بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان نامه‌ی دکتری رشته‌ی میکروبیولوژی

بررسی تنوع باکتریوفاژهای کدکننده انتروتوکسین‌ها در میان جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین

استادان راهنما:

دکتر مجید بوذری

دکتر محمد رضا پورشفیع

دکتر محمد کتولی

پژوهشگر:

فاتح رحیمی

تیر ماه ۱۳۹۱

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،

ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع

این پایان نامه متعلق به دانشگاه اصفهان است.

دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی

پایان نامه‌ی دکتری رشته‌ی میکروبیولوژی آقای فاتح رحیمی تحت عنوان

بررسی تنوع باکتریوفاژهای کدکننده انتروتوکسین‌ها در میان جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین

در تاریخ ۹۱/۴/۱۴ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه.....به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان نامه دکتر مجید بوذری با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

۲- استاد راهنمای پایان نامه دکتر محمد رضا پورشفیع با مرتبه ی علمی استاد امضا

۳- استاد راهنمای پایان نامه دکتر محمد کتولی با مرتبه ی علمی استاد امضا

۴- استاد داور داخل گروه دکتر گیتی امتیازی با مرتبه ی علمی استاد امضا

۵- استاد داور داخل گروه دکتر رسول روغنیان با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۶- استاد داور خارج از گروه دکتر سید اصغر هوایی با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

امضای مدیر گروه

سپاس و ستایش خدای را رواست که در اولیت، بی آغاز و در آخریت، بی انجام است . سر بر آستان ربوبی حضرت حق می سایم و خدا را سپاس می گویم که بی لطف و عنایت او انجام این مطالعه میسر نبود.

با سپاس فراوان از:

جناب آقای دکتر مجید بوذری که در سایه زحمات بی دریغ و راهنمایی های ارزنده ایشان این پایان نامه به ثمر نشست.

جناب آقای دکتر محمد رضا پورشفیع که در سایه عنایت، راهنمایی ها و الطاف بی حد و پدرانه ایشان مجال انجام این پایان نامه برایم محقق گشت.

جناب آقای دکتر محمد کتولی که با راهنمایی های ارزنده خود همواره گره گشای بسیاری از مشکلات موجود در این پایان نامه بودند.

استادان ارجمند سرکار خانم دکتر گیتی امتیازی، جناب آقای دکتر رسول روغنیان و جناب آقای دکتر سید اصغر هوایی که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند.

جناب آقای دکتر سعید افشارزاده مدیر محترم گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان جهت همکاری های بی دریغشان.

جناب آقای دکتر سید مجید قادریان مدیریت سابق گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان که همواره با راهنمایی‌های خود بنده را مورد لطف و محبت خود قرار دادند.

تمامی اساتید بخش میکروبیولوژی گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان که افتخار شاگردی ایشان را داشته - ام.

کارکنان گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان به ویژه جناب آقای انتشاری و سرکار خانم باقری جهت همکاری‌های بی دریغشان.

تشکر ویژه از کارکنان بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران به ویژه سرکار خانم لطفی و سرکار خانم صداقت جهت محبت‌های بی حدشان.

تقدیم با بوسه بر دستان:

عزیزانم که با تمام وجود و قلبم دوستشان دارم

به **پدر بزرگوارم** که با غیرت خود به من آموخت که چگونه در عرصه زندگی ایستادگی را تجربه نمایم. او که عمری خستگی‌ها را به جان خرید تا طعم خوش پیروزی و موفقیت را به من بچشاند. او که در طول تحصیل متحمل زحماتم بود و همواره تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات بوده است.

به **مادر فداکارم**، اولین معلم زندگیم، که از اول آفرینش، هیچ واژه ای نتوانسته مهر او را معنی کند. بودنش تاج افتخاری است بر سرم و سایه مهربانیش سایه سار زندگیم. او که همواره نازم را کشید و لبریزم کرد از شوق و اکنون حاصل دستان خسته‌اش رمز موفقیتم شد.

به **خواهر عزیز و نازنینم** که وجودش شادی بخش و مایه آرامشم است. او که بهترین دوست و همراهم در زندگی بوده است.

به **نامزد عزیز و مهربانم** که همواره با محبت‌های خود باعث دلگرمی و آرامشم بوده است.

به استاد دانشمند و فرزانه‌ام **جناب آقای دکتر محمد رضا پورشفیع**، که تمامی داشته‌های علمی خود را مدیون حضور ایشان در زندگی خود می‌دانم. بر خود می‌بالم که افتخار شاگردیشان را داشته‌ام.

«خداوندا سایه پر مهر پدر و مادر را همواره بر سرمان نگاه دار و به تمامی عزیزانم طول عمر با عزت عنایت فرما. جمعمان را تا همیشه با خورشید وجود خوبانمان روشن کن و چشم ناپاکان و حسودان را از وجودشان دور فرما. خداوندا چگونه پاس گویم این همه نعمت را که به من ارزانی داشته ای! خدای خوبم برای وجود خوبانم از تو سپاس گزارم.»

چکیده

استافیلوکوکوس اورئوس باکتری بیماری زای انسانی و دامی است که به عنوان بیماری زای بیمارستانی و همچنین اکتسابی از جامعه شناخته می شود که واجد طیف وسیعی از باکتری‌خوارها و همچنین عوامل حدت می‌باشد. تمامی جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از روی حساسیت به ۲۷ باکتری‌خوار لیزوژنیک در ۶ گروه طبقه‌بندی می‌شوند. تغییر لیزوژنیک مرتبط با عوامل حدت مانند انتروتوکسین های مختلف، استافیلوکیناز، همولایزین β، لیپاز، اکسفولیاتیو توکسین A، سم سندرم شوک سمی و لکوسیدین پنتون ولنتاین ناشی از وجود پروفاژهای مختلف در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. مقاومت به متی سیلین در جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* ناشی از حضور ژن *mecA* است. ژن *mecA*، ژن‌های تنظیم کننده و همچنین ژن های رمزکننده مقاومت به چند عامل ضد باکتریایی و لوکوس ژنی *ccr* بر روی کاست ژنی SCC*mec* قرار گرفته‌اند. این مطالعه با هدف تجزیه و تحلیل ژنتیکی پروفاژ تایپ‌های مختلف، بررسی انتشار کلونال، تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و تایپینگ کاست ژنی *mecA* و لوکوکوس ژنی *ccr* و همچنین بررسی عوامل حدت و میزان بیان آن ها در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی - سیلین جداسازی شده از نمونه‌های بالینی، دامی و محیطی در شهر تهران در طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۸۷ به انجام رسید.

در این مطالعه در مجموع ۳۱۹ جدایه بالینی، ماکیان و محیطی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین جداسازی شده از چهار بیمارستان، دو دامداری و یک تصفیه خانه فاضلاب در شهر تهران مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند . تمامی جدایه‌ها با استفاده از پرایمر اختصاصی تا حد گونه شناسایی شدند و به روش‌های Phene-Plate و الکتروفورز ژل در میدان ضربانی دسته بندی گردیدند. حساسیت جدایه‌ها نسبت به ۱۷ آنتی‌بیوتیک به روش دیسک دیفیوژن و همچنین حداقل غلظت مهار کننده آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین و ونکومایسین به روش Etest با استفاده از توصیه های Clinical Laboratory and Standard Institute (CLSI) تعیین گردید. حضور ژن *mecA* در میان جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین با استفاده از آزمون PCR مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین وجود پروفاژهای مختلف در جدایه‌های مقاوم به متی سلین آزمون Multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ۶ دسته پروفاژی مورد استفاده قرار گرفت . جهت اثبات لیزوژن بودن پروفاژها در جدایه های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین از آزمون‌های سنجش پلاک و نقطه استفاده گردید. وجود پروفاژ تایپ‌ها و باکتری‌خوارهای مختلف به ترتیب در میان نواحی غیر آلوده و پلاک ها با استفاده از آزمون Multiplex-PCR مشخص گردید. عوامل حدت شامل ۱۶ ژن انتروتوکسین (*sea-seq*) و ژن‌های *hlb*، *pvl*، *sak*، *tst*، *eta* و *etb* به‌روش PCR مورد شناسایی قرار گرفتند. تایپ کاست ژنی *mecA* و لوکوس ژنی *ccr* در این جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن‌های پروفاژی و انتروتوکسین ها در میان جدایه ها با استفاده از آزمون Real-Time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

با استفاده از آزمون PCR تمامی ۳۱۹ جدایه جمع آوری شده به عنوان جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین مورد تأیید قرار گرفتند. بیشترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰ درصد)،

سیپروفلوکساسین (۹۶ درصد)، اریترومایسین (۹۳ درصد)، توبرامایسین (۹۳ درصد)، کانامایسین (۹۲ درصد)، کلیندامایسین (۸۷ درصد)، تتراسایکلین (۸۷ درصد) و آمیکاسین (۸۷ درصد) مشاهده گردید. هیچکدام از ۳۱۹ جدایه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، لینزولید و سینرسید مقاومت نشان ندادند. سه درصد جدایه‌ها تنها نسبت به پنی-سیلین مقاوم بودند و ۳۴ درصد جدایه ها نیز نسبت به ۱۱ آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند . همچنین ۳ و ۸۸ درصد جدایه‌ها به‌ترتیب از مقاومت پایین (MIC≥4 µg/ml) و بسیار بالا (MIC≥256 µg/ml) نسبت به اگزاسیلین برخوردار بودند. پنج پروفاژ تایپ مختلف در میان جدایه ها شناسایی گردید و تمامی جدایه‌ها واجد حداقل ۱ پروفاژ تایپ بودند. ۸۳٪ جدایه‌ها واجد ۴ پروفاژ تایپ و ۱۲ درصد نیز واجد ۳ پروفاژ تایپ بودند. پس از القاء پروفاژ در میان جدایه ها، پلاک‌های با مرکز کدر ظاهر شدند که نشان دهنده لیزوژن بودن این پروفاژها بود . در نواحی غیر آلوده باکتریایی، باندهای مربوط به پروفاژ تایپ های مختلف و همچنین باند مربوط به ژن *nuc* مشاهده گردید اما در پلاک ها تنها باندهای متعلق به باکتری خوارها مشاهده گردید . صد درصد جدایه ها واجد ژن های *sea*، *sek*، *seq* و *hlb* بودند. همچنین ۸۳،۹۳، ۳۲، ۱۹، ۱۴، ۷، ۴، ۴، ۳، ۱/۳، ۱ و ۰/۳ درصد جدایه‌ها نیز به‌ترتیب واجد ژن‌های *sak*، *eta*، *sel*، *seg*، *sem*، *sei*، *sen*، *pvl*، *seo*، *tst*، *sec* و *sep* بودند. در مجموع ۲۰ پالسوتایپ در میان جدایه‌ها شناسایی گردیدند که شامل هشت تیپ منفرد (ST) و دوازده تیپ مشترک (CT) بودند و چهار CT به‌طور غالب در هر ۳ منبع در حال گردش بودند. نود و شش، ۳ و ۱ درصد جدایه‌ها به‌ترتیب واجد SCC*mec* تایپ III، IVa و IVc بودند. همچنین ۹۶ و ۴ درصد جدایه‌ها واجد *ccr* تایپ‌های ۳ و ۲ بودند. تمامی جدایه‌ها ژن‌های انتروتوکسینی و پروفاژها را بیان نمودند و میزان بیان در میان آن‌ها متفاوت بود.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد علیرغم اینکه باکتری خوارها از تنوع بالایی در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین برخوردار بودند اما این تنوع در جدایه‌های بالینی بسیار بیشتر از جدایه‌های دامی و محیطی بود. پروفاژ تایپ SGF شایعترین تایپ بود و در تمامی جدایه‌ها مشاهده گردید که نشان‌دهنده قابلیت تولید طیف وسیعی از عوامل حدت توسط تمامی جدایه‌ها است. وجود پروفاژهایی از دسته های مختلف، طیف وسیعی از عوامل حدت و همچنین مقاومت بالای جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین می تواند نشان دهنده اهمیت نقش باکتری‌خوارها در گسترش و تکامل عوامل حدت و همچنین ناهمگونی کلاستر مقاومت به متی سیلین در جدایه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* باشد. وجود این جدایه‌های بسیار بیماری‌زا واجد مقاومت چندگانه نسبت به بسیاری از داروهای معمول خطوط اول و دوم درمانی می‌تواند یک تهدید بالقوه برای سلامت عمومی و بهداشت جامعه باشد.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین، پروفاژ، SGF، PFGE، Phene-Plate، عوامل حدت، SCC*mec*

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱- استافیلوکوکوس ها ۱

۱-۲- فیزیولوژی و ویژگی‌های کشت ۲

۱-۳- ساختمان سلول ۴

۱-۳-۱- کپسول ۴

۱-۳-۲- پپتیدوگلیکان ۴

۱-۳-۳- اسید تیکوئیک ۵

۱-۳-۴- پروتئین A ۵

۱-۳-۵- پلی‌ساکاریدها ۵

۱-۳-۶- گیرنده‌های پروتئینی ۶

۱-۴- آنزیم‌های خارج سلولی ۶

۱-۴-۱- کاتالاز ۶

۱-۴-۲- کواگولاز ۶

۱-۴-۳- لیپاز ۷

۱-۴-۴- هیالورونیداز ۷

۱-۴-۵- استافیلوکیناز ۸

۱-۴-۶- نوکلئاز ۸

۱-۴-۷- پنی‌سیلیناز ۸

۱-۵- عناصر ژنتیکی متحرک در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۹

۱-۶- باکتری‌خوارها و حدت ۱۰

عنوان **صفحه**

۱-۷- شناسایی انواع باکتری‌خوارها و چگونگی انتقال آنها در استافیلوکوکوس اورئوس ۱۳

۱-۸- جزایر کروموزومی وابسته به باکتری‌خوارها در باکتریهای گرم مثبت ۱۷

۱-۹- جزایر بیماریزائی استافیلوکوکوسی و پروفاژها ۲۰

۱-۱۰- کاست کروموزومی mec (SCCmec)، طبقه بندی و روش‌های دسته‌بندی ۲۵

۱-۱۰-۱- ترکیب SCCmec ۲۸

۱-۱۰-۲- مجموعه ژن ccr ۲۹

۱-۱۰-۳- مجموعه ژنی mec ۲۹

۱-۱۰-۴- نواحی اتصالی (J) ۳۰

۱-۱۰-۵- SCC غیر mec ۳۱

۱-۱۱- دسته بندی مولکولی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ۳۲

۱-۱۱-۱- الکتروفورز ژل در میدان ضربانی ۳۳

۱-۱۲- انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی ۳۳

۱-۱۲-۱- ساختار انتروتوکسین ۳۶

۱-۱۲-۲- خصوصیت انتروتوکسین‌ها ۳۶

۱-۱۲-۳- ارتباط فیلوژنتیکی در میان انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی ۳۷

۱-۱۲-۴- انتروتوکسین A استافیلوکوکوسی ۳۸

۱-۱۲-۵- انتروتوکسین B استافیلوکوکوسی ۳۹

۱-۱۲-۶- انتروتوکسین C استافیلوکوکوسی ۴۰

۱-۱۲-۷- انتروتوکسین D استافیلوکوکوسی ۴۱

۱-۱۲-۸- انتروتوکسین E استافیلوکوکوسی ۴۲

۱-۱۲-۹- انتروتوکسین G استافیلوکوکوسی ۴۲

۱-۱۲-۱۰- انتروتوکسین H استافیلوکوکوسی ۴۲

عنوان **صفحه**

۱-۱۲-۱۱- انتروتوکسین I استافیلوکوکوسی .....۴۳.....

۱-۱۲-۱۲- انتروتوکسین J استافیلوکوکوسی .....۴۳.....

۱-۱۲-۱۳- انتروتوکسین K استافیلوکوکوسی .....۴۴.....

۱-۱۲-۱۴- انتروتوکسین L استافیلوکوکوسی .....۴۴.....

۱-۱۲-۱۵- سایر سم‌های استافیلوکوکوس اورئوس .....۴۴.....

۱-۱۲-۱۵-۱-سم آلفا .....۴۴.....

۱-۱۲-۱۵-۲-سم بتا .....۴۵.....

۱-۱۲-۱۵-۳- سم دلتا .....۴۵.....

۱-۱۲-۱۵-۴- سم گاما .....۴۵.....

۱-۱۲-۱۵-۵- سم لوکوسیدین پنتون ولنتاین .....۴۶.....

۱-۱۲-۱۵-۶- سم اکسفولیاتیو .....۴۶.....

۱-۱۲-۱۵-۷- سرم شوک سمی .....۴۶.....

۱-۱۳- اهدافی که در این تحقیق دنبال می‌شوند عبارتند از: .....۴۸.....

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌گیری .....۴۹.....

۲-۱-۱- نمونه‌های بالینی .....۴۹.....

۲-۱-۲- نمونه‌های فاضلاب .....۵۰.....

۲-۱-۳- نمونه‌های ماکیان .....۵۰.....

۲-۲- جداسازی و شناسایی جدایه‌ها .....۵۱.....

۲-۲-۱- جداسازی جدایه‌های بالینی .....۵۱.....

۲-۲-۲- جداسازی جدایه‌های فاضلاب .....۵۱.....

۲-۲-۳- جداسازی جدایه‌های ماکیان .....۵۲.....

عنوان **صفحه**

۲-۳- تعیین جنس استافیلوکوکوس در جدایه‌های بالینی، فاضلاب و ماکیان ۵۳

۲-۳-۱- آزمون کاتالاز ۵۳

۲-۳-۲- آزمون مقاومت به باسیتراسین ۵۳

۲-۴- افتراق استافیلوکوکوس اورئوس از استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی ۵۴

۲-۴-۱- آزمون بررسی وجود آنزیم کواگولاز ۵۴

۲-۴-۲- آزمون بررسی وجود آنزیم DNase ۵۴

۲-۵- شناسایی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین ۵۵

۲-۶- آزمون تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۵۵

۲-۷- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین و ونکومایسین ۵۶

۲-۸- آزمون Biochemical Fingerprinting (PhPlate) ۵۸

۲-۹- استخراج DNA ۶۰

۲-۱۰- آزمون PCR ۶۱

۲-۱۰-۱- آزمون PCR جهت شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس ۶۲

۲-۱۰-۲- آزمون PCR جهت شناسایی ژن mecA ۶۴

۲-۱۰-۳- آزمون PCR جهت شناسایی پروفاژهای SGA، SGB، SGF، SGFa، SGFb ۶۵

۲-۱۰-۴- آزمون Multiplex-PCR جهت شناسایی پروفاژهای SGA، SGB، SGF، SGFa، ۶۶

۲-۱۰-۵- آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های انتروتوکسین‌های A، B، C، D، E، G، H، I، J و L ۶۸

۲-۱۰-۶- آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های انتروتوکسین‌های K، M، N، O، P و Q ۶۹

۲-۱۰-۷- آزمون PCR جهت شناسایی ژن tst ۷۱

۲-۱۰-۹- آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های sak و hlb ۷۲

۲-۱۰-۱۰- آزمون PCR جهت شناسایی ژن pvl ۷۳

۲-۱۰-۱۱- آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های eta و etb ۷۵

عنوان **صفحه**

۲-۱۰-۱۲- آزمون Multiplex-PCR جهت SCCmec تایپینگ .....۷۶.....

۲-۱۰-۱۳- آزمون PCR جهت ccr (cassette chromosome recombinase) typing ۷۸

۲-۱۱- آزمون‌های نقطه و پلاک و القاء پروفاژ .....۸۲.....

۲-۱۲- خالص سازی باکتری‌خوارها از پلاک .....۸۴.....

۲-۱۳- شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری‌خوارهای آن در پلاک و نواحی پیرامون آن ۸۴

۲-۱۴- الکتروفورز ژل در میدان ضربانی .....۸۵.....

۲-۱۴-۱- تهیه سوسپانسیون باکتری .....۸۵.....

۲-۱۴-۲- تهیه پلاک .....۸۶.....

۲-۱۴-۳- هضم آنزیمی .....۸۷.....

۲-۱۴-۴- تهیه شاخص .....۸۸.....

۲-۱۴-۴-۱- تهیه سوسپانسیون باکتری سالمونلا کلراسوئیس .....۸۸.....

۲-۱۴-۴-۲- تهیه پلاک .....۸۹.....

۲-۱۴-۴-۳- هضم آنزیمی .....۸۹.....

۲-۱۴-۵- الکتروفورز .....۹۰.....

۲-۱۴-۶- رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید .....۹۱.....

۲-۱۴-۷- بررسی و تجزیه و تحلیل الگوهای الکتروفورز ژل در میدان ضربانی .....۹۱...

۲-۱۵- استخراج RNA .....۹۲.....

۲-۱۶- خالص نمودن RNA استخراج شده .....۹۳.....

۲-۱۷- سنتز cDNA .....۹۵.....

۲-۱۸- آزمون Quantitative Real-Time PCR .....۹۶.....

۲-۱۸-۱- آزمون Real-Time PCR جهت سنجش بیان ژن nuc .....۹۷.....

۲-۱۸-۲- آزمون Real-Time PCR جهت سنجش بیان ژن‌های باکتری‌خوار ۹۸

عنوان **صفحه**

۲-۱۸-۳- آزمون Real-Time PCR جهت سنجش بیان ژن انتروتوکسین‌های sea، sec، seg، sei ۹۹

۲-۱۸-۴- آزمون Real-Time PCR جهت سنجش بیان ژن انتروتوکسین‌های sek، ۱۰۰

۲-۱۹- بررسی اثر نیتریک اکساید بر روی بیان ژن‌های باکتری‌خواری و انتروتوکسین‌ها ۱۰۱

۲-۲۰- تجزیه و تحلیل داده‌ها ۱۰۲

فصل سوم: نتایج

۳-۱- نتایج آزمون کشت و تعیین هویت جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۰۳

۳-۱-۱- جدایه‌های بالینی ۱۰۳

۳-۱-۲- نمونه‌های ماکیان ۱۰۷

۳-۱-۳- نمونه‌های فاضلاب ۱۰۷

۳-۲- نتایج آزمون تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۰۸

۳-۲-۱- جدایه‌های بالینی ۱۰۸

۳-۲-۲- جدایه‌های ماکیان ۱۱۲

۳-۲-۳- جدایه‌های فاضلاب ۱۱۳

۳-۳- نتایج آزمون حداقل غلظت مهارکننده ۱۱۴

۳-۳-۱- نمونه‌های بالینی ۱۱۴

۳-۳-۲- نمونه‌های ماکیان ۱۱۵

۳-۳-۳- نمونه‌های فاضلاب ۱۱۶

۳-۳-۴- حداقل غلظت مهارکننده جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ۱۱۷

۳-۴- مقاومت چندگانه در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ۱۱۸

۳-۴-۱- جدایه‌های بالینی ۱۱۹

۳-۴-۲- جدایه‌های ماکیان ۱۱۹

۳-۴-۳- جدایه‌های فاضلاب ۱۲۱

عنوان **صفحه**

۳-۵- نتایج استخراج DNA جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ۱۲۲
۳-۶- نتایج آزمون PCR جهت شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس ۱۲۳
۳-۷- نتایج آزمون PCR جهت شناسایی ژن mecA ۱۲۴
۳-۸- نتایج آزمون PCR جهت شناسایی پروفاژها ۱۲۴
۳-۹- نتایج آزمونMultiplex-PCR جهت شناسایی پروفاژهای مختلف ۱۲۷
۳-۱۰- نتایج آزمون‌های سنجش پلاک و نقطه ۱۲۹
۳-۱۱- نتایج آزمون PCR جهت شناسایی ژن انتروتوکسین‌های استافیلوکوکوسی ۱۳۱
۳-۱۲- نتایج آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های hlb و sak ۱۳۹
۳-۱۳- نتایج آزمون PCR جهت شناسایی ژن tst ۱۴۲
۳-۱۴- نتایج آزمون PCR جهت شناسایی ژن pvl ۱۴۳
۳-۱۵- نتایج آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های eta و etb ۱۴۴
۳-۱۶- نتایج آزمون PCR و Multiplex-PCR جهت SCCmec تایپینگ و ccr تایپینگ ۱۴۴
۳-۱۷- نتایج گروه‌بندی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین بالینی به روش ۱۴۷
۳-۱۷-۱- گروه‌بندی PhPlate جدایه‌های بالینی ۱۴۷
۳-۱۷-۲- گروه‌بندی PhPlate جدایه‌های ماکیان ۱۴۸
۳-۱۷-۳- گروه‌بندی PhPlate جدایه‌های فاضلاب ۱۴۸
۳-۱۸- الکتروفورز ژل در میدان ضربانی ۱۴۹
۳-۱۹- بررسی نتایج ۱۴۹
۳-۲۰- نتایج آزمون Real-Time PCR کمی ۱۵۶
۳-۲۱- بررسی اثر نیتریک اکساید بر روی بیان ژن‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۷۲
۳-۲۲- نتیجه تعیین توالی ژن‌های مختلف ۱۷۴

فصل چهارم: بحث

عنوان **صفحه**

بحث ۱۸۵

نتیجه گیری ۲۲۳

پیشنهادات ۲۲۴

پیوست‌ها ۲۲۵

منابع و مآخذ ۲۲۸

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- تصویر مدور کروموزوم MW2..... ۱۱
شکل ۱-۲- استافیلوکوکوس اورئوس جدایه N315 و عوامل حدت رمزشده به‌وسیله..... ۱۸
شکل ۱-۳- ساختمان چند شکلی باکتری‌خوارها و جزیره بیماری‌زائی استافیلوکوکوسی..... ۲۷
شکل ۱-۴- مقایسه انواع مختلف SCCmec. ۳۴
شکل ۳-۱- فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب نوع بیمارستان..... ۱۰۴
شکل ۳-۲- فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب نوع نمونه..... ۱۰۴
شکل ۳-۳- فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در بخش‌های مختلف بیمارستان..... ۱۰۵
شکل ۳-۴- فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در میان مردان و زنان..... ۱۰۶
شکل ۳-۵- فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس در میان بیماران بستری و بیماران سرپایی..... ۱۰۶
شکل ۳-۶- فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده از مرغداری‌های مختلف..... ۱۰۷
شکل ۳-۷- فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده در طی ۳ مرتبه..... ۱۰۸
شکل ۳-۸- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس جداسازی شده..... ۱۰۹
شکل ۳-۹- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس..... ۱۱۰
شکل ۳-۱۰- فراوانی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین در میان بیماران..... ۱۱۲
شکل ۳-۱۱- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم..... ۱۱۳
شکل ۳-۱۲- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم..... ۱۱۴
شکل ۳-۱۳- حداقل غلظت مهارکننده آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین بر روی جدایه‌های بالینی..... ۱۱۵
شکل ۳-۱۴- حداقل غلظت مهارکننده آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین بر روی جدایه‌های..... ۱۱۶
شکل ۳-۱۵- حداقل غلظت مهارکننده آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین بر روی جدایه‌های..... ۱۱۷
شکل ۳-۱۶- حداقل غلظت مهارکننده آنتی‌بیوتیک اگزاسیلین بر روی تمامی ۳۱۹ جدایه..... ۱۱۸
شکل ۳-۱۷- درصد مقاومت جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین نسبت..... ۱۲۲

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱۸- DNA استخراج شده از ۸ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ۱۲۳
شکل ۳-۱۹- آزمون PCR جهت شناسایی ژن nuc جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۲۳
شکل ۳-۲۰- آزمون PCR جهت شناسایی ژن mecA در میان جدایه‌های ۱۲۴
شکل ۳-۲۱- آزمون PCR جهت شناسایی پروفاژ SGA در میان جدایه‌های ۱۲۵
شکل ۳-۲۲- آزمون PCR جهت شناسایی پروفاژ SGB در میان جدایه‌های ۱۲۵
شکل ۳-۲۳- آزمون PCR جهت شناسایی پروفاژ SGF در میان جدایه‌های ۱۲۶
شکل ۳-۲۴- آزمون PCR جهت شناسایی پروفاژ SGFa در میان جدایه‌های ۱۲۶
شکل ۳-۲۵- آزمون PCR جهت شناسایی پروفاژ SGFb در میان جدایه‌های ۱۲۷
شکل ۳-۲۶- آزمون Multiplex-PCR جهت شناسایی پروفاژهای مختلف در میان جدایه‌های ۱۲۸
شکل ۳-۲۷- تشکیل پلاک در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ۱۳۰
شکل ۳-۲۸- آزمون PCR جهت شناسایی ژن sea در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۳۲
شکل ۳-۲۹- آزمون PCR جهت شناسایی ژن sec در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۳۲
شکل ۳-۳۰- آزمون PCR جهت شناسایی ژن seg در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ...۱۳۳
شکل ۳-۳۱- آزمون PCR جهت شناسایی ژن sei در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۳۳
شکل ۳-۳۲- آزمون PCR جهت شناسایی ژن sek در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ...۱۳۴
شکل ۳-۳۳- آزمون PCR جهت شناسایی ژن sel در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۳۴
شکل ۳-۳۴- آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های sea، sec، seg، sei و sel در میان ۱۳۵
شکل ۳-۳۵- آزمون PCR جهت شناسایی ژن sem در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ..۱۳۵
شکل ۳-۳۶- آزمون PCR جهت شناسایی ژن sen در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ...۱۳۶
شکل ۳-۳۷- آزمون PCR جهت شناسایی ژن seo در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ...۱۳۶
شکل ۳-۳۸- آزمون PCR جهت شناسایی ژن sep در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ...۱۳۷
شکل ۳-۳۹- آزمون PCR جهت شناسایی ژن seq در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ...۱۳۷

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۴۰- آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های sek، sem، sen، seo، sep و seq در ۱۳۸
شکل ۳-۴۱- آزمون PCR جهت شناسایی ژن hlb در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۴۰
شکل ۳-۴۲- آزمون PCR جهت شناسایی ژن sak در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ...۱۴۱
شکل ۳-۴۳- آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های sak و hlb در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس ۱۴۱
شکل ۳-۴۴- آزمون PCR جهت شناسایی ژن‌های sea، sec، seg، sei، sel، sek، sem، ۱۴۲
شکل ۳-۴۵- آزمون PCR جهت شناسایی ژن tst در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۴۳
شکل ۳-۴۶- آزمون PCR جهت شناسایی ژن pvl در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۴۴
شکل ۳-۴۷- آزمون PCR جهت شناسایی ژن eta در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۴۵
شکل ۳-۴۸- SCCmec نوع ۳ و ccr دسته III در میان جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۴۶
شکل ۳-۴۹- SCCmec تایپینگ و ccr تایپینگ جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۴۶
شکل ۳-۵۰- دندروگرام حاصل از روش PhPlate برای جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۵۰
شکل ۳-۵۱- دندروگرام حاصل از روش PhPlate برای جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۵۱
شکل ۳-۵۲- دندروگرام حاصل از روش PhPlate برای جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۵۲
شکل ۳-۵۳- دندروگرام حاصل از روش PhPlate برای جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۵۳
شکل ۳-۵۴- تصاویر الکتروفورز ژل در میدان ضربانی ۶۴ جدایه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ..۱۵۴
شکل ۳-۵۵- دندروگرام تشابه ژنتیکی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین ۱۵۵
شکل ۳-۵۶- اطلاعات کمی و چرخه آستانه ژن nuc .....۱۵۶.....
شکل ۳-۵۷- اطلاعات کمی و چرخه آستانه ژن مربوط به باکتری‌خوار SGA ۱۵۸
شکل ۳-۵۸- بیان کمی ژن باکتری‌خوار SGA در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم ۱۵۸
شکل ۳-۵۹- اطلاعات کمی و چرخه آستانه ژن مربوط به باکتری‌خوار SGB ۱۵۹
شکل ۳-۶۰- بیان کمی ژن باکتری‌خوار SGB در جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم ۱۵۹
شکل ۳-۶۱- اطلاعات کمی و چرخه آستانه ژن مربوط به باکتری‌خوار SGF ۱۶۰