وزارت بهداشت، آموزش و درمان پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اراک

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان:

تولید پروتئین نوترکیب لایزوستافین و بررسی فعالیت ضد استافیلوکوکی آن بر علیه استافیلوکوک اورئوس تحت شرایط In vitro وIn vivo

استاد راهنما:

دکتر حمید ابطحی

Ph.D میکروب شناسی پزشکی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اراک

اساتید مشاور:

دکتر احسان الله غزنوی راد

Ph.D میکروب شناسی پزشکی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اراک

دکتر صفیّه صوفیان

Ph.D بیوفیزیک، استادیار دانشگاه پیام نور اراک

پژوهش و نگارش:

لیلا فرهنگ نیا

چکیده

زمینه و هدف: استافیلوکوک اورئوس عامل طیف وسیعی از عفونت ها، از عفونت های پوستی تا انتشار آن ها و عفونت های سیستمیک منجر شونده به نارسایی ارگانی و مرگ می باشد. مقاومت دارویی در این گروه از پاتوژن ها یک نگرانی جهانی است و نیازمند توسعه ی عوامل درمانی جدید می باشد. لایزوستافین یک نمونه از این عوامل است. لایزوستافین یک باکتریوسین تولید شده بوسیله ی استافیلوکوک سیمولانس می باشد که باعث کشتن سلول های استافیلوکوک اورئوس از طریق تخریب دیواره سلولی استافیلوکوک می شود. هدف از این مطالعه بیان بالا و بررسی فعالیت ضد استافیلوکوکی پروتئین نوترکیب لایزوستافین بر علیه استافیلوکوک اورئوس تحت شرایط In vitro و In vivo می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، قطعه حاوی ناحیه پپتید بالغ ژن لایزوستافین به طول ۷۳۸ جفت باز پس از تکثیر با استفاده از روش PCR در ناقل پلاسمیدی pET32a کلون و بیان شد. پس از خالص سازی بر اساس کروماتوگرافی تمایلی، پروتئین نوترکیب لایزوستافین با روش وسترن بلات با استفاده از سرم موش های تلقیح شده با پروتئین تجاری لایزوستافین بررسی شد. سپس فعالیت ضد استافیلوکوکی لایزوستافین نوترکیب تولید شده در آزمایشگاه در شرایط in vitro و in vivo ارزیابی گردید.

یافته ها: نتایج PCR و تعیین توالی نشان داد که ژن هدف به درستی در ناقل پلاسمیدی کلون شده است. بیان پروتئین با استفاده از IPTG القا شد. پروتئین بیان شده بر اساس کروماتوگرافی تمایلی به وسیله کیت Ni-NTA تخلیص و با آنتی بادی های استفاده شده در وسترن بلات واکنش داد. پروتئین نوترکیب با وزن مولکولی ۴۲ کیلو دالتون به دست آمد. نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد استافیلوکوکی نشان داد که لایزوستافین نوترکیب قادر به لیز سلولی و کشتن سلول های استافیلوکوک اورئوس در بینی حیوان می باشد.

نتیجه گیری: پروتئین نوترکیب لایزوستافین قادر به لیز سلول های استافیلوکوک اورئوس می باشد، از این رو این پتانسیل را دارد که در پیشگیری و درمان عفونت های استافیلوکوکی به کار گرفته شود. بنابراین با تولید پروتئین خالص و فعال لایزوستافین در آزمایشگاه می توان آن را به عنوان یک داروی موثر برای استافیلوکوک اورئوس مطرح کرد.

واژگان کلیدی: استافیلوکوک اورئوس، لایزوستافین، پروتئین نوترکیب

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱-۱- استافیلوکوک ها..... ۱۴

۱-۲- استافیلوکوک اورئوس..... ۱۴

۱-۲- ۱- فیزیولوژی و ساختار استافیلوکوک اورئوس..... ۱۵

۱-۲-۱-۱- ژنوم..... ۱۵

۱-۲-۱-۲- دیواره سلولی..... ۱۶

۱-۲-۱-۳-کپسول..... ۱۶

۱-۲-۱-۴- پروتئین های سطحی..... ۱۷

۱-۲-۱-۵- توکسین ها..... ۱۷

۱-۲-۱-۶- آنزیم ها..... ۱۸

۱-۲-۲- پاتوژنز..... ۱۸

۱-۲-۳- بیماری های ایجاد شده بوسیله ی استافیلوکوک اورئوس..... ۱۹

۱-۲-۴- مکانیسم های مقاومت استافیلوکوک اورئوس به عوامل آنتی باکتریال..... ۲۰

۱-۳- ویژگی های عمومی لایزوستافین..... ۲۲

۱- ۴- سازماندهی مولکولی لایزوستافین..... ۲۳

۱- ۵- فعالیت ضد استافیلوکوکی لایزوستافین..... ۲۴

۱-۶- ژن مقاومت به اندوپپتیداز یا فاکتور ایمنی لایزوستافین..... ۲۷

۱-۷- مکانیسم های مقاومت به لایزوستافین در استافیلوکوک اورئوس..... ۲۸

۷-۱-۱- مقاومت به لایزوستافین بواسطه موتاسیون در ژن fem A و حساسیت به آنتی بیوتیک های بتا لاکتام..... ۲۹

۱ -۸- بیان مسئله و اهمیت پژوهش..... ۳۰

۱-۹- اهداف پژوهش..... ۳۳

۱-۹-۱- هدف اصلی..... ۳۳

۱-۹-۲- اهدف ویژه..... ۳۳

۱-۹-۳- هدف کاربردی..... ۳۳

فصل دوم: بررسی متون

بررسی متون..... ۳۵

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱- مواد شیمیایی و آنزیم ها..... ۴۱

۳-۲- پلاسمید و سویه های باکتری و شرایط کشت..... ۴۱

۳-۳- جداسازی پلاسمید استافیلوکوک سیمولانس..... ۴۵

۳-۴- بررسی کمی وکیفی DNA پلاسمیدی..... ۴۷

۳-۵-طراحی پرایمر..... ۵۰

۳-۶-تکثیر ناحیه پپتید بالغ ژن لایزوستافین..... ۵۱

۳-۷- جدا کردن محصولPCR از روی ژل آگارز (elution)..... ۵۵

۳- ۸- تخلیص پلاسمید(+) pET-32a ۵۶

۳-۹- هضم آنزیمی پلاسمید (+)pET-32a و قطعه ژنی ژن لایزوستافین..... ۵۷

۳-۱۰- اتصال (Ligation) ناحیه پپتید بالغ ژن لایزوستافین با پلاسمید pET-32a ۵۸

۳-۱۱- تهیه سلولهای مستعد (Competent Cell)..... ۶۰

۳-۱۲- انتقال DNA نوترکیب(Transformation)به میزبان*E. coli DH5α* ۶۳

۳-۱۳- غربالگری ۶۴
۳-۱۳-۱- PCR ۶۴
۳-۱۳-۲- هضم آنزیمی ۶۵
۳-۱۳-۳- تعیین ترادف نوکلئوتیدی قطعه ژنی ۶۶
۳-۱۴- انتقال پلاسمید نوترکیب pET-32a-lys به میزبان *E. coli BL21 (DE3) pLysS* ۶۶
۳- ۱۵- القا ۶۷
۳-۱۶- آنالیز محصول قبل و بعد از القا باSDS-PAGE ۷۰
۳ -۱۶-۱- روش تهیه SDS-PAGE ۷۶
۳-۱۶-۲- رنگ آمیزی SDS-PAGE ۷۹
۳-۱۷- تخلیص پروتئین نوترکیب ۸۱
۳-۱۸- دیالیز پروتئین ۸۵
۳-۱۹- سنجش پروتئین ۸۷
۳-۲۰- تزریق پروتئین تجاری لایزوستافین به رت ۸۷
۳-۲۱- وسترن بلاتینگ ۸۸
۳-۲۲- کدورت سنجی ۹۳
۳-۲۳- تلقیح سلول های استافیلوکوک اورئوس در بینی رت ۹۴
۳-۲۴- درمان حیوانات با پروتئین نوترکیب لایزوستافین ۹۵

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- جداسازی پلاسمید استافیلوکوک سیمولانس ۹۷
۴-۲- طراحی پرایمر ۹۸

۴-۳- تکثیر ژن لایزوستافین توسطPCR ۹۹
۴-۴- کلونینگ ژن لایزوستافین در وکتور بیانیpET-32a و ترانسفورماسیون در میزبان *E.coli* ۱۰۰
۴-۵- نتایج تعیین توالی ژن (Sequencing) و همردیفی (Alignment) ۱۰۲
۴-۶- القا و تخلیص پروتئین نوترکیب لایزوستافین ۱۰۳
۴-۷-وسترن بلاتینگ ۱۰۴
۴-۸-کدورت سنجی ۱۰۶
۴-۹- تلقیح سلول های استافیلوکوک اورئوس در بینی رت..... ۱۰۸
۴-۱۰- درمان حیوانات با پروتئین نوترکیب لایزوستافین ۱۰۸

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

بحث ۱۱۰
نتیجه گیری ۱۱۵
پیشنهادات ۱۱۶

فصل ششم: منابع

References ۱۱۸
چکیده انگلیسی ۱۲۳

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱: ساختار دیواره سلولی استافیلوکوک اورئوس ۱۵

شکل ۱-۲: روند پردازش پرولایزوستافین به لایزوستافین ۲۴

شکل ۱-۳: ساختار پپتیدوگلیکان دیواره سلولی استافیلوکوک اورئوس وجایگاه فعالیت لایزوستافین روی پپتیدوگلیکان ۲۶

شکل ۴-۱: الکتروفورز DNA پلاسمیدی خالص شده بر روی آگارز۰/۸درصد ۹۷

شکل ۴-۲: ترادف نوکلئوتیدی ناحیه پپتید بالغ ژن لایزوستافین ۹۸

شکل ۴-۳: توالی آمینو اسیدی ناحیه پپتید بالغ ژن لایزوستافین ۹۸

شکل ۴-۴: تکثیر ژن لایزوستافین توسط PCR ۹۹

شکل ۴-۵: غربالگری پلاسمید سلول های ترانسفورم برای تشخیص پلاسمید نوترکیب pET-32a-lys ۱۰۰

شکل۴-۶: نتایج PCR و هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET-32a-lys ۱۰۱

شکل۴-۷: نتیجه BLAST و Alignment قطعه تعیین توالی شده درpET-32a ۱۰۲

شکل۴-۸: القا و تخلیص پروتئین نوترکیب لایزوستافین ۱۰۴

شکل۴- ۹: وسترن بلات پروتئین نوترکیب لایزوستافین با سرم موش های ایمن شده با لایزوستافین تجاری ۱۰۵

شکل ۴-۱۰: نتایج کدورت سنجی در PBS ۱۰۷

شکل ۴-۱۱: نتایج کدورت سنجی در MHB ۱۰۷

فهرست جداول

جدول ۳-۱: عوامل پایه واکنش PCR ۵۳

جدول ۳-۲: برنامه ی واکنش PCR ۵۴

جدول ۳-۳: هضم آنزیمی ناقل پلاسمیدی pET-32a ۵۷

جدول ۳-۴: هضم آنزیمی قطعه ی ژنی ۵۸

جدول ۳-۵: واکنش اتصال قطعه ی ژنی با ناقل پلاسمیدی pET-32a ۵۹

جدول ۳-۶: هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET32a-lys ۶۵

جدول ۳-۷: محتوای محیط های القای بکار رفته جهت القای بیان ژن لایزوستافین ۶۸

فهرست علائم و اختصارات

APS: ammonium per sulfate

ATCC: American Type Culture Collection

Blast: Basic Local Alignment Search Tool

Bp: base pair

CoNS: Coagulase-negative staphylococci

CoPS: Coagulase-positive staphylococci

CWTD: C-terminal wall targeting domain

DAB: 3, 3'-Diaminobenzidine

DDW: Double Distilled Water

DTT: Dithiotheritol

E. coli: Escherichia coli

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

Epr: Endopeptidase resistance

IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

kbp: Kilo base pairs= 1,000 bp

KDa: Kilodalton

Lif: Lysostaphin immunity factor

MCS: Multiple Cloning Sites

MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MSSA: Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*

MSCRAMM: Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules

NCBI: National Center for Biotechnology Information

Ni-NTA: Nickel- Nitrilotriacetic acid

OD: Optical Density

PBP: Penicillin-Binding Protein

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PD: Peptidase domain

PEG: Polyethylene glycol

PTCC: Persian Type Culture Collection

P-V: Panton–Valentine

PVDF: polyvinylidene difluoride

rpm: revolution per minute

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

TBS: Tris-buffered saline

TSST: Toxic Schock Syndrome Toxin

VISA: Vancomycin intermediate *S.aureus*

فصل اول

مقدمه

۱-۱- استافیلوکوک ها

استافیلوکوک ها سلول های گرم مثبت و کروی شکلی هستند که به طور معمول به شکل خوشه های نامنظم، شبیه انگور قرار گرفته اند. اخیرا به ۴۲ گونه و۲۴ زیر گونه شناخته شده تقسیم شده اند (۱). برخی از آن ها به شکل همزی روی پوست، غدد پوستی و غشاهای مخاطی انسان وجود دارند و یک ارتباط بی خطر با میزبان خود برقرار می کنند ولی ممکنه وارد بافت های میزبان شده و شیوه زندگی آن ها به یک پاتوژن تغییر کرده و باعث جراحت، تشکیل آبسه و انواع متعددی از عفونت های چرک زا و سپتی سمی کشنده شوند.

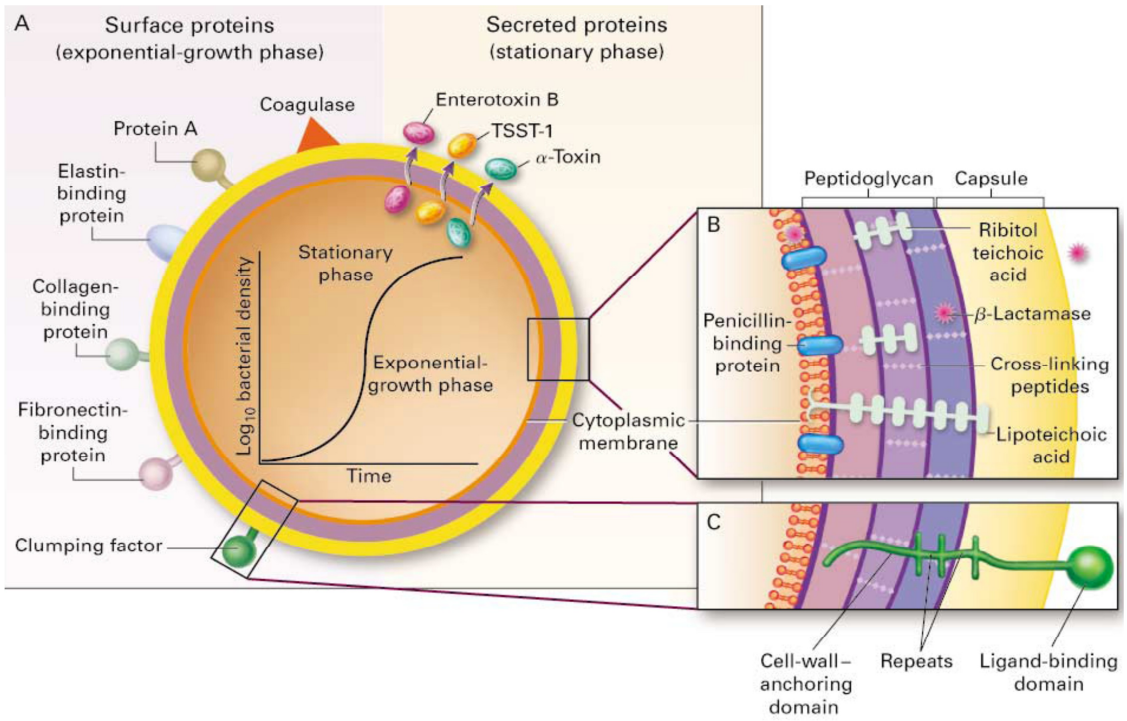
استافیلوکوک ها به طور کلی بر اساس تولید آنزیم کو آگولاز به ۲ گروه تقسیم می شوند:

۱) استافیلوکوک کوآگولاز مثبت coagulase-positive staphylococci(CoPS)

۲) استافیلوکوک کوآگولاز منفی coagulase-negative staphylococci(CoNS)

۱-۲- استافیلوکوک اورئوس

استافیلوکوک اورئوس (شکل۱-۱) تنها گونه یافت شده در انسان است که می تواند آنزیم کوآگولاز تولید کند، بنابراین استافیلوکوک کوآگولاز مثبت به شمار می آید و سایر گونه های استافیلوکوک، استافیلوکوک های کوآگولاز منفی محسوب می شوند (۲). درطول قرن اخیر استافیلوکوک اورئوس به خطرناکترین پاتوژن انسانی و شایعترین علت عفونت های بیمارستانی و عفونت های اکتسابی از جامعه در سرتاسر جهان تبدیل شده است (۴،۳) که باعث طیف وسیعی از عفونت ها از عفونت های پوستی تا انتشار آن ها و ایجاد عفونت های سیستمیک منجرشونده به نارسایی ارگانی و مرگ می باشد، و درمان عفونت های ناشی از این پاتوژن به علت ظهور مقاومت های چند دارویی بسیار دشوار شده است (۵).



شکل ۱-۱: ساختار دیواره سلولی استافیلوکوک اورئوس

۱-۲-۱- فیزیولوژی و ساختار استافیلوکوک اورئوس

۱-۲-۱-۱- ژنوم

استافیلوکوک اورئوس شامل یک کروموزوم حلقوی با پروفاژها، پلاسمید ها و ترانسپوزون ها می باشد. ژن های کنترل کننده سموم و مقاومت به آنتی بیوتیک ها روی کروموزوم و همچنین عناصر خارج کروموزومی یافت می شوند (۶). این ژن ها بین گونه های استافیلوکوک و دیگر گونه های باکتری های گرم مثبت از طریق عناصر خارج کروموزومی منتقل می شوند (۷).

۱-۲-۱-۲- دیواره سلولی

۵۰ درصد از وزن دیواره سلولی استافیلوکوک اورئوس مربوط به پپتیدوگلیکان می باشد. پپتید وگلیکان شامل چارچوبی ساخته شده از زنجیره های گلیکان است که بوسیله ی زیر واحد های یک در میان ازN - استیل گلوکوز آمین و N - استیل مورامیک اسید که با پیوند β-1,4 به هم متصل شده اند تشکیل شده است. یک زنجیره تترا پپتیدی به هریک از این زیر واحدهای N - استیل مورامیک اسید متصل می باشد و زنجیره های پپتیدوگلیکان از طریق پل های پپتیدی پنتا گلایسین بین زنجیره های تترا پپتیدی به طور متقاطع به هم متصل می باشند. پپتیدوگلیکان دارای فعالیتی شبیه اندوتوکسین بوده و رهاسازی سایتوکاین ها بوسیله ماکروفاژ ها، فعال شدن کمپلمان و تجمع پلاکت ها را ممکنه تحریک کند (۸).

اسید های تیکوئیک از ترکیبات مهم دیواره سلولی هستند. ریبیتول تیکوئیک اسید به طور کووالانسی به لایه پپتیدوگلیکان متصل است و از اجزای اصلی دیواره سلولی استا فیلوکوک اورئوس می باشد. لیپوتیکوئیک اسید یک پلی مر حاوی فسفات وگلیسرول می باشد که بوسیله ی اتصال لیپوفیلیک به غشاء سیتوپلاسمی متصل است. اسید های تیکوئیک اتصال استافیلوکوک اورئوس را به سطوح مخاطی از طریق اتصال اختصاصی آن به فیبرونکتین تسهیل می کند (۹).

۱-۲-۱-۳-کپسول

کپسول لایه پلی ساکاریدی با وزن مولکولی کم می باشد که توسط اغلب استافیلوکوک ها تولید می شود.۱۱سروتایپ کپسولی در استافیلوکوک ها تشخیص داده شده که سروتایپ ۵ و ۸ مسئول ۷۵ درصد از عفونت های انسانی می باشند. اغلب استافیلوکوک های اورئوس مقاوم به متی سیلین ایزوله شده دارای سروتایپ نوع ۵ می باشند. کپسول خاصیت آنتی فاگوسیت داشته و موجب حفاظت باکتری در برابر فاگوسیتوز ناشی از سلول های پلی مورفونوکلئرمی شود (۱۰).

۱-۲-۱-۴- پروتئین های سطحی

برای شروع عفونت استافیلوکوک اورئوس ابتدا باید به بافت های میزبان یا وسایل صناعی بچسبد، برای انجام این کاراستافیلوکوک اورئوس از یکسری پروتئین های سطحی استفاده می کند که نقش مهمی در توانایی استافیلوکوک برای کلونیزه شدن روی بافت های میزبان دارند. این پروتئین های سطحی چسبنده به عنوان MSCRAMM (ترکیبات سطحی میکروبی شناسایی شده توسط مولکول های چسبنده ماتریکس خارج سلولی) شناخته شده اند (۱۱).

پروتئین A (به طور کووالانسی به پپتید وگلیکان متصل می باشد) نخستین نمونه شناخته شده از این پروتئین ها است. یک فاکتور بیماری زا می باشد که دارای خاصیت آنتی فاگوسیت است. این پروتئین به قسمت FC ایمونوگلوبولین ها (IgG) متصل می شود و باعث مهار اپسونیزاسیون (مهار حذف ارگانیسم با واسطه پاسخ آنتی بادی) می شود.

پروتئین های سطحی که برای اتصال به بافت های میزبان دارای اهمیت هستند، شامل پروتئین متصل شونده به کلاژن، پروتئین متصل شونده به الاستین و پروتئین متصل شونده به فیبرونکتین می باشند.

۱-۲-۱-۵- توکسین ها

بسیاری از استافیلوکوک های اورئوس سمومی تولید می کنند که قادر به ایجاد اختلالات فیزیولوژیک خاص می شوند. سموم به عنوان سوپر آنتی ژن هایی که باعث تحریک پرولیفراسیون سلول های T و طوفان سایتوکاینی می شوند طبقه بندی می شوند (۱۴،۱۳،۱۲).

یکی از سوپر آنتی ژن ها، توکسین ۱ سندرم شوک توکسیک (TSST-1) و نتایج بالینی و ویرانگر سندرم شوک سمی می باشد.

توکسین اکسفولیاتیو(پوسته پوسته کننده) سبب اریتما و جدا شدن پوست و همچنین سندرم پوست سوخته یا تاول زده می شود.

P-V لوکوسیدین یک توکسین لوکوسیتولایتیک است که باعث اختلال در غشای گلبول های سفید می شود و به طور شایعی با عفونت های جلدی شدید همراه است. نهایتا سبب تولید انتروتوکسین ها ی ایجاد کننده مسمومیت های غذایی می شوند.

۱-۲-۱-۶- آنزیم ها

استافیلوکوک اورئوس انواعی از آنزیم ها از قبیل پروتئاز ها، لیپاز ها و هیالورونیداز را تولید می کند که باعث تخریب بافتی می شوند. همچنین این محصولات باکتریایی ممکن است باعث تسهیل انتشار عفونت به بافت های مجاور شوند (۹).

پنی سیلیناز (بتالاکتاماز) آنزیمی است که باعث غیر فعال کردن آنتی بیوتیک های بتا لاکتام مثل پنی سیلین و ایجاد مقاومت به پنی سیلین می شود. مقاومت در برابر پنی سیلین به خاطر وجود ژن آن بر روی پلاسمید قابل انتقال رو به افزایش است (۱۵).

کوآگولاز یک آنزیم فعال کننده پروترومبین است که توانایی تبدیل فیبرینوژن به فیبرین نامحلول را دارد و سبب تجمع استافیلوکوک ها و تشکیل لایه فیبری به دور آبسه های استافیلوکوکی شده و در نتیجه باعث لوکالیزه شدن عفونت و محافظت ارگانیسم از فاگوسیتوز می شود (۹).

۱-۲-۲- پاتوژنز

استافیلوکوک اورئوس دارای محصولات و اجزای مختلفی می باشد که در بیماری زایی و عفونت شرکت می کنند. این اجزا و محصولات می توانند هماهنگ با هم یا به تنهایی عمل کنند. بیماری زایی استافیلوکوک اورئوس بسیار چشمگیراست. این پاتوژن می تواند در مجرای بینی، آگزیلا، واژن، حلق یا روی سطوح آسیب دیده پوست کلونیزه شود (۱۷،۱۶). عفونت وقتی آغاز می شود که استافیلوکوک از سد پوستی یا مخاطی عبور کرده و در مجاورت بافت قرار گیرد یا وارد جریان خون شود، و محدود شدن یا انتشار عفونت وابسته به تاثیر متقابل بین مجموعه عوامل بیماری زای استافیلوکوک اورئوس و مکانیسم های دفاعی میزبان می باشد.

خطر عفونت در حضور وسایل خارجی افزایش داده می شود. عملکرد فاگوسیت ها در حضور وسایل خارجی به طور جدی آسیب می بیند (۱۸). وسایلی از قبیل کاتتر های داخل وریدی به طور سریع با اجزای سرمی از قبیل فیبرینوژن و فیبرونکتین پوشانده می شوند. این اجزای سرمی استافیلوکوک اورئوس را قادر به چسبیدن و تجمع روی کاتتر از طریق پروتئین های سطحی چسبنده و ساخت بیوفیلم و تسهیل کلونیزاسیون می کند.کاتتر های داخل وریدی به طور مکرر مستلزم اندوکاردیت بیمارستانی می باشند (۲۰،۱۹).

این بیماری زایی به توانایی استافیلوکوک اورئوس در:

۱) تولید انواع توکسین ها

۲) حمله به وسایل پزشکی (Medical device) بوسیله ی پروتئین های سطحی چسبنده و تولید بیوفیلم

۳) و توانایی خارق العاده در مقاومت به انواع آنتی بیوتیک ها

اشاره دارد (۲۱).

۱-۲-۳- بیماری های ایجاد شده بوسیله ی استافیلوکوک اورئوس

استافیلوکوک اورئوس باعث محدوده وسیعی از عفونت ها، از عفونت های پوستی تا انتشار آن ها و ایجاد عفونت های سیستمیک منجر شونده به نارسایی ارگانی و مرگ می باشد (۵). بیماری ها شامل:

۱) **وابسته به سم:** مسمومیت غذایی، سندرم شوک سمی

۲) **جلدی:** زرد زخم، فولیکولیت، کورک، کفکیرک، عفونت های زخم

۳) **سایر عفونت ها:** باکتریمی، اندوکاردیت، پنومونی، امپی یم، استئومیلیت، آرتریت سپتیک

۱- ۲-۴- مکانیسم های مقاومت استافیلوکوک اورئوس به عوامل آنتی باکتریال

مدت کوتاهی بعد از معرفی پنی سیلین به عنوان یک عامل درمانی در سال ۱۹۴۰ یک گونه از استافیلوکوک های اورئوس به سرعت ظاهر شد که آنزیمی به نام بتا لاکتاماز (پنی سیلیناز)که ژن آن (bla) بر روی پلاسمید باکتری قرار گرفته، پنی سیلین را به یک ماده غیر فعال تبدیل می کرد. این آنزیم یک سرین پروتئاز می باشد که حلقه بتا لاکتام را در آنتی بیوتیک های بتا لاکتام هیدرولیز می کند (۲۲). به دنبال آن در سال ۱۹۶۱ متی سیلین معرفی شد، یک گروه از بتا لاکتام های مقاوم به بتالاکتاماز، ما متاسفانه چند سال بعد مقاومت به متی سیلین در اروپا گزارش شد (۲۳). کمتر از یک دهه بعد استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* که اشاره به مقاومت به همه ی بتالاکتام های مقاوم به بتالاکتاماز مثل (متی سیلین، نفسلین، اگزاسیلین) و سفالوسپورین ها دارد شناسایی شد (۲۵،۲۴). و امروزه مبارزه با بسیاری از آن ها برای درمان عفونت به علت ظهور مقاومت به همه ی آنتی بیوتیک های حاضر بسیار مشکل شده است (۲۶). این سطح بالای مقاومت نیازمند حضور کروموزمی یک قطعه DNA خارجی است که mec element نامیده می شود. ژن mecA در mec element قرار گرفته است که یک نوع تغییر یافته از PBP2 به نام PBP2a را کد می کند. پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین (Penicillin-Binding Protein(PBP پروتئین های هستند که مسئول ساخت، حفاظت و تنظیم پروتئین های پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری هستند. آنتی بیوتیک های بتا لاکتام سبب مهار مجموعه ای از این پروتئین ها ی باکتریایی یا PBPs می شوند. PBP2a میل پائینی به آنتی بیوتیک های بتالاکتام دارد بنابراین توانایی از سرگیری ساخت دیواره سلولی و زنده ماندن درحضور متی سیلین را دارد (۲۷). ونکومایسین یک داروی انتخابی برای درمان عفونت های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین می باشد اما مقاومت به این آنتی بیوتیک هم مشاهده شده است. موتاسیون در استافیلوکوک اورئوس باعث مقاومت نسبی به ونکومایسین (VISA)vancomycin-intermediate *S.aureus* شده است (۲۸). اخیرا چندین گونه از استافیلوکوک