بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته باکتری شناسی پزشکی

عنوان

بررسی بیان RNAهای کوچک، ژنهای بیوفیلم و توانایی اتصال در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و دارای مقاومت حدواسط به ونکومایسین

نگارش

محسن میرزائی

استاد راهنما

دکتر شهین نجار پیرایه

اساتید مشاور

دکتر مهرداد بهمنش

دکتر مهدی فروزنده مقدم

زمستان ۱۳۹۳

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای محسن میرزایی رشته **باکتری شناسی پزشکی** رساله **دکتری** خود را با عنوان **« بررسی بیان RNAهای کوچک، ژنهای بیوفیلم و توانایی اتصال در ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین و دارای مقاومت حدواسط به ونکومایسین »** در تاریخ **۱۳۹۳/۱۱/۲۸** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر شهین نجار پیرایه	
استاد مشاور	دکتر مهرداد بهمنش	
استاد مشاور	دکتر مهدی فروزنده مقدم	
استاد ناظر	دکتر امین طالبی بزمین آبادی	
استاد ناظر	دکتر علی اکبر میر صالحیان	
استاد ناظر	دکتر مهدی فیض آبادی	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر بی تا بخشی	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی و فناوری 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 هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **محسن میرزائی** دانشجوی رشته **باکتری شناسی** ورودی سال تحصیلی **۸۹** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا

تاریخ

۹۳/۱۲/۶

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین 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 می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور 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 **رساله دکتری** نگارنده در رشته **باکتری شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۹۳** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر شهین نجار پیرایه** ، مشاوره **دکتر مهرداد بهمنش و مهدی فروزنده مقدم** از آن دفاع شده است.

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

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **محسن میرزائی** دانشجوی رشته **باکتری شناسی پزشکی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

۹۳/۱۲/۶

تقدیم به :

به تمام کسانی که نیک می اندیشند و عقل و منطق را پیشه خود نموده و جز رضای الهی و پیشرفت و سعادت جامعه، هدفی ندارند.

دانشمندان، بزرگان، و جوانمردانی که جان و مال خود را در حفظ و اعتلای این مرز و بوم فدا نموده و مینمایند.

تشکر و قدردانی

هیچکس نمی تواند شما را چیزی بیاموزد مگر آنچه را که نیم خواب در فجر آگاهی شما آرمیده است.

شکر و سپاس بی کران خدای مهربانم را که همواره در وجودم لذت آموختن را قرار داد و روح و جانم را با دانستن عجین کرد تا فراز و نشیب های این راه پرپیچ و خم را هموار ببینم.

سپاس فراوان

از آموزگار خردمندم سرکار خانم دکتر شهین نجار پیرایه که نه تنها گنج دانش خویش را به من ارزانی داشت، همواره مرا به آستان اندیشه خویش رهنمون بود و عشق و ایمانش را نیز با من قسمت کرد.

سپاس فراوان

از آموزگار فرزانه ام، جناب آقای دکتر مهرداد بهمنش که بی شائبه مرا یاری کرد و سخاوتمندانه از دانشش بخشید.

سپاس فراوان از پدر و مادر بزرگوارم که بی دریغ عشق و محبتشان را بر من نثار کردند و روح مرا برای پرواز در آسمان بی کران علم آزاد گذاردند.

سپاس بی پایان از همسر مهربانم که از صبر و مهربانی بی دریغش دریافتم که در لحظه ای در ازل از یک عشق و روح زاده شدیم و پیوسته با من همراه بوده حتی در خاطره خاموش خداوند...

مراتب سپاس و قدردانی‌ام را پیشکش اساتید گرانقدری می‌کنم که در طول دوره تحصیلم از ایشان آموختم؛ سرکار خانم دکتر اشرف محبتی مبارز، سرکار خانم دکتر بی‌تا بخشی و جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم.

و سپاس فراوان از دوستان و همکلاسی های گران مایه ام، بخصوص جناب آقای محمد رضا مهرابی، جناب آقای مجید اکبری، جناب آقای مجید قاسمیان، جناب آقای فرزاد سلیمانی و آقای دکتر نیما خرم آبادی، که مرا صمیمانه و مشفقانه یاری داده اند.

بی شک خداوند از دستهای چنین بخشندگانی با آدمیان سخن می گوید و از پشت چشمان آنان بر زمین لبخند می زند.

چکیده

عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس مرتبط با بیوفیلم همچنان به عنوان یک نگرانی بالینی جدی در بیماران استفاده کننده از ابزارهای پزشکی مطرح می باشد. از روش Real-time PCR می توان به منظور بررسی نقش عوامل دخیل در بیماریزایی از جمله بیوفیلم استفاده نمود. RNA های کوچک (sRNAs) در تنظیم بعد از رونویسی مسیرهای متابولیکی و پاسخ به استرس ها و ویرولانس باکتری نقش دارند. در این مطالعه به بررسی میزان بیان ژنهای مرتبط با بیوفیلم و sRNAs و بررسی توانایی اتصال و پتانسیل تولید بیوفیلم در جدایه های بالینی MRSA و VISA پرداخته شده است.

ابتدا همه جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس با روش های بیوشیمیایی معمول تعیین هویت شدند. سپس جدایه های VISA و MRSA با روش های توصیه شده توسط CLSI شناسایی شدند. در این مطالعه با استفاده از روش میکروتیتر (MPA) توانایی تشکیل بیوفیلم بررسی شد. سپس با استفاده از روش PCR سیزده ژن مرتبط با بیوفیلم مورد ارزیابی قرار گرفتند. جدایه هایی که واجد بیشترین ژنها بودند، از نظر تغییرات رونویسی این ژنها و sRNA های منتخب مورد بررسی قرار گرفتند.

فراوانی ژنهای MSCRAMMs و ژنهای لوکوس *ica* بسیار متغیر بوده و در جدایه های مورد بررسی به یک میزان انتشار نیافته بود. ژن های کد کننده پنج sRNA مورد بررسی در تمامی جدایه های بالینی بیان شدند. ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم و sRNAs در جدایه های MRSA به صورت بسیار متغیر و در جدایه های VISA تقریبا به صورت یکسان بیان شدند. علاوه براین، نتایج تغییر در بیان ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم و sRNA ها در جدایه های MRSA و VISA نشان داد که عوامل متعددی در تنظیم بیان ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم دخالت دارند.

اگرچه در این مطالعه بیشتر به بررسی بیان ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم و sRNA ها پرداخته شد، بررسی های توالی ها با استفاده از میکرواری ژنهای بیشتر دخیل در تشکیل بیوفیلم می تواند اطلاعات بیشتر و دقیق تری در خصوص مکانیسم های مولکولی دخیل در شکل گیری بیوفیلم و تنظیم بیان عوامل ویرولانس در استافیلوکوکوس اورئوس را فراهم نماید.

کلمات کلیدی: بیوفیلم، بیان ژنهای دخیل در بیوفیلم، sRNA و استافیلوکوکوس اورئوس

فهرست مطالب

مقدمه و مروری بر مطالعات انجام شده ۱

۱-۱. مقدمه ۲
۱-۱-۱. استافیلوکوکوس اورئوس ۳
۱-۱-۲. ساختار آنتی ژنیک و شاخص های بیماریزایی ٤
۱-۱-۳. خصوصیات ژنتیکی باکتری ٤
۱-۱-۴. بیماری زایی و علایم بالینی ٥

۱-۲. مقاومت ضد میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس ۷
۱-۲-۱. مقاومت به بتالاکتام ها ۷
۱-۲-۲. *SCCmec* در استافیلوکوکوس اورئوس ۸
۱-۲-۳. کمپلکس ژنی *ccr* ۸
۱-۲-۴. کمپلکس ژنی *mec* ۹

۱-۳. مقاومت نسبت به ونکومایسین ۹
۱-۳-۱. استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به ونکومایسین ۱۰
۱-۳-۲. مقاومت به ونکومایسین؛ دیواره سلولی استافیلوکوکوس اورئوس ۱۱
۱-۳-۳. مکانیسم عمل ونکومایسین ۱۲
۱-۳-۴. استافیلوکوکوس اورئوس با مقاومت حد واسط به ونکومایسین (VISA) ۱٤
۱-۳-۵. استافیلوکوکوس اورئوس دارای مقاومت هتروژن به ونکومایسین (hVISA) ۱٤
۱-۳-۶. تاریخچه و اپیدمیولوژی: اولین گزارشها از جدایه های VISA و hVISA ۱۴

۱-۴. اپیدمیولوژی جهانی و ویژگی های مرتبط با VISA و hVISA ۱۵
۱-۴-۱. اپیدمیولوژی مولکولی جدایه های VISA و hVISA ۱۵
۱-۴-۲. استافیلوکوکوس اورئوس اکتسابی از جامعه شامل سویه های PVL مثبت و VISA/hVISA . ۱٦
۱-۴-۳. گروه های *agr* و VISA/hVISA ۱٦

۱-۵. ویژگی های فنوتیپی و مکانیسم مقاومت ۱۶
۱-۵-۱. تغییرات دیواره سلولی ۱۷
۱-۵-۲. فعالیت اتولیتیکی ۱۹
۱-۵-۳. مکانیسم های مولکولی مقاومت ۱۹
۱-۵-۴. تغییرات رونویسی ۱۹

۱-۶. ویژگی های سویه های VISA و hVISA ۲۱
۱-۶-۱. پروتئین های سطحی ۲۲
۱-۶-۲. کپسول ۲۲
۱-۶-۳. سیستم *agr* ۲۳

۱-۶-۴. بیوفیلم ۲٤

۱-۷. بیوفیلم و عفونتهای استافیلوکوکی ۲۴
۱-۷-۱. عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس مرتبط با بیوفیلم ۲۵
۱-۷-۲. اساس مولکولی تشکیل بیوفیلم در استافیلوکوکوس ها ۲۵
۱-۷-۳. اتصال ۲٦
۱-۷-۴. بلوغ ۲۸
۱-۷-۵. نیروهای اتصال؛ تجمع ۲۸
۱-۷-۶. عوامل تخریب بیوفیلم ۲۹
۱-۷-۷. سیستم کروم-سنسینگ ۳۰

۱-۸. روش میکروفلوئیدی ۳۲
۱-۸-۱. مزایای استفاده از روش میکروفلوئیدی ۳۲

۱-۹. RNA های تنظیمی ۳۵
۱-۹-۱. RNA های خانه دار ۳٦
۱-۹-۲. خاموشی پس از رونویسی (PTGS) ۳۷
۱-۹-۳. ریبوزیم ۳۹
۱-۹-۴. RNA های مداخله گر ۳۹
۱-۹-۵. RNA های تنظیمی در استافیلوکوکوس اورئوس ٤۰
۱-۹-۶. مناطق cis-acting mRNA، تنظیم کننده مسیرهای مورد نیاز رشد باکتری ها ٤۲
۱-۹-۷. تعاملات پیچیده بین پروتئین ها و RNAها در سیستم کروم سنسینگ ٤۳
۱-۹-۸. کسب sRNAها بوسیله عناصر متحرک ژنتیکی ۴۵
۱-۹-۹. sRNA ها رابط بین جزایر بیماریزایی و ژنوم اصلی ٤۵
۱-۹-۱۰.RNA های Rsa ٤٦

۱-۱۰. اصول Real-Time PCR ۴۶
۱-۱۰-۱. رنگ‌های متصل شونده به DNA ۵۰
۱-۱۰-۲. Real-Time PCR بر مبنای پرایمر ۵۲
۱-۱۰-۳. Real-Time PCR بر مبنای پروب ۵۳
۱-۱۰-۴. ویژگی‌های شاخص Real-time PCR ۵۵
۱-۱۰-۵. Quantitative Real-time PCR ۵۵

۱-۱۱. مروری بر مطالعات انجام شده در داخل کشور ۵۸
۱-۱۱-۱. مقاومت آنتی بیوتیکی ۵۸
۱-۱۱-۲. بیوفیلم ۵۹
۱-۱۱-۳.sRNA ۶۲

فصل دوم: مواد و روش‌ها ۶۴

۲-۱. جمع آوری نمونه های بالینی ۶۵

۲-۲. تایید هویت سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده ۶۵
۲-۲-۱. مواد مورد نیاز برای تایید هویت ۶۵
۲-۲-۲. رنگ آمیزی گرم و مشاهده مستقیم ۶۵
۲-۲-۳. آزمایش کاتالاز ۶۶
۲-۲-۴. آزمایش کواگولاز به روش لوله ای ۶۶
۲-۲-۵. آزمایش کواگولاز به روش اسلایدی ۶۶
۲-۲-۶. آزمایش مانیتول سالت آگار ۶۷
۲-۲-۷. تولید آنزیم دزوکسی ریبونوکلئاز (DNase) ۶۷
۲-۲-۷-۱. تهیه کشت روی پلیت حاوی محیط DNase ۶۷
۲-۲-۸. ذخیره سازی نمونه های جدا شده ۶۷

۲-۳. بررسی حساسیت ضد میکروبی به روش انتشار از دیسک ۶۸
۲-۳-۱. مواد و وسایل لازم جهت انجام آزمایشهای تعیین حساسیت ضد میکروبی ۶۸
۲-۳-۲. محیط کشت ۶۹
۲-۳-۳. روش تهیه محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند ۶۹
۲-۳-۴. آماده سازی سوسپانسیون میکروبی ۰/۵ مک فارلند ۶۹
۲-۳-۵. کنترل کیفی دیسکها ۶۹
۲-۳-۶. تهیه سالین استریل ۰/۹ درصد ۷۰
۲-۳-۷. آزمایش تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن ۷۰

۲-۴. آزمایش غربالگری شناسایی جدایه های مقاوم به ونکومایسین ۷۰
۲-۴-۱. روش ساخت پلیت های حاوی آنتی بیوتیک ونکومایسین ۷۱
۲-۴-۱-۱. تهیه محیط کشت BHI آگار حاوی ونکومایسین ۷۱
۲-۴-۲. تلقیح باکتری ها درون محیط کشت حاوی ونکومایسین ۷۲

۲-۵. کنترل کیفی محلولهای آنتی بیوتیکی به روش تهیه رقت در براث ۷۳
۲-۵-۱. تهیه رقتهای سریال آنتی بیوتیکی ۷۳
۲-۵-۱-۱- تهیه سوسپانسیون میکروبی ۷۴
۲-۵-۲. آزمایش تعیین حداقل غلظت مهار کننده دارو به روش تهیه رقت در آگار ۷۵
۲-۵-۳. روش آزمایش تعیین حداقل غلظت مهار کننده دارو به روش E-test ۷۶

۲-۶. واکنش PCR ۷۷
۲-۶-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۷۷
۲-۶-۲. استخراج DNA ۷۷
۲-۶-۳. مواد و وسایل لازم ۷۸
۲-۶-۴. تعیین ژن *mecA* ۷۸
۲-۶-۵. تعیین تیپ های ژنی *SCCmec* ۷۹
۲- ۶-۶. تعیین تیپ های ژنی *agr* با روش دابلکس PCR ۷۹
۲-۶-۷. تعیین ژن های اتصالی و دخیل در تشکیل بیوفیلم ۸۱

۲-۶-۸. تعیین ژن های MSCRAMMs با روش مـولتی پلکـس PCR و ژن هـای *icaABCD* بـا روش مونو پلکس ۸۱

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندرف (Master cycler® gradient) انجـام گرفـت. برنامـه هـا و توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژنهای *ica* در جدول ۲ آورده شده است. ۸۲

۲-۷. بررسی تیپ بندی ژن پروتئین A استافیلوکوکوس (*Spa*) ۸۲
۲-۷-۱. رسم Minimum spaning tree ۸۳

۲-۸. تهیه بافر های الکتروفورز ۸۳
۲-۸-۱. تهیه محلول بافر TAE ۸۳
۲-۸-۲. تهیه بافر TBE ۸٤

۲-۹. روش آزمایش بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم ۸۴
۲-۹-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۸٤
۲-۹-۲. روش کار ۸٤

۲-۱۰. بررسی خصوصیات فنوتیپی اتصال به فیبرونکتین ۸۶
۲-۱۰-۱. مواد و وسایل مورد نیاز ۸٦

۲-۱۱. انتخاب جدایه ها جهت بررسی بیان ژنهای منتخب ۸۷

۲-۱۲. استخرج RNA باکتریها در شرایط بیوفیلم ۸۷

۲-۱۳. طراحی و ساخت سیستم میکروفلوئیدی ۸۸
۲-۱۳-۱. طراحی سیستم میکروفلوئیدی ۸۸
۲-۱۳-۳. تهیه ماکت پلی دی متیل سیلوکسان (PDMS) ۸۸
۲-۱۳-۴. مونتاژ بیوراکتور ۸۹

۲-۱۴. استخراج RNA باکتریها به منظور بررسی sRNA ۹۰
۲-۱۴-۱. رسم نمودار رشد ۹۰
۲-۱۴-۲. استخراج RNA ۹۲
۲-۱۴-۲-۱. روش استخراج RNA ۹۲
۲-۱۴-۲-۲. تیمار RNA استخراج شده با آنزیم DNase I ۹۳
۲-۱۴-۲-۳. روش کار ۹۳
۲-۱۴-۲-۴. کنترل کیفی RNA تیمار شده با آنزیم DNaseI ۹۴

۲-۱۵. روش اسپکتروفتومتری به منظور بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده ۹۴
۲-۱۵-۱. الکتروفورز RNA ۹۵

۲-۱۶. سنتز cDNA ۹۵
۲-۱۶-۱. تائید صحت سنتز cDNA ۹٦

۲-۱۷. بررسی تغییر رونویسی ژنهای دخیل در اتصال و تشکیل بیوفیلم در جدایه های منتخب با استفاده از روش Real-time PCR ۹۶
۲-۱۷-۱. طراحی پرایمر ۹۶
۲-۱۷-۲. انجام PCR با پرایمر های مورد استفاده ۹۹
۲-۱۷-۳. ارزیابی الکتروفورتیک نتایج PCR ۱۰۰
۲-۱۷-۴. رسم منحنی استاندارد ۱۰۰
۲-۱۷-۵. آماده سازی واکنش Real-time PCR ۱۰۰
فصل سوم: نتایج و یافته‌ها ۱۰۲
۳-۱. نمونه های بالینی ۱۰۳
۳-۱-۱. نتایج فراوانی در بخش های مختلف ۱۰۴
۳-۲. نتایج آزمایش غربالگری با استفاده از پلیت BHI6V ۱۰۴
۳-۲-۱. نتایج آزمایش غربالگری با استفاده از پلیت BHI4V ۱۰۵
۳-۳. نتایج آزمایش تعیین MIC با استفاده از روش E-test ۱۰۵
۳-۳-۱. نتایج آزمایش تعیین MIC با استفاده از روش تهیه رقت در آگار ۱۰۶
۳-۴. نتایج بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه های VISA و VRSA ۱۰۷
۳-۵. نتایج آنتی بیوگرام ۱۰۷
۳-۶. آزمایش PCR برای شناسایی ژن *mecA* ۱۱۰
۳-۷. آزمایش PCR برای شناسایی ژن *vanA* و *vanB* ۱۱۰
۳-۷-۱. فراوانی انواع ***SCCmec*** در جدایه های واجد ژن ***mecA*** ۱۱۱
۳-۸. فراوانی انواع *agr* در جدایه های استافیلوکوس اورئوس ۱۱۲
۳-۹. فراوانی انواع *ica* در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس ۱۱۳
۳-۱۰. نتایج حاصل از فراوانی ژنهای MSCRAMMs در جدایه های VISA ۱۱۴
۳-۱۱. نتایج حاصل از فراوانی جدایه های VISA/VRSA از نظر تشکیل بیوفیلم ۱۱۷
۳-۱۱-۱. نتایج حاصل از فراوانی جدایه های MRSA و MSSA از نظر تشکیل بیوفیلم ۱۱۸
۳-۱۱-۲. نتایج حاصل از فراوانی جدایه های MRSA، MSSA و VISA/VRSA از نظر بیوفیلم ۱۱۸
۳-۱۲. نتایج بررسی *Spa* تیپ ها در جدایه های VISA/VRSA ۱۲۰
۳-۱۳. بررسی نتایج حاصل از استخراج RNA ۱۲۱
۳-۱۴. بررسی نتایج حاصل از سنتز cDNA ۱۲۲
۳-۱۵. نتایج مربوط به Real time PCR ۱۲۲
۳-۱۵-۱. بررسی منحنی استاندارد ۱۲۲
۳-۱۵-۲. نتایج حاصل از تغییر بیان ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم ۱۲۴

۳-۱۵-۳. نتـایج مربـوط بـه تغییـر بیـان ژنهـای دخیـل در تشـکیل بیـوفیلم در جدایـه هـای منتخـب VISA/MRSA ۱۲۶
۳-۱۵-۴. نتـایج مربـوط بـه تغییـر بیـان ژنهـای دخیـل در تشـکیل بیـوفیلم در جدایـه هـای منتخـب VISA/MSSA ۱۲۸
۳-۱۵-۵. نتایج مربوط به تغییر بیان ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم در جدایه های منتخب بـا توانـایی ضعیف تشکیل بیوفیلم ۱۳۰
۳-۱۶. نتایج نمودار رشد ۱۳۲
۳-۱۷. نتایج بیان نسبی sRNA در جدایه های منتخب MRSA ۱۳۳
۳-۱۷-۱. نتایج بیان نسبی sRNA در جدایه های منتخب VISA/MRSA ۱۳۵
۳-۱۷-۲. نتایج بیان نسبی sRNA در جدایه های منتخب VISA/MSSA ۱۳۷
۳-۱۷-۳. نتایج بیان نسبی sRNA در جدایه های منتخب با توانایی ضعیف در تشکیل بیوفیلم ۱۳۹
فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها ۱۴۳
۴-۱. بحث ۱۴۴
۴-۲. نتیجه گیری ۱۵۸
۴-۳. پیشنهادها ۱۵۹
فهرست منابع ۱۶۰
چکیده انگلیسی ۱۷۸

فهرست جدول‌ها

جدول ۰-۱. ویژگی‌های رنگ‌های مرسوم مورد استفاده در Real-Time PCR. ۴۷

جدول ۲-۱. تعریف اصطلاحات مورد استفاده در Real-time PCR. ۴۸

جدول ۲-۱. نحوه تهیه رقتهای مختلف آنتی بیوتیک ونکومایسین ۷۳

جدول ۲-۲ پرایمر های ژن *mecA* ۷۸

جدول ۲-۳. پرایمر های اختصاصی قطعات ژنی *SCCmec* ۷۹

جدول ۲-۴. پرایمر های اختصاصی گروه های ژنی *agr* ۸۰

جدول۲-۵. پرایمر های اختصاصی ژن های اتصالی و دخیل در تشکیل بیوفیلم ۸۱

جدول ۲-۶. ترادف پرایمرهای و برنامه PCR مورد استفاده به منظور تکثیر ژنهای مرتبط با بیوفیلم ۸۲

جدول ۲-۷. شرایط و برنامه PCR برای ژن *Spa* ۸۲

جدول شماره ۲-۸. طبقه بندی توانایی تشکیل بیوفیلم به وسیله روش میکروتیتر پلیت ۸۵

جدول ۲-۹. برنامه سنتز cDNA ۹۶

جدول ۲-۱۰. مقادیر مواد مورد استفاده برای واکنش PCR ۹۶

جدول ۲-۱۱.برنامه و شرایط PCR به منظور تکثیر ژن *gyrB* ۹۶

جدول ۲-۱۲. پارامترهای مهم جهت طراحی پرایمر ۹۷

جدول ۲-۱۳. خصوصیات پرایمرهای طراحی شده و مورد استفاده در روش Real-time PCR ۹۸

جدول ۲-۱۴. خصوصیات پرایمرهای طراحی شده و مورد استفاده در روش Real-time PCR ۹۹

جدول ۲-۱۵. مقادیر اجزای مورد استفاده برای آزمون Real-Time PCR روی جدایه های مورد بررسی ۱۰۱

جدول ۳-۱. خصوصیات فنوتیپی جدایه های VISA و VRSA ۱۰۹

جدول ۳-۲. خلاصه وضعیت بالینی بیماران مبتلا به عفونت با جدایه های VISA ۱۰۸

جدول ۳-۳. خصوصیات ژنتیکی جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس غیر حساس به ونکومایسین ۱۱۲

جدول ۳-۴. فراوانی ژنهای مرتبط با بیوفیلم، توانایی اتصال و انواع *Spa* جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس غیر حساس به ونکومایسین ۱۱۶

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱. توزیع فراوانی نسبی جدایه های استافیوکوکوس اورئوس بر حسب نوع نمونه بالینی.....۱۰۳

نمودار ۳-۲. توزیع فراوانی نسبی جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس بر حسب بخش های مختلف.....۱۰۴

نمودار ۳-۳. توزیع فراوانی نسبی مقادیر MIC ونکومایسین در جدایه های غربال شده استافیلوکوکوس اورئوس بر مبنای آزمایش تعیین MIC در روش E-test.....۱۰۶

نمودار ۳-۴. توزیع فراوانی نسبی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس در روش انتشار از دیسک.....۱۰۸

نمودار ۳-۵. درصد فراوانی نسبی ژنهای اتصالی MSCCRAMs و *icaADBC* در جدایه های غیر حساس به ونکومایسین را نشان می دهد.....۱۱۴

نمودار ۳-۵. درصد فراوانی نسبی ژنهای اتصالی MSCCRAMs و *icaADBC* در جدایه های غیر حساس به ونکومایسین.....۱۱۶

نمودار ۳-۶. درصد فراوانی نسبی جدایه های غیر حساس به ونکومایسین از نظر توانایی تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش Mtp.....۱۱۷

نمودار ۳-۷. درصد فراوانی نسبی جدایه های MRSA و MSSA از نظر توانایی تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش Mtp.....۱۱۸

نمودار ۳-۸. درصد فراوانی نسبی جدایه های MRSA، MSSA و VISA/VRSA مورد بررسی از نظر توانایی اتصال و تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش بررسی میکروتیتر پلیت (Mtp).....۱۱۹

نمودار ۳-۹. بررسی فنوتیپی اتصال به فیبرونکتین در جدایه های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس.....۱۱۹

نمودار ۳-۱۰ الف و ب. نمودار های مربوط به بیان نسبی ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم در جدایه های MRSA منتخب.....۱۲۵

نمودار ۳-۱۱. الف و ب. نمودار های مربوط به بیان نسبی ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم در جدایه های VISA/MRSA منتخب.....۱۲۷

نمودار ۳-۱۲ الف و ب. نمودار های مربوط به بیان نسبی ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم در جدایه های VISA/MSSA منتخب.....۱۲۹

نمودار ۳-۱۳ الف و ب. نمودار های مربوط به بیان نسبی ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم در جدایه های منتخب با توانایی ضعیف در تشکیل بیوفیلم در آزمایش Mtp.....۱۳۱

نمودار ۳-۱۴ الف و ب. نمودار های رشد جدایه های مختلف VISA، MRSA و MSSA از نظر الگوی رشد ...۱۳۲

نمودار ۳-۱۵ الف و ب. نمودار های مربوط به بیان نسبی sRNA ها در جدایه های MRSA منتخب.....۱۳۴

نمودار ۳-۱۶ الف و ب. نمودار های مربوط به بیان نسبی sRNA ها در جدایه های VISA/MRSA منتخب ..۱۳۶

نمودار ۳-۱۷ الف و ب. نمودار های مربوط به بیان نسبی sRNA ها در جدایه های VISA/MSSA منتخب...۱۳۸

نمودار ۳-۱۸ الف و ب. نمودار های مربوط به تغییر بیان ژنهای sRNA در جدایه های منتخب با توانایی ضعیف در تشکیل بیوفیلم در آزمایش Mtp ۱۴۰

نمودار ۳-۱۹. نمودار مربوط به بیان نسبی ژنهای دخیل در تشکیل بیوفیلم در جدایه VISA در شرایط میکروفلوئیدی و روش پلانکتونیک..... ۱۴۱

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. محل فعالیت ونکومایسین در سپتوم تقسیم در استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم و تغییرات مرتبط با فنوتیپ VISA ۱۳

شکل۱-۲. بررسی برخی از ویژگی های دیواره سلولی به طور کلی در گونه های VSSA و VISA عناصر کلیدی نظارتی مرتبط با مقاومت حدواسط به وانکومایسین..... ۱۸

شکل ۳-۱. سیستم *agr* در استافیلوکوکوس اورئوس. ۲۳

شکل۴-۱. تصویر بیوفیلم استافیلوکوکوسی با استفاده از میکروسکوپ SEM..... ۲۴

شکل ۵-۱. تصویری از نحوه توسعه بیوفیلم درون بدن موجود زنده..... ۲۶

شکل ۶-۱. تصویر اپران *ica* و نحوه ساخته شدن پلی ساکارید اتصالی بین سلولی..... ۲۹

شکل ۷-۱. کروم-سنسیگ با واسطه سیستم *agr* در استافیلوکوکوس اورئوس..... ۳۱

شکل ۸-۱. مزایای استفاده از روش میکروفلوئیدی برای مطالعه روی بیوفیلم باکتریایی. ۳۴

شکل ۹-۱. مهار ترجمه یک mRNA اختصاصی توسط آنتی سنس..... ۳۸

شکل ۱۰-۱. یک منحنی تیپیک از واکنش Real-Time PCR به همراه توضیح شماتیک اصطلاحات مورد استفاده در این تکنیک..... ۴۸

شکل ۱۱-۱. مراحل مختلف یک واکنش Real-Time PCR. سیگنال‌های Background در طول واکنش تغییرات محدودی دارند که عمدتاً ناشی از دستگاه Real-time PCR و لوله‌های واکنش است..... ۴۹

شکل ۱۲-۱. با تولید DNA دو رشته‌ای و اتصال SYBR Green I به آن تابش فلورسانس متناسب با طول DNA دورشته‌ای و مقدار آن افزایش می‌یابد..... ۵۰

شکل ۱۳-۱. مثالی از منحنی ذوب واکنشی که در آن تنها یک پیک فلورسنتی در ۸۷°C مشاهده می‌شود. منحنی‌های فاقد پیک کنترل منفی می‌باشند..... ۵۲

شکل ۱۴-۱. در Plexor system منحنی تکثیر کاملاً برعکس می‌شود..... ۵۳

شکل ۰-۱۵. چگونگی عملکرد پروب TaqMan..... ۵۴

شکل ۱-۱۶. منحنی استاندارد با پنج رقت لگاریتمی متوالی..... ۵۶

شکل ۲-۱. E-test..... ۷۷

شکل ۲-۲. تصویر نحوه اتصال سیستم میکروفلوییدی به وسیله شلنگ باریک به پمپ SP-500 و برقراری جریان محیط کشت..... ۸۹

شکل ۲-۳. تصویر ماکت PDMS پس از ایجاد ورودی و خروجی کانال ها که روی یک اسلاید شیشه ای به وسیله اکسیژن پلاسما چسبانیده شده است.....۸۹

شکل ۳-۱. پلیتهای غربالگری حاوی ۴ و ۶ میکروگرم در میلی لیتر ونکومایسین.....۱۰۵

شکل۳-۲. آزمایش تعیین MIC با استفاده از E-test.....۱۰۶

شکل ۳-۳. بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار از دیسک.....۱۰۷

شکل ۳-۴. باند ۱۵۶ جفت بازی حاصل از پرایمرهای طراحی شده. M: مارکر، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت، T: نمونه مثبت.....۱۱۰

شکل ۳-۶. بررسی محصولات PCR به منظور شناسایی انواع *SCCmec*. M. مارکر. ردیف های ۵-۱ شامل: ردیف ۱ کنترل مثبت برای *SCCmec* type V، ترکیب محصولات برای ژن های *SCCmec* type IVa (776 bp) و IVc (200 bp)؛ ردیف ۳، ترکیب محصولات برای ژن های(493 bp) *SCCmec* type IVb و *SCCmec* type I (6138)؛ ردیف چهار ترکیب محصولات برای ژن های(881 bp) IVd و (398 bp) II و ردیف ۵، نمونه دمثبت برای *SCCmec* type III (280 bp) را نشان می دهد.....۱۱۱

شکل ۳-۷. بررسی محصولات PCR به منظور شناسایی انواع *agr*. ردیف ۱، کنترل مثبت برای ژن *agr* گروه III (۴۰۶ bp)، ردیف ۲، کنترل مثبت برای ژن *agr* گروه IV (۵۸۸ bp)، ردیف ۳، کنترل مثبت برای ژن *agr* گروه I (۴۳۹ bp) و ردیف ۴، کنترل مثبت برای ژن *agr* گروه II (۵۷۲ bp).....۱۱۲

شکل ۳-۸. باند ۱۱۰۰ جفت بازی حاصل از پرایمرهای طراحی شده برای ژن *icaB*. M: مارکر، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت، T: نمونه مثبت.....۱۱۳

شکل ۳-۹. باند ۹۰۰ جفت بازی حاصل از پرایمرهای طراحی شده برای ژن *icaC*. M: مارکر، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت، T: نمونه مثبت.....۱۱۳

شکل ۳-۱۰. باند ۱۸۸ و ۱۹۸ جفت بازی حاصل از پرایمرهای طراحی شده برای ژن های*icaA* و *icaD* . M: مارکر، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت، T: نمونه مثبت.....۱۱۴

شکل ۳-۱۱. باند ۵۲۳، ۴۰۵، ۲۸۸، ۲۰۳ و ۱۲۸ جفت بازی حاصل از پرایمرهای طراحی شده برای ژن های *fnbB*، *fib*، *clfA*، *clfB* و *fnbA*. M: مارکر، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت، T: نمونه مثبت.....۱۱۵

شکل ۳-۱۲. باند ۵۷۴، ۳۰۱، ۱۹۲، ۱۸۰ جفت بازی حاصل از پرایمرهای طراحی شده برای ژن های *bbp*، *eno*، *cna* و *ebpS*. M: مارکر، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت، T: نمونه مثبت.....۱۱۵

شکل ۳-۱۳. تصویر آزمایش بررسی توانایی اتصال در جدایه های استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی با استفاده از روش Mtp.....۱۱۷

شکل ۳-۱۴. تصویر MST آنالیز Spa تیپ ها در جدایه های VISA مورد بررسی، فهرست Spa تیپ ها بر اساس سایت Ridom Spa Server آورده شده است.....۱۲۰

شکل ۳-۱۵. تصویر UPGMA جدایه های VISA مورد بررسی بر اساس *Spa* تیپ های مختلف و توانایی جدایه های مختلف در تشکیل بیوفیلم و ارتباط بین توانایی تشکیل بیوفیلم و *Spa* تیپ ها ۱۲۱

شکل ۳-۱۶. نتایج حاصل از الکتروفورز RNA های استخراج شده ۱۲۱

شکل ۳-۱۷ محصول‌های PCR با ژن gyrB و پروموتر 16S. M: سایز مارکر. ۱۲۲

شکل ۳-۱۸. منحنی استاندارد به دست آمده از ژن *ClfA*، Slope: -۳/۴، Intercept: ۳۶/۸، R^2:۰/۹۹ ..... ۱۲۳

شکل ۳-۱۹. منحنی ذوب بدست آمده با جفت پرایمر *clfaF/clfaR*. ظهور یک پیک در دمای ۷۸ $^{\circ}C$ نشان از تولید محصول اختصاصی و عدم ایجاد پرایمر-دایمر دارد. ۱۲۳

شکل ۳-۲۰. منحنی تکثیر Real-time PCR برای چند ژن مورد بررسی ۱۲۴

شکل ۳-۲۱. الف- تصویری از ساختار میکروفلوئیدی با بزرگ نمایی ۴۰، ب- تصویری از ساختار میکروفلوئیدی با بزگنمایی ۱۰۰، تصاویر ج و د ساختار با بزرگنمایی ۲۵۰ و ۴۰۰ را نشان می دهد. ۱۴۲