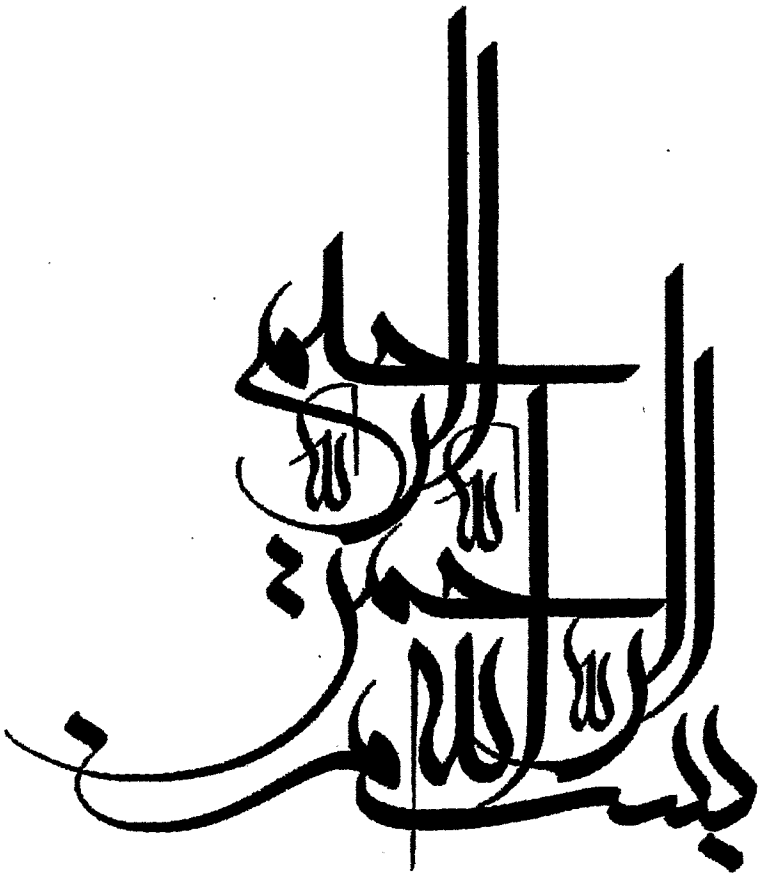

١٤٢٧٠١

دانشگاه شهید بهشتی
دانشکده علوم زیستی
پایان نامه دوره کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

تایپینگ سویه های بیمارستانی *Staphylococcus aureus* مقاوم به متی سیلین با استفاده از روش PFGE

دانشجو:
انسیه جوان

اساتید راهنما:
دکتر غلامحسین ابراهیمی پور
دکتر مهناز سیفی

استاد مشاور:
دکتر محمد رضا پورشفیع

۱۳۸۹/۷/۲۲

مرداد ۱۳۸۹

۱۴۲۷۰۲

تاریخ .....
شماره .....
پیوست.....

دانشگاه شهید بهشتی

بسمه تعالی

«صورتجلسه دفاع پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد»

بازگشت به مجوز دفاع شماره ۲۰۰/۱۶۹۰/ د مورخ ۸۹/۴/۲۶ جلسه هیأت داوران ارزیابی پایان نامه خانم انسیه جوان به شماره شناسنامه ۲۰۲۳۷ صادره از مشهد متولد۱۳۶۰ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته زیست شناسی- میکروبیولوژی

۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین

۲۹۹۰۱

با عنوان :

تایپینگ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین جدا شده از مراکز بیمارستانی تهران با استفاده از روش Pulsed Field Gel Electrophoresis

به راهنمائی:

۱- آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور

۲-خانم دکتر مهناز سیفی

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۱۳۸۹/۵/۱۰ تشکیل گردید و براساس رأی هیأت داوری و با عنایت به ماده ۲۰ آئین نامه کارشناسی ارشد مورخ ۷۵/۱۰/۲۵ پایان نامه مزبور با نمره ۱۹/۸ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

۱- استاد راهنما: آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور

۲- استاد راهنما: خانم دکتر مهناز سیفی

۳- استاد مشاور: آقای دکتر محمد رضا پور شفیع

۴- استاد داور : آقای دکتر مهدی سلطان دلال

۵- استاد داورونماینده تحصیلات تکمیلی : خانم دکتر فرشته افتخار

تقدیم به:

روح پدرم

و تقدیم به:

مادرعزیزم که همواره حامی و پشتیبانم بود

با سپاس و تشکر فراوان از

استاد بزرگوار و ارجمندم **سرکار خانم دکتر مهناز سیفی** که بی دریغ مرا یاری نمودند و راهنمایی های ارزنده ایشان انجام این پروژه را ممکن ساخت.

استاد گرانقدر و ارجمندم **جناب آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور** که همواره لطف و مساعدت های ارزنده ایشان مشکلات را بر من هموار ساخت.

استاد مشاور گرامی جناب آقای **دکتر محمد رضا پورشفیع** که همواره راهنمای من بودند و بی دریغ مرا در دانسته های خویش شریک کردند.

جناب آقای محمد شفیعی که از آغاز تا پایان پروژه همواره یار و یاور من بودند.

سرکار خانم دکتر ملیحه طالبی و سایر دوستان و همکاران عزیزم در بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران از جمله خانم ها عباسعلی پور، نیک بین، شورج، جاویدنیا، مموییی، دادفرما، ایلوخانی، نویری، رحمتی، عبدالهی، حبیبی، مختاری و آقایان دکتر رحیمی، فلاحتی، وطن خواه، دکتر مرعشی، ملک جمشیدی، حسن شفیعی به خاطر تمامی کمک هایشان.

و در نهایت برای همکلاسی های عزیزم خانم ها مرادی، حیدرچی، موسوی، رومانی و آقایان رستگار، مرزبان، علایی، سلامیان آرزوی موفقیت روز افزون را خواهانم.

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱- استافیلوکوک ها ۲
۱-۲- فیزیولوژی و ویژگی های کشت ۲
۱-۳- روش های شناسایی ۳
۱-۴- آنزیم ها ۴
۱-۵- توکسین ها ۵
۱-۶- بیماری زایی ۵
۱-۷-۱ استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) ۷
۱-۷-۲- تکامل HA-MRSA ۸
۱-۷-۳- تکامل CA-MRSA ۸
۱-۷-۴- استافیلوکوک های اورئوس مقاوم به متی سیلین در بیماران بیمارستانی (HA-MRSA) ۹
۱-۸- اهمیت تایپینگ سویه های MRSA بیمارستانی ۹
۱-۹- مکانیسم های مقاومت آنتی بیوتیکی در استافیلوکوک اورئوس
..... ۱۰
۱-۱۰- کاست کروموزومی مقاومت به اگزاسیلین (SCC mec) ۱۰
۱-۱۱- بررسی مقاومت به متی سیلین یا اگزاسیلین ۱۲
۱-۱۲- واکنش های زنجیره ای پلیمراز (PCR) ۱۳
۱-۱۲-۱- کاربرد های PCR ۱۳
۱-۱۳-۱ مهم ترین روشهای تایپینگ مولکولی استافیلوکوک اورئوس
..... ۱۴
۱-۱۳-۲- تایپینگ توالی چند جایگاه (MLSA) ۱۴
۱-۱۳-۳- تایپینگ کاست کروموزومی SCCmec ۱۴
۱-۱۳-۴- تایپینگ spa ۱۵
۱-۱۳-۵- پالس فیلد ژل الکتروفورز ۱۵
۱-۱۳-۶- چگونگی تفسیر دندروگرام UPGMA/Dice رسم شده ۱۷
۱-۱۳-۷- تایپینگ مولکولی MRSA بر اساس PFGE ۱۷
۱-۱۴- اهداف این مطالعه ۱۸

فصل دوم: مواد و روش ها

۲-۱- نمونه‌گیری ۲۰
۲-۲- جداسازی و شناسایی استافیلوکوک آرئوس ۲۰
۲-۳- تست بیوشیمیایی ۲۰
۲-۳-۱- شناسایی استافیلوکوک ها در سطح جنس و گونه ۲۰

۲-۳-۱-۱- تعیین هویت جنس استافیلوکوک ۲۱
۲-۳-۱-۲- آزمون کاتالاز ۲۱
۲-۳-۱-۳- آزمون مقاومت به باسیتراسین ۲۱
۲-۳-۱-۴- تعیین هویت گونه استافیلوکوک اورئوس ۲۱
۲-۳-۱-۵- بررسی وجود آنزیم DNase ۲۱
۲-۳-۱-۶- بررسی وجود آنزیم coagulase ۲۲
۲-۳-۱-۷- تخمیر مانیتول ۲۲
۲-۴- تعین حساسیت دارویی ۲۲
۲-۴-۱- آنتی بیوگرام به روش Disk diffusion ۲۲
۲-۴-۲- تهیه محلول استاندارد Mc Farlan ۲۴
۲-۴-۳- MIC: Minimum Inhibitory Concentration ۲۴
۲-۴-۴- تفسیر نتایج ۲۵
۲-۵- استخراج DNA با استفاده از فنل-کلروفرم ۲۶
۲-۶- آزمون PCR ۲۷
۲-۷- الکتروفورز محصول PCR ۲۹
۲-۸- PFGE ۲۹
۲-۸-۱- آماده سازی استافیلوکوک اورئوس ۲۹
۲-۸-۱-۱- آماده سازی سوسپانسیون باکتری ۲۹
۲-۸-۱-۲- تهیه پلاک ۳۰
۲-۸-۱-۳- هضم آنزیمی ۳۰
۲-۹-۲- آماده سازی مارکر ۳۱
۲-۹-۲-۱- تهیه سوسپانسیون باکتری ۳۱
۲-۹-۲-۲- تهیه پلاک ۳۱
۲-۹-۲-۳- شستشو ۳۲
۲-۹-۲-۴- هضم آنزیمی ۳۲
۲-۹-۳- الکتروفورز ۳۲
۲-۹-۴- رنگ آمیزی ۳۳

فصل سوم: نتایج

۳-۱- جداسازی استافیلوکوک اورئوس های مقاوم به اگزاسیلین ۳۵
۳-۲-گروه بندی سنی بیمارانی که MRSA از آنها جدا شده است ۳۵
۳ -۴-درصد کلی سویه هایMRSAجمع آوری شده از هر دو بیمارستان با توجه به موضع جداسازی ۳۷
۳-۵- آزمون های تعیین حساسیت دارویی ۳۸
۳-۵-۱-آنتی بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن ۳۸
۳-۵-۲-استافیلوکوک اورئوس های مقاوم به اگزاسیلین(MRSA) ۳۸
۳-۵-۳-گروه بندی سویه های MRSA بر اساس مقاومت آنتی بیوتیکی ۴۰
۳-۵-۴-میزان سویه های چند مقاومتی ۴۲

۳-۵-۵-تعیین میزانMIC به روشMicro dilution ۴۲
۳-۷-آزمونPCR ۴۳
۳-۷-۱-PCR جهت شناسایی ژنmecA ۴۳
۳-۸-نتایج حاصل از PFGE ۴۴
۳-۹-آنالیز نتایج ۴۷

فصل چهارم: بحث

بحث ۴۹
پیشنهادات ۵۹
ضمیمه ۱ ..... ۶۰
منابع ۶۳

فهرست جداول

۱-۱- معیارهای تفسیر نتایجPFGE ۱۶
۱-۲- چگونگی تفسیر دندروگرام رسم شده از طریق ضریب Dice ۱۷
۱-۳-تست های بیوشیمیایی استافیلوکوک اورئوس ۲۰
۲-۳- استانداردهای حساسیت ومقاومت آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده ۲۳
۲-۵-PCR Mixture مورد استفاده جهت تکثیر ژن مقاومت استافیلوکوک اورئوس ۲۸
۳-۱- توزیع فراوانی استافیلوکوک اورئوس های مقاوم درگرو های سنی مختلف ۳۵
۳-۲- توزیع فراوانیMRSA در بیمارستان های مختلف ۳۵
۳-۳- درصد ایزوله های جداشده از بخش های مختلف بیمارستان های شریعتی و لقمان ۳۶
۳-۴-درصد سویه های مقاوم با روش دیسک دیفیوژن ۳۸
۳-۵- الگوهای مقاومت آنتی بیوتیکی MRSA ۴۰
۳-۶-توزیع فراوانی و درصد سویه های MRSA جدا شده بر حسب MIC ۴۳

فهرست تصاویر

۱-۱- انواع کاست کروموزومی mec ۱۲
۳-۱-الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوک اورئوس مقاوم به اگزاسیلین ۴۱
۳-۲-PCRژن mecA ۴۴
۳-۳- شمایی از یک زل PFGE ۴۵
۳-۴- شمایی از یک زل PFGE ۴۵
۳-۵- شمایی از یک زل PFGE ۴۶
۳-۶- شمایی از یک زل PFGE ۴۶
۳-۷- شمایی از یک زل PFGE ۴۷
۳-۸- شمایی از یک زل PFGE ۴۷
۳-۹- نمایشگر نتایج حاصل از آنالیز الگو های به دست آمده ازMRSA ۴۹

فهرست نمودارها

۳-۱- درصد کلی سویه های MRSA جمع آوری شده از هر دو بیمارستان با توجه به موضع جداسازی ۳۷
۳-۲- درصد سویه‌های MRSA به روش دیسک دیفیوژن ۳۹
۳-۳-درصد سویه های چند مقاومتی ۴۲

چکیده

مقدمه: سویه های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین(MRSA)، از جمله علل اصلی عفونت های بیمارستانی در دنیا هستند. درمان عفونت حاصل از این باکتری به علت مقاومت چند دارویی مشکل است. بنابراین تشخیص دقیق این از اهمیت زیادی برخوردار است. مقاومت به متی سیلین توسط کاست متحرک کروموزومی *mecA* بر روی کروموزوم باکتری انجام می گیرد. علاوه بر تشخیص فنوتیپی وجود ژن مقاومت به وسیله روش آنتی بیوگرام، از PCR نیز جهت اتشخیص استفاده شده است.

مواد و روش ها: درطی این مطالعه از ۵۵۰ نمونه از بیمارستان های لقمان و شریعتی که اکثر آنها شامل زخم و خون و مایعات بدن بودند، جمع آوری گردید که از این تعداد۳۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس تشخیص داده شد. کلیه آزمایشات تعیین هویت باکتری، تست سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن و MIC اگزاسیلین به روش micro dilution با استفاده از روش های استاندارد بین المللی انجام شدند. سپس آزمایش PCR جهت تشخیص ژن mecA در سویه های مقاوم به اگزاسیلین انجام شده و برای کلیه سویه های MRSA روش pulsed field gel electrophoresis جهت تایپینگ مولکولی آنها به کار گرفته شد.

نتایج: از تعداد ۳۵۰ سویه استافیلوکوکوس اورئوس بر اساس آزمایشات سنجش حساسیت آنتب بیوتیکی و MIC در مجموع ۱۰۸(۳۲/۳٪) سویه MRSA تشخیص داده شدند. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی این سویه ها نشان دهنده بالا بودن میزان سویه های چند مقاومتی بود به طوری که مقاومت نسبت به ۱۰ آنتی بیوتیک ۶۷٪و ۱۱ آنتی بیوتیک ۱۷٪ مشاهده گردیدو در مجموع ۲۵ الگوی آنتی بیوتایپی در این سویه ها مشخص گردید. آزمایشات PCR در خصوص کلیه سویه های MRSA نشان دهنده وجود ژن mecA در آنها بود. بر اساس نتایج PFGE در مجموع ۱۸ پالسوتایپ شناسایی شده که از این تعداد ۱۵ common type و ۳ single type مشخص گردیدند. در بین common type ها، ۵ تایپ غالب (A-E) شناسایی شدند که ۷۶٪ از سویه ها را در بر می گرفتند.

بحث: در این مطالعه فراوانی سویه های MRSA در جمعیت مورد مطالعه ۳۲/۳ درصد بود که در مقایسه با مطالعات مشابه هشدار دهنده می باشد. مقاومت بالای آنتی بیوتیکی در این سویه ها می تواند در نتیجه مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها و رعایت نکردن اصول بهداشتی در بین پرسنل و بیماران باشد.

از این رونیاز به تشخیص به موقع و دقیق این سویه ها بخصوص در محیط های بیمارستانی بخوبی مشخص است. از آنجایی که در کلیه مباحث اپیدمیولوژی عفونت های بیمارستانی تایپینگ سویه ها و بررسی و شناسایی منابع انتقال این عفونت ها همواره از ارزش زیادی برخوردار بوده اند، در این مطالعه با استفاده از روش PFGE که استاندارد طلایی در مولکولار تایپینگ سویه های MRSA می باشند مشخص گردید که ۵ تایپ غالب از این سویه ها در حال چرخش در بیمارستان های مورد مطالعه هستند و مطلب قابل توجه این است که پالسوتایپ های موجود در تمام ۵ common type بصورت تقریبا یکنواختی در هر دو بیمارستان مورد مطالعه شیوع دارند که این مطلب می تواند احتمال وجود این پالسوتایپ ها را در سایر مراکز بیمارستانی، نشان دهد. از آنجایی که سویه های MRSA در برخی از پالسوتایپ های غالب دارای مقاومت چندگانه نیز هستند این مطلب هشداری مهم جهت مسئولین کلیه مراکز بیمارستانی و کمیته های کنترل عفونتهای بیمارستانی در آن مراکز جهت توجه به پروتکل های صحیح درمانی و رعایت اصول بهداشت در میان پرسنل بیمارستانی و بیماران می باشد. بدیهی است مطالعه مشابه در سایر بیمارستان هاو اشتراک نتایج آنها با مطالعه حاضر می تواند زنجیره پژوهش های مولکولار تایپینگ سویه های MRSA بیمارستانی را محکمتر و اطلاعات حاصل از آن را مستند تر در اختیار مسئولین بهداشتی جامعه قرار دهد. همچنین مطالعات مشابه در خصوص تایپینگ سویه های MRSA در بیماران سرپایی نیز از اهمیت خاصی برخوردار خواهد بود.

مقاومت بالای آنتی بیوتیکی در سویه های استافیلوکوک اورئوس در بیماران بیمارستانی می تواند در نتیجه مصرف نادرست آنتی بیوتیکها، رعایت نکردن اصول بهداشتی در محیطهای بیمارستانی و در بین کارکنان و پرسنل بیمارستان باشد.

از این رو لزوم تشخیص به موقع و صحیح این سویه ها بخصوص در محیط های بیمارستانی احساس می شود و از طرفی درمان با آنتی بیوتیکهایی نظیر وانکومایسین و تیکوپلانین که آخرین درمان محسوب می شود،پر هزینه ودارای عوارض جانبی بسیاری برای بیماران میباشد.با در دست داشتن الگوی مقاومت سویه های MRSA و دانش تایپینگ سویه ها برای پیدا کردن سویه غالب با استفاده از PFGE می توان قدمهای موثری در جهت کنترل روند مقاومت این سویه ها و جلوگیری از شیوع بیشترعفونتهای ناشی از آنها شد .

کلمات کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، متی سیلین،بیمارستان، پالس فیلد ژل الکتروفورز

فصل اول

کلیات

۱-۱- استافیلوکوک ها

استافیلوکوک ها از نخستین باکتری های بیماریزایی هستند که صفات آنها در اوایل دهه ۱۸۸۰ شناخته شد. جنس استافیلوکوکوس در خانواده میکروکوکاسه با دو جنس میکروکوکوس و پلانوکوکوس قرارداده شده است. گونه های جنس میکروکوکوس و پلانوکوکوس در انسان بیماریزا نیستند ولی میکروکوک ها به علت شباهت با استافیلوکوک ها از نظر میکروب شناسان پزشکی مورد توجه قرار دارند و همواره باید این دو را از یکدیگر متمایز ساخت (۲).

استافیلوکوک ها در طبیعت انتشار وسیع داشته و غالباً به صورت میکروفلور نرمال پوست و غشاهای مخاطی در بینی و بخش فوقانی دستگاه تنفس در انسان و حیوانات حضور دارند.

جنس استافیلوکوک حداقل ۳۰ گونه دارد که سه گونه *اورئوس*[1]، *اپیدرمیدیس*[2] و *ساپروفیتیکوس*[3] از اهمیت بالینی برخوردارند (۲).

۱-۲-فیزیولوژی و ویژگی های کشت

استافیلوکوک ها به آسانی با رنگ های بازی رنگ گرفته و قویاً گرم مثبت می شوند. این کوکسی ها دارای قطری حدود ۰/۵ تا ۱/۵ میکرون هستند که در محیط کشت مایع به صورت منفرد، دوتایی، چهارتایی و زنجیره ای مشاهده می شوند. این باکتری ها معمولاً به صورت اجتماعات نامنظم و به شکل خوشه انگور دور هم قرار می گیرند که به علت نحوه تقسیم سلول های استافیلوکوک، خوشه ها در چند سطح ایجاد می گردد. برخی ازسویه ها کپسول دارند و وجود کپسول را می توان با مشاهده مورفولوژیکی یا با روش های ایمنولوژیکی تشخیص داد(۱).

سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* پیگمان های کاروتنوئیدی تولید کرده و کلنی های زرد طلایی یا کرم رنگ بوجودمی آورند. در محیط کشت تازه، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* کلنی هایی به رنگ خاکستری تا سفید دارد و گاهی در محیط کشت کهنه کلنی ها زرد کمرنگ می شوند. سویه های *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوکوس هومینیس*[4] کمتر پیگمان ایجاد می کنند(۱).

استافیلوکوک ها غیر متحرک و بدون اسپورند. از نظر متابولیکی اغلب بی هوازی اختیاری اند ولی رشد در شرایط هوازی بهتر انجام می گیرد. این باکتری ها با سرعت بسیار زیاد در دمای ۳۰ تا ۳۷ درجه سانتی گراد رشد می کنند(۳).

بر روی آگار خون دار اکثر کلنی های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس همولیتیکوس*[5] با یک هاله بتاهمولیز احاطه می شوند. سایر گونه ها غیرهمولیتیک بوده وهمولیز نوع آلفا در استافیلوکوک ها معمولاً دیده نمی شود(۹).

---

[1] *Staphylococcus aureus*
[2] *Staphylococcus epidermidis*
[3] *Staphylococcus saprophyticus*
[4] *Staphylococcus hominis*
[5] *Staphylococcus haemolyticus*

نیازمندی های غذایی استافیلوکوک ها پیچیده نیست و انواع هیدرات های کربن را در شرایط هوازی تجزیه و اسید تولید می کنند. در حقیقت تفاوت در تجزیه هیدرات های کربن یکی از پایه های متمایز کردن گونه های استافیلوکوکی می باشد.
از آنجایی که اغلب سویه ها در محیط دارای ۱۰٪ کلرید سدیم و حتی برخی در غلظت ۱۵٪ رشد می کنند، جدا کردن باکتری ها بر اساس تحمل نمک در محیط های انتخابی نظیر مانیتول سالت آگار (MSA) پایه گذاری می شود. این ویژگی از نظر نگهداری مواد غذایی نیز حائز اهمیت است زیرا برخی از استافیلوکوک ها با رشد در چنین شرایطی انتروتوکسین ایجاد کرده و موجب مسمومیت غذایی می شوند(۹).
استافیلوکوک ها نسبت به اشکال رویشی اکثر باکتری های بیماریزا، نسبت به گرما و مواد ضدعفونی کننده مقاومت بیشتری دارند. این باکتری ها در $80^{\circ}C$ به مدت ۱ ساعت زنده می مانند در حالی که اغلب باکتری ها در دمای $60^{\circ}C$ طی ۳۰ دقیقه کشته می شوند. آنها نسبت به خشکی هم مقاومند و در چنین شرایطی قادرند مدت طولانی عفونت زا باقی مانده و به راحتی توسط ذرات گرد و غبار هوا منتشر شوند(۹).

۱-۳-روش های شناسایی

استافیلوکوک ها و میکروکوک ها از خانواده میکروکوکاسه هستند که انتشار وسیعی در آب، خاک و پوست پستانداران دارند (۷). میکروکوک ها کوکسی های گرم مثبت غیر متحرک، هوازی اجباری، مولد کاتالاز و کوآگولاز منفی هستند که معمولاً در محیط های کشت کلنی های زرد، نارنجی یا قرمز رنگ دارند. این باکتری ها بیماریزا نیستند اما متمایز کردن آنها به ویژه از استافیلوکوک های کوآگولاز منفی[1] (CNG) لازم می باشد(۳).
ازجمله تفاوت های دو جنس استافیلوکوک و میکروکوک ترکیب شیمیایی دیواره سلولی است. استافیلوکوک ها در پل های پپتیدی پپتیدوگلیکان دارای پیوند میانی حاوی پنتا گلیسین هستند که در میکروکوک ها وجود ندارد. درصد G+C در میکروکوک ها حدود ۷۳-۶۶ ٪ است که تقریباً دو برابر آن در استافیلوکوک ها می باشد(۴).
بیشتر میکروکوک ها به تراکم معینی از لیزوزیم حساسند در حالیکه استافیلوکوک ها نسبت به همان غلظت از لیزوزیم مقاومند. لیزوزیم آنزیمی است که اتصال گلیکانی بین ان- استیل مورامیک اسید (NAM[2]) و ان- استیل گلوکز آمین (NAG[3]) را در دیواره سلولی باکتری ها می شکند.
از طرف دیگر، استافیلوکوک ها نسبت به لیزواستافین حساسند زیرا لیزواستافین اتصالات گلیسین - گلیسین را تجزیه می کند اما میکروکوک ها به دلیل فقدان اتصالات گلیسین به لیزواستافین ($200\mu g / ml$) مقاومند(۱۲).
همچنین میکروکوک ها دارای سیتوکروم C هستند که تست اکسیداز اصلاح شده را برای آنها مثبت نشان می دهد و بر خلاف استافیلوکوک ها به آنتی بیوتیک باسیتراسین ($0/04u$) حساس هستند(۷).
در آزمایشگاه های کلینیکی برای تشخیص استافیلوکوک ها از میکروکوک ها از واکنش های اکسیداسیون- تخمیر استفاده می شود. استافیلوکوک ها به دلیل توانایی رشد و تخمیر گلوکز تحت شرایط بی هوازی از میکروکوک ها قابل تمایزند. هرچند

[1] Coagulase-Negative Staphylococci
[2] N-acetylmuramic acid
[3] N-acetylglucose amine

بعضی از آنها نظیر *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* به دلیل رشد بسیار محدود تحت شرایط بی هوازی ممکن است با میکروکوک ها اشتباه شود(۳).

مهمترین تست برای تشخیص استافیلوکوک ها در حد گونه، تست کوآگولاز است که گاهی بعنوان تست شناسایی استافیلوکوک های بیماریزا عنوان می شود(۵). در بین استافیلوکوک ها تنها *استافیلوکوکوس اورئوس* و دو گونه حیوانی با نام های *استافیلوکوکوس اینترمدیوس*[1] و *استافیلوکوکوس هیکوس*[2] کوآگولاز ایجاد می کنند. ارتباط بین تولید کوآگولاز و بیماریزایی را ۹۵٪ گزارش کرده اند(۶).

آنزیم کوآگولاز که عامل تشکیل لخته است به صورت پروکوآگولاز تولید می شود. این پروتئین نسبتاً مقاوم به گرما است و به دو شکل آزاد و متصل به سلول ظاهر می شود. کوآگولاز متصل به سلول که فاکتور لخته کننده[3] نامیده می شود، پلاسمای انسان، خرگوش یا خوک را لخته می کند. این آنزیم با تست سریع اسلاید قابل شناسایی است اما در ۵٪ سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید نمی شود. در این صورت باید در این ایزوله ها توانایی تولید کوآگولاز خارج سلولی (کوآگولاز آزاد) بررسی شود(۱۰). کوآگولاز آزاد ماده ای شبیه ترومبین است. وقتی سوسپانسیونی از ارگانیسم تولید کننده کوآگولاز در پلاسما قرار می گیرد، فاکتور واکنش دهنده با کوآگولاز[4] که در پلاسما وجود دارد با کوآگولاز آزاد واکنش داده و فیبرینوژن را به فیبرین تبدیل می کند. ارگانیسم هایی که هیچ نوع کوآگولازی تولید نمی کنند کوآگولاز منفی به شمار می روند. از این گروه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* از لحاظ کلینیکی اهمیت بیشتری دارند(۱۰).

۱-۴-آنزیم ها

الف- کاتالاز: این آنزیم پراکسید ئیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می کند. تست کاتالاز استافیلوکوک ها را از استرپتوکوک ها (که کاتالاز منفی هستند) متمایز می کند(۱۶).

ب -کواگولاز و فاکتور منعقد کننده: کواگولاز پلاسمای سیتراته یا اگزالاته را در حضور فاکتوری در سرم بیمار، لخته می کند.

ج-هیالورنیداز: این آنزیم اسید هیالورونیک، موکوپلی ساکاریدهای اسیدی موجود در ماتریکس بدون سلول نسج هم بندی را هیدرولیز می کند هیالورونیداز انتشار استافیوکوکوس اورئوس در نسوج را تسهیل می نماید. بیشتر از ۹۰٪ سویه های استافیلوکوک اورئوس این آنزیم را تولید می کنند(۱۴).

د-فیبرینولیزین: این آنزیم که بنام استافیلوکیناز نیز موسوم است، در واقع توسط تمام سویه های استافیوکوک اورئوس تولید می شودو موجب تجزیه لخته های فیبرین می گردد. این آنزیم با آنزیم های فیبرینولیتیک که توسط استرپتوکوک ها ایجاد می شود، تفاوت دارد.

ر-لیپازها: تمام سویه های استافیلوکوک اورئوس و بیش از ۳۰٪ استافیلوکوک های کوآگولاز منفی چند لیپاز متفاوت تولید می کنند. این آنزیم ها موجب هیدرولیز لیپید ها می شوند. این موضوع برای بقای استافیلوکوک ها در نواحی چربی بدن اساسی

---

[1] *Staphylococcus intermedius*
[2] *Staphylococcus hyicus*
[3] Clumping Factor
[4] Coagulase Reacting Factor

است. اعتقاد بر این است که این آنزیم ها برای تهاجم استافیلوکوک به نسوج جلدی و زیرجلدی و تشکیل عفونت های پوستی سطحی(نظیر کورک یا جوشها) و کفگیرک ضروری هستند(۱۴).

ه- نوکلئاز: آنزیم مقاوم در برابر حرارت استافیلوکوک اورئوس بوده و وجود آن نشانه دیگری از حضور باکتری مزبور می باشد. نقش این آنزیم در پاتوژنز ناشناخته است.

ی-پنی سیلیناز: زمانیکه پنی سیلین برای کنترل عفونت های باکتریایی معرفی گردید بیش از ۹۰٪ از استافیلوکوک ها به آن حساس بودند. بهرحال مقاومت به پنی سیلین بسرعت توسعه یافت و عامل این مقاومت نیز تولید پنی سیلیناز توسط باکتری است(۱۶).

۱-۵-توکسین ها

د- اگزوتوکسین ها: توکسین های متعددی وجود دارند که در تزریق به حیوانات کشنده هستند. آنها موجب نکروز پوست شده و حاوی همولیزین های محلول می باشند که در الکتروفورز قابل جداسازی هستند(۱۳).

ه- لکوسیدین: این توکسین گلبول های سفید انسان و خرگوش را تخریب می کند.

و- توکسین اکسفولیاتیو: توکسین های اپیدرمولیتیک استافیلوکوک ارئوس، دو پروتئین مجزا با وزن ملکولی مشابه هستند که موجب پوسته ریزی منتشر یا نشانگان شبه سوختگی جلدی می شوند(۱۴).

ز- توکسین سندرم شوک سمی: این توکسین موجب بروز تب، شوک و گرفتاری چندین عضو بدن می شود. ژن توکسین شوک سمی در حدود ۲۰درصد نمونه ها استافیلوکوک ارئوس یافت شده است(۱۳).

ح- انتروتوکسین ها: تقریباً ۵۰درصد از سوش های استافیلوکوک ارئوس می توانند یک یا چند انتروتوکسین را تولید کنند که در برابر حرارت پایدار هستند و عامل مهمی در مسمومیت غذایی هستند.

توکسین اکسفولیاتیو، توکسین سندرم شوک سمی و انتروتوکسین ها سوپرآنتی ژن هستند(۱۸و

۱-۶-بیماری زایی:

ظرفیت بیماری زایی یک سوش معین از استافیلوکوک ارئوس، ترکیبی از اثرات فاکتورها و توکسین های خارج سلولی در همراهی با خصوصیات تهاجمی آن است.

سندرم پوستی پوسته ریزی دهنده(SSS)(Scaled skin syndrome)

این بیماری بدون ایجاد عفونت تهاجمی و با تولید سم ایجاد می شود، که بیشتر منجر به بروز بیماری در کودکان زیر یکماه می شود، این بیماری با وقوع ناگهانی اریتم دور دهان که طی ۲ روز انتشار یافته و تمام سطح بدن را می پوشاندمشخص شده و در اثر فشار قوی پوست جابه جا می شود.کمی پس از آن تاول های بزرگ یا وزیکول های پوست تشکیل می شوند و بدنبال آن پوسته ریزی اپی تلیوم رخ می دهد(۱۷).

یک شکل موضعی SSS زرد زخم تاولی است. سویه های اختصاصی استافیلوکوک اورئوس مولد سم موجب بروز وزیکول های سطحی پوست می شوند، زرد زخم تاولی دارای وزیکول های لوکالیزه است که از نظر کشت باکتری مثبت هستند.

سندرم شوک توکسیک(Toxic shock syndrome) :(TSS)

این بیماری نیز با تولید سم ایجاد می شود، غالبا طی ۵ روز پس از شروع قاعدگی در خانم های جوانی که تامپون به کار می برند دیده می شودولی در کودکان و مردانی که زخم های استافیلوکوکی دارند هم ایجاد می شود.با شروع ناگهانی تب بالا، استفراغ، اسهال، درد عضلانی، بثورات مخملی شکل و درموارد شدید با افت فشار خون و نارسایی قلبی و کلیوی تظاهر می یابد(۱۷).

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی:

مسمومیت غذایی استافیلوکوکی که یکی از شایعترین مسمومیت ها در مصرف غذاست در حقیقت عفونت به حساب نمی آید ۵ تیپ سرولوژیکی از انتروتوکسین ها(A تا E) وجود دارد، مسمومیت غذایی ناشی از انتروتوکسین استافیلوکوکی با دوره نهفتگی کوتاه(۱تا۸ساعت)، تهوع شدید، استفراغ و اسهال و دوره نقاهت سریع تظاهر می یابد و تب در آن وجود ندارد(۱۷).

عفونت های جلدی:

عفونت های استافیلوکوکی پیوژن شامل زردزخم، فولیکولیت،کورک و کفگیرک می باشد،فولیکولیت یک عفونت موضعی پیوژنیک فولیکول مو است ،کورک ها یا جوش ها در اثر توسعه فولیکولیت بوجود می آیند و از بهم پیوستن کورک ها کفگیرک بوجود می آید(۱۲).

باکتریمی و آندوکاردیت

استافیلوکوک اورئوس شایعترین ارگانیسم گرم مثبت مسبب باکتریمی است،اندوکاردیت ناشی از استافیلوکوک اورئوس یک بیماری شدید، با میزان مرگ و میر بالا می باشد(۱۲).

پنومونی و آمپیم:

بیاری تنفسی استافیلوکوک اورئوس بدنبال آسپیره کردن ترشحات دهانی یا انتشار خونی ارگانیسمها بوجود می آید، آمپیم در ۱۰٪ از مبتلایان به پنومونی رخ می دهد و استافیلوکوک اورئوس مسئول یک سوم کل آمپیم می باشد(۱۲).

استئومیلیت و آرتریت سپتیک:

استئومیلیت ناشی از استافیلوکوک اورئوس در نتیجه یک عفونت خونی یا عفونت ثانویه بعلت ضربه یا یک عفونت استافیلوکوکی می باشد،استافیلوکوک اورئوس عامل اولیه آرتریت سپتیک در اثر تزریقات داخل مفصلی در بچه ها و بالغین و نیز افرادیست که مفاصل آنها از نظر مکانیکی نیز طبیعی می باشد(۱۲).

عفونت های ناشی از استافیلوکوک های کوآگولاز منفی:

استافیلوکوکوس اپیدرمیس:

استافیلوکوک اپیدرمیس و استافیلوکوک های کوآگولاز منفی وابسته موجب عفونت در دریچه طبیعی و مصنوعی قلب می شوند،این نوع از آندوکاردیت استافیلوکوکی نسبتا نادر بوده و بطور شایع با استرپتوکوک همراه است همچنین در ایجاد عفونت های ناشی از استفاده از وسایل خارجی نیز نقش دارند.

این عفونت بدلیل توانایی تولید بیوفیلم در استافیلوکوک اپیدرمیس می باشد و عفونت های مربوط به مفصل مصنوعی که بیشتر در مفصل ران مشاهده می شود، تظاهرات بالینی عفونت، معمولا محدود به درد موضعی و نقص حرکتی مفصل می باشد(۱۸)

استافیلوکوک ساپروفیتیکوس:

بیشتر باعث عفونت های مجاری ادراری در خانم ها در سنین جوانی مشاهده می شود(۱۸).

۱-۷-۱-استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین *MRSA* (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*)

استافیلوکوک اورئوس در سال ۱۸۸۰ کشف شد و یک باکتری بالقوه بیماریزای گرم مثبت که باعث بیماریهایی نظیر عفونت های پوستی و عفونت های زخم های پس از جراحی شناخته شد. در اوایل ۱۹۴۰ قبل از معرفی پنی سیلین بعنوان درمان عفونت های استافیلوکوک اورئوس سرعت مرگ و میر با عفونت های استافیلوکوکوس اورئوس در حدود ۸۰٪ بود(۵).

استافیلوکوک ارئوس به دلیل قدرت تخریب بالقوه ومقاومت روزافزون در برابر داروهای ضد باکتریایی به صورت یکی از نگرانی های سلامت عمومی باقی مانده است. در سال ۱۹۴۲، ۲ سال پس از معرفی پنی سیلین برای مصرف پزشکی، اولین سویه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم در بیمارستان مشاهده شد و پس از آن سویه های مقاوم به پنی سیلین در جوامع مشاهده شدند(۲۴). از سال ۱۹۶۰ حدود ۸۰٪ سویه های استافیلوکوکوس اورئوس به پنی سیلین مقاوم بودند. در سال ۱۹۶۱، ۲ سال پس از معرفی متی سیلین، مقاومت به متی سیلین مشاهده شد و این مقاومت در نتیجه وجود ژن *mecA* گزارش شد. در حال حاضر به جز درصد کمی از سویه های استافیلوکوک ارئوس تمام آنها بتا لاکتاماز تولید می کنند و نسبت به پنی سیلین ها مقاوم هستند. بامشاهده اولین سویه های استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین *(MRSA)* در سال ۱۹۶۱ ،به تدریج میزان شیوع عفونت های بیمارستانی و مرگ و میر ناشی از این عوامل، بشدت رو به افزایش نهادو در طول ۴۵ سال اخیر کلون های *HA-MRSA (hospital acquired methicillin-resistant staphylococcus aureus)* یعنی سویه های مقاوم به متی سیلین در بیمارستان در سراسر جهان گزارش شد و از سال ۱۹۹۰ سویه های *(community acquired CA-MRSA methicillin-resistant staphylococcus aureus)* که بوسیله وجود توکسین پنتون والنتین لوکوسیدین مشخص می شد در سراسر جهان از جوامع گزارش شد(۲۳).

بر اساس تعریف،استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی سیلین به سویه هایی از استافیلوکوک اورئوس گفته میشود که یا حامل ژن *mecA* باشند و یا اینکه حداقل غلظت مهارکنندگی اگزاسیلین ۴μg/ml و یا بیشتر را از خود نشان دهند(۲) .

اکثر سویه های *MRSA* دارای مقاومت و یا کاهش حساسیت نسبت به دیگر عوامل آنتی بیوتیکی می باشند که این مساله باعث ایجاد مشکلات درمانی و جلوگیری از انتشار این پاتوژنها میگردد. مسوولین مراقبت های بهداشتی و کنترل عفونت در بیمارستانها باید ضمن بررسی میزان شیوع باکتری، برنامه هایی جهت جلوگیری از انتشار این ارگانیسم ارائه نمایند که در این راستا دانستن الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و نقش عوامل مرتبط با بروز مقاومت می تواند در برنامه های کنترل عفونت مفید باشد(۲).

از طرف دیگر پیدایش سویه های با MIC بالا نسبت به اگزاسیلین می تواند باعث مشکلات در درمان بخصوص برای بیماران بستری در بیمارستانها شود که بدنبال آن لزوم استفاده از داروهایی نظیر وانکومایسین که سمی بوده و مصرف آن مقرون به

صرفه نمی باشد، دلیلی برای تلاش در جلوگیری از گسترش و شیوع سویه های *MRSA* با MIC بالا میباشد، طبق گزارشات اخیر در میان بیماران بیمارستانی مبتلا به باکتریمی *MRSA* میزان MIC بالای وانکومایسین نیزگزارش شده است(۵).

مقاومت به متی سیلین و دیگر مشتقات خانواده آنتی بیوتیکهای خانواده بتالاکتام،ناشی از وجود ژن *mecA* به طول 2.1kb میباشد(۵). تا کنون ۷ نوع مختلف از Staphylococcal cassette chromosome (SCCmec) شناسایی شده که میزان شیوع متفاوتی را در انواع سویه های بیمارستانی و غیر بیمارستانی دارند(۲۸).

مقاومت به متی سیلین نشان دهنده مقاومت به تمامی پنی سلین های مقاوم به پنی سلیناز و سفالوسپورین ها می باشد.در مطالعهOrret و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داده شد که از ۶۰/۱ درصد از زخم های جراحی و سوختگی و ۱۵/۵ درصد از نمونه های ادرار و ۶/۶ درصد از نمونه های مجاری تنفسی فوقانی استافیلوکوک ارئوس مقاوم به متی سیلین جدا شد (۱). در مطالعه Nimmo و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داده شد که از ۲۶۵۲ نمونه استافیلوکوک ارئوس جدا شده ۳۹۵ (۱۴/۹ درصد) مقاوم به متی سیلین بودند(۲).
استافیلوکوک ارئوس مقاوم به متی سیلین (*MRSA*) از پاتوژن های شایع بیمارستانی است که در طی دهه های اخیر میزان شیوع آن در سراسر جهان در حال افزایش می باشد (۱۷-۳).

۱-۷-۲-تکامل *HA-MRSA*

اولین *MRSA* در سال ۱۹۶۱ در انگلستان جداسازی شد. در طول سال های بعدی *MRSA* در کشورهای دیگر اروپایی شیوع پیدا کرد و تا سال ۱۹۷۰،MRSA در کل دنیا پخش شد(۲۹).
برنامه نظارت ضدمیکروبی SENTRY، شیوع *MRSA* در بیمارستان های سراسر دنیا از سال ۱۹۹۷ تا ۱۹۹۹ را مورد بررسی و تحقیق قرار داده و مشاهده نموده است که شیوع *MRSA* در استرالیا ۲۳٪ در ژاپن ۶۷٪، امریکای لاتین ۳۵٪، افریقای جنوبی ۴۰٪ و در امریکا و اروپا به ترتیب ۳۲٪ و ۲۶٪ بوده است(۳۴و۳۵).
اگرچه شیوع *MRSA* بین کشورهای اروپایی متنوع می باشد، به طور مثال در کشورهای شمالی تقریبا ۱٪ و در کشورهای جنوبی بالای ۴۵٪ می باشد(۵۶).

۲ تئوری برای پیدایش *MRSA* وجود دارد که رابطه بین اولین *MRSA* و کلون های *MRSA* متنوع را توضیح می دهد،که یکی از آنها تک کلونی و دیگری چند کلونی می باشد(۶۷).
تئوری تک کلونی پیشنهاد می دهد که کلون های *MRSA* متنوع یک جد مشترک *MSSA* دارند، که فقط یکبار SCCmec را بدست آورده است و تئوری چند کلونی که بوسیله Enright ارائه شد،اعتقاد دارد که در آن کلون های *MRSA* متنوع دارای اجداد متنوع می باشند که در زمان های مختلف دارای SCCmec شده اند(۶۸).

۱-۷-۳-تکامل *CA-MRSA*

اولین بار CA-MRSA از استرالیای غربی در سال ۱۹۹۳ از جوامع بومی خارج از منطقه گزارش شد. CA-MRSA بر اساس تعریف CDC (مرکز کنترل و پیشگیری بیماری ها در امریکا) عبارتست از آن دسته از سویه هایی از MRSA که از بیماران out-patient جداسازی شده یا ایزوله هایی از بیماران با استقرار کمتر از ۴۸ ساعت در بیمارستان به علاوه این که این بیماران نباید هیچ سابقه پزشکی یا کلونیزاسیون با MRSA داشته و همچنین در طول یک سال گذشته نیز سابق بستری در بیمارستان را نداشته باشند(۶۵)

.سویه های CA-MRSA و HA-MRSA از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی با هم متفاوتند(۶۵).

برخلاف CA-MRSA،HA-MRSA به آنتی بیوتیک های بتالاکتام حساس می باشند و بر طبق مطالعاتی که بر اساس MLST و PFGE انجام گرفته، اجداد این دو با هم وابستگی ندارند.

بعلاوه تنوع سویه های CA-MRSA نسبت به سویه های HA-MRSA بیشتر است و از نظر اجداد،بیشتر می باشند، یعنی تعداد بیشتری از استاف اورئوس توانایی ایجاد CA-MRSA را دارند، همچنین اکثر سویه های CA-MRSA دارای تایپ های ۴و۵ و۷ از SCCmec typing می باشند و در چندین مطالعه هم تایپ های SCC mec typing ۱ و ۲ و ۳ را دارا می باشند(۶۵).

۱-۷-۴-استافیلوکوک های اورئوس مقاوم به متی سیلین در بیماران بیمارستانی(HA-MRSA)

مقاومت میکروبی به آنتی بیوتیک ها یک مشکل جهانی در زمینه پزشکی به حساب می آید و کنترل عفونت در بیماران بستری در بیمارستان ها دارای اهمیت ویژه ای می باشد و مقاومت آنتی بیوتیکی درعفونت های این بیماران می تواند به بروز مشکلات زیادی در درمان سایر بیماریهانیز منجر شود. از این رو بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در بیماران بیمارستانی اهمیت زیادی دارد،از آنجا که تقریبا ۸۰٪ عفونت های MRSAدر بیماران بیمارستانی وجود دارد، این بیماران پس از ترخیص می توانند به عنوان ناقلین بالقوه در اجتماع باعث بروز مشکلات عفونتی برای کل جامعه گردند(۷۱).

۱-۸-اهمیت تایپینگ سویه های MRSA بیمارستانی

دانستن توزیع پاتوژن و ارتباط آن، برای تعیین اپیدمیولوژی عفونت های بیمارستانی ضروری است و در طراحی روش های کنترل بیماریزا کمک می کند(۲۵).

کاربرد روش های مولکولی برای تایپینگ پاتوژن های بیمارستانی گامی مهم جهت به دست آوردن یک تشخیص اساسی از قرابت سویه ها ی شایع در عفونت های بیمارستانی است(۲۴).

ارائه کلونالیتی پاتوژن ها در شناسایی منبع(محیطی یا فردی) ارگانیسم، تشخیص سویه عفونت زا از غیر عفونت زا و تشخیص عود عفونت از عفونت جدید کمک می کند(۲۵).