دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زنجان

دانشکده داروسازی

پایان‌نامه

جهت دریافت دکترای حرفه‌ای داروسازی

عنوان:

راه اندازی تست تشخیص مولکولی سریع، برای شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس*های مقاوم به متی‌سیلین در پرسنل بیمارستان‌های آموزشی‌درمانی دانشگاه علوم پزشکی زنجان با استفاده از تکنیک Multiplex PCR

توسط:

مهدی حاصلی

استاد راهنما:

دکتر علی رمضانی

سال تحصیلی 92–1391 **شماره پایان نامه:** 2

تقدیم به

زیباترین شعر هستی،
مادر، که زیر پاهایش
بهشت را

می‌توان احساس کرد

وپشتیبان لحظه های
سختم، پدر، که استوار
بودن را به من یاد داد

وتقدیم به امیر حسین،
برادر عزیزم به خاطر
محبت بی‌دریغش به من

تقدیم به گل سرسبد عالم بشریت،
یگانه منجی انسان، که با آمدنش
دلنوازترین آهنگ را خواهد
نواخت، مهدی موعود (عج)

تقدیم به سیدوسالار شهیدان امام حسین مظلوم (ع) و یار با وفایش قمر منیر بنی هاشم

تقدیم به روح جاویدان مردی به بلندای تمامی انسانیت،پدربزرگ عزیزم، شادروان پرویز اسکندرزاده

تقدیم به روح سرافراز فرزند غیور آذربایجان، که ایران اسلامی همیشه تاریخ به وجودش افتخار خواهد کرد، شادروان غلامرضا مردانی آذر

تقدیم به همه‌ی عزیزانی که شادی من را شادی خود دانسته و در لحظات غمناک یار و یاورم بودند

عرض احترام و مراتب تشکر از:

استاد راهنمای محترم پایان نامه،جناب آقای دکتر علی رمضانی

ریاست محترم دانشکده،جناب آقای دکتر مهرداد حمیدی

معاونت محترم آموزشی،جناب آقای دکتر علیرضا یزدی نژا

دوست و استاد گرانقدر، جناب آقای دکترعلیرضا خوش خلق

معاونت محترم پژوهشی، سرکار خانم دکتر کبری رستمی زاده

مدیر محترم آموزش ، سرکار خانم دکتر مریم حسن

همکار محترم آزمایشگاه، آقای علیرضا خالقی خرمی

همکاران محترم گروه آموزش، سرکار خانم رواء، سرکار خانم رزاقی و جناب آقای رستمی

همکاران معاونت پژوهشی، جناب آقای دکتروکیلی و آقای دکتر سراج

همکاران گرامی داروخانه پاستور زنجان

دوستان گرامی ،آقای سام شادنوش ، آقای رضا خدادادی و دکتر میثم ملکی

دوست عزیزم آقای سید محسن موسوی

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فهرست شکل‌های پایان نامه..... IX

فهرست جداول..... X

کلمات اختصاری..... XII

خلاصه..... XIII

فصل اول

1-1.مقدمه..... 1

1-2.استافیلوکوک‌ها..... 2

1-3.تاریخچه..... 2

1-4. مرفولوژی سلول..... 3

1-5. مشخصات رشد و شکل کلنی..... 3

1-6. پوشش سلولی 4

1-7. دیواره سلولی..... 4

1-8. پپتیدوگلیکان 4

1-9. مواد خارج سلولی..... 5

1-9-1. آنزیم‌های خارج سلولی..... 5

1-9-2. سموم مترشحه توسط استافیلوکوک‌ها 6

1-10. ساختمان آنتی‌ژنیک 8

1-10-1. پلی‌ساکارید A.....8
1-10-2. پروتئین A.....8
1-10-3. آنتی ژن کپسولی.....8
1-11. ژنوم *استافیلوکوکوس اورئوس*.....8
1-11-1. پلاسمید 8
1-11-2. باکتریوفاژها 9
1-11-3. ترانسپوزون‌ها 9
1-12.تبادلات ژنتیکی در استافیلوکوک‌ها 9
1-12-1. کونژوگاسیون.....9
1-12-2. ترانسداکشن 10
1-12-3. ترانسفورمیشن.....10
1-13. بیماریزائی 10
1-13-1. عفونت‌های جلدی 10
1-13-2. سندرم شوک سمی.....11
1-13-3. استئومیلیت 12
1-13-4. پنومونی 12
1-13-5. انتروکولیت استافیلوکوکی 12
1-14. درمان.....12
1-15. عوامل ضد میکروبی 13

1-15-1. داروهای موثر در درمان *استافیلوکوس اورئوس*.....13

1-1-15-1. داروهای دسته بتالاکتام.....13

2-1-15-1. سایر داروها.....14

1-16. مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها.....14

1-16-1. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های دسته بتالاکتام 14

2-16-1. مقاومت به تتراسایکلین 15

3-16-1. مقاومت نسبت به آمینوگلیکوزیدها 15

4-16-1. مقاومت به تری‌متوپریم 16

5-16-1. مقاومت به فلوروکینولون‌ها 16

6-16-1. مقاومت به آنتی بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی – تیکوپلانین و ونکومایسین 17

7-16-1. مقاومت به اریترومایسین.....17

1-17. استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین 18

1-18. ژنتیک در MRSA 18

1-19. منشأ ژن *mecA* 19

1-20. شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) در بیمارستان‌ها.....20

1-21. روش‌های شناسائی مقاومت به اگزاسیلین و متی‌سیلین در استافیلوکوک‌ها 21

1-22.تست‌های شناسایی.....21

1-22-1. تست‌های شناسایی فنوتیپی.....21

1-1-22-1.کمترین غلظت مهارکنندگی 21

2-1-22-1.Disk Diffusion 22

3-1-22-1. غربال‌گری اگزاسیلین با آگار..... 22

4-1-22-1. روش آگلوتیناسیون لاتکس برای PBP2a..... 22

2-22-1. تست های شناسایی ژنوتیپی..... 22

1-2-22-1. تکثیر ژن *mecA* با (PCR)..... 22

2-2-22-1. تکثیر ژن *mecA* با real time PCR..... 24

23-1.مروری بر مطالعات انجام شده..... 24

1-23-1.مروری بر مطالعات انجام گرفته در کشورهای خارجی..... 24

1-23-2.مروری بر مطالعات انجام گرفته در داخل کشور..... 26

24-1.درآمد..... 27

فصل دوم

2-1 مواد و وسایل مورد نیاز..... 28

2-1-1 سویه های باکتریایی..... 28

2-1-2. ابزار و وسایل اولیه استفاده شده در تحقیق..... 28

2-1-3 مواد شیمیایی..... 29

2-1-4.کیت‌ها..... 30

2-1-5 دستگاه‌ها.....31

2-2. نمونه‌برداری.....32

2-2-1. نحوه کشت خطی (streaking)در محیط‌های کشت جامد.....32

2-3.آزمایشات تشخیصی اولیه برای شناسائی *استافیلوکوکوس اورئوس*.....33

2-3-1. کشت در محیط مانیتول‌سالت‌آگار.....33

2-3-2.مشاهده مستقیم زیر میکروسکوپ نوری.....34

2-3-2-1.رنگ‌آمیزی گرم.....34

2-3-3. آزمایش کاتالاز 34

2-3-4. آزمایش کوآگولاز 35

2-3-4-1. روش لوله‌ای 35

2-3-4-2. روش آزمایش روی لام.....35

2-4. تست تعیین حساسیت به روش انتشار دیسک در آگار.....36

2-4-1. تهیه محیط کشت مولر هینتون‌آگار.....36

2-4-2. تهیه سوسپانسیون میکروبی 36

2-4-3. روش تهیه محلول استاندارد 0/5 مک فارلند 36

2-4-4. کنترل کیفی دیسک‌ها 37

2-4-5. انجام آزمایش تعیین حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها با روش انتشار دیسک در آگار.....38

2-5. ذخیره سازی نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین.....38

2-6. تشخیص مولکولی *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش PCR.....39

2-6-1.استخراج DNA*استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین *جهت انجام* PCR 39

2-1-1-6.روش Boiling برای استخراج DNA.....39

2-6-1-2.روش فنل‌کلروفورم برای استخراج DNA 39

2-6-2. نگهداری DNA استخراج شده.....42

2-6-3. ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده و تعیین مقدار آن 43

2-6-4. طراحی پرایمرها.....43

2-6-5. آماده کردن مخلوط اصلی (MASTER MIX) 44

2-6-6.تکثیر کروموزوم اختصاصی *استافیلوکوکوس اورئوس*(*SA442*).....45

2-6-7. الکتروفورز محصول PCR :.....46

2-6-8. تکثیر کروموزوم اختصاصی ایجادگر مقاومت به متی‌سلین در *استافیلوکوکوس-اورئوس*(*mecA*).....48

2-6-9. تکثیر کروموزوم اختصاصی عامل ایجادگر کوآگولاز مثبت در *استافیلوکوکوس اورئوس*(*femA*).....49

2-6-10. تکثیر کروموزوم اختصاصی *استافیلوکوکوس اورئوس* (*SA442*)، ژن *mecA* و ژن *femA* همزمان با هم، به روش Multiplex PCR در دستگاه ترموسایکلر 51

2-7. کنترل کیفی 53

2-8. تعیین توالی ژن‌های تکثیر شده.....53

فصل سوم

3-1. نمونه برداری.....54

3-2.افراد مورد مطالعه بر حسب تفکیک جنسیتی 54

3-3. سابقه شغلی پرسنل مورد مطالعه.....54

3-4. نتایج سابقه مصرف خود سرانه آنتی بیوتیک.....55

3-5. نتایج مصرف دقیق و سر موقع آنتی‌بیوتیک (رأس ساعت مشخص، با فاصله مشخص از غذا با میزان کافی آب).....56

3-6. نتایج آخرین آنتی بیوتیک مصرفی توسط فرد مورد مطالعه.....56

3-7. کشت نمونه‌های به دست‌آمده 58

3-8. آزمایش میکروسکوپی گرم.....58

3-9. بررسی pH محیط‌های کشت مولرهینتون‌آگار و مانیتول‌سالت‌آگار.....59

3-10. زمان قرارگرفتن نمونه‌های محیط کشت مانیتول‌سالت‌آگار و مولرهینتون‌آگار داخل انکوباتور.....59

3-11. نتایج آزمایش کاتالاز.....59

3-12. نتایج آزمایش کوآگولاز.....60

3-13.تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی به روش دیسک دیفیوژن(کایربی بوئر).....61

3-14.نتایج حاصل از آزمایش تعیین حساسیت به روش دیسک‌دیفیوژن بر روی سویه استاندارد.....62

3-15. تشخیص ژن‌هابه روش PCR در دستگاه ترموسایکلر.....63

3-16. شناسایی هر سه قطعه ژنی *SA442*، *femA*، *mecA* در یک پروتکل به روش Mutiplex PCR.....66

3-17.تولی ژن*mecA* به فرمت FASTA.....68

3-18. .تولی یابی ژن*femA* به فرمت FASTA.....68

فصل چهارم

4-1.بحث.....70

4-2.نتایج و علت‌یابی ایجاد مقاومت.....74

4-3.پیشنهادات.....74

منابع.....76

ضمیمه.....83

خلاصه انگلیسی.....87

فهرست نمایه.....88

فهرست شکل‌های پایان نامه

عنوان شکل | صفحه

شکل2-1.نحوه کشت خطی در محیط‌های کشت جامد.....33

شکل3-1. نمونه‌ای از کشت خطی در محیط کشت مانیتول سالت آگار.....58

شکل3-2. نمونه‌ای از کشت خطی در محیط کشت مولر هینتون آگار برای تعیین آنتی‌بیوگرام.....58

شکل3-3. نمونه‌ای از شکل کلنی‌های خوشه‌ای گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* در زیر میکروسکوپ نوری.....59

شکل 3-4. نمونه‌ای از آزمایش کاتالاز مثبت.....60

شکل3-5. نمونه‌ای از آزمایش کاتالاز مثبت.....60

شکل 3-6. نمونه‌ای از آزمایش کوآگولاز مثبت.....60

شکل3-7. نمونه‌ای از تست آنتی‌بیوگرام در محیط کشت مولر هینتون آگار.....62

شکل3-8. نتایج الکتروفورز ژن *mecA* با اندازه bp310، روی ژل آگارز.....64

شکل3-9. نتایج الکتروفورز ژن *femA* در بازه bp686.....65

شکل3-10. نتایج الکتروفورز ژن *SA442* در بازه bp108.....66

شکل3-11. نتایج الکتروفورز هر سه ژن *SA442*، *femA* و *mecA* به روش Multiplex PCR.....67

فهرست جداول

عنوان | صفحه

جدول 2-1.ابزار و وسایل اولیه استفاده شده در تحقیق.....28

جدول 2-2. لیست مواد شیمیایی مصرفی.....29

جدول 2-3.Master Mixاستفاده شده.....30

جدول 2-4. دستگاه های مورد استفاده.....31

جدول2-5. روش تهیه محلول استاندارد 0/5 مک فارلند.....37

جدول2-6. روش تهیه بافر STE.....42

جدول2-7. روش تهیه بافرTE 42

جدول2-8. مخلوط اصلی PCR(PCR Master Kit).....44

جدول 2-9. توالی پرایمرهای ژن *SA442استافیلوکوکوس اورئوس*.....45

جدول 2-10. مواد لازم جهت PCR برای تکثیر ژن *SA442استافیلوکوکوس اورئوس*.....45

جدول 2-11. پروتوکول دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن *SA442*.....46

جدول2-12. روش تهیه بافر TAE (50X).....48

جدول 2-13. توالی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن*mecAاستافیلوکوکوس اورئوس*.....48

جدول 2-14. مواد لازم جهت تکثیر ژن *mecAاستافیلوکوکوس اورئوس*.....49

جدول2-15. پروتوکول دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن *mecA*.....49

جدول 2-16. توالی پرایمرهای ژن *femA* *استافیلوکوکوس اورئوس*.....50

جدول 2-17. مواد لازم جهت PCR برای تکثیر ژن *femA* *استافیلوکوکوس اورئوس*.....50

جدول 2-18. پروتوکول دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن *femA*.....50

جدول 2-19. توالی پرایمرهای ژن *SA442*، *femA* و *mecA*.....51

جدول 2-20. مواد لازم جهت PCR برای تکثیر همزمان ژن‌های *SA442*،*mecA*و *femA* *استافیلوکوکوس اورئوس*.....51

جدول2-21. پروتوکول دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر همزمان ژن‌های*SA442*،*mecA*و *femA* *استافیلوکوکوساورئوس*.....52

جدول2-22.میزان مواد مورد استفاده در Master Mix جهت انجام PCR.....52

جدول3-1.افراد مورد مطالعه بر حسب تفکیک جنسیتی.....57

جدول3-2. .میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی در روش دیسک دیفیوژن.....61

جدول3-3.نتایج حاصل از آزمایش دیسک دیفیوژن سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25423 با مقادیر موجود در NCCLS جهت کنترل کیفی دیسک‌ها.....63

جدول4-1.مقایسه میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* این تحقیق با سایر گروه‌های تحقیق‌کننده در زمینه مقاومت به *استافیلوکوکوساورئوس*.....73

کلمات اختصاری

MRSA: Methicillin Resistant *Staphylococos aureus*

MSSA: Methicillin Susceptible *Staphyloccocus aureus*

MSA: manitol salt agar

$MgCl_2$: magnesium chloride

OX: Oxacillin

CC : Clindamycin

MSSA: Methicillin Susseptible *Staphylococos aureus*

DHFR :Di HydroFolate Reductase

MIC: Minimum Inhibitory Concentration

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

PBP: Penicillin – binding proteins

NAG: N-Acetyl Glucose amin

CRF: coagulase reacting factor

Zn: zinc

SSSS: Staphylococcal Scalded Skin Syndrome

TSST: Toxin Shock Syndrome Toxin

PCR: Polymerase Chain Reaction

CP : Ciprofloxacin

TE: Tetracyclin

P: Penicillin

V: Vancomycin

E: Erytromycin

SXT: Cotrimoxazol

AN: Amikacin

PBP2a: Penicillin Binding Protein 2a

CNS: Central Nervous System

CRF: Coagulase Reacting Factor

DNA: Deoxy ribonucleic acid

dNTPs: deoxy ribo nucleotide tri phosphates

خلاصه

مقدمه: استافیلوکوکوس اورئوس یکی از پاتوژن‌های خطرناکی می‌باشد که عامل بسیاری از بیماری‌های عفونی می‌باشد. لذا تشخیص، کنترل، شناسایی دقیق و درمان بیماری‌های ناشی از این باکتری بسیار حائز اهمیت می‌باشد. هدف از این مطالعه، راه‌اندازی روشی سریع برای تشخیص به موقع جهت ارائه راهکار لازم برای مقابله با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، از کارکنان شاغل در بیمارستان‌های آموزشی و درمانی شهر زنجان به روش تصادفی نمونه‌گیری انجام شد. پس از انجام تست‌های شناسایی و تایید باکتری مورد نظر، جهت انجام آنتی-بیوگرام از محیط کشت مولرهینتون‌آگار به روش‌کربی بایر استفاده شد. پس از استخراج DNA به روش جوشان (Boiling) و روش فنل کلروفورم ژن‌های *femA*، *mecA* و *SA442* (قطعه‌ای از کروموزوم اختصاصی باکتری) به طور همزمان با دستگاه ترموسایکلر تکثیر شده و پس از انجام ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی با Syber GreenDNA باندها شناسایی شدند.

یافته‌ها: 185 نمونه کاتالاز مثبت، و 65 نمونه کوآگولاز مثبت گزارش شدند. نتایج حاکی از تست آنتی-بیوگرام نشان داد که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین و پنی‌سیلین بیشترین مقاومت و به کلیندامایسین و ونکومایسین بیشترین حساسیت را دارد. با بهینه‌سازی شرایط PCR ژن‌های *femA*، *mecA* و *SA442* در یک میکروتیوب به صورت Multiplex تکثیر شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: روش Multiplex PCR به عنوان یک تست سریع و دقیق در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن می‌تواند در شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* مقاوم به متی‌سیلین کمک کننده باشد.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *mecA*، *femA*، MRSA، Multiplex PCR

فصل اول:

کلیات

1-1.مقدمه

استافیلوکوک‌ها باکتری‌های گرم مثبت، کروی‌شکل، بی‌حرکت، بدون اسپور و کاتالاز مثبت بوده که بصورت خوشه‌های نامنظمی قرار می‌گیرند. این باکتری‌ها در سطح بدن انسان و حیوانات وجود دارند و در شرایط خاص می‌توانند بیماری‌زا باشند(1).

استافیلوکوک‌ها قادرند عفونت‌های خفیف تا کشنده‌ای را ایجاد کنند. استافیلوکوک‌ها به دلیل استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها، وجود توانائی بالا در تبادلات ژنتیکی و حضور انواع پلاسمیدهای مقاومتی به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت نشان می‌دهند. نتایج حاصل از مطالعات مختلف در سرتاسر جهان و ایران نشان دهنده افزایش انواع MRSA می‌باشد(2).

هدف

با توجه به اهمیت موضوع، این تحقیق در راستای رسیدن به اهداف زیر انجام گرفت.

1-راه‌اندازی تست تشخیص مولکولی سریع برای شناسایی استافیلوکوک‌های مقاوم به متی‌سیلین در بیمارستان‌های‌آموزشی‌درمانی‌دانشگاه‌علوم‌پزشکی‌زنجان با استفاده از تکنیکMultiplex PCR

2- مشخص نمودن میزان مقاومت*استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی که بصورت رایج در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری استفاده می‌شود.

3- معرفی داروی موثر در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری.

4- تعیین میزان شیوع MRSA در بین سویه‌های جدا شده و بررسی نتایج بدست آمده با نتایج حاصل از تحقیقات سال‌های قبل.

5- تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از نمونه‌های بالینی

1-2.استافیلوکوک‌ها[1]

[1]staphylococci

جنس استافیلوکوک حداقل 30 گونه دارد، سه گونه مهم از نظر بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس*[1]، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*[2]، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*[3] هستند.

کلنی‌های این باکتری غالباً به صورت مات، گرد، اندکی محدب، به رنگ زرد و قطر آن‌ها بین 1 الی 4 میلی‌متر است. *استافیلوکوکوس اورئوس* کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، احیاء نیترات مثبت و DNase مثبت است. گلوکز و مانیتول را در شرایط هوازی و بی‌هوازی مورد استفاده قرار می‌دهد(3).

این باکتری‌ها حدود 1/5-0/5 میکرومتر قطر دارند. نوترینت براث یا آگار غنی شده می‌تواند رشد باکتری را حمایت کند، متوسط زمان تقسیم این باکتری در حدود 20 دقیقه است. استافیلوکوک‌ها برخلاف استرپتوکوک‌ها کاتالاز مثبت هستند ولی مواردی از کاتالاز منفی نیز گزارش شده است(4).

3-1.تاریخچه

اولین بار فردیریک ژولیوس روسنباخ[4] در سال 1884 جنس استافیلوکوک را شرح داد و آن را به دو گروه *استافیلوکوکوس آلبوس*[5] و *استافیلوکوکوس اورئوس* تقسیم کرد.

الکساندر اوگستون[6]، نام استافیلوکوکوس را برای میکروکوکوس که عامل عفونت، التهاب و ترشحات چرکی می‌باشد، به‌کار برد. لویی پاستور[7] مشاهده کرد که باکتری‌های کروی کوچک در چرک و استئومیلیت حضور دارند و فکر کرد که این باکتری‌ها ممکن است بیماریزا باشند. در واقع پاستور باکتری‌های را که اوگستون شرح داده بود، مشاهده کرد.

---

[1] *Staphylococcus aureus*
[2] *Staphylococcus epidermidis*
[3] *Staphylococcus saprophyticus*
[4] Friedrich Julius Rosenbakh
[5] *Stapyhlococcus albus*
[6] Alexander Ogstone
[7] Louis Pastor