دانشگاه علوم پزشکی کرمان
دانشکده پزشکی
کتابخانه مرکزی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی

عنوان:

تعیین تیپ‌های ژنی Immune-Evasion-Cluster (IEC) و لوکوس ژنی (*ica*) Intercellular adhesion در استافیلوکوک‌های اورئوس جداشده از نمونه‌های کلینیکی شهر کرمان، ایران

توسط: سیده فاطمه لایق خویدکی

استاد راهنما: دکتر داود کلانتر نیستانکی-دکتر رویا احمدرجبی

سال تحصیلی: ۱۳۹۶-۱۳۹۵

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
حوزه معاونت تحقیقات و فناوری
کتابخانه مرکزی

Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science (MSc)

Title:

Determination of Immune-Evasion-Cluster (IEC) gene types and Intercellular adhesion (*ica*) in clinical isolates of *staphyloccus aureus* collected from Kerman, Iran

By:
Seyyedeh Fatemeh Layegh Khavidaki

Supervisors:
1- Davood Kalantar Nistanaki (Ph.D)
2- Roya Ahmad Rajabi (Ph.D)

Year:
2017

چکیده:

مقدمه و اهداف: ویرولانس نقش مهمی را ایفا می‌کنند. در این مطالعه، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، حضور لوکوس ژنی *icaABCD* و ارتباط آن با تولید بیوفیلم و تنوع کلاستر ژنی فرار از سیستم ایمنی (IEC) در استافیلوکوک-های اورئوس جدا شده از نمونه‌های کلینیکی شهرکرمان، ایران تعیین شده است. مجموعه ژنی IEC حاوی ژن‌های *chp* (کدکننده پروتئین‌های مهارکننده کموتاکسی)، *scn* (کدکننده پروتئین‌های مهارکننده کمپلمان)، *sak* (کدکننده استافیلوکیناز)، *sea* (کدکننده انتروتوکسین A) و *sep* (کدکننده انتروتوکسین P) می‌باشد که در مهار سیستم ایمنی میزبان نقش دارند. لوکوس ژنی *icaABCD* مسئول ایجاد اتصالات پلی‌ساکاریدی با واحدهای N-استیل‌گلوکزآمین جهت تولید بیوفیلم می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در طول ۷ ماه(آبان ۸۵ تا اردیبهشت ۸۶)، ۱۰۰ ایزوله کلینیکی استافیلوکوک اورئوس از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های آموزشی کرمان جمع‌آوری شد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی توسط روش دیسک دیفیوژن تعیین شد. روش‌های فنوتیپی برای تعیین توانایی ایزوله‌ها جهت تولید بیوفیلم و شناسایی ایزوله‌های مقاوم به متی‌سلین (MRSA) انجام شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تشخیص ژن‌های *nuc*(تعیین هویت ایزوله‌های استافیلوکوک اورئوس)، *mec*(شناسایی ایزوله‌هایMRSA)، ژن‌های کلاستر IEC(*scn*، *sak*، *chp*، *sea* و *sep*) و لوکوس ژنی *icaABCD* انجام شد.

یافته‌ها: از میان ۱۰۰ نمونه، ۴۴ ایزوله MRSA شناسایی شد از این تعداد، ۳۰ نمونه (۶۸/۲ درصد) مربوط به بیماران HA-MRSA و ۱۴ نمونه (۳۱/۸ درصد) مربوط به بیماران CA-MRSA بود. در نتایج ما همه ایزوله‌ها به ونکومایسین و لینزولاید حساس بودند. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، کلیندامایسین، اریترومایسین، جنتامایسین، تتراسایکلین و تریمتوپریم-سولفومتاکسازول به ترتیب ۲۵، ۳۹، ۳۱، ۵۲، ۳۳، ۵۴ و ۳۸ درصد مشاهده شد. نتایج ما نشان داد که ۷۷/۲ ٪ (۳۴/۴۴) از ایزوله‌های MRSA و ۸/۹ ٪ (۵/۵۶) از ایزوله‌های MSSA مقاومت چندداروئی (MDR) داشتند. مقاومت القایی کلیندامایسین به میزان ۱۸ ٪ مشاهده شد. فراوانی ژن‌های کلاستر IEC به صورت *sak* با ۶۰٪ ، *scn* با ۵۴٪ ، *chp* با ۳۵٪ ، *sea* با ۱۰٪ و ژن *sep* با ۳٪ مشاهده شد. حضور کلاستر ژنی IEC در ایزوله‌های MSSA به طور معناداری بیشتر از ایزوله‌های MRSA بود (P=0.000). تیپ شایع کلاستر ژنی IEC تیپ B بود. در نتایج ما، ۹ نمونه دارای بیوفیلم قوی، ۲۶ نمونه دارای بیوفیلم متوسط ، ۴۸ نمونه دارای بیوفیلم ضعیف و ۱۷ نمونه فاقد بیوفیلم بودند. ژن *icaD* در ۸۴٪ از نمونه‌ها یافت شد. ژن‌های *icaA* ، *icaB* و *icaC* به ترتیب

Abstract

Introduction: Resistance to antibiotics and presence of virulence factors play an important role in increased mortality associated with infection due to *Staphylococcus aureus*. In this study, we determine antibiotic resistance pattern, presence of the *icaADBC* locus as well as biofilm formation and distribution and diversity the immune evasion cluster (IEC) genes in clinical isolate of *S. aureus* from Kerman, Iran. The IEC encodes the immune-modulating proteins such as chemotaxis inhibitory protein (CHIPS), staphylococcal complement inhibitor (SCIN), staphylococcal enterotoxin A (sea), staphylococcal enterotoxin p (sep) and staphylokinase (sak). The *icaADBC* locus encodes genes lead to the biosynthesis of polysaccharide intercellular adhesion (PIA) molecules which is composed of N-acetylglucosamin to biofilm formation.

Material and methods: During 7 months, 100 clinical isolates *S. aureus* recovered from different patients were admitted to Kerman University affiliated hospitals. Resistance to different antibiotic agents was determined by disk diffusion method. Phenotypic method was used to determination of biofilm formation ability and methicillin-resistance *S. aureus* (MRSA). Polymerase chain reaction technique (PCR) was used to detection of *nuc(*Identification of Staphylococcus aureus isolates), *mecA(*recognition of MRSA), the *icaADBC* locus and The IEC genes*(,scn, sea, sak, sep* and *chb*).

Results: Forty-four isolates were considered as MRSA (68.2% isolates HA-MRSA and 31.8% CA-MRSA). All of isolates were sensitive to vancomycin and linezolid. Resistance to antibiotics amikacin, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, gentamicin and tetracycline and trimethoprim/sulfamethoxazole was 25, 39, 31, 52, 33, 54, and 38% respectively. Our results showed, 77.2% (34/44) of MRSA and 8.9 %(5/56) of MSSA isolates were multidrug resistant. Inducible clindamycin resistance rate was 18%. *chp* was present in 35% of these strains, *scn* was in 54% , *sak* was in 60%, *sea* and *sep* were in 10% and 35% respectively. There was significant difference in presence of IEC types between MSSA and MRSA isolates (P=0.000). The predominant IEC variant was type B. The ability to production biofilm in 9(9%) isolates was strong, 26 (26%) isolates was moderate,48 (48%) isolates was weak and 17(17%) of them had no production biofilm. The prevalence of *icaA, icaB, icaC* and *icaD* in all of isolates was 2%, 1%, 2% and 84% respectively. There was no significant difference in production biofilm between MSSA and MRSA isolates and No significant relationship was found between the *icaABCD* locus and biofilm formation ($P \geq 0.05$).

Conclusion: Antibiotic resistance in clinical samples of Kerman, especially in MRSA strains is increasing. The presence of the *icaADBC* locus may not be determining factor for biofilm formation, our data may support some published data based on that biofilm formation may rely on environmentally regulated, *icaADBC*-independent mechanism (s). IEC has spread

successfully through the *S. aureus* population and will continue to do so. This enables *S. aureus* with a unique mechanism to adapt to, and counteract, the human host.

Keywords: *Staphylicoccus aureus*, Antibiotic resistance, *icaABCD* locus, Biofilm, IEC types

بسمه تعالی

تاریخ.....

صورتجلسه دفاع از پایان نامه

شماره.....

پیوست.....

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی **خانم سیده فاطمه لایق خویدکی** دانشجوی کارشناسی ارشد رشته **میکروب شناسی پزشکی** دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان " **تعیین تیپ های ژنی (IEC) و لوکوس ژنی (ica) در استافیلوکوک های ارئوس جدا شده از نمونه های کلینیکی شهر کرمان .ایران** "در ساعت ۱۰ روز **سه شنبه** مورخ **۹۵/۱۲/ ۳** با حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف:استاد(ان) راهنما	**جناب آقای دکتر داود کلانتر نیستانکی** **سرکار خانم دکتر رویا احمد رجبی**	
ب: استاد مشاور	.....	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	**سرکار خانم دکتر شهلا منصوری**	
د :عضو هیات داوران (خارجی)	**جناب آقای دکتر سید امین آیت اللهی موسوی**	
ه :نماینده تحصیلات تکمیلی	**جناب آقای فرزین فاطمی زاده**	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه .....بسیار خوب..... و نمره .....۱۷,۸۳..... مورد تایید قرار گرفت.

۹۵/۱۲/۲۷

مهر و امضاء معاون آموزشی

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی افضلی پور