الكشف عن جينات مقاومة للفانكومايسين في المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من عينات سريرية وبيئية في محافظة ذي قار

يحيى عبد الرضا عباس
المعهد التقني / ناصرية
ستار عبود فارس
Satar_af68@yahoo.com
همسة ماجد مصطفى
قسم علوم الحياة / كلية التربية جامعة ذي قار

الملخص:

تم عزل (100) عزلة من المكورات العنقودية الذهبية من عينات سريرية وبيئية بلغ مجموعها 650 عينة وكان مجموع العينات السريرية 470 عينة والعينات البيئة 180 عينة .
العزلات السريرية البالغة 85 جمعت من مسحات الحروق,الإذن,المنخر ,الجروح,المهبل،وعينات الادرار, اختبرت حساسية*Staphylococcus aureus* المعزولة خلال الدراسة تجاه (13) مضاداً حياتياً باستعمال طريقة انتشار الأقراص وأظهرت النتائج أن هناك تباينا واضحاً في مقاومة العزلات المدروسة للمضادات المستعملة , تم تحديد التركيز المثبط الأدنى لمضاد الفانكومايسينلعزلات بكترياالمكورات العنقودية الذهبية قيد الدراسة اذ الاختبار على (20) عزلة (10) حساسة و(10)مقاومة, بجهاز الفايتك VITEK 2 وتراوحت قيم MICبين (1-32) مايكروغرام\مل .عزل الدنا من خلايا العزلات وتم توكيد التشخيص من خلال تفاعل السلسلة المتضاعف للكشف عن الجين nuc *A* والخاص ببكتريا *S.aureus*ظهر أن جميع العزلات حاوية على هذا الجين من خلال ظهور حزمة الجين في مسارات ترحيل الدنا لجميع العزلات.أجريت تفاعلات السلسلة المتضاعفة (PCR) للدنا المعزول من بكتريا *Staphylococcus aureus* المقاومة والحساسة للفانكومايسين,باستعمال البادئات النوعية للجينات (van *HAX* , van *H*,van *A*, van *X*) رحل ناتج تفاعلات الـ PCR على هلام الاكاروز بتركيز (2%) ظهر ان عدد العزلات الحاوية على الجين van *X* هو (9) عزلات,وللجين van *H* (6) عزلات,وللجين van *A* (2)عزلاتان,أما الجين van *HAX* فقد ظهر في عزلة واحدة.

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية الذهبية، المضادات الحياتية، مقاومة الفانكومايسين .

summary

One handred of *S.aureus* were isolated from 650 of clinical and environmental samples. The clinical samples were 470 and environmental were 180.
Eighty five of clinical isolats were isolated from burn swabs , ear swabs , nasal swabs , wound swabs , vaginal swabs and urine samples.Antibiotic suceptibity was done for the isolates a gainst (13) antibiotics by disk diffusion methed. The results showed variations in the resistance . Minimum inhibitory concentration (MIC) for vancomycin was detected for 20

isolates , (10) from sensitive isolates and 10 from resistante using VITEK$_2$ apparatus . MIC was ranged from (1-32 mg/mlc).

The DNA was extracted from the isolates and nuc*gene* which uniqe for *S.aureus* was detected in all the isolates through the appearance of gene band on the gel.

Polymerase . chain reactions for detection of vancomycin resistance genes (van *A* , van *X* , van *H* , van *HAX*) was done usiny specific primers . PCR Products separated on 2% a garos . The results showed that 9 isolates have van *X* , 6 isolates have van *H* , 2 isolates have van *A* while van *HAX* was showed in only one isolates.

المقدمة

تعد المكورات العنقودية *Staphlococci* من الممرضات المهمة للإنسان إضافة إلى كونها من العوامل الملوثة الواسعة الانتشار في المستشفيات إذ أن قابلية بعض أنواع هذه المجموعة على اختراق دفاعات الجسم وغزوأنسجته وامتلاكها لعوامل الضراوة(virulence factors) ومنها مقاومتها العالية للمضادات الحياتيةجعلها سبباً مهماً لإصابات الإنسان وفي الوقت نفسه فان بعض أنواع هذه المجموعة تعد من الفلورا الطبيعية المتواجدة في أنحاء مختلفة من الجسم مثل الجلد والمجاري التنفسيةوالأمعاء (Collee*etal.*,1996) . ويقدر الحاملون (carries) للنوع *S.aureus* في مقدمة مناخرهم(40 - 50%) لكنها تعد من الجراثيم التي يمكن أن تسبب إصابات خطيرة عند حدوث خلل أواضطرابات في دفاعات جسم المضيف المناعية (Gordon and Chistensen, 2002;Brooks *et al.*,2001) .ويمكن لها أن تكون عاملاً ممرضاً انتهازياً (Oliveria&Ramose,2002). وغالباً ما تكون الاصابةبالمكورات العنقودية الذهبية حادة وقيحية واذا لم تعالج سريعاً تنتشر الإصابة الى الأنسجة المحيطة و منها تجرثمالدم(Bactermia)وعفونية(Septicemia)(Bilal&Gedebou,2000).

تعد بكتيريا *S.aureus*واحدة من اهم واكثر البكتريا المسببة لأمراضعدوى المستشفيات(Nosocomial infectionTiemersmaet *et al*.;2004).

ازدادت خطورة المكورات العنقودية الذهبية بظهور بعض السلالات المقاومة لاكثر من 20مضاداًحياتياً(Sila *et al.*,2009).ويعد النوع *S.aureus*الأكثرإمراضيه لامتلاكه عوامل ضراوة متعددة متمثلة بالأنزيمات Forbes (*et al.*, 2007;Lowey 1998)وتعد انزيمات البيتالاكتاميزمن العوامل المهمة لكونها المسؤولة عن هذه المقاومة (Fuda*et al.*; 2006) ومن عوامل الضراوة الاخرى امتلاك بعض سلالات *S.aureus* لمورثة (MecA) المسؤولة عن مقاومتها مضاد المثسيلين نتيجة لتشفيرها للبروتينات الرابطة (Penicillin binding protein(PBPS التي تعمل تقليل الالفة مع المضاد الحياتيالمثسيلين وتعرفالمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلينالتي تمتاز بتوطنها بشكل اساس فيالمستشفيات بـ(Hosptial acquired –MRSA) .وجاءت اهميتها من خلال مقاومتهاللعديد من المضادات الحياتية ومنها مضادات البيتالاكتام (Al-Rawahi *et al.*; 2008) , اذ تسبب مقاومة الجراثيم للمضادات مشاكل صحية كبيرة كما هو الحال مع *Psendomonas* , *Klebsiella* , *Staphylococcus* Methicillin resistance , Vancomycin resistance *Enterococcus* (عبد السلام, 2010) . إن أكثر من 70% من الجراثيم المسببة لهذه الأخماج مقاومة على الاقل لواحد او اكثر من المضادات التي كانت تستعمل لعلاجها سابقاً, مما يؤدي الى استخدام مضادات

اقـل فعاليـة واكثـر سميـة فضلا عن زيادة نسبة الأمراضية والوفيـات وزيـادة مـدة المكوث في المستشفى (مرعي,2011).

يعد الفانكومايسينمضاداً فعالاً لعلاج الاصابات بسلالات بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثسيلين(MRSA)سيما في اصابات ذات الرئة و مجرى الدم مع ذلك فقد تطورت المقاومة في بعض سلالات *S.aureus* لمضاد الفانكومايسين وقد سجلت نسب مقاومة متصاعدة لهذا المضاد في مختلف دول العالم (Weigel*et al.*;2007).وقد ظهرت تجارب الاقتران البكتيري امكانيـة انتقـال جينـات مقاومـة الفانكومايسينمن البكتريا المعوية البرازية *Enterococcus feacalis*إلى بكتريا*S.aureus*(Tenover*et al.*,2004). واصبحت دراسة البكتريا المقاومة للفانكومايسين مهمة جداً في جميع دول العالم ومنها العراق,إذ تعد المقاومة للفانكومايسين مشكلة كبيرة من وجهة نظر الطب والصحة العامة .

هدف الدراسة

التحري عن جينات المقاومة للفانكومايسين*X* van ,*A* van ,*H* van ,*HAX* van في ضوء :

1 - عزل بكتريا *Staphylococcus aureus*وتشخيصها من عينات سريرية وبيئية مختلفة من بعضالمستشفيات مع الكشف عن جين nuc *gene* لتوكيد التشخيص .

2 - الكشف عن مقاومة العزلات لبعض المضادات الحياتية ومنها المثسيلينوالفانكومايسين .

3 - تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للفانكومايسين على عزلات الدراسة .

4 - التحري عن جينات مقاومة الفانكومايسين بتقنية PCR واستعمال بادئات متخصصة .

طرائق العمل

1 -جمع العينات Collection of samples

جمعت (650) عينة خلال الفترة من 1\11\2012 لغاية 1\4\2013 شملت 180 مسحة بيئية من مناطق مختلفة في مستشفيات مدينة الناصرية و 470 مسحة وعينة من حالات مرضية مختلفة للمرضى المراجعين والراقدين في مستشفى الأمام الحسين التعليميو مستشفـى بنت الهدى للنسائية والأطفال و مستشفى الحبوبي العام ,إستخدمت في عملية جمع العينات مسحات قطنية معقمة مزودة بوسط زرعي للنقل فيما جمع الإدرار في أنابيب معقمة نقلت العينات إلى المختبر خلال ساعة لغرض زراعتها على الأوساط أكار الدم وأكار المانيتول حضنت الأطباق هوائيا في درجة حرارة (37)م°ولمدة (24) ساعـةتـم تشخيـص عزلات بكتريا *S.aureus* اعتمـاداً على الصفـات المجهـرية والزرعية وعـدد مـن الفحوصات الكيـموحيويه (Harley and Prescott,2002;Collee *et al.*,1996) .

2 -فحص الحساسية للمضادات الحياتية

اختبرت حساسية جميع العزلات المشخصة من الخطـوات السابقة للمضادات الحياتية وفقا لطريقة Bauer and Kirby(1966).استعمل في هذا الاختبار (13) نوعا من مضادات الحياة وعلى الوسط الزرعي أكار المولر-هينتون وتم تحديد المقاومة والحساسية اعتماداً على أقطار مناطقالتثبيط (CLSI,2009).

3 -تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لمضاد الفانكومايسين

استخدم في هذه الدراسة جهاز الفايتك VITEK2 لتحديد العزلات*S.aureus* المقاومة للفانكومايسينوحسب تعليمات الشركة المصنعة (Biomerieux).

الفحصوات الجزيئية

1 - تم توكيد تشخيص عزلات*S.aureus* من خلال الكشف عن جين nuc في دنا العـزلاتوباستعمال البادئ :

جدول(1) تسلسل البادئْ المستعمل في تضخيم الجين

Nuc gene(Brakstad *et al*.,1992)

no	Specific gene	primer	Primer sequence(5-3)	Strain no	Expected size	produt
1	Nuc	F R	GCGATTGATGGTGATACGGTT AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	VRSASTM2 VRSASTM2	270bp 270bp	270bp 270bp

وفقاً لبرنامج التالي :

NO	Step	Temp C	Time Min	Cycle
1	Denaturation	94	30	1
2	Denaturation	94	1	30
3	Annealing	50	1	
4	Extension	72	1	
5	Final extension	72	5	1

2 - تم الكشف عن وجود جينات مقاومة الفانكومايسين (van*HAX* , van*A* , van*X*, van*H*) بطريقة multiplex باستعمال البادئات :

جدول(2) تسلسل البادئات المستعملة في تضخيم الجينات

vanHAX(Donabedian *et al*.,2000), vanX,vanA,vanH(Biswajit *et al*.,2008)

no	Specific gene	primer	Primer sequence(5-3)	Strain no	Expected size	produt
1	vanHAX	F R	ATGAATAACATCGGCATTAC TTATTTAACGGGGAAATC	VRSASTM2 STM2-1 T48	2.6kp 2.3kp	2.6kb 2.3kb 2.3kb 2.3kb
2	VanH	F R	ATGAATAACATCGGCATTAC CTATTCATGCTCCTGTCTCC	VRSASTM2 STM2-1 T48	969bp 969bp	1kb 1kb 1kb
3	VanA	F R	ATGAATAGAATAAAAGTTGC TCACCCCTTTAACGCTAATA	VRSASTM2 VRSASTM2	1032bp 1032bp	1.1kb 1.1kb
4	vanX	F R	ATGGAAATAGGATTTACTTT TTATTTAACGGGGAAATC	VRSASTM2 STM2-1 T48	609bp 609bp	600bp 600bp 600bp

اجري تفاعل السلسلة المتضاعف وفقاً للبرنامج التالي :

No	Step	Temp	Time	Cycle
1	Denaturation	98c	2min	1
2	Denaturation	98c	10s	35
3	Annealing	50c	1min	
4	Extension	72c	1min	
5	Final extension	72c	5min	1

رحلت نواتج تفاعل السلسلة المتضاعف في جهاز الترحيل الكهربائي وعلى هلام الاكاروز بتركيز 2 % بعدها حددت مواقع الحزم على الهلام بجهاز الاشعة فوق البنفسجية (UVTransillumenator) ومن خلال مسار مسطرة الدنا (Ladder) تم تحديد الاوزان الجزيئية للحزم الناتجة .

النتائج

عزل وتشخيص بكتريا *Staphylococcus aureus*

عزلت (100) عزلة من المكورات العنقودية الذهبية من عينات سريرية وبيئة بلغ مجموعها 650 وكان مجموع العينات السريرية 470 عينة والعينات البيئة 180 عينة .العزلات السريرية البالغة 85 عزلة جمعت من مسحات الحروق,الاذن,المناخر,الجروح,المهبل،وعينات الادرار, وكانت أعلى نسبة عزل للبكتريا من مسحات المناخر فكانت 31.3% فيما كانت اقل نسبة عزل من عينات الادرار وقد بلغت 6.9%كمـــا فـي جدول (3)

جدول (3) النسب المئوية لعزل المكورات العنقودية الذهبية من العينات السريرية

ت	المســحـــــة	العــدد الكلي	عــدد العزلات	النسبة %
1	مسحة الحروق Burn swab	39	8	20.5
2	مسحة الأذن Ear swab	57	17	29.8
3	مسحة المنخر Nasal swab	64	20	31.3
4	مسحة اللوزتين Throat swab	67	14	20.9
5	عينة الإدرارUrine sample	87	6	6.9
6	مسحة المهبل Vaginal swab	80	7	8.8
7	مسحة الجروح Wound swab	76	13	17.1
	العدد الكلي	470	85	18.1

أما العزلات البيئة فقد بلغت 15 عزلة جمعت من صالات العمليات و ردهات الجراحة البولية وردهات الحروق و وحدة العناية المركزة CCU, وكانت النسبة المئوية الأعلى لعزل البكتريا من صالات الحروق وبلغت (31.15%) ,فيما كانت النسبة المئوية الادنى لعزل البكتريا من وحدات العناية المركزة (2.85%) والجدول رقم(4) يوضح النسب المئوية للعزل

جدول (4) النسب المئوية لعزل المكورات العنقودية الذهبية من العينات البيئية

ت	المســحـــــة	العــدد الكلي	عــدد العزلات	النســبـة %
1	صالات العمليات	36	4	11.11
2	صالة الجراحة البولية للرجال	32	2	6.25
3	صالة الجراحة البولية للنساء	39	3	7.69
4	صالة الحروق	38	5	13.15
5	وحدة العناية المركزية CCU	35	1	2.85
	المجموع الكلي	180	15	8.33

قياس التركيز المثبط الأدنى لمضاد الفانكومايسين (MIC)

تم تحديد التركيز المثبط الأدنى لمضاد الفانكومايسين لـ (20)عـــزلة بكتـــريا *S.aureus* قيد الدراســـة باستعمـــال جهـــاز الفايتـــك (VITEK2 compound 2),10 عـــزلات مقـــاومة للفانكومايس,10 عزلات حساسة له بموجب نتائج طريقة انتشار القرص. أظهرت النتائج أن التركيز المثبط الأدنى للعزلات المقاومة (32≤ مايكرو غرام \مل) و(1≤ مايكروغرام \مل)للعزلات الحساسة.

مقاومة بكتيريا *S.aureus* للمضادات الحياتية

❖ **مقاومة العزلات السريرية**

تم اختبار حساسية (85) عزلة عائدة لبكتريا *S.aureus* قيد الدراسة تجاه (13) مضاداً حياتياً شائع الاستعمال,وباستعمال طريقة انتشار الأقراص Disc diffusion method.أبدت العزلات مقاومة لمعظم المضادات الحياتية المستعملة,فقد أظهرت مقاومة بنسبة 100 لكل من Methicillin,Cifixime ونسبة 92.94% Ampicillin, 90.58 %Ampiclox,88.23% Erythromycin.فيما كانت اقل نسبة مقاومة للمضاد الحياتي Imipenemوهي 3.52%في حين كانت نسبة المقاومة 11.76% Vancomycinكما في الجدول رقم (5).

جدول (5) النسب المئوية لمقاومة المضادات الحياتية من العينات السريرية

ت	Antibialic	اعداد العزلات الحساسة	اعداد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة
1	Amoxicillin (AX)	29	56	65.88
2	Ampicillin (AM)	6	79	92.94
3	Ampiclox(ApX)	8	77	90.58
4	Augmentin (Amc)	38	47	55.29
5	Cifixime (cFm)	0	85	100
6	Ciprofloxacin (cip)	74	11	12.94
7	Clindamycin (DA)	30	55	64.70
8	Erythromycin (E)	10	75	88.23
9	Gentamycin (eN)	52	33	38.82
10	Imipenem (ipm)	82	3	3.52

100	85	0	Methicillin (me)	11
30.58	26	59	Trimethoprim (Tmp)	12
11.76	10	75	Vancomycin (VA)	13

مقاومة العزلات البيئية

تم اختبار حساسية (15) عزلة بيئية عائدة لبكتريا *S.aureus* قيد الدراسة تجاه (13) مضاداً حياتياً,وباستعمال طريقة انتشار الأقراص ,أبدت العزلات مقاومة لمعظم المضادات الحياتية المستعملة. فقد اظهرت مقاومة 100% لكل من المضادات Cifixime,Ampicillin , Methicillin ,وكانت المقاومة بنسبة 80% لكل من Amoxicillin , Erythromycin , فيما كانت جميع العزلات حساسة 100% للمضاد Vancomycinكما في جدول رقم (6).

جدول (6) النسب المئوية لمقاومة المضادات الحياتية من العينات البيئية

ت	Antibialic	اعداد العزلات الحساسة	اعداد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة
1	Amoxicillin	3	12	80
2	Ampicillin	0	15	100
3	Ampiclox	1	14	93.33
4	Augmentin	7	8	53.33
5	Clindamycin	8	7	46.66
6	Cifixime	0	15	100
7	Ciprofloxacin	11	4	26.66
8	Erythromycin	3	12	80
9	Gentamycin	10	5	33.33
10	Imipenem	13	2	13.33
11	Methicillin	0	15	100

46.66	7	8	Trimethoprim	12
0	0	15	Vancomycin	13

التحري عن جينات المقاومة للفانكومايسين

❖ **اعادة توكيد التشخيص من خلال الكشف عن الجين nuc**

اجري تفاعل السلسة المتضاعف لـ (20) عزلة للكشف عن وجود الجين (nuc*A*) ورحل ناتج التفاعل على هلام الاكاروز وظهرت الحزمة الخاصة بالجين لجميع العزلات في مستوى واحد وذات وزن جزئي (270bp).مما أكد أن جميـــع العزلات تعـــود للنوع *S.aureus*.

❖ **جينات المقاومة للفانكومايسين**

اجري تفاعل السلسلة المتضاعف الدنا (PCR) للعزلات المدروسة وباستعمال البادئات المتخصصة للجينات (van *H* ,van *A*,van *X*,van *HAX*) . ظهر خلو العزلات الـ (10) الحساسة للفانكومايسينمن اي جينات مقاومة الفانكومايسين قيد الدراسة في حين أظهرت (9) من العزلاتالمقاومة للفانكومايسين حزم الجينات باشكالواحجام مختلفةكما موظح في جدول (7)والصورة (1) , بينما لم يظهر احتواء العزلة رقم (20) على اي من جينات المقاومة للفانكومايسينالمذكورة في الجدول (2) بالرغم من كونها مقاومة له .

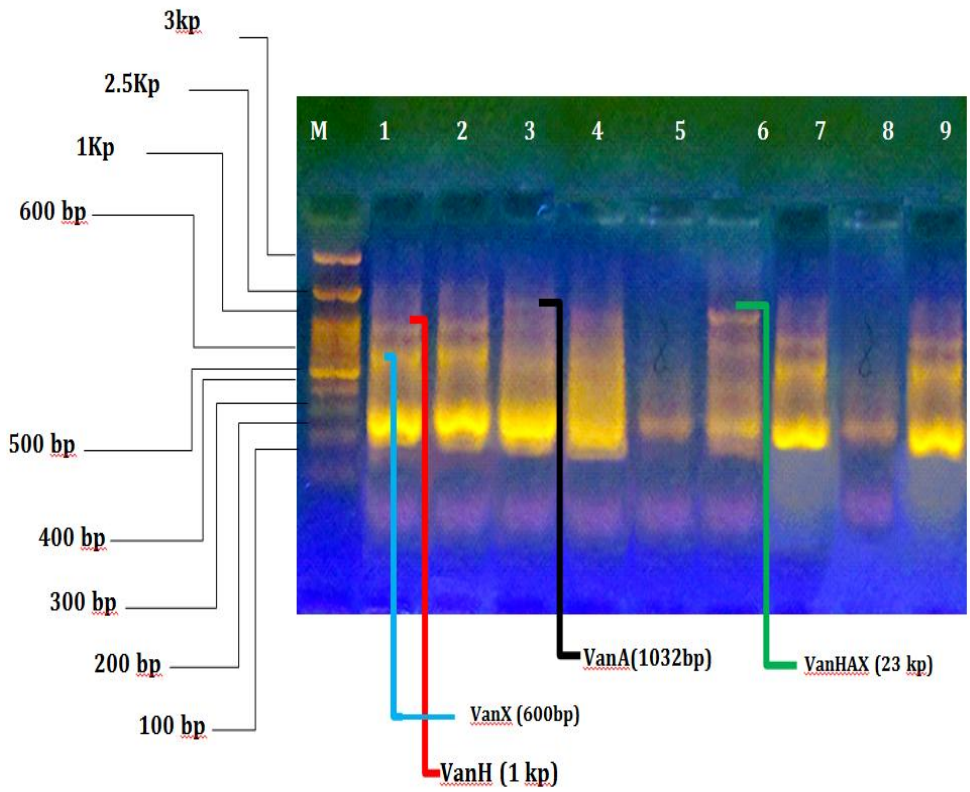
جدول (7) المحتوى الجيني المدروس في العزلات قيد الدراسة

رقم العزلة	مصدر العزلة	الجينات التي تحملها
1	مسحة المهبل	nuc gene,van H,van X
2	مسحة الحنجرة	nuc gene,van H,van X
3	مسحة الجروح	nuc gene,van A,van X
4	مسحة الجروح	nuc gene,van H,van X
5	مسحة الأذن	nuc gene
6	مسحة الجروح	nuc gene,vanX,vanHAX
7	مسحة الأذن	nuc gene,van H,van X
8	مسحة الجروح	nuc gene
9	مسحة الحنجرة	nuc gene,van H,van X
10	مسحة الأذن	nuc gene,vanH,vanX
11	مسحة الحروق	nuc gene,vanA,vanX
12	مسحة الجروح	nuc gene
13	مسحة المنخر	nuc gene

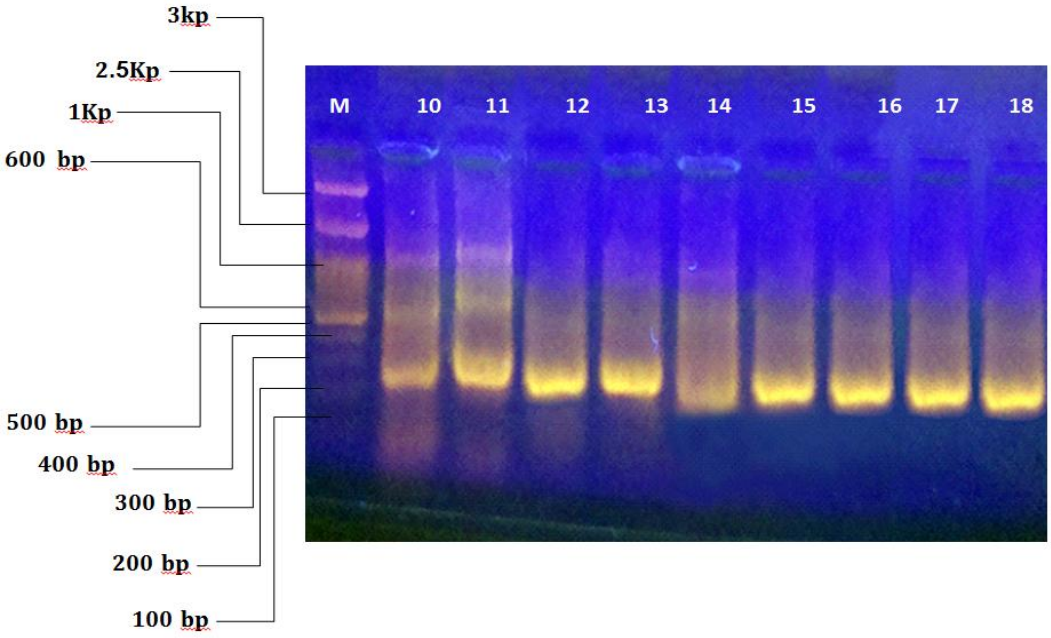
nuc gene	مسحة الحروق	14
nuc gene	مسحة الحنجرة	15
nuc gene	مسحة الأذن	16
nuc gene	مسحة الإدرار	17
nuc gene	مسحة المنخر	18
nuc gene	مسحة الحنجرة	19
nuc gene	مسحة الجروح	20

يظهر في الجدول (7) أن 9 عزلات تحمل الجين van*X* , و 6 عزلات تحمل الجين van*H* وعزلتين تحمل الجين van*A* وعزلة واحدة فقط تحمل الجين van*HAX* من الجدول اعلاه ان (6) عزلات تحمل الجين van*H* مترافقاً مع الجين van*X* وعزلتين تحمل مع الجين van*X* الجين van*A* وعزلة واحدة تحمل الجينين van*X* و van*HAX*.

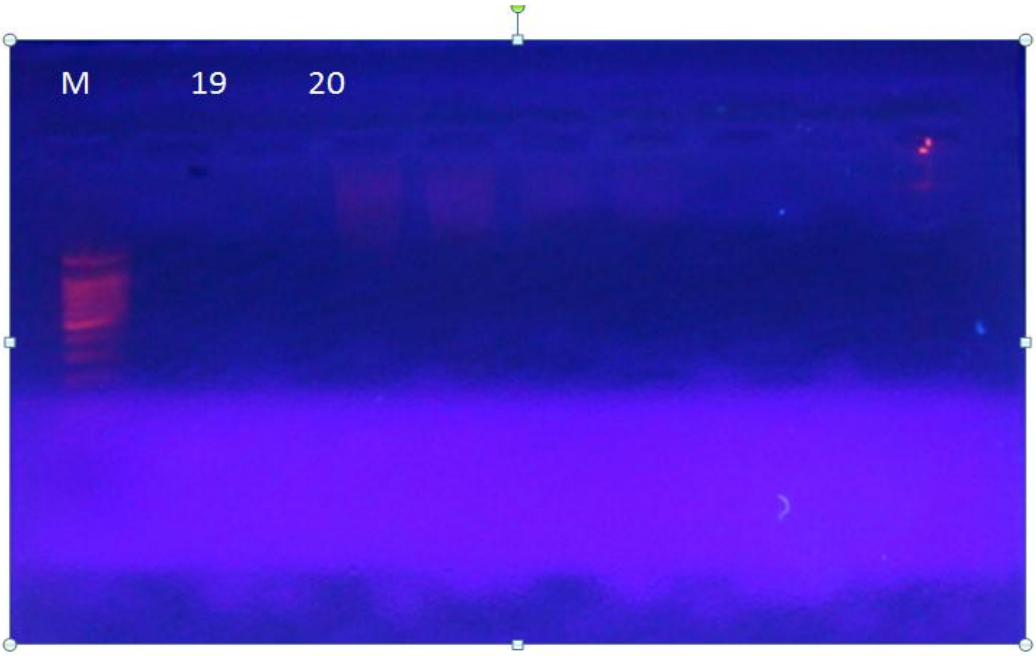
(A)



(B)



C



صورة (1) محتوى العزلات من جينات المقاومة للفانكومايسين على اكاروز (2%) وفرق جهد 80 فولت والوقت المستغرق لترحيل (ساعة ونصف) وبطريقة Multiplex

صورة (A) تمثل

عزلة 1- نلاحظ وجود VanHوVanXوnuc gene

عزلة 2- نلاحظ وجود VanHوVanXوnuc gene

عزلة 3 - نلاحظ وجود Van Aوvanxوnuc gene

عزلة 4 - نلاحظ وجود VanHوVanXوnuc gene

عزلة 5و8 - نلاحظ وجود nuc gene

عزلة 6 - نلاحظ وجود VanHAXوVanXوnuc gene

عزلة 7 - نلاحظ وجود VanHوVanXوnuc gene

عزلة 9 - نلاحظ وجود VanHوVanXوnuc gene

صورة (B) تمثل

عزلة 10 - نلاحظ VanHوVanXوnuc gene

عزلة 11- نلاحظ VanAوVanXوnuc gene

عزلة (12-18) - نلاحظ nuc gene

صورة(C) تبين العزلتين 19 و 20 لا تحتوي على اي تضخيم

المناقشة

أن أعلى نسبة عزل لبكتريا *S.aureus* قيد الدراسة كانت من مسحات المناخر بلغت 31.3% إذ تعد المناخر أحد المصادر المهمة للتلوث ونشر المكورات العنقودية الذهبية. وتعد هذه النسبة في الدراسة الحالية مقاربة من نسبة Kowalski وجماعته (2005) التي بلغت 35% في حين اظهرت في دراسة Priya (2007), انها (20%) والذي أكد أن الخطورة لا تكمن في ارتفاع النسبة أو انخفاضها بمقدار ارتباطها بالمحتوى الوراثي المشفر لعوامل الضراوة ,أما Klevens وجماعته (2007) فقد أشار إلى أن حمل *S.aureus* بالأنف لا تشكل خطراً على جروح العمليات ولا تسبب في أحداث الاخماج للجروح إي أن نسبة حمل المكورات العنقودية ليست بالمقياس الأساس للتنبؤ بحصول الاخماج بينما أكدت مصادر أخرى بان أصل العدوى يبقى غير واضح (CDC,2007). بلغت نسبة عزل المكورات العنقودية من مسحات اللوزتين 20.9% واتفقت هذه النتائج مع غالي (2005) إذ عزلها بنسبة (24.6%) وتعود أمراضية هذه البكتريا وقدرتها على غزو أنسجة المضيف وانتشارها إلى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة منها أنتاج السموم والأنزيمات التي تساعدها في أحداث الإصابة .وأظهرت الدراسة الحالية أن التهاب الأذن الوسطى يزداد في الفئات العمرية الصغيرة وذلك كون الأطفال أكثر عرضة للإصابة بهذا المرض من الكبار لضعف جهازهم المناعي والى قصر قناة اوستاكي ورقة الغضروف المكون لها واستقامتها مقارنة بالبالغين (Damoiseaux,2005) كما أن الإصابة المتكررة بالأنفلونزا تؤدي إلى انخفاض أعداد البكتريا المتعايشة في البلعوم والسماح بنمو الممرضات الانتهازية وغالباً ما يصل المرض إلى الأذن الوسطى من اللوزتين عبر قناة اوستاكي (Loss *et al.*,1989) أو قد تدخل الممرضات البكتيرية إلى الأذن الوسطى عن طريق الأذن الخارجية (Loy *et al*.,2002) .

أظهرت نتائج الدراسة انخفاض نسب عزل المكورات العنقودية الذهبية من مسحات المهبل وعينات الإدرار البالغة 8.8%,6.9% على التوالي وكانت نسبة الإصابة لدى الإناث أكثر من الذكور ,بسبب الشكل التشريحي للجهاز التناسلي الأنثوي وقصر الأحليل عند النساء وقرب الفتحة التناسلية من فتحة المخرج (Moges *et al.*,2002) . أظهرت النتائج في الجدول (4) أعلى نسبة عزل للمكورات العنقودية الذهبية من العينات البيئة بلغت 8.33% إذ تم عزلها من مصادر مختلفة منها صالة العمليات الجراحية ,صالة الجراحة البولية (رجال,نساء) صالة الحروق ,صالة وحدة العناية المركزة CCU وشملت (أبواب,جدران,أرضية,أسرة المرضى , قنوات تهوية) وكانت أعلى نسبة عزل من صالة الحروق بلغت 13,15% ثم تلتها صالة العمليات وبنسبة 11,11% واقل نسبة عزل كانت من وحدة العناية المركزة (2.85%).يعود السبب في التواجد والانتشار الواسع في بيئة المستشفيات إلى امتلاك المكورات العنقودية الذهبية للعديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من التواجد في بيئات مختلفة ومنها أنتاج الإنزيمات التي تعمل على تحطيم المركبات العضوية المعقدة التركيب وتحويلها إلى مواد أولية مثل إنتاج أنزيمات الحال لليوريا (لليوريز) والحال للجلاتين (الجيلاتينيز) وانزيم الكاتاليز (Baron&Finegold,1990) وامتلاكها القابلية على العيش والبقاء في الظروف الرطبة والجافة وقدرتها على مقاومة التراكيز الملحية العالية (Macfaddin,2000) واحتواء بعض السلالات على المحفظة التي تعد من أهم وسائل الحماية من الأذى الكيميائي والميكانيكي (ORiodar&Lee,2004) وجاءت نتائج الدراسة الحالية لتسجل نسب عزل اقل من عدد الدراسات السابقة (2004, ديوان;عبد الرزاق ,2006; كاظم ,2007) وهذا ربما يعود إلى زيادة الوعي الصحي في السنوات الاخيرة وارتفاع مستوى النظافة والاهتمام في المستشفيات رغم انها تبقى دون مستوى الطموح.

مقاومة بكتريا *S.aureus* للمضادات الحياتية

أظهرت الدراسة الحالية أن عزلات *S.aureus* مقاومة لمعظم المضادات الحياتية المستعملة ويمكن اعتبارها عزلات متعددة المقاومة إذ أظهرت نسب مقاومة مرتفعة لكل من المضادات سفكسيم,مثسيلين,امبسلين,امبيكلوكس,ارثرومايسين,اموكسسلين,وكلندامايسن.وهذا ربما يعود لكثرة استخدام المضادات الحياتية والاستخدام الخاطئ لها مما أدى إلى نشوء السلالات الطافرة أو لامتلاكها لعوامل المقاومة بطرق مختلفة .

أظهرت بعض العزلات قيد الدراسة مقاومة للفانكومايسين وكانت جميعها من العزلاتالسريرية بلغت 11,76% , ولقد ظهرت في الآونة الأخيرة مشكلة صحية كبيرة تمثلت بظهور عزلات مقاومة من بكتريا *S.aureus*لمضاد الفانكومايسين (Hososaka *et al.*,2004). وقد كان هذا المضاد يوصف بأنه العلاج الأمثل لمعالجة واحدة من اشد أنواع البكتريا امراضية على جسم الإنسان ,واستطاعت هذه البكتريا أن تطور بعض الآليات لمقاومة هذا المضاد كبقية المضادات الأخرى (Daily *et al.*,2005) وأشار Cui وجماعته (2000) أن تطور المقاومة للفانكومايسين يعود إلى سمك جدار الخلية مما يتطلب جزيئات أكثر من الفانكومايسين لتقوم بعملها وتأثيرها على طبقة الميورين,وذكر(2000) Clark *et al.* أن مقاومة المكورات العنقودية الذهبية للفانكومايسين ناتجة عن اكتساب مورثة van التي تعمل على تغيير فعالية ارتباط إنزيم الببتايديز (D-D peptidase) الذي يلعب دوراً في بناء جدار الخلية البكتيرية.ويعد van *A* الأكثر شيوعا بين سلالات VRSA(Cui *et al.*,2000;Nicho *et al.*,2006) .أن انتقال جينات المقاومة من بكتريا *Enterococci* هوالسبب الأساس في نشوء سلالات*S.aureus* المقاومة للفانكومايسين انتقلت أليها عبر آلية النقل الأفقي عن طريق البلازميد (Grundmann *et al.*,2006) .

التحري عن جينات المقاومة

❖ **الكشف عن جين nuc**

أجريت التفاعلات التضاعفية لسلسلة الدنا لـ 20 عزلة من *S.aureus* وكانت 10 منها مقاومة للفانكومايسين و 10 حساسة له , من خلال اختبار انتشار القرص ولغرض التشخيص على المستوى الجزيئي لجميع العزلات قيد الدراسة فقد تم الكشف عن وجود الجين nuc في هذه العزلات وبذلك تم توكيد التشخيص من خلال ظهور حزمة الجين ذات الوزن الجزيئي 270bp في نفس المستوى على الاكاروز بتركيز 2% ولجميع العزلات وقد اعتمد هذا الجين في التشخيص للمكورات العنقودية الذهبية (Brakstad *et al* .,1992).

❖ **الكشف عن جينات المقاومة للفانكومايسين**

أظهرت (9) من العزلات المقاومة للفانكومايسين وجود واحد او اكثر من جينات مقاومة الفانكومايسين كما في الجدول (7) وعزلة مقاومة واحدة (20) منها كانت تخلو من وجود جينات المقاومة . أن جرثومة *Enterococcus faecium* تحتوي على اوبرون van *A* ويضم خمسة جينات van *A*,van *H*,van *S*,van *R*,van *X*)(Arthur *et al.*,1993) وهي جينات منظمة (Wright*et al.*,1993) , إذ تعد جينات المقاومة للفانكومايسين (van*A*,van*H*,vav*X*) هي جينات أساسية للمقاومة إما الجينات (van*Y*,van*Z*) هي جينات ثانوية يمكن الاستغناء عنها. يشفر لهذا النوع من المقاومة من خلال عنقود الجين (van*RSHAX*Gene ,cluster) الذي يقع على الترانزبوزون Tn1546 وهذا النوع من الترانزبوزونات يحتوي على جينين تنظيميين هما (van *S*,van *R*) . تتميز المقاومة من النوع van*A* بمستويات مقاومة عالية لمضاد الفانكومايسين ومضاد التيكوبلانين.تشفر مجموعة جينات van*A* لمقاومة مستحثة بمستويات عالية للفانكومايسين وبتراكيز مختلفة من المضاد وهذه المجموعة تكون محمولة على الترانزبوزون Tn1546 أو عناصر مشابه له جينياً Tn1546 like elements محمول على الكرموسوم او على بلازميداتاقترانية .ويعتقد ان جينات van*A* المحمولة على Tn1546 قد تكون محمولة على وحدة وراثية اكبر من الترانزبوزون واصغر من البلازميد والتي تؤدي إلى ظهور اختلافات في احجام البلازميدات التي تحملها (Sletvold *et al* .,2011). تعتمد مقاومة البكتريا للفانكومايسين على ميكانيكية تتضمن استبدال D-alanine في الطرف البيبتيدوكلايكان بحامض D-lactate أو α-hydroxy إي استبدال D-anayl- D-alanin بـ D-alanyl-D-Lactate بواسطة إنزيمات (van *H*,van *A*) وتكون آلفة الفانكومايسنلل D-alanyl-D-Lactate اقل بألف مرة من آلفة التركيب الأصلي في البكتريا الحساسة. ويعمل إنزيم (van *H*) والذي يسمى D-lactete dehydrogenase بتحويل حامض الباروفيك إلى حامض اللاكتيك,أما إنزيم (van *A*) والذي يسمى D-Ala-D-Lac فهو الذي يحفز على تكوين الطرف D-Ala-D-Lac الذي يحل محل D-anayl-D-alanin,بينما أنزيم (van *X*) والذي يسمى DD-Peptidase فيحلل D-anayl-D-alanine والذي يزيل موقع ارتباط الفانكومايسين إذ لو ارتبط به الفانكومايسين يتسبب في فقدان المقاومة, إما جين المقاومة (van *HAX*) أنزيم أيضي يوجد لتسهيل عملية استخلاص أنزيم van*H* dehydrogenase, van*A* ligase لتكوين D-Ala-D-lactate أن عملية تضخيم وتسلسل النيوكيلوتيدات أنتجت عنقود جين (van *HAX*) وهو مشابه لذلك الموجود في Tn1546 , أن انتقال جينات المقاومة للفانكومايسين من *Ent.faecalis* إلى *S.aureus* قد أوضح بواسطة (Noble *et al* .,1992) والانتقال بين الجينات لمثل هذا المستوى العالي وغيرها من المضادات الحياتية المقاومة قد سجلت من *S.aureus* إلى *S.aureus*المعزولة سريرياً (Severin *et al*.,2004).

المصادر العربية

1 - ديوان , إيمان خضير (2004) دراسة انتشار بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسلين في صالات الولادة في مدينة بغداد ومقاومتها للمضادات الحيوية. رســـالة ماجستير ,كلية العلوم ,الجامعة المستنصرية.

2 - عبد الرزاق , رغد عبد اللطيف (2006). دراسة عوامل الضراوة للبكتريا المعزولة من الأدوات المستخدمة في رعاية الأطفال الخدج. رسالة ماجستير , كلية العلوم , الجامعة المستنصرية. (116) صفحة.

3 - عبد السلام (2010) . المضادات الحيوية والمقاومة الجرثومية المجلد (5) , العدد 9 .

4 - غالـــي ميثـــــم (2005) . التحـــري عـــن المكـــورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* المنتجة لانزيم البيتا لاكتاميز لدى عمال المطاعم الحاملين لها في مدينة الديوانية .جامعة القادسية ,كلية العلوم ,علوم الحياة .

5 - كاظم , ميعاد (2007). دراسة بكتريولوجية ووراثية للمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين المعزولة من مستشفيات النجف . رسالة ماجستير كلية العلوم ,علوم الحياة ,جامعة الكوفة.

6 - مرعي , سمير (2011) . المعزولات الجرثومية وحساسيتها للمضادات الحيوية في مستشفى الاطفال بجامعة دمشق , المجلد 27 .

المصادر الاجنبية

- Al- Rawahi , G.N.; Schreader , A.G.; Porter , S.D.; Roscoe , D.L.; Gusta fson , R.; and Bryce , E.A.(2008). Methecillin resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage among injection drug users : six year later. J.Clin. Microbiol.,46 : 477-479.
- Arthur M . Molinas C , Depardieu F. and Courvalin , P. (1993) . Characterization of Tn 1546 , a Tn 3 – related transposon Conferring glycopeptide resistance by cynthesis of depsipeptide Peptidogly Can Precursors in *Enterococcusfaecium* Bm 4147 . J Bacteria 175 : 117 – 127 .
- Baron , E.J.; and Finegold , S.M. (1990). Diagnostic Microbiology , ed 8. Pheladelphia. CV. Mosby. 1: 105-325.
- Bauer , A.W.; Kirby , W.M.; Sherries , J.C.; and Turck , m. (1966). Antibiotic susceptibility test by a standardized single disk method. Am. J. Clim. Path., 36 : 493 – 496.
- Bilal , N.E. and Gedebou , M , in press.(2000) . *Staphylococcus aureus* as a paradigm of a persistent problem of bacterial multiple antibiotic resistance on . Abha, Saudi Arabia . J .Eastern Mediterranean Heal .
- Brakstad , O.G., Aasbakk , K. and Maeland . J.A.(1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by Poly Merase Chain reaction amplification of the nuc geme. 1 Clin. Microbial 30 , 1654-1660.

- Brooks , G.F;Butel , J.S. and Morse , S.A.(2001). Jawetz , melnick , and Adelbergys medical microbiology . 22 ed . ADivision of Mc Graw- Hill Companies.
- Centers for Disease control and prevention (CDC).(2007). Four pediatric deaths form community .acquired methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* – Minnesota and North Dakota , 1997-1999. MMWR. Morb . mortal Wkly . Rep. 1999. 48(32): 707-710.
- Clark , N. C.; Weigel , L.M.; Patel , J. B.; and tenover , F.C.(2000). Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin – resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania . Antimicrob. Agents chemother 49:470-472.
- CLSI (2009) . Performance standard S for Antimicrobial Susceptibility Testing , (19) Supplement , CLSI document M 100 – S 19 . 29(3). CLSI , Wayne , Pennsylvania USA .
- Collee, G.J.; Faser, G.A.; Marmion , B.and Simmons , A.(1996). Mackie and Maccartoey. Parctical Medical Microbiology .
- Cui , L., H. murakami , K. Kuwahara – Arai H. Hanaki and Hiramatsu, K. (2000). Contribution of athickened cell wall and its Iutaine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu 50 . Antimicrob Agents chemother , 44: 2276-85.
- Daily , L.; Coomds , G.; O'Brien , F.G.; Pearman , J.W. and Riley , T.V.(2005). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Western Australia . Emerging Infect. Dis., 11(10) : 64 – 76.
- Damoiseaux , R.(2005) .Antibiotic treatment for acute otitismedia : timeto think again . CMAJ. MAR. 172(5) : 657-658.
- Forbes , B.A.; Sahm , D.F. and Wesisfeld A.S.(2007). Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology , Internatinaledition , 12th ed., Mosby year Book , Inc ., USA. PP1031.
- Fuda,C.;Hesek,D.;Lee,M.;Heilmayer,W.;Novak,R.;Vkulenko,S.B.;and Mobashery,s.(2006).Mechanistic Basis for the action of new cephalosporin antibiotes effective against methicillin-and vancomyein-resistnt *Staphylococcus aureus*. J.Biol.Chem.,281:10035-10041.
- Gordon , D. and Christensen ,M.D.(2002). Pathogenesisof *Staphylococcal* infections. Shane ottmann , reviused by mike Williams.
- Harley , J.P. and Prescott , L.M. (2002) Laboratory Exercises in microbiology . 5th ed ., Mc Graw – Hill publishing companics USA . PP. 466.
- Hososaka , Y.; Hanaki , H.; Hayashi , L.; and Sunakaw , K. (2004) . Epidemological investigation of beta – lactam antibiotic in duced vancomycin MRSA Comparison of detection rate of BIVR With or with out czx . J. Antibiot ., 57(2) : 204 – 216.

- Klevens , R.M.; Morrison , M.A.; Nadle , J.; Petit , S.; Gershman , K.; Ray , S.; Harrison , L.H.; Lynfield , R.; Dumyati , G.; Townes , J.M.; Craig , A.S.; Zell , E.R.; Fosheim , G.E.; Mc Dougal , L.K.; Carey , R.B. and Fridkin , S. K.(2007). Invasive methicillin – resistant *Staphylococcus aurers* infection in united states . JAMA , 298 (15) : 1763 – 1771.
- Kowalski , T.J.; Berbari, E.F.; and osmon , D.R.(2005). Epidemiology , treatment and prevention of community – acquired methicillin resistant *Staphylococcus aurers* Infection . mayo. Clin . proc . 80(9) : 1201-1208
- Loss , B.G., Bernstein , J.M.; Dryja , D.M.; Murphy , T.F. and Dickinson , D.P .(1989). Determination of epidemiology and transmission of nontypeable haemophilkus influenzaein children with otitis media by comparison of total genomic DNA restriction fingerprints . Infect and Immun ., 57(9) : 2751 – 2757.
- Lowy , F.D.(1998). *Staphylococcus aureus* infections . N. Engl . J. Med ., 339 : 520-32.
- Loy , A.H.C.; Tan , A.L. and Lu , P.K.S.(2002). Microbiology of chronic suppurative otitis media in singapore . Singapore . Med. J., 43(6) : 296- 299.
- Macfaddin , J.F.(2000). Biochemical test for identification of medical bacteria 3rd ed Lippin cott Williams and wilkins , USA :555-565.
- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe,1999-2002.Emerg.Infect.dis.,
- Moges , A.F.; Genetu , A. and mengistu , G. (2002). " Antibiotic sensitivities of common bacterial pathogensin urinary tract infection , East Afric . Med : J. Vol . 79 . No. 3 , pp. 167 – 169.
- Nicho , K.A.; Slii , M.; Laing, M. and Johnson , J.L.(2006). Molecular epidemiology of urinary tract isolates of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from North America . Int .J.Antimicrob . Agent. 27 : 392 – 396 .
- Noble , WC , Virani Z , Creel (1992) . A . G . A . Cotransfer of van comycin and other resistance genes form *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus* . FEMS Microbiol Lett 92 : 195 – 198
- O Riodan , K.; and Lee , J.C. (2004) . *Staphylococcus aureus* capsular poly sacharides . J.Clin Microbiol. Infect . DIS . 17(1) : 218-234.
- Oliveira , A.M. and Romos , M . C . (2002) . PCR . ripoty ping of *Staphulococcus* . Braz . J. Med . Biol . Res ., 35 : 175 – 180 .
- Priya , S.(2007). Methicillin – resistant *Staphylococcusaureus.* The latest health cares. Infect. DIS . 21: 11-17.

- Severin , A., Tabei , K., Tenover , F., Chung , M., and Clarke , N.(2004). High level oxacillin and Vancomycin resistance and altered cellwall composition in *Staphylococcus aureus* corrging the staphylococcal Mec A and Enterococcal Van A gene Compex . J. Biol Chem ., 279 : 3398 – 3407.
- Sila , j .; sauer , p . and kolar ,m.(2009) . comparision of the prevalence of genes coding for enterotoxins , exfoliatins , panton - valentine leukocidin and TSST - I betweenmethicillin - resistante and inethicillinSusceptible isolates of staphylo coccus in Olomouc. Biomed. pap , thed . Fac . TUTniv-palaky Olomouc CzechREPUB.,153(3):515-218.
- Sletvold , H.; Johnsen , P.J.; Wikmark , O.G.; Simonsen , G.S.; Sundsfj-ord , A. and Nielsen , K.M.(2011). Tn 1546 is part of alarge plasmid-encoded genetic Unit horizontally disseminated among clonal *Enterococcus faecium* lineages.J. Antimicrob. Chernther . 65 : 1894-1906.
- Tenover , F.C.; Weigel , L.M.; Appelbaum , P.C.;Mc Dougsl , L.K.; Chaitram , J.; Mc Allister , S.; Clark , N.; Killgore , G.; OHara , C.M.; Jevitt , L.; Patal , J.P. and Bozdogan , B.,(2004). Vancmycin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from apatient in pennsylvania . Antimicrobial Agents And chemotherapy , Jan. 48(1) : 275-280.
- Tiemersmaet.E.W.;Bronzwaer,S.;Lytikainnen,O.;Degener,J.and Bruinsum .M.(2004).
- Weigel , L.M.;Donlan , R.M.; Shin , D.H.; Jensen , B.; Clarck , N.C.; Mc Dougal , L.K.; Zhu , W.; Musser , K.A.; Thompson , J.; Kohlerschmidt , D., Dumas N.; Limberger , R.J. and patel , J.B.(2007). High – level vahcomycin – Resistant *Staphylococcus aureus* isolates Associated with a polymicrobial Biofilm. J.Antimicrob. Agent. Chemother. 51: 231-238
- Wright , G.D., Holman , T.R. and Walsh , C.T. (1993) . Purication and characterization of Van R and cytosolic domain of van S a two – Component regulatotry system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM 4147 . Biochem., 32 : 5057 – 5063 .
- Biswajit S , Anil K S , A brajyoti G , Manjusri B. (2008). Identification and characterization of avancomycin – resistsnt *Staphylococcus aureus* isolated form KolKata . (South Asia) . J. Med Microbiol ; 57 : 72 – 9.
- Donabedian , S., Hershberger , E., Thal , L.A., Chow , J.W., Clewell , D.B., Dunn , B.R. and Zervos , M.J.(2000). PCR. Fragment length Polymorphism analysis of Vancomycin resistant *Entercoccus faecinm* / Clin. Microbiol 38 , 2885-2888.
- Grundmann, H.,Aires- ge-Sousa,M.,Boyce,J,.and Tiermersma ,E.(2006) . Emergence and resurgence of methicillin – resistant *Staphylococcus aureues* as apublic – health . Lancet., 368:874-85.