Isolation *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients in Sacred Kerbela governate and diagnosis in PCR technology

عزل بكتريا *Staphylococcus aureus* الحساسة و المقاومة للمثيسلين (MRSA) من المرضى في محافظة كربلاء المقدسة و تشخيصها بتقنية PCR

نيران عدنان عبدالكاظم الجبوري / جامعة كربلاء/ كلية العلوم
أ.د. علي عبدالكاظم الغانمي / جامعة كربلاء / كلية العلوم

* البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الأول

المستخلص :

تضمنت هذه الدراسة عزل بكتريا *Staphylococcus aureus* الحساسة و المقاومة للمثيسلين (MRSA) وتشخيصها. فقد تم الحصول على 18 عزلة بكتيرية من أماكن مختلفة من أجسام المرضى الراقدين في مستشفى الحسين (ع) في محافظة كربلاء المقدسة بواقع عزلتين (11.11) % من الحروق و عزلة واحدة من الأذن (5.55) % و أخرى من الجروح (5.55) % و ثلاث عزلات من الإدرار (16.66) % وعزلتين من المهبل (11.11) % و ثلاث عزلات من أشخاص مصابين بتعفن الدم (16.66) % فضلاً عن ست عزلات من الأنف (33.33) % .

شُخصت العزلات أعلاه بتقنية PCR وإتضح أن العزلات الثماني عشرة تحوي جين *femA* الذي يثبت عائديتها للنوع *S. aureus* كما تبين أن تسع عزلات فيها تحوي الجين *mecA* الذي يمنحها المقاومة للمضادات الحيوية (MRSA) .

اشتملت هذه الدراسة أيضاً على اختبار حساسية عزلات *S. aureus* لعدد من المضادات الحيوية و إتضح أن جميع العزلات كانت مقاومة للبنسلين فيما كانت جميعها حساسة للفانكومايسين.

Abstract :

This study included the isolation of sensitive *Staphylococcus aureus* and Methicillin-resistance *S. aureus* (MRSA) and diagnosis bacteria . 18 isolates of *S. aureus* were obtained from different parts of patient's bodies hospitalized in Al-Hussein hospital in Sacred Kerbalaa governate by two (11.11%) from burns ,One (5.55%) from ear , One (5.55%) from wounds, Three isolates (16.66%) from urine , Two (11.11%) from vagaina, Three (16.66%) from blood and six (33.33%) from nasal .

Isolates above were diagnosed by PCR technique and it turns out that the 18 isolates containing *femA* gene which confirmed that all belong to *S. aureus* while nine isolates containing *mecA* gene which gave it antibiotic resistance (MRSA) .

This study also included a sensitivity test for *S. aureus* isolates to several antibiotics and it turns out that all isolates were resistant to penicillin while all sensitive to vancomycin .

المقدمـة :

على الرغم من أن بكتريا *Staplylococcus aureus* تتعايش بشكل طبيعي مع الانسان كونها تستوطن (20 – 30) % من الأشخاص البالغين ، الاّ انها في الوقت نفسه تصنف ضمن الممرضات الغازية (invasive pathogens) إذ انها تعد المسبب الرئيس لإصابات الجلد والأنسجة الرخوة وإصابات مجرى الدم والقنوات التنفسية والقناة البولية فضلاً عن إمكانية غزوها لأي نسيج في الجسم محدثة مجموعة من الأمراض الخطيرة مثل التهاب نقي العظم (Osteomyelitis) والتهاب شغاف القلب (endocarditis) وذات الرئة (Pneumonia) وأمراض التسمم الغذائي [1] و[2] و[3].

و من جانب آخر فأن ظهور بكتريا *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين (Methicillin – resistant *S. aureus*) وانتشارها بشكل ملفت للنظر ومثير للقلق خاصة في العقدين االأخيرين يمثل تحدياً كبيراً للصحة العامة وعبئاً اقتصادياً بالنظر لصعوبة علاجها فضلاً عن ارتفاع معدل الوفيات جراء الإصابات الناجمة عنها إذ تتصف البكتريا المذكورة باكتسابها لجين *mecA* الذي يمنحها المقاومة لمضادات β-lactam (البنسلينات والسيفالوسبورينات) و غالباً ما تتفاقم ضراوتها لتصبح مقاومة لمدى واسع من المضادات الحيوية [4] و[5] .

إن خطورة بكتريا MRSA تتطلب توفر طرائق دقيقة للكشف عنها وعموماً يتوفر نوعان من الطرائق لتحقيق هذا الهدف هما : الطرائق التقليدية والطرائق الجزيئية ، إذ تعتمد الأولى منها على استخدام أوساط أكار انتقائية مزودة بمواد ملونة حيث

تستغرق عملية الكشف عنها حوالي (18- 24) ساعة فيما تعتمد الثانية على استخدام تقنية (Polymerase Chain Reaction PCR) التي تختزل فترة الكشف عنها الى (2 - 3) ساعات [6] و [7] .

وبالنظر لخطورة بكتريا *S. aureus* الحساسة للمضادات الحيوية عموماً و المقاومة لهذه المضادات MRSA خصوصاً فقد كان هدف هذه الدراسة هو تحديد مدى أنتشار و تزايد مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية من خلال الحصول على عزلات من هذه البكتريا وتشخيصها بالطرائق التقليدية و الجزيئية .

المواد وطرائق العمل :

تم اجراء عمليات العزل و التشخيص في مختبر الصحة العام و مستشفى الحسين (ع) التعليمي في كربلاء المقدسة وذلك بجمع مسحات كثيرة من أصابات مختلفة من المرضى الراقدين في مستشفى الحسين (ع) للفترة 1/11/2015 و لغاية 31/1/2016 شملت الحروق والجروح والأنف والإدرار والمهبل و الدم ، زرعت تلك المسحات على وسطي أكار الدم و المانيتول و حضنت بدرجة حرارة 37 **م°** لغرض عزل بكتريا *S. aureus* .

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *S. aureus* اذ تم تشخيصها من خلال تنميتها بدرجة 37 م° فضلاً عن الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية .

تم تشخيص البكتريا المعزولة باستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي (Polymerase chain reaction , PCR) و ذلك من خلال أستخلاص الـ DNA من عزلات بكتريا *S. aureus* باستخدام عدة التشخيص المجهزة من شركة Wizard Genomic DNA Purification Kit , Promega , USA بحسب تعليمات الشركة .

تم استخدام البوادئ الموضحة صفاتها في الجدول الاتي :

الجين المستخدم	اسم البادئ	تتابع البادئ 5`—3`	Amplicon size (bp)	المصادر
femA	*FemA-F* *FemA-R*	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132	[8]
MecA	*MecA-F* *MecA-R*	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	310	[9]

- *femA* (132 bp) for *Staph. aureus*
- *mecA* (310 bp) for Methicillin Resistance *Staph. aureus* (MRSA)

تم برمجة جهاز الـPCR كما في الجدول الاتي :

الخطـوة	العمليـــة	
1	دورة واحدة لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 95 °م للمسخ الأولي لـ DNA القالب .	
2	35 دورة تضمنت :	
	A	1 دقيقة عند درجة حرارة 96 °م لمسخ DNA القالب .
	B	30 ثانية عند درجة حرارة 52 °م لارتباط البوادئ لـ DNA القالب .
	C	1 دقيقة عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البوادئ المرتبطة .
3	دورة واحدة لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 72 °م للاستطالة النهائية لشريط لـ DNA المتضاعف .	

تم أختبار حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* المعزولة في هذه الدراسة تجاه عدد من المضادات الحيوية وفق طريقة إنتشار الاقراص (Disk diffusion) لتحديد حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية على وفق ما جاء في [10] اشتملت على Penicillin (P) و Cefoxitin (FOX) و Tobramycin (TOB) و Tetracycline (TE)و Gentamicin (CN) و Netilmicin (NET) و Chloramphenicol (C) و Vancomycin (VA) و Clindamycin(CD) و Azithromycin(AZM) و Erythromycin (E) و Trimethoprim- sulfomethoxazole (STX).

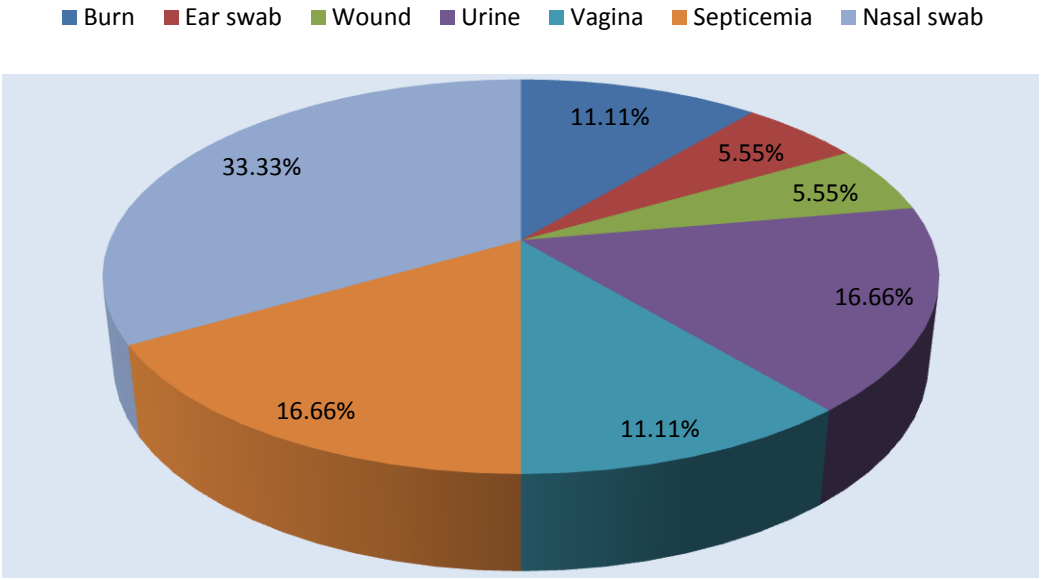
النتائج و المناقشة :

بعد جمع العينات من مناطق مختلفة من أجسام المرضى الراقدين في مستشفى الحسين (ع) التعليمي في محافظة كربلاء المقدسة زرعت تلك العينات على وسطي أكار الدم و المانيتول وحضنت بدرجة حرارة 37 مº واعتماداً على نتائج التشخيص التي سيرد ذكرها لاحقاً ، أسفرت عملية العزل عن الحصول على 18 عزلة من بكتريا *S. aureus* توزعت هذه العزلات بواقع عزلتين (11.11) % من الحروق و عزلة واحدة من الأذن (5.55) % و أخرى من الجروح (5.55) % و ثلاث عزلات من الإدرار (16.66) % وعزلتين من المهبل (11.11) % و ثلاث عزلات من أشخاص مصابين بتعفن الدم (16.66) % فضلاً عن ست عزلات من الأنف (33.33) % وحسب ما هو موضح في الشكل **1** .

يتضح من نتائج هذه الدراسة أن النسبة الأكبر من عزلات بكتريا *S. aureus* تم عزلها من الأنف (6 عزلات بنسبة 33.33 % من المجموع الكلي للعزلات) . و جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما أشارت اليه الدراسات السابقة من أن الأنف يعد المستوطن الرئيس لبكتريا *S. aureus* إذ يمكن لهذه البكتريا أن تتواجد فيه أما بشكل عابر (Transitory) أو تستوطنه بصورة دائمية كجزء من النبيت الطبيعي [11] .

و من جانب آخر فقد أشارت دراسات كثيرة الى أمكانية عزل هذه البكتريا من أجزاء الجسم الأخرى ولكن بدرجة أقل مما هو في الأنف ففي دراسة أجريت في نيوزيلندا تم عزل البكتريا المذكورة من الجلد و الجروح و الأذن و مجرى الدم و الإدرار [12] .

يتضح من نتائج هذه الدراسة أن النسبة الأكبر من عزلات بكتريا *S. aureus* تم عزلها من الأنف (6 عزلات بنسبة 33.33 % من المجموع الكلي للعزلات) . و جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما أشارت اليه الدراسات السابقة من أن الأنف يعد المستوطن الرئيس لبكتريا *S. aureus* إذ يمكن لهذه البكتريا أن تتواجد فيه أما بشكل عابر (Transitory) أو تستوطنه بصورة دائمية كجزء من النبيت الطبيعي [11] .



الشكل 1 : توزيع بكتريا *S. aureus* حسب أماكن عزلها من اجسام المرضى الراقدين في مستشفى الحسين (ع) التعليمي في محافظة كربلاء المقدسة .

و من جانب آخر فقد أشارت دراسات كثيرة الى أمكانية عزل هذه البكتريا من أجزاء الجسم الأخرى ولكن بدرجة أقل مما هو في الأنف ففي دراسة أجريت في نيوزيلندا تم عزل البكتريا المذكورة من الجلد و الجروح و الأذن و مجرى الدم و الإدرار [12] .

لغرض تشخيص بكتريا *S. aureus* فقد تم تنميتها على وسط (Manitol salt agar , MSA) فضلاً عن الفحوصات الكيموحيوية .

اسفرت نتائج الزرع الميكروبي على وسط اكار الدم بعد مدة حضن 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ عن الحصول على مستعمرات دائرية ومحدبة وبراقة وذات لون أصفر – ذهبي . اما مجهرياً فكانت بهيئة مكورات موجبة لصبغة كرام ومتجمعة بهيئة عناقيد (Clusters) مما يدل على ان هذه البكتريا تعود لجنس المكورات العنقودية (*Staphylococcus*) وهذا يتفق مع ما وصفه [13] .

امتازت مستعمرات بكتريا *S. aureus* النامية على الوسط MSA بكونها مستعمرات غير شفافة (Opaque) وبراقة (Shiny) وذات لون اصفر . يستخدم وسط MSA لتمييز بكتريا *S. aureus* عن بقية المكورات الموجبة لصبغة كرام المنتجة للكاتليز . يحتوي هذا الوسط على 7.5 % من كلوريد الصوديوم الذي يثبط نمو الكثير من الأحياء المجهرية ، اما بكتريا

S. aureus فتتمكن من النمو عليه وتعمل على تخمير سكر المانيتول الموجود فيه مؤدية الى انتاج حامض يعمل بدوره على تحول كاشف الفينول الأحمر من اللون الوردي الى الأصفر[14].

عند اجراء الفحوصات الكيموحيوية على عزلات بكتريا المكورات العنقودية وجد أنها كانت منتجة للكاتليز من خلال مقدرتها على تحطيم بيروكسيد الهيدروجين(H_2O_2) وتحويله الى ماء وغاز الأوكسجين اذ اتسمت النتيجة الموجبة بظهور فقاعات غازية .

وعندما خضعت هذه العزلات لأختبار إنتاج انزيم مجلط البلازما (Coagulase) فقد اعطت نتيجة موجبة ، مما يدل على أن هذه العزلات تعود لبكتريا *S. aureus* وهذا يتفق مع ما وصفه [13] . ويوضح الجدول **1** الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *S.aureus* المعزولة في هذه الدراسة.

الجدول 1 : الاختبارات الشكلية و الكيموحيوية لبكتريا *S. aureus* المعزولة من المرضى الراقدين في مستشفى الحسين (ع) التعليمي في محافظة كربلاء المقدسة .

ت	الاختبار	الاستجابة
-1	صبغة غرام	+
-2	المظهر الخلوي	خلايا كروية بشكل عناقيد
-3	ظروف النمو	لا هوائية اختيارية
-4	اختبار الكاتليز	+
-5	اختبار الاوكسيديز	_
-6	تخمر المانيتول	+
-7	اختبار التجلط	+
-8	الوسط الانتقائي Manitol–Salt Agar	+

تم اختبار حساسية عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* تجاه عدد من المضادات الحيوية اشتملت على Penicillin و Cefoxitin و Tobramycin و Tetracyclineو Gentamicin و Netilmicin و Chloramphenicol و Vancomycinو Clindamycin و Azithromycin و Erythromycin و Trimethoprim- sulfomethoxazole.

و قد أظهرت النتائج الموضحة في الجداول **2** و**3** و**4** و**5** أن جميع عزلات بكتريا *S. aureus* المتحصل عليها في هذه الدراسة كانت مقاومة للبنسلين . و قد جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما ورد في العديد من الدراسات السابقة ، فقد ظهر أن بكتريا *S. aureus* المعزولة من عينات الإدرار لمجموعة من النساء في أحدى مستشفيات نيجيريا كانت مقاومة بنسبة 100 % للبنسلين [15]. و في دراسة أخرى أجريت في النيبال على بكتريا *S. aureus* المعزولة من الجلد و الأنسجة الرخوة لمجموعة من المرضى في أحدى المستشفيات بلغت مقاومة البكتريا للبنسلين 97.3 % [16] .

يحتوي البنسلين على حلقة β-lactam في تركيبه و يمكن أن تتحقق مقاومة البكتريا لهذا المضاد بثلاث آليات ، الأولى : تتمثل بإفراز أنزيمات β-lactamases التي تعمل على تحلل حلقة البيتا لاكتام الموجودة في المضاد ، و الثانية : تقليل نفاذية البكتريا للمضاد و بالتالي تمنعه من الدخول الى داخل الخلية ، أما الثالثة : فتعتمد على تغيير الهدف المحدد للمضاد الموجود في الخلية مما يتعذر على المضاد الأرتباط بالهدف المرسوم له ، و بالتالي عدم قتل البكتريا [17] .

و بالتمعن في جداول فحص الحساسية يتضح أن جميع العزلات المتحصل عليها في هذه الدراسة كانت حساسة للمضاد فانكومايسين . و تتفق هذه الدراسة مع ما ذكره [18] , إذ أن عزلات بكتريا *S. aureus* المتحصل عليها من مرضى في وحدة الجراحة بإحدى مستشفيات بنغلاديش كانت حساسة بنسبة 100 % للمضاد قيد الدراسة ، كما تم الحصول على نسبة الحساسية ذاتها لبكتريا *S. aureus* المعزولة من المرضى في إحدى مستشفيات أثيوبيا [19].

في حين أشارت دراسات أخرى الى ظهور بكتريا *S. aureus* مقاومة للمضاد فانكومايسين فقد بلغت نسبة المقاومة 21 % للبكتريا المعزولة من الجلد و الأنسجة الرخوة لمرضى إحدى مستشفيات النيبال [16]، بينما بلغت نسبة المقاومة 10.81 % للبكتريا المعزولة من المرضى الراقدين في مستشفى الكندي التعليمي في بغداد [20].

تشير نتائج الدراسة الحالية أيضاً الى أن عزلات بكتريا *S. aureus* المتحصل عليها في هذه الدراسة كانت مقاومة للمضادات Cefoxitin و Tetracycline و Erythromycin و Clindamycin و Azithromycin و Gentamicin و بنسب بلغت (50 و11.11 و38.9 و 5.55 و 44.44 و 11.11) %،على التوالي من مجموع العزلات الثمانية عشر قيد الدراسة .

ينتمي المضادان Erythromycin و Azithromycin الى مجموعة مضادات Macrolide و يمكن تفسير مقاومة البكتريا لهما بآليتين ، الأولى : من خلال إفراز إنزيم Esterase الذي يعمل على تحلل حلقة اللاكتون (Lacton ring) أو يعمل الأنزيم على تغيير تركيب المضاد عن طريق نقل مجموعة فعالة (Functional group) للمضاد مثل مجاميع acyl و ribosyl و phosphoryl و الثانية : تتمثل بتغيير الهدف للمضاد الحيوي ، بينما تتمكن البكتريا من مقاومة المضاد Clindamycin عن طريق تغيير تركيب المضاد بفعل إنزيم Nucleotide transferase [17] .

الجدول 2 : اختبار حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* المعزولة من الحروق و الجروح والأذن تجاه مضادات الحيوية .

1-E	1-W	2-B	1-B	رقم العزلة / المضاد الحيوي	ت
R	R	R	R	P	-1
R	R	R	R	FOX	-2
S	S	S	S	VA	-3
S	S	R	R	TE	-4
R	S	R	R	E	-5
S	S	R	S	CD	-6
S	S	S	S	NET	-7
S	S	S	S	TOB	-8
S	S	S	S	SXT	-9
S	R	R	R	AZM	-10
R	S	S	R	CN	-11
S	S	S	S	C	-12

- **1**-B و 2-B تعني الحروق ل Burn .
- 1-W تعني الجروح و 1-E تعني الاذن Ear.

الجدول 3 : اختبار حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* المعزولة من الإدرار و المهبل تجاه مضادات الحيوية .

2-V	1-V	4-U	3-U	2- U	رقم العزلة / المضاد الحيوي	ت
R	R	R	R	R	P	-1
S	S	S	R	S	FOX	-2
S	S	S	S	S	VA	-3
S	S	S	S	S	TE	-4
R	S	R	S	S	E	-5
S	S	S	S	S	CD	-6
S	S	S	S	S	NET	-7
S	S	S	S	S	TOB	-8
S	S	S	S	S	SXT	-9
S	S	S	R	R	AZM	-10
S	S	S	S	S	CN	-11
S	S	S	S	S	C	-12

- 2-U و 3-U و 4-U تعني الإدرار Urine .
- 1-V و 2-V تعني المهبل Vagaina .

الجدول 4 : اختبار حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* المعزولة من الدم تجاه مضادات الحيوية .

ت	رقم العزلة / المضاد الحيوي	1-S	2-S	3-S
-1	P	R	R	R
-2	FOX	R	S	S
-3	VA	S	S	S
-4	TE	S	S	S
-5	E	S	R	S
-6	CD	S	S	S
-7	NET	S	S	S
-8	TOB	S	S	S
-9	SXT	S	S	S
-10	AZM	S	R	R
-11	CN	S	S	S
-12	C	S	S	S

❖ 1-S و 2-S و 3-S تعني الدم Septicemia .

تتمكن بكتريا *S. aureus* من مقاومة التتراسايكلين بآليتين هما الأخراج الفعال(Active efflux) للمضاد من البكتريا مما يؤدي الى تخفيف تركيز المضاد داخل الخلية فضلاً عن الإلية الأقل شيوعاً المتمثلة بإيقاف فعالية المضاد عن طريق عمليات الأكسدة و الاختزال(Redox process) ، في حين تتمكن هذه البكتريا من مقاومة المضاد Cefoxitine من خلال تحليل حلقة β-lactam الموجودة في تركيب هذا المضاد [17] .

الجدول 5 : اختبار حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* المعزولة من الأنف تجاه مضادات الحيوية .

ت	رقم العزلة / المضاد الحيوي	11-N	10-N	8-N	68-N	64-N	73-N
-1	P	R	R	R	R	R	R
-2	FOX	R	R	R	S	S	S
-3	VA	S	S	S	S	S	S
-4	TE	S	S	S	S	S	S
-5	E	S	R	S	S	S	S
-6	CD	S	S	S	S	S	S
-7	NET	S	S	S	S	S	S
-8	TOB	S	S	S	S	S	S
-9	SXT	S	S	S	S	S	S
-10	AZM	S	R	S	S	S	S
-11	CN	S	S	S	S	S	S
-12	C	S	S	S	S	S	S

❖ 11-N و 10-N و 8-N و 68-N و 64-N و 73-N تعني الأنف Nasal .

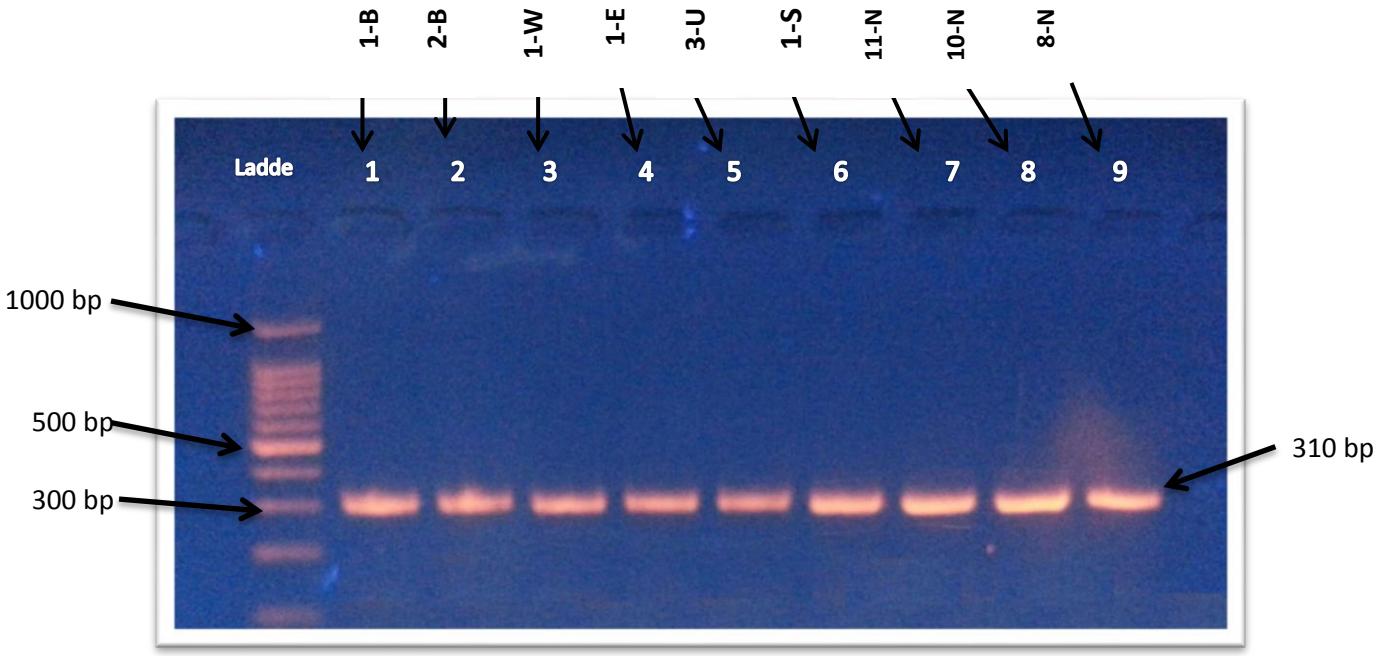
يصنف المضاد Gentamicin ضمن مجموعة Aminoglycosides و تقاوم البكتريا هذا المضاد من خلال إنزيم Nucleotide transferase الذي يعمل على تغيير تركيب المضاد عن طريق نقل مجموعة فعّالة (Functional group) للمضاد مثل مجاميع acyl و ribosyl وPhosphoryl أو Thiol و الثانية : تتمثل بتحوير الهدف للمضاد الحيوي بواسطة عملية Methylation على الحامض النووي 16S rRNA ، و الثالثة : تقليل نفاذية جدار البكتريا للمضادات الحيوية و بالتالي تمنعها من الدخول الى داخل الخلية البكتيرية [17] .

إن الكشف السريع (Rapid identification) عن بكتريا MRSA يعد ضرورياً لإعطاء تشخيص مبكر (Early diagnosis) لهذه البكتريا [21] . و بالنظر الى أن الطرائق التقليدية المتبعة في الكشف تتسم بكونها بطيئة فضلاً عن انه لا يمكن الوثوق بنتائجها [22] لذا فأن الحل البديل هو التوجه نحو استخدام الطرائق الجزيئية باستخدام تقنية (PCR Polymerase Chain Reaction إذ تتميز الأخيرة بكونها سريعة و ذات حساسية (Sensitivity) و تخصص (Specificity) عاليين على الرغم من أنها مكلفة (Expensive) [23] و [24] و [25] و [26] .

استخدمت تقنية PCR في هذه الدراسة للكشف عن وجود جين *mecA* في بكتريا *S. aureus* إذ أن وجود هذا الجين في البكتريا يعني أنها مقاومة للمثيسلين MRSA . يوضح الشكل **8** الترحيل الكهربائي لنواتج PCR و التي يتبين من خلالها أن البادئ (Primer) الخاص بالجين *mecA* كان ناجحاً في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه 310 bp و عند التمعن في الشكل يتضح أن 9 عزلات من البكتريا قيد الدراسة تحوي جين *mecA* . و قد جاءت هذه النتائج تأكيداً لنتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية في الجداول **5** و **6** و **7** و **8** والتي أوضحت أن 9 عزلات من بين الثمانية عشر عزلة المتحصل عليها في هذه الدراسة كان مقاومة MRSA بالنظر لمقاومتها للمضادين Penicillin و Cefoxitin اشتملت العزلات المذكورة على العزلتين 1-B و 2-B (المعزولتين من الحروق) و العزلة 1-W (المعزولة من الجروح) والعزلة 1-E (المعزولة من الأذن) و العزلة 3-U (المعزولة من الإدرار) و العزلة 1-S (المعزولة من الدم) فضلاً عن العزلات 11-N و 10-N و 8-N (المعزولة من الأنف).

تُعزى المقاومة للمثيسلين الى وجود البروتين (PBP-2a Penicillin-binding protein 2a)الذي يشفر عنه بواسطة الجين *mecA* [4] يقع هذا الجين على منطقة من (*mec* SCC , Staphylococcal cassete chromosomal) [27]كما أن *mec* SCC يوجد مندمجاً (Integrated) على منطقة ثابتة على الكروموسوم قرب منشأ التكرار .

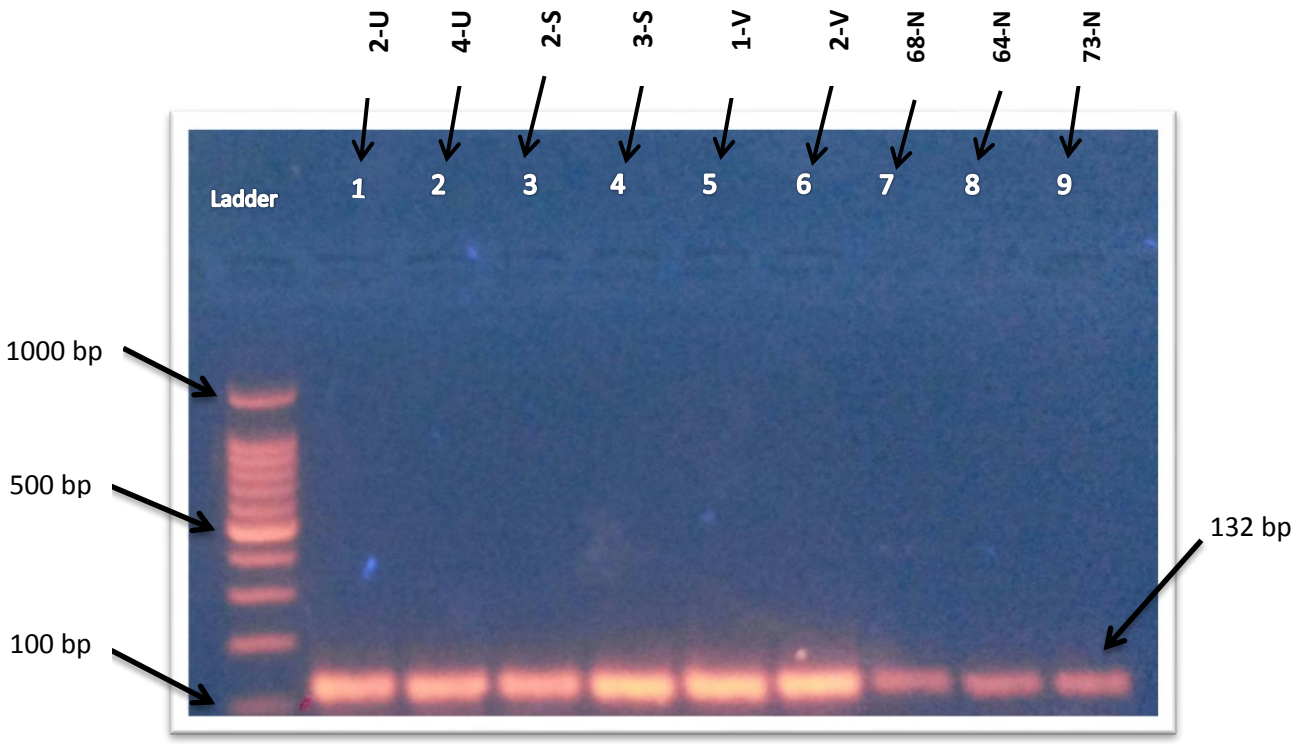
إن تشخيص البكتريا المقاومة للمثيسلين MRSA يعد ضرورياً للسيطرة على الإصابة بهذه البكتريا فضلاً عن معالجة المرضى ، لذا فأن التشخيص الجزيئي لجين المقاومة *mecA* يعد وسيلة مهمة في الاحياء المجهرية السريري [28].



الشكل 8 : الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *S. aureus* بإستعمال البادئ النوعي لجين *mecA* (310bp) ، بتركيز هلام (1.5)% ،و فولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.

و بالنظر لخلو العزلات التسعة المتبقية لبكتريا *S. aureus* قيد الدراسة من جين *mecA* فقد كان من الضروري التحري عن جين يثبت عائدية تلك العزلات للنوع *S. aureus* ، لذا أستخدمت تقنية PCR للكشف عن وجود جين *femA* الخاص ببكتريا *S. aureus* . و يوضح الشكل **9** الترحيل الكهربائي لنواتج PCR و التي يتبين من خلالها أن البادئ (Primer) الخاص بالجين *femA* كان ناجحاً في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه 132 bp . إن هذه النتيجة تعني أن العزلات المذكورة هي *S. aureus* كما انها جاءت تعزيزاً لنتائج الأختبارات الشكلية و الكيموحيوية و العدة التشخيصية الوارد ذكرها في الجداول **6** و**7** و**8**.

إن جين *femA* يتواجد فقط في بكتريا *S. aureus* سواء كانت حساسة أم مقاومة MRSA و أن الجين المذكور يلعب دوراً في أيض الخلية و تكوين السلسلة الجانبية للـ Pentaglycine [29] .



الشكل 9 : الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *S. aureus* بإستعمال البادئ النوعي لجين *femA* (132bp) ، بتركيز هلام (1.5)% ، و فولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة .

نستنتج من هذه الدراسة تزايد نسب بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثيسلين MRSA في محافظة كربلاء المقدسة مما يعكس الاستخدام غير المدروس للمضادات الحيوية في علاج المرضى في المحافظة .

المصـــادر :

1- **Costello,** M.C.(2010). Single nucleotide polymorphism (SNP) – genotyping of Community Acquired Methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus*, including the subtyping of PVL toxin producers using Real – Time PCR. MSc thesis . the Queensland University of Technology .

2- **Norm ,** V. (2011) . Usage of antimicrobial agents and occurance of antimicrobial resistance in Norway. Tromsø/OsloISSN:1502-2307 .

3- **Wertheim ,** H.F; Melles, D.C.; Vos, M.C.; van Leeuwen, W.; van Belkum, A.; Verbrugh, H.A. and Nouwen, J.L. (2005) . The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*,5(12):751-762.

4- **Chambers,** H.F.(1988). Methicillin – resistance *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev* 1, 173- 186.

5- **Grundmann,** H.; Aires-de-Sousa, M.; Boyce, J. and Tiemersma, E.(2006) Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* ; 368:874-85.

6- **Fang ,** H. and Hedin, G.(2003)." Rapid Screening and Identification of Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Clinical Samples by Selective – Broth and Real Time PCR Assay . *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 41, No. 7, pp.2894-2899.

7- Warren , H. ; Liao , R.;Merz,L.; Eveland, M. and Dunne, W.(2004). " Detection of MRSA Directly from Nasal Swabs Specimens by a Real Time PCR Assay, " *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, No. 12, pp.5578-5561.

8- Mehrotra , M., Wang, G. and Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1 and methicillin resistance. Journal of Clinical Microbiology 38, 1032-1035.

9- Geha , D. J. ; James , R.U. ; Cynthia , A.G. and David , H.P. (1994) . Multiplex PCR for identification of Methicillin – resistant Staphylococci in clinical laboratory . Journal of Clinical Microbiology 32 (7) : 1768-1772 .

10- Morello , J.A.; Mizer, H.E.; and Granato. (2006). Laboratory manual and workbook in microbiology applications to patient care. 18th.ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York: 95-99.

11- Patrida, A.; Espunes, T. and Marines, J.B.(2010). Characterization and Persistence of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from the Anterior Nares and Throats of Healthy Carriers in a Mexican Community. J. of Clin. Microbiol. 48 (5) : 1701-1705.

12- Brett , M. (1999) . Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* in New Zealand in 1999.A report prepared for Ministry oh Health as part of the 1998/1999 contract (project C8) .

13- Quinn , P. J.; Carter, M. E.; Markey, B. and Carter, G. R. (2004). Clinical veterinary microbiology ,Elsevier limited.

14- De La Maza , L.M.; Pezzlo , M.T. and Baron, E.J.(1997).Color Atlas of Diagnostic Microbiology. Mosby-year book, Inc. USA.

15- Onanuga , A. ; Oyi, A.R. and Onaolapo , J.A. (2005) . Prevalence and susceptibility pattern of Methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates among healthy women in Zaria , Nigeria .

16- Khanaland , L.K. and Jha , B.K. (2010) . Prevalence of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among skin infection cases at a hospital in Chitwan , Nepal . Nepal Med Croll J; 12(4): 224-228 .

17- Kumar, S. and Varela, M.F.(2013) . Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education MSc. Thesis (A. Méndez-Vilas, Ed.).

18- Roy , P.C.; Shaheduzzaman , M.; Sultana , N. and Jahid , I.K.(2015) . Comparative antibiotic sensitivity pattern of hospital and community acquired *Staphylococcus aureus* isolated of Jessore, Bangladesh. Journal of bioscience and Medicines; 3,17-23.

19- Taddesse , Z.; Tiruneh , M. and Gizachew , M. (2014) . *Staphylococcus aureus* and its Antimicrobial Susceptibility Pattern in Patients, Nasalcarage of Health Personnel, and objects at Dessie referral hospital, Northern Ethiopia. Global Journal of Medical research: Online ISSN: 2249-4618 & Print ISSN: 0975-5888.

20- AL-azzawi , H.A.M.K.(2014). Detection of Vancomycin- Resistance among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Their effect on Autolysis. M.Sc thesis , College of Science-University of Baghdad .

21- Huang , Z. ; Zheng , X. ; Guan , J. ; Xiao , S. and Zhuo , C. (2015) . Direct detection of Methicillin – Resistance *Staphylococcus aureus* in sputum specimens from patients with Hospital- Associated *Pneumonia* using a novel multilocus PCR assay . Pathogen , 4,199-209 ; doi: 10.3390/ pathogens 4020199 .

22- Cunha , M.L.R.S. ; Sinzato , Y.K. and Silverira L.V.A. (2004). Comparision of method for the identification of Coagulase – negative *Staphylococci* . *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol*. 99(8) : 855-860 .

23- Kobayashi , N. ; Wu , H. ; Kojima , K. ; Taniguchi , K. ; Urasawa , S. Uehara , N. *et al*.(1994). Detection of mecA, femA and femB genes in clinical strains of *Staphylococci* using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* ; 113 : 259-66. (citted from Mohanasoundaram and Lalitha , 2008)

24- Kohner , P.; Uhl, J.; Kolbert , C. ; Persing , D. and Cockerill, I. F.(1999) Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining methicillin resistance in

clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus spp*. *J. Clin Microbiol* ; 37 : 2952-61.

25- Sakoulas , G. ; Gold, H.S. ; Venkataraman, L. ; Degirolami, P.C. ; Eliopoulos , G.M. and Qian, Q.(2001) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* : Comparison of susceptibility testing methods and analysis of mecA positive susceptible strains. *J. Clin Microbiol* ; 39 : 3946-51.

26- Vannuffel , P. ; Gigi, J. ; Ezzedine, H.; van Der Cam , B. ; Delmee , M.; Wauters , G. *et al.* (1995) . Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J. Clin Microbiol* ; 33 : 2864-7. (citted from Mohanasoundaram and Lalitha , 2008).

27- Ito , T. ; Okuma, K. ; Ma, X.X. ; Yuzawa , H. and Hiramatsu , K. (2003) . Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome : genomic island SCC. Drug Resist . Update 6, 41- 52 .

28- Bignardi , G.E. ; Woodford , N.; Chapman , A.; Jonson , A.P. and Speller , D. C. (1996) .Detection of the mecA gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low- level methicillin resistance . *J. Antimicrob* . *Chemother* . 37, 53-36 .

29- Judith , H. ; Andrea , J.; Oliver , K. ; Juliane , S. ; Paul , A.M. ; Llinos , G.H. ; Gabriele , B. ; Matthias , H. and Brigitte , B. (2007). Living with an imperfect cell wall : compensation of *femAB* inactivation in *Staphylococcus aureus* . *Bio Med Central Genomics* 8: 307-314 .