آلية مقاومة *Staphylococcus sciuri* المعزوله من حالات التجرثم الدموي والتهاب شغاف القلب والفشل الكلوي للمضادات الحيوية

فاطمة عبودي علي[1] و باسمةاحمد عبد الله[2]

[1] قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة تكريت، تكريت، جمهورية العراق
[2] قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، جمهورية العراق

الملخص:

شملت الدراسة عزل وتشخيص أفراد النوع *Staphylococcus sciuris* من عينات دم المرضى المصابين بتجرثم الدم والتهاب شغاف القلب والفشل الكلوي من مستشفيات محافظة الموصل ، اذ جمعت ٢٠٢ عينة دم من كلا الجنسين ومختلف الفئات العمرية ، شخصت من خلال اجراء الاختبارات التشخيصية الكيموحيوية والفسلجية وبينت النتائج ١٦ عزلة تابعة لافراد النوع *Staphylococcus sciuri* كذلك أوضحت نتائج الدراسة امتلاك السلالات مديات مقاومة متباينة ازاء المضادات حيث انحصرت بين مقاومة (٦-٢٤) مضاداً،اختبرت آلية مقاومة العزلات للمضادات الحيويه من حيث قدرتها على انتاج أنزيم Extened Spectrum Beta Lactamase (ESBLs) وبينت النتائج قدرة ٥٠% من العزلات على انتاج الانزيم ، واستخدمت تقنية الهجرة الكهربائية-SDS Polyacrylamide Electrophoresis لأنزيم BLs المستخلص من ٥ عزلات منتجة لانزيم ESBLs واسفرت النتائج عن الحصول على حزم متباينة تتراوح بين (١-٣) حزم وقدرت أوزانها الجزيئية التي تراوحت ما بين (٢٠-٥٦) كيلو دالتون .

لغرض التعرف على البنيه الوراثيه المسؤوله عن مقاومة افراد النوع *Staph. sciuri* تم انجاز تجارب التحول الوراثي مع سلالة قياسية مختبرية مستلمة *Escherichia coli* JM83 باستخدام الـ DNA البلازميدي المنقى من ٥ عزلات للجرثومة لتعيين مواقع المورثات المانحة لصفة المقاومة للمضادات الحيويةوأظهرت النتائج ان هذه المورثات المدروسة لعزلات جرثومة *Staph. sciuri* واقعة على DNA البلازميدي من خلال قيم متوسط التردد التي تقع ضمن المدى الطبيعي للتردد .دعمت هذه النتائج بالهجرة الكهربائية وبالطريقة القاعدية للـ DNA البلازميدي المحضر من المستعمرات المتحولة لسلالة *E. coli* JM83 المختبرية اذ ظهرعلى هيئة حزم مفصولة على هلام الاكاروز تراوحت ما بين (١-٤) حزم وحسب نوع السلالة .لتعزيز نتائج الدراسة الوراثية تم استخدام مواد كيميائية وعوامل فيزيائية لغرض ازالة مقاومة المضادات الحيوية للعزلات المدروسة وقد أظهرت مادة SDS التأثير الأكبر على اشفاء البلازميدات من معظم السلالات وانحصرت نسبة الشفاء ما بين (٣٠-١٠٠)% وبوجود المضادات ، تلتها مادة الاكردين البرتقالي وبنسبة شفاء انحصرت بين (٢٠-٨٠)% ثم مادة اثيديم بروماید وبنسبة شفاء انحصرت بين (٢٤-٦٠)% وأخيراً الانماء في درجة حرارة (٤٤)مْ وبنسبة شفاء انحصرت بين (٣٠-٧٠)% .

المقدمة:

تنتمي جرثومة *Staph. sciuri* إلى مجموعة الجراثيم السالبة لاختبارالتجلط Coagulase-negative Staphylococcus (CONS) (١) . وبالرغم من كون الجرثومة حيوانية المنشأ فان العديد من الدراسات الحديثة أفادت بأهمية الجرثومة من خلال عزلها من العينات السريرية للانسان لاسيما داخل أجواء المستشفى وهنالك اسباب عديدة أخرى تكون عوامل مساعدة للاصابة بالتجرثم الدموي الناجم عن هذه الجرثومة مثل المعالجة المتكررة بمدى واسع من المضادات الحيوية، عمر المريض، جروح ما بعد العمليات اطالة فترة اقامته في المستشفى، حالات الحروق، المرضىالمثبطين مناعياً وقد يعزى ذلك إلى خلق ظروف مثآلية للجرثومة حتى تصبح انتهازية (٢) . تعتبر افراد نوع جرثومة CONS عموماً احدى المسببات الرئيسة لالتهاب شغاف القلب وغلبه الاصابات بالجرثومة عادة تكون بشكل ممرضات انتهازية وتعتمد بالدرجة الاساس على اكتسابها سواء كان في المجتمع أو في المستشفى مع أهمية مراعاة احتمآلية اكتسابها في المجتمع اكبر من المستشفى في المرضى الذين يمتلكون صمامات طبيعية Native Valves وبصورة معاكسة تزداد اكتساب الاصابة في المستشفى نسبة إلى المجتمع في المرضى الذين يمتلكون صمامات بديلةProsthetic Valves (٣) ، تكون الاصابة بالتهابات السبيل البولي عن طريق مجرى الدم قليلة الحدوث عموماً ومع ذلك فلا يمكن تجاهل وصول أعداد كبيرة من الجراثيم إلى مجرى الدم في بعض الأحيان والتسبب بتجرثم الدم وخاصة عند الأطفال حديثي الولادة وبالتالي يكون سبباً لاصابتهم بالتهابات السبيل البولي (٤)،الجراثيم الأكثر تسبباً في تجرثم الدم هي الجراثيم الموجبة لصبغة كرام بغض النظرعن نوعية التجرثم سواء كان ابتدائياً أو ثانوياً (5) ،كذلك اشار الباحث Couto وجماعته (٢٠٠٠) الى ان تواجد جرثومة*Staph. sciuri* في البيئة بشكل واسع وامتلاكها المهارات اللازمة لديمومة انتشارها يسبب تلويثها للبيئة وبالاخص للمستشفيات وهو أحد الاسباب الرئيسة لتسببها بالتهابات السبيل البولي .ان المستشفى أحد البؤر الرئيسة لانتشار وانتقال جراثيم *Staph. sciuri* ذات المقاومة المتعددة للمضادات ، ولاحظ في دراسته التي أجراها في احدى مستشفيات الولايات المتحدة الأمريكية مقاومة *Staph. sciuri* متعددة لمجموعة مضادات ومنهاPenicillin (P) و Clindamycin (CA) و Methicillin (MET)بالاضافة إلى مقاومتها

المستحثة للمضادات Chloramphenicol(C) و Florfenicol وللمضادات Macrolide و Streptogramine Lincosamide.

الطرائق التي تراوغ فيها الجراثيم المضادات متنوعة ومتعددة وتتضمن الأولى منها انتاج انزيمات تجعل المضادات غير فعالة بوساطة تحليلها أو تكوين مشتقات غير فعالة منها ، والأنزيم الأكثر معرفة في هذا النطاق أنزيم Beta Lactamase (BLs) ، وكذلك الأنزيمات التي تقع على عاتقها عملية فسفرة Phosphorylate أو استلة Acetylate أو Adenylate لمضادات Aminoglycoside (7) .من جانب آخر فان الزيادة في نسبة ظهور سلالات لجرثومة *Staph. sciuri* مقاومة لمضاد Erythromycin (E) في المرضى ترجع إلى الجينات *ermA* و *ermC* وتتواجد هذه الجينات على الكروموسوم وتتمثل بما يسمى بجينات Erythromycin Resistant Methylase *erm* (٨) ، تمتلك هذه الجينات القدرة على الانتقال والانتشار بين المرضى وكذلك من الحيوانات إلى الإنسان والعكس وبالعكس وبذلك تمثل مشكلة صحية متنامية الخطورة (٩)، من الجدير بالملاحظة ما أثبته الباحث Wu وجماعته (٢٠٠١) بامتلاك جين *mecA* الذي يشفر لمقاومة المضادات في *Staph. sciuri* القدرة على الانتقال ونقل المقاومة إلى أنواع أخرى لجرثومة *Staphylococcus* وبالأخص الممرضة للانسان، أوضحت التقنيات الحديثة كتقنية PCR والتحليل الجزيئي لبصمة الاصبع Finger Print التي استعين بها لمقارنة تتابعات الجين في *Staph. sciuri* و *Staph. aureus* اختلافات قليلة جداً لا تتجاوز ٥% . ويشفر هذا الجين لاثنين من الانزيمات المهمة وهي أنزيم Transglycosylase و Transpeptides بالاضافة إلى انتاج البروتين المرتبط بالبنسلين PBp_2A الذي يكون البؤرة المحدد لمقاومة مضاد MET (11) يتجلى تأثير المضاد بخداع بروتينات ارتباط البنسلين PBpS وبالذات أنزيم Transpeptidase الأنزيم المرتبط بالغشاء الخلوي الذي يلعب دوراً في تكوين الجسور الرابطة العرضية وبالتالي يلغى المضاد الاستطالة الاضافية للببتيدوكلايكان(١٢) ، ان نظرية منشأ انزيمات BLs من أحد الأنزيمات المرتبطة بالبنسلين المساهمة في صنع جدار الخلية الجرثومية باتت سائدة ومقبولة وهناك العديد من الدراسات التي أكدت هذه النظرية ، ولكن الجراثيم وجدت لها نظاماً حياتياً يقيها تأثير مضادات Beta Lactam وذلك من خلال انتاجها لأنزيم BLs ، وتنتمي انزيماتBLs إلى عائلة Serine Family الحاوية على الحامض الأميني Serine لمجموعته الهيدروكسيلية ويعد الموقع الفعال لجزيئة الأنزيم وان جزيئة الأنزيم متغيرة من نوع جرثومي إلى آخر ويشمل التغير في التركيب الأولي Primary Structure مما يؤثر على البناء الهيكلي لجزيئة الأنزيم وبالتالي يؤثر على الموقع الفعال في الأنزيم وعلى الفعآلية الأنزيمية (١٣).

بشكل عام فان انزيمات BLs المشفرة بالبلازميد تتميز عن الأنماط الكروموسومية مع وجود تداخلات قليلة بينها .تعتبر أنزيمات ESBLs أنزيمات طافرة حيث تخلق بوساطة استبدال واحد أو اكثر من الأحماض الأمينية في أنزيمات BLs ومنها TEM-1 و SHV1 (١٤) والجين المشفر لأنزيمات ESBLs يتواجد أو يحمل على بلازميد ينتقل ذاتياً ويمتلك المقاومة لاكثر من أصناف المضادات قسم من أنزيمات ESBLs تقع تحت سيطرة جينات قافزة والتي تستطيع الانتقال من بلازميد إلى آخرأومن بلازميد إلى كروموسوم بسهولة(١٥) . مع الأخذ بنظر الاعتبار بان الجراثيم المنتجة لأنزيمات ESBLs تكون مقاومة لجميع مضادات (P) و Cephalosporins بالاضافة إلى مضادات Cephamycins Cefoxitin وCefotetan و Aztreonam ،اعتبرت لاحقاً كذلك مقاومة لمضادات Cephalosporins الجيل الثالث (١٦) ،وسبب ذلك كون البلازميدات المشفرة لأنزيمات ESBLs عادة تكون تحمل المقاومة ايضاً للمضادات Gentamicin (GM) وTobramycin و Fluoroquinolones (١٧) ، عموماً واكبت انزيمات ESBLs التطورات الحاصلة في مجال صناعة المضادات ومثبطات انزيم BLs بحيث أصبحت مصدراً لقدرة كامنة على منح المقاومة لتلك المثبطات ، تمتلك آلفةعآلية للارتباط مع مثبطات أنزيم BLs مثل Sulbactam ، Tazobactam، Calvulanic Acid وعلى هذا الأساس يستخدم خليط البنسلينات أو السيفالوسبورينات مع واحد من هذه المثبطات المذكورة لايقاف فاعلية هذه الأنزيمات (١٨).

تعتمد تقريبا جميع طرائق التحري عن الإنزيم على تحلل حلقة Beta Lactam في البنسلينات والسيفالوسبورينات فيؤدي إلى حدوث تغيرات كيميائية في المادة تتسبب في تكوين مجموع كربوكسيل إضافية حرة تجعل المركب أكثر حامضية مما يسهل الكشف عنه باستخدام كاشف الدالة الحامضية أو بقابليته على اختزال الايودين(19) ، وجدت طرائق عديدة ومتنوعة للكشف عن انزيمات ESBLs منذ ظهورها وأبسط هذه الطرائق وأكثرها إستخداماً وشيوعاً طريقةDouble Disk synergy ، استعين بالوقت الحالي بتقنيات متطورة في مجال الطرائق الجزيئية مثل تقنية الترحيل على الهلام عند نقطة التعادل الكهربائي وتقنية تهجين DNA وتقنية Oligotyping باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (20).

انزيمات BLs لجرثومة Staphylococcus تكون مرتبطة بسطح الخلية وتعمل على اختزال مستوى الدواء الخارجي ، وعند وجود خلايا اكثر يمكنها تحطيم كمية اكبر من المادة الاساس في نفس الفترة الزمنية ، وبالتالي فان MIC للمادة الاساس يزداد كلما ازداد تركيز الخلايا الجرثومية (٢١) انتاج انزيم BLs في الجراثيم الموجبة لصبغة كَرام يختلف عنه في الجراثيم السالبة لصبغة كرام ، فهي انزيمات خارج خلوية في النوع الاول تفرزه الجرثومة إلى الوسط الزرعي الذي تنمو فيه الجرثومة كما هو الحال في أنواع*Bacillus*،*subtilis, Staph. aureus* وتكون كمية الانزيم المنتجة كبيرة تعمل على تحطيم المضاد خارج الخلية ، اما في الجراثيم السالبة لصبغة كَرام فان الانزيم داخل خلوي أو من النوع المرتبط بالخلية ويعود الاختلاف إلى طبيعة تكوين الجدار الخلوي الجرثومي حيث تكون كمية الانزيم المنتجة في الجرثومة السالبة لصبغة كَرام قليلة وتبقى عادة محتجزة في الفسحة خارج البلازما مما يعمل على اعاقة مرور جزيئات المضاد الحيوي إلى الداخل(٢٢) ترتكز المقاومة الوراثية على نوعين من المقاومة هي المقاومة الكروموسومية التي تتضمن حصول طفرة او تغيير في موقع ما من الكروموسوم الذي يسيطر على حساسية الجراثيم لمضاد حيوي معين مما يكسب الجرثومة صفة المقاومة للمضادات ، والمقاومة الثانية خارج كروموسومية وترتكز على وجود وحدات وراثية صغيرة من الـ DNA حلقية

توجد في السايتوبلازم وتتكاثر وتتوارث وبشكل مستقل عن الكروموسوم الرئيس للخلية ويعود ذلك الى امتلاكها منشأ تضاعف مستقل (٢٣)،عموماً فان نجاح بلازميدات المقاومة في الانتشار بين الجراثيم تتحدد بقابليةهذه البلازميدات على الانتقال الى مضائف متعددة ومقاومة فعل انزيمات التقييدRestriction Endonuclease بالاضافة الى قدرته على التضاعف في المضيف الجديد (٢٤) . قد جوبهت طرائق عزل بلازميدات جرثومية *Staphylococcus* بمعوقات كثيرة وذلك بسبب صعوبة تحلل الجدار الخلوي لهذه الجراثيم دون احداث مسخ Denaturation للـ DNA البلازميدي وكذلك تقاوم هذه الجرثومة فعل انزيم Lysozyme بخلاف اجناس اخرى كثيرة(25) ، نتيجة لتكثيف جهود الباحثين تم اكتشاف Lysostaphin الذي له قدرة عالية على احداث تحليل الجدار الخلوي لجرثومة *Staphylococcus* مما ادى الى اتمام عزل بلازميدات هذه الجرثومة وبنجاح مع التنويه الى امكانية فصل DNA البلازميدي عن الـ DNA الكروموسومي بسبب الاختلافات الفيزوكيميائية بين هذين النوعين (٢٦) ،تخدم عزلات CONS منها *Staph. epidermids* و *Staph. cohniis* و *Staph. lentus* و*Staph. xylosus* و *Staph. sciuri* كمخزن لانتشار جينات *ermC,ermA* تشفر لمقاومة مضاد (E) ومن الممكن ان تكون محمولة في بعض العزلات على الكروموسوم والبعض الاخر على بلازميد. (8) ، يمارس Plasmid PSCFSI المعزول من جرثومة *Staph. sciuri* دورا مهما في مقاومة الجرثومة المتعددة للمضادات واصبح محط انظار الباحثين لدرجة تم تحليل التتابع الكامل لجينات بلازميد PSCFSI والتي نتجت عنها وجود ١٤ ORFS يشفر لاكثر من ١٠٠ حامض اميني بالاضافة الى التعرف على دور النواقل ABC المساهمة في مقاومة الجرثومة المتعددة للمضادات وينصب اهمية بلازميد PSCFSI باحتوائه جينات *CFR* المسؤولة عن توجيه المقاومة لمضادات florfenicol / Chloramphenicol فضلا عن احتواء جين *erm C* والذي يقع على عاتقه حث المقاومة للمضادات Macrolide-Lincosamide , Streptogramin B (27) .

التحول الوراثي:

تعد عملية التحول الوراثي من اهم تطبيقات الهندسة الوراثية ولا يحدث التحول في كافة انواع الجراثيم بصورة طبيعية وانما في تلك الانواع التي تمتلك الماكنة الانزيمية التي تتطلبها عمليات الادخال النشط واعادة الارتباط ويجب ان تكون الخلايا الجرثومية في حالة تسمح لها بالتحول تسمى التأهيل Competence وهي قدرة السلالة الجرثومية على التقاط الـ DNA الفعال حيويا وتحويله (٢٨)، تمتلك الخلايا المؤهلة عامل التأهيل وربما يكون عامل الخلية السطحي أو انزيما قادرا على الارتباط مع الـ DNA الغريبة مع ذلك ومن الممكن ان تستحث خلايا غير مؤهلة طبيعيا لالتقاط الـ DNA (٢٩)،التأهل حالة فسيولوجية معقدة تعتمد على العديد من الظروف وحتى تلك الانواع المؤهلة لاخذ جزيئات DNA مثل جراثيم *Bucillus subtilis, Diplococcus pneumoniae* تحتاج إلى ان تكون في طور معين من دورة نموها أو في وسط نمو معين محدد لها (٣٠) .

تحييد البلازميدات:

يعد التحييد واحدا من المميزات المألوفة في البلازميدات ويقصد به عملية فقدان البلازميد أو اجزاء فيه من الجرثومة بوساطة معاملات متنوعة مع اهمية الاشارة إلى كون بعض البلازميدات تعاني انعزالا تلقائيا أوحذفا الاان الغالبية العظمى من البلازميدات تكون مستقرة بدرجة كبيرة والتي تتطلب استعمال عوامل محيدة Curing Agents مختلفة لغرض زيادة تردد الانعزال التلقائي (٣١) ، تظهر نتيجة لحصول تثبيط في تضاعف البلازميد دون حصول عملية تثبيط في تضاعف الكروموسوم ونتيجة لعملية انقسام الخلية فيقل تواجد البلازميد في الخلايا البنوية ثم فقدانه وتسمى هذه الظاهرة اشفاء البلازميد، وعموما يرتبط احداث الشفاء باستخدام معاملات كيميائية وفيزيائية فقد استخدمت الحرارة كأحد العوامل الفيزيائية في بادئ الامر في تحييد بلازميدات *Staph. aureus* وذلك بتنميتها في درجات حرارة عالية (42 - 44)مْ وقد نجحت هذه الطريقة في تحييد البلازميدات المسؤولة عن انتاج انزيم BLsأو من الممكن الاستدلال على حدوث التحييد من خلال حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية التي كانت سابقا مقاومة لها أو من خلال فقدان الامراضية التي تسببها تلك الجراثيم والمسؤول عنها تلك البلازميدات المحيدة (٣٢)،اوضح Wu وجماعته (2001) بان نقل جين *mecA* المسؤولة عن التشفير لمقاومة مضاد(MET) من العزلة المالكة له والمقاومة للمضاد *Staph. sciuri* إلى عزلة جرثومة *Staph. aureus* باستخدام الوسائل الوراثية المعتمدة في نقل المورثات الا وهي التوصيلTransduction ادى إلى زيادة مقاومة *Staph. aureus* للمضاد من4 مايكروغرام / سم^3 إلى 12 مايكروغرام / سم^3 ولكن على الطرف النقيض عند ازالة البلازميد المعامل لحين *mecA* باحدى العوامل الفيزيائية أو الكيميائية المذكورة آنفا ادى إلى استعادة العزلة مستوى حساسيتها للمضاد قبل عملية التوصيل.

المواد وطرائق العمل:

جمعت ٢٠٢ عينة دم من المرضى الراقدين والمراجعين المصابين بتجرثم الدم والتهاب شغاف القلب والفشل الكلوي من مستشفيات السلام والخنساء،ابن الاثير، ابن سينا والزهراوي في محافظةنينوى للمدة من شباط (٢٠٠٤) ولغاية شباط (٢٠٠٥)،اذ تراوحت أعمارهم بين(٢ - ≤ ٦٥) سنة ومن كلا الجنسين والمشخصين من قبل الطبيب الاختصاص،سحب ٥ سم^3 من دم الوريد العضدي للمرضى وتم تطهير الجلد باليود ثم الكحول ٧٠% وتركه ليتبخر تجنباً للتلوث وكررت العملية بعد ساعة لغرض المقارنة وحقن الدم في حاويةمعقمة خاصة بزرع الدم Blood Culture Tube تحوي مادة مانعة للتخثر Sodium Polyanethol Sulphonate التي تعمل على تثبيط تأثير العوامل المضادة لنمو البكتريا Antibacterial الموجودة في المصل وعملية البلعمة Phagocytosis ممزوجة مع ٥٠سم^3 من مرق نقيع القلب والمخ Brain Heart Infusion Broth المعقم داخل حاوية مكبوسة جرى التأكيد على عدم تناول المرضى المضادات الحيوية قبل ٤٨ ساعة من أخذ العينة(٣٣) ولقح وسط الدم الصلب بطريقة التخطيط ثم حضن في درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ ساعة ومن جهة أخرى حضنت الحاويات في درجة حرارة٣٧مْ لمدة أربعة أسابيع

تقريباً مع مراقبة مستمرة للتغيرات التي تطرأ على عينة الدم مع مراعاة أخذ عينة دم وزرعها كل٤٨ ساعةومراقبة ظهور المستعمرات ثم لقحت المستعمرات النامية المعزولة على أوساط انتخابية وتفريقية وحضرت أغشية رقيقة من المستعمرات النامية النقية عند كل فترة تحضين وصبغت بصبغة كَرام لملاحظة أشكال الخلايا وقابليتها على الاصطباغ لغرض تشخيصها وتخمير السكريات والتحلل المائي للاسكولين وانتاج عوامل الضراوه (٣٤) .

اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية:

أجري الاختبار على السلالات قيد الدراسة بالطريقة القياسية (طريقة الانتشار بالأقراص) باتباع طريقة Kirby-Bauer المحورةالمعتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية (٣٥) وكذلك اجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية بطريقة التخفيف بالآكارالتي تعد هذه الطريقة المدخل إلى التجارب اللاحقة في التحليل الوراثي وحضر فيها محاليل خزينة Stock لـ ٦ من المضادات الحيوية وحسب ما جاء في طريقة الباحث Ahmed(١٩٨٩).

الكشف عن انزيم Beta Lactamase لافراد النوع *Staph. sciuri*

الطريقة الأيودية السريعة Iodometric Method

تعتبر من اسهل الطرائق واقلها كلفة للتحري عن أنزيمات BLs عموماً ، تمت مراقبة اختفاء اللون الازرق الغامق كنتيجة لحصول التفاعل بين النشأ واليود كدليل على انتاج أنزيم BLs مع التركيز على وقت ظهور اللون كدلالة على سرعة حدوث التفاعل وانتاج الأنزيم واعطاء درجات (++ و +) للتمييز بين مقدرة السلالة على سرعة انتاج الأنزيم (٣٦) .

التحري عن أنزيمات Beta Lactamase واسعة الطيف ESBLS

للتحري عن أنزيمات ESBLs استخدمت طريقة الأقراص المتاخمة Disc Approximation للباحث Jarlier وجماعته (١٩٨٨) حيث دلّ حدوث اتساع في منطقة التثبيط ما بين القرص المركزي Augmenten وواحد أو أكثر من الأقراص Cefotaxime و Ceftazidimeو Pipracillin علىوسط مولر هنتون الصلب على النتيجة الموجبة لانتاج الأنزيم .

استخلاص أنزيم البيتالاكتاميز:

تم الاستخلاص اعتماداً على طريقة الناصري (٢٠٠٢)واختير عدد من العزلات التي أعطت نتيجة موجبة سريعة خلال الدقائق الأولى في الفحص الأولي للتحري عن أنزيم BLs .

الهجرة الكهربائية لانزيم BLs المستخلص من افراد النوع *Staph. scuiri* وتتضمن:-

تقدير كمية البروتين الكلي :استخدمت طريقة لاوري Lowry وجماعته (١٩٥١) لتقدير البروتين الكلي لأنزيم BLs المستخلص من افراد النوع *Staph. sciuri* .

فصل انزيم BLs بالهجرة الكهربائية: فصل بروتين أنزيم BLs باستخدام تقنيةSodium Dodecyl (SDS – PAGE)Sulphate Polyacrylamide Electrophoresis بالاعتماد على طريقة الباحث Laemmli (١٩٧٠) وحسب ما ورد من قبل الباحثان Robyt و White (١٩٨٧) .

استخلاص وتنقية DNA البلازميدي:-استخلص DNA البلازميدي لافراد منتخبة للنوع *Staphylococcus sciuri* بطريقة محورة من قبل الباحث محسن (١٩٩٨) .

قياس تركيز DNA البلازميدي طيفياً:-اعتمدت طريقةBrown (1995) لغرض قياس تركيز DNA البلازميدي حيث تم أخذ ٠,١سم^3 من نماذج DNA البلازميدي المحضر وخفف إلى ١سم^3 بالمحلول المنظم دارئ TE وقيست الكثافة الضوئية عند طول موجي يساوي ٢٦٠ نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية والمرئية UV-Visible Spectrophotometer وبالاستعانة بدارئ TE كمحلول سيطرة في درجة حرارة ٢٥مْ .

الهجرة الكهربائية لـ DNA البلازميدي على هلام الآكاروز:-اعتمدت طريقة Priefer(1984)في ترحيل DNA البلازميدي وتم التقصي عن الحزم المصبوغة DNA البلازميدي بعد كشفها بالاشعة فوق البنفسجية على جهاز (UV-Transilluminator) .

التحول الوراثي Transformation

استخدم التحول الوراثي لتعيين مواقع المورثات المانحة لصفة المقاومه للمضادات الحيوية من خلال نقل DNA البلازميدي من افراد منتخبة للنوع *Staph. sciuri* المقاومة لأكبر عدد من المضادات الحيوية المستخدمة والمنتجة لانزيم BLs و ESBls إلى السلالة *E. coli* JM83 المختبرية القياسية ذات النمط الوراثي المعلومةوتم تحضير الخلايا المؤهلة Competent من سلالة الجرثومة

E. coli JM83 لاستقبال DNA البلازميدي باستخدام كلوريد الكالسيوم المبرد لزيادة كفاءة عملية التحول الوراثي وحفظت الخلايا المؤهلة عند درجة حرارة ٤مْ مدة ٢٤ ساعة(٤٥)،لايجاد تردد التحول الوراثي Transformation Frequency استخدمت طريقة Puhlerو Timmis(1984) وذلك بتطبيق المعادلة الآتية :

$$\text{تردد التحول الوراثي} = \frac{\text{عدد المستعمرات المتحولة لكل 1 مايكروغرام من DNA البلازميدي}}{\text{عدد المستعمرات الجرثومية الحية}}$$

طرائق تحييد بلازميدات المقاومة:

لغرض دعم نتائج التحول الوراثي والحصول على سلالات حساسة للمضادات الحيوية تم تحييد بلازميدات المقاومة وازالتها عن طريق معاملتها بمواد وعوامل محيدة ذات التأثير المحيد لفعل البلازميد والتي عرفت بقابليتها على تكوين معقدات مع مادة الدنا (DNA) الجرثومي Lerman, 1961) واستخدمت مواد وصبغات مثل بروميد الاثيديوم وحسب ماجاءبطريقة الباحثان Rubin و Rosenblum (١٩٧١) المحورة وصبغة الاكردين البرتقاليه وحسب ماجاء بطريقةالباحثان Lovell و

Barrow (١٩٨٨) ومـادة SDS وحسـب ماجـاء بطريقـة الباحثـان Sonsteinو Baldwin (1972) و باسـتخدام الحـرارة باتبـاع طريقـة الباحثـــان Baldwin و Strickland (1969) وتـــم التحـــري عـــن المسـتعمرات الجرثوميـة التـي اصـابها التحييـد وذلـك بنقـل ١٠٠ مسـتعمرة جرثومية على وسط لوريا الصلب الحاوي مضادات حيوية مختلفة وحضنت في درجة حرارة ٣٧مْ مدة ٢٤ ساعة وحسبت عدد المستعمرات الحساسة والمقاومة للمضادات الحيوية بعدها تم تسجيل النتائج.

النتائج والمناقشة:

توضح النتائج المستقاة من الجدول (١) بان نسبة عزل أفراد النوع *Staph. sciuri* من عموم العينات لم يتجاوز١٦ عزلة وبنسبة٧,٩٢% من حاصل مجموع العينات الكلية المأخوذة من دم المصابين بالتجرثم الدموي والفشل الكلوي والتهاب شغاف القلب وبضمنها٦ عزلات وبنسبة ٢,٩٧% عزلة من المرضـى المصـابين بتجـرثم الـدم وذات النسـبة٢,٩٧%مـن المرضـى المصابين بالفشل الكلوي في حين لم تتعد العزلات المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب شغاف القلب (٤)عزلات وبنسبة ١,٩٨% .

الجدول (١) : النسب المئوية لافراد النوع *Staph. sciuri* المعزولة من العينات السريرية للحالات المرضية قيد الدراسة .

مصدر العزل	العينات الكلية		العينـــــات السالبة		العينـــــات الموجبة		عزلات النوع Staph. sciuri	
	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%
تجرثم الدم	١١٥	٥٦,٩	٥٠	٤٣,٥	٦٥	٥٦,٥	٦	٢,٩٧
الفشل الكلوي	٦٢	٣٠,٧	٣٢	٥١,٦	٣٠	٤٨,٤	٦	٢,٩٧
التهاب شغاف القلب	٢٥	١٢,٤	١٣	٥٢	١٢	٤٨	٤	١,٩٨
المجمـــــوع الكلي	٢٠٢	١٠٠	٩٥	٤٧	١٠٧	٥٢,٩	١٦	٧,٩٢

وذكر الباحث Petzsch وجماعته (٢٠٠١) بان جراثيم CONSعموماً من بين أكثر الجراثيم شيوعاً من حيث تسببها بالتهاب شغاف القلب وان نسبة ٣٠% من حالات الاصابة تحدث نتيجة الاستعانة بالأدوات الطبية وكذلك الاستخدام السيء وغير المعقول للمضادات الحيوية وذكر ذات الباحث ايضاً بان ما نسبته (١٣-٢١)% من التهاب شغاف القلب سببه اصابات مكتسبة وان ديمومة وجود CONS في عينات الدم يؤدي إلى الشك بوجود تقيحات في الصمامات . لغرض التعرف على افراد انواع *Staph. sciuri* بصورة دقيقة وعلمية تم زرع العينات المأخوذة من المرضى على الاوساط الزرعية واستخدام أختبارات التحري التي تتضمن دراسة الصفات المجهرية والمظهرية بالاضافة إلى الاستعانة بالأختبارات الكيموحيوية لتشخيص الجرثومة عند مستوى الجنس والنوع ولتمييز الجرثومة عن بقية أنواع جراثيم CONS وكما موضح في جدول (٢) واثبتت النتائج بان جميع عزلات الجرثومة سالبه لاختبارأنزيم التجلط Coagulaseو موجبة لاختبار انزيم الكتاليز والاكسديز وهذا يتطابق مع ما ذكره الباحثان Kwok و Chow (٢٠٠٣) كما بينت النتائج عدم قدرة الجرثومة على انتاج أنزيم اليوريز في حين تمكنت جميع عزلات الجرثومة وبدون استثناء من اختزال النترات إلى نتريت وتحويل لون الوسط إلى الأحمر كدلالة على ايجابية التفاعل وهذا يتطابق مع ما ذكره Couto وجماعته (٢٠٠٠) ،اما فيما يتعلق باختبار IMVIC فقد أعطت جميع العزلات نتيجة سالبة لهذه الأختبارات وهذا ما أكده الباحث Koneman وجماعته (١٩٩٧) وتمكنت جميع عزلات الجرثومة من تخمير ١٠ سكريات وبنسبة ١٠٠% وهذا يتطابق إلى درجة ما مع ما وجده الباحث Stepanovic وجماعته (٢٠٠٥) والباحث Hussain وجماعته (٢٠٠٠) .لغرض التمييز بين سلالات جرثومة *Staph. sciuri* أجريت بعض الأختبارات التكميلية كاختبار قابلية هذه الجراثيم على النمو المتماثل في درجات الحرارة ٣٥مْ و ٤٥مْ واعطت جميع السلالات المدروسة نمواً لا بأس به عند درجة حرارة٣٥مْ المثلى لنمو جميع السلالات تقريباً ، بالاضافة إلى ما سبق استعين ببعض المضادات الحيوية المستخدمة في المصادر المعتمدة لغرض التشخيص مثل Bacitracin و Novobiocin Optochin وبتراكيز محددة عالمياً لتمييز افراد النوع *Staph. sciuri* التي تمتاز بمقاومتها للمضادات آنفة الذكر عن افراد النوع CONS وجاءت النتائج متوافقة مع ما ذكره الباحث Koneman وجماعته (١٩٩٧) افادت العديد من الدراسات باستخدام API-Staph في تشخيص أفراد النوع *Staph. sciuri* حيث أعطت النتائج تطابقاً كاملاً مع ما ذكره الباحثون (٥٥،٥٤) علاوة على ذلك عند اجراء مقارنة بين نتائج التشخيص بوساطة API-Staphمع الأختبارات الكيموحيوية التقليدية السالفة الذكر لأفراد نوع *Staph. sciuri* أعطت النتائج تطابقاً كاملاً.

الجدول (٢) : الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة لتشخيص افراد النوع *Staphylococcus sciuri* .

الاختبارات الكيموحيوية	العـزلات																	
	$S.b_1$	$S.b_2$	$S.b_3$	$S.b_4$	$S.b_5$	$S.b_6$	$S.k_7$	$S.k_8$	$S.k_9$	$S.k_{10}$	$S.k_{11}$	$S.k_{12}$	$S.e_{13}$	$S.e_{14}$	$S.e_{15}$	$S.e_{16}$
الكتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

أنزيم التجلط																
اختبار الشريحة	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
اختبار الانبوب	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
الأوكسديز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اليوريز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
اختزال النترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
انتاج الاندول	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
المثيل الأحمر	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
فوكس بروسكور	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
السترات	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
انتاج الاسكولتين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تميع وتحلل الجيلاتين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
ارجنين ديهايدروجنيز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
اورنثين ديكاربوكسليز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

S.b : افراد نوع *Staph. sciuri* المسببة لتجرثم الدم .

S.k : افراد نوع *Staph. sciuri* المسببة للفشل الكلوي .

S.e : افراد نوع *Staph. sciuri* المسببة لالتهاب شغاف القلب .

أختبارات المضادات الحيوية :

أختبارات الحساسية لافراد النوع *Staph. sciuri*

بينت نتائج السلالات المدروسة تباينا ملحوظا في مديات الحساسية والمقاومة إزاء المضادات الحيوية ويتضح تأزم مشكلة المقاومة من خلال نتائج الجدول (٣) حيث تمكنت عزلة $S.s_6$ من مقاومة ٢٤ مضادا في آن واحد تلتها $S.e_{13}$ و $S.e_{16}$ بمقاومة ٢٣ مضاداً فيما قاومت العزلة $S.e_{15}$ ١٨ مضادا فيما انحصرت مقاومة بقية السلالات بين مقاومة (٣–١١) مضاداً وفي دراسة مشابهة للباحث Nawaz وجماعته (١٩٩٩) عن عدد المضادات التي تقاومها جراثيم CONS فقد استعان بـ١١ مضادا حيويا ووجد عزلة واحدة قاومت٨ مضادات وأخرى ٧ مضادات فيما ٥ عزلات قاومت ٦ مضادات و١٤ عزلة قاومت ٥ مضادات واما الحصة الاكبر للمقاومة كانت إزاء مضاد واحد وبعدد٤٦ عزلة وأكد الباحث Tskaris وجماعته (٢٠٠٢) على امتلاك جرثومة *Staph. sciuri* اسلوب المقاومة المتعددة للمضادات بمصاحبة المقاومة لمضاد (OX) المقاومة لمضادات Macrolid و Ofloxacin(OFX) و Nitrofurantoin (F)و Tetracycline (T) في حين تناقضت إلى درجة ما نتائجه مع نتائج دراستنا من حيث استجابة الجرثومة وبشكل فعال إزاء المضادات (OFX)و (F) حيث لم تتعدى مقاومةالجرثومة للمضادات نسبة ٢٥% و١٢,٥% على التوالي في دراستنا . علاوة على ذلك فان المرضى الذين يجرى لهم عمليات غسل متكرر للدم ويُعطَون علاج غير ملائم ينتج عنه نسبة موت لا تقل عن٢٣,١% وان١٣,٢% منهم مصابين بجراثيم CONS ، كما ان استخدام بعض المضادات من اجل الوقاية وخاصة لمنع الاصابة بالتهاب شغاف القلب يساعد على زيادة نسبة الموت خمسة اضعاف مقارنة بالاشخاص المصابين فعليا بالتهاب شغاف القلب لانها تكون الجهد الانتخابي لانتقاء العزلات المقاومة واستمرارها وانتشارها (٥٨).

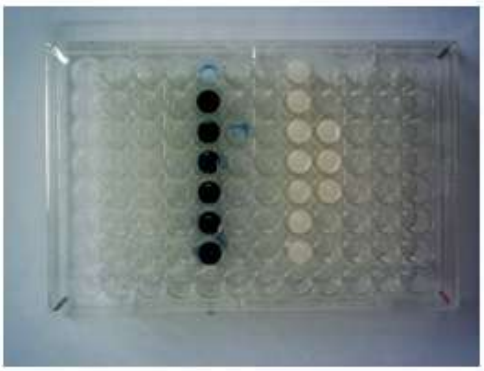
الجدول (٣) : مقاومة وحساسية أفراد النوع *Staphylococcus sciuri* للمضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة .

العزلة	المضادات بتركيز مايكروغرام / سم٣																													عدد المضادات التي قاومتها العزلات
	AX	AM	PRL	P	AMC	MET	OX	CL	CRO	CTX	CAZ	CPM	GM	AK	S	E	AZM	CLR	C	RA	TMP	VA	OFX	CIP	NA	F	DA	T	
	٢٥	٢٥	١٠٠	10U	٢٠	٥	٣٠	٣٠	٣٠	٣٠	٣٠	٥	١٠	١٠	١٠	١٠	١٥	١٥	٢	١٠	٥	٣٠	٥	٥	٥	٣٠	٣٠	٣٠	
$S.b_1$	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	11
$S.b_2$	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	9
$S.b_3$	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	10
$S.b_4$	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	6
$S.b_5$	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	6
$S.b_6$	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	24
$S.k_7$	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	5
$S.k_8$	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	8
$S.k_9$	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	11
$S.k_{10}$	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	9
$S.k_{11}$	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	9
$S.k_{12}$	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3
$S.e_{13}$	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	23
$S.e_{14}$	R	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	7
$S.e_{15}$	S	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	R	18
$S.e_{16}$	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	23

S = حساسة R = مقاومة

التحري عن انتاج انزيم BLs من قبل افراد النوع*Staph. sciuri*

تم التحري عن انتاج انزيمات BLs للجراثيم قيد الدراسة باستخدام الطريقة الايودية السريعة وهي من احسن الطرائق المستخدمة للتحري عن الانزيم وتعطي نتائج ممتازة (٥٩) ، يستدل على قدرة الجرثومة بانتاج الانزيم من خلال ظهور اللون الابيض مباشرة بعد اضافة كاشف اليود وكما موضح في الصورة (١) ويرجع ذلك الى قدرة انزيم BLs على التحليل المائي لحلقة BLs للبنسلين إلى حامض البنسلويك والذي يعمل على اختزال اليود إلى ايوديد مسببا ظهور اللون الابيض في معقد النشا – اليود الازرق (20) .والنتائج المستقاة من الجدول (٤) توضح بأن نسبة العزلات المنتجةللانزيم مرتفعة بشكل عام إذ بلغت ٦٢,٥% ولوحظ تفاوت في ظهور النتيجة الموجبة لعزلات الجرثومة حيث ان٦٠% من العزلات المنتجة للانزيم اعطت نتيجة موجبة سريعة خلال ثواني (++) وهذا يتطابق مع ما ذكره الناصري (٢٠٠٢) باختلاف عزلات جرثومة*Staphylococcus* في مدى قدرتها على انتاج .



الصورة (1) : انتاج انزيم BLs من قبل افراد النوع *Staph. sciuri*
A : نتيجة سالبة .
B : نتيجة موجبة .

الجدول (٤): انتاج أنزيمات BLs وأنزيمات ESBLs من قبل افراد النوع *Staph. sciuri* .

مصدر العزلة	رمز العزلة	انتاج أنزيمات BLs	انتاج أنزيمات BLs واسعة الطيف
جرثمة الدم			
	$S.b_1$	+	–
	$S.b_2$	+	–
	$S.b_3$	++	+
	$S.b_4$	–	–
	$S.b_5$	–	–
	$S.b_6$	++	+
الفشل الكلوي			
	$S.k_7$	–	–
	$S.k_8$	–	–
	$S.k_9$	+	–
	$S.k_{10}$	+	–
	$S.k_{11}$	+	–
	$S.k_{12}$	–	–
التهاب شغاف القلب			
	$S.e_{13}$	++	+
	$S.e_{14}$	–	–
	$S.e_{15}$	++	+
	$S.e_{16}$	++	+

اما عند اجراء مقارنة مع نتائج الباحث AK وجماعته (٢٠٠٥) نجد تبايناً ملحوظاً في نسبة انتاج الانزيم حسب مناطق عزل الجرثومة وذلك عند اجراء دراسته في احد المستشفيات وبلغت عدد جراثيم CONS المعزولة٥٦ عزلة واخذت من اجزاء مختلفة من المرضى وذلك لغرض اجراء مقارنة من حيث انتاج العزلات للانزيم من مناطق متباينة ووجد بأن١٩ عزلة وبنسبة٥١,٤% منتجة للانزيم ومنها ١٨ (٤٨,٦%) معزولة من الجلد و٥ (٤٥,٥%) معزولة من الدم و ٢ (٣٣,٣%) معزولة من العين ولم تنتج أية عزلة معزولة من الجروح والانف الانزيم ، وقد تمت ملاحظة وجود جين نادر شبيه بجين *mecA* في افراد نوع *Staph. sciuri* متطابقة إلى درجة ما مع جين *mecA* المعزولة من جرثومة*Staph. aureus* وذلك عند اجراء مقارنة بينهما (10) .

التحري عن انتاج انزيمات ESBLs من قبل افراد النوع *Staph. sciuri*

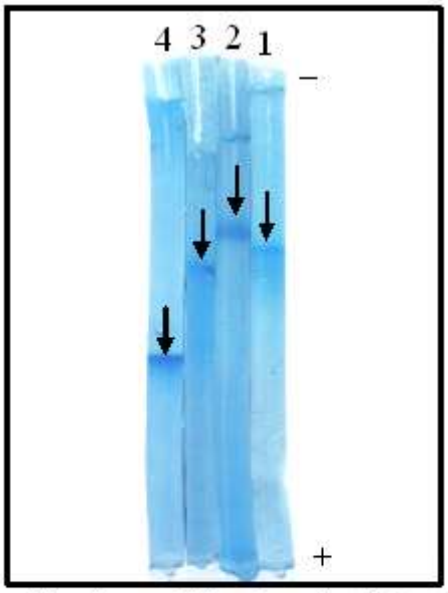
استخدمت طريقة Double Disk Synergy للكشف عن انزيمات ESBLs وحسب ما ورد في طريقة الباحث Jarlier وجماعته (١٩٨٨) وهي من اكثر الطرائق العملية والنتائج المدونة في الجدول (٤) توضح اعطاء ٥ عزلات وبنسبة٥٠% من مجموع ١٠ عزلات منتجة لانزيم BLs نتيجة موجبة للاختبار وان انتاج انزيمات ESBLs تعد اهم آليات المقاومة التي تمتلكها الجرثومة إزاء المضادات الحيوية إذ تعمل هذه الانزيمات على تحطيم الجيل الثالث من السيفالوسبورينات مثل Ceftazidimeو Cefotaxime (١٥). والى درجة ما تتفق نتيجة دراستنا مع ما اشار اليه الباحث Wiener وجماعته(١٩٩٩) إلى ان مجموعة البنسلينات والتي تضم مجاميع مختلفة لا تكون فعالة كثيرا إزاء جرثومة *Staphylococcus* المنتجة لانزيم ESBLs مع الاخذ بالحسبان بأن سبب تواجد هذه الانزيمات برمتها يرجع إلى الاستعمال الواسع لمضادات السيفالوسبورينات واسعة الطيف وان تناول هذه المضادات بشكل مفرط ومنها Ciprofloxacin يفتح المجال امام انتشار الجراثيم المنتجة لهذه الانزيمات .

فصل انزيم BLs المستخلص من افراد النوع *Staph. sciuri* بالهجرة الكهربائية:

لغرض اجراء الهجرة الكهربائية لمستخلص انزيم BLs قدر تركيز البروتين للانزيم المستخلص من السلالات $S.b_3$ و $S.b_6$ و $S.e_{13}$ و $S.e_{15}$ و $S.e_{16}$ التي امتازت بانتاج انزيم ESBLs بطريقة الباحث Lowery وجماعته (١٩٥١) وبالاعتماد على المنحني القياسي للبروتينات القياسية.

أظهرت النتائج بأن اعلى تركيز للبروتين الكلي للخلية كان للعزلة $S.b_6$ المقاومة لـ٢٤ مضادا إذ بلغ١٩ مايكروغرام/سم^3 واقل تركيز للسلالة S.b3 المقاومة لـ ١٠ مضادات إذ بلغ ٥ مايكروغرام/سم^3 وتراوحت تراكيز العزلات الباقية ما بين تركيزالعزلتين وبتراكيز ١٧ و١٦ و١٠ للعزلات $S.e_{13}$, $S.e_{16}$ المقاومة لـ٢٣ مضاداً و $S.e_{15}$ المقاومة لـ١٨ مضاداً على التوالي ، اجري فصل لبروتينات BLs لسلالات جرثومة *Staph sciuri* بوساطة تقنية (SDS - PAGE)كما اجري فصل للبروتينات القياسية المعلومة الاوزان الجزيئية وقيست المسافة النسبية التي قطعتها البروتينات

القياسية والمعلومة الوزن الجزيئي كما موضحه في الصوره(٢) واستخرجت الاوزان الجزيئية التقريبية لبروتينBLs لسلالات جرثومة *Staph. sciuri* اعتمادا على تحضير منحنى قياسي لتحديد الوزن الجزيئي .أظهرت النتائج اختلافا في عدد الحزم الرئيسة للانزيم المستخلص والذي جرى استخلاصه حسب طريقة الناصري (٢٠٠٢) بين عزلة واخرى وكما موضح في الصورة (٣) إذ امتلكت السلالة $S.b_6$ ٣ حزماً بروتينية والسلالة $S.e_{13}$ حزمتان و$S.e_{15}$ و $S.e_{16}$ و $S.b_3$ حزمة واحدة لكل منهم ثم قدر الوزن الجزيئي للحزم البروتينية حيث تراوحت ما بين (٣٥-٥٦) كيلودالتون ، وقدرت الاوزان الجزيئية للحزم الثلاث التابعة لسلالة $Sb.6$ وكانت (٣٠ ، ٤٥ ، ٥٦) كيلو دالتون ، بينما قدرت بوزن (٢٠ ، ٣٠) كيلو دالتون للحزم المفصولة من $S.e_{13}$ و٢٥ كيلو دالتون لحزم السلالات $S.e_{15}$ و $S.e_{16}$ و٣٠ كيلو دالتون لحزمة السلالة $S.b_3$. فيما أظهرت نتائج دراسة الباحث Wu وجماعته (٢٠٠١) امتلاك افراد النوع *Staph. sciuri* انزيم BLs المشفر لها بوساطة جين *mecA* وبوزن جزيئي (٧٦، ٦٤) كيلو دالتون .



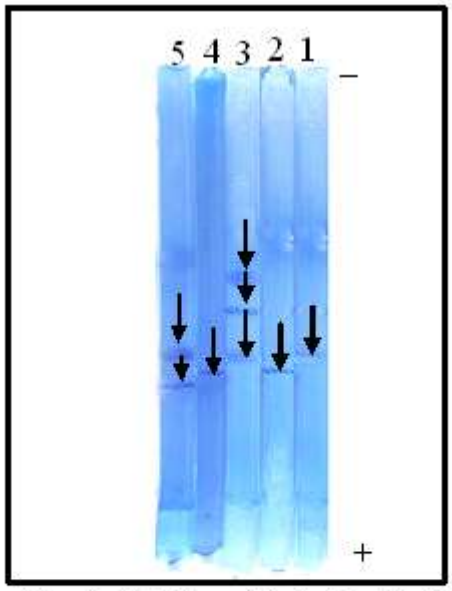
الصورة (2) : الحزم البروتينية للبروتينات القياسية لتحديد الوزن الجزيئي والتي تمثل :

1- Egg Albumine .

2- Bovine Serum Albumine .

3- Pepsin .

4- Lysozyme .



الصورة (3) : الحزم البروتينية لانزيم BLs لافراد النوع *Staph. sciuri* :

1- $Sb._3$

2- $Se._{15}$

3- $Sb._6$

4- $Se._{16}$

5- $Se._{13}$

التحول الوراثي لافراد النوع *Staph. sciuri* عزل ونقي البلازميد لغرض اجراء التحول الوراثي من ٥ سلالات لجرثومة *Staph. sciuri* امتازت بمقاومتها للمضادات الحيوية وانتاجها انزيم ESBLs BLs وكماجاء في طريقة محورة من قبل محسن (١٩٩٨) ويكمن التحوير بعدم استخدام انزيم Lysostaphin لعدم تمكننا من الحصول عليه واستخدام البديل عن طريق المعاملة بالاسيتون

قبل الهضم بانزيم Lysozyme حيث أكد الباحث Heath وجماعته (١٩٨٦) بان المعاملة بالاسيتون تزيد من حساسية الخلايا الجرثومية للهضم بالانزيمات المحللة لها .حدد تركيز DNA البلازميدي للعزلات المختارة إذ لوحظ ان اعلى تركيز كان للسلالة $S.b_6$ حيث بلغ٠,٨٥ مايكروغرام/سم^3 بينما كان تركيز DNAللسلالتان $S.e_{13}$ و $S.e_{16}$ ٠,٧٠ مايكروغرام/سم^3 لكل منهم اما تركيز DNA البلازميدي للسلالتان $S.b_3$ و $S.e_{15}$ فكانت (٠,٥٥ ، ٠,٥٠) مايكروغرام/سم^3 وقد يعود سبب الاختلاف في التركيز إلى اختلاف عدد نسخ الـ DNA البلازميدي في الخلية الجرثومية ولاستكمال متطلبات اجراء الدراسة الوراثيةتم اختيار حساسية السلالات المنتخبة آنفة الذكر إزاء ستة مضادات حيوية انتقيت من ضمن المضادات الحيوية المشمولة بالدراسة مع مراعاة كونها من المضادات الحيوية القياسية المستخدمة لاجراء التجاربالوراثية وبتراكيز محددة وكما جاء في الجدول (٥) من طرائق العمل وبطريقة التخفيف بالاكار وحسب ما جاء في طريقة الباحث Ahmedوجماعته (١٩٨٩) .

الجدول (٥) : مقاومة افراد النوع *Staph. sciuri* للمضادات الحيوية القياسية المعتمدة في الدراسات الوراثية بطريقة التخفيف بالآكار .

المضادات الحيوية مايكروغرام / سم^3	افراد النوع *Staph. sciuri*					السلالة *E. coli* JM83
	$S.b_3$	$S.b_6$	$S.e_{13}$	$S.e_{15}$	$S.e_{16}$	
(٥٠) Ampicillin	R	R	R	R	R	S
(٢٥) Streptomycin	S	S	S	S	R	R
(١٥) Tetracyclin	R	R	R	R	R	S
Chloramphenicol (١٠)	S	R	R	R	S	S
(١٠) Trimethoprim	S	S	S	S	R	R
(١٠)Gentamicin	R	S	R	R	S	S

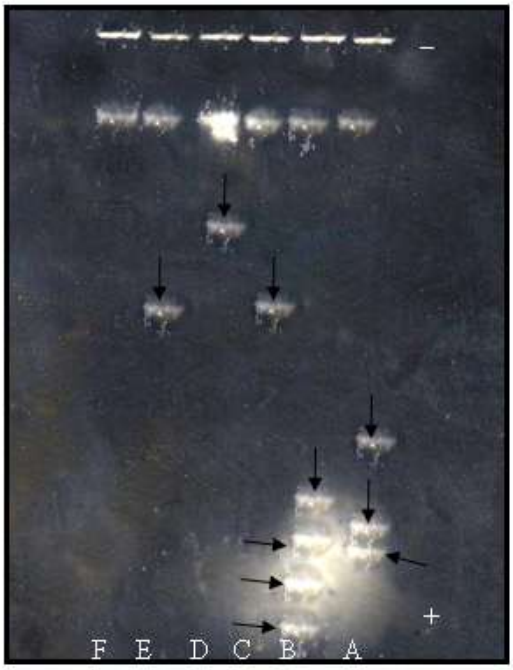
ان الهدف الاساس من انجاز اختبار التحول الوراثي هو التعرف على البنية الوراثية المسؤولة عن مقاومة سلالات جرثومة *Staph. sciuri* للمضادات الحيوية وكذلك التعرف على قابلية سلالة JM83 *E. coli* المختبرية المعلومة النمط الجين والخالية من البلازميد والمصنفة عالميا بتقبل بلازميدات من اجناس اخرى على التحول من سلالة حساسة إلى سلالة مقاومة بعد معاملتها بكلوريد الكالسيوم وتعريضها للـ DNA البلازميدي المحضر والمنقى من سلالات جرثومة *Staph. sciuri* التي تعود الى جنس مغاير والحاملة لصفة المقاومة لاكثر من مضاد حيوي والذي لم تجر عليه حسب علمنا أية دراسة مماثلة في العراق وبذلك ستكتسب سلالة JM83 *E. coli* صفات وراثية جديدة لا تمتلكها سابقا ويعتمد ذلك على الصفات الوراثية المحمولة على الـ DNA البلازميدي للجرثومة الواهبة وبذلك تصبح سلالة JM83 *E. coli* مضيفا للـ DNA البلازميدي المنقى .سيماء الجدول (٦) تظهر جليا بأن مصدر المقاومة للمضادات الحيوية المذكورة في الجدول هو مورثات واقعة على جزيئة DNA البلازميدي وقد أظهرتها تجربة التحول الوراثي وأظهرت السلالات اختلافا في قيمة متوسط التردد بالرغم من التقارب في تلك القيم وان اعلى متوسط تردد كان للعزلة $S.e_{16}$ إذ بلغ (٠,١٨ × ١٠$^{-٤}$) فيما كانت اقل قيمة للعزلة $S.e_{13}$ بتردد (١٠×٠,١١$^{-٤}$) .ان هذه القيم مرضية نوعا ما لانها تقع ضمن التردد الطبيعي التي يبلغ ١٠$^{-٤}$ وتوحي بنجاح عملية التحول الوراثي وتمكن سلالة JM83 *E. coli* المختبرية والخالية من البلازميدات من استضافة البلازميدات المنقاة من سلالات جرثومة *Staph. sciuri* ، وبذلك اصبحت السلالة JM83 *E. coli* تحمل المقاومة للمضادات Tetracylcin و Ampicillin و Cloramphenicol و Gentamicin بالاضافة إلى كونها تحمل المقاومة للمضادات Streptomycin و Trimethoprim وتعليل وجود تقارب في قيم تردد التحول الوراثي ربما يعود إلى التقارب في حجم البلازميدات الموجودة في الخلايا الجرثومية العائدة لسلالات جرثومة *Staph. sciuri* وذلك ما استنتجته الباحثة الصفاوي (٢٠٠١) عند انجاز دراستها على اجراء التحول الوراثي من سلالات *Staph. aureus* المعزولة من مناطق متباينة من جسم المرضى في محافظة نينوى إلى سلالة جرثومة JM83 *E. coli* فيما كان تردد التحول الوراثي لجرثومة *E. coli* المعزولة من نماذج مرضية مختلفة في محافظة نينوى تتراوح بين (٠,٨–٢,٨)×١٠$^{-٤}$ (محمد ، ١٩٩٩) اكد الباحثانSchwarz و Grotz-Krug (١٩٩١) امتلاك جرثومة *Staph. sciuri* بلازميد يحمل المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وبالاخص لمضاد Chloramphenicol ،ان الجين المشفر لمقاومة هذا المضاد والمحمول على البلازميد يدعى جين *Cat* وتحدث المقاومة للمضاد بوساطة Acetyltransferases, Diacety وتم بنجاح انجاز عملية التحويل الوراثي بنقل بلازميد يحمل المقاومة لمضاد Chloramphenicol و Erythromycin و Tetracyclin و Kanamycin إلى الخلية المضيفة*E.coli*HB101القياسية(65).

الجدول (٦) : عدد المستعمرات الجرثومية وعدد الخلايا المتحولة لسلالة JM83 *E. coli* والناتجة عن اضافة الـ DNA البلازميدي من سلالات افراد النوع *Staph. sciuri* .

DNAالبلازميدي المنقى من العزلات	عدد المستعمرات الجرثومية المتحولة من سلالة JM83 *E. coli* على الأوساط الغذائية الحاوية على المضادات الحيوية (مايكروغرام/سم^3)												متوسط التردد
	Ampicillin 50			Tetracycline 15			Chloramphenicol 10			Gentamycin 10			
	العدد الكلي	المتحولات	التردد	العدد الكلي	المتحولات	التردد	العدد الكلي	المتحولات	التردد	العدد الكلي	المتحولات	التردد	
$S.b_3$	٨١٠×١٠١	٤١٠×٢٨	٤١٠×٠,٢٧	٨١٠×٧٥	٤١٠×١٠	٤-١٠×٠,١٣	0	0	0	٨١٠×٦٢	٤١٠×٥	٤-١٠×٠,٨	٤-١٠×٠,١٦
$S.b_6$	٨١٠×١١٠	٤١٠×١٩	٤-١٠×٠,١٧	٨١٠×١٠٥	٤١٠×١٨	٤-١٠×٠,١٧	٨١٠×١١٢	٤١٠×٢٥	٤-١٠×٠,٢٢	٨١٠×١٢٠	٤١٠×١٨	٤-١٠×٠,١٥	٤-١٠×٠,١٨
$S.e_{13}$	٨١٠×١٠٥	٤١٠×١٠	٤-١٠×٠,٠٩٥	٨١٠×٦٨	٤١٠×٦	٤-١٠×٠,٠٨	٨١٠×٧٠	٤١٠×٩	٤-١٠×٠,١٢	٨١٠×٧٩	٤١٠×١٣	٤-١٠×٠,١٦	٤-١٠×٠,١١
$S.e_{15}$	٨١٠×١٠٣	٤١٠×١٧	٤-١٠×٠,١٧	٨١٠×٩٠	٤١٠×١١	٤-١٠×٠,١٢	٨١٠×٦٥	٤١٠×٥	٤-١٠×٠,٠٧	0	0	0	٤-١٠×٠,١٢
$S.e_{16}$	٨١٠×١٠٠	٤١٠×٢٢	٤-١٠×٠,٢٢	٨١٠×٦٦	٤١٠×١٠	٤-١٠×٠,١٥	0	0	0	٨١٠×٩٥	٤١٠×٢٠	٤-١٠×٠,٢١	٤-١٠×٠,١٩

الهجرة الكهربائية للـ DNA البلازميدي المستخلص من افراد النوع *Staph. sciuri*

لتقييم دور البلازميدات كعوامل وراثية مسؤولة بالدرجة الاساس عن التشفير للمضادات الحيوية واعطاء الدعم لتجارب التحول الوراثي وتعزيز نتائجه نقي الـ DNA البلازميدي من المستعمرات المتحولة Transformed Colonies لسلالة *E. coli* JM83 نتيجة معاملتها مع نماذج الـ DNA البلازميدي المنقى من سلالة جرثومة *Staph. sciuri* وقد طبقت الخطوات ذاتها المصممة لعزل DNA البلازميدي من عزلات جرثومة *Staph. sciuri* وكذلك طبقت نفس الطريقة على سلالة *E. coli* JM83 قبل ان يجري عليها اختبار التحول الوراثي لغرض استخدامها كسيطرة ، واجريت تجربة الهجرة الكهربائية باستخدام جهاز الهجرة الكهربائية وبالاستعانة بمادة الاكاروز لاعطاء البرهان على امتلاك سلالات جرثومة *Staph. sciuri* بلازميد يشفر لمقاومة المضادات الحيوية وكذلك لاثبات نجاح التحول الوراثي واحتواء سلالات *E. coli* JM83 على البلازميد المنقول لها من سلالات جرثومة *Staph. sciuri* بطريقة التحول الوراثي وبعد الانتهاء من الترحيل تم تعريض الهلام للاشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي ٢٥٤ نانومتراذ تظهر حزم DNA البلازميدي بهيأة حزم منفصلة متجهة باتجاه القطب الموجب ، وتظهر الصورة(٤) حزم البلازميدات المفصولة من سلالات *E. coli* JM83 بعد اجراء التحول الوراثي بالاضافة إلى سلالة *E. coli* JM83 المستخدمة كسيطرة قبل اجراء التحول الوراثي ونجد احتواء السلالة *E. coli* JM83 المستلمة للبلازميد من سلالة $S.b_6$ ٤ حزم بلازميدية وابدت مقاومة لـ ٢٤ مضاداً حيويا بينما اعطت السلالة *E. coli* JM83 المستلمة للبلازميد من سلالة $S.e_{13}$ ثلاث حزم بلازميدية وهي مقاومةلـ ٢٣ مضاداً ، اما السلالات *E. coli* JM83 المستلمة للبلازميد من السلالات $S.sb_3$ و $S.b_{15}$ و $S.e_{16}$ فلم تعط سوى حزمة واحدة لكل منهم ، ونستنتج مما سبق عدم وجود ترابط ما بين عدد المضادات الحيوية التي تقاومها الجرثومة وعدد الحزم البلازمدية وهذا ما استنتجه ايضا الناصري (٢٠٠٢) عند اجراء دراسته على عزلات جرثومة *Staph. aureus* المعزولة من المرضى في محافظة بغداد وقد يرجع السبب في ذلك إلى ما ذكره الباحث Poirl وجماعته (١٩٩٨) بأن المقاومة للمضادات الحيوية يمكن ان تكون محمولة على كروموسوم أو تكون محمولة على بلازميد وأن عدد حزم البلازميدات قد يساعد في التفريق بين السلالات فيما ذهب الباحث Schwarz وجماعته (٢٠٠٠) إلى اكتشاف وجود ٦ بلازميدات في جرثومة *Staph. sciuri* المقاومة لعدد من المضادات وبضمنها المضاد Chloramphenicol الذي كان محور دراسته وذلك عند اجراء تجارب التحول الوراثي على سلالات الجرثومة ، بالاضافة إلى ما سبق فإن السلالة *E. coli* JM83 المستخدمة كسيطرة لم تظهر وجود أية حزمة وذلك يدلل على مدى نجاح عملية الفصل للبلازميدات حيث ان السلالة لا تحوي أية بلازميد وان المقاومة للمضادات يشفر لها بوساطة جينات تقع على الكروموسوم .



الصورة (4) : ترحيل الـ DNA البلازميدي بتقنية الهجرة الكهربائية على هلام الاكاروز ويظهر بشكل حزمة منفصلة خارجة من الحفرة باتجاه القطب الموجب .
A : السلالة *E. coli* JM83 المتحولة والمستلمة للبلازميد من السلالة Se_{13} .
B : السلالة *E. coli* JM83 المتحولة والمستلمة للبلازميد من السلالة Sb_{15} .
C : السلالة *E. coli* JM83 المتحولة والمستلمة للبلازميد من السلالة Sb_3 .
D : السلالة *E. coli* JM83 المتحولة والمستلمة للبلازميد من السلالة Sb_{15} .
E : السلالة *E. coli* JM83 المتحولة والمستلمة للبلازميد من السلالة Se_{16} .
F : السيطرة *E. coli* JM83 .

تحييد بلازميدات افراد النوع *Staph. sciuri*

بهدف التعرف على محددات المقاومة للمضادات الحيوية من كونها بلازميدية أو كروموسومية فقد تمت ازالة البلازميدات من العزلات قيد الدراسة باستخدام عدد من العوامل المحيدةوتبين النتائج المذكورة في الجدول (٧) تقارب في قيم عدد المستعمرات المعاملة بصبغة Acridine orange المحيدة من حيث شفاؤها من البلازميد وهذا يعني بأن المورثات المقاومة للمضادات الحيوية تقع على جزيئة البلازميد واحدة وهذا ما أظهرته العزلة $S.b_6$ في حين أظهرت العزلة $S.e_3$ و $S.b_{16}$ قدرتها على مقاومة التحييد بالصبغة وذلك من خلال تمكنها من النمو بوجود الصبغة وحصولها على نسبة شفاء قليلة نسبيا إزاء بعض وان فقدان صفة مقاومة المضادات الحيوية بعد تحييد البلازميدات يعطي دليلا قويا على التشفير البلازميدي لتلك الصفات، اما فيما يخص صبغة Ethidium bromide فقد أظهرت تباينا في تأثيرها على سلالات جرثومة *Staph. sciuri* وبصورة عامة كانت نسب شفاء لاكثر العزلات إزاء المضادات اقل من ٥٠% حيث لم تتجاوز نسبة شفاء العزلة $S.b_3$ ٢٠% إزاء مضاد (GM) وقد يكون السبب هو اخفاقها في تثبيط عمل البلازميدات الحاملة لمقاومة المضادات الحيوية من خلال انخفاض نسبة الشفاء بصورة عامة إزاء المضادات مقارنة بصبغة Acridine Orange التي كانت اكفأ في ازالة البلازميد وقد يكون ذلك ناجماً عن عدم قدرته على اعتراض آلية توزيع البلازميدات على الخلايا البنيوية ثم بقاء البلازميدات في هذه العزلات ،هذا ما ذكرته ايضا الباحثة الصفاوي (٢٠٠١) في دراستها عن استخدام المحيدات لتحييد

بلازميدات *Staph. aureus* كما بينت النتائج نجاح مادة SDS وبتركيز ٠,٠٢٥% في ازالة مقاومة الجرثومة وأظهرت سلالات الجرثومة عامة نسبة شفاء جيدة إزاء SDS حيث تراوحت بين ٨٠–١٠٠% للسلالة $S.b_6$ وبين (٧٠–١٠٠)% للسلالة $S.e_{13}$ واكد الباحث الناصري (٢٠٠١) على نجاح مادة SDS في تحييد بلازميدات *Staph. aureus*

اما عند استخدام درجة الحرارة كعامل فيزيائي محيد وفي درجة حرارة ٤٤ مْ وبمدة حضانة ٢٤ ساعة فلوحظ اختلاف العزلات الجرثومية في اشفاء بلازميداتها المقاومة للمضادات الحيوية ، على نحو عام امتلكت معظم العزلات نسبة شفاء قليلة نسبيا حيث احتفظت العزلات بمقاومتها للمضادات الحيوية وبنسب معقولة وبغض النظر عن نوعية المضاد وقد يعود السبب في ذلك إلى ان ارتفاع درجة الحرارة تؤدي إلى احتفاظ الخلية لجرثومية ببلازميداتها،اما الباحث Baldwin وStrickland (١٩٦٩) فقد ذكر بأن تنمية عزلات *Staph. epidermidis* عند درجة حرارة ٤٤ مْ ادى إلى فقدان مورثات BLs التي تقع على البلازميد بتكرار عال .ونستنتج مما سبق بأن افضل عامل محيد هو مادة SDS بتحقيقه نسبة شفاء عالية نسبيا وبوجود المضادات إزاء معظم سلالات *Staph. sciuri* إذا انحصرت نسبة الشفاء بين (٣٠–١٠٠)% تليها صبغة Acridine Orange وبنسبة شفاء انحصرت بين(٢٠–٨٠)% ثم Ethidium bromide وبنسب شفاء انحصرت بين (٢٤–٦٠)% واخيراً درجة الحرارة ٤٤ مْ وبنسبة شفاء انحصرت بين (٣٠–٧٠)% .

الجدول (٧) : ازالة مقاومة افراد النوع *Staph. sciuri* بوساطة استخدام بعض المواد والعوامل المحيدة .

العزلات	المحيد المستخدم	عدد المستعمرات النامية على وسط الآكار المغذي (خلية/سم^3)	النسبة المئوية لشفاء المستعمرات الجرثومية بعد المعاملة			
			المضادات الحيوية			
			Ampicillin	Tetracycline	Chloramphenicol	Gentamicin
$S.b_3$	Acridine orange	$10^8 \times 25$	60%	%٣٠	٠	%٢٠
	Ethidium bromide	$10^6 \times 45$	%٤٥	%٦٠	٠	%٢٠
	SDS	$10^8 \times 17$	%٧٠	%٧٠	٠	%٧٠
	Temperature (44)°C	$10^8 \times ١٧$	%٦٠	%٤٥	٠	%٥٥
$S.b_6$	Acridine orange	$10^{10} \times 15$	%٧٠	%٦٠	%٨٠	%٧٧
	Ethidium bromide	$10^8 \times 9$	%٣٥	%٣٠	%٦٠	%٣٥
	SDS	$10^9 \times 12$	%١٠٠	%٧٥	%٨٠	%٨٥
	Temperature (44)°C	$10^9 \times 10$	%٤٥	%٥٥	%٥٠	%٥٥
$S.e_{13}$	Acridine orange	$10^{10} \times 9$	%٨٠	%٥٠	%٦٤	%٧٠
	Ethidium bromide	$10^6 \times 20$	%٥٥	%٤٣	%٥٢	%٦٠
	SDS	$10^7 \times 11$	%١٠٠	%١٠٠	%٧٠	%٧٠
	Temperature (44)°C	$10^7 \times 15$	%٣٠	%٦٠	%٤٠	%٤٣
$S.e_{15}$	Acridine orange	$10^7 \times 4$	%٣٥	%٤٦	%٥٥	٠
	Ethidium bromide	$10^6 \times 10$	%٣٢	%٢٤	%٤١	٠
	SDS	$10^8 \times 8$	%٨٥	%٦٠	%٧٥	٠
	Temperature (44)°C	$10^9 \times 2$	%٦٥	%٧٠	%٣٠	٠
$S.e_{16}$	Acridine orange	$10^9 \times 10$	%٣٦	%٢٥	٠	%٤٥
	Ethidium bromide	$10^8 \times 23$	%٦٠	%٤٠	٠	%٣٠
	SDS	$10^7 \times 15$	%٨٥	%١٠٠	٠	%٦٥
	Temperature (44)°C	$10^8 \times 20$	%٤٠	%٣٣	٠	%٤٠

المصادر :

1-Sakai, H.; Procop, G. W.; Kobayashi, N.; Togawa, D. and Bauer, T. W. (2004). Stimultaneous Detection of Staphylococcus aureus and coagulase – negative Staphylococci in positive blood culture by real – time PCR with Two fluorescence resonance energy transfer probe sets. J. Clin. Microbiol., 42 (12) : 5739 – 5744.

2-Daki, I., Morisson, D.; Vukovi, D.; Savi, B. and Shittu, A. (2005). Isolation and molecular characterization of Staphylococcus sciuri In the hospital environment. J. Clin. Microbiol., 43 (6) : 2782 – 2785.

3-Eykyn, S. J. (2001). Valve disease: Endocarditis : basics. Heart. 86: 476-480.

4-Helerstein, S. (1996). Evolving concepts in the evalution and management of children with urinary tract infections. Children's Hosiptal Quarterly., 8 (2) : 57.

5-Arbo, M. D. J. and Syndman, D. R. (1994). Influence of blood culture results on antibiotic choice in the treatment of bacteremia. Arch Intern. Med., 154 : 2641 – 1645.

6-Couto, I.; Snnches, I. S.; Leao, R. and de lencastre, H. (2000). Molecular characterization of Staphylococcus sciuri strains isolated from humans. J. Clin. Microbiol., 38 : 1136 – 1143.

7-Davies, J. (1994). Inativation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science., 264 : 357 – 382.

8-Nawaz, M.; Khan, A. A.; Khan, A. S.; paine, D. D.; Pothaluri, J. V. and Cerniglia, E. (1999). Biochemicaland molecular characterization of Erthromycin – resistant avian Staphylococcus spp.

strain of Salmonella typhimurium causes increased resistance to cephalosporins during therpay. J. Infect. Dis., 156 : 751 – 757.

23-Jawetz, E., Brooks, G. F.; Butel, J. S and Mores, S. A. (2004). Jawetz, Melinck and Adelberg's Medical Microbiology. 23th ed. McGraw–Hill Comp., Singapore.

24-Thompson, R. (1986). R. Plasmid transfere. J. Antimicrob. Chemother., 18 suppl. C : 13 – 23.

25-Kloose, W. E., and Jorgensen, J. H. (1985). Staphylococci, In E. H. Lennette., A. Balowsi, W. D.; Hausler.; J. V. and H. J. Shadomy (ed). Manual of Clinical Microbiology, 4th ed. American Society of Microbiology. Washintgton, D. C., P. 143 – 153.

26-Huber, M. M. and Huber, T. W. (1989). Susceptibility of Methicillin – resistant Staphylococcus aureus to Lysostaphin. J. Clin. Microbiol., 27 : 122 – 1124.

27-Khrenberg, C.; Ojo, K. K. and Schwarz, S. (2004). Nucleotide sequence and organization, of the multiresistance plasmid PSCFSI from Staphylococcus sciuri. J. Antimicrob. Chemother., 936 – 939.

28-Talaro, K. P. and Talaro, A. (1999). Foundations in Microbiology. 3rd ed. McGrow – Hill companies, Inc, U. S. A.

29-Massey, A and kreuzer, H. (1996). Recombinant DNA and Biotechnology, Acuid for Teachers. ASM press, Washington, D. C.

30-Zakrezewska – Czerwinska, J.; Gaszewska – Matsalarz, A.; Lis, B.; Gamian, A. and Mordarski, M. (1995). Staphylococcus puluereri sp. nov. isolated from Human and animal specimens. Int J. Syst Bacteriol., 45 : 169 – 172.

31-Caro, T.; Chuarch ward, G. and Chandler, M. (1984). Study of Plasmid replication in Vivo. In pennet, P. M. and Grinsted. J. (Ed) : Method in Microbiology., 17 : 97 – 122.

32-Barrow, P. A.; Simpson, J. M., Lovell, M. A. and Binns, M. M. (1987). Contribution of Salmonella gallinarum Large plasmid toward virulence in fowl typhoid, J. Infect. and Immun., 55 : 388 – 392.

33-Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuck, C. C. (1991). Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, World Health Organization, Geneva.

34-Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmino, B. P. and Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology, 14th ed.Churchill livingstone Inc., New York.

35-National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically approved standerd. 6th ed., 23 (2) : 1 – 46.

36-Ahmed, K. D. (1989). The positive Control of ilv C expression in Isolated from chickenes. Poultry Science., 78 : 1191 – 1197.

9-Levy, S. (1995). The challenge of antibiotic resistance. Sci. Am. 278: 32–39.

10-Wu, S. W.; Lencastre, H. and Tomasz, A. (2001). Recruitment of the mec A gene homologue of Staphylococcus sciuri into a resistance determinant and expression of the resistance phenotype in Staphylococcus aureus. J. of Bacteriol., 183 (8) : 2417 – 2424.

11-Chambers, H. F. (1997). Molecular and biochamical basis and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev., 10 : 781 – 791.

12-Lakayi, B.; Dubus, A., Lepage S. Groslambert, S. and Frere, J. M. (1999). When drug inactivation renders the target irrelevant to antibiotic resistance : a case story with Beta Lactamases. Mol. Microbiol., 31 (1) : 89 – 101.

13-Chaibi, E. B.; Sedigheh, F. Peduzzi, J. and Labia, R. (1996). An additional ionic bond suggested by molecular modeling of TEM – 2 might induce a slight discrpancy between catalytic properties of TEM – 1 and TEM - 2 Beta Lactamases. FEMS. Microbiol. Left., 143 : 121 – 125.

14-Bonafede, M. and Rice, L. B. (1997). Emerging antibiotic resistance. J. Lab. Clin. Med., 130 : 558 – 566.

15-Wiener, J.; Quinn, J. P.; Bradford, P. A.; Goering, R. V. Nathan, C.; Bush, K. and Weinstein, R. A. (1999). Multiple antibiotic – resistant Klebsiella and Escherichia coli in nursing homes. JAMA., 281: 517-523.

16-Gold , H. S. and Moellering , R. C. (1996) . Antimicrobial – drug resistance . N. Eing I J. Med ., 335 : 1445 – 1452 .

17-Paterson, P. L.; Mulazeimoglu, L.; Casellas, J. M.; Goossens, H. and Yu, V. L. (2000). Epidemiology of Ciprofloxacin resistance and its relation shipto extended–spectrum Beta Lactamase production in Klebsiella pneumoniae isolates causing bacteremia. Clin. Infect. Dis., 30: 473-478.

18-Karam, G. H. and Heffner, J. E. (2000). Emerging issues in antibiotic resistance in blood – borne infections. Amj. Respir Crit Care Med., 162 : 1610 – 1616.

19-Sami, A. A.; Abd – el. Hamid, T. and Sabbour, M. S. (1985). Incidence of Beta Lactamase producing E. coli in urinary tract infections. Chemiotherapy., 4 (6) : 429 – 430.

20-Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Junda, W.M.; Schrenchenberger, P.C. and Winn, W.C. (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Lippincott. Raven publishers. Philadelphia.

21-Bennett, P. M. and Chopran, J. (1993). Molecular basis of Beta Lactamase Induction in bacteria. Antimicrob. Agents Chemother., 37 : 153 – 158.

22-Mederiros, A. A.; Brien, T. F. O.; Rosenberg, E. X. and Nikaido, H. (1987). Loss of OMPC porin in

E – coli. K – 12. Ph. D. Thesis, Univ. Durham. England.

37-Lennette, E.H.; Balows, A.; Haus,W.J. and Shadomy, H.J. (1985). Manual of Clinical Microbiology. 4th ed., American Society for Microbiology, Washington D.C.

38-Jarlier, V.; Nicolas, M. H.; fournier, G. and Philippon, A. (1988). Extended broad. Spectrum Beta Lactamase Confering transferable resistance to newer Beta Lactam agents in Enterobacteriaceae : Hospital prevalence and Suaceptibility paterns. Rev. Infec. Dis., 4 : 867 – 878.

٣٩-الناصري ، اسامة ناظم نجرس . (٢٠٠٢) . دراسة بكتريولوجية ووراثية جزيئية لبكتريا *Staphylococcus aureus* ودراسة مقاومتها لمضادات β-Lactam وعقارات الكوينولونات الحديثة . اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية.

40-Lowry, O. H.; Roserough, N. J.; Farr, A. L. and Rendall, R. J. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 265 – 275.

41-Robyt, J. F. and White, B. J. (1987). Biochemical techniques theory and practice. 1st ed. Brooks / Cole, Montery, California.

٤٢-محسن ، رحيم . (١٩٩٨) . دراسة المحتوى البلازميدي للمكورات العنقودية وعلاقتها بمقاومة المضادات الحيوية ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية.

43-Brown, T. A. (1995). Gene Cloning. 3rd ed. Nostrand, London, pp. 262–291.

44-Priefer, U. (1984). Characterization of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. P. 26 – 37. In Puhler, A.; and Timmis, K. N. (eds). Advance Molecular Genetics. Springer Verlage.

45-Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1989). Molecular Cloning, 2nd ed. Cold spring Harbor, Ny. Cold spring Harbor Laboatory, Ny.

46-Puhler, A. and Timmis, N. K. (1984). Advanced in Molecular Genetics. Springer – Verlarg, New York.

47-Lerman , L. S. (1961) . Structural consideration in interaction of DNA and Acridiues . J. Mol . Biol . III : 18 – 30 .

48-Rubin, S. J. and Rosenblum, E. D. (1971). Effect of ethidium bromide on growth and on loss of the penicillinase plasmid of Staphylococcus aureus. J. Bacteriol., 118 : 155 – 164.

49-Lovell, M., M. A. and Barrow, P. A. (1988). The association between a large molecular mass plasmid and virulence in a strain of Salmonella pullorum. J. Gene. Microbiol., 134 : 2307 – 2316.

50--Sonstein, S. A. and Baldwin, (1972). Loss of penicillinase Plasmid after treatment of Staphylococcus aureus with Sodium dodecyle Sulfate. J. Bacteriol., 109. 262 – 265.

51-Baldwin, J.N. nad Strickland, K.H. (1969). Some properties of the Beta Lactamase genes in Staphylococcus epidermidis. J. Appl. Microbiol., 118: 628-630.

52-Petzsch, M.; Kraus, K. and Reising, E. C. (2001). Current treatment options of infective endocarditis. J. Clinical and Basic Cardiol., 4: 25 – 30.

53-Kwok, A. Y. and Chow, A. W. (2003). Phylogenetic study of Staphylococcus and Micrococcus species based on partial hsp 60 gene Sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53 : 87 – 92.

54-Stepanovic, S.; Daki, T.; Morrison, D., Haus, T. and Devriese. (2005) Identification and characterization of clinical isolates of members of the Staphylococcus sciuri groups. J. Clin. Microbiol., 43 (2) : 956 – 958.

55-Hussain, Z.; Stoakes, L.; Massey, V., Diagre, D., Fitzgerald, V.; Sayed, S. E. and Lannigan, R. (2000). Correlation of Oxacillin MIC with mecA gene Carriage in Coagulase – negative Staphylococci. J. Clin. Microbiol., 38 (2) : 752 – 754.

56-Tskaris, A.; Papadimition, E.; Douboyas, J.; Stylianopoulou, F. and Manolis. (2002). Emergency of vancomycin intermediate Staphylococcus sciuri, Greece. Emerging Infections Diseases., 8 (5): 536-537.

57-Elliott, T. S. J.; Foweraker, J.; Gould, F. K.; Perry, J. D. and Sandoe, J. A. T. (2004). Guidelines for the antibiotic treatment of endocarditis in adults : report of the working party of the British Society for antimicrobial chemotherapy. J. Antimicrob. Chemother., : 971 – 981.

٥٨-الجبوري ، رسمية عمر سلطان . (٢٠٠٠) . التحري عن انزيمات بيتا – لاكتاميز لعدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام المعزولة سريريا وتأثير بعض المركبات الكيمياوية المحضرة على هذه الجراثيم ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل .

59-Ak, A. N.; Adeyemi, F. M.; Aboderin, O. A., and Kassim, O. O. (2005). Antibiotic resistance Profile of Staphylococci from clinical sources recovered from infants. African. J. Biotech., 4 (8) : 816 – 822.

60-Heath, L. S.; Soloan, G. L. and Heath, H. E. (1986). A simple and generally applicable procedure for releasing DNA from bacterial Cell. Appl. Environ. Microbiol., 51 (5) : 1138 – 1140.

٦١-الصفاوي ، نوار طلال حامد عزيز . (٢٠٠١) . ازالة مقاومة *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات مرضية مختلفة في الانسان للمضادات الحيوية ، باستخدام مواد كيميائية وعوامل فيزيائية ، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل .

٦٢-محمد ، بيداء غانم . (١٩٩٩) . دراسة وراثية لجرثومة *E.coli* المعزولة من حالات مرضية مختلفة ، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل .

Chloramphenicol – Florfenicol resistance gene in Staphylococcus sciuri. J. Antimicrob. Agents and Chemother., 44 (a) : 2530 – 2533.

65-Johnston, J. H. and Richmond, M. H. (1970). The increase rat of loss of pencillinase plasmids from Staphylococcus aureus in the presence of rifampicin. J. Gen. Microbiol., 60 : 137 : 139.

63-Zakrezewska – Czerwinska, J.; Gaszewska – Matsalarz, A.; Lis, B.; Gamian, A. and Mordarski, M. (1995). Staphylococcus puluereri sp. nov. isolated from Human and animal specimens. Int J. Syst Bacteriol., 45 : 169 – 172.

64-Schwarz, S.; Werckenthin, C. and Kehrenberg, C. (2000). Identification of a plasmid – Borne

Mechainism of Resistance Staphylococcus sciuri Isolated from Cases of Bacteremia and Endocarditis and Kidney Failure to Antibiotics

Fattma Abodi Ali[1] and Basima Ahmed Abdulla[2]

[1]Department of Biology, College of Science, Universitiy of Tikrit, Tikrit, Iraq

[2] Department of Biology, College of Science, Universitiy of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract:

This study involved the isolation and identification of *Staphylococcus sciuri* suspected to be infected with Bacteremia, endocarditis and kidney failures cases in hospitals of Mosul city. The study started from Feb. (2004) till Feb. (2005). A total of 202 blood samples were collected from both sexes. The bacteria were diagnoised using biochemical and physiological tests. The results recovered 16 isolates of *Staph. sciuri* . As concern antibiotics sensitivity test a variable rate between strain were observed, also the results showed that the strains posses predominant resistance differences between (6-24) antibiotics for *Staph. sciuri* .As regard the mechanism responsible for antibiotic resistance showed that 50% of *Staph. sciuri* was produced Extend Spectrum Beta lactamase (ESBLs) after using electrophoresis technique using Polyacrylamide gel with sodium dodocyl sulfate (SDS – PAGE) for BLs extracted from the 5 strains produced it and it revealed (1-3) bands with m.wt. between (20-26) KDa.

For investigating the genetic factors responsible for antibiotics resistance for *Staph. sciuri* transformation experiments were carried out with standard strains *Escherichia coli* JM83 using DNA plasmid purified from 5 strains of *Staph. scriui* for the location of the antibiotic resistant gene.As regard responsible for It was found that this genes are located on plasmid DNA molecules and these results were supported by electrophoresis of DNA purified from plasmid transformed colonies of laboratory strains of *E. coli* JM83, a single band of plasmid DNA on agarose gel appeared to have between (1-4) bands according to the types of the strains. On the other hand, one strain couldn't give any band which may indicate the occurrence of gene code for antibiotic resistance may be carried by the chromosome too. To support the genetic result the chemical materials and physical factors were used to eliminate the antibiotic resistance of bacteria isolates a chemical was used SDS which appear to have high effectiveness in curing the plasmid DNA, for the most antibiotics have a cure rate between (30-100)% followed by the dye acridine orange between (20-80)% then ethidium bromide between (24-60)% finally temperature was raised to 44°C, the cure rate between (30-70)%.