

التحري عن بعض الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية في
بكتريا المكورات العنقودية المعزولة من حالات سريرية مختلفة في مدينة الديوانية

مصطفى رعد جواد ميثم عالي يوسف

قسم علوم الحياة- كلية العلوم- جامعة القادسية

الخلاصة :

جمعت (173) عينة من حالات سريرية مختلفة لمرضى من أعمار مختلفة , راجعوا عدة مستشفيات ومراكز صحية في مدينة الديوانية (مستشفى الديوانية التعليمي العام ومستشفى النسائية والاطفال ومختبر الصحة العامة) خلال الفترة من تشرين الثاني 2011 الى نيسان 2012 للتحري عن المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*, بينت نتائج الاختبارات المظهرية والكيموحيوية عائلية 66 (38.1%) عزلة لبكتريا *S. aureus* تضمنت 27(40.9%) عزلة من الحروق و 18(27.2%) عزلة من الخراجات و 18(27.2%) عزلة من الجروح و 2(3%) عزلة من الادرار و 1(1.5%) من الاذن . تم التحري عن قابلية عزلات *S. aureus* على إنتاج إنزيم البيبتالاكتاميز بالاعتماد على طريقة اليود القياسية السريعة حيث أظهرت 54 (81.8%) عزلة قدرتها على إنتاج الإنزيم . كما تم التحري عن بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة لمضاد الميثيسيلين (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) باستخدام أربع طرائق هي طريقة أنتشار القرص (Disk Diffusion) وطريقة التركيز المثبط الأدنى (HiComb MIC test) وطريقة التخطيط على الوسط الزرعى (CHROMagar MRSA) وتقنية تفاعل إنزيم البلمرة Polymerase chain reaction(PCR). تم التحري عن بعض عوامل الضراوة Virulence Factors في جميع عزلات MRSA(البالغ عددها 30 عزلة والتي حصلنا عليها بالطرق الأربعة المذكورة) باستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد والمتعدد Single & Multiplex PCR . أظهرت نتائج PCR أملاك جميع عزلات MRSA بنسبة (100%) لجينات *Coagulase (coa)* و *Clumping factor (clfA)* و *Protein A (spa)* و *Fibronectin (fnbA)* , بينما أظهرت 13 (43.3%) عزلة أملاكها لجين (*lks*) .

Leukocidin

المقدمة :

تضم المكورات العنقودية (Staphylococci) أنواعا عديدة من البكتيريا الممرضة للإنسان والحيوان على حد سواء ، وتعد *S. aureus* من أهم الأنواع الممرضة للإنسان وأكثرها شيوعاً وهي مسؤولة عن مدى واسع من الأمراض مثل الدمامل ، والخراجات المختلفة وخراجات الجروح الناتجة عن العمليات الجراحية ، والتهاب الجلد والأنسجة الرخوة ، والتهاب العظام ، والمفاصل ، والتهاب الرئة القصي ، والتهاب الأجزاء الداخلية للقلب ، والإصابات الناتجة عن الذيفانات مثل متلازمة الصدمة الذيفانية ، ومتلازمة الجلد الحرشفي العنقودي والتسمم الغذائي (1). تعود امراضية هذه البكتيريا وقدرتها على غزو نسيج المضيف وانتشارها فيه الى امتلاكها الكثير من عوامل الضراوة مثل انتاجها اليافانات Toxins والانزيمات Enzymes التي تساعد البكتيريا على احداث اللصابة (٢). حيث تمتلك القدرة على إنتاج العديد من الـذيفانات ، والانزيمات خارج خلوية (Extracellular enzymes and toxins) مثل الأنزيم المخثر لبلازما الدم الذي يمتلك القدرة على تثبيط عملية البلعمة ، ولها القدرة على إنتاج أنزيمات أخرى تمثل عوامل انتشار (Spreading factors) مثل أنزيم الستافيلوكاينيز ، والبروتينيز ، واللايباز التي تسهم في غزو البكتيريا للأنسجة ، وانتشار الخمج ، وتعمل على إنتاج ذيفانات محللة للدم نوع ألفا وبيتا وكاما ودلتا ، إلى جانب إنتاجها ذيفانات معوية مسببة تسمماً غذائياً ، كما إنها تمتلك قدرة على إنتاج ذيفانات خارجية تنتج في حالات متلازمة الصدمة الذيفانية ومتلازمة الجلد الحرشفي العنقودي(3). فضلاً عن امتلاكها المحفظة التي تساعد في مقاومة البكتيريا لعملية البلعمة (٤) ، بالإضافة إلى امتلاكها جدار الخلية الذي يعد تركيباً أنتجينيّاً لاحتوائه على التراكيب الأنتجينية (البيتايدوكلايكان ، وحامض التوكويك ، وبروتين A) ، ويعمل جدار الخلية على مقاومة الجهاز المناعي للمضيف ، ويشكل حماية أوزموزية للخلية البكتيرية (5). لقد كان البنسلين من أكثر المضادات الحيوية تأثيراً على المكورات الذهبية وعليه فقد تم استعماله منذ بداية الأربعينيات لعلاج الإصابات المتسببة بفعل هذه البكتيريا ، غير ان بعض السلالات التابعة لها بدأت تقاوم هذا المضاد بفعل قدرتها على إنتاج انزيم البيتاالاكتاميز (β- Lactamase) الذي يعطل عمل البنسلين ، تعد أنزيمات البيتاالاكتاميز من الأنزيمات المهمة لكونها المسؤولة عن مقاومة هذه البكتيريا للمضادات الحيوية البيتاالاكتام (6) ، ومن عوامل الضراوة الأخرى هي امتلاك بعض سلالات *S. aureus* لمورثة *mecA* المسؤولة عن مقاومتها لمجموعة البنسيلينات الثابتة نتيجة لتشفيرها البروتينات الرابطة للبنسيلين (PBPs) Penicillin binding proteins التي تعمل على تقليل الألفة مع المضاد الحيوي الميثيسيلين وتعرف المكورات العنقودية المقاومة للميثيسيلين بـ MRSA التي تمتاز بتوطنها بشكل أساس في المستشفيات وتعرف بـ [Hospital acquired-MRSA (HA-MRSA)] وعند استيطان MRSA في بيئة المجتمع تعرف عندئذ بـ [Community acquired-MRSA (CA-MRSA)] ، وجاءت أهميتها من خلال مقاومتها العديد من المضادات الحيوية مثل مقاومتها لجميع أنواع مضادات البيتاالاكتام ، والعديد من المضادات الحيوية الأخرى(7) . سجلت أول عزلة مقاومة للميثيسيلين Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA) في انكلترا عام ١٩٦١ شكلت بذلك كارثة صحية كبيرة انتقلت إلى مناطق مختلفة من العالم (٨).

وبالنظر لأهمية MRSA في إحداث إصابات مختلفة من الجسم ، وصعوبة علاجها والسيطرة عليها ، وقلّة الدراسات بشأن انتشارها في مستشفيات مدينة الديوانية ، وقلّة الدراسات الجزيئية التي تتعلق بالعوامل الامراضية (عوامل الضراوة) الخاصة بهذه البكتيريا ، فقد هدفت الدراسة الحالية الى :

أ- عزل وتشخيص بكتريا *S. aureus* من أصابات سريرية مختلفة .

ب- التحري عن عزلات MRSA باستخدام وسط ال Chrom Agar والكشف عن مورثة *mecA* باستخدام تقنية الـ PCR .

ج- التحري عن الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة في عزلات ال MRSA باستخدام تقنية الـ PCR المفرد والمتعدد (Single and Multiplex PCR) .

د- تحديد قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) في عزلات ال MRSA باستخدام فحص HiComb MIC Test .

المواد وطرق العمل :

جمع العينات Samples collection

تم جمع ١٧3 عينة من مستشفيات ومراكز صحية في مدينة الديوانية وهي (مستشفى النسائية والأطفال ، مستشفى الديوانية التعليمي العام ، ومختبر الصحة العامة) للفترة من تشرين الثاني ٢٠١١ إلى نيسان ٢٠١٢ . حيث شملت الدراسة عينات سريرية مختلفة ، تم جمعها من مناطق مختلفة من الجسم للمرضى الراقدين ولجميع الأعمار ولكلا الجنسين ، حيث أخذت العينات من (الإدرار والأذن والخراج والجروح والحروق) .

العزل والتشخيص Isolation and identification

نقلت المسحات والعينات مباشرة إلى المختبر ، وتم زرعها في وسط نقيع القلب-الدماغ الصلب ووسط الدم الصلب ووسط المانيتول الملحي الصلب ووسط Staph110، وحضنت المستنبتات في ظروف هوائية وفي درجة حرارة ٣٧ م° ، ومدة ٢٤ ساعة . شخصت *S. aureus* المعزولة ، بالاعتماد على كل من Holt وجماعته (9) ، Collee وجماعته (10) ، MacFaddin (11) لتشخيص بعض الصفات الزرعية والمجهرية ، والكيموحيوية ، واستعملت طريقة اليود القياسية السريعة للتحري عن قابلية ٦٦ عزلة *S. aureus* قيد الدراسة على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز .

طريقة اليود القياسية السريعة

١. تم نقل عدد من المستعمرات حديثة النمو بعمر (١٨-٢٤) ساعة النامية على وسط نقيع القلب-الدماغ بوساطة العيدان الخشبية المعقمة إلى صفيحة التخفيف الدقيقة الحاوية على ١٠٠ مايكروليتر من محلول بنسيلين G في كل حفرة من حفر الصفيحة ، ومزجت مزجاً جيداً وحضنت في درجة ٣٧ م° لمدة ٣٠ دقيقة .
٢. إضافة ٥٠ مايكروليتر من محلول النشا ، ومزجت بوساطة العيدان الخشبية .
٣. إضافة ٢٠ مايكروليتر من محلول اليود ، ومزج جيداً بالعيدان ، لضمان تجانس المحتويات . ان تكون اللون الأزرق يحصل نتيجة لتفاعل اليود مع النشا وأن التغير اللوني السريع من اللون الأزرق إلى الأبيض خلال ٥ دقائق يعد نتيجة موجبة .

التحري عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين MRSA

تم التحري عن البكتريا المقاومة للمثيسيلين بعدة طرائق وهي كالاتي :

• طريقة أقراص فحص الحساسية Disk diffusion

تتضمن استعمال أقراص مضاد الأوكزاسيلين ومضاد السيفوكسيتين بطريقة الانتشار بالقرص (disk diffusion method) . ثم قيست أقطار التثبيط وقورنت مع القيم القياسية المذكورة في CLSI (12).

• طريقة التركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية MIC

تم استخدام فحص HiComb MIC test لهذا الغرض المجهز من شركة Himedia الهندية وطبقا لطريقة Bryskier (13) و Lorian (14) وكما يلي :

- 1- تم تحضير عالق قياسي من البكتريا مساوي لعكورة انبوية ماكفرلاند القياسية (0.5) ما يقارب عكورة (1-2x10⁸) .
- 2- لقت أطباق وسط مولر هنتون Muller-Hinton agar بالعالق بطريقة التخطيط لاكثر من مرتين وباتجاهات مختلفة و تركت الاطباق لمدة ١٥-٥ دقيقة .
- 3- تم وضع شريط MIC الحاوي على تراكيز متدرجة من المضاد على سطح وسط مولر هنتون وحضنت الأطباق في درجة 37 م° لمدة 18-٢٤ ساعة
- 4- سجلت النتائج وقورنت مع القيم المثبتة في CLSI (30) .

• وسط كروم أكار CHROMagar MRSA

تم التحري عن عزلات بكتريا *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين (MRSA) بأستخدام طريقة التخطيط على الوسط الزرعي كروم أكار CHROMagar MRSA المجهز من شركة CHROMagar الفرنسية والمحضر حسب تعليمات الشركة المجهزة والذي يعتبر وسط أختياري لعزل وتفريق سلالات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين (MRAS) بالأعتماد على اللون .

استخلاص الحامض النووي البكتيري (Genomic DNA extraction)

تم استخلاص الحمض النووي (DNA) من بكتريا *S.aureus* وذلك بأستخدام العدة الجاهزة Genomic DNA Mini Kit المجهزة من شركة Geneaid الأمريكية وحسب تعليمات الشركة المجهزة .

تحضير هلام الأكاروز

حضر بحسب طريقة Sambrook وجماعته (15) وكالاتي:

- 1- أذيب 1.5 غم من هلام الأكاروز Agarose gel في 100 مل من محلول ال TBE buffer الدارئي بتركيز (1X) وباستخدام الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة 15 دقيقة.
- 2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50 م° وبعدها تم إضافة (3) مايكروليتر من صبغة الحامض النووي المشعة Ethidium bromide ومزجت جيداً مع الهلام.
- 3- صب هلام الأكاروز في قالب الترحيل (Tray) الحاوي على المشط (Comb) وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة , تم إزالة المشط من الهلام بعناية لغرض عمل وتحديد الحفر (wells) في الهلام اللازمة لحقن العينات المضخمة .

تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد Single PCR master mix

حضر مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد بأستخدام عدة AccuPower® PCR PreMix المجهزة من شركة Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة المجهزة وكالاتي :

- 1-حضر مزيج تفاعل إنزيم البلمره في انابيب (PCR) المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل إنزيم البلمره مع إضافة المكونات الأخرى لمزيج التفاعل كما في الجدول (1)

الجدول (1): مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد Single PCR master mix

PCR master mix		Volume
DNA template		5 µL
Primer	Forward primer	1.5µL
	Reverse primer	1.5µL
PCR water		12 µL
Total		20 µL

٢- بعد إكمال تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة تم غلق الأنابيب مع المزج بعناية بجهاز vortex لمدة 5 ثواني.

3- نقلت الأنابيب الى جهاز المضخم الحراري Thermocycler لتفاعل إنزيم البلمرة لأجراء عملية تضخيم ال DNA . (Amplification DNA) على وفق الظروف المثلى للدورات الحرارية Thermocycling conditions والمتمثلة بعمليات فصل شريط ال DNA (Denaturation) وارتباط البادئات مع الشريط المنفصل (Annealing) وتطويل سلسلة ال DNA (Extension) .

تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR master mix

حضر مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد بأستخدام عدة KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit المجهزة من شركة KAPA (جنوب أفريقيا) وحسب تعليمات الشركة المجهزة وكما موضح في الجدول (2)

الجدول (2) : مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR master mix

PCR master mix		Volume
DNA template		2.5µL
KAPA2G Fast Multiplex		12.5µL
Primers	Forward primer	0.5µL
	Reverse primer	0.5µL
PCR water		up to 25µL
Total		25 µL

بادئات ال-DNA (DNA primers):

الجينات المستخدمة في الدراسة الحالية والمسؤولة عن عوامل الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية والتي قامت بتجهيزها شركة (Bioneer) الكورية وكما مبين في جدول (3).

جدول (3) : بادئات ال-DNA (DNA primers)

المصدر	حجم ناتج التضخيم	تسلسل القواعد للنروجينية (5'-3')		نوع البادئ
45	154 bp	F	TAGAAATGACTGACGTC	<i>mecA</i>
		R	TTGCGATCAATGTTACCGTAG	
46	151 bp	F	CAGGAGGTAATGGTTCATT	<i>Luks</i>
		R	ATGTCCAGACATTTTACCTAA	
47	1150-1500 bp	F	ATCTGGTGGCGTAACACCTG	<i>Spa</i>
		R	C GCTGCACCTAACGCTAATG	
٤٨	270 bp	F	GAG CAG CAT TAT TCT TAG	<i>FnbA</i>
		R	TTT GTG GCG CTT GTA CT	
صمم في هذه الدراسة	378 bp	F	GGCAACAACCTCAATCAAGCA	<i>clfA</i>
		R	GCTTGGTGCGGATAAACTGT	
صمم في هذه الدراسة	593 bp	F	AGCAGTTAAAGAAGCAGACG	<i>Coa</i>
		R	CGTTGTATTCACGGATACCT	

برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـ DNA

أجري تفاعل إنزيم البلمرة باستخدام المضخم الحراري لجهاز الـ (Thermocycler PCR). وتم برمجة الجهاز للجينات قيد الدراسة حسب التفاعل , وكما مبين في جدول (4) وجدول (5).

جدول (4) : برنامج الدورات الحرارية لتفاعل إنزيم البلمرة المفرد Single PCR

Cycle No.	Temperature (°C)/Time					Gene
	Final extension	Cycling condition			Initial denaturation	
		extension	annealing	denaturation		
30	72/5 min	72/10 sec	55/30 sec	95/30 sec	95/2 min	<i>mecA</i>
30	72/5 min	72/2 min	59/30 sec	95/30 sec	95/2 min	<i>spa</i>
30	72/5 min	72/40 sec	56/30 sec	95/30 sec	95/2 min	<i>clfA</i>
30	72/5 min	72/1 min	55/30 sec	95/30 sec	95/2 min	<i>coa</i>
30	72/5 min	72/10 sec	50/30 sec	95/30 sec	95/2 min	<i>fnbA</i>
30	72/5 min	72/20 sec	52/30 sec	95/30 sec	95/2 min	<i>luks</i>

جدول (5) : برنامج الدورات الحرارية لتفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR

Cycle No.	Temperature (°C)/Time					Gene
	Final extension	Cycling condition			Initial denaturation	
		extension	annealing	Denaturatio		
30	72/5 min	72/20 sec	52/30 sec	95/30 sec	95/2 min	<i>fnbA</i> <i>luks</i>
30	72/5 min	72/30 sec	55/30 sec	95/15 sec	95/3 min	<i>mecA</i> <i>spa</i> <i>clfA</i>

الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis

تم إجراء الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز المحضر بنسبة 1.5% تحت فرق جهد 100 فولت وتيار 80 امبير وزمن ساعة لغرض الكشف عن حزم (Bands) الـ DNA المستخلص والـ DNA المضخم والذي يمثل نواتج التضخيم (Amplicon size) او نواتج الـ PCR (PCR Products) بالمقارنة مع سلم الحامض النووي (DNA Ladder (100-1500bp).

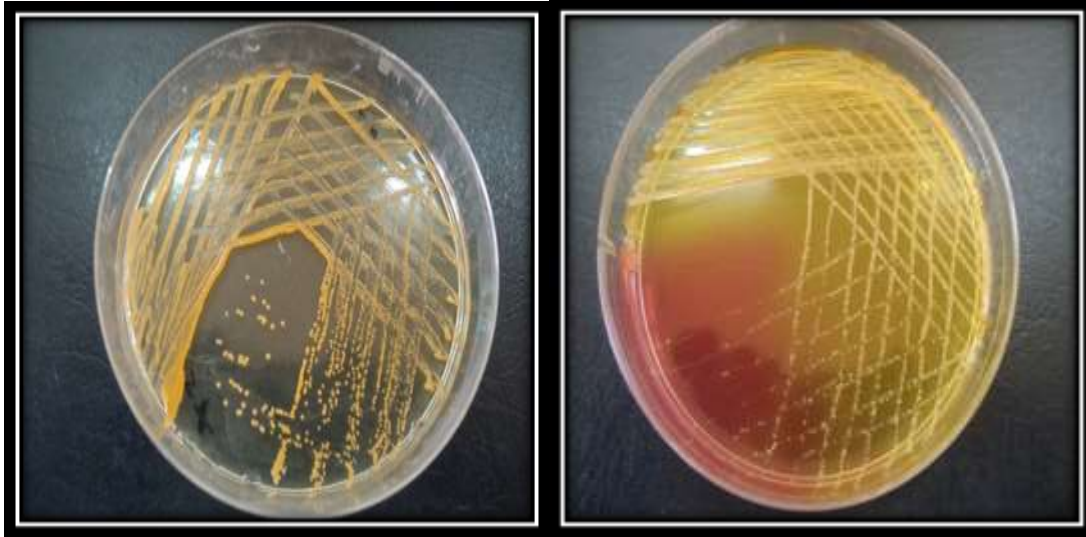
تصميم البادئات Primer design

صممت البادئات *coa* و *clfA* في الدراسة الحالية عن طريق الحصول على التسلسل الجيني لكل بادئ من بنك الجينات Gene Bank ثم ادخل هذا التسلسل الجيني في برنامج الـ Primer.3Plus والذي يوجد على الموقع الالكتروني WWW. Primer3Plus . Com اذ ضبطت الاعدادات الملائمة لكل بادئ مثل درجة حرارة الارتباط Annealing Temperature ونسبة G+C وحجم ناتج التضخيم Product size وحسب الحاجة واخيرا اختير البادئ الذي يعتقد بانه هو المناسب.

النتائج :

عزل بكتريا الـ *S. aureus* وتشخيصها

أثبتت الدراسة الحالية عائلية ٦٦ عزلة إلى جنس المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* من خلال دراسة بعض الصفات الزرعية والمجهرية والفحوصات الكيموحيوية , ظهرت المستعمرات النامية على وسط المانيتول الملحي الصلب Mannitol Salt Agar باللون الأصفر وعلى وسط Staphylococcus Medium No. 110 باللون البرتقالي وكما مبين بالشكل (1) .



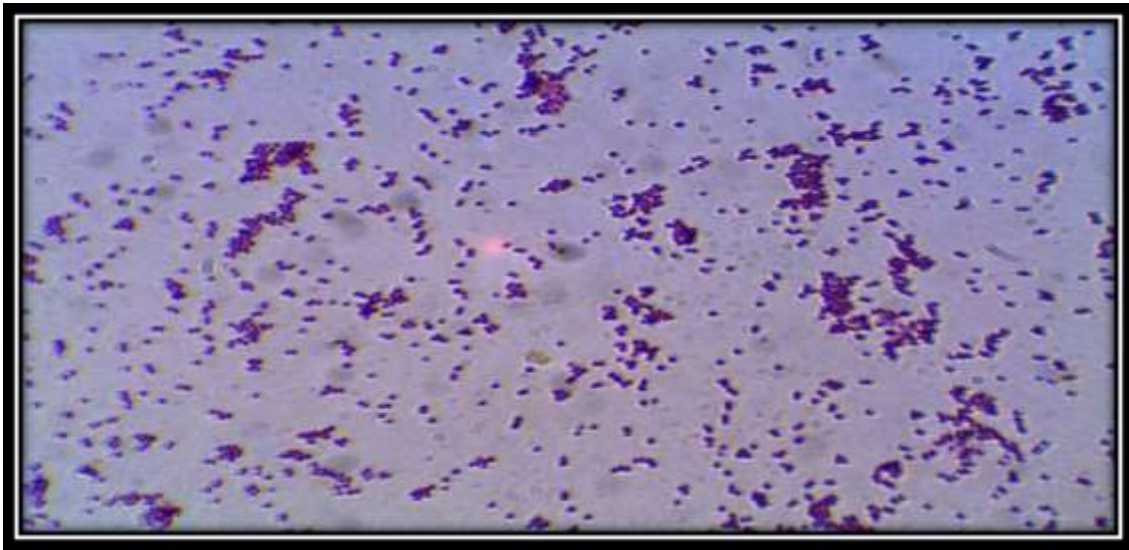
B

A

الشكل (١) -A مستعمرات بكتريا *S. aureus* النامية على وسط Mannitol Salt Agar

-B مستعمرات بكتريا *S. aureus* النامية على وسط Staph 110

أظهرت نتائج الفحص المجهرى ان خلايا البكتريا المعزولة كروية الشكل ، عنقودية الترتيب ، موجبة لصبغة غرام ، غير مكونة للسبورات وكما مبين بالشكل (2) .



الشكل (2): بكتريا المكورات العنقودية *S. aureus* المصبغة بصبغة غرام تحت المجهر (قوة التكبير X100) .

شخصت العزلات النامية على الوسط الانتقائي بالاعتماد على الفحوصات الكيموحيوية حيث أظهر الجدول (6) استجابة ٦٦ عزلة بنسبة (١٠٠%) لكل من اختبار الكتاليز ومخثر البلازما الحر واختبار محلل الدنا والجيلاتينيز وتخمر المانيتول ، وتباينت استجابة العزلات لاختبار عامل التكتل إذ أظهرت ٤٠ عزلة نتيجة موجبة بنسبة (٦٠,٦%) ، و ٥١ عزلة نتيجة موجبة لاختبار فوكس - بروسكاور بنسبة (٧٧,٢%) ، و ٤٨ عزلة نتيجة موجبة لاختبار اليوريز بنسبة (٧٢,٧) ، بينما أظهرت جميع العزلات نتيجة سالبة لاختبار الاوكسيديز .

جدول (6) : الأختبارات الكيموحيوية ل عزلة *S. aureus* (66)

نوع الاختبار	عدد البكتريا الموجبة	النسبة المئوية (%)
اختبار الكتاليز Catalase test	٦٦	%١٠٠
اختبار الأوكسيديز Oxidase test	٠	%٠
اختبار مخثر البلازما الحر Coagulase test	٦٦	%١٠٠
اختبار مخثر البلازما المرتبط (عامل التكتل) Clumping Factor test	٤٠	%٦٠,٦
اختبار محلل الدنا DNase test	٦٦	%١٠٠
اختبار الفوكس- بروسكاور Voges Proskauer test	٥١	%٧٧,٢
اختبار إنتاج الجيلاتينيز Gelatinase test	٦٦	%١٠٠
اختبار اليوريز Urease test	٤٨	%٧٢,٧
تخمر المانيتول Mannitol Fermentation test	٦٦	%١٠٠

الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ *S.aureus*

شخصت ٦٦ عزلة (بنسبة عزل ٣٨,١% من مجموع العينات ١٧٣) كما مبين في الجدول (7) وكانت أعلى نسبة عزل لبكتريا الـ *S.aureus* من اخماج الحروق وبنسبة (40.٩%) ، تلتها اخماج الجروح والجلد (الخراج) بنسب عزل (27.2%) و(27.2%) على التوالي ، بينما كانت أدنى نسبة عزل لبكتريا الـ *S.aureus* من الإدرار و اخماج الأذن وبنسب عزل (3%) و (1.5%) على التوالي .

جدول (7) : الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ *S. aureus* المعزولة من عينات سريرية مختلفة.

مصدر العينات	عدد العينات	عدد العزلات	النسبة المئوية (%)
الإدرار Urine	١٣	٢	٣%
*مسحات الأذن Ear swabs	٩	١	1.5%
مسحات الجروح Wound swabs	٤٩	١٨	27.2%
مسحات الحروق Burn swabs	٥٢	٢٧	40.9%
**الخراجات Absceses	٥٠	١٨	27.2%
المجموع	١٧٣	٦٦	٣٨,١%

* التهاب الأذن الخارجية والوسطى ** التهابات جلدية مختلفة مثل الدامل

التحري عن قابلية *S. aureus* على إنتاج إنزيم البيبتالاكتاميز

استعملت طريقة اليود القياسية السريعة للتحري عن قابلية ٦٦ عزلة *S. aureus* قيد الدراسة على إنتاج إنزيمات البيبتالاكتاميز، اظهر الجدول (8) وجود ٥٤ عزلة منتجة لإنزيم البيبتالاكتاميز بنسبة (٨١,٨%) من مجموع ٦٦ عزلة وكانت أعلى نسبة لها في عزلات الحروق التي بلغت (33.3%) ، كما أظهرت النتائج في الدراسة الحالية وجود ١٢ عزلة غير منتجة لإنزيم البيبتالاكتاميز بنسبة (١٨,١%) ، ومن خلال النتائج يمكن الاستدلال على ارتفاع نسبة إنتاج إنزيم البيبتالاكتاميز ، ويبين الشكل (3) طريقة اليود القياسية السريعة .

جدول (8) : قدرة ٦٦ عزلة *S. aureus* على إنتاج إنزيم البيبتالاكتاميز

المصدر	الإدرار Urine	مسحات الأذن Ear swabs	مسحات الجروح Wound swabs	مسحات الحروق Burn swabs	الخراجات Absceses	المجموع (%)
العزلات المنتجة	1(1.5%)	1(1.5%)	14(21.2%)	22(33.3%)	16(24.2%)	54(81.8%)
العزلات غير المنتجة	1(1.5%)	٠(٠,٠%)	4(6.0%)	5(7.5%)	2(3.0%)	12(18.1%)



الشكل (3) : طريقة اليود القياسية السريعة .

التحري عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين MRSA

طريقة أقراص فحص الحساسية

تم التحري عن صفة المقاومة للمثيسيلين لجميع عزلات *S. aureus* البالغ عددها (66) عزلة باستعمال اختبار أقراص فحص الحساسية الدوائية لمضادات الأوكزاسيلين والسيفوكسيتين (لم يتم استخدام أقراص مضاد المثيسيلين في هذا الفحص) ، أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة العزلات السرييرية المقاومة للأوكزاسيلين والسيفوكسيتين (45.4%) بواقع 30 عزلة وبالتالي عدت هذه العزلات مقاومة للمثيسيلين MRSA كتحري أولي ، وكما موضح في الجدول (9) .

جدول (9): الأعداد والنسب المنوية لعزلات *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين بالاعتماد على طريقة أقراص

فحص الحساسية

عدد العزلات (66)			المضادات
(%) S	(%) I	(%) R	
(54.5%) 36	(0.0%) 0	(45.4%) 30	Oxacillin
(54.5%) 36	(0.0%) 0	(45.4%) 30	Cefoxitin

طريقة التركيز المثبط الأدنى للمثيسيلين والأوكزاسيلين (MIC) Minimum Inhibitory Concentration

تم التحري عن التركيز المثبط الأدنى للعزلات المقاومة لمضادات الأوكزاسيلين والسيفوكسيتين ، وذلك باستخدام اختبار التركيز المثبط الأدنى HiComb MIC test لمضاد المثيسيلين Methicillin والأوكزاسيلين Oxacillin ، كما مبين في الشكل (4) . أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (10) مقاومة العزلات قيد الدراسة بنسبة (100%) لكل من المثيسيلين والأوكزاسيلين ، وسجلت النتائج ارتفاع مستويات نسب MIC لكل من المضاديين والتي كانت بين (240 ≥ - 30) مايكروغرام/ ملي لتر لمضاد المثيسيلين و (256 ≥ - 16) مايكروغرام/ ملي لتر لمضاد الأوكزاسيلين .

جدول (10): التركيز المثبط الأدنى MIC للمثيسيلين Methicillin والأوكزاسيلين Oxacillin

MIC للأوكزاسيلين			MIC للمثيسيلين			العزلات
S	I	R	S	I	R	
≤2 µg/ml	–	>4 µg/ml	≤8 µg/ml	–	>16 µg/ml	
	≥ 256			≥ 240		SA1
	16			30		SA2
	16			30		SA3
	32			30		SA4
	64			60		SA5
	128			120		SA6
	≥ 256			≥ 240		SA7
	16			60		SA8
	16			30		SA9
	32			30		SA10
	≥ 256			30		SA11
	128			120		SA12
	≥ 256			≥ 240		SA13
	32			60		SA14
	16			60		SA15
	32			120		SA16
	≥ 256			≥ 240		SA17
	64			30		SA18
	128			30		SA19
	64			60		SA20
	64			120		SA21
	16			30		SA22
	32			60		SA23
	32			60		SA24
	128			120		SA25
	64			30		SA26
	64			60		SA27
	128			120		SA28
	≥ 256			≥ 240		SA29
	≥ 256			≥ 240		SA30

وسط كروم أكار CHROM agar MRSA

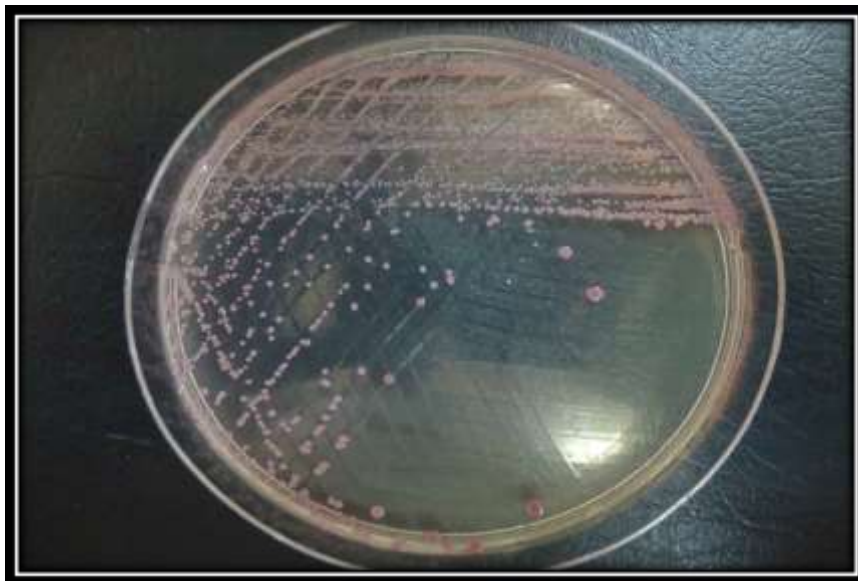
نميت جميع عزلات *S. aureus* قيد الدراسة البالغة (66) عزلة على وسط CHROM agar MRSA حيث أضرهت (30) عزلة قدرتها على مقاومة مضاد المثيسيلين والنمو على وسط (CHROM agar MRSA) وتميزها بأعطائها اللون الوردي الخاص بعزلات ال (MRSA) ، وكما مبين في الشكل (5) .



A

B

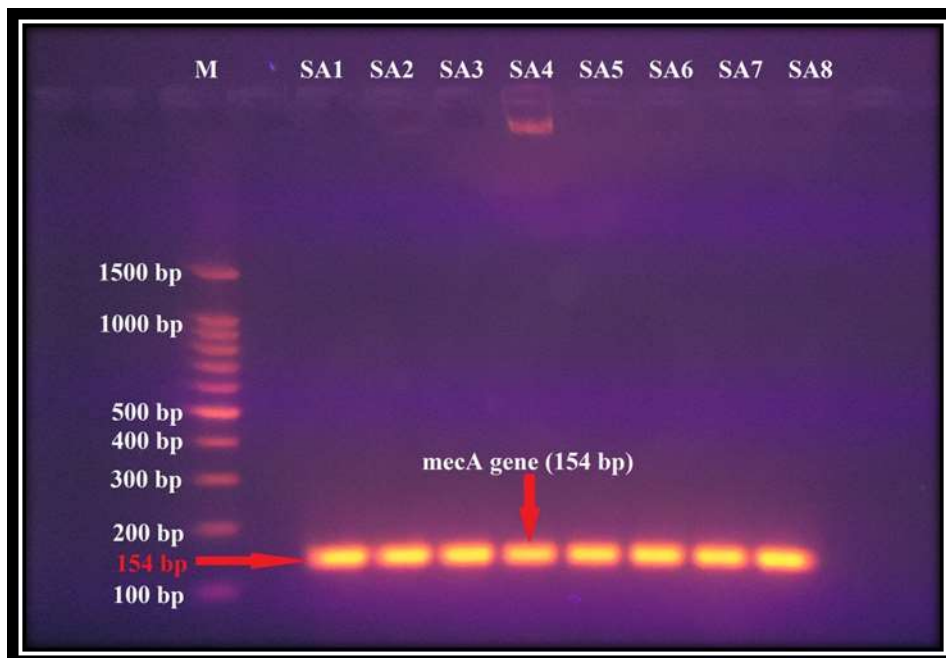
الشكل (4) : التركيز المثبط الأدنى HiComb MIC test لمضادات Oxacillin -B Methicillin – A :



الشكل (5) : وسط كروم أكار CHROM agar MRSA

التشخيص التوكيدي للتحري عن عزلات MRSA باستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة (PCR)

تم اختبار جميع عزلات *S.aureus* للتأكد من أحتوائها على مورثة *mecA* (المقاومة للمثيسيلين) بأستعمال تقنية تفاعل إنزيم البلمرة (PCR) , إذ أظهرت الـ (30) عزلة (الموجبة للطرق السابقة) أحتوائها على هذه المورثة , وبالتالي عدت هذه العزلات مقاومة للمثيسيلين MRSA , وكما مبين في الشكل (6) .



الشكل (6) : نواتج تضخيم الجين *mecA* لبكتريا الـ *S.aureus* والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة باستخدام تقنية الـ PCR .

تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد والمتعدد Single & Multiplex PCR

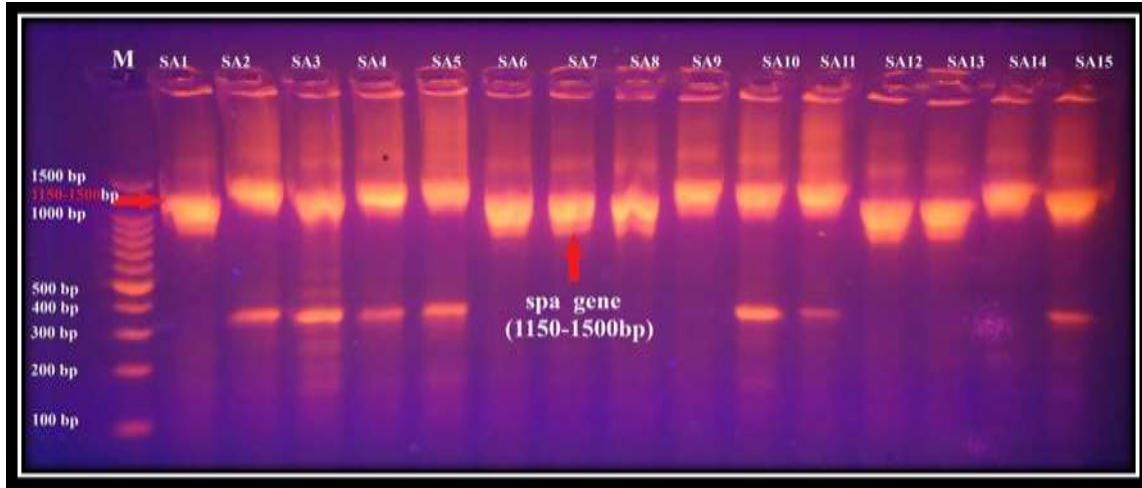
تم التحري عن بعض عوامل الضراوة لجميع عزلات MRSA البالغة (30) عزلة باستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد والمتعدد Single & Multiplex PCR كما مبين في الأشكال (7,8,9,10,11) , حيث أظهرت (30) عزلة بنسبة (100%) أمتلاكها لكل من جينات *Coa* و *ClfA* و *Spa* و *FnbA* , بينما أظهرت (13) عزلة بنسبة (43,3%) أمتلاكها لجين *Luks* , وكما مبين في جدول (11) .

جدول (11) : الاعداد والنسب المنوية للتحري عن بعض جينات عوامل الضراوة في عزلات (MRSA)

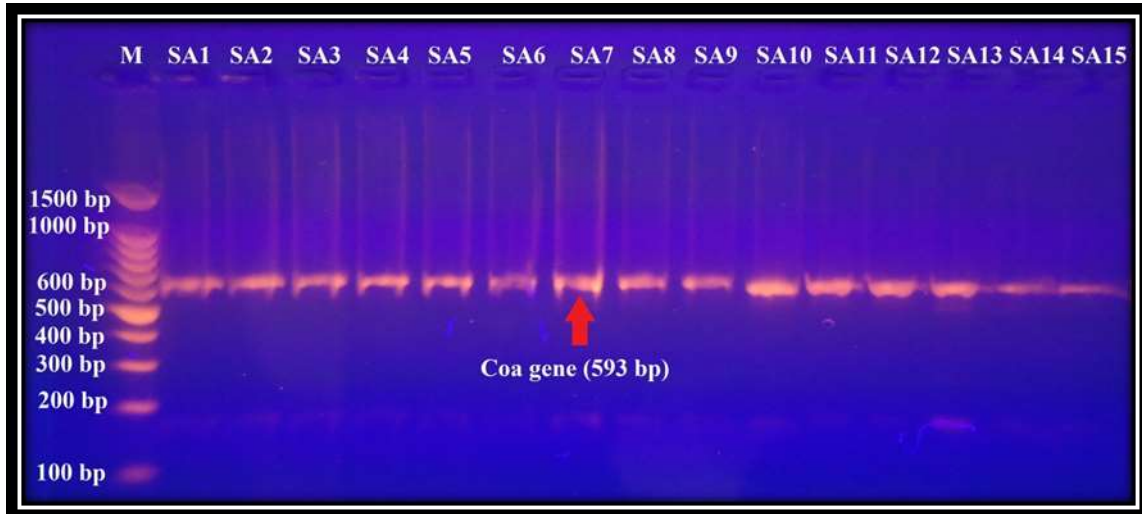
بأستخدام تقنية الـ Single & Multiplex PCR .

النسبة النوية (%)	عدد عزلات الـ MRSA	الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة Virulence Factor genes
100%	30	<i>Coa</i> (Coagulase gene)
100%	30	<i>ClfA</i> (Clumping Factor gene)

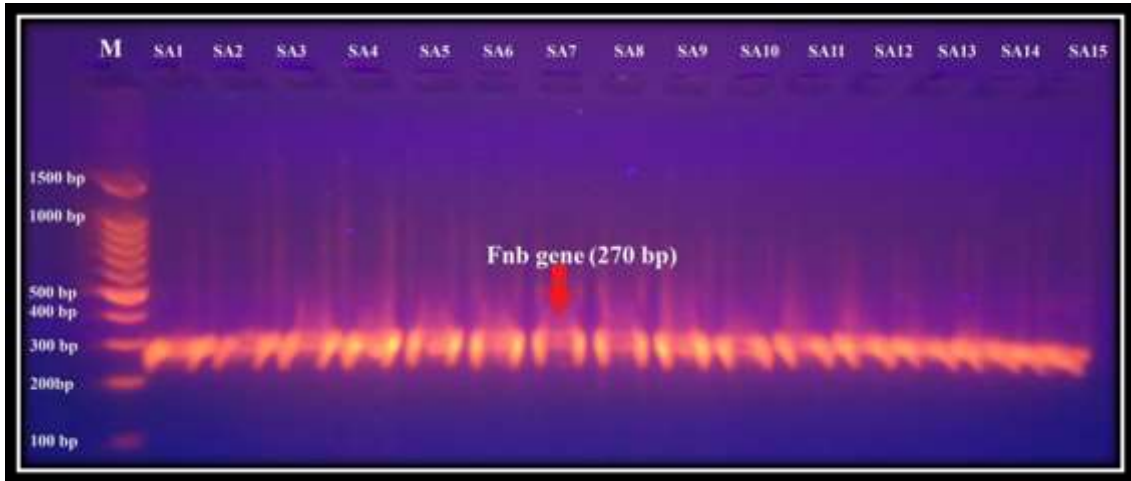
100%	30	<i>Spa</i> (Protein A gene)
100%	30	<i>Fnb</i> (Fibronectin gene)
43.3%	13	<i>Luks</i> (Leukocidin gene)



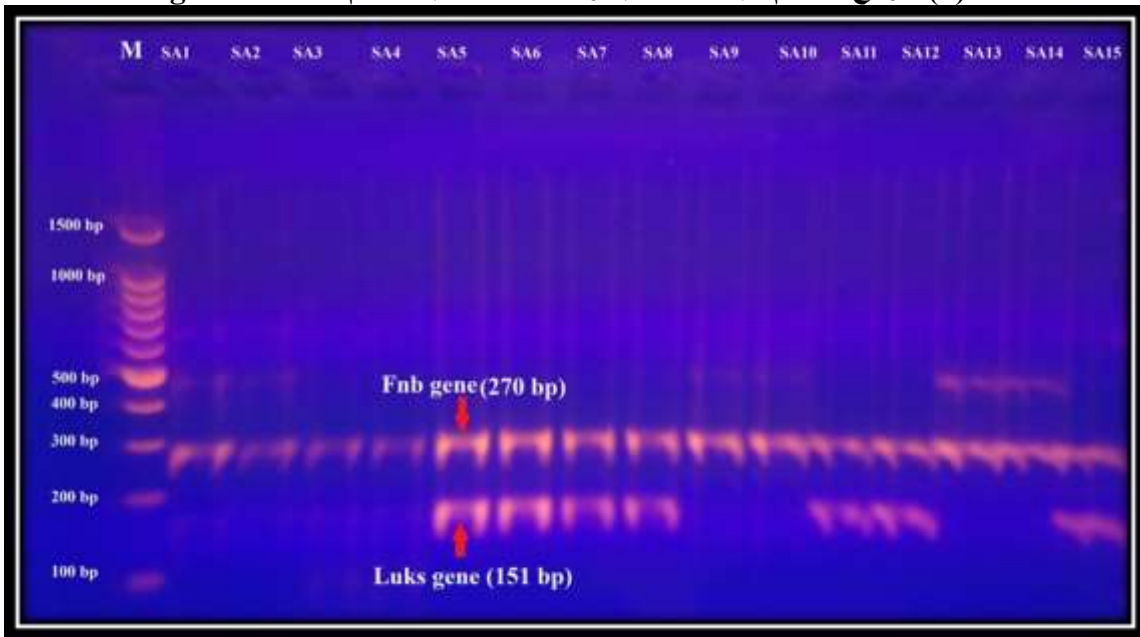
الشكل (7): نواتج تضخيم الجين *Spa* لبكتريا ال MRSA باستخدام تقنية Single PCR



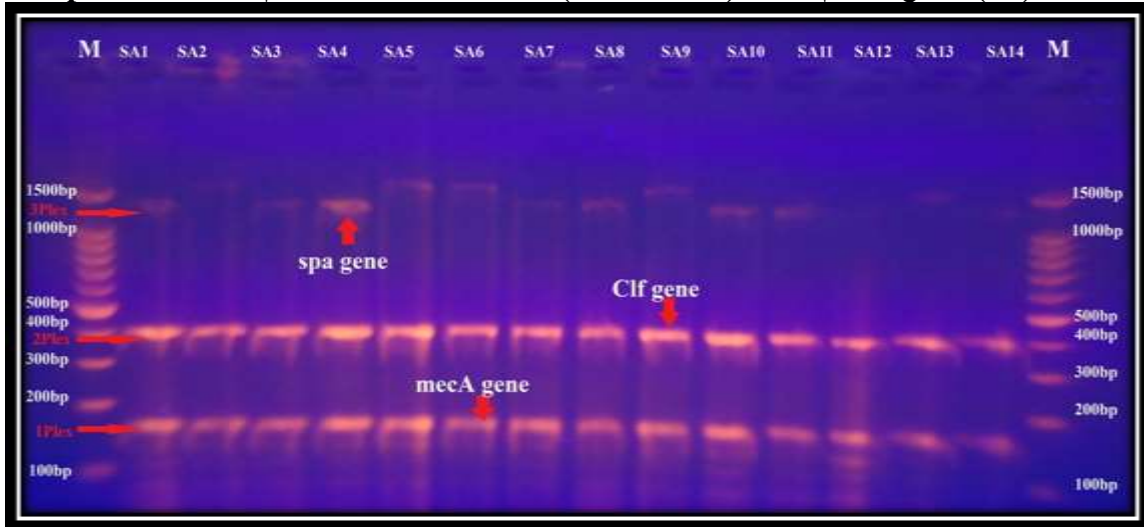
الشكل (8): نواتج تضخيم الجين *Coa* لبكتريا ال MRSA باستخدام تقنية Single PCR



الشكل (٩): نواتج تضخيم الجين *Fnb* لبكتريا ال *MRSA* باستخدام تقنية Single PCR



الشكل (١٠): نواتج تضخيم الجينات (*Fnb + Luks*) لبكتريا ال *MRSA* باستخدام تقنية Multiplex PCR



الشكل (1١): نواتج تضخيم الجينات (*mecA + ClfA + Spa*) لبكتريا ال *MRSA* باستخدام تقنية Multiplex PCR

المناقشة :

ظهرت المستعمرات النامية على وسط المانيتول الملحي الصلب (Mannitol Salt Agar) باللون الأصفر، والأصفر الشاحب، والذهبي، وبلغت أقطارها (1-2) ملي متر تقريباً، بالإضافة إلى تغير لون الوسط من الأحمر إلى اللون الأصفر نتيجة لتخمير المانيتول وإنتاج الحامض، وهذه النتائج كانت متوافقة مع ما ذكره (9) Holt *et al.* و (16) Stukus و (11) MacFaddin. أظهرت نتائج الفحص المجهرى ان خلايا البكتريا المعزولة كروية الشكل، عنقودية الترتيب متجمعة بصورة ثنائية او رباعية او على هيئة سلاسل، وموجبة لصبغة غرام وهذا يتوافق مع ما ذكر من قبل (10) Collee *et al.* و (17) Lowy، و (18) Brooks *et al.*. أظهر الجدول (6) الخاص بالاختبارات الكيموحيوية استجابة 66 عزلة بنسبة (100%) لكل من اختبار الكتاليز ومخثر البلازما الحر واختبار محلل الدنا والجيلاتينيز وتخمير المانيتول، بينما اظهرت جميع العزلات نتبجة سالبة لاختبار الاوكسيديز وكان ذلك متقارباً مع ما ورد في كل من (10) Collee *et al.* و (11) Macfaddin، و (19) Harley and Prescott و (20) Forbes *et al.*. أظهر الجدول (7) بأن أعلى نسبة عزل لبكتريا *S. aureus* بلغت (40.9%) من اخماج الحروق، ويمكن ان يعزى السبب في ارتفاع النسبة المؤوية لهذه البكتريا في عينات الحروق لكون الوسائل الدفاعية للمصابين مخترقة واقل قدرة على المقاومة وطول فترة الرقود للمصابين بالحروق في المستشفى قد يؤدي الى انتقال الأصابة عن طريق الأشخاص المشرفين على رعاية المريض، نتيجة لتواجد بكتريا *S. aureus* كنببت طبيعي في الجسم وهذا ما أكدته Novak (21)، فضلاً عن كونها من المسببات الرئيسية لعدوى المستشفيات Nosocomial infetion (22) Zasshi، كانت نسبة عزل *S. aureus* من الحروق في الدراسة الحالية أعلى من نسبة العزل في دراسة Al-Hassnawi (23) التي بلغت (4.3%) ودراسة Al-Fu'adi (24) التي بلغت (0.0%)، وكانت النسبة مقارنة الى حد كبير مع النسبة في دراسة حموشي (25) ودراسة الخضيرى (26) التي بلغت (40%) و (41.7%) على التوالي، وأظهرت النتائج جدول (8) أن أعلى نسبة لإنتاج إنزيم البييتالاكتاميز كانت من أخماج الحروق بنسبة (33.3%) وهذه النسبة أعلى من النسبة المسجلة في دراسة Al-Hassnawi (23) التي بلغت (4.5%)، ومن خلال النتائج يمكن الاستدلال على ارتفاع نسبة إنتاج إنزيم البييتالاكتاميز، ويمكن أن يعزى السبب في ارتفاع نسبة *S. aureus* المنتجة لإنزيم البييتالاكتاميز التي بلغت (81.8%) إلى تعاطي مضادات البييتالاكتام التي قد تكون سبباً في تحفيز عملية إنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز (27) Zhang *et al.*

تم التحري عن صفة المقاومة للمثيسيلين لجميع عزلات *S. aureus* باستعمال اختبار أقراص فحص الحساسية الدوائية لمضادات الأوكزاسيلين والسيفوكسيتين، (لم يستخدم مضاد المثيسيلين في هذا الاختبار) نتيجة لتأثر مضاد المثيسيلين بظروف الاختبار وأعطاه نتائج خاطئة أدى الى فشل التحري عن المقاومة باستخدام هذا المضاد (28) Derek *et al.* مضاد الأوكزاسيلين ثابت تحت ظروف الخزن، ومضاد السيفوكسيتين بالحقيقة هو محفز جيد لمورثة *mecA* المسؤولة عن المقاومة لمضاد المثيسيلين (29) Weigelt. وطبقاً لذلك فإن العزلات المقاومة لمضاد Oxacillin و Cefoxitin تعتبر مؤشر أولي على انها مقاومة لمضاد (MRSA) Methicillin. تم التحري عن التركيز المثبط الأدنى لجميع عزلات MRSA المشخصة بطريقة أقراص فحص الحساسية لمضادات الأوكزاسيلين و السيفوكسيتين البالغ عددها (30) عزلة وذلك باستخدام اختبار التركيز المثبط الأدنى HiComb MIC test لمضاد المثيسيلين Methicillin والأوكزاسيلين Oxacillin، وتم تحديد مستويات التركيز المثبط الأدنى بالاعتماد على CLSI (30)، تتوافق نسب MIC في الدراسة الحالية مع النسب في دراسة Al-Hassnawi (23). أيضاً أظهرت ال 30 عزلة قدرتها على النمو وأعطائها مستعمرات وردية اللون الخاصة بعزلات MRSA على وسط كروم أكار، بينما يعمل وسط MRSA CHROMagar على تثبيط نمو المكورات العنقودية الحساسة للمثيسيلين Methicillin Susceptible (*Staphylococcus aureus*(MSSA) ولذلك يعتبر وسط كروم أكار MRSA وسط اختيارى لعزل وتفريق سلالات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين (MRAS) وحتى ضمن المستويات القليلة. أذ تبلغ نسبة الحساسية والخصوصية Sensitivity/Specificity حوالي 100% لوسط كروم أكار MRSA (31) Taguchi *et al.* اختبرت جميع عزلات *S. aureus* قيد الدراسة لمعرفة قدرتها على مقاومة المثيسيلين باستعمال تقنية (PCR)، واعتمدت هذه التقنية لتشخيص مورثة *mecA* المسؤولة عن المقاومة الفعالة والكامنة لسلالات MRSA

Huletsky *et al* (32). حيث تم التحري عن ناتج التضخيم لمورثة *mecA* لعزلات MRSA من خلال فحص الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية ومقارنتها بالسلم القياسي (Ladder) حيث وجد تكون حزمة واحدة مفردة ذات وزن جزيئي (154 bp) زوجاً قاعدياً وهذه النتيجة مطابقة لما ذكره Santos *et al* (45). أن نسبة MRSA في الدراسة الحالية التي بلغت (45.4%) أعلى من النسب المسجلة في دراسة Huletsky *et al* (33) إذ بلغت نسبة عزل MRSA (21%) للعام 1994 و (29%) للعام 2003، كما أن نسب عزلات MRSA المسجلة في هذه الدراسة أعلى من النسب المسجلة في دراسة بحثية أعدها Panhotra *et al* (34) إذ تضمنت النسبة المسجلة لعزلات MRSA المعزولة من بعض المستشفيات اليونانية اقل من (0,5%) للأعوام (1999-2004)، وكانت نسبة MRSA أعلى من نسبة الخضيري (26) التي بلغت (18,5%).

تم استخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد Single PCR والمتعدد Multiplex PCR في التحري عن بعض الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة Virulence Factors في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة لمضاد الميثيسيلين Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)، ومن خلال استعمال قطع من الـDNA ذات عدد محدود من النيوكليوتايد (Oligonucleotide) والتي تعمل كبادئات (Primers) متخصصة لجينات الضراوة في سلالة الـMRSA، والتي شملت جينات كل من *coa* الجين المسؤول عن إنتاج إنزيم الكوكليز *clfA*, Coagulase الجين المسؤول عن عامل التكتل *spa*, Clumping Factor الجين المسؤول عن بروتين Protein A، *fnbA*، الجين المسؤول عن بروتين الفايبرونكتين Fibronectin Binding Protein، *lukS*، الجين المسؤول عن إنتاج الـذيفان القاتل لكريات الدم البيض (Panton Valentine Leukocidin (PVL)، أظهرت نتائج التحري عن جينات عوامل الضراوة باستخدام تقنية PCR أملاك جميع عزلات MRSA البالغة 30 عزلة بنسبة (100%) لجينات *coa* و *clfA* و *spa* و *fnbA*، وكما موضح في جدول (11)، كانت نسبة أملاك عزلات MRSA لجينات *clfA* و *fnbA* في الدراسة الحالية متوافقة مع نسبة دراسة Al-Hassnawi (23) التي بلغت (100%) في جميع عزلات MRSA البالغة 24 عزلة في دراستها والتي توزعت بين 9:9 (100%) في عزلات MRSA المكتسبة من المستشفى HA-MRSA، و15:15 (100%) في عزلات MRSA المكتسبة من المجتمع CA-MRSA، وكانت نسبة *clfA* و *fnbA* متوافقة أيضاً مع نسبة دراسة Atshan *et al* (35) التي بلغت (100%)، في دراسة Baba-Moussa *et al* (36) أظهرت أن (17%) من عزلات MRSA كانت تحتوي على جين *fnbA* ومعزولة من مرضى مصابين بالتهاب القناة البولية UTI في نيجيريا، وفي دراسة أخرى أظهرت ان عزلات MRSA على جين *fnbA* معزولة مرضى مصابين بالأسهال كانت تحتوي على جين *fnbA* بنسبة (100%) Baba-Moussa *et al* (37)، وكانت نسبة *clfA* و *fnbA* في الدراسة الحالية أعلى من نسبة دراسة Eiichi *et al* (38) في اليابان والتي بلغت (77.1%) و (72.5%) على التوالي، بينما كانت نسبة وجود جين *coa* في الدراسة الحالية أعلى من نسبة دراسة Mlynarczyk *et al* (39) التي بلغت (92.8%) إذ أظهرت 39 عزلة فقط من عزلات MRSA البالغ عددها 42 عزلة تحتوي هذا الجين في دراسته، وكانت نسبة وجود جين *spa* في الدراسة الحالية التي وصلت نسبة (100%) أعلى من نسبته في دراسة Fatemeh *et al* (47) التي بلغت (96.6%) في منطقة جوجان شمال إيران.

كذلك أظهرت نتائج الدراسة الحالية الخاصة بعوامل الضراوة أن (13) عزلة من أصل (30) عزلة من عزلات MRSA كانت تحتوي على جين (*lukS*) وبنسبة (43.3%) وكانت هذه النسبة متقاربة لنسبة Al-Hassnawi (23) والتي بلغت (42.1%) في عزلات MRSA المكتسبة من المستشفى HA-MRSA، وكانت نسبة جين *lukS* في الدراسة الحالية أعلى من النسب في دراسة Gulmez *et al* (40) ودراسة Marimon *et al* (41) في أسبانيا خلال الفترة 2007 و 2009 والتي بلغت (2.2%) و (4.4%) على التوالي، وأعلى من النسبة في دراسة Al-Mohana *et al* (42) التي بلغت (27.2%) في عزلات MRSA المكتسبة من المجتمع CA-MRSA. أن ارتفاع نسبة الجين المشفر لإنتاج الـذيفان القاتل لكريات الدم البيض *lukS* في الدراسة الحالية لعله يرجع لنوع العزلات حيث كانت أعلى نسبة له في عزلات أخماج الجلد القبيحية (الخراج) والتي بلغت (33.3%) مقارنةً بالمصادر الأخرى المبينة في جدول (4-11) وذلك بسبب الارتباط القريب بين جين *lukS* وهذا النوع من الأصابات Lina *et al* (43). ولا يدعوا هذا للأستغراب، بسبب النقل الأفقي لجينات الضراوة بين سلالات MRSA والتي تتضمن جينات السموم ومنها جين *lukS* Diep *et al* (44). وفي العراق، لا يوجد اهتمام بشأن أنتشار جين *lukS* في عزلات MRSA ماعدا

بعض الدراسات القليلة في محافظة النجف ومحافظة بابل (42) Al-Mohana *et al* , Al-Hassnawi (23) . ولا يوجد مركز تخصصي للدراسة والبحث عن أنتشار وتوزيع وتنقية هذا السم . وكانت نسبة وجود جين *lukS* في الدراسة الحالية أدنى من النسبة في دراسة Havaei *et al* (49) التي بلغت (%61.8) في عزلات MRSA المكتسبة من المستشفى HA-MRSA .

المصادر

1. Omoe, K.; Ishikawa, M.; Shimoda, Y.; Hu, D. L.; Ueda, S.; and Shinagawa, K. (2002). Detection of *seg*, *seh*, or *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. J. Clin. Microbiol. 40: 857-862.
2. Brooks, G.F., Butel, J.S. and Morse. S.A. (1998). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology .21sted. Appleton & lange, Asimon and Schuster Co., California.
3. Ryan, K. J.; and Ray, C. G. (2004). Sherris Medical Microbiology 4th ed. McGraw-Hill-NewYork.
4. O'Riodan, K.; and Lee, J. C. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17 (1): 218-234.
5. McKinney, T. K.; Sharma, V. K.; Craig, W. A.; and Archer, G. L. (2001) . Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is co repressed but not co induced by cognate *mecA* and β -lactamase regulators. J. Bacteriol. 183: 6862-6868.
6. Fuda, C.; Heseck, D.; Lee, M.; Heilmayer, W.; Novak, R.; Vkulenko, S. B.; and Mobashery, S. (2006). Mechanistic basis for the action of new cephalosporin antibiotics effective against methicillin-and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 281: 10035-10041.
7. Al-Rawahi, G. N.; Schreader, A. G.; Porter, S. D.; Roscoe, D. L.; Gustafson, R.; and Bryce, E. A. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage among injection drug users: six years later. J. Clin. Microbiol. 46: 477-479.
8. Suzuki, J.; Komatsuzawa, H.; Sngai, M.; Suzuki, T.; Kozai, K.; Miyake, Y. Suginaka, H. & Nagasaka, N. (1997). A Long-Term Survey of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Oral Cavityof Children. Microbiol .Immunol., 41:681-686 .
9. Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Stanley, J. T.; and Williams, S. T. (1994). Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed., Wiliams and Wilkins, Baltimore, USA.
10. Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmiom, B. P.; and Simmon, A. (1996). Mackie and McCarteny, Practical Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone inc., USA.
11. MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

12. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)** . (2010) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement. M 100-S20., Wayne, Pannsylvania; 30 (1).
13. **Bryskier A.**, (2005) . Antimicrobial . ASM Press, USA .
14. **Lorian V.**, (2005) . Antibiotics in Laboratory medicine . Lippincott Williams & Wilkins, USA
15. **Sambrook, J.; Fritsh, E.F.; and Maniatis**, (1989) . Molecular cloning, laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
16. **Stukus, P. E.** (1997) . Investigating microbiology. Harcourt Brace and Companies.
17. **Lowy, F.D.** (1998) . *Staphylococcus aureus* Infections. The N. Engl .J.Med., 339 (8) : 520 - 532.
18. **Brooks, G. F.; Carroll, K. C.; and Morse, S. A. (Jawetz)**, (2007). Melnick and Adelberg`s, Medical microbiology, 24th edition. The McGraw-Hill. New York.
19. **Harley, J. P. and Prescott, L.M.** (2002). Laboratory exercises in microbiology. 5th edition. McGraw Hill companies. New York.
20. **Forbes, B.A.; Sahm, D.F.; and Weissfled, A.S.** (2002) . Baiely and Scott's Diagnostic Microbiology. (11th ed.) Mosby. St .Louis.
21. **Novak, R.P.** (2000). Pathogenicity factors and their regulation, In V.A .Fischetti, R.P. Noviak, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy, and J.I. Rood (ed.), Gram positive pathogens . American Society for Microbiology, Washington, D.C. P. 392 - 407.
22. **Zasshi, K.** (2004). Epidemiological invistigation of beta-lactam antibiotic induced vancomycin MRSA comparition of detection rate of BIVR with or without CZX ., 78 (8) : 717 - 21.
23. **Al-hassnawi, H.H.** (2012) . Molecular Characterization of Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Clinical Cases in Babylon Province . PhD. thesis. College of Medicine. University of Babylon.
24. **Al-Fu'adi, A.H.H.** (2010). Phenotypic and Genotypic (*mecA* gene) of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates in Dewaniya City . M.Sc thesis. Babylon university . College of medicine .
٢٥. **حموشي, رواء محمود داود** (٢٠٠٤) . التأثير التثبيطي لعدد من النباتات الطبية على جرثومة *Staphylococcus aureus* المعزولة من أخماج جلدية مختلفة . رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة الموصل .
٢٦. **الخصيري, ميعاد كاظم علي** (٢٠٠٨) . دراسة بكتريولوجية ووراثية للمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين المعزولة من مستشفيات مدينة النجف . رسالة ماجستير . كلية التربية للبنات . جامعة الكوفة .
27. **Zhang, H. Z.; Hackbarth, C. J.; Chansky, K. M.; and Chambers, H. F.** (2001). A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta lactams in staphylococci. Science . 291: 1962-1965.
28. **Derek, F.J. Brown, David, I. Edwards, Peter, M. Hawkey, D. Morrison, L. Ridgway, Kevin, J. Towner, and Michael, W . D** . (2005) . Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility of

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Oxford University Press. J. Antimicrob. Chemother., 56:1003.
29. Weigelt, J.A.(2007). MRSA Informa Healthcare. USA, Inc.
 30. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) . (2011) . Performance standards for Antimicrobial Disks Susceptibility tests.Vol.31 No.1 Jan.
 31. Taguchi *et al* . (2004) . J. Jap. Ass. Infect. Dis. Jan. 54-58.
 32. Huletsky, A.; Gagnon, F.; and Rossbach, V. (2002). Less than 1-h detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swabs by real-time polymerase chain reaction (PCR) using the smart cycler. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8 (1): 85.
 33. Huletsky, A.; Giroux, R.; and Rossbach, V. (2004). New real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 42: 1875-1884.
 34. Panhotra, B. R.; Saxena, A. K.; and Al-Mulhim, A. S. (2005). Chloramphenicol susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Eastern region of Saudi Arabia. J. Saudi. Med. 26 (7): 1149-1151.
 35. Atshan, S.S., Shamsudin, M.N., Lung, L.T.T., Sekawi, Z., Ghaznavi-Rad ,E., and Pei,C.P.(2012) . Comparative Characterisation of Genotypically Different Clones of MRSA in the Production of Biofilms . J. Biomed Biotechnol.
 36. Baba-Moussa L, Anani L, Scheftel JM, Couturier M, Haikou N, Hounsou F, Monteil H, Sanni A, Prevost G (2008) . Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections, J.Hosp. Infect.,(968): 32-38.
 37. Baba-Moussa L., Ahissou, H., Azokpota, P., Assogba, B., Atindehou, M. M., Anagonou, S. (2009). Toxins and adhesion factors associated with *Staphylococcus aureus* strains isolated from diarrhoeal patients in Benin. Afri. J. Biotech.,9(5): 604-611.
 38. Eiichi, A.; Koichi, M.; Ritsuko, M.; Reiko, K.; and Hiromi K .(2004). Biofilm Formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Patients with Urinary Tract Infection .Acta med . Okayama.,58(4): 207-214.
 39. Młynarczyk, A; Młynarczyk, G; Szymanowska, A; Stańczak, J; Luczak, M; and Jeljaszewicz J.(2000). Use of PCR for evaluating detection of *coa* and *nuc* genes in methicillin-resistant, coagulase-negative strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA-CN).Med Dosw Mikrobiol. , 52(3):217-222.
 40. Gülmez, D; Sancak, B; Ercis, S; Karakaya, J;and Haşcelik, G.(2012). Investigation of SCCmec types and Panton-Valentine leukocidin in community-acquired and nosocomial *Staphylococcus aureus* strains: comparing skin and soft tissue infections to the other infections. Mikrobiyol Bul. 46(3):341-351.

41. **Marimón, JM; Villar, M; García-Arenzana, JM; Caba Ide, L;and Pérez-Trallero, E.**(2012). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* carrying the panton-valentine leukocidin genes in northern Spain. *J Infect.* 64(1):47-53.
42. **Al-Mohana, A. M., Al-Kudhieri, M. K.,and Al-Charrakh, A.H.**(2012). Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying *mecA* and Panton-Valentine leukocidin *PVL* Genes That Isolated From Holy shrine In Najaf , Iraq. *J.Bacteriol.Res.*June (in press) .
43. **Lina, G; Piémont, Y; Godail-Gamot, F; Bes, M; Peter, MO; Gauduchon, V; Vandenesch, F;and Etienne; J.** (1999) . Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.*, 29(5):1128-1132 .
44. **Diep, B., Carlton, H., Chang, B., Senabaugh, G. and Predreau-Remington,F.** (2011) . Roles of 34 Virulence Genes in the Evolution of Hospital- and community – Associated Strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J.Infect.Dis.*,(193): 1495-1503 .
45. **Santos, K. R. N.; Teixeira, L. M.; Leal, G. S.; Fonseca, L. S.; and Filho, P. P. G.** (1999). DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. *Med. Microbiol.* 48: 17-23.
46. **Al-Talib, H., Yean, C.Y., Al-Khateeb, A., Hassan, H., Singh, K.K., Al-Jashamy, K.,and Ravichandran, M.**(2009). A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine Leucocidin. *BMC Microbiology*, 9 :113.
47. **Fatemeh, S; Shojai, A; Golalipour, M; Rahimi Alang, S; Vaez, H;and Ghaemi, EA.**(2010). Spa Diversity among MRSA and MSSA Strains of *Staphylococcus aureus* in North of Iran. *Int J Microbiol* .
48. **Moore, N** .(2006). Examination of Virulence genes in Nasal Isolates and Community-Acquired Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* . *UW-L Journal of Undergraduate Research IX* .
49. **Havaei, S.A.; Moghadam, S. O.; Pourmand, M.R.;and Faghri, J.** (2010). Prevalence fo Genes Encoding Bi-Component Leukocidins among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.*Iran.J. Publ. Health*,39(1):8-14.

Detection of Some Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes in *S.aureus* Isolated from Clinical Cases in Al-Dewaniya City

Mustafa Raad Jowad Maitham Ghaly Yousif

Biology Department , Collage of Science , Al-Qadissiay University

Abstract :

A total of 173 specimens from different clinical cases were collected from patients (in different age groups) who admitted to several health centers in Al-Dewaniya city (Al-Dewaniya General Teaching Hospital, Al-Dewaniya Maternity and Pediatrics Teaching Hospital , and General Health Laboratory) during a period extending from November 2011 to March 2012 . Biochemical and morphological characterization tests showed that 66 (38.1%) isolates were identified as *Staphylococcus aureus* 27(40.9%) isolates from burns , 18(27.2%) isolates from abscess , 18(27.2%) isolates from wounds , 2(3%) isolates from urine , 1(1.5%) isolate from ear .The vast majority 54 (81.8 %) of *S. aureus* isolates were able to produce β -lactamase enzymes using rapid iodometric method.The investigating for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) of 66 *S. aureus* by four tests (Disk diffusion , HiComb MIC test , CHROM agar MRSA,and Polymerase chain reaction PCR) .The investigating some virulence factors for 30 isolate of MRSA using Single and Multiplex PCR For detection virulence factor genes which both *coa* gene encoding production of coagulase, *clfA* gene encoding for clumping factor, *spa* gene encoding for protein A, *fnbA* gene encoding for fibronectin binding proteins, *lukS* gene encoding production of Panton Valentine Leukocidin(PVL), Results showed that all isolates 30 (100%) were posses *coa,clfA,spa* and *fnbA* genes , 13 (43.3%) were posses *lukS* gene .