



جامعة كربلاء

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

**الكشف الجزيئي لبعض عوامل الضراوة في بكتريا *Staphylococcus aureus*  
المقاومة للمثيسيلين المعزولة من مصادر سريرية مختلفة**

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

فاطمة سالم عبيد الجاسمي

بكالوريوس علوم حياة - جامعة كربلاء 2019

بإشراف

أ.د. علي عبد الكاظم جاسم الغانمي

إقرار المشرف

اشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء بوصفها جزءاً من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيع:

الاسم: د . علي عبد الكاظم الغانمي

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ: 2023 / 2 / 20

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات أعلاه, أحيل هذه الدراسة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع: خويلد

الاسم: د . خالد علي حسين

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ: 2023 / 2 / 21

### إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه ، نشهد باننا قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة (الكشف الجزيئي لبعض عوامل الضراوة في بكتريا *Staphylococcus aureus* المقاومة للمثيسيلين المعزولة من مصادر سريرية مختلفة) المقدمة من قبل الطالبة (فاطمة سالم عبيد) كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة وبعد اجراء المناقشة العلنية وجد انها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعلية نوصي بقبول الرسالة بتقدير (امتياز) .

#### عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم: د. ميس عماد احمد

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة بغداد

#### عضواً ومشرفاً

التوقيع :

الاسم : د. علي عبد الكاظم جاسم

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : كلية العلوم | جامعة كربلاء

التاريخ : 2023 / 6 / 2

#### رئيس اللجنة المناقشة

التوقيع :

الاسم : د. ناجح هاشم كاظم

المرتبة العلمية : أستاذ

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة كربلاء

#### عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. عزيز ياسر حسن

المرتبة العلمية : مدرس

العنوان : كلية العلوم / جامعة كربلاء

التاريخ : 2023 / 6 / 2

#### مصادقة عمادة كلية العلوم جامعة كربلاء

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع :

الاسم : د. جاسم حنون هاشم العوادي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : عميد كلية العلوم - جامعة كربلاء

التاريخ : 2023 / 6 / 2



## الأهداء

الى المبعوث رحمة للعالمين معلم الانسانية الاول

الى من انقذنا الله به من ظلمات الجهل الى نور العلم

خير البرية محمد (ص) واله الهداة الميامين

إلى .... والدي العزيز الذي تعلمت منه العطاء بدون انتظار

إلى ... والدي الغالية التي حملتني وهنا على وهن وكانت ينبوعا للمحبة والصبر

والتفاؤل

إلى ... أخوتي الأعزاء الذين كانوا سندنا وعونا وذخرا

أهدي ثمرة عملي هذا

فاطمة





## شكر وتقدير

ارفع أكف الضراعة لله جلا وعلا الذي سدد خطاي ووفقي الى انجاز هذه الدراسة ، ومن ثم فإني مصداقا للقول "تواضعوا لمن تتعلمون منه " اتقدم بكل الشكر والتقدير والفضل والامتنان إلى أستاذي والمشرف على الرسالة الدكتور (علي عبد الكاظم جاسم الغامبي) الذي قدم نموذجاً منفرداً في الإثراء العلمي والمتابعة الدقيقة لكل خطواتي في اعداد الرسالة ليثريها بعلمه وملحوظاته وادعو الله ان يجزيه عني خير الجزاء .

كما يطيب لي أن اتقدم بالشكر والتقدير الى عمادة كلية العلوم ، و رئاسة قسم علوم الحياة لتفضلهم بإتاحة الفرصة لي لإكمال دراستي ولا يسعني إلا ان أقدم جزيل شكري وامتناني إلى العاملين في مدينة الامام الحسين (ع) الطبية ومستشفى النسائية والتوليد التعليمي ومختبر الصحة العامة ، ولا سيما السيد مهند خلف و السيدة "اميره محمد جبر " وادعوا الله ان يجازيهم على ارشادي خير الجزاء في الدنيا والاخرة.

ولا يفوتني أن اقدم خالص شكري وتقديري لزملائي طلبة الدراسات العليا في القسم للصحة الجميلة التي جمعتنا طيلة مدة الدراسة ، كما اود ان ابر عن عظيم امتناني وتقديري لكل من ساهم في اخراج الرسالة بهذه الصورة .

الباحثة



## الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة الحصول على 31 عزلة من المكورات العنقودية الذهبية من المرضى المراجعين لمستشفى النسائية والتوليد التعليمي ، مدينة الامام الحسين (ع) الطبية ، مختبر الصحة العامة فضلا عن العيادات الخارجية ومن مصادر سريرية مختلفة تمثلت بالحروق ، الجروح ، الدم ، الادرار والجلد . وقد خضعت هذه العزلات الى بعض الفحوصات المجهرية والكيموحيوية والجزئية للتأكد من تصنيفها من حيث الجنس والنوع ، كما خضعت تلك العزلات ايضا لاختبار تحديد البكتريا المقاومة للمثيسلين عن تلك الحساسية منها . اعقب ذلك التحري عن قابلية العزلات المقاومة للمثيسلين على انتاج بعض عوامل الضراوة المتمثلة في الغشاء الحيوي والبروتينيز والانزيم الحال للدم فضلا عن التحري عن وجود بعض جينات الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية تضمنت جين *mecA* و *hlb* و *lukED* و *tetK* . وقد أظهرت النتائج ماياتي :

❖ اثبتت الاختبارات الشكلية والكيموحيوية إن العزلات المتحصل عليها كانت عائدة إلى جنس المكورات العنقودية بواقع 31 عزلة من أصل 150 عينة وبنسبة عزل 20.6 % تضمنت عشر عزلات من الحروق وثمانى عزلات من الجروح وثلاث من الدم وخمس عزلات من الادرار والجلد بنسب ( 32.25 , 25.80 , 9.67 , 16.12 , 16.12 )% ، علي التوالي .

❖ بلغ عدد العزلات البكتيرية المقاومة للمثيسلين (24) بنسبة 77.41 %

❖ من خلال اختبار حساسية عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسلين للمضادات الحيوية تبين إن كل العزلات مقاومة لمضادات Benzyl Penicillins و Amoxicillin و Piperacillin و Ampicillin - Sulbactam و Amoxicillin و Clavulanic Acid و Carbenicillin و Amoxicillin ( بنسبة 100% ، وذات النسبة لمجموعة المضادات العائدة لعائلة (Cephalosporins) المتمثلة في Cefadroxil و Cephalexin من الجيل الأول و Cefuroxime من الجيل الثاني و Cefixime و Cefpodoxime و Ceftriaxone و Cefotaxime و Ceftizoxime و Cefoperazone من الجيل الثالث و Cefepime و Cefpirome من الجيل الرابع . واطهرت هذه البكتريا حساسية بنسبة 100% لمضاد (Linezolid و Vancomycin).

❖ أظهرت نتائج الاختبارات الجزيئية وجود جينات (*tetK* و *hlyB* و *mecA* و *femA*) بنسبة 100% في العزلات الاربع والعشرين المختبرة ، بينما كان جين *lukED* موجودا بنسبة 58.3%.

❖ أظهرت الدراسات إن العزلات جميعها لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي باستخدام الطريقة النوعية ، وتوزعت قابليتها بين المنتجة القوية بنسبة 29.16% والمتوسطة الانتاج بنسبة 50% والضعيفة بنسبة 20.8%، بينما توزعت العزلات عند استخدام الطريقة الكمية المتمثلة بطريقة الصفيحة بواقع 25% منها قوية الانتاج و 66.6% منها متوسطة و 8.3% منها ضعيفة الانتاج .

❖ اتضح وجود علاقة بين قوة الغشاء الحيوي ومقاومة البكتريا للمضادات الحيوية .

❖ أظهرت النتائج إن العزلات التي لها القابلية على انتاج انزيم البروتياز هي 20 عزلة وبنسبة 83.3% باستعمال الكازئين كماده اساس وأبرت العزلة S9 اعلى انتاج بفعالية انزيمية 13.9 وحدة املليتر.

أظهرت العزلات المتمثلة في (S6 ,S9,S22) فعالية منخفضة لانزيم الهيمولايسين .

الصفحة	المحتويات	التسلسل
3-1	المقدمة	-1
4	استعراض المراجع	-2
4	جنس <i>Staphylococcus</i>	1-2
5-4	لمحة تاريخية	1-1-2
5	خصائص جنس <i>Staphylococcus</i>	2-1-2
7-5	المكورات العنقودية الذهبية <i>Staphylococcus aureus</i>	3-1-2
7	تصنيف بكتريا <i>S.aureus</i>	1-3-1-2
9-8	الخصائص الكيموحيوية والزرعية لبكتريا <i>S.aureus</i>	2-3-1-2
11-9	امراضه بكتريا <i>S.aureus</i>	3-3-1-2
11	عوامل ضراوة بكتريا <i>S.aureus</i>	4-3-1-2
12	عوامل الضراوة المرتبطة بسطح بكتريا <i>S.aureus</i>	1-4-3-1-2
13	البروتينات الخارجية Exoproteins	2-4-3-1-2
13	السموم الخارج خلوية Exotoxins	3-4-3-1-2
14-13	ا- السم القاتل لخلايا الدم البيض panton valentine leukocidin pvl	
14	ب- سم متلازمة الصدمة السمية (Toxic Skin shock syndrom (TSST-1)	
14	ت- السموم المعوية العنقودية <i>Staphylococcal</i> enterotoxins	
15-14	ث- الانزيمات الحالة للدم Hemolysis	
15	ج- الانزيم المقشر للخلايا Exofoliative	
15	الانزيمات الخارج خلوية Extracellular enzyme	4-4-3-1-2
16	ا- انزيم الكاتليز (Catalase)	
16	ب - الانزيم الحال للحمض النووي Nucleases	



16	ت- انزيم الهيالورونيديز (Hyaluronidase)	
16	ث- انزيم اللايبيز (Lipase)	
16	ج- انزيم الكواكيوليز (Coagulase)	
17	د- انزيم البرويتيز (Protease)	
18-17	الغشاء الحيوي Biofilm	2-2
20-19	مقاومة بكتريا <i>S. aureus</i> للمضادات الحيوية	3-2
20	آليات مقاومة بكتريا <i>S. aureus</i> لبعض المضادات الحيوية	1-3-2
20-21	ا- مقاومة بكتريا <i>S. aureus</i> للمثيسلين	
21	ب - مقاومة بكتريا <i>S. aureus</i> للبتسولين	
22-21	ت- دور البلازميدات في مقاومة بكتريا <i>S. aureus</i> للمضادات الحيوية	
22	ث- مقاومة بكتريا <i>S. aureus</i> للفانكوميسين	
25-23	وراثة بكتريا <i>S.aureus</i>	7-3-2
26	المواد وطرائق العمل	3
26	المواد والاجهزة المستخدمة .	1-3
27-26	الاجهزة المستخدمة والشركات المصنعة لها .	1-1-3
28-27	المواد الكيميائية والايوساط الزرعية المستخدمة والشركات المصنعة لها .	2-1-3
29-28	المواد ذات الاستخدام الواحد	3-1-3
30-29	المضادات الحيوية المستخدمة	4-1-3
30	طرائق العمل .	2-3
30	جمع العينات .	1-2-3
33-32	الايوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص بكتريا <i>S.aureus</i>	2-2-3
35-34	الكواشف والمحاليل المستخدمة في الكشف عن بكتريا <i>S.aureus</i>	3-2-3
35	عزل وتشخيص بكتريا <i>Staphylococcus</i>	4-2-3
35-36	الفحوصات المجهرية (Microscopic tests)	1-4-2-3

37-36	الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests )	2-4-2-3
37	تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص API 20E	3-4-2-3
39-38	اختبار حساسية البكتريا المعزولة لمضادات الحيوية	5-2-3
40-39	فحص الحساسية للبكتريا المعزولة باستعمال جهاز الفايترك Vitek-2 compact system	6-2-3
40	حفظ وادامة العزلات	7-2-3
40	التوصيف الجزيئي لبكتريا <i>S.aureus</i>	8-2-3
42-40	استخلاص الحامض النووي الديوكسي رايبوزي ( DNA ) من بكتريا <i>S.aureus</i> باستخدام عدة الاستخلاص	1-8-2-3
43-42	توصيف البكتريا المعزولة باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction	2-8-2-3
46-43	اجراء تفاعل البلمرة (PCR Assay)	3-8-2-3
46-47	الترحيل الكهربائي في الهلام (Gel Electrophoresis)	4-8-2-3
47	الكشف عن نواتج التضاعف	5-8-2-3
47	تحديد بعض عوامل الضراوة في بكتريا <i>S.aureus</i> (MRSA)	9-2-3
47	التحري عن قابلية بكتريا <i>S.aureus</i> على تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm)	1-9-2-3
47	ا-التحري بطريقة الانبوبة ( Tube method )	
49-48	ب- التحري بالطريقة الكمية	
50-49	التحري عن الانزيم الحال للبروتين (Protease)	2-9-2-3
50	الكشف عن فعالية الهيمولايسين بيتا	3-9-2-3
51-50	المنحنى القياسي لتحلل لدم باستخدام تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم	1-3-9-2-3
51	تحضير الراشح البكتيري	2-3-9-2-3
52	الاختبار الكمي للتحلل الدموي	4-9-2-3
	النتائج والمناقشة	4
54-53	عزل بكتريا <i>Staphylococcus aureus</i>	1-4
54	تشخيص بكتريا <i>Staphylococcus</i>	2-4

55-54	الصفات الزرعية والمجهرية (Cultural and Microscopical characteristics):	1-2-4
55	تشخيص بكتريا <i>S.aureus</i>	3-4
55	النمو على وسط اكار ملح المانتول (Mannitol salt agar , MSA)	1-3-4
55	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical test)	2-3-4
56-55	تشخيص بكتريا <i>S.aureus</i> باستخدام العدة التشخيصية API Staph	3-3-4
57-56	الكشف المظهري عن البكتريا المقاومة للمثيسلين MRSA	4-4
62-58	اختبار حساسية عزلات <i>S.aureus</i> للمضادات الحيوية	5-4
68-62	التشخيص الجزيئي لبكتريا <i>Staphylococcus aureus</i>	6-4
68	التحري الجزيئي عن بعض جينات المقاومة في بكتريا MRSA	7-4
70-68	جين مقاومة المثيسلين ( <i>mecA</i> )	1-7-4
73-70	التحري عن جين مقاومة التتراسكلين <i>tetK</i>	2-7-4
74	التحري عن بعض عوامل الضراوة في البكتريا المقاومة للمثيسلين بالطرق التقليدية والجزيئية	8-4
78-74	الكشف عن قابلية بكتريا <i>S.aureus</i> المقاومة للمثيسلين على انتاج الغشاء الحيوي	1-8-4
80-78	تقدير فعالية انزيم البروتيز (Protease) المنتج من بكتريا <i>Saureus</i> المقاومة للمثيسلين	2-8-4
81-80	التحري عن الجين لمشفر لسم ( <i>Leukocidin lukED</i> )	3-8-4
87-81	التحري عن الانزيم الحال للدم بالطرائق الجزيئية والتقليدية	4-8-4
88	الاستنتاجات والتوصيات	
127-89	المصادر	

## قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
6	أهم الانواع المرضية العائدة للمكورات العنقودية والأمراض المرتبطة بها	1

7	أهم الفروقات بين المكورات العنقودية الموجبة لفحص انزيم التجلط ونظيرتها السالبة لهذا الفحص	2
8	المفتاح التصنيفي للمكورات العنقودية الذهبية	3
9	خصائص مستعمرة بكتريا <i>S.aureus</i> على اوساط زرعية مختلفة	4
39-38	الاستجابة الموجبة والسالبة لاختبارات API20E	5
43	البيودئ المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم في هذه الدراسة	6
44	مكونات المزيج Master Mix المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل	7
44	برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل لجين <i>femA</i> و <i>mecA</i>	8
45	برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل لجين <i>tetK</i>	9
45	برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل لجين <i>lukE-lukD</i>	10
46	برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل لجين <i>hly</i>	11
51	التراكيز المترتبة من محلول كلوريد الصوديوم وقيمة الامتصاص لكل تركيز والتحلل الدموي بنسبة (50)%	12
56	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>S.aureus</i>	13
57	اختبار حساسية <i>S.aureus</i> لتحديد البكتريا المقاومة للمثيسلين	14
64-63	اختبار حساسية عزلات بكتريا ( <i>S1-S12</i> ) <i>S.aureus</i> المعزولة من مصادر سريرية مختلفة	15
66-65	اختبار حساسية عزلات بكتريا ( <i>S12-S124</i> ) <i>S.aureus</i> المعزولة من مصادر سريرية مختلفة	16
69	توزيع الجينات المختبرة في عزلات <i>S.aureus</i>	17
76	توزيع بكتريا <i>S.aureus</i> المقاومة للمثيسلين بحسب انتاجها للغشاء الحيوي باستخدام الطريقة النوعية والكمية .	18
80	غربة عزلات بكتريا <i>S.aureus</i> المقاومة للمثيسلين لأننتاج انزيم البروتياز	19
87	توزيع الجينات بين العزلات اعتمادا على قوة الغشاء الحيوي المكونة له	20

## قائمة الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
-----------	-------------	--------

11	عوامل الضراوة في بكتريا <i>S.aureus</i>	1
81	مراحل تكوين الغشاء الحيوي	2
22	اليات المقاومة المختلفة في بكتريا <i>S.aureus</i>	3
23	التركيب الكيميائي لمضادات Beta-lactam البنسلين والمثيسلين	4
25	عملية اندماج SCC mecA داخل منطقة orfx	5
53	توزيع بكتريا <i>Staphylococcus aureus</i> حسب أماكن عزلها من مصادر سريرية مختلفة	6
67	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا <i>S.aureus</i> (S1-S8) المعزولة من الحروق باستعمال البادئ النوعي لجين ( <i>femA132bp</i> ) بتركيز هلام الاكاروز (1.5)% وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.	7
67	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا <i>S.aureus</i> (S9-S14) المعزولة من الجروح و(S15-S16) من الدم باستعمال البادئ النوعي لجين ( <i>femA132bp</i> )، بتركيز هلام الاكاروز (1.5)% وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.	8
68	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا (S17-S20) <i>S.aureus</i> معزولة من الجلد و(S21 - S24) معزولة من الأدرار باستعمال البادئ النوعي لجين ( <i>femA132bp</i> )، بتركيز هلام الاكاروز (1.5)% وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.	9
71	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا <i>S.aureus</i> (S1-S8) المعزولة من الحروق باستعمال البادئ النوعي لجين <i>mecA</i> (310bp)، بتركيز هلام الاكاروز (1.5)% وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.	10
71	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا <i>S.aureus</i> (S9-S14) المعزولة من الجروح وS15-S16 من الدم باستعمال البادئ النوعي لجين ( <i>mecA</i> 310bP) ، بتركيز هلام الاكاروز (1.5)% وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.	11
72	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا(S17-S20) ( <i>S.aureus</i> معزولة من الجلد و S24-S21 معزولة من الأدرار	12

	باستعمال البادئ النوعي لجين ( <i>mecA</i> 310bP) ، بتركيز هلام الاكاروز (1.5)% وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة	
73	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا ( <i>S.aureus</i> ( S1-S8) المعزولة من الحروق باستخدام البادئ النوعي لجين <i>tetk</i> (360bp) ، بتركيز هلام الاكاروز (1.5)% وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة	13
73	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا ( <i>S.aureus</i> (S9-S14) المعزولة من الجروح و S15-S16 من الدم باستخدام البادئ النوعي لجين <i>tetk</i> 360bp ، بتركيز هلام الاكاروز (1.5)% وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.	14
73	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا (S17-S20) <i>S.aureus</i> معزولة من الجلد و (S24-S21) معزولة من الادرار باستخدام البادئ النوعي لجين <i>tetK</i> 360bp ، بتركيز هلام الاكاروز (1.5)% وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.	15
77	النسب المئوية لمقاومة المضادات الحيوية في بكتريا <i>S.aureus</i> (MRSA) ذات الانتاج القوي للغشاء الحيوي.	16
77	النسب المئوية لمقاومة المضادات الحيوية في بكتريا <i>S.aureus</i> (MRSA) ذات الانتاج المتوسط للغشاء الحيوي.	17
78	النسب المئوية لمقاومة المضادات الحيوية في بكتريا <i>S.aureus</i> (MRSA) ذات الانتاج الضعيف للغشاء الحيوي.	18
82	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا ( <i>S.aureus</i> (S1-S8) المعزولة من الحروق باستخدام البادئ النوعي لجين <i>LukE-D</i> (269bp) ، بتركيز هلام الاكاروز (1.5)% وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.	19
82	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا ( <i>S.aureus</i> (S9-S14) المعزولة من الجروح و (S15-S16) من الدم باستخدام البادئ النوعي لجين ( <i>LukED</i> 269bp) ، بتركيز هلام الاكاروز (1.5)% وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.	20
83	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا (S17-S20) <i>S.aureus</i> معزولة من الجلد و (S24-S21) معزولة من الادرار	21

	باستعمال البادئ النوعي لجين (LukED 269bp) ، بتركيز هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.	
85	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا <i>S.aureus</i> (S1-S8) ، المعزولة من الحروق باستخدام البادئ النوعي لجين (hIb 300bp) ، بتركيز هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.	22
86	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا <i>S.aureus</i> (S9-S14) المعزولة من الجروح و(S15-S16) من الدم باستخدام البادئ النوعي لجين (hIb300bp) ، بتركيز هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.	23
86	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا (S17-S20) <i>S.aureus</i> المعزولة من الجلد و (S24-S21) معزولة من الادرار باستخدام البادئ النوعي لجين (hIb 300bp) ، بتركيز هلام الاكاروز (1.5%) وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة	24
87	الفعالية الأنزيمية للهيموليسين لبعض عزلات <i>S.aureus</i> المقاومة للمثيسلين .	25

### جدول المخططات

الصفحة	اسم المخطط	ت
31	تصميم الدراسة (Study Disgn)	1
36	عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية	2

### قائمة المختصات

الرمز	المعنى الكامل
agr	accessory gene regulator
Api	Analytical Profile Index

attB	attachment site of bacteria
blaz	beta-lactamase z
CA-MRSA	Community-associated methicillin - resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CONS	Coagulase negative staphylococcus
COPS	Coagulase positive staphylococcus
EPS	Extra polysaccharides
ermBC	Erythromycin BC
ETA	enterotoxins A
ETB	Enterotoxins-B
ETC	Enterotoxins-C
ETD	Enterotoxins-D
Fab region	fragment antigen-binding region
FC region	fragment crystallizable region
HA-MRSA	Hospital-acquired Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>hla</i>	Hemolysin a
<i>hlb</i>	Hemolysine b
LA-MRSA	Livestock associated Meticillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>LukAB</i>	Leukocidin AB
<i>LukED</i>	leukocidin ED
LukF-PV	Leukocidin F-Panton-Valentine
<i>LukHG</i>	Leukocidin HG



Luks-PV	Leukocidin S-Panton-Valentine
<i>mecA</i>	Methicillin A
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MRVP	Methyl red Voges Proskauer
ORFX	Open reading frame X
PBP	Protein Binding Protein
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	polymerase Chain Reaction
PVL	Panton-Valentine leukocidin
RBCs	Red blood cells
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
<i>SarA</i>	Staphylococcal accessory regulator A
SCCmec	<i>Staphylococcal</i> Cassette Chromosome mec
SspA	Staphylococcus Serine Protease A
TCA	Trichloroacetic acid
<i>tetk</i>	Tetracycline k
<i>tetM</i>	Tetracycline M
TN	Transposon
Tsst-1	Toxic shock syndrome toxin-1
VISA	Vancomycin-intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	Vancomycin-resistant Enterococcus
VRSA	Vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
WTAs	wall teichoic acids

الفصل الأول

المقدمة

*Introduction*

## المقدمة

تشير احدى الاحصائيات العالمية الى ان البكتريا متعددة المقاومة للأدوية (Multidrug resistance bacteria) تتسبب بما يقارب من 700000 حالة وفاة سنويا ومن المتوقع ان يرتفع هذا العدد ليصل الى عشرة ملايين بحلول عام 2050 (Reale et al ., 2017) .

وبرزت بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثيسلين (MRSA) كواحدة من ابرز أنواع البكتريا متعددة المقاومة للأدوية وأصبحت تشكل تهديدا خطيرا للعالم عبر زيادة معدلات الوفيات الناجمة عن الأصابة بها وارتفاع تكاليف العلاج والفحوصات الإضافية وزيادة مكوث المرضى في المستشفيات فضلا عن إنها المسبب الرئيس للعديد من الأصابات التي تشتمل على أصابات الجلد والتهاب شغاف القلب (Endocarditis) والانتان الدموي (Sepsis) وأصابات المسالك البولية (Urinary tract infections) وهشاشة العظام (Osteomyelitis) والتهاب الثدي (Mastitis) والتهاب السحايا (Meningitis) فضلا عن التسمم الغذائي (Food poisoning) (Scudiero et al ., 2020).

تنوعت اليات مقاومة بكتريا MRSA للمضادات الحيوية، ولعل أبرزها مقاومتها للمثيسلين والتي يمكن أن تعزى لاكتسابها لجين *mecA* المسؤول عن تكوين بروتين Penicillin binding protein PBP2a الذي يتميز بالفه القليلة للارتباط بمضادات  $\beta$ -lactam ويشفر هذا البروتين بواسطة قطعة DNA حجمها بين (40-60) كيلو زوج قاعدي تدعى *mecA* . أما مقاومة هذه البكتريا للبنسلين فتعزى إلى وجود جين *blaZ* الذي يشفر لانزيم  $\beta$ -latamase الذي يقوم بتحليل حلقة  $\beta$ -lactam محولا هذه الحلقة إلى حالة غير فعالة (inactive) ، في حين أن مقاومة هذه البكتريا للفاנקومايسين ظهرت أولا في بكتريا Enterococci ، وبعد ذلك في عام 2002 ظهرت أول عزلة سريرية من بكتريا *S.aureus* المقاومة لهذا المضاد . إن الجينات المحمولة على البلازميدات والعناصر المتنقلة (Transposons) هي المسؤولة عن التبادل الوراثي بين نوعي البكتريا المشار اليهما في ما سبق والتي أدت الى جعل بكتريا *S.aureus* مقاومة للفاנקومايسين . لقد تزايدت أنواع بكتريا MRSA حتى أصبحت الآن تصنف الى

ثلاث مجموعات اعتمادا على خصائصها الوبائية والوراثية الأولى : بكتريا MRSA المكتسبة في المستشفيات (Hospital acquired ,HA- MRSA)، والثانية :بكتريا MRSA المرتبطة بالمجتمع (Community-associated,CA-MRSA) ،والثالثة بكتريا MRSA المرتبطة بالدواجن (Livestock- associated ,LA- MRSA) وتختلف المجاميع الثلاثة في حساسيتها للمضادات الحيوية وفي موقع وحجم جين *mecA* ،فضلا عن وجود الجين المشفر لسم Leukocidin (Huber et al .,2010;Nikolic and Mudgil.,2023).

و تعزى أمراضية بكتريا *S.aureus* إلى امتلاكها مجموعة واسعة من عوامل الضراوة المتمثلة بالمكونات السطحية للخلية أولاً (مثل المحفظة و الببتيدوكلايكان و حامض التيكويك و بروتين A ) وإفرازها الإنزيمات ثانياً ( مثل إنزيمات Lipase و Hyaluronidase و Staphylokinase و DNase و Collagenase و Protease و Catalase و  $\beta$ -lactamase ) و إنتاجها السموم ثالثاً ( مثل Leukocidins و Enterotoxins و الهيمولايسين بانواعه الفا و بيتا و كاما و دلتا ) ( Vasconcelos & Cunha ., 2010 ) و انتاجها للأغشية الحيوية (Biofilm) رابعا، فضلا عن اكتسابها للعديد من الجينات المشفرة لمقاومة المضادات الحيوية خامسا (AL- Saleh et al.,2022) (Larsen et al .,2022). ولا بد من الإشارة إلى الدور المهم الذي تلعبه الأغشية الحيوية بوصفها تمثل تجمعات من الخلايا البكتيرية الملتصقة مع بعضها على السطح الصلب وتحيط نفسها بمادة بينية خارج خلوية (Extracellular matrix) تشتمل على سكريات متعددة (Polysaciharides) وبروتينات ، إذ يساعد الغشاء الحيوي في عمليات اصابة المضيف ويزيد من مقاومة البكتريا للأدوية ويوفر الحماية للخلايا من الاليات الدفاعية للمضيف مثل خلايا البلعمة (Macrophages) (Silva et al ., 2017).

وبالنظر للانتشار الواسع لبكتريا MRSA فقد هدفت الدراسة الى تقييم خطورة هذه البكتريا في محافظة كربلاء المقدسة عبر التحري عن مقاومتها للمضادات الحيوية وتنفيذ المحاور الاتية :

1- عزل بكتريا *S. aureus* من عينات سريرية مختلفة.

2- تشخيص البكتريا المعزولة والمشار اليها انفا بالفحوصات الكيموحيوية ، و الطرائق الجزيئية وتحديد نسبة الحساسية منها للمثبيلين عن تلك المقاومة منها (MRSA).

3- التحري عن تواجد بعض جينات المقاومة والضرارة في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثسلين MRSA.

4- تقدير فعالية بعض الانزيمات والسموم منها انزيم البروتيز وسم الهيمولايسين.

5- التحري عن قابلية بكتريا MRSA على تكوين الاغشية الحيوية بالطرائق الكمية والنوعية وتحديد علاقة قوة الاغشية المتكونة مع مقاومة هذه البكتريا للمضادات الحيوية .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

*Literature Review*

## الفصل الثاني

### 1-2 جنس *Staphylococcus*

#### 1-1-2 لمحة تاريخية :

اكتشفت المكورات العنقودية *Staphylococcus* لأول مرة في الاصابات المتقيحة في الانسان من قبل Von Reckling Hausen في عام 1871 ، وتم تعزيز هذا الاكتشاف من قبل روبرت كوخ في عام 1878 عندما لاحظ الشكل الكروي الصغير لهذه البكتريا في الصديد والخراج ودم الاشخاص المصابين وعرفت بـ *micrococcus* (parvathareddy., 2020).

وفي عام 1880 تم زراعة هذه البكتريا في مزرعة سائلة من قبل لويس باستور ، ويعد السير Alexander Ogston أول من اطلق اسم المكورات العنقودية *Staphylococcus* على هذه البكتريا لكونها تترتب في مجاميع تشبه عنقود العنب (Sastry.,2000; Reba and panikers 2017).

وحصل الجراح الألماني Anton Fridrich في عام 1884 على مزرعة نقية من هذه البكتريا وسماها *S.aureus* وهي ذات لون ذهبي أصفر بينما سمي النوع الثاني من هذه البكتريا *S.albus* لإنتاجها صبغة بيضاء فيما سمي النوع الثالث منها *S.citrus* بعد ان وصفت من قبل Passet في عام 1885 (Vazhavandalg., 2019).

في عام 1903 وصف Loeb فعالية انزيم التجلط Coagulase في بكتريا المكورات العنقودية وتم فيما بعد استخدام هذا الاختبار لتشخيص بكتريا *S.aureus* من قبل Vondaranyi في عام 1925 ( Vazhavandalg., 2019 ; parvathareddy ., 2020 ).

تم الاعتماد على اختبار الأكسدة – التخمر (Oxidation-Fermentation) للتمييز بين المكورات العنقودية والمكورات الدقيقة Micrococci. وفي عام 1963 قسم Baird-parker المكورات العنقودية الى ست مجاميع وبكتريا Micrococcus إلى ثمان مجاميع اعتمادا على الخصائص المظهرية والفسيلولوجية فضلا عن الاختبارات الكيموحيوية (Patil .,2017)، وفي عام

2001 تم اكمال تسلسل جينوم بكتريا *S.aureus* باستخدام تقنية (Shot gun random). وفي عام 2010 تم السماح باستخدام المضادين Ceftaroline و Ceftabiprole علاجا للبكتريا المقاومة للمثيسيلين MRSA. (kavitha.,2020).

## 2-1-2 خصائص جنس *Staphylococcus* :

ينتمي جنس *Staphylococcus* الى عائلة *Staphylococcaceae* وتضم 32 نوعا و8 تحت النوع (kavitha., 2020). تعد المكورات العنقودية ممرضة للبشر إلى جانب أنواع عدة من الحيوانات منها الاسماك و الماشية فضلا عن النبات تحت ظروف معينة بحسب الدراسات التي أجريت على نبات *Arabidopsis thaliana*، ويمكن عزل المكورات العنقودية من مصادر متنوعة متمثلة في العينات السريرية من الانسان و جلد الحيوان ومن الغدد والاعشية المخاطية، إلى جانب ذلك يمكن عزلها من الهواء و الماء و التربة (Ortega., et al 2020). يضم هذا الجنس العديد من الانواع واهم انواعها المرضية تلك المبينة في الجدول 1.

أعضاء هذه العائلة موجبة لصبغة كرام غير مكونة للصبورات وذات شكل كروي يتراوح حجمها بين (0.5-2.5) مايكرومتر وغير متحركة وتوجد بصورة مفردة أو أزواج أو رباعيات، وهي هوائية أو اختيارية لاهوائية وموجبة للكاتليز، وهي من نوع *chemoorganotrophes* وقادرة على التنفس الهوائي و الايض التخمري (Madhaiyan et al .,2020).

اعتمادا على الفحص الذي قام به Von daranyi قسمت المكورات العنقودية إلى مجموعتين واسعتي النطاق وهي المكورات العنقودية الموجبة لانزيم التجلط ويرمز لها (COPS) والآخرى سالبة لهذا الفحص ويرمز لها (CONS) (Götz et al., 2006) ويوضح الجدول 2 الفروقات بين النوعين.

## 3-1-2 المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*

تتصف هذه البكتريا بأنها موجبة لصبغة كرام كروية الشكل وغالبا على شكل مجموعات تشبه عناقيد العنب عند ملاحظتها تحت المجهر ويتراوح قطرها بين (0,5-1) مايكرومتر . أما شكل مستعمراتها فهي كبيرة ذات لون اصفر او ابيض ويعود اللون الاصفر الى الكاروتينات المنتجة بواسطة هذه البكتريا . تتمكن بكتريا *S.aureus* من تحمل الملح عبر قابليتها على النمو في وسط



الجدول1: اهم الانواع المرضية العائدة للمكورات العنقودية والأمراض المرتبطة بها ,Mohan., (2019).

الامراض المتسببة بها	<i>Staphylococcus species</i>
<p>الدمامل ،الالتهاب الرئوي القصي ، عدوى القدم السكري ، القوباء ، التهاب الأمعاء والقولون الناخر ،الالتهاب الرئوي الناخر ، التهاب العظم والنقي ، الالتهابات بعد الجراحة، والتهاب العضل ، وتسمم الدم ، والتهاب المفاصل الانتاني ،التسمم الغذائي بالمكورات العنقودية ، تسمم الجلد العنقودي ، متلازمة الصدمة السامة ، التهابات الموقع الجراحي ،الالتهاب الرئوي المصاحب لجهاز التنفس الصناعي</p>	<i>S. aureus</i>
<p>عدوى المستشفيات الانتهازية ، السبب الرئيس لالتهابات مجرى الدم في المستشفيات ، والتهابات العين ، والأذن ، الأنف ،والحنجرة والقلب والأوعية الدموية والجهاز البولي ،أجهزة تقويم العظام وحتى العدسات اللاصقة</p>	<i>S. epidermidis</i>
<p>التهاب البربخ والتهاب الشغاف المعدي</p>	<i>S. hominis</i>
<p>التهاب المسالك البولية عند النساء</p>	<i>S. saprophyticus</i>

الجدول 2: أهم الفروقات بين المكورات العنقودية الموجبة لفحص انزيم التجلط ونظيرتها السالبة لهذا الفحص (Chaurasia and Jain .,2019).

المكورات الموجبة لفحص انزيم التجلط	المكورات السالبة لفحص انزيم التجلط
أكثر ضراوة	أقل ضراوة
تكون مستعمراتها ذات لون اصفر ذهبي على الوسط الصلب	تكون مستعمرات بيضاء
عادة ممرضة	عادة غير ممرضة

mannitol salt agar الحاوي على % ( 7.5 ) من كلوريد الصوديوم وتستطيع أن تحلل الدم لإفرازها أنزيم الهيمولايسن (hemolysin) الفا وبيتا وكاما ودلتا، كما أنها تنتج انزيمات تجلط الدم وتعد موجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الاوكسيديز (Gnanamani et al ., 2017).

يمكن أن تنمو بكتريا *S.aureus* بدون الاوكسجين وهي ليست متحركة وتتكاثر عن طريق الانشطار الثنائي وتنتشر عن طريق ملامسة القيح من الجروح او ملامسة جلد المصاب او الاشياء المستخدمة للشخص المصاب ويمكن ان تعيش لعدة سنوات دون ان يتم اكتشافها (Ramiah ., 2017).

### 1-3-1-2 تصنيف بكتريا *S.aureus*

يمكن تصنيف المكورات العنقودية اعتمادا على تسلسل جين ribosomal RNA, ويبلغ محتوى DNA من قواعد G+C حوالي 33% وهي قريبة الصلة من اجناس (*Streptococcus* و *Enterococcus* و *Listeria* و *Lactobacillus*). (Afaq .,2017). بحسب ما هو موضح في

الجدول 3 .

الجدول 3: المفتاح التصنيفي للمكورات العنقودية الذهبية (patil.,2017).

Eubacteria\Gram Positive Bacteria	المملكة (Kingdom)
Firmicutes	الشعبة (Phylum)
Bacilli	الصف (Class)
Bacillales	الرتبة (Order)
Staphylococcaceae	العائلة (Family)
Staphylococcus	الجنس (Genus)
<i>Stapylococcus aureus</i>	النوع (Species)

## 2-3-1-2 الخصائص الكيموحيوية والزرعية لبكتريا *S.aureus* :-

تقوم هذه البكتريا بتخمير السكريات مثل (الكلوكوز و المانتول وغيرها ) وتتصف بأنها موجبة لفحص الكاتليز فضلا عن تحليلها للـ DNA والدهون عبر قابليتها على انتاج انزيمي الـ Dnase و lipase على التوالي .

اما خصائصها الاختزالية فهي تختزل الـ Tellurite وينتج عن ذلك مستعمرات سوداء على وسط tellurite agar والى جانب ذلك تختزل النترات الى نترتريت ويعود ذلك الى عمل انزيم nitrate reductase enzyme ،اما الاوكسيديز فيكون سالبا للمكورات العنقودية مما يميزها عن بكتريا Microccoci وذات النتيجة بالنسبة لفحص الاندول وعكسها بالنسبة لفحص vogesproskauer (kavitha.,2020) .

يختلف شكل المستعمرات للمكورات العنقودية باختلاف الأوساط المزروعة عليها على وفق ما هو موضح بالجدول 4.

الجدول 4 : خصائص مستعمرة بكتريا *S.aureus* على اوساط زرعية مختلفة (Aziz et al.,2013).

اسم الوسط الزراعي	شكل المستعمرات وصفاتها
Nutrient agar	مستعمرات دائرية صغيرة ناعمة ومحدبة.
Mannitol salt base agar	مستعمرة مخمره للمانيتول ذات اصفر ذهبي.
Staphylococcus Agar No110	مستعمرات صفراء ذهبية
Blood agar media	مستعمرات محدبة وذات شكل مستدير أملس محاطة بهالة كونها محللة للدم

### 3-3-1-2 امراضه بكتريا *S.aureus* :

الأمراضية هي قابلية الكائنات المجهريّة على احدث او بدء المرض بما يتضمن دخول الكائن المجهري والاستعمار (Colonization) ، واخيرا النمو داخل العائل. تظهر المكورات العنقودية في كل مكان على الجلد مما يعرض العديد من المجاميع السكانية لخطر الاصابة بها ،لهذا تشكل هذه البكتريا تهديدا خطيرا للصحة العامة ولاسيما عند مرضى السكري و متعاطي المخدرات و مرضى الغسل الكلوي وعمليات القسطرة والحقن وجروح العمليات ومرضى نقص المناعة وحديثي الولادة وكبار السن (Al.Ugailli.,2013).

وبالنظر للصفة الانتهازية لهذه البكتريا فهي تتسبب بأحداث أمراض للحيوانات والإنسان إذ تسبب في الواقع العديد من الاضطرابات منها الاصابات (infection) والخراجات في الجلد ( Abscesses of the skin ) والتهاب الشغاف (Endocarditis) و التهاب المسالك البولية (urinary tract infection) و التهاب نقي العظم (Osteomyclitis) والتهاب السحايا (Meningitis) فضلا عن التسمم الغذائي (food poisoning) (Scudiero et al.,2020).

تتمركز أهمية الجلد في الطبقة القرنية التي تمثل الطبقة الخارجية منه وتتمحور أهميتها بالدفاع عن الجسم عبر التصدي للأحياء المجهريّة بما في ذلك المكورات العنقودية الذهبية كما أنها تحافظ على توازن الرقم الهيدروجيني ومحتويات الدهون والماء والبيبتيدات المضادة للبكتريا (Choi et al (2014). على الرغم من أن الجلد يمثل خط الدفاع الاول ضد غزو الاحياء المجهريّة بفضل تركيبه

المميز بيد أنه يمكن لبعض الممرضات ومنها بكتريا *S.aureus* ان تكسر هذه الدفاعات والتسبب بالعدوى (Kobayashi et al.,2015).

تضطلع بكتريا *S.aureus* في العديد من التهابات الجلد المتنوعة في المجتمع بسبب عوامل ضراوتها المختلفة ومنها البروتينات المثبتة في جدار الخلية البكتيرية والسموم إذ تؤدي الأخيرة إلى حدوث مسامات في الغشاء البلازمي للخلية المضيفة و بالتالي تحلل الخلية (Haritharm.,2020).

تتسبب بكتريا *S.aureus* في حدوث القوباء في مرحلة الطفولة كما أنها تعد السبب الرئيس في التهابات موقع الجراحة التي تشكل مشكلة سريرية كبيرة غالبا ما تنتهي بالوفاة (owens and Stoessel.,2008).

اما في ما يخص متلازمة الجلد المسموط (scalded skin syndrome) والمعروفة ايضا بمرض ريتر فتظهر بسبب السموم التي تنتجها أنواع من المكورات العنقودية وتظهر بعد 48 ساعة من الولادة وهي نادرة عند الاطفال ممن تجاوزوا الست سنوات من العمر. ولكنها قد تظهر عند البالغين الذين يعانون من نقص المناعة أو المصابين بمرض كلوي حاد (Ross and shoff.,2022). ومن الأمراض الأخرى التي تسببها المكورات العنقودية الذهبية هو تجرثم الدم الذي يعد أكثر أنواع الالتهابات الخطيرة في العالم (Thwaites., 2010), وبمعدل وفيات يصل الى 20% , إذ تنتشر العدوى بالدم وتصل إلى الاعضاء وتؤدي إلى حدوث التهاب الشغاف والتهاب نقي العظم فضلا عن الخراجات (Buis et al.,2022).

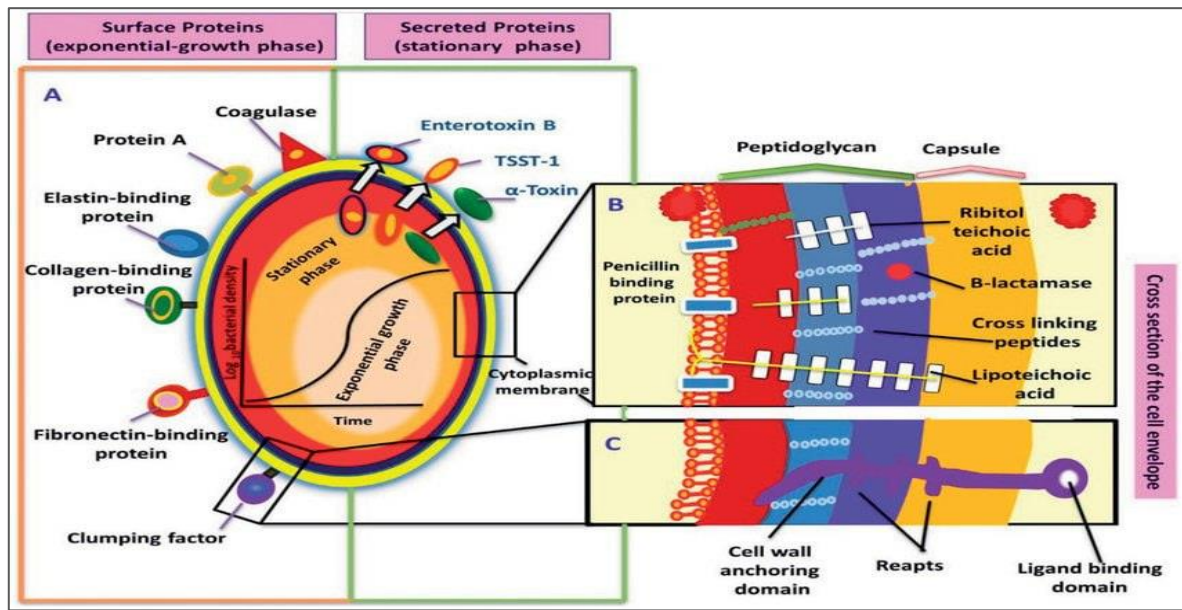
ومن جهة أخرى تؤثر هذه البكتريا على الرئة مسببة الالتهاب الرئوي (Pneumonia), وهناك ما يقارب 70000 حالة من الالتهاب الرئوي تحدث بسبب المكورات العنقودية الذهبية في الولايات المتحدة كل عام وذلك بسبب المستضدات الفوقية (Superantigen) التي تنتج بكميات عالية بفعل بكتريا *S.aureus* وهذه المستضدات تساهم في حصول الالتهاب الرئوي الحاد ومن هذه السموم Alpha toxin الذي يسبب احتقان رئوي كبير (Spaulding et al.,2013).

تشتمل عدوى العظم والمفاصل المتسببة بفعل بكتريا *S.aureus* على نوعين هما عدوى المفاصل الانتاني والتهاب نقي العظم، إذ تبين إن (37-67) % من التهاب المفاصل الانتاني سببه *S.aureus* (Hariharan.,2020)، و تسبب ايضا المكورات العنقودية الذهبية التهابات المسالك البولية التي

تتراوح بين التهاب المثانة الى التهاب الكلية الحاد والتحصي الكلوي ويقدر حوالي (25-50)% من التهابات المسالك البولية على انها عدوى مكتسبة من المستشفى .(Gajdacs and Albericio., 2019)

#### 4-3-1-2 عوامل ضراوة بكتريا *S.aureus* :-

تمتلك بكتريا *S.aureus* العديد من عوامل الضراوة التي تساهم في انتشارها وتكاثرها داخل المضيف ، وإن خطورة الامراض التي تحدث بسبب تلك الكائنات تنتج من تفاعل معقد بين اليات الدفاع في المضيف وفعالية عوامل الضراوة للبكتريا . واعتمادا على وظيفتها قسمت عوامل الضراوة الى ثلاث مجاميع وهي مجموعة الالتصاق و غزو الدفاعات واختراق الأنسجة (Iatha.,2017) مثلما هو موضح في الشكل 1.



الشكل 1: عوامل الضراوة في بكتريا *S.aureus* (Vatansever et al .,2013).

#### 1-4-3-1-2 عوامل الضراوة المرتبطة بسطح بكتريا *S.aureus* :-

يحتوي الجدار الخلوي للبكتريا على بروتينات (CWA) Complex cell wall anchored التي تظهر داخل طبقة الببتيدوكلايكان (peptidoglycan) بينما توجد بعض عوامل الضراوة داخل المحفظة (CPS), (Capsular polysaccharides) فيما يتواجد البعض الاخر في well

(teichoic acid WTAS). وتعد البروتينات الموجودة في CPS ، CWA عوامل ضراوة مهمة وتساهم في ضراوة و إمرضية هذه البكتريا خلال مرحلة الاصابة ، إذ تمثل CPS جزيئات خاصة تمنع البلعمة بواسطة الخلايا للمفاوية Neutrophils وبالوقت نفسه تساعد البكتريا في الثبات على الأغشية فضلا عن تسهيل الاستعمار البكتيري (Zephyr., 2019).

يحتوي جدار بكتريا *S.aureus* على نوعين من احماض Teichoic يكون الأول منها مرتبطا بالجدار الخلوي بينما يكون الاخر مرتبطا بالغشاء البلازمي وكلا النوعين ضروريان لإمرضية ومقاومة البكتريا للمضادات الحيوية فضلا عن المحافظة على شكل الخلية البكتيرية ( Reichmann & Grundling, 2011; Brown et al ., 2013). يتواجد بروتين Protein A على سطح الخلية وكذلك يوجد في الوسط خارج الخلية ويعد عامل ضراوة مهم لبكتريا *S.aureus* . يكون هذا البروتين ذو شكل حلزوني ثلاثي الابعاد ويرتبط مع منطقة FC (Fragment crystallizable region) للغلوبين المناعي IGg ، وأيضا مع ( Fragment antigen – binding Fab ) من الغلوبين المناعي IgM البشري وهذا الارتباط مع منطقة Fab يستنفذ الخلايا البائية مما يثبط تطور الاستجابة المناعية التكيفية وكذلك يمنع قتل *S.aureus* بواسطة عملية البلعمة ويعزز الالتهابات ومنها التهاب نقي العظم ( Claro et al., 2011; O'Halloran ., et al 2015).

تحتوي بكتريا *S.aureus* ايضا على سطحها بوليمرات بروتينية ذات وحدات فرعية متعددة تعرف بالأهداب وتلعب هذه الأهداب دورا مهما في استعمار البكتريا لأنسجة المضيف (Mandlik et al ., 2008). تستطيع العديد من سلالات بكتريا *S.aureus* انتاج المحفظة الدقيقة , التي تتكون من السكريات المتعددة وهذه المحفظة تعمل على تثبيط عملية البلعمة بفعل خلايا الدم البيض متعددة الانوية , تقوم هذه البكتريا بتنشيط الجينات المسؤولة عن انتاج المحفظة الدقيقة عندما تكون داخل المضيف .

## 2-4-3-1-2 البروتينات الخارجية (Exoproteins)

تنتج المكورات العنقودية عددا من البروتينات الخارجية التي تلعب دورا مهما في أمراض البكتريا . إذ يتم انتاج هذه البروتينات ما بعد الطور اللوغاريتمي (postexponential) ومعظم هذه البروتينات تنتج بصوره سريعة ومن ثم تفرز إلى الخارج (Cheung et al ., 1992) ومن الأمثلة

على تلك البروتينات هو السم الحال للدم (Hemolysin) والانزيم الحال للحامض النووي (Nuclease) والبروتياز (Protease) والانزيم الحال للدهون (Lipase) والمحلل للكولاجين (Collagenase) والوظيفة الاساس لتلك البروتينات هي تحويل أنسجة المضيف الى مواد غذائية مطلوبة لنمو البكتريا . هنالك بعض السلالات تنتج واحد أو أكثر من البروتينات الخارجية الاضافية مثل بروتين متلازمة الصدمة السمية (TSST-1) Staphylococcal enterotoxins toxic-1) والانزيمات المقشرة (Efoliative) والسموم الحالة لكريات الدم البيضاء (Leukocidin) (Dinges ) (et al ., 2000;Matsumoto et al .,2007).

## 2-1-3-4-3 السموم الخارج خلوية (Exotoxins)

أ-السم القاتل لخلايا الدم البيض ( panton valentine leukocidin pvl) هو سم خارجي يحطم خلايا الدم البيضاء ويفرز من قبل (2-5)% من بكتريا *S.aureus* (Castellazzi et al.,2021) ويتكون هذا السم من مكونين يفرزان بصورة مفردة تعرف -LukF و PV و LukS-PV وقد اكتشف لأول مرة عام 1932 وهو من أهم عوامل الضراوة في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية إذ تنتج هذه البكتريا بكميات مختلفة ومعظم العزلات المسببة لعدوى الجلد والأنسجة الرخوة والالتهاب الرئوي الناخر تكون موجبة للانتاج pvl وهذا السم له ارتباط وثيق مع تكوين الخراجات وهو في العزلات المقاومة للمثيسلين و الحساسة لها , وترجع خطورته ودوره في احداث الأمراض لقابليته على تكوين ثقب في أغشية خلايا الدم البيض وتغيير نفاذيتها (Bocchini et al.,2006; Najar-Peerayeh et al.,2021; Qu et al.,2022).

تستطيع بكتريا *S.aureus* المعزولة من الانسان أن تنتج خمسة انواع من Leukocidins وهي leukocidin AB و leukocidin ED و  $\gamma$ -haemolysin CB و  $\gamma$ - haemolysin AB و (Panton–Valentine leukocidin) والألية الجزيئية لتكوين الثقب غير مفهومة جيدا وهذا السم يحمي البكتريا من القتل بفعل الخلايا البلعمية للمضيف ، ويكون هذا السم قاتلا للخلايا بتراكيز منخفضة ويستطيع السم leukocidin ED أن يحلل كريات الدم الحمراء للإنسان والارانب ويحرر الهيموكلوبين الغني بالحديد المطلوب لأيض بكتريا *S.aureus* فضلا عن ذلك يتمكن هذا السم من استهداف بعض المستقبلات على خلايا neutrophils, monocytes, macrophages, dendritic cells,



(Spaan *et al.*; Tam and Torres *et al.*, 2019) NK cells, T-cells and red blood cells, *al.*, 2017

### ب- سم متلازمة الصدمة السمية (Toxic shock syndrome Skin, TSST-1)

يعد الديدان TSST-1 من المستضدات الفوقية وحوالي 75% من أمراض الصدمة السمية تحدث بفعل هذا السم . يؤثر هذا السم على الجسم ويحفز جهاز المناعة للمضيف كما انه يتفاعل مع الخلايا التائية Tcells وتقوم الأخيرة بإفراز الانترلوكينات التي تسبب ارتفاع الحرارة (Brian *et al.*, 2004).

### ت- السموم المعوية العنقودية *Staphylococcal enterotoxins*

هي عبارة عن بروتينات كروية منخفضة الأوزان الجزيئية تتراوح بين ( 22-29 ) كيلو دالتون وهي ثابتة بالحرارة ومقاومة للانزيمات الهاضمة مثل الببسين ويتم التشفير لها عن طريق جينات محمولة على بلازميدات أو عاثيات وهذه السموم لها القابلية على احداث التهابات في المعدة (Hennekinne *et al.*, 2010).

### ث- الانزيمات الحالة للدم (Hemolysin)

هي سموم خارجية تفرزها بكتريا *S.aureus* وتلعب دورا مهما في امراضية هذه البكتريا بسبب سميتها للخلايا (Bairy *et al.*, 2016) ، وقد وصفت فعالية هذه السموم من قبل (Christie much petersen و atkins) عام 1944 وتتميز بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثيسلين بقابليتها على انتاج أربعة أنواع من هذه السموم وهي (الفاو بيتا و كما ودلتا) (wang *et al.*, 2020) و إن الية عمل الهيمولايسين في احداث الامراضية تكون إما بصورة مباشرة عن طريق تحلل كريات الدم الحمراء وهذا بدوره يؤدي إلى تحرر الهيموكلوبين الضروري لنمو وتكاثر البكتريا أو عن طريق التداخل مع العمليات الدفاعية داخل الجسم إذ يقوم بمهاجمة الخلايا المناعية للمضيف دون أن يحفز تحللها ولكن مقابل ذلك يمنعها من اداء وظيفتها (Goni&Ostolaza., 1998).

يعد سم الفا من أهم السموم المكونة للثقبوب في الأغشية البلازمية للخلايا وبالتالي يلعب دورا في امراضية بكتريا *S.aureus* ويتم التشفير له عن طريق جين *hla* (Divyakolu *et al.*, 2019).

ويبلغ وزن هذا السم حوالي 33 كيلو دالتون ويكون ذائب في الماء ولكن لا يعد ساما من تلقاء نفسه إلا بعد الترابط مع الغشاء الخلوي لخلايا المضيف (Oliveira et al., 2018).

يعد سم بيتا من السموم الحالة للدم بفعل تحليل دهون الغشاء البلازمي المعروفة بـ Sphingomyelin الى السيراميد (Ceramide) وفوسفات الكولين (Choline phosphate) وهذا كفيل بزعة سيولة واستقرار الهيكل ثنائي الطبقة المتمثل بالغشاء البلازمي وأخيرا موت الخلية (Vandenesch et al., 2012 ; Guan et al 2021) ولا يقتصر تأثير هذا السم على كريات الدم الحمراء وإنما يتعدى ذلك على خلايا الدم البيضاء فضلا عن الخلايا الكيراتينية (Miruka et al., 2022).

أما سم دلتا فيتم انتاجه من قبل 97% من عزلات بكتريا *S.aureus* وله تأثيرات سامة على الخلايا وينتج من قبل السلالات المسببة للتهاب الضرع بصورة أكبر ، يعمل هذا السم بصورة تآزرية مع سم بيتا (Vehmas et al., 2001).

### ج-الانزيم المقشر للخلايا (Exofoliative)

هو سم تفرزه بكتريا *S.aureus* ويعد من عوامل ضراوة البكتريا ويمتلك هذا السم انماطا مصلية عدة هي (ETA,ETB,ETC,ETD) ويقوم السم بتحليل بروتين Desmosome في الجلد ، ويبلغ وزنه الجزيئي 27 كيلو دالتون ويكون ETA من الأنماط المصلية الثابتة حراريا فيما يكون ETB,ETC حساسين للحرارة (Mariutti et al., 2017).

### 2-1-3-4 الانزيمات الخارج خلوية (Extracellular enzyme)

تستطيع بكتريا *S.aureus* أن تنتج مجموعة واسعة من الانزيمات الخارج خلوية مثل Nucleases و protease و lipase و Hyaluronidase وغيرها (Tang et al., 2008).

#### ا- انزيم الكاتليز (Catalase):

تنتج بكتريا *S. aureus* انزيم الكاتليز كأحد عوامل الضراوة ويعد هذا الانزيم مهما للتمييز بين المكورات العنقودية عن المكورات العقدية إذ يقوم بتحويل بيروكسيد الهيدروجين  $H_2O_2$  الى ماء

واوكسجين في الكائنات التي تنمو بوجود الاوكسجين وبالتالي فإن الكاتليز يمنع تراكم المستويات السامة من  $H_2O_2$  كمنتج ثانوي للتمثيل الغذائي داخل الخلية (Mustafa.,2014).

#### ب - الانزيم الحال للحامض النووي (Nucleases):

هو انزيم له القابلية على تحليل أو تحطيم الأحماض النووية للمضيف عبر تحليل الاواصر الفوسفاتية (Phosphodiester bond) للحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA) والحمض الرايبوزي (RNA) يضم هذا الأنزيم نوعين ( Nucleases A ) ذو وزن جزيئي 16.9 كيلو دالتون و Nucleases B والاخير هو سلف للنوع A (Tang et al ., 2008).

#### ت- انزيم الهيالورونيديز (Hyaluronidase):

هو صنف من الانزيمات لها القابلية على تكسير حمض الهيالورونيك ( Hyaluronic acid ) ويوجد ثلاثة أنواع من هذا الأنزيم اعتمادا على نواتج التفاعل الانزيمي والنوع المتواجد في الاحياء المجهرية هو (Hyaluronate -3-glycanhydrolases) الذي يحطم حمض الهيالورونيك ويزيد من نفاذية الأغشية والمساعدة في انتشار هذه الممرضات داخل الأنسجة العميقة ( Halim et al ., 2020).

#### ث- انزيم اللابيز (Lipase)

هو انزيم يعمل على تحطيم الدهون عن طريق تحليل أستر الكليسرول (Glycerol ester) لذا فإنه يستهدف بعض الأدوية المستخدمة في علاج الأمراض الجلدية فضلا عن تأثيره في الاستجابة المناعية (kitadokoro et al .,2020).

#### ج- انزيم الكواكيوليز (Coagulase)

تفرز المكورات العنقودية انزيم الكواكيوليز الذي يتمكن من الارتباط مع البروثروبين وينشطه عن طريق تحويل الفايبرينوجين الى الفايبرين وبالتالي يعزز تجلط البلازما والدم. ان ارتباط هذا الانزيم مع الفايبرينوجين يعزز حدوث الأمراض وتكون الخراجات فضلا عن مساعدته في ثبات البكتريا في أنسجة المضيف وبالتالي أحداث التعفن للدم (Mcadow et al ., 2012).

#### د- انزيم البرويتيز (Protease)

تنتج بكتريا *S.aureus* مجموعة متنوعة من أنزيمات البروتياز ومنها Serine protease, Staphopain (A,B) Surerolysin, وغيرها (Lehman et al., 2019). إذ تقوم هذه الانزيمات بهضم البروتينات وتشويه أنسجة المضيف وزيادة العدوى ومنها السموم الحالة للبشرة وسم متلازمة الجلد المسموط عند الأطفال إذ يقوم هذا الانزيم بشق البروتينات الهيكلية في الأنسجة وبالتالي فقدان طبقات الجلد السطحية كما يؤثر ايضا على جهاز المناعة وتحديد الكلوبينات المناعية مثل IgG فضلا عن تحطيم الكولاجين (Komori et al., 2001 ; Ali et al., 2017).

## 2-2 الغشاء الحيوي ( Biofilm )

تم وصف مصطلح الغشاء الحيوي من قبل Costerton و Colleagues عام 1978 (Schilcher and Horswill 2020), يمكن تعريف الغشاء الحيوي على أنه مجتمع مشتق من الميكروبات ويتميز بخلايا مرتبطة يتراوح سمكها من طبقة واحدة رقيقة الى مجتمع كبير مغلفة بمواد بوليميرية لربطه ويمكن أن يكون بشكل عمود أو عش الغراب (Archer et al., 2011). وهو أيضا من عوامل الضراوة المهمة لبكتريا *S.aureus* إذ يعمل على تسهيل الالتصاق والاستعمار وأيضا غزو دفاعات المضيف (Darwish and Asfour.,2013).

يتكون الغشاء الحيوي بصورة عامة من السكريات المتعددة و البروتينات والحامض النووي خارج الخلية (Lister and Horswill., 2014).

يعد تكوين الشكل الثلاثي الأبعاد للغشاء الحيوي بواسطة بكتريا *S.aureus* من العمليات المعقدة إذ تمر بأربعة مراحل وهي الالتصاق (Adhesion) والتجمع (Aggregation) والنضج (Maturation) والتحلل أو التدهور (Dispersion) بحسب ما هو موضح في الشكل 2 (Moormeier and Byles.,2017).

### 1-مرحلة الالتصاق والتجمع ( Adhesion stage ):

خلال هذه المرحلة تلتصق الخلايا البكتيرية على سطح حيوي أو غير حيوي باستخدام مجموعة من العوامل والاليات المختلفة بما في ذلك المواد اللاصقة وأحماض التيكويك والحامض النووي منقوص

الايوكسجين الخارج خلوي (eDNA) وغيرها. وبعد ذلك تتكاثر الخلية البكتيرية المرتبطة بالسطح وبالتالي تبني مستعمرات صغيرة على السطح (Schilcher and Horswill., 2020).

## 2-مرحلة التجمع ( Aggregation stage ) :

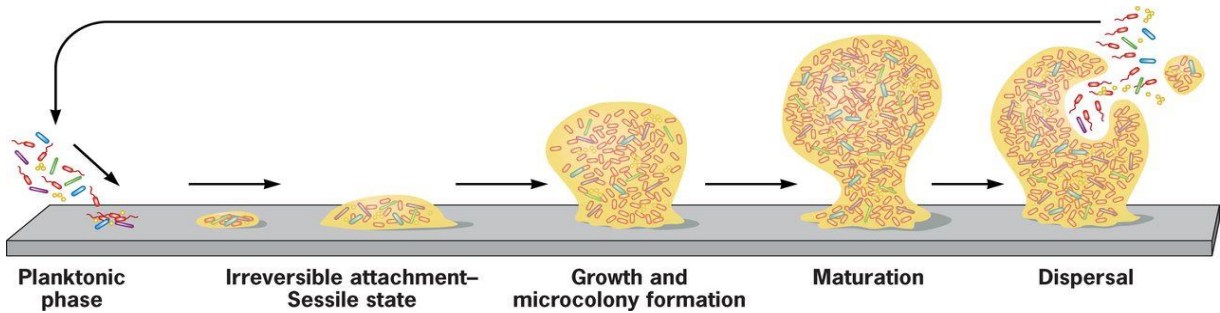
خلال مرحلة التجمع تنظم البكتيريا عملية تكوين الغشاء الحيوي عن طريق استشعار الأشارات البيئية التي تؤدي إلى تنظيم الشبكات والإشارات الخلوية وتستمر البكتيريا في التكاثر وتشكل الغشاء الحيوي (Peng et al .,2022).

## 3- مرحلة النضج (Maturation stage) :-

يكون الغشاء الحيوي في هذه المرحلة مكتمل التركيب ويكون على شكل ثلاثي الأبعاد يشبه المشروم (Rasamiravaka et al ., 2015). ويتكون عدد كبير من الأنابيب حول المستعمرات الصغيرة لتعزيز وصول المغذيات إلى الطبقات العميقة من الغشاء الحيوي (Peng et al ., 2022). وهذا الغشاء المتكون يمكن الخلايا البكتيرية من مقاومة المضادات الحيوية وكذلك الظروف البيئية الصعبة (Gupta et al ., 2016).

## 4-التدهور او الأنحلال ( Dispersion stage) :-

تتضمن هذه العملية مراحل عدة منها إنتاج الانزيمات الخارج خلوية والمواد الخافضة للتوتر السطحي لتحطيم متعدد السكر ( Exopolysaccharide,EPS ) إذ يؤدي تدهور EPS إلى انفصال الخلايا واطلاقها إلى البيئة (lister and Horswill et al ., 2014;Peng et al.,2022).



الشكل 2: مراحل تكوين الغشاء الحيوي (Magana et al ., 2018).

## 2-3 مقاومة بكتريا *S. aureus* للمضادات الحيوية :

إن قابلية الأحياء المجهرية على اكتساب المقاومة حيال العوامل المضادة للأحياء المجهرية تتجاوز حدود التصور. تعد بكتريا *S. aureus* الأكثر شيوعاً لاكتساب المقاومة في الأماكن السريرية فقد أصبحت هذه البكتريا مقاومة منذ دخول البنسلين إلى حيز الاستخدام في العلاج الطبي في عام 1940 وقبل هذا التاريخ فإن الإصابة المتسببة بفعل بكتريا *S. aureus* كانت تعالج باستخدام طرائق معالجة الجروح الأولية السائدة آنذاك وأما المرضى الذين تتطور عندهم الإصابة بهذه البكتريا bacteremia فإنهم غالباً ما يتعرضون للموت جراء تلك الإصابة ( Costello , 2010 ).

كما أصبحت البكتريا المذكورة مقاومة لمضادات Sulfonamides بمجرد دخول الأخيرة في العلاج وكان البنسلين في بداية الأمر فعالاً ضد الأحياء المجهرية إلا أن أعداد البكتريا المنتجة لإنزيم Penicillinase تزايدت في مطلع الخمسينيات لذلك فإن Penicillinase - stable methicillin تطورت في عام 1960. و في عام 1961 عزلت بكتريا MRSA في المملكة المتحدة ( Jevons ,1961 ).

وفي مطلع التسعينيات أصبحت الإصابات الأنفية ببكتريا MRSA تمثل مشكلة اجتماعية , لذا فخلال تلك المدّة تم تغيير هدف مضادات Cephems بجيلها الثاني والثالث ليتم استخدامها ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام بدلاً من الموجبة لهذه الصبغة، كما شاع استخدام المضادات ذات الطيف الواسع والفعالية التثبيطية الأضعف ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام.

لقد اكتسبت بكتريا MRSA المقاومة من خلال اكتسابها لجين ( Pencilin binding protein , *pbp2*) وهو جين يشفر لأنزيم PBP2 المطلوب في تصنيع الجدار الخلوي والذي يتميز بألفته القليلة للارتباط بمضادات  $\beta$ -lactam

ومن جانب آخر فقد ظهرت بكتريا Community associated methicillin resistance *S. aureus* ( CA- MRSA ) في الولايات المتحدة في عام 1997 كنوع مختلف عن Nosocomial MRSA ( Yamamoto et al., 2007 ).

لحسن الحظ كانت بكتريا MRSA في اليابان تستجيب ولمدّة طويلة لمضادات glycopeptides مثل Vancomycin إلا أنه في النصف الثاني من التسعينيات لوحظ ظهور بكتريا (VISA), (Vancomycin – intermediate *S. aureus*) في هذا القطر وساد

الاعتقاد أن زيادة سمك الجدار الخلوي ساهم بانخفاض الحساسية لهذا الدواء . و في الولايات المتحدة سجل ظهور بكتريا ( VRSA ) ( Vancomycin – resistance S. aureus ) و يبدو إن هذه البكتريا قد اكتسبت المقاومة من بكتريا Vancomycin – resistance enterococci, ( Appelbaum , ) ( VRE ) في حين لم ترد أية تقارير بشأن ظهور هذه البكتريا في اليابان ( Appelbaum , ) ( 2006 ) .

تنوعت بكتريا MRSA حتى أصبحت الآن تصنف إلى ثلاث مجموعات اعتماداً على خصائصها الوبائية و الوراثة , الأولى : بكتريا MRSA المكتسبة في المستشفيات ( Hospital acquired , HA-MRSA ) و الثانية : بكتريا MRSA المرتبطة بالمجتمع ( Community-associated , CA-MRSA ) و الثالثة : بكتريا MRSA المرتبطة بالدواجن ( Livestock-associated , LA-MRSA ) .

تختلف المجاميع المذكورة في ما سبق في حساسيتها للمضادات الحيوية و في موقع Chromosomal cassette ( SCC mec ) وحجمه فضلاً عن وجود جين - Panton ( Valentine leukocidin gene ( PVL ) ) ( Karpikova et al., 2009 ; Huber et al., ) ( 2010 ) .

### 1-3-2 آليات مقاومة بكتريا *S. aureus* لبعض المضادات الحيوية :

هنالك العديد من اليات مقاومة بكتريا *S.aureus* للمضادات الحيوية وسوف نعرض أهمها مثلما هو موضح في الشكل 3.

#### أ- مقاومة بكتريا *S. aureus* للمثيسلين :

يختلف المضاد Methicillin عن البنسلين بإضافة مجموعة ميثوكسي (Methoxy group) ضمن مجموعة الفينول الموجودة في البنسلين مثلما هو واضح في الشكل 4.

يعمل المثيسلين على تثبيط البكتريا بآلية مشابهة لعمل البنسلين باستثناء إن مجموعة الميثوكسي تنتج انزيماً يقلل ألفة (β-lactamase Staphylococcal) (Stapleton & Taylor ,2008).

بعد دخول الميثيسلين بمدة قصيرة في الستينيات 1960 بدأت المقاومة لهذا المضاد تتطور والتي يمكن أن تعزى إلى تعبير ( $\beta$  - lactamase methicillin - hydrolyzing) و تعبير (PBP2a) ذو الوزن الجزيئي 76 KDa . يعد PBP2a بروتيناً غريباً مقاوماً لفعل الميثيسلين وهو يشفر عنه بواسطة قطعة DNA يتراوح حجمها بين (40 - 60) كيلو زوج قاعدي تدعى *mecA* . وقد تمكنت بكتريا *S. aureus* من اكتساب هذا الجين من بكتريا *S. scuri* (Wu et al., 2001) .

إن جين *mecA* يحمل بواسطة عنصر وراثي جديد (Staphylococcal Cassette Chromosome SCC) الذي يسهل مقاومة  $\beta$ - lactamase و ربما يعمل كحامل لجين *mecA* عبر سلالات *Staphylococcal spp* (Ito et al., 2001) .

#### ب- مقاومة بكتريا *S. aureus* للبنسلين :

يعمل البنسلين على تثبيط بروتين Penicillin binding protein (*PBP*) المسؤول عن التقاطع العرضي في طبقة الببتيدوكلايكان في البكتريا مما يؤدي الى إضعاف جدار الخلية. إن تثبيط *PBP* يعني موت الخلية بعملية Osmosis . تعزى مقاومة البكتريا للبنسلين إلى وجود جين *blaZ* الذي يشفر لإنزيم  $\beta$ -lactamase وهو إنزيم خارج خلوي يصنع عندما تتعرض بكتريا *Staphylococci* إلى مضادات  $\beta$ -lactam مثل Amoxicillin . يقوم هذا الإنزيم بتحليل حلقة  $\beta$ -lactam محولاً هذه الحلقة الى حالة غير فعالة (Inactive) ينعكس هذا التحليل على المضادات الأخرى المعتمدة على البنسلين Penicillin based antibiotics مثل Cephalosporins و Carbapenems إذ تصبح الأخيرة غير فعالة أيضاً (Lowey , 2003) .

#### ت- دور البلازميدات في مقاومة بكتريا *S. aureus* للمضادات الحيوية :

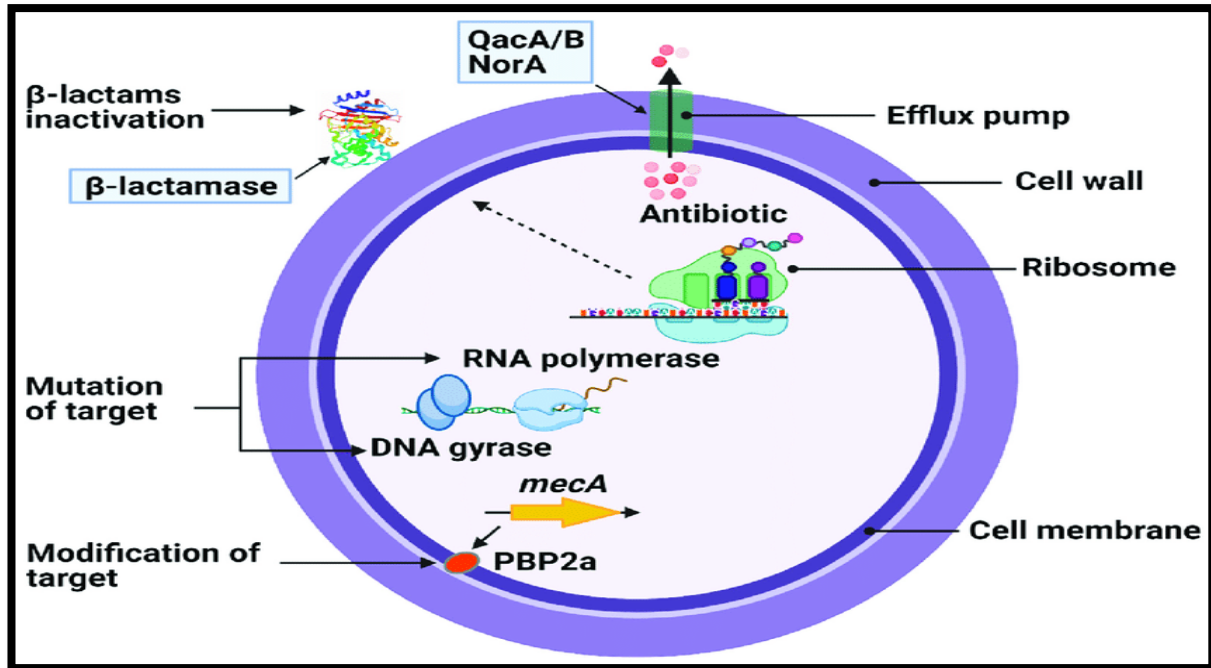
البلازميدات قطع DNA تقع خارج الكروموسوم لها القابلية على التضاعف بشكل مستقل عن الكروموسوم وتعد غير أساسية لحياة الخلية . إن البلازميدات التي اكتسبت بواسطة بكتريا CA-MRSA أدت إلى زيادة مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية ، فعلى سبيل المثال إن مقاومة البكتريا للإثرثرومايسين تكون محمولة على بلازميد يبلغ حجمه 2 كيلو زوج قاعدي (Kb) . وأوضحت دراسات أخرى إن هناك بلازميد كبير الحجم (41 كيلو زوج قاعدي) يشفر لمقاومة  $\beta$ -lactamase و Tetracycline و Mupirocin و Trimethoprim و Cadmium . ويمكن أن تعزى مقاومة



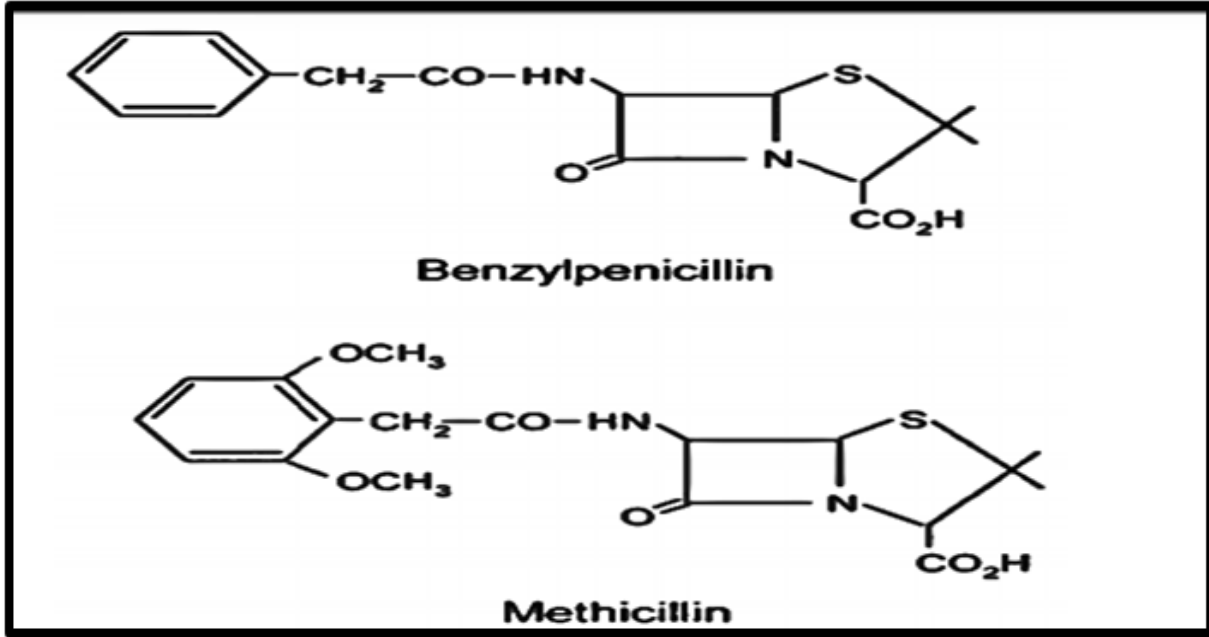
البكتريا للمضاد Trimethoprim نتيجة لدخول العنصر المتنقل (O'Brien et al., Tn 4003) (2004).

### ث- مقاومة بكتريا *S. aureus* للفانكومايسين :

إن مقاومة البكتريا للمضاد فانكومايسين ظهرت أولاً في بكتريا Enterococci في عام 1988 إلا أنه تم العثور على أول عزلة سريرية من بكتريا *S. aureus* مقاومة لهذا المضاد عام 2002. إن الجينات المحمولة على البلازميدات والعناصر المتنقلة (Transposons) هي المسؤولة عن التبادل الوراثي بين بكتريا *enterococci* و *Staphylococci* والتي أدت إلى جعل الأخيرة مقاومة للفانكومايسين (VRSA) (Weigel et al., 2003).



الشكل 3: اليات المقاومة المختلفة في بكتريا *S.aureus* (Lade and Kim.,2021).



الشكل 4: التركيب الكيميائي لمضادات  $\beta$ -lactam البنسلين والمثيسلين . ( Karpikova et al., 2009 ; Huber et al., 2010)

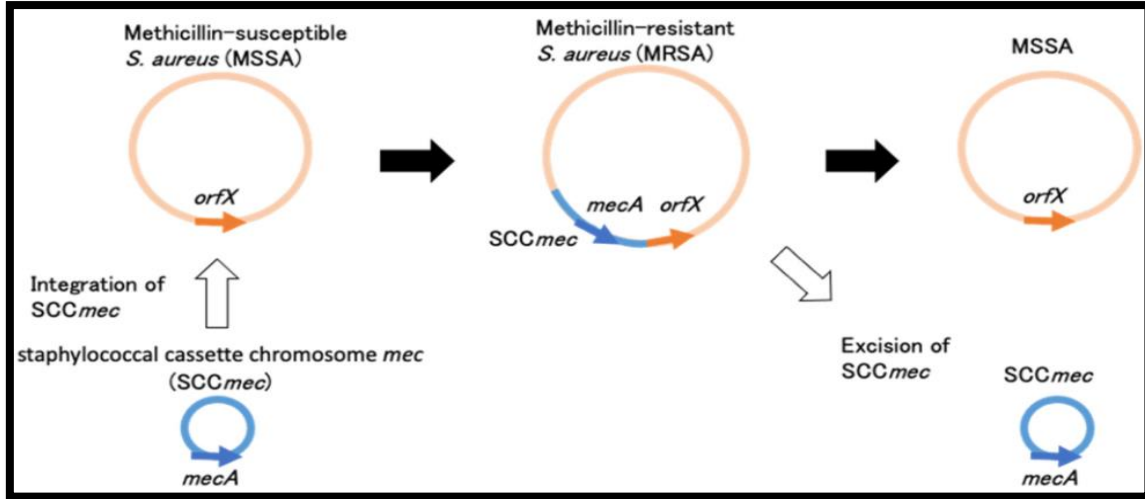
#### 4-2 وراثه بكتريا *S.aureus*

تحتوي بكتريا *S.aureus* على كروموسوم دائري واحد ذو حجم 2,874,302 bp وهذا الكروموسوم يحتوي على حوالي 32.88% من GC (Zubair et al., 2015). تحتوي إلى جانب الى الكروموسوم على مجموعه متنوعه من العناصر الوراثية تعرف بالعناصر الجينية المتنقلة (Mobile genetic elements, MGE) وتشتمل على البلازميدات (Plasmids) والعائيات البكتيرية (Bacteriophage) والجزر الامراضية و (Transposon, TN) و (Staphylococcal cassette chromosome) (Malachowa and Deleo., 2010). تعد الجينات الموجودة على الكروموسوم اساسية لبقاء البكتريا حية وهي ضرورية لنمو البكتريا ولتمثيلها الغذائي بينما تحمل البلازميدات جينات مسؤولة عن ضراوة ومقاومة البكتريا Stalin (., 2017).

تحتوي بكتريا *S.aureus* على بلازميدات ذاتية التضاعف بنسخة واحدة أو أكثر لكل خلية وتحمل البلازميدات محتوى جيني متنوع ويمكن تصنيف البلازميدات إلى بلازميدات صغيرة ذات نسخ متعددة وأخرى كبيرة ذات نسخ قليلة (Malachowa and Deleo., 2010).

ومن جينات المقاومة المحمولة على بلازميد هو جين *blaZ* الذي يشفر لانزيم البنسلينيز ويستحث هذا الجين بوجود مستويات عالية من البنسلين أو أي مركبات ذات تركيب مشابه (Pantosti et al., 2007). أما المقاومة للنتراسكلين فتعزى الى جينات *tetK* و *tetM* المسؤولة عن التشفير لعملية الضخ الفعال للنتراسكلين (Gulzar and Zehra ., 2018) وإلى جانب ذلك هناك جين مقاومة الاريترومايسين *ermBC* الذي يشفر إلى عملية اضافة الميثيل إلى الوحدة الرايبوسومية 23SrRNA (Malachowa and Deleco., 2010).

وتحتوي بكتريا *S.aureus* على الجزر الوراثية Genomic islands إذ تحتوي بكتريا MRSA ثلاثة عوامل من هذه الجزر وهي الفا وبيتا وكاما وتحمل هذه الجزر جينات مشفرة لعوامل ضراوة بما في ذلك المستضدات الفوقية (Superantigens) والبروتينات الدهنية (Lipoproteins) و(leukocidins) وغيرها من العوامل (Turner et al ., 2019). أما (Staphylococcal cassette chromosome) فهي قطع كبيرة من الحامض النووي تغرس في جين *orfX* على كروموسوم بكتريا *S.aureus* مثلما هو موضح في الشكل 5، وهذه القطع مهمة لمقاومة وضراوة البكتريا (Malachowa and Deleco ., 2010) وقد تشفر لمقاومة الميثيسلين وتنتقل هذه العناصر عن طريق التنبيغ (Transduction) و الاقتران (Conjugation) (Mlynarczyk et al ., 2022). تظهر *SCCmec* في بكتريا MRSA وتتصف بتنوعها إذ يوجد منها أحد عشر نوعا وعلى الرغم من اختلاف حجمها الذي يتراوح بين (21-67) Kbp كيلو زوج قاعدي لكنها تشترك جميعا ببعض الخصائص المعروفة إذ تندمج جميعا في منطقة *attB* من جين *orfX* فضلا عن اشتراكها جميعا بوجود جين *mec complex* اي جين *mecA* والجينات المنظمة الأخرى وايضا الجينات المسؤولة عن حركة القطع الكروموسومية (Chromosome recombinase) (Cassette) (Peacock & paterson ., 2015; Uihara., 2022) والجين المشفر للمثيسلين هو جين *mecA* ويتم السيطرة على تشفير هذا الجين عن طريق جينات *mecIR* (Foster., 2017) ومن الممكن حدوث طفرات في PBP4 و PBP2 تؤدي إلى مقاومة الاوكساسلين Oxacillin وتعرف البكتريا *S.aureus* modified pencillin binding protein (Mlynarczyk et al ., 2022).



الشكل 5: عملية اندماج SCCmec داخل منطقة *orfX* (Uihara., 2022).

اما العائيات البكتيرية فتستطيع أن تشفر لجينات السموم المعوية (Malachowa and Deleco) 2010، ومن الممكن أن يقوم العائى بتثبيط جين معين في البكتريا ومثال على ذلك جين *hly* المشفر لسم الهيمولايسين من النوع بيتا إذ يحدث اندماج للعائى داخل الجين وبالتالي يصبح الجين غير فعال وهذا ما يفسر انعدام التعبير الجيني لهذا الجين في معظم سلالات *S.aureus* (Salgado Pabon et al., 2014).

# الفصل الثالث

## المواد وطرائق العمل

## *Materials & Methods*

### 3- المواد وطرائق العمل

#### 1-3 المواد والاجهزة المستخدمة

#### 1-1-3 الاجهزة المستخدمة والشركات المصنعة :

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة
1	حاضنة ( Incubator )	Binder – Germany
2	كاميرا رقمية ( Digital camera )	Canon-Japan
3	ميزان حساس ( Sensitive Balance )	Denver – Germany
4	جهاز طرد مركزي ( Centrifuge )	Hettich – Germany
5	ماصات دقيقة ( Micropipettes )	Human-Germany
6	هود بايلوجي ( Laminar flow cabinet )	Jeio-Tech-Korea
7	مصباح بنزن ( bunsen burner )	Jenway-Germany
8	جهاز مزج ذو الصفيحة الساخنة ( Magnetic Stirrer with hot plate )	Labtech-Korea
9	حاضنة هزازة ( Shaker incubator )	Labtech-Korea
10	مؤسدة ( autoclave )	Labtech-Korea
11	ثلاجة ( Refrigerator )	LG-Korea
12	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني ( pH-meter )	Mauritius-Germany
13	المجهر الضوئي ( Light microscope )	Motic-Germany
14	جهاز الطرد المركزي المبرد ( Cooling centrifuge )	SIGMA-Germany
15	Gel Doc System	Syngene
16	حمام مائي ( Water path )	Tafesa - Germany
17	Thermal cycler	Techne
18	Electrophoresis Vertical System	Techne me
19	مطياف ضوئي ( uv-visible )	Tudor-Korea
20	مازج ( Vortex )	ROMA-Italy
21	جهاز تقطير ( Distiller )	GFL-Germany
22	جهاز الاليزا ( ELISA )	BioTek-England

BioTek-England	فرن كهربائي (Oven)	23
BioMerieux-France	VITEK 2 System	24
Ultraviolet product-USA	Transilluminator UV	25

### 2-1-3 المواد الكيميائية والايوساط الزراعية المستخدمة والشركات المصنعة لها:

الشركة المصنعة	اسم المادة	ت
BDH- England	فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1
BDH- England	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2
BDH	كلوريد الباريوم (Barium chloride)	3
BDH	هيدروكسيد الصوديوم (NaOH)	4
Analytical Rasayan	حامض الهيدروكلوريك (HCl)	5
BDH- England	كليسيرول (Glycerol)	6
BDH-England	كلوريد الصوديوم (NaCl)	7
BDH- England	سترات الصوديوم	8
BDH- England	كلوكوز (Glucose)	9
BDH- England	هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH)	10
	كلوريد الكالسيوم (CaCl <sub>2</sub> )	11
	ثلاثي كلورو حامض الخليك Trichloroacetic acid	12
Himedia-India	الكازئين ( Cascin )	13
BDH- England	اكاروز (Agarose)	14
Scharlau-European Union	ميثانول مطلق ( CH <sub>3</sub> OH )	15
Bioanalyse	اقراص المضادات الحياتية	16
Bio BASIC INC.	TE buffer	17
Bio BASIC INC.	صبغة ( Ethidium Bromide )	18
Bio BASIC INC.	(10x) TBE solution	19
AccuOligo, USA	بادئات ( Primers )	20
INtRON Biotechnology	2x PCR Master mix solution (i-Taq <sup>TM</sup> )	21

INtRON-Biotechnology	Genomic DNA Extraction Kit(for bacteria)	22
Biomerieux	عدة التشخيص ( Api Staph )	23
Bioneer	1500bp DNA Ladder	24
GCC-UK	حامض الخليك الثلجي ( CH <sub>3</sub> COOH )	25
Himedia-India	Blood agar base وسط	26
Himedia-India	Agar powder	27
Himedia-India	Muller- Hinton Agar وسط	28
Himedia-India	Brain – Heart infusion broth وسط	29
Oxoid	Mannitol Salt Agar وسط	30
Scharlau-European Union	ايتانول مطلق (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	31
SEARLE	حامض الكبريتيك المركز ( H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	32
معهد المصول واللقاح (VSI) العراق	بيروكسيد الهيدروجين (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	33
معهد المصول واللقاح (VSI) العراقية	كاشف الاوكسيديز	34
معهد المصول واللقاح (VSI) العراقية	عدة صبغة كرام ( Gram Stain kits )	35
كربلاء - مصرف الدم	بلازما ( plasma )	36
England	كبريتات المغنسيوم المائية (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	37
BDH- England	كبريتات الأمونيوم (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	38
BDH- England	صبغة البنفسج البلوري Crystall violet	39
BDH- England	Tris -base	40
Himedia-India	Nutrients broth	41
BDH- England	زيت البرافين السائل	42

### 3-1-3 المواد ذات الاستخدام الواحد

الشركة المصنعة	المادة	ت
Afco-Dipo – Jordan	ابر معقمة (Sterilized needles)	1
Afco-Dipo – Jordan	انابيب مختبرية حجم 10مل (Test tube)	2



Afco-Dipo – Jordan	مسحات قطنية (Sterilized cotton swabs ) معقمة	3
Afco-Dipo – Jordan	اطباق (Petri dish)	4
Broche – Malaysia	قفازات مطاطية (Latex Gloves)	5
Sigma – England	ابندروف أنابيب (Eppendorf tube)	6
Sartorius – Germany	ورق ترشيح (Filter paper)	7
HDA- China	قطن (Cotton)	8
Sterellin Ltd – England	Tips	9
Mercury-China	Microplate	10
Sterellin Ltd – England	ماصة باستور	11

### 3-1-4 المضادات الحيوية :

استخدمت اقراص المضادات الحيوية المجهزة من شركة Bio-analyse والتي شملت:

اسم المضاد	ت	اسم المضاد	ت
Doripenem	15	Benzyl Penicillin	1
Ertapenem	16	Amoxicillin	2
Meropenem	17	Amoxicillin/	3
Genamicin	18	Clavulanic Acid	
Ciprofloxacin	19		
Gatifloxacin	20	Ampicillin -sulbactam	4
Levofloxacin	21	Carbenicillin	5
Moxifloxacin	22	Ticarcillin-Clavulanic Acid	6
Norfloxacin	23	Piperacillin	7

Ofloxacin	24	Oxacillin	8
Erythromycin	25	Cefadroxil	9
Clindamycin	26	Cefalexin	10
Linezolid	27	Cefuroxime	11
Teicoplanin	28	Cefixime	12
Vancomycin	29	Cefpodoxime	13
Doxycycline	30	Cefoperazone	14
Tetracycline	37	Cefotaxime	31
Tigecycline	38	Ceftazidime	32
Fusidic Acid	39	Ceftizoxime	33
Rifampicin	40	Ceftriaxone	34
Trimethoprim/Sulfa Methoxazo	41	Cefepime	35
		Cefpirome	36

### 2-3 :- طرائق العمل

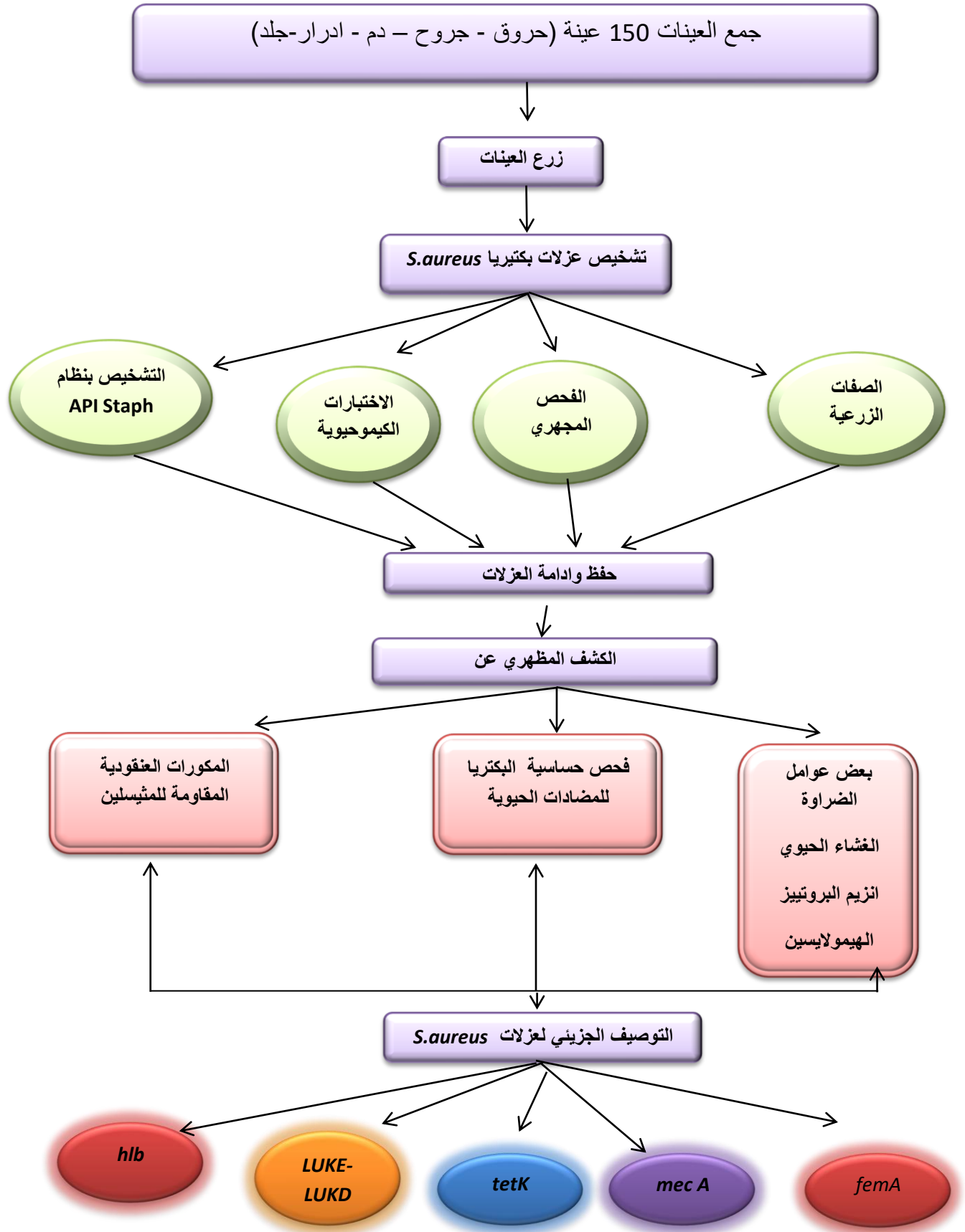
#### ❖ تصميم الدراسة :

يوضح المخطط 1 تصميم الدراسة الحالية

#### 1-2-3 :- جمع العينات :

تم جمع 150 عينة من المرضى المراجعين لمدينة الامام الحسين (ع) الطبية و مستشفى النسائية والتوليد التعليمي ، فضلا عن العيادات الخارجية من إصابات مختلفة شملت الجروح والحروق و الدم والإدرار والجلد ومن ثم زرعت المسحات على الوسط الخاص لعزل بكتريا *S.aureus* المتمثل بوسط ملح المانتول (Mannitol salt agar) و اكار الدم كوسط اغنائي ، و تم نقل المستعمرات الشبيهة ببكتريا *S.aureus* إلى الوسط الانتقائي وتنقيتها ، اعقب بعد ذلك اجراء الفحوصات التشخيصية المجهرية والكيموحيوية والجزيئية .

المخطط 1 :- تصميم الدراسة (Study Design).



### 2-2-3 الاوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص بكتريا *S.aureus* :-

#### ❖ وسط **Blood agar base**

حُضِر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بإذابة 40 غم في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة ، وبعد اكمال عملية التعقيم برد إلى درجة (45-50) م° وأضيف إليه دم الإنسان بنسبة (3-5) % ، استخدم هذا الوسط وسطاً أغنائياً في عزل وتشخيص البكتريا.

#### ❖ وسط **Mannitol salt agar**

حُضِر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة ، وذلك بإذابة 111 غم في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة ، استخدم هذا الوسط لعزل المكورات العنقودية وتشخيصها من حيث قابليتها على تحمل ملوحة الوسط فضلاً عن قابليتها على تخمير سكر المانيتول وتحويل لون الوسط الى الاصفر .

#### ❖ وسط **Brain heart infusion broth**

حُضِر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة ، وذلك بإذابة 37 غم من الوسط المغذي السائل في لتر من الماء المقطر ووزع في انابيب وعقم بالمؤصدة . وقد استخدم هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتريا فضلاً عن استخدامه لحفظ العزلات البكتيرية وذلك بإضافة 15% كليسيرول الى 85% من الوسط السائل بعد تعقيمه.

#### ❖ وسط **Muller Hinton Agar**

حُضِر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة ، وذلك بإذابة 38 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر ، وعقم الوسط باستخدام المؤصدة ، وبعد اكمال عملية التعقيم برد الى درجة (45-50) م° وتم صبه في أطباق بتري معقمة. وقد استخدمت الاطباق لتنمية العزلات البكتيرية لغرض اختبار فحصي الحساسية والفعالية التثبيطية للمضادات الحياتية.

❖ الوسط المعرف كيميائياً (Chemically defined medium, CDM)

المادة	الوزن بالغرام
فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين	2.3 (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	0.78 (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
كبريتات الأمونيوم	1 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
كبريتات المغنسيوم	0.1 (MgSO <sub>4</sub> )
كلوكوز	2

حضر الوسط وفقاً لما جاء في (Bubey and Maheshwari (2009) ومثلما يأتي:

أضيفت كل من المواد المذكورة سابقاً إلى لتر من الماء المقطر على التوالي وضبط الرقم الهيدروجيني إلى 7.4 وعقم بالمؤصدة لمدة 10 دقائق ثم أضيف له 0.2% من سكر الكلوكوز والذي تم تعقيمه باستخدام مرشح دقيق (Millipore filter).

❖ وسط الكازئين (Casaein media)

المادة	الوزن بالغرام
فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين	0.25 غم (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	0.25 غم (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
كلوريد الكالسيوم	0.25 غم (CaCl <sub>2</sub> )
كبريتات المغنسيوم المائية	0.25 غم (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)
كلوكوز	10 غم
الكازئين	10 غم

أضيفت كل من المواد التي ذكرت سابقاً إلى لتر من الماء المقطر عدا الكازئين وضبط الرقم الهيدروجيني إلى 7.5 ومن ثم اضيف الكازئين وعقم بالمؤصدة .

### 3-2-3:- الكواشف والمحاليل المستخدمة في الكشف عن بكتريا *S.aureus*

#### ❖ كاشف الكاتليز (Catalase reagent) :

استخدمت مادة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% للتحرري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الكاتليز (Tille, 2014) .

#### ❖ كاشف الاوكسيديز (Oxidase reagent) :

حضر الكاشف أنياً بإذابة 1 غم من مادة رباعي مثيل بارافنيلين ثنائي امين ثنائي هيدروكلورايد (Tetramethyl P-phenylen diamine dihydrochloride) في 100 مل من الماء المقطر في قنينة معتمة. استخدم هذا الكاشف في التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الاوكسيديز (Macfaddin,2000) .

#### ❖ صبغة كرام (Gram stain) :

استخدمت هذه الصبغة في التشخيص المظهري لعزلات بكتريا .

#### ❖ صبغة البنفسج البلوري ( Crystall violet ) :

تم تحضيرها بتركيزين هما (0.5 و 0.1)% . إذ يتم اذابة (0.5 و 0.1) غم من الصبغة على التوالي في 10 مل من الميثانول المطلق وبعد اكمال الذوبان اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ، إذ يستخدم التركيز 0.1% للتحرري عن الغشاء الحيوي بطريقة الأنبوية فيما يستخدم التركيز 0.5% للتحرري عن الغشاء المذكور بالطريقة الكمية .

#### ❖ المحلول الملحي الفسيولوجي (Normal saline) :

حُضِر بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 50 مل ماء مقطر ، وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر أيضا".

## ❖ دارى الفوسفات الملحي (Phosphate Buffer Saline ,PBS)

حُضِرَ الدارى بحسب ما جاء في (Macfaddin 2000) من المواد الآتية :

أذيب (8 غرام من كلوريد الصوديوم، 0.3 غرام فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين و1.12 غرام فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين) في حجم قليل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى اللتر وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2 وعقم بالمؤصدة وحفظ بالتلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال.

## ❖ محلول ماكفرلاند ( أنبوب رقم 0.5 ) Macfarland Solution :

حُضِرَ هذا المحلول بحسب الطريقة الموصوفة من قبل (Tille, 2014) إذ يتكون من محلولين :

A- محلول كلوريد الباريوم (1.175 %) : أذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الاذابة أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

B- محلول حامض الكبريتيك (1%) : أضيف 1 مل من حامض الكبريتيك المركز إلى 99 مل من الماء المقطر .

حضر محلول مكفرلاند (انبوبة رقم 0.5 ) وذلك باضافة 0.5 مل من محلول A الى 99.5 مل من

محلول B ومزج المحلول جيداً .

## ❖ عالق كريات الدم الحمراء (RBCs suspension)

جُمع 10 مل من دم الأغنام في قنينة تحتوي مادة مانعة للتخثر وفصلت كريات الدم الحمراء بواسطة النبذ المركزي بسرعة 1500 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق ، ثم غسلت بمحلول دارى الفوسفات الملحي وعلقت به بنسبة 2 %.

## 3-2-4 عزل وتشخيص بكتريا *S. aureus* :

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *Staphylococcus aureus* ، إذ تم تشخيصها من خلال تنميتها بدرجة 37 م° فضلاً عن الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية ، ويمكن إيجاز عملية العزل و التشخيص على وفق المخطط 2 .

## 3-2-4-1:- الفحوصات المجهرية (Microscopic tests) :

• تصبغ البكتريا :

تم انتقاء المستعمرات النامية على وسط Mannitol salt agar الصلب وتم تصيغها بصبغة كرام للتعرف على أشكال الخلايا و تجمعاتها



المخطط 2 : عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية.

### 2-4-2-3:-الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests ) :

#### ❖ اختبار الكاتليز (Catalase test) :

أجري هذا الاختبار بمزج مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة مع قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين 3 % على شريحة زجاجية نظيفة، إذ إن ظهور الفقاعات دليل على ايجابية الفحص, (Tille 2014).

#### ❖ اختبار الاوكسيديز (Oxidase test) :

تم نقل مستعمرة بكتيرية بعمر (48) ساعة بواسطة عود خشبي معقم (stick) إلى ورقة ترشيح، وأضيفت لها قطرة من كاشف الاوكسيديز , مع الاحتكام الى ان تحول لون المستعمرة الى اللون البنفسجي الغامق دليل على ايجابية الفحص ( Tille , 2014 ) .

#### ❖ اختبار انزيم التجلط ( Coagulase test )



تم اختبار العينات باستخدام بلازما الإنسان ، إذ تم وضع 0.5 مل من البلازما في أنابيب معقمة ، ثم نقلت مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة بواسطة عروة (Loop) الى الأنابيب الحاوية على البلازما ومزجت جيدا ، ثم حضنت بدرجة حرارة (35-37) م لمدة 4 ساعات ، إذ إن حصول التجلط دلالة على إيجابية الفحص ( Tille , 2014 ) .

### 3-4-2-3:- تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص API staph :

#### A- تحضير اللقاح :

حُضِر المزرع البكتيري بنقل 5 مستعمرات من العزلات النامية على وسط المانيتول إلى 5 مليلتر من دارئ الفوسفات الملحي المحضر مسبقا في أنبوبة نظيفة ومعقمة ، وتم رجها جيدا للحصول على عكورة ملائمة.

#### B- إجراء الفحص :

1- حُضِرَت حافظة الحضانة ( incubation box ) وذلك بإضافة كمية قليلة من الماء المقطر في الحفر ( Grooves ) لجعل الظروف رطبة .

2. تم تعليم الحافظة بكتابة اسم البكتريا أو العزلة على جانب الحافظة .

3. لُقِح الشريط باستخدام ماصة باستور نظيفة ومعقمة ، إذ تم ملء الجزء السفلي Tube بالعالق البكتيري في كل الفحوصات ما عدا الفحوصات ADH و URE ، في حين تم ملء الجزء العلوي Cupule بزيت البارافين السائل المعقم لجعل الظروف لا هوائية في ما اقتصرت بقية الفحوصات على ملء الجزء السفلي فقط بالعالق البكتيري ، بعدها اغلقت الحافظة بالغطاء الخاص بها .

4. تمت قراءة النتائج بعد مدة حضانة (18-24) ساعة بدرجة حرارة 37 م° ، وسجلت نتائج الاختبارات في الأنابيب التي لا تحتاج إلى إضافة الكواشف مباشرة فيما أضيفت الكواشف للأنابيب التي تحتاج للإضافة بحسب تعليمات الشركة المجهزة ، وتم تحديد ايجابية الاختبار من عدمه على وفق ما هو موضح في الجدول 5 .

### 3-2-5 اختبار حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية :

استخدمت طريقة انتشار الأقراص (Disk diffusion test) لتحديد حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية على وفق ما جاء في (Morello et al., 2006) بحسب الخطوات الآتية :

1. نشطت عزلات بكتريا *S. aureus* على وسط Blood agar و حضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .

2. تم نقل كمية قليلة من مستعمرات البكتريا النامية والمشار اليها أنفا بواسطة العروة (Loop) إلى أنابيب تحوي المحلول الملحي الفسلجي ومزجت جيداً ، وقورنت عكورة النمو مع عكوره محلول ثابت العكورة القياسي ( McFarland standard 0.5 ) والذي يعطي عدداً تقريبياً للخلايا  $1.5 \times 10^8$  وحدة تكوين خلية / مليلتر .

#### الجدول 5: الاستجابة الموجبة والسالبة لأختبارات API20E

ت	نوع الاختبار	الرمز	الاستجابة الموجبة	الاستجابة السالبة
-1	(No substrate Negative control)	0	—	Red
-2	D-GLUcose (Positive control)	GLU	Yellow	Red
-3	Acidification (D-FRUctose)	FRU	Yellow	Red
-4	Acidification (D-ManNosE)	MAN	Yellow	Red
-5	Acidification (MALtose)	MAL	Yellow	Red
-6	Acidification (LACtose)	LAC	Yellow	Red
-7	Acidification (D-TREhalose)	TRE	Yellow	Red
-8	Acidification (D-MANnitole)	MAN	Yellow	Red
-9	Acidification ( XyLiTol)	XLT	Yellow	Red
-10	Acidification (D-MELibiose)	MEL	Yellow	Red
-11	Reduction of NITrates to nitrites	NIT	Red	Colorless-ligh Pink
-12	ALKaline Phosphatase	PAL	Violet	Yellow

Colorless- ligh Pink	Violet-Pink	VP	Acetyl-methyl-carbinol production (Voges Proskauer)	-13
Red	Yellow	RAF	Acidification (RAFFinose)	-14
Red	Yellow	XYL	Acidification (XYLose)	-15
Red	Yellow	SAC	Acidification (SACcharose)	-16
Red	Yellow	MDG	Acidification (Methyl- $\alpha$ D-Glucopyranoside)	-17
Red	Yellow	NAG	Acidification (N-Acetyl-Glucosamine)	-18
Yellow	Orange-Red	<u>ADH</u>	Arginine DiHydrolase	-19
Yellow	Red-Violet	<u>URE</u>	UREase	-20

3. نقل 100 مايكروليتر من العالق البكتيري بوساطة الماصة الدقيقة (Micropipette)، ثم نشر بوساطة الناشر الزجاجي على سطح وسط أكار مولر – هنتون بصورة متجانسة ، بعدها تركت الأطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة (10-15) دقيقة .
4. نقلت أقراص المضادات الحيوية بوساطة ملقط معقم إلى الأطباق ، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .
5. تم قراءة النتائج بقياس أقطار مناطق التثبيط بالمليمتر حول أقراص المضادات الحيوية .

### 6-2-3 فحص الحساسية للبكتريا المعزولة باستعمال جهاز الفايتهك Vitek-2 Compact System :-

- تمت جميع خطوات العمل وفقا لتعليمات الشركة المجهزة Biomerieux وكما يلي :
- 1- يوضع 3 مل من المحلول الملحي (normal saline) في أنابيب بلاستيكية معقمة .
- 2- يتم نقل عدد من المستعمرات النقية من البكتريا المراد تشخيصها (والتي يتم تنشيطها على وسط مناسب لمدة (18- 24) ساعة وذلك باستخدام عروة نقل معقمة (loop) وتمزج جيدا حتى يصبح المحلول عكرا.

- 3- تتم قياس عكورة المعلق باستخدام جهاز Denis Chek والتي يجب ان تكون مطابقة لعكورة محلول ماكفرلانند ( 1.5 \* 10<sup>8</sup> خلية / مل ) .
- 4- يتم نقل العالق الى حامل الجهاز وتوضع البطاقة الخاصة في الحامل يعقبها ربط البطاقة والعالق بوساطة قناة توصيل رفيعة جدا ثم يدخل رمز البطاقة بوساطة ماسح ضوئي .
- 5- يوضع الحامل في حجرة خاصة مفرغة من الهواء ( Vacuum chamber ) إذ يتم نقل البكتريا الى البطاقة وتوزيعها في الحفر الموجودة فيها.
- 6- يتم قطع قناة الوصل آليا ويتم غلق البطاقة جيدا لمنع أي تسرب وتنقل إلى الحاضنة وتحضن بدرجة حرارة (35-37) م .
- 7- تتم قراءة نتائج التشخيص من خلال جهاز الحاسوب الذي يحتوي على برنامج خاص يقوم من خلاله قراءة الاطوال الموجية للتفاعلات وترجمتها من خلال التغيرات اللونية والعكورة ،فضلا عن النواتج الايضية .

### 3-2-7 حفظ وإدامة العزلات

تم حفظ العزلات لمدة قصيرة الأمد ، و ذلك بزرعها في ممالات (Slants) حاوية على الوسط المغذي الصلب ، و تحضن لمدة 18 ساعة لتنميتها في درجة حرارة 37 م° و بعدها حُفظت بالثلاجة ، إذ يتم تجديد المزارع كل شهر ، كما تم حفظها لمدة طويلة الامد باستخدام الوسط المغذي السائل Brain heart infusion broth المدعم بـ 15% من الكليسيروول .

### 3-2-8 :- التوصيف الجزيئي لبكتريا *S.aureus* :

3-2-8-1 :- استخلاص الحامض الرايبوزي منقوص الاوكسجين ( DNA ) من بكتريا *S.aureus* :

الاستخلاص باستخدام عدة الاستخلاص :

أستخدمت عدة التشخيص المجهزة من شركة iNTRON Biotechnology , Inc. والتي تتكون من المحاليل والمواد التالية :

- Pre – Buffer<sup>1</sup>
  - G – Buffer<sup>2</sup>
  - Buffer Binding<sup>3</sup>
  - Wash buffer A
  - Wash buffer B
  - Elution buffer
  - Columns
  - 2ml Collection tubes
  - RNase A<sup>4</sup>
  - Proteinase K<sup>5</sup>
  - Lysozyme<sup>6</sup>
- طريقة الاستخلاص :

1- تم تنمية عزلات بكتريا *S.aureus* في وسط brain heart infusion broth لمدة 20 ساعة بدرجة حرارة 37 م° ثم سحب 1.5 مل من المزرع البكتيري النامي ووزع في أنابيب ابندروف .

2- أُجريت عملية طرد مركزي للمزرع البكتيري بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لدقيقة واحدة لترسيب الخلايا، إذ أُزيل الجزء الرائق منها ، ثم اضيف 50 مايكروليتر من محلول Pre buffer و 3 مايكروليتر من محلول lysozyme ومزجت جيدا وحضن المزيج عند درجة حرارة 37م لمدة 15 دقيقة على الأقل .

3 - أُضيف 250 مايكروليتر من محلول G-buffer إلى معلق الخلايا ثم مُزجت جيدا أعقب ذلك حضن المزيج بدرجة حرارة 65 م° لمدة 15 دقيقة من أجل تحلل الخلايا .

4 - أُضيف 250 مايكروليتر من Binding buffer ثم مُزجت جيدا بالماصة على الأقل عشر مرات، من جهة أخرى تم وضع الانبوبة الحاوية على الفلتر Column داخل انبوبة جمع Collection tube ثم سكب العالق البكتيري مع الاضافات السابقة داخل انبوبة الفلتر و أُجريت عملية طرد مركزي لمعلق الخلايا بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لدقيقة واحدة ، إذ أُزيل الرائق المتجمع في انبوبة الغسل وبقي DNA الخلايا البكتيرية مع رواسب أخرى عالقة في الفلتر .

5- أُضيف 500 مايكروليتر من محلول الغسل Wash buffer A ثم أُجريت عملية طرد مركزي بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لدقيقة واحدة وتم التخلص من الراشح.

6 - أضيف 500 µl من محلول الغسل الثاني Wash buffer B المضاف له الايثانول المطلق، أعقب ذلك إجراء طرد مركزي للمزيج بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لدقيقة .

7- ازيل المحلول واجري طرد مركزي بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لـ دقيقة واحدة .

8- تم وضع انبوبة الفلتر داخل انبوبة ابندروف جديدة وتم التخلص من انبوبة الغسل ثم أُضيف (50-200) مايكروتير من محلول Elution إلى انبوبة الفلتر وتركت دقيقة واحدة من اجل اعطاء الوقت اللازم لفك ارتباط DNA الخلية البكتيرية من الفلتر.

9- أُجريت عملية طرد مركزي بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لمدة دقيقة واحدة إذ تم التخلص من انبوبة الفلتر وتم الاحتفاظ بأنبوبة الابندروف الحاوية على DNA وخزن بعدها بدرجة حرارة - 20 °م لحين الاستخدام .

**2-8-2-3 توصيف البكتريا المعزولة باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction , PCR)**

- البوادي المستخدمة في التوصيف الجزيئي لبكتريا *S.aureus* :  
تم استخدام البوادي الموضحة صفاتها في الجدول 6 .

**المحاليل المستخدمة :**

**A-تحضير محلول البادي الخزين ( Stock Primers ) :**

حُضِر محلول البوادي بحسب تعليمات الشركة المجهزة للحصول على تركيز نهائي 100 µl /picomoles . ثم حفظ بدرجة حرارة - 20 م لحين الاستخدام .

**B-مزيج Master Mix :**

أُستخدم المزيج (Master Mix) المجهز من شركة Intron Biotechnology الموضحة مكوناته في الجدول 7 .

**3-8-2-3 اجراء تفاعل البلمرة (PCR Assay)**

تم تحضير محلول كل بادئ وبشكل منفصل بتركيز 10 بيكو مول/مايكرو ليتر، وذلك بإضافة 10

الجدول 6 : البوادي المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم في الدراسة

المصادر	Amplicon size (bp)	تتابع البادئ 5'—3'	اسم البادئ	الجين المستخدم
Mehrotra, et al. (2000)	132bp	AAAAAAGCACATAACAAGCG  GATAAAGAAGAAACCAGCAG GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	femA-F  femA-R	femA
(Geha et al., 1994)	310bp	GTAGCGACAATAGGTAATAGT  GTAGTGACAATAAACCTCCTA	mecA-F  mecA-R	mecA
Ullah et al .,(2012)	360bp	GTAGCGACAATAGGTAATAGT  GTAGTGACAATAAACCTCCTA	tetK  tetK	tetK
Rasheed &Hussein.,(2020)	369bp	TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG  TGTATTCGATAGCAAAAGCAGTGCA	lukE-lukD  lukE-lukD	lukE- lukD
Karmakar et al ., (2016)	300bp	GTGCACTTACTGACAATAGTGC  GTTGATGAGTAGCTACCTTCAG	hIb-F  hIb -R	Hib

الجدول 7 : مكونات المزيج Master Mix المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل

Component	20 µl reaction
i-Taq™ DNA Polymerase 5U\µL	2.5 U
dNTPS	2.5 µM
PCR Reaction Buffer	1X
Gel Loading buffer	1X

مايكرو ليتر من المحلول الخزين لكل بادئ كلا على إنفراد إلى 90 مايكروليتر من الماء المقطر اللا أيوني، ومُزج جيداً وحُفظ في الثلج لحين الاستخدام في حين حُفظت المحاليل الخزينة للبوادئ في درجة 20- م°.

تم اضافة المواد الاتية لكل انبوبة من انابيب Master Mix

- 3 مايكروليتر (10 picomole) لكل من البوادئ الامامي والخلفي .
- 5 مايكروليتر من الحامض النووي DNA المستخلص في الفقرة 2-3-1-8 .
- أكمل الحجم الى 20 مايكروليتر وذلك بإضافة ماء مقطر معقم .
- تم برمجة جهاز PCR كما في الجداول 8 و9 و10 و11 حسب نوع البادئ .

الجدول 8 : برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *femA* و *mecA*

الخطوة	العملية
1	دورة واحدة لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 94 م° للمسخ الأولي لـ DNA القالب .
2	30 دورة تضمنت :
	A دقيقة عند درجة حرارة 94 م° لمسح DNA القالب .
	B 30 ثانية عند درجة حرارة 55 م° لارتباط البوادئ لـ DNA القالب .
C دقيقة عند درجة حرارة 72 م° لاستطالة البوادئ المرتبطة .	
3	دورة واحدة لمدة خمس دقائق عند درجة حرارة 72 م° للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف .

الجدول 9 : برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *tetK*

الخطوة	العملية
1	دورة واحدة لمدة 5 دقيقة عند درجة حرارة 95 م° للمسخ الأولي لـ DNA القالب .
2	30 دورة تضمنت :
	A دقيقة واحدة عند درجة حرارة 95 م° لمسح DNA القالب .



B	دقيقة واحدة عند درجة حرارة 55 °م لارتباط البودئ لـ DNA قالب .
C	دقيقة ونص عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البودئ المرتبطة .
3	دورة واحدة لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 72 °م للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف .

الجدول 10: برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *lukE- lukD*

الخطوة	العملية
1	دورة واحدة لمدة نصف دقيقة عند درجة حرارة 94 °م للمسح الأولي لـ DNA قالب .
2	30 دورة تضمنت :
	A نصف دقيقة عند درجة حرارة 94 °م لمسح DNA قالب .
	B نصف دقيقة عند درجة حرارة 55 °م لارتباط البودئ لـ DNA قالب .
	C نصف دقيقة عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البودئ المرتبطة .
3	دورة واحدة لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 72 °م للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف .

الجدول 11: برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *hfb*

الخطوة	العملية
1	دورة واحدة لمدة 2 دقيقة عند درجة حرارة 95 °م للمسح الأولي لـ DNA قالب .
2	30 دورة تضمنت :
	A دقيقة واحدة عند درجة حرارة 94 °م لمسح DNA قالب .
	B 40 ثانية عند درجة حرارة 52 °م لارتباط البودئ لـ DNA قالب .
	C دقيقتان عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البودئ المرتبطة .
3	دورة واحدة لمدة 4 دقائق عند درجة حرارة 72 °م للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف .

### 4-8-2-3 الترحيل الكهربائي في الهلام (Gel Electrophoresis) :

#### A-المحاليل المستخدمة:

- صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide) : استخدمت بالهيئة المجهزة بها من شركة Intron Biotechnology.
- تحضير 0.5 X TBE buffer : تم تحضيره من المحلول الخزين 10x TBE Solution بأضافة 50 مليلتر من المحلول الخزين الى 950 مليلتر من الماء المقطر المعقم .
- تحضير هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % :

حُضِر هلام الاكاروز وفق الطريقة الموصوفة من قبل (Sambrook & Russell (2001) مع بعض التحوير وذلك بإذابة 0.75 غم من الاكاروز في 50 مليلتر من محلول TBE buffer 0.5 X ، اذ تم تسخين الاكاروز الى درجة الغليان ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة ( 45- 50 ) م° ثم أُضيفت إليه 3µl من صبغة بروميد الاثيديوم ومُزج الاكاروز جيداً . تم إعداد صفيحة لإسناد الأكاروز (Tray) ثم نُبِت المشط ( Comb ) لتكوين الحفر ( Wells ) المُعدة لتحميل العينات ثم صُبَّ الأكاروز بشكل هادئ ومستمر لتجنب حدوث فقاعات هوائية ، بعدها تُرك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ثم رُفِع المشط بهدوء. بعدها نُقِل الهلام مع القالب إلى حوض الترحيل لإجراء عملية الترحيل الكهربائي .

### 5-8-2-3 الكشف عن نواتج التضاعف :

تم الكشف عن نواتج التضاعف بترحيل العينات على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 1.5 % ، اذ تم تحميل 5 مايكرو لىتر من العينات فضلاً عن تحميل 5 مايكرو لىتر من الدليل الحجمي ( DNA Ladder ) . تم ترحيل النواتج والدليل الحجمي كهربائياً بفرق جهد 70 فولت لمدة 45 دقيقة ، وفُحِص الهلام بعد الانتهاء من عملية الترحيل عبر تعريضه لمصدر للأشعة فوق البنفسجية وتم تقدير الأحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة بالمقارنة مع مواقع الحزم للدليل الحجمي المستخدم والمُرَحَل مع نواتج التضاعف .

### 9-2-3 تحديد بعض عوامل الضراوة في بكتريا *S.aureus* (MRSA)

#### 1-9-2-3 التحري عن قابلية بكتريا *S.aureus* على تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm)

استخدمت طريقتان للتحري عن قابلية البكتريا قيد الدراسة على تكوين الغشاء الحيوي هما :-

## 1-التحري بطريقة الانبوبة (Tube method):

تم التحري عن قابلية عزلات *S.aureus(MRSA)* على تكوين الغشاء الحيوي وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Bose et al. (2009) مع بعض التحوير. تم تنمية العزلات في 10 مل من وسط نقيع القلب والدماغ وذلك بتلقيح الوسط بعروة كاملة من كل عزلة على انفراد وحضنت العزلات بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 24 ساعة وسكب بعد ذلك معلق الخلايا من انابيب الاختبار وغسلت الانابيب بالمحلول الملحي الفسلجي وتركت لتجف قليلا ثم صبغت بـ 0.1% من صبغة الـ Crystal violet وتركت لمدة (5-10) دقائق ثم غسلت بالماء المقطر و قلبت الانابيب لتجف . ان ظهور طبقة مصبغة مرئية على جدران وقاعدة الانبوبة يدل على نتيجة موجبة .

## 2-التحري بالطريقة الكمية :-

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Malik et al., (2022) في التحري الكمي عن قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي وبحسب الاتي :-

1-لقحت العزلات الفتية في 5 مل من Brain heart infusion broth وحضنت لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 مئوية.

2- تم تخفيف البكتريا بالوسط المذكور نفسه وقورن مع محلول مكفر لاند القياسي ذو التركيز 0.5 .

3- نقل 200 مايكروليتر من المزروع البكتيري المخفف الى كل حفرة بواقع ثلاث مكررات لكل عزلة , اما السيطرة فقد اضيف Brain heart infusion broth غير المزروع الى الحفر وبعدها حضنت الصفيحة Microplate بعد تغطيتها بصورة محكمة في حاضنة لمدة 24 ساعة عند درجة 37 مئوية.

4-سكب المزروع الموجود في الحفر وغسلت الحفر بالمحلول الفسلجي بواقع ثلاث مرات

5- جففت الصفيحة بالفرن عند درجة 60 مئوية لمدة نصف ساعة.

6-اضيف 200 مايكروليتر من صبغة البنفسج البلوري ذو التركيز % 0.5 وتركت لمدة ربع ساعة .

7-سكبت الصبغة وغسلت الحفر ثلاث مرات لحين زوال الصبغة وجففت .

8-اضيف 200 مايكروليتر من حامض الخليك الثلجي بنسبة %33 .

9- تم قياس الكثافة الضوئية عند طول موجي 630 نانوميتر باستخدام جهاز الاليزا

- 10- تم تحديد كفاءة العزلات في انتاج الغشاء الحيوي بمقارنة القراءات وفقاً للمعادلات الآتية :-
- تعد العزلة غير مكونة للغشاء الحيوي (non –adherent) اذا كان معدل الكثافة الضوئية للسيطرة اكبر او يساوي معدل الكثافة الضوئية للعزلة. ( $OD \geq OD_c$ )
  - تعد العزلة ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي (adherent weakly) اذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة اكبر من معدل الكثافة الضوئية للسيطرة او يساوي او اصغر من ضعفي الكثافة الضوئية ( $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ ) .
  - تعد العزلة متوسطة التكوين للغشاء الحيوي (adherent moderately) اذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة اكبر من ضعفي الكثافة الضوئية للسيطرة او تساوي او اصغر من اربعة ( $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ ) .
  - تعد العزلة شديدة التكوين للغشاء الحيوي (adherent strong) اذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة اكبر من اربعة اضعاف معدل السيطرة ( $OD > 4 \times OD_c$ ) .

### 2-9-2-3 التحري عن الانزيم الحال للبروتين ( Protease )

- تم تقدير فعالية انزيم البروتيز في بكتريا *S.aureus* تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل joo et al ., (2000) مع بعض التحوير .
- وتعرف وحدة الفعالية لانزيم البروتيز بأنها (كمية الأنزيم التي تسبب زيادة في الامتصاص مقدارها (0.001) على طول موجي 280 نانو ميتر وتحت ظروف التقدير ) .

#### المحاليل المستخدمة :

- ❖ محلول رقم 1- 0.5 مولر هيدروكسيد الصوديوم  
حضر باذابة 0.2 غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد الاذابة اكمل الحجم الى 10 مل بالماء المقطر .
- ❖ محلول رقم 2- محلول الكازئين الخزين  
حضر باذابة 2 غم من الكازئين في 90 مل من الماء المقطر مع التسخين الى 90 م واطافة 5 مل من محلول رقم 1 ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

❖ محلول رقم 3- 1 مولر منظم الترس (pH8.5)

حضر بإذابة 12.11 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل ال pH الى 8.5 اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

❖ محلول رقم 4- محلول مادة التفاعل

❖ حضر بمزج حجم واحد من محلول رقم 2 واربع حجوم من الماء المقطر وحجم واحد من محلول رقم 3

❖ محلول رقم 5- محلول Trichloroacetic Acid (TCA) (10)%

حضر بتخفيف 10 مل من TCA في 90 مل من الماء المقطر .

تم تقدير الفعالية الانزيمية على درجة حرارة 37 م بحسب الاتي :-

1- اضيف 0.2 مل من المسخلص الانزيمي الى 2 مل محلول رقم 4 في انابيب اختبار واجري التفاعل لمدة 20 دقيقة .

2- اوقف التفاعل بإضافة 3 مل من محلول رقم 5 بعدها طردت الانابيب مركزيا بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة.

3- عمل محلول صفري ( Blank ) وذلك بإضافة 3 مل من محلول رقم (5) الى 2 مل من محلول رقم(4) ثم اضيف 0.2 مل من المسخلص الانزيمي الى مزيج التفاعل .

4- تمت قراءة الامتصاص على طول موجي 280 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي (UV-visible spectrophotometer).

قدرت الفعالية الانزيم باستخدام المعادلة الاتية :

الفعالية الانزيمية وحده /ملليتر = الامتصاص على 280نانوميتر \ 0.001 \* 20 دقيقة \* 0.2 مل

**3-9-2-3 الكشف عن فعالية الهيمولايسين بيتا:**

**3-9-2-3-1 المنحنى القياسي لتحلل الدم باستخدام تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم )**

**(Norddin et al.,2010).**

تم تحضير تراكيز متدرجة من محلول كلوريد الصوديوم بالماء المقطر إذ تم مزج 3 مليلتر من كل تركيز مع 1 مليلتر من كريات الدم الحمراء للاغنام والمعلقة بالدارئ الفسلجي, حضنت الأنابيب بعد ذلك بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعة واحدة بعدها رسبت الأنابيب على سرعة 1500 دورة /دقيقة لمدة 30 دقيقة، تمت قراءة الأمتصاص للراشح بعد فصله عن الراسب عند الطول الموجي 412 نانوميتر بعد ذلك تم أستخراج التركيز الذي سبب تحلل دموي نسبته 50% (Hemolysis 50%) (الجدول 12) وذلك وفقاً للعلاقة الآتية:-

$$\text{Hemolysis } 50 \% = \frac{A}{A1} * 100$$

حيث A1 :- تمثل قيم الأمتصاص العظمى

A :- تمثل قيمة الأمتصاص الصغرى .

التحري عن انتاج الهيمولايسين:

### 2-3-9-2-3 تحضير الراشح البكتيري

تم اختبار ثلاث عزلات من بكتريا S.aureus قيد الدراسة للتحري عن انتاج الهيمولايسين ، اذ زُرعت العزلات السريرية في 5 مليلتر من الوسط المعرف كيميائياً المحضر وفق الفقرة (2-2-3) حضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة وباستخدام حاضنة هزازة بسرعة 120 / دورة. تم سحب الراشح بعد إجراء الطرد المركزي المبرد على سرعة 3000 دورة / 30 دقيقة وعند درجة حرارة 4 مئوية بعدها تم ترشيح الراشح باستخدام ورق ترشيح قطر ثقوبه (0.22) مايكروميتر(مسلم ، 2005) و تم قياس فعالية الهيمولايسين في الراشح بالطريقة الكمية .

الجدول 12 :التراكيز المتدرجة من محلول كلوريد الصوديوم وقيمة الأمتصاص لكل تركيز والتحلل الدموي بنسبة .

(50%)

رقم الأنبوبة	تركيز كلوريد الصوديوم (غم / 100 مليلتر)	الأمتصاص على طول موجي 412 nm)	التحلل الدموي نسبته (50%)
1	0.90%	0.022	2.9
2	0.85%	0.0265	3.60
3	0.80%	0.0275	3.74
4	0.75%	0.0290	3.94
5	0.70%	0.0360	4.89

5.71	0.0420	0.65%	6
7.07	0.0520	0.60%	7
16.32	0.120	0.55%	8
36.46	0.268	0.50%	9
49.1	0.361	0.45%	10
79.1	0.582	0.40%	11
87.3	0.642	0.35%	12
87.89	0.646	0.30%	13
93.60	0.688	0.25%	14
95.91	0.705	0.20%	15
98.5	0.724	0.15%	16
98.7	0.726	0.10%	17
100	0.735	0.0%	18

### 3-2-9-4 الأختبار الكمي للتحلل الدموي (Quantitative assay of hemolysis)

تم إختبار الفعالية التحليلية للهيمولايسين بواسطة سلسلة تخافيف مضاعفة بحسب الطريقة

الموصوفة من قبل ( Santos *et al.*, 1999 ; Bizani and Brandelli ,2001 ):-

1- تم تخفيف 1مليلتر من الراشح البكتيري الخام بعمل سلسلة تخافيف مضاعفة وباستخدام دارئ الفوسفات الملحي (Phosphate buffer saline), استخدمت التخافيف من (10/1) إلى (2560/1).

2- رسبت خلايا الدم الحمراء (RBCs) باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 1500دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة ، وتم غسلها ثلاث مرات بمحلول دارئ الفوسفات الملحي ،مع إجراء الطرد المركزي في كل مرة بسرعة 1500 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة تحت ظروف مبردة بعد ذلك علقت الكريات بنسبة 2% في نفس الدارئ.

3- تم مزج 1 مليلتر من راشح خلايا البكتيريا مع 1 مليلتر من عالق كريات الدم الحمراء المستحصل عليه من الخطوة 2 أعلاه في أنابيب زجاجية نظيفة وجافة وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م لمدة ساعة واحدة تم بعد ذلك إضافة 2 مليلتر من دارئ الفوسفات الملحي لكل أنبوبة ومزجت بلطف.

5-أجري ترسيب بقايا الخلايا الدموية بسرعة 1500 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة وفصل الراشح وقيست الكثافة الضوئية له على الطول الموجي 545 نانوميتر. حددت الفعالية من خلال اخذ قراءة معكوس أعلى تخفيف يعطي تحلل كامل.



الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

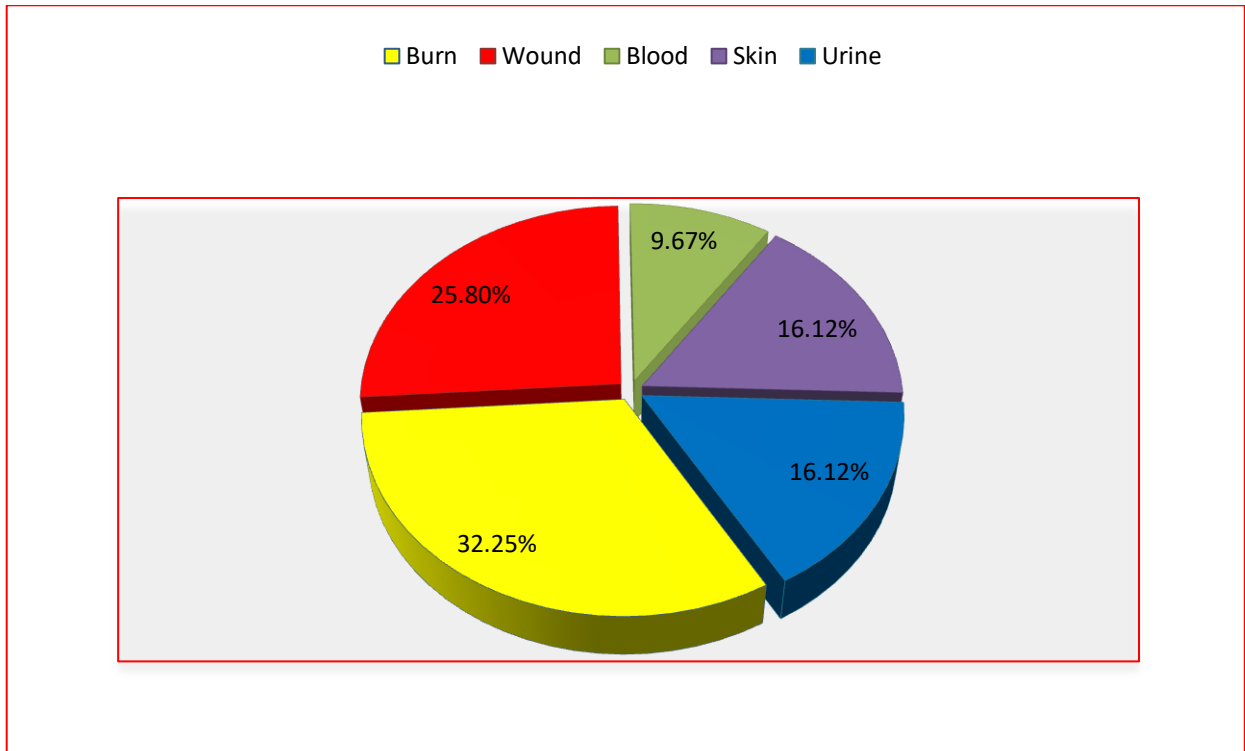
*Results & Discussion*

## 4- الفصل الرابع

### 4- النتائج والمناقشة

#### 4-1 عزل بكتريا *Staphylococcus aureus*:

جمعت خلال مدة الدراسة 150 عينة من الجروح والحروق والجلد والإدرار والدم من المرضى المراجعين لمدينة الامام الحسين (ع) الطبية و مستشفى النسائية والتوليد التعليمي ومختبر الصحة العامة ، فضلا عن العيادات الخارجية ، و زرعت العينات المتحصل عليها على الوسط الانتقائي اكار ملح المانتول (Mannitol salt agar) فضلا عن زراعتها على الوسط الاغثائي اكار الدم (Blood agar) وحضنت لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37م°، وقد اسفرت عملية الزرع عن الحصول على 31 عزلة تعود للبكتريا *S.aureus* توزعت هذه العزلات بواقع 10 عزلات (32.25%) من الحروق وثمانية عزلات من الجروح (25.80%) وثلاث من الدم (9.67%) وخمس عزلات (16.12%) من كل من الجلد والإدرار وبحسب ما هو موضح في الشكل 6.



الشكل 6 توزيع بكتريا *Staphylococcus.aureus* حسب اماكن عزلها من مصادر سريرية مختلفة .

بلغت نسبة عزل بكتريا *S.aureus* المعزولة في هذه الدراسة (20.6%) ، وتتفق هذه النتيجة مع ما تم الحصول عليه في دراسات سابقة ففي دراستين أجريتا في كل من العراق والنيبال بلغت تلك النسبة (20.22 و 19.96) % ، على التوالي (Al-Taie et al .,2014; Sapkota et al .,2019) ، بينما لا تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه كل من (Kumurya et al., 2017) ، (Garoy et al ., 2019) . اللذين أشارا إلى إن بكتريا *S.aureus* المعزولة بلغت (28.16 و 63.1%) في دراستين أجريتا في كل من نيجيريا واريتريا ، على التوالي.

أما من حيث مصدر العزل فيتضح من نتائج هذه الدراسة إن الحروق هي أكثر الأماكن التي تستوطنها بكتريا *S.aureus* تليها الجروح ومن ثم الجلد والإدرار اللذين يشتركان بنفس النسبة ، وأخيرا الدم ، لهذا فقد جاءت هذه النتائج تأكيدا لما وجدته (Alebachew et al (2012). ان الحروق هي الأكثر تلوثا ببكتريا *S.aureus* في دراسة أجريت في اثيوبيا في حين اشار (Rasmi et al.,(2022) في دراسة أجريت في مصر الى ان أعلى نسبة لتواجد هذه البكتريا كانت في الجروح فيما وجد (Selim et al .,(2022) ان أعلى نسبة لعزل هذه البكتريا من الإدرار في احدى الدراسات في مصر ايضا.

تعد الحروق واحدة من المشاكل المهمة التي تواجه الصحة العامة على مستوى العالم بالنظر إلى أن تلف الحروق يفضي إلى اضطراب مناعي مما ينتج عنه تفاقم الإصابة البكتيرية لدى المرضى (Corcione et al .,2020) .

يعد الجلد الحاجز الرئيس لمنع وصول الإصابات إلى الأنسجة الداخلية ، لهذا لذا فإن تمزيق هذا الحاجز يؤدي إلى تكوين الجروح التي يمكن أن تتلوث بمسببات الأمراض البكتيرية ، وبالتالي اطالة المدة اللازمة للشفاء وما يترتب على ذلك من تكاليف إضافية لإتمامها (Tom et al ., 2019).

## 2-4 تشخيص بكتريا *Staphylococcus*

### 1-2-4 الصفات الزرعية والمجهريّة (Cultural and Microscopical)

بعد زرع العينات على وسط اكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة اسفرت النتائج عن الحصول على مستعمرات دائرية كبيرة ومحدبة وبراقة وذات لون أصفر ذهبي ، من ناحية

أخرى ظهرت بكتريا المكورات العنقودية من خلال الفحص المجهرى بشكل خلايا موجبة لصبغة كرام ذات شكل كروي (Spherical cells) متجمعة بشكل عنائيد (Clusters) مما يدل على ان البكتريا تعود لجنس *Staphylococcus* وهذا يتفق مع ما وصفه (Mater., 2014) .

#### 3-4 تشخيص بكتريا *S.aureus* :

تم استخدام الوسطين الزرعيين اكار ملح المانتول ، و اكار الدم لغرض تشخيص بكتريا *S. aureus* فضلا عن الفحوصات الكيموحيوية.

#### 1-3-4 النمو على وسط اكار ملح المانتول (Mannitol salt agar ,MSA)

إن وسط اكار المانيتول الملحي هو وسط تفريري و اختياري بسبب احتوائه على نسبة عالية من ملح كلوريد الصوديوم (7.5 - 10) % الذي يثبط نمو الكثير من الأحياء المجهرية ، والتي بالإمكان تحملها من قبل بكتريا *S. aureus* ، كما يحتوي على سكر المانيتول وكاشف الفينول الاحمر إذ ظهرت بكتريا *S.aureus* بشكل مستعمرات صفراء لها القابلية على تخمير سكر المانيتول مؤدية إلى انتاج حامض يتسبب في تحويل الكاشف من اللون الوردي إلى الاصفر بحسب ما هو موضح في الجدول 13 (Pierce &Leboffe., 2010).

#### 2-3-4: الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical Tests)

أظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 13 ان بكتريا *S. aureus* كانت لاهوائية اختيارية وموجبة لاختبار الكاتليز ، إذ تسطيع تحطيم بيروكسيد الهيدروجين ( $H_2O_2$ ) إلى غاز الاوكسجين والماء ، إذ تميزت النتيجة الموجبة بظهور فقاعات غازية .

وخضعت هذه العزلات ايضا لاختبار انتاج انزيم مجلط البلازما (Coagulase) إذ اتسمت بكتريا *S.aureus* بالنتيجة الموجبة وهذا يتفق مع ما وصفه (Quinn et al.,2004).

#### 3-3-4: تشخيص بكتريا *S.aureus* باستخدام العدة التشخيصية API staph

استخدمت العدة التشخيصية API staph لغرض تشخيص بكتريا *S.aureus* ، وقد تبين من خلال النتائج إن جميع العزلات المتحصل عليها والموجبة لفحص coagulase ذات نتائج موجبة .

الجدول 13 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *S.aureus*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	الوسط الانتقائي Mannitol salt agar	+
2	صبغة غرام	+
3	المظهر الخلوي	خلايا كروية بشكل عناقيد
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الاوكسديز	-
6	اختبار الكوكبوليز	+
7	فحص KOH	-

+ نتيجة موجبة ، (-) نتيجة سالبة

في اختبارات GLU, Fru, MNE, MAL, LAC, TRE, MAN, NIT, PAL, SAC, ADH, URE وذات نتيجة سالبة للاختبارات XLT,VP, MEL, RAF, XYL, MDG, NAG, LSTR وهذه النتائج تشير إلى أن البكتريا تعود لنوع *S.aureus* .

#### 4-4 الكشف المظهري عن البكتريا المقاومة للمثيسلين MRSA

استخدمت طريقة الانتشار بالأقراص (Disk diffusion test) في الكشف المظهري عن البكتريا المقاومة للمثيسلين عن تلك الحساسة منها عبر استخدام المضادين البنسلين (Penicillin) والسيفوكستين (Cefoxitin) ، وتبين من النتائج الموضحة في الجدول 14 إن جميع العزلات البكتيرية كانت مقاومة للبنسلين (penicillin) أي بنسبة 100% فيما كانت 77.41% منها مقاومة للسيفوكستين (Cefoxitin) وتتفق النتائج المستحصلة من هذه الدراسة مع ما تم الحصول عليه في دراسة أجريت في بنكلادش قام بها Hasan.,(2016) الذي أوضح إن جميع العزلات المستخدمة في دراسته كانت مقاومة للبنسلين فيما كانت (75%) منها مقاومة للمثيسلين (Methcillin) ، كما كانت هذه الدراسة مطابقة أيضا لدراسة أخرى أجريت في بنكلادش إذا كانت البكتريا مقاومة للاوكساسلين (Oxacilin) بنسبة (77.3%) (Sultana et al .,2019)، وتم استبعاد العزلات البكتيرية الحساسة للمثيسلين فيما تم الاحتفاظ بالعزلات المقاومة منها لإجراء الدراسات اللاحقة .

يختلف المضاد Methicillin عن البنسلين بإضافة مجموعة ميثوكسي (Methoxy group) ضمن مجموعة الفينول الموجودة في البنسلين، إذ يعمل الميثيسلين على تثبيط البكتريا بالية مشابهة لعمل البنسلين باستثناء أن مجموعة الميثوكسي تنتج أنزيما يقلل ألفة Staphylococcal  $\beta$  lactamase (Stapleton & Taylor, 2008).

الجدول 14 : اختبار حساسية *S. aureus* لتحديد البكتريا المقاومة للميثيسلين.

Cefoxitin 30 ug	Penicilin 10ug	ت
17	11	S1
18	11	S2
18	22	S3
20	16	S4
20	15	S5
18	9	S6
20	16	S7
20	15	S8
21	21	S9
17	11	S10
17	12	S11
19	15	S12
17	11	S13
20	14	S14
21	20	S15
20	16	S16
20	15	S17
14	10	S18
14	10	S19
0	0	S20
17	9	S21
0	8	S22
17	10	S23
21	14	S24
30	18	S25
27	13	S26
26	13	S27
30	14	S28
29	18	S29
30	18	S30
28	14	S31

- إذا كان قطر التثبيط أكبر أو يساوي 29 ملم تعد العزلة حساسة للبنسلين
- إذا كان قطر التثبيط أكبر أو يساوي 22 ملم تعد العزلة حساسة للسيفوكستين

#### 5-4: اختبار حساسية عزلات بكتريا *S.aureus* للمضادات الحيوية

اجرى اختبار الحساسية لبكتريا *S.aureus* ضد 41 مضاد حيوي باستعمال جهاز Vitek-2 . يلاحظ من الجدولين (15 و16) إن جميع العزلات مقاومة لمجموعة مضادات البيتا لكتام ( $\beta$ -lactam) التي تضم مجاميع واسعة من المضادات تشتمل بشكل رئيس على Penicillins و Cephaloporins و Carbapenems و Monobactams (Petri.,(2001) . بلغت مقاومة العزلات البكتيرية 100% للبنسلينات التي تشتمل على Benzyl Penicillins و Amoxicillin و Carbenicillin و Ampicillin sulbactam و Piperacillin و Amoxicillin Clavulanic و Oxacillin و Acid . تتفق هذه النتائج مع ما وجدته Tsiga et al.,(2020) في دراسة في اثيوبيا لست وعشرين عزلة بكتيرية معزولة من الجروح كانت مقاومة للبنسلين بنسبة 100%. كما تتفق في جزء منها مع ما أشار إليه Tadesse et al., (2018) في دراسة في اثيوبيا ايضا لتسع وسبعين عزلة من بكتريا *S.aureus* بينما لا تتفق نتائج تلك الدراسة مع ما حصل عليه &Melaku(2021) في دراسة ثلاثة في اثيوبيا أيضا إذ إن ( 84 و 83 و 67 ) % من العزلات فقط كانت مقاومة للبنسلين والامبنسلين والاموكسيلين ، على التوالي .

يحتوي البنسلين على حلقة  $\beta$ -lactam في تركيبه ويمكن أن تتحقق مقاومة البكتريا لهذا المضاد بثلاث اليات الاولى : تتمثل بإفراز انزيمات  $\beta$ -lactamase التي تعمل على تحلل حلقة البيتا لكتام الموجودة في المضاد و الثانية : تقليل نفاذية البكتريا للمضاد وبالتالي تمنعه من الدخول الى داخل الخلية , أما الثالثة : فتعتمد على تغيير الهدف المحدد للمضاد الموجود في الخلية مما يتعذر الارتباط بالهدف المرسوم له ، وبالتالي عدم قتل البكتريا (Kumar &Varella.,2013).

وتشير النتائج أيضا إلى أن عزلات بكتريا *S.aureus* قيد الدراسة كانت مقاومة 100% أيضا للسيفالوسبورينات بجميع أجيالها والتي تشتمل على عائلة (Cephalosporins) ولجميع اجيالها المتمثلة في Cefadroxil و Cephalexin من الجيل الأول و Cefuroxime من الجيل الثاني و Cefixime و Cefpodoxime و Ceftriaxone و Cefotaxime و Ceftizoxime و Cefoperazone, Ceftazidime من الجيل الثالث و Cefepime و Cefpirome من الجيل

الرابع. تتفق هذه النتائج في جزء منها مع ما حصل عليه (2021), Al-Naqshbandi et al . في دراسة محلية في أربيل إذ بلغت مقاومة البكتريا 100% للمضادين Cefotaxime و Ceftriaxone .

تحتوي السيفالوسبورينات على حلقة  $\beta$ -lactam ويمكن أن تُعزى مقاومة البكتريا لهذه المضادات الى امكانية تحلل تلك المضادات بفعل انزيمات  $\beta$  - lactamase أو تحويل البروتينات المرتبطة بالبنسلين (PBP) أو من خلال تقليل نفاذية المضاد إلى داخل البكتيرية (Byarugaba.,2010).

ومن خلال ملاحظة الجدولين 15 و16 ايضا نفسه يتضح إن جميع عزلات *S.aureus* كانت مقاومة 100% للمضادات Ertapenem و Doripenem و Meropenem العائدة لمجموعة مضادات Carbapenems. تتمكن الاحياء المجهرية من مقاومة هذه المجموعة من المضادات عبر عدد من الاليات منها انتاج انزيمات Oxacillinase المحللة لحلقة البيتا لاكتام (Turton et al ., 2006) او عن طريق فقدان احد بروتينات الغشاء الخارجي التي يمر من خلالها المضاد المعروف ببروتين Caro (Mussi et al ., 2005).

أجريت دراسة قام بها ( Hasan et al.,(2016) في بنغلادش إذ كانت 90% من العزلات حساسة لمضاد Imipenem وهذا لا يتطابق مع نسبة المقاومة للمضادات التابعة للمجموعة نفسها .

يتضح من نتائج الدراسة الحالية أيضا تفاوت في حساسية عزلات *S.aureus* قيد الدراسة للمضاد Gentamicin تبعا لمصدر عزلها فجميع العزلات المتحصل عليها من الحروق كانت حساسة بنسبة 100% لهذا المضاد بينما كانت العزلات المتحصل عليها من الجروح حساسة بنسبة 83% وانخفضت تلك النسبة لتصل الى 50% لكل من العزلات المتحصل عليها من الدم والادرار فيما بلغت النسبة 75% للعزلات المتحصل عليها من الجلد. تتفق نتائج هذه الدراسة في جزء منها مع ما وجدته Oguzkaya et al .(2008) في دراسة اجريت في تركيا شملت 36 عزلة من بكتريا *S.aureus* المعزولة من انوف الاطفال إذ بلغت حساسية العزلات للجنتاميسين 100% . وفي دراسة محلية في ميسان تبين أن 35.9% منها مقاومة للجنتاميسين (Mtsher & Aziz.,2019).

ينتمي المضاد Gentamycin إلى مجموعة مضادات Aminoglycosides وتقاوم البكتريا هذه المضادات عبر اليات عدة تتضمن الأولى تثبيط المضادات من خلال انزيم يعمل على تغيير تركيب المضاد عن طريق نقل مجموعة فعالة ( functional group ) للمضاد مثل مجاميع acyl و



riboseyl و Thiol و phosphoryl عن طريق تغيير تركيب المضاد بفعل انزيم Nucleotide transferase والثانية تتمثل بتحويل الهدف للمضاد الحيوي بواسطة عملية Methylation على الحامض النووي 16srRNA والثالثة بتغيير نفاذية جدار البكتريا للمضادات الحيوية وبالتالي تمنعها من الدخول إلى داخل الخلية البكتيرية (Kumar&Varella .,2013).

يعد مضاد Gentamicin قاتلا للبكتريا لكونه يرتبط مع مستقبلات بروتينية على الوحدة الريبوسومية 30S وتثبيط تصنيع البروتين البكتيري الطبيعي (Gentilini et al .,2000).

وبالرجوع إلى الجدولين 15 و16 وعند دراسة حساسية عزلات البكتريا ضد مضادات Quinolones يتضح أن جميع العزلات كانت حساسة بنسبة 100% لمضاد Levofloxacin بينما تفاوتت حساسيتها ضد مضادات Quinolones الأخرى فقد بلغت نسبة الحساسية للمضادات Ciprofloxacin و Gatifloxacin و Norfloxacin و Ofloxacin (100 و100 و100 و50 و75) % لكل من عزلات الحروق والجروح والدم والجلد والادرار، على التوالي .

أجريت دراسة في امستردام قام بها Bonko et al .,(2021) الذي اشار إلى أن بكتريا *S.aureus* المعزولة من البلعوم الانفي كانت منخفضة المقاومة للـ Ciprofloxacin بنسبة 4.5 % . وإلى جانب ذلك هنالك دراسة محلية في مصر اشارت إلى ارتفاع المقاومة لعزلات *S.aureus* المستحصل عليها من مصادر سريرية مختلفة وكانت حوالي 80% منها مقاومة ( Ghoniem et al., 2014).

تتمكن البكتريا من مقاومة مضادات Fluoroquinolon عبر تقليل نفاذية جدار البكتريا لهذه المضادات وبالتالي تمنعها من الدخول إلى داخل الخلية البكتيرية (Kumar &Varella.,2013). وتتضح اليات عمل مضادات Fluoroquinolones من خلال إيقافها لعملية تكرار الحامض النووي (DNA replication) بتثبيطها لانزيم DNA gyrase مما يؤدي إلى توقف نمو الخلية البكتيرية فيما بعد (Soni.,2012).

و يلاحظ أن نسب حساسية العزلات للمضادين Erthromycin و Clindamycin منخفضة نوعا ما إذ بلغت (62.5 و66.7)% على التوالي . ينتمي هذان المضادات إلى مجموعة الماكروليدات (Macrolides) التي تتلخص الية عملها بالارتباط بالوحدة الريبوسومية 50S مما يؤدي الى تثبيط

تصنيع البروتين. تعد هذه المضادات موقفة لنمو البكتريا (Bacteriostatic) في التراكيز الواطئة بيد أن تأثيرها يصبح قاتلا عند التراكيز العالية أو يعتمد على نوع الكائن المجهرى (Tomisic ., 2011).

أظهرت النتائج أن مضادات مجموعة Glycopeptide ذات فعالية ممتازة ضد بكتريا *S.aureus* إذ بلغت حساسية العزلات 100% لمضاد Vancomycin . تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره Roy *et al* .,(2015) إذ إن عزلات البكتريا المذكورة المتحصل عليها من مرضى وحدة الجراحة بإحدى مستشفيات بنغلادش كانت حساسة بنسبة 100% للمضادات قيد الدراسة كما تم الحصول على نسبة الحساسية ذاتها لبكتريا *S.aureus* المعزولة من المرضى في إحدى مستشفيات اثيوبيا (Taddesse *et al* .,2014).

تتلخص الية عمل الفانكوميسين بارتباطه إلى النهاية الكربوكسيلية للثمالة D- ALa -D-Ala للبيتيد الخماسي (Pentapeptide) مما يؤدي إلى تثبيط تكوين الجسر العرضي (Cross bridge) بين البيتيد الخماسي (Hu *et al* .,2016).

وعند دراسة حساسية عزلات بكتريا *S.aureus* للنتراسايكلينات يلاحظ أن نصف عدد العزلات (50%) كانت مقاومة للمضادين Tetracycline و Doxycycline بينما كانت حساسة بنسبة 95.84% للمضاد Tigecycline . لا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما أشار اليه Oguzkaya *et al* (2008) في دراسة أجريت في تركيا اتضح فيها أن 8.3% من العزلات فقط مقاومة للـ Tetracycline , كما لا تتفق ايضا مع ما وجدته Kengne *et al* .(2019) إذ بلغت نسبة مقاومة العزلات البكتيرية 68%. تقاوم البكتريا المضادين Tetracycline و Doxycycline باليتين هما الإخراج الفعال (Active efflux) للمضاد من البكتريا مما يؤدي الى تخفيف تركيز المضاد داخل الخلية فضلا عن الالية الأقل شيوعا المتمثلة بإيقاف فعالية المضاد عن طريق عمليات الأكسدة والإختزال (Redox process) (Kumar.&Varella,2013) .

أما مضاد Tigecycline فهو من مضادات Tetracycline المحورة وينتمي إلى مجموعة Glycylcyclines . وعلى الرغم من أن الية عمله مشابهة لآلية عمل Tetracycline وهي تثبيط بناء البروتين في الخلية البكتيرية من خلال الارتباط مع tRNA في الموقع A للرايبوسوم إلا انه يمتاز

بتجاوزه لكل اليات المقاومة المذكورة سابقا والتي تقاوم بها البكتريا مضادات Tetracyclines مما يعزز من فعاليته لعلاج أنواع مختلفة من الإصابات البكتيرية (Schedlbauer et al., 2015).

وأخيرا فقد كانت جميع عزلات بكتريا *S.aureus* قيد الدراسة حساسة لمضاد Linzolid بنسبة 100%. يقوم هذا المضاد بتنشيط تصنيع البروتين من خلال الارتباط بالوحدة الريبوسومية 50S ويمنع تكوين معقد البدء 70S. يعد هذا المضاد قاتلا لبكتريا *Streptococci* ومثبطا لبكتريا *Staphylococci* و *Enterococci* (Dilley & Geny., 2022).

#### 6-4: التشخيص الجزيئي لبكتريا *Staphylococcus aureus*

يُعد تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) طريقة مختبرية لتضخيم الحمض النووي تم ادخاله في عام 1985. وقد أحدث هذا التفاعل ثورة في التشخيص الجزيئي ، مما أتاح تحقيق عدد من التطبيقات التي كانت مستحيلة قبل ايجاده (Dennis ., 1998).

تحل تقنية PCR أهمية كبيرة في التشخيص بالنظر لسرعتها وحساسيتها العاليتين في الكشف عن مسببات الأمراض الميكروبية في العينات السريرية ولاسيما عند وجود بعض الأحياء المجهرية التي يصعب استزراعها في المختبر أو تتطلب مدة زراعة طويلة (Yamamoto., 2002).

أُستخدمت هذه التقنية لتشخيص بكتريا *S.aureus* تأكيدا لتشخيصها بالطرائق التقليدية. استخدم جين *femA* للكشف عن هذه البكتريا على وجه الخصوص المقاومة لل سيفوكستين ويتضح من النتائج في الشكل ( 7 و 8 و 9) إن البادئ (primer) الخاص بهذا الجين ابدى تضخيما ناجحا من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه 132 bp وهذا ما يؤكد إن جميع عزلات البكتريا تعود للجنس *S.aureus* وبالتالي تطابق التشخيص التقليدي مع التشخيص الجزيئي بنسبة 100% .

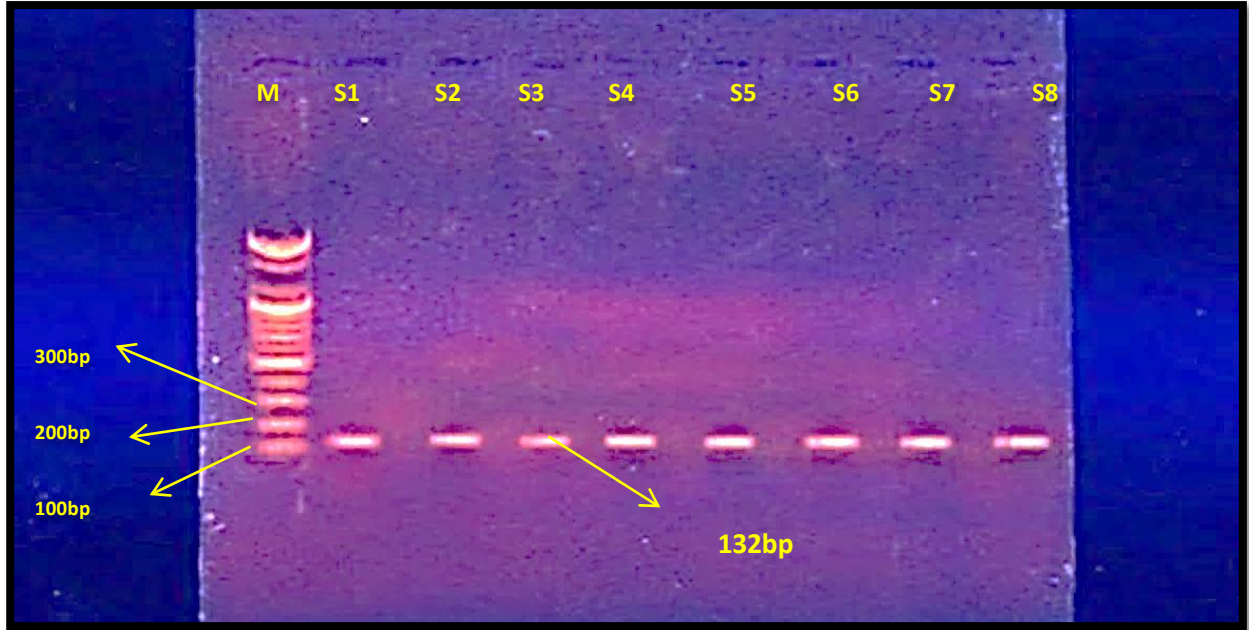
إن جين *femA* يتواجد فقط في بكتريا *S.aureus* سواء كانت حساسة ام مقاومة للميثيسيلين MRSA وان الجين المذكور يلعب دورا في ايض الخلية (judith et al ., 2007). استخدم جين *femA* في دراسات كثيرة لتشخيص بكتريا *S.aureus* ففي دراسة محلية قام بها Fadhil and Mohammed., (2022) اتضح وجود هذا الجين في 45 عزلة من أصل 50 معزولة من التهاب



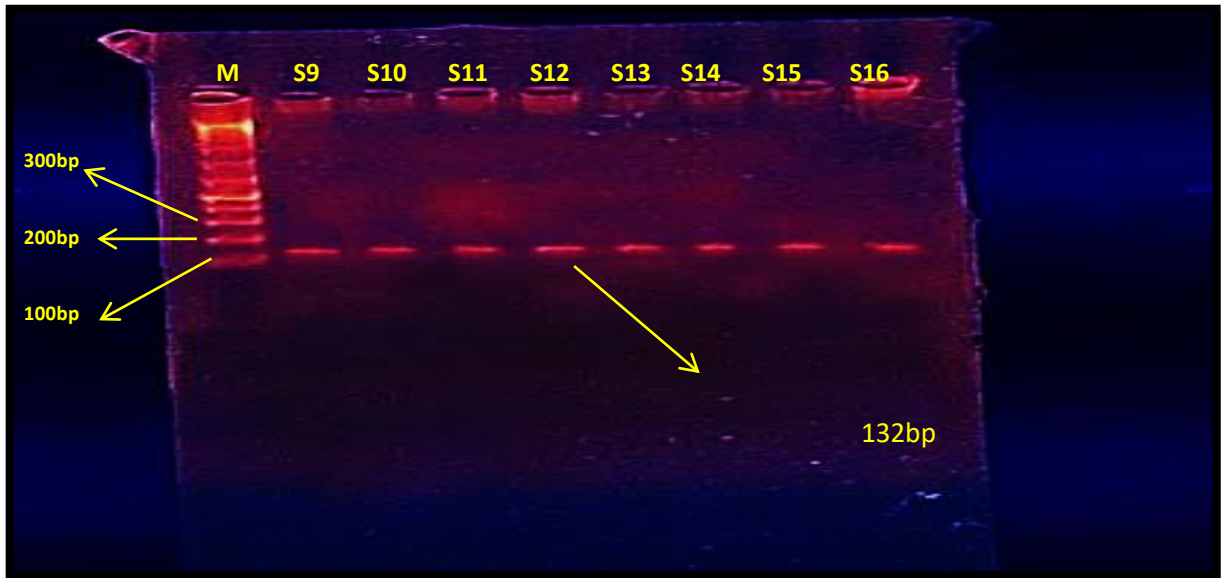
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Cefepime	19
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Cefpirome	20
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Doripenem	21
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Ertapenem	22
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Meropenem	23
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Genamicin	24
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ciprofloxacin	25
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Gatifloxacin	26
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Levofloxacin	27
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Moxifloxacin	28
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Norfloxacin	29
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Ofloxacin	30
R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	Erthromycin	31
S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	Clindamycin	32
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Linezolid	33
R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Teicoplanin	34
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Vancomycin	35
R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	Doxycycline	36
R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	Tetracycline	37
S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Tigecycline	38
R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	Fusidic Acid	39
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Rifampicin	40
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Trimethoprim/Sulf a Methoxazo	41



R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Cefpirome	20
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Doripenem	21
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Ertapenem	22
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Meropenem	23
R	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	Genamicin	24
S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	Ciprofloxacin	25
S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	Gatifloxacin	26
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Levofloxacin	27
S	S	R	S	S	I	I	S	S	S	S	S	Moxifloxacin	28
S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	Norfloxacin	29
S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	Ofloxacin	30
S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	Erthromycin	31
S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	Clindamycin	32
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Linezolid	33
S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	Teicoplanin	34
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Vancomycin	35
R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	Doxycycline	36
R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	Tetracycline	37
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Tigecycline	38
R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	Fusidic Acid	39
S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	Rifampicin	40
S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Trimethoprim/Sulf a Methoxazo	41

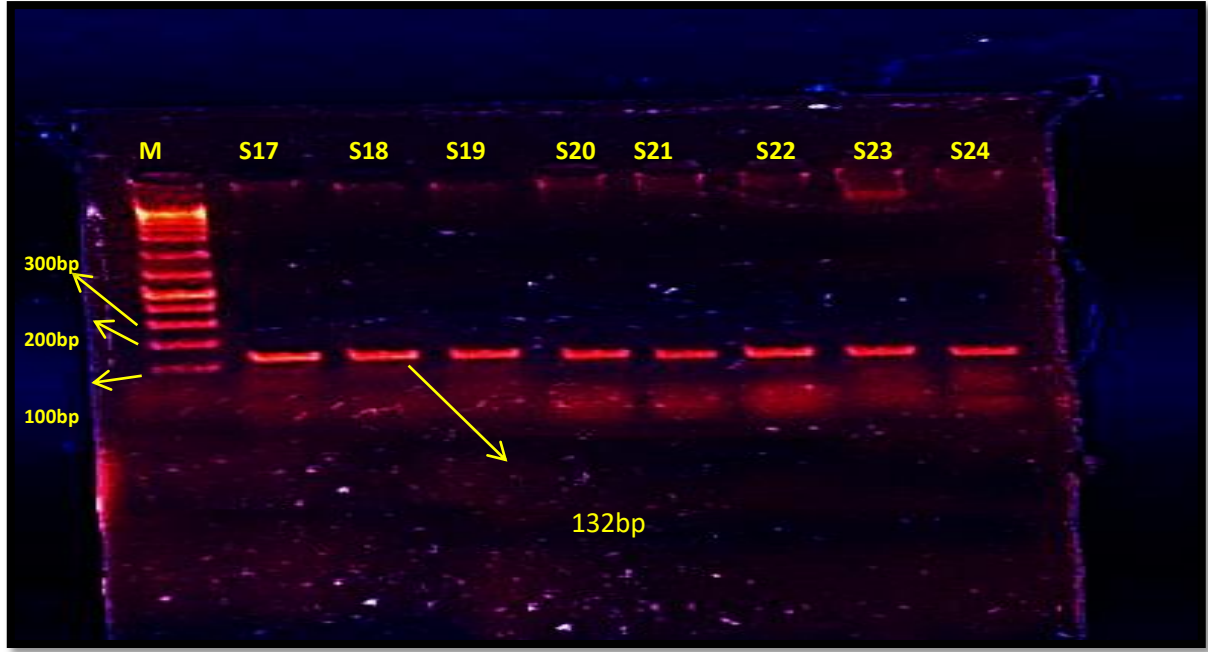


الشكل 7: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S1-S8) المعزولة من الحروق باستعمال البادئ النوعي لجين *femA* (132bp) بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



الشكل 8: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S9-S14) المعزولة من الجروح و-S15 من الدم باستعمال البادئ النوعي لجين *femA* (132bp)، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.





الشكل 9: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S17-S20) المعزولة من الجلد و - (S21S24) معزولة من الأذرار بأستعمال البادئ النوعي لجين *femA* (132bp) ، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.

#### 4-7 التحري الجزيئي عن بعض جينات المقاومة في بكتريا MRSA

##### 4-7-1 جين مقاومة الميثيسيلين ( *mecA* gene )

يعد تطوير المقاومة للمضادات الحيوية تهديدا رئيسا للبشرية لذلك فقد اتجهت منظمة الصحة العالمية مؤخرا إلى تصنيف الاحياء المجهرية بحسب مقاومتها وخطورتها وقد احتلت بكتريا المكورات العنقودية موقعا مهما في هذا التصنيف بالنظر لاستعمارها حوالي ثلث الاشخاص في العالم , , Haaber *et al* . ( 2017 ) .

أستخدم جين *mecA* في هذه الدراسة لتحديد البكتريا *S.aureus* المقاومة للميثيسيلين جزيئيا. إذ تم استخلاص الحامض النووي DNA من 24 عزلة مقاومة مظهريا للميثيسيلين وأظهرت النتائج إن البادئ الخاص بهذا الجين أعطى تضخيما ناجحا عبر ظهور ناتج PCR بحجم يبلغ 310bp ولجميع العزلات البكتيرية قيد الدراسة بحسب ما هو موضح في الجدول 17 والأشكال 10 و11 و12 لذا فإن التشخيص جاء مطابقا للتشخيص المظهري المتمثل بمقاومة العزلات للمضادين

.Cefoxitin و Penicillin

الجدول 17: توزيع الجينات المختبرة في عزلات *S.aureus*

<i>hlb</i>	<i>lukED</i>	<i>tetK</i>	<i>mecA</i>	<i>femA</i>	ت
+	+	+	+	+	S1
+	-	+	+	+	S2
+	-	+	+	+	S3
+	+	+	+	+	S4
+	+	+	+	+	S5
+	+	+	+	+	S6
+	-	+	+	+	S7
+	-	+	+	+	S8
+	+	+	+	+	S9
+	-	+	+	+	S10
+	+	+	+	+	S11
+	-	+	+	+	S12
+	-	+	+	+	S13
+	-	+	+	+	S14
+	+	+	+	+	S15
+	+	+	+	+	S16
+	+	+	+	+	S17
+	-	+	+	+	S18
+	+	+	+	+	S19
+	+	+	+	+	S20
+	+	+	+	+	S21
+	-	+	+	+	S22
+	+	+	+	+	S23
+	+	+	+	+	S24

تعزى المقاومة للمثيسلين إلى وجود Penicillin binding protein 2a (PBP2a) الذي يشفر عنه بواسطة الجين *mecA* (Chambers., 1988) يقع هذا الجين على منطقة في SCCmec (Staphylococcal cassette chromosomal, SCC mec) كما إن يوجد مدمجا (Integrated) على منطقة ثابتة على الكروموسوم قرب منشأ التكرار (Monecke *et al* 2021).

إن تشخيص البكتريا المقاومة للمثيسلين MRSA يُعد ضروريا للسيطرة على الإصابة بهذه البكتريا فضلا عن معالجة المرضى ، لهذا فإن التشخيص الجزيئي لجين المقاومة *mecA* يعد وسيلة مهمة في المايكروبيولوجي السريري (Bignardi *et al* .,1996).

و تتفق النتائج المستحصلة في هذه الدراسة مع ما وجدته (Nasution *et al* ., 2018) في دراسة اجريت في احد مستشفيات اندونيسيا إذ إن جميع عزلات بكتريا *S.aureus* البالغ عددها 40 كانت مقاومة للمثيسلين بينما لا تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما تم التوصل إليه في دراسات محلية وأخرى عالمية ، ففي دراسة أجريت في المثني اتضح أن خمس عزلات فقط من بين 19 عزلة لبكتريا *S.aureus* كانت MRSA (Kokas.,2015).

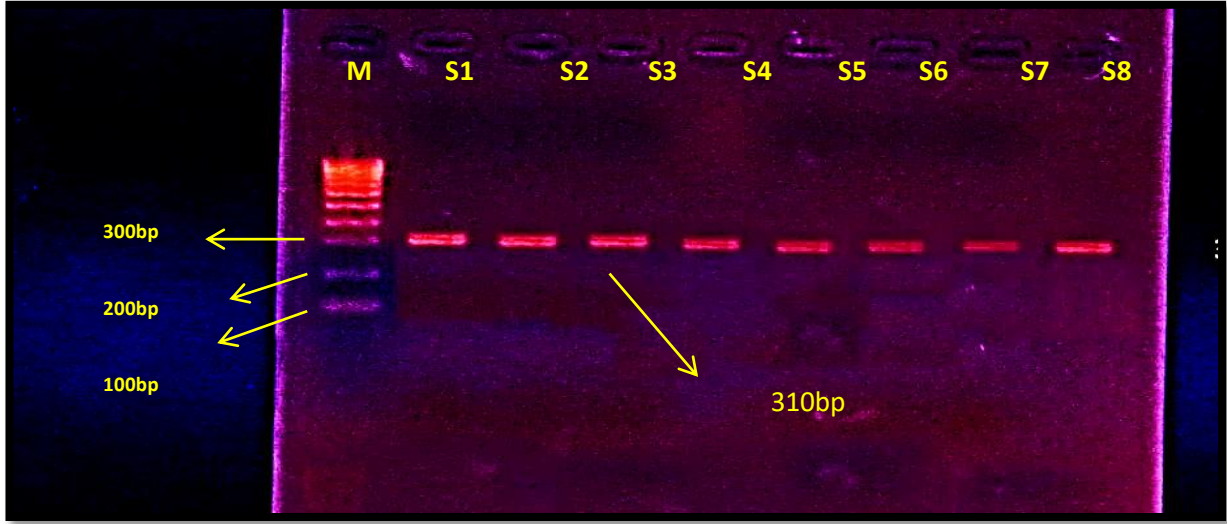
وفي دراسة أجريت في ايطاليا قام بها (Scapoli *et al* (2022) تبين أن 3.1% فقط من عزلات هذه البكتريا كانت MRSA بينما بلغت نسبة هذه البكتريا 22.2% في دراسة أجريت في نيجريا (Alli *et al* ., 2011). وفي دراسة اخرى في العراق كان جين *mecA* متواجد بنسبة 76.67% من العزلات المتحصل عليها في تلك الدراسة (Ahmed and Ahmed 2022).

وأجريت دراسة أخرى في النيبال قام بها (Dhungel *et al* ., 2021). إذ أشارت إلى ارتفاع نسبة البكتريا الحاملة لجين *mecA* بواقع 94.1% .

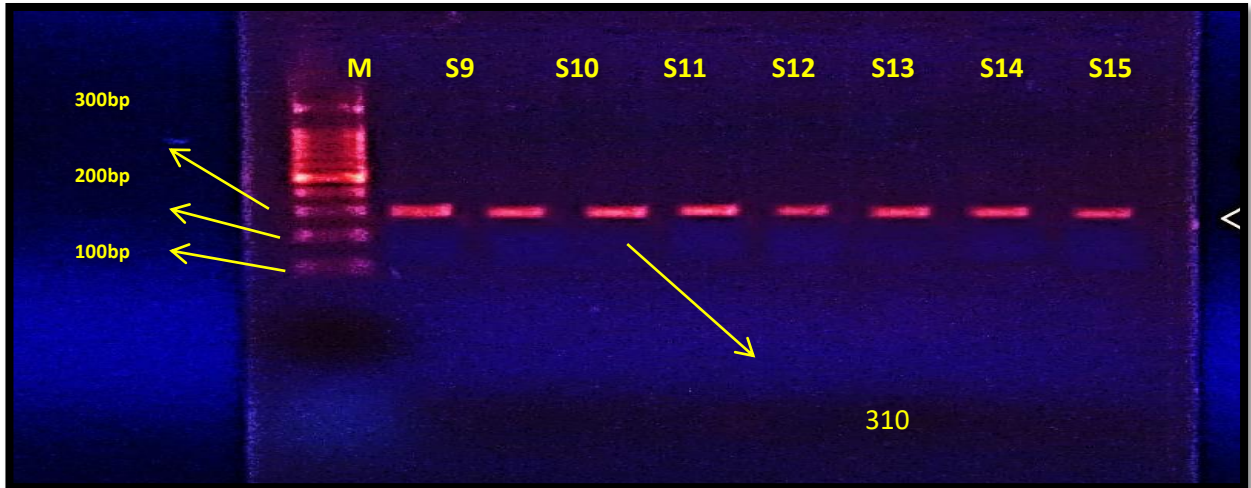
#### 2-7-4 : التحري عن جين مقاومة التتراسيكلين *tetk*

يعد التتراسايكلين من الأدوية الامنة ذات الطيف التثبيطي الواسع وسميتها القليلة فضلا عن كلفتها الواطئة ، وتتلخص مقاومة البكتريا لهذا المضاد باليتين الأولى الأكثر شيوعا وهي الإخراج الفعال

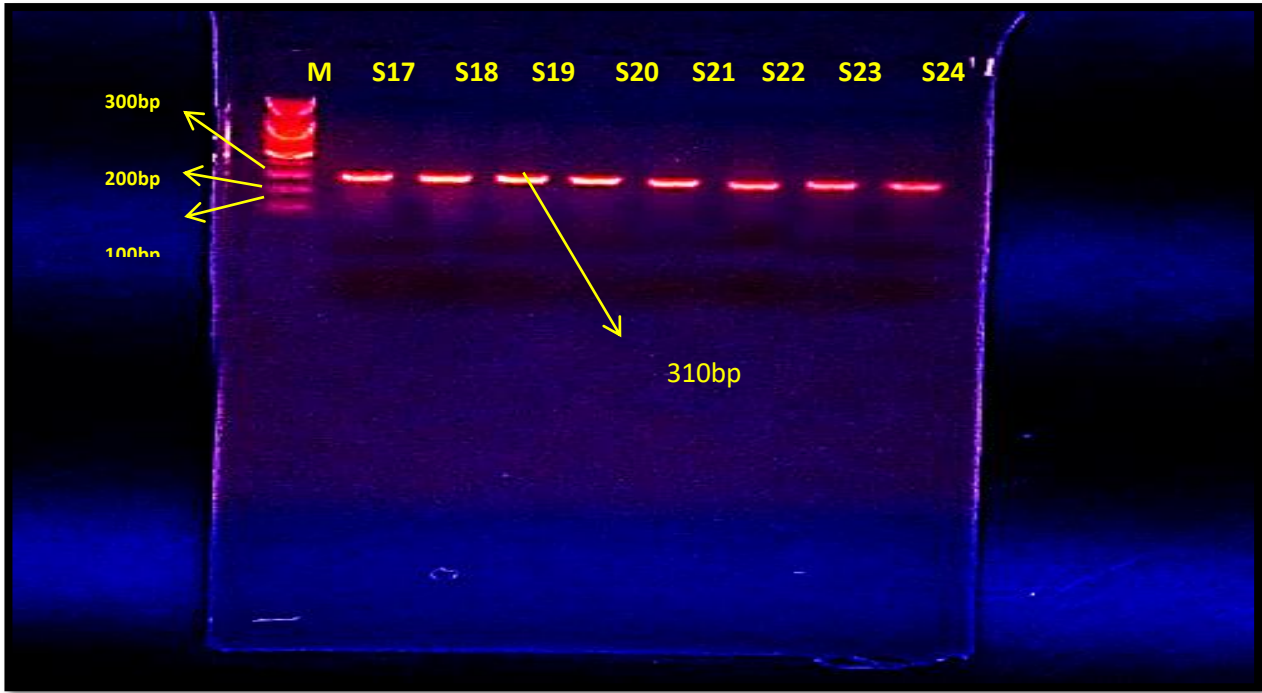
(Active efflux) للمضاد من البكتيريا مما يؤدي إلى تخفيف تركيز المضاد داخل الخلية، والثانية الأقل شيوعا المتمثلة بإيقاف فعالية المضاد عن طريق عمليات الأكسدة والاختزال (Redox process) . (Jeony *et al.*.,2010,Kumar *et al.*,2013)



الشكل 10: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا *S.aureus* (S1-S8) المعزولة من الحروق باستعمال البادئ النوعي لجين *mecA* (310 bp)، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



الشكل 11: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتيريا *S.aureus* (S9-S14) المعزولة من الجروح و-S15 من الدم باستعمال البادئ النوعي لجين *mecA* (310bP)، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.

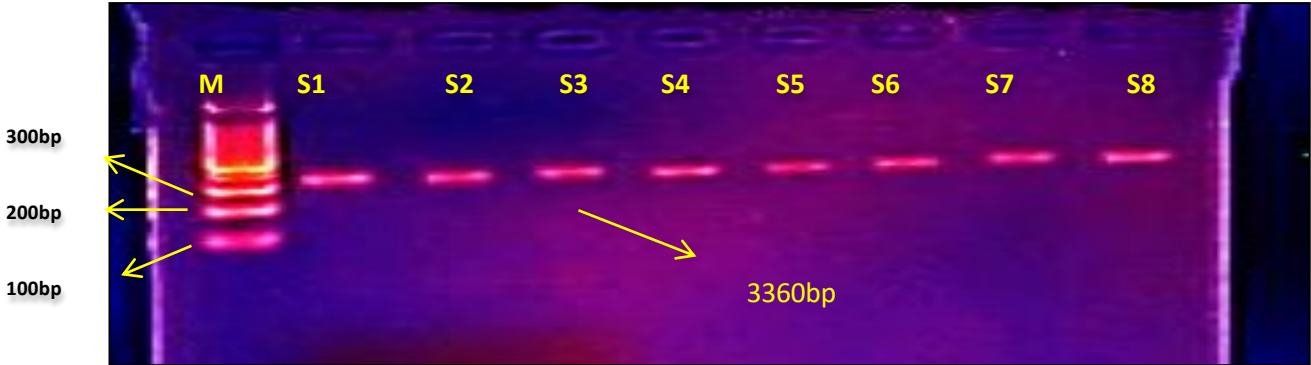


الشكل 12: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S17-S20) معزولة من الجلد و (S24-S21) المعزولة من الأدرار باستعمال البادئ النوعي لجين *mecA* (310bp)، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.

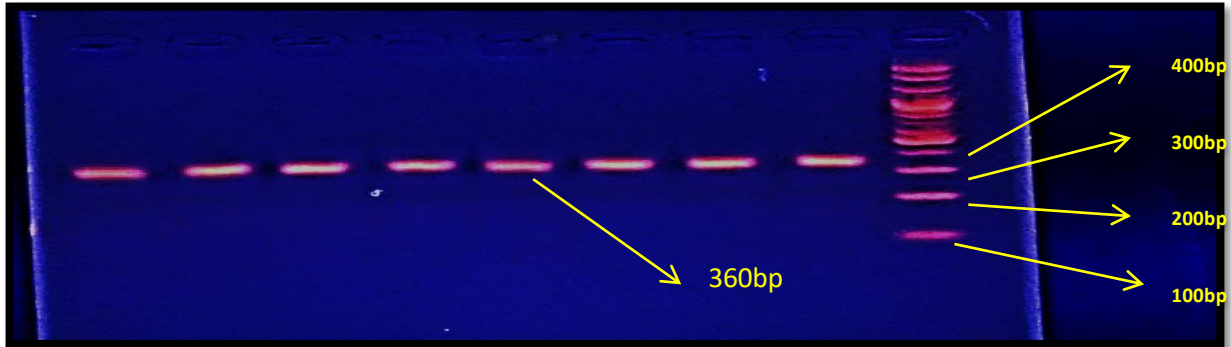
استخدم جين *tetK* في هذه الدراسة لتحديد بكتريا *S.aureus* المقاومة للنتراسايكلين . يتضح من الأشكال 13 و14 و15 والجدول 17 إن البادئ الخاص بهذا الجين كان ناجحا في التضخيم عبر ظهور ناتج PCR ذو حجم 360 bp ولجميع العزلات البكتيرية الأربع والعشرين المعزولة من مصادر مختلفة (الحروق والجروح والجلد والادرار والدم ) مما يشير إلى أن مقاومة العزلات للنتراسايكلين كانت 100%.

تفاوتت نسب تعبير جين التتراسايكلين في بكتريا *S.aureus* من منخفضة إلى متوسطة إلى مرتفعة . فقد اشارت احدى الدراسات المحلية إلى وجود هذا الجين بنسبة 35% من العزلات البكتيرية المتحصلة من اربيل (Aziz and Abdulrahman ., 2021) بينما بلغت هذه النسبة 46% في دراسة اجريت في باكستان (Ullah et al ., 2012) ووصلت إلى 82.75% في دراسة قام بها khoramrooz (2017) et al ., في ايران وارتفعت لتصل الى 100% في دراسة أجريت في مصر بما يتفق مع نتائج دراستنا الحالية (El-Tawab et al ., 2022).

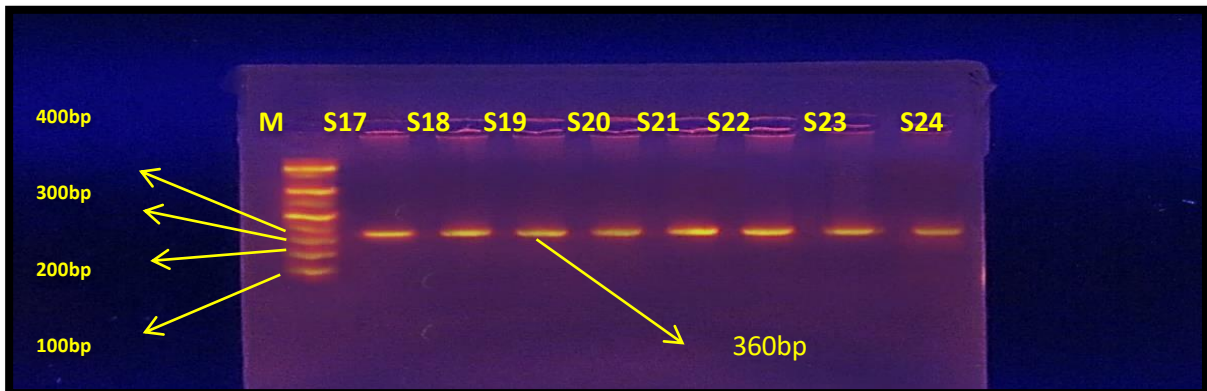
تتمثل الية عمل مضاد التتراسيكلين في تثبيط تخليق البروتين البكتيري عن طريق منع ارتباط المركب Aminoacyl.tRNA مع الرايبوسوم البكتيري (Chopra and Roberts.,2001).



الشكل 13: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S1-S8) المعزولة من الحروق باستعمال البادئ النوعي لجين *tetk* (360bp) ، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة



الشكل 14: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S9-S14) المعزولة من الجروح و-S15 S16 من الدم باستعمال البادئ النوعي لجين *tetk* (360bp) ، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



الشكل 15: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S17-S20) معزولة من الجلد و (S21-S24) المعزولة من الادرار باستعمال البادئ النوعي لجين *tetK* (360bp) ، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.

## 8-4 التحري عن بعض عوامل الضراوة في البكتريا المقاومة للمثيسلين بالطرائق التقليدية والجزئية

### 1-8-4 الكشف عن قابلية بكتريا *S.aureus* على انتاج الغشاء الحيوي

يلعب الغشاء الحيوي دورا محوريا في الالتهابات المزمنة، إذ يؤدي التعلق البكتيري على سطح الركيزة (Substrate surface) إلى تكوين الأغشية الحيوية والتي بدورها تشكل حاجزا يصعب اختراقه مما يتسبب في تطور العدوى المزمنة وتكون هذه البكتريا مقاومة للمضادات الحيوية والمناعة أكثر من البكتريا غير المكونة للأغشية (Sedarat and Taylor -Robinson., 2022).

استخدمت في هذه الدراسة طريقتان لتقدير الغشاء الحيوي في بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثيسلين MRSA هما طريقة الانابيب (Tube method) وطريقة الصفيحة (Microtiter plate assay) يتضح من الجدول 18 أن جميع العزلات مكونة للغشاء الحيوي سواء أكانت بالكشف النوعي أم الكمي وبنسبة 100% وتوزعت قوة انتاج الغشاء في العزلات بين قوية الانتاج وأخرى متوسطة وثالثة ضعيفة الانتاج ففي الطريقة النوعية تم تحديد سبع عزلات (29.16%) منها قوية الانتاج وهي كل من S1,S2,S7,S9,S15,S18,S22 وأخرى متوسطة بعدد 12 (50%) والمتمثلة بالعزلات S3,S5,S6,S12,S13,S14,S16,S19,S20,S21,S23,S24 فيما اقتصرت ذات الانتاج الضعيف على خمس عزلات فقط (20.8%) وهي S4,S8,S10,S11, S17. أما عند استخدام الطريقة الكمية المتمثلة بطريقة الصفيحة للكشف عن الغشاء الحيوي فقد أظهرت النتائج إن هناك ست عزلات ذات انتاج قوي للغشاء (25%) وهي S1,S2,S7,S9,S15,S22 بينما كان ثلثا العزلات متوسطة الانتاج بنسبة 66.6% بواق مع 16 عزلة وهي S3,S4,S5,S6,S8,S10,S11,S12,S13,S14,S16,S18,S19,S20,S21,S23 الضعيفة على عزلتين فقط بنسبة 8.3% وهي S17,S24 ومن ملاحظة النتائج لكلا طريقتي تقدير الغشاء الحيوي يتبين وجود نسبة من التطابق بينهما بلغت 75%.

إن الكشف عن الغشاء الحيوي يعتمد على عوامل عدة منها الطريقة المتبعة في الكشف ونوع الوسط وظروف الحضان ويرجع التفاوت بين كلتا الطريقتين إلى إن الطريقة المعتمدة على المطياف الضوئي

تكون أكثر حساسية وسهلة وغير مكلفة ولا تحتاج إلى المعدات المتطورة ، فضلا عن امكانية استخدامها في اختبار المركبات المضادة للأغشية الحيوية Test of anti biofilm compound (Azeredo et al.,2017).

وقد اتضح من خلال دراسة في كوريا شملت 126 عزلة من بكتريا *S.aureus* ان 86 عزلة (68.3%) منتجة للغشاء الحيوي من بينها 5 عزلات قوية الانتاج و81 عزلة ضعيفة الانتاج فيما كانت 40 (31.7%) عزلة غير مكونة لهذا الغشاء (Cha et al., 2013).

وفي دراسة أخرى في الصين شملت 137 عزلة بكتيرية بلغ عدد البكتريا ذات الانتاج الضعيف للغشاء الحيوي 18 (13.1%) بينما ارتفع هذا العدد الى 36 (26.3%) لكل من متوسطة و قوية الانتاج (Yu et al.,2020)، فيما بينت دراسة في الهند ان 33.33% من العزلات ذات انتاج قوي للغشاء وهي نسبة مقارنة لما تم الحصول عليه في دراستنا الحالية (Verma and Naheshwan.,2017).

وأشارت دراسة أخرى إلى أن المكورات العنقودية المتحصل عليها من مصادر سريرية مختلفة كانت متفاوتة من حيث قابليتها على انتاج الغشاء الحيوي إذ توزعت بين القوية والمتوسطة والضعيفة بنسب (12.30 و30.16 و57.54) % بطريقة الأنبوبة ( Tube method ) وبنسب (15.64 و38.55 و45.81) % بطريقة الصفيحة بما لا يتوافق مع نتائج دراستنا (Bose et al.,2009).

ويتضح من ملاحظة الأشكال (16 و17 و18) إن جميع العزلات مقاومة بنسبة 100% للمضادات التابعة للمجاميع Penicillins, Cephalosporines, Carbapenems، إذ لا يوجد تفاوت في مقاومتها سواء أكانت ذات انتاج ضعيف أم متوسط او قوي للغشاء الحيوي . فيما كان هنالك تفاوتنا واضحا لتسع مضادات أشتملت على CIP و GAT و MXF و NOR و OFX و CLI و ERY و RIF و SXT اذ كانت البكتريا ذات الغشاء الضعيف حساسة لجميع المضادات المذكورة وبنسبة 100%.

ومن خلال التمعن في الشكل 17 يلاحظ ظهور مقاومة لتلك المضادات بين العزلات ذات الانتاج المتوسط للغشاء الحيوي، إذ كانت مقاومة بنسبة 12.5% لكل من CIP و Gat و MXF و NOR و



OFX وينسب ( 18.75 و 25 و 31.25 ) % للمضادات RIF و ERY و CLI ، على التوالي . ارتفعت المقاومة ايضا في العزلات قوية الانتاج للغشاء الحيوي مقارنة مع العزلات الضعيفة والمتوسطة لأنتاج هذا الغشاء وبنسبة 16.66% للمضادات CIP و GAT و MXF و NOR و OFX و RIF و SXT و نسبة 66.66% لكلا من المضادين CLI و ERY كما هو موضح في الشكل 16.

و أشارت احدى الدراسات التي اجريت في اليابان ان بكتريا *S.aureus* المكونة للغشاء الحيوي كانت مقاومة للمضادات Amp و CIP و ERY بنسبة ( 60 و 86.7 و 50 )% على التوالي (Neopane et al ., 2018).

وهناك ثلاثة اسباب على الأقل لمقاومة البكتريا المكونة للغشاء الحيوي للمضادات الأول يتمثل بتأخير وصول المضادات الحيوية إلى داخل الخلية بفعل طبقة متعدد السكريد الخارجي ( EPS ) أو تفاعل الأخيرة مع المضادات الحيوية وتعطيلها ، والثاني هو أن الكائنات المكونة للغشاء الحيوي تكون ذات معدل نمو منخفض وبذلك يؤخذ المضاد الى داخل الخلية وهذا يؤثر على حركات التنشيط ، وأخيرا قد توفر البيئة المحيطة بالخلايا داخل الاغشية الحيوية الرقيقة ظروف حماية للكائن الحي بصورة مباشرة (Dolan ., 2001) .

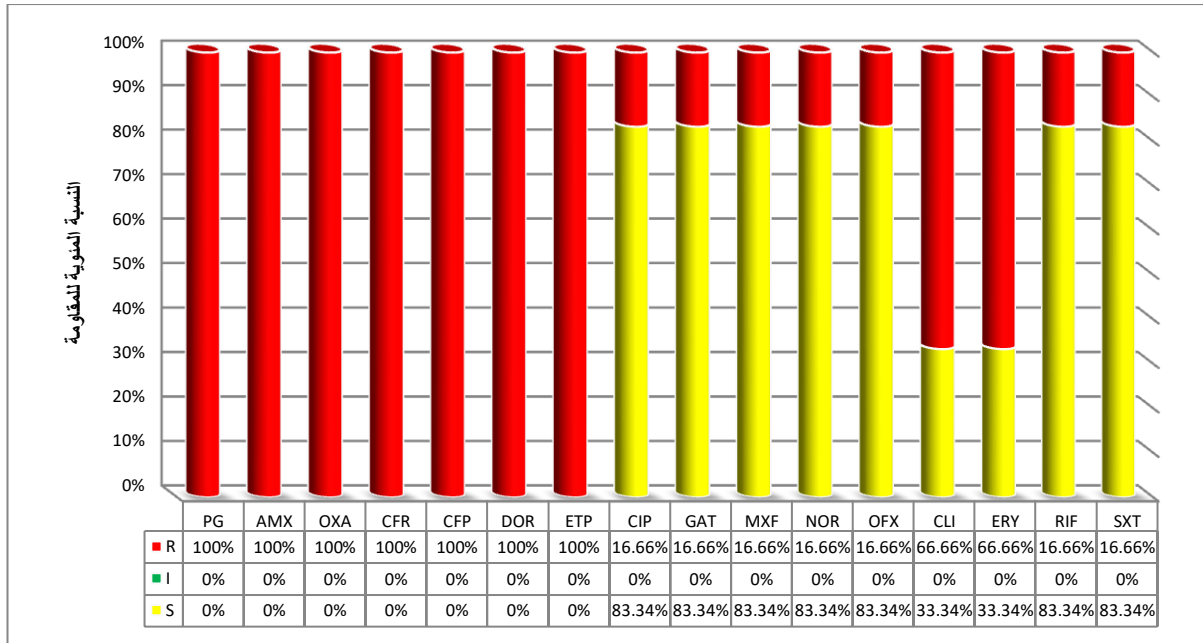
الجدول 18: توزيع بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثيسلين بحسب انتاجها للغشاء الحيوي باستخدام الطريقتين النوعية والكمية .

الطريقة الكمية		الطريقة النوعية		العزلات المنتجة للغشاء الحيوي
النسبة المئوية %	العدد	النسبة المئوية %	العدد	
25	6	29.16	7	قوية الانتاج +++
66.6	16	50	12	متوسطة الانتاج ++
8.3	2	20.8	5	ضعيفة الانتاج +

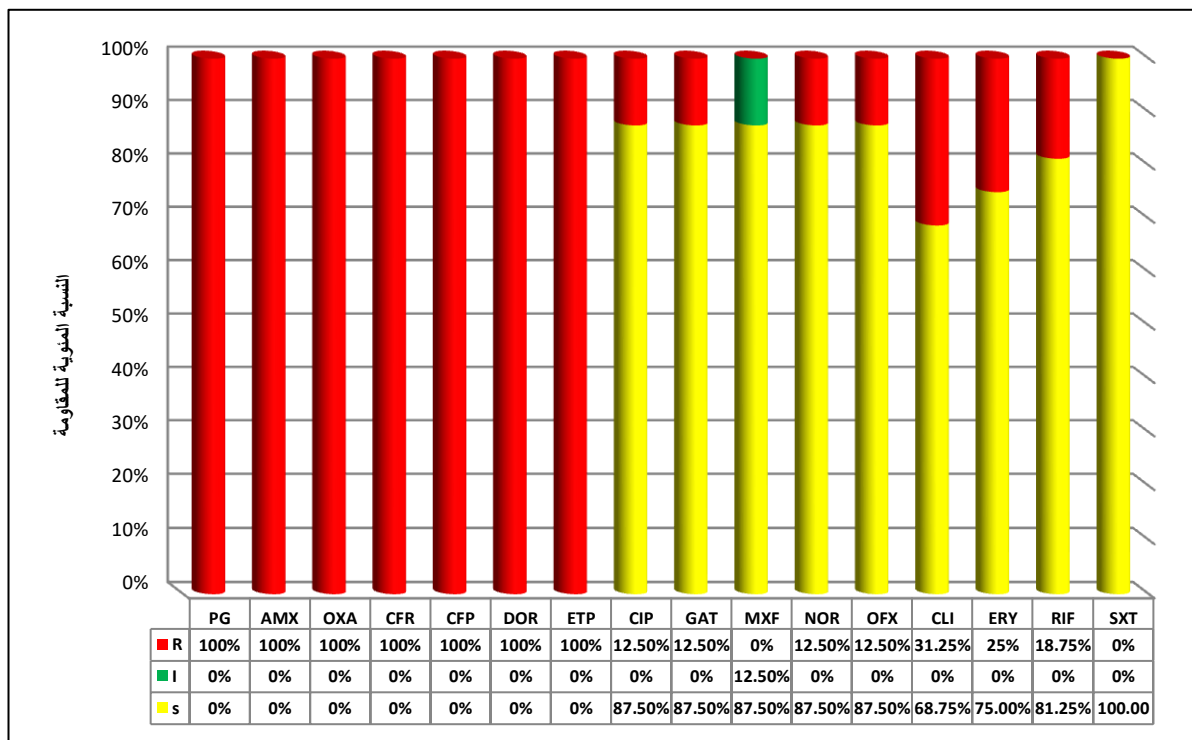
+++ بكتريا ذات انتاج قوي للأغشية الحيوية

++ بكتريا ذات انتاج متوسط للأغشية الحيوية

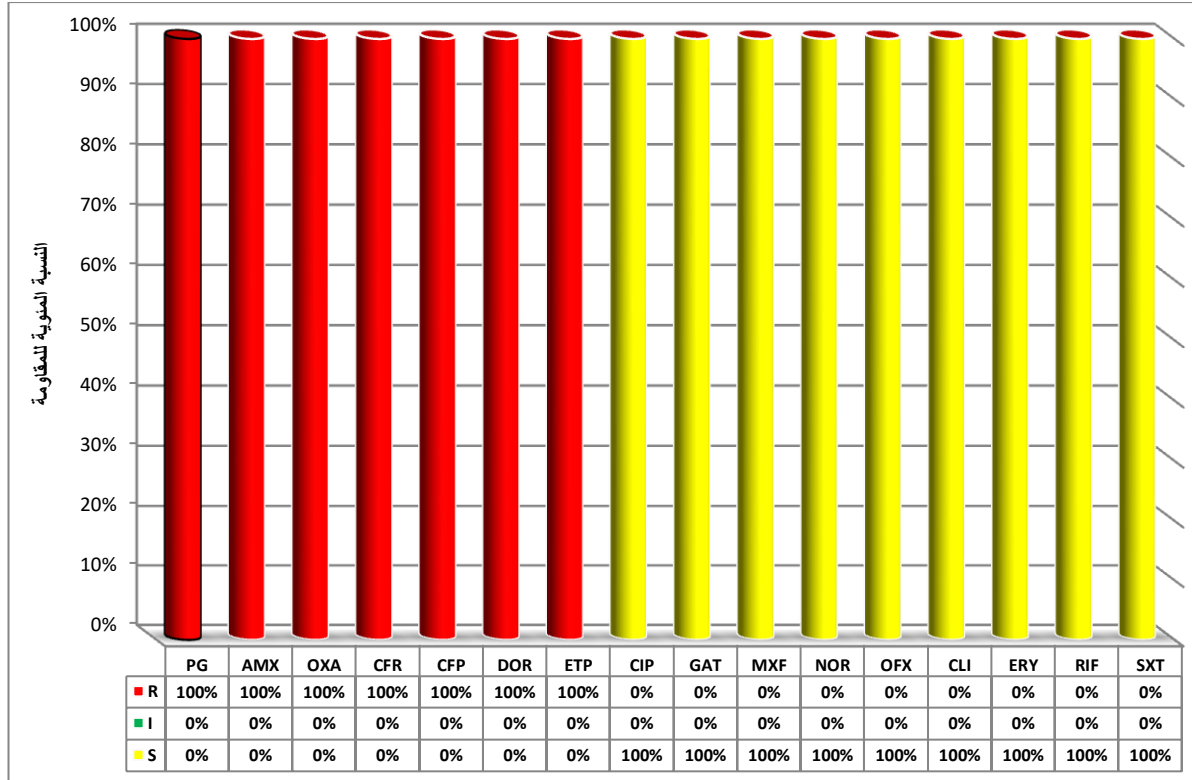
+ بكتريا ذات انتاج ضعيف للأغشية الحيوية



الشكل 16 : النسب المنوية لمقاومة المضادات الحيوية في بكتريا *S.aureus* (MRSA) ذات الانتاج القوي للغشاء الحيوي.



الشكل 17 : النسب المنوية لمقاومة المضادات الحيوية في بكتريا *S.aureus* (MRSA) ذات الانتاج المتوسط للغشاء الحيوي.



الشكل 18: النسب المئوية لمقاومة المضادات الحيوية في بكتريا *S. aureus* (MRSA) ذات الانتاج الضعيف للغشاء الحيوي.

#### 2-8-4 : تقدير فعالية انزيم البروتياز (protease) المنتج من بكتريا *S. aureus* المقاومة للمثسلين.

تنتج بكتريا *S. aureus* انزيم البروتياز خارج الخلية ويكون هذا الانزيم من أهم عوامل الضراوة في هذه البكتريا وهو على أربعة انواع staphylococcal serine protease و Cysteine Protease و Aureolysin Metalloprotease و Staphopain ، إذ تلعب هذه الانزيمات دورا مهما في تدمير انسجة العائل والسماح للبكتريا باستغلال العناصر الغذائية وانتشارها في الأنسجة المجاورة (Zdzalik et al.,2012; IP., 2009 ;Karlsson and Arvidson.,2002).

قدرت فعالية انزيم البروتياز كليا لأربع وعشرين عزلة مقاومة للمثسلين باستخدام الكازئين كمادة تفاعل، إذ يُعد الكازئين المفصول من مصل اللبن مصدرا جيدا للبيبتيدات النشطة بيولوجيا (Shu et al.,2018).

اتضح من النتائج المتحصل عليها في الجدول 19 ان 20 عزلة ( 83.3 % ) منها منتجة لانزيم البروتياز موزعة بواقع ثلاث عزلات كانت ذات فعالية عالية وهي S8,S9,S21 ، وتميزت العزلة S9 بكونها أعلى العزلات انتاجية للانزيم بينما كانت أربع عزلات متوسطة الفعالية والمتمثلة ب S2,S7,S18,S23 و ثلاث عشرة عزلة منها ضعيفة الفعالية وتتمثل ب S1,S3,S4,S5,S6,S11,S12,S13,S15,S16,S17,S22, S24 ، S24 فعالية وهي S10,S14,S19,S20.

تقع عملية التعبير الجيني عن جينات البروتياز تحت سيطرة عاملين منظمين احدهما يحفز التعبير الجيني (Accessory gene regulator (agr) واخر كاجح للجين يعرف (Staphylococcal accessory regulator (SarA) (Shaw et al .,2004).

أجريت دراسة في السويد للتحري عن انتاج البروتياز للمكورات العنقودية الذهبية واتضح أن 21 عزلة متحصل عليها من مصادر سريرية اظهرت منطقة تثبيط على وسط الكازئين الصلب (Karlsson and Arvidson ., 2002).

وأظهرت دراسة محلية قام بها Humadi and Omar ., (2013) أن بكتريا *S.aureus* اعطت أعلى قطر تثبيط يبلغ 2.8 سم على وسط الحليب الصلب الخالي من الدسم ، فيما بلغت الفعالية 57.5 وحدة/ مل على وسط الكازئين السائل ، وفي دراسة محلية أخرى أجريت في بغداد بلغت فعالية انزيم البروتياز المنتج من بكتريا *S.aureus* 0.25 وحدة / مل باستخدام الاوساط الصناعية و0.24 وحدة / مل على عصير التمر (مهدي وعلي ., 2009).

وأشارت دراسة في بولندا ان 167 عزلة من المكورات العنقودية الذهبية معزولة من مصادر سريرية مختلفة كانت حاوية جين ( SspA ) V8 protease بنسبة 100% ونسبة 99% منها حاوية على جين Aureolysin و Staphopain A و 98% منها تحتوي على B Staphopain (Zdzalik et al ., 2012).

الجدول 19: غريلة عزلات بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثسلين لانتاج انزيم البروتيز

الفعالية وحدة امللتر	ت	الفعالية وحدة امللتر	ت
0.2	S13	1.95	S1
0.00	S14	3.87	S2
2	S15	1.37	S3
1.7	S16	1.52	S4
1.075	S17	1.37	S5
2.35	S18	0.4	S6
0.00	S19	4.7	S7
0.00	S20	6.5	S8
6.15	S21	13.9	S9
1.17	S22	0.00	S10
4.97	S23	0.9	S11
1	S24	0.6	S12

#### 3-8-4-: التحري عن الجين المشفر لسم *Leukocidin* (*LukED*)

هو مادة سامة مكونة للمسام تنتجها المكورات العنقودية الذهبية ، تقوم بتحليل خلايا المضيف وتعزز ضراوة البكتيريا. تمكن *LukED* بكتيريا *S. aureus* من الحصول على الحديد عن طريق تحلل كريات الدم الحمراء (Vasquez et al., 2020).

استخدم جين (*LukED*) في هذه الدراسة لتحديد البكتريا المستعدة جزيئيا لانتاج السم القاتل والمحلل لخلايا الدم البيضاء ، فقد تم اختبار 24 عزلة *S.aureus* (MRSA) وتوضح نتائج

الترحيل الكهربائي في الاشكال 19 و20 و21 إن البادئ الخاص بهذا الجين كان ناجحا في التضخيم عبر ظهور حزم جينية ذات حجم 269bp ويتضح من النتائج أيضا أن 14 عزلة (58.3%) تمتلك هذا الجين .

تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ماتم الحصول عليه في دراسة أجريت في Benin ، إذ بلغت نسبة الظهور لهذا الجين 56% (Baba - Moussa et al., 2010). فيما اشارت دراسة اخرى اجريت في ايران الى ظهوره بنسبة (66.26%) (Khosravi et al., 2012).

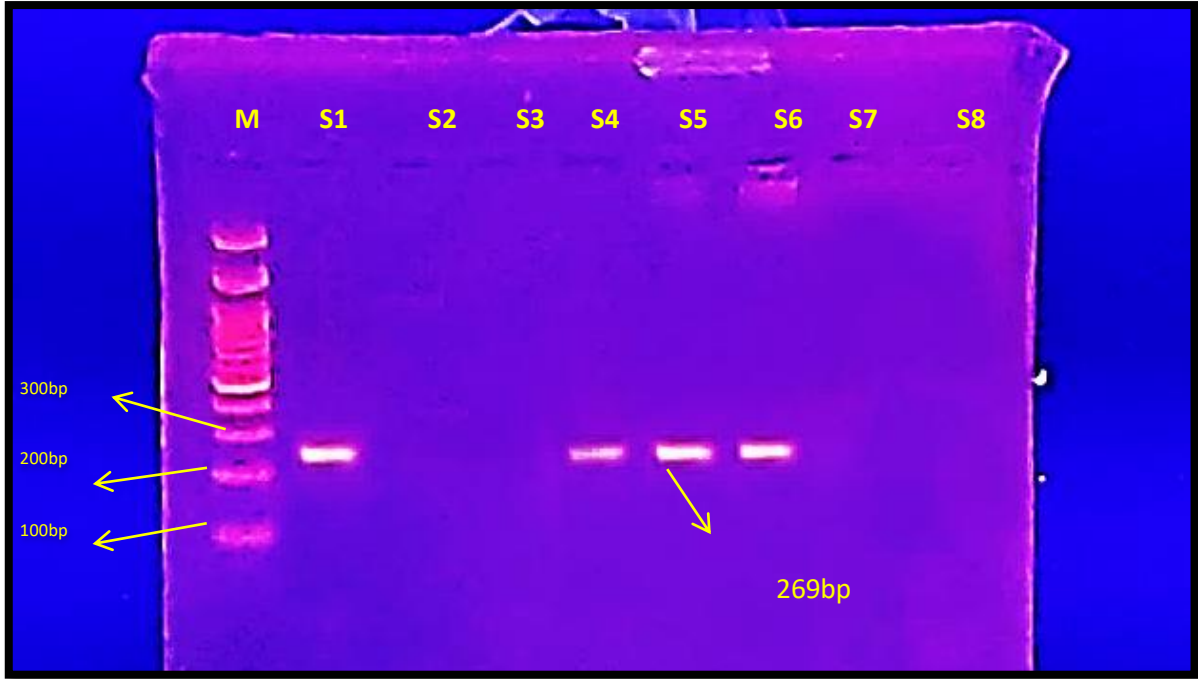
وأجريت دراسات عدة للتحري عن هذا الجين في بكتريا *S.aureus* ومنها ثلاث دراسات في الصين اتضح خلال الأولى التي قام بها Liu et al., (2015) أن نسبة تردد الجين المذكور سابقا بلغت 88.3% وهي أعلى بكثير من نسبة التردد في الدراسة الحالية بينما بينت الدراسة الثانية ان نسبة ظهور الجين في العزلات منخفضة جدا مقارنة بدراستنا وبواقع 27% (Zhu et al., 2022) ، فيما بينت الدراسة الثالثة أن نسبة ظهور الجين في عزلات البكتريا قيد الدراسة 68.1% (He et al., 2018) .

و يمكن أن تنتج السلالات البكتيرية المسببة للإصابات في الإنسان ما يصل إلى خمسة أنواع من سم Leukocidine تشتمل على (*LukSF-PV / PVL* و *HlgAB* و *HlgCB* و *LukED* و *LukAB* ، والمعروف أيضًا باسم *LukHG*) (Robles et al., 2013) .

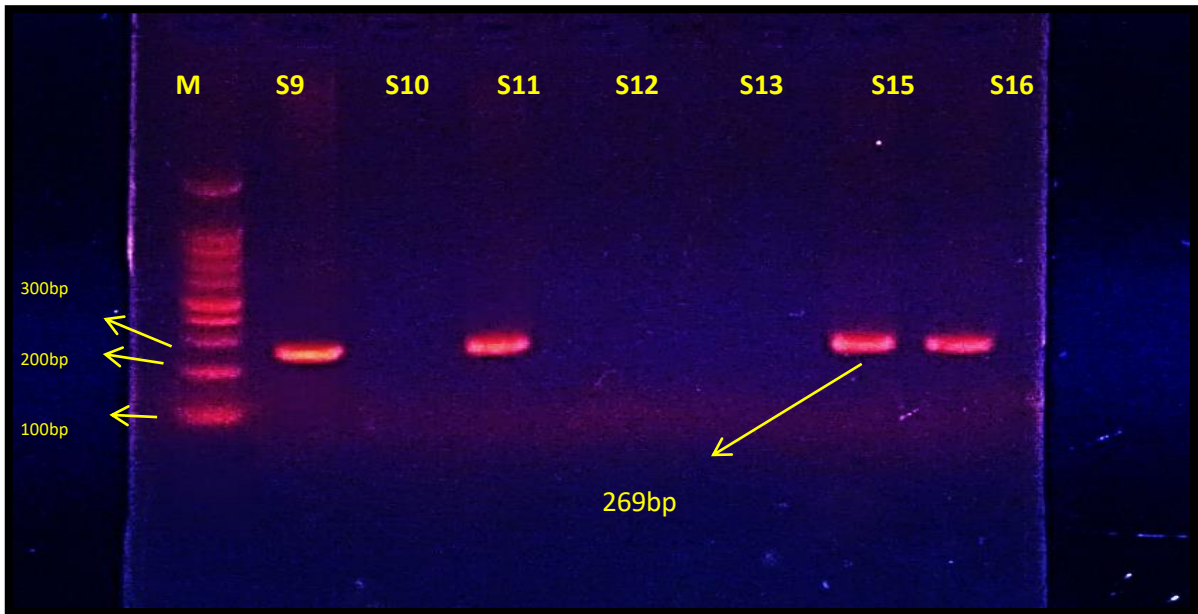
تشكل جينات الليكوسدين اوبرونا مميزا عن باقي الليكوسيديئات عبر وقوعه على جزر امراضية متغيرة (Variable pathogenicity island) فتمكن البكتريا من اكتسابها عن طريق الانتقال الجيني الافقي (Alonza et al., 2012) .

#### **4-8-4: التحري عن الانزيم الحال للدم بالطرائق الجزيئية والتقليدية :**

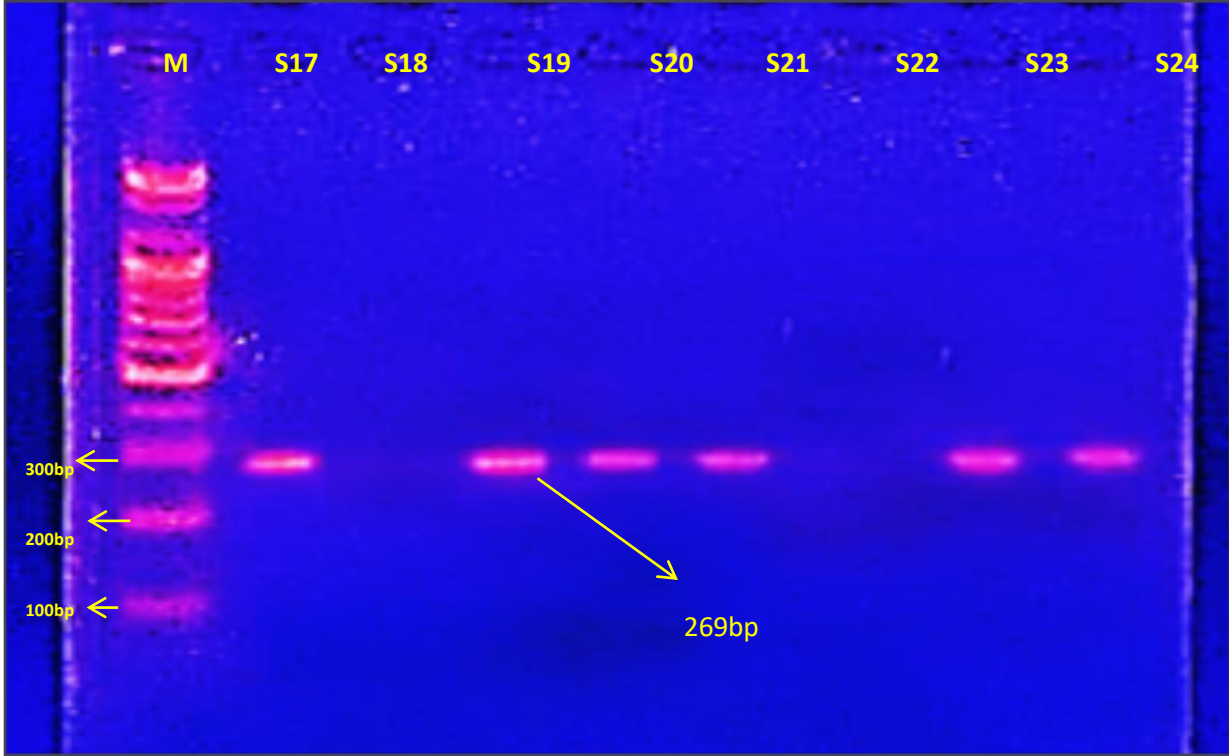
تستطيع بكتريا *S.aureus* أن تعبر عن مجموعة واسعة من عوامل الضراوة تتضمن البروتينات السطحية التي تعزز الالتصاق بالأنسجة المتضررة أو تفرز السموم الخارجية التي تتسبب بدورها في العديد من الإصابات المختلفة في الجلد والأنسجة الرخوة (Delgado et al., 2011) .



الشكل 19: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S1-S8) المعزولة من الحروق باستعمال البادئ النوعي لجين *LukED* (269bp) ، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



الشكل 20: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S9-S14) المعزولة من الجروح و(S15-S16) من الدم باستعمال البادئ النوعي لجين *LukED* (269bp) ، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



الشكل 21: الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S17-S20) معزولة من الجلد و (-S21 S24) معزولة من الادرار باستعمال البادئ النوعي لجين *LukED* (269bp)، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.

من بين هذه السموم الانزيم الحال للدم Hemolysin ، إذ يعد هذا الانزيم من أهم عوامل ضراوة هذه البكتريا ويسبب تحلل للدم . وتنتج بكتريا *S.aureus* المقاومة للميثسليين على الأقل أربعة أنواع من السم الحال للدم تشتمل هذه الأنواع على سم الفا وبيتا وكاما ودلتا (Wang et al ., 2020). التي تتمكن من تلف الغشاء البلازمي لخلايا المضيف (Zhang et al ., 2016; et al ., 2012). (Vandenesch .

أستخدم في هذا الدراسة جين *hly* للتحري عن الانزيم جزئيا، إذ اختبرت أربع وعشرين عزلة مقاومة للميثسليين بأستخدام البادئ *hly* ، ويتضح من النتائج أن هذا البادئ اعطى تضخيما ناجحا وذلك بظهور حزم جينية ذات حجم 300 bp ومن خلال التمعن في الصورة تبين أن جميع العزلات حاوية على جين *hly* وبنسبة 100% كما هو موضح بالأشكال 22 و23 و24.

و يكون السم الحال للدم الفا ذو تأثير ساما على خلايا الثدييات وذو تأثير جزئي على خلايا الدم الحمراء للأرانب وقاتلا لها بتركيز 1 مايكرو غرام ، اما سم بيتا فيكون فعالا على دم الاغنام وليس له تأثير على دم الأرانب وغير قاتل لها ، ويتم التشفير له عن طريق جين *hly* محمول على الكرموسوم ، يتكون هذا



السم من سلسلة بيتيدية تحتوي 330 حمض اميني بوزن جزيئي 39000 . Nasaj et al ; (.,2020;Divyakolu et al ., 2019; Dinges et al ., 2000)

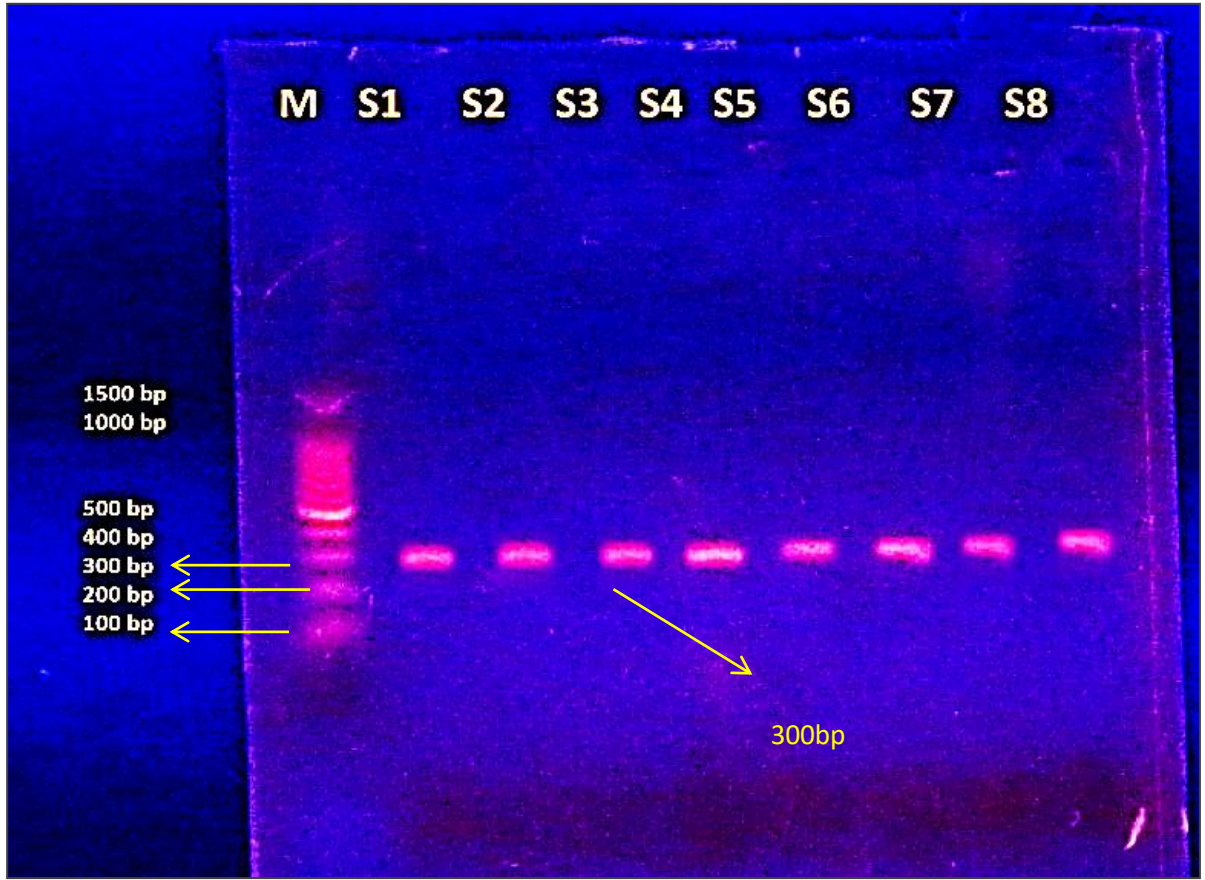
أما التحري عن الانزيم بالطرائق التقليدية باستخدام المطياف الضوئي فقد تم انتقاء ثلاث عزلات وهي S6,S9,S22 بوصفها محللة للدم بصورة واضحة على وسط اكار الدم وذلك بأخذ قراءة معكوس أعلى تخفيف اعطى تحللا كاملا اشارت نتائج الاختبار الكمي للتحلل الدموي إلى أن الفعالية الانزيمية كانت (10و10و20) وحدة تحلل/ مل على التوالي كما هو موضح في الشكل 25 وباستخدام الوسط الزراعي(Chemical define media (CDM) . يمكن أن يعزى انخفاض الفعالية إلى أن عزلات *S.aureus* المعزولة من الانسان تشفر للإنزيم الحال من نوع بيتا ولكن لا تتمكن من التعبير عنه ( Todar ., 2006 ) مما يؤيد نتائج دراستنا الحالية إذ كانت جميع العزلات حاملة للجين المشفر للسم الحال للدم من نوع بيتا إلا أن العزلات المنتقاة كانت ضعيفة الفعالية الانزيمية .

والجدير بالذكر أن الدم المستخدم في التحري عن الانزيم كيميا هو دم الاغنام بسبب كثرة وجود المادة الدهنية Sphingomyelin لذلك تكون حساسة للإنزيم من نوع بيتا ويعزز ايون المغنسيوم  $Mg^{+2}$  من فعالية الانزيم (Huseby et al .,2007).

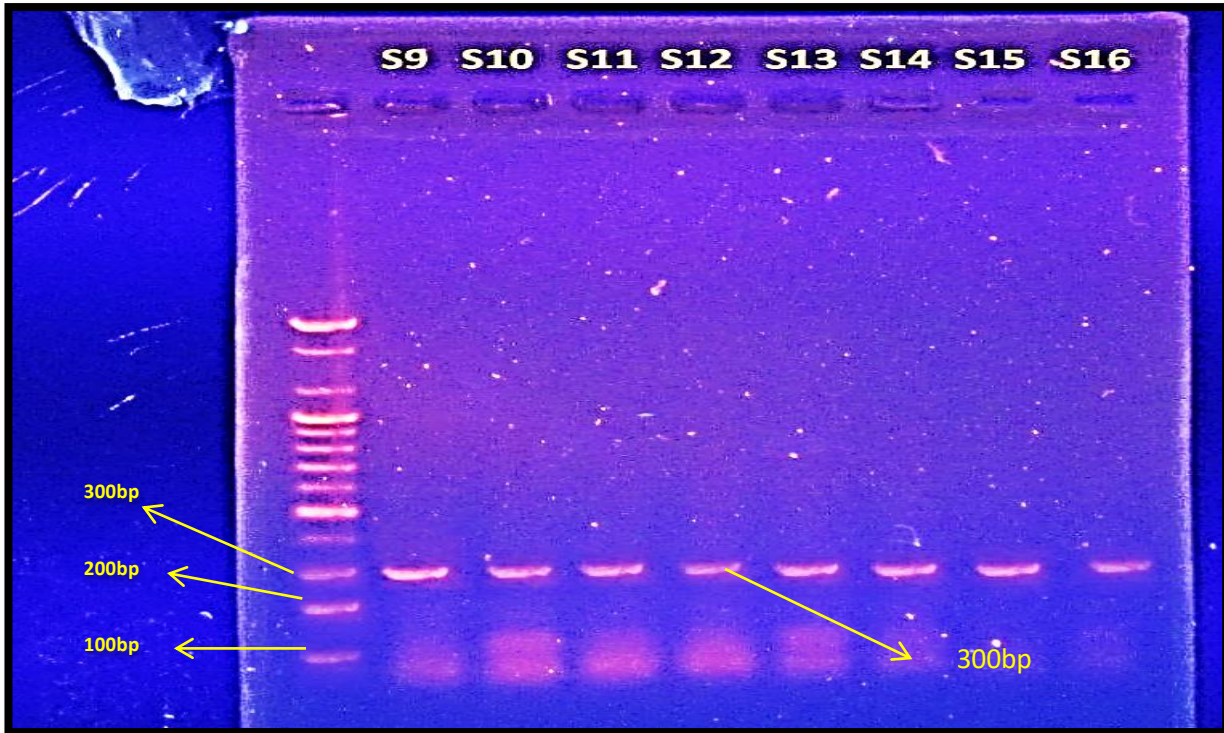
يساهم السم الحال للدم في تهرب البكتريا من الاستجابة المناعية للمضيف كما يعزز من قابلية البكتريا على احداث الامراض بالنظر لإمكانية البكتريا من تحويل انسجة المضيف الى مغذيات مطلوبة لنمو البكتريا ( Dinges et al ., 2000 ; Ariyanti et al.,2011 ).

أجريت العديد من الدراسات على المستوى المحلي والعربي والعالمى للتحري عن جين *hly* في بكتريا *S.aureus* وتوزع تردد الجين بين المنخفض والمتوسط والمرتفع في العزلات السريرية المعزولة في ثماني دراسات إذ بلغت نسب التحلل ( 5.07 و 40 و 40 و 79.17 و 93.94 و 97,4 و 100 و 100 )% على التوالي شملت ( ايران و الهند و العراق والصين والمانيا وباكستان ) لذا تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما تم الحصول عليه في المانيا وباكستان (Moraveje et al .,2014;Karmakar et al.,2016 ; Saleem., 2017;Motamedia et al 2018; Tuchscher et al ., 2019; Wang et al ., 2020; Lin et al .,2021;Khan et al.,2021).

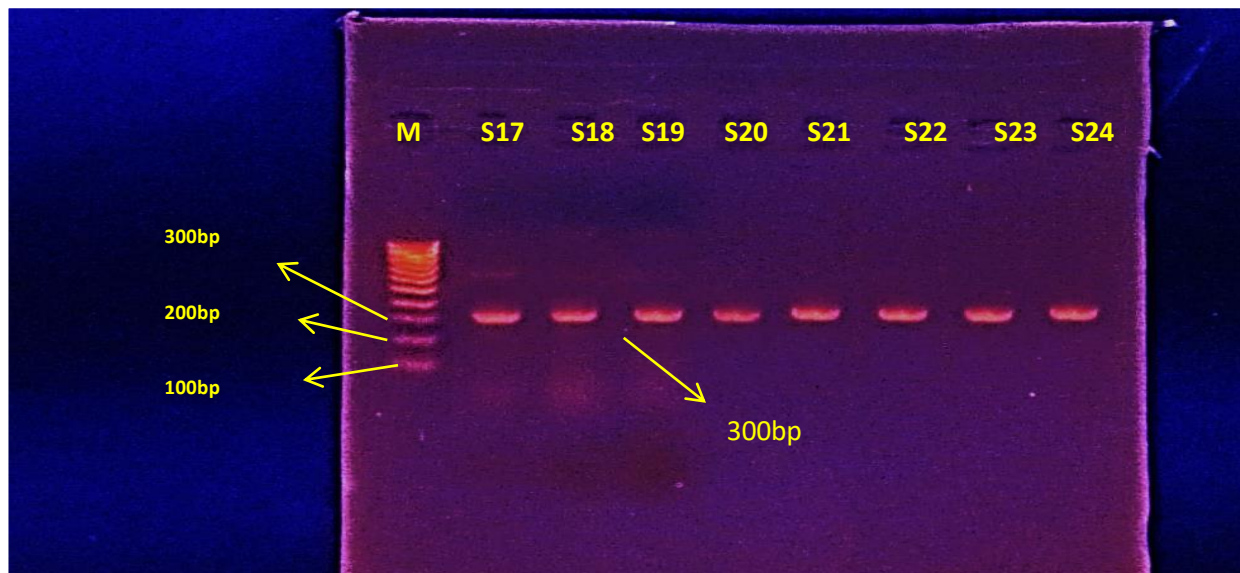
كما تتفق أيضا في جزء منها مع ما وجدته ( Desouky et al ., (2014) إذ بلغت نسبة التحلل (8.2 و22.2 و23.6%) في دراسة في مصر ، كما لا تتفق مع نتائج احدى الدراسات التي اجريت في مصر ايضا إذ كانت فعالية الهيمولايسين مرتفعة لعزلتين سريرتين بلغت ( 166 و 281 )% (Almwafy., 2020).



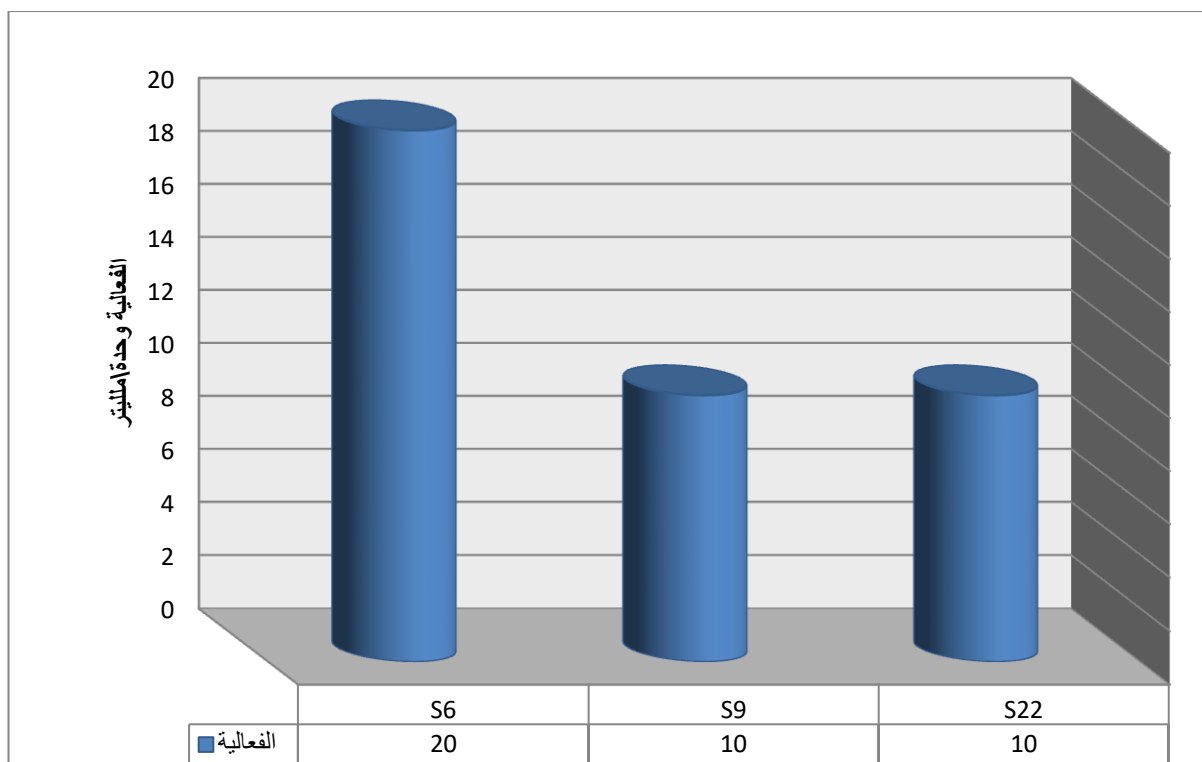
الشكل 22: الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S1-S8) المعزولة من الحروق باستعمال البادئ النوعي لجين (*hly* (300bp) ، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



الشكل 23: الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S9-S14) المعزولة من الجروح و-S15 من الدم باستعمال البادئ النوعي لجين *hlb* (300bp)، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



الشكل 24: الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* (S17-S20) معزولة من الجلد و-S24 من الدم باستعمال البادئ النوعي لجين *hlb* (300bp)، بتركيز هلام الاكاروز 1.5% وفولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.



الشكل 25: الفعالية الانزيمية للهيمولايسين لبعض عزلات *S.aureus* المقاومة للمثبسلين MRSA

ويوضح الجدول 20 العلاقة بين الجينات قيد الدراسة وقوة الغشاء الحيوي في بكتريا MRSA.

الجدول 20: توزيع الجينات بين العزلات اعتمادا على قوة الغشاء الحيوي المكونة له

<i>hlb</i>	<i>LukED</i>	<i>tetK</i>	<i>mecA</i>	قوة الغشاء الحيوي
6\6 100%	3\6 50%	6\6 100%	6\6 100%	العزلات قوية الانتاج
16\16 100%	9\16 56.2 5%	16\16 100%	16\16 100%	العزلات متوسطة الانتاج
2\2 100%	2\2 100 %	2\2 100%	2\2 100%	العزلات ضعيفة الانتاج

الفصل الخامس

الإستنتاجات والتوصيات

*Conclusions*

&

*Recommendations*

## الاستنتاجات

- 1- ارتفاع نسب الإصابة ببكتريا المكورات العنقودية المقاومة للمثيسلين في محافظة كربلاء المقدسة.
- 2- ارتفاع نسبة مقاومة المكورات العنقودية الذهبية تجاه المضادات الحيوية.
- 3- وجود علاقة بين قوة الغشاء الحيوي المنتج من قبل بكتريا المكورات العنقودية المقاومة للمثيسلين ومقاومتها لبعض المضادات الحيوية.
- 4- ارتفاع نسب المكورات العنقودية المنتجة لانزيم البروتيز .
- 5 - انخفاض فعالية انزيم بيتا الحال للدم في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسلين على الرغم من تواجد الجين المشفر للانزيم في جميع العزلات المختبرة .

## التوصيات

- 1- إجراء مسح أكثر شمولية للتحري عن الإصابة ببكتريا المكورات العنقودية في محافظة كربلاء المقدسة ومقارنة نسبة الإصابة في المحافظة مع محافظات عراقية اخرى.
- 2- التحري عن عوامل الضراوة و مقاومة المضادات على المستوى الجزيئي.
- 3- تحضير مضادات البيبتالاكتام نانويا واختبار فعاليتها تجاه المكورات العنقودية الذهبية .

المصادر

*References*

مهدى, جندي علي ; علي ,محمد رفيق .(2009). دراسة أنتاج انزيم البروتياز من بعض الاحياء  
المجهرية –المعهد التقني الطبي - بغداد.

مسلم، ساهرة نصيف. (2005). دراسة وراثية وكيموحيوية على الهيمولايسين المنتج من بكتريا الـ  
*Aeromonas hydrophila* والمعزولة من المياه السطحية والمصابين بالأسهال . أطروحة  
دكتوراه - كلية العلوم – الجامعة المستنصرية.



**Afaq, N.**(2017). Screening And Molecular Characterization Of VRSA And Visa Among The MRSA Isolates From The Purified Compounds Of *Cannabis Sativa* L And *Allium Sativum* L, Rama University Uttar Pradesh, Kanpur.

**Ahmed, A. H.; & Ahmed, F.** (2022). Identification of MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) by *mecA* gene. Al-Salam Journal for Biochemical and Medical Science, 1(2), 25-30.

**Alebachew, T.; Yismaw, G.; Derabe, A.; & Sisay, Z.** (2012). *Staphylococcus aureus* burn wound infection among patients attending Yekatit 12 hospital burn unit, Addis Ababa, Ethiopia. Ethiopian journal of health sciences, 22(3).

**Ali, S.; Abbdin, M. Z. U.; Ali, M. F.; & Ali, W.**(2017). From Simple to its Extreme: Proteases Serving as Innovative Bacterial Weapon.

**Alli, O. T.; Ogbolu, D. O.; Akorede, E.; Onemu, O. M.; & Okanlawon, B. M.** (2011). Distribution of *mecA* gene amongst *Staphylococcus aureus* isolates from Southwestern Nigeria. African Journal of Biomedical Research, 14(1), 9-16.

**Almwafy, A.** (2020). Preliminary characterization and identification of gram positive hemolysis bacteria. Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences, 62(2), 96-109.

**Al-Naqshbandi**, A. A.; Hassan, H. A.; Chawsheen, M. A.; & Abdul Qader, H. H. (2021). Categorization of bacterial pathogens present in infected wounds and their antibiotic resistance profile recovered from patients attending Rizgary hospital-Arbil. ARO-The Scientific Journal of Koya University, 9(2), 64-70.

**Alonzo III**, F.; Benson, M. A.; Chen, J.; Novick, R. P.; Shopsin, B.; & Torres, V. J. (2012). *Staphylococcus aureus* leucocidin ED contributes to systemic infection by targeting neutrophils and promoting bacterial growth in vivo. Molecular microbiology, 83(2), 423-435.

**Al-Saleh**, A.; Shahid, M.; Farid, E.; & Bindayna, K. (2022). Trends in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Gulf Cooperation Council countries: antibiotic resistance, virulence factors and emerging strains. Eastern Mediterranean Health Journal, 28(6), 434-443.

**Al-Taie**, L. H.; Hassan, S.; Al-Mayah, K. S.; & Talib, S. (2014). Isolation and identification of bacterial burn wound infection and their sensitivity to antibiotics. Al-Mustansiriyah J Sci, 25(2), 17-24.

**Al-Ugaili**, D. (2013). Bacteriological and Genetic Studies on Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Some Hospital in Baghdad City (Doctoral dissertation, Ministry of Higher Education).

**Appelbaum**, P.C.(2006). The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 12(Suppl 1):16–23.

**Archer**, N. K.; Mazaitis, M. J.; Costerton, J. W.; Leid, J. G.; Powers, M. E.; & Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445-459.

**Ariyanti**, D.; Salasia, S. I. O.; & Tato, S. (2011). Characterization of haemolysin of *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 16(1), 32-37.

**Azeredo**, J.; Azevedo, N. F.; Briandet, R.; Cerca, N.; Coenye, T.; Costa, A. R.; ... & Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical reviews in microbiology*, 43(3), 313-351.

**Aziz**, A.; Akter, M. R.; Rahaman, M. S.; Khan, M. A. S.; Haque, A. K. M. Z.; Jahan, M. S.; & Kabi, S. M. L. (2013). Isolation, identification and antibiogram profiles of *Staphylococcus aureus* from commercial broiler flocks in Dinajpur District of Bangladesh with special focus on the determination of lethal effect of extracted toxin. *Scientific Journal of Microbiology*, 2(4), 74-82.

**Aziz**, K. E.; & Abdulrahman, Z. F. A. (2021). Detection of Tetracycline *tet* (k) Gene in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 761, No. 1, p. 012128). IOP Publishing.

**Baba-Moussa**, L.; Ahissou, H.; Azokpota, P.; Assogba, B.; Atindéhou, M. M.; Anagonou, S.; ... & Prévost, G. (2010). Toxins and adhesion factors associated with *Staphylococcus aureus* strains isolated from diarrhoeal patients in Benin. *African Journal of Biotechnology*, 9(5).

**Bairy, I.;** & Shenoy, G. Evaluation of in vitro and in vivo bactericidal activity of lysostaphin on methicillin resistant *staphylococcus aureus* India.

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

**Bizani, D.;**& Brandelli, A. (2001). Antimicrobial susceptibility, hemolysis and hemagglutination among *Aeromonas* spp. isolated from water of a bovine abattoir. Brazilian. J. Microbiol. 32: 334-339.

**Bocchini, C. E.;** Hulten, K. G.; Mason Jr, E. O.;Gonzalez, B. E.; Hammerman, W. A.; & Kaplan, S. L. (2006). Panton-Valentine leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. Pediatrics, 117(2), 433-440.

**Bonko, M. D. A.;** Lompo, P.;Tahita, M. C.; Kiemde, F.; Karama, I.; Some, A. M.; ... & DFH Schallig, H. (2021). Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* Isolates from the Nasopharynx of Febrile Children under 5 Years in Nanoro, Burkina Faso. Antibiotics, 10(4), 444.

**Bose, S.;** Khodke, M.; Basak, S.; & Mallick, S. K. (2009). Detection of biofilm producing staphylococci: need of the hour. *Journal of clinical and diagnostic research*, 3(6), 1915-1920.

**Brian, S.** (2004). TOXIC SHOCK SYNDROME, Copyright © 2004 by Infobase Publishing All rights reserved. No part of this book may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording, or by any information storage or retrieval systems, without permission in writing from the publisher. For information contact: Chelsea House An imprint of Infobase Publishing 132 West 31st Street New York NY 10001.

**Brown, S.; Santa Maria Jr, J. P.; & Walker, S.** (2013). Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology*, 67, 313-336.

**Bubey, R. C.; & Maheshwari, D. K.** (2009). *Practical Microbiology*. S. Chand and Company LTD: 206-207.

**Buis, D. T. P.; Sieswerda, E.; Kouijzer, I. J. E.; Huynh, W. Y.; Burchell, G. L.; Berrevoets, M. A. H.; ... & Sigaloff, K. C. E.** (2022). [18F] FDG-PET/CT in *Staphylococcus aureus* bacteremia: a systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 1-10.

**Byarugaba, D. K.** (2010). Mechanisms of antimicrobial resistance. In *Antimicrobial Resistance in Developing Countries* (pp. 15-26). Springer, New York, NY.

**Castellazzi, M. L.; Bosis, S.; Borzani, I.; Tagliabue, C.; Pinzani, R.; Marchisio, P.; & di Pietro, G. M.** (2021). Panton-valentine leukocidin *Staphylococcus aureus* severe infection in an infant: a case report and a review of the literature. *Italian Journal of Pediatrics*, 47(1), 1-9.

**Cha, J. O.;** Yoo, J. I.; Yoo, J. S.; Chung, H. S.; Park, S. H.; Kim, H. S.; ... & Chung, G. T. (2013). Investigation of biofilm formation and its association with the molecular and clinical characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Osong public health and research perspectives*, 4(5), 225-232.

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

**Chaurasia, R.;** & Jain, A. (2019). Self Assessment & Review of Microbiology & Immunology. JP Medical Ltd.

**Chelkeba, L.;** & Melaku, T. (2021). Epidemiology of staphylococci species and their antimicrobial-resistance among patients with wound infection in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*.

**Cheung, A. L.;** Koomey, J. M.; Butler, C. A.; Projan, S. J.; & Fischetti, V. A. (1992). Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(14), 6462-6466.

**Choi, J. H.;** Seo, H. S.; Lim, S. Y.; & Park, K. (2014). Cutaneous immune defenses against *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Lifestyle Medicine*, 4(1), 39.

**Chopra, I.;** & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65(2), 232-260.

**Claro**, T.; Widaa, A.; O'Seaghdha, M.; Miajlovic, H.; Foster, T. J.; O'Brien, F. J.; & Kerrigan, S. W. (2011). *Staphylococcus aureus* protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. PloS one, 6(4), e18748.

**Corcione**, S.; Lupia, T.; De Rosa, F. G.; & Host and Microbiota Interaction Study Group. (2020). Microbiome in the setting of burn patients: implications for infections and clinical outcomes. Burns & Trauma, 8.

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

**Darwish**, S. F.; & Asfour, H. A. (2013). Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. The Scientific World Journal, 2013.

**Delgado**, S.; García, P.; Fernández, L.; Jiménez, E.; Rodríguez-Baños, M.; del Campo, R.; & Rodríguez, J. M. (2011). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 62(2), 225-235.Hemolysis

**Dennis** Lo, Y. M. (1998). Introduction to the polymerase chain reaction. In Clinical applications of PCR (pp. 3-10). Humana Press.

**Desouky**, S. E.; El-Gamal, M. S.; Mohammed, A. F.; & Abu-Elghait, M. A. (2014). Determination of some virulence factors in *Staphylococcus* spp. isolated from clinical samples of different Egyptian patients. *World Appl Sci J*, 32, 731-740.

**Dhungel**, S.; Rijal, K. R.; Yadav, B.; Dhungel, B.; Adhikari, N.; Shrestha, U. T.; ... & Ghimire, P. (2021). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Prevalence, antimicrobial susceptibility pattern, and detection of *mec A* gene among cardiac patients from a Tertiary Care Heart Center in Kathmandu, Nepal. *Infectious Diseases: Research and Treatment*, 14, 11786337211037355.

**Dilley**, M.; & Geng, B. (2022). Immediate and delayed hypersensitivity reactions to antibiotics: aminoglycosides, clindamycin, linezolid, and metronidazole. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 62(3), 463-475.

**Dinges**, M. M.; Orwin, P. M.; & Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 13(1),

**Divyakolu**, S.; Chikkala, R.; Ratnakar, K. S.; & Sritharan, V. (2019). Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An update on their biology, role in pathogenesis and as targets for anti-virulence therapy. *Advances in Infectious Diseases*, 9(2), 80-104.

**Donlan**, R. M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical infectious diseases*, 33(8), 1387-1392.



**El-Tawab**, A.; El Hofy, F.; Sorour, H.; Abd Ali, M.; & Hamouda, R. H. (2022). Molecular characterization of some antibiotic resistant genes of *Staphylococcus aureus* isolated from different sources and human. *Benha Veterinary Medical Journal*, 41(2), 6-10.

**Fadhil**, H.; & Mohammed, B. J. (2022). Molecular and Classical identification of *Staphylococcus aureus*, Isolated from Iraqi Patients with Recurrent Tonsillitis. *Medico-legal Update*, 22(1).

**Foster**, T. J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), 430-449.

**Gajdács**, M.; & Albericio, F. (2019). Antibiotic resistance: from the bench to patients. *Antibiotics*, 8(3), 129.

**Garoy**, E. Y.; Gebreab, Y. B.; Achila, O. O.; Tekeste, D. G.; Kesete, R.; Ghirmay, R.; ... & Tesfu, T. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): prevalence and antimicrobial sensitivity pattern among patients—a multicenter study in Asmara, Eritrea. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*.

**Geha**, D. J.; Uhl, J. R.; Gustafarro, C. A.; & Persing, D. H. (1994). Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(7), 1768-1772.

**Gentilini**, E.; Denamiel, G.; Llorente, P.; Godaly, S.; Rebuelto, M.; & DeGregorio, O. (2000). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus*

*aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of dairy science*, 83(6), 1224-1227.

**Ghoniem**, E. M.; El Hendawy, G. R.; Moteleb, T. M. A.; Hassan, H. A.; & Khalil, H. A. E. R. (2014). Characterization of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the National Liver Institute. *Menoufia Medical Journal*, 27(4), 825.

**Gnanamani**, A.; Hariharan, P.; & Paul-Satyaseela, M. (2017). *Staphylococcus aureus*: Overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach. *Frontiers in Staphylococcus aureus*, 4, 28.

**Goni**, F . M .; & Ostolaza,H.(1998). *E.coli* alpha hemolysin :a membrane-active protein toxin. *Brazilian J.Med.Biological.Res* .,31(8): 1019-1034.

**Götz**, F.; Bannerman, T.; & Schleifer, K. H. (2006). The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. *The prokaryotes*, 1-71, 10.1007/0-387-30744-3\_1.

**Guan**, Z.; Liu, Y.; Liu, C.; Wang, H.; Feng, J.; & Yang, G. (2021). *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -Hemolysin Up-Regulates the Expression of IFN- $\gamma$  by Human CD56bright NK Cells. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 658141.

**Gulzar**, M.; & Zehra, A. (2018). *Staphylococcus aureus*: A brief review. *Int J Vet Sci Res*, 4(1), 020-022.

**Gupta, P.;** Sarkar, S.; Das, B.; Bhattacharjee, S.; & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of microbiology*, 198(1), 1-15.

**Haaber, J.;** Penadés, J. R.; & Ingmer, H. (2017). Transfer of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 25(11), 893-905

**Halim, N. H. A.;** Zahir, N. S. M.; Amin, N. M. M.; & Yusof, H. A. (2020). Distribution of Hyaluronidase-producing *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Palm Skin and Anterior Nares of Healthy Malaysian Adults. *Journal of Clinical and Health Sciences*, 5(1), 42-48.

**Hariharan.**(2020). Evaluation of anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of selected phytochemicals and other beneficial microorganisms, microbiology division csir - central leather research institute adyar, chennai – 600 020 India November 2020.

**Hasan, R.;** Acharjee, M.; & Noor, R. (2016). Prevalence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from burn wound infections. *Tzu Chi Medical Journal*, 28(2), 49-53.

**He, C.;** Xu, S.; Zhao, H.; Hu, F.; Xu, X.; Jin, S.; ... & Liu, Q. (2018). Leukotoxin and pyrogenic toxin Superantigen gene backgrounds in bloodstream and wound *Staphylococcus aureus* isolates from eastern region of China. *BMC infectious diseases*, 18(1), 1-10.

**Hennekinne**, J. A.; Ostin, A.; Guillier, F.; Herbin, S.; Pruger, A. L.; & Dragacci, S. (2010). How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized?. *Toxins*, 2(8), 2106-2116.

**Hu**, Q.; Peng, H.; & Rao, X. (2016). Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in microbiology*, 7, 1601.

**Huber** , H.; Koller, S.; Giezendanner, N.; Stephan, R.; & Zweifel, C. (2010). Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin. Switzerland, 2009. *Euro Surveillance*, 15 (16): pii 19542.

**Humadi**, H.G.;Omar,S.S. (2013). Qualitative and Quantitative screening of alkaline protease production from some pathogenic bacteria. *journal of karbala university*, 9(1), 309-314.

**Huseby**, M.; Shi, K.; Brown, C. K.; Digre, J.; Mengistu, F.; Seo, K. S.; ... & Earhart, C. A. (2007). Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 189(23), 8719-8726.

**Ip**, J. (2009). Autocatalytic Activation and Characterization of *Staphylococcus aureus* Cysteine Protease Staphopain A (Doctoral dissertation).

**Ito**, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., & Hiramatsu, K. (2001). Structural comparison of three

types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(5), 1323-1336.

**Jeong**, J.; Song, W.; Cooper, W. J.; Jung, J.; & Greaves, J. (2010). Degradation of tetracycline antibiotics: mechanisms and kinetic studies for advanced oxidation/reduction processes. *Chemosphere*, 78(5), 533-540.

**Jevons** , M.P.(1961) "Celbenin"-resistant *Staphylococci*. *Br Med J*.1:124-125.

**Joo**, Y. E.; Seo, K. S.; Kim, H. S.; Rew, J. S.; Park, C. S.; & Kim, S. J. (2000). Expression of tissue inhibitors of metallo proteinases (TIMPs) in gastric cancer. *Digestive diseases and sciences*, 45(1), 114-121.

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

**Karlsson**, A.; & Arvidson, S. (2002). Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor sarA. *Infection and immunity*, 70(8), 4239-4246.

**Karmakar**, A.; Dua, P.; & Ghosh, C. (2016). Biochemical and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from hospitalized

patients. *Canadian journal of infectious diseases and medical microbiology*, 2016.

**Karpiskova** , R. ; Stastkova , Z.; & Karpiskova , S. ( 2009) . Nalezy methicillin resistant *Staphylococcus aureus* u zvirat . *Veterinarstvi* , 59: 34-36 .

**Kavitha**, E.(2020). Molecular Characterization of Antibiotic Resistant Gene of *Staphylococcus* SPP from Clinical Isolates in a Tertiary Care Hospital Puducherry South India.

**Kengne**, M.; Fotsing, O.; Ndomgue, T.; & Nwobegahay, J. M. (2019). Antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* strains isolated at the Yaounde Central Hospital, Cameroon: a retro prospective study. *Pan African Medical Journal*, 32(1).

**Khan**, M . F.(2014) Prevalence of drug resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in a tertiary care centre in Tribal area of Bastar district (c.g.).

**Khan**, S.; Marasa, B. S.; Sung, K.; & Nawaz, M. (2021). Genotypic characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from Pakistan. *Pathogens*, 10(8), 918.

**Khoramrooz**, S. S.; Dolatabad, S. A.; Dolatabad, F. M.; Marashifard, M.; Mirzaii, M.; Dabiri, H.; ... & Darban-Sarokhalil, D. (2017). Detection of tetracycline resistance genes, aminoglycoside modifying enzymes, and coagulase gene typing of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in

the Southwest of Iran. *Iranian journal of basic medical sciences*, 20(8), 912

**Khosravi**, A. D.; Hoveizavi, H.; & Farshadzadeh, Z. (2012). The prevalence of genes encoding leukocidins in *Staphylococcus aureus* strains resistant and sensitive to methicillin isolated from burn patients in Taleghani Hospital, Ahvaz, Iran. *Burns*, 38(2), 247-251.

**Kitadokoro**, K.; Tanaka, M.; Hikima, T.; Okuno, Y.; Yamamoto, M.; & Kamitani, S. (2020). Crystal structure of pathogenic *Staphylococcus aureus* lipase complex with the anti-obesity drug orlistat. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.

**Kobayashi**, N.; Wu, H.; Kojima, K.; Taniguchi, K.; Urasawa, S.; Uehara, N.; ... & Kurokawa, I. (1994). Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiology & Infection*, 113(2), 259-266.

**Kobayashi**, S. D.; Malachowa, N.; & DeLeo, F. R. (2015). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* abscesses. *The American journal of pathology*, 185(6), 1518-1527.

**Kokaz**, O. F. (2015). Detection of *mec A* gene in *Staphylococcus aureus* from Osteomyelitis infections. *Al-Qadisiyah Medical Journal*, 11(20), 184-189.

**Komori**, Y.; Nonogaki, T.; & Nikai, T. (2001). Hemorrhagic activity and muscle damaging effect of *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinase (elastase). *Toxicon*, 39(9), 1327-1332.

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

**Kumar, S.; Mukherjee, M. M.; & Varela, M. F.** (2013). Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. *International journal of bacteriology*.

**Kumurya, A. S.; Sule, H.; & Maje, A. U.** (2017). *Staphylococcus aureus* from the Microbial Load of Open Wounds from Patients Attending Aminu Kano Teaching Hospital, Kano, Nigeria. *J Bacteriol Mycol Open Access*, 5(7), 00162.

**Lade, H., & Kim, J. S.** (2021). Bacterial targets of antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 10(4), 398.

**Larsen, J.; Raisen, C. L.; Ba, X.; Sadgrove, N. J.; Padilla-González, G. F.; Simmonds, M. S.; ... & Larsen, A. R.** (2022). Emergence of methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics. *Nature*, 602(7895), 135-141.

**Latha, J.**(2017). Phenotypic and genotypic characterization of methicillin resistant *staphylococcus aureus* in a tertiary care center Chennai India.

**Leboffe , M. J.; & Pierce , B. E.** (2010). Microbiology: Laboratory Theory and Application. 3d ed. Morton Publishing Company. Englewood, CO .



**Lehman**, M. K.; Nuxoll, A. S.; Yamada, K. J.; Kielian, T.; Carson, S. D.; & Fey, P. D. (2019). Protease-mediated growth of *Staphylococcus aureus* on host proteins is opp3 dependent. *MBio*, 10(2), e02553-18.

**Lin**, T.; Li, Q.; Jin, D.; Liu, W.; Tang, C.; & Zhang, X. (2021). Investigation of Virulence Genes of *Staphylococcus aureus* Isolated from Sterile Body Fluid Samples and Their Correlation with Clinical Symptoms and Outcomes. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2021.

**Lister**, J. L.; & Horswill, A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 178.

**Liu**, C.; Chen, Z. J.; Sun, Z.; Feng, X.; Zou, M.; Cao, W.; ... & Sun, M. (2015). Molecular characteristics and virulence factors in methicillin-susceptible, resistant, and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* from central-southern China. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 48(5), 490-496.

**Lowy**, F.D.(2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*, *J.Clin. Invest.*111: 1265-1273.

**Macfaddin**, J.F.(2000).Biochemical tests for identification of medical Bacteria .1sted.,the Williams and Wilkins Baltimore, USA.*Manual of Clinical Microbiology*, ASM, Washington D.C, , pp. 222-237. .( citted from Costa et al.,2013).

**Madhaiyan.**; Joseph S. W.; & Venkatakrisnan .S.S.(2020). Phylogenomic analyses of the Staphylococcaceae family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliococcus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family Staphylococcaceae , taxonomic description Madhaiyan et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020;70:5926–5936 DOI 10.1099/ijsem.0.004498.

**Magana**, M.; Sereti, C.; Ioannidis, A.; Mitchell, C. A.; Ball, A. R.; Magiorkinis, E.; ... & Tegos, G. P. (2018). Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(3), e00084-16.

**Malachowa**, N.; & DeLeo, F. R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cellular and molecular life sciences*, 67(18), 3057-3071.

**Malik**, N.; Bisht, D.; Aggarwal, J.; & Rawat, A. (2022). Distribution of *IcaA* and *IcaB* Genes in Biofilm-Producing Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus*. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Health Care*, 14(1), 21.

**Mandlik**, A.; Swierczynski, A.; Das, A.; & Ton-That, H. (2008). Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends in microbiology*, 16(1), 33-40.

**Mariutti**, R. B.; Tartaglia, N. R.; Seyffert, N.; de Paula Castro, T. L.; Arni, R. K.; Azevedo, V. A.; ... & Nishifuji, K. (2017). Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. The Rise of Virulence and Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*, 2(5), 1148-1165.

**Matar** , S. (2014). Characterization of Staphylococcus Small Colony Variant and their Pathogenic Role in Biomaterial Related Infection with Special Reference to Staphylococcus epidermidis.:187-192

**Matsumoto**, Y.; Kaito, C.; Morishita, D.; Kurokawa, K.; & Sekimizu, K. (2007). Regulation of exoprotein gene expression by the *Staphylococcus aureus cvfB* gene. Infection and immunity, 75(4), 1964-1972.

**McAdow**, M.; Missiakas, D. M.; & Schneewind, O. (2012). *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. Journal of innate immunity, 4(2), 141-148.

**Mehrotra**, M.; Wang, G.; & Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), 1032-1035.

**Miruka**, S. A.; Aboge, G. O.; Macharia, R. W.; Obiero, G. O.; & Omwenga, I. M. (2022). Beta hemolysin gene of Staphylococcus phage 3AJ\_2017 genome is a suitable molecular marker for identification and characterization of pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Medicine and Science*, 8(2), 845-851.

**Mlynarczyk**, B. B.; Kowalewski, C.; Krolak-Ulinska, A.; & Marusza, W. (2022). Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8088.

**Mohan**, A.S. (2019). comparative study of community and hospital acquired MRSA in north Karnataka a thesis submitted to Gulbarga university, kalaburagi for the award of the degree of, department of post graduate studies and research in microbiology Gulbarga university, Kalaburagi- 585106 India.

**Monecke**, S.; Müller, E.; Braun, S. D.; Armengol-Porta, M.; Bes, M.; Boswihi, S.; ... & Ehricht, R. (2021). Characterisation of *S. aureus*/MRSA CC1153 and review of mobile genetic elements carrying the fusidic acid resistance gene *fusC*. *Scientific reports*, 11(1), 1-13

**Moormeier**, D. E.; & Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Molecular microbiology*, 104(3), 365-376.

**Moraveji**, Z.; Tabatabaei, M.; Aski, H. S.; & Khoshbakht, R. (2014). Characterization of hemolysins of *Staphylococcus* strains isolated from human and bovine, southern Iran. *Iranian journal of veterinary research*, 15(4), 326.

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

**Motamedi**, H.; Asghari, B.; Tahmasebi, H.; & Arabestani, M. R. (2018). Identification of hemolysine genes and their association with

antimicrobial resistance pattern among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in West of Iran. *Advanced biomedical research*, 7.

**Mtsher**, A. M.; & Aziz, Z. S. (2019). phenotypic and molecular characterization of gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Plant Archives*, 19(2), 3929-3932.

**Mussi**, M. A.; Limansky, A. S.; & Viale, A. M. (2005). Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of  $\beta$ -barrel outer membrane proteins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(4), 1432-1440.

**Mustafa**, H. S. I. (2014). *Staphylococcus aureus* can produce catalase enzyme when adding to human WBCs as a source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> productions in human plasma or serum in the laboratory. *Open Journal of Medical Microbiology*, 4(04), 249.

**Najar-Peerayeh**, S.; Yadegar, A.; & Bakhshi, B. (2021). Clonal diversity and genomic characterization of Panton-valentine Leukocidin (PVL)-positive *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 1-12.

**Nasaj**, M.; Saeidi, Z.; Asghari, B.; Roshanaei, G.; & Arabestani, M. R. (2020). Identification of hemolysin encoding genes and their association with antimicrobial resistance pattern among clinical isolates of coagulase-negative Staphylococci. *BMC research notes*, 13(1), 1-6.

**Nasution**, G. S.; Suryanto, D.; & Kusumawati, R. L. (2018, March). Detection of *mecA* gene from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates of north sumatera. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science* (Vol. 130, No. 1, p. 012026). IOP Publishing

**Neopane**, P.; Nepal, H. P.; Shrestha, R.; Uehara, O.; & Abiko, Y. (2018). In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. *International journal of general medicine*, 11, 25.

**Nikolic**,p.;& Mudgil,p.(2023). The Cell Wall, Cell Membrane and Virulence Factors of *Staphylococcus aureus* and Their Role in Antibiotic Resistance , 11, 259.

**Norddine**, H.; Ghita, B.; Younes, Z.; Abdallah, N.; Nourichafi, N.; Mifdal, H.; Said, M.; & Mounia, O. (2010). Analyses of the effect of para-phenylenediamine Takaout roumia on the osmotic stability of human erythrocytes. *J.Toxi.Envi.Heal.Scie*.2(7):101-107.

**O'Brien** , F.G.; Lim,T.T.; Chong, F.N.; Coombs,G.W.; Enright, M.C.; Robinson, D.S.; Monk,A.; Said-Salim,B.; Kreiswirth,B.N.; & Grubb, W.B.(2004). Diversity among Community Isolated of Methicillin-Resistance *Staphylococcus* in Australia, *J. Clin. Micro*.42:3185-3190.

**Oguzkaya**,A. M.; Baykan, Z.; & Artan, C. (2008). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy preschool children. *Japanese journal of infectious diseases*, 61(1), 70.

**O'Halloran**, D. P.; Wynne, K.; & Geoghegan, J. A. (2015). Protein A is released into the *Staphylococcus aureus* culture supernatant with an unprocessed sorting signal. *Infection and immunity*, 83(4), 1598-1609.

**Oliveira**, D.; Borges, A.; & Simões, M. (2018). *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins*, 10(6), 252.

**Ortega**, A. C. D.; Cruz-Valderrama Sánchez, B. P.; & Chaman Medina, M. E. (2020). First report of *Staphylococcus* isolates identified by genomic analysis from *Rhizospheric* soils of **Capsicum annum** L. cv Piquillo. *Scientia Agropecuaria*, 11(2), 237-240.

**Owens** ,C.D;& Stoessel ,K.(2008). Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention, 0195-6701 - see front matter ,*The Hospital Infection Society*. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Pantosti**, A.; Sanchini, A.; & Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*.

**Parvathareddy**, V.(2020). Genotypic characterization of drug resistant *Staphylococcus aureus* from clinical specimens,bihe ,india.

**Patil**, N. R.(2017) Detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with special reference to *mec A* gene,India.

**Peacock**, S. J.; & Paterson, G. K. (2015). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*, 84(1), 577-601.

**Peng, Q.;** Tang, X.; Dong, W.; Sun, N.; & Yuan, W. (2022). A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics*, 12(1), 12.

**Petri, W. A.** (2001). Chapter 53. Penicillins, cephalosporins, and other  $\beta$ -lactam antibiotics. Goodman & Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics. Hardman, JG, Limbird, LL, and Gilman, AG,(ed). 10th ed. Mc Graw-Hill, Medical Publishing Division, New York, 1197.

**Qu, M. D.;** Kausar, H.; Smith, S.; Lazar, P. G.; Kroll-Desrosiers, A. R.; Hollins III, C.; ... & Ellison III, R. T. (2022). Epidemiological and clinical features of Panton-Valentine Leukocidin positive *Staphylococcus aureus* bacteremia: A case-control study. *PloS one*, 17(3), e0265476.

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

**Ramiah,p.,**(2017). Isolation and Identification of *Staphylococcus aureus* from environmental factors., Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Udayana Denpasar.

**Rasamiravaka, T.;** Labtani, Q.; Duez, P.; & El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed research international*, 2015.

**Rasheed, N. A.;** & Hussein, N. R. (2020). Characterization of different virulent factors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates



recovered from Iraqis and Syrian refugees in Duhok city, Iraq. *PloS one*, 15(8), e0237714.

**Rasmi**, A. H.; Ahmed, E. F.; Darwish, A. M. A.; & Gad, G. F. M. (2022). Virulence genes distributed among *Staphylococcus aureus* causing wound infections and their correlation to antibiotic resistance. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 1-12.

**Reale**, M.; Strazzulla, A.; Quirino, A.; Rizzo, C.; Marano, V.; Postorino, M.C.; Mazzitelli, M.; Greco, G.; Pisani, V.; Costa, C.; Cesana, B.M.; Liberto, M.C.; Torti, C.; & Foca, A., 2017. Patterns of multi-drug resistant bacteria at first culture from patients admitted to a third level University hospital in Calabria from 2011 to 2014: Implications for empirical therapy and infection control. *Infezioni in Medicina*, 25, pp.98-107.

**Reba**, K.,A.; &Paniker's.(2017). Textbook of Microbiology, *Staphylococcus*, United Press (India) Private Limited, Hyderabad, Tenth Edition, chapter- 21;201-209.

**Reichmann**, N. T.; & Gründling, A. (2011). Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. *FEMS microbiology letters*, 319(2), 97-105.

**Robles**, T.; Alonzo III, F.; Kozhaya, L.;Lacy, D. B.; Unutmaz, D.; & Torres, V. J. (2013). *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection. *Cell host & microbe*, 14(4), 453-459.

**Ross**, A.; & Shoff, H. W. (2022). Staphylococcal scalded skin syndrome. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

**Roy**, P. C.; Shaheduzzaman, M.; Sultana, N.; & Jahid, I. K. (2015). Comparative antibiotic sensitivity pattern of hospital and community acquired *Staphylococcus aureus* isolates of Jessore, Bangladesh. *Journal of Biosciences and Medicines*, 3(10), 17.

**Saleem**, A. (2017). High frequency of hemolysin associated genes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Iraq. *Journal of Global Pharma Technology*, 9, 308-14

**Salgado- Pabón**, W.; Herrera, A.; Vu, B. G.; Stach , C. S.; Merriman, J. A.; Spaulding, A. R.; & Schlievert , P. M. (2014). *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -toxin production is common in strains with the  $\beta$ -toxin gene inactivated by bacteriophage. *The Journal of infectious diseases*, 210(5), 784-792.

**Sambrook** , J.; & Russell , D. (2001) . *Molecular Cloning : A laboratory Manual* , 3rd ed. , Cold Spring Harbor Laboratory press , New York.

**Santos**, J. A.; Gonzalez, C. J.; Otero, A.; & Garcia-Lopez, M. (1999). Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(12): 5612-5614.

**Sapkota**, J.; Sharma, M.; Jha, B.; & Bhatt, C. P. (2019). Prevalence of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital: A descriptive cross-sectional study. *JNMA: Journal of the Nepal Medical Association*, 57(220), 398.

**Sastry** .A.S.(2000).Essentials of Medical Microbiology, Staphylococcus, Jaypee Brothers Medical Publisher , New Delhi , Second Edition, chapter- 21, 217-227.

Scapoli, L., Palmieri, A., Pellati, A., Carinci, F., Lauritano, D., Arcuri, C., ... & Martinelli, M. (2022). Prevalence of Staphylococcus aureus and mec-A Cassette in the Throat of Non-Hospitalized Individuals Randomly Selected in Central Italy. *Antibiotics*, 11(7), 949.

**Schedlbauer**, A.; Kaminishi, T.; Ochoa-Lizarralde, B.; Dhimole, N.; Zhou, S.; López-Alonso, J. P.; & Fucini, P. (2015). Structural characterization of an alternative mode of tigecycline binding to the bacterial ribosome. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(5), 2849-2854.

**Schilcher**, K.; & Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3), e00026-19.

**Scudiero**, O.; Brancaccio, M.; Mennitti, C.; Laneri, S.; Lombardo, B.; De Biasi, M. G.; ... & Pero, R. (2020). Human defensins: A novel approach in the fight against skin colonizing *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 9(4), 198.

**Sedarat**, Z.; & Taylor-Robinson, A. W. (2022). Biofilm Formation by Pathogenic Bacteria: Applying a *Staphylococcus aureus* Model to Appraise Potential Targets for Therapeutic Intervention. *Pathogens*, 11(4), 388.

**Selim**, S.; Faried, O. A.; Almuhayawi, M. S.; Saleh, F. M.; Sharaf, M.; El Nahhas, N.; & Warrad, M. (2022). Incidence of Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains among Patients with Urinary Tract Infections. *Antibiotics*, 11(3), 408.

**Shaw**, L.; Golonka, E.; Potempa, J.; & Foster, S. J. (2004). The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 150(1), 217-228.

**Shu**, G.; Huang, J.; Bao, C.; Meng, J.; Chen, H.; & Cao, J. (2018). Effect of different proteases on the degree of hydrolysis and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity in goat and cow milk. *Biomolecules*, 8(4), 101.

**Silva**, D. P.; Schofield, M. C.; Parsek, M. R. ,&Tseng, B. S. (2017). An Update on the Sociomicrobiology of Quorum Sensing in Gram- Negative Biofilm Development. *Pathogens*. 6(51): 1-9.

**Soni** , K.(2012). Fluoroquinolones: Chemistry & Action – A Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Science*; 2(1): 43-53.

**Spaan**, A. N.; van Strijp, J. A.; & Torres, V. J. (2017). Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 435-447.

**Spaulding**, A. R.; Salgado-Pabón, W.; Kohler, P. L.; Horswill, A. R.; Leung, D. Y.; & Schlievert, P. M. (2013). Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 26(3), 422-447.

**Stalin .M.**(2017). Studies on prevalence and molecular epidemiology of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Tamilandu thesis , Madras university,Department of Micribiology,India.

**Stapleton** , P.D.; & Taylor, P.W.(2008). Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation, Sci. Prog. 85: 57-72.

**Sultana**, H.; Sattar, H.; Tarafder, S.; Sarker, J. N.; Bhuiyan, M. T. H.; Rahman, M. M.; & Naz, F. M. U. (2019). Evaluation of Oxacillin Disk Diffusion Test for the Phenotypic Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*.

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

**Tadesse**, S.; Alemayehu, H.; Tenna, A.; Tadesse, G.; Tessema, T. S.; Shibeshi, W.; & Eguale, T. (2018). Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with infection at Tikur Anbessa Specialized Hospital, Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 19(1), 1-8.

**Tam**, K.; & Torres, V. J. (2019). *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiology spectrum*, 7(2), 7-2.

**Tang**, J.; Zhou, R.; Shi, X.; Kang, M.; Wang, H.; & Chen, H. (2008). Two thermostable nucleases coexisted in *Staphylococcus aureus*: evidence from mutagenesis and in vitro expression. *FEMS microbiology letters*, 284(2), 176-183.

**Thwaites**, G. E.; & United Kingdom Clinical Infection Research Group (UKCIRG). (2010). The management of *Staphylococcus aureus* bacteremia in the United Kingdom and Vietnam: a multi-centre evaluation. *PLoS One*, 5(12), e14170.

**Tille** ,P.M.(2014). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*.13th Mosby, Inc.,an affiliate of Elsevier Inc.

**Todar**, K. (2006). *Todar's online textbook of bacteriology*.

**Tom**, I. M.; Ibrahim, M. M.; Umoru, A. M.; Umar, J. B.; Bukar, M. A.; Haruna, A. B.; & Aliyu, A. (2019). Infection of wounds by potential bacterial pathogens and their resistogram. *Open Access Library Journal*, 6(7), 1-13.

**Tomisic**, Z. B. (2011). The story of azithromycin. *J Chem Chem Eng*, 60, 603- 617.

**Tsige**, Y.; Tadesse, S.; Tefera, M. M.; Amsalu, A.; Menberu, M. A.; & Gelaw, B. (2020). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and associated risk factors among patients with wound infection at referral hospital, northeast Ethiopia. *Journal of Pathogens*, 2020.

**Tuchscher**, L.; Pöllath, C.; Siegmund, A.; Deinhardt-Emmer, S.; Hoerr, V.; Svensson, C. M.; ... & Löffler, B. (2019). Clinical *S. aureus* isolates

vary in their virulence to promote adaptation to the host. *Toxins*, 11(3), 135.

**Turner**, N. A.; Sharma-Kuinkel, B. K.; Maskarinec, S. A.; Eichenberger, E. M.; Shah, P. P.; Carugati, M.; ... & Fowler, V. G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 203-218.

**Turton**, J. F.; Ward, M. E.; Woodford, N.; Kaufmann, M. E.; Pike, R.; Livermore, D. M.; & Pitt, T. L. (2006).(a) The role of IS Aba1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter*

**Uehara**, Y. (2022). Current status of staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec). *Antibiotics*, 11(1), 86.

**Ullah**, F.; Malik, S. A.; Ahmed, J.; Shah, S. M.; Ayaz, M.; Hussain, S.; & Khatoon, L. (2012). Investigation of the genetic basis of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* from Pakistan. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(6), 925-931.

**Vandenesch**, F.; Lina, G.; & Henry, T. (2012). *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 12.

**Vasconcelos**, N. G. ;& Cunha, M.L.R.S.(2010). Staphylococcal enterotoxina: Molecular aspects and detection methods. *J Public Health Epidemiol*; 2:29- 42.

**Vasquez**, M. T.; Lubkin, A.; Reyes-Robles, T.; Day, C. J.; Lacey, K. A.; Jennings, M. P.; & Torres, V. J. (2020). Identification of a domain critical for *Staphylococcus aureus* LukED receptor targeting and lysis of erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 295(50), 17241-17250.

**Vatansever**, F.; Ferraresi, C.; de Sousa, M. V. P.; Yin, R.; Rineh, A.; Sharma, S. K.; & Hamblin, M. R. (2013). Can biowarfare agents be defeated with light?. *Virulence*, 4(8), 796-825.

**Vazhavandalg.**(2019). phenotypic and molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a tertiary care hospital, Tamilnadu, India, Kattankulathur-603 203 november 2019.

**Vehmas**,A. T.; Vikerpuur, M.; Pyörälä, S.; & Atroshi, F. (2001). Characterization of hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitic milk. *Microbiological research*, 155(4), 339-344.

**Verma**, P.; & Maheshwari, S. K. (2017). Minimum biofilm eradication concentration (MBEC) assay of Silver and Selenium nanoparticles against biofilm forming *Staphylococcus aureus*. *JMSCR*, 5, 20213-22.

**Wang**, L. J.;Yang, X.; Qian, S. Y.; Liu, Y. C.; Yao, K. H.; Dong, F.; & Song, W. Q. (2020). Identification of hemolytic activity and hemolytic genes of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children. *Chinese medical journal*, 133(01), 88-90.

**Weigel** , L.M.; Clewell, D.B.; Gill, S.R.; Clark, N.C.; McDougal, L.K.; Flannagan, S.E.; Kolonay, J.F.; Shetty, J.; Killgore, G.E. and Tenover,



F.C.(2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus* . *Science*. 302: 1569-1571.

**Wu** , S.W.; Lencastre, H.; & Tomaz, A. (2001) . Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus scurii* into a resistance determinant and expression of the resistance phenotype in *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol* 183:2417-2424.

**Yamamoto** , T.; Okubo, T.; Takano, T. (2007) . Recent topics in emerging and re-emerging infectious diseases. *J. Jpn. Soc. Int. Med.* 96 (3): 584–595. (in Japanese) ( cited from Saga and Yamaguchi , 2009 )

**Yamamoto**, Y. (2002). PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(3), 508-514.

**Yu**, S.; Jiang, B.; Jia, C.; Wu, H.; Shen, J.; Hu, X.; & Xie, Z. (2020). Investigation of biofilm production and its association with genetic and phenotypic characteristics of OM (osteomyelitis) and non-OM orthopedic *Staphylococcus aureus*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 19(1), 1-9.

**Zdzalik**, M.; Karim, A. Y.; Wolski, K.; Buda, P.; Wojcik, K.; Brueggemann, S.; ... & Dubin, G. (2012). Prevalence of genes encoding extracellular proteases in *Staphylococcus aureus* important targets triggering immune response in vivo. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 66(2), 220-229.

**Zephyr** ,C, K.(2019) Studies on antibodies in response to methicillin resistant *Staphylococcus aureus* MRSA antigens for vaccine development, *Department of Biotechnology and Microbiology*.

**Zhang**, H.; Zheng, Y.; Gao, H.; Xu, P.; Wang, M.; Li, A.; ... & Du, H. (2016). Identification and characterization of *Staphylococcus aureus* strains with an incomplete hemolytic phenotype. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 146.

**Zhu**,H.;Luo,H.;Zhong,Q.;Gao,X.;Gu,S.;Peng,S.;Xiao,Y.;Chen,C.;Hang,Y.;Fang,X.;Zou,S.;Yu,F.;Hu,L.(2022).Comparison of Molecular Characteristics Between Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates by Whole-Genome Sequencing. *Infection and Drug Resistance*, 15 2949–2958.

**Zubair**, S.; Fischer, A.; Liljander, A.; Meens, J.; Hegerman, J.; Gourelé, H.; ... & Jores, J. (2015). Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus*, strain ILRI\_Eymole1/1, isolated from a Kenyan dromedary camel. *Standards in genomic sciences*, 10(1), 1-12.

## Abstract

This study included obtaining 31 isolates of *Staphylococcus aureus* from patients attending the Obstetrics and Gynecology Teaching Hospital, Imam Hussein Medical City, and the Public Health Laboratory, as well as outpatient clinics, and from various clinical sources represented by burns, wounds, blood, urine, and skin. These isolates were subjected to some microscopic, biochemical and molecular examinations to ensure their classification in terms of genus and species. These isolates were also subjected to a test to identify methicillin-resistant bacteria from those sensitive to them. This was followed by an investigation of the ability of methicillin-resistant isolates to produce some virulence factors represented in the biofilm, protease and hemolytic enzyme, as well as the investigation of the presence of some virulence and antibiotic resistance genes, including *mecA*, *hly*, *lukED* and *tetK*. The results showed the following:

- ❖ The morphological and biochemical tests proved that the obtained isolates belonged to the genus *Staphylococcus*, with 31 isolates out of 150 samples, with an isolation rate of 20.6%, which included ten isolates from burns, eight isolates from wounds, three from blood, and five isolates from urine and skin, with percentages (32.25, 25.80, 9.67, 16.12, 16.12)%, respectively.
- ❖ The number of bacterial isolates resistant to methicillin was 24, with a rate of 77.41%.

- ❖ By testing the sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates to antibiotics, it was found that all isolates are resistant to (Benzyl Penicillins, Amoxicillin, Piperacillin, Ampicillin - Sulbactam, Amoxicillin Clavulanic Acid, Carbenicillin, and Amoxicillin) by 100%, and the same percentage for the group of antibiotics belonging to the Cephalosporins family represented by in Cefadroxil, Cephalexin of the first generation, Cefuroxime of the second generation, Cefixime, Cefpodoxime, Ceftriaxone, Cefotaxime, Ceftizoxime, Ceftazidime, Cefoperazone of the third generation, Cefepime, and Cefpirome of the fourth generation. These bacteria showed 100% sensitivity to (Vancomycin and Linezolid).
- ❖ The results of the molecular tests showed the presence of genes (*femA*, *mecA*, *hly* and *tetK*) by 100% in the twenty-four tested isolates, while the *lukED* gene was present by 58.3%.
- ❖ Studies have shown that all isolates have the ability to produce biofilm using the qualitative method, and their ability was distributed between the strong producers by 29.16%, the medium producers by 50%, and the weak by 20.8%, while the isolates were distributed when using the quantitative method represented by the plate method, with 25% of them being highly productive and 66.6% of them are medium and 8.3% of them are of poor production.
- ❖ It was found that there is a relationship between the strength of the biofilm and the resistance of bacteria to antibiotics.

- ❖ The results showed that the isolates that have the ability to produce the protease enzyme are 20 isolate, with a rate of 83.3%, using casein as a base material, and the isolate S9 produced the highest production with an enzyme activity of 13.9 units / ml.
- ❖ The isolates (S6, S9, and S22) showed low activity of hemolysin enzyme.



University of Kerbala

College of Science

Department of Biology

**Molecular detection of some virulence factor in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from different clinical sources**

A thesis

Submitted to the council of the College of Science \ University of Kerbala

In partial of fulfillment of requirements for degree of Master of Science in  
Biology

By

**Fatima Salem Obid Al- jasemi**  
BSc. Kerbala University 2019

Supervised by

Prof.

**Dr. Ali Abdul Kadhim Al-Ghanimi**