وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية
كلية العلوم

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

رسالة قدّمها

مصطفى رعد جواد ال ابراهيم

بكالوريوس علوم حياة / جامعة القادسية ٢٠١٠

إلى

مجلس كلية العلوم / جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة / أحياء مجهرية

إشراف

د . ميثم غالي يوسف

كلية العلوم / جامعة القادسية

جمادي الثاني ١٤٣٤ هـ **آيار ٢٠١٣**

م

إقرار لجنة المناقشة

نشهد إننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ (**التحري عن الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية في بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات سريرية مختلفة في مدينة الديوانية**) وناقشنا الطالب **مصطفى رعد جواد** في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 5 / 5 /2013 وإنها جديرة لنيل درجة الماجستير علوم / علوم الحياة / أحياء مجهرية.

التوقيع:

رئيس اللجنة

الاسم : أ.د. حبيب صاحب نهر

اللقب العلمي : استاذ

العنوان : كلية الطب ـ جامعة بابل

التاريخ : / / ٢٠١3

التوقيع :

عضو اللجنة

الاسم : أ.م.د. زياد متعب الخزاعي

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

العنوان : كلية العلوم ـ جامعة القادسية

التاريخ : / / ٢٠١3

التوقيع :

عضو اللجنة

الاسم : أ.م.د. احلام كاظم نعيم

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للبنات ـ جامعة الكوفة

التاريخ : / / ٢٠١3

التوقيع :

عضو اللجنة (المشرف)

الاسم : د. ميثم غالي يوسف

اللقب العلمي : مدرس

العنوان : كلية العلوم ـ جامعة القادسية

التاريخ : / / ٢٠١٣

إقرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية العلوم بجلسته ..... المنعقدة في / / ٢٠١3 وقرر منحه شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة / أحياء مجهرية

التوقيع :

الاسم : د. نجم عبد الواحد عبد الخضر الحساني

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

التاريخ : / / ٢٠١٣

إقرار المشرف

أشهد إن رسالة الماجستير الموسومة بـ (**الكشف عن بعض الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية في بكتريا المكورات العنقودية *S. aureus* المعزولة من حالات سريرية مختلفة في مدينة الديوانية**) قد أعدها الطالب **مصطفى رعد جواد** تحت إشرافي، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم / علوم الحياة / أحياء مجهرية .

التوقيع :

الأسم : م.د. ميثم غالي يوسف

اللقب العلمي : مدرس

العنوان : كلية العلوم – جامعة القادسية

التاريخ: / / ٢٠١٣

توصية رئيس قسم علوم الحياة

اشارة إلى التوصية المقدمة من الأستاذ المشرف أحيل هذه الدراسة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:
الأسم : م.د. علي عبد الحسين غزاي
اللقب العلمي : مدرس
العنوان : كلية العلوم – جامعة القادسية
التاريخ: / / ٢٠١٣

الخلاصة Summary

تم في هذه الدراسة جمع (173) عينة من حالات سريرية مختلفة لمرضى من كلا الجنسين و بأعمار مختلفة , راجعوا عدة مستشفيات ومراكز صحية في مدينة الديوانية (مستشفى الديوانية التعليمي العام ومستشفى النسائية والاطفال ومختبر الصحة العامة) للفترة من تشرين الثاني 2011 الى نيسان 2012 للتحري عن المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* . شملت العينات (52) عينة من الحروق و (50) عينة من الخراجات و (49) عينة من الجروح و (13) عينة من الادرار و (9) عينة من الاذن .

بينت نتائج الاختبارات المظهرية والكيموحيوية عائدية 66 (38.1%) عزلة لبكتريا *S. aureus* تضمنت 27 عزلة من الحروق و 18 عزلة من الخراجات و 18 عزلة من الجروح و 2 عزلة من الادرار و عزلة واحدة من الاذن .

تم التحري عن قابلية عزلات *S. aureus* على إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز بالاعتماد على طريقة اليود القياسية السريعة , حيث أظهرت 54 (81.8%) عزلة قدرتها على إنتاج هذا الإنزيم .

اختبرت حساسية جميع عزلات *S. aureus* تجاه 16 مضاداً حيوياً بالاستناد إلى طريقة انتشار القرص , وأظهرت النتائج ان جميع العزلات بنسبة (100%) كانت مقاومة لمضادات

Penicillin G و Ampicillin و Amoxicillin Clavulinic acid , (77.2%) و (72.7%) و (74.2%) مقاومة لمضادات Ceftriaxone و Cefotaxime و Cephalothin على التوالي , (69.6%) مقاومة لمضاد Erythromycin , (53%) و (48.4%) مقاومة لمضادات Gentamicin و Amikacin على التوالي , (48.4%) و (37.8%) و (34.8%) مقاومة لمضادات Clindamycin و Tetracyclin و Chloramphenicol على التوالي , (1.5%) و (3.0%) (21.2%) مقاومة لمضادات Ciprofloxacin و Imipenem و Meropenem على التوالي , بينما أظهرت النتائج حساسية جميع العزلات بنسبة (100%) لمضاد Vancomycin .

تم التحري عن بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة لمضاد المثيسيلين Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) في جميع عزلات *S. aureus* البالغة (66) عزلة بأستعمال أربع طرائق هي طريقة أنتشار القرص (Disk Diffusion) وطريقة التركيز المثبط الأدنى (HiComb MIC test) وطريقة التخطيط على الوسط الزرعي (CHROMagar MRSA) وتقنية تفاعل إنزيم البلمرة Polymerase chain reaction(PCR) , حيث أظهرت النتائج ان 30(45.4%) عزلة مقاومة لمضاد الاوكزاسيلين والسيفوكسيتين بطريقة انتشار القرص وسجلت النتائج ارتفاع مستويات نسب MIC والتي كانت بين (240≤ - 30) مايكروغرام/ ملي لتر لمضاد المثيسيلين و (256≤ - 16) مايكروغرام/ ملي لتر لمضاد الأوكزاسيلين بأستعمال أختبار HiComb MIC test , وأظهرت ايضاً 30 (45.4%) عزلة نتيجة موجبة بأستخدام وسط CHROMagar MRSA وتقنية الـ PCR .

تم التحري عن بعض عوامل الضراوة Virulence Factors في جميع عزلات الـ MRSA البالغة (30) عزلة بأستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد والعدة الخاصة بالتفاعل Single PCR(AccuPower PCR PreMix) , وتقنية تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد والعدة الخاص به Multiplex PCR(**KAPA**2G Fast Multiplex PCR Kit) للتحري عن الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة وهي كل من *coa* الجين المسؤول عن أنتاج إنزيم الكوكليز Coagulase , *clfA* الجين المسؤول عن عامل التكتل Clumping Factor , *spa* الجين المسؤول عن بروتين Protein A , *fnbA* الجين المسؤول عن بروتين الفايبرونكتين Fibronectin Binding Protein , *luks* الجين المسؤول عن انتاج الذيفان القاتل لكريات الدم البيض Panton Valentine Leukocidin(PVL) , *eta* الجين المسؤول عن ذيفان تقشر الجلد

Toxic الجين المسؤول عن ذيفان متلازمة الصدمة السمية *tst* , Exfoliative Toxin A
. Shock Syndrome Toxin-1(TSST-1)

أظهرت النتائج أمتلاك جميع عزلات MRSA بنسبة (100%) لجينات *coa* و *clfA* و *spa* و *fnbA* بواقع 14 (46.6%) عزلة من الخراجات , و11 (36.6%) عزلة من الحروق , و 4 (13.3%) عزلة من الجروح , وعزلة واحدة (3.3%) من الأذن تحتوي الجينات المذكورة . كما أظهرت 12 (40%) عزلة من عزلات MRSA أمتلاكها لجين *eta* وبواقع 6 (20%) عزلات من الحروق , و 4 (13.3%) عزلات من الخراجات , وعزلتين (6.6%) من الجروح . وأظهرت ١٣ (43.3%) عزلة أمتلاكها لجين *luks* وبواقع 10 (33.3%) عزلات من الخراجات , وعزلة واحدة (3.3%) لكل من الجروح والحروق والأذن وبالنسبة نفسها . بينما أظهرت 4 (13.3%) عزلات فقط أمتلاكها لجين *tst* وبواقع عزلتين (6.6%) من الخراجات وعزلتين بالنسبة نفسها ايضاً (6.6%) من الجروح , ولم تحتوي عزلات الحروق والأذن على جين *tst* .

{ قائمة المحتويات }

الموضوع	الصفحة
الفصل الأول / المقدمة Introduction	١-٢
الفصل الثاني / استعراض المراجع Literatures Review	٣
2-١ المكورات العنقودية Staphylococci	٣
2-٢ المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*	٣
2-٣ عوامل الضراوة Virulence Factors	٤
2-٣-١ المحفظة Capsule	٤
2-٣-٢ الببتيدوكلايكان Peptidoglycan وحامض التيكويك Teichoic acid	٥
2-٣-٣ بروتين A protein A	٥
2-٣-٤ الانزيم المختثر للبلازما Coagulase	٦
2-3-5 عوامل التكتل Clumping Factors	6
2-٣-6 انزيمات البيتالاكتاميز β-Lactamase	٧
2-٣-7 الفايبرونكتين Fibronectin-binding proteins (Fnbps)	٧
٢-٣-٨ الذيفان القاتل لكريات الدم البيض Panton –Valentine Leucocidin	٨
٢-٣-٩ ذيفان متلازمة الصدمة السمية Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1)	٩
٢-٣-١٠ ذيفان تقشر الجلد Exfoliative toxins	١٠
٢-٣-١١ عوامل ضراوة أخرى	١٠
2-4 التحري الجزيئي عن عوامل الضراوة في بكتريا *S. aureus*	١١
2-٥ امراضية بكتريا *S.aureus* Pathogenesis of *S.aureus*	١٣
2-٦ الوبـــائية Epidemiology	١٤
2-٧ مقاومة بكتريا *S.aureus* للمضادات الحيوية	١٥
2-٨ آلية المقاومة للمضادات الحياتية Mechanism of antibiotic resistance	١٦
2-٩ الاساس الجزيئي لمقاومة *S.aureus* للمضادات الحيوية	١٧
2-٩-١ مقاومة بكتريا *S.aureus* لمضاد الـ Methicillin	١٧
2-٩-٢ مقاومة بكتريا *S.aureus* لمضاد الـ Vancomycin	١٩
2-١٠ وبائية بكتريا MRSA	٢١

الموضوع	الصفحة
الفصل الثالث / المواد وطرائق العمل	٢٣
3- المواد وطرائق العمل Materials and methods	٢٣
3-1 المـــواد Materials	٢٣
3-1-1 الأجهــزة والأدوات المختبرية Equipment and apparatus	٢٣
3-1-2 المواد الكيمياوية Chemical materials	٢٤
3-1-3 الأوساط الزرعية الجاهزة Standard media	٢٥
3-1-4 المضادات الحيوية Antibiotics	٢٦
3-1-5 العُدد الجاهزة Kits	٢٧
3-1-5-1 العدة المستعملة في استخلاص الحمض النووي DNA extraction kit	٢٧
3-1-5-2 العدة المستعملة في تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد (Single PCR)	٢٧
3-1-5-3 العدة المستعملة في تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR	٢٨
3-1-5-4 بـادئـات الـDNA (DNA primers)	٢٨
3-1-5-5 العدد المستعملة في أختبار التركيز المثبط الأدنى MIC	٢٩
٣-٢ طــرائـق الـعـمـل	٣٠
٣-٢-١ محاليل الصبغات والكواشف Stains and reagents solutions	٣٠
٣-٢-١-١ محاليل صبغة غرام Gram stain solutions	٣٠
٣-٢-١-٢ محلول صبغة المحفظة Capsule stain solution	٣٠
٣-٢-١-٣ كاشـــف الكتاليز Catalase reagent	٣٠
٣-٢-١-٤ كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent	٣٠
٣-٢-١-٥ كاشف فوكس بروسكاور Voges Proskauer reagent	٣٠
٣-٢-١-٦ كاشـــف محلل الدنا DNase reagent	٣١
٣-٢-٢ المحاليل والدوارئ Solutions and buffers	٣١
٣-٢-٢-١ المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline solution	٣١
٣-٢-٢-٢ أنبوبة ماكفرلاند القياسية McFarland tube standard No.(0.5)	٣١
٣-٢-٢-٣ دارئ الفوسفات Phosphate buffer	٣٢

٣-٢-٢-4 المحاليل المستعملة في التحري عن إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز	٣٢

٣-٢-3 الأوساط الزرعية التركيبية	٣٣
٣-٢-3-١ وسط الدم الصلب Blood agar medium	٣٣
٣-٢-3-٢ وسط اليوريا الصلب Urea agar	٣٣
٣-٢-3-٣ وسط الجيلاتين المغذي Nutrient gelatin medium	٣٣
٣-٢-٣-٤ وسط مولر هنتون الصلب Muller-Hinton agar	٣٣
٣-٢-٣-٥ وسط الاغار المغذي Nutrient agar medium	٣٣
٣-٢-٣-٦ وسط المرق المغذي Nutient broth medium	٣٤
٣-٢-٣-٧ وسط مرق نقيع القلب و الدماغ Brain-Heart infusion broth	٣٤
٣-٢-٣- ٨ وسط الحفظ طويل الأمد Maintenance medium	٣٤
٣-٢-٣- ٩ وسط Staphylococcus Medium No. 110	٣٤
3-2-3-10 وسط كروم أكار CHROMagar MRSA	٣٤
٣-٢-٤ طرائق التعقيم Sterilization methods	٣٥
٣-٢-٥ جمع العينات Samples collection	٣٥
٣-٢-٦ العزل والتشخيص Isolation and identification	٣٥
3-٢-٧ الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests	٣٦
٣-٢-٧-١ اختبار الكتاليز Catalase test	٣٦
٣-٢-٧-٢ اختبار الأوكسيديز Oxidase test	٣٦
٣-٢-٧-٣ اختبار إنتاج مخثر البلازما Coagulase test	٣٦
٣-٢-٧-٤ اختبار عامل التكتل Clumping factor test	٣٦
٣-٢-٧-٥ اختبار إنتاج إنزيم محلل الدنا DNase test	٣٦
٣-٢-٧-٦ اختبار الفوكس- بروسكاور Voges Proskauer test	٣٧
٣-٢-٧-٧ اختبار إنتاج إنزيم الجيلاتينيز Gelatinase test	٣٧
٣-٢-٧-٨ اختبار تحلل الدم Haemolysins test	٣٧
٣-٢-٧-٩ اختبار إنتاج إنزيم اليوريز Urease test	٣٧
3-٢-٨ حفظ وإدامة العزلات البكتيرية Preservation and	٣٧

maintenance of bacterial isolates	
٣-٢-٨-١ الحفظ قصير الأمد	٣٨
٣-٢-٨-٢ الحفظ طويل الأمد	٣٨
٣-٢-٩ التحري عن قدرة *S. aureus* على إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز	٣٨
٣-٢-١٠ التحري عن مقاومة *S.aureus* للمضادات الحيوية (طريقة الانتشار بالقرص)	٣٨
3-2-11 التحري عن *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA	٣٩
3-2-11-١ طريقة أقراص فحص الحساسية	٣٩
3-2-11-2 طريقة التركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية	٣٩
3-2-11-3 وسط كروم أكار CHROMagar MRSA	٣٩
3-٢-12 استخلاص الحامض النووي البكتيري	٤٠
٣-٢-13 تحضير هلام الأكاروز	٤١
٣-٢-14 تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد Single PCR master mix	٤١
3-2-15 تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR master mix	٤٢
3-2-16 برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـ DNA	٤٣
٣-٢-17 الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis	٤٤
3-2-18 تصميم البادئات Primer design	٤4
3-2-19 التحليل الأحصائي	٤٤

الموضوع	الصفحة
الفصل الرابع/ النتائج	٤٥
٤-١ عزل بكتريا الـ *S. aureus* وتشخيصها	٤٥
٤-١-١ الصفات الزرعية Cultural Characteristics	٤٥
٤-١-٢ الصفات المجهرية Microscopic Characteristics	٤٥
٤-١-٣ الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests	٤٦
٤-٢ الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ *S.aureus*	٤٨

٤-٣ التحري عن قابلية *S. aureus* على إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز	٥٠
٤-٤ اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility test	٥٢
٤-٥ التحري عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين MRSA	٥٤
٤-٥-١ طريقة أقراص فحص الحساسية	٥٤
٤-٥-٢ طريقة التركيز المثبط الأدنى للمثيسيلين والأوكزاسيلين Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	٥٤
٤-٥-٣ وسط كروم أكار CHROM agar MRSA	٥٧
٤-٥-٤ تقنية تفاعل إنزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR)	٥٨
٤-٥-٤-١ استخلاص الـ DNA	٥٨
٤-٥-٤-٢ التشخيص ألتأكيدي للتحري عن عزلات MRSA بأستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة (PCR)	٥٨
4-6 مقاومة عزلات MRSA للمضادات الحيوية	٥٩
4-6-1 اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility test	٥٩
4-6-2 طريقة التركيز المثبط الأدنى للفانكومايسين	٦١
٤-7 تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد والمتعدد Single and Multiplex PCR	٦٣

الموضوع	الصفحة
الفصل الخامس/ المناقشة	٧٢
٥-١ عزل بكتريا الـ *S.aureus* وتشخيصها	٧٢
5-٢ التحري عن قابلية *S. aureus* على إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز	٧٦
5-٣ اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility test	٧٨
5-٤ التحري عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين MRSA	٨٢
5-٤-١ طريقة أقراص فحص الحساسية	٨٢
5-4-٢ طريقة التركيز المثبط الأدنى للمثيسيلين والأوكزاسيلين Minimum Inhibitory Concentration (MIC)	٨٣
5-٤-٣ طريقة التخطيط على الوسط الزرعي كروم أكار CHROM agar MRSA	٨٤
5-٤-٤ التشخيص ألتأكيدي للتحري عن عزلات MRSA بأستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة (PCR)	٨٥

5-5 مقاومة عزلات MRSA للمضادات الحيوية	٨٦
5-5-1 اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility test	٨٦
5-5-2 طريقة التركيز المثبط الأدنى للفانكومايسين	٨٩

٥-٦ تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد والمتعدد Single and Multiplex PCR	٩٠

الموضوع		الصفحة
الاستنتاجات Conclusions والتوصيات Recommendations		94
المصادر References		-95
المصادر العربية	المصادر الأجنبية	١٣٤
الملحق Appendix		١٣٥

{ قائمة الجداول }

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
(٣-١)	مكونات دارئ الفوسفات بدرجات حامضية مختلفة	٣٢
(2-3)	مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد Single PCR master mix	٤١
(3-3)	مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR master mix	٤٢
(4-3)	برنامج الدورات الحرارية لتفاعل إنزيم البلمرة المفرد Single PCR	٤٣
(5-3)	برنامج الدورات الحرارية لتفاعل إنزيم البلمرة المتعددMultiplex PCR	٤٣
(1-4)	الاختبارات الكيموحيوية لـ (٦٦) عزلة *S. aureus*	٤٨
(2-4)	الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ *S. aureus* المعزولة من عينات سريرية مختلفة.	٤٩
(3-4)	توزيع الاصابة بجرثومة *S. aureus* حسب الفئة العمرية للمصاب ونسبتها المئوية .	٥٠
(4-4)	قدرة ٦٦ عزلة *S. aureus* على إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز	٥١

(5-4)	مقاومة 66 عزلة *S. aureus* للمضادات الحيوية	٥٣
(6-4)	الأعداد والنسب المئوية لعزلات *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين بالاعتماد على طريقة أقراص فحص الحساسية	٥٤
(7-4)	التركيز المثبط الأدنى MIC للمثيسيلين Methicillin والأوكزاسيلين Oxacillin	٥٦
(8-4)	مقاومة 30 عزلة MRSA للمضادات الحيوية	٦٠
(9-4)	التركيز المثبط الأدنى MIC لمضاد الفانكومايسين Vancomycin	٦١
(10-4)	الاعداد والنسب المئوية للتحري عن بعض جينات عوامل الضراوة في عزلات (MRSA) بأستخدام تقنية الـ Single & Multiplex PCR .	٦٣
(11-4)	الأعداد والنسب المئوية لتوزيع جينات عوامل الضراوة حسب مصادر عزل بكتريا الـ *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA .	٦٤

{ قائمة الأشكال }

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
(1-4)	A : مستعمرات بكتريا *S. aureus* النامية على وسط Staph 110 B : مستعمرات بكتريا *S. aureus* النامية على وسط Mannitol Salt Agar	٥4
(2-4)	بكتريا المكورات العنقودية *S. aureus* المصبغة بصبغة غرام تحت المجهر (قوة التكبير X100) .	٤٦
(3-4)	C,B,A : بعض الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا *S. aureus*	47
(4-4)	طريقة اليود القياسية السريعة (اللون الابيض موجب , اللون الازرق سالب)	51
(5-4)	B ,A : طريقة التركيز المثبط الأدنى للمثيسيلين والأوكزاسيلين	٥5
(6-4)	مستعمرات بكتريا MRSA النامية على وسط CHROM agar MRSA	٥٧
(7-4)	نواتج استخلاص الـ DNA بالترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة لعزلات *S. aureus* باستعمال العدة الجاهزة Genomic DNA Mini Kit	58
(8-4)	نواتج تضخيم الجين *mecA* لبكتريا الـ *S. aureus* والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة بأستعمال	59

	تقنية الـ PCR	
62	A- B طريقة التركيز المثبط الأدنى للمثيسيلين والأوكزاسيلين والفانكومايسين	**(9-4)**
65	نواتج تضخيم الجين *mecA* لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة	**(10-4)**
65	نواتج تضخيم الجين *Spa* لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Single PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة	**(١١-4)**
66	نواتج تضخيم الجين *ClfA* لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة	**(12-4)**
66	نواتج تضخيم الجينات(*mecA + Clf+Spa*) لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Multiplex PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة	**(13-4)**
67	نواتج تضخيم الجينات(*mecA + Spa*) لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Multiplex PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة	**(14-4)**
67	نواتج تضخيم الجين *Coa* لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Single PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة	**(١٥-4)**
68	نواتج تضخيم الجين *FnbA* لبكتريا الـMRSA بأستعمال تقنية Single PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة	**(16-4)**
68	نواتج تضخيم الجين *Luks* لبكتريا الـMRSA بأستعمال تقنية Single PCRوالمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة	**(17-4)**
69	نواتج تضخيم الجينات(*Fnb + Luks*) لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Multiplex PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة	**(18-4)**
69	نواتج تضخيم الجين *Tst* لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة	**(19-4)**
70	نواتج تضخيم الجين *Eta* لبكتريا الـMRSA بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة	**(20-4)**
70	نواتج تضخيم الجينات (*Eta +Tst*) لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Multiplex PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة	**(٢١-4)**
71	D,C,B,A: نواتج تضخيم الجينات(*coa+tst+eta+Spa+mecA*)	**(٢2-4)**

{ قائمة المختصرات }

المختصر	المصطلح
AMC	Acetylmethyl-carbinol
b.p	Break point
CDC	Center for disease control and prevention
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
coa gene	Coagulase gene
CFU	Colony forming unit
DNA	Deoxyribonucleic acid
erm gene	Erythromycin resistance methylase gene
mecA	Methicillin resistant gene
MSSA	Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*
MR/VP	Methyl red/Voges proskauer broth
MSCRAMMs	Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MDR	Multidrug resistance
NCCLS	National committee for clinical laboratory standards
CNS	Coagulase negative staphylococci
nuc gene	Nuclease gene
PH	Power of hydrogen (H^+)
SCC*mec*	Staphylococcal chromosome cassettes *mec*
TBE	Tris-Borate-EDTA buffer
UTI	Urinary tract infection
van gene	Vancomycin resistance gene
VISA	Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*
VRSA	Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*
VRE	Vancomycin-resistant enterococci
WHO	World health organization

CA-MRSA	Community acquired-MRSA
ClfA	Clumping factor A
ClfB	Clumping factor B
ETA	Exfoliative toxins A
ETB	Exfoliative toxins B
FC	Fraction Crystalisable
FnbpA	Fibronectin-binding protein A
FnbpB	Fibronectin-binding protein B
Fnbps	Fibronectin-binding proteins
HA-MRSA	Hospital acquired-MRSA
IgG	Imminoglobulin G
MRSA	Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*
NAG	N-acetylglucosamine
NAM	N-acetylmuramic acid
NCBI	National center for biotechnology information
PBPs	Penicillin binding proteins
PCR	Polymerase chain reaction
PMNL	Polymorph nuclear leucocyte
PTSAgs	Pyrogenic toxin superantigens
PVL	Panton –valentine leukocidin
SEs	Staphylococcal enterotoxins
Spa gene	Surface protein A gene
SSSS	Staphylococcal scalded skin syndrome
TSS	Toxic shock syndrome

1- المـــقـــدمة Introduction :

تضم المكورات العنقودية (Staphylococci) أنواعا عديدة من البكتريا الممرضة للإنسان والحيوان على حد سواء ، وتعد *S. aureus* من أهم الأنواع الممرضة للإنسان وأكثرها شيوعاً وهي مسؤولة عن مدى واسع من الأمراض مثل الدمامل ، والخراجات المختلفة وخراجات الجروح الناتجة عن العمليات الجراحية ، والتهاب الجلد والأنسجة الرخوة ، والتهاب العظام ، والمفاصل ، والتهاب الرئة القصبي ، والتهاب الأجزاء الداخلية للقلب ، والإصابات الناتجة عن الذيفانات مثل متلازمة الصدمة الذيفانية ، ومتلازمة الجلد الحرشفي العنقودي والتسمم الغذائي (Omoe *et al.*, 2002) .

تعود امراضية هذه البكتريا وقدرتها على غزو نسيج المضيف وانتشارها فيه الى امتلاكها الكثير من عوامل الضراوة مثل انتاجها الذيفانات Toxins والانزيمات Enzymes التي تساعد البكتريا على احداث الاصابة (Brooks *et al.*, 1998) . إذ تمتلك البكتريا القابلية على إنتاج الأنزيمات خارج خلوية مثل الأنزيم المخثر لبلازما الدم الذي يمتلك القدرة على تثبيط عملية البلعمة وأنزيم الستافيلوكاينيز ، والبروتينيز ، واللاييز التي تسهم في غزو البكتريا للأنسجة ، وانتشار الخمج ، وتعمل على إنتاج ذيفانات محللة للدم نوع ألفا وبيتا وكاما ودلتا ، إلى جانب إنتاجها ذيفانات معوية مسببة تسمماً غذائياً ، كما إنها تمتلك قدرة على إنتاج ذيفانات خارجية تنتج في حالات متلازمة الصدمة الذيفانية ومتلازمة الجلد الحرشفي العنقودي (Ryan and Ray, 2004) . فضلاً عن امتلاكها المحفظة التي تساعد في مقاومة البكتريا لعملية البلعمة (O'Riodan and Lee, 2004) ، بالإضافة إلى امتلاكها جدار الخلية الذي يعد تركيباً انتجينياً لاحتوائه على التراكيب الأنتجينية (الببتايدوكلايكان ، وحامض التكويك ، وبروتين A) ، ويعمل جدار الخلية على مقاومة الجهاز المناعي للمضيف ، ويشكل حماية أوزموزية للخلية البكتيرية (McKinney *et al.*, 2001) .

لقد كان البنسلين من أكثر المضادات الحياتية تأثيرا على المكورات الذهبية وعليه فقد تم استعماله منذ بداية الأربعينيات لعلاج الاصابات المتسببة بفعل هذه البكتريا ، غير ان بعض السلالات التابعة لها بدأت تقاوم هذا المضاد بفعل قدرتها على انتاج (انزيم البيتالاكتاميز) (β- Lactamase) الذي يثبط عمل البنسلين ،

تعد أنزيمات البيتالاكتاميز من الأنزيمات المهمة لكونها المسؤولة عن مقاومة هذه البكتريا لمضادات البيتالاكتام (Fuda *et al.*, 2006) ، ومن عوامل الضراوة الأخرى هي امتلاك

بعض سلالات *S. aureus* لمورثة *mecA* المسؤولة عن مقاومتها لمجموعة البنسيلينات الثابتة نتيجة لتشفيرها البروتينات الرابطة للبنسيلين (PBPs) Penicillin binding proteins التي تعمل على تقليل الألفة مع المضاد الحيوي المثيسيلين وتعرف المكورات العنقودية المقاومة للمثيسيلين بـ MRSA التي تمتاز بتوطنها بشكل أساس في المستشفيات وتعرف بـ Hospital acquired-MRSA (HA-MRSA) وعند استيطان الـ MRSA في بيئة المجتمع تعرف عندئذ بـ Community acquired-MRSA (CA-MRSA) ، وجاءت أهميتها من خلال

مقاومتها العديد من المضادات الحيوية مثل مقاومتها لجميع أنواع مضادات البيتالاكتام ، والعديد من المضادات الحيوية الأخرى (Al-Rawahi *et al.*, 2008) .

إن لهذه السلالات البكتيرية أهمية كبيرة في الاصابات المرتبطة بالمستشفيات وخاصة في ردهات العناية المركزة وردهات الأطفال والحروق وصالات العمليات مسببة اصابات مختلفة هددت حياة المرضى الراقدين في المستشفيات وخاصة ضعاف المناعة (Falcao *et al.*, 1999) .

ان من العوامل المهمة التي ساعدت في انتشار هذه السلالات البكتيرية وتزايد الاصابة بها هي سهولة انتقالها بين ايادي الكادر الطبي مع تواجدها بصورة طبيعية في المجاري التنفسية الخارجية للعاملين في المستشفيات فضلا عن مقاومتها لمدى واسع من المضادات الحياتية (Ramose *et al.*, 1999) و (Walker *et al.*, 1999) .

وبالنظر لأهمية MRSA في إحداث إصابات مختلفة من الجسم ، وصعوبة علاجها والسيطرة عليها ، وقلة الدراسات بشأن انتشارها في مستشفيات مدينة الديوانية ، ولقلة الدراسات الجزيئية التي تتعلق بالعوامل الامراضية (عوامل الضراوة) الخاصة بهذه البكتريا ، فقد هدفت الدراسة الحالية الى كشف وتحديد عوامل الضراوة في هذه البكتريا وذلك من خلال المحاور التالية :

أ- عزل وتشخيص بكتريا *S. aureus* ودراسة حساسيتها للعديد من المضادات الحيوية المختلفة .

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

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

د- تحديد قيم التركيز المثبط الادنى (MIC) في عزلات الـ MRSA بأستعمال فحص HiComb MIC Test لثلاثة أنواع من المضادات الحيوية وهي (Methicillin, Oxacillin, Vancomycin) .

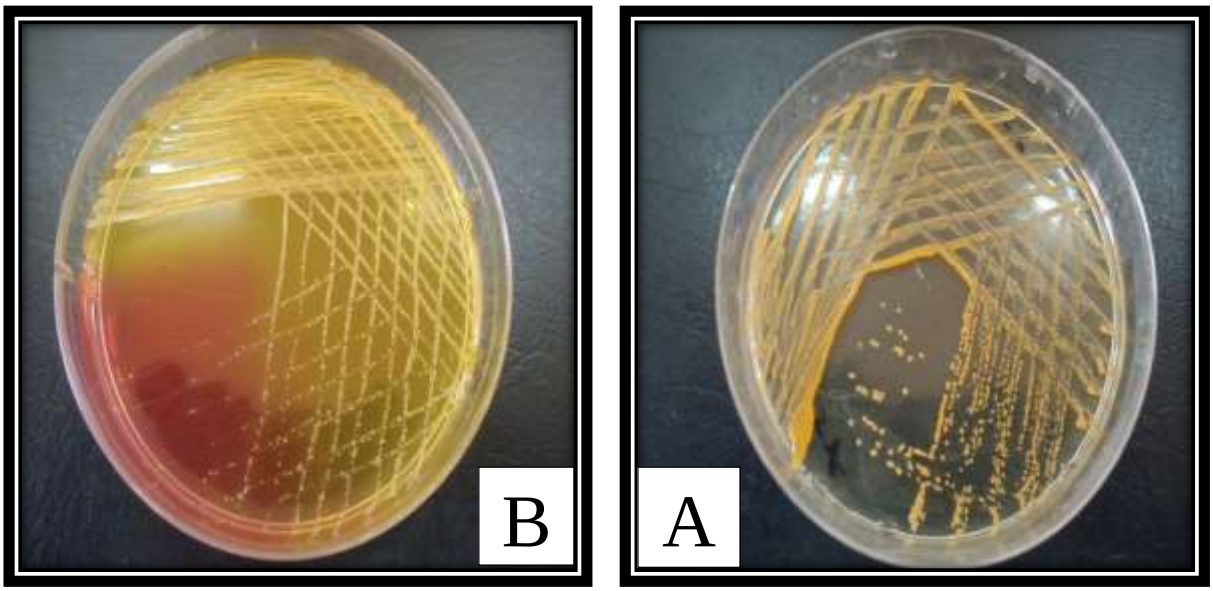
٤- النتائج Results

٤-١ عزل بكتريا الـ *S. aureus* وتشخيصها

أثبتت الدراسة الحالية عائدية ٦٦ عزلة إلى جنس المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* من خلال دراسة بعض الصفات الزرعية والمجهرية والفحوصات الكيموحيوية وكما يلي :

٤-١-١ الصفات الزرعية Cultural Characteristics

ظهرت المستعمرات النامية على وسط المانيتول الملحي الصلب Mannitol Salt Agar باللون الأصفر وعلى وسط Staphylococcus Medium No. 110 باللون البرتقالي وكما مبين بالشكل (4-1) B-A .

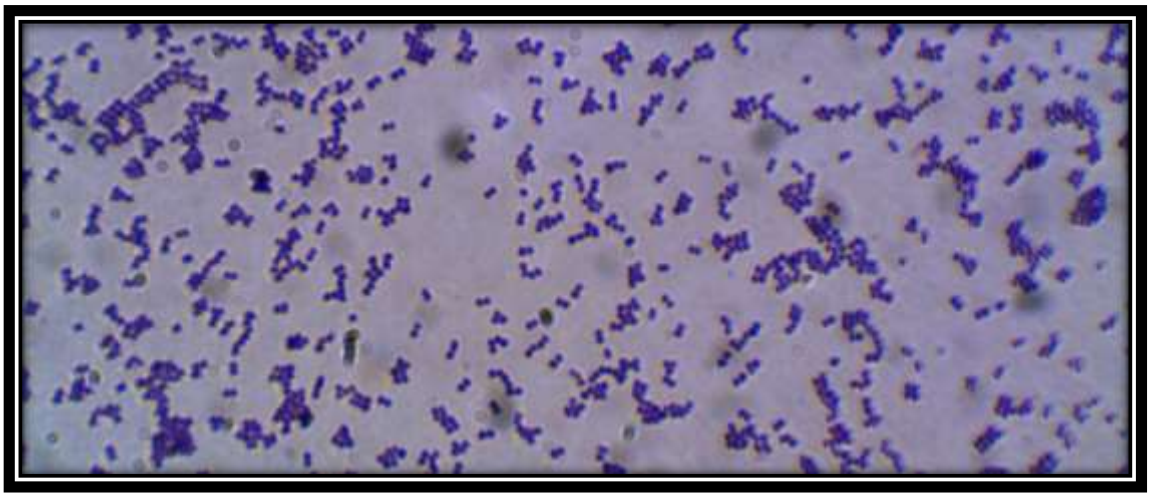


الشكل (4-1) A : مستعمرات بكتريا *S. aureus* النامية على وسط Staph 110

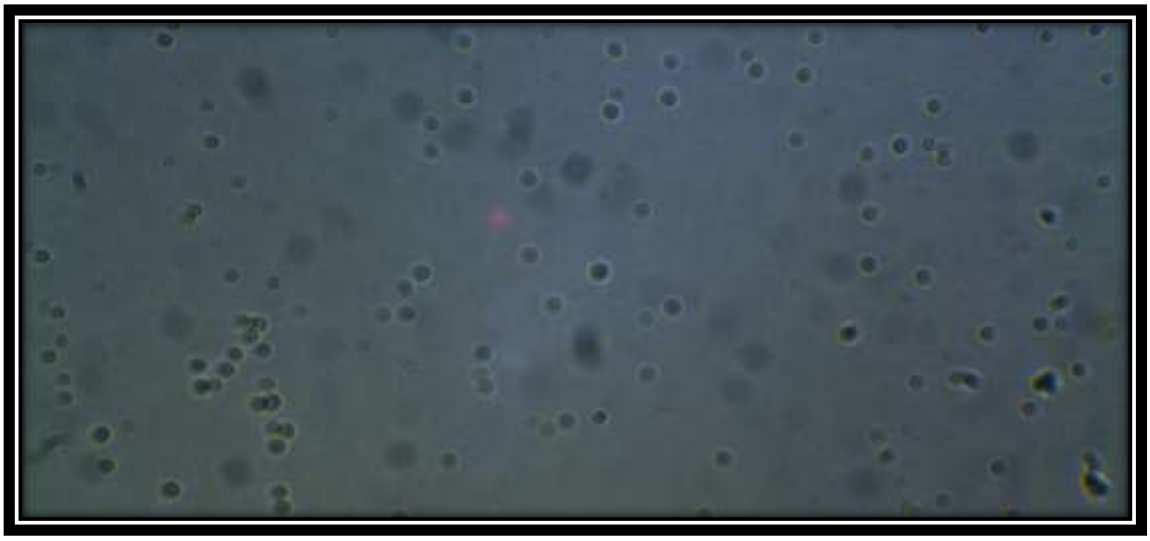
B : مستعمرات بكتريا *S. aureus* النامية على وسط Mannitol Salt Agar

٤-١-٢ الصفات المجهرية Microscopic Characteristics

أظهرت نتائج الفحص المجهري ان خلايا البكتريا المعزولة كروية الشكل ، عنقودية الترتيب ، موجبة لصبغة غرام كما في الشكل (4-2) A , ومكونة للمحفظة كما في الشكل (4-2) B .



A : بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* المصبغة بصبغة غرام تحت المجهر وبالعدسة الزيتية

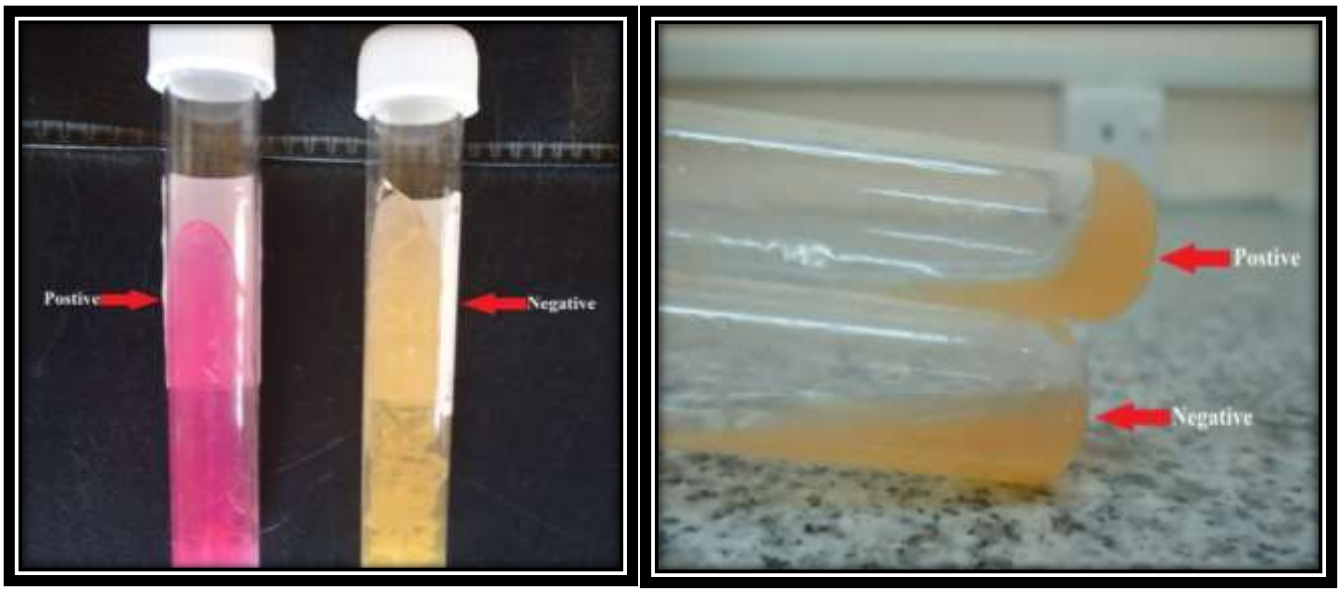


B : بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* المصبغة بصبغة الحبر الهندي تحت المجهر وبالعدسة الزيتية .

الشكل (4-2) B-A : الفحوصات المجهرية لبكتريا الـ *S. aureus* (قوة التكبير X 100) .

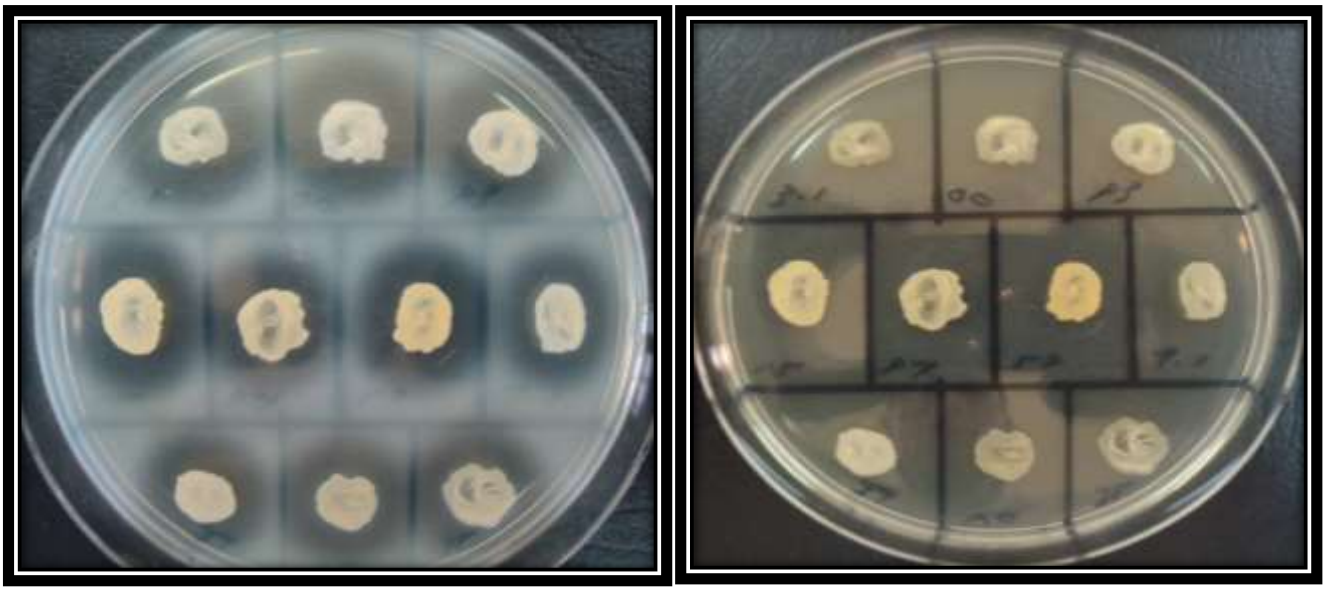
٤-١-٣ الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests

شخصت العزلات النامية على الوسط الانتقائي بالاعتماد على الفحوصات الكيموحيوية حيث أظهر الجدول (4-1) استجابة ٦٦ عزلة بنسبة (١٠٠%) لكل من اختبار الكتاليز ومختزالبلازما الحر واختبار محلل الدنا والجيلاتينيز وتخمر المانيتول ، وتباينت اســـتجابة العزلات لاختبار عامل التكتل إذ أظهرت ٤٠ عزلة نتيجة موجبة بنسبة (٦٠,٦%) ، و٥١ عزلة نتيجة موجبة لاختبار فوكس - بروسكاور بنسبة (٧٧,٢%) , و٤٨ عزلة نتيجة موجبة لاختبار اليوريز بنسبة (٧٢,٧) , بينما اظهرت جميع العزلات نتبجة سالبة لاختبار الاوكسيديز .



A- فحص الكوكليز Coagulase test

B- فحص اليوريز Urease test



قبل أضافة الكاشف (HCl)

بعد أضافة الكاشف (HCl)

C- فحص تحلل الـ DNA (DNase test)

الشكل (3-4): C,B,A: بعض الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا *Staphylococcus aureus*

جدول (1-4) : الاختبارات الكيموحيوية لـ (٦٦) عزلة *S. aureus*

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

٤-٢ الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ *S. aureus*

شخصت ٦٦ عزلة (بنسبة عزل ٣٨,٢ % من مجموع العينات ١٧٣) كما مبين في الجدول (4-2) وكانت أعلى نسبة عزل لبكتريا الـ *Staphylococcus aureus* من اخماج الحروق وبنسبة (٤٠.٩%) , تلتها اخماج الجروح والجلد (الخراج) بنسب عزل (27.3%)

لكل منهما , بينما كانت أدنى نسبة عزل لبكتريا الـ *S. aureus* من الإدرار واخماج الأذن وبنسب عزل (3 %) و (1.5%) على التوالي .

جدول (4-2) : الاعداد والنسب المئوية لعزل بكتريا الـ *S. aureus* المعزولة من عينات سريرية مختلفة.

مصدر العينات	عدد العينات	عدد العزلات	النسبة المئوية (%)
الإدرار Urine	١٣	٢	%٣
*مسحات الأذن Ear swabs	٩	١	%1.5
مسحات الجروح Wound swabs	٤٩	١٨	%27.3
مسحات الحروق Burn swabs	٥٢	٢٧	%40.9
**الخراجات Absceses	٥٠	١٨	%27.3
المجموع	١٧٣	٦٦	% ٣٨,٢

$X^2_{tab} = 0.078$ $X^2_{cal} = 8.385$

يوجد فرق معنوي عند مستوى احتمالية $p<0.05$ (ماعدا عينات الجروح والخراجات) .

*تشمل التهاب الأذن الخارجية والوسطى .

**تشمل اصابات جلدية مختلفة مثل الدمامل والتهابات الجلد والانسجة الرخوة .

بينت نتائج الدراسة الحالية أن اعلى نسبة عزل لبكتريا الـ *S. aureus* كانت من اخماج الحروق لمصابين انحصرت اعمارهم بين (١ -١٠ سنة) وبنسبة عزل هي (18.1%) بواقع ١٢ عزلة وكما مبين في الجدول (4-3) . كما يبين الملحق رقم (1) توزيع بكتريا الـ *S. aureus* حسب مصدر العزل وجنس وعمر المريض .

جدول (4-3) : توزيع الاصابة بجرثومة *S. aureus* حسب الفئة العمرية للمصاب ونسبتها المئوية .

المصدر+عدد العزلات / الفئة العمرية	الإدرار Urine	مسحات الأذن Ear swabs	مسحات الجروح Wound swabs	مسحات الحروق Burn swabs	الخراجات Absceses
١-١٠ سنة	(%0.0)0	(%0.0)0	(%0.0)0	(%18.1)12	(%0.0)0
١٠-٢٠ سنة	(%1.5)١	(%1.5)1	(%13.6)9	(%6)4	(%12.1)8
٢٠-٣٠ سنة	(%0.0)0	(%0.0)0	(%0.0)0	(%12.1)8	(%12.1)8
30 سنة وأكثر	(%1.5)١	(%0.0)0	(%13.6)9	(%4.5)3	(%3)2
المجموع	(%3)٢	(%1.5)1	(%27.3)18	(%40.9)27	(%27.3)18

LSD = 2.6 (بين الاعمارلكل مصدر) LSD = 2.6 (بين مصادر العزلات)

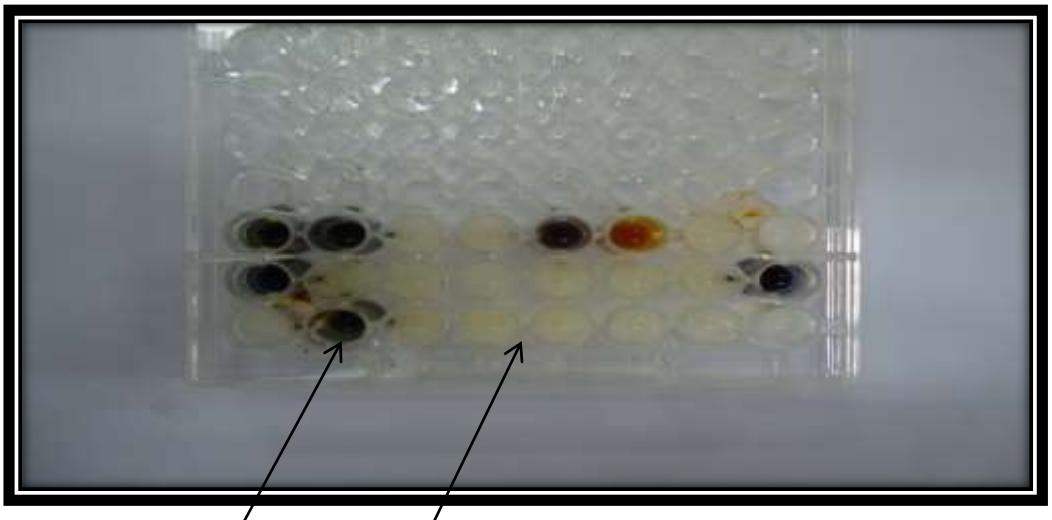
LSD التداخل = 6.2 يوجد فرق معنوي عند مستوى احتمالية $p<0.05$.

٤-٣ التحري عن قابلية بكتريا *S. aureus* على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز

استعملت طريقة اليود القياسية السريعة للتحري عن قابلية ٦٦ عزلة *S. aureus* قيد الدراسة على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز، اظهر الجدول (4-4) وجود ٥٤ عزلة منتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز بنسبة (٨١,٨%) من مجموع ٦٦ عزلة كما أظهرت النتائج في الدراسة الحالية وجود ١٢ عزلة غير منتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز بنسبة (١٨,٢%) ، ومن خلال النتائج يمكن الاستدلال على ارتفاع نسبة إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز ،ويبين الشكل (4-4) طريقة اليود القياسية السريعة .

جدول (4-4) : قدرة ٦٦ عزلة *S. aureus* على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز

المصدر / أنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز	الإدرار Urine	مسحات الأذن Ear swabs	مسحات الجروح Wound swabs	مسحات الحروق Burn swabs	الخراجات Absceses	المجموع (%)
العزلات المنتجة	(%1.5)1	(%1.5)1	(%21.2)14	(%33.3)22	(%24.2)16	54(%81.8)
العزلات غير المنتجة	(%1.5)1	(%٠٠)٠	(%6.0)4	(%7.5)5	(%3.0)2	12(%18.2)
يوجد فرق معنوي عند مستوى احتمالية $p<0.05$ بين جميع العزلات ماعدا عزلات الإدرار						



الشكل (4-4) : طريقة اليود القياسية السريعة (اللون الابيض موجب , اللون الازرق سالب)

٤-٤ اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility test

تم اختبار الحساسية الدوائية لجميع عزلات *S. aureus* قيد الدراسة باستعمال 16 نوعاً من المضادات الحيوية القياسية ، أظهرت النتائج وكما هو موضح في الجدول (4-5) ان هناك تبايناً في مقاومة العزلات قيد الدراسة تجاه المضادات المستخدمة اذ اظهرت البكتريا مقاومة عالية لكل من مضاد PenicillinG و Ampicilln و Amoxicillin/Clavulinic acid اذ بلغت نسبة المقاومة (١٠٠%) ، وللجيل الثالث من السيفالوسبورينات والمتمثلة بـ Ceftriaxone و Cefotaxime اذ جاءت نسب المقاومة لها (٧٧,٢%) و (٧٢,٧%) على التوالي، في حين بلغت نسبة المقاومة لمضاد Cephalothin هي (٧٤,٢%), أما بالنسبة لمضادات مجموعة الـ الماكروليدات Macrolides ومن ضمنها Erythromycin فقد بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد هي (٦٩,٦%) , كما أوضحت النتائج ان نسبة المقاومة لمضادات الـ Aminoglycosides والتي منها الـ Amikacin وGentamicin فقد بلغت (٤٨,٤%) و (٥٣,٠%) على التوالي .

أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى أن نسب المقاومة لكل من مضاد Clindamycin و Chloramphenicol و Tetracycline هي (٤٨,٤%) و (٣٤,٨%) و (٣٧,٨%) على التوالي , كما بينت النتائج ان المضادين الحيويين Ciprofloxacin و Imipenem هي من أهم الخيارات العلاجية في علاج الاصابات التي تسببها بكتريا الـ *S. aureus* اذ بلغت نسب المقاومة لهما (١,٥%) و (٣,٠%) على التوالي ، وسجلت النتائج ارتفاعاً ملحوظا في نسبة المقاومة لمضاد الـ Meropenem إذ بلغت (٢١,٢%) , في حين أظهرت جميع العزلات قيد الدراسة حساسية عالية للمضاد الحيوي Vancomycin بنسبة (100%) .

جدول (4-5) : نسب مقاومة 66 عزلة لبكتريا *S. aureus* للمضادات الحيوية

S (%)	I (%)	R (%)	Symbol	انواع المضادات الحيوية
33(50%)	1(1.5%)	32(48.4%)	**AK**	**Amikacin**
0(0.0%)	0(0.0%)	66(100%)	**AMC**	**Amoxicillin/Clavulinic acid**
0(0.0%)	0(0.0%)	66(100%)	**AMP**	**Ampicilln**
17(25.7%)	1(1.5%)	48(72.7%)	**CTX**	**Cefotaxime**
7(10.6%)	8(12.1%)	51(77.2%)	**CTR**	**Ceftriaxone**
16(24.2%)	1(1.5%)	49(74.2%)	**CF**	**Cephalothin**
62(93.9%)	3(4.5%)	1(1.5%)	**CIP**	**Ciprofloxacin**
40(60.6%)	3(4.5%)	23(34.8%)	**C**	**Chloramphenicol**
34(51.5%)	0(0.0%)	32(48.4%)	**CD**	**Clindamycin**
14(21.2%)	6(9.0%)	46(69.6%)	**E**	**Erythromycin**
31(46.9%)	0(0.0%)	35(53.0%)	**GEN**	**Gentamicin**
52(78.7%)	0(0.0%)	14(21.2%)	**MEP**	**Meropenem**
61(92.4%)	3(4.5%)	2(3.0%)	**IPM**	**Imipenem**
0(0.0%)	0(0.0%)	66(100%)	**P**	**Penicillin G**
38(57.5%)	3(4.5%)	25(37.8%)	**TE**	**Tetracycline**
66(100%)	0(0.0%)	0(0.0%)	**VA**	**Vancomycin**
Sensitive=**S** 6.2 =LSD		Intermediate =**I** 2.6 =LSD		Resistance =**R** 3.6 =LSD

يوجد فرق معنوي عند مستوى احتمالية $p<0.05$.

٤-٥ التحري عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين MRSA

٤-٥-١ طريقة أقراص فحص الحساسية

تم التحري عن صفة المقاومة للمثيسيلين لجميع عزلات *S. aureus* البالغ عددها (66) عزلة باستعمال اختبار أقراص فحص الحساسية الدوائية لمضادين الأوكزاسيلين والسيفوكسيتين وكما مبين بالشكل (4-5) (لم يتم أستعمال أقراص مضاد المثيسيلين في هذا الفحص) ، أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنَ نسبة العزلات السريرية المقاومة للأوكزاسيلين والسيفوكسيتين هي (45.5%) بواقع 30 عزلة وبالتالي عدت هذه العزلات مقاومة للمثيسيلين MRSA كتحري أولي , وكما موضح في الجدول (4-6) .

جدول (4-6): الأعداد والنسب المئوية لعزلات *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين بالاعتماد على طريقة أقراص فحص الحساسية

المضادات	عدد العزلات (66)		
	(%) R	(%) I	(%) S
Oxacillin (OX)	(45.5%) 30	(0.0%) 0	(54.5%) 36
Cefoxitin (FOX)	(45.5%) 30	(0.0%) 0	(54.5%) 36

Resistance =**R** Intermediate =**I** Sensitive=**S**

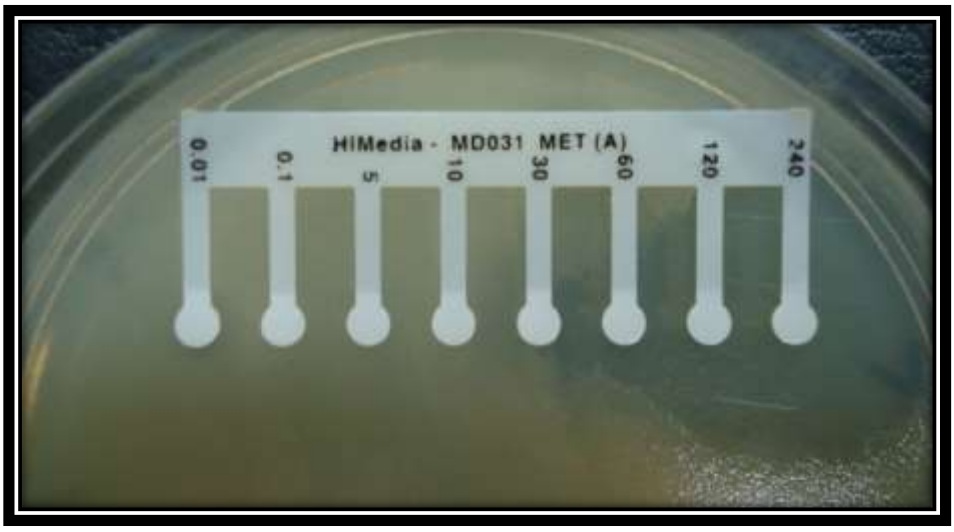
لايوجد فرق معنوي عند مستوى احتمالية $p<0.05$.

الشكل (4-5) : طريقة أقراص فحص الحساسية للتحري عن عزلات الـ MRSA

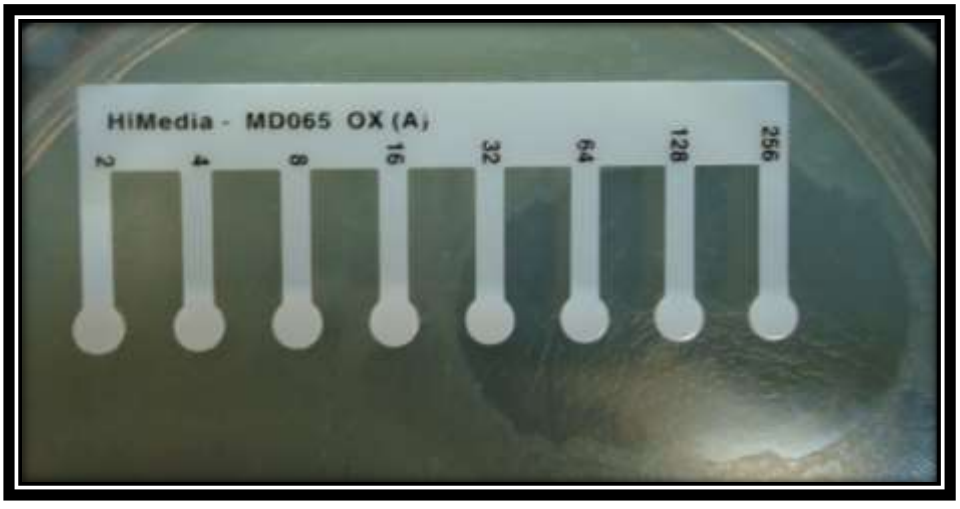
٤-٥-٢ طريقة التركيز المثبط الأدنى للمثيسيلين والأوكزاسيلين

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

تـم التحـري عـن التركيـز المثـبط الأدنــى للعـزلات المقاومــة لمضــادات الأوكزاسـيلين والسيفوكسيتين , وذلك باستعمال اختبـار التركيز المثبط الأدنـى HiComb MIC test لمضـاد المثيسيلين Methicillin والأوكزاسيلين Oxacillin , وكما مبين في الشكل (4-٥) .



A : التركيز المثبط الأدنى HiComb MIC test لمضاد Methicillin



B : التركيز المثبط الأدنى HiComb MIC test لمضاد Oxacillin

الشكل (4-5) : B-A : طريقة التركيز المثبط الأدنى للمثيسيلين والأوكزاسيلين

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (4-7) مقاومة العزلات قيد الدراسة بنسبة (100%) لكل من المثيسيلين والأكزاسيلين , وسجلت النتائج ارتفاع مستويات نسب MIC لكل من المضادين والتي كانت بين (240≤ - 30) مايكروغرام/ ملي لتر لمضاد المثيسيلين و - 16) (256≤ مايكروغرام/ ملي لتر لمضاد الأوكزاسيلين .

جـدول (4-7): التركيـز المثـبط الأدنـى MIC للمثيسـيلين Methicillin والأوكزاسـيلين Oxacillin .

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

٤-٥-٣ وسط كروم أكار CHROM agar MRSA

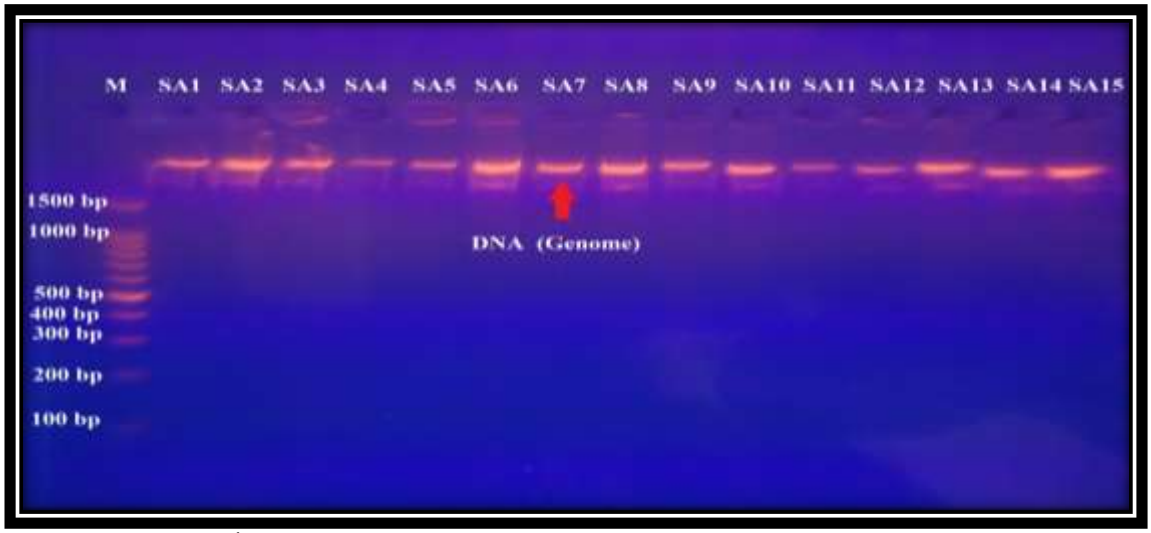
نميت جميع عزلات *S .aureus* قيد الدراسة البالغة (66) عزلة على وسط CHROM agar MRSA اذ أظهرت (30) عزلة وبنسبة (45.5%) قدرتها على مقاومة مضاد المثيسيلين والنمو على وسط (CHROM agar MRSA) وتميزها بأعطائها اللون الوردي الخاص بعزلات الـ (MRSA) , وكما مبين في الشكل (4-6) .

الشكل (4-6) : مستعمرات بكتريا MRSA النامية على وسط CHROM agar MRSA بطريقة التخطيط .

٤-٥-٤ تقنية تفاعل إنزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR)

٤-٥-٤-١ استخلاص الـ DNA

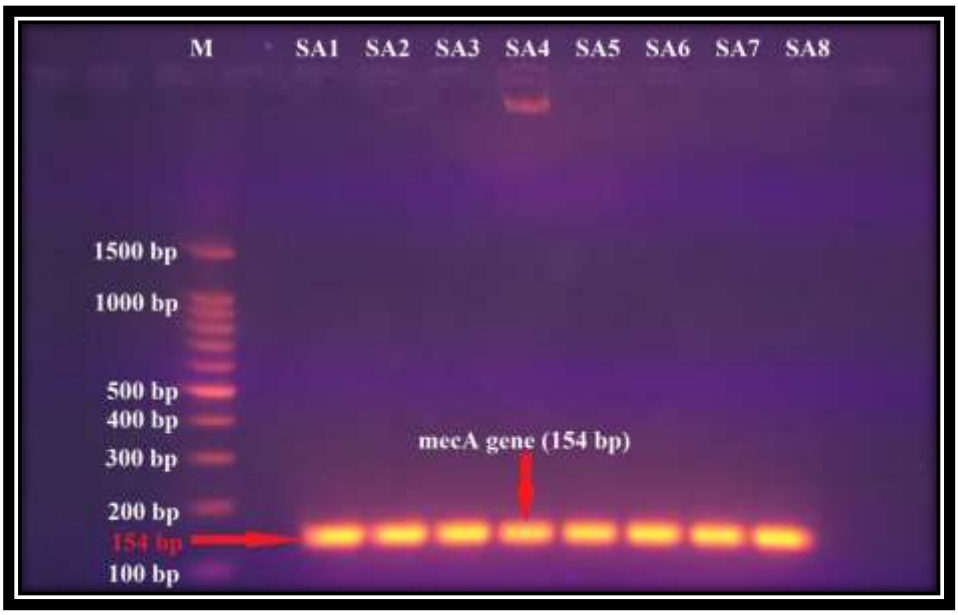
أظهرت نتائج استخلاص الـ DNA لعزلات *S. aureus* بأستعمال العدة المستعملة لهذا الغرض وترحيله كهربائياً في هلام الأكاروز(1.5 %) والكشف عنه بأستعمال صبغة الأثيديوم بروميد وفحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية Ultra violate (UV) احتواء جميع العزلات على حزمة واحدة ومفردة للـ DNA المستخلص , وكما مبين في الشكل (4-7) .



الشكل (4-7) : نواتج استخلاص الـ DNA بالترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة لعزلات *Staphylococcus aureus* باستعمال العدة الجاهزة Genomic DNA Mini Kit . حيث أن M = DNA Ladder (100-1500bp) , SA = *Staphylococcus aureus* , bp = base pair زوج قاعدي .

٤-٥-٤-٢ التشخيص ألتأكيدي للتحري عن عزلات MRSA بأستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة (PCR) .

تم اختبار جميع عزلات *S. aureus* للتأكد من أحتوائها على مورثة *mecA* (المقاومة للمثيسيلين) بأستعمال تقنية تفاعل إنزيم البلمرة (PCR) , إذ أظهرت الـ (30) عزلة (الموجبة للطرق السابقة) أحتوائها على هذه المورثة وبنسبة (45.5%) , وبالتالي عدت هذه العزلات مقاومة للمثيسيلين MRSA , وكما مبين في الشكل (4-8) .



الشكل (4-8) : نواتج تضخيم الجين *mecA* لبكتريا الـ *Staphylococcus aureus* والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة بأستعمال تقنية الـ PCR . حيث أن M = (100-1500bp) DNA Ladder marker , SA = *Staphylococcus aureus* , جميع العزلات أظهرت نتيجة موجبة لجين *mecA* المسؤول عن المقاومة للمثيسيلين في بكتريا MRSA .

4-6 مقاومة عزلات الـ MRSA للمضادات الحيوية

4-6-1 اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility test

تم التحري عن الحساسية الدوائية لعزلات MRSA تجاه 16 نوعاً من المضادات الحيوية لمعرفة مدى مقاومة عزلات MRSA وحساسيتها لبعض المضادات التي من الممكن إن تقدم بوصفها علاجاً للأخماج الناتجة عن الإصابة بها .

أظهرت النتائج وكما هو موضح في الجدول (4-8) مقاومة جميع عزلات MRSA بنسبة (100%) لمضادات البيتالاكتام β-lactam وهي كل من (Ampicilln , Amoxicillin/Clavulinic acid , Cefotaxime , Ceftriaxone , Cephalothin , Penicillin G) . وأظهرت نتائج الدراسة الحالية مقاومة عزلات MRSA لمضاد Erythromycin بنسبة (76.6%) , وكانت نسب المقاومة لمضادات Clindamycin , Tetracycline , Amikacin هي (56.6%) , (56.6%) , (53.3%) على التوالي , اما مضادات Chloramphenicol , Gentamicin فكانت نسبة المقاومة لكل منهما هي (46.6%) , وبلغت نسب المقاومة لمضادات Ciprofloxacin , Imipenem , Meropenem هي (3.3%) , (3.3%) , (20.0%) على التوالي , في حين سجلت النتائج حساسية جميع عزلات MRSA بنسبة (100%) للمضاد الحيوي Vancomycin.

جدول (4-8) : مقاومة 30 عزلة MRSA للمضادات الحيوية

S (%)	I (%)	R (%)	Symbol	انواع المضادات الحيوية
(%46.6)14	(%0.0)0	(%53.3)16	**AK**	**Amikacin**
(%0.0)0	(%0.0)0	(%100)30	**AMC**	**Amoxicillin/Clavulinic acid**
(%0.0)0	(%0.0)0	(%100)30	**AMP**	**Ampicilln**
(%0.0)0	(%0.0)0	(%100)30	**CTX**	**Cefotaxime**
(%0.0)0	(%0.0)0	(%100)30	**CTR**	**Ceftriaxone**
(%0.0)0	(%0.0)0	(%100)30	**CF**	**Cephalothin**
(%90.0)27	(%6.6)2	(%3.3)1	**CIP**	**Ciprofloxacin**
(%40.0)12	(%13.3)4	(%46.6)14	**C**	**Chloramphenicol**
(%40.0)12	(%3.3)1	(%56.6)17	**CD**	**Clindamycin**
(%16.6)5	(%6.6)2	(%76.6)23	**E**	**Erythromycin**
(%50.0)15	(%3.3)1	(%46.6)14	**GEN**	**Gentamicin**
(%80.0)24	(%0.0)0	(%20.0)6	**MEP**	**Meropenem**
(%96.6)29	(%0.0)0	(%3.3)1	**IPM**	**Imipenem**
(%0.0)0	(%0.0)0	(%100)30	**P**	**Penicillin G**
(%43.3)13	(%0.0)0	(%56.6)17	**TE**	**Tetracycline**
(%100)30	(%0.0)0	(%0.0)0	**VA**	**Vancomycin**

Sensitive=**S** Intermediate =**I** Resistance =**R**

6.4 =LSD 3.3 =LSD 3.9 =LSD

يوجد فرق معنوي عند مستوى احتمالية $p<0.05$.

2-6-4 طريقة التركيز المثبط الأدنى للفانكومايسين

تم التحري عن التركيز المثبط الأدنى MIC لجميع عزلات MRSA البالغ عددها (30) عزلة والمشخصة بالطرائق الأربعة المذكورة سابقاً وذلك بأستعمال اختبار التركيز المثبط الأدنى HiComb MIC test لمضاد الفانكومايسين Vancomycin , كما مبين في الشكل (4-9) .

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (4-9) حساسية عزلات MRSA بنسبة (100%) لمضاد الفانكومايسين وسجلت نسبة MIC بين (4 ≤ - O.128) مايكروغرام / ملي لتر , ولم تظهر النتائج وجود عزلة مقاومة لمضاد الفانكومايسين VRSA .

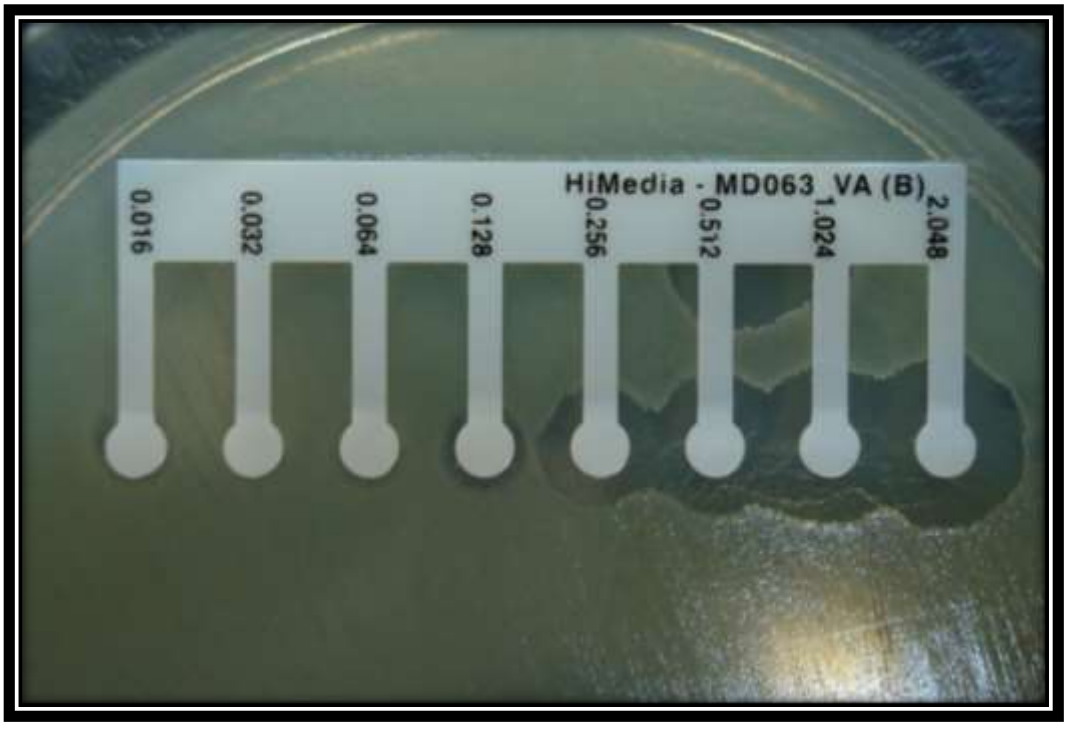
جدول (4-9): التركيز المثبط الأدنى MIC لمضاد الفانكومايسين Vancomycin

العزلات	MIC للفانكومايسين		
	R	I	S
	>32 µg/ml	8-16 µg/ml	≤ 4 µg/ml
SA1		0.256	
SA2		0.128	
SA3		2	
SA4		4	
SA5		4	
SA6		4	
SA7		2.048	
SA8		2	
SA9		2	
SA10		0.128	
SA11		2	
SA12		0.128	
SA13		1.024	
SA14		0.512	
SA15		0.128	

العزلات	MIC للفانكومايسين		
	R	I	S
	>32 µg/ml	8-16 µg/ml	≤ 4 µg/ml
SA16		0.128	
SA17		2	
SA18		0.128	
SA19		0.128	
SA20		0.256	
SA21		4	
SA22		2	
SA23		4	
SA24		0.128	
SA25		0.128	
SA26		2	
SA27		4	
SA28		2	
SA29		2	
SA30		2	

Sensitive=**S** Intermediate =**I** Resistance =**R**

A-فحص التركيز المثبط الأدنى HiComb MIC test لمضادات Vancomycin, Oxacillin, Methicillin



B : فحص التركيز المثبط الأدنى HiComb MIC test لمضاد Vancomycin

الشكل (4-9) : A- B طريقة التركيز المثبط الأدنى للمثيسيلين والأوكزاسيلين والفانكومايسين

٤-7 تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد والمتعدد Single and Multiplex PCR

تـم التحـري عـن بعـض عوامـل الضـراوة لجميـع عـزلات MRSA البالغـة (30) عزلـة بأستعمال تقنيـة تفاعل إنـزيم البلمـرة المفرد والمتعدد Single & Multiplex PCR , اذ تـم التحري عن الجينـات المسؤولة عن عوامل الضـراوة وهـي كل من *Coa* الجين المسؤول عن الانزيم المخثر للبلازما (Coagulase) , و *ClfA* الجين المسؤول عن عامل التكتل (Clumping Factor), و *Spa* الجين المسؤول عن بروتين A (Protein A) , و *FnbA* الجين المسؤول عن بروتين الفايبرونكتين (Fibronectin) , و *Luks* الجين المسؤول عن الذيفان القاتل لكريـات الدم البيض (Leukocidin) , و *Eta* الجين المسؤول عن ذيفـان تقشـر الجلـد (Exfoliative Toxin) , و *Tst* الجـين المسؤول عـن ذيفـان متلازمـة الصـدمة السمية (Toxic Shock Toxin) .اذ أظهرت (٣٠) عزلة بنسبة (١٠٠%) أمتلاكها لكل من جينـات *Coa* و*Clf A* و *Spa* و*Fnb A* , كمـا أظهـرت (١٣) عزلـة بنسبة (٤٣,٣%) أمتلاكهـا لجين *Luks* , و (١٢) عزلة بنسبة (٤٠%) أمتلاكها لجين *Eta* , بينما أظهرت (٤) عزلات فقط بنسبة (١٣,٣%) أمتلاكها لجين *Tst* , وكما موضح في الجدول (4-10) .

جدول (4-10) : الاعداد والنسب المئوية للتحري عن بعض جينات عوامل الضراوة في عزلات (MRSA) بأستعمال تقنية الـ Single & Multiplex PCR .

الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة Virulence Factor genes	عدد عزلات الـ MRSA	النسبة الئوية (%)
Coa (Coagulase gene)	**30**	**100%**
ClfA Clumping Factor (gene)	**30**	**100%**
Spa (Protein A gene)	**30**	**100%**
Fnb (Fibronectin gene)	**30**	**100%**

43.3%	**13**	***Luks*** (Leukocidin gene)
40%	**12**	***Eta*** Exfoliative Toxin (gene)
13.3%	**4**	***Tst*** Toxic Shock Toxin (gene)

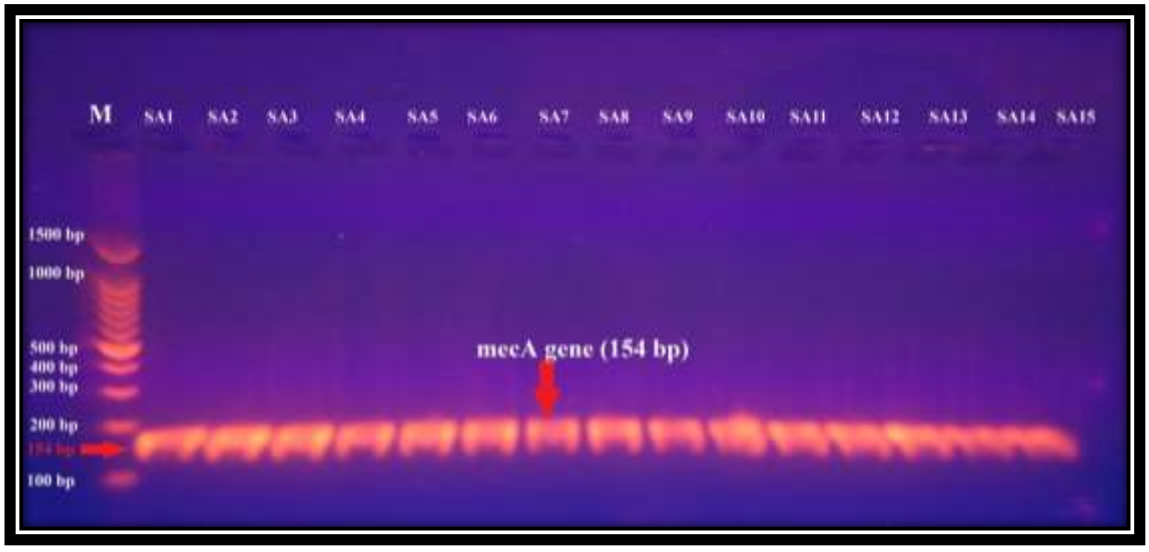
توزعت الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة Virulence Factors بالنسبة لمصدر عزل بكتريا *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA فكانت 30 عزلة بنسبة (100%) وبواقع 14 (46.6%) عزلة من الخراجات , و11 (36.6%) عزلة من الحروق , و 4 (13.3%) عزلة من الجروح , وعزلة واحدة (3.3%) من الأذن تمتلك لكل من جينات *coa* و *clfA* و *spa* و *fnbA* على التوالي , وكانت 13 عزلة بنسبة (43.3%) وبواقع 10 (33.3%) عزلات من الخراجات , وعزلة واحدة (3.3%) لكل من الجروح والحروق والأذن و بالنسبة نفسها ايضاً

جدول (4-11) : الأعداد والنسب المئوية لتوزيع جينات عوامل الضراوة بحسب مصادر عزل بكتريا الـ *S.aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA .

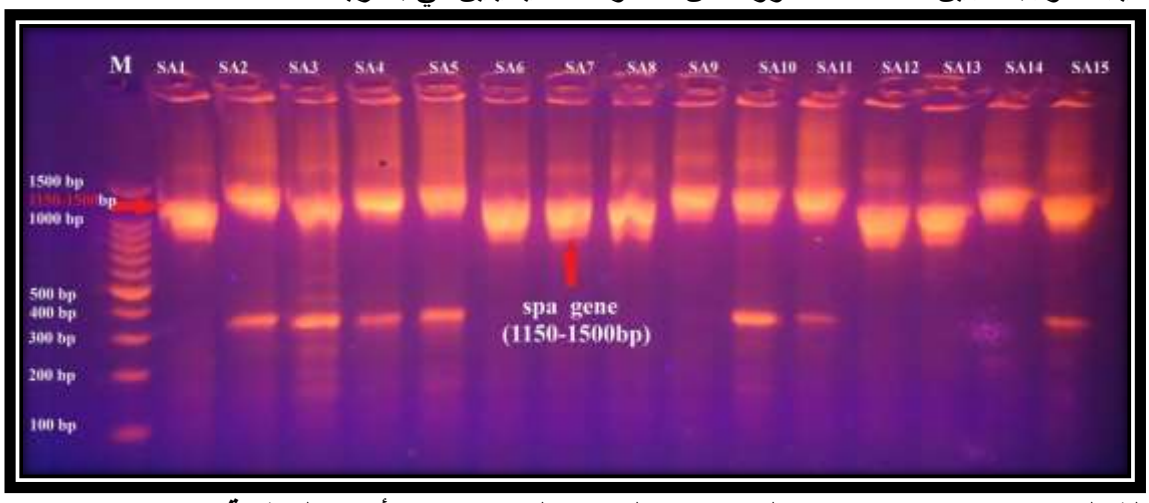
المصدر+عدد العزلات / الجينات	الإدرار Urine (%)	مسحات الأذن Ear swabs (%)	مسحات الجروح Wound swabs (%)	مسحات الحروق Burn swabs (%)	الخراجات Abscesses (%)	المجموع (%)
Coa (Coagulase gene)	**0(0.0%)**	**1(3.3%)**	**4(13.3%)**	**11(36.6%)**	**14(46.6%)**	**30(100%)**
ClfA Clumping Factor (gene)	**0(0.0%)**	**1(3.3%)**	**4(13.3%)**	**11(36.6%)**	**14(46.6%)**	**30(100%)**
Spa (Protein A gene)	**0(0.0%)**	**1(3.3%)**	**4(13.3%)**	**11(36.6%)**	**14(46.6%)**	**30(100%)**

30(100%)	**14(46.6%)**	**11(36.6%)**	**4(13.3%)**	**1(3.3%)**	**0(0.0%)**	***Fnb*** (Fibronectin gene)
13(43.3%)	**10(33.3%)**	**1(3.3%)**	**1(3.3%)**	**1(3.3%)**	**0(0.0%)**	***Luks*** (Leukocidin gene)
12(40.0%)	**4(13.3%)**	**6(20.0%)**	**2(6.6%)**	**0(0.0%)**	**0(0.0%)**	***Eta*** Exfoliative Toxin (gene)
4(13.3%)	**2(6.6%)**	**0(0.0%)**	**2(6.6%)**	**0(0.0%)**	**0(0.0%)**	***Tst*** Toxic Shock (Toxin gene)
LSD = 3.2 (بين الجينات) **LSD = 1.9 (بين المصادر)** **LSD التداخل = 5.1 (يوجد فرق معنوي عند مستوى احتمالية $p<0.05$)**						

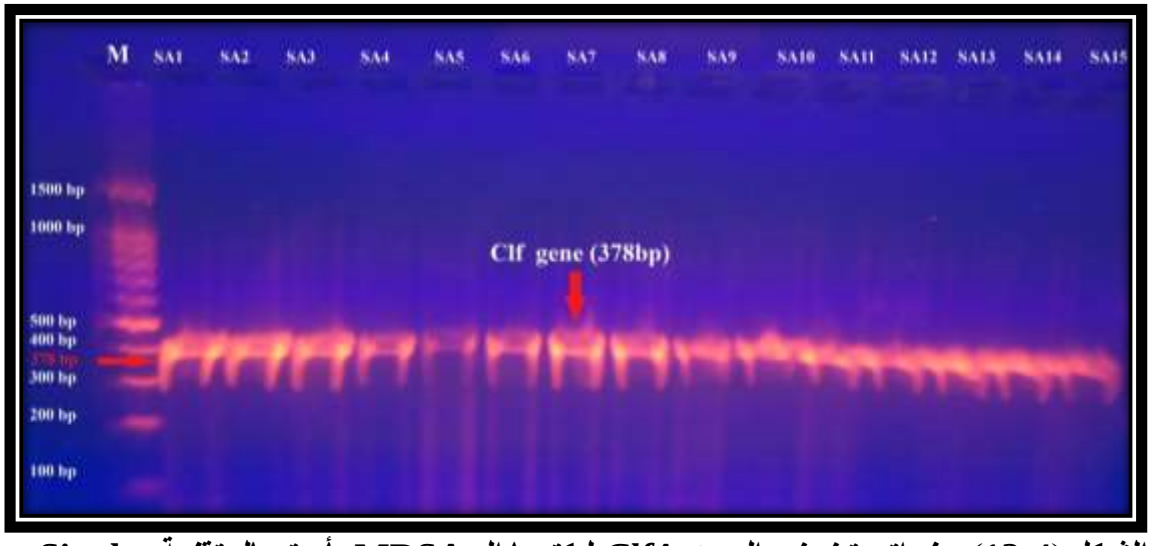
تمتلك لجين *luks* , في حين كانت 12 عزلة بنسبة (40%) من عزلات MRSA وبواقع 6 (20%) عزلات من الحروق , و 4 (13.3%) عزلات من الخراجات , وعزلتين (6.6%) من الجروح تمتلك لجين *eta* ولم تحتوي عزلات الأذن عليه , بينما كانت 4 عزلات فقط بنسبة (13.3%) وبواقع عزلتين (6.6%) من الخراجات وعزلتين وبالنسبة نفسها ايضاً (6.6%) من الجروح تمتلك جين *tst* , ولم تحتوي عزلات الحروق والأذن على جين *tst* , وكما موضح في الجدول (4-11) .



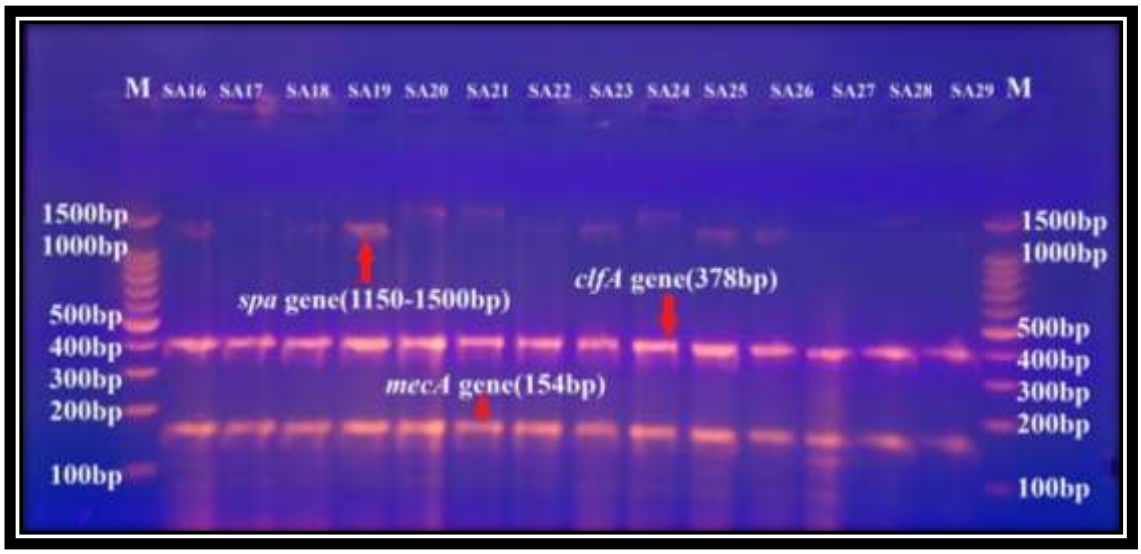
الشكل (4-10): نـواتج تضـخيم الجين *mecA* لبكتريـا الـ MRSA بأسـتعمال تقنيـة Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكـاروز (1.5%) وفولتيـة (100) ولمـدة سـاعة . حيث أن M = (100-1500bp) DNA Ladder , SA = *S. aureus* , جميع العزلات أظهرت نتيجة موجبة لجين *mecA* المسؤول عن المقاومة للمثيسيلين في بكتريا MRSA .



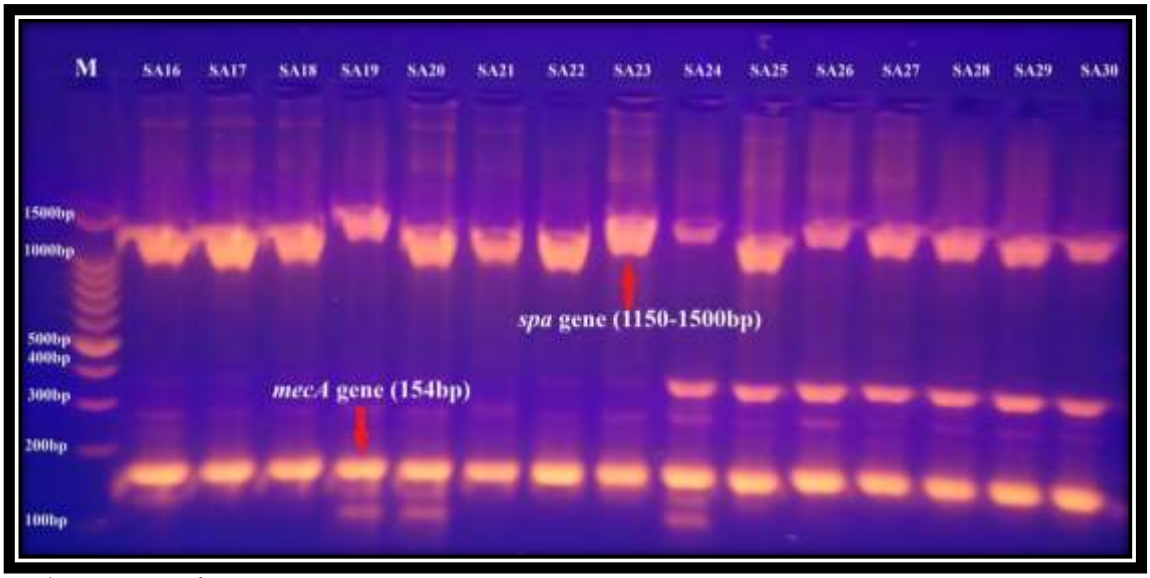
الشكل (4-١١): نواتج تضخيم الجين *Spa* لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلـة كهربائيـاً علـى هـلام الأكـاروز (1.5%) وفولتيـة (100) ولمـدة سـاعة . حيـث أن M = (100-1500bp) DNA Ladder , SA = *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA , جميع العزلات أظهرت نتيجة موجبة لجين *Spa* المسؤول عن بروتين A في بكتريا MRSA .



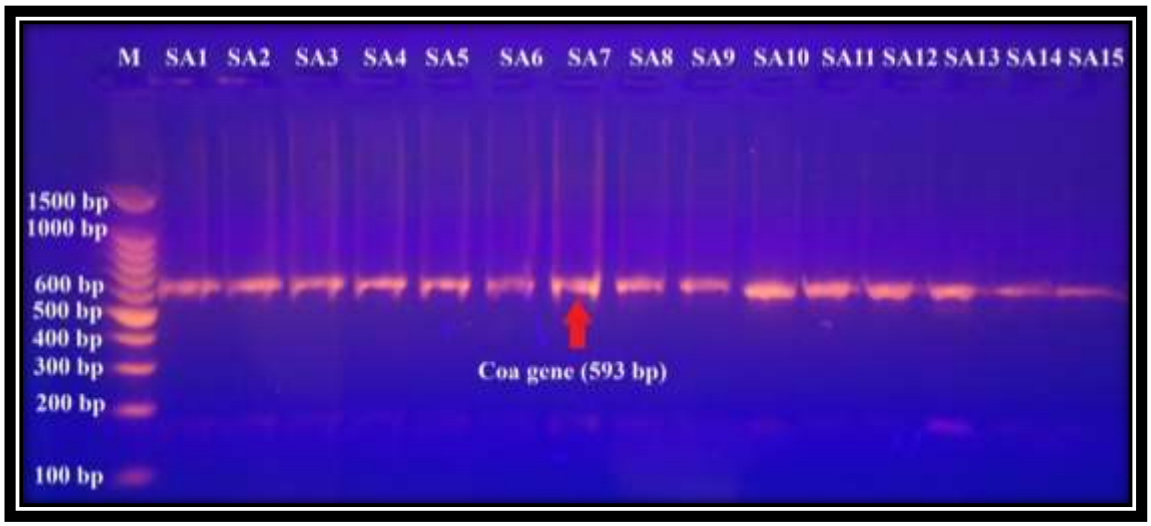
الشكل (4-12) : نـواتج تضـخيم الجين *ClfA* لبكتريـا الـ MRSA بأسـتعمال تقنيـة Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكـاروز (1.5%) وفولتيـة (100) ولمـدة سـاعة . حيث أن M = (100-1500bp) DNA Ladder , SA = *S. aureus* المقاومـة للمثيسـيلين MRSA , جميـع العزلات أظهـرت نتيجـة موجبـة لجـين *clfA* المسؤول عـن عامـل التكتـل فـي بكتريا MRSA .



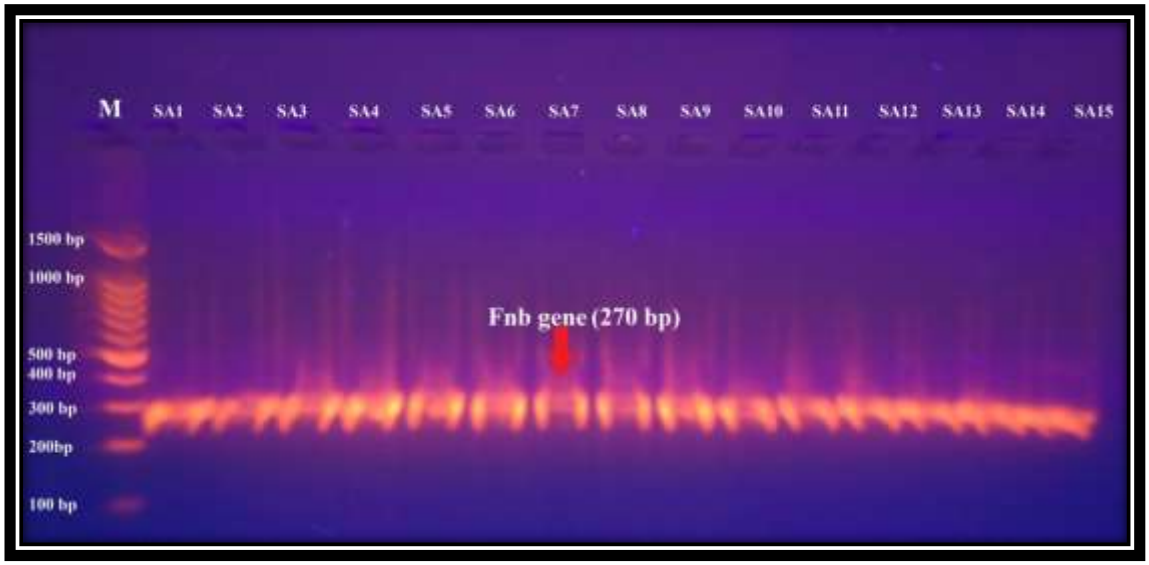
الشكل (4-13): نواتج تضخيم الجينات(*mecA + Clf+Spa*) لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Multiplex PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة . حيث أن M = DNA Ladder (100-1500bp) , SA = *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA , جميع العزلات أظهرت نتيجة موجبة لجينات *mecA* و *clfA* و *Spa* .



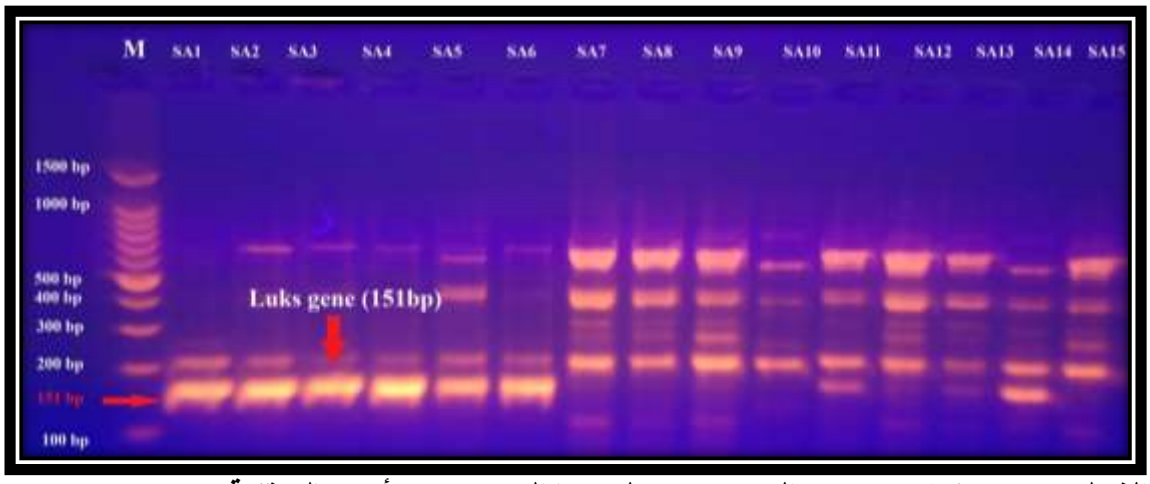
الشكل (4-14): نواتج تضخيم الجينات(*mecA + Spa*) لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Multiplex PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة . حيث أن M = DNA Ladder (100-1500bp) , SA = *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA , جميع العزلات أظهرت نتيجة موجبة لجينات *mecA* و *Spa* .



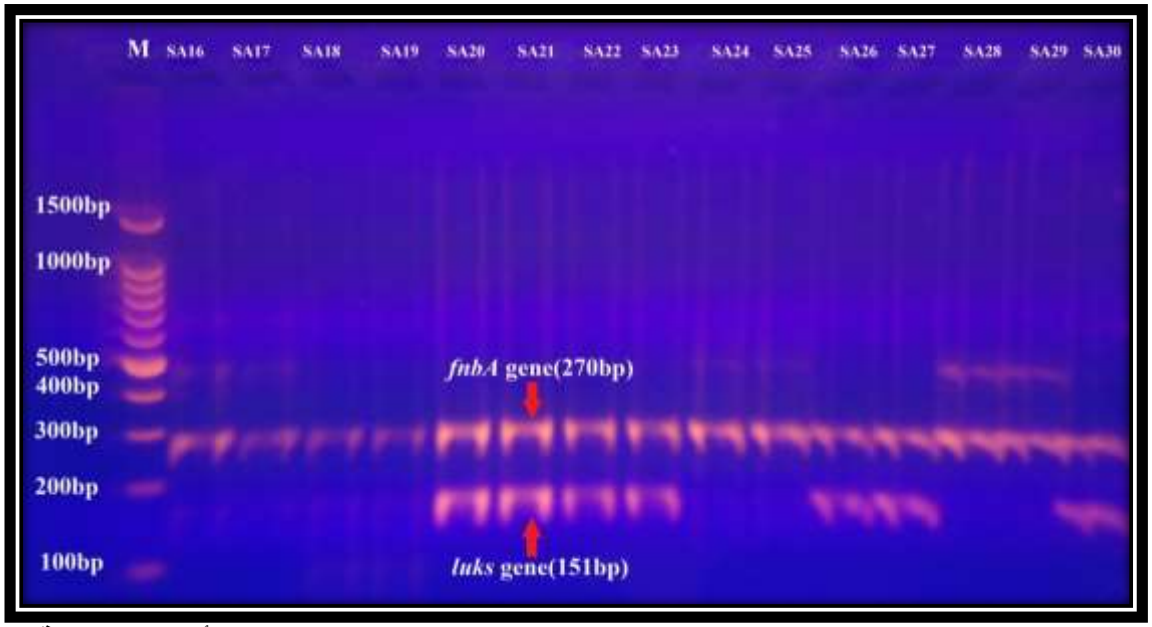
الشكل(4-١٥): نـواتج تضـخيم الجـين *Coa* لبكتريـا الـ MRSA بأسـتعمال تقنيـة Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة . حيث أن M = DNA Ladder (100-1500bp) , SA = *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA , جميـع العـزلات أظهـرت نتيجـة موجبـة لجـين *Coa* المسـؤول عـن انتـاج الكـوكليز فـي بكتريـا MRSA .



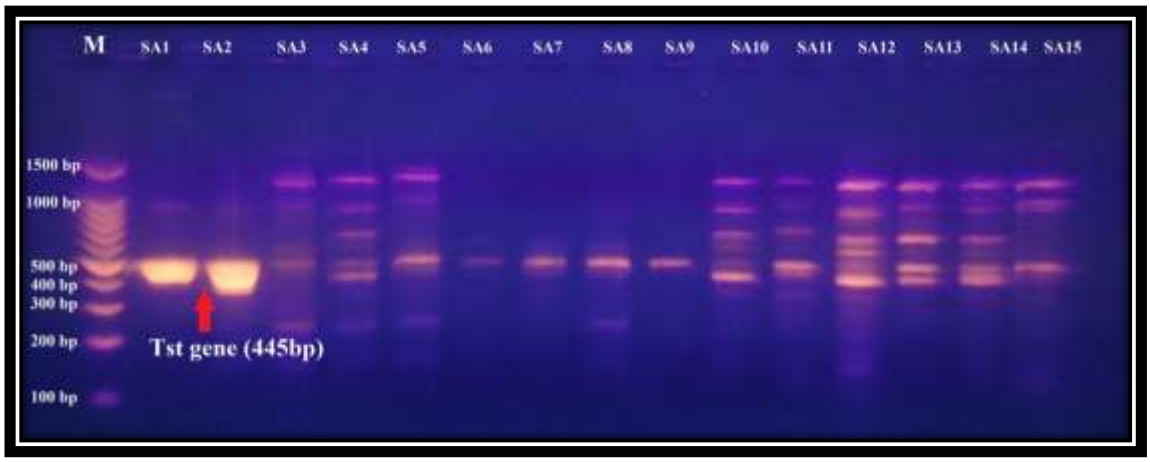
الشكل(4-16): نـواتج تضـخيم الجـين *FnbA* لبكتريـا الـMRSA بأسـتعمال تقنيـة Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة . حيث أن M = DNA Ladder (100-1500bp) , SA = *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA , جميـع العـزلات أظهـرت نتيجـة موجبـة لجـين *FnbA* المسـؤول عـن الفـايبرونكتين فـي بكتريـا MRSA .



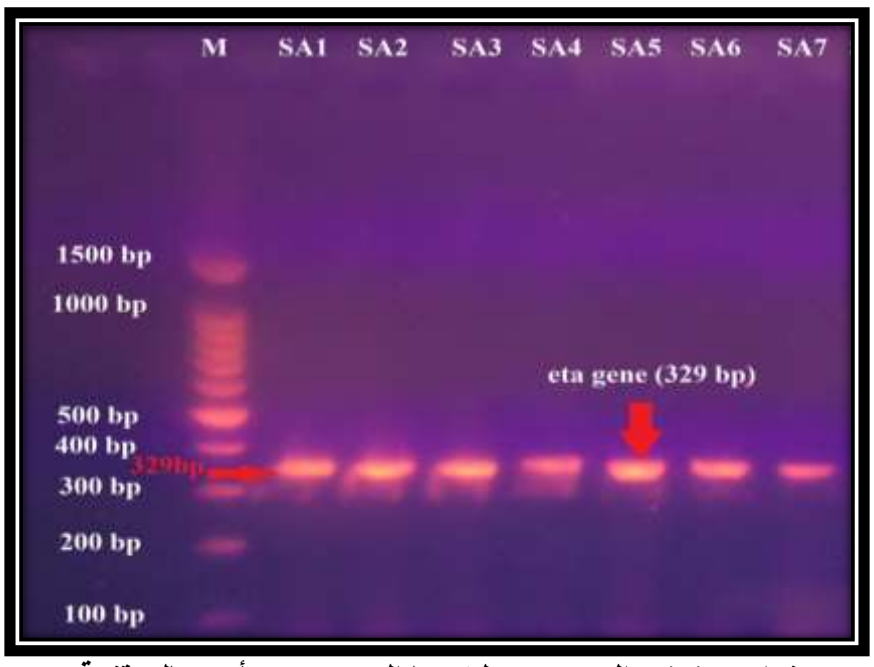
الشكل(4-17): نواتج تضخيم الجين *Luks* لبكتريا الـMRSA بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة . حيث أن M = DNA Ladder (100-1500bp) , SA = *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA , العزلات (SA1,SA2,SA3,SA4,SA5,SA6) أظهرت نتيجة موجبة لجين *Luks* , العزلات (SA7,SA8,SA9,SA10,SA11,SA12,SA13,SA14,SA15) أظهرت نتيجة سالبة لجين *Luks* (اذ أظهرت Non-specific product) المسؤول عن الذيفان القاتل لكريات الدم البيض في بكتريا MRSA .



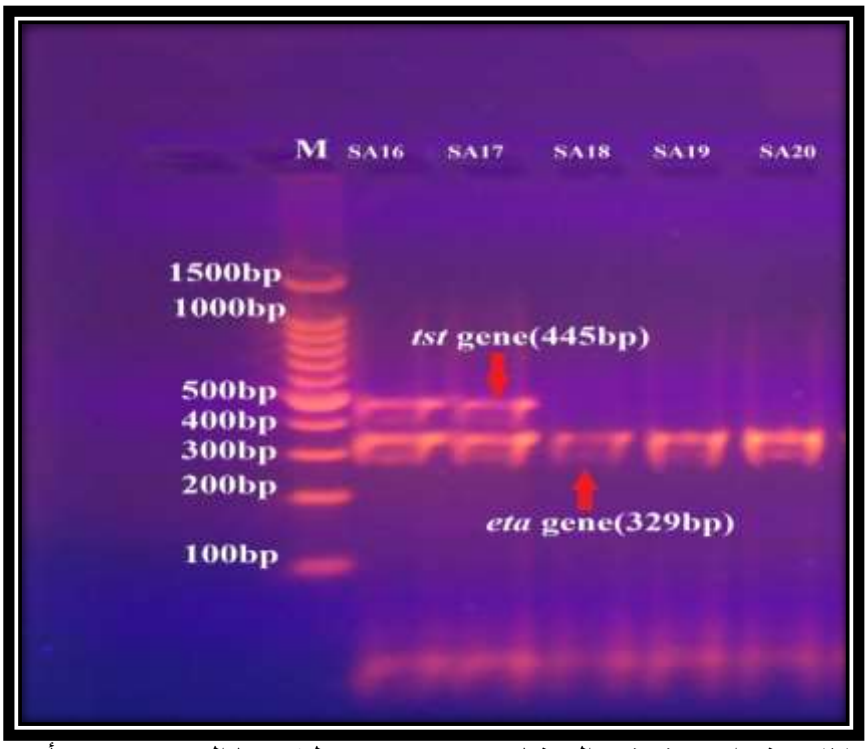
الشكل (4-18): نواتج تضخيم الجينات(*Fnb + Luks*) لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Multiplex PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة . حيث أن M = DNA Ladder (100-1500bp) , SA = *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA , العزلات (SA20,SA21,SA22,SA23,SA26,SA27,SA30) أظهرت نتيجة موجبة لجين *Luks* , العزلات (SA16,SA17,SA18,SA19,SA24,SA25,SA28,SA29) أظهرت نتيجة سالبة لجين *Luks* , وأظهرت جميع العزلات نتيجة موجبة لجين *FnbA* .



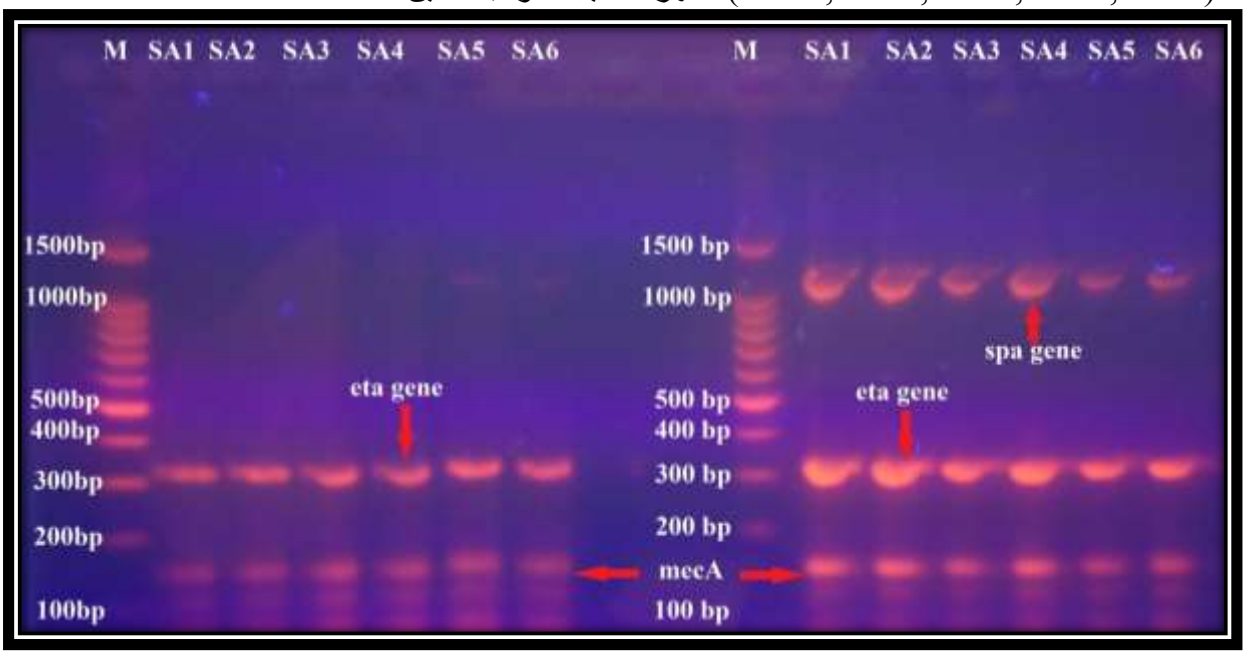
الشكل (4-19) : نواتج تضخيم الجين *Tst* لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة . حيث أن M = DNA Ladder (100-1500bp) , SA = *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA , العزلات (SA2,SA1) أظهرت نتيجة موجبة لجين *Tst* , العزلات (SA3,SA4,SA5,SA6,SA7,SA8,SA9,SA10,SA11,SA12,SA13,SA14,SA15) أظهرت نتيجة سالبة لجين *Tst* المسؤول عن ذيفان متلازمة الصدمة السمية في بكتريا MRSA .



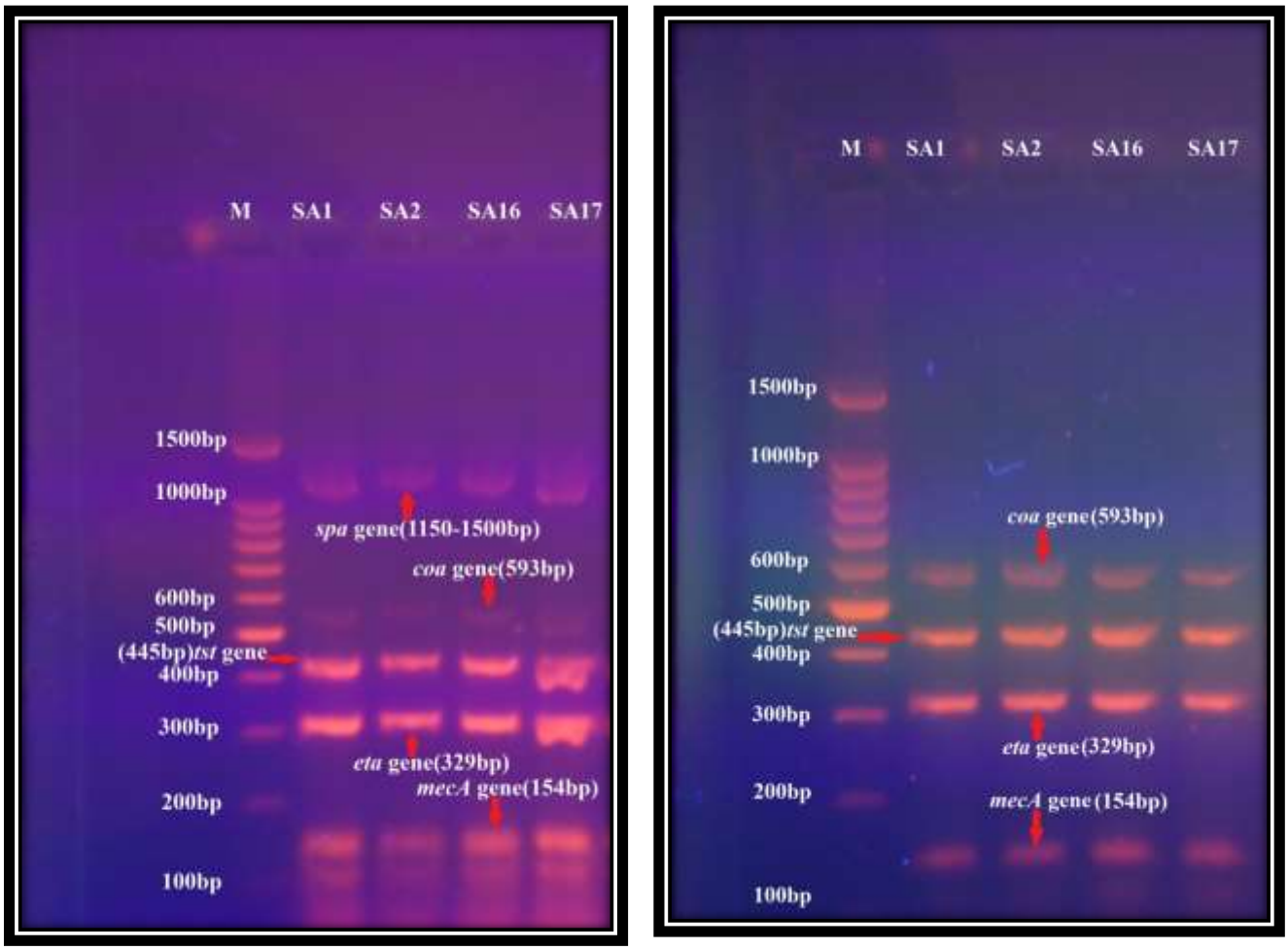
الشكل (4-20): نواتج تضخيم الجين *Eta* لبكتريا الـMRSA بأستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة . حيث أن M = DNA Ladder (100-1500bp) , SA = *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA , العزلات (SA7,SA6,SA5,SA4,SA3,SA2,SA1) أظهرت نتيجة موجبة لجين *Eta* المسؤول عن ذيفان تقشر الجلد في بكتريا MRSA .



الشكل (4-٢١) : نـواتج تضـخيم الجينـات (*Eta +Tst*) لبكتريـا الــ MRSA بأسـتعمال تقنيـة Multiplex PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الأكـاروز (1.5%) وفولتيـة (100) ولمـدة ساعة . حيث أن M = DNA Ladder (100-1500bp) , SA = *S. aureus* المقاومـة للمثيســيلين MRSA, العــزلات (SA17,SA16) أظهــرت نتيجـــة موجبـــة لجـــين *Tst* , العـــزلات (SA20,SA19,SA18) أظهـــرت نتيجـــة ســـالبة لجـــين *Tst* , العـــزلات (SA20,SA19,SA18,SA17,SA16) أظهرت نتيجة موجبة لجين *Eta* .



A- 2Plex PCR **B- 3Plex PCR**



D- 5Plex PCR **C- 4Plex PCR**

الشكل (4-٢٢) : D,C,B,A: نواتج تضخيم الجينات(*coa+tst+eta+Spa+mecA*) لبكتريا الـ MRSA بأستعمال تقنية Multiplex PCR بتفاعلات متعددة .

٢- استعراض المراجع Literatures review

2-١ المكورات العنقودية Staphylococci

هي مكورات موجبة لصبغة غرام ، مرتبة بشكل عناقيد غير منتظمة ، تنمو في العديد من الأوساط الزرعية منتجة مستعمرات بصبغات مختلفة تتدرج بين اللون الأبيض ، والأصفر الداكن والذهبي (Ryan and Ray, 2004) ، وتعد المكورات العنقودية موجبة للكتاليز كصفة تفريقية عن جنس *Streptococcus* (MacFaddin, 2000) .

يعود جنس العنقوديات *Staphylococcus* الى عائلة المكورات العنقودية Staphylococcaceae التي تضم أجناساً اخرى هي *Gemella, Jeotgalicoccus, Macrococcus, Salinicoccus* (Garrity and Holt, 2001) .

أن معظم أنواع المكورات العنقودية تتواجد بشكل تعايشي في الإنسان على الجلد , وفي الأغشية المخاطية , وبعض السلالات الأخرى تسبب خراجات سطحية , وإصابات داخلية (جهازية) , وأحيانا قد تسبب تسمم الدم الذي قد يؤدي إلى الوفاة . أن الأنواع الشائعة من حالات تسمم الغذاء ناتج عن الذيفانات المعوية (الثابتة بالتسخين) التي تنتجها بعض سلالات *S. aureus* ، ويضم جنس المكورات العنقودية (٤٤) نوعا ، إلا أن هناك ثلاثة أنواع مهمة سريرياً لارتباطها بالإصابات التي تسببها للإنسان وهي كالأتي :

أ - المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*

ب- المكورات العنقودية الجلدية *Staphylococcus epidermidis*

ج- المكورات العنقودية التعايشية *Staphylococcus saprophyticus*

(Ryan and Ray, 2004; Holt *et al.*, 1994) .

2-٢ المكورات العنقودية الذهبية ***Staphylococcus aureus***

تعد بكتريا *S. aureus* من أوسع أنواع المكورات العنقودية أمراضية للإنسان وتتميز بكتريا الـ*S. aureus* عن بقية أنواع المكورات العنقودية بكونها موجبة لإنزيم مخثر بلازما الدم (Coagulase)

(Collee *et al.*, 1996) . وتعرف بكتريا *S.aureus* على إنها خلايا كروية الشكل قطرها ١مايكروميتر تقريباً ، موجبة لصبغة غرام ، غير متحركة (Nonmotil) ، غير مكونة للسبورات (Non sporforming) وعادة مكونة للمحفظة (Capsulated) (Kenneth,2002; Humpherys,1997) وذات مستعمرات كبيرة صفراء على الاوساط الغنية (Rich media) حيث تظهر مستعمراتها دائرية رقيقة ذات سطوح لماعة يصل قطر المستعمرة الواحدة (2-3) مليمتر

وتصطبغ بلون ذهبي مصفر،ولها القابلية على تحلل الدم في وسط أكار الدم (Blood agar) ومعيشة هذه البكتريا هوائية او لاهوائية

اختيارية او بوساطة التخمر منتجة حامض اللاكتيك (Kenneth, 2005) ، ولكنها تنمو بشكل أفضل في الظروف الهوائية ، وتنمو بسهولة في العديد من الأوساط الزرعية بدرجات حرارية مثلى (30-37) مْ (Ryan and Ray, 2004) .

تعطي بكتريا *S. aureus* نتائج موجبة لاختبار إنزيم مخثر البلازما الحر (Free coagulase) ، وإنزيم محلل الدنا (DNase) ، والفوسفاتيز(phosphatase) ، والجيلاتينيز (Gelatinase) ، وسالبة لفحص الاوكسيديز (Oxidase) (Macffaddin, 2000) .

تستطيع *S. aureus* العيش في الظروف الرطبة ، والجافة مثل التسخين في درجة حرارة 60 مْ مدة 30 دقيقة ، كما تقتل بوساطة الفينولك (Phenolic) ، والهايبوكلورايت (Hypochlorite)، والهيكساكلوروفين (Hexachlorophene) , والكلورهسدين (Chlorhexidine) (Collee *et al.*, 1992) . كما تستطيع النمو في اس هيدروجيني (PH) واسع ينحصر بين (4.8-9.4) ويعد PH (7.5) هو الامثل للنمو ، ان هذه الصفات وغيرها جعلت لها القدرة على البقاء في عينات القيح الجاف واللعاب لمدة أسابيع (Brooks *et al.*, 2001; Brooks *et al.*,1998) .

تتعايش بكتريا *S. aureus* بصورة طبيعية على الجلد والممرات التنفسية والاغشية المخاطية ، ومعظم سلالاتها ممرضة للانسان (Irind *et al*, 2005; Kenneth, 2002) .

2-٣ عوامل الضراوة Virulence factors

تكمن الاهمية السريرية لبكتريا *S. aureus* في كونها تمتلك العديد من عوامل الضراوة(Virulence factors) التي تعطيها القدرة على النمو والتكاثر وغزو انسجة المضيف وبذلك فهي تسهم بصورة كبيرة في امراضيتها (Edouard *et al.*, 2000 –Zadik *et al.*, 2001; Rochon) وفيما يلي اهم تلك العوامل :

2-٣-١ المحفظة Capsule

تمتلك بعض سلالات *S. aureus* محفظة ضمن جدار الخلية ، التي تعمل على تثبيط عملية البلعمة الناتجة عن خلايا الدم البيضاء ذات الأنوية متعددة الأشكال (Bannerman, 2003) و تتكون من عديد السكريدات (Polysaccharide) (Prevost *et al* .,2003)، كما ان السلالات المحفظة تعد أكثر ضراوة من السلالات غير المحفظة والسبب في ذلك لامتلاكها المحفظة التي تجعلها مقاومة لعملية البلعمة (Phagocytosis) ، وتتأثر ضراوة البكتريا بحجم المحفظة إذ وجد إن السلالات ذات المحفظة الكبيرة أكثر ضراوة من السلالات ذات المحفظة الدقيقة (٢٠٠٤ Lee *et al.*,) .

2-٣-٢ الببتيدوكلايكان Peptidoglycan وحامض التيكويك Teichoic acid

تمتلك *S. aureus* بعض التراكيب الأنتجينية مثل جدار الخلية البكتيرية الذي بدوره يتكون من الببتايدوكلايكان (Peptidoglycan) المحتوي على سلسلة خطية من الكلايكان المتكون من نوعين من السكريات الأنتيجينية المتعاقبة ، والمتبادلة وهما الأستيل كلوكوزأمين (NAG) N-acetylglucosamine , والأستيل حامض الميورامك (NAM) N-acetylmuramic acid (Ryan and Ray, 2004) ، وهو مهم في الامراضية لانه يشجع انتاج الانترلوكين (Interleukin-1) الذي يفرز من الخلايا وحيدة النواة (Monocyte) ،وهو مولد حرارة داخلي وجاذب كيميائي للخلية متعددة اشكال الانوية (Polymorphonuclear cell) (Brook *et al.* ,2001) . اما التركيب الثاني لجدار الخلية هو حامض التايكويك وهو مركب متعدد ذائب بالماء يحوي على وحدات من الرابيتول ،او الكليسيرول ترتبط باواصر استرية ثنائية (Phosphodiester bonds) ويحوي واحدا او اكثر من الحامض الاميني ، او مكونات سكرية (Lawrence and Nauciel, 1998) . ويعد التركيب الثاني

مسؤولاً عن إنتاج مستضدات تدعى مستضدات حامض التكويك Nair *et al.*, (2000) .

2-٣-٣ بروتين A protein A

هو عبارة عن مستضد يقع على سطح الخلية البكتيرية يمثل حوالي 7% من جدار البكتريا، يرتبط تساهمياً مع الطبقة الخارجية لجدار الخلية المكونة من الـ Peptidoglycan (Hiramatsu,1997 ; Albus *et al.*,1988) . لهذا البروتين القدرة على الارتباط بمنطقة Fraction Crystalisable (FC) لجزيئة Imminoglobulin G (IgG) (Wann *et al.*,1999) ينتج بروتين A من قبل اكثر من 95 % من سلالات *S. aureus* ، لوحظ ان هذا البروتين يثبط آلية الطهاية (Opsonization) ، والبلعمة (Phagocytosis) مختبريا (*In vitro*) حيث يعمل بروتين A قناعاً مناعياً Immunological (disguises) يحمي البكتريا ويساعدها على البقاء . فبكتريا *S. aureus* التي يعوزها بروتين A تبتلع بسرعة وتمتاز بفوعة ضعيفة (Gemmell et al ., 1991; Patel et al ., 1987) . يمتلك بروتين A وزن جزيئي يقدر حوالي 42 KD كيلو دالتون (Palmqvist *et al.*, 2002) , يشفر بروتين A بواسطة جين الـ *spa* Mitani *et al.*, 2005; Wichelhaus *et al.*, (2001) ويختلف جين *spa* في الوزن الجزيئي بين سلالات بكتريا *S. aureus* (Fatemeh *et al* ., 2010) , وقد اكتشف ان بروتين A له ارتباط مع العديد من الامراض كمرض كوازاكي (Kawazaki Disease KD) (Ellsabeth *et al* ., 1999) و التهاب المفاصل الخمجي (Septic Arthritis) (Palmqvist *et al* ., 2002) . ومن اهم الاكتشافات الحديثة التي شكلت منعطفا بارزا هو ارتباط بروتين A مع الاصابة بذات الرئة (Pneumonia) . او هو احد العوامل الرئيسية لبكتريا *S . aureus* التي تقود لأحداث الاصابة بذات الرئة (. (Gomez *et al.*, 2004

2-٣-٤ الانزيم المخثر للبلازما Coagulase

يفـرَزُ الانـزيم المختـر للبلازمـا مـن بكتريـا *S. aureus* ويعـد مـن الصـفات التشخيصـية المهمـة لهـذه البكتريـا ، والانـزيم عبـارة عـن بـروتين قليـل الكاربوهيدرات يفرز في الطور اللوغاريتمي من النمو البكتيري Deepak *et al.*, 2000; Collee *et al.*, 1996)) . الذي يؤدي وجوده إلى تجميع الفايبرونجين الموجود ضمن التركيب الكيمياوي لبلازما الدم ومن ثم ترسيبه على سـطح خـلايا بكتريا الـ *S. aureus* على شكل شبكة من الألياف الدقيقة مكونة بذلك الخثرة ، ومن المميزات المهمة لهذا الإنزيم تكوينه للأضداد ، إذ يمتلك صفة مستضدية ، والقدرة على تثبيط عملية البلعمة Phagocytosis (Nair *et al.*, 2000) .

والانزيم المختر للبلازما نوعان وهما :

- الانزيم المختر الحر (Free Coagulase) والذي يفرز خـارج الخلية ويكشـف عنـه بفحص الانبوبة Tube Coagulase test , وينتج هذا الانزيم في جميع سلالات *S. aureus* ويشفر بوساطة جين الـ *coa* (Kloos and Schleifer., 1986) .
- الانـزيم المـرتبط بجـدار الخليـة (Bound Coagulase) ويكشـف عنـه بفحـص الشريحة Slid test ويعرف احياناً بالعامل المرتبط (Clumping factor) او عامل التكتل .

(Collee *et al.*,1996) .

5-3-2 عوامل التكتل Clumping factors

يوجـد أثنـين مـن عوامـل التكتـل فـي بكتريـا *S. aureus* همـا عامـل التكتـل A (ClfA) وعامل التكتل B (ClfB) اللذان يعمـلان علـى تكتـل خلايـا *S. aureus* فـي بلازما الدم , ويزيدان من ألتصـاق البكتريـا فـي السطوح المغطـاة بالفـايبرنوجين مختبريـاً (*In vitro*) بالأضافة الى التسبب في حدوث ألتهاب شغاف القلب (endocarditis) داخل الجسم (*In vivo*) (Entenza *et at.*, 2000) . تمتلك الجينـات *clfA* و *clfB* المسؤولة عن عوامل التكتل تنظيم جزيئي متشابه لكنها تختلف من ناحيـة أنتاجها إذ يكـون أنتـاج جين *clfA* خـلال النمو البكتيـري بينمـا يكـون أنتـاج جين *clfB* فقط خـلال الطور اللوغاريتيمي (Entenza *et at.*, 2000; Tristan *et al.*, 2003) .

عامل التكتل ClfA يمكن بكتريا *S. aureus* من الألتصاق الى المواد المحتوية في تركيبها على الفايبرنوجين مثل بلازما الدم والتكتل بوجود الفايبرنوجين (McDevitt *et al*., 1994) . ولذلك يعتبر عامل التكتل A عاملاً أمراضيا مهما في بكتريا *S. aureus* . ويعتقد ان لعامل التكتل B دور مهم في استعمار *S. aureus* للأنف (O'Brien *et al*., 2002) .

2-٣-6 انزيمات البيتالاكتاميز β-Lactamase

تعرف إنزيمات البيتالاكتاميز بأنها إنزيمات تعمل على تثبيط فعالية مضادات البيتالاكتام وهي متواجدة في كل أنواع البكتريا سواء كانت موجبة أو سالبة لصبغة غرام ، ويوجد أكثر من 200 نوع من أنواع إنزيمات البيتالاكتاميز ، وتأتي أهميتها من خلال قدرتها على فتح حلقة البيتالاكتام لكل من البنسيلينات والسيفالوسبورينات ، وبذلك تكون تلك الأدوية غير فعالة ضد البكتريا (Koneman *et al*., 1992) .

وتفرز اكثر من ٩٠% من بكتريا العنقوديات الذهبية انزيم البيتالاكتاميز والذي يشكل ٢% من وزن الخلية الجاف (Murray *et al*., 1999) . يكون إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز أما محفزاً (Inducible) ، أو كامناً (Constitutive) وتنتج إنزيمات البيتالاكتاميز المحفزة فقط عند التعرض لمضادات البيتالاكتام (McDougal and Thornsberry, 1986) ، وبمجرد التوقف عن تقديم مضادات البيتالاكتام يتوقف إنتاج الإنزيمات المحفزة ، وغالبا ما تكون الخلية البكتيرية حاوية على مورثة مقاومة تمتلك آلية سيطرة تمكنها من إيقاف عملية تصنيع إنزيم البيتالاكتاميز في حال التوقف عن تقديم مضادات البيتالاكتام ، وهذه العملية تدعى بعملية التحفيز (Induction) ، والخلية المحفزة أيضا تنتج إنزيمات مثبطة في حال زوال العوامل المحفزة وهذا ما يؤكد على كون المضادات الحيوية لا تسبب المقاومة ، وإنما تعمل على تحفيز المقاومة الكامنة في الخلية البكتيرية ، أما الإنزيمات الذاتية المقاومة فهي إنزيمات مشفرة يتم انتقالها عبر السلالات وتنتج في حال وجود أو عدم وجود المحفز (Koneman *et al*., 1992).

تشفر إنزيمات البيتالاكتاميز بواسطة جينات عادةً تكون محمولة على البلازميدات التي تحمل أيضاً الجينات المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحيوية مثل Erythromycin و Tetracycline (Waldvogel, 2000) وربما تنتقل جينات المقاومة هذه الى بكتريا أخرى عن طريق آليات الأنتقال الوراثي .

2-٣-7 البروتينات الرابطة للفايبرونكتين Fibronectin-binding protein(Fnbps)

الفايبرونكتين هو عبارة عن بروتين سكري (Glycoprotein) ذو وزن جزيئي عالي يقدر بحوالي ٢٧٠ kd (Ana *et al.*, 2002) ، وقد اثبتت التجارب ان بكتريا الـ *S.aureus* لها القابلية على تطوير آليات عديدة لغرض زيادة ضراوتها ، وتأكد بأن للفايبرونكتين (Fibronectin) الدور الأساس في أمراضيتها (Jennifer, 2004; Greene *et al* .,1995) ، من خلال إعتباره حالة وسطية في عملية الألتصاق التي تحصل بين الفايبرونكتين الموجود في خلايا المضيف مع بروتين الالتصاق السطحي المفرز من الجدار الخلوي للبكتريا , ومن ثم أختراق الخلايا المصابة ومنها خلايا اللبائن والتي تشمل الخلايا الطلائية الخارجية والداخلية والليفية بوساطة تكوين جسر بين بروتين الالتصاق السطحي في البكتريا وفايبرونكتين الخلية البشرية عن طريق وجود مستلمات خاصة بهذا البروتين تدعى الأنتكرين Integrin (Joh *et* ; Ozeri *et al.*,1998 ; Van *et al.*,1998 . (*al.*,1999

ويؤدي وجوده الى حصول أصابات خطيرة مثل الأصابة بألتهاب شغافي القلب (Endocarditis) والتهاب العظام (Osteomylitis) (Eric *et al.*, 2003 ; Yok *et al.*, 2005) .وبالأضافة الى قابليته على الارتباط مع الفايبرونوجين (Fibrinogen) وهذا الارتباط يؤدي الى مضاعفة التداخلات بين خلية البكتريا والمضيف مما يسبب مضاعفة خطر الاصابة الناتجة من البكتريا Matthia *et al.*, (2004) .

أغلب سلالات بكتريا *S. aureus* تنتج نوعين من بروتينات الفايبرونكتين هما A (FnbpA) و B (FnbpB) التي تشفر بواسطة جينات *fnbA* و *fnbB*

(Flock *et al* ., 1987; Signas *et al.*, 1989; Jonsson *et al* ,1991). وتمكن بروتينات الفايبرونكتين A وB بكتريا *S. aureus* في زيادة تكوينها وأنتاجها للأغشية الحيوية Biofilm وخصوصاً في عزلات *S. aureus* السريرية المقاومة للمثيسيلين MRSA (O'Neill *et al.*, 2009) .

٢-٣-8 الذيفان القاتل لكريات الدم البيض Panton –Valentine Leukocidin PVL

وهو عبارة عن سموم بروتينية متعددة المكونات تؤدي الى تحطم الأغشية ويعد عاملاً مهماً في تأثيراته الحيوية وخاصة في قابليته على تحطيم غشاء البلعمة الكبيرة (Macrophagocytes) والخلايا الحبيبية (Granulocyte) . وقد لوحظ ان لهذا السم علاقة بالأخماج الجلدية وحصول الأصابات التنخرية للجلد ، ويعد من عوامل الضراوة للبكتريا من خلال تأثيره على كريات الدم متعددة الأنوية (PMNL) Polymorph nuclear leucocyte ويعتقد ان آلية عمل هذا السم تتضمن تغييراً في نفاذية أيون البوتاسيوم مما يسمح للمواد بالدخول الى داخل الخلية (Couppie *et al.*, 1997) . ويعدّ هذا السم من اهم عوامل الضراوة في بكتريا الـ MRSA المكتسبة من المجتمع (CA-MRSA) (Brasel and Weigelt, 2007 ; Wannet *et al.*, 2005 ; Vandenesch *et al.*, 2003) .

يوجد نوعين من الذيفان القاتل لكريات الدم البيض هما LukS-PV و LukF-PV وهما عبارة عن بروتينات خارجية exoproteins واللذان يشفران بواسطة جينات *LukS-PV* و *LukF-PV* (Holmes *et al* ., 2005; Denis *et al* ., 2005) والتي تستنسخ كجزيئة mRNA مفردة (Johnsson *et al.*, 2004) ويُحملان على عاثيات بكتيرية خاصة Bacteriophages (Holmes *et al.*, 2005) والتي تكون على الاقل ثلاث عاثيات وهي ØPVL و ØSa2mw و ØSLT (Kaneko and Kamio, 2004; Narita *et al.*, 2001) وفقط العاثي ØSLT له القدرة على تحويل سلالة بكتريا *S. aureus* الغير المنتجة لذيفان PVL الى سلالة منتجة عن طريق الإصابة (Narita *et al* ., 2001) . وتوجد جينات PVL بنسبة 2% تقريبا من عزلات بكتريا

السريرية , لكن النسبة الأعلى توجد في عزلات (CA-MRSA) *S. aureus* وتم وصف الذيفان (Naimi *et al* ., 2003; Shukla *et al.*, 2004) PVL من قبل Van de Veld في عام 1894 (Boyle-Vavra *et al* ., 2007) .

٢-٣-9 ذيفان متلازمة الصدمة السمية Toxic Shock Syndrome Toxin-1 (TSST-1)

يعرف الذيفان TSST-1 بأنه عبارة عن سلسلة مفردة متعددة الببتيد (Single Chain Polypeptide) وزنه الجزيئي تقريباً (22KD) (Deresiewicz *et al.*, 1994) تسبب بكتريا *S. aureus* مايقارب من (٦٠٠٠) حالة سنوياً من متلازمة الصدمة السمية Toxic Shock Syndrome (TSS) في الولايات المتحدة الأمريكية (Schlievert, 1998)، حيث وجد ان معظم حالات (TSS) ناتجة عن الذيفان الخارجي TSST-1 الواقع ضمن عائلة الذيفان الخارجية المولدة للحمى Pyrogenic Toxin Superantigens (PTSAgs) التي تفرزها بكتريا *S. aureus* , بالأضافة الى الذيفانات المعوية enterotoxins وذيفان تقشر الجلد العنقودي A و B exfoliative toxins A and B (ETA and ETB) (Dinges *et al* ., 2000; Fey *et al.*, 2003) ويعمل TSST-1 على تحفيز تحرير كميات هائلة من السايتوكاينات (Cytokines) نتيجة لامتلاكه صفات المستضد الفائق (Superantigen) ، ويدعى هذا بالتأثير غير المباشر ، أما التأثير المباشر فيتم من خلال تأثيره في الخلايا البطانية (Endothelial cells) الذي يؤدي إلى غلق الأوعية الشعرية الدموية وهذا بدوره يؤدي إلى انخفاض الضغط ومن ثَمَ التسبب بحدوث صدمة (Ryan and Ray, 2004) . وتتصف متلازمة الصدمة السمية بأعراض عديدة والتي منها الحمى الشديدة , الطفح الأحمراري , حدوث تقشر للجلد خلال 1-2 أسبوع من بعد الأصابة , بالأضافة الى انخفاض ضغط الدم (Iwatsuki *et al.*, 2006) وتنتج تقريبا 20% من بكتريا *S. aureus* هذا

الذيفان (Novick *et al.*, 2001) .يشفر ذيفان متلازمة الصدمة السمية ١-TSST بواسطة جين *tst* (See and A.W.Chow, 1989) وذكرت العديد من الدراسات أستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة PCR في الكشف والتحري عن جين *tst* (Schmitz *et al.*,1998; Monday and Bohach., 1999; Mehrotra *et al.*, 2000) ووصف هذا الذيفان لأول مرة من قبل Todd *et al* عام ١٩٧٨ .

٢-٣-10 ذيفان تقشر الجلد Exfoliative toxins

تنتج بعض سلالات بكتريا الـ *S. aureus* الذيفان المقشر إذ يعمل على فصل طبقات البشرة في أماكن الاصابة مسبباً موتها وتقشرها وهذا ما يلاحظ في متلازمة تقشر الجلد العنقودي Staphylococcal Scalded Skin Syndrome (SSSS) اذ يعمل هذا الذيفان على نخر الانسجة داخل البشرة وفصلها (Prevost *et al.*, 2003; Ladhani *et al.*, 1999)، تدعى متلازمة تقشر الجلد بمرض (Ritters disease) الذي يصيب بالدرجة الاولى الاطفال الرضع , ويتألف الذيفان المقشر Exfoliative toxin من نمطين مصلين هما النمط Exfoliative toxin A (ETA) A والنمط Exfoliative toxin B B (ETB) (Ladhani, and Evans, 1998; Ladhani *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*,2001; Ladhani *et al.*,2001) وأظهرت بعض الدراسات وجود ثلاث انماط مصلية لهذا الذيفان هي ETA و ETB و ETD , وان النمط A و B فقط هي التي ترتبط بمتلازمة تقشر الجلد العنقودي SSSS (yamaguchi *et al.*, 2002; Amagai *et al.*, 2000) .

أظهرت الدراسات السابقة ان ETA يشفر كروموسوميا حيث يكون محمول على جينوم لعاثي Phage الذي يتداخل مع كروموسوم بكتريا *S. aureus* (Yamaguchi *et al.*, 2000) , بينما ETB يكون محمول على بلازميد كبير يدعى PETB (Yamaguchi *et al.*, 2001; Freer *et al.*, 1982) .

ويبلغ الوزن الجزيئي لكل منهما حوالي 24 KD (Waldvogel, 2000) , ان لذيفان تقشر الجلد أيضا دور في امراض اخرى مثل مرض كوازاكي Kawasaki disease , التهاب البشرة الحساس atopic dermatitis , داء الصدفية psoriasis , وامراض المناعة الذاتية المختلفة (Amagai *et al* ., 2000) , ووصف الذيفان المقشر لأول مرة في عام ١٨٧٨ من قبل العالم Baron . وقد تم التحري عن الجينات المشفرة لذيفان تقشر الجلد A و B وهي *eta* و *etb* بأستخدام تقنية PCR (Mehrotra *et al.*, 2000) .

٢-٣-11 عوامل ضراوة أخرى

هناك عدد من الانزيمات والذيفانات الاخرى التي تنتجها بكتريا *S. aureus* التي تسهم في زيادة أمرضيتها مثل انزيم الكتاليز (Catalase) الذي يقوم بتحليل بيروكسيد الهيدروجين الى اوكسجين وماء(Lowy,1998; Cohen ,1991) وعامل الانتشار (Hyaluronidase) الذي يعمل على تحطيم حامض الهايلرونك في الانسجة الضامة (Murray *et al.*, 2009), والستافيلوكاينيز (Staphylokinase) الذي يحلل الفايبرين المكون للخثرة , أضافة الى (Proteinase) الذي يحلل البروتينات الخلوية , و (DNase) الذي يحلل الحامض النووي DNA (Humphrey,1997) ، ومن الانزيمات الاخرى التي تفرزها الانزيم الحال للدهن (Lipase) الذي يساعد على غزو هذه البكتريا لانسجة الجلد الدهنية وما تحت الجلد (Todar, 2002; Melish, 1992) .

من النواتج الاخرى التي تنتجها بكتريا *S. aureus* هي انزيمات Urease و Gelatinase والتي تعدّ من عوامل الضراوة التي تسّهل عملية انتشار الاصابة الى الانسجة المجاورة وبالتالي تؤدي دوراً في أمراضية هذه البكتريا Murray *et al.*,2009; Brooks *et al.*, 2007; Harley and (Prescott, 2002) . ومن ضمن الذيفانات الأخرى ذيفانات محللات الدم (Hemolysins) مثل ذيفان نوع ألفا (α-toxin) الذي يعمل على تحلل خلايا الدم

الحمــراء وتحطــيم الصــفيحات الدمويــة ، أمــا النــوع الآخــر فيمـــثل ذيفــان نـــوع بيتـــا (β-toxin) الـــذي يعمـــل علـــى تحطـــيم السـفنجومـايلــــين (Sphingomyelin) وبعض الخـلايـا الأخرى (Ryan and Ray, 2004) .
كما تقـوم *S. aureus* بإنتاج أنواع معينة من الذيفانات تســــمى بالذيفانات المعويـة Staphylococcal enterotoxins (SEs) ، التي كـان يعرف منهـا علـى الأقل ستة أنواع بحسب التسلسل من (A) إلى (F) ، وكذلك تم اكتشاف أنواعاً جديدة من السموم المعويـة بحسب التسلسل من (G) إلـى(Q) (Kuroda *et al.*, 2001) ، وتنتـجها (٥٠%) من ســــــلالات *S. aureus* ، وهـذه الذيفانات ثابتـة بـالحرارة ، إذ تقـاوم التسخين بدرجـة حـرارة ١٠٠ مْ لمدة ٣٠ دقيقـة ، وتقـاوم الإنزيمـات المعويـة وتـؤثر فـي المستقبلات العصبية فـي الجزء الأعلـى مـن القنـاة الهضمية ممـا يـؤدي إلـى تحفيـز مركـز التقيؤ في الدماغ (Boynukara *et al.*, 2007) .

4-2 التحري الجزيئي عن عوامل الضراوة في بكتريا *S. aureus*

تمكنـــت تقـــنية تفاعـل إنـزيم البلمـرة (PCR) Polymerase Chain Reaction من إعطـاء نتـائج ذات دقـة عاليـة وحساسية نوعيـة إذ تعد مـن أحد أهم التقنيات التشخيصية التي يتم من خلالهـا اختصـار العديد من الاختبـارات التقليديـة ، فعلـى سـبيل المثـال يـتم تشــــــخيص *S. aureus* عـن طريـق اسـتعمال بادئـا الهـدف (primer) لمورثـة إنـزيم محلـل الـدنا (*nuc* gene) ، ومورثـة إنـزيم مخثـر البلازمـا (*coa* gene) ومورثـة بـروتين A (*spa* gene) ، ولكونـهـا طريقـة قياسية فقد تـم اعتمادهـا لتشـخيص سـلالات الــ *S. aureus* المقاومـة للمثيسيلين MRSA والســلالات الحساســة الحاملـــة لمورثـــة *mecA* غيـــر الفعالـــة (Non-functional) ، أو غـير التعبيريـة (Liu and Chambers, 2003; Hallin *et al.*, 2007b) .

تُستخدم الطرق الجزيئيـة عـادةً فـي التحـري عن الجينـات المشفرة والمسؤولة عن عوامل الضراوة وهي جينات الذيفانات والجينات المسؤولة عن الألتصـاق فـي بكتريـا *S. aureus* , ان استخدام الطرق المظهريـة فـي التحري عن مكونـات الأغشية الميكروبيـة المميـزة لجزيئـات الأرضـيـة اللاصـقة Microbial surface

component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) في المكورات العنقودية تكون مكلفة ومعقدة وقد تؤدي الى أحداث ضرر يتمثل في

فصل التركيب الكيمياوي لبعض بروتينات الألتصاق مثل بروتينات الفايبرونكتين A و B (FnbpA and FnbpB) وعوامل التكتل A و B (ClfA and ClfB) , بالأضافة الى أرتباط بعض من بروتينات MSCRAMMs الى أكثر من موقع للألتصاق مثل أرتباط بروتين FnbpA الى كل من الفايبرونكتين والفايبرنوجين , ولذلك فأن التشخيص الوراثي للجينات المسؤولة عن الألتصاق وأنتاج الذيفانات والمقاومة للمضادات الحيوية يكون ضروري جداً , ان الطرق التقليدية التي تستخدم لتشخيص عزلات *S. aureus* و MRSA تستهلك الكثير من الوقت ودقة هذه الطرق في أعطاء النتائج تكون بين (80-95%) , بينما التقنيات الجزيئية البديلة أغلبها تعتمد على تقنية الـ PCR لتضخيم المورثات 16S rRNA الخاص ببكتريا الـ *S. aureus* (Jo-Ann *et al.*, 2006; Riffon *et al.*, 2001) ومورثة *mecA* الخاصة بالمقاومة للمثيسيلين تتصف بالتشخيص السريع والخاص لسلالات الـ MRSA (Moussa and Shible, 2009 ; Salisbury *et al.*, 1997) . ولعدم وجود أي من الفحوصات المظهرية (غير الجزيئية) للكشف عن الذيفان القاتل لكريات الدم البيض PVL فتستخدم الطرق الجزيئية في التحري عن سموم PVL التي تعتبر كمؤشر للسلالات MRSA المكتسبة من المجتمع (Akpaka *et al.*, 2011) . أن أستخدام طرق التنميط الجزيئية بواسطة الـ PCR هي أفضل الطرق للتميز بين عزلات MRSA (Zhang *et al.*, 2005) , والتي تمتاز بالسرعة والدقة العالية ووصفت من قبل Oliveira وجماعته عام (2002) . الطرق التي تعتمد على تقنية تفاعل إنزيم البلمرة الـ PCR تظهر النتائج في وقت قصير يكون بين (2-4 ساعة) في تشخيص عزلات الـ MRSA وبالتالي يؤدي الى السرعة في أعطاء العلاج للأصابات المتعلقة بـ MRSA (Van Hal *et al.*, 2009) .

تم وصف العديد من تقنيات تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR لدراسة صفات المكورات العنقودية من ناحية امراضيتها ومقاومِتها للمضادات الحيوية (Kearns *et al.*, 1999; Towner *et al.*, 1998) أذ تم التحري عن جين *coa* المشفر

لانتـاج إنـزيم الكـوكليز وجـين *mecA* المشـفر لمقاومـة مضـاد المثيسـيلين فـي المكـورات العنقوديـة بأسـتعمال تقنيـة الـ Multiplex PCR مـن خـلال تفاعـل واحـد سـريع (Kearns *et al.*, 1999) . هنالك العديد من البحوث التي وصفت لأستخدام تقنية الـ Multiplex PCR للتحري عن سلالات الـ MRSA ولكن أغلبها صممت للتحري عن جين واحد أو أثنين فقط في طريقة العمل , تم تطوير العديد من البرامج (Software) لتصميم البادئات (Primer design) بعد فترة قصيرة من أكتشاف تقنية الـ PCR (Rychlik and Rhoads., 1989) . ومـن هـذه البـرامج هـي برنـامج VectorNTI وبرنـامج OLIGO (Rychlik and Rhoads., 1989) , وبرنـــامج WisconsinGCG وبرنـــامج Primer3 (Rozen and Skaletsky., 2000) , وبرنـامج PRIMO (Li *et al.*, 1997) , وبرنـامج PRIDE (Haas *et al.*, 1998) , وبرنـامج PRIMER MASTER (Proutski and Holmes., 1996) وذلك لتوفير ظروف ملائمة للتفاعل للتحري عـن جينـات متعـددة فـي خطـوة واحـدة عنـد أسـتخدام تقنيـة تفاعـل إنـزيم البلمـرة المتعـدد Multiplex PCR . اذ اسـتعمل برنـامج Oligo Software لتصـميم بادئـات متخصصـة عن الجينـات المنتجـة للـذيفانات فـي بكتريـا الـ *S. aureus* للتحـري عنهـا باستعمال تقنية الـ Multiplex PCR وهي جينات الـ enterotoxins من A الى E (*entA,entB,entC,entD* and *entE*) وجينـات الـ exfoliative toxins A,B (*etA,etB*) وجين الـ toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) وتعد تقنيـة الـ Multiplex PCR طريقـة متخصصـة جداً وسـريعة وبـديل أقل كلفـة مـن الطريقـة العاديـة Conventional PCR فـي أسـتخدامها وتطبيقهـا فـي المختبـرات السريرية لتشخيص جينـات السموم المختلفة في المكورات العنقودية (Manisha *et al.*, 2000) .

تـم أسـتعمال تقنيـة الـ Real-time PCR TaqMan® assay للتحري عن الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة في سلالات بكتريا الـ *S. aureus* اذ استعملت في الكشف السريع عن جينات الذيفان PVL وهما (*lukF-PV* and *lukS-PV*) وجين الـ *mecA* (المقاومة لمضاد المثيسيلين) وجين *nuc* في سلالة الـ MRSA المعزولة من عينات سريرية بأستعمال تفاعل triplex real-time PCR (McDonald *et*

real-time تمتاز تقنية الـ , *al.*, 2005; Deurenberg *et al.*, 2004) PCR بالخصوصية والحساسية العالية في التحري عن الجينات الثلاثة السابقة في أنبوبة أختبار واحدة خلال ثلاث ساعات (Nakagawa *et al* ., 2005) . أيضاً تم التحري الجزيئي عن جينات الذيفان PVL من قبل عدة باحثين ;Zhang *et al.*, 2005) Okuma *et al.*, 2002) .

5-2 امراضية بكتريا *S. aureus* Pathogenesis of *S. aureus*

تعد جرثومة *S. aureus* من اشد انواع المكورات العنقودية في امراضيتها على الرغم من كونها جزءاً من النبيت الطبيعي (Normal flora) للجلد والانف والبلعوم والقناة الهضمية والتناسلية للانسان (Todar,2002) . وتمتلك ايضاً القدرة على احداث اخماج انتهازية Opportunistic infections تتفاوت بين اخماج الجلد البسيطة نسبيا الى الامراض الجهازية المهددة للحياة (Levinson and Jawetz, 2000) . وبسبب امتلاكها العديد من المستضدات السطحية والانزيمات والذيفانات تستطيع هذه البكتريا اختراق انسجة الجسم بقوة (Zadik *et al.*, 2001) .

من الأمراض التي تسببها هي الأخماج الأولية مثل الدمامل الموضعية (Furuncles)وهي عبارة عن خمج جلدي سطحي يحدث في حويصلات الشعر ، أو في الغدد الشحمة ، أو الغدد العرقية ، وهذا الخمج يؤدي إلى إغلاق قناة الغدة مصحوباً بحكة ، وتنتهي الإصابة عادة بتصريف القيح ، ومن الممكن أن تمتد الحويصلة بين الأنسجة الجلدية المتجاورة وتكون سلسلة من الإصابات التي قد تصل إلى مجـــــرى الدم (Diep *et al.*, 2004)، كما تنـــتج *S. aureus* الدمـــامل المزمنة (Chronic furuncles) نتيجة لتكرار الإصابة وهذه الإصابات عادة تكون مصحوبة بعدة عوامل كأن يكون الشخص مصاباً بداء السكري ، أو مصاباً بأحد أمراض الدم الأخرى ، وغالباً ما تظهر الإصـابة ببكتريا *S. aureus* كإصابة ثانوية مصاحبة للإصابة الأولية بالمكورات المسبحية (Ryan and Ray, 2004). ومن الامراض الجلدية الاخرى التي تسببها بكتريا *S. aureus* هي الخراجات Abscesses

والتهاب حويصلة الشعر Folliculitis ومرض القوباء المعدي Impetigo Contagiosa والبثور Pimples

(Johnson *et al.*, 2002 ; Jawetz *et al.*, 1998 ; 1996) Collee *et al.*,.

وتعد بكتريا *S. aureus* من اهم مسببات اخماج المستشفيات ومن المسببات الرئيسية لاخماج الجروح واخماج جروح العمليات Surgical Wound infections واخماج الحروق Burn infections (Munoz *et al* ., ١٩٩٩) .

تنتج بكتريا الـ *S. aureus* الذيفان المقشر (Exfoliative toxin) مسبباً متلازمة تقشر الجلد (Scalded Skin Syndrome) حيث يسبب هذا الذيفان تقشرات وانسلاخات (Scalded) اذ يصيب الاطفال بعمر اربع سنوات وحديثي الولادة كما يصيب كبار السن ضعيفي المناعة وتدعى ايضًا بالمتلازمة المحللة للبشرة (Prevost *et al.*, 2003) . كما تسبب التهاب المفاصل Arthritis والتهاب اغشية الدماغ (السحايا) Meningitis وخراج الكبد Liver abscess وخراجات البروستات Prostatic abscess والتهاب المجاري البولية Urinary tract infection (UTI) والتهاب اللوزتين والبلعوم Tonsillitis and pharyngitis والتهاب الجيوب الانفية Nasal furuncles (Collee *et al* ., ١٩٩٦) . وللجرثومة دور في احداث التهاب شغاف القلب والذي يؤدي الى حدوث وفيات عالية بين المرضى المصابين (Tornos *et al*, 1999; Roder *et al*, 1999) .

تنتج *S. aureus* العديد من الإصابات الذيفانية غير المباشرة مسببة بذلك حدوث التسمم الغذائي (Food poisoning) نتيجة لتلوث الغذاء بالذيفانات المعوية التي تنتجها ، ومن ثمَ حصول حالات حادة من التقيؤ الشديد والإسهال الذي قد يمتد من ساعة إلى خمس ساعات وتكون الإصابة عادة من دون حمى وسريعة الشفاء فيما عدا الأشخاص المسنين والأشخاص المصابين بأمراض أخرى يكون طريقهم إلى الشفاء أبطأ قليلاً (Boynukara *et al.*, 2007) .

فضلاً عن قدرة البكتريا على أصابة الحيوانات خصوصاً الأبقار مسببة التهاب الضرع Mastitis (Pamela, 2001 ; Albert, 2000) .

6-2 الوبـــائية Epidemiology

تعد الوبائية من أهم الجوانب التي يجب الإحاطة بها ، ومعرفتها بشكل واف لما لذلك من أهمية للفرد والمجتمع ، ولغرض السيطرة على عوامل الانتشار ، وتصحيح المسارات التقنية في مواجهة المرض والوقاية منه ، إذ تعمل *S. aureus* على استيطان مناطق الجسم المختلفة كالأنف والمجاري التنفسية والجلد بشكل طبيعي ، وتزداد هذه النسبة لدى الأشخاص العاملين في المستشفيات ، وتعد البكتريا المتوطنة لأكثر من موقع في الجسم أحد أهم مصادر الأخماج الكامنة والمشكلة الأساس هي عدم معرفة الرابط بين مواقع استيطان البكتريا ، وإنتاج المرض ، وعلى الرغم من ذلك أمكن معرفة بعض السلالات التي تمتلك قدرة كامنة على إنتاج المرض ، ولكن لاتوجد وسيلة للتنبؤ بالسلالات التي قد تتحول إلى سلالات مرضية (Fluit *et al.*, 2001) .

تكتسب أخماج المجتمع تلقائياً بوساطة السلالات المحمولة في فتحتي الأنف ، أو على سطح الجلد ، أو كليهما ، أما أخماج المستشفى من الممكن إن تحدث من خلال اكتساب خلية مفردة من سلالات بكتريا *S. aureus* الشائعة الوجود لدى المرضى الذين خضعوا لعمليات جراحية ، أو المرضى المخمجين بتلك البكتريا (Bratu *et al.*, 2003)، ومن أهم مصادر انتشار الأخماج هم المرضى المصابين بالتقرحات المخمجة التي قد تنتقل مباشرة إلى المرضى الآخرين عن طريق أيادي الأشخاص العاملين في المستشفى ، وتعد المستشفيات مصدراً رئيساً للإصابات الشديدة التي تتحول بعد حصول عملية الشفاء إلى حالات كامنة ، وغالباً ما تتحول البكتريا من الحالة الفعالة إلى بكتريا محمولة صامتة (Silent) مما يساعدها على الانتقال إلى البيئة المحيطة والتوسع في الانتشار (Warshawsky *et al.*, 2000).

هناك العديد من الإصابات التي تحدثها بكتريا *S. aureus* مثل حالات التسمم الغذائي التي تحصل نتيجة لتلوث الأطعمة بالأيادي الملوثة أو الرذاذ ، وقد يكون من خلال الأدوات الملوثة وعند توافر الظروف الملائمة من درجات الحرارة والرطوبة المناسبتين

والغذاء الغني بالمواد الضرورية لنمو البكتريا ، عند ذاك تحصل عملية تضاعف البكتريا ، وإنتاج الذيفانات المعوية التي تمتاز بمقاومتها لعمليات التسخين (Boynukara *et al.*, 2007).

2-٧ مقاومة بكتريا *S. aureus* للمضادات الحيوية

تعد *S. aureus* واحدة من أهم مسببات الأخماج الشائعة في المستشفيات ، ولاسيما الأخماج المصاحبة لجروح العمليات منذ أن اكتشفها أول مرة الجراح الكسندر اوكستين (Alexander Ogston) في اسكتلندا عام ١٨٠٠ في خراج ناتج عن تلوث جروح عملية جراحية ، ومنذ اكتشاف البنسيلين من قبل الكسندر فليمنك (Alexander Fleming) عام ١٩٢٩ والبدء باستعماله عام ١٩٣٦ فان معظم المكورات العنقودية ومن ضمنها *S. aureus* كانت تعد حساسة للبنسيلين إلى بداية عام ١٩٤٤ ، ولكن بعد مدة وجيزة من تعاطي البنسيلين ولاسيما في عام 1944 سجلت نسبة المقاومة للبنسيلين (65%-85%) (Diep *et al.*, 2004) وتم الربط بين إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز ومقاومة المكورات العنقودية للبنسيلين ، ولغرض اجتناب مقاومة البنسيلين تم استعمال البنسيلينات الثابتة تحت تأثير إنزيم البيتالاكتاميز المتمثلة بمجموعة (المثيسيلين والأوكزاسيلين والنافسيلين والدايكلوكزاسيلين) (Kuehnert *et al.*, 2006) ، ونتيجة لسلسلة المقاومات التي أبدتها معظم سلالات المكورات العنقودية للبنسيلين فقد وصلت نسبة المقاومة بشكل تقريبي (80%-90%) من مجموع الإصابات المكتسبة من المستشفيات أو من المجتمع (Diekema *et al.*, 2002) ، أما في عام 1961 تم التأكد من أن *S. aureus* تظهر مقاومة للمثيسيلين وأطلق على السلالات المقاومة بسلالات MRSA (Tiemersma *et al.*, 2004) .

أظهرت بعض الدراسات أن المقاومة للمضادات الحيوية لم تقتصر على مجموعة البيتالاكتام وإنما امتدت لتشمل العديد من أصناف المضادات الحيوية مثل (الأمينوكلايكوسايد ، الكوينولين مركبات السلفا ، الكلندامايسين ، الماكروليد ، التتراسايكلين ، الفنيكول) وتعد المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (MDR) Multidrug resistance مؤشراً على مقاومة المكورات العنقودية للمثيسيلين (NCCLS, 2003c) ، فضلاً عن ذلك فان المقاومة للأمينوكلايكوسايد ازدادت في

السنوات الأخيرة بالتوازي مع الزيادة في مقاومة *S. aureus* للمثيسيلين فقد وجد عام 1970 بأن سلالات *S. aureus* مقاومة فقط للستربتومايسين ، في حين لوحظ في عام 1980 امتداد المقاومة لتشمل مجموعة كبيرة من مضادات الأمينوكلايكوسايد (Spratt, 1989) ، وسجلت عام ١٩٩٧ أولى حالات المقاومة للمضاد الحيوي (الفانكومايسين) الذي اظهر نجاحاً واسعاً لعلاج الإصابات الناتجة عن MRSA ، وأطلق على سلالات بكتريا الـ *S. aureus* المقاومة للفانكومايسين بسلالات (VRSA) Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* مما دفع العلماء على حث الجهود لإيجاد علاجات جديدة ذات تأثير فعال (Siegman-*Igra et al.*, 2005; Kacica *et al.*, 2004) .

8-2 آلية المقاومة للمضادات الحياتية Mechanism of antibiotic resistance

أشارت الدراسات الحديثة الى ان مقاومة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية لاغلب المضادات الحياتية تحصل بسبب قدرة هذه البكتريا على أنتاج العديد من الأنزيمات والجينات التي تؤدي دوراً أساسياً في مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية ، فقد وجد ان مقاومة البكتريا للبنسيلين (Penicillin) والسيفالوسبورين (Cephalosporin) ناتجة من قابليتها على انتاج انزيم β-Lactamase الذي يحطم حلقة β-Lactam لجزيئة البنسيلين (Katzung , 2001) .

في حين وجد ان مقاومة البكتريا للمثيسيلين (Methicillin) تحصل بسبب امتلاك البكتريا جينات تدعى (*mec* A gen) التي تشفر بديلا عن البنسيلين المرتبط بالبروتين وبذلك يصبح اقل ألفه للأرتباط مع β-Lactam ، كذلك وجد ان بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين تمتلك نوعاً خاصاً من البروتينات المرتبطة بالبنسيلين (PBPs) يدعى PBP_2 والذي لايوجد في سلالات المكورات العنقودية الحساسة للمثيسيلين (Hebeisen *et al* ., 2001) والتي تتصف بمقاومتها لأنزيمات البيتالاكتاميز (β- Lactamase) المنتجة من البكتريا وذلك لأمتلاك هذه المجموعة من المضادات سلسلة اسيل جانبية (Acyl side – chain)

التي تعمل على حماية آصرة البيتالاكتام β-Lactame للمضاد وتمنع بالتالي وصول أنزيم البيتالاكتاميز المحطم لها (Laurence *et al* ., 1997) اما مقاومة البكتريا للفانكومايسين والكلايكوببتايد فهو بسبب أمتلاك البكتريا لجينات (*van*A gene) التي تشفر لأنتاج أنزيم بديلا عن الببتايدوكلايكان الذي لايستطيع الأرتباط مع المضاد الحياتي الفانكومايسين (Changs *et al* ; Fluit *et al* ., 2001 ., 2003) .

وأشارت دراسات اخرى الى ان بعض المضادات الحيوية لها تأثيرات في انتاج البروتينات الخارج خلوية على المستوى الجزيئي ، وكانت نتائج هذه الدراسات مختلفة بأختلاف الأساس الجزيئي لمقاومة أو حساسية المكورات العنقودية الذهبية لهذه المضادات (Humphreys, 1997) .

9-2 الاساس الجزيئي لمقاومة *S. aureus* للمضادات الحيوية :

٩-2-١ مقاومة بكتريا *S. aureus* لمضاد الـ Methicillin

ظهرت مقاومة العنقوديات الذهبية للمثيسيلين بعد مدة قصيرة من ادخاله الى حيز الأستعمال الطبي واطلق على هذا النوع من المقاومة بالمقاومة الداخلية (Intrinsic) (Jones *et* al., 1997) ثم توسعت المقاومة للمثيسيلين بالأنتشار خارج المستشفيات وخاصة لدى الأشخاص المصابين بالأمراض المزمنة و الأشخاص الذين يتعاطون المضادات الحيوية بأفراط ومن دون استشارة الطبيب (Cox *et al* .,1995; Hiramatsu and Konodo , *et al* .,1995 ; Moreno 1995) .

تعدَ MRSA إحدى أهم مسببات الإصابات والأمراض في العالم منذ خمسة عقود ، وما تزال MRSA في حالة ازدياد واستمرار لحد الآن (Al-Rawahi *et al.*, 2008) وتأتي أهمية هذه السلالات نتيجة لمقاومتها لجميع أنواع مضادات البيتالاكتام بالإضافة إلى مقاومتها للعديد من أنواع المضادات الحيوية الأخرى (NCCLS, 2003c) .

تعزى مقاومة MRSA لمضادات البيتالاكتام إلى إنتاج بروتينات جديدة وهي البروتينات الرابطة للبنسيلين (PBPs) وتعرف بـ (PBP2a) أو (PBP2') وهي عادة لا تشبه أيا من المجموعة الداخلة ضمن أنواع البروتينات الرابطة للبنسيلين (PBPs) ، أما آلية عمل (PBP2a) فهو تقليل الألفة أو التجانس مع مضادات البيتالاكتام ، وعلى الرغم من وجود التراكيز المثبطة لمضادات البيتالاكتام فان MRSA تستطيع أن تكمل بناء جدار الخلية بالاعتماد على الفعالية غير المثبطة لـ (PBP2a) فقط (Ito *et al.*, 2004, Ito *et al.*,2001).

ان الأساس الجزيئي لمقاومة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* للمثيسيلين هو وجود قطعة اضافية من الدنا DNA على كروموسوم بكتريا الـ *S. aureus* تدعى *Mec* A وهي بحدود (30– ٥٠ KB) كيلو زوج قاعدة ولا توجد هذه القطعة في العنقوديات الذهبية *S. aureus* الحساسة للمثيسيلين (Hiramatsu *et al* ., 1996 Oliveira *et al.*,2000;) .

تشفر بروتينات (PBP2a) بوساطة مورثة *mec*A المتواجدة على كروموسومات MRSA ، وفي عام 1987 تم إدخال مورثة *mec*A في بعض سلالات MSSA وتم تحديد تسلسل القواعد النتروجينية لتلك المورثة (Song *et al.*, 1987) ، كما تم تحديد تواجد مورثة *mec*A في بكتريا *S. aureus* وفي المكورات العنقودية السالبة لإنزيم مخثر البلازما (CoNS) Coagulase negative staphylococci (Deplano *et al.*, 1997b) ، ومن ذلك يمكن التخمين أن المقاومة للمثيسيلين تحدد بمحددات المورثة (*mec* determinats) وهذه المحددات حرة في الانتقال بين أنواع المكورات العنقودية وهذا ما يفسر عملية انتقال وانتشار المقاومة للمثيسيلين بين الأنواع البكتيرية (Katayama *et al.*, 2000) .

اعتمد Hiramatsu وجماعته (1999) على *mec*DNA بكونه صنفاً جديداً من العناصر الوراثية وحدد الرمز (Staphylococcal chromosome cassettes *mec* (SCC*mec*) للدلالة على العناصر الوراثية للعنقوديات ، إذ تم تمييز اثنتين من المورثات ذات الفعالية العالية في عملية تكوين الاتحادات الجديدة

(Recombinase genes) ، وهما ccrA و ccrB المتمركزتين في الجزء الكروموسومي SCC*mec* ، ويعملان على تشفير متعدد الببتايد CcrA و CcrB على التوالي ، إذ يحتوي الأول على 499 حامض أميني والثاني على 542 حامض أميني ، كما يوجد على يسار ويمين SCC*mec* مناطق مقاومة المضادات الحيوية مثل الموقع الذي يحمل مورثات المقاومة للمضادات الحيوية المعقد (*mecI-mecR1-mecA* gene complex) الذي يعمل على تشفير المقاومة للمضادات الحيوية المختلفة ، وغالباً ما تحمل مورثة *mecA* المسؤولة عن المقاومة لمضاد المثيسيلين من بعض سلالات بكتريا الـ *S. aureus* وبعض من أنواع المكورات العنقودية الأخرى (Suzuki *et al.*, 1992; Hurlimann-Dalei *et al.*, 1992) .

يمكن الاستنتاج بأن المورثة المقاومة للمثيسيلين محمولة بوساطة عناصر وراثية جديدة هي SCC*mec* التي تندمج وتستثار من قبل مورثات الاتحادات الجديدة ccrA و ccrB ولذلك فأن دراسة توزيع SCC*mec* يساعد على تفسير تبادل المعلومات المهمة بين الأنواع المختلفة و *S. aureus* وكذلك فإن معرفة آلية تنظيم SCC*mec* قد تسهم في إنتاج علاج دوائي جديد يتم خلاله تحويل سلالات MRSA إلى MSSA (Ito *et al.*, 2004) .

ويعتقد إن مجموعة البنسيلينات الثابتة Penicillinase-Stable Penicillins التي تضم عدة مضادات حيوية مثل المثيسيلين والأوكزاسيلين والنافسيلين (Macfaddin ., 2000) ، تمتلك تأثيرات محفزة لبكتريا *S. aureus* على المقاومة ، إلا أنَ بعض الدراسات الأخيرة أظهرت بان هذه المجموعة تمتلك تأثيرا يسيراً على تحفيز المقاومة للمثيسيلين ، وان مقاومة *S. aureus* لهذه المضادات لم تنشأ نتيجة التحفيز وإنما تم اكتسابها عن طريق انتقالها من الأنواع البكتيرية السالبة لإنزيم مختثر البلازما (CoNS) إلى *S. aureus* بوساطة آليات الانتقال الوراثي مثل (الاقتران البكتيري ، والتحول الوراثي والعاثي البكتيري) (Lindsay *et* Waldron and Lindsay, 2006; *al.*, 2006) كما يعتقد McKinney وجماعته (٢٠٠١) ان المضاد الحيوي السيفوكستين (Cefoxitin) أو(Cephamycin) يمتلك القدرة الكامنة على تحفيز أنظمة تنظيم مورثة *mecA*

أكثر من البنسيلينات إلا ان Darini وجماعته (٢٠٠٤) يؤكدون على ان السيفوكستين لايحفز إنتاج PBP2a في عزلات MSSA أي انه لايحفز المقاومة في العزلات الحساسة ولكنه يعمل على تحفيز المقاومة الكامنة في العزلات ذات المقاومة غير المتجانسة .

٢-9-2 مقاومة بكتريا *S.aureus* لمضاد الـ Vancomycin

ظهرت في الاونة الاخيرة مشكلة صحية كبيرة تمثلت بظهور عزلات مقاومة من بكتريا *S.aureus* لمضاد الـ Vancomycin (Hososaka *et al.*, 2004 ; Hanaki *et al.*, 1998) ، أذ سجلت اول حالة اصابة بهذه البكتريا سنة (1997) في اليابان ، اتبعها تسجيل حالات اصابة اخرى على نطاق اوسع سنة (2002) في الولايات المتحدة الامريكية وفرنسا وسلوفاكيا وغيرها من الدول (Srinivasan *et al.*, 2002;Yangihara *et al.*, 2002) الامر الذي شكل حالة طارئة وخطيرة مهددة بكارثة صحية كبيرة . فبعد ان كان مضاد الـ Vancomycin يصنف على انه العلاج الامثل لمعالجة واحدة من أشد انواع البكتريا امراضية على جسم الانسان استطاعت هذه البكتريا ان تجعل هذا المضاد غير قادر على التاثير عليها كسابقاته من مضادات الحياة (May *et al.*,1998; Daily *et al* ., 2005) . هذا ما دفع الباحثين الى وضع هذا الموضوع قيد المناقشة والبحث المستمرين (Srinivasan *et al.*, 2002) لمعرفة الاسباب الحقيقية لهذه المقاومة والوقوف عليها .

للعوامل الوراثية دورٌ مهمٌ بنشوء المقاومة لمضادات الحياة وانتقالها (Forbes *et al.*, 2002;Wotton *et al.*,2004) وذلك لامتلاك الاجناس البكتيرية المختلفة لعناصر وراثية متنقلة مثل البلازميدات Plasmids (مادة وراثية خارج كروموسومية حاملة لصفة المقاومة لها القدرة على التضاعف والانتقال بصورة مستقلة) (Flannagan *et al.*, 2003) . والجينات القافزة Transposons (عناصر وراثية لها القدرة على القفز بين بلازميد وآخر وبين كروموسوم وبلازميد محدثة الكثير من التغييرات منها حذف اواضافة على سلاسل الدنا المتنقلة ضمنها (Chang *et al.*, 2003) وتبادل القطع الكروموسومية وخاصة الحاملة لصفة المقاومة لمضادات الحياة التي لها القابلية على

الانتقال بآليات مختلفة تؤدي الى اكتساب الجينات المقاومة بين الانواع المختلفة وخاصة بين بكتريا *E .faecalis* وبكتريا *S. aureus* (Paterson,1999 ;Melo *et al.*, 2005) ان القابلية على نقل صفة المقاومة لمضادات الحياة بين الانواع البكتيرية المختلفة يشكل مشكلة صحية حقيقية ومن ضمنها مضاد الـ Vancomycin الذي يستعمل بديلاً لمضادات البيتالاكتام لعلاج البكتريا الموجبة لصبغة غرام وبالاخص بكتريا *S. aureus* المقاومة لمضاد الـ Methicillin (Reipert *et al* ., 2003) فمن جملة الاسباب التي تقف وراء هذه المقاومة ، هو ما ذكرهُ الباحثان Tenover *et al.*, (٢٠٠٤) و Bhalakia, (2005) من ان سبب المقاومة لمضاد الـ Vancomycinهو احتواء بكتريا *S. aureus* على بلازميدين بحجم جزيئي ٤ كيلو زوج قاعدي و ١٢٠ كيلو زوج قاعدي ، بينما اشار كل من Awards and Fellowships, (1998) و Chang *et al.*, (2003) ان سبب هذه المقاومة هو وجود الجينات القافزة وبالتحديد الجين القافزTn1546 الحامل للجين *van*A المسؤول عن التشفير لأنزيم يقوم باحداث تحويرات على طبقة الببتيدوكلايكان (Peptidoglycan) جاعلاً مضاد الـ Vancomycin غير قادر على الارتباط بالموقع الفعال له .

كما اشار الباحث Clark *et al.*, (2005) الى ان المقاومة لمضاد الـ Vancomycin محمولة على جينات قافزة نوع Tn1546 ، و ان لهذا الجين القافز القدرة على الانتشار والانتقال من نوع الى آخر من المكورات المعوية أو الى الاجناس البكتيرية الاخرى مثل المكورات العنقودية الذهبية (Senn *et al.*, 2005) .

اما Schaaff *et al.*, (2003) فقد علل سبب المقاومة بحدوث طفرات في سلسلة الجينات المسؤولة عن بناء طبقة الببتيدوكلايكان (Peptidoglycan) التي تعد الهدف لمضاد الـ Vancomycinمحدثة عليها تغيرات عديدة تمنعه من الارتباط بها ، وكذلك فقد يعود سبب المقاومة الى انتاج بعض الانواع من PBPs مثل PBP2a ذات الالفة الواطئة للارتباط بمضادات البيتالاكتام والمسؤولة عن مقاومة مضاد الـ Vancomycinبتراكيز عالية اوحدوث طفرات وراثية تؤدي الى تغييرفي الفعالية الوظيفية لهذه البروتينات واحداث المقاومة (Srinivasan *et al.*, 2002) .

اما السبب الاكثر شيوعاً من بين الاسباب الوراثية الذي اشارت اليه اغلب الادبيات العلمية هو انتقال صفة المقاومة عن طريق الاقتران البكتيري (Bacterial conjugation) الذي يعرف على انه اكثر الطرائق شيوعاً لانتقال بلازميدات المقاومة وعوامل الضراوة وبصورة سريعة في المجاميع البكتيرية أذ يحصل الاقتران بتردد عالٍ بين البكتريا من النوع نفسه او الانواع القريبة وراثياً (Dionisio *et al.*, 2001) حيث وجد ان صفة المقاومة لمضاد الـ Vancomycin في بكتريا *E.faecalis* تشفر لها عدة جينات وهي كل من الجين *van* A, *van* B , *van* C, *van* D وان جينات المقاومة هذه غالبا ما تكون محمولة على بلازميد اقتراني كبير الحجم ذي حجم جزيئي ٦٠ كيلو زوج قاعدي (٦٠Kb) وحامل للجينات المشفرة للبكتريوسين والانزيم الحال للدم ، وان لهذا البلازميد القدرة على الانتقال الى بكتريا *S. aureus* وبتردد جيد (Awards and Fellowships,1998) وعند دراسة الجين *van*A الموجود في كل من VRSA،VRE باستعمال تقنية PCR باعتماد مجسات (Probs) خاصة لهذا الجين ، حيث وجد ان هناك تماثل الجين *van* A في كلا النوعين مما يدعم حقيقة انتقال صفة المقاومة بين بكتريا *E.faecalis* و *S. aureus* سببه انتقال بلازميد اقتراني او سلسلة من الجينات المسؤولة عن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية و الحاملة للجين (*van* A) (Wiegel *et al.*, 2007 ; Chang *et al* ., 2003) .

2- 10 وبائية بكتريا الـ MRSA Epidemiology of MRSA

تتواجد بكتريا MRSA في العديد من البيئات والمجتمعات ، ويعزى تواجد بكتريا الـ MRSA وانتشارها إلى ما تملكه من عوامل الضراوة العالية ، والقدرة على التطور ، والبقاء ، ونتيجة لخطورتها في إحداث المرض والإصابة فقد صنفت سلالات MRSAإلى صنفين بحسب طريقة انتقالها والبيئة التي تنتشر فيها ، وجاء التصنيف لغرض التمكن من دراستها وتحديد العوامل المساعدة على بقاءها وتوطنها ولغرض السيطرة عليها والحد من انتشارها ولتقليل قدرتها على المقاومة ، ولتقديم العلاج الأفضل في حال الإصابة بها ، فالصنف الأول يكتسب عن طريق المستشفى

Hospital aquired-MRSA (HA-MRSA) ، وهذا النوع من الإصابة يكتسبه الأشخاص الداخلين في المستشفى ، وقد تسببMRSA أخماج عديدة مثل أخماج الجروح الناتجة عن العمليات الجراحية وأخماج المجاري البولية ، والأخماج الرئوية (Ito *et al.*, 2004; Deplano *et al.*, 1997b) .

تتمتع HA-MRSA بميزات على المستوى الجزيئي ، إذ يتميز SCC *mec* بثلاثة أنواع هي *mec* (I , II , III) ونوع المورثة USA100 ، أما نوع العاثي للـ MRSA فهو بانتون فالنتين ليوكوسدين Panton Valentine leukocidin (PVL) من النوع غير الشائع كما تمتاز بمقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية وينتج عنها العديد من الأخماج وفي مواقع مختلفة من الجسم ، أما النوع الثاني هو Community acquired - MRSA (CA-MRSA) الذي يتعرض له الأشخاص الذين يترددون على المستشفى ترددا مستمراً أو الأشخاص الذين يقومون بعمليات ديلزة أو قسطرة ، ومن ميزات CA-MRSA على المستوى الجزيئي هو اتصافSCC*mec* بنوع واحد هو *mec* (IV) ، أما نوع المورثة هو USA300 والعاثي البكتيري PVL فهو من النوع الشائع ويكون تواجده بنسبة (٢%- ٣%) في المكورات العنقودية بصورة عامة (Okuma *et al.*, 2002) ، وهذا النوع من CA-MRSA يتميز بمقاومة انتقائية لمضادات البيتالاكتام ، ويسبب أخماج الجلد والأنسجة الرخوة وغالبا ما تنتج حالات حادة قد تصل تأثيراتها أحيانا إلى أعضاء حيوية من الجسم مما يؤدي إلى حصول أخماج واسعة الانتشار مثل متلازمة الصدمة الذيفانية وتآكل الأنسجة ، وذات الرئة .

إن الإصابة بسلالات CA-MRSA نادرة الحدوث مقارنة بتردد الإصابة بسلالات HA-MRSA ، وغالبا ما تصيب CA-MRSA الأشخاص الأصحاء والأطفال حديثي الولادة كما تصيب الأطفال والبالغين المفتقرين لعوامل المقاومة المناعية ، وتظهر الإصابات الناتجة عن CA-MRSA بشكل أخماج جلدية والتهابات رئوية حادة مثل ذات الرئة الحاد ، وقد تؤدي بعد حصول المضاعفات إلى حالات وفاة وخاصة للأشخاص من ذوي التاريخ المرضي ، وقد وثقت أولى حالات CA-MRSA بشكل

رسمي عام ١٩٩٧ لأربع حالات أدت إلى الوفاة في ولاية منيسوتة الأمريكية (CDC, 2007) أما HA-MRSA من الممكن أن تكتسب عن طريق المستشفى وخاصة الأطفال حديثي الولادة في وحدتي الولادة ورعاية الأطفال الخدج ، وقد تحصل للنساء بعد الولادة حيث تتطور الحالة للمدة من يومين إلى شهر من دخول المستشفى وتحدث عملية انتقال العدوى عن طريق الأشخاص العاملين في المستشفى ، ومن الممكن أن تنتقل العدوى عن طريق الأدوات والأجهزة الملوثة ، وهناك العديد من العوامل التي تساعد في تفاقم الإصابة بـ HA-MRSA مثل كون الطفل المولود حديثاً خديجاً أو ذو وزن منخفض ، أو كون الشخص الحامل لسلالات HA-MRSA من المرضى الراقدين لفترات طويلة ، أما الإصابات الناتجة بعد العملية الجراحية فان عامل تضرر الجلد الناتج عن جروح العملية الجراحية يكون عاملاً مهماً للإصابة لان الجلد في هذه الحالة يكون أرض خصبة لنمو وتكاثر HA-MRSA أما العامل الآخر الذي لا يقل أهمية عما سبق فان عملية الاستعمار والتوطن للبكتريا لدى الأشخاص يشجع على سرعة حدوث الإصابة و تفاقم أعراضها (Reed *et al.*, 2005; Baba *et al.*, 2002; Haglind *et al.*, 2001; CDC, 2001) .

3- المواد وطرائق العمل Materials and methods

3-1 المـــواد Materials

3-1-1 الأجهـزة والأدوات المختبرية Equipment and apparatus

أســـــم الجـــهـاز		الشركة المصنعة (المنشـــأ)
أطباق بتري بلاستيكية	Disposable Petri dishes	Al-Hani (China)
أنابيب اختبار	Test tubes	Superestar (India)
انابيب (PCR)	PCR tubes	Ependorff / (USA)
انابيب ابندورف	Ependorff tubes	Sigma (England)

Concord (Lebanon)	Refrigerator	ثلاجة
GFL (Germany)	Deep freezer	جهاز التجميد العميق
Primus (USA)	Thermocycler (PCR)	جهاز الدورات الحرارية
Apel (Japan)	Spectrophotometer	جهاز المطياف الضوئي
GFL (Germany)	Distiller	جهاز تقطير
Ino-lab. (Germany)	pH-meter	جهاز قياس الحموضة
Memmert (Germany)	Incubator	حاضنة
Lab-line (USA)	Shaker incubator	حاضنة هزازة
GFL (Germany)	Water bath	حمام مائي
Eriotti (Italy)	Electric oven	فرن كهربائي
China	Calipers	فيرنيا
Lab.Companion (Korea)	Cabient	كابينة الزرع المجهري
Sony (Japan)	Digital camera	كاميرا رقمية
Stuart Scientific (UK)	Auto Vortex SA6	مازج
Certyfied (Germany)	Automatic micropipettes	ماصات دقيقة
Olympus (Japan)	Compound light microscope	مجهر ضوئي مركب
Stuart Scientific (UK)	Magnetic stirrer	محرك مغناطيسي
Difco (USA)	Millipore filters (0.22µm)	مرشحات دقيقة
K&K (Korea)	Hot plate&Stir	مسخن حراري
BioStep	UV-transilluminater	مصدر الأشعة فوق

(USA)		البنفسجية
Hettich (Germany)	Cooling centrifuge	منبذة (مبردة)
Hettich (Germany)	High speed centrifuge	منبذة عالية السرعة
Hiclave (Japan)	Autoclave	موصدة
Kern (Germany)	Sensitive electronic balance	ميزان الكتروني حساس
Himedia (India)	Standard wire loop (1µ)	الناقل الزرعي القياسي
SCIE-Plas (USA)	Electrophoresis unit	وحدة ترحيل كهربائي

2-1-3 المواد الكيمياوية Chemical materials

الشـركة المصنعة (المنشـأ)	أسـم المـادة	
BDH	Ethylen-diamine-tetra acetic acid-disodium Na_2-EDTA	اثيلـين - ثنـائي الامـين رباعي حامض الخليك - ثنائي الصوديوم
BDH	Ethylene-diamine-tetra acetic acid (EDTA)	اثيلـين - ثنـائي الامـين- رباعي حامض الخليك
Biolife (Italy)	Agar	أكـار
Bio Basic Inc (USA)	Lysozyme	أنزيم تحليل الخلايا
Difco	Peptone	ببتون
Sigma (USA)	Ethidium bromide	بروميد الاثيديوم
BDH	Crystal violet	البلور البنفسجي
SDI (Iraq)	Hydrogen peroxide (H_2O_2) (7%)	بيروكسيد الهيدروجين
Difco	Trypton	تربتون

BB (USA)	Gelatin	جيلاتين
BDH	Boric acid	حامض البوريك
BDH	Sulphuric acid (H_2SO_4)	حامض الكبريتيك
BDH	Hydrochloric acid (HCl)	حامض الهيدروكلوريك
Difco	Yeast extract	خلاصة الخميرة
BDH	Tetramethyl-*P*-phenylene diamine dihydrochloride	رباعي المثيل- ثنائي كلوريد الهيدروجين
Sigma	Safranine	سفرانين
Difco	Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	سكروز
Promega (USA)	DNA ladder (100-1500bp)	سلم الحمض النووي القياسي
BDH (England)	α-naphthol ($C_{10}H_8O$)	الفانفثول
Fluka	Formaldehyde	فورمالديهايد
Fluka	Sodium monohydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين
Fluka	Sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين
BDH	Sodium dihydrogen orthophosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين المائية
BDH	Phenol	فينول
BDH	Kovacs reagent	كاشف كوفاكس
BDH	Ethanol (96%)	كحول الايثانول
Fluka (Switzerland)	Barium chloride	كلوريد الباريوم
BDH	Sodium chloride (NaCl)	كلوريد الصوديوم
Fluka	Glycerol ($C_3H_8O_3$)	كليسيرول
Bioneer (Korea)	PCR water	ماء سلسلة البلمرة

BDH	Mannitol	مانيتول
BDH	Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)	المثيل الاحمر
Mastdiagnostic	Urea solution	محلول اليوريا
Difco (USA)	Beef extract	مستخلص اللحم
Himedia (India)	Penicillin G Powder	مسحوق بنسيلين G
BDH	Solubile starch	النشا الذائب
Fluka (Switzerland)	Nigrosin,Indian Inc	نيكروسين , الحبر الهندي
BDH	Potassium hydroxide (KOH)	هيدروكسيد البوتاسيوم
Fluka	Sodium hydroxide (NaOH)	هيدروكسيد الصوديوم
Mastdiagnostic(USA)	Iodine	اليود
BDH	Potassium iodide (KI)	يوديد البوتاسيوم

3-1-3 الأوساط الزرعية الجاهزة Ready media

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم الوسط الزرعي	
Himedia	Blood agar base	وسط اغار الدم
Himedia	Mannitol salt agar	وسط المانيتول الملحي الصلب
Biolife (Italy)	MR/VP broth	وسط المثيل الأحمر/ فوكس-بروسكاور السائل
Himedia	Nutrient broth	الوسط المغذي السائل
Himedia	Nutrient agar	الوسط المغذي الصلب
Himedia	Urea agar base	وسط اليوريا
Biolife	Trypticase soy broth	وسط تربتون الصويا السائل
Oxiod (France)	Staphylococcus medium NO. 110	وسط ستاف 110
CHROMagar (France)	CHROM agar MRSA	وسط كروم أكار
Himedia (India)	DNase agar	وسط محلل الدنا الصلب
Himedia	Muller-Hinton agar	وسط مولر- هنتون الصلب
Mastdiagnostic	Brain heart infusion broth	وسط نقيع القلب-الدماغ السائل

Mastdiagnostic (USA)	Brain heart infusion agar	وسط نقيع القلب-الدماغ الصلب

4-1-3 المضادات الحيوية Antibiotics

أقـراص المضـادات الحيويـة (Antibiotic disks) التـي جهزتهـا شـركة (Turkey)Bioanalyse

صنف المضاد الحيوي	تـــحت الصنف للمضـــاد الحيوي	اســـــم المضاد الحيوي	الرمز	التركيز
Penicillins	Penicillin	Penicillin G بنســـيلينG	P	10 وحدات
	Aminopenicillin	Ampicillin أمبســـــيلين	AM	مايكروغرام 10
	Penicillinase-stable penicillins	Oxacillin أوكزاسـيلين	OX	مايكروغرام 10
β-lactam/ β-lactamase inhibitor combination		Amoxicilln - clavulanic acid أموكسسـيلين - حـــامـض كلافـيولانك	AMC	20/10 مايكروغرام
Cephems	Cephamycin	Cefoxitin سيفوكسيتين	FOX	مايكروغرام 30
	Cephalosporin I الجيل الأول	Cephalothin ســـيفالوثن	CF	مايكروغرام 30
	Cephalosporin III الجيل الثالث	Cefotaxime سيفوتاكزايم Ceftriaxone سفترياكزون	CTX CTR	مايكروغرام 30 مايكروغرام 30
Penems	Carbapenem	Imepenem اميبينيم	IMP	مايكروغرام 10
		Meropenem ميروبينيم	MEP	مايكروغرام 10
Aminoglycosides		Amikacin اميكاسين Gentamicin جنتامايســين	AK GEN	مايكروغرام 30 مايكروغرام 30

2 مايكروغرام	CD	Clindamycin كلندامايســين		Lincosamides
مايكروغرام 15	E	Erythromycin أرثرومايسين		Macrolids
مايكروغرام 30	VA	Vancomycin فانكومايسـين	Glycopeptide	Glygopeptides
مايكروغرام 30	C	Chloramphenicol كلورامفينكول		Phenicols
5 مايكروغرام	CIP	Ciprofloxacin سيبروفلوكساين	Floroquinolones	Quinolones
مايكروغرام 30	TE	Tetracycline تتراسايكلين		Tetracyclines

3-1-5 العُدد الجاهزة Kits

3-1-5-1 العدة المستعملة في استخلاص الحمض النووي (DNA extraction kit)

اسم العدة	المكونات	الشركة وبلد المنشأ
عدة استخلاص الحمض النووي Genomic DNA Mini Kit	GT Buffer 30 ml	Geneaid (USA)
	GB Buffer 40 ml	
	W1 Buffer 45 ml	
	Wash Buffer 100 ml with ethanol	
	Elution Buffer 30 ml	
	GD Column 100 pcs	

	2ml collection tubes 200 pcs	

3-1-5-2 العدة المستعملة في تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد (Single PCR)

اسم العدة	المكونات	الشركة وبلد المنشأ
عدة مزيج تفاعل إنزيم البلمرة AccuPower® PCR PreMix	Top DNA polymerase 1U	Bioneer (South Korea)
	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) each: 250μM	
	Tris-HCl (pH 9.0) 10mM	
	KCl 30mM	
	$MgCl_2$ 1.5mM	
	Stabilizer and tracking dye	

3-1-5-3 العدة المستعملة في تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد (Multiplex PCR)

اسم العدة	المكونات	الشركة وبلد المنشأ
عدة مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد	KAPA2G Fast HotStart DNA Polymerase 1U	KAPA
	KAPA2G Buffer A (1.5X at 1X)	

(South Africa)	dNTPs (0.2 mM at 1X)	KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit
	MgCl2 (3.0 mM at 1X)	
	Stabilizers	

4-5-1-3 بـادئـات الـDNA (DNA primers) : التي قامت بتجهيزها شركة (Bioneer)

نوع البادئ	تسلسل القواعد للنتروجينية ('3-'5)		حجم ناتج التضخيم	المصدر
mecA	*F	TAGAAATGACTGACGTCCG	154 bp	Santos *et al*, 1999
	**R	TTGCGATCAATGTTACCGTAG		
Tst	F	AAG CCC TTT GTT GCT TGC G	445 bp	Becker K *et al*, 1998
	R	ATC GAA CTT TGG CCC ATACTT T		
Luks	F	CAGGAGGTAATGGTTCATTT	151 bp	Al-Talib H *et al*, 2009
	R	ATGTCCAGACATTTTACCTAA		
Spa	F	ATCTGGTGGCGTAACACCTG	1150-1500 bp	Fatemeh Shakeri *et al*, 2010
	R	C GCTGCACCTAACGCTAATG		
FnbA	F	GAG CAG CAT TAT TCT TAG	270 bp	Moore N ., 2006
	R	TTT GTG GCG CTT GTA CT		
clfA	F	GGCAACAACTCAATCAAGCA	378 bp	صمم في هذه الدراسة
	R	GCTTGGTGCGGATAAACTGT		
Coa	F	AGCAGTTAAAGAAGCAGACG	593 bp	صمم في هذه الدراسة
	R	CGTTGTATTCACGGATACCT		
Eta	F	GCGGAATCTTTGCTTTCTTG	329 bp	صمم في هذه الدراسة***
	R	TCCTGCGATAGCAATACCAA		

***F: Forward البادئ الأمامي primer **R: Reverse primer البادئ العكسي**

***** تم ذكر خطوات تصميم البادئ *clfA* في ملحق (٢) كتوضيح لطريقة التصميم في الدراسة الحالية.**

5-5-1-3 العدد المستعملة في أختبار التركيز المثبط الأدنى MIC

اسم العدة	الشركة وبلد المنشأ
عدة فحص التركيز المثبط الأدنى لمضاد المثيسيلين Methicillin HiComb MIC test	Himedia (India)
عدة فحص التركيز المثبط الأدنى لمضاد الأوكزاسيلين Oxacillin HiComb MIC test	
عدة فحص التركيز المثبط الأدنى لمضاد الفانكومايسين Vancomycin HiComb MIC test	

٣-٢ طــرائـق الـعـمـل :

٣-٢-١ محاليـل الصـبغات والكواشـف Stains and reagents solutions

٣-٢-١-١ محاليل صبغة غرام Gram stain solutions

حضرت المحاليل على وفق ماذكره Benson (1998) . استعملت هذه الصبغة لمعرفة استجابة البكتريا لعملية التصبيغ عند الفحص المجهري.

٣-٢-١-٢ محلول صبغة المحفظة Capsule stain solution

حضر المحلول بإذابة ١٠ غرام من النيكروسين (أو استعمال صبغة الحبر الهندي بدل النيكروسين) في ٩٠ ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر ، وتم تسخينه إلى درجة الغليان مدة ٢٠ دقيقة ، ورشح مرتين متتاليتين ثم أضيف إليه ٠,٥ ملي لتر من الفورمالديهايد ، وحفظ في درجة حرارة ٤ °م لحين الاستعمال . استعملت هذه الصبغة للتحري عن البكتريا المنتجة للمحفظة (Stukus, 1997).

٣-٢-١-٣ كاشـــف الكتاليز Catalase reagent

حضر الكاشف آنياً بإضافة ٢١ ملي لتر من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بتركيز (٧٠%) إلى ٥٠ ملي لتر من الماء المقطر المعقم ، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر للحصول على تركيز نهائي (٣%) ، وحفظ في قنينة معقمة . استعمل هذا الكاشف للاستدلال على البكتريا المنتجة لإنزيم الكتاليز (MacFaddin, 2000).

٣-٢-١-٤ كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent

حضر الكاشف آنياً بإذابة ٠,١ غرام من رباعي المثيل- بارافنيلين ثنائي أمين ثنائي كلوريد الهيدروجين في ١٠ ملي لتر من الماء المقطر المعقم ، وحفظ في قنينة معتمة. استعمل هذا الكاشف في اختبار الأوكسيديز للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الأوكسيديز (MacFaddin, 2000).

٣-٢-١-٥ كاشف فوكس بروسكاور Voges Proskauer reagent

حضرت المحاليل بحسب ما جاء في MacFaddin (2000):

محلول (آ) الفانفثول (٥%): حضر بإذابة ٥ غرام من الفانفثول في ١٠٠ ملي لتر من الكحول الأثيلي بتركيز (٩٦%).

محلـول (ب) هيدروكسـيد البوتاسـيوم (٤٠%): حضـر بإذابـة ٤٠ غـرام مـن هيدروكسـيد البوتاسيوم في حجم من الماء المقطر ، وأكمل الحجم إلـى ١٠٠ ملـي لتر . استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز وانتاج الاستيل مثيل كاربينول في اختبار الفوكس - بروسكاور.

٣-٢-١-٦ كاشـــف محلل الدنا DNase reagent

حضر الكاشف بإضافة ٨,٤ ملي لتر من حامض الهيدروكلوريك المركز ببطء إلى ٨٠ ملي لتر من الماء المقطر ، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر من الماء المقطر للحصول على ١ مولار من HCl. استعمل هذا الكاشف للاستدلال على البكتريا المنتجة لإنزيم محلل الدنا (MacFaddin, 2000).

٣-٢-٢ المحاليل والدوارئ Solutions and buffers

٣-٢-٢-١ المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline solution

حضر المحلول بإذابة ٠,٨٥ غرام من كلوريد الصوديوم في ٩٠ ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر ، وعقم بالموصدة . استعمل هذا المحلول في أعداد اللقاح البكتيري المباشر (MacFaddin, 2000)

٣-٢-٢-٢ أنبوبة ماكفرلاند القياسية McFarland tube standard No.(0.5)

حضرت من المحاليل الآتية وبحسب ما جاء في NCCLS (2003a):

آ- محلول كلوريد الباريوم $BaCl_2$

حضر المحلول بإذابة ١,١٧٥ غرام في ٥٠ ملي لتر من الماء المقطر المعقم ، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر للحصول على تركيز ٠,٠٤٨ مول/لتر من $BaCl_2$.

ب- محلول حامض الكبريتيك H_2SO_4

حضر المحلول بإضافة ١٨ ملي لتر من حامض الكبريتيك المركز ببطء إلى ٥٠ ملي لتر من الماء المقطر المعقم ، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر للحصول على تركيز ٠,١٨ مول/لتر من H_2SO_4.

أضيف ٠,٥ ملي لتر من محلول (آ) إلى ٩٩,٥ ملي لتر من محلول (ب) وعدلت قراءة العكورة القياسية إلى (٠,٠٨-٠,١٠) عند طول موجي ٦٢٥ نانومتر وهذه القراءة تمثل ما يقارب عكورة ($1-2 \times 10^8$) [Colony forming unit (CFU)] وحدة تكوين المستعمرة في ملي لتر واحد من البكتريا النامية ، ووزع المحلول على أنابيب اختبار معقمة ذات سدادات محكمة بحجم ٤ ملي لتر لكل أنبوبة وحفظ في أماكن معتمة في درجة حرارة الغرفة ، استعملت الأنبوبة لغرض مقارنة كثافة النمو البكتيري في اللقاح المستعمل مع كثافة المحلول في الأنبوبة.

٣-٢-٢-٣ دارئ الفوسفات Phosphate buffer

يتكون هذا الدارئ من المحاليل الآتية :

المحلول الأول: حضر بإذابة ٣١,٢ غرام من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين المائية $NaH_2PO_4.2H_2O$ في حجم من الماء المقطر ، وأكمل الحجم إلى ١٠٠٠ ملي لتر من الماء المقطر المعقم للحصول على محلول بتركيز ٠,٢ مول/لتر.

المحلول الثاني: حضر بإذابة ٢٨,٣٩ غرام من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين Na_2HPO_4 في ٩٠٠ ملي لتر من الماء المقطر المعقم ، وأكمل الحجم إلى ١٠٠٠ ملي لتر للحصول على محلول بتركيز ٠,٢ مول/لتر . أخذ حجم (أ) ملي لتر من المحلول الأول ، وأضيف إلى حجم (ب) ملي لتر من المحلول الثاني للحصول على قيم pH مختلفة ، وكما هو مبين في الجدول (٣-١).

جدول (٣-١) : مكونات دارئ الفوسفات بدرجات حامضية مختلفة

pH بدرجات حامضية مختلفة	(أ) ملي لتر من المحلول الأول	(ب) ملي لتر من المحلول الثاني
6.0	12.3	87.7
7.0	61.0	39.0
7.2	72.0	28.0
7.4	81.0	19.0

استعمل هذا الدارئ في تحضير محلول بنسيلين G (Collee *et al.*, 1996) .

٣-٢-٢-4 المحاليل المستعملة في التحري عن إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز (طريقة اليود القياسية السريعة)

أ- محلول النشا الذائب: حضر آنياً بإذابة ١ غرام من النشا في ٩٠ ملي لتر من الماء المقطر ثم وضع المزيج في حمام مائي في درجة ١٠٠ °م مدة ١٠ دقائق مع الرج لإتمام الإذابة ، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر.

ب- محلول اليود: حضر بإذابة ٢,٠٣ غرام من اليود ، و ٥,٣٢ غرام من أيوديد البوتاسيوم في ٥٠ ملي لتر من الماء المقطر ، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر وحفظ في قناني معتمة في درجة ٤ °م .

ج- محلول بنسيلين G: حضر المحلول بإذابة ٠,٦ غرام من مسحوق المضاد الحيوي بنسيلينG في ٥٠ ملي لتر من دارئ الفوسفات (PH=7.2) وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر ، وعقم المحلول بالترشيح وعدل الأس الهيدروجيني إلى ٧,٢ ، وحفظ في درجة - ٢٠ °م (١٩٩٦ . (Collee *et al.*,

٣-٢-3 الأوساط الزرعية الجاهزة

٣-٢-3-١ وسط الدم الصلب Blood agar medium

حضر الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 40 غرام اغار اساس الدم (Blood agar base) في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر، ضبط الرقم الهيدروجيني الى

7.4، ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 °م لمدة 20 دقيقة وبرد الى درجة حرارة 55 °م, ثم أضيف إليه دم الإنسان بنسبة (10%) . واستعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على تحليل الدم .

٣-٢-3-٢ وسط اليوريا الصلب Urea agar

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة، باذابة Urea agar base بمقدار ٢,٣ غم في ٩٥ مل من الماء المقطر المعقم، ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة ١٢١ °م لمدة ١٥ دقيقة بعدها اضيف (٥مل) من محلول اليوريا ٢٠% (المعقم بالترشيح) بعد تبريد الوسط في الحمام المائي لدرجة (٥٠) °م ، ووزع الوسط على انابيب وضعت بشكل مائل لتتصلب (Deep slop)، استعمل للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم اليوريز .

٣-٢-3-٣ وسط الجيلاتين المغذي Nutrient gelatin medium

حضر الوسط بإذابة ١٢٠ غرام من الجيلاتين في ٨٠٠ ملي لتر من الماء المقطر ، وسخن في درجة حرارة ٥٠ °م ، وأضيف إليه ٣ غرام من خلاصة اللحم ، و ٥ غرام من الببتون ، وأكمل الحجم إلى ١٠٠٠ ملي لتر من الماء المقطر ، وأعيد تسخينه بالدرجة نفسها ، ثم عُدِّل الأس الهيدروجيني إلى ٧ ، ووزع الوسط على أنابيب اختبار ، وعقم بالموصدة ، وترك ليتصلب أفقياً وحفظ في درجة ٤ °م لحين الاستعمال . استعمل هذا الوسط للتحري عن البكتريا المنتجة لإنزيم الجيلاتينيز (MacFaddin, 2000) .

٣-٢-٣-٤ وسط مولر هنتون الصلب Muller-Hinton agar

حُضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 38 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر، وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.4، ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة ١٢١ °م ولمدة 20 دقيقة . استعمل لغرض اختبار حساسية العزلات لبعض المضادات الحيوية بطريقة انتشار القرص (Collee *et al.*, 1996) .

٣-٢-٣-٥ وسط الاغار المغذي Nutrient agar medium

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 28 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني الى ٧,٢ ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم

باستعمال المؤصدة بدرجة حرارة 121 °م لمدة 20 دقيقة ، استعمل بوصفه وسط عام للتنمية وحفظ العزلات (Collee *et al.*, 1996) .

٣-٢-٣-٦ وسط المرق المغذي Nutient broth medium

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة ، بإذابة 13 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر ضبط الرقم الهيدروجيني الـــى 7.2 ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم باستعمال المؤصدة بدرجة حرارة 121 °م لمدة 20 دقيقة. واستعمل لتنشيط العزلات وادامتها (Collee *et al.*, 1996) .

٣-٢-٣-٧ وسط مرق نقيع القلب و الدماغ Brain-Heart infusion broth

حُضر الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة ، بإذابة ٣٧غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر ثم ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.3 ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم باستعمال المؤصدة بدرجة حرارة 121 °م لمدة 20 دقيقة ، استعمل لتنشيط العزلات (MacFaddin, 2000) .

٣-٢-٣- ٨ وسط الحفظ طويل الأمد Maintenance medium

حضر الوسط بإضافة (١٥%) من الكليسيرول إلى الوسط المغذي السائل المحضر بإذابة ٤ غرام من الوسط في ٥٠ ملي لتر من الماء المقطر ، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر ، وعقم بالموصدة ، وترك ليبرد في درجة حرارة ٥٦ م باستعمال الحمام المائي ، ووزع على أنابيب اختبار معقمة وذات سدادات محكمة وحفظ في ٤ °م لحين الاستعمال . استعمل هذا الوسط لحفظ البكتريا المعزولة والمشخصة لعدة أشهر في درجة حرارة - ٢٠ °م (NCCLS, 2003a) .

٣-٢-٣- ٩ وسط Staphylococcus Medium No. 110

حُضر الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة ، بإذابة 150 غرام من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر وعقم باستعمال المؤصدة بدرجة حرارة 121 °م لمدة 15 دقيقة ، أستعمل كوسط أختياري لعزل المكورات العنقودية الممرضة .

10-3-2-3 وسط كروم أكار CHROMagar MRSA

حُضر الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة ، بإذابة 82 غرام من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر

بالتسخين بوساطة المسخن الحراري (Hot Plate) وترك ليبرد في درجة حرارة 45-50 °م بعدها أضيف اليه 1 مل/لتر من مادة rehydrated CHROMagar MRSA supplement , أستعمل كوسط أختياري للتحري عن عزلات المكورات العنقودية المقاومة لمضاد المثيسيلين Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA)

٣-٢-٤ طرائق التعقيم Sterilization methods

عقمت جميع الأوساط الزرعية الجاهزة ، والتركيبية ، وأغلب المحاليل المستعملة التي لاتتأثر بالحرارة بجهاز الموصدة عند درجة حرارة ١٢١ °م وتحت ضغط ١٥ باوند / انج ٢ مدة ١٥ دقيقة ، أما الزجاجيات فقد تم تعقيمها بالفرن الكهربائي عند درجة حرارة ١٦٨ °م مدة ساعتين ، كما عقمت جميع محاليل المضادات الحيوية وبعض المحاليل التي تتأثر بالحرارة مثل السكريات باستعمال مرشحات غشائية ذات فتحات دقيقة (0.22µm) (Ryan and Ray, 2004; MacFaddin, 2000) .

٣-٢-٥ جمع العينات Samples collection

تم جمع ١٧3 عينة من مستشفيات ومراكز صحية في مدينة الديوانية وهي (مستشفى النسائية والأطفال ، مستشفى الديوانية التعليمي العام , ومختبر الصحة العامة) للمدة من تشرين الثاني ٢٠١١ إلى نيسان ٢٠١٢ , حيث شملت الدراسة عينات سريرية مختلفة ، تم جمعها من

مناطق مختلفة من الجسم للمرضى الراقدين ولجميع الأعمار ولكلا الجنسين ، أذ أخذت (١٣) عينة من الإدرار و(9) من الأذن و(50) من الخراج و(49) من الجروح و(52) من الحروق .

٣-٢-٦ العزل والتشخيص Isolation and identification

نقلت المسحات والعينات مباشرة إلى المختبر ، وتم زرعها في وسط نقيع القلب-الدماغ الصلب ووسط الدم الصلب ووسط المانيتول الملحي الصلب ، وحضنت المستنبتات في ظروف هوائية وفي درجة حرارة ٣٧ °م ، ومدة ٢٤ ساعة.

شخصت *S. aureus* المعزولة ، بالاعتماد على كل من Holt وجماعته (١٩٩٤) Collee وجماعته (1996) و MacFaddin (2000) لتشخيص بعض الصفات الزرعية والمجهرية ، والكيموحيوية وعلى وفق الأسس الآتية :

آ- الصفات الزرعية Cultural characters

أعتمد على الصفات الزرعية للمستعمرات النامية على وسط ستاف 110 Staphylococcus No. ووسط المانيتول الملحي Mannitol salt agar من حيث لون المستعمرات وشكلها ، وحجمها ، ونوع حافاتها وارتفاعها ، فضلا عن التغير في لون الوسط .

ب- الصفات المجهرية Microscopical characters

تم عمل مسحات من المستعمرات الفتية النامية على الوسط التفريقي (وسط المانيتول الملحي الصلب) وصبغت بصبغة غرام المحضرة في الفقرة (٣-٢-١-١) ، وفحصت تحت العدسة الزيتية للمجهر ، لملاحظة شكل الخلايا ، وحجمها ، وترتيبها ، وتفاعلها مع الصبغة .

ج- الصفات الكيموحيوية Biochemical characters

تم التحري عن بعض الصفات الكيموحيوية من خلال إجراء بعض الاختبارات الكيموحيوية .

3-٢-٧ الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

٣-٢-٧-١ اختبار الكتاليز Catalase test

نقل جزء من مستعمرة فتية بعمر ٢٤ ساعة بوساطة ناقل زرعي إلى شريحة زجاجية نظيفة وتم إضافة قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بتركيز(٣%) . تكون النتيجة موجبة بظهور فقاعات من غاز الأوكسجين (MacFaddin, 2000) .

٣-٢-٧-٢ اختبار الأوكسيديز Oxidase test

نقل جزء من مستعمرة فتية بعمر ٢٤ ساعة بوساطة عود خشبي معقم إلى ورقة ترشيح مشبعة بكاشف الأوكسيديز. أن تكون اللون الأزرق خلال ١٠ ثوان دليل على ايجابية الاختبار (MacFaddin, 2000).

٣-٢-٧-٣ اختبار إنتاج مخثر البلازما Coagulase test

تم التحري عن إنزيم مخثر البلازما بالاعتماد على طريقة أنبوبة الاختبار (Tube Test)، إذ تم إضافة ٠,٥ ملي لتر من بلازما دم الإنسان غير المخفف إلى أنابيب اختبار حاوية على ٠,٥ ملي لتر من وسط تربتون الصويا السائل الملقحة بالعزلات البكتيرية المراد التحري عنها وحضنت أنابيب الاختبار في حمام مائي في درجة حرارة ٣٧ °م مدة أربع ساعات ، تم خلالها مراقبة تكون الخثرة لكونها دليلاً على ايجابية الفحص ، أما الأنابيب التي لم تظهر استجابة للاختبار تركت في الحاضنة مدة ٢٤ ساعة وفي درجة حرارة ٣٥ °م للتأكد من النتائج (MacFaddin, 2000) .

٣-٢-٧-٤ اختبار عامل التكتل Clumping factor test

تم التحري عن إنزيم مخثر البلازما المرتبط (Bound coagulase) بإتباع طريقة الشريحة الزجاجية (Slide Test) ، إذ وضعت قطرتان من البلازما على جانبي الشريحة الزجاجية وأضيف إلى إحداهما مليء ناقل من وسط تربتون الصويا السائل الملقح بمستعمرة فتية بعمر (١٨-٢٤) ساعة ، بينما أضيف إلى الأخرى قطرة من الماء المقطر لغرض المقارنة (سيطرة سالبة) ، ومزجت المكونات بعناية للحصول على معلق متجانس تعد النتيجة موجبة عند حدوث خثرة مميزة خلال (٥-٢٠) ثانية (MacFaddin, 2000).

٣-٢-٧-٥ اختبار إنتاج إنزيم محلل الدنا DNase test

لقح وسط محلل الدنا الصلب DNase agar بنقل جزء من مستعمرة فتية بعمر (١٨-٢٤) ساعة بلقاح على شكل بقع ، وحضنت الأطباق في درجة حرارة ٣٥ °م لمدة ٢٤ ساعة. أن تكون منطقة شفافة حول بقعة التلقيح بعد تغطية الطبق بكاشف محلل الدنا (HCl بتركيز ١ مولار) المحضر في الفقرة (٣-٢-١-٦) دليل على إيجابية الاختبار (MacFaddin, 2000) .

٣-٢-٧-٦ اختبار الفوكس- بروسكاور Voges Proskauer test

لقح وسط MR/VP السائل ببكتريا حديثة النمو بعمر (١٨-٢٤) ساعة المراد اختبارها وبعد مدة ٢٤ ساعة حضانة ، تم إضافة ٠,٦ ملي لتر من كاشف الفانفثول و ٠,٢ ملي لتر من كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم . أن تغير لون الوسط إلى الأحمر بعد مرور ١٥ دقيقة دلالة على التحلل الجزئي للسكر وإنتاج مركب الأستيل مثيل كاربينول (MacFaddin, 2000) .

٣-٢-٧-٧ اختبار إنتاج إنزيم الجيلاتينيز Gelatinase test

طعنت الأنابيب الحاوية على وسط الجيلاتين المغذي بعمق (٠,٥-١) أنج بمستعمرة فتية بعمر (١٨-٢٤) ساعة من البكتريا المراد اختبارها وحضنت الأنابيب في درجة حـــرارة ٣٥ °م مابين يوم واحد إلى أربعة عشر يوماً ، وفحصت الأنابيب يومياً بوضعها في حمام ثلجي لمدة ساعتين . أن تميؤ الجيلاتين ، وعدم تجمده يعد نتيجة موجبة (MacFaddin, 2000) .

٣-٢-٧-٨ اختبار تحلل الدم Haemolysins test

لقح وسط الدم الصلب ببكتريا المراد فحصها (١٨-٢٤) ساعة ، ثم حضنت الأطباق في درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة . إن ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات دلالة على قدرة البكتريا على تحليل الدم (Collee *et al.*, 1996) .

٣-٢-٧-٩ اختبار إنتاج إنزيم اليوريز Urease test

تم تلقيح وسط اليوريا الصلب بمستعمرة فتية (١٨-٢٤) ساعة من البكتريا المراد فحصها وحضنت في درجة حرارة ٣٥ °م لمدة (٢٤-٤٨) ساعة . أن تغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي يعد نتيجة موجبة (MacFaddin, 2000) .

3-2-7-10 اختبار التحري عن المحفظة Capsule

اتبعت طريقة المسحة الرطبة اوالتصبيغ السالب (Negative staining) ، إذ تم إضافة قطرة من صبغة النيكروسين او الحبر الهندي على شريحة زجاجية معقمة ، وأخذ مليء ناقل من مزروع بكتيري فتي بعمر(١٨-٢٤) ساعة النامي في وسط نقيع القلب- الدماغ الصلب ، ومزج المزروع مع الصبغة مزجاً جيداً ، تم تغطية العينة بغطاء الشريحة الزجاجية ، وتم فحص

الشريحة تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي . أن وجود هالة شفافة غير مصطبغة حول الخلية البكتيرية يعد دليلاً على وجود المحفظة (Stukus, 1997) .

٣-٢-٨ حفظ وإدامة العزلات البكتيرية Preservation and maintenance of bacterial isolates

٣-٢-٨-١ الحفظ قصير الأمد Short period incubation

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتريا المراد حفظها وحضنت في درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة ، ثم حفظت في درجة ٤ °م ، وكررت عملية الحفظ لتجديد حيوية العزلات ، وتجنب حدوث التلوث (Collee *et al.*, 1996) .

٣-٢-٨-٢ الحفظ طويل الأمد Long period incubation

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي السائل المدعم بالكليسيرول بتركيز(١٥%) بالبكتريا قيد الدراسة ، وحفظت في درجة -٢٠ °م (Collee *et al.*, 1996) .

٣-٢-٩ التحري عن قدرة *S. aureus* على إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز (طريقة اليود القياسية السريعة)

اختبرت قابلية العزلات البكتيرية على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز باستخدام طريقة اليود القياسية وفقاً لـ (Colle *et al.*, 1996) إذ تم استعمال المحاليل المذكورة في الفقرة (٣-٢-٢-٤) ، بإتباع الخطوات الآتية :

أ- تم نقل عدد من المستعمرات حديثة النمو بعمر (١٨-٢٤) ساعة النامية على وسط نقيع القلب-الدماغ بوساطة العيدان الخشبية المعقمة إلى صفيحة التخافيف الدقيقة الحاوية على ١٠٠ مايكروليتر من محلول بنسيلين G في كل حفرة من حفر الصفيحة ، ومزجت مزجاً جيداً وحضنت في درجة ٣٧ °م لمدة ٣٠ دقيقة.

ب- إضافة ٥٠ مايكروليتر من محلول النشا ، ومزجت بوساطة العيدان الخشبية.

ج- إضافة ٢٠ مايكروليتر من محلول اليود ، ومزج جيداً بالعيدان ، لضمان تجانس المحتويات.

ان تكون اللون الأزرق يحصل نتيجة لتفاعل اليود مع النشا وأن التغير اللوني السريع من اللون الأزرق إلى الأبيض خلال ٥ دقائق يعد نتيجة موجبة.

٣-٢-١٠ التحري عن مقاومة *S.aureus* للمضادات الحيوية (طريقة الانتشار بالقرص)

اجري اختبار الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بالاعتماد على طريقة (Bauer *et al.*, 1966; Forbes *et al.*, 2007;CLSI, 2010) وذلك بنقل ٤ -٥ مستعمرات نقية باستعمال عروة الناقل الحلقي إلى أنابيب اختبار حاوية على ٥ مليليتر من الوسط المغذي السائل، وحضنت الانابيب بدرجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢-٨ ساعة او لحين ظهور العكورة عندها تم مقارنة الأنابيب مع أنبوبة ماكفرلاند القياسية (٠,٥) المحضرة في الفقرة (3-٢-٢-٢) باستعمال المحلول الملحي الفسيولوجي المعقم حيث تم تعديل كثافة الانابيب حتى تساوى كثافة أنبوبة ماكفرلاند و باستعمال مسحة قطنية معقمة نشرت البكتريا بطريقة التخطيط لاكثر من مرتين وباتجاهات مختلفة لغرض التاكد من نشر البكتريا المراد اختبار حساسيتها على وسط غراء مولر هنتون بالتساوي و تركت الاطباق لمدة ١٥ دقيقة في درجة حرارة الغرفة لضمان امتصاص الرطوبة عندها وزعت أقراص المضادات الحيوية بواقع ٧ أقراص للطبق الواحد و بوساطة ملقط معقم وضعت الاقراص على وسط غراء مولر هنتون وحضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة. ثم قرأت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط باستعمال الفيرنيا (Caliper) و مقارنتها بالجداول القياسية المحددة من قبل (CLSI, 2010) لتحديد البكتريا المقاومة او الحساسة .

3-2-11 التحري عن *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA

تم التحري عن البكتريا المقاومة للمثيسيلين بعدة طرائق وهي كالاتي :

3-2-11-١ طريقة أقراص فحص الحساسية

تتضمن استعمال أقراص مضاد الأوكزاسيلين ومضاد السيفوكسيتين بطريقة الانتشار بالقرص (disk diffusion method) (Bauer *et al.*, 1966) وذلك بتلقيح وسط MHA بالبكتريا المراد اختبارها بطرقة النشر ثم يوضع قرصي مضاد الأوكزاسيلين و السيفوكسيتين وتحضن الاطباق بدرجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة . ثم قيست أقطار منطقة التثبيط وقورنت مع القيم القياسية المذكورة في (CLSI, 2010) .

3-2-11-2 طريقة التركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية

أستعمل فحص HiComb MIC test لهذا الغرض وطبقا لطريقة Bryskier و Lorian (2005) وكما يلي :

1- تحضير عالق قياسي من البكتريا مساوي لعكورة انبوبة ماكفرلاند القياسية (0.5) .

2- لقحت أطباق وسط مولر هنتون Muller-Hinton agar(MHA) بالعالق بطريقة التخطيط لاكثر من مرتين وباتجاهات مختلفة و تركت الاطباق لمدة ٥-١٥ دقيقة .

3- وضع شريط MIC الحاوي على تراكيز متدرجة من المضاد على سطح وسط مولر هنتون وحضنت الأطباق في درجة 37 °م لمدة 18-٢٤ ساعة .

4- سجلت النتائج وقورنت مع القيم المثبتة في CLSI (2011) .

3-2-11-3 وسط كروم أكار CHROMagar MRSA

تم التحري عن عزلات بكتريا *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين (MRSA) بأستعمال طريقة التخطيط على الوسط الزرعي كروم أكار CHROMagar MRSA المجهز من شركة CHROMagar الفرنسية والمحضر في الفقرة (3-2-3-10) والذي يعدّ وسطاً أختيارياً لعزل وتفريق سلالات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين (MRSA) بالأعتماد على اللون .

3-2-١2 استخلاص الحامض النووي البكتيري

(Genomic DNA extraction)

تم استخلاص الحمض النووي (DNA) من بكتريا *S. aureus* وذلك بأستعمال العدة الجاهزة وبحسب تعليمات الشركة المجهزة وكآلاتي :

1- نقل 1مل من عالق كل عزلة من جرثومة *S. aureus* النامية على وسط مرق نقيع القلب والدماغ ووضعت في انابيب ابندروف معقمة قياس 1.5مل وبعدها نقلت الى جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 15000 دورة / دقيقة وذلك لجمع الخلايا البكتيرية ثم التخلص من السائل الطافي .

2- أضيف 200 ميكروليترمن محلول أنزيم الليسوزايم Lysozyme (20mg/ml) buffer الى الراسب البكتيري , بعدها مزج الخليط بوساطة المازج vortex لمدة 5 ثواني .

3- حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق وخلال فترة الحضن تم تقليب الأنابيب لضمان تحليل كامل للخلايا في المزيج .

4- أضيف 200 ميكروليتر من محلول GB Buffer المجهز مع العدة الى مزيج الخلايا المتحللة ومزج جيدا بوساطة المازج vortex لمدة 5 ثواني .

5- حضن المزيج بدرجة حرارة 70 مْ لمدة 10 دقائق باستخدام الحمام المائي .

6- أضيف 200 ميكروليتر من الكحول الأثيلي المطلق الى المزيج المتحلل ومزج الخليط جيدا" بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثواني .

7- نقل الخليط من أنبوبة الابندروف الى انابيب جمع (collection tubes) قياس 2 مل الحاوية على أعمدة تحوي مرشحات لتنقية الحمض النووي (GD filter) column والمجهزة مع العدة.

8- وضعت انابيب الجمع مع الأعمدة الحاوية على الخليط في جهاز الطرد المركزي المبرد ودورت بسرعة 15000دورة / دقيقة للتخلص من نواتج الخلايا المتحللة .

9- تم التخلص من المحلول الراسب للخلايا المتحللة ونقل الـ (GD column) الحاوي على الحمض النووي الى أنبوبة جمع collection tube جديدة .

10- أضيف 400 ميكروليتر من محلول W1 Buffer المجهز مع العدة الى العمود الحاوي على الحامض النووي لغسل الحمض النووي بعدها وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 دورة لمدة 30 ثانية.

11- تم التخلص من الراسب ومن ثم أضيف 600 ميكروليتر من محلول الغسل الحاوي على الكحول الاثيلي المطلق Wash buffer المجهزة مع العدة الى العمود الحاوي على الحمض النووي للتخلص من الدهون ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 دورة لمدة 30 ثانية .

12- تم التخلص من الراسب وإعادة الأنابيب الى جهاز الطرد المركزي المبرد مرة ثانية لتجفيف الأعمدة بسرعة 15000 دورة لمدة 3 دقائق .

13- نقلت الأعمدة الحاوية على الحمض النووي الى انابيب ابندروف معقمة مع إضافة 100 ميكروليتر من محلول الإذابة Elution Buffer المجهز مع العدة الى وسط العمود وترك لمدة 5 دقائق وبعدها وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 15000 دورة لمدة 30 ثانية لأذابة الحمض النووي وحفظ في درجة حرارة (-20)مْ لحين أجراء فحص تفاعل إنزيم البلمرة الـ PCR .

٣-٢-13 تحضير هلام الأكاروز

حضر بحسب طريقة (Sambrook *et al* .,1989) وكالأتي :

1- أذيب 1.5 غم من هلام الأكاروز Agarose gel في 100 مل من محلول الـ TBE buffer الدارئ بتركيز (1X) وباستعمال الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة 15 دقيقة.

2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50 مْ وبعدها تم إضافة (3) مايكروليتر من صبغة الحامض النووي المشعة Ethidium bromide ومزجت جيداً مع الهلام .

3- صب هلام الأكاروز في قالب الترحيل (Tray) المثبت عليه المشط (Comb) وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ثم إزالة المشط من الهلام بعناية للحفاظ على الحفر Wells.

٣-٢-14 تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد PCR master mix Single

حضرمزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد بأُستعمال عدة AccuPower® PCR PreMix وبحسب تعليمات الشركة المجهزة كألاتي :

1- حضر مزيج تفاعل إنزيم البلمرة في انابيب (**PCR**) المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل إنزيم البلمرة مع إضافة المكونات الأخرى لمزيج التفاعل كما في جدول (**2-3**)

الجدول (3-2): مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد PCR master Single mix

PCR master mix	Volume
DNA template	٥ µL

Primer	Forward primer	1.5µL
	Reverse primer	1.5µL
PCR water		١٢ µL
Total		**٢٠ µL**

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

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

15-2-3 تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR master mix

حضرمزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد بأستعمال عدة KAPA2G Fast Multiplex PCR Kit وبحسب تعليمات الشركة المجهزة وكما موضح في الجدول (3-3)

الجدول (3-3) : مكونات وحجوم مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد PCR master Multiplex mix

PCR master mix	Volume

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

* nuclease free water الذي يستكمل حجمه حسب عدد البرايمرات المستعملة .

3-2-16 برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـ DNA

أجري تفاعل إنزيم البلمرة بأستخدام المضخّم الحراري لجهاز الـ (Thermocycler PCR). وتم برمجة الجهاز للجينات قيد الدراسة حسب التفاعل , وكما مبين في جدول (3-4) وجدول (3-5) .

جدول (3-4) : برنامج الدورات الحرارية لتفاعل إنزيم البلمرة المفرد Single PCR

Temperature (˚C)/Time					Gene
Final extension	Cycling condition			Initial denaturation	
	extension	annealing	denaturation		

2/5 min	72/10 sec	55/30 sec	95/30 sec	95/2 min	***mecA***
2/5 min	72/2 min	59/30 sec	95/30 sec	95/2 min	***spa***
2/5 min	72/40 sec	56/30 sec	95/30 sec	95/2 min	***clfA***
2/5 min	72/1 min	55/30 sec	95/30 sec	95/2 min	***coa***
2/5 min	72/10 sec	50/30 sec	95/30 sec	95/2 min	***fnbA***
2/5 min	72/20 sec	52/30 sec	95/30 sec	95/2 min	***luks***
2/5 min	72/40 sec	55/30 sec	95/30 sec	95/2 min	***eta***
2/5 min	72/50 sec	56/30 sec	95/30 sec	95/2 min	***tst***

جدول (3-5) : برنامج الدورات الحرارية لتفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR

Cycle No.	**Temperature (˚C)/Time**					**Gene**
	Final extension	**Cycling condition**			**Initial denaturation**	
		extension	**annealing**	**denaturatin**		
30	72/5 min	72/20 sec	52/30 sec	95/30 sec	95/2 min	***fnbA luks***
30	72/5 min	72/30 sec	55/30 sec	95/15 sec	95/3 min	***mecA spa clfA***
30	72/10 min	72/30 sec	56/30 sec or 57/30 sec	95/15 sec	95/3 min	***coa spa eta tst mecA***

٣-٢-17 الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز gel electrophoresis Agarose

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

3-2-18 تصميم البادئات Primer design

تم تطوير العديد من البرامج (Software) لتصميم البادئات (Oligonucleotides) بعد فترة قصيرة من أكتشاف تقنية الـ PCR , ولقد تم الأستعانة ببرنامج Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007) في الدراسة الحالية لتصميم ثلاث بادئات متخصصة ومسؤولة عن أنتاج عوامل ضراوة في بكتريا الـ *S. aureus* وذلك لتوفير ظروف ملائمة للتفاعل عند أستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد Multiplex PCR .

صممت البادئات *clfA* و *coa* و *eta* في الدراسة الحالية عن طريق الحصول على التسلسل الجيني لكل بادئ من بنك الجينات GenBank الموجود في الموقع الالكتروني www.ncbi.nlm.nih.gov ثم ادخل هذا التسلسل الجيني في برنامج الـ Primer3Plus والذي يوجد على الموقع الالكتروني www.bioinformatics.nl اذ ضبطت الاعدادات الملائمة لكل بادئ مثل درجة حرارة الارتباط Annealing Temperature ونسبة G+C وحجم ناتج التضخيم Product size وحسب الحاجة واخيرا اختير البادئ الذي يعتقد بانه هو المناسب بعد التأكد من برنامج الدورات الحرارية لكل بادئ مصمم والبادئات الاخرى الجاهزة وذلك عن طريق برنامج Optimase Protocol Writer المبين في ملحق رقم (٥) . ولقد تم ذكر خطوات تصميم البادئ *clfA* في الدراسة الحالية كما مبين في ملحق رقم (2) .

3-2-١٩ التحليل الإحصائي : Statistical Analysis

كل النتائج حللت أحصائياً بأستخدام اختبار مربع كاي ($\mathbf{X^2}$) chi-square واختبار الـ **LSD** عند مستوى احتمالية $P<0.05$ (الراوي , ٢٠٠٠) .

الاستنتاجات Conclusions :

١. انتشار السلالات المقاومة للمثيسلين MRSA بشكل متزايد داخل المستشفيات من بين بكتريا العنقوديات الذهبية المسببة لعدوى المستشفيات .

٢. لسلالات MRSA مقاومة عالية للمضادات الحيوية وخصوصاً مضادات البيتالاكتام مقارنة بالسلالات الحساسة للمثيسلين MSSA .

٣. أن اختبار HiComb MIC test لقياس التركيز المثبط الأدنى ذو كفاءة عالية نسبيا لفحص الحساسية للمضادات الحيوية ويمكن اعتماده مستقبلا .

٤. أظهرت طريقة التخطيط على الوسط الزرعي CHROMagar MRSA نتائج مقاربة لنتائج تقنية الـ PCR اذ تميزت بالسرعة والدقة العالية في التشخيص .

٥. تقنية الـ Multiplex PCR طريقة مميزة من حيث السرعة وتقليل الوقت في اعطاء النتائج الخاصة بجينات عوامل الضراوة مقارنة باستعمال تقنية الـ Single PCR .

٦. أظهرت الدراسة انتشار الجينات *luks* و *eta* بنسبة أعلى من جين *tst* بالنسبة للجينات المشفرة لأنتاج الذيفانات في عزلات الـ MRSA .

التوصيات Recommendations :

١. ضرورة اعتماد فحص الحساسية الدوائية للتحري عن عزلات MRSA في مختبرات مستشفيات مدينة الديوانية .

٢. استعمال (Vancomycin, Ciprofloxacin, Imipenem) كخيار علاجي للأخماج الناتجة عن بكتريا *S. aureus* وسلالة الـ MRSA بعد اجراء تجارب اضافية لهذا الغرض .

٣. ضرورة اعتماد طريقة التخطيط على الوسط الزرعي CHROMagar MRSA في العمل المختبري وذلك لسهولة الأستعمال والسرعة في اعطاء النتائج .

٤. ضرورة استعمال تقنية الـ Multiplex PCR عند التحري عن أكثر من جين (جينات متعددة موجودة في نفس النوع او السلالة البكتيرية) مسؤولة عن عامل ضراوة او مقاومة لمضاد حيوي معين .

٥. استعمال تقنية تصميم البادئات Primer design واعتمادها في الأبحاث كونها ذات نتائج موثوقة وتوفيرها لظروف مثالية للبادئات المصممة المستعملة في تقنية الـ PCR وخصوصاً تقنية الـ Multiplex PCR .

٦. استعمال تقنية Real-Time PCR للتحري عن جينات المسؤولة عن عوامل الضراوة في بكتريا الـ MRSA وخصوصا الذيفانات PVL,ETA,TST لمعرفة تعبيرها الجيني .

المصادر العربية :

- **حموشي , رواء محمود داؤد** (٢٠٠٤) . التأثير التثبيطي لعدد من النباتات الطبية على جرثومة *Staphylococcus aureus* المعزولة من أخماج جلدية مختلفة . رسالة ماجستير. كلية التربية . جامعة الموصل .
- **الخضيري , ميعاد كاظم علي** (٢٠٠٨) . دراسة بكتريولوجية ووراثية للمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين المعزولة من مستشفيات مدينة النجف . رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات . جامعة الكوفة .
- **الراوي، خاشع محمود** (٢٠٠٠) . مدخل الى الاحصاء الحياتي . الطبعة الاولى جامعة بغداد .
- **زيدان , إسراء علي** (2007) . دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من عينات سريرية مختلفة ومقاومة لمضاد الفانكومايسين . رسالة ماجستير. كلية العلوم . جامعة بغداد .

المصادر الأجنبية :

- **Akpaka, E. P., Monecke, S., Swanston, H. W., Rao, A. V. and Schulz, R.** (2011) . Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin toxin in Trinidad and Tobago: a case report. J. Med. Case Reports, 5: 157 .
- **Albert , J. Guidry .** (2000) . Promising new Mastitis Vaccines , Agricaltural Research Magazine .
- **Albus,A.; Fournier,J.M.; Molz,C.; Bontonnier,A.; Rank,M.; Hoiby, N.; Hochkeppel , H. ;and Doring,G.** (1988). *Staphylococcus aureus* capsular types and antibody response to lung infection in patients with cystic fibrosis .J.Clin.Microbiol., **26**:2505-2509.
- **Al-Fu'adi, A.H.H.** (2010). Phenotypic and Genotypic (*mecA* gene) of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates in

Dewaniya City . M.Sc thesis. Babylon university . College of medicine .

- **Al-Geobory, H.A.** (2011). Comparative study between Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), and detect the antimicrobial effects of some plant extracts on them.MSc thesis. College of Science .University of Baghdad .

- **Al-Ghazi, Z., Z.** (1998) . Hemolytic Activity of *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Clinical Samples and its Resistance to Antibiotics .M.Sc thesis . College of Education . Thi-Qar University .
- **Al-Hasseny, R.J.H.**(2011).Evaluation of Efficacy of Selected Antibacterials in Growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Wounds and Burns Infection in Hilla city *An In vitro* and *In vivo* Study.M.Sc thesis. College of Medicine. University of Babylon.

- **Al-hassnawi, H.H.** (2012) . Molecular Characterization of Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Clinical Cases in Babylon Province . PhD. thesis. College of Medicine.University of Babylon.
- **Al-Mohana, A. M., Al-Kudhieri, M. K., Al-Charrakh, A.H.**(2012). Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying *mecA* and Panton-Valentine leukocidin *PVL* Genes That Isolated From Holy shrine In Najaf , Iraq. J.Bacteriol.Res.June (in press) .
- **Al-Rawahi, G. N.; Schreader, A. G.; Porter, S. D.; Roscoe, D. L.; Gustafson, R.; and Bryce, E. A.** (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage among injection drug users: six

years later. J. Clin. Microbiol. **46**: 477-479.

- **Al-Talib H., Yean C.Y., Al-Khateeb A., Hassan H., Singh K.K., Al-Jashamy K., Ravichandran M.**(2009). A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Panton-Valentine Leucocidin. BMC Microbiology, 9 :113.
- **Al-Yasseen, A. K. N.** (2004). Bacteriological and genetic study to evaluated the relationship between hospital effluent and distribution of multiple antibiotic resistant bacteria. PhD. Thesis. College of Science. Babylon University.
- **Amagai, M., N. Matsuyoshi, Z. H. Wang, C. Andl, and J. R. Stanley.** (2000) . Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. Nat. Med. **6:**1275-1277.
- **Ana , M .; Kellie, S .; Elena , L .; Jrina , M .; Dudley , K . and Steven , C . L .** (2002) . The low density Lipoprotein receptor Related protein mediates fibronectin Accumulation on cell surfaces J. Biol . chem . **277** : 1660 – 1666 .
- **Archer , G . and Niemeyer , D .** (1994) . Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in *Staphylococci* Trends . Microb . **2** : 343 - 347 .
- **Atshan, S.S., Shamsudin, M.N., Lung, L.T.T., Sekawi, Z., Ghaznavi-Rad ,E., and Pei,C.P.**(2012) . Comparative Characterisation of Genotypically Different Clones of MRSA in the Production of Biofilms . J. Biomed Biotechnol. Infect Immun .**70**:4987-4996.
- **Baba, T.; Takeuchi, F.; and Kuroda, M.** (2002). Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. **359**: 1819-1827.
- **Baba-Moussa L, Anani L, Scheftel JM, Couturier M, Haikou N,**

Hounsou F, Monteil H, Sanni A, Prevost G (2008) . Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections, J.Hosp. Infect. (968): 32-38.

- **Baba-Moussa L., Ahissou, H., Azokpota, P., Assogba, B., Atindehou, M. M., Anagonou, S.** (2009). Toxins and adhesion factors associated with *Staphylococcus aureus* strains isolated from diarrhoeal patients in Benin. Afri. J. Biotech. **9**(5): 604-611.
- **Bannerman, T. L.** (2003). Staphylococci, micrococci and other catalase-positive cocci that grow aerobically. eds. Manual of Clinical Microbiology, 8th edn. Washington: American society for microbiol. Press. 384-404.
- **Barada K, Hanaki H and Ikeda S.** (2007). Trends in gentamicin and arbekacin susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the genes encoding aminoglycoside modifying enzymes. J . Infect. Dis. Chem, **13**:74-78.
- **Barry, A. S.** (2001). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canada progress, priorities and plans. J. Clin. Microbiol. **21**: 122-127.
- **Bauer, A.W.; Kirby,W.A.M.; Sherris,J.S. and Turk,M.** (1966) . Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method . Am.J.Clin.Pathol. **45**: 493-496
- **Beck , W .; Berger , B . and Kayser , F .** (1986) . Additional DNA in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and molecular cloning of mec specific DNA . J. Bact . **165** : 373 - 378 .
- **Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, et al.** (2003) . Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal

specimens. J Clin Microbiol . **41**:1434-1439.

- **Becker K., Roth R., Peters G.** (1998) . Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. J Clin Microbiol. **36**(9):2548-53.
- **Benson, H. J.** (1998) . Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology, 7th edition, McGraw-Hill Companies.
- **Berg, K. D., Glaser, C. L. and Thompson, R. E.** (2000) . Detection of microsattelite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction. J . molec. Diagnostics, **2**: 20-28 .
- **Bhalakia,N.**(2005). Isolation and plasmid analysis of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*.J. Youn. Investi . **13** (10) : 1-5.
- **Booth,M.C.; Pence,L.M.; Mahasreshti,P.; and Gilmore,M. S.** (2001) . Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection . Infect.Immun. **69** : 345 - 352.
- **Boyle-Vavra and S., Daum, R. S.** (2007) . community-Acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : The role of Panton-Valentine Leukocidine. Laboratoey Investigation. **87**(1) : 3-9.
- **Boynukara, B.; Gulhan, T.; Gurturk, K.; Alisarli, M.; and Ogun, E.** (2007). Evolution of slime production by coagulase-negative staphylococci and enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from various human clinical specimens. J. Med. Microbiol. **56**: 1296-1300.
- **Brasel, K.J. and J.A. Weigelt.** (2007) . Community-Acquired MRSA as a Pathogen.P.43-54. In, J.A. Weigelt (ed.). MRSA. Informa Healthcare, New York.

- **Bratu, S.; Eramo, A.; Kopec, R.; Coughlin, E.; Ghitan, M.; and Yost, R.** (2003). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital nursery and maternity units. J. Clin. Microbiol. **45**: 56-67.
- **Brook ,G ,F.; Butel, J, S.; and Morse,S ,A.**(2001).Medical microbiology lange medical brook Mcgraw-hill.tewenty-second edition pp 197-202.
- **Brooks, G. F.; Carroll, K. C., and Morse, S. A. (Jawetz),** (2007). Melnick and Adelberg`s, Medical microbiology. 24th edition. The McGraw-Hill. New York.
- **Bro oks, G.F., Butel, J.S. & Morse. S.A.** (1998). Jawetz, Melinck and Adelberg's Medical Microbiology .21sted. Appleton and lange, Asimon and Schuster Co., California.
- **Brown, D. F.** (2001). Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. J. Antimicrob. Chemother. **48** (1): 65-70.
- **Brown, D. F. J.; Edwards, D. I.; Hawkey, P. M.; Morrison, D.; Ridgway, G. L.; Towner, K. J. M.; and Wren, W. D.** (2005). Behalf of the joint working party of the britis guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. **56** (6): 1000-1018.
- **Bryskier A., Antimicrobial.** 2005, ASM Press, USA
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** (2001). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin of soft tissue infections in a state prison-Mississippi, 2000. Morb. Mortal. Wkly. Rep. **50**: 919-922.

- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** (2007). Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-Minnesota and North Dakota, 1997-1999. MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 1999. **48** (32): 707-710.

- **Cesur S, Yildiz E, Irmak H, Aygün Z, Karakoç E, Kinikli S, Demiröz AP.** (2010). Evaluation of oxacillin resistance screening agar and chromogenic MRSA agar media for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Mikrobiyol Bul. **44**(2):279-284.

- **Chakraborty,S.P.,Mahapatra, S.K.,Bal, M.and Roy, S.**(2011).Isolation and Identification of Vancomycin Resistance *Staphylococcus aureus* from post operative pus samples.Al-Ameen J. Med. Sci. **4**(2):152-168.

- **Chambers , H .** (1997) . Methicillin resistance Staphylococci : molecular and biochemical basis and clinical implications . Clin . Micro . Rev .**10** : 781 – 791 .

- **Chambers, H. F .** (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*.J.Infect.Dis. **7** (2) : 178 – 182.

- **Chambers, H. F.; and Neu, H. C. (**1995). Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, N.Y. **1**: 233-246.

- **Changs , S .; Sievert, D. M.; Hageman, J. C.; Boulton, M.L.; Tenover, F.C.; Downes, F. P.; Shah,**

S.; Raudrik, J.T.; Pupp ,G.R.; Brown ,W.J.; Cardo, D. and Fidkin, S.K. (2003) . Infection with vancomycin resistance *Staphylococcus aureus* containing the Van A resistance Gene , N . Engl . J . Med . **348** : 1342 – 1347 .

- **Clark,N.C.; Weigel,L.M.; Patel,J.B.; and Enover,F.C.** (2005) . Comparsion of Tn 1546-Like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania.J.Antimicrob.Agents Chemother. **49** (1) : 470 - 472.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) .** (2010) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement. M 100-S20., Wayne, Pannsylvannia; **30** (1).
- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) .** (2011) . Performance standards for Antimicrobial Disks Susceptibility tests.Vol.31 No.1 Jan.
- **Cohen ,J.O.** (1991) . *Staphylococcus* . In Baron ,S. (ed.): Medical Microbiology. (3rd ed.). pp.203-313. Churchill Livingstone London.
- **Collee, J. G. ; Fraser, A. G. ; Marmion, B. P. and Simmons, A.**(1996). Mackine and McCarteny "Practical medical microbiology" 14th ed, Churchill livingston Inc., New York.
- **Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmiom, B. P.; and Simmon, A.** (1996). Mackie and McCarteny, Practical Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone inc., USA.
- **Couppie , P.; Hommet , D .; Prevost , G .; Godart , M . C .; Morean , B .; Sainte, D .; Penean, C .; Hulin , A .; Monte , I. H . and Pradinand , R .** (1997) . Septicemies *Staphylococcus aureus* producteurs de leucocidin depanton- Valentin . Ann. Dermatol . Venner . **124** : 684 - 686 .

- **Cox , R .; Mellaghan , C.; Conquest , C . and King , J .**(1995).Epidemic methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* :controlling the spread outside the hospital . J . Hosp. Infect . **29** : 107 - 119 .
- **Daily,L.; Coombs,G.; O'Brien,F.G.; pearman,J.W.; and Riley,T.V.** (2005) . Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Western Australia Emerging Infect. Dis., **11** (10): 64 – 76.
- **Darini, A. L.; Palazzo, I. C.; and Felten, A.** (2004). Cefoxitin does not induce production of penicillin binding protein 2a in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. **42** (9): 4412- 4413.
- **Daum, R. S., Gupta S., Sabbagh R. and Milewski W. M.**(1992). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin : isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. J . Infect. Dis. **166**:1066-1072.
- **Deepak, S.; Samant, S. A., and Urhekar, A. D.** (2000). study of coagulase positive and negative staphylococci in clinical samples.Indian. J.,Med. Sci. **53** : 425-8.
- **Denis, O., Deplano A., De Beenhouwer H., Hallin M., Huysmans G., Garrino M.G., Glupczynski Y., Malaviolle X., Vergison A., Struelens M.J.**(2005) . Polyclonal emergence *Staphylococcus aureus* . J. Hosp. Infect. **62**:520-522 .
- **Deplano, A.; Vaneechoutte, M.; Verschraegen, G.; and Struelens, M. J.** (1997a). Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by polymerase chain reaction (PCR) analysis of inter-IS256 spacer length polymorphisms. J. Clin. Microbiol. Infect. **35**: 2580-

2587.

- **Deplano, A.; Witte, W.; and van-Leeuwen, W. J.** (2000b). Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. J. Clin. Microbiol. Infect. **6**: 239-245.
- **Derek, F.J. Brown, David, I. Edwards, Peter, M. Hawkey, D. Morrison, L. Ridgway, Kevin, J. Towner, and Michael, W . D .** (2005) . Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Oxford Unversity Press. J . Antimicrob. Chemother., 56:1003.
- **Deresiewicz, R.L.; Wool, J.; Chan, M.; Fingerg, R.; Kapser, D.L.** (1994) . Mutations affecting the activity of TSST-1. Biochemistry. Vol.**33**(20): 7194-7202.
- **Deurenberg, R. H., Vink, C., Driessen, C., Bes, M., London, N., Jerome, E. and Stobberingh, E.** (2004) . Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin from clinical isolates of *Staphylococcus aureus* strains by real-time PCR . FEMS Microbiol . Lett. **240**: 225-228 .
- **Diekema, D. J.; Pfaller, M. A.; Schmitz, F. J.; Smayevsky, J.; Bell, J.; Jones, R. N.; and Beach, M.** (2002). Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Clin. Infect. Dis. **32**: 114-132.
- **Diep, B. A.; Sensabaugh, G. F.; Somboona, N. S.; Carleton, H. A.; and Perdreau-Remington, F.** (2004). Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin. J. Clin. Microbiol.

42: 2080-2084.

- **Diep, B., Carlton, H., Chang, B., Senabaugh, G. and Predreau-Remington,F.** (2011) . Roles of 34 Virulence Genes in the Evolution of Hospital- and community – Associated Strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J.Infect.Dis. (193): 1495-1503 .
- **Dinges, M. M., Orwin, P. M. and Schlievert, P. M.** (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*, Clin. Microbiol. Rev. **13**(1): 16-34.
- **Dionisio,F;Matic,L.; Radman,M.; Rodringuse,O.R.; and Taddei, F .**(2001). Plasmid spread very fast in heterogenous bacterial communities .Genetics. **62** :1525 - 1532.
- **Durand G, Bes M, Meugnier H, Enright MC, Forey F, Liassine N, Wenger A, Kikuchi K, Lina G, Vandenesch F, Etienne J.** (2006) . Detection of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones containing the toxic shock syndrome toxin 1 gene responsible for hospital- and community-acquired infections in France. J Clin Microbiol . **44**(3):847-853.
- **Eiichi A., Koichi M., Ritsuko M., Reiko K., and Hiromi K .**(2004). Biofilm Formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Patients with Urinary Tract Infection .Acta med . Okayama. **58**(4): 207-214.
- **Ellsabeth , R . W . ; Fehringer , A . P . ; Ezepechuk , Y . V . ; Schlievert , P . M . ; Bina , P . ; Reiser , R . F . ; Hook , M . M . and Leung , D . Y . M .** (1999) . *Staphylococcus aureus* isolation from patients with Kawasaki disease express high levels of protein A . Infection and Immunity . **67** : 4737 – 4743 .
- **Enright, M. C. D.; Robinson, G.; Randle, E. J.; Feil, H.; and Spratt, B. G.** (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **99**: 7687-7692.

- **Entenza, J. M., Foster, T. J., Ni Eidhin,D., Vaudaux, P., Francioli, P. and Moreillon, P.**(2000). Contribution of clumping factor B to pathogenesis of experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. **68**:5443-5446.
- **Eric , B .; Brain, G .; Talbot . and Francosis .** (2003) . The fibronectin binding protein of *Staphylococcus aureus* many promote mammary gland colonization in alactating mouse model of mastitis , Infection and immunity . **71** : 2292 – 2295 .
- **Falcao, M.H.L.; Texeira, L.A.; Ferreira-Carvalho, B.T.; Burges–Neto, A.A. and Figueiredo, A.M.S.** (1999). Occurrence of Methicillin–Resistant and Susceptibile *Staphylococcus aureus* with a single colony contributing to MRSA mis–identification. J. Med. Microbiol. **48**:515-521.
- **Fatemeh S, Shojai A, Golalipour M, Rahimi Alang S, Vaez H, Ghaemi EA.**(2010). Spa Diversity among MRSA and MSSA Strains of *Staphylococcus aureus* in North of Iran. Int J Microbiol .
- **Fey, P. D., Said-Salim, B., Rupp, M. E., Hinrichs, S. H., Boxrud, D. J., Davis, C. C., Kreiswirth, B. N. and Schlievert, P. M.** (2003). Comparative molecular analysis of Community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.Antimicrob. Agents Chemother. **47**: 196-203.
- **Flannagan,S.E.;Chow,J.W.; Donabedian,S.M.; Brown,W. J.;Perri , M.B. ; Zervos,M.J.;Ozawa,Y.; and Clewell, D. B.** (2003). Plasmid content of a vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *S.aureus* with a *van* A phenotype .

Antimicrob.Agent and Chemother.**47** (12) : 3954-3959.

- **Flock, J., Froman, G.and Onsson, K. J.** (1987) . Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus* . EMBO J. **6**(8): 2351-2357.
- **Fluit, A. C.; Verhoef, J.; and Schmitz, F. J.** (2001). Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care units of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRY antimicrobial surveillance program. 1997-1998. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **20**: 617-625.
- **Foley, J. M.; and Perret, G. J.** (1962). Screening bacterial colonies for penicillinase production. Nature. **195**: 2877-2880.
- **Forbes, B.A., Sahm, D.F., and Weissfeild, A.S.** (2007). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby, USA. pp: 323.
- **Forbes,B.A.; Sahm,D.F.; and Weissfled,A.S.** (2002) . Baiely and Scott's Diagnostic Microbiology.(11th ed.) Mosby. St .Louis.
- **Freer, J. H., and J. P. Arbuthnott.** (1982). Toxins of *Staphylococcus aureus*. Pharmacol. Ther.**19:**55-106.
- **Fuda, C.; Hesek, D.; Lee, M.; Heilmayer, W.; Novak, R.; Vkulenko, S. B.; and Mobashery, S.** (2006). Mechanistic basis for the action of new cephalosporin antibiotics effective against methicillin-and vancomycin-resistant *Staphyloccocus aureus*. J. Biol. Chem. **281**: 10035-10041.
- **Fuda, C.; Hesek, D.; Lee, M.; Heilmayer, W.; Novak, R.; Vkulenko, S. B.; and Mobashery, S.** (2006). Mechanistic basis for the action of new cephalosporin antibiotics effective against methicillin-and

vancomycin-resistant *Staphyloccocus aureus*. J. Biol. Chem. **281**: 10035-10041.

- **Fuda, C.; Suvorov, M.; Vakulenko, S. B.; and Mobashery, S.** (2004). The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin binding protein 2a of methecillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. **279**: 40802-40806.
- **Garrity, G.M. and J.G. Holt.** (2001). The road map to the manual. In R.D.Boone, R.W. Castenholz, and G.M. Garrity (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd. ed., Springer-Verlag, New York. PP: 119-166.
- **Gaventa S, Reingold AL, Hightower AW, Broome CV, Schwartz B, Hoppe C, Harwell J, Lefkowitz LK, Makintubee S, Cundiff DR, et al** .(1989). Active surveillance for toxic shock syndrome in the United States, 1986. Rev Infect Dis. 11 Suppl 1:S28-34.
- **Gemmell , G . ; R . Tree ; A . Patel ; M . O . Reilly . and T . J . Foster .** (1991) . Susceptibility to opsonophagocytosis of protein A , Alpha – haemolysin and Beta – toxin deficient mutants of *S. aureus* isolated by allele – replacement . Zentbl . Bakteriol . **21** (suppl.) : 273 – 277 .
- **Ghazal, A., Kader O., Ebid, S., Mostafa, N.and El Sayed, S.** (2011). Detection of Community Acquired Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* among *Staphylococcus aureus* isolates. J. Am. Sc. **7**(2):423-431.
- **Goerge, S. D.** (2001). *Staphylococcus aureus* infections on hospitals in the Wales: an analysis of the 1999 and 2000 database. Health Stat. Q. 31-37.
- **Goldman, E., H.G., Lorrence.** (2009) . Practical Handbook of Microbiology .2nd. Ed. Taylor and Francis Group.

- **Gomez , M . *et al* .** (2004) . *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNF R1 . Nature . Medicine . **10** : 842 – 848 .
- **Gormley, M.** (2007) . States consider new laws to fight spread of staphylococci infections. Press and sun bulletin, Binghamton, Ny. 11922.
- **Green , G .; Mcdevitt , D .; Francois , P . Vaudaux .; P . E .; Lew, D .P . and Foster, T. J .** (1995) . Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin binding protein and studies on the expression of fibronectin b genes , Mol . Microbiol . **6** : 1143 – 1152 .
- **Griffiths, C.; Lamagni, T. L.; Crowcroft, N. S.; Duckworth, G.; and Rooney, C.** (2004). Trends in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in England and Wales: analysis of morbidity and mortality data for 1993-2002. Health Stat. Q. 15-22.
- **Gülmez D, Sancak B, Ercis S, Karakaya J, Hasçelik G.**(2012). Investigation of SCCmec types and Panton-Valentine leukocidin in community-acquired and nosocomial *Staphylococcus aureus* strains: comparing skin and soft tissue infections to the other infections. Mikrobiyol Bul. **46**(3):341-351.
- **Haas, S., Vingron, M., Poustka, A. and Wiemann, S.** (1998). Primer design for large scale sequencing. *Nucleic Acids Res*. **26**.3006–3012.
- **Haglind, E.; Brantervik, A.; Friman, S.; Jertborn, M.; Rodjer, S.; and Seeberg, S.** (2001) . Control of methicillin resistant staphylococci at the Sahlgrenska hospital. Successful control program against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. Lakartidningen **98**: 5312-5313.
- **Hallin, M.; Deplano, A.; Denis, O.; DeMendonca, R.; DeRyck, R.;**

and Struelens, M. J. (2007b) . Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **45**: 127-133.

- **Hanaki,H.** (2004) . Epidemiology and clinical effect against "beta-lactam antibiotic induce" .J. Antibiot. **78** (8) : 204-216.
- **Hanaki,H. ; Labischinski,H. ; Inaba,Y. ; Kondo,N. ; Murakami, H.; and Hiramatsu,K .** (1998) . Increase in glutamine non amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu 50 . J. Antimicrob. Chemother. **42**:315-320.
- **Harley, J. P. and Prescott, L.M.** (2002). Laboratory exercises in microbiology. 5th edition. McGraw Hill companies. New York.

- **Havaei, S.A., Moghadam, S. O., Pourmand, M.R., Faghri, J.** (2010). Prevalence fo Genes Encoding Bi-Component Leukocidins among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.Iran.J. Publ. Health.**39**(1):8-14.
- **Hebeisen , P.; Heinze, I.; Angehrn, P.; Page, M.P.G.; Then ,R.L**. (2001). In vitro and in vivo properties of Ro 63- 9141 , anovel broadspectrum cephalosporin with activity against methicillin resistant *Staphylococci* . antimicrobial agents and chemotherapy .Mar. **45** : 825 - 836 .
- **Hiramatsu , K . and Konodo , N.** (1995) . Cloning of anovel genetic element conferling high Methicillin resistance to *Staphylococcus aureus* Conference of antimicrobial agents

and chemotherapy . Am . Soc. Micro . Washington. D.C.

- **Hiramatsu , K .; Konodo , N . and Ito , T .** (1996) . Genetic basis for molecular apidemiology of MRSA . J. Infect . Chem . **2** : 117 - 129 .
- **Hiramatsu, K.; Cui, L.; Kuroda, M.; and Ito, T.** (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. **9** (10): 486-493.
- **Hiramatsu, K.; Ito, T.; and Hanaki, H.** (1999). Evolution of methicillin and glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. In R. G. Finch, and Williams, R. J. (ed.). Bailliere's clinical infectious disease. Bailliere tindall, London, United Kingdom. 221-242.
- **Hiramatsu,K.**(1997). *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility .J.Antimicrob. Agents Chemother. **40**: 135-136.
- **Holmes, A., Ganner, M., McGuane, S., Pitt, T. L., Cookson, B. D. and Kearns, A. M.** (2005) . *Staphylococcus aureus* isolates carrying panton-valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization , and association with clinical disease, J. Clin.Microbiol. **43**(5) : 2384-2390.
- **Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Stanley, J. T.; and Williams, S. T.** (1994). Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed., Wiliams and Wilkins, Baltimore, USA.
- **Hososaka,Y.; Hanaki,H.; Hayashi,L.; and Sunakawa,K.** (2004) . Epidemiological investigation of beta-lactam antibiotic induced vancomycin MRSA comparison of detection rate of BIVR with or without czx.J.Antibiot. **57** (2) : 204 - 216.

- **Huletsky, A.; Gagnon, F.; and Rossbach, V.** (2002). Less than 1-h detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swabs by real-time polymerase chain reaction (PCR) using the smart cycler. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **8** (1): 85.
- **Huletsky, A.; Giroux, R.; and Rossbach, V.** (2004). New real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **42**: 1875-1884.
- **Humphreys,H.** (1997) . Staphylococcus : Skin infection : Osteomylitis Food poisoning , Foreign body infections . Medical Microbiology.5th ed.,Churchil Lidingston .USA.
- **Hurliman n-Dalei, R. L. C.; Ryffel, F. H.; and Berger-Bachi, B.** (1992). Survey of the methicillin resistance-associated genes *mecA, mecR1-mecI,* and *femA-femB* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **36**: 2617-2621.
- **Hussain, F. M.; Boyle-Vavra, S.; Bethel, C. D.; and Daum. R. S.** (2000) . Current trends in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care pediatric facility. J. Pediatr. Infect. Dis. **19**: 1163-1166.
- **Irina , S .; Vinogrador , E .; Flahant , S . and Grigoris .** (2005) . Extraction and purification of fibronectin *Staphylococcus aureus* , Jour. Infect Immun .**73** : 3007 - 3017 .
- **Ito, T. X.; Ma, X.; Takeuchi, F.; Okuma, K.; Yuzawa, H.; and Hiramatsu, K.** (2004). Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombines, *ccrC*. Antimicrob. Agents Chemother. **48**: 2637-2651.

- **Ito, T.; Katayama, Y.; and K. Hiramatsu.** (1999). Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. Antimicrob. Agents Chemother. **43**: 1449-1458.
- **Ito, T.; Katayama, Y.; Asada, K.; Mori, N.; Tsutsumimoto, K.; Tiensasitorn, C.; and Hiramatsu, K.** (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **45**: 1323-1336.
- **Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S. and Oono, T.** (2006) . Staphylococcal cutaneous infections: Invasion, evasion and aggression. J. Dermatol. Sci. **42**(3): 203-214.
- **Jacobs,M.** (2005) . Epidemiology and clinical implications of glycopeptides resistant *Staphylococcus aureus* .Infect .Dis.**7** : 1023-1028 .
- **Jennifer , P .** (2004) . Students of fibronectin pathogen intraction using NMR Spectroscopy , Mol . Microbiol . **52** : 631 – 641 .
- **Jo-Ann M, John MC, Vicky L, Sameer E, Thomas L, Wendy H .** (2006) . Novel Multiplex PCR Assay for detection of the Staphylococcal Virulence Marker Panton-Valentine Leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from resistant staph. J. Clin. Microbiol. **44**(3): 1141-1144 .
- **Joh , D .; Speziale , P .; Gurusiddappa , S .; Manor , J . and Hook , M.** (1999). Role of fibronectin binding protein in bacterial adherence and entry in to mammalian cells , Matrix . Biol . **18** : 211 – 223 .

- **Johnson, A. G.; Ziegler, R. J.; Lukasewycz, O. A. and Hawley, L. B.** (2002). Board Review Series Microbiology and Immunology. 4thed. Lippincott Williams & Wilkins Awolters Kluwer Company. 88.
- **Johnsson, D., Molling, P., Stralin, K. and Soderquist, B.** (2004). Detection of Panto-Valentine leukocidin gene in *Staphylococcus aureus* by LightCycler PCR: clinical and epidemiological aspects. Clin. Microbiol. Infect. **10**:884-889.
- **Jones , R .; Barret , M . and Erwin , M .** (1997) . Invitro activity and spectrum of Ly 333228 anovel glycopeptide derivative antimicrob. agent . Chemoth . **41** : 488 - 493 .
- **Jonsson, I.** (2010). The incidence and epidemiological factors of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in a suburban family practice in Florida. Ph.D thesis. College of Nursing . University of Central Florida.
- **Jonsson, K., Signas, C., Muller, H. P. and Lindberg, M.** (1991). Two dhfferent genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus* . The complete Nucleotide sequence and characterization of the second gene . Eur. J. Biochem. **202**: 1041-1048.
- **Jorgensen, J. H.; Crwford, S. A.; McElmeel, M. L.; and Fiebelkorn, K. R.** (2004). D-zone test clindamycin resistance of staphylocci in conjunction with performance of automatically detection. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **42**: 1800-1802.
- **Kacica, M.; and McDonald, L. C.** (2004). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*-New York. Morb. Mortal. Wkly. Rep. **53**: 322-323.
- **Kaneko, J. and Kamio, Y.** (2004) . Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-

forming mechanism, and organization of the genes . Biosci. Biotechnol. Biochem. **68**:981-1003.

- **Katayama, Y.; Ito, T.; and Hiramatsu, K.** (2000). A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus.* Antimicrob. Agents Chemother. **44**: 1549-1555.
- **Katayama, Y.; Takeuchi, F.; Ito, T.; Ma, X. X.; Ui-Mizutani, Y.; Katayama, Y.; Zhang, H. Z.; Hong, D.; and Chambers, H. F.** (2003). Jumping the barrier to {beta}-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **185**: 5465-5472.
- **Katzung , B. G.** (2001) . Basic and clinical Pharmacology . (8^{th}) ed. lange medical books . Mc Graw – Hill. New York .

- **Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M.** (1999) . Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by multiplex PCR. J Hosp Infect. **43**(1): 33-37.
- **Kenneth, T .** (2002) . The bacterial flora of Human , University of Wisconsin – Madison . Department of bacteriology .
- **Kenneth, T .** (2005) . *Staphylococcus aureus* . Text book of bacteriology , Univercity of Wisconsin , Department of bacteriology .
- **Klein, E.; Smith, D. L.; and Laxminarayan, R.** (2007). Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. United States, 1999-2005. Emerg. Infect. Dis.

12: 1840-1846.

- **Kloos, W. E; Schleifer, K. H.** *(*1986*)* Family I. Micrococcaceae. Genus IV. *Staphylococcus*, Rosenbach 1884, 18^{AL}. *in Bergey's manual of systematic bacteriology*, *eds* Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G. *(*Williams and Wilkins, Baltimore, Md*). 2:*1013–1035.
- **Kohner, J.; Uhl, C.; Kolbert, D.; Persing, A.; and Cockerill, F.** (1999) . Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **37** (9): 2952-2961.
- **Koneman, E. W.; Allen, S. D.; and Janda, W. M.** (1992). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 4ed. J. B. Lippincott. Philadelphia, USA.
- **Kowalski, T. J.; Berbari, E. F.; and Osmon, D. R.** (2005). Epidemiology, treatment, and prevention of community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections. Mayo. Clin. Proc. **80** (9): 1201-1208.
- **Kreiswirth, B.; Kornblum, J.; Arbeit, R. D.; Eisner, W.; Maslow, J. N.; McGeer, A.; Low, D. E.; and Novick, R. P.** (1993). Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science. **259**: 227-230.
- **Kuehnert, M. J.; Hill, H. A.; and Kupronis, B. A.** (2006). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospitalizations. United States. Rep. **121**: 17-35.
- **Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H.; and Kobayashi, I.** (2001) . Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. **357**: 1225-1240.

- **Ladhani, S.; and Evans, R. W.** (1998) . Staphylococcal scalded skin syndrome. Arch . Dis. Child. **78:**85-88.
- **Ladhani, S.; Joannou, C. L.; Lochrie, D. P.; Evans, R. w.; and Poston, S. M .** (1999) . Clinical, microbiol and biochemical aspects of the Exfoliative toxins causing Staphylococcal scalded skin syndrome. Clin. Microbiol. Rev.**12:** 224-242.
- **Ladhani, S.; Robbie, S.; Garratt, R. C.; Chapple, D. S.; Joannou, C. L.; and Evans, R. W.** (2001) . Development and evaluation of detection systems for Staphylococcal Exfoliative toxin A responsible for scalded skin syndrome. J. Clin. Microbiol. **39:** 2050-2054.
- **Ladhani,S.; Poston,S.M.; and Evans,R.W. (**1999). Staphylococcal scaldd skin syndrome : exfoliative toxin A(ETA) induces serine protease activity when combined with A 431 cells .Acta Pediatr. **88** (7) :776 - 779.
- **Lamy B, Laurent F, Gallon O, Doucet-Populaire F, Etienne J, Decousser JW; Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH) Study Group**.(2012) . Antibacterial resistance, genes encoding toxins and genetic background among Staphylococcus aureus isolated from community-acquired skin and soft tissue infections in France: a national prospective survey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **31**(6):1279-84.
- **Laurence , D. R .; Bennett , P. N .; Brown . and M . J .** (1997) . Clinical Phrmacology . (8^{th}) ed . Churchill Livingstone London .
- **Lawrence,C.; and Nauciel,C.**(1998).Production of interleukin -12 by murine macro phage in response to bacterial peptidoglycan .Infect Immun.**66**:4947-4949
- **Leclercq, R.** (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and

lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **34**: 482-492.

- **Lee, E.; Ulrich, R.; Goldmann, Y.; and Wang, D. A.** (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide/adhesion. Infect. Immun. **34**: 432-438.
- **Lee, J. H.** (2003). Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 6489-6494.
- **Levinson, W. and Jawetz, E.** (2000). Medical Microbiology and Immunology. Examination and Board Review. 6th ed., McGraw-Hill, International Editions. Health Professions Series.
- **Li, P., Kupfer, K. C., Davies, C. J., Burbee, D., Evans, G. A. and Garner, H. R.**(1997). PRIMO: a primer design program that applies base quality statistics forautomated large-scale DNA sequencing . Genomics **40**: 476–485.
- **Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gauduchon V, Vandenesch F, Etienne J.** (1999) . Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis. **29**(5):1128-1132 .
- **Lindsay, J. A.; Moore, C. E.; Day, N. P.; Peacock, S. J.; Witney, A. A.; Stabler, R. A.; Husain, S. E.; Butcher, P. D.; and Hinds, J.** (2006). Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of

Staphylococcus aureus has unique combinations of surface-associated and regulatory genes. J. Bacteriol. **188**: 669-676.

- **Liu, C.; and Chambers, H. F.** (2003) . *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. Antimicrob. Agents Chemother. **47**: 3040-3045.
- **Lorian V., Antibiotics in Laboratory medicine .** 2005, Lippincott Williams and Wilkins, USA
- **Lowy,F.D.**(1998) . *Staphylococcus aureus* Infections. The N. Engl .J.Med., **339** (8) : 520 - 532.
- **Lyon, B. R.; and Skurray, R.** (1987). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*, genetic basis. Microbiol. Rev. **51**: 88-134.
- **MacFaddin, J. F.** (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
- **Manisha, M; Gehua, W; and Wendy, M. J.** (2000) . Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance . J. Clin. Microbiol. **38**(3):1032-1035.
- **Marimón JM, Villar M, García-Arenzana JM, Caba Ide L, Pérez-Trallero E**.(2012). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* carrying the panton-valentine leucocidin genes in northern Spain. J Infect. **64**(1):47-53.
- **Matthews, K. R.; Roberson, J.; Gillespie, B. E.; Luther, D. A.; and**

Oliver, S. P. (1997) . "Identification and differentiation of coagulase - negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction". J. prot. **60** (6): 686-688.

- **Matthias , G .; Hassain, M .; Petra , B .; Christine , H .; Georg , P . and Bhanu , S .** (2004) . Truncation of fibronectin – binding protein in *Staphylococcus aureus* strain newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function . Infection and immunity . **72** : 7155 – 7163 .
- **May,J.; Shannon,K.; King,A.; and French,G.** (1998) . Glycopeptide tolerance in *Staphylococcus aureus* .J . Antimicrob .Chemother., **42**:189-197.
- **McDevitt, O., Francois, P., Vaudaux, P. and Foster, T. J.**(1994). Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus* . Mol. Microbiol., II:237-248.
- **McDonald, R. R., Antonishyn, N. A. and Hansen, T.** (2005) . Development of a triple real-time PCR assay for detection of Panton-Valentine leukocidin toxin genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* . J. Clin. Microbiol., **43**: 6147-6149
- **McDougal, L. K.; and Thornsberry, C.** (1986). The role of ß-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **23**: 832-839.
- **McKinney, T. K.; Sharma, V. K.; Craig, W. A.; and Archer, G. L.** (2001) . Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is co repressed but not co induced by cognate *mecA* and ß-lactamase regulators. J. Bacteriol. **183**: 6862-6868.

- **Medeiros, A. A.** (2001). Role of beta-lactamase in expression of resistance by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1426-1428.

- **Mehrotra M, Wang G, Johnson WM.** (2000) . Mutiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance . J Clin Microbiol . **38**: 1032-1035 .

- **Melish,M. E.** (1992) . Staphylococcal infection. In Feigin, R. D., and Cherry, J. D., (ed.): Test book of pediatric infections diseases, 3rd. ed. Vol. 2. W. B. Saunders, philadelphia.

- **Melo,G.B.; Melo,M.C.; Gama,A.P.; Carvalho,K.S.; and Filho G.**(2005) . Analysis of the genetic diversity of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. Brazilian. J.Microbiol., **36** : 126 - 130.

- **Miller, L. G.; Perdreau-Remington, F.; Rieg, G.; Mehdi, S.; Perlroth, J.; Bayer, A. S.; Tang, A. W.; Phung, T. O.; and Spellberg, B.** (2005). Necrotizing fascitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. NEJM. **352**: 1445-1453.

- **Mitani N, Koizumi A, Sano R, et al.** (2005) . Molecular typing on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP and its usefulness in an epidemiological study of an outbreak. Japanese Journal of Infectious Diseases. **58**(4):250–252.

- **Młynarczyk A, Młynarczyk G, Szymanowska A, Stańczak J, Luczak M, Jeljaszewicz J**.(2000). Use of PCR for evaluating detection of coa and nuc genes in methicillin-resistant, coagulase-negative strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA-CN).Med Dosw Mikrobiol. , **52**(3):217-

222.

- **Moise-Broder PA, Sakoulas G, Eliopoulos GM** . (2004). Accessory gene regulator group II polymorphism in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is predictive of failure of vancomycin therapy. Clin. Infect. Dis., **38**: 1700-1705.
- **Monday, S. R , and Bohach, G.A .** (1999) . Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates . J Clin Microbiol . **37**: 3411-3414 .
- **Moore N .**(2006). Examination of Virulence genes in Nasal Isolates and Community-Acquired Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* . UW-L Journal of Undergraduate Research IX .
- **Moreno , F.; Criso, C . and Jorgensen** . (1995). Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* as community organism . Clin . Infect . Dis. **21** : 1308 - 1312 .
- **Moussa, I.,M. and Shible,A.,M.** (2009). Molecular Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Recovered from out patient clinic in Riyadh, Saudi Arabia.Saudi. Med.J.,**30**(5):611-617.
- **Munoz, A.; Alvanez, O.; Alonso, B. & Liovo, J.** (1999). Lectin tuping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol, **48**: 495-499.
- **Murphy, G. J.; Pararajasingam, R.; and Nasim, A.** (2001). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in vascular surgery patients. Ann. R. Coll. Surg. Engl. **83**: 158-163.
- **Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; and Pfaller, M. A.** (2009) . John, F. K. Kennedy. Medical microbiology. 6th edition. Mosby Elsevier. U.K.
- **Murray,P. R.; Baron, E. J.; Tenover, F. C., and Yolken, R. H.** (1999).

Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for microbiology. ASM Press. Washington. D. C.

- **Naimi, T. S., LeDell, K. H., Como-Sabetti, K., Borchardt, S. M., Boxrud, D. J., Etienne, J., Johnson, S.K., Vandenesch. F., Fridkin, S., O'Boyle, C., Danila, R. N.and Lynfield, R.**(2003) . Comparison of community-and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection . JAMA., **290**: 2976-2984.
- **Nair, S. P.; Williams, R. J.; and Henderson, B.** (2000). Advances in our understanding of the bone and joint pathology caused by *Staphylococcus aureus* infection. Rheumatol. **39** :131-138.
- **Nakagawa, S., Taneike, I. and Mimura, D.** (2005) . Gene sequences and specific detection for Panton-Valentine leukocidin. Biochem. Biophys . Res. Commun ., **328**: 995-1002 .
- **Narita, S., Kaneko, I., Piemont, Y., Jarraud, S., Etienne, J. and Kamio, Y.**(2001) . Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, phiSLT . Gene, **268**:195-206.
- **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) .** (2003a) . Performance standards for disk susceptibility testing; approved standard, 6th ed. M 100-S13. NCCLS, Wayne, Pa.
- **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).** (2003c). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 6th ed. M7-6A. NCCLS, Wayne. Pa.
- **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).** (2003b). Performance standards for antimicrobial

susceptibility tests, 8th ed. Approved standard M 2-A8. NCCLS. Wayne. Pa.

- **Nguyen Van JC, Kitzis MD, Ly A, Chalfine A, Carlet J, Ben Ali A, Goldstein F.** (2006) . Detection of nasal colonization methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a prospective study comparing real-time genic amplification assay vs selective chromogenic media . Pathol Biol (Paris). **54**(5):285-292.
- **Noskin, G. A.; Rubin, R. J.; Schentag, J. J.; Kluytmans, J.; Hedblom, E. C.; Smulders, M.; Lapetina, E.; and Gemmen, E.** (2005) . "The burden of *Staphylococcus aureus* infections on hospitals in the United States: an analysis of the 2000 and 2001 nationwide inpatient sample database". Arch. Intern. Med. **165**: 1756-1761.
- **Noskin, G. A.; Rubin, R. J.; Schentag, J. J.; Kluytmans, J.; Hedblom, E. C.; Smulders, M.; Lapetina, E.; and Gemmen, E.** (2005). "The burden of *Staphylococcus aureus* infections on hospitals in the United States: an analysis of the 2000 and 2001 nationwide inpatient sample database". Arch. Intern. Med. **165**: 1756-1761.
- **Novak,R.P.(**2000).Pathogenicity factors and their regulation, In V.A .Fischetti, R.P.Noviak,J.J.Ferretti,D.A. Portnoy, and J.I.Rood(ed.) , Gram positive pathogens .American Society for Microbiology,Washington,D.C. P. 392 - 407.
- **Novick, R., Richard, P., Patrick, S. and Alexey, R.** (2001) . Pathogenecity and resistance islands of staphylococci . Microb. and Infect., **3**(7): 585-594.
- **O'Brien, L. M., Walsh, E. J., Massey, R. C., Peacock, S. J.and Foster, T. J.**(2002). *Staphylococcus aureus* clumping factor B (ClfB)

promotes adherence to human type I cytokeratin 10: Implications for nasal colonization . Cell Microbiol., **4**:759-770.

- **Ockubo, B. N.** (2001). The role of methicillin in the persistence or recurrence of *Staphylococcus aureus*. Scand. J. Infect. Dis. **31** (8): 542-548.
- **Okuma, K.; Iwakawa, K.; and Turnidge, J. D.** (2002). Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **40**: 4289-4294.
- **Oliveira, D. C., Tomasz, A. and de Lencastre, H.** (2002) . Secrets of success of a human pathogen : molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet Infect. Dis., **2**:180-189.
- **Oliveira, D.C.; Wu, S.W. & Lencaster, H.** (2000). Genetic Organization of the Downstream Region of the *mec*A Element in Methicillin–Resistant *Staphylococcus aureus.* Isolates carrying Different Polymorphisms of this Region. Antimicrob. Agents Chemother., **44**:1906-1910 .
- **Omoe, K.; Ishikawa, M.; Shimoda, Y.; Hu, D. L.; Ueda, S.; and Shinagawa, K.** (2002). Detection of *seg*, *seh*, or *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. J. Clin. Microbiol. **40**: 857-862.
- **O'Neill, E., Humphreys, H. and O'Gara, J.P.** (2009) . Carriage of both the fnbA and fnbB genes and growth at 37 6C promote FnBP-mediated biofilm development in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J. Med. Microbiol., **58**: 399-402.

- **O'Riodan, K.; and Lee, J. C.** (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **17** (1): 218-234.
- **Ozeri , V .; Rosenshine , L .; Mosher , D . F .; Fassler, R . and Hansk , E .** (1998) . Role of integrin and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* in to cells via protein F1 , Mol . Microbial . **30** : 625 – 637 .
- **Palmqvist N, Foster T, Tarkowski A, Josefsson E.** (2002) . Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. J. Microbial. Patho. **33**(5):239–249.
- **Pamela , R .; DVM .; MPVM .** (2001) . Evaluating the effectiveness of Mastitis vaccines . Apractical guide to managing mastitis . University of Wisconis . Madison .
- **Panhotra, B. R.; Saxena, A. K.; and Al-Mulhim, A. S.** (2005). Chloramphenicol susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Eastern region of Saudi Arabia. J. Saudi. Med. **26** (7): 1149-1151.
- **Patel , A .H . ; P . Nowlan . ; E . D . Weavers . and T . Foster .** (1987) . Virulance of protein A – deficient and alpha – toxin – deficient mutants of *staphylococcus aureus* isolated by allele replacement . Infect . Immun . **55** : 3103 - 3110.
- **Patel, M.; Waites, K. B.; Moser, S. A.; Cloud, G. A.; and Hoesley, C. J.** (2006). Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**44**: 2481-2484.

- **Paterson, D.J.**(1999). Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin a review of current knowledge . Infect.Dis., **23** (3): 34-39.
- **Peacock SJ, Moore CE, Justice A**.(2002) . Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus*
- **Prevost,G.; Couppie,P.; and Monteil,H**. (2003). Staphylococcal epidermolysins carrapin .J.infect. Dis., **16** (2) :71 -76.
- **Proutski, V. & Holmes, E. C.** (1996). PrimerMaster: a new program for the design and analysis of PCR primers. Comput. Appl. Biosci. **12**: 253–255.
- **Ramos, R.L.B.; Teixeira, L.A., Ormonde, L.R.; Sioueira, P.L.A.; Santos, M.S.; Marangoni, D. and Figueirede, A.M.S.** (1999). Emergence of Mupirocin Resistance in Multiresistant *Staphylococcus aureus.* Clinical Isolates Belonging to Brazilian Epidemic Clone III: B: A.J. Med. Microbiol., **48** : 303-307.
- **Raymond, A. R.; and Albert, E. D.** (2000). Development of resistance to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. J. Antimicrob. Chemother. **22**: 325–331.
- **Reed, S. D.; Friedman, J. Y.; and Engemann, J. J.** (2005). Costs and outcomes among hemodialysis-dependent patients with methicillin-resistant or methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. **26** (2): 175-183.
- **Reipert,A.; Ehlert,K.; Kast,T.; and Bierbaum,G.**(2003) . Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin . J . Antimicrob. Agents Chemother.,**47**(2) : 568-576.

- **Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M. and Lagace, J.** (2001) . Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogen in bovine mastitis by PCR. J. Clin. Microbiol., **39**(7): 2584-2589 .
- **R ochon–Edouard, S.; Pestel–Caron, M.; Lemeland, J. and Caron, F.** (2000). In Vitro Synergistic Effects of Double and Triple Combinations of β-Lactams, Vancomycin, and Netilmicin Against Methicillin–Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. Antimicrob. Agents Chemother., **44**:3055-3060.
- **Roder,B. L. ; Wandall, D. A. ; Moller, N. F. ; Espersen, F. ; Skinhoj, P. and Rosdahl, V. T.** (1999). Clinical features of staphylococcus aureus endocarditic. Arch. Intern. Med. **159** : 462-469.
- **Rozen, S. and Skaletsky, H.** (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol. Biol. 132: 365–386.
- **Ryan, K. J.; and Ray, C. G.** (2004). Sherris Medical Microbiology 4th ed. McGraw-Hill-NewYork.
- **Rychlik, W. and Rhoads, E. R.** (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing, and in vitro amplification of DNA. Nucleic Acids Res. **17**: 8543–8551.
- **Salisbury, S. M., Sabatini, L. M. and Spiegel, C. A.** (1997) . Identification of methicillin-resistant Staphylococci by multiplex polymerase chain reaction assay . Am. J. Clin. Pathol., 107: 368-373 .
- **Sambrook, J.; Fritsh, E.F., and Maniatis,** (1989) . Molecular cloning,laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory.

- **Santos, K. R. N.; Teixera, L. M.; Leal, G. S.; Fonseca, L. S.; and Filho, P. P. G.** (1999). DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. Med. Microbiol. 48: 17-23.
- **Sattler, C. A.; Mason, E.; Jr, O.; and Kaplan, S. L.** (2002). Prospective comparison of risk factors and demographic and clinical characteristics of community-acquired, methicillin-resistant versus methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* infection in children. Pediatr. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **21**: 910-917.
- **Schaaff,F.; Reiprt,A.; and Bierbaum,G.** (200٣) . Lack of evidnce for involvement of hypermutability in emergence of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* .J. Antimicrob.Agents Chemother., **47**(4) : 1484 - 1485.
- **Schlievert, P. M .** (1998) . Incidence studies toxic shock syndrome. J. Arbuthonott. P.167-168.
- **Schmitz, F. J.; Petridou, J.; and Fluit, A. C.** (2000a). Distribution of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* blood-culture isolates from fifteen German university hospitals. Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **19**: 385-387.
- **Schmitz, F. J.; Sadurski, R.; and Kray, A.** (2000b). Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. J. Antimicrob. Chemother. **45**: 891-894.
- **Schmitz, F.J ; Steiert, M ; Hofmann B, *et al* .** (1998) . Development of multiplex-PCR for direct detection of the genes for

enterotoxin B and C, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* isolates. J med Microbiol . **47**: 335-340 .

- **Schmitz, F.J; Mackenzie, C.R; Hofmann, B; Verhoef, J; Finken-Eigen, M; Heinz, H.P; Köhrer, K .** (1997) . Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and methicillin resistance of staphylococci obtained by a multiplex PCR. J Med Microbiol. **46**(9): 773-778.
- **See R. H., and A. W. Chow.** (1989). Microbiology of toxic shock syndrome: overview. Rev. Infect. Dis. **11**:S55-S60.
- **Senn,M.M.; Giachino,P.; Homerova,D.; Cteinhuber, A.; Strassner, J.;Kormanec,J.; Flöckiger,U.; Berger - Bachi, B.;and Bischoff,M.** (2005) . Molecular analysis and organization of the δ^B operon in *Staphylococcus aureus* .,**187** (23) : 8006 - 8019.
- **Shlaes, D.M.; Shlaes J.H.; Vincent S.; Etter L.; Fey P.D. and Goering R.V.**(1993). Teicoplanin- resistant *Staphylococcus aureus* expresses a novel membrane protein and increases expression of penicillin – binding protein 2 complex. Antimicrob . Agents Chemother.,**37**: 2432-2437.
- **Shukla, S.K., Stemper, M. E., Ramaswamy, S., Conradt, J. M., Reich, R., Graviss, E. A. and Reed, K. D.** (2004) . Molecular characteristics of nosocomial and Native American community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from rural Wisconsin. J. Clin. Microbiol., **42**: 3752-3757.
- **Siegman-Igra, Y.; Reich, P.; Orni-Wasserlauf, R.; Schwartz, D.; and Giladi, M.** (2005). "The role of vancomycin in the persistence or recurrence of *Staphylococcus aureus* bacteraemia". Scand. J. Infect. Dis. **37** (8): 572-578.

- **Sieradzki, K. and Tomasz, A.** (1997). Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin resistant mutant of *Staphylococcus aureus* . J.Bacteriol ., **179**:2557-2566.
- **Signas, C., Raucci, G., Jonsson, K., Lindgren, P. E., Anantharamaiah, G. M., Hook, M. and Lindberg, M.** (1989). Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus* : Use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. Proc Natl Acad . Sci. USA., **86**: 699-703.
- **Sila J, Sauer P, Kolar M.**(2009). Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, panton-valentine leukocidin and tsst-1 between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* at the university hospital in olomouc. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. **153**(3):215-218.
- **Smyth, R. W.; Kahlmeter, G.; Olsson, G.; Liljequist, B.; and Hoffman, B.** (2001). Methods for identifying methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Hosp. Infect. **48**: 103-107.
- **Song, M. D.; Wachi, M.; Doi, M.; Ishino, F.; and Matsuhashi, M. (**1987). Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS. Lett. **221**: 167-171.
- **Spratt, J. L.** (1989). Antimicrobial drug in essentials of pharmacology. F. A. Davis company, Philadelphia. 363-407.
- **Srinivasan,A.; Dick,J.D.; andperl,T.M.** (2002) . Vancomycin resistance in *Staphylococci*.Clin.Microbiol., **15**(3) : 430- 438.

- **Stukus, P. E.** (1997) . Investigating microbiology. Harcout Brace and Companies.
- **Suzuki, E.; Hiramatsu, K.; and Yokota. T.** (1992). Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mecA* gene distribution. Antimicrob. Agents Chemother. **36**: 429-434.
- **Suzuki, J.; Komatsuzawa, H.; Sngai, M.; Suzuki, T.; Kozai, K.; Miyake, Y. Suginaka, H. & Nagasaka, N.** (1997). A Long-Term Survey of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Oral Cavity of Children . Microbiol. Immunol., **41**:681-686 .
- **Taguchi *et al* .** (2004) . The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases, 54-58.
- **Tenover,F.C.;Weigel,L.M.;Appelbaum,P.C.;Mc Dougal, L.K.; and Chaitram,J.** (2004). Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania .J.Antimicrob.Agents Chemother.,**48**(1) : 275 - 280.
- **Tiemersma, E. W.; Bronzwaer, S. L.; Lyytikainen, O.; Degener, J. E.; Schrijnemakers, P.; Bruinsma, N.; Monen, J.; Witte, W.; and Grundman, H.** (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. European antimicrobial resistance surveillance system. Emerg. Infect. Dis. **10**: 1627-1634.
- **Todar,K.** (2002). Staphylococcus. J. Med. Microbiol, 1-9.
- **Tornos,P. ; Almirante, B. ; Mirabet, S. ; Permanyer, G. ; Pahissa, A. and Soler, J. S.** (1999). Infective endocarditis due to *staphylococcus aureus*. Arch. Intern. Med. **159** : 433-475.
- **Towner KJ, Talbot DC, Curran R, Webster CA, Humphreys H .** (1998) . Development and evaluation of a PCR-based

immunoassay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol. **47**(7) : 607-613.

- **Tristan, A., Ying, L., Bes, M., Etienne, J., Vandenesch, F.and Lina, G.**(2003). Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections.J.Clin. Microbiol.,**41**:4465-4467.
- **Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts. R.and Leunissen JA.** (2007) . Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res. 35(Web Server issue):W71-74.
- **Van , P .; J . P .; Duensing , T . D . and R . L .** (1998) . Entery of opaA gonococci in to HEP-2 cells requires concerted action of glycosaminglycans , fibronectin and integrin receptors ,Mol .Microbial . **29** : 369 – 379 .
- **Van Hal, SJ., Jennings, Z. and Stark, D.** (2009) . MRSA detection : comparison of two molecular methods (BD GeneOhm® PCR and Easy-Plex) with two selective MRSA agars (MRSA-ID and Oxoid MRSA) for nasal swabs . Clin . Microbiol. Infec. Dis., **28**: 47-53 .
- **Vandenesch, F.; Naimi, T.; Enright, M. C.; Lina, G.; Nimmo, G. R.; Heffernan, H.; Liassine, N.; Bes, M.; Greenland, T.; Reverdy, M. E.; and Etienne, J .** (2003) . Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine Leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg. Infect. Dis. **9**: 978-984.
- **Waldron, D. E.; and Lindsay, J. A.** (2006). Sau1: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of Different Lineages. J. Bacteriol. **188**: 5578-5585.

- **Waldvogel, F. A.** (2000) . *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome) . In: Mandell,G. L; Bennett, J. E; Dolin R, eds . Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th Ed. New York, Churchill-Livingstone,2069-2092 .
- **Walker, J.; Borrow, R.; Goering, R.V.; Egerton, A.J.F.; Oppenheim, B.A.** (1999). Subtyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the north-west of England: A Comprarison of standardized pulsed-field gel electrophoresis with bacteriophage typing including an inter-laboratory reproducibility study. J. Med. Microbiol., **48**:297-301.
- **W ann,E.R; Fehringer,A.P.; Ezepchuk,Y.V.; Schlievert,P. M. ; Bina,P .; Reiser,R.F.; Hook,M.M.; and Leug,D.Y. (**1999) . *Staphylococcus aureus* isolates from patients with kawasaki disease express high levels of protein A. J.Infect.Immun., **67**: 4737- 4743.
- **Wannet, W. J. B.; Spalburg, E.; Heck, M. E. O.C.; Pluister, G. N.; Tiemersma, E.; Willems, R. J. L.; Huijsdens, X. W.; de-Neeling, A. J.; and Etienne, J.** (2005) . Emergence of virulent methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton- Valentine Leukocidin genes in the Netherlands. J. Clin. Microbiol. **43**:3341-3345.
- **Warshawsky, B.; Hussain, Z.; and Gregson, D. B.** (2000). Hospital and community-based surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: previous hospitalization is the major risk factor. Infect. Control Hosp. Epidemiol. **21** (11): 724-727.
- **Weigelt, J.A.**(2007). MRSA Informa Healthcare. USA, Inc.
- **WHO.** (1996). Guidelines for Antimicrobial Resistance Survillance.

- **Wichelhaus TA, Hunfeld K-P, Böddinghaus B, Kraiczy P, Schäfer V, Brade V.** (2001) . Rapid molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by PCR-RFLP. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. **22**(5):294–298.
- **Wiegel ,L.M.; Donlan ,R.M.; Shin,D.H.; Jensen,B.; and Clark,N.C** (2007). High level vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm . J. Antimicrob . Agents Chemother. **51**(1) : 231 - 238.
- **World Health Organization (WHO).** (2001b) . Prevention and control of *Staphylococcus aureus* infections . Geneva, Switzerland.
- **Wotton ,M.; Avison, P.M. ; and Walsh,T.R.** (2004). Genetic analysis of 17 genes in *Staphylococcus aureus* with reduced susceptitiltiy to vancomycin (VISA) and hetero VISA .J. Antimicrob. Agents Chemother., **53** : 406 – 407.
- **Yam, T. S.; Hamilton-Miller, J. M. T.; and Shah, S.** (1998). The effect of component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2` synthsis, and beta-lactamase production in *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Agents Chemother. **42**: 211-216.
- **Yamaguchi, T., et al.** (2000). Phage conversion of exfoliative toxin A production in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. **38:**694-705.
- **Yamaguchi, T., et al.** (2002) . Identification of the *Staphylococcus aureus etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. Infect. Immun. **70:**5835-5845.
- **Yamaguchi, T.; Hayashi, T.; Takami, H.; Ohnishi, M.; Murata, T.; Nakayama, K.; Asakawa, K.; Ohara, M.; Komatsuzawa, H.; and Sugai, M .** (2001) . Complete nucleotide sequence of

Staphylococcus aureus Exfoliative toxin B plasmid and identification of a novel ADP-Ribosyl transferase, EDIN-C. Infect. Immun. **69:**7760-7771.

- **Yamasaki O, Yamaguchi T, Sugai M, Chapuis-Cellier C, Arnaud F, Vandenesch F, Etienne J, Lina G.** (2005) . Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins J Clin Microbiol. **43**(4):1890-3.
- **Yangihara,K.; Kaneko,Y.; Sawai,T.; Miyazaki,Y.; and Kohno,S** (2002). Efficacy of linezolid aginst methicillin resistant or vancomycin in sensitive *Staphylococcus aureus* in a model of hematogenous plumonary infection.J.Antimicrob.Agents Chemother., **46** (10) : 3288 - 3291.
- **Yok-Aque .; Jacquen , A .; Lionel , p .; Patrice , F .; Eleonorn , W .; Jose, M.; Bhanu , S .; Pierre , V .** (2005) .Fibrinogen and Fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis.
- **Yokota, T.** (1999). Role of pencillinase plasmids in the stability of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **45**: 1132-1139.
- **Zadik, P.M.; Davies, S.; Wttittaker, S. and Muson, C.** (2001). Evaluation of new selective medium for methicillin-resistance *Staphylococcus aureus.* J. Med. Microbial. **50**:476-479.
- **Zasshi,K**. (2004). Epidemiological invistigation of beta-lactam antibiotic induced vancomycin MRSA comparition of detection rate of BIVR with or without CZX .,**78** (8) : 717 - 21.

- **Zetola, N., Francis, J. S., Nuermberger, E. L. and Bishai, W. R.** (2005). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : an emerging threat. Lancet Infect. Dis., **5**:275-286.
- **Zhang, H. Z.; Hackbarth, C. J.; Chansky, K. M.; and Chambers, H. F.** (2001). A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta lactams in staphylococci. Science . **291**: 1962-1965.
- **Zhang, K., McClure, J., Elsayed, S., Louie, T. and Conly, J. M.** (2005) . Novel multiplex PCR assay for characteriszation and concomitant subtyping of the staphylococcal cassette chromosome *mec* Types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiol., **43**: 5026-5033 .

Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Al-Qadisiya

College of Science

Detection of some Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*

Isolated from Clinical Cases in Al-Diwanyia City

A Thesis
Submitted to The Council of The College of Science
University of Al-Qadisiya as Partial Fulfillment of The Requirements for The Degree of Master of Science in
Biology / Microbiology

By

Mustafa Raad Jowad
B. Sc/Biology/ Al-Qadisiya University 2010

Supervision by
Dr. Maitham Ghaly Yousif
Al-Qadisiya University/College of Science

1434 A.H.
٢٠١٣ A.D.