وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة

التوصيف المظهري والوراثي لعزلات *Staphylococcus aureus* المقاومة للـ Methicillin والمعزولة من مصادر سريرية مختلفة

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

ساره فوزي سهم

بكالوريوس علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة ديالى 2010

بإشراف

د. هادي رحمن الطائي
أستاذ

د. عباس عبود الدليمي
أستاذ

1440 هـ

2019 م

1. Introduction

The staphylococci

Staphylococcus aureus (*S.aureus*) belongs to the *Staphylococcaceae* family and is Gram positive bacteria forming microscopical irregular grape-like clusters. It has been initially observed by Ogston (1881), when defining their importance in bacteremia. Since Ogston' work, 49 staphylococci species were identified and recorded on the taxonomy database of NCBI (Islam,2011).

Staphylococcus is one of the most prevalent bacteria in nature. It exists in soil, air, on the skin, mucous membranes and the upper respiratory tract. It is also presnt naturally in the teeth, nose and pharynx. These bacteria can cause severe health problems, such as deep skin injuries or may reach the blood stream and other body tissues and organs causing blood poisoning and heart valve inflammation in addition to other serious diseases (Federhen, 2012).

Staphylococcus aureus which resist the usual antibiotics used in routine infection treatment is called Methicillin resistant *staphylococcus aureus* (MRSA), which is primarily found as endemic bacteria in hospitals, and known as HA-MRSA [Hospital acquired-MRSA], but when it is settled in the community, then it is known as community acquired-MRSA (C-MRSA), which is resistant to many other types of antibiotics (Ameer *et al.,* 2015).

Many virulent agents of *S. aureus* increase its susceptibility including capsule, which helps it in resisting bacteria, phagocytosis and enables it to form other enzymes, such as protease, lipase and staphylocyanase, which helps the bacteria to invade and spread in tissues and to produce α-and-β type lipoproteins as well as the production of food poisonings (Ryan and Ray, 2004).

The appearance of multiple antibiotic resistant strains with is due to antibiotics misuse as well as the high frequency of random use of these antibiotics. Bacterial resistance to antibiotics is one of the most common serious threats, and infections due to bacterial resistance are nowadays very common, and even some pathogenic bacteria become resistant to multiple kinds of antibiotics. *S.aureus* is becoming a main public health problem because of the continuous elevation in antibiotic resistance, particularly MRSA (Oliveira A. 2011).

Increased antibiotic resistance by bacteria causes increase in research and studies on using alternative therapies and drugs. Application of nanoparticles is one of the alternative methods of treatment. The sizes of nanoparticles range between (1-100 nanometers). Physical, chemical and biochemical methods can be used to obtain metal nanoparticles (Duran *et al.*, 2010).

Since ancient times, it was known that silver and its compounds have different impacts towards bacteria and viruses because their particles are too small (less than 5 nm), which increases the surface area and causes migration to the outer surface of nanoparticles, leading to the increase of their chemical activities and production of free radicles (Lok *et al*.,2006).

Titanium dioxide (TIO2) nanoparticles are largely used for killing different microorganisms, including bacteria, viruses and fungi, since it possesses a high photo catalysis (Allen, 2008).

For analysis of the genetic properties and phylogeny of MRSA, several methods were developed. Multi locus sequence typing (MLST), which possesses highly discriminatory ability, has been increasingly applied and become the gold standard of the evolutionary microbe studying. This method of typing identifies bacterial isolates through

comparing nucleotide variations in housekeeping genes and enables an in depth investigation of epidemiology (O'Hara et al., 2016).

Due to the lack of studies on the genetic detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Iraq, this study was conducted in Baquba Teaching Hospital / Diyala Governorate, shedding light on the following :

1: Isolation of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from wounds and burns and abscesses.

2: Detection the resistance of isolates against antimicrobial agent from different families, including fluoroquinolones, beta lactam, aminoglycosides etc., as well as the study of the minimum inhibitory concentration MIC and the minimum bactericidal concentration MBC for some of these antibiotics.

3: Study the effect of nanoparticles (Silver Nano particles (Ag NPs) and Titanium dioxide TiO_2 NPs) on the growth of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA).

4: Genetic typing of the of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using the Multi locus sequence typing system (MLST) of the Housekeeping genes.

تم في هذه الدراسة تشخيص (80) عزلة من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية من (110) عينات اخذت من المرضى الراقدين في مستشفى بعقوبة التعليمي / محافظة ديالى خلال الفترة من شهر حزيران 2018 إلى نهاية شهر اب 2018 واشتملت العينات على مسحات الجروح والحروق والخراجات.

تم تشخيص جميع العزلات اعتمادًا على الفحوصات المجهرية والكيميائية الحيوية و اختبار فايتك-2 (Vitek 2) ، اذ وجد أن بكتريا المكورات العنقودية الذهبية شكلت 80 (72.7 ٪) من العزلات فيما شكلت المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) 50 (62.5٪) من تلك العزلات.

اظهرت جميع عزلات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) البالغ عددها (50) عزلة نتائج إيجابية لاختبار انزيم الكاتاليز و كذلك أظهرت هذه العزلات نتائج ايجابية لاختبار إنزيم التخثر ، بينما اظهرت هذه العزلات نتائج سلبية لاختبار انزيم الأوكسيديز. أظهرت نتائج اختبارات عوامل الضراوة أن جميع عزلات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) البالغ عددها (50) كانت منتجة للاغشية الحيوية و لانزيم الهيمولايسين، وان جميع هذه العزلات تم صبغها بصبغة غرام باللون الازرق . و بينت النتائج أن جميع عزلات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) الـ 50 (100٪) عزلة كانت منتجة لانزيم اليورياز ، في حين أن 32 (64٪) منها كانت منتجة لانزيم البروتياز المحلل للبروتين و 15 (30٪) منتجة لانزيم اللايبيز المحلل للدهون و 12 (24٪) منتجة للبكتريوسين فيما كانت 35 (70 ٪) من هذه العزلات منتجة لانزيم staphylokinase. اوضحت النتائج كذلك بان 7(14%) من هذه العزلات كانت منتجة لانزيمات بيتا لاكتميز واسعة الطيف (ESBLs) بينما كانت 28 (56%) عزلة منها منتجة لانزيمات بيتا لاكتميز المعدني (MBLs).

تم اجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية باستخدام 17 نوعا من هذه المضادات وهي Amikacin AK, Augmentin AUG, Azithromycin AZM, Cefotaxime CEF, Ciprofloxacin CIP, Clindamycin DA, Chloramphenicol CL, Methicillin ME, Norfloxacin NOR, Oxacillin OX, Penicillin G P, Rifampin RA, Tetracycline TE, Ofloxacin OFL, Sulphamethoxazole/Trimethoprim SXT, Vancomycin VA, Gentamycin CN

الخلاصة

أظهرت النتائج أن أعلى مقاومة كانت بين مجموعة بيتا لاكتام ، حيث كانت نسبة المقاومة (100٪) Augmentin و Tetracycline وOxacillin و Methicillin و Penicillin بينما كانت نسبة المقاومة (90٪) Rifampin وTrimethoprim . كشفت النتائج أيضًا عن مقاومة بلغت نسبتها (88٪ و 76٪ و 70٪)لمضادات Amikacin و Gentamycin و Cefotaxime على التوالي. وكانت أدنى نسبة مقاومة (9.7٪) ضد Vancomycin .

تراوحت قيمة التركيز المثبط الادنى (MIC) للميثيسيلين بين (256-1024ميكروغرام/مل) بينما كانت قيمة التركيز القاتل الادنى (MBC) (<1024ميكروغرام / مل).

تم فحص التأثير لتراكيز مختلفة من الجسيمات النانوية للفضة Ag NPs والجسيمات النانوية لثنائي اوكسيد التيتانيوم TiO_2NPs على عزلات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسلين MRSA وأظهرت النتائج أن قيمة التركيز المثبط الاصغري لجسيمات Ag NPs هي (325-5200 ميكروغرام / مل) وقيمة التركيز المثبط الاصغري لجسيمات TiO2NPs (40.6 -2600 ميكروغرام / مل).

في هذه الدراسة ، تم استخدام طريقة التنميط المتسلسل متعدد المواقع (MLST) لدراسة التنوع الوراثي للمكورات الذهبية المقاومة للمثيسلين MRSA المعزولة من جروح وحروق وخراجات المرضى ، ومعرفة نقاط التشابه والاختلاف بين الجراثيم المعزولة وهو الهدف الرئيسي من هذه الدراسة. تم الحصول على سبعة جينات هي جينات تشخيصية وتركيبية تسمى جينات العناية والتدبير housekeeping genes وهي: arc (Carbamate kinase), aro (Shikimate dehydrogenase), glp (Glycerol kinase), gmk (Guanylate kinase), pta (Phosphate acetyltransferase), tpi (Triosephosphate isomerase), yqi (Acetyle coenzyme A acetyltransferase اخذت من الموقع الاكتروني لمعهد باستور.

تم اختيار خمسة عزلات لاجراء فحص تفاعل البلمرة المتسلسلPCR . تم اجراء تسلسل الجينات لجميع العزلات الخمس باستخدام أداة بحث الارتصاف المحلية الأساسية (BLAST) في المركز الوطني للمعلومات للتكنولوجيا الحيوية (NCBI). تمت ملاحظة تباين النوكليوتيدات مع تحديد ألائل كل موقع. ثم تم استخدام ملف تعريف الائل كل عزلة لتحديد نوع التسلسل. تم رسم شجرة وراثية (dendrogram) باستخدام مزيج فريد من الاليلات كنوع من انواع التسلسل.

الخلاصة

اعتمدت الشجرة الوراثية dendrogram على مصفوفة من الاختلافات الثنائية بين الملفات الاليلية لسبعة جينات حيث تم تمييز نوعين من التسلسلات (ST) من بين العزلات الخمسة.

تم تشخيص عزلة عراقية جديدة سجلت في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) وفي البنك الياباني للحمض النووي (DDBJ) بأسم *Staphylococcus aureus* IRQS1015 .