



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم



الكشف البكتريولوجي والجزيئي لبكتريا المكورات العنقودية

الذهبية المحمولة في الأنف في مدينة بعقوبة

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية العلوم - جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

نورهان عبدالستار رمضان

بكالوريوس علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ديالى 2013

بإشراف

د. كريم ابراهيم مبارك

(استاذ مساعد)



المقدمة : Introduction

المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* هي بكتيريا موجبة لصبغة كرام، موجبة لأنزيم الكاتاليز، وعامل التخثر، تعود إلى جنس *Staphylococcus*، توجد بشكل رئيسي على الجلد والغشاء المخاطي للأنف لدى معظم الأفراد الأصحاء (Ugwu et al., 2015)، وتعد من العوامل المسببة للأمراض وتستوطن الأشخاص الأصحاء كنبيت طبيعي دون أن تسبب أعراض أو مرض (Abimana et al., 2019). يُعد الأنف أحد الأماكن القليلة التي تستطيع البكتيريا من خلاله الوصول بصورة مباشرة إلى داخل الجسم، وبالتالي يمكن أن يكون الأنف والممرات الأنفية بيئة مثالية لبعض أنواع البكتيريا ومنها بكتيريا *S. aureus* باعتبارها من أهم البكتيريا المسببة للأمراض بما في ذلك إصابات الجلد والإصابات الجهازية وتساهم بشكل كبير في الالتهابات المكتسبة في المستشفى والمجتمع في جميع أنحاء العالم، إن وجود البكتيريا في جوف الأنف يُعتبر مشكلة صحية خطيرة (Chen et al., 2012) وتنقسم على نوعين أساسيين هما: مكورات عنقودية ذهبية مقاومة للميثيسيلين Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) ومكورات عنقودية ذهبية حساسة للميثيسيلين Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA)، المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين MRSA هي سلالة ممرضة مسؤولة عن صعوبة علاج الالتهابات في الإنسان (Bonar et al., 2016).

تُعتبر المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين من أكثر الأنواع خطورة في الجلد والأنسجة الرخوة وتجفيف الأنف وتقاوم أغلب مضادات الحياة، وتعتبر ذات مقاومة متعددة لذلك يكون علاجها صعباً، وغالباً ما يميل هذا المرض إلى التكرار وقد ينتشر بين أفراد الأسرة الواحدة، إذ إن بعض الأشخاص الأصحاء يكونون حاملين لبكتيريا *S. aureus* (Ibler and Kromann, 2014)، وترتبط عادة بمعدل الإمبراضيات والوفيات morbidity and mortality يمكن تقسيم عدوى بكتيريا



Hospital associated Methicillin Resistance *S. aureus* MRSA إلى إصابات مرتبطة بالمستشفى
Community associated Methicillin *aureus* (HA-MRSA) وإصابات مرتبطة بالمجتمع
Resistance *S. aureus* (CA-MRSA) (Khan *et al.*, 2018).

تُعد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية سبباً متكرراً للإصابات المهمة سريريًا والتي تتراوح شدتها من الالتهابات السطحية إلى الأمراض الغازية الشديدة (Deng *et al.*, 2014)، تُعد مقدمة الانف المكان الرئيسي لانتشار هذه البكتريا إلى مواقع الجسم الأخرى (Nsofor *et al.*, 2015)، كما ذكرت دراسات أخرى بأنها المسبب المرضي للإنسان، إذ وُجد بأن ما يقارب 20-30% من سكان العالم تتعايش هذه البكتريا في أنوفهم وتقريباً 10-40% من الأشخاص هم مرضى خارجيين أو ناقلين لعدوى بكتريا المكورات العنقودية الذهبية (Lamers *et al.*, 2011).

تمتلك بكتريا المكورات العنقودية الذهبية القدرة على غزو نسيج المضيف وانتشارها فيه، وإن أمراضيتها تعود الى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة Virulence factor مثل عامل الالتصاق الذي يمكنها من الالتصاق بسطح الخلية، والمحافظة التي تساعد البكتريا في مقاومة عملية البلعمة، فضلاً عن امتلاكها لجدار الخلية الذي يعمل على مقاومة الجهاز المناعي للمضيف، كما تستطيع هذه البكتريا إنتاج الكثير من الذيفانات والأنزيمات خارج خلوية التي تمكن البكتريا من إحداث الإصابة، مثل الأنزيم المخثر للبلازما Coagulase الذي يعمل على تثبيط عملية البلعمة (O'Riordan and Lee, 2004). يحدث انتشار العدوى عادةً في مناطق الاتصال القريبة مثل

المدارس وغيرها عن طريق تلوث اليدين والسطوح (Odu and Okonka, 2012)،

نظراً لامتلاك المكورات العنقودية الذهبية العديد من عوامل الضراوة والمقاومة العالية لمضادات الحياة المختلفة هذا يسبب صعوبة في العلاج ويتطلب الكشف عن مصادر الحاملين لها وبالتالي



الوقاية منها، وتكون عوامل الضراوة منظمة بأحكام وتعمل على تحطيم خلايا المضيف والأنسجة وتغيير الاستجابة المناعية، وتمكنها من الانتشار داخل وخارج خلايا المضيف، وقد أدى الاستخدام المفرط والعشوائي لمضادات الحياة إلى ظهور سلالات بكتيرية مقاومة لها (Davoodabadi *et al.*, 2016)، وإن التطور الكبير الحاصل في علم الأحياء الجزيئي وتقنيات الهندسة الوراثية المتطورة والدقيقة والسريعة لها دور كبير في التحري عن جينات الضراوة و المقاومة لمضادات الحياة، بالإضافة الى التحري عن العناصر الوراثية التي لها العلاقة بالإمراضية من دون اللجوء إلى الطرق التقليدية في العزل والتشخيص واختبار الحساسية لمضادات الحياة (Nassif and Sansonetti., 1986).

تُعد المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* للأشخاص الأصحاء الحاملين لها في الأنف *Healthy persons carriers* وبشكل خاص أولئك الذين يتعاملون مع الآخرين من العاملين في المستشفيات والمهن الأخرى واحدة من أهم مصادر الإصابة *Sources of infection* للعديد من الأمراض التي تسببها هذه البكتريا للإنسان فضلاً عن تباين نسبة انتشارها من مجتمع لآخر عليه أُجريت هذه الدراسة بهدف البحث عن انتشار هذا النوع من البكتريا لعدم وجود دراسة بهذا الصدد في مدينة بعقوبة وذلك من خلال اتباع الخطوات التالية:

- 1- عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية من الأنف باستخدام الطرق الجزيئية.
- 2- الكشف عن بعض عوامل الضراوة لعزلات البكتريا مظهرياً.
- 4- الكشف عن مقاومة البكتريا لمضادات الحياة المستخدمة في العلاج وتحديد قيم التركيز المثبط الأدنى MIC.
- 5- الكشف الجزيئي عن جينات *fnbA* و *mecA* في العزلات قيد الدراسة بواسطة تقنية PCR.

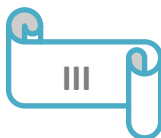


الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة عزل وتشخيص 50 عزلة تعود الى بكتريا *Staphylococcus aureus* من أصل 450 عينة جُمعت من الأنف ومن مصادر مختلفة تضمنت الأشخاص الأصحاء، الكادر الصحي، المرضى الراقدين في المستشفى، مرضى الجيوب الأنفية، مرضى الدامل، طلبة المدارس ومن مهن مختلفة وشملت عمال مطاعم، عمال أجبان، عمال المقاهي والحلاقين وتضمنت 200 عينة من الإناث و250 عينة من الذكور تراوحت أعمارهم من (1-80) سنة للفترة من 2018/9/20 ولغاية 2019/2/20. تم تشخيص العزلات بالاعتماد على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية التي تضمنت فحص الكاتاليز، مخثر البلازما Coagulase، الاوكسديز وفحوصات اخرى، وتم تأكيد التشخيص باستخدام جهاز VITEK 2 Compact فضلاً عن إجراء التشخيص الجزيئي للكشف عن وجود جين 16S rRNA.

اُختبرت قابلية العزلات على إنتاج بعض عوامل الضراوة فأنتجت جميع العزلات الهيموليسين من نوع بيتا β وبنسبة 100 % وبالنسبة لأنزيم البروتيز كانت 35 عزلة وبنسبة 70 % منتجة له، كما اُختبرت قابلية العزلات على إنتاج أنزيم اللايباز فكانت 40 عزلة وبنسبة 80 % منتجة له، أما أنزيم اليوريز فظهرت النتائج بأن 48 عزلة من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية وبنسبة 96 % لها القدرة على إنتاجه، في حين أنّ 30 عزلة وبنسبة 60 % من هذه البكتريا كانت لها القدرة على إنتاج أنزيم الستافيلوكاينيز، وبالنسبة لأنزيم DNase كانت 41 عزلة وبنسبة 82 % لها القدرة على إنتاجه، أما الغشاء الحيوي فكانت 33 عزلة وبنسبة 66 % من بكتريا *S. aureus* لها القدرة على تكوينه.

اُختبرت مقاومة العزلات تجاه اثنا عشر مضاداً حيوياً بطريقة الانتشار بالأقراص Kirby-Bauer ، وقد أظهرت النتائج أنّ جميع العزلات كانت مقاومة لمضاد Penicillin G و Oxacillin





بنسبة 100 % ، بينما قاومت عزلات *S.aureus* مضادات Azithromycin و Erythromycin و Tetracycline بنسب 94 % و 76 % و 72 % على التوالي، وكانت المقاومة بنسبة 36 % لكل من المضادين Clindamycin و Chloramphenicol، في حين أبدت عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية مقاومتها لمضاد Gentamycin بنسبة 32 % ، ومضاد Vancomycin بنسبة 8 %، أما باقي المضادات والتي هي Doxycycline و Trimethoprim- Sulfanmide و Ciprofloxacin و فكانت نسبة حساسية العزلات للمضادات أعلى من مقاومتها فبلغت نسبة المقاومة لهذه المضادات 26 % ، 20 % و 14 % على التوالي .

أظهرت نتائج اختبارات المقاومة المتعددة لمضادات الحياة أن جميع العزلات في الدراسة الحالية تمتلك صفة المقاومة المتعددة لمضادات الحياة، حيث بينت النتائج بأن هنالك عزلة واحدة قاومت جميع المضادات المستخدمة في الدراسة بينما أبدت عزلتان مقاومتها لـ احد عشر مضاداً حيوياً واختلفت باقي العزلات في عدد المضادات التي قاومتها.

حُدِّد التركيز المثبط الأدنى MIC للمضادين Gentamycin و Doxycycline بطريقة التراكيز المتسلسلة المتضاعفة إذ تبين أن قيم التراكيز المثبطة الدنيا MIC لمضاد Gentamycin تراوحت بين 8- 256 مايكروغرام/ مل، أما مضاد Doxycycline فقد تراوحت قيم MIC له من 16-1024 مايكروغرام/ مل.

أخيراً تم استخلاص الحامض النووي DNA لـ (10) عزلات بكتيرية، وأُجري تفاعل البلمرة التسلسلي PCR من خلال استخدام عدة البودئ المتخصصة لها، وبينت نتائج تفاعل PCR أن جميع العزلات تمتلك جين الالتصاق *fnbA* وبنسبة 100 % ، أما بالنسبة لجين المقاومة *mecA*



فتطابقت نتائج التشخيص الوراثي مع نتائج التشخيص المظهري بأن جميع العزلات التي قاومت الميثيسيلين امتلكت جين المقاومة *mecA* وبنسبة 100 %.