



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

مقارنة وراثية و بكتريولوجية بين *Staphylococcus* spp. و
Streptococcus spp. المقاومة لمضادات الـ Macrolide و المعزولة
من إصابات سريرية مختلفة .

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الأحياء المجهرية

من قبل

سيف علي محمد الحيالي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2012

بإشراف

أ. م. د. هادي رحمن رشيد الطائي

1. المقدمة Introduction

تضم المكورات الموجبة لصبغة كرام عدة أجناس ذات صفات مشتركة منها كروية الشكل ، لاهوائية اختيارية ، إذ تعد جزءاً من النبيت الطبيعي و تكون متعايشة مع الانسان ، إضافة إلى ذلك تعد من الممرضات المهمة للانسان و الحيوان إذ تتميز بقدرتها على إحداث أنواع مختلفة من الإصابات في مواقع متعددة من الجسم (Brooks و آخرون ، 2010) .

إن إمرضية الجنسين *Streptococcus* و *Staphylococcus* مرتبطة بقدرتها على أنتاج العديد من عوامل الضراوة التي تشمل أنتاج الذيفانات المحللة 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 و متلازمة الجلد الحرشفي العنقودي والانزيمات الخارج خلوية مثل أنزيم السنافيولوكاينيز ، والبروتينيز ، واللايبيز ، و الستربتوكاينيز التي تسهم في غزو البكتيريا للأنسجة ، وانتشار الخمج بالإضافة إلى امتلاكها جدار الخلية الذي يعد تركيباً مستضدياً لاحتوائه على التراكيب المستضدية (الببتايدوكلايكان ، وحامض التوكويك ، وبروتين A) ، ويعمل جدار الخلية على مقاومة الجهاز المناعي للعائل ، ويشكل حماية أوزموزية للخلية البكتيرية وغيرها من العوامل الاخرى مما يعطي هذه الاجناس القدرة على التضاعف والانتشار داخل أنسجة العائل (Gillespie و آخرون ، 2006) .

إن لهذه الاجناس القدرة على التسبب بمدى واسع من الأمراض مثل الدامل ، والخراجات المختلفة وخراجات الجروح الناتجة عن العمليات الجراحية ، والتهاب الجلد والأنسجة الرخوة ، والتهاب العظام ، والتهاب الرئة القصي ، والتهاب الأجزاء الداخلية للقلب ، التهاب البلعوم واللوزتين ، الحمى الروماتزمية من التهاب المفاصل وغيرها (Willems و آخرون ، 2013) .

تعد مضادات الـ Macrolide من أهم عوائل المضادات الحياتية ؛ و ذلك لأستخدامها في علاج العديد من الأخماج الناتجة عن البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة غرام ، تنتج من الفطر *Streptomyces* أو بكتريا *Arthrobacter* ، التركيب الكيميائي لها مكون من حلقة كبيرة من اللاكتون Macro lacton ring cyclic مؤلفة من 10 – 60 ذرة مرتبط بها سكر سداسي (desosamine ، cladinose) وهناك مواقع جانبية في حلقة اللاكتون هي :R4,R3,R2,R1 يضاف لها جذور كيميائية مثل (CH₃) وغيرها لإنتاج مشتقات هذه المجموعة ، الية عمل الـ Macrolide هي تثبيط التخليق الحيوي Biosynthesis للبروتين عن طريق الارتباط بالوحدة الريبوسومية الكبيرة 50s للبكتريا وبالتالي منع خطوة تبديل الموضع (Translocation) مما يؤدي الى أيقاف عملية الترجمة Translation (Mankin ، 2008) . أن سوء إستخدام المضادات الحياتية وكذلك كثرة الاستخدام من الاسباب التي أدت الى نشوء المقاومة المتعددة

لمضادات الحياة وبالتالي تدفق كبير للجينات في عالم المايكروبات إذ إنتشرت المقاومة بشكل واسع بواسطة البلازميدات وغيرها من وسائل الانتقال الافقي للجينات مما ساعد الممرضات على مواجهة الضغط الانتخابي الذي تفرضه المضادات إذ أصبحت مقاومة الاحياء متعددة أي أن السلالة الواحدة تقاوم عدد من المضادات كما هو الحال في MRSA ، كما وأصبحت الاصابات المستعصية العلاج مصدرها المستشفيات ، حيث تؤدي في بعض الدول المتقدمة الى 5000 حالة وفاة سنوياً ، و تحدث الإصابة لأكثر من ربع مليون شخص ممن يترددون المستشفيات الكبيرة سنوياً (الخفاجي ، 2008 ; Larson ، 2007) .

تعد مقاومة الـ Erythromycin و عناصر الـ Macrolide الأخرى واسعة الانتشار في البكتريا الكروية الموجبة لصبغة غرام حيث لوحظت زيادة المقاومة للارثروميسين في أنحاء العالم كافة . اليات المقاومة ضد مجموعة الـ Macrolide هي إما نتيجة التحوير في الموقع الهدف (Target site modification) أو تحوير الدواء بواسطة الأنزيمات من خلال التعبير الجيني للـ بلازميد أو الـ ينقول Transposons الحساوي على جينات الـ erm gene المشفرة لهذه الالية ، أو من خلال انظمة الدفع الخارجي Efflux system والتي تشفر من قبل الجين *mef A* (Shain و آخرون ، 2002 ; Reyes و آخرون ، 2007) . أشارت الدراسات الى إمكانية ظهور توليفة تضم المورثات *erm* و *mef* مجتمعتين معاً في بكتريا *S. pneumonia* و *S. pyogenes* و *S. agalactiae* و *S. aureus* تشفر لمقاومة Macrolide (Kataja و آخرون ، 2000) .

نظراً لقلّة وجود دراسات في العراق (ديالى) بشأن الكشف الجزيئي عن طرق مقاومة *Staphylococcus spp* و *Streptococcus spp* لمضادات Macrolides بين المرضى الراقدين وغير الراقدين في مستشفيات محافظة ديالى جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على ما يأتي :

- تحديد الأجناس البكتيرية الكروية الموجبة لملون غرام الأكثر شيوعاً و المسببة للاخماج المختلفة بين المرضى الراقدين وغير الراقدين في مستشفيات ديالى المختلفة .
- إجراء دراسة مقارنة بين عوامل الضراوة للأجناس المختلفة و دراسة حساسية العزلات لمضادات الـ Macrolide .
- الكشف عن الجين *erm A* و *mef A* المشفر للانزيمات المحطمة و أنظمة الدفع Efflux pump للمضاد الحيوي الارثروميسين باستخدام تقنية PCR .

الخلاصة Summary

جمعت 200 عينة من مصادر متنوعة شملت (الادرار، والدم ، ومسحات الأذن الوسطى ، والقشع ، والجروح ، و البلعوم ، و مسحات مهبلية) من مستشفيات (بعقوبة العام ، البتول للولادة ، و بلدروز العام) بالإضافة الى بعض المراكز الصحية و ذلك للفترة من 1 / 9 / 2013 لغاية 1 / 1 / 2014 ، حيث أظهرت 75 عينة وبنسبة (37.5%) نموا سالبا للزرع البكتيري و 125 عينة (62.5%) نمواً موجباً للزرع البكتيري .

تم الحصول على 40 عزلة تعود للجنسين *Staphylococcus* و *Streptococcus* spp . إذ شخصت العزلات باستخدام الاختبارات الزرعية ، والمجهرية ، والكيموحياتية فضلا عن الفحص التأكيدي للعزلات باستخدام نظام *api 20 staph and strep* . وصلت نسبة *Staphylococcus* المعزولة من الدم الى 33.3% ومن الادرار 12.6% و من البلعوم 36% ، ومن الاذن الوسطى 13.8% ، و من الجروح 18.7% ، أما نسبة *Streptococcus* المعزولة من البلعوم فكانت نسبتها 30.7% ، و من القشع 11.7% ، ومن الجروح 6.2% .

تم اختبار حساسية جميع العزلات لبعض مضادات الـ Macrolide الشائعة الاستخدام بالإضافة الى مضاد الكلنداميسين العائد لعائلة الـ Lincosamides ، أظهرت النتائج أن مقاومة *S. aureus* للارثرومايسين وصلت الى نسبة 50% ، و للارثرومايسين بنسبة 45% ، و للكلنداميسين بنسبة 25% . أما *S. epidermidis* فقد كانت النسب كالتالي 66.6% للارثرومايسين و 44.4% للارثرومايسين ، و 11.11% للكلنداميسين . أما بالنسبة للجنس *S.pyogenes* فكانت نسب المقاومة كالتالي 25.5% للارثرومايسين ، و 25.5% للارثرومايسين ، و 14.5% للكلنداميسين .

تم تحديد التركيز المثبط الأدنى لمضاد الارثرومايسين للعزلات قيد الدراسة والتي أظهرت مقاومة تجاه هذا المضاد في فحص الحساسية بطريقة الاقراص (المقاومة) حيث تراوحت قيم MIC للعزلات بين (32-64) مايكروغرام / مل .

تم التحري عن قابلية عزلات *Staphylococcus* spp . و *Streptococcus* spp على إنتاج بعض عوامل الضراوة وقد أظهرت النتائج أن تلك العزلات كانت منتجة لعدة أنواع من الأنزيمات والذيفانات التي تسهم عادة في أمراضيتها ومن هذه الأنزيمات أنزيم البروتياز ، و اللايباز ، و اليوريز ، و الأنزيم المحلل للدنا ، و الستافيلوكاينيز ، و الستربتوكاينيز و كذلك

II

أظهرت هذه العزلات قدرتها على إنتاج أربعة أنواع من الهيمولاييسين (ألفا ، بيتا ، كاما ، و دلتا). كما و تم التحري عن قابلية العزلات على إنتاج الطبقة اللزجة Slime layer باستخدام طريقة أكار احمر الكونغو وقد بينت النتائج أن كلا الجنسين لها القدرة على إنتاج الطبقة اللزجة فقد أظهرت النتائج أن (65%) من عزلات بكتريا *S. aureus* منتجة للطبقة اللزجة بينما كانت جميع عزلات *S.epidermidis* و بنسبة 100% منتجة للطبقة اللزجة ، بينما أظهرت 75% من عزلات *S.pyogens* قدرتها على إنتاج الطبقة اللزجة .

أجريت عملية أستخلاص للدنا الكلي البكتيري لـ (12) عزلة ثم أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات *Staphylococcus spp.* و *Streptococuss spp.* المقاومة للـ Mcrolide وذات MIC أكثر من 64 مايكروغرام/ مل والموجبة النمو على الوسط المعلم بالارثرومايسين من خلال أستعمال البوادى المتخصصة التي تستهدف التسلسل النوعي للجين *erm A* و *mef A* ، رُجِلت نواتج التضاعف على هلام الأكاروز بتركيز 1% و لوحظ ظهور حزمة واحدة في جميع المسارات في الهلام بالمستوى نفسه بالنسبة للجينين . أظهرت النتائج أن نسبة وجود الجين *erm A* في عزلات *S. aureus* وصل الى 80% و في عزلات *S.epidermidis* 30% ، وفي عزلات *S.pyogens* وصلت النسبة الى 50% ، أما بالنسبة للجين *mef A* فكانت نسبة توافره في عزلات *S. aureus* 20% ، و في عزلات *S.epidermidis* 40% ، و في عزلات *S.pyogens* 50% .