جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جـامـعـة ديـالـى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

التحري الجزيئي عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من عينات سريرية مختلفة

اطروحة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في علوم الحياة

من قبل الطالبة

ملاح نورالدين عيسى الفياض

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2004
ماجستير علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2016

بإشراف

أ.د. كريم ابراهيم مبارك

1443هـ 2021م

Repuplic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Science
Biology Department

Molecular detection of some virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from different clinical specimens

A Thesis

submitted to the council of College of Education for Pure Science , University of Diyala in partial fulfillment of the requirements of the degree of Doctorate of Philosophy of Science in biology

By

Melah Noor Al-deen Essa Al Fayad

B.Sc. in Biology / University of Diyala (2003-2004)

M.Sc.Biology/ College of Education for pure Science/ University of Diyala 2016

Supervised by

Dr. Karem Ibrahim Mubarak

Professor

1443 **2021**

المقدمة : Introduction

ان بكتريا *Staphylococcus aureus* من الانواع البكتيرية الممرضة التي تعود لعائلة Staphylococcaceae والتي تقسم الى مجموعتين رئيسيتين بالاعتماد على القدرة لانتاج انزيم التجلط Coagulase ،المكورات العنقودية المنتجة لهذا الانزيم Coagulase positive staphylococci (CoPS) هي *Staphylococcus aureus* و *S. intermedius* و *S. hyicus* *S. pseudointermedius* و *S. delphini* و *S.lutrae* ، اما البكتيريا غير المنتجة لانزيم التجلط Coagulase Negative Staphylococci (CoNS) فهي تتضمن *S. haemolyticus* و *S. epidermidis* و *S.capitis* (Thomer واخرون ،2016).

تعد بكتريا *S.aureus* بكتريا موجبة لصبغة كرام، ولها قطر يتراوح بين 0.5-1.5 مايكروميتر، وهي غير متحركة وغير مكونة للسبورات ولاهوائية اختيارية (Forbes واخرون ،2007)، ان لهذه البكتريا القدرة على الامراضية الانتهازية وهي مرتبطة بقدرتها على انتاج العديد من عوامل الضراوة التي تشمل الذيفانات Toxins والانزيمات الخارج خلوية Extracellular enzymes ، مما يعطي البكتريا قدرة على الانتشار والتضاعف داخل الانسجة الحية للمضيف ، فضلا عن مقاومتها العالية والمتعددة لمضادات الحياة ولاسيما التي تعود لمجموعة البيتالاكتام والامينوكلايكوسايد(Chan واخرون ،2016).

لقد ازدادت في الاونة الاخيرة مقاومة بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* لمضادات الحياة وهذا بدوره يشكل مشكلة صحية خطيرة ومن ضمنها مضاد Vancomycin والذي يستعمل بديلا لمضادات البيتالاكتام المستخدم ضد المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* المقاومة المثيسيلين(MRSA) (*S. aureus* Methicillin Resistance)(Kromannو Ibier ،2014).

تمتلك بكتريا المكورات العنقودية ايضا جينات لمقاومة السيفالوسبورينات والبنسلينات وخصوصا (Penicillin G) المسؤولة عن انتاج انزيمات البيتالاكتام β –Lactame وهذه الجينات يكون

منشأها اما كروموسومي او بلازميدي او بسبب حدوث الطفرات الوراثية في البروتينات المرتبطة بالبنسلينات Penicillin Binding Proteins (PBPS) (Levinson، 2014) .

لقد اشارت الدراسات الى ان لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية جينات مقاومة لمضادات الامينوكلايكوسايد وعلى وجه التحديد مضاد Gentamicin والسبب في ذلك يعود لوجود جين متخصص مسؤول عن المقاومة لذلك المضاد حيث انه يعمل على تحوير موقع الهدف Target site وذلك بارتباط المضاد معه مما يؤدي الى حدوث المقاومة (Mirzaee واخرون، 2014 ; Jaddoa و Al-Mathkhury، 2018).

ان للمكورات العنقودية الذهبية القدرة على انتاج العديد من عوامل الضراوة المسببة لعدة امراض مثل متلازمة الصدمة السمية Toxic Shock Syndrom (TSS) والذيفان المعوي Enterotoxin المسبب للتسمم الغذائي Food poisoning والذيفان المقشر exfoliative Toxin ، وهذه السموم لها القدرة على عمل ثقوب في الغشاء البلازمي لخلايا الانسجة المصابة وهذا يؤدي الى تدفق الجزيئات والفيتامينات والمواد الضرورية الى خارج الخلية وبالتالي موتها (Hamza واخرون ،2015; Sankomkai واخرون ،2020). ان لهذه البكتريا القدرة على انتاج الطبقة اللزجة Slyme layer وتوفر لها هذه الخاصية امكانية الالتصاق على جسم الانسان كالجلد والاغشية المخاطية وتجنبها ايضا تأثيرمضادات الحياة (Keikhaie واخرون ،2017 ; Horvath واخرون ،2020).

ان للمكورات العنقودية الذهبية عوامل ضراوة اخرى وهي افرازها للانزيمات التي منها انزيم اللاييز Lipase المحلل للدهون وانزيم Hyaluronidase الذي يساعد البكتريا على الانتشار من خلال تحطيم المادة الاساس للنسيج الرابط وانزيم البروتييز Protease المحلل للبروتينات وانزيم الهيمولايسين Hemolysin المحلل للهيموغلوبين وايضا انزيم Staphylokinase الذي يحل خثرة الفايبرين (Diab واخرون ،2021).

جميع عوامل الضراوة الانفة الذكر يشفر لها عن طريق جينات تكون موجودة في مناطق تدعى بالجزر الامراضية pathogenicity islands والتي تحمل على الكروموسوم، اوقد تحمل على البلازميدات (Jaran،2017) .

الهدف من الدراسة Aim of the study

بالنظر لقلة وجود دراسات جزيئية لعوامل ضراوة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية وزيادة اهميتها السريرية في مدينة بعقوبة اقترحت هذه الدراسة بهدف دراسة عوامل الضراوة في هذه البكتريا والجينات المشفرة لها وكذلك حساسية العزلات لعدد من المضادات الحيوية وباعتماد الخطوات التالية :

1. عزل وتشخيص بكتريا *Staphylococcus aureus* من عينات سريرية مختلفة .

2- الكشف عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بالطرائق المظهرية والكيموحيوية والتحري عنها باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)وهي :

أ. الكشف عن الجينات المشفرة لتكوين الغشاء الحيوي *icaA* ، *icaB* ، *icaC* ودراسة التعبير الجيني لها.

ب – الكشف عن الجين المشفر لانتاج السموم المعوية *see* A ، *see* B ، *see* C ، *see* D ، *see* E.

ج- الكشف عن الجين المشفر لانتاج السم المسبب لمتلازمة الصدمة السمية Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST) (*tst*) .

د-الكشف عن الجينات المشفرة لانتاج السموم الحالة لكريات الدم البيضاء Panton Valntene Leukocidine (PVL) (*lukS – lukF*) .

هـ – الكشف عن الجينات المشفرة لانتاج السموم الحالة لكريات الدم الحمراء (*hlb – hlg*) .

3- دراسة قابلية بكتريا *S.aureus* على التعبير الجيني لانتاج الغشاء الحيوي قبل وبعد معاملتها بمضادي الجنتامايسين والازثرومايسين.

Summary

The study included 175 samples,collected from different clinical sources of different ages and from both sexes,they where 45 urine samples, 40 blood samples, 30 swabs from ear, 25 swabs from nasal, 24 swabs from burns and 11 samples were taken from sputum, all of them were collected in the consulting clinic / Baquba Teaching Hospital / Diyala from April 2018 to August 2018, The results of the bacteriological diagnosis of the samples showed that 40 samples, at a rate of 22.85% were negative growth of bacterial culture, and 135 samples, at a rate of 77.14%, showed a positive growth of bacterial culture, and the highest percentage of the isolated bacteria was *Staphylococcus aureus*, as the total number 55 isolates (39%).

The sensitivity of *S. aureus* isolates to Oxacillin was tested , so 21 (38.18%)isolates were methicillin-resistant (MRSA) and 34 isolates, (61.81%) were methicillin- susceptible (MSSA).

The results of current study showed that the isolation ratios of *S. aureus* according to the source were as follows: Blood 12 (81-21%), of which 9 (16.36%) MSSA and 3 (5.45%) MRSA, 13 (23.63%) ear , 7 isolates (12.72%) were sensitive to MSSA, and 6 isolates (10.9%) MRSA, from nasal 10 (18.18%), 7 (12.72%) MSSA and 3 (5.45%) MRSA, urine UTI was 9 isolates (16.36%), of which 4 isolates were sensitive to methicillin with a percentage (7.27%) and 5 isolates (9.09%) methicillin-resistant, sputum 6 (10.90%), the isolation rate for both MSSA and MRSA

was (5.45%) 3, the lowest percentage of *S. aureus* was isolated from Burns, as it was recorded (1.81%) for MRSA.

S.aureus isolates were tested for their susceptibility to 10 antimicrobial agents by standard disk diffusion method. The results showed that all *S. aureus* isolates showed 100% resistance to penicillin, 47% to Ceftaroline, the rate of MRSA resistance to Gentamicin was 100%, while MSSA bacteria resisted the antagonist by 32%, the percentage of resistance of the bacteria under study to Azithromycin was 100% in MRSA bacteria while it was 61.76% in MSSA bacteria. The rate of resistance to Tetracycline was different between MRSA and MSSA bacteria, as it reached 71.42% and 41.17%, respectively, the percentage of resistance to Doxycycline in MRSA was 23.80%, while MSSA bacteria did not completely resist the antagonist and were 100% sensitive to it.

All isolates of S.aureus bacteria under study showed 100% for ability to produce biofilm using the CRA method, but in different quantities, and 100% biofilm was formed when using the tube method, the results of the biofilm formation test using the microtiter plate (MTP) of MRSA showed Three isolates(14.28%) formed the biofilm with strong strength, and 15 isolates (71.42%) were moderate, while the remaining three isolates formed a weak biofilm , as for the results shown by MSSA isolates, 5 isolates (14.70%) were formed a strong biofilm with 55.88%, moderate biofilm(29.41%) of MSSA isolates, as it formed a weak biofilm.

Depending on PCR investigations the current results showed that presence of *ica* A,B,C genes was confirmed in all *S. aureus* MRSA and MSSA isolates at 100%.

The results of the investigation of genes encoding for the production of enterotoxins in S.aureus were,sea 3(15%),seb 4(20%),sec 4(20%),sed 6(30%) and see 4(20%).

Summary

The presence of genes encoded to produce hemolysins (*hlg*, *hlb*) was investigated, and it was found that the *hlb* gene was carried in 20(100%) of isolates under study, , while the *hlg* gene was present in 5(25%) of isolates.

The results of the investigation of genes encoding for the production of leukolytic toxin showed that20 (100%) contained the *luk*-S gene and an isolation rate of 10(50%) was containing the *luk*-F gene.

The results of the current study indicated that 9 (45%) of isolates was carrying the *tst* gene that encodes for the production of the toxic shock syndrome toxin.

Quantitative gene expression was studied using quantitative reverse transcription (real-time PCR) of 10 *S. aureus* isolates before and after treatment with Azithromycin at sub MIC concentration (μg / ml 128), and antagonist. Gentamicin at sub MIC concentration (16 μg / ml) to determine the effect of these antagonists on the amount of gene expression of genes encoded for biofilm production.

All MRSA isolates showed high genomic expression of the *ica* A gene after treatment with Azithromycin, and the gene expression values ranged between (54.86 - 1.61). As for the isolates of MSSA bacteria, the isolates (SA50, SA48, SA35) were not expressed after treatment with the antagonist, while the two isolates were maintained (SA 31, SA 24) on its ability to express gene after treatment with an antagonist

All MRSA isolates showed good expression of the *icaA* gene after treatment with Gentamicin, and the folding gene expression values ranged between (53.34 - 1.18), in MSSA isolates were 4 of them unexpressed after treatment with the antagonist and one isolate had a gene expression value of 1.04.

Summary

4 isolates out of a total of 5 MRSA bacteria showed good gene expression for the *icaB* gene, while the SA20 isolate did not show any gene expression. On the other hand, 3 MSSA isolates showed good expression, and gene expression was stopped in the isolates (SA50, SA48), so there were no significant differences between MRSA and MSSA isolates after treating the isolates under study with Azithromycin.

The results of the quantitative gene expression of the *ica* B gene showed that three isolates of MRSA crossed, at high values, so the value of Folding SA2 (26.67) and SA8 (47.94) was less than the expression shown by the isolate SA16, it reached 9.83, while the gene expression was stopped in the isolates SA14,and SA24. on the other hand, none of the MSSA isolates showed a gene expression, indicating that the gene expression process of the *ica* B gene in it was stopped after treatment with Gentamicin.

After treating isolates under study with Azithromycin, the quantitative gene expression of the *ica* C gene was measured, in the isolation SA8 (59.79) ,the isolate SA2 (14.76) ,in the isolate of SA16 (9.89) and (2.13) in isolation of SA14, while in isolate SA20 the gene expression was stopped, while the gene expression values ranged between (8.60 - 2.36) in four isolates of MSSA bacteria and the gene expression was stopped by isolation.

The results of the gene expression of the *ica* C gene after treating isolates under study with Gentamicin ,showed that only two MRSA isolates genetically crossed SA8 (64.97) and SA2 (4.42). As for the rest of the MRSA isolates, their gene expression stopped after treatment with the antagonist, while they did not express. Only two isolates of MSSA after treatment with Gentamicin were expressed ,SA50 (2.07) and SA48 (1.35).