



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم
قسم علوم الحياة



تميط كاسيتات المئيسيلين الكرموسومية في بكتريا المكورات العنقودية المعزولة من مرضى مدينة بعقوبة

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية العلوم- جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة
من قبل الطالبة

نور غفوري قدوري الدليمي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة ديالى / 2005

إشراف

د. هادي رحمن رشيد الطائي

(أستاذ)



Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Diyala
College of Science
Department of Biology



**Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) typing in
methicillin - resistant *Staphylococcus* spp isolated from patients
in Baquba city**

A Thesis

Submitted to the College of Science, University of Diyala in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Master Degree of Science in Biology

By

NOOR GHAFFOORI QADDOORI ALdulaimi

B.Sc. Biology/ College of Science/ Diyala University/2005

Supervised by

Dr. Hadi Rahman Rasheed Al-Taai

(Professor)

2024 A.D

1446 A.H

Chapter One

Introduction

1.1. Introduction

Staphylococcus genus constitutes a large part of the natural human microflora, which mainly inhabits the skin and nostrils and can transform into opportunistic pathogens and cause a severe infection of individuals in the community and hospitals if the body barriers are breached (such as damage to the skin and mucous membranes) or if the immune system is weakened (Kateete *et al.*, 2020).

Coagulase production is one of the most essential characteristics for differentiating between *Staphylococci* spp. Consequently, *Staphylococcus* species are divided into two categories: the coagulase-positive *Staphylococci* (CoPS), which mainly comprise the more pathogenic *Staphylococcus aureus*, and the minor pathogenic coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS), which include the majority of the species (França *et al.*, 2021).

Staphylococcus aureus is the most frequently isolated pathogen causing blood stream infections, and often resist many types of antibiotics. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) has become a worldwide public health and hospital concern due to the high prevalence of antimicrobial resistance to methicillin and other antimicrobials and its relationship with the inappropriate use of antimicrobials. Therefore, the prevalence of MRSA is still used as an indicator of appropriate antimicrobial usage and reasonable infection control and prevention precautions (Lade *et al.*, 2022). Documented data showed that nearly 50–70% of all *S. aureus* strains isolated from the hospital environment were MRSA (Abdolmaleki *et al.*, 2019).

Staphylococcus epidermidis is among the most critical pathogens of Coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS), responsible for hospital infections associated with the blood stream and infections related to prosthetic devices and vascular catheters

(Bellou *et al.*, 2022). It has been noted that the increasing resistance of *S. epidermidis* to several antibiotics is one of the significant concerns related to CoNS infections, which is further aggravated not only by the phenomenon of multidrug resistance but also by the ability of *S. epidermidis* to create biofilm, which makes them more tolerant to antibiotics than free-living cells. As a result, treating infection of CoNS has become increasingly challenging (França, 2023).

Resistance of MRSA to almost all Beta-Lactams is often associated with resistance to different classes of antibiotics, such as oxazolidinones, lipopeptides, lincosamides, macrolides, and aminoglycosides (Lade *et al.*, 2022). Aminoglycosides are bactericidal agents that inhibit bacterial protein synthesis. They play an essential role in treating Staphylococcal infection by binding specifically to the 16S rRNA of the 30S ribosomal subunit, thus interfering with protein synthesis. Amikacin, Gentamicin, and Tobramycin are the most active aminoglycosides against Staphylococcal infection and are often used in combination with other classes of antibiotics, such as Beta-lactams (El-Baz *et al.*, 2021).

Staphylococci have a wide range of multi-antibiotic-resistant determinants, most located on plasmids that mediate resistance to several significant antibiotics and can be transferred between Staphylococcal species such as *S. epidermidis* and *S. aureus*, mainly because of *S. aureus* acquired drug-resistant genomic island-Staphylococcal cassette chromosome (SCC) elements carrying the *mecA* gene (SCC*mec*) (Asante *et al.*, 2020).

The most common mechanism for acquiring methicillin resistance in *Staphylococci* is inserting the mobile genetic element SCC*mec*, into the chromosomes of sensitive strains. This produces a penicillin-binding protein (PBP2a/2c) encoded by *mec A*. This significantly reduces the binding affinity to β -

lactam antibiotics, thereby producing resistance to β -lactam antibiotics (Hou *et al.*,2023). Which is responsible for conferring resistance to other non- β -lactam drugs. The high diversity in the structural organization and genetic content of SCC *mec* elements have led to their classification into types and subtypes, which have recently been found in various species. However, these elements share several similar structural characteristics (Lakhundi and Zhang,2018).

1.2. The aims of current study:

Determining molecular diversity of Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in Methicillin-resistant *S. aureus* and *S. epidermidis*, obtained from patients in the Baquba city, as well as their association between antibiotic resistance to Aminoglycoside and a different classes of antibiotics. The thesis was implemented using the following steps:

- 1-Isolation of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* bacteria from patients attending Baqubah city hospitals and diagnosis by morphological, biochemical, Vitek 2-GP system.
- 2-Phenotypic detection of some virulence factors.
- 3-Detection of the resistance of isolates to Aminoglycoside antibiotics.
- 4-Detection of the *mecA* gene and *PVL* gene.
- 5-Detection of some antibiotic resistance genes Aminoglycoside *aac*(6')-Ie-*aph*(2'')-Ia, *ant*(4')-Ia, and *aph*(3')-IIIa .
- 6-Typing cassettes (SCC*mec*),(Mec complex -Universal (mA6) -Class A -Class B -Class C (IS2) as well as *Ccr* complex (Determining the I, II, III and IV type).

الخلاصة

في السنوات الأخيرة، كان هناك زيادة مقلقة في الإصابات المرتبطة بالمستشفيات الناجمة عن سلالات المكورات العنقودية المقاومة لعدة أدوية. لذلك، تم استخدام تصنيف SCCmec كأداة رئيسية في علم الأوبئة الجزيئية لدراسة MRSA وفهم تطور هذه الأنواع من المكورات العنقودية.

تم جمع مائتين واثنين وعشرين عينة سريرية من مرضى راجعوا مستشفيات مختلفة في محافظة ديالى بين أيلول 2023 وكانون الثاني 2024. تضمنت هذه العينات عينات من (حروق، جروح، مسحات أذن، مسحات أنف، مسحات حلق، بول، دم، سوائل، وخراجات). أشارت نتائج الدراسة إلى أنه تم العثور على عزلات بكتيرية في 130 عينة، بينما كانت 92 عينة سلبية. باستخدام كل من الطرق الميكروبيولوجية التقليدية ونظام VITEK 2 Compact، تم تحديد أن 42 من العزلات، والتي تشكل 18.9% من الإجمالي، هي عزلات من المكورات العنقودية الذهبية. في المقابل، تم تحديد 27 عزلة، والتي تشكل 12.1% من الإجمالي، على أنها عزلات من المكورات العنقودية البشرية. تم تشخيص العزلات المقاومة للميثيسيلين باستخدام طريقة انتشار قرص cefoxitin. أظهرت النتائج أن 28 من 42 (66.6%) من عزلات *Staphylococcus aureus* كانت مقاومة للميثيسيلين (MRSA)، بينما 14 من 42 (33.3%) منها كانت حساسة للميثيسيلين (MSSA) في الوقت نفسه، أظهرت النتائج أن 17 من 27 (62.9%) من عزلات *Staphylococcus epidermidis* كانت مقاومة للميثيسيلين (MRSE)، بينما كانت 10 من 27 (37.03%) منها حساسة للميثيسيلين (MSSE).

كانت نسبة انتشار عزلات *S. aureus* الأعلى في مسحات الأذن، حيث تمثل 8 من 28 (28.57%) من الحالات، تليها الجروح 6 من 28 (21.4%)، ومسحات الأنف 4 من 28 (14.2%)، و3 عزلات من 28 (10.7%) لكل من الدم، ومسحات الحلق، ومسحات الحروق، وأخيراً البول 1 من 28 (3.57%). بينما كانت نسبة انتشار عزلات بكتيريا المكورات العنقودية البشرية *S. epidermidis* كالتالي: 8 من أصل 27 (29.6%) عزلة من الدم، 7 من 27 (25.9%) عزلة من الحروق، 5 من 27 (18.5%) عزلة من البول، 4 من 27 (14.8%) عزلة من الجروح، 2 من 27 (7.4%) عزلة من مسحات الأذن، وأخيراً 1 من أصل 27 (3.7%) عزلة من مسحات الأنف.

جميع عزلات المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* البالغ عددها 42 أظهرت نتائج إيجابية للإنزيم التخثر خارج الخلية (CoPS) ، واختبارات Dnase و Gelatinase . وفي المقابل، أظهرت نتائج سلبية لإنزيم Oxidase ، وأنتجت جميع عزلات المكورات العنقودية الذهبية تحللًا دمويًا من نوع بيتا (β -hemolysis) حول مستعمراتها. في الوقت نفسه، أظهرت (27) عزلة من *S. epidermidis* نتائج سلبية للإنزيم التخثر خارج الخلية (CoNS) واختبارات Dnase و Gelatinase وإنزيم oxidase ، وايضا لا تنتج *S.epidermidis* أي انحلال دم حول مستعمراتها. تم تحديد نتائج مقاومة المضادات الحيوية لجميع عزلات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) ضد (12) نوعًا من المضادات الحيوية كما يلي: Ceftriaxone (96.4%)، Amoxilline-clavulanic acid (82.1%)، مجموعة الأمينوكلايكوسيدات (Gentamicin 42.8%)، Amikacin 7.1%، Kanamycin 67.8%، Streptomycin 42.8%، Netlimycin 3.5%، Tobramycin 21.4%، Azithromycin (78.5%)، Ciprofloxacin (42.8%)، (32.1%)، Trimethoprim-sulfamethoxazole و Tetracyclin (60.7%) . أما بالنسبة لمقاومة 12 نوعًا من المضادات الحيوية لجميع عزلات *S. epidermidis*، تم تحديد النتائج على النحو التالي: Ceftriaxone (96.2%)، Amoxilline-clavulanic acid (29.6%)، ومجموعة الأمينوكلايكوسيدات (Gentamycin (14.4%)، Netlimycin (3.7%)، Streptomycin (3.7%)، Kanamycin (48.1%)، Amikacin (3.7%) و Tobramycin (14.8%)، Azithromycin (74%)، Ciprofloxacin (33.3%)، Trimethoprim- sulfamethoxazole (70.3%) و Tetracyclin (51.8%).

يمكن تصنيف العزلات الثمانية والعشرين من MRSA إلى نمطين متميزين بناءً على أنماط مقاومة المضادات الحيوية. على وجه التحديد، تم تصنيف 13 من أصل 28 عزلة (46.4%) على أنها عزلات متعددة المقاومة للمضادات (MDR)، بينما تم تصنيف 15 من أصل 28 عزلة (53.5%) على أنها عزلات ذات مقاومة دوائية شديدة (XDR). بالمقارنة، أظهرت العزلات السبعة والعشرون من *S. epidermidis* أن 5 (18.5%) منها كانت متعددة الحساسية للأدوية (MDS) ، و 10 (37.03%) منها كانت متعددة المقاومة للمضادات (MDR) و 12 (44.4%) منها كانت ذات مقاومة شديدة للمضادات (XDR).

أظهرت عملية الكشف عن النمط الظاهري لتكوين الأغشية الحيوية باستخدام Micro-titer plate لعزلات MRSA أن 15 / 28 (53.5%) عزلة كانت تشكل أغشية حيوية قوية، و 11 / 28 (39.2%) عزلة كانت

تشكل أغشية حيوية متوسطة، بينما 2 / 28 (7.1%) عزلة كانت تشكل أغشية حيوية ضعيفة. بالمقابل، كشفت النتائج الحالية أن 18 / 27 (66.6%) من عزلات *S. epidermidis* تم تصنيفها على أنها تشكل أغشية حيوية ضعيفة، بينما 9 / 27 (33.3%) عزلة تم تصنيفها على أنها تشكل أغشية حيوية متوسطة. العلاقة بين تكوين الأغشية الحيوية ومقاومة المضادات الحيوية: أظهرت الدراسة الحالية وجود علاقة سلبية بين تكوين الأغشية الحيوية و *S. epidermidis*، حيث كانت معظم مقاومة المضادات في العزلات التي تشكل أغشية حيوية ضعيفة. في نفس الوقت، هذه النتائج لا تتفق مع نتائج *S. aureus*، حيث كانت معظم المقاومة للمضادات الحيوية في العزلات التي تشكل أغشية حيوية قوية، وهذا يدل على وجود علاقة إيجابية.

في الدراسة الحالية، تم إخضاع 10 عزلات من MRSA المقاومة للجنتاميسين لتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لتضخيم جين *mecA*، وسجلت جميعها نتائج إيجابية بنسبة 100%، وفي نفس الوقت، سجلت 5 عزلات من MRSE المقاومة للجنتاميسين نتائج إيجابية بنسبة تصل إلى 80%. بالمقابل، أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة وجود جين *PVL* بين 15 عزلة تم اختبارها لكلا سلالتي *Staphylococci* كانت (0%)، مما يشير إلى أن جميع العزلات تم اكتسابها في المستشفى.

تم فحص جينات المقاومة للأمينوكلايكوسيدات في العزلات باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) أظهر تحليل PCR أن من بين عزلات MRSA العشرة، كانت 2 (20%) تحتوي على جين *aac(6')-Ie-aph(2'')*، وكانت 2 (20%) تحتوي على جين *aph(3')-IIIa*، بينما كان جين *ant(4')-Ia* غائب تماماً. أظهرت نتائج تقنية Multiplex-PCR بالنسبة *S. epidermidis* أن تردد الجينات *aac(6')-Ie-aph(2'')*، *aph(3')-IIIa*، و *ant(4')-Ia* بين 5 عزلات MRSE كان 20% لكل منها.

باستخدام تحليل PCR للكشف عن نوع *SCCmec* بين 10 عزلات MRSA، أظهرت النتائج أن معظم عزلات 10/7 (70%) كانت من الصنف I، تليها عزلة واحدة (10%) كانت من الصنف III، مما يؤكد انتشاراً عالياً لصنف *SCCmec* الأول في مستشفيات بعقوبة في محافظة ديالى. بالمقابل، كانت أنواع *SCCmec* II و IV و V غير موجودة تماماً. في نفس الوقت، تم تحديد صنف واحد فقط من *SCCmec* لعزلات MRSE، كانت معظم العزلات 3 / 5 (60%) من الصنف I، تليها 2 / 5 (40%) كانت غير قابلة للتمييز. بينما لم نتمكن من التعرف على عزلات MRSE من أنواع *SCCmec* II أو III أو IV أو V.

أشارت نتائج تنميط 10 عزلات من MRSA المقاومة للعديد من الأدوية XDR إلى وجود 7 نسائل متميزة، تم تصنيفها إلى مجموعتين رئيسيتين ومجموعتين فرعيتين، كما تبين وجود ثلاث عزلات كانت فريدة ومنفصلة بناءً على قيمة القطع المحددة. في نفس الوقت، بالنسبة لـ 5 عزلات من MRSE المقاومة للعديد من الأدوية XDR ، أشارت النتائج إلى وجود 4 نسائل متميزة وكانت عزلة واحدة فريدة. تُعتبر هذه العزلة الأصلية للعزلات النسيجية الأخرى.