# دراسة مقاومة بعض من عزلات بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* المقاومة للمثيسلين في مستشفيات عدن

**محمد فضل الميسري، حسن محمد الرهوي و لاريسا عبدالله عوض الشيخ**
قسم علوم الحياة، كلية العلوم والتربية، جامعة عدن – اليمن
DOI: https://doi.org/10.47372/uajnas.2015.n1.a05

## الملخص

أجريت هذه الدراسة لعزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* المقاومة لمضاد المثيسيلين .وتم أخذ العينات من جروح الأشخاص المصابين بأخذ مسحة من الجرح بوساطة القطيلة القطنية المعقمة "Swab" ,وأظهرت الدراسة بعد إجراء الزرع البكتيري والفحوص الكيموحيوية كفحص الإنزيم المختر للبلازما وفحص إنزيم المحلل الدنا المقاوم للحرارة وفحص احتواء التليورايت وتخمير المانيتول هوائياً..إلخ.تم الحصول على 50 عزلة تابعة لبكتريا *S.aureus* ,ثم تم تحديد العزلات المقاومة للميثسلين وأظهرت الاختبارات إن 8 عزلات كانت مقاومة للميثسلين "MRSA" *S.aureus*وهي العزلات التي استكملت عليها الخطوات اللاحقة لهذه الدراسة.

تم التحري عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز بعد أن ًاجري فحص الحساسية تجاه المضادات الحيوية وعددها '17' مضاداً.أظهرت نتائج إنزيم البيتالاكتاميز أنً 6 عزلات أعطت نتائج موجبة لهذا الفحص .ثم اجري ترحيل العزلات في جهاز الترحيل الكهربائي لمعرفة محتواها من البلازميدات وأظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي أنً5 عزلات تمتلك حزمتين بلازميدتين في حين كانت عزلتان تمتلك أربع حزم بلازميدية واحتوت عزلة واحدة على حزمة بلازميدية واحدة .

**الكلمات المفتاحية:** المثيسلين،*S.aureus* ،جروح ، بلازميد.

## المقدمة:

أدى دخول البنسلين ومشتقاته بداية القرن العشرين إلى الحد من الإصابة بهذه البكتريا *Staphylococcus aureus*, إنهًا لم تدم طويلاً ,إذ ظهرت السلالات مقاومة بفعل إنتاج هذه البكتريا لإنزيمات البيتالاكتاميز.وتعد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلين Methicillin-resistat *Staphylococcus aureus (MRSA)*.من أكبر المشاكل الصحية في المستشفيات لما تسببه من إصابات تهدد حياة المرضى لاسيما الذين يعانون ضعفاً في المناعة.

وقد بًين[8] أنً هذا النوع من بكتريا*S.aureus* من أكثر أنواع المكورات العنقودية أهمية من الناحية السريرية للإنسان فهي تمتلك العديد من العوامل التي تسهم في إحداث المرض.وأوضح[3]أنً بكتريا MRSA هي السبب الرئيس للعدوى المرتبطة بالمستشفيات منذ عام 1960 وفي عامي 2009 و 2010 هي الأكثر شيوعاً للعدوى المرتبطة بالمستشفيات بنسبة 8.5% في مستشفيات الولايات المتحدة الأمريكية.

هدفت الدراسة إلى معرفة مدى حساسية هذه العزلات المحلية لمضاد المثيسلين ومعرفة حساسيتها للمضادات الأخرى المستعملة في علاجها ودراسة المحتوى البلازميدي وعلاقته بمقاومة المضادات ومدى مقدرتها على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز.

## المواد وطرائق العمل:

تم جمع العينات من أشخاص مصابين بجروح من مستشفيات محافظة عدن وأجريت التجارب اللاحقة على العينات في مختبرات كلية العلوم الجامعة المستنصرية- بغداد .

### عزل البكتريا:

تم عزل (50) عزلة تابعة لبكتريا *Staphylococcus aureus* بأخذ عينات من جروح أشخاص مصابين بوساطة Swab وتم تشخيص العزلات باستخدام الفحوص الكيموحيوية التي تحدد نوع البكتريا موضع الدراسة كفحص إنزيم مختر البلازما وفحص إنزيم المحلل الدنا المقاوم للحرارة وفحص إنتاج الأسيتون وتم أيضاً فحص العزلات باستخدام شريط *api-Staph*المصنَّع من قبل شركة (bio-Merieux).ولتحديد العزلات المقاومة للمثيسيلين"MRSA" تم اخذ لقاح للعزلات خفف بنسبة 10:1أضيف إلى أطباق مولرهنتونأجار المدعومة ب(6)مكغم/مل من مضاد المثسيلين و4% وزن/حجم من الملح Naclوبعد..نمو البكتريا على هذه الأطباق ثم اختبارها بطريقة انتشار الأقراص لمضادي المثسيلين و الاوكساسيلين وفق طريقة [12].

### الكشف عن إنتاجإنزيم البيتالاكتاميز:

تم الكشف عن الإنزيم باستخدام طريقة اليود السريعة وفق ماذكرً [17]، وُضِع (0.5) مل من محلول بنسلين ج في صفر[Wells of microtitreplate] وبعدها لُقِّح المحلول بمستعمرات حديثة بوساطة العروة (Loop) حُضِنت في درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة ثم أضيف إليها(0.2) مل من محلول النشاء و(0.1) مل من كاشف اليود حيث ينتج اللون الأزرق من تفاعل اليود مع النشاء وسُجلتَ نتيجة موجبة عند تغَير اللون الأزرق سريعاً إلى عديم اللون وًعَد سالباً في حالة عدم تغير اللون الأزرق لمدة (10) دقائق وقورنت النتائج مع العزلة القياسية السالبة **ATCC 25923***S.aureus*.

### الكشف عن الدنا البلازميدي بطريقة الترحيل الكهربائي:

اعتمدت الطريقة التي ذكرها [11]في فصل قطع ألدنا البلازميدي,وتمت عملية الترحيل الكهربائي بإضافة(5)ميكروليتر من دارئ التحميل إلى(10)ميكروليتر من محلول الدنا البلازميدي المستخلص وبعد المزج بصورة جيدة حمل على الهلام الموجود في جهاز الترحيل الكهربائي .ثبت فرق الجهد في الجهاز بمقدار (1.5) فولت/سم حين اقتراب حزمة البروموفينولا لأزرق من نهاية الهلام، ثم نُقَل الهلام إلى الحوض الحاوي على صبغة بروميد الايثدبوم بتركيز نهائي (0.5)مكغم/مل ترك الهلام لمدة (30) دقيقة وغمر بعدها بمحلول (TBEIX) لمدة (15) دقيقة لإزالة الصبغة الزائدة ًوضِع الهلام وفُحِص بالأشعة فوق البنفسجية بطول موجي (340) نانوميتر لملاحظة حزم الدنا البلازميدي.

## النتائج والمناقشة:

من بين 50عزلة عائدة إلى بكتريا *S.aureus* تم الحصول على 8 عزلات فقط كانت تتمتع بمقاومة مضاد المثسيلين "MRSA" ويبين الجدول "1" ذلك.

**جدول (1) :**مقاومة عزلات *S.aureus* "MRSA"للمضادات الحيوية ونسبتها المئوية.

| المضاد الحيوي | عدد العزلات المقاومة | النسبة المئوية |
|---|---|---|
| بنسلين ج | 8 | 100 |
| اموكسيسلين | 8 | 100 |
| امبسلين | 8 | 100 |
| كلوساسلين | 5 | 62.5 |
| اوكساسلين | 8 | 100 |
| كارنبسلين | 7 | 87.5 |
| سيفالكسين | 8 | 100 |
| سيفتازيديم | 8 | 100 |
| سيفوتاكسيم | 8 | 100 |
| جتامايسين | 5 | 62.5 |
| تتراسايكلين | 8 | 100 |
| ارثومايسين | 6 | 75 |
| لينكومايسين | 7 | 87.5 |
| فانكومايسين | 0 | 0 |
| كلورامفينكول | 3 | 37.5 |
| تراي ميثوبريم | 7 | 87.5 |
| تيكراسيلين | 8 | 100 |

ومن الجدول السابق يتبين أنَ عزلات *S.aureus*المدروسة والمقاومة للمثسيلين "MRSA" كانت لها مقاومات عالية للمضادات الحيوية المدروسة وعددها "17" مضاداً وفق الجدول السابق والذي يبين نسب مقاومة العزلات لكل مضاد كما هو موضح في الجدول ,وتجدد الإشارة إلى انه بالرجوع إلى فحص الحساسية للمضادات الحيوية يتبين أنَ عزلتين فقط تمكنت من مقاومة "16"مضاداً وبنسبة94% وأربع عزلات تمكنت من مقاومة "14" مضاداً في حين أنَ عزلة واحدة قاومت "13" مضاداً وأخرى قاومت "11" مضاد ,وافشلت العزلات في مقاومة مضاد واحد هو الفانكومايسين وقد وصلت حساسيتها لذلك المضاد إلى100% و اتفقت نتائجنا مع ما توصل إليه[1و]10 .وقد أوضح[15]أنَ إفراز إنزيمات البيتالاكتاميز ليست الميكانيكية الوحيدة التي من خلالها قاومت بكتريا *S.aureus*مضادات البيتالاكتام ولكن هناك ميكانيكيات أخرى للمقاومة.وقد بين [2]إن مقاومة البكتريا المدروسة لمضاد المثيسلين تكون من خلال خفض الفة البروتينات المرتبطة بالبنسلين (PBPs) مما يجعل البكتريا قادرة على تحمل التأثير القاتل للمضاد ,وقد أوضح[16]إلى أنَ مقاومة بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثيسلين نتيجة امتلاكها جين mec-A المحمول على الكروموسوم والمشفر لتخليق(PBP2a) .أمَا بالنسبة لمقاومة البكتريا MRSAلمضاد التتراسايكلين فأنَها تعمل من خلال تنشيط تخليق

البروتين عن طريق ارتباطها بتحت الوحدة (205) لجزئية الرايبوسوم تحول دون ارتباطها .وأشار [7] إلى أنَ مقاومة بكتيريا MRSAللتراسايكلين يكون من خلال محددات وراثية تقع على الكروموسوم تدعى tetA(M) .

أمَا المضادات التي تنتمي إلى مجموعة ماكروليديز مثل ارثومايسينولينكومايسين فإنَ مقاومة البكتريا MRSA لها تتم من خلال ارتباطها بتحت الوحدة الكبيرة (60s) لجزئية الرايبوسوم وإيقاف عملية صناعة البروتين[9] .أمَا مقاومة البكتريا "MRSA" لمضاد تراي ميثوبريم فتعود إلى محددات وراثية تدعى dfrA المحمولة على ألجين القافز[14]Tn4003 .

وقد أشار[13]إلى أنَ مقاومة البكتريا لمضاد الفانكومايسين تتم بتغيير موقع عمل هذا المضاد من خلال حدوث تغيير بالنفاذية مما يعيق وصول المضاد إلى هدافه في حين أشاربين[5]إلى وجود بعض العزلات المقاومة للفانكومايسين نتيجة لتحملها الفعل القاتل لهذا المضاد .

## الكشف عن إنزيمات البيتالاكتاميز:

أظهرت نتائج فحص إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز أن"6" عزلات لبكتريا MRSA كانت موجبة لهذا الإنزيم "جدول2" باستعمال طريقة اليود السريعة، وتعد هذه الطريقة من بين الطرائق الأكثر ملائمة للبكتريا الموجبة لصبغة جرام ذلك بإطلاق البكتريا إنزيماتها خارج الخلية إلى الوسط[17].

**جدول2:** قابلية العزلات لإنتاج إنزيم البيتالاكتاميز

| العزلة | إنتاجالإنزيم |
|---|---|
| $Ws_1$ | +++ |
| $Ws_2$ | ++ |
| $Ws_3$ | ++ |
| $Ws_4$ | +++ |
| $Ws_5$ | ++ |
| $Ws_6$ | - |
| $Ws_7$ | ++ |
| $Ws_8$ | - |

+++:إنتاج عالي للإنزيم يؤدي إلى حدوث تغَير سريع بلون الكاشف خلال الـ5 دقائق الأولى للفحص .
++:إنتاج متوسط يؤدي إلى حدوث تغير بلون الكاشف خلال الـ10 دقائق الأولى للفحص .
+: إنتاج ضعيف للإنزيم يؤدي إلى تغير بلون الكاشف بعد الـ10 دقائق الأولى للفحص .
– :غير منتجة للإنزيم .

## الكشف عن ألدنا البلازميدي :

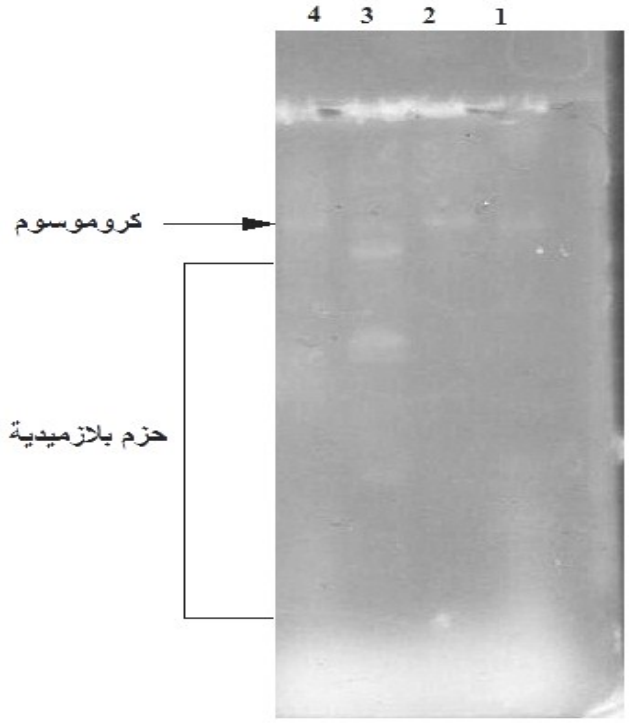
أظهرت نتائج ترحيل الدنا البلازميدي بوساطة الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بنسبة (1%) .اختلافاً في عدد الحزم للعزلات المدروسة , و أظهرت الدراسة عدم وجود أي ترابط بين الحزم البلازميدية وعدد المضادات الحيوية التي قاومتها العزلات.

ويُبيَن جدول(3)والشكل (1) الحزم البلازميدية التي احتوتها العزلات المدروسة إذ احتوت (5) عزلات على حزمتين هي $Ws_1$، $Ws_3$ ، $Ws_5$ ، $Ws_6$ ، $Ws_8$ ، وا احتوت (2) عزلتين على أربعة حزم بلازميدية هي $Ws_2$, $Ws_7$.وعزلة واحدة احتوت على حزمة بلازميدية واحدة هي $Ws_4$ .وتتفق النتائج مع ما أشار[4]إذ بين إن الحصول عل عزلات متعددة المقاومة من عزلات احتوت على حزمتين أو حزمة بلازميدية واحدة ومع ذلك استطاعت مقاومة عدد اكبر من المضادات الحيوية.إذ أشار [6] الى أنَ المقاومة يمكن أن تكون محمولة على الكروموسوم، ولذا من الممكن الحصول على عزلات مقاومة لعدد أكبر من المضادات الحيوية على الرغم من خلوها من الحزم البلازميدية.

**جدول(3):** أنواع المضادات الحيوية التي أظهرت العزلات المقاومة لها وعدد الحزم البلازميدية

| رمز العزلة | مظاهر المقاومة للمضادات الحيوية | عدد الحزم البلازميدية |
|---|---|---|
| $Ws_1$ | TIC-W-E-TE-CF-CAZ-CL-OX-AMP-AMX-P | 2 |
| $Ws_2$ | TIC-W-LN-E-TE-CF-CAZ-CL-CAR-OX-AMP-AMX-P | 4 |
| $Ws_3$ | TIC-W-LN-E-TE-GM-CF-CAZ-CL-CAR-OX-AMX-AMP-P | 2 |
| $Ws_4$ | TIC-W-LN-TE-GM-CAZ-CF-CL-CAR-CX-AMX-AMP-P | 1 |
| $Ws_5$ | TIC-W-LN-E-TE-CF-CAZ-CL-CAR-OX-AMX-AMP-P | 2 |
| $Ws_6$ | TIC-W-C-LN-E-TE-GM-CF-CAZ-CL-CAR-CX-OX-AMX-AMP-P | 2 |
| $Ws_7$ | TIC-C-LN-TE-GM-CF-CL-CAR-CX-OX-AMX-AMP-P | 4 |
| $Ws_8$ | TIC-W-E-C-LN-TE-GM-CAZ-CF-CL-CAR-CX-OX-AMX-AMP-P | 2 |

بنسلين ج P كلوكساسلينCXسيفوتاكسيمCFلينكومايسينLNتيكرامايسين TIC
امبسلينAMPكاربنسلينCARجنتامايسينGM فانكومايسين VA
اموكسيسلينAMXسيفالكسينCLتتراسايكلينTEكلورامفينولC
اوكساسيلينOXسيفتازيديمCAZارثرومايسينE تراي ميثوبريمW




شكل (1) المحتوى البلازميدي لعدد من العزلات قيد الدراسة:

العمود(1):المحتوى البلازميدي للعزلة SW4 .
العمود(2): المحتوى البلازميدي للعزلةSW3 .
العمود(3): المحتوى البلازميدي للعزلة SW5.
العمود(4): المحتوى البلازميدي للعزلةSW2 .

## References:


1.**Appelbaum,P.C. (2007).**Microbiology of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*.clinical infectious Diseases.45.3:165-170.

2.**Bachii,B. B. (1997).** Factors controlling resistance in *Staphylococcus aureus*: New antibacterial targets in cell wall biosynthesis Antimicrob. Agents chemother.2:15.

3.**Balm,M.N. D; Lover,A.A; Salmon, S.;Tambyah,P.A.and Fisher,D.A.(2013).** Progression from new methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*colonisation to infection:an observational study in a hospital cohort . BMC Infection Diseases ,13,491:1471-2334.

4.**Coleman, D. C.;Estridge, C.T.;Cafferey, R. and Hone, R. (1985).**Susceptibility to antimicrobial agents and analysis of *Staphylococcus aureus* from Dublin hospitals.J.Med. Microbiol.20:157-167.

5.**Faville, R. J.; Zaske, D.E. and Kaplan, E. L. (1978).** *Staphylococcus aureus* endocarditis: combined therapy with vancomycin and Rifampin .J.Am. Med , Assoc.240:1963-1965.

6. **Gelmi, M.; Foresti, L. and Ravizzola, G. (1987).**Antibiotic resistance and plasmids in *Staphylococcus aureus* from Italian hospital.J.Med. Microbiol .23:111-18.

7.**Kayser,F.H. Wust, J. and Corrodi, P. (1972).**Transduction and elimination of resistance determinants in methicilin –resistant *Staphylococcus aureus* .Antimicrob. Agent Chemother.2:217223.

8. **Koneman, E.W.;Allen, S.D.;Janda,W. M.; Schrckenberger,P.C. and Winn, J. W.C. (1992).** Color plate and textbook of diagnostic microbiology.4th.ed.,PP.405-429.J.B.Lippincott company, Washington.

9.**Loncle, V. and Casetta, A. (1993).** Analysis of pristinamycin –resistance *Staphylococcus aureus* isolates responsible for an outbreak in parisian hospital. Antimicrob Agents chemother .37:2159..

10.**Lowy, F. D. (2003).**Antimicrobial resistance:the example of *Staphylococcus aureus* .J Clin Invest.111(9):1265-1273.

11.**Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982).** Molecular cloning ,A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory .cold spring .New York.

12. National Committee for Clinical Laboratory Standards performance Standards for anti-Microbial Disk Susceptibility Tests,4thedn .Approved standard .M2-A4.National committee for Clinical Laboratory Standards,Villanova,PA.1990.

13.**Reynolds, P.E. (1984).**Resistance of the antibiotic target site .Brit .Med.Bull. 40: 3-10.

14.**Rouch,D.A. and Messerotti, L.J. (1989).** Trimethoprim resistance transposonTn 4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolatereductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS 257. Mol.Microbiol .3:161.

15. **Skurray, R. A. (1998).**Resistance to antimicrobial agents other than Beta-lactams.In the Staphylococcion human desease by crossly, K.B. and Archer, GL. (eds.) Harccourtbroce and coltd 175-210.

16. **Song, M. O.; Wach, M.; Doi, M. and Marsuhashi, M. (1987).**FEBS.Lett.221-167.

17. **Sykes,R.B.(1978).**Methods for detecting β-lactamases.p:64-69.In Laboratory methods in anti-microbial chemotherapy. By David, S; Ian, P.David, W .And Richard, W.1st ed. Churchill Livingstone .Edinburgh .London.

# A comparative study of some isolated bacterial *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin conducted in Aden Hospitals

**Mohammed Fadhl Al-Maisary, Hassan Mohammed Al-Rahway and Larisa Abdulla Awad Al-Shiekh**
Dept. of Biology – Faculty of Science and Education, University of Aden - Yemen
DOI: https://doi.org/10.47372/uajnas.2015.n1.a05

## Abstract

The study was carried out for the isolated bacterial staphylococcus aureus resistant to Methicillin. Samples were taken from wounds of the infectious person by swab. After conducting bacterial implant as well as biochemical examinations, such as rennet enzyme, analyzed enzyme,which is heat-resistant, tolerate and menthol fermentation, the study revealed that 50 *staphylococcus aureus* were found, of which only 8 isolates were identified to be methicillin-resistant. These are isolates which would be the matter of the study for further steps.
An investigation was conducted on β-lactamase production after allergy examination was done for antibiotics amounting to 17 kinds.
β-lactamase results showed that 6 isolates indicated positive results for this examination.
These isolates were expelled to electrical expulsion device in order to find out its content of plasmid bands.
The electrical expulsion results of plasmid showed that 5 isolates possess two plasmid bands, while the other two plasmid bands possess four plasmid bands. One isolate only contained one plasmid band.

**Key words:** Methicillin, *S.aureus*, wound, plasmid.