Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Science

Genetic Study of theVancomycin-Resistant *Staphylococcus* spp.

A Thesis

Submitted to the Council of College of Education for Pure Science / Diyala University

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biology/Microbiology

By

Ahmed Issa Jaaffar Al-Tameemi

B. SC. Baghdad University - 2010

Supervised By

prof.Dr.
Abbas. A. Farhan Al-Dulaimi
2012 AD

Assist.prof.Dr
Mohammed F. Shather
1433 AH

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

دراسة وراثية لبكتريا *Staphylococcus* spp. المقاومة لمضاد الفانكومايسين

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة /الأحياء مجهرية

من قبل الطالب

احمد عيسى جعفر التميمي

بكالوريوس علوم الحياة / جامعة بغداد

2009-2010

بإشراف

الاستاذ الدكتور
عباس عبود فرحان الدليمي

الاستاذ المساعد الدكتور
محمد فرج شذر المرجاني

1433 هـ ذوالقعدة

2012 م ايلول

بِسْمِ اللهِ الرَّحْمنِ الرَّحِيمِ

إِنَّا فَتَحْنَا لَكَ فَتْحًا مُّبِينًا (1) لِيَغْفِرَ لَكَ اللَّهُ مَا تَقَدَّمَ مِن ذَنبِكَ وَمَا تَأَخَّرَ وَيُتِمَّ نِعْمَتَهُ عَلَيْكَ وَيَهْدِيَكَ صِرَاطًا مُّسْتَقِيمًا (2) وَيَنصُرَكَ اللَّهُ نَصْرًا عَزِيزًا (3)

صَدَقَ اللهُ العَظِيمْ

سورة الفتح (1-3)

الاهداء

إلى من غرس في نفسي حب العلم والتعلم.. نور عيني ومثلي الأعلى.. أستاذي الأول

..... أبي

إلى من آثارت لي الطريق بدعائها

..... أمي

إلى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة إلى رياحين حياتي

(إخواني و أخواتي)

إلى كل من احبني وتمنى لي الخير

إلى أساتذتي الكرماء

أهدي ثمرة جهدي المتواضع

أحمد عيسى

إقرار المشرفين

نشهد بأن اعداد رسالة طالب الماجستير«**احمد عيسى جعفر**»الموسومة بـ «**دراسة وراثية لبكتريا *Staphylococcus* spp المقاومة لمضاد الفانكومايسين**» قد جرى تحت اشرافنا في قسم علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة/ الأحياء المجهرية .

التوقيع :
الاسم : د.عباس عبود فرحان الدليمي
المرتبة العلمية : استاذ
كلية التربية /جامعة ديالى

التوقيع :
الاسم :د.محمد فرج شذر المرجاني
المرتبة العلمية :استاذ مساعد
كلية العلوم /الجامعة المستنصرية

بناءً على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة .

التوقيع :
الاسم : أ.م. د. نجم عبد الله جمعه
رئيس لجنة الدراسات العليا في قسم علوم الحياة
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / / 2012

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة بأننا قد اطلعنا على الرسالة الموسومة (**دراسة وراثية لبكتريا *Staphylococcus* spp. المقاومة لمضاد الفانكومايسين**) المقدمة من قبل طالب الماجستير (**احمد عيسى جعفر التميمي**) ، وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها ، وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ 30/9/ 2012 ووجدناها مستوفية لمتطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة /الأحياء المجهرية بتقدير (**إمتياز**).

رئيس اللجنة
التوقيع :
الاسم :د.عدنان نعمه عبد الرضا
المرتبة العلمية :استاذ
التاريخ : / / 2012

عضو اللجنة
التوقيع :
الاسم :د. هادي رحمن رشيد الطائي
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
التاريخ : / / 2012

عضو اللجنة
التوقيع :
الاسم :د.صدام حسين جبر الحيدري
المرتبة العلمية :استاذ مساعد
التاريخ : / / 2012

عضواً ومشرفاً
التوقيع :
الاسم : د.عباس عبود فرحان الدليمي
المرتبة العلمية : أستاذ
التاريخ : / / 2012

عضواً ومشرفاً
التوقيع :
الاسم :د.محمد فرج شذر المرجاني
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
التاريخ : / / 2012

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع :
الاسم : د. عباس عبود فرحان الدليمي
المرتبة العلمية : أستاذ
التاريخ : / / 2012

قائمة المحتويات

العنوان	الصفحة
الخلاصة	أ
قائمة المختصرات	I
قائمة المحتويات	II
قائمة الأشكال	XI
قائمة الجداول	X
المقدمة	1
الفصل الأول / إستعراض المراجع	
أستعراض المراجع	
1-1 المكورات العنقودية *Staphylococci*	3
2-1 المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*	4
1- 2- 1 طرق العدوى ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية	5
1- 2- 2 عوامل ضراوة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية	6
1- 2- 3 امراضية المكورات العنقودية الذهبية	10
3-1 المكورات العنقودية غير المنتجة للكواكيوليز (Coagulase negative Staphylococci ;CoNS)	15
1-3-1 تصنيف المكورات العنقوديةغير المنتجة للكواكيوليز Classification of CoNS	16
2-3-1 امراضية المكورات العنقودية غير المنتجة للكواكيوليز CoNS pathogenicity	16

4-1 مقاومة المكورات العنقودية للمضادات المايكروبية	18
1-5-1 مقاومة المكورات العنقودية لمضادات البيتالاكتام	20
6-1 مقاومة الفانكومايسين	24
7-1 آلية المقاومة لمضاد الفانكومايسين	28
8-1 التحري عن جينات مقاومة الفانكومايسين بتقنية PCR	33

الفصل الثاني / المواد وطرائق العمل	
1-2 الأجهزة والمواد المستخدمة	35
1-1-2 الأجهزة المستخدمة	35
2-1-2 المواد الكيميائية والبايولوجية	36
2-2-1-2 المضادات المايكروبية Antimicrobial Agents	37
3-2-1-2 الإنزيمات	38
4 -2-1-2 العُدة المختبرية	38
5-2-1-2 مـواد متفرقـة	39
6-2-1-2 السلالة القياسية	39

2-2 طرائق العمل Methods	39
2-2-1 تحضير المحاليل والكواشف والصبغات المستعملة	39
2-2-1-1 كاشف الكتاليز Catalase reagent solution	39
2-2-1-2 الكواشف الخاصة بنظام API API – system reageuts	39
2-2-1- 3 محاليل صبغة كرام Gram's stain solutions	39
2-2-2 المحاليل المستعملة في إختبارات الحساسية للمضادات المايكروبية	39
2-2-2-1 محلول ثابت العكرة القياسي 0.5 Macfarland standerd solutions	39
2-2-2-2 المحلول الملحي الفسلجي Physiological saline solution	40
2-2-3 المحاليل الخزينة للمضادات الجرثومية	40
2-2-3 المحاليل الخزينة الخاصة بالإختبارات الوراثية	40
2-2-3-1 دارىء ترس – حامض الهيدروكلوريك Tris – HCl buffer	40
2-2-3-2 محلول EDTA	40
2-2-3-3 محلول هيدروكسيد الصوديوم (10)عياري NaOH (10N)	40
2-2-3-4 محلول دارىء TE	41
2-2-3-5 المحاليل المستعملة في عزل الدنا البلازميدي Plasmid DNA- Extraction	41

2-2-3-6 المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي	41
2-2-3-6-1 محلولx Tris- Boric acid – EDTA(TBE)10	41
2-2-3-6-2 دارئ التحميل 6 x Loading buffer	41
2-2-3-6-3 محلول خزين بروميد الإثيديوم Ethidium Bromide Stock Solution	41
2-2-4 المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR	42
2-2-4-1 محلول PCR master mix , 1x	42
2-2-4-2محاليل البوادئ Primers Solutions	42
2-2-3 الأوساط الزرعية	43
2-2-3-1 الأوساط الزرعية الجاهزة	43
2-2-3-2 الأوساط الزرعية التركيبية	44
2-2-4 العزلات البكتيرية	44
2-2-4-1 جمع العينات	44
2-2-4-2 زرع العينات	44
2-2-4-3 تشخيص البكتريا	44
2-2-4-3-1 الصفات الزرعية	45
2-2-4-3-2 الصفات المجهرية	45
2-2-3-3 الاختبارات الكيموحيوية	45

4-3-2 حفظ العزلات وإدامتها	47
5-3-2 فحص الحساسية للمضادات المايكروبية Antimicrobial Susceptibility test	48
6-3-2 تحديد التركيز المثبط الأدنى لمضاد الفانكومايسين Determination of minimal inhibitory concentration	48
7-3-2 التحري عن المحتوى البلازميدي Detection of plasmid profile	48
1-7-3-2 عزل الدنا البلازميدي Plasmid DNA extraction	48
2-7-3-2 الترحيل الكهربائي في الهلام Gel Electrophoresis	50
8-3-2 التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR)	51
1-8-3-2 تحضير الدنا البكتيري بطريقة الغليان لتفاعل PCR	51
2-8-3-2 تحضير خليط التفاعل التضاعفي التسلسلي لكل جين	51
3-8-3-2 الكشف عن نواتج التضاعف	52

الفصل الثالث / النتائج والمناقشة	
1-3 عزل وتشخيص بكتريا *Staphylococcus spp*	53
1-1-3 التشخيص ألزرعي Cultural Characterization	53

2-1-3 التشخيص المجهري Microscopic Characterization	53
3-1-3 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests	54
2-3 مقاومة الفانكومايسن Vancomycin-Resistant	57
3-3 مقاومة بكتريا *Staphylococcus* للمضادات المايكروبية الاخرى	60
4-3 قياس التركيز المثبط الادنى لمضاد اللفانكومايسين (MIC) Determination of minimal inhibitory concentration	63
5-4 عزل DNA البلازميدي	66
6-3 التحري عن جينات مقاومة الفانكومايسين	69
الإستنتاجات والتوصيات	74
المصادر العربية	76
المصادر الأجنبية	77
الملاحق	103
Summary	A

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1-1	التطور في مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا *S.aureus*	20
1-3	نسب عزلات بكتريا *Staphylococcus* المنتجة وغير النتجة لل coagulase	56
2-3	مقاومة عزلات بكتريا *Staphylococcus* للمضادات المايكروبية	60
3-3	المحتوى البلازميدي لبعض عزلات الدراسة	67
4-3	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا VRSA بإستعمال البوادئ النوعية لجين *van A*	71

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1-2	تتابعات وتراكيز البوادئ وحجم الناتج المتوقع لكل بادئ	42
2-2	خصائص البوادئ المستعملة في هذه الدراسة	43
3-2	المكونات اللازمة لخليط تفاعل PCR الخاص بتضاعف الجينين *vanA* و *vanB*	52
1-3	أعداد ونسب عزلات لبكتريا *Staphylococcus spp.* من العينات السريرية المختلفة ومن الاصحاء موزعة حسب النماذج المرضية	55
2-3	مقاومة عزلات بكتريا *Staphylococcus* لمضاد الفانكومايسين	58
3-3	مجاميع عزلات بكتريا *Staphylococcus* التي تمتلك صفة المقاومة المتعددة للمضادات المايكروبية	63
4-3	التراكيز المثبطة الدنيا لمضاد Vancomycin التي أبدتها عزلات الدراسة	64
5-3	الظروف المستعملة للكشف عن الجين *van A*	70
6-3	الظروف المستعملة للكشف عن الجين *van B*	73

API	Analytical Profile Index
bp	Base pairs
CLSI	Clinical And Laboratory Standards Institute
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylen-Diamine-Tetra-Acetic acid
hVRSA	Heterogeneous vancomycin- Resistant *Staphylococcus aureus*
hVISA	Heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*
IS	Insersion Sequence
MRSA	Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
MSSA	Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
PBPs	Penicillin Binding Proteins
PCR	Polymerase Chain Reaction
UTIs	Urinary Tract Infections
VISA	Vancomycin intermediately-resistant *Staphylococcus aureus*
VRE	Vancomycin- Resistant *Enterococcus*
VREFm	Vancomycin- Resistant *Enterococcus faecium*
VRSA	Vancomycin- Resistant *S.aureus*
VSSA	Vancomycin Susceptible *Staphylococcus aureus*
CoNS	Coagulase negative Staphylococci
Fc	Fragment crystallized
IgG	Immunoglobulin –G
S.aureus	*Staphylococcus aureus*
spp	Specie

شكـر و تقديـر

بسم الله الذي لاارجو إلا فضله ولا أخشى إلا عدله ولا اعتمد إلا قوله ولا اتمسك إلا بحبله , والصلاة والسلام على سيد الأنام نبينا المصطفى الأمين وعلى آله الغر الميامين الطيبين الطاهرين وصحبه المنتجبين ..

الحمد لله أولا وأخيرا لتيسيره لي الصعوبات لانجاز هذا العمل المتواضع ولما انعم به علي من نعم كثيرة وأمدني بالصبر الجميل طوال مدة البحث والدراسة.

وأنا أضع اللمسات الأخيرة لإتمام هذا البحث المتواضع لا يسعني الا أن أتقدم بفائق شكري وامتناني واصدق اعتزازي إلى مشرفيَ الأستاذ الدكتور عباس عبود فرحان الدليمي و الأستاذ المساعد الدكتور محمد فرج شذر المرجاني لاقتراحهما موضوع البحث وإشرافهما عليه وتقديمهما النصائح العلمية القيمة طيلة فترة البحث والكتابة.

أتقدم بجزيل شكري وتقديري واحترامي إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة ديالى والى رئيس قسم علوم الحياة الاستاذ المساعد الدكتور نجم عبد الله جمعة والاستاذ الدكتور عدنان نعمه عبد الرضا والى أساتذتي الكرام ومنتسبي القسم كافة.

وأتقدم بالشكر الجزيل إلى عمادة كلية العلوم / الجامعة المستنصرية والى رئيس قسم علوم الحياة الأستاذ الدكتور عبد الامير ناصر غلوب ومنتسبي القسم كافة لاسيما الست مها مخلف الشمري والاستاذ المساعد الدكتور علي حسين العامري ،لتوفير المكان وتهيئة الظروف الملائمة للعمل طيلة فترة البحث.

يسعدني ويشرفني أن أقدم جزيل شكري وعرفاني إلى الأستاذ الدكتور المساعد عبد الرزاق شفيق,عميد كلية الطب البيطري/جامعة ديالى والاستاذ المساعد الدكتور هادي رحمن رشيد/كلية العلوم/جامعة ديالى والاستاذ عامر عباس محمد علي .

وأتقدم بجزيل الشكر والامتنان لطلبة الدراسات العليا مع دعواتي لهم بالتوفيق والنجاح .

ختامنا وأمتناني وعميق عرفاني لعائلتي التي ساندتني و وقفت الى جانبي وتحملت معي الكثير .

أحمد عيسى

الخلاصة

تم الحصول على (105) عزلة تعود لجنس *Staphylococcus* من عينات سريرية مختلفة شملت الادرار والدم ومسحات الأذن الوسطى والحروق والجروح، من مستشفيات مختلفة من مدينة بغداد وذلك للفتره من 2011/9/1 لغاية 2012/1/1 ، أضافة الى (13) عزلة من أصحاء .بلغت نسبة عزل بكتريا *Staphylococcus* من عينات الدم (38. 52 %) ، ومن الإدرار 8.57% ومن الجروح والحروق 20.95 %، أظهرت العزلات نتيجة موجبة لاختبارات صبغة كرام والنمو على وسط المانتول الملحي و قدرتها على إنتاج أنزيم Catalase و Coagulase .

تم أختبار حساسية العزلات السريرية وعزلات الأصحاء لمضاد الفانكومايسين وأظهرت النتائج أن (16) عزلة من عزلات الدراسة مقاومة للفانكومايسين بنسبة (15.23%) كانت (10) عزلات منها تعود لبكتريا *S.aureus* بنسبة(9.52%) و (6) عزلة تعود لبكتريا Coagulase negative *Staphylococci* (CO –ve) بنسبة(5.71%) وكانت (15) عزلة متوسطة المقاومة للفانكومايسين (VISA) أما بالنسبة لعزلات الأصحاء فكانت (4) عزلات من مجموع (13) عزلة مقاومة للفانكومايسين وبنسبة (30.76%).

أختبرت حساسية عزلات الدراسة (105) عزله تجاه (10) مضادات مايكروبية مختلفة باستعمال طريقة الأقراص ، وأظهرت النتائج أن هناك تبايناً واضحاً في مقاومة العزلات المدروسة للمضادات المستعملة، اذ وجد إن العزلات كانت عالية المقاومة للمضادات الحياتية (Ampicillin 99%) و (Cloxacillin 95.20%) و (Ceftriaxone 90.40%) و (Erythromycin 85.70%) و(Cefepime 80.90%) و (Azithromycin % 78) على التوالي, فيما كانت نسبة مقاومة العزلات لمضاد الحيوي (Lincomycin 43.80%)

و(Fusidic acid 36.91%)و(Neomycin 30.47%) و(Enorfloxacin 27.60%) على التوالي.

تم تحديد التركيز المثبط الادنى لمضاد الفانكومايسين لعزلات بكتريا *Staphylococcus* قيد الدراسة والتي أظهرت مقاومة تجاه هذا المضاد في فحص الحساسية بطريقة الاقراص (المقاومة والمتوسطة المقاومة (I)،تراوحت قيم MIC للعزلات السريرية لبكتريا *Staphylococcus* بين (6-512) مايكروغرام /مل .

أجريت عملية عزل الدنا البلازميدي لـ (15) عزلة عن طريق عدة مجهزة من شركة promega، واظهرت النتائج احتواء بعض هذه العزلات على حزم بلازميدية مختلفة الاحجام.

أجريت التفاعلات التضاعفية لسلسلة الدنا (PCR) لعزلات بكتريا ***Staphylococcus*** المقاومة للفانكومايسين وذات MIC اكثر من 64 مايكروغرام/مل بأستعمال البوادىء المتخصصة التي تستهدف التسلسل النوعي للجين *van* A و *van B* ، رُحِلت نواتج التضاعف على هلام الأكاروز بتركيز (1)% و لوحظ ظهور حزمة واحدة في جميع المسارات في الهلام بالمستوى نفسه بالنسبة لجين *vanA* فيما لم تظهر حزم في جميع المسارات في الهلام بالنسبة لجين *vanB* .

بيَنت نتائج التحري عن جينات مقاومة Vancomycin في بكتريا VRSA أن جينات المقاومة *vanA* هي الأكثر إنتشارا بين العزلات المحلية بالمقارنة مع جينات *vanB* إذ إحتوت العزلات ذاتMIC ≤(64)مايكروغرام\مل على جين *vanA* .

المقدمة

يعود جنس المكورات العنقودية إلى العائلة البكتيرية *Staphylococcaceae* التي تضم أجناسا أخرى اقل شيوعاً هي *Salinicoccus* و *Gamella* و *Macrococcus* (Prescott *et al*., 2005) ، تمتاز بكتريا *Staphylococcus aureus* أنها موجبة لصبغة كرام، ويتراوح قطرها بين 0.5-1.5 مايكروميتر، غير متحركة ، وغير مكونة للسبورات ، لاهوائية اختيارياً تنمو بالتنفس الهوائي أو بالتخمر (Harris *et al* ., 2002)، تتسبب هذه البكتريا في إصابات خطيرة مثل حالات العدوى الجلدية العميقة وقد تنفذ إلى الدم، وسائر أعضاء الجسم ، مسببة حدوث تسمم الدم ، التهابات رئوية، التهابات صمامات القلب، التهابات العظام و غيرها، وقد تؤدي إلى الوفاة أحياناً عند الاشخاص ذوي المناعة الضعيفة او المصابين بداء السكري او السرطان(Benson , 2002). يعد الفانكومايسين هو المضاد الفعال لعلاج الاصابات بسلالات بكتريا *S. aureus* المقاومة للمثسلين (MRSA) والتي تعد احد مسببات أمراض المستشفيات خاصة ذات الرئة والالتهابات الجراحية والتهابات مجرى الدم . تطورت المقاومة لدى بعض سلالات *S. aureus* لمضاد الفانكومايسين (VRSA) وقد سجلت حالات أصابة سلالات VRSA في الولايات المتحدة الامريكية عام 2002، وقد عزلت هذه السلالات في اليابان وكوريا (Weigel *et al*., 2007; Kim *et al*., 2000) .

أن ظهور السلالات المقاومة للفانكومايسين (VRSA) أصبح يشكل احد المشاكل الطبية الرئيسة لأسباب عديده منها انتشار هذه السلالات يقلل من خيارات اعطاء العلاج الممكن أمام الاطباء ، وقد اظهرت تجارب الاقتران البكتيري امكانية أنتقال جينات مقاومة الفانكومايسين من بكتريا المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* الى بكتريا *S aureus* (Tenover *et al*., 2004).تعد الدراسة الجزيئية في العراق عن بكتريا *Staphylococcus* المقاومة

للفانكومايسن قليلة جداً على الرغم من ان المقاومة الفانكومايسين في بكتريا *S.aureus* تعد مشكلة كبيرة من وجهة نظر الطب والصحة العامة لذا جاءت هذه الدراسة الحالية والتي تهدف الى:-

1. عزل بكتريا *Staphylococcus* وتشخيصها من عينات سريرية مختلفة من بعض المستشفيات المحلية و من أصحاء.
2. الكشف عن مقاومة العزلات المحلية للفانكومايسين فضلاً عن بعض المضادات المايكروبية الأخرى، و تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للفانكومايسين .
3. التحري عن جينات مقاومة الفانكومايسين (*van A* و*van B*) باستعمال تقنية PCR بين العزلات المحلية لبكتريا *S.aureus* وتلك السالبة لانزيم Coagulase .

الخلاصة

المقدمة

Introduction

الفصل الأول

استعراض المراجع

Litreture Review

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Results & Discussion

الإستنتاجات والتوصيات

Conclusions

&

Recommendation

المـــصــادر

References

الملاحق

Appendix

1-1 المكورات العنقودية *Staphylococci*

يعد العالم الكسندر اوكستون Alexander Ogston أول من وصف المكورات العنقودية عام 1883 اذ اطلق عليها تسمية *Staphylococci*، وهي مشتقة من الكلمة الأغريقية Staphyle وتعني عنقودالعنب (Bunch of grape) , وCoccos وتعني حبات الحنطة (Ryan and Ray, 2004; Humphreys, 2002)

يضم جنس المكورات العنقودية ما لايقل عن خمسة و ثلاثين نوعا وواحد وعشرين تحت نوع (Brooks *et al*., 2007). يحتوي هذا الجنس انواعا غالبا ما تكون غير ممرضة ، وتوجد بصورة طبيعية على الجلد والأغشية المخاطية للأنسان وبقية الأحياء(Madigan and Martinko, 2005) . كما توجد المكورات العنقودية متعايشة في أنف و بلعوم الأنسانِ(Alcamo, 2001) ، وهي موجبة لصبغة كرام ، تظهر خلاياها تحت المجهر دائرية الشكل وتتجمع بشكل يشبه عناقيد العنب (Ryan and Ray, 2004) ، وهي بكتريا لاهوائية اختيارية ، ومنتجة لانزيم Catalase وغير منتجة Oxidase ، غير متحركة وغير مكونة للسبورات (Todar, 2005). تنمو المكورات العنقودية بشكل طبيعي على العديد من الأوساط الزرعية اذ انها تخمر العديد من انواع الكربوهيدرات ، وكذلك تنتج (انواع عديدة من الصبغات) بين الأبيض والأصفر الغامق(Liu *et al*., 2005). تقسم المكورات العنقودية إلى مجموعتين اعتمادا على انتاجها لأنزيم Coagulase (Woo *et al*., 2001).وتشمل المكورات العنقودية المنتجة لأنزيم Coagulase اهم نوع ممرض للإنسان وهو *Staphylococcus aureus* (Finch, 2006).

1- 2 المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*

تعد بكتريا *S.aureus* أهم الأنواع التابعة لجنس المكورات العنقودية من الناحية السريرية والتي تكون موجبة لإنزيم تجلط البلازما (Coagulase) ومع ذلك هناك سلالات نادرة منها قد تكون سالبة لهذا الإنزيم, علماً ان بعض الأنواع المسببة لأمراض الحيوانات الأخرى مثل *S.intermedius* و *S.hyicus* تكون موجبة لإنزيم تجلط البلازما (Deepak *et al*., 2000)

تتواجد هذه البكتريا في جسم الإنسان بشكل نبيت ميكروبي طبيعي (Normal microflora)، وأبرز أماكن تواجدها الجلد، تجويف الأنف، والبلعوم الانفي، ومنطقة الإبطين، ومابين الفخذين ، في المستقيم ، المنطقة التناسلية، والمنطقة الشرجية، ويمكن ان تستعمر في مختلف السطوح الظِهاريّة أوالمخاطية (Forbes *et al*.,2002). تخمر العديد من السكريات منتجة الحامض وتفرز إنزيم الكاتاليز(catalase) وتميع هلام الجيلاتين(liquefy gelatin) وهي تحلل الدم عند تنميتها على بيئة أكار الدم (دم الأرنب أو الخروف). كما تنمو هذه البكتيريا على وسط غذائي ملحي يحتوي على 15% من (Nacl) وهو وسط لا تنمو عليه البكتيريا السالبة لصبغة كرام وبعض البكتريا الموجبة لصبغة كرام بسبب تركيزه العالي. وتستغل هذه الخاصية في عزل هذه البكتيريا بين خليط من الأنواع المختلفة (Todar,2005;Johnson *et al*., 2002)

يصل معدل تعايشها لدى الأفراد إلى 20%، وعند حدوث أي تشققات أو خدوش بالجلد، فإن هذه البكتريا تتسبب في بعض الالتهابات كالقروح. الدمامل لاسيما في المناطق المشعرة مثل الرأس،الرقبة،تحت الإبطين،ومنطقة العانة (Ayliffe, 1998). بالنسبة للمرضى الذين يكون النبيت الميكروبي microflora لأمعائهم متغايراً بوساطة العناصر المضادة للميكروب ونوعية

الغذاء،فأنه قد تتواجد البكتريا العصوية السالبة الكرام الأكثر مقاومة والمكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* (Forbes *et al*., 2002).

عندما تصيب تلك البكتريا ذوي المناعة الضعيفة مثل حديثي الولادة والأطفال، أو كبار السن، أو المرضى المصابين بداء السكري، حالات زراعة الأعضاء،المرضى بالسرطان (Greenwood *etal*.,1997) ، فانها تتسبب في إصابات خطيرة مثل حالات خمج الجلدية العميقة وقد تنفذ إلى الدم،وسائر أعضاء الجسم ،مسببة حدوث تسمم الدم أوالتهابات رئوية،التهابات صمامات القلب، التهابات العظام و غيرها، وقد تؤدي إلى الوفاة أحياناً (Benson 2002)

1- 2- 1 طرق العدوى ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية

تنتقل بكتيريا المكورات العنقودية إلى أي مستشفى بوساطة المرضى المصابين بهذا النوع من خمج أو شخص آخر ناقل لجراثيم المرض، ويعد هؤلاء الأشخاص المصابين أو الناقلين للمرض المصدر الرئيس له و تنتقل البكتريا بين المرضى عن طريق أيدي مقدمي الرعاية الصحية بعد ملامستهم للمريض المصاب ، وقد يكون ذلك سبباً لأنتشارها في بعض المستشفيات التي تقدم الرعاية الصحية للحالات المزمنة ايضاً(cooper *et al*., 2004).

يمثل تكاثر بكتريا *Staphylococcus* المقاومة للمضادات الحيوية في المنخرين الأماميين خطورة كبيرة في نقل العدوى مقارنة بتكاثر سلالة المكورات العنقودية الحساسة للمضادات الحيوية، يقاوم المصابون بالبكتريا المقاومة بوساطة الإفرازات الموجودة في الجهاز التنفسي ، والجروح بنقلها بصورة سريعة بسبب الحاجة إلى استخدام اليدين بشكل مركز ومستمر من خلال تقديم الرعاية الصحية لمستقبلها(Gordon and Christensen, 2002) ولا يعد انتقال خمج عن طريق الهواء ذو أهمية في طريقة الانتقال، إلا في مرضى الحروق الراقدين في وحدة رعاية

الحروق ،والذين يحملون أو يشكون من الإصابة بالبكتريا المقاومة للمضادات حيث يكون لهم دوراً في انتشار العدوى عن طريق الهواء. إن انتقال العدوى عن طريق البيئة غير الحية تكون أهمية ولها عند بعض المرضى، مثل مرضى الحروق ومرضى وحدة العناية المركزة إذ يحتمل حدوث تلوث شامل في البيئة (Forbes *et al*., 2002).

1- 2- 2 عوامل الضراوة لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية Virulence Factors

تكمن ضراوة بكتريا العنقوديات الذهبية في قدرتها على التضاعف والانتشار بصورة واسعة في الانسجة ، يمكنها في تحقيق ذلك هو انتاجها العديد من المواد الخارج خلوية (Extracellular products) و التي يشكل جزءاً كبيراً منها انزيمات متعددة ذات وظائف حيوية مختلفة.تمتلك هذه البكتريا محفظة (Capsule) صغيرة تحيط بجدارها الخلوي (Nair and Henderson 2000)، تنتج العنقوديات الذهبية بروتينات متخصصة تؤدي الى تلف خلايا المضيف أو الأنسجة تطلق عبر المحفظة الصغيرة أو تقوم بإفرازها الى السايتوبلازم والتي تمثل سبب ضراوة هذه البكتريا , هذه البروتينات هي إنزيمات تؤدي الى موت النسيج وتدمير الخلايا البلعمية وتساهم بظاهرة تشكيل الخراج (cooper *et al*., 2004)

- **مكونات الجدار الخلوي Cell Wall Constituents**

يحتوي جدارها على حامض التايكويك (Teichoic acid) و الببتيدوكلايكان (Peptidoglycan) اذ يؤديان دورا مهما في اعطاء الصلابة للجدار الخلوي فضلا عن تحفيز انتاج الاضداد التي يعتقد انها تسهم في ضراوة البكتريا (Nair *et al*.,2000)

- **البروتين A: Protein A**

يحتوي جدار خلية *S.aureus* على بروتين A الذي له القدرة على الارتباط بمنطقة Fc لجزيئة الكلوبيولين المناعي (1gG) اذ يرتبط بروتين A ببتيدوكلايكان الجدار الخلوي ويمكن ان يطرح الى الوسط الزرعي خلال نمو البكتريا، وبالتالي يحمي البكتريا من عملية البلعمة (Brooks *et al*., 2007 ; Demuth & Lamont, 2006).

- **إنزيم التخثر Coagulase**

إنزيم يُخثر بلازما الدم للإنسان والأرنب وهذه الصفة من أهم الصفات التي تفرق بين انوع المكورات العنقودية و تعرف المكورات العنقودية الذهبية بالمكورات العنقودية المفرزة لـ Coagulase (Coagulase-Positive *Staphylococci*) أما المكورات غير المفرزة لهذا الإنزيم فتعرف بالمكورات العنقودية غير المفرزة لـ Coagulase (Coagulase – Negative *Staphylococci*) من انواع المكورات العنقودية المفرزة لإنزيم Coagulase بجانب المكورات العنقودية الذهبية هنالك بكتريا *S.intermedius* و *S.hyicus* التي يتم عزلها من الحيوانات.تكمن أهمية أنزيم Coagulase في أنه يغلف خلايا المكورات بالفايبرين مانعاً بذلك الخلايا البلعمية من التهامها وهناك نوعان من هذا الإنزيم: المقيد (bound) والطليق (free)(Brooks *et al.,* 2007)

أ- bound coagulase:

يوجد على جدار الخلية الخارجي في معظم أنواع المكورات العنقودية الذهبية ويتفاعل مع الفيبرينوجين مسببا تجمع المكورات العنقودية ويكشف عنه باستخدام الشريحه الزجاجية (Brooks *et al.,* 2007)

ب- free coagulase:

يفرز في أثناء نمو البكتيريا خاصة خلال الطور اللوغاريتمي ويسبب تجلط البلازما ويكشف عن هذا الانزيم في اختبار الكواجيوليز باستخدام الأنبوبة tube coagulase test (Demuth & Lamont, 2006)

- **الأنزيمات الحالةالدموية Hemolysins**

لها أربعة أنماط : ألفا و بيتا وكاما و دلتا(Henry, 2001) يمكن لهذا الأنزيمات أن تحطم كريات الدم والعدلات والصفيحات الدموية وهو سام لبعض خلايا الأنسجة المزروعة، كما يحلل النمط ألفا الخلايا الملتهمة الكبيرة (Demuth & Lamont, 2006)

- **الإنزيمات القاتلة لخلايا الدم البيضاء Leukocidins**

تحطم هذه الانزيمات كريات الدم البيضاء بانواعها (Demuth & Lamont, 2006)

- **البنسلينيز Pencillinase:**

يعد من ضمن انزيمات البيتالاكتاميز ،يحطم حلقة البيتالاكتام في جزيء المضاد الحيوي البنسلين (Gillespie and Hawkey, 2006)

- **عامل الانتشار Hyaluronidase**

يدعى Spreading Factor يعمل على تحليل الحامض المسمى (Hyaluronic acid) في الأنسجة الرابطة ,مما يسمح بانتشار البكتريا خلال أنسجة المضيف ويدمر هذا البروتين السكر البروتيني (Proteoglycan) في الانسجة الضامة (Gillespie and Hawkey, 2006)

- **Staphylokinase:**

يدعى (Fibrinolysin) يحل هذا الانزيم خثرة الفايبرين المتكتلة (Fibrin clot)، مما يسمح بالانتشار خلال أنسجة المضيف من الجروح والحروق (Brooks *et al*., 2007) .

- **الإنزيمات الحالة للدهون Lipase**

يحلل هذا الإنزيم الشحوم والزيوت ، وهذا يسهل استعمار المكورات العنقودية الذهبية للغدد الدهنية (Macfaddin , 2000)

- **الإنزيمات الحالة للبروتينات Protease**

وهي إنزيمات محللة للمواد المعقدة للحصول على المغذيات الضرورية حيث تدمر النسج البروتينية (Brooks, 2004; Henry, 2001).

- **الذيفان المقشر Exfoliatin :**

وهو ذيفان خارجي منتشر يؤدي إلى تسلخ الجلد ويسبب متلازمة الجلد السمطي (Henry, 2001)

- **الذيفانات المعوية Enterotoxins (وهو ذيفان ثابت بالحرارة)**

تسبب إسهالاً وقيئاً ناتجاً عن التسمم الغذائي (Brooks *et al*., 2007).

- **ذيفان متلازمة الصدمة السمية (TSST-1Toxic Shoch Syndrome)**

يؤدي إلى متلازمة الصدمة السمية وقد تم عزله من 20% من المكورات العنقودية الذهبية، ويسمى هذا الذيفان بالمستضد الفائق ويرتبط مع MHC-IIالمتواجد على سطح الخلية المقدمة للمستضد (كالخلية البلعمية) إذ يؤدي هذا المعقد (ذيفان / MHC-II) إلى

استجابة الخلايا التائية بشكل كبير وتدفق السايتوكينات وبالتالي حدوث متلازمة الصدمة السمية(Brooks *et al*., 2007).

1- 2- 3 امراضية المكورات العنقودية الذهبية Pathogenicity of *Staphylococcus aureus*

تعد المكورات العنقودية الذهبية من اكثر أنواع المكورات العنقودية إمراضية، تكون بكتريا *S.aureus* جزء من النبيت الطبيعي (Normal flora) للجلد والانف والبلعوم والقناة الهضمية والتناسلية للانسان والحيونات الاخرى، الا انها تطرح ايضا في الهواء وعلى الادوات Fomites ومن الحالات المرضية ومن الحاملين لها Carriers(Paul *et al*.,2004)، كما انها تمتلك قدرة كبيرة على احداث اخماج انتهازية Opportunistic infections تتفاوت بين اخماج الجلد البسيطة نسبيا الى الامراض الوظيفية المهددة للحياة(Life – threatining systemic illness)(Levinson &Jawetz,2000)، خصوصاًعندما تتوفر الظروف الملائمة لها مثل وجود خلل في قوى الدفاع المناعية، اصابات الجلد،الاصابة بكائنات مرضية اخرى كالفايروسات، وجود امراض مزمنة كالسرطانات (Shapiro *et al*., 2000). في حالة اصابات الجلد ، والتي عادة ما تحدث للمواليد الحديثة ، تسبب السموم التقشرية تسلخاً واسعاً في الغلاف الخارجي للجلد لتنتج بذلك أثراً شبيهاً بالحرق.أن تفاقم هذه العوامل ، هو المسؤول المباشر عن إصابات الجلد والجروح المختلفة وإصابات الأنسجة العميقة التي تسببها المكورات العنقودية الذهبية بشكل شائع. وبغض النظر عن موقع الإصابة الأولي، فإن الطبيعة الغازية لهذا الكائن تظهر دائماً تهديداً لاصابة الأنسجة العميقة، والتسبب بتجرثم الدم، انتشار الاصابة لواحد أو أكثر من الاعضاء الداخلية وقد تهدد الحياة اذا لم تعالج ويسطر عليها بسرعه(Gillespie and Hawkey, 2006).

تنشأ أمراضية بكتريا المكورات العنقودية جراء التأثير المشترك لعدد من العوامل المفرزة خارج الخلية (الذيفانات والانزيمات) المذكورة سابقا مع خصائص الغزو للسلالة (Todar,2008) تمتلك السلالات المعزولة من الاخماج الخطرة العديد من هذه العوامل مقارنة مع سلالات الحاملين لها (Carriers) كذلك فان استعمال المضادات الحيوية في المستشفيات ادى الى ظهور سلالات مقاومة لتلك المضادات والتي غالبا ما تحمل من قبل الكادر الطبي او المرضى . (Brooks *et al*., 2001)

الامراض التي تسببها المكورات العنقودية الذهبية لانسان:-

- **التهاب المعدة والأمعاء Gastroenteritis**

تنمو العنقوديات على الطعام منتجة ذيفاناتها، وعند تناول الإنسان للطعام الملوث بهذا الذيفان تسبب تسمماً غذائياً(Food Poisoning) فتبدأ لديه آلام في البطن ، يليها حدوث غثيان، قيء ،إسهال مصحوبه بحمى (Gillespie and Hawkey, 2006)

- **متلازمة الصدمة السميةToxic Shock Syndrome**

لها علاقة مع الفوط النسائية غير النفاذة ، فقد تبين أن هذا النوع من الفوط عند تركه لفترة طويلة يؤدي بطريقة ما إلى إطلاق العنقوديات الذهبية لذيفانها (TSST-1) الذي يخترق مخاطية المهبل فيحرض انطلاق العامل المنخر للورم TNF والانترلوكين -1 والذي بدوره يحرض الحساسية للذيفان الداخلي TSST-1 (Gillespie and Hawkey, 2006) . وهناك أسباب أخرى تساعد على تكاثر العنقوديات الذهبية وتحرير ذيفانها TSST-1مثل استعمال الخيوط الملوثة في خياطة الجروح و الأخماج الجلدية و تحت الجلدية والإصابات

المنتقلة أثناء الولادة.إن سم (TSST-1) يؤدي بصورة محتملة إلى الصدمة العصبية (السكتة الدماغية) والموت (Gill *et al*., 2005)

- **متلازمة الجلد السمطي بالعنقوديات *Staphylococcus* Scalded Skin Syndrome**

تشبه بآليتها متلازمة الصدمة السمية ، إذ أن سلالة العنقوديات الذهبية التي تنتج ذيفاناً مقشراً تؤدي إلى خمج موضعي،وتطلق ذيفانها لتسبب أخماج بعيدة ، وعلى عكس متلازمة الصدمة السمية فإنها تصيب الأطفال حديثي الولادة الذين يحدث عندهم خمج في الحبل السري أو الأطفال الاكبر سناً الذين لديهم أخماج جلدية إذ تتظاهر سريرياً بتشققات في البشرة المتوسطة وتقشرات ناعمة تترك تحتها جلداً أحمراً رطبا(Gillespie and Hawkey, 2006;Gill *et al*.,2005)

- **ذات الرئة Pneumonia**

تعد ذات الرئة بالمكورات العنقودية الذهبية سبباً نادراً لذات الرئة المكتسبة بالمجتمع ولكنها تؤدي إلى اصابة شديدة ، في حين تكثر ذات الرئة بين مرضى المستشفيات إذ تتلو إصابة الطرق التنفسية العلوية بفيروس النزلة الوافدة (الانفلونزا Flu) وذلك ببداية مفاجئة لحمى وتكثفات قصبية في الرئة مع تدمير سريع في النسيج الرئوي وتشكل وفراغات في الرئة ، وينتج عن ذات الرئة المدمرة هذه انصبابات وتقيحات جنب (; Nimmo & Coombs, 2008 Forbes *et al*., 2002) يعد مرض ذات الرئة السبب المؤدي إلى الوفاة بين المرضى المصابين بإصابات المستشفيات (nosocomial) اذ يشكل نسبة عالية تقدر بـ 50% من عدد الوفيات بين المرضى المتواجدين في وحدات العناية المركزة،ويشكل ذات الرئة المكتسب عن طريق المستشفى خطرا لأي مريض يدخل المستشفى للمعالجة، ويمكن أن تكون الكائنات الحية

المقترنة بهذه الإصابات محدودة جداً في المستشفى، لكن عموماً تتضمن الكائنات الحية الأكثر شيوعاً نوع *Klebsiella spp.* والمكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* (Forbes *et al*., 2002; Henry, 2001)

- **التهاب السحايا meningitis والتهاب الدماغ والخراجات الدماغية:**

تمتاز بحمى مرتفعة وصداع وعلامات عصبية موضعية (Henry, 2001).

- **التهاب نقي العظم: Osteomyelitis**

هو خمج عظمي يحدث عادة عند الأطفال تحت 12 سنة إذ ينتقل الخمج إلى العظام عبر الدم، ويتميز موضعياً تورم النسج فوق العظم وارتفاع حرارة الجسم، وتعد المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* العامل الأكثر شيوعاً في حدوث الأمراض الخاصة بالتهاب نقي العظام بين الفئات العمرية جميعاً. إن السموم والإنزيمات التي تنتجها هذه البكتريا فضلاً عن قدرتها على الالتصاق بالسطوح الناعمة وإنتاج غطاءً سكري واقي، يساعد في قدرتها على احداث المرض(Nimmo & Coombs, 2008; Gill *et al*., 2005)

- **التهاب الشغاف الحاد: Acut endocarditis**

وهو خمج مدمر للصمامات القلبية يبدأ فجأة بحرارة مرتفعة وآلام عضلية (أعراض تشبه الزكام الشديد) ولا تظهر أحياناً عند المريض أي علامات تشير إلى إصابة صمامات القلب ، وتنمو البكتريا بسرعة على الصمامات مؤدية إلى خلل في وضيفتها (Gillespie and Hawkey, 2006)

- **التهاب المفاصل الخمجي: Septic arthritis**

تعد المكورات العنقودية الذهبية العامل الأكثر شيوعاً في إحداث هذا المرض عند الأطفال وعند البالغين فوق 50 سنة ، وإذا لم يعالج مباشرة فإن المريض سوف يفقد وظيفة المفصل المصاب بشكل دائم. عموماً، تعد المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* العامل الأكثر شيوعاً في أسباب الأمراض الناشئة عن التهاب المفاصل العفني، اذ تشكل نسبة 70% تقريباً من مجموع مثل هذه الإصابات (Forbes *et al*., 2002)

- **الاخماج الجلدية: Skin infections**

تنتج الأخماج الجلدية البسيطة عن الخمج ببكتريا *staphylococcus* الحالة للدم بيتا المجموعة Aأو بالمكورات العنقودية الذهبية ، ولا يمكن التمييز بينهما سريرياً (Henry, 2001)

- **القوباء Impetigo:**

يظهر هذا الخمج المعدي عادة على الوجه خاصة حول الفم ، ويتظاهر بحويصلات صغيرة لا تلبث أن تشكل بثوراً ، وهذه البثور تأخذ لوناً عسلياً ذو منظر رطب ومؤلف من طبقات (Gill *et al*., 2005& Forbes *et al*., 2002)

- **التهاب النسيج الخلوي Cellulitis :**

وهوخمج عميق بالخلايا تكون فيه النسج المصابة محمرة ومنتفخ(Nimmo & Coombs, 2008)

- **تجرثم الدم Bacteremia \ إنتان الدم Septicemia**

يمثل إنتان الدم احد أهم المشاكل الصحية التي تسببها هذه البكتريا، إذ ذكرت دراسات عدة انه خلال فترة الثمانينات ازدادت نسبة الإصابة بتجرثم الدم وكانت البكتريا الموجبة لملون كرام لا سيما المكورات العنقودية الذهبية هي السائدة(Gill *et al*., 2005)

- **خمج المسالك البولية المكتسبة عن طريق المستشفى Hospital-Accquired**

تلعب بيئة المستشفى دوراً مهماً في تحديد الكائنات الحية المشتركة في إصابات الجهاز البولي UTIs. ويكون المرضى الداخلين إلى المستشفى للمعالجة أكثر عرضةً للإصابة ببكتريا *Klebsiella ssp.* و *E.coli* و *Proteus mirabilis* والمكورات العنقودية بأنواعها .(Nimmo & Coombs , 2008 ; Brooks *et al*., 2007 ; Forbes *et al*., 2002)

- **التهاب الأُذن الوسطى (إصابات الأذن الوسطى):**

Otitis Media (Middle Ear Infections)

إن التهاب الأُذن الوسطى أكثر شيوعاً في الأطفال وتكون1% إلى 6% من الحالات بسبب*Moraxella spp*، والمكورات العنقودية الذهبية *S.aureu* (Forbes *et al*., 2002)

1-3 المكورات العنقودية غير المنتجة لانزيم التجلط (Coagulase negative *Staphylococci* ;CoNS)

تضم المكورات العنقودية غير المنتجة للكواكيوليز(CoNS) مجموعة واسعة من البكتريا التي توجد كفلورا طبيعياً حيث تستوطن الجلد والأغشية المخاطية للأنسان والكثير من اللبائن والطيور(Nagase *et al*., 2002; Hauschild, 2001). وغالبا ماتعزل في مختبرات الأحياء المجهرية السريرية من مزروع الدم (Blood culture) من المرضى الراقدين في المستشفيات

والذين يستخدمون القثطرات الطبية داخل الأوعية الدموية ، وتعد من الملوثات الرئيسة للأوساط الزرعية (Finch, 2006)، كما تم عزل بكتريا CoNS من جلد الحيوانات واظافرها مثل : الماعز والخنازير والخراف (Kaszanyitzky *et al*., 2005)

1-3-1 تصنيف المكورات العنقودية غير المنتجة للكواكيوليز Classification of CoNS

وضعت مجموعة CoNS من الناحية التصنيفية مع بكتريا *S. aureus* ضمن عائلة *Micrococcacea* في الطبعة الاولى لموسوعة بيرجي ،وضمن العائلة *Staphyloccocacea* في الطبعة الثانية لموسوعة بيرجي (Nester *et al*., 2001). تتصف افرادها بكونها موجبة لملون غرام ، لاهوائية اختيارياً، تظهر على شكل عناقيد ، غيرمكونة للأبواغ ، موجبة لفحص Ctalase ،على الغالب لاتنتج انزيم Coagulase ،بعض السلالات تحتوي على محفظة دقيقة(Microcapsule) ، وهي على العموم تقسم CoNS على انواع عديدة بالأعتماد على ميزات عديدة ، منها شكل المستعمرات و انتاجها انزيم Phosphatase و انتاج الحامض من السكريات مثل Maltose، Sucrose ، Manitol ، Trehalose، Xylose (Finch, 2006)

2-3-1 امراضية المكورات العنقودية غير المنتجة للكواكيوليز CoNS pathogenicity

بدأ بروز CoNS بوصفها ممرضات عند استخدام القثطرات داخل الأوعية الدموية (Intravascular catheters) ، وعند استخدام البدائل في المرضى تحت العناية المركزة ، وفي الأطفال حديثي الولادة ، وفي عمليات زرع الأعضاء (Kloos and Bannerman,1994) .

تختلف الأعراض السريرية التي تسببها CoNS بشكل كبير عن الأعراض السريرية للأصابات التي تسببها *S. aureus*، فالأعراض التي تسببها CoNS عادة تكون مخفية وغير نوعية (Subtle and non specific). والمراحل السريرية للأصابة تكون في الطور تحت الحاد او المزمنة بدون اعراض واضحة (VonEiff *et al*., 1999; Peters *et al*., 1995).على

الرغم من كون CoNS فلورا طبيعية على الجلد والأغشية المخاطية للأنسان والحيوان على السواء ، الا ان هذه المجموعة سببت اخماجا عديدة في المرضى الراقدين في المستشفيات عند استعمال القثطرات ، والمفاصل الصناعية ، وصمامات القلب الصناعية ، وغيرها ، وعلى الرغم من افرازها العديد من السموم وامتلاكها لعوامل فوعة عديدة الا ان هذه المجموعة لم تشخص في مختبرات الأحياء المجهرية السريرية ، (Bannerman , 2003) . وقد ثبت ان *S. epidermidis* هي المسبب الرئيس لألتهاب شغاف القلب (Endocarditis) في المرضى الذين يستخدمون القثطرات الطبية ، كما تم تأكيد حالات اخرى تسببها هذه البكتريا مثل: خمج العظام (Osteomyelitis)، وخمج الجروح ، وخمج الأذن الوسطى ، وذات الرئة والسحايا (Peters *et al*., 1995 ; Heilmann and Peters , 2000) . وكذلك عزلت CoNS وخصوصا *S. epidermidis* ، و *S, xylosus* ، و *S. capitis* من المصابين بالتهاب البشرة التحسسي(Atopic dermatitis)، (Alsaimary *et al*., 2006) . وكذلك تعد CoNS مسببا مهما لأخماج القناة البولية التناسلية (Al-Heety , 2005 ; Al-Ghrairy , 2007 ; Tawfik , 2007).

يستعمر تقريبا نصف انواع CoNS الإنسان بصفتها عوامل انتهازية وتكون هي الأكثر سيادة والأكثر شيوعا في توافرها على اعضاء الجسم منتجة اصابات حادة (Bannerman, 2003) . الأصابات الناتجة من CoNS معظمها في المرضى الراقدين في المستشفيات ، لذلك فليس من المستغرب ان تكون CoNS المعزولة من هؤلاء المرضى مقاومة لمعظم المضادات الحيوية كحال *S. aureus* . وقد وجد ان مايقارب 80-90% من سلالات CoNS المعزولة من عينات بشرية تنتج انزيم (Beta-lactamase) ، وان اكثر من 60-80% من اصابات الراقدين في المستشفيات بهذه المجموعة تكون مقاومة للمضاد الحيوي مثيسيلين

Methicillin، وهناك سلالات تقاومMacrolides و Lincosamidesو Aminoglycosides و Floroquinolones فضلا عن مجموعة اخرى من المضادات الحيوية ، أن ظهور سلالات مقاومة لمضادات Glycopeptides يزيد القلق من تطور سلالات تكون مقاومة لمضادات الحياة جميعها (Diekema *et al*., 2001; Peters *et al*., 1995)

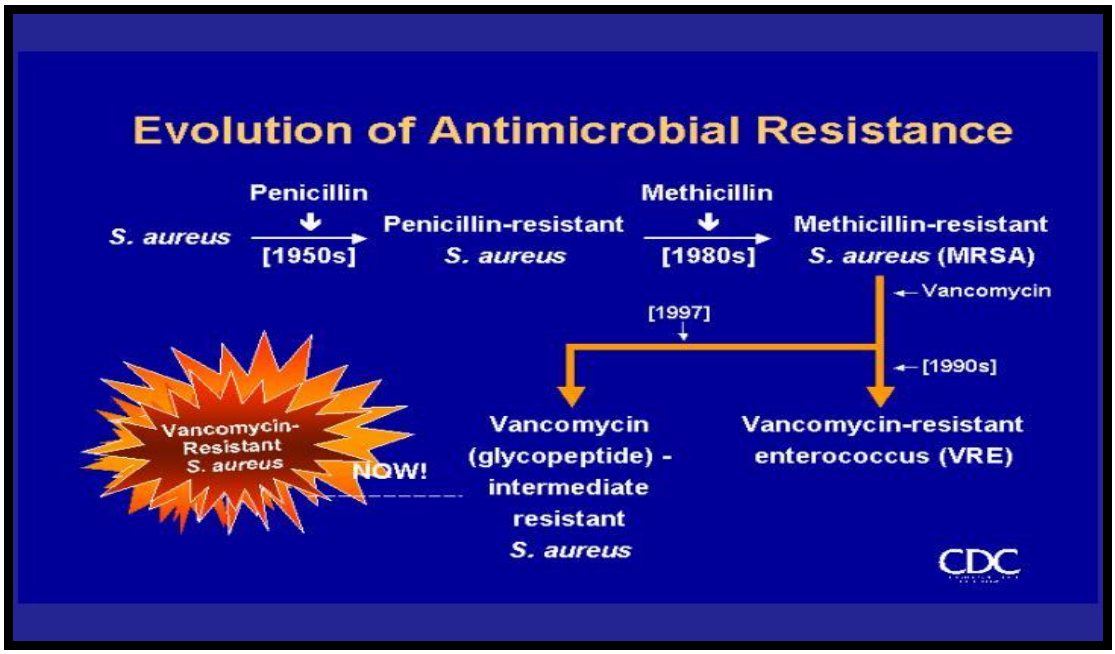
4-1 مقاومة المكورات العنقودية للمضادات المايكروبية

تعد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية واحدة من اكثر الانواع البكتريا المنقولة خلال المستشفيات انتشارا وضراوة وامراضية وعادة تكون مقاومة لانواع عدة من المضادات الحيوية التي تجعل الإصابة صعبة المعالجة (cooper *et al*., 2004). لذا دعت الحاجة الى ايجاد انواع اخرى من مركبات البنسلين مثل Nafcillin و Methicillin . تتطور الاصابة بالمكورات العنقودية الذهبية الى ان تصبح مشكلة رئيسة في العديد من مراكز العناية الصحية والمستشفيات خصوصا مع نشوء وانتشارسلالات مقاومة للمثيسيلين (Fagade *et al*., 2010) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

تعد العنقوديات الذهبية أوّل بكتيريا طوّرت مقاومة ضدّ البنسلين في عام 1948 م اي بعد اعوامٍ قليلة (أربع سنوات) من بيع البنسلين بكمّيّات كبيرة وبعد تطوّر المقاومة ضدّ البينيسيلين، تمّ استعمال المثسلين بدلا عن البينيسيلين لكن بسبب ظهور تسمّم الكليتين نتيجة استعمال الميثيسيلين، تمّ استبداله هو الآخر بالأكساسلين. تمّ اكتشاف العنقوديات الذهبية المقاومة للمثسلينMRSA لأوّل مرّة في بريطانيا عام 1961. تعد العنقوديات الذهبية المقاومة للميثيسيلين مسؤولة عن 37% من الحالات القاتلة لتسمّم الدّمّ وفي بريطانيا في عام 1999 م بعدما كانت نسبتها 4% عام 1991 م(Maree *et al*.,2007). لوحظ أن نصف حالات عدوى العنقوديات الذهبية بالولايات المتّحدة الأمريكيّة كانت مقاومة للبنسلين والميثيسيلين والتتراسيكلين،

والإريثروميسين.و بالتّالي فإنّ الفانكومايسن يعد المضادّ الحيوي الوحيد ذا فعاليّة في هذه الحالات. لكن بالرغم من ذلك عزلت سلالات من بكتريا العنقوديات الذهبية مقاومة للفانكومايسين باليابان عام 1996 م. وعزلت كذلك ببعض مستشفيات بريطانيا و الولايات المتّحدة الأمريكيّة وفرنسا يوضح الشكل (1) التطور في مقاومة بكتريا *S.aureus* للمضادات الحيوية. تمّ تطوير صنف جديد من المضادّات الحيويّة هوOxazolidin الّذي أصبح جاهزا في التّسعينيّات. وأوّل هذه المضادات تمّ بيعه هو Linezolied الّذي يمكن مقارنته مع الفانكومايسين من حيث الفعّاليّة ضدّ العنقوديات الذهبية المقاومة للمثسلين MRSA . لكن تمّ تسجيل مقاومة العنقوديات الذهبية للّينيزوليد عام 2003 م (Maree *et al*.,2007; Boyle-Vavra *et al*.,2007)

يكون لبكتريا المكورات العنقودية القابلية على تطوير مقاومة ذاتية ضد صنفين او اكثر من المضادات الحيوية, مما يجعل علاج الاصابة الناتجة عن هذه البكتريا صعب جدا, ومكلف اقتصادياً وارتبطت في بعض الاحيان بالإمراضية العالية او الموت (Bashir *et al*., 2007) ان دخول جين الى الخلية البكتيرية, يحدث تطوير مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية متى ماكان هذا الجين قادر عن التعبير عن نفسه داخل الخلية وابداء تأثير حيوي ملموس مما ينتج عنه فقدان في فعالية المضاد (Chambers and DeLeo,2009)



شكل (1) : التطور في مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا *S. aureus*

(Johnson,2007)

1-5-1 مقاومة المكورات العنقودية لمضادات البيتالاكتام:

يعد تحليل حلقة البيتالاكتام بواسطة انزيمات البيتالاكتميز وتتضمن (penicillinases and cephalosporinases) من آليات المقاومة الاكثر اهمية (Guilfoile,2007) . حيث تؤثر هذه المجموعة من المضادات في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام، اذ تقوم بغلق الإرتباط التصالبي (Cross-linking) في طبقة Peptidoglycan خلال عمليات بناء الجدار اذ ترتبط حلقة Beta-lactam بالأنزيمات(Penicillin-binding Protein (PBP التي تشترك في بناء البروتينات عبر عمليات الإرتباط التصالبي في جدار الخلية ، ان عملية ارتباط البيتالاكتام مع PBPs تؤدي الى توقف عمليات بناء الجدار ، وبذلك تموت الخلية نتيجة لعدم ثباتها عند الضغط الأزموزي الواطيء، تعمل عناصر البيتالاكتام ضد طيف واسع من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام. ومن هنا فان هذا النوع من المضادات يكون قاتلاً للبكتريا Bacteriocidal (Forbes *et al*., 2002; Alcamo, 2001).

ومن أهم المجاميع التابعه لمضادات البيتالاكتام :.

أ- البنيسلينات Penicillins

تضم هذه المجموعة انواعا عديدة من مضادات الحيوية الغير سامة للانسان اهمها البنسلين الذي ينتج طبيعيا من عفن البنيسيليوم ، بعض السلالات الطافرة تكون مقاومة للبنسلين وذلك لأنتاجها انزيم Penicillinase او يسمى أيضاًBeta-lactamase الذى يحول البنسلين الى مركب Penicilloic acid مما يؤدي الى الفشل في العلاج بهذا العقار (Forbes *et al*., 2007; Alcamo, 2001). يعد Penicillin G أو Benzyle Penicillin الأكثر شيوعا بين انواع البنسلينات في معالجة الإصابات التي تسببها عدد من المكورات الموجبه لصبغة كرام، ويكون البنسيلين G حساس لانزيمات β-lactamase (Mycek *et al*., 2000).

ب: السيفالوسبورينات Cephalosporins

مجموعة اخرى من مضادات البيتالاكتام تتشابه تركيبيا ووظيفيا مع البنسلين، تعتمد فعاليتها ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام على ألفة المضاد للأنزيمات الحساسة للبنسلين (PBPs) بينما ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام على اختراقها للغلاف الخارجي ومقاومتها لأنزيمات البيتالاكتاميز الموجودة في الفسحة المحيطة بالبلازما وأرتباطها بأنزيمات PBPs .

تكون هذه المضادات واسعة الطيف قليلة السمية آمنة الاستعمال(Alacamo, 2001)، يمكن الحصول منها على مشتقات عديدة بإجراء تحويرات جانبية ومن هذه المضادات :

- **الجيل الأول:** تعمل ضد المكورات الموجبة وبعض عصيات البكتريا السالبة ، منها مضادات Cephalexin (Keflex) ، و Cephalothin (Keflin) .

- **الجيل الثاني:** يشمل مضادات Cefuroxime ، Cofoxitin ، و Cefaclor ، وتكون فعالة ضد المكورات الموجبة وكذلك بعض عصيات البكتريا السالبة .
- **الجيل الثالث:** يشمل مضادات Cefotaxime(Claforan) ، Ceftiaxone (Rocephin) ، و Ceftazidime (Fortaz) .
- **الجيل الرابع:** يشمل Cefepime ، و Cefozopram ، و Cefselis .
- **الجيل الخامس:** مثالها مضاد Ceftobiprole ذو الفعالية ضد بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثسلين (MRSA) وبكتريا ذات الرئة *Streptococcus pneumoniae* المقاومة للبنسلين، يعطى بالحقن لعلاج إصابات الجلد والأنسجة الرخوة(المرجاني 2011)

2-5-1 مقاومة المكورات العنقودية لمضادات المجموعه الامينوكلايكوسيدية:

تكون بكتريا*Streptococci* و *Enterococci* مقاومة نسبياً لمضاد Gentamycin و ذلك يرجع إلى فشل جزيئات المضاد في إختراق الخلية. ويخلط هذا المضاد مع الفانكومايسين أو البنيسيلين ليعطي تأثيراً فعالاً قاتلاً للبكتيريا في تثبيط تخليق الجدار الخلوي (Abramowicz.,2005) تظهر المقاومة ضد الجنتاميسين سريعاً في بكتريا*Staphylococcus* بسبب الطفرات في المحتوى الوراثي. أما المقاومة التي تظهر في البكتيريا السالبة لصبغة كرام ترجع في معظم الحالات إلى إنزيمات بروتينية مشفرة من بلازميد مُحَوِّرة طافرة للأمينوكلايكوسيدات تكون البكتيريا الموجبة لصبغة كرام المقاومة للجنتاميسين حساسة للأميكاسين الذي يكون مقاوماً للإنزيمات المُحوَّرة (Katzung *et al*.,2009).

3-5-1 مقاومة بكتريا المكورات العنقودية لمضادات الماكروليد:

الارثرومايسين: تكون المقاومة ضد الإريثروميسين عادة مُشفرة من بلازميد. هناك ثلاث آليات للمقاومة تم التعرف عليها هي(1) النفاذية القليلة لغلاف الخلية (2) إنتاج الانزيمات المثبطه للمضاد (3) تغيير تركيب موقع الإرتباط الريبوسومي (الذي يطلق عليها الحماية الريبوسومية) عن طريق طفرة كروموسومية أو تُحفز بوجود الماكروليد أوعن طريق أنزيم Methylase تحدث المقاومة المشتركة بين الإريثروميسين و الماكروليدات الآخرى Katzung) .(*et al*.,2009; Abramowicz *et al*.,2005

الازثرومايسين(azithromycin): هو احد افراد مجموعة المايكروليدات التي تثبط تخليق البروتين , التي ترتبط مع الوحدة الرايبوسومية الكبيرة (Craig and Stitzel, 2004)

4-5-1 مقاومة بكتريا المكورات العنقودية لمضاد Fusidic acid

يثبط هذا المضاد تخليق البروتين إذ يرتبط بعامل الاستطالة (EF-G) ويمنع تحرير عامل الاستطالة (EF-G) من معقد (EF-G/GDP) من الرايبوسوم (Abramowicz ,2005). يثبط هذا المضاد تضاعف البكتريا لكن لا يتسبب بقتلها لذلك يسمى (Bacteriostatic). يستخدم غالبا ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام وخصوصا ضد المكورات العنقودية الذهبية (*aureusStaphylococcus*) وضد المسبحيات (*spp.Streptococcus*), وهو غالبا يستخدم كمراهم او قطرات للعين لكن ايضا ممكن ان يعطى كحقن او كبسولة في الحالات الشديدة(Abramowicz,2005) .تمتلك البكتريا السالبة لصبغة كرام مقاومة ذاتيه لهذا المضاد بمستوى مقاومة واطئ من خلال حاجز النفاذية ،بينما تكون البكتريا الموجبة لصبغة كرام حساسة له ويمكن ان تكتسب مقاومة بتحور البلازميدات من خلال تقليل دخول المضاد للخلية ويمكن ان تلعب أنزيمات نوع CATs دورا في المقاومة (المرجاني ،2011).

6-1 مقاومة الفانكومايسين

ينتمي الفانكومايسين لمجموعة Glycopeptides التي تضمُ أيضاًمضاد Ristocetin، يُعزل الفانكومايسين من البكتريا الخيطية *Streptomyces orientalis* و هو ذو تركيب معقد (Tricyclic glycopeptides)، أستعمل في العلاج منذ سنة 1950 وله تأثيرات سامة وقد تمت تنقيته ليُصبح أقل سميّة (المرجاني ،2011) .

يمتلكُ هذا المضاد وزناً جزيئياً عالياً وتعتمد فعاليته ضد الخلية البكتيرية على قابليته على الإرتباط بمجموعة D-alanyl-D-alanine الطرفية للسلسلة الجانبية للببتيد عند بناء الببتيدوكلايكان المعقد المتكون بين الفانكومايسين وD-alanyl-D-alanine الذي يعمل على غلق إنزيم Transglycosylase والذي يدخل في بناء الببتيد والسكريات الثُنائية داخل سلسلة الببتيدوكلايكان النامية وإنزيمي DD-Transpeptidase وDD-carboxy peptidase (أي أنه يُثبط عمليةTransglycosylation) ، وهُنا يمنع المضاد من إستغلال المادة الأساس للإنزيم بدلاً عن التداخل المباشر مع الإنزيم الهدف وهي طريقة غير إعتيادية في التثبيط (المرجاني ،2011)

يُعد تأثير الفانكومايسين قاتلاً للبكتريا (Bactericidal) إذ يثبط عملية تكوين جدار الخلية من خلال إيقاف عملية Transpeptidation لكن بآلية تختلف عن آلية عمل مضادات-β Lactam ، إذ يرتبط الفانكومايسين مباشرة مع الجزء D-alanine−D-alanyl ضمن سلسلة pentapeptide الذي يؤدي لمنع إرتباط إنزيم Transpeptidase بينما ترتبط مضادات -β Lactam مع الإنزيم نفسه (Levinson &Jawetz,2002).

يُعد هذا المضاد فعالاً ضد مُعظم البكتريا الموجبة لصبغة كرام ، ويُعد العلاج الأمثل لاسيّما للمرضى الذين يعانون من حساسية تجاه البنسيلين ، كذلك الحال بالنسبة للبكتريا المقاومة

للسيفالوسبورينات وبشكل خاص مضادات الجيل الثالث إذ يُعد فعالاً ضد بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثيسيلين(MRSA) وبكتريا المكورات المعوية وخاصة *E.faecalis*، و فعالاً ضد بكتريا *S.epidermides* و *Clostridium difficile* والبكتريا الكروية السالبة لصبغة كرام ،أما البكتريا العصوية السالبة لصبغة كرام وبكتريا السل والفطريات فتكون مقاومة له(المرجاني، Levinson &Jawetez, 2002;2011)

استعمل مضاد الفانكومايسين في العلاج السريري سنة 1958 بوصفه المضاد مضاداً للبكتريا الموجبة لصبغة كرام . وازداد استخدام هذا المضاد بشكل كبير في 20 سنة الاخيرة, بسبب ازدياد المقاومة لمضاد المثيسيلين لكلا النوعين من العنقوديات السالبة Coagulase و *Staphylococcus aureus* (Srinivasan *et al*., 2002) . وتشير البيانات عام 2000 الى ان 75% من العنقوديات السالبة Coagulase و47% من عزلات *S. aureus* كانت مقاومة للمثيسيلين. وبقي الفانكومايسين هو العلاج البديل لهذه الاصابات .

تطورت مقاومة العنقوديات لـ الفانكومايسين في المختبرات حتى قبل استخدامه سريريا (Srinivasan*et al*., 2002) . نظرا للضراوة بكتريا *S. aureus* المعروفة مما جعل عزل السلالات المقاومة للفانكومايسين محط اهتمام كبير في الاوساط الطبية وايجاد الحلول للحد من ظهورها .

أصبح هذا المضاد فعالاً بدل البنسلين لعلاج التهاب شغاف القلب الناتج عن الاصابة ببكتريا *Streptococcus viridans* و*Enterococcus* او الاصابة الحادة الناتجة من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية , وضد البكتريا التي تسبب ذات الرئة المقاومة للبنسلين(Abramowicz, 2005)

تطورت المقاومة عند بعض سلالات المكورات العنقودية (*S. aureus*) للفانكومايسين واصبحت ذات مقاومة عالية تجاهه, لذلك يستخدم الان مضاد Linezolid او Daptomycin الذي يعد العلاج الامثل لتلك السلالات المقاومة للفانكومايسين (Bauer,2008). ويستخدم الفانكومايسين ايضا لعلاج الاصابة بـ المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للاوكزاسيلين (oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*), (Abramowicz, 2005).

تعد سلالات *S.aureus* حساسة للفانكومايسين (VSSA) عندما يكون التركيز المثبط الادنى (MIC) اقل او يساوي 4 مايكروغرام /مل ، أما السلالات التي تكون ذات MIC بين 8-16 مايكروغرام /مل فتعد سلالات متوسطة المقاومة للفانكومايسين (VISA) يستعمل هذا التصنيف في الولايات المتحدة الامريكية (Cosgrove *et al* ., 2004).أما في اليابان فإن السلالات ذات MIC⩽8 مايكروغرام /مل فيشار لها بانها VISA .أما السلالات المقاومة للفانكومايسين فهي السلالات ذات MIC⩽32 مايكروغرام /مل (Tenovery and Moellering, 2007; Hiramatsu,2001).بالإضافة الى سلالات *S. aureus* التي تم تحديدها كعزلات VISA/ VRSA، هناك سلالات من *S. aureus* يُشار اليها (heteroresistant) هذه السلالات هي حساسه للفانكومايسين بتركيز أكبر او يساوي 4مايكروغرام/مل(MIC= ⩽4 µg/mL) (Cosgrove *et al* ., 2004).

تشير هذه المقاومة الى سلالات من المكورات العنقودية الذهبية التي أصبحت مقاومة لمضاد الفانكومايسين، هناك ثلاثة اصناف مقاومة من *S.aureus* لمضاد الفانكومايسين : بكتريا *S. aureus* متوسطة المقاومة للفانكومايسين (hVISA) و (VISA) و(VRSA) المقاومة للفانكومايسين بمستوى عالٍ (Gould,2010;Appelbaum,2007)

يعد النمط المظهري hVISA مكون اساسي للتحول الى VISA. سجل اول ظهور لسلالات HVISA في اليابان عام 1996 وتنشأ بصورة متباينه (0-74%) بسبب صعوبة الكشف عنها ،عرفت سلالات VISA في اليابان عام 1996 ومنذ ذلك الحين وجدت في مستشفيات المملكة المتحدة ،فرنسا، الولايات المتحدة، اسيا، والبرازيل. ويطلق عليا ايضاً GISA (Glycopeptide-intermediated *S. aureus*) وتحتوي هذه السلالات على جدار خلوي سميك، يعمل على تقليل قابلية الفانكومايسين على اختراق هذا الحاجز(Howden *et al*.,2010).

يعتقد أن سلالات (hVISA) ساهمت في وجود السلالات متوسطة المقاومة للفانكومايسين (Moore *etal*.,2003)، على الرغم من عدم وجود ارتباط مهم بين فشل العلاج و ظهور سلالات hVISA في عدد من التقارير ، فقد اشارت تقارير كثيرة اخرى أن فشل علاج الفانكومايسين والاصابات المستمره من المحتمل ان تكون مرتبطة مع ظهور سلالات hVISA (Bae *et al*., 2009).

يمكن أن تنشأ سلالة البكتريا *S.aureus* المقاومة لمضاد الفانكومايسين (VRSA) من حصول السلالة المقاومة لمضاد المثيسيلين (MRSA) على اوبرون*vanA* من بكتريا المعويات المقاومة للكلايكوببتيد (Glycopeptides Resistant *Enterococci*)(Miller *et al*.,2002; Sievert *et al*., 2002). تم عزل عزلتين VRSA في الولايات المتحدة عام 2002 ومنذ ذلك الحين تم تحديد سبع عزلات اضافية لسلالة MRSA تحمل مجموعة الجين *vanA*في الولايات المتحدة (واحدة في نيويورك وست في ولاية مشيغان) كما سجلت سلالتين VRSA في الهند وإيران (Saha *et al* ., 2008;Aligholi *et al* .,2008).

كما عزل العديد من السلالات المعوية المعتمدة على الفانكومايسين*vanB*-type والتي تحتوي على الاوبرون *vanA* وهي *Enterococcus faecalis* و *Enterococcus faecium* (Moubareck *et al* .,2009) وصفت ميكانيكية الاعتماد على الفانكومايسين في *سلالة* *S.aureus* strain VRSA-7 vanA-type والمعزولة من مريض عولج بمضاد الفانكومايسين لفترة طويلة (Zhu *et al* .,2008; Sievert *et al* .,2008)، سجلت في فرنسا عام 1988 اول عزلة لبكتريا *Enterococcus faecium* مقاومة لمضاد الفانكومايسين, ومما اثار القلق لدى مسؤولي الصحة العامة وخبراء مكافحة العدوى هو امكانية انتقال الجين *vanA* الى *Staphylococcus aureus* وغيرها من البكتريا (Tenover *et al*.,2004). إن ظهور السلالات المقاومة للفانكومايسين (VRSA) أصبح يشكل احد المشاكل الطبية المهمة لاسباب عديدة منها أن انتشار هذه السلالات يقلل من خيارات العلاج الممكن أمام الاطباء، كما أظهرت تجارب الاقتران البكتيري في عام 1992 أمكانية انتقال جينات مقاومة الفانكومايسين من البكتريا البرازية المعوية (VRE) عن طريق نقل الجينات أفقياً الى *S.aureus*(Tenover *et al*.,2004). وبعد عام 2002 تم عزل سلالة VRSA من انابيب القثطرة لمرضى السكر ومرضى غسيل الكلى في ولاية مشيغان (Chang *et al*.,2003). إن نشوء سلالات VRSA ناتج عن الاستعمال الواسع للفانكومايسين في علاج hVRSA وان هناك علاقة لمضادات البيتالاكتم في نشوء وتطور مقاومة السلالات للفانكومايسين (Cui *etal*.,2003)

1-7آلية المقاومة لمضاد الفانكومايسين

ان مقاومة مضاد الفانكومايسين وبمستويات عالية وغيره من المضادات الكلايكوببتيدية ترجع لفعالية جينات *van* التي توجه عملية تصنيع السلاسل الطرفية لطبقة الببتيدوكلايكان (Serina

et al.,2004).قسمت هذه المقاومة في المكورات العنقودية الى ستة انواع التي يمكن تمييزها بالاعتماد على تتابع الجين التركيبي المسؤول عن كل نوع و يشفر كل منها لانزيم Resistant ligase مختلف وهذه الجينات هي (*van A* و *van B* و *van C* و *van D* و *vanE* و *vanG*) (Depardieu *etal*.,2004;Angeletti *etal*., 2001)، تعد مقاومة الفانكومايسين من النوع *vanA* و *van B* الاكثر شيوعا في معظم انحاء العالم (Zheng *etal*.,2009;Zirakzadeh &Patel ,2006).

تتميز المقاومة من النوع *van A* ذات التركيب المظهري van A phenotype بمستويات مقاومة عالية لمضاد الفانكومايسين وTeicoplanin وهومضاد ينتمي لمجموعة Lipoglycopeptides ذو تركيب معقد يشبه الفانكومايسين بطيف الفعالية وميكانيكية العمل ويختلف عنه من خلال توافر سلسلة طويلة من الاحماض الدهنية ويكون اقل فعالية ضد بعض سلالات بكتريا*S.aureus* السالبة لفحص Coagulase واكثر كفاءة من الفانكومايسين ضد بعض البكتريا الموجبة لصبغة كرام (Nichol *etal*., 2006; Depardieu , 2003 ;المرجاني 2011)

يشفر لهذا النوع من المقاومة من خلال *vanRSHAXGene* cluster التي تقع على الترانزبوزون *Tn1546* وهذا النوع من الترانزبوزونات يحتوي على جينين تنظيميين (Regulatory Genes) هما *vanR* و *van S* وجينات المقاومة الثلاثة *van H* و *van A* و *vanX* ويحتوي ايضا جينين اضافيين ليس لهما دور في المقاومة *vanY* و *van Z* (Talebi *etal*.,2008 ; Moubareck *et al*.,2009;Sletvold *etal*.,2011).

تعتمد مقاومة البكتريا لمضاد الفانكومايسين على ميكانيكية مهمة تتضمن استبدال D-alanine الطرفي في الببيتيدوكلايكان بحامض α-hydroxy وD-Lactate اي استبدال D-

anayl–D-alanine بـD-alanyl-D-Lactateبوساطة انزيمات VAN H و VAN A اذ تكون الفة الفانكومايسين لـD-anayl -D-Lactate اقل بالف مره من الفه للتركيب الاصلي في البكتريا الحساسة ، اذ يقوم انزيم VANH الذي يسمى D-Lactate dehydrogenase بتحويل حامض البايروفيك الى حامض اللاكتيك بينما يعمل انزيم VANA الذي يطلق عليه انزيم D-Ala-D-Lac Ligase الذي يساعد في تكوين اصرة آستر بين D-alanyl و-D lactate اما انزيم VANX والمسمى DD-Peptidase فيحلل D-anayl –D-alanine وبالنسبة لانزيم VANY فيزيل D-alanineالطرفي من الببتيدوكلايكان ،بينما يشفر *vanZ* لمقاومة Teicoplanin بميكانيكية غيرمعروفة (Panesso *etal*.,2002; ;Hasman *et al*.) (2006;Moubareck *et al*.,2009) .

تشفر مجموعة جينات *vanA* لمقاومة مستحثة (Inducible) بمستويات عالية للفانكومايسين وبتراكيز مختلفة من المضاد وهذه المجموعة قد تكون محمولة على الترانزبوزون *Tn1546* او على عناصر مشابهة له جينيا *Tn1546* like elements ويتوافر الترانزبوزون *Tn1546* محمولا على الكروموسوم او على بلازميدات مثل البلازميد pIP816 الذي عزل لاول مرة من السلالة *BM4147E.faecium* في فرنسا عام 1986 الذي يحمل قطعة جينية بحجم 25 kb بالإضافة لـ *Tn1546* الحامل للجين *vanA* الذي يبلغ حجمه 10.85 kb، ويعتقد ان جينات*vanA* المحمولة على *Tn1546* قد تكون محمولة على وحدة وراثية اكبر من الترانزبوزون واصغر من البلازميد والتي تؤدي الى ظهور اختلافات في احجام البلازميدات التي تحملها وكذلك انماط القطع التي يتم الحصول عليها وذلك عند المقارنة بين البلازميدpIP816 وpVEF4 المعزول من *E.faecium* التي عزلت من النرويج بالإضافة لسلالات مختلفة من نفس البكتريا معزولة من مناطق مختلفة وتحتوي قطع جينية تحمل *van A* gene cluster

Tn1546 بعد تحديد تتابعات هذه القطع وجد ان هناك وحدة جينية اكبر من *Tn1546* ذي حجم 10.85 kb تسهل الانتشار الافقي للبلازميدات المشفرة لمقاومة المضادات الكلايكوببتيدية بين سلالات *E.faecium* (Sletvold *etal*.,2011).

هناك آليات معقده تنتج التغيرات في محتوى جدار الخلية وتكون مولده للنمط المظهري لسلالات (VRSA) ،ولكن الاساس الجيني لهذه التغيرات لم يتم تحديده بشكل جيد (Avison *et al*., 2002) .يعد هذا النوع من المقاومة المكتسبة للمضادات الكلايكوببتيدية المشفرلها بواسطة اوبرون *vanA* المحمول على *Tn1546* (غالبا ما يحمل على بلازميدات اقترانية) هو الاكثر انتشارا بين سلالات *Staphylococcus* (Moubareck *etal*.,2009).

يتميز التركيب المظهري لاوبرون *vanB* بمستوى عالٍ من مقاومة الفانكومايسين المستحثة ولكنه يظهر حساسية تجاه مضاد Teicoplanin ولكن بعض الدراسات اظهرت نتائج مغايرة اذ تم عزل سلالات VREfmمن عينات مرضية وتم دراسة التركيب المظهري والوراثي لهذه العزلات في كوريا الجنوبية للتحري عن مسببات وباء في فترات متقطعة فوجد في بداية الامر ان اغلب هذه العزلات اظهرت التركيب المظهري *vanB* اي انها كانت مقاومة للفانكومايسين وحساسة لمضاد Teicoplanin ولكن عند التحري عن وجود جينات المقاومة بتقنية PCR باستخدام البوادىء (Primers) المتخصصة لكل جين وجد انها تحمل الجين *vanA* وبذلك تم التأكد من ان هذه العزلات كانت تحمل التركيب المظهري *vanB* في حين انها تحمل التركيب الوراثي *vanA* (Oh *etal*.,2007).

يقسم *vanB* الى ثلاثة انواع بالإعتماد على الاختلاف بتتابعات Van B ligase ولكنها تعمل بنفس آلية المقاومة (Courvalin *etal*.,2006) ، هذه الانواع هي *vanB1* و*vanB2* و*vanB3* ويحمل *vanB2* على الجين القافز الاقتراني *Tn1549* الذي يبلغ حجمه 34kb

وجين قافز اخر وثيق الصلة به هو *Tn5382* بحجم 27kb اللذين يطابقان الجينات القافزة التي تعود لمجموعة *Tn916* الاقترانية وهذه العناصر القافزة قد تكون محمولة على بلازميدات اقترانية وغير اقترانية مثل البلازميد pMG2200 بحجم 106 kb والذي يحمل جين مقاومة الفانكومايسين وانتاج البكتيريوسين (Zheng *etal*., 2009;Garnier *etal*.,2000)

كما وجد ان مقاومة الفانكومايسين المرتبطة باوبرون*vanB* محمولة ايضا على البلازميدات pIP834 وpIP835 وهي بلازميدات اقترانية ايضا (Garnier *etal*.,2000).

اما المقاومة التي يشفر لها بوساطة الجين المشفر للإنزيم *Van C* Ligase تتميز بمستويات مقاومة واطئة للفانكومايسين فقط وهي غير مكتسبة وليست انتقالية بوصفها تعد ذاتية اذ ان جيناتها محمولة على الكروموسوم فقط وتشفر هذه الجينات لمقاومة من النوع التركيبي (غير المستحثة) للفانكومايسين من خلال آلية استبدال D-alanyl-D-alanine في السلسلة الطرفية بـD-alanyl-D-Serien ويعد النوع *vanC* اكثر انتشارا بين خلايا النوع *E.gallinarum* بصورة عامة بينما vanC2/3 فيزداد انتشارها بين النوعين *E.flavescens* و*E.cassliflavus* (Arias *et al*. , 2000; Panesso *et al*. ,2005; Reynold & Courvalin , 2005; Merquior *et al*. ,2008).

يشفر*vanD* لمستويات مقاومة معتدلة لكل من الفانكومايسين وTeicoplanin وآلية عمله مماثلة لعمل كل من اوبرون *vanA* و اوبرون *vanB* ويكون *vanD* محمولا اما على الكروموسوم او البلازميد مثلpAT820 وpAT821 وpAT822 في السلالة *E.faecium* BM4538 (Depardieu *etal*.,2003;Depardieu *etal*.,2004). اما اوبرون *vanE* فيشفر لمستويات مقاومة واطئة للفانكومايسين فقط ويشابه في آلية عمله *vanC* وكذلك الحال بالنسبة للاوبرون*vanG* والتي توجد جيناتها محمولة على الكروموسوم،وكما هو

الحال بالنسبة للاوبرون *vanC* فان *vanE* و *vanG* يعملان على استبدال D-alanine الطرفية بـD-Ser ليكون التركيب النهائي للسلسلة الطرفية D-Ala-D-Ser

(Patino *etal*.,2000; Reynolds&Courvalin,2005; Boyd *etal*.,2006)

8-1 التحري عن جينات مقاومة الفانكومايسين بتقنية PCR

تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) Polymerase Chain Reaction عبارة عن تفاعل يتضمن تضخيم تتابع من DNA سواءً كان هذا التتابع جزء من الجينوم أو ناتج من عملية كلونه ، وضع أهم أسسها العالم Kary Mullis عام 1985 وحاز من خلال اكتشافه على جائزة نوبل للكيمياءعام 1993 ، تتمُ هذه العملية بوجود شريط قالب DNA الذي يحتوي على التتابع المطلوب تضخيمه والمتكوّن من عشرات أو عشرات الآلاف من النيوكليوتيدات وبوجود *Taq* DNA Polymerase الثابت حرارياً ، وبوجود زوج من البوادئ، وهي عبارة عن قطعة DNA تتكون من عدد من النيوكليوتيدات فضلاً عن محلول دارئ يُمثل وسطاً لإجراء أو حدوث التفاعل الذي يحتوي على القواعد النيتروجينية الأربعة(dNTPs) . وتتم هذه العملية بثلاث خطوات: الأولى تتضمن مسخ (Denaturation) لشريط القالب أي فك شريطيه للسماح للبوادئ بالارتباط مع التتابع المكمل لها على شريط القالب ،أما الخطوة الثانية فتضم ارتباط البوادئ مع شريطي القالب (Annealing) ، والثالثة التي يطلق عليها بخطوة الاستطالة(Extension) والتي يبدأ من خلالها إنزيم البلمرة بإضافة القواعد النيتروجينية لشريط البادئ من النهاية 3`- OH الحرة (Sambrook&Russell,2001).

يتم الكشف عن جينات مقاومة الفانكومايسين (*van B,van A*) في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بوساطة استخدام العدة التشخيصية نفسها أو نفس الجينات التي تستخدم للكشف أو

التحري عن هذه المقاومة بتقانة (PCR) في بكتريا المكورات المعوية *Enterococci* بالاعتماد على تبادل أو انتقال الجينات الذي يحدث بين بكتريا المكورات العنقودية الذهبية وبكتريا المكورات المعوية (Shindia *et al*., 2011).

أدت زيادة مقاومة المكورات العنقودية الذهبية لمضاد الفانكومايسين والاستخدام المفرط للمضادات الحيوية إلى تفاقم المقاومة وخطرها. مما يتطلب دراسات موسعة تشمل مناطق جغرافية مختلفة وكبيرة للتوصل إلى نتائج مضمونة فيما يخص علم الأوبئة, وآلية مقاومة المكورات العنقودية الذهبية للفانكومايسين وآثارها السريرية, وطريقة أسرع تختصر الوقت للوصول إلى الحل السريع لمشكلة المقاومة لمضاد الفانكومايسين إذ استخدمت طريقة التضخيم بوساطة تقانة (PCR) التي استخدمت هذه التقانة لسنوات عديدة للكشف أو التحري عن المسببات المرضية أو عوامل الضراوة أو آليات المقاومة للمضادات المختلفة (Al Zahrani , 2011) يتم الكشف عن كل جين من جينات مقاومة الفانكومايسين بهذه التقانة وبالتالي نحدد الطرز الوراثية لكل جين فضلا عن تحديد الطرز المظهرية مسبقا بوساطة فحص الحساسية والتركيز المثبط الأدنى (MIC) كما أن المستويات العالية من المقاومة للفانكومايسين يعطي توقع أكيد بوجود جين مقاومة الفانكومايسين , كما إن الخطر يتفاقم خصوصا وان لها قابلية الانتقال بين الأجناس والانواع البكتيرية المختلفة وهذا أدى إلى البحث السريع للتحري عن هذه الجينات لدراسة انتقالها واكتساب صفة المقاومة المتعددة للمضادات المختلفة(Loomba *et al*., 2010)

المواد وطرائق العمل Materials & Methods

2-1 الأجهزة والمواد

2-1-1 الأجهزة المستخدمة

استخدمت الأجهزة المدرجة في القائمة أدناه :

ت	اسم الجهاز	الشركةالمصنعة(المنشأ)
1	فرن كهربائي Oven	IMS (Mauritius)
2	مازج Vortex	Labcco (Japan)
3	جهاز طرد مركزي Centrifuge	Hermle (Germany)
4	جهاز طرد مركزي صغير مبرد Cooling Biofuge	Hettich (Germany)
5	مقياس الرقم الهيدروجيني pH meter	Radiometer (Danmark)
6	حاضنة هزازة Shaker Incubator	Gallenkamp (England)
7	حاضنة Incubator	
8	موصدة Autoclave	
9	محرك مغناطيسي Magnatic stirrer	
10	حمام مائي Water bath	
11	مسخن حراري ممغنط Hot plate	
12	جهاز تقطير Water Distillator	
13	مجهر ضوئي مركب Compound light microscope	Olympus(Japan)
14	ميزان حساس Analytical balance	Mettler (Switzerland)
15	جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis	Cleaver scientific (Taiwan)
16	جهاز بلمرة متدرج Gradient PCR	TechNet – 500(USA)

17	مصدرالاشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator	U.V.P (USA)
18	جهاز طرد مركزي صغير Biofuge	Heraeus (Germany)

2-1-2 المواد الكيميائية والبايولوجية

1-2-1-2 المواد الكيميائية

ت	المادة	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	محاليل صبغة كرام Gram stain	Syrbio(Syria)
2	محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland solution	Biomérieux(France)
3	كلوريدالصوديوم NaCl	BDH(England)
4	هيدروكسيدالصوديوم NaOH	
5	صبغة أزرق البروموفينول Bromophenol Blue	
6	كليسيرول Glycerol	
7	سكروز Sucrose	
8	رافينوز Raffinose	
9	فينول Phenol	
10	حامض الهيدروكلوريك HCl	
11	كلوروفورم Chloroform	
12	حامض البوريك Boric acid	
13	سترات الصوديوم Na - citrate	
14	أثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك EDTA	
15	أسيتون Acetone	
16	كحول آيزوأميلي Isoamylalcohol	
17	مستخلص اللحم Beef extract	Oxoid (UK)
18	ببتون Peptone	
19	مستخلص الخميرة Yeast extract	
20	أكار–أكار Agar −Agar	
21	سترات أمونيوم الحديديك FerricAmmonium citrate	Rediel de hein (Germany)

22	مسحوق البلورات البنفسجية	Crystal violate	Fluka(Switzerland)
23	ترس الحامضي	Tris - HCl	Fluka(Switzerland)
24	ترس القاعدي	Tris – base	
25	بيروكسيدالهيدروجين	H_2O_2	
26	كلوكوز	D-glucose	
27	أكاروز	Agarose	
28	كحول أثيلي	Ethanol	Promega (USA)
29	صبغة برومايد الإثيديم	Ethidium Bromid	Sigma (USA)

2-2-1-2 المضادات المايكروبيه Antimicrobial Agents

أ- **أقراص المضادات المايكروبيه Antimicrobial disks**

ت	اسم المضاد	رمز المضاد	تركيزه في القرص µg	الشركة المصنعة والمنشأ
.1	Vancomycin	VA	30	Bioanalyse (Turkey)
.2	Ampicillin	AMP	1	Bioanalyse (Turkey)
.3	Cloxacillin	CX	1	Bioanalyse (Turkey)
.4	Ceftriaxone	CRO	30	Bioanalyse (Turkey)
.5	Erythromycin	E	15	Bioanalyse (Turkey)
.6	Enorfloxacin	ENR	10	Bioanalyse (Turkey)
.7	Cefepime	FEP	30	Bioanalyse (Turkey)
.8	Azithromycin	AZM	15	Bioanalyse (Turkey)
.9	Lincomycin	L	2	Bioanalyse (Turkey)
.10	Fusidic acid	FA	15	Bioanalyse (Turkey)
.11	Neomycin	N	30	Bioanalyse (Turkey)

ب- مساحيق المضادات المايكروبية Antimicrobial Powders

المضاد	الشركة المصنعة والمنشأ
Vancomycin	Rospira(USA)

2-1-2- 3 الإنزيمات

أستعمل في هذه الدراسة إنزيم اللايسوزايم (Lysozyme) المجهز من شركة (England\BDH)

2-1-2-4 العدة المختبرية

ت	العدة المختبرية	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	عُدة Go taq Green master mix PCR وتحتوي المحاليل الكافية لإجراء 100 تفاعل كل تفاعل بحجم (50) مايكروليتر ويضم مايأتي :- 2x1.25ml 2x PCR master mix 2x1.25 ml Nuclease free water	Promega (USA)
2	100bp DNA Ladder تحتوي على المحلولين الآتيين :- 100 bp DNA Ladder Blue /orange 6X loading dye	
3	عدة الفحص Api staph الذي يضم شريط الفحص بالإضافة إلى ما يأتي : 1-API suspension media 2ml 2-API GP Medium 3- VP1 +VP2 reagent 4-Nin reagent 5- Zym A + Zym B reagent	Biomérieux (France)

2-1-2-5 مــواد متفرقـة

المادة	المصدر
أكياس الدم البشري Human Blood	مصرف الدم – مستشفى مدينة الطب–بغداد
بلازما الدم البشري Human Blood Plasma	مصرف الدم – مستشفى مدينة الطب–بغداد
بوادىء(primers)	(Canada) Alpha DNA

2-1-2-6 السلالة القياسية

أستعملت السلاله القياسية *S .aureus* ATCC 29213 لتقييم أقراص المضادات المستعملة وتم الحصول عليها من مختبر الصحه المركزي /بغداد

2-2 طرائق العمل Methods

2-2-1 تحضير المحاليل والكواشف والصبغات المستعملة في عزل وتشخيص البكتريا

حُضرت المحاليل والكواشف المستعملة كافة في عـزل البكتريا وتشخيـصها حسب مــا ورد في (Macfaddin, 2000; Levinson & Jawetz, 2002; Forbes *et al*., 2002)

2-2-1-1 كاشف الكتاليز Catalase reagent solution

حُضر محلول بتركيز (3)% من بيروكسيد الهيدروجين أستعمل للكشف عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم Catalase وحُفظ في قنينة معتمة .

2-2-1- 2 محاليل صبغة كرام Gram's stain

استعملت المحاليل الجاهزة والمصنعة من قبل شركة (Syria\Syrbio) .

2-2-2 المحاليل المستعملة في إختبارات الحساسية للمضادات المايكروبية.

2-2-2-1محلول ثابت العكرة القياسي(Macfarland stander solution 0.5)

أُستعمل المحلول الجاهز المجهز من شركةFrance\Biomérieux ، لمُعايرة عدد الخلايا البكتيرية ، و هو يعطي عدداً تقريبياً للخلايا (1.5×10^8) خلية\مل.

2-2-2-2 المحلول الملحي الفسلجي Physiological Saline Solution

حُضر بإذابة (8.5) غم من كلوريد الصوديوم في (900) مل من الماء المقطر و أكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر، ثم عُقم بالموصدة وحُفظ في درجة حرارة(4)م لحين الإستعمال .

2-2-2-3 المحاليل الخزينة للمضادات المايكروبية.

حُضر المحلول الخزين لمضاد الفانكومايسين حسب ماجاء في Stephenson (2003)، كالآتي:-

حضر محلول خزين لمضاد الفانكومايسين Vancomycin Stock Solution بتركيز(10)ملغم /مل وذلك بإذابة (0.1)غم من المضاد في (9) مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى (10) مل بالماء المقطر.بعدها عقم بأستعمال المرشح الغشائي ذي ثقوب بقطر 0.22مايكروميتر.

2-2-3المحاليل الخزينة الخاصة بالإختبارات الوراثية .

حُضرت المحاليل الخزينة كافة حسب ما جاء في Sambrook&Russell (2001) و Stephenson (2003) و كالآتي:-

2-2-3-1 دارئ ترس – حامض الهيدروكلوريك Tris – HCl

حُضرهذا المحلول بتركيز(2) مولار بإذابة (31.52) غم من الترس الحامضي في(80)مل من الماء المقطر، ثم عُدل الرقم الهيدروجين إلى(7.5)بإستعمال حامض HCL المركز وأكمل الحجم إلى(100) مل وعُقم بالموصدة .

2-2-3-2 محلول EDTA

حُضر هذا المحلول بتركيز(0.5)مولار بإذابة (93.06) غم من مادة EDTA في(400)مل من الماء المقطر، ثم ضُبط الرقم الهيدروجيني إلى (8) بإستعمال NaOH (10)عياري ، و أكمل الحجم الى (500) مل من الماء المقطر وعُقم بالموصدة.

2-2-3-3 محلول هيدروكسيد الصوديوم (10)عياري NaOH (10N)

حُضر بإذابة (40) غم من NaOH في (80) مل من الماء المقطر ثم أكمل إلى (100) مل بالماء المقطر .

2-2-3-4 محلول دارئ TE

يتكون من (0.05 مولار Tris-HCl و0.005 مولار من EDTA)،إذ حُضر (100) مل منه بأخذ(2.5) مل من محلول Tris- HCl المحضر وفق الفقرة (2-2-3-1) و(1) مل من محلول EDTA المحضر وفق الفقرة (2-2-3-2) و أكمل الحجم إلى(100) مل بالماء المقطر وعُقم بالموصدة وحُفظ بعدها في الثلاجة فـي (4) م^0 .

2-2-3-5 المحاليل المستعملة في عزل الدنا البلازميدي Plasmid DNA- Extraction Solution

أستعملت عدة أستخلاص DNA المجهزة من شركة Promega (USA) لأ ستخلاص DNA البلازميدي .

الإنزيمات المستعملة

إنزيم Lysozyme

حُضر بتركيز(1) ملغم\مل بإذابة (0.001) غم من الإنزيم في(1)مل من دارئ TEالمحضر وفق الفقـرة (2-2-3-4) ، تم تحضير هذا المحلول آنيا.

2-2-3-6 المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي

2-2-3-6-1محلول10 x Tris- Boric acid – EDTA(TBE)

حُضر بإذابة(108) غم من الترس القاعدي و (50) غم من حامض البوريك و (40)مل من محلول EDTA المحضر وفق الفقرة (2-2-3-2) بمقدار (800) مل من الماءالمقطر ثم عُدّل الرقم الهيدروجيني الى (7.8) بعدهاأكمل الحجم إلى لتر وعُقم بالموصدة .

2-2-3-6-2 دارئ التحميل 6 x Loading buffer

حُضر بإذابة (0.25)غم من صبغة البروموفينول الأزرق و (30) مل من الكليسيرول و (40) غم من السكروز في(50) مل من الماء المقطر، ثم عُدّل الرقم الهيدروجيني إلى (8) بإستعمال NaOH (1) عياري، وأكمل الحجم إلى (100)مل بالماء المقطر وحُفظ في قنينة مُعتمة في (4) م^0.

2-2-3-6-3 محلول خزين بروميد الإثيديوم Ethidium Bromide Stock Solution

حُضر بإذابة (0.05) غم من صبغة بروميد الإثيديوم في (9) مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى (10) مل بالماء المقطر للحصول على تركيز نهائي (5) ملغم \مل.

2-2-4 المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR

2-2-4-1محلول PCR master mix , 1x

تم تحضيرهُ حسب تعليمات شركة Promega المُجهزة وكالآتي :-

تم أخذ حجم من محلول PCR master mix , 2x الذي يتكون من [دارئ التفاعل 2x Green Go taq reaction ذي الرقم الهيدروجيني (8.5) الحاوي على (50) وحدةا مل من إنزيم البلمرة Go Taq DNA polymerase بالإضافة للقواعد النيتروجينية الأربع بتركيز (400) ملي مولار لكل من dATP و dGTP و dCTP و dTTP و(3) ملي مولار من$MgCl_2$] وإضافته إلى حجم مماثل من محلول (Nuclease Free Water) وبعدها مُزج جيدا بإستعمال المازج و حُفظ في(– 20) م^0 لحين الإستعمال .

2-2-4-2 محاليل البوادئ Primers Solutions

أختيرت البوادئ النوعية المُستهدفة لجينات *vanA* و*vanB* في بكتـريا *S.aureus* . وفقاً لما ذكر في Dutka-Malen *et al*. (1995) و(2001). Elsayed *et al* و Jackson *et al*. (2004)،وكما مُبين في جدول (2-1)،إذ تم تحضير محاليلها الخزينة حسب تعليمات شركة Alpha DNA المُجهزة لها كما في جدول(2-2) بإستعمال الماء المقطر اللاّأيوني المُعقم للحصول على تركيز (100) بيكومول\مايكروليتر

جدول (2-1) تتابعات وتراكيز البوادىء وحجم الناتج المتوقع لكل بادىء

ت	البادئ	تتابع البادئ 5`——3`	عدد القواعد bp	التركيـز Pmol	حجم D.W µL	حجم الناتج bp
1	*vanA*-F	GGGAAAACGACAATTGC	17	12708	1270	732
	R	GTACAATGCGGCCGTTA	17	18900	1890	
2	*vanB*-F	AAGCTATGCAAGAAGCCATG	20	12513	1250	536
	R	CCGACAATCAAATCATCCTC	20	11664	1160	

تـم تحضـير محلـول كـل بـادئ وبشـكل منفصـل بتركيـز (10) بيكومول\مـايكروليتر، وذلـك بأخـذ(10) مـايكروليتر من المحلول الخزين لكل بـادئ وإضـافته إلـى (90) مـايكروليترمن المـاء المقطراللاأيوني، ومُزج جيداً وحُفظ في الثلج لحين الإستعمال في حين حُفظت المحاليل الخزينة

للبوادئ في درجة (20-) م^0 مع مُراعاة مزج المحلول بعد إخراجه من الثلج بإستعمال المازج لمُجانسته قبل الإستعمال

جدول (2-2)خصائص البوادئ المستعملة

ت	البادئ	ODs	*Pmoles	µg	Mol/OD	Pmol/OD	µg/OD	**Tm
1	*vanA*–F	22.2	12708	667	5252	5714	30	61.09
2	R	31.4	18900	985	5210	6024	31.4	63.5
3	*vanB*-F	25.6	12513	771	6159	4880	30.1	66.2
4	R	22.1	11664	699	5990	5283	31.6	66.2

* Picomoles

** Melting Temperature

2-2-5 الأوساط الزرعية

2-2-5-1 الأوساط الزرعية الجاهزة

حضرت الأوساط الزرعية الجاهزة الآتية، وعقمت بالموصدة بدرجة 121°م وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة تبعاً لتعليمات الشركة المجهزة:

2-2-5-1-1 أكار نقيع القلب والدماغ Brain Heart Infusion Agar (BHIA) (Himedia / India)

2-2-5-1-2 مرق نقيع القلب والدماغ Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Himedia / India)

2-2-5-1-3 آكار المانيتول الملحي Mannitol salt agar (Himedia / India)

2-2-5-1-4 آكار مولر– هنتون Muller – Hinton agar (Himedia / India)

2-2-5-1-5 الاكار المغذي Nutrient agar (Oxoid/England)

2-2-5-1-6 المرق المغذي Nutrient broth (Oxoid/England)

2-5-2-2 الأوساط الزرعية التركيبية :-

1-2-5-2-2 أكار اليوريا Urea agar

حضر وسط أكار اليوريا الأساس ، ثم عقم بالموصدة عند درجة 121 م وضغط 15 باوند/انج² لمدة 15 دقيقة ، ثم ترك ليبرد عند درجة 45 م ، ثم اضيف اليه 50 مليلترا" من اليوريا بتركيز 40 % المعقمة بالترشيح بمرشحات ذات اقطار 0.22 مايكروميتر وبعد ذلك صب المزيج في انابيب معقمة ووضعت بشكل مائل (Slant) الى ان تصلبت .

2-2-5-2-2 وسط آكار الدم Blood agar

حُضر هذا الوسط بإضافة دم الإنسان بنسبة 5 % إلى وسط أكار الدم الأساس المحضر وفق تعليمات الشركة والمُعقم بالموصدة وذلك بعد تبريده إلى (50) م^0 ، ثم صُبّ في أطباق معقمة وتُرك ليتصلب (Forbes *et al.*,2002) .

3-2 العزلات البكتيرية

1-3-2 جمع العينات

تم جمع عينات سريرية مختلفة شملت عينات الجروح والحروق والدم والادرار للتحري عن بكتريا ***Staphylococcus*** للفتره من 2011/9/1 لغاية 2012/1/1 من مستشفيات مختلفة في مدينة بغداد شملت المختبرات التعليمية لمدينة الطب و مستشفى الإمام علي ومستشفى الكاظمية التعليمي ومستشفى الطفل المركزي ومستشفى العلوية للولادة ومستشفى ابن البلدي للولادة ومختبر الصحة المركزي.

2-3-2 زرع العينات

زرعت العينات على وسط آكار الدم ، ثم حضنت الأطباق بدرجة 37 م° لمدة 18-24 ساعة ثم نقلت إلى وسط المانيتول الملحي، وحضنت بدرجة 37م° لمدة 48 ساعة.

3-3-2 تشخيص البكتريا

شخصت البكتريا اعتماداً على صفاتها الزرعية، و المجهرية، والاختبارات الكيموحيوية، وكالاتي :

2-3-3-1 الصفات الزرعية

شخصت العزلات البكتيرية النامية مبدئياً اعتماداً على صفاتها الزرعية من حيث حجم المستعمرات، ولونها، وقوام المستعمرات، فضلاً عن قدرتها على تحليل كريات الدم الحمراء على وسط آكار الدم.

2-3-3-2 الصفات المجهرية

أخضعت العزلات البكتيرية إلى الفحص المجهري فقد صبغت مسحة خفيفة من المستعمرات البكتيرية بصبغة كرام، وفحصت تحت العدسة الزيتية لتمييز شكل الخلايا، وطريقة تجمعها، وايجابيتها، وسلبيتها للصبغة.

2-3-3-3 الاختبارات الكيموحيوية

تم اعتماد الاختبارات الكيموحيوية لغرض التشخيص وعلى النحو الآتي :

- **اختبار انتاج انزيم Urease**

زرعت البكتريا تحت الاختبار بطريقة التخطيط على وسط أكار اليوريا وحضنت عند درجة 37م لمد ة24-48 ساعة ، ظهور اللون الوردي دل على النتيجة الموجبة

- **اختبار أنتاج الكاتاليز Catalase test**

نقل جزء من المزروع البكتيري بعمر (18-24 ساعة) من وسط الاكار المغذي إلى شريحة زجاجية نظيفة وجافة باستخدام العيدان الخشبية المعقمة (wooden sticks)، ووضع فوقها قطرة من 3% بيروكسيد الهيدروجين، وكانت النتيجة الموجبة هي ظهور فقاعات هوائية على سطح الشريحة دلالة على إنتاج إنزيم الكاتاليز، وتحرر غاز الأوكسجين (Harley and Prescott, 2002)

2-3-3-4التشخيص بنظام Api Staph

استخدام نظام Api Staph

يتكون هذا النظام من 20 مستودعا تحوي كل منها على مكونات لمواد منزوعة الماء (Dehydrated ingredients) .

1- تحضير الشريط Preparation of strip

وضع 5 ملليترات من الماء المقطر في الاخدود (Groove) الموجود في حافة الشريط لتهيئة ظروف رطبة داخل الحاوية .

2- تحضير العالق البكتيري Preparation of inoculums

اخذت مستعمرة معزولة ونقية من وسط الأكار المغذي وعلقت في انبوبة تحوي 6 ملليترات من Api Staph medium ومزجت جيدا .

3- تلقيح الشريط Inoculation of strip

أ- ملء الجزء السفلي و العلوي للأنابيب الصغيرة (Microtube) بالعالق البكتيري بوساطة ماصة باستور.

ب- تم ملء الجزء السفلي فقط للأنابيب الحاوية على كل من ADH ، URE ، اذ ملئت الأجزاء العلوية لها بقطرات من زيت البارافين السائل المعقم لجعل الظروف لاهوائية ، وبعدها اغلقت الحاوية بالغطاء الخاص بها ، وحضنت عند درجة حرارة 37 م ولمدة 24 ساعة

4- قراءة الشريط Reading the strip

بعد انتهاء مدة الحضن قرأت النتائج بعد أضافة الكواشف الاتية :-

الانبوبة	الكواشف	مادة الكشف
NIT	قطرة من كاشف NIT1 + قطرة من كاشف NIT2	0.8 % Sulfanilic acid in 5N acetic acid 0.6 % Dimethyl–1–naphthylamine in 5N acetic acid
PAL	قطرة من كاشف PAL1 + قطرة من كاشف PAL2	Laarly sulfatein tris hydrochloride Fast blue BB in 2–methoxy ethanol
VP	قطرة من كاشف VP1 + قطرة من كاشف VP2	40 % Pottasium hydrochloride 60 % α-naphthol in ethanol

- **اختبار النمو على وسط المانيتول الملحي**

نقل جزء من المزروع البكتيري بعد التشخيص الأولي على وسط آكار الدم إلى وسط المانيتول الملحي، وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 24-48 ساعة للتمييز بين المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* عن الانواع غير المخمره للمانيتول, إذ تكون مستعمراتها صفراء ذهبية على هذا الوسط نتيجة تخميرها لسكر المانيتول وتغيرها لون الكاشف الى الاصفر، اما الانواع التي لا تخمر سكر المانيتول فتظهر مستعمراتها وردية او بيضاء(Brooks *et al*., 2007).

- **اختبار إنتاج إنزيم مجلط البلازما Coagulase test**

تم إجراء هذا الفحص بطريقتين:

- الطريقة الأولى

فحص عامل التكتل (فحص الشريحة) Clumping factor (slide test)

تم إجراء هذا الفحص بعمل عالق بكتيري بمزج مستعمرات نامية على وسط اكار الدم Blood agar بعمر 18-24 ساعة مع قطرة بلازما دم الإنسان على شريحة زجاجية نظيفة وجافة، تم مزج القطرتين جيداً لمجانسة العالق، كما تم عمل سيطرة سالبة بمزج البكتريا مع قطرة من المحلول الملحي الفسلجي المعقم، عدت النتيجة موجبة عند تكتل العالق خلال مدة 10 ثوان (Morello *et al*.,2003).

- الطريقة الثانية

فحص إنزيم مجلط البلازما الحر (فحص الأنبوبة) Free Coagulase (tube test)

تم خلط 0.1 مللتر من المزروع البكتيري المنمى على وسط نقيع الدماغ والقلب مع 0.5 مللتر من بلازما دم الإنسان، حضن الخليط بدرجة 37 م°، وتمت قراءة النتيجة خلال فترة 4 ساعات، وقد عدت النتيجة الموجبة عند تكون الخثرة بإمالة الأنبوبة بدرجة 90 ° تركت النتائج السالبة إلى اليوم التالي بدرجة حرارة الغرفة ؛ لان بعض السلالات تنتج إنزيم Coagulase ببطء (Brooks *et al*., 2007).

4-3-2 حفظ العزلات وإدامتها

أ- الحفظ على مائل الاكار Slant agar (WHO , 2003)

لقحت العزلات البكتيرية بعد تشخيصها على وسط الاكار المغذي المحضر بشكل مائل وبطريقة التخطيط، وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة، ثم حفظت بدرجة 4 م° للاستعمال

اليومي، ويتم تجديد العزلات بشكل دوري شهرياً، وذلك بتنشيطها على وسط المرق المغذي ثم إعادة زرعها على وسط مائل جديد لضمان بقاء العزلات بشكل نشط طيلة مدة الدراسة.

ب- الحفظ في الكليسيرول 20% (Burnett and Crocker,2005)

حضرت أنابيب صغيرة تحوي 0.5 مللتر من 40% كليسيرول معقم، وأضيف له حجم مماثل من المزروع البكتيري المنمى على وسط المرق المغذي للحصول على تركيز نهائي للكليسيرول 20% ، وحضنت الأنابيب بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة بعدها حفظت الأنابيب بدرجة 20- م° لحين الاستعمال.

5-3-2 فحص الحساسية للمضادات المايكروبية Antimicrobial Susceptibility

استخدمت طريقة انتشار الأقراص (Disk diffusion test) وحسب ماجاء في(Morello *et al*., 2006) و(CLSI (2009 :

1- نقلت 3-5 مستعمرات لها الصفات المظهرية نفسها نامية على وسط الاكار المغذي بوساطة ناقل الزرع القياسي إلى أنبوبة تحوي 5 مللتر من المرق المغذي.
2- حضنت الأنابيب الحاوية على المزروع البكتيري السائل بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة.
3- نقل جزء من المزروع السائل (0.1 مل) إلى أنابيب تحوي المحلول الملحي الفسلجي, وقورنت عكورة النمو مع عكورة محلول ثابت العكورة القياسي (McFarland standard No.5 والذي يعطي عدداً تقريبياً للخلايا1.5×10^8 وحدة تكوين مستعمرة / مللتر.
4- نقل 100 مايكروليتر من العالق البكتيري بوساطة الماصة الدقيقة Micropipette, ثم نشر بوساطة الناشر الزجاجي على سطح وسط آكار مولر – هنتون بصورة متجانسة، بعدها تركت الأطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة 10-15 دقيقة.
5- نقلت بعدها أقراص المضادات المايكروبية بوساطة ملقط معقم إلى الأطباق، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة.
6- قرأت النتائج بقياس قطر مناطق التثبيط بالملم حول أقراص المضادات المايكروبية , وقورنت مع الجداول القياسية في (CLSI (2009

6-3-2 تحديد التركيز المثبط الأدنى لمضاد الفانكومايسين

Determination of minimal inhibitory concentration

اتبعت طريقة التخافيف المتسلسلة المتضاعفة Double dilution method في وسط مولر هنتون الصلب وحسب ماجاء في (Morello *et al*. 2003) و(CLSI (2009 وكما مبين أدناه:

- حضرت تراكيز متسلسلة متضاعفة تراوحت قيمتها ما بين (8-512) مايكروغرام/مل لمضاد الفانكومايسين، و ذلك بأضافة نسب مختلفة من هذا المضاد من محلول الخزين إلى وسط أكَار مولر – هنتون المعقم و المبرد إلى 50 مo .
- رُجّت الأوساط جيدا بعد إضافة المضاد و صبت في اطباق معقمة ، وحفظت بدرجة حرارة الثلاجة (في 4 مo) لحين الأستعمال ، واستعملت خلال 24–48 ساعة.
- حُضّرت التخافيف العشرية 10^{-2} لمزارع البكتريا كافة باستعمال محلول الملح الفسلجي المعقم.
- سُحبَ 5 مايكروليتر من التخفيف اعلاه بوساطة ماصة دقيقة ولُقِّحت به اوساط المضادات الحيوية .
- تم تكرار العملية لكافة المزارع بالتسلسل (مكررين للتركيز الواحد) وتركت الأطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لكي تجف القطرات قبل قلب الأطباق ، ثم حضنت بدرجة 37 م^{o} لمدة 24 ساعة . تم حساب التركيز المثبط الأدنى M.I.C على انه اقل تركيز من المضاد الحيوي والذي يمنع ظهور نمو واضح للبكتريا.

2-3-7 التحري عن المحتوى البلازميدي Detection of plasmid profile

2-3-7-1 عزل الدنا البلازميدي

تم عزل الدنا البلازميدي حسب promega وكالآتي :-

- نقل 1 مل من مزروع العزلات البكتيرية المنماه بعمر 24 ساعة الى انابيب ابيندروف (1.5 مل)
- طردت الانابيب مركزياً لمدة دقيقة بسرعة 14000 دوره / دقيقة ، بعدها أهمل الطافي .
- أعيد تعليق راسب الخلايا بإضافة 200 مايكروليتر من اللايسوزايم (المحضر في الفقرة 2-3-2-5) ورجت الانابيب جيداً .
- حضنت الانابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة عشر دقائق ، وتم قلب الانابيب ثلاث مرات في أثناء فترة الحضن.
- أضيف 200 مايكروليتر من دارىء GB وخلطت المحتويات جيداً لمدة (5) ثوان
- حضنت الانابيب لمدة عشر دقائق بدرجة 60 م مع تقليب الانبوبه كل ثلاث دقائق

- أضيف 200 مايكروليتر ايثانول مطلق ثم خلط المزيج بقوة
- تم وضع عامود GD في انبوبة الجمع (collection tube) سعة 2 مل ونقل له جميع الخليط
- طردت الانابيب مركزياً لمدة دقيقتين بسرعة 16000 دورة /دقيقة بعدها نقل المحتويات الى أنبوبة جمع جديده.
- أضيفت 400 مايكروليتر من دارىء W1 الى عمود GD
- طردت الانابيب مركزياً بسرعة 16000 دورة / 30 ثانية ثم وضع عمود GD في انبوبة الجمع .
- أضيف 600 مايكروليتر من دارىء (wash buffer) الى عمود GD.
- أجري الطرد المركزي 16000 دورة /30 ثانية .
- أعيد الطرد المركزي لمدة ثلاث دقائق بسرعة 16000 دوره /دقيقة لتجفيف العمود
- نقل العمود GD الى أنبوبة ابيندروف نظيفة (1.5مل)
- أضيف 100 مايكروليتر من دارىء Elution المسخن مسبقاً ثم طردت الانابيب مركزياً لمدة 30ثانية بسرعة 16000 دورة / دقيقة

2-7-3-2 الترحيل الكهربائي في الهلام Gel Electrophoresis

أُجري الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص حسب ماجاء في Sambrook &Russell (2001) بإستعمال المحاليل المحضرة وفق الفقرة (2-2-3-6) وكالاتي :-

حُضر هلام الأكاروز بتركيز (0.8)% باذابة (0.8) غم من الأكاروز في (100) مل من محلول 10x TBE بعد تخفيفه (10) مرات للحصول على1x TBE، سُخن الأكاروز إلى درجة الغليان وتُرك ليبرد إلى درجة حرارة (45) م^0، ثم أُضيفت إليه صبغة بروميد الإثيديوم بتركيز نهائي (0.5)مايكروغرام\ مل بإستعمال المحلول الخزين المحضر لهذه الصبغة بعدها مُزج الأكاروز جيدا . تم إعداد صفيحة لإسناد الأكاروز(Tray) بإحاطة حافاتها بشريط لاصق وبشكل جيد ، ثم ثُبت المشط (Comb) لتكوين الحفر (Wells) المُعدة لتحميل العينات ثم صُبّ الأكاروز بشكل هادىء ومستمر لتجنب حدوث فقاعات هوائية ، بعدها تُرك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، رُفِع المشط بهدوء ونُزِع الشريط اللاصق . بعدها نُقِل الهلام مع القالب إلى حوض الترحيل الحاوي على حجم مناسب يغطي الهلام من1x TBEثم حُملت العينات المُعدة للترحيل بعد خلطها مع (3) مايكروليتر من دارىء التحميل6x بإستعمال ماصة

دقيقة (Micropipette) . بعدها تم إجراء عملية الترحيل الكهربائي بفرق جهد مقداره (5) فولت \سم لمدة 45 دقيقة حتى وصول العينات إلى ماقبل نهاية الهلام ، بعد الإنتهاء من عملية الترحيل نُقِل القالب لفحص الهلام بتعريضه إلى مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminatorعند طول موجي(340) نانوميتر .

2-3-8 التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR)

2-3-8-1 تحضير الدنا البكتيري بطريقة الغليان لتفاعل PCR

أُتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Olsvik وجماعته (1993) وكالآتي :-

- زُرِعت أطباق حاوية على وسط أكار نقيع القلب والدماغ المحضر وفق الفقرة (1-2-2-5-1) ببكتريا المكورات العنقودية و حُضنت بدرجة (37) م^0 لمدة (24) ساعة .
- إنتخبت (3-4) مستعمرات وعُلِّقت بمقدار (0.5) مل من الماء المقطر المعقم في أنابيب أبندورف ومُزجت محتوياتها جيداً بالمازج .
- وضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي لمدة (10) دقائق وبعدها نُبذت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي بسرعة(13000) دورة \ دقيقة لمدة دقيقة واحدة لفصل محتويات العالق .
- نقل الراشح الناتج ووضع في أنبوبة أبندورف نظيفة أخرى وأُستعمل في التفاعل التضاعفي التسلسلي (PCR) .

2-3-8-2 تحضير خليط التفاعل التضاعفي التسلسلي لكل جين

تضمنت هذه العملية الخطوات الآتية:-

- أُذيب محلول PCR Master Mix, 1x المحضر وفق الفقرة (2-2-4-1) في درجة حرارة الغرفة ومُزج بالمازج لغرض مجانسته قبل الإستعمال .
- أُذيبت محاليل البوادىء المحضرة وفق الفقرة (2-2-4-2) لكل جين في درجة حرارة الغرفة ومُزجت بالمازج لغرض مجانستها قبل الإستعمال مع مراعاة إستعمال الحمام الثلجي عند إجراء الإضافة لكل محلول ، وقد تمت إضافة المحاليل كما موضح في الجداول (2-3) لكل جين .

جدول (2-3) المكونات اللازمة للتفاعل التضاعفي لكل من الجينين *vanA*و*vanB* .

ت	المكونات	التركيز النهائي	حجم خليط التفاعل لأنبوبة واحدة(مايكروليتر)
1	محلول PCR Master Mix,2x	1x	12.5
2	البادئ الأمامي 10*	1*	2.5
3	البادئ الخلفي 10*	1*	2.5
4	قالب الدنا		2.5
5	ماء مقطر معقم		5
	الحجم النهائي		25

* بيكومول\مايكروليتر.

تم إجراء خطوات التضاعف للتحري عن الجينvanAحسب ماجاء في (Dutka-Malen *et al*. 1995) و الجين*vanB* حسب ماجاء في (Kariyama *et al*., 2000) مع إجراء بعض التحويرات ، ثم تمت برمجة جهاز PCR كالآتي

الخطـوة	العمليـــة	
1	دورة واحدة لمدة(4) دقائق عند درجة حرارة (95) ْم للمسخ الأولي لدنا القالب .	
2	(30) دورة تضمنت :	
	A	(45) ثانية عند درجة حرارة (95) ْم لمسخ دنا القالب .
	B	(1) دقيقة عند درجة حرارة (54) ْم لإرتباط البوادئ بدنا القالب .
	C	(1) دقيقة عند درجة حرارة (72) ْم لإستطالة البوادئ المرتبطة .
3	دورة واحدة لمدة (7) دقائق عند درجة حرارة (72) ْم للإستطالة النهائية لشريط الدنا المتضاعف .	

* نُقل بعد ذلك (10)مايكروليتر من ناتج التضاعف للترحيل الكهربائي .
* حُفظ المتبقي من نواتج التضاعف في درجة(-20)ْم.

2-3-8-3 الكشف عن نواتج التضاعف

كُشف عن نواتج التضاعف بترحيل العينات على هلام الأكاروز المحضر بتركيز (1)%، ثم حُمِّلت العينات بإستعمال دارىء التحميل المحضر وفق الفقرة(2-2-3-6-2) بالإضافة لترحيل الدليل الحجمي(DNALadder)الذي حُضر آنياً من خلال مزج (5) مايكروليتر من الدليل الحجمي مع (1) مايكروليتر من Blue/Orange 6x Loading Dye، إذ تم ترحيل النواتج والدليل الحجمي كهربائيا وكما ذكر في الفقرة (2-3-7-2) ولمدة (45) دقيقة، فُحِص الهلام بعد إنتهاء الترحيل من خلال تعريضه لمصدر للأشعة فوق البنفسجية وتم تقدير الأحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة بالمقارنة مع موقع الحزم للدليل الحجمي المستعمل والمُرحل مع نواتج التضاعف.

3 – النتائج والمناقشة

1-3 عزل وتشخيص بكتريا *Staphylococcus*

تم الحصول على (105) عزلة للبكتريا التابعة لجنس *Staphylococcus* من عينات سريرية مختلفة شملت الادرار، والدم، ومسحات الأذن الوسطى ،والحروق، والجروح ، إضافة الى (13) عزلة من أصحاء ظاهرياً.بلغت نسبة عزل بكتريا *Staphylococcus* من عينات الدم نسبة38. 52 % ومن الأدرار 8.57% ومن الجروح والحروق 20.95 % ومن الخراج نسبة 8.57% ومن الآذن الوسطى نسبة 9.53% جدول (3-1) أخضعت جميع العزلات للفحوصات الزرعية والكيموحيويه الآتية :-

1-1-3 التشخيص ألزرعي Cultural Characterization

شخصت العزلات البكتيرية التابعة لجنس *Staphylococcus* مبدئياً اعتماداً على صفاتها المظهرية عند تنميتها على وسط آكار الدم في ظروف هوائية بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، فظهرت مستعمرات *Staphylococcus* متوسطة إلى كبيرة يتراوح قطرها 1-3 ملم، تكون حافاتها منتظمة ، و ملساء ، ومحدبة، ولماعة، ومعتمة ذات قوام زبدي، تحاط هذه المستعمرات بمنطقة تحلل ضيقة (Collee *et al*., 1996).

2-1-3 التشخيص المجهري Microscopic Characterization

أخذ جزء من مستعمرة ذات صفات نموذجية ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة مع قطرة من المحلول الفسلجي، ومزجت جيداً، وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة. ثبتت باللهب بعدها تم تصبيغها بملون كرام، وفحصت تحت المجهر الضوئي المركب باستعمال العدسة الزيتية. تمت ملاحظة شكل الخلايا، وانتظامها، وطريقة تجمعها، وتفاعلها مع ملون كرام، اظهر الفحص

المجهري للشرائح المصبوغة بملون كرام خلايا كروية عنقودية الترتيب وموجبة لملون كرام، هذا يتوافق و مميزات جنس *Staphylococcus* وحسب ما ورد عن (Atlas *et al*.,1995).

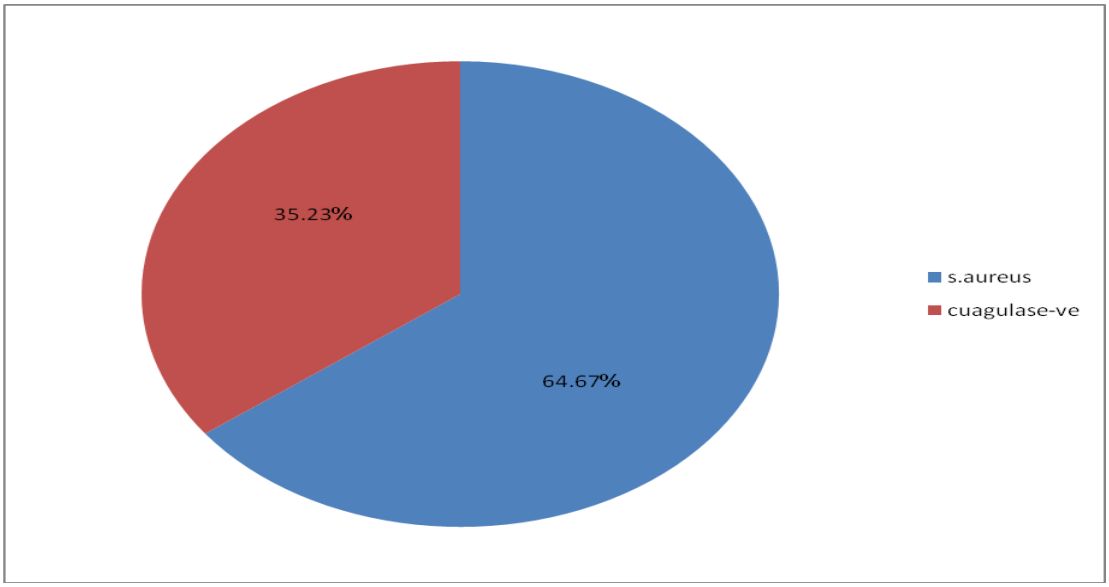
3-1-3 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests

أعتمد عدد من الفحوصات الكيموحيوية لتمييز بكتريا *Staphylococcus* عن البكتريا الاخرى وحسب ما جاء في (Macfadin , 2000;Forbes *etal*., 2007) أعطت العزلات جميعها نتائج موجبة لفحص الكاتاليز (Catalase) اذ كانت لجميع العزلات القدرة على تحطيم H_2O_2 وتحويله الى ماء وغاز الأوكسجين وقد ظهرت النتيجة الموجبة على شكل فقاعات غازية، وعند تنمية البكتريا على وسط المانيتول الملحي (Mannitol salt agar) الحاوي على NaCL(7.5%) . أظهرت جميع العزلات القدرة على تحمل هذا التركيز الملحي العالي كما أن وجود سكر المانيتول سهل الكشف عن قابلية البكتريا على تخمير هذا السكر اذ تمتلك بكتريا *S.aureus* القابلية على تخمير سكر المانيتول محولة الوسط الى اللون الاصفر مما يميزها عن بعض الانواع التي لا تمتلك هذه القدرة والتي لا تؤثر على لون الوسط (Gillespie and Hawkey,2006)

جدول (3-1): أعداد عزلات بكتريا انواع جنس *Staphylococcus spp* ونسبها من العينات السريرية المختلفة موزعة حسب النماذج المرضية ومن الاصحاء ظاهرياً.

نوع العينات	عـــــدد عـــــزلات بكتريـــــا *Staphylococcus*	النسبة المئوية
الدم	55	%52.38
الآدرار	9	%8.57
الحروق والجروح	22	%20.95
الخراج	9	%8.57
الآذن الوسطى	10	%9.53
المجموع الكلي	105	%100
عينات الاصحاء ظاهرياً Nasal swabs	13	

أخضعت العزلات قيد الدراسة جميعها لأختبار إنتاج مجلط البلازما (coagulase) وقد اعطت (68) عزلة (64.67%) نتيجة موجبة بطريقة الشريحة والانبوبة مما يدل أن هذه العزلات تعود لبكتريا *S.aureus* وهذا يتفق مع (Gillespie and Hawkey ,2006) ،بينما أعطت (37) عزله(35.23%) نتيجة سالبة للاختبار شكل (3-1) .



شكل (3-1) نسب عزلات بكتريا *Staphylococcus* المنتجة وغير المنتجة للـ coagulase

تم الحصول على (9) عزلات تعود لبكتريا *Staphylococcus* لجنس المكورات العنقودية من عينات الادرار بنسبة عزل 8.57 % من مجموع عزلات *Staphylococcus* الكلية وتتفق هذه النتيجة مع ماتوصلت له المالكي (2009) اذ بلغت نسبة عزلاتها من الادرار 11% ، ومع ما توصلت له الحلفي (2009) اذ بلغت نسبة عزلها لبكتريا *Staphylococcus* من الادرار 11.05% ولم تتفق نتائج دراستنا فيما يخص عينات الاذن والجروح والحروق مع نتائج المالكي (2009) التي كانت نسبة عزل بكتريا *Staphylococcus* من هذه العينات عالية في دراستها ربما يعود سبب الأختلاف في نسبة العزل الى طبيعة العينات ،ونوع الدراسة، وحجم العينة، والموقع الجغرافي الذي أخذت منه العينات وموسم جمع العينات ، من جانب اخر شخصت (68) عزلة على انها تعود لبكتريا *S.aureus* من مجموع (105) عزلة *Staphylococcus* شملتها الدراسة وتم التأكد من تشخيصها بأستعمال عدة Api staph (ملحق 1) وهذا يتفق مع ما وجدته المالكي (2009) التي حصلت على (61) عزلة *S.aureus* من مجموع (106)عزله *Staphylococcus*.

تعد بكتريا ***S.aureus*** عاملاً ممرضاً انتهازيا للإنسان (Oliveira and Ramos, 2002) وهي من أكثر الأنواع التابعة لجنس المكورات العنقودية ***Staphylococcus*** أهمية من الناحية السريرية ففي ظروف معينة تستطيع بكتريا ***S.aureus*** إحداث العديد من الإصابات القيحية المختلفة, وتعد هذه بكتريا واحدة من أهم وأكثر البكتريا المسببة لأمراض عـدوى المستشفيات (Nosocomial infections) Solberg,2000;Boyce,2001; Haraga *et al.*,2002;Tiemersma *et al.*,2004). إن الإصابات القيحية التي تسببها بكتريا ***S.aureus*** مختلفة فمنها السطحية وأبرزها الأمراض الجلدية مثل الدمامل (Boils) والحصف (Impetigo) ومنها إصابات عميقة ومميتة مثل تسمم الدم (Septicemia) فضلاً عن الالتهابات المعوية الحادة . ومما زاد من خطورة المكورات العنقودية الذهبية ظهور بعض الســلالات المقاومــة للعديد من المضادات و المطهـرات (Antiseptics) (Aries-de-souas *et al.*, 2000).

2-3 مقاومة الفانكومايسن Vancomycin-Resistant

تم أختبار حساسية العزلات السريرية وعزلات الأصحاء لمضاد الفانكومايسين وأظهرت النتائج أن (16) عزلة من عزلات الدراسة مقاومة للفانكومايسين بنسبة (15.23%) كانت (10) عزلات منها تعود لبكتريا ***S.aureus*** (9.52%) و (6) عزلات تعود لبكتريا Coagulase negative ***Staphylococci*** (CO –ve) (5.71%) وكانت (15) عزلة متوسطة المقاومة للفانكومايسين (VISA) أما بالنسبة لعزلات الأصحاء ظاهرياً فكانت (4) عزلات من مجموع (13) عزله مقاومة للفانكومايسين وبنسبة (30.76%) جدول (3-2)

جدول **(3-2) : مقاومة عزلات بكتريا *Staphylococcus* لمضاد الفانكومايسين**

العزلات البكتيرية المقاومة لمضاد الفانكومايسين	عدد العزلات	النسبة المئوية
Staphylococcus aureus	10	%9.52
Coagulase negative *Staphylococcus*	6	%5.71
الأصحاء ظاهرياً	4	%30.76

أظهرت نتائج دراستنا الحاليه أن نسبة عزلات بكتريا *Staphylococcus* المقاومة للفانكومايسين (15.23%) وهذا يتفق مع نتائج Shindia وجماعته (2011) في مصر الذي بلغت نسبة عزلات بكتريا *Staphylococcus* المقاومة للفانكومايسين في دراسته (14%).

بينما لا تتفق نتائج دراستنا مع نتائج Rushdy وجماعته (2007) الذي وجد أن نسبة المقاومة لمضاد الفانكومايسين(41.2 %) بين عزلات بكتريا *Staphylococcus* التي عزلها .

و وجد Theaker وجماعته (2001) نسبة مقاومة مرتفعة للفانكومايسين (30%) عند المرضى المصابين بأمراض مزمنه مما يسمح بنشوء البكتريا المقاومة وتطورها على الجلد أو في القناة المعوية.أشار Cui وجماعته (2000) الى أن تطور المقاومة للفانكومايسن يعود الى سمك جدار الخلية مما يتطلب جزيئات اكثر من الفانكومايسين لتقوم بعملها وتأثيرها في طبقة الميورين.

يعد الفانكومايسن المضاد المنتخب والاختيار الجيد لعلاج الآصابة ببكتريا *S.aureus* المقاومة للمثسلين (MRSA) (Tiwari ,2007).

منذ أول ظهور لسلالة *S.aureus* مقاومة لمضاد الفانكومايسين في اليابان عام 1997 بدأت تزداد نسبة بكتريا VRSA ، إذ أصبحت مقاومة Vancomycin تمثل خطراً صحياً متزايداً (Bhateja *et al* .,2005;Avison *et al* .,2002).

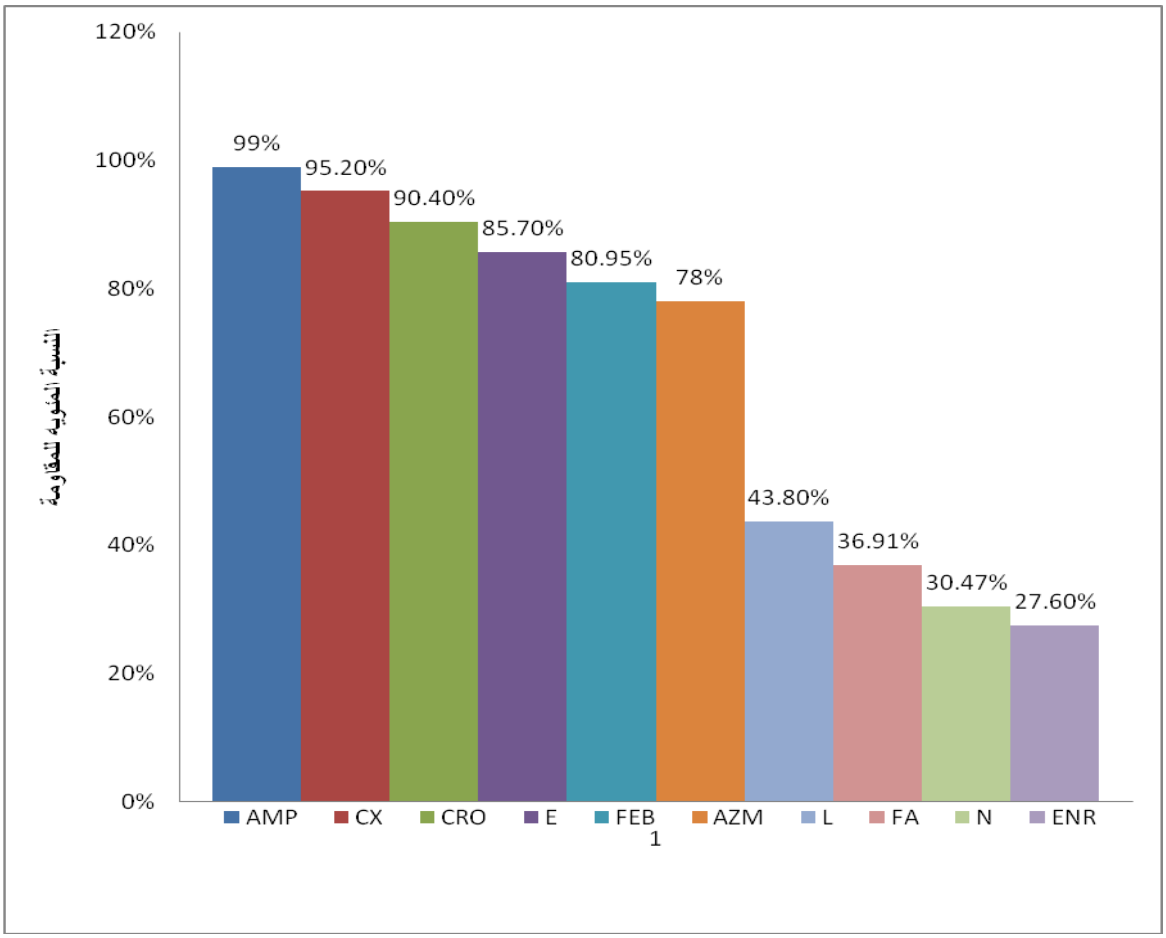
أدى الإستعمال المفرط والواسع للمضادات الكلايكوببتيدية مثل Vancomycin و Teicoplanin لعلاج الإصابات الناجمة عن بكتريا المكورات العنقودية لدى الإنسان ادى إلى ظهور سلالات VRSA ، توجد ستة جينات مسؤولة عن مقاومة Vancomycin هي (*vanA,vanB, vanC, vanD, van E, vanG*) ويُعد *vanA* الأكثر شيوعاً بين سلالات VRSA وبالإعتماد على الحساسية تجاه Teicoplanin فقد صُنِّف الطراز المظهري لجين *vanA* على أساس مقاومة كل من Vancomycin و Teicoplanin ، أما الجين *vanB* الذي يأتي بالمرتبة الثانية فيتميز بمقاومته للـ Vancomycin ولكنه يكون حساس لـTeicoplanin (Cui *et al*,.2000 ; Nicho *et al*,.2006) .

هناك طريقتان لإنتشار جينات مقاومة Vancomycin ، تتمثل الأولى بالإنتقال العمودي (Clonal spread) أما الثانية فتحدث عن طريق الإنتقال الأفقي بوساطة الإقتران البكتيري (Conjugation) فعلى سبيل المثال ينتقل الجين *vanA* المحمول على *Tn 1546* بين سلالات المكورات المعوية بوساطة بلازميدات إقترانية مستجيبة لفرمون الجنس مثل البلازميد pMG 1 التي تنتقل بكفاءة بين سلالات هذه البكتريا ، ويزيد من خطورة إنتشار جينات مقاومة Vancomycin بين أنواع المكورات المعوية فضلاً عن إنتقاله إلى أجناس أخرى مثل بكتريا*S.aureus* كما هو الحال بالنسبة للبلازميد الإقتراني Inc 18-like vanAplasmids الناقل لجين *van A* من VRE إلى *S.aureus* وكذلك انتقال جينات مقاومة من العزلات البيئية لبكتريا *S.aureus* الى *E.faecalis* (; Weigel *et al*., 2007; Moubareck *et al*.,2009 . (Zhu *et al*.,2010;Gillespie and Hawkey , 2006;Tenover *et al*.,2004

أشار Saravolatz وجماعته (2012) في ولاية مشيغان الى زيادة نسبة عزلات بكتريا *S.aureus* المقاومة للفانكومايسين (VRSA) ومتوسطة المقاومة للفانكومايسين (VISA) .

3-3 مقاومة بكتريا *Staphylococcus* للمضادات المايكروبية الاخرى.

أختبرت حساسية عزلات الدراسة (105) عزله تجاه (10) مضاداً مايكروبياً مختلفاً باستعمال طريقة الأقراص وتم تحديد حساسية ومقاومة العزلات للمضادات المايكروبية بالأعتماد على قياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر (ملم) حول أقراص المضادات المستعملة وقورنت النتائج مع ماورد في(2009) CLSI ، ويظهر من النتائج أن هناك تبايناً واضحاً في مقاومة العزلات المدروسة للمضادات المستعملة (شكل3-2) .



شكل (3-2) مقاومة عزلات بكتريا *Staphylococcus* للمضادات المايكروبية .

(AMP)Ampicillin, (CX) Cloxacillin (CRO) Ceftriaxone, (E) Erythromycin, , (FEP) Cefepime, (AZM) Azithromycin, (L) Lincomycin, (FA) Fusidic acid, (N) Neomycin, (ENR) Enorfloxacin,

يتبين من النتائج في الشكل (3-3) أعلاه أن نسبة المقاومة لمضاد Ampicillin (من مجموعة مضادات البيتالاكتام) (99%), في حين كانت نسبة المقاومة للمضاد Cloxacillin (95.2%) بينما كانت نسبة مقاومتها للمضاد ceftriaxon (90.4%) ولمضاد cefepime (80.95%), تعمل هذه المضادات على تثبيط عملية تصنيع الجدار الخلوي للبكتريا من خلال تداخلها مع عملية تصنيع طبقة الببتيدوكلايكان، وربما تعود أسباب هذه المقاومة إلى إفراز البكتريا لأنزيمات البيتالاكتميز واسعة الطيف التي تعمل على إبطال فعالية مضادات البيتالاكتام عن طريق كسر حلقة البيتالاكتام في مجموعة البنسلينات و السيفالوسبورينات (Gupta *et al*.,2001; Andrews *et al*., 2002), كما ان سبب المقاومة قد يعود الى قلة الفة ارتباط المضادات الحيوية بالبروتينات المرتبطة بالبنسلينات (Penicillin binding Proteins) . من جانب آخر كانت نسبة المقاومة لمضاد Neomycin (30.47%) ، وقد يعزى سبب مقاومة البكتريا لهذا المضاد الى تحوير جزيئة المضاد بوساطة الإنزيمات المحورة ,Adenylating (Acetylating, Phosphorylating) او حدوث طفرة كروموسومية مثل طفرة في الجين المشفر للبروتين الهدف في تحت الوحدة الرايبوسومية 30S مسببة بذلك فقدان المضاد ألفته للإرتباط بالبروتين الهدف وتقليل نفاذية الخلية البكتيرية للمضاد (Levinson *et al* .,2000) اما بالنسبة لمضادات مجموعة الماكروليدات المتمثلة بمضادي Erythromycin و Azithromycin فقد كانت نسبة المقاومة للارثرومايسين (85.7%) , وهو يعد مضاد Erythromycin مثبط لنمو البكتريا من خلال تثبيط تخليق البروتين البكتيري, ويكون فعالا ضد معظم البكتريا الموجبة لصبغة كرام , ولكنه يكون غير فعال ضد بكتريا العائلة المعوية، وبلغت نسبة المقاومة لمضاد Azithromycin 78%. (Todar,2007).

من جانب آخر اظهرت نتائج الدراسة أن مضادات Enorfloxacin من مجموعة الكوينولون والنيومايسن من مجموعة الامينوكلايكوسيد هي الاكثر فعالية ضد عزلات بكتريا *Staphylococcus* قيد الدراسة ، تتفق هذه النتيجة مع ما وجده Rushdy وجماعته (2007) من أن مضادات الكينولون والامينوكلايكوسيد هي الاكثر فعالية تجاه عزلات بكتريا *S.aureus* التي درسها الباحث .

عند مقارنة هذه النتائج مع نتائج الدراسات الاخرى وجد Bernardo وجماعته (2005) أن 79.5% من عزلات المكورات العنقودية السريرية كانت مقاومة للامبسيلين, بينما وجد Vaez وجماعته (2011) في إيران أن جميع عزلات المكورات العنقودية (100%) كانت مقاومة للامبسيلين وبذلك تتفق نتائج دراستنا مع الدراسه أعلاه. بينما وجد Islam وجماعته (2008) في بنكلاديش أن نسبة مقاومة المكورات العنقودية لمضاد Cloxacillin بلغت (100%), ووجد Uwaezuoke& Aririatu , (2004) أن نسبة المقاومة منخفضة قليلا أذ بلغت 85.4% من مجموع العزلات الكلية.

من جانب أخر لا تتفق نتائج دراستنا مع ما وجده Islam وجماعته (2008) و Vaez وجماعته (2011) اذ سجلوا نسبة مقاومة لمضاد ceftriaxon 20% و 25.4% على التوالي . بينما تتفق نتائجنا مع نتائج Zahra وجماعته (2010) الذي وجد أن نسبة المقاومة لمضاد cefepime 85%.

أما بالنسبة لمضادات المجموعة الامينوكلايكوسيدية, فقد بلغت نسبة المقاومة لمضاد Neomycin 50% طبقا لدراسة أجريت في المملكة العربية السعودية من قبل2011 (Hamid) بينما بلغت نسبة مقاومة المكورات العنقودية الذهبية لهذا المضاد 92.3% طبقا لنتائج Ninkovic وجماعته (2008) وهي نسبة عالية نسبيا مقارنة بنتائج الدراسة الحالية.

بينما بلغت نسبة مقاومة مضاد Erythromycin 29.2% في دراسة Vaez وجماعته (2011) و15% في دراسة Hamid (2011) في السعودية.ولا تتفق نتائجنا مع ما وجده Vladimir وجماعته (2002) الذي سجل نسبة المقاومة 20.4% لمضاد لنكومايسين.

من جانب اخر أظهرت عزلات الدراسة جميعها مقاومة متعدده للمضادات الحيوية ،قاومت معظم العزلات (1-4) مضادات وقد بلغت 8 عزله سريريه ، ومن جانب اخر كانت 70 عزله سريريه تعود لبكتريا *Staphylococcus* تقاوم (5-7) مضادات بينما قاومت عزلات سريريه (8-10) مضادات وقد بلغت 27 عزله سريريه جدول (3-3) .

جدول (3-3): مجاميع عزلات بكتريا *Staphylococcus* التي تمتلك صفة المقاومة المتعددة للمضادات المايكروبية .

عدد المضادات	عدد العزلات المقاومة لبكتريا *Staphylococcus*
4-1	8
7-5	70
10-8	27

4-3 قياس التركيز المثبط الادنى لمضاد الفانكومايسين (MIC)

Determination of minimal inhibitory concentration

تم تحديد التركيز المثبط الادنى لمضاد الفانكومايسين لعزلات بكتريا *Staphylococcus* قيد الدراسة والتي أظهرت مقاومة تجاه هذا المضاد في فحص الحساسية بطريقة الاقراص (المقاومة والمتوسطة المقاومة (I)) . أختبرت (25) عزلة توزعت بين (20) عزله تعود لبكتريا *S.aureus* و (5) عزلات تعود للبكتريا *Staphylococci* Coagulase negative وأعتمدت نقطة التوقف (Break point) الموضوعة من قبل CLSI (2009) كأساس لحساب الأستجابة وتمثل التركيز الأمثل الذي يمكن أن يصله المضاد في المصل بحيث يوفر أعلى حد من

المعالجة ، إذ يعد الكائن حساساً عندما تكون قيم (MIC) المحسوبة أقل من نقطة التوقف . تم تحديد (MIC) بطريقة التراكيز المتضاعفة المتسلسلة في وسط مولر هنتون (Mueller Hinton agar)، تبين النتائج في جدول (3-4) أن قيم (MIC) للعزلات تراوحت بين (512 - 16) مايكروغرام /مل .

جدول (3-4): قيم (MIC) لمضاد الفانكومايسن التي أبد تها عزلات الدراسة .

رقم العزلة	MICمايكروغرام/مل	رقم العزلة	MICمايكروغرام/مل
1	16	33	64
5	32	48	128
6	32	53	32
20	128	54	64
21	512	58	64
22	32	60	64
23	64	67	64
25	64	69	64
26	16	70	512
28	64	77	64
29	64	79	64
30	128	99	64
31	64		

من جانب آخر كانت هناك عزلتان ذات (MIC=512) مايكروغرام /مل وهي التي توصف بأنها عالية المقاومة للفانكومايسين High – level VRSA وكانت هناك عزلتان ذات قيمة MIC (16) مايكروغرام/مل وهي التي توصف (VISA) متوسطة المقاومة للفانكومايسن و(23) عزله ذات MIC > 32 مايكروغرام /مل وهي التي توصف بأنها المقاومة للفانكومايسين VRSA.

يعد تحديد التركيز المثبط الادنى MIC القياس الجيد لتحديد حساسية البكتريا للفانكومايسين لكن هذه الطريقة لا تعتمد في الإستعمال الروتيني في المختبرات التشخيصية والمستشفيات (Bhateja *et al* .,2005) .

ذكر Dejonge وجماعته (1992) أن عزلات VRSA المعزوله من المرضى من المستشفيات الفرنسية كانت ذات MIC اكبر او يساوي 256 مايكروغرام / مل .

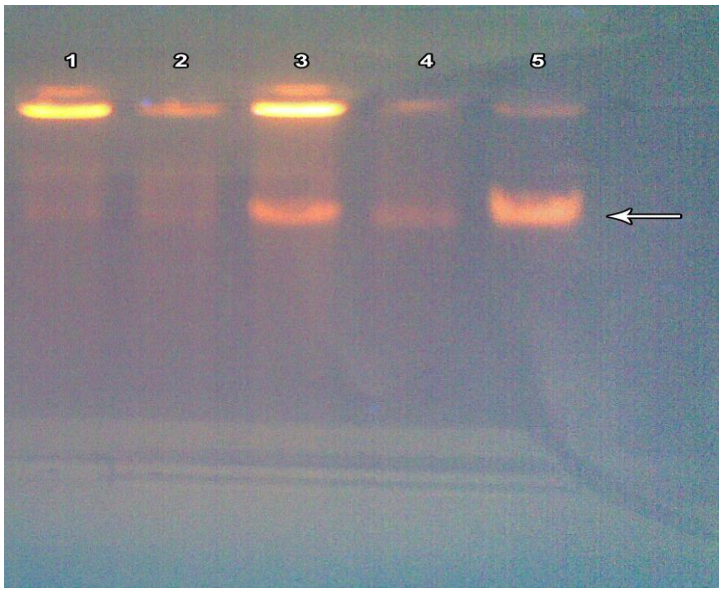
بينما كانت قيم MIC للفانكومايسين خلال دراسة أجراها Tenover وجماعته (2004) على عزلات *S.aureus* معزوله من مصادر سريرية مختلفة من مستشفيات بنسلفانيا 32 مايكروغرام / مل و 64 مايكروغرام / مل ، وكانت مقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيد والبيتالاكتام والماكروليد والتتراسايكلين .اشار .Dezfulian وجماعته (2012) خلال دراسه اجراها على عزلات *Staphylococcus* معزولة من مصادر مختلفة في إيران ان قيم MIC (512) مايكروغرام /مل .بينما وجد Bhateja وجماعته (2005) أن جميع عزلات *S.aureus* التي درسها كانت ذات MIC مساوي او أقل من 4 مايكروغرام / مل .

وجد Zhu وجماعته (2007) أن عزلات بكتريا *S.aureus* المقاومة للفانكومايسين أبدت قيم MIC 256 مايكروغرام / مل الى 1024 مايكروغرام / مل .

أشار Perichon & Courvalin الى عزل بكتريا VRSA ذات مقاومة عالية للفانكومايسين MIC اكبر من 256 مايكروغرام / مل وهي التي توصف بـ HLR-VRSA

5-3 :عزل DNA البلازميدي

أجريت عملية عزل الدنا البلازميدي بأستعمال عدة مجهزة من شركة promega لـ (15) عزلة كان منها (8) عزلات تعود لبكتريا *S.aureus* المقاومة للفانكومايسين و (3) عزلات تعود لبكتريا *S.aureus* متوسطة المقاومة للفانكومايسين (VISA) و(4) عزلات حساسة للفانكومايسين . وتم التحري عن ناتج الاستخلاص بوساطة الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز ، وبعد تعريضة للاشعة الفوق البنفسجية تم ملاحظة وجود حزم بلازميدية مختلفة الأحجام في 7 عزلات من عزلات الدراسة ، أحتوت العزلات رقم (20 و 21 و 28 و 29 و 30 و 58 و 67) التي تعود لبكتريا *S.aureus* المقاومة للفانكومايسين على حزمه بلازميدية واحدة ، بينما كانت العزلة رقم (70) لاتحتوي اي حزمة بلازميدية وكانت هذه العزلة تعود لبكتريا *S.aureus* المقاومة للفانكومايسين،وأبدت قيم MIC = 512 مايكروغرام / مل ، في حين لم يلحظ وجود اي حزم بلازميدية لمعظم العزلات الحساسة لمضاد الفانكومايسين ما عدا العزلة رقم (9) العائدة لبكتريا *Staphylococcus* الحساسه للفانكومايسين التي أحتوت على حزمة بلازميدية واحده ، ولم يلحظ وجود اي حزم بلازميدية في معظم العزلات لسلالات VISA ، وكما في شكل(3-3)



شكل (3-3): المحتوى البلازميدي لبعض عزلات الدراسة

المسار (1) العزلة 20 المسار (2) العزلة21 المسار (3) العزلة 67

المسار (4) العزلة 30 المسار (5) العزلة 58

*** تركيز الهلام (0.8)% ، الفولتية (75) فولت لمدة ساعة واحدة.**

اشار Tenover وجماعته (2004) الى إحتواء عزلات بكتريا *S.aureus* المقاومة لمضاد الفانكومايسين على حزمتين بلازميدية احدهما 120 Kb و الاخرى 4 Kb والى امتلاك هذه العزلات لبلازميدات إقترانية تحمل جينِ مقاومة الفانكومايسين *van A* .

يُعد إنتقال جينات مقاومة Vancomycin(*vanA*) من بكتريا *Enterococcus* إلى بكتريا *S.aureus* من المشاكل الطبية التي تُنذر بإزدياد خطورة مقاومة Vancomycin بين سلالات بكتريا *S.aureus* إذ وجدت سلالات VRSA حاملة للجين *vanA* على أحد العناصر القافزة أو البلازميدات الإقترانية التي كانت متطابقة مع مثيلاتها في بكتريا VRSA مثل Tn 1546الذي أظهر تطابقا في كلا النوعين فقد سُجلت حالات إصابة ببكتريا VRSA التي تحوي بلازميدات تحمل *vanA* المنتقل بالإقتران من بكتريا VRE إلى بكتريا *S.aureus* (Weigel *et al*., 2003; Weigel *et al*., 2007; Zhu *et al*., 2008).

ذكر Grohmann وجماعته (2003) وجود بلازميدات إقترانية ذات مدى واسع من المضائف تتوافر بشكل طبيعي في جنس *Enterococcus* و *Streptococcus* ومثال عليها البلازميدين pAMβ1 و pIP501 التي تنقل جينات مقاومة متعددة تشمل مضادات من مجموعة Macrolides و Lincosamids و Streptogramin B تمتاز هذه البلازميدات بقابليتها على الإنتقال ضمن مدى واسع من الأجناس تضم *Streptococci* و *Lactococci* و *Staphylococci* و *Enterococci* .

أشار Zhu وجماعته (2007) الى دور البلازميدات الاقترانية مثل (Ink 18-like van A plasmid) التي تحمل الترانزبوزون Tn 1546 في مقاومة الفانكومايسين والذي يمتلك القابلية على الانتقال بالاقتران بين البكتريا المختلفه .

أجريت دراسة قام بها Zhu وجماعته (2010) على مرضى يعانون من إصابات ناجمة عن بكتريا VRSA في ولاية مشيغن ، و تم عزل بكتريا VREمن جميع الإصابات تحتوي Inc plasmid vanA like -18 وبالذات النوع *E.faecalis* مما قاد إلى الإعتقاد بأن هذه البلازميدات هي الأكثر قدرة على الإنتقال من *Enterococcus* إلى بكتريا *S.aureus* عن طريق الإقتران .

كما وجد Kos وجماعته (2012) الترانزبوزون Tn 1546 محمول على البلازميدات في جميع سلالات VRSA التي درسها ، وأن جميع هذه السلالات تمتلك بلازميدات ، وفي إحدى هذه السلالات يحمل Tn 1546 على بلازميد بحجم اكبر من (100 Kb).

قام Shearer وجماعته (2011) بدراسة المحتوى البلازميدي لـ (280)عزلة تعود لبكتريا *Staphylococcus* من مناطق جغرافية مختلفة ولسنوات مختلفة بعض هذه العزلات تعود لعام 1940 ولغاية 2000 ، فقد وجدوا أن 79% من السلالات تحتوي على الأقل بلازميد واحد اكبر

من (20Kb) و أن 75% من هذه البلازميدات بحدود (20-30) Kb تحمل هذه البلازميدات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة .

ذكر Feng وجماعته (2008) أن معظم جينات عوامل الضراوة ومقاومة المضادات الحيوية تحمل على عناصر وراثية متحركة مثل البلازميدات والترانزبوزونات وجزر الامراضية (Pathogenicity islands)،إن أنتشار هذه العناصر الوراثيه يزيد من خطورة الممرضات البكتيرية.وأشار Malachowa &Deleo (2010) أن بلازميدات بكتريا *Staphylococcus* تنتقل أفقياً خلال عملية الاقتران والتوصيل، وذكر Shearer وجماعته (2011) ان أصل بعض بلازميدات بكتريا *Staphylococcus* هي من بكتريا *Enterococcus* و *Bacillus* .

6-3 :التحري عن جينات مقاومة الفانكومايسين

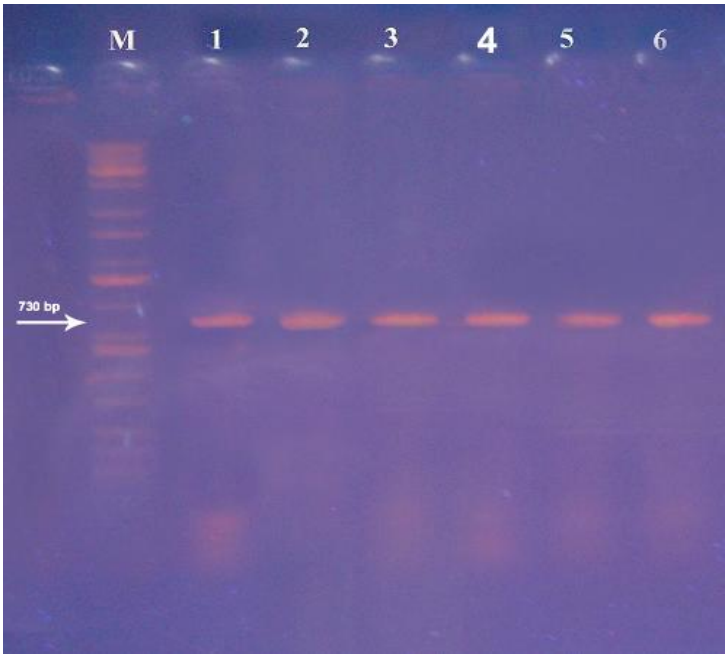
أجريت التفاعلات التضاعفية لسلسلة الدنا (PCR) لعزلات بكتريا *Staphylococcus* المقاومة للفانكومايسين وذات MIC اكثر من 64 مايكروغرام/مل بأستعمال البوادىء المتخصصة التي تستهدف التسلسل النوعي للجين A *van* و *van B* .استعمل البادىء المتخصص بجين *vanA* والمجهز من شركة promega (Alpha DNA) على وفق التسلسل المصمم من قبل Dutka-Malen وجماعته (1995) لكن بعد إجراء بعض التحويرات خلال الدراسة الحالية على برنامج التفاعل جدول(3-5)

جدول (3-5) الظروف المستعمله للكشف عن الجين *van A* بوساطة جهاز تقانة PCR

خطوات PCR		ظروف PCR	
		درجة الحرارة C^0	الوقت
Initial denaturation		95	4 min
30 cycles	Denaturation	95	45 sec
	Annealing	54	1 min
	Extension	72	1 min
Final Extension		72	7 min

رحلت نواتج التضاعف على هلام الأكاروز بتركيز (1)% و لوحظ ظهور حزمة واحدة في جميع الحفر بالمستوى نفسة و ذلك بعد تعريض الهلام للأشعة فوق البنفسجية ،مما يدل على إرتباط البادىء مع التسلسل المكمل له على شريط القالب ،عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي ذي الحزم المعروفة الأحجام الجزيئية والموضوع في المسار الأول كما في الشكل(3–4) ، جاءت أحجام الحزم مماثلة للحجم المتوقع وهو (732) زوج قاعدة تقريباً وذلك عند مقارنتها مع النتائج التي توصل اليها Dutka-Malen وجماعته (1995) وقد أختيرت العزلات ذات MICاكبر من (64) مايكروغرام\مل التي يُتوقع أن تحمل جين *vanA* الذي يُشفر لمستويات مقاومة عالية Vancomycin إذ تتجاوز قيم MIC لها (32) مايكروغرام\مل ، وقد تم إستعمال الدنا القالب المحضر بطريقة الغليان السريعة بالإضافة للعينات التي تم الحصول عليها من إستخلاص الدنا البلازميدي ، وقد أعطت كلتا الطريقتين النتائج نفسها مما يدل على

وفرة جينات مقاومة Vancomycin محمولة على بلازميدات، حسب ما جاءت به نتائج التحري عن الدنا البلازميدي التي من الممكن أن تكون بلازميدات إقترانية.



شكل (3-4) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* بإستعمال البوادئ النوعية لجين *van A*

المسار (M) الدليل الحجمي المسار (1) العزلة 28 المسار (2) العزلة 29
المسار (3) العزلة 30 المسار (4) العزلة 58 المسار (5) العزلة 67
المسار (6) العزلة 21

*** تركيزالهلام (1)% ،الفولتية (75) فولت لمدة (45) دقيقة.**

أشار Fosheim وجماعته (2007) الى إمتلاك عزلات *Staphylococcus* لجين *van A* وأشار Garcia – Migural وجماعته (2007) الى خطورة وجود بلازميدات اقترانيه تساهم في إنتقال صفة مقاومة الفانكومايسين بين العزلات المختلفة ووصولها الى مناطق متباعدة ، وتوصل Biavasco وجماعته (2007) الى وجود تشابه بين جينات مقاومة الفانكومايسين المحمولة على *Tn 1546* والمنتشرة بين عزلات بكتريا *Enterococcus* المقاومة للفانكومايسين المعزولة

من عينات أصحاء وعينات سريرية ومنتجات غذائية وفسر الباحث هذه النتيجة الى الانتقال الواسع لهذه الجينات بين الانواع البكتيرية المختلفة مع أختلاف مصادر عزلها بوساطة البلازميدات الاقترانية عبر الاقتران .

و وجد Moubareck وجماعته (2009) امتلاك عزلات بكتريا *S.aureus* لجين *van A* محمول على بلازميد أقتراني بحجم 40kb (pIp848) موجود بخمس نسخ في الخليه الواحده . واشار Howe وجماعته (2004) الى أن سلالات *S.aureus* المقاومة للفانكومايسين بمستو عالٍ أكتسبت جين *vanA* من بكتريا *Enterococcus* .

وجد Zhu وجماعته (2007) أن عزلات VRSA التي درسها (خمس عزلات) في الولايات المتحده الامريكية تحمل جين *van A* لمقاومة الفانكومايسين واشاروا الى أن جين *van A* يحمل على بلازميد بحجم Kb(57.9) ويعتقد ان اصله من بكتريا *Enterococcus* المقاومة للفانكومايسين . اشار Perichon & Courvalin (2009) الى دور الجين *van A* في مقاومة الفانكومايسين.

أستعمل البادىء المتخصص بجين *vanB* المجهز من شركة (Alpha DNA) على وفق التسلسل المصمم من قبل Elsayed وجماعته (2001) وبإعتماد برنامج التفاعل المذكور من قبل Kariyama وجماعته (2000) بعد إجراء بعض التحويرات على هذا البرنامج جدول(3-6) ، إذ تم إختيار العزلات (28 و 29 و 30 و 58 و 70) التي تعود لبكتريا *S.aureus* على التوالـي بالإعتماد على قيم MIC التي بلغت اكبر او يساوي (64) مايكروغرام\مل .

بعد ترحيل ناتج التضاعف على هلام الأكاروز بتركيز (1)% وبعد تعريضه للأشعة فوق البنفسجية لم يلحظ وجود اي حزم في عزلات *Staphylococcus* تحت الدراسة.

جدول (3-6): الظروف المستعملة للكشف عن الجين *van B* بوساطة جهاز تقانة PCR

خطوات PCR		ظروف PCR	
		درجة الحرارة C^0	الوقت
Initial denaturation		95	4 min
30 cycles	Denaturation	95	45 sec
	Annealing	54	1 min
	Extension	72	1 min
Final Extension		72	7 min

الاستنتاجات

1. كانت نسبة عزلات بكتريا *S.aureus* هي السائدة من بين العزلات التي تم الحصول عليها من العينات السريرية .
2. وجود مقاومة للفانكومايسين بين عزلات Co-ve من العينات السريرية ومن الاصحاء .
3. وجود مقاومة عالية بين عزلات VRSA لمضادات الامبسلين والكلوكساسلين وسفترياكسون ان افضل المضادات في تأثيرها على عزلات *Staphylococcus* المقاومة للفانكومايسين هي نورفلوكساسين ونيومايسين .
4. امتلاك عزلات بكتريا VRSA حزمة بلازميدية واحدة وبأحجام مختلفة.
5. احتواء اغلب العزلات على جين *vanA* باستعمال تقنية PCR .
6. ان جين مقاومة الفانكومايسين *vanB* ليس سائداً بين عزلات الدراسة .

التوصيات

1. اجراء دراسات جزيئية عن مقاومة الفانكومايسين بين البكتريا الاهوائية .
2. اجراء دراسات جزيئية عن مقاومة الفانكومايسين بين العزلات البيئية .
3. دراسة مقاومة بكتريا VRSA لمجاميع المضادات الاخرى .
4. دراسة انتشار سلالات VISA في المستشفيات والبيئة .
5. تحديد تتابعات DNA للجينات القافزه المسؤوله عن مقاومة الفانكومايسين .

المصادر العربية

- القرآن الكريم .
- المرجاني ،محمد فرج (2011). المضادات الحيوية . المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية . الطبعة الاولى . دار دجلة . عمان.255
- المالكي ،افراح عبد الرضا (2009) . دراسة حول عزل بعض أنواع المكورات العنقودية المقاومة للمثسلين MRSA وMRSE من المرضى في بعض مستشفيات بغداد ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم / الجامعة المستنصرية .97
- الحلفي ، عبد القادر كريم (2008) . دراسة التاثيرات المرضية لطافي خلايا *Staphylococcus xylosus* المقتولة بالمضادات الحياتية ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم / جامعة بغداد .97
- الشمري ، مها مخلف كاضم (2011) . دراسة جزيئية لبكتريا *Enterococcus spp* المقاومة للفانكومايسين ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم / الجامعة المستنصرية .93
- الغزي ، زينة زامل تركي (2008) . النشاط الهيمولايسيني لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من حالات مرضية مختلفه ومقاومتها لمضادات الحياة ، رسالة ماجستير ، كلية التربية / جامعة ذي قار .104
- الحسني ، هالة محمد حسين (2011) . دراسة مقارنة بين انواع بكتريا *Staphylococci* المنتجة وغير المنتجة للإنزيم المخثر للبلازما المقاومة للمثسلين ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم / جامعة بغداد .114

ملحق (1) الاختبارات الكيموحيوية باستخدام نظام Api Staph

الأختبار	المادة الأساس	النتيجة السالبة	النتيجة الموجبة
GLU	D-glucose	أحمر	أصفر
FRU	D-fructose	أحمر	أصفر
MNE	D-mannose	أحمر	أصفر
MAL	Maltose	أحمر	أصفر
LAC	Lactose	أحمر	أصفر
TRE	D-trehalose	أحمر	أصفر
MAN	D-mannitol	أحمر	أصفر
XLT	Xylitole	أحمر	أصفر
MEL	D-melibiose	أحمر	أصفر
NIT	Potassium nitrate	أحمر	أصفر
PAL	B-nephthyl-acid phosphate	عديم اللون- وردي فاتح	أحمر
VP	Sodium pyruvate	أصفر	بنفسجي
RAF	Raffinose	عديم اللون	بنفسجي- وردي
XYL	Xylose	أحمر	أصفر
SAC	Sucrose	أحمر	أصفر
MDG	α-methyl glucoside	أحمر	أصفر
NAG	N-acetyl glucose amine	أحمر	أصفر
ADH	Arginine dihydrolase	أصفر	برتقالي- أحمر
URE	Urease	أصفر	أحمر- بنفسجي

ملحق (2) نتائج فحص حساسية بكتريا *Staphylococcus* للمضادات المشمولة بالدراسة

رقم العزلة	VA	AM	CX	CRO	E	FEP	AZM	L	FA	N	ENR
1	I	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S
2	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
3	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
4	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
5	I	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
6	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
7	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R
8	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
9	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
10	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
11	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
12	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S
13	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R
14	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
15	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S
16	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
17	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
18	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
19	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S
20	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S
21	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
22	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
23	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
24	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
25	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
26	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S
27	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R
28	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S

رقم العزلة	VA	AM	CX	CRO	E	FEP	AZM	L	FA	N	ENR
29	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
30	I	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S
31	I	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S
32	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
33	I	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
34	I	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
35	I	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S
36	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
37	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
38	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
39	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
40	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
41	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
42	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R
43	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
44	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
45	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
46	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S
47	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
48	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
49	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S

رقم العزلة	VA	AM	CX	CRO	E	FEP	AZM	L	FA	N	ENR
50	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
51	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
52	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
53	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
54	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
55	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R
56	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
57	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
58	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R
59	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
60	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
61	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S

رقم العزلة	VA	AM	CX	CRO	E	FEP	AZM	L	FA	N	ENR
62	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
63	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
64	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
65	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
66	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
67	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
68	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
69	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
70	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S
71	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R

رقم العزلة	VA	AM	CX	CRO	E	FEP	AZM	L	FA	N	ENR
72	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
73	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S
74	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S
75	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
76	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
77	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
78	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S
79	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
80	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
81	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
82	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
83	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S
84	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R
85	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S
86	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S
87	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
88	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
89	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
90	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
91	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R
92	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
93	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
94	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
95	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
96	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S
97	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R
98	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
99	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
100	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R
101	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
102	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S

رقم العزلة	VA	AM	CX	CRO	E	FEP	AZM	L	FA	N	ENR
103	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
104	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S
105	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S

Summary

Hundred and five clinical *Staphylococcus* isolates have been isolated from different samples included the urine, blood, swaps of: (otitis media, burns, wounds) from different hospitals of Baghdad for the period from 1/9/2011 until 1/1/2012, in addition to (13) isolates from healthy persons. 52.38% was the highest percentage of isolates of *Staphylococcus* from blood samples, 8.57% from the urine and from the wounds and burns was 20.95%. All isolates had been identified by morphological, cultural and biochemical tests such API-staph.

The vancomycin susceptibility test for *Staphylococcus* was done results showed that 16 clinical isolates were resistances to vancomycin (15.23%) and the (15) isolates intermediate resistance to vancomycin (VISA) , As for the healthy isolates were (4) isolates (30.76%) of the total (13) isolates resistance to vancomycin .

The antibiotic susceptibility test to (10) types of antibiotics by using the discs method , it has been found that there is a clear variation in the resistance of isolates were studied for the antibiotics used, as it was found that the isolates were highly resistant to antibiotics : (Ampicillin 99%) ,(Cloxacillin 95.20%) ,(Ceftriaxone 90.40%) ,(Erythromycin 85.70%) ,(Cefepime% 80.90) and (Azithromycin 78%), the high susceptibility was to (Enorfloxacin 27.60%).

The minimum inhibitory concentration (MIC) for the vancomycin has been determined for the *Staphylococcus* isolates ,the values of MIC for the clinical *Staphylococcus* isolates ranged between (8-512) µg/ml.

The detection of plasmid DNA in isolates by gel electrophoresis showed that some of these isolates had plasmid bands with different sizes.

DNA Polymerase chain reaction technique has been done for the *Staphylococcus* isolates resistance to vancomycin which had MIC more

than 64µg/ml by using the specific primers targeting the specific sequences of the *van A* and *van B* genes, the results showed one band was noticed in the all wells at the same level for the *van A* gene, while the results revealed no bands in all wells for the *vanB* gene.

A

- **Abramowicz,** M. & Zuccotti, G.(2005). Antibacterial Drugs:A Brief Summary For Quick Reference. Handbook of Antimicrobial Therapy.17th ed. New Rochelle.USA: 7-9.
- **Al-camo**, I.E. (2001). Fundamental of Microbiology . 6th ed . Jones and Bartelett. London. UK : 25-34.
- **Al-Ghrairy** , Z.K.A. (2007). Comparative study on some pathological aspects between *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus saprophyticus*. M.Sc. Thesis. University of Baghdad , College of Science: 5-14
- **Al-Heety**, A.S.F. (2005). Role of peptidoglycan in pathogenicity of *Staphylococcus saprophyticus* . M.Sc. Thesis . University of Baghdad , College of Science:5-17
- **Aligholi**, M.; Emaneini, M. ; Jabalameli, F. ; Shahsavan, S. ; Dabiri, H. & Sedaght, H. (2008). Emergence of high-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Imam Khomeini Hospital in Tehran. *Med. Princ. Pract*. 17:432–434.
- **Al-Saimary**, I.E.; Bakr, S.S. & Al-Hamdi, K.E. (2006). Bacterial skin colonization in patients with atopic dermatitis/ Eczema syndrome : *Inter. J. Dermatol.* 4 .(2) 10
- **Al-Zahrani**, I.A.(2011). A novel multiplex PCR-based tool of typing strains of *Staphylococcus aureus.* Ph.D. Thesis. Faculty of Medical Sciences. Newcastle University.
- **Andrews**, S. J. ; Brooks, P. T. & Hanbury, D. (2002). Ultrasonography and abdominal radiography versus intravenous urography in investigation of urinary tract

infection in men : Prospective incident cohort study. BMJ: 324 – 454.

- **Angeletti**, S.; Lorino, G.; Gherardi, G.; Battistoni, F.; De Cesaris, M.; & Dicuonzo, G. (2001). Routin Molecular Identification of *Enterococcus* by Gene-Specific PCR and 16S Ribosomal DNA Sequencing. *J. Clin. Microbiol*. 39:794-797.
- **Appelbaum**, P.C. (2007). "Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)". *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30 (5): 398–408.
- **Arias,** C.A.; Courvalin, P. & Reynolds, P.E. (2000). *vanC* Cluster of Vancomycin-Resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *J. Antimicrob. Agent. Chemother*. 44(6):1660-1666.
- **Aries-de-sousa**, M.; de-Lencastre, H.; Santos, S.I.; Kikuchi, K.; Totsuka, K. & Tomasz, A. (2000**).** Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated widely spread in hospitals in New York City and a hospital in Tokyo, Japan. Microb.Drug.Resist. 6:253-258.
- **Atlas**, R.M.; Parks, L.C. & Brown, A.E. (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology. Mosby. U.S.A.
- **Ayliffe**, G.A.J.(1998). methicillin -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) update .Postgraduate doctor middle east . 15, (3), 84-89. **Avison**, M. B. ; Bennett, P.M.; Howe, R.A. & Walsh, T.R. (2002). Preliminary analysis of the genetic basis for vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J. Antimicrob. Chemother*.49: 255-260.

B

- **Bae**, IG.; Federspiel, JJ.; Miro, JM. (2009) Heterogeneous vancomycin-intermediate susceptibility phenotype in bloodstream methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from an international cohort of patients with infective endocarditis: prevalence, genotype, and clinical significance. *J. Infect Dis*. 200: 1355-1366.
- **Bannerman**, T.L. (2003). *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase positive cocci that grow aerobically. *In*: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Pfaller, M.A.; and Yolken, R.H. (eds.). Manual of Medical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, : 384-404.
- **Baron**, E.J.; Jorgensen, J.H.; Pfaller, M.A. & Yolken, R.H.(eds). Manual of clinical microbiology . American society Microbiology. Washington. 384-404 .
- **Bashir**, A.; Mujahid, T.Y. & Jehan. N. (2007). Antibiotic resistance profile: Isolation and characterization of clinical isolates of *Staphylococci* from patients with community – acquired skin infections. *J. Pharm .Sci.* 20(4):299-304.
- **Bauer**, L.A. (2008). Applied Clinical Pharmacokinetics. 2nd edition. McGraw-Hill, New York. U.S.A: 459-464.
- **Benson** ,H.J.(2002). Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology . 8 th ed. McGraw-Hill. U.S.A: 366-375.
- **Bernardo**, W.L.C.; Boriollo, M.F.G.; Gonçalves, R.B. & Höfling, J.F. (2005). *Staphylococcus aureus* ampicillin-resistant from the

odontological clinic environment. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 47(1):19-24.

- **Bernards, A. T.; Frenay. H. M. & Lim, B. T.** (1998). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*: an unexpected difference in epidemiologic behavior.*Amer. J. Infect. Control*. 26:544-551.
- **Bhateja**, P.; Pandya, M. Mathur,T, Fatma, T; & Rattan, A. (2005) Detection of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*: A comparative study of three different phenotypic screening methods Indian. *J.Med. Microbio*. 23(1): 52-55.
- **Biavasco**, F.; Foglia, G.; Paoletti, G.; Zandri, G.; Mayi; G. ; Guaglianone, E.; Sundsfjord, A.; Pruzzo, C.; Donelli, J. &Facinelli, B. (2007). *vanA*-Type *enterococci* from humans, animals, and food: species distribution, population structure, *Tn1546* typing and location, and virulence determinants. *J. Appl.Environ. Microbiol*. 73(10):3307-19.
- **Boyce, J. M. (2001**). MRSA patients: proven methods to treat colonization and infection.*J.Hosp. Infect*. 48:S 9-14.
- **Boyd**, D.A.; Du, T.; Hizon, R.; Kablen, B.; Murphy, T.; Tyler, S.; Brown, S.; Jamieson, F.; Weiss, K.; Mulvey, M.R. & The Canadian Nosocmial Infection Surveillance Program. (2006). *VanG*-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Strains Isolated in Canada. *J. Antimicrob. Agent. Chemother*. 50(6):2217-2221.
- **Boyle-Vavra**, S. and Daum, R.S. (2007). "Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Panton-Valentine leukocidin". *Lab. Invest.* 87 (1): 3–9.
- **Bozdogan**, B. ; Ednie L.; Credito, K.; Kosowska, K. and Appelbaum, P.C. (2004). Derivatives of a Vancomycin-Resistant

Staphylococcus aureus Strain Isolated at Hershey Medical Center. *Antimicrob .Agents. Chemother*. 48(12): 4762–4765.

- **Brooks,** G. F.; Butel, J. S. & Morse, S. A. (2001). *Staphylococci*. In: Medical Microbiology.22th ed. Lange Medical publication. 197-203.
- **Brooks,** G. P.; Butel, J. S.; Carroll, K. C. & Morse, S.A. (2007). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. McGraw-Hill, New York. U.S.A: 224-232
- **Brooks**, G.F.; Butel, J.S. & Morse, S.A. (2004). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 23 th ed. McGraw-Hill. New York. U.S.A.
- **Burnett**, D. and Crocker, J. (2005). The Science of Laboratory Diagnosis. 2nd edition. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium. England. UK:444-448

C

- **Chambers ,** H.F & Deleo , F.R.(2009). Waves of resistance *Staphylococcus aureus* in antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 7:629-641
- **Chambers ,** H.F . (2001). The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *Emerg infect Dis* 7, 178-182
- **Chang**, S.; Sievert, D. M. ; Hageman, J. C.; Boulton, M. L. ;. Tenover, F. C; Downes, F. P. ; Shah, S. ; Rudrik, J. T. ; Pupp, G. R. ; Brown, W. J. ; Cardo, D. and Fridkin, S. K.(2003)Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*

containing the *vanA* resistance gene. *N. Engl. J. Med.* 348:1342–1347.

- **CLSI** (2009). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 19th supplement, CLSI document M100-S19. 29(3). CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.

- **Collee**, G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. & Simmons, A. (1996). Makie and McCartney Practical Microbiology. 14th ed. Churchill Livingstone. New York. U.S.A: 244-248.
- **Cooper**, B.S.; Medley, G.F.; Stone, S.P.; Kibb1er, C.C.; Cookson, B.D.; Roberts , J.A.; Duckworth, G.; Lai, R.; and Ebrahim, S. (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: Stealth dynamics and control catastrophes. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) of the USA .101(27): 10,223-8.
- **Cosgrove** , S . E . ; Carroll , K . C. and Perl , T . M . (2004). *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin .*Clin .Infect .Dis.* 39 (4): 539-545.
- **Courvalin**, P. (2006). Vancomycin-resistance in gram –positive cocci. *J. Clin. Infect. Dis*. 42:525-534.
- **Craig** , C., & Stizel , R. (2004). Modern Pharmacology with clinical Applications .sixth Edition: 140-152.
- **Cui**, L., H. Murakami, K. Kuwahara-Arai H. Hanaki and K. Hiramatsu,M.(2000). Contribution of a thickened cell wall and its lutaine nonamidated component to the vancomycin resistanc expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 2276-85.

❖ **Cui**, L.; Ma, X.; Sato, K.; Okuma, K .; Tenover, F .C. ; Mamizuka, E. M. ; Gemmel, C.G. ; Ploy, K. M-C.; Solh, N. E.; Ferraz, V.& Hiramatsu, K. (2003). cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus. J .Clin .Microbio*., 41(1): 5–14.

D

❖ **Deepak**, S.; Samantha, S. A. and Urhekar, A. D. (2000). Study of coagulase positive and negative *Staphylococci* in clinical samples. Indian. *J. Med. Sci*. 53:425-428.

❖ **Dejonge**, B. L. M., Chang,Y. S., Gage ,D., and A. Tomasz. (1992). Peptidoglycann composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *J. Biol . Chem*. 267: 11248–11254.

❖ **Demuth** , D. R., and Lamont , R. (2006). Bacterial cell-to-cell communication Rol in virulence and Pathogeesis .AMCM. 10(13):97-105.

❖ **Depardieu**, F.M; Kolbert, M.; Pruul, H.; Bell, J. & Courvalin, P. (2004a). VanD-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Agent. Chemother*. 48(10): 3892-3904.

❖ **Depardieu** ,F.; Perichon ,B. & Courvalin ,P.(2004b) .Detection of the *van* alphabet and identification of *Enterococci* and *Staphylococci* at the Species Level by Multiplex PCR. *J. Clinc. Microbio*l. 42(12): 5857-5860.

❖ **Depardieu**, F.M.; Bonora, M.G.; Reynolds, P.E. and Courvalin, P. (2003). The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *J. Mol. Microbiol*. 50:931-948.

- **Dezfulian**, A.; Aslani, M.M.; Oskoui, M.; Farrokh, P.; Azimirad, M.; Dabiri, H.; Salehian, M.T. and Zali, M.R.(2012). identification and characterization of a high Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring VanA gene cluster isolated from diabetic foot ulcer. Iran. *J. Basic. Med. Sci.*, 15(2): 803-806.
- **Diekema**, D.J.; Pfaller, M.A. & Schmitz, F.J. (2001). Survey of infections due to *Staphylococcus* species : frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the united states , Canada , Latin America, Europe, and the Western pacific region for the sentry antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis*. 32(2): 114-132 .
- **Dutka-Malen**, S.; Evers, S. &Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevan *Enterococci* by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 33(1):24-27.

E

- **Elsayed**, S.; Hamilton, N.; Boyd, D. &Mulvey, M. (2001). Improved primer design for multiplex pcr analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus spp. J.Clin. Microbiol*., 39(6):2367-2368.

F

- **Fagade**, O.E.; Ezeamagu, C.O.; Oyelade, A.A. & Ogunjobi, A.A. (2010). Comparative study of antibiotic resistance of *Staphylococcus* species isolated from clinical and environmental samples. *J. Techn. Rep.*, 13(3): 165-169.

- **Farzana**, K. & Hameed, A. (2006). Resistance pattern of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* against five groups of antibiotics. *J. Res. Sci.*, 17(1): 19-26.
- **Feng**,Y (2008). Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev*. 32, 23–37.
- **Finch**, R.G. (2006). Coagulase negative *Staphylococci* . In : Principles and practice of Clinical Bacteriology .(Gillepie, S.H. and Hawkey, P.M, eds) 2nd ed . John Wiley and Sons. Nottingham, UK .7(10):1002-9780.
- **Finks**, J.; Wells, E.; Dyke, T.L.; Husain, N.; Plizga, L.; Heddurshetti, R.; Wilkins, M.; Rudrik, J.; Hageman, J.; Patel, J. & Miller, C. (2009). vancomycin- resistant *Staphylococcus aureus*, Michigan, USA, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 6(15): 943- 945.
- **Forbes**, B.; Sahm. D. & Weissfeld, A. (2007). Diagnostic Microbiology.12th ed. Elsevier, Pheladelphia, USA: 276-216
- **Forbes**, B.A.; Sahm, D.F. &Weissfeld, A.S. (2002). Baily and Scott' s: Diagnostic Microbiology.11thedition. Mosby, Inc. Baltimore, USA. , 302-309.
- **Fosheim**, G., R. ;Carey, B& Limbago,B.(2007). Evaluation of the advan dx vre evigene assay for detectionof vanA in vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiology* : 1611-1613.

G

- **Garcia-Migural**, L.; Liebana, E. & Jensen, L.B. (2007).Transposon characterization of vancomycin-resistant

Enterococcus faecium (VREFm) ND dissemination of resistance associated with transferable plasmids. *J. Antimicrob. Chemother*. 60(20):263-268.

- **Garnier**, F.; Taourit, S.; Glaser, P.; Courvalin, P. & Galimand, M. (2000).Characterization of transposon *Tn1549*, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus spp. J. Microbiol*. 146:1481-1489.
- **Gill**, S.R.; Fouts, D.E.; Archer, G.L.; Mongodin, E.F.; Deboy, R.T.; Ravel, J.; Paulsen, I.T.; Kolonay, J.F.; Brinkac, L.; Beanan, M.; Dodson, R.J.; Daugherty, S.C.; Madupu, R.;Angiuoli, S.V.;Durkin, A.S.; Haft, D.H.; Vamathevan, J.; Khouri, H.; Utterback, T.; Lee, C.; Dimitrov, G.; Jiang, L.; Qin, H.; Weidman, J.; Tran, K.; Kang, K.; Hance, I.R.; Nelson, K.E. & Fraser, C.M. (2005). Insight on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and a biofilm-producing Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains. *J. Bacteriol*. 187: 2426-2438.

- **Gillespie** ,S.H & Hawkey , P. M. (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology . second Edition.7(10) 73-98
- **Gould**, I.M. (2010). "VRSA-doomsday superbug or damp squib". Lancet .*Infect .Dis* .10 (12): 816–818.
- **Gordon , D . and Christensen , M . D** . (2002) . Pathogenesis of *staphylococcal* infections . Shane Ottmann , revised by Mike Williams.
- **Greenwood**, D. ; Slack, R.C.B. & Peutherer, J.F.(1997). Medical Microbiology . 15th ed. Churchill , Livingstone.

- **Grohmann,** E.; Muth, G. & Espinosa, M. (2003). Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *J. Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 67: 277-301
- **Guilfoile,** P.G.; Alcamo, E. & Heymann, D. (2007). Antibiotic Resistant Antbacteria. Infobase Publishing . New York.USA: 40-46.
- **Gupta**, K. ; Hooton, T. M. and Stamm, W. E. (2001). Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community acquired urinary tract infections. *Am. Intern. Med*.135(1):41-50

H

- **Hamid**, M.E. (2011). Resistance pattern of coagulase positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates from Asir region, Kingdom of Saudi Arabia. *J. Microbiol. Antimicrob*. 3(4):102-108.
- **Haraga,** I.; Nomura, S.; Fukamachi, S.; Ohjimi, H.; Hanaki, H.; Hiramatsu, K. & Nagayama, A. (2002). Emergence of Vancomycin resistance during therapy against methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* in a burn patient-importance of low-level resistant of vancomycin. *Int. J. Infect. Dis*. 6:302-308.
- **Harley**, J.P. & L.M. Prescott. (2002) .Laboratory Exercises in Microbiology. 5th.ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York.8(13) :456-459
- **Harris**,L.G.;Foster,S.J.& Richards,R.G.(2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *Staphylococcus aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review.*European Cells and Materials*.4:39-60.

- **Hasman,** H.; Aarestrup, F.M.; Dalsgaard, A. & Guardabassi, L. (2006). Heterologous Expression of Glycopeptide Resistance *vanHAX* gene Clusters from Soil Bacteria in *Enterococcus faecalis. J. Antimicrob. Chemother*. 57:648-653.
- **Hauschild**, T. (2001). Phenotyping and genotyping identification of *Staphylococci* isolated from wild small mammals. *Syst. Appl. Microbiol*. 24: 411-416 .
- **Heijenoort**, J.V. and Gutmann, L. (2000). Correlation between the structure of the bacterial peptidoglycan monomer unit, the specifity of transpeptidation, and susceptibility to B-Lactams. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 97(10): 5028-5030.
- **Heilmann**, C. & Peters, G.(2000). Biology and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* . In: Fischetti, V.A.; Novick, R.P.; Ferrtti, J.J. (eds). Gram- positive pathogens. Washington . DC. :442-449 .
- **Henry**, J.B.(2001).Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods . 20th ed .vol(1,2,3).W.B.Saunders company.U.S.A.47(12):2188-2189
- **Hiramatsu**, K.(2001). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet .Infect. Dis.*1:147-55.
- **Hitner**, H. and Nagle, B. (2010). Pharmacology. An Introduction. 6th edition. McGraw-Hill, New York. U.S.A:701-711.
- **Howden**, B.P.; Davies, J.K.; Johnson, P.D.; Stinear, T.P. & Grayson, M.L. (2010). "Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance

mechanisms, laboratory detection, and clinical implications". *Clin. Microbiol. Rev.* 23 (1): 99–139.

- **How,**R.A., Monk A.; Wootton M.; Walash T.R.& Enright M.C. (2004). vancomycin Susceptibility within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Emerg . infect. Dis*. 10:855-857.
- **Humphreys**, H. (2002). *Staphylococcus.* In: Medical Microbiology.(Green Wood, D.; Slack, R.C.B. and Peutherer, J.F. eds) 16th ed. London. New York :174-188.

I

- **Islam**, M. A. ; Alam, M. M. ; Choudhury, M. E. ; Kobayashi، N. & Ahmed, M. U. (2008). Determination Of minimum inhibitory concentration (MIC) of cloxacillin for selected isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with their antibiogram. *Bangl. J. Vet. Med.* 6 (1): 121–126.

J

- **Jackson,** C.R.; Fedorka-Cray, P.J. & Barrett, J.B. (2004). Use of Genus – and species – specific multiplex PCR for identification of Enterococci. *J. Clin. Microbiol*. 42(8):3558-3565.
- **Johnson**, M. (2007) . IU School of medicine , J621 . Medical Microbiology . Ph.D:118
- **Johnson,** A. G.; Zieglar, R. J.; Lukasewycz, O. A. & Hawley, L. B. (2002)**.** Board Review Series Microbiology and Immunology. 4thed. Lippincott Williams and Wilkins Awolters Kluwer Company: 80-88.

K

- **Kariyama,** R. ;Mitsuhata, R.; Chow, J.W.;Clewell, D.B. &Kumon, H. (2000). Simple and reliable Multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant *enterococci*. *J. Clin. Microbil*. 38: 3092-3095.
- **Kaszanyitzky**, E.J.; Egyed, Z.; Jánosi, S.Z.; Keserű, J.; Gál, Z.; Szabó, I. ,Veres, Z. & Somogyi, P. (2005). *Staphylococci* isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to β-lactamase-resistant β-lactam antibiotics . *J. Acta. Veter. Hung*. 52(41-17).
- **Katzung**, B.G.; Trevor**,** A.J. & Masters, S.B. (2009). Aminoglycosides. Pharmacology: Examination & Board Review.11 th ed. McGraw-Hill Medical: 773-8804.
- **Kim,**M. N; Pai, C. H.; Woo, J. H.; Ryu , J. S. &Hiramastsu, K. (2000).Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J .Clin .Microbiol*. 38,3879-3891.
- **Kloos**, W. & Bannerman, T.L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative *Staphylococci* . *Clin. Microbiol. Rev*. 7: 117-140
- **Kluytmans**, J.; Belkum, A. & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiologz underlzing Mechanisms, Associated Risks. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:505-520.
- **Kos**,.V.N. ; Desjardins,.C.A. ; Griggs,.A .; Cerqueira,.G. ; Tonder,.A.V. ; Holden,.M.T.G. ; Godfrey,.P. ; Palmer,.K.L. ; Bodi,.K. ; Mongodin,.E.F .; Wortman,.J. ; Feldgarden,.M. ; Lawley,.T. ; Gillm,.S.R. ; Haas,.B.J. ; Birren,.B& Gilmore,.M.S. (2012). comparative genomics of vancomycin-resistant

Staphylococcus aureus strains and their positions within the clade most commonly associated with methicillin-resistant *S. aureus* hospital-acquired infection in the united states . *Bio* 3 (3) :112-12.

L

- **Levin, T**.p.; Suh, B.; Axelrod, P.; Truant, A.L. & Fekete, T. (2005). Potential clindamycin resistance in clindamycin-susceptible, erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* : report of a clinical failure . *Antimicrob. Agents. Chemother* 49,1222-1224
- **Levinson,** W. & Jawetz, E. (2000). Medical Microbiology & Immunology :Examination & Board Review (6th ed). Mc Graw-Hill,U.S.A: 85-89.
- **Levinson**,W.&Jawetz,E.(2002).Medical.Microbiology&Immunology: Examination & Board Review.7th Edition. TheMcGraw-Hill Co., USA:77,96-98 .
- **Liu**, G.Y.; Essex, A.; Buchnan, J.T.; Datoo, V.; Hoffwen, H.M.; Bastain, J.F.; Fierer & Nizet, V. (2005). *Staphylococcus aureus* goldenpigment impairsneutrophil killing and promot virulence throughlts antioxidant activity . *J. Exp. Med.* 202: 209-215 .
- **Loomba**, P.S.; Taneja, J. & Mishra, B. (2010). Methicillin and Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus* in Hospitalized Patients. *J. Glob. Infect. Dis.*3(2): 275- 283.

M

- **MacFaddin**, J.F.(2000). Biochemical test for identification of medical bacteria . 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA: 555-565.
- **Madigan**, M. & Martinko, J.(eds). (2005). Brock biology of Microorganism. 11th ed . Prentice Hall.
- **Marchant, D. J. (2002**). Inflammation of the breast, obstet. Gynecol. Clinical. Nor. Am. 29(1): 89-107.
- **Maree CL**, Daum RS, Boyle-Vavra S, Matayoshi K, Miller LG (2007). "Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare-associated infections". *Emerging Infect. Dis*. 13 (2): 236–42
- **Malachowa** ,N & F. R.(2010) Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 67*:* 3057–3071.
- **Merquior,** V.L.; Neves, F.P.; Ribeeiro, R.L.; Duarte, R.S.; Marques, E.D. & Teixeira, L.M. (2008). Bacteraemia associated with a vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* strain harbouring both the *vanA* and *vanC1* genes. *J. Med. Microiol.* 57:244-245.
- **Miller**, D.; Urdaneta, V. ; Weltman, A. & Park. S. (2002). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51:902.
- **Moore**, MR; Perdreau-Remington ,F .& Chambers HF (2003) Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother*. 47: 1262-1266.

- **Morello**, J.A.; H.E. Mizer; & Granato. (2006). Laboratory Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care. 18th.ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York: 95-99.
- **Morello**, J.A.; Granato, P.A. &Mizer, H.E. (2003). Laboratory Manual and Workbook in Microbiology:Applications to patient Care. 17th edition. The Mc Grow-Hill Companies:97-99.
- **Moubareck**, V.; Cherif, D .M. ; Courvalin, P. & Périchon, B .(2009) . VanA-Type *Staphylococcus aureus* Strain VRSA-7 Is Partially Dependent on Vancomycin for Growth. *J. Antimicrob. Agents Chemother*. 53(9):3657-3663.
- **Mycek**,M.J. ;Harvey,R.A. & Champe,P.C.(2000). Pharmacology 2 nd ed. Lippincott Williams &Wilkins . New Jersey:610-617

N

- **Nagase**, N.; Sasak, A.; Yamashita, K.; Shimizu, A.; Wakita, Y.; Kitai, S. & Kawano, J. (2002). Isolation and species distribution of *Staphylococci* from animal and human skin. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 245-250 .
- **Nagle**, B . & Hitner , H . (2012) . Pharmacology An introduction .Mc Graw Hill. 6th edition.
- **Nair,** S. P.; Williams, R. J. & Henderson, B. (2000). Advances in our understanding of the bone and joint pathology caused by *Staphylococcus aureus* infection. *Rheumatology*. 39: 821-834.

- **Nester**, E.; Anderson, D.; Roberts, J.R.; Paersall, N. & Nester, M. (2001). Microbiology: Ahuman Prepction. McGraw Hill Co. New York:64-65 .
- **Nichol**, K.A.; Sill, M.; Laing, M. & Johnson, J.L. (2006). Molecular epidemiology of urinary tract isolates of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from North America. *Int. J. Antimicrob. Agent*. 27: 392-396.
- **Nimmo**, G. and Coombs , G. (2008) . The Australian society for Microbiology Inc. 29(3):6-10.

O

- **Oh**, J.Y.; Au, S.; Jin, J.S.; Lee, Y.C.; Cho, D.T. & Lee, J.C. (2007). Phenotypic and genotyping differences of the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from humans and poultry in korea. *J. Microbiol*. 45(5):466-472.
- **Oliveira,** A. M. and Ramos, M. C. (2002). PCR ripotyping of *Staphylococcus aureus* .Braz. *J. Med. Biol. Res*. 35:175-180.
- **Olsvik,** O. &Strockbin, N.A. (1993). PCR Detection of Heat-Stable , Heat-Label and Shiga-Like toxin genes in *Escherichia coli*. In. Persing, D.H.; Smith, T.F.; Tenover, F.C. & White, T.J. Diagnostic Molecular Microbilogy. 9th ed. American Society for Microbiology. Washington, DC.

P

- **Panesso**, D.; Ospina, S.; Robledo, J.; Vela, M.C.; Pena, J.; Hernandez, O.; Reyes, J. & Arias, C.A. (2002). First characterization of a cluster of *vanA*-Type Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in Colombia. *J. Emerg. Infect. Dis.* 8(9):961-965.
- **Panesso**, D.; Abadia-Patino, L.; Vanegas, N.; Reynolds, P.E.; Courvalin, P. & Arias, C.A. (2005**a**). Transcriptional Analysis of The *vanC* Cluster from *Enterococcus gallinarum* Strains with constitutive and inducible vancomycin resistance. *J. Antimicrob. Agent. Chemother*. 49(3):1060-1066.
- **Panesso**, D.; Reyes, J.; Rincon, S.; Diaz, L.; Galloway-Pena, J.; Zurita, J.; Carrillo, C.; Merentess, A.; Guzman, M.; Adachi, J.A.; Murray, B.E. & Arias, C.A.(2005b). Molecular epidemiology of vancomycin–resistant *Enterococcus faecium*: A prospective, multicenter study in south american hospitoals. *J. Clin. Microbiol*. 43(4):1575-1580.
- **Patino**, L.A.; Courvalin, P. & Perichon, B. (2000). *vanE* Gene cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* BM4405. *J. Bacteriol*. 184(23):6457-6464.
- **Paul,** S. M.; Pasquariello, A.; Kacek, O.; Fisher, A. & Thomson, R. (2004)**.** Direct detection of *Staphylococcus aureus* from adult and neonate nasal swab specimens using real-time polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn*. 6(3): 191-196.
- **Périchon**,.B. & **Courvalin**,.P.(2009). VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Genes, Genomes, Genetics* 53(11) : 4580-4587.

- **Peters**, G.; Von Eiff, C. and Herrmann, M. (1995). The changing pattern of Coagulase-negative *Staphylococci* as infectious pathogens. *Cur. Opin. Infect. Dis.* 8(1): 12-19 .
- **Prescott**,L.M.; Harley,J.P. & Klein,D.A.(2005). Microbiology. 6 th ed. McGraw-Hill .U.S.A.

R

- **Reynolds**, P.E. & Courvalin, P. (2005). Vancomycin-Resistance *Enterococci* Due to Synthesis of Precursors Terminating in D-alanyl- D-Serine. *J. Antimicrob. Agent. Chemother*. 49(1):12-25.
- **Rushdy** , A.A; Salama**,**M**.S** and Othman,A.A. (2007)**.** Detection of Methicillin/Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Some Clinical hospitals in Cairo Using *Meca*/ *Nuc* Genes and Antibiotic Susceptibility profile. *interational Joural of Agriculture and Biology* 9(6) : 800-806
- **Ryan**, K.J. and Ray, C.G.(eds). (2004). Sherris Medical Microbiology . 4th ed. McGraw Hill . USA:483-485

S

- **Saha**, B.; Singh, A. K. ; Ghosh, A. & Bal, M. (2008). Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *J. Med. Microbiol*. 57:72–79.
- **Sambrook**, J.& Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor, NewYork, USA. 5.2-5.14, 8.2.

- **Saravolatz**, L.D.; Pawlak.,J.& Johnson, L.B.(2012). *In Vitro* Susceptibilities and molecular analysis of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *Clinical infectious diseasesid. journals org*.55(4):582-586.
- **Serina**, S.; Radice,F.; Maffioli, S. ; Donadio, S. & Sosio, M. (2004). Glycopeptide resistance determinants from the teicoplanin producer actinoplanes teichomyceticus. *FEMS. Microbiol. Lett*. 240(1):69-74.
- **Shapiro,** M.; Smith, K. J.; James, W. D.; Giblin, W. J.; Margolis, D. J.; Foglia, A. N.; McGinley, K. & Leyden, J. J. (2000)**.** Cutaneous microenvironment of human immmuno deficiency virus (HIV+) seropositive and (HIV-) seronegative individuals with special reference to *Staphylococcus aureus* colonization. *J. Clin.Microbiol*. 38: 174-178.
- **Shearer**, J.E.S. ; Wireman,. J.; Hostetler,. J.; Forberger,. H.; Borman,. J.; Gill,. J.; Sanchez,. S.; Mankin,.A.; LaMarre,.J.; Lindsay,.J.A.; Bayles,.K.; Nicholson,.A.; O'Brien,.F.; Jensen,. S.O.; Firth,.N.; Skurray,.R.A.& Summers,.A.O. (2011) Major Families of Multiresistant Plasmids from Geographically and Epidemiologically Diverse *Staphylococci*. *Genes, Genomes, Genetics www.g3journal.org*. 1(7): 581-591.
- **Shindia**, A.A.; Ragab F.A. and Nasrat H.M. (2011). Emergence of High-Level Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Critical care patients Cairo University Hospitals. *Aust. J. Basic & Appl. Sci*.. 5(5): 1281-1290.
- **Sievert**, D. M.; Boulton, M. L. ; Stolman, G.; Johnson, D. ; Stobierski, M. G. ; Downes, F. P. ; Somsel, P. A. ; Rudrik, J. T. ; Brown, W.; Hafeez, W.; Lundstrom, T. ; Flanagan, E.; Johnson, R.;

Mitchell, J. and Chang, S. (2002). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep*.51:565–567.

- **Sievert**, D. M.; Rudrik, J. T. ; Patel, J. B.; McDonald, L. C. ; Wilkins, M. J. and Hageman, J. C. (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. *Clin. Infect. Dis.* 46:668–674.
- **Sletvold**, H.; Johnsen, P.J.; Wikmark, O.G.; Simonsen, G.S.; Sundsfj- ord, A. & Nielsen, K.M. (2011). *Tn1546* is part of a large plasmid- encoded genetic unit horizontally disseminated among clonal *Enterococcus faecium* lineages. *J. Antimicrob. Chemother*. 65:1894-1906.
- **Solberg,** C. O. (2000). Spread of *Staphylococcus aureus* in Hospitals: causes and prevention. Scand. *J. Infection*.32 (6): 587-595.
- **Srinivasan**, A.; Dick, J.D. and Per, T.M. (2002). Vancomycin Resistance in Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(3) :430-438.
- **Stephenson**, F.H. (2003). Calculations for Molecular Biology and Bio-technology:A Guide to Mathematics in the Laboratory. 1st edition. Elsevervier.USA. CH-2:18-34.

T

- **Talebi,** M.; Pourshafie, M.R.; Oskouii, M. and Eshraghi, S.S. (2008). Molecular analysis of *vanHAX* Element in Vancomycin Resistant *Enterococci* Isolated from Hospitalized patients in Tehran. *Iran. J. Biomed*. 12(4):223-228.

- **Tawfiq**, H.K. (2007). Comparative pathogenicity of peptidoglycan extracted from *Staphylococcus xylorus* and standard lipopolysaccharide extract from *E.coli* .M.Sc. Thesis . University of Baghdad / Baghdad Iraq / College of Science : 46-51.
- **Tenover** ,F . C. ;Weigel , L . M . ; Appelbaum , P . C . ; McDougal , L . K . ; Chaitram , J. ; McAllister , S. ; Clark , N .; Killgore , G. ; O'Hara , C . M . ; Jevitt , L . ; Patel , J . P .andBozdogan , B . (2004) .Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*Isolate from a Patient in Pennsylvania . *Antimicrobial Agents And Chemotherapy, Jan*. 48.(1):275–280.
- **Tenover**, F.C. and Moellering, R.C.(2007).The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for Staphylococcus aureus .*Clin. Infect. Dis.* 44 :1208-15.
- **Theaker**, C., S. Ormond-Walshe, B. Azadian, *et al*. 2001. *MRSA* in the critically ill. J. Hosp. Infect., 48" 98-102.
- **Tiemersma**, E. W.; Bronzwaer, S.; Lytikainen, O.; Degener, J. and Bruinsma, N. (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999- 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 10(9): 1627-1634.
- **Tiwari,** K.B.(2007) VRSA proposal: Study of genetic polymorphisms among *Staphylococcus aureus* responding variously towards vancomycin .New Biodieel Technology.
- **Todar,K**.(2005). Staphylococcus .Todar's online textbook of bacteriology(http:/www.textbookofbacteriology.net/Staph.html)
- **Todar**, K.(2008) . Todar's Textbook of Bacteriology.1st ed .Madison and Wisconsin. USA: 1-6.

❖ **Todar,**K.(2007).The mechanism of bacterial Pathogenicity ‘‘Klebsiella’’. Todars Textbook of bacteriology.Wisconin-Madison Inc.USA.4(1):55-62.

U

❖ **Uwaezuoke**, J.C. and Aririatu, L.E. (2004). A Survey of Antibiotic Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from Clinical Sources in Owerri. *J. Appl. Sci. Environ.* 8 (1) 67 – 69.

V

❖ **Vaez**, H.; Tabaraei, A.; Moradi, A. and Ghaemi, E.A.(2011). Evaluation of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from patients in Golestan province-north of Iran. *Afr. J. Microbiol. Res*. 5(4): 432-436.

❖ **Von-Eiff**, C.; Heilmann, C. and Peters, G. (1999). New aspects in the molecular basis of polymer-associated infection due to *Staphylococci* . *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18(12): 843-846 .

W

❖ **Weigel**, L.M., D.B. Clewell, S.R. Gill, N.C. Clark, L.K. McDougal, S.E. Flannagan, J.F. Kolonay, J. Shetty, G.E. Killgore and Tenover, F.C. (2003). Genetic analysis of a high-level

vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science, 302: 1569-71.

- **Weigel,** L.M.; Donlan, R.M.; Shin, D.H.; Jensen,B.; Clarck, N.C.; McDougal, L.K.; Zhu, W.; Musser, K.A.; Thompson, J.;Kohlerschmidt,D., Dumas, N.; Limberger, R.J. &Patel,J.B. (2007). High level Vancomycin-Resistsnt*Staphylococcus aureus* Isolates Associated with a Polymicrobial Biofilm.*J.Antimicrob. Agent.Chemother*. 51:231-238.
- **WHO**. (2003). Basic laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. 2nd ed. Geneva.
- **Woo**, P.; Leung, A.; Leung, K.W. and Yuen. (2001). Identification of slide coagulase positive , Tube coagulase negative *Staphylococcus aureus* by 16S ribosomal RNA gene sequencing . *J. Clin. Pathol*. 54: 244-277 .

Z

- **Zehra**, A.; Naqvi, B.S.; Bushra, R. and Ali, S.Q.(2010). Comparative study on resistance pattern of different pathogens against cefixime and cefepime. *Jord. J. Pharm*. Sci. 3(2):145-156.
- **Zheng**, B.; Tomita, H.; Inoue, T. and Ike, Y. (2009). Isolation of *vanB*- type *Enterococcus faecalis* strains from nosocomial infections: first report of the isolation and identification of the pheromone-Responsive plasmids pMG2200,encoding *vanB*-type vancomycin resistance and a Bac 41-Type bacteriocin, and pMG2201, encoding erythromycin resistance and cytolycin (HIy/Bac*). J. Antimicrob. Agent. Chemother*. 53(2):735-747.

- **Zhu**, W.; Clark, N. C. ; McDougal, L. K. ; Hageman, J.; McDonald, L. C. and Patel, J. B. (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-like *vanA* plasmids in Michigan. *J. Antimicrob. Agent. Chemother*.52:452–457.
- **Zhu**, W.; Murray, P.R.; Huskins, W.C.; Jernigan, J.A.; McDonald, L. C.; Clark, N.C.; Anderson, K.F.; McDougal, L.K.; Hageman, J.C.; Olsen-Rasmussen, M.; Frace, M.; Alangaden, G.J.; Chenoweth, C.; Zervos, M.J.; Robinson-Dunn, B.; Schreckenberger, P.C.; Reller, L.B. ; Rudrik, J.T. &Ratel, J.B. (2010). Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-like *vanA* Plasmid associated with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus. J. Antimicrob. Agent. Chemother*. 54(10): 4314-4320.
- **Zhu**,.W.; Clark,.N.C.; McDougal,.L.K.; Hageman,.J.; McDonald,. L.C.& Patel,. J.B.(2007). Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with Inc18-Like *vanA* plasmids in Michigan. *Antimicrob. Agents Chemother*. 52 (2) : 452-457.
- **Zirakzadeh**, A. & Patel, R. (2006). Vancomycin-Resistant *Enterococci*: Colonization, Infection, Detection, and Treatment. *Clin. Proc.* 81:529-536.