Iraqi Journal of Science
ISSN: 0067-2904
GIF: 0.851

دراسة وراثية مقارنة لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية و العنقوديه البشرونيه المعزولة من أخماج الجروح و الحروق و الفلورا الطبيعية

هالة سالم عبد الكريم[١]* ، علي صالح حسين[٢]

[١] قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ،جامعة تكريت، العراق.

[٢] كلية الطب ، الجامعة العراقية ، بغداد ، العراق.

الخلاصة

جُمعت 100 عينة من أخماج جروح وحروق ومسحات جلدية من مرضى مراجعين وراقدين في مستشفى بلد العام ، وبواقع 50مسحة من الجروح و 25 مسحة من الحروق و 25 مسحة من جلد المرضى . وجد ان ٥٠ عزلة تعود لجنس *Staphylococcus* منها ٣٨ عزلة تم تشخيصها على انها *S. aureus* و ١٢ عزلة تعود الى النوع *S. epidermidis*، شُخصت العزلات أعتماداً على الصفات المظهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية .

بينت دراسة أنتاجية بعض عوامل الفوعة و لسبعة إنزيمات خارج خلوية شملت كل من الإنزيمات : urease, lipase, DNase, haemolysin, Coagulase, β –lactamase, lecithinase أن كل عزلات *S.aureus* كانت لها القدرة على أنتاج كل تلك العوامل وبنسبة 100% ، بينما كانت عزلات *S.epidermidis* غير منتجة للإنزيمات DNase و coagulase و lipase ، لكنها أنتجت كل من انزيمات haemolysin,urease,lecithinase,β–lactamase وبنسب انتاج تراوحت 45%.10%,80%,58.33% على التوالي. انتخبت 18 عزلة من عزلات *staphylococci* اعتمادا على قدرتها في أنتاج أغلب عوامل الفوعة لتقيم وجود الجينات المشفرة للانزيمات coagulase(*coa*) , haemolysin(*hly*) بواسطة تقنية تفاعل البلمرة التضاعفي المتسلسل polymerase chain reaction(PCR) .تبين وجود الجين *hly* في جميع العزلات المدروسة ،بينما تواجد الجين *coa* في 14 عزلة فقط .

Genetic Comparative Study of *Staphylococcus aureus*& *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Wounds, Burns and Skin Flora

Hala S. Abdul-Kareem[1]*, Ali S. Husain[٢]

[١]Department of Biology, College of Science, Tikrit University, Iraq

[٢]College of Medicine, Al-Iraqia University, Baghdad, Iraq

Abstact

One hundred specimens from wounds, burns, and skin swabs were collected from patients laying and attended to Balad general hospital. It was found that 50 isolates belong to *Staphylococcus* spp., 38 isolates were identified as *S. aureus* and 12 isolates were identified as *S. epidermidis* according to microscopic, cultural and biochemical testing. The study of seven extracellular enzyme as virulence factors including the enzymes: urease, lipase, DNase, haemolysin, coagulase, β-lactamase,

*Email:halaalbakri73@yahoo.com

and lecithinase. Reavealed that 100% of *S.aureus* had the ability to produce these enzymes, while S. epidermidis isolates were unable to produce the enzymes DNase, lipase, coagulase, but they were capable to produce haemolysin, urease, lecithinase, and β-lactamase, the range for production of these factors were 58.33 %,80,%, 10,%, and 45% respectively.

Eighteen *Staphyolococcus* isolates were selected according of their ability for production most of studies virulence enzymes for detection of genes encoding for the enzymes heamolysine (*hly*) and coagulase (*coa*) by using of polymerase chain reaction (PCR) technique. The Gene *hIy* was detected in all isolates and *coa* was detected in 14 isolates only.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, PCR, virulence factor.

المقدمة

إن تلوث الجروح والحروق بالبكتريا يعد من المشاكل الصحية التي تواجه المرضى الراقدين في المستشفى لما تسببه من أخماج تعرف بأخماج المستشفيات (Nosocomial infection) ومن أكثر المرضى الذين يصـابون بهذا النوع من الأخماج هم مرضى العناية المركزة في جميع أنحاء العالم، ولا سيما البلدان النامية.

وتشير التقارير إلى أن حوالي (5%–10%) من الراقدين في وحدات العناية المركزة في مستشفيات الولايات المتحدة يكتسب هذا النوع من الأخماج، ويعتمد حصول الخمج وتطوره على عدة عوامل تشمل الفوعة Virulence وعدد الجراثيم المسببة للخمج، ومدى حساسية المضيف Host وطبيعة تعرضه للعدوى، والوسيلة التي تنتقل بواسطتها الجراثيم، فضلا عن صنف الجرح ودرجة الحرق والعلاج بالمضادات، والعمر والجنس، ومدة الرقود في المستشفى .

وعلى الرغم من التقدم الحاصل في مجال الرعاية الطبية لمرضى الجروح و الحروق فقد كان للمضادات الحيوية منذ اكتشافها الأثر الكبير في خفض معدلات هذه الإصابة ، وقد أعطت نتائج جيدة في علاجها والسيطرة عليها والحد من انتشارها بشكل وبائي، إلا أن سوء استعمال هذه المضادات وبشكل عشوائي وغير مدروس ودون إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية، أدى إلى ظهور العديد من السلالات البكترية المقاومة للمضادات الحيوية .

ان التطور الكبير في علم الاحياء الجزيئي وتقنيات الهندسة الوراثية ادى الى استخدام تقنيات متطورة وسريعة في الكشف عن جينات الفوعة أو المقاومة للمضادات الحيوية والتحري عن العناصر الوراثية ذات العلاقة بالامراضية دون اللجوء الى الطرائق التقليدية في العزل والتشخيص واختبار الحساسية للمضادات الحيوية [1] وإن بعض عوامل امراضية البكتريا يصعب احيانا تشخيصها مختبريا بالطرق التقليدية لذا تم اللجوء الى استخدام تقنية PCR الجزيئي باستخدام بادئات متخصصة للكشف عن تلك العوامل التي لم تدرس محليا سواء بالطرق المختبرية التقليدية او الجزئية.

المواد وطرائق العمل :

جمع العينات

جُمعت (100) عينة من أخماج جروح وحروق ومسحات جلدية من مرضى مراجعين وراقدين في مستشفى بلد العام للمدة من شهر تشرين الاول 2012 ولغاية شهر أذار 2013 ، وتم أخذ المسحات من مختلف الاعمار ومن كلا الجنسين ، وبواقع 50 عينة للجروح و 25 عينة للحروق و25 مسحة جلدية .

عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية

زُرعت العينات على كل من وسطي أكار الدم Blood agar و أكارالمانيتول الملحي Mannitol salt agar (MSA). حُضنت الاطباق بدرجة حرارة 37° لمدة 24 ساعة ، وشُخصت العزلات اعتماداً على الصفات المظهرية والفحص المجهري والاختبارات الكيموحيوية .

التحري عن بعض عوامل الضراوة

تم التحري عن انتاجية بعض عوامل الفوعة ولسبعة من الانزيمات الخارج خلوية التالية: lipase ,Urease haemolysin, coagulase, lecithinase, DNase, ß–lact.lipasamase باستخدام الاوساط الزرعية المختبرية المختلفة.

التحري عن انتشار جينات (*hly,coa*) في العزلات البكتيرية واستخلاص الدنا الجينومي بطريقة الغليان Bioling method باستخدام عُدة أستخلاص الدنا وحسب تعليمات الشركة المُصنعة (promega).

أُنتخبت 18 عزلة اعتماداً على قدرتها على أنتاج اغلب عوامل الفوعة المدروسة مختبريا من أخماج الجروح والحروق وبواقع 7 عزلات من كل من إصابات الجروح و الحروق و4 عزلات من المسحات الجلدية . واسُتخدمت بادئات متخصصة التي تستهدف التسلسل النوعي المشترك لجينات (*hly,coa*) وكما في الجدول-١ التالي :

جدول 1- تسلسلات القواعد النيتروجينية لبادئات نوعية

ت	اسم البادئ	تسلسل البادئ	حجم الجين المتوقع	الشركة المصنعة
1	*coa*	F:GATTTTGGATGAAGCGGATT R:ATACTCAACCGACGACACCG	440-1400 bp	Alpha DNA
2	*hIy*	F:GGTTTAGCCTGGCCTT R:CATCACGAACTCGTTC	534 bp	Alpha DNA

النتائج والمناقشة

جمعت مائة مسحه من اخماج جروح وحروق ومسحات جلدية لمرضى مراجعين وراقدين في مستشفى بلد العام، من كلا الجنسين، وتراوحت تراوحت أعمار المرضى بين١- ٦٠ سنة و للفترة من تشرين الأول ٢٠١٢، ولغاية آذار ٢٠١٣. بينت نتائج التشخيص المجهري والزرعي والكشوفات الكيموحيوية ان 50 عزلة تعود الى البكتريا العنقودية *Staphylococcus* منها 38 عزلة تعود للمكورات العنقودية الذهبية *S. aureus*، و12 عزلة تعود للمكورات العنقودية البشرونية *S. epidermidis* .تبين من الفحص المجهري وباستخدام صبغة كرام أنها مكورات موجبة تترتب بشكل أزواج أو عناقيد وعموما، فإن الفحص المجهري يميز جرثومة *Staphylococci* ولكن لا يعتمد عليه للتمييز بين الانواع [2] . كانت كل العزلات سالبة لفحص أنزيم الاوكسديز و موجبة لفحص الكتاليز بدلالة ظهور فقاعات هوائية عند نقل جزء من المستعمرة الى قطرة من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2، استخدم وسط MSA كوسط اختياري وانتقائي للتمييز بين المكورات المتحملة لتراكيز ملحية عاليه % 7.5 وللتحري عن المكورات المخمرة للمانيتول عن المكورات غير المخمرة للمانيتول و حيث ان معظم المكورات العنقوديه الامراضيه مثل *S.aureus*تكون مخمرة للمانيتول حيث تظهر مستمراتها على وسط MSA بلون اصفر لتخميرها المانيتول وانتاج الحموض العضويه التي تغير من pH الوسط فيتغير لون الكاشف phenol red من الاحمر الى الاصفر [2] ، وأعطت معظم عزلات *S.aureus* نتيجة موجبة لانزيم Coagulase، وامتازت أيضاً بقدرتها على تخمير معظم السكريات باستثناء سكر الرافينوز، كانت عزلات *S.epidermis* سالبة لانتاج coagulase ,وغير مخمرة لسكر المانيتول لذا لم تغير لون وسط MSA . أوضحت النتائج أن أعلى نسبة عزل المكورات العنقودية الذهبية التي تم الحصول عليها من أخماج الجروح، فقد بلغت 24عزلة أي بنسبة عزل (48%)، ، واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما وجده [3] في هولندا إذ أشاروا إلى أن هنالك نسبة عالية لشيوع المكورات العنقودية في جروح ما بعد العمليات .

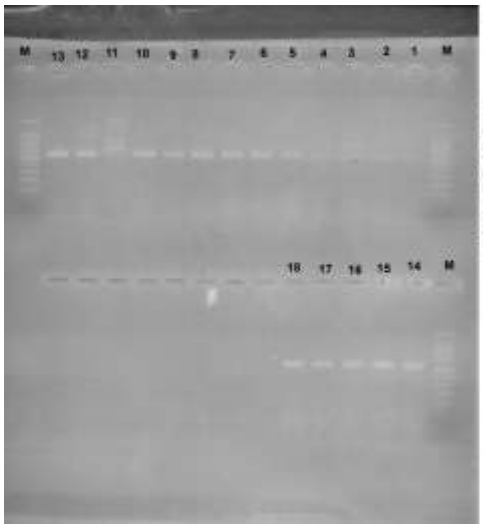
استعين ببعض الأوساط المختبرية للتحري عن قدرة المكورات العنقوديه لانتاجية بعض الأنزيمات الخارج خلوية كعوامل فوعة , كانت عزلات المكورات العنقودية الذهبية منتجة وبنسبة 100%لكل من DNase،haemolysin – ß & coagulase, lecithinase ، lipase، urease،lactamase,

اظهرت النتائج واعتمادا على مصادر العزلات ان الجين *hly* موجود في جميع العزلات و بنسبة (100%)والتي توزعت الى 7عزلة من الجروح و7عزلة من الحروق و4 عزلة مأخوذة من جلد المرضى الراقدين في المستشفى كما مبين في جدول-٢ ويتضح مما تقدم ان هذا الجين كان شائعا في العزلات المأخوذة من مواقع الإصابة المختلفة كافة مما يظهر اهميته كعامل ممرض مقارنة بغيره من عوامل الضراوة وهذا ما اكدته نتائج الترحيل الكهربائي . حيث بينت النتائج امتلاك هذه العزلات حزم الدنا DNA ذات وزن جزئي 530pb مقارنةً مع الدليل الحجمي 100pb وكما في الشكل-1.

جدول ٢ - يبين النسبة المئوية لانتشار الجين *hIy* في عزلات المكورات العنقودية حسب موقع الاصابة

مصدر العزلة	عدد العزلات	العزلات الموجبة	
		العدد	(%)
الحروق	7	7	% 100
الجروح	7	7	% 100
مسحات من جلد مرضى راقدين	4	4	% 100

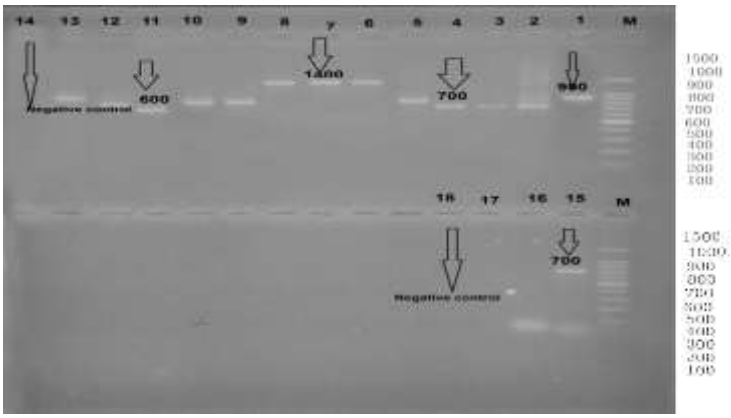
وجاءت نتائج الدراسة الحالية لتواجد الجين *hly* مقاربة نسبيا لما توصل اليه [4] حيث وجد ان امراضية هذه البكتريا تعود الى انتاجها عامل فوعة مهم هو انزيم هيمولاسين حيث ذكر ان نسبة (81.18 %) هي جينات مشفرة لانتاج *hla* gene و (18.18) هي جينات مشفرة *hlb* و ايضا تطابقت نتائج الدراسة الحالية مع ما وجده[5]حيث ذكروا ان α–haemolysin يكون اكثر ترددا من β– haemolysin وبنسبة (43.4 %) وايضا تقاربت نتائج الدراسة الحالية مع ما وجده [6] فقد بينوا ان العزلات ذات المقاومة العالية للمضادات الحيوية تكون لها القدرة العالية للامراضية وذلك من خلال انتاجها انزيم هيمولاسين ، ووُجِدَ ان انتاج الهيمولاسين له علاقة وثيقة بتكوين Bioflims وهذا ما أكده [7].



شكل ١– نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لدنا عزلات بكتريا *S.aureus* و *S.epidermidis* المعزولة من أخماج جروح وحروق ومسحات من جلد مرضى راقدين باستعمال بادئات متخصصة لجينات *hly* على هلام الاكاروز بتركيز (1.5%)وفرق جهد (60)فولت لمدة ساعتين.

واظهرت النتائج الدراسة الحالية واعتمادا على مصادر العزلات الى وجود جين *coa* بنسبة (100%) في عزلات أخماج الجروح والحروق ،وعدم وجودهُ في العزلات المأخوذة من جلد مرضى راقدين في المستشفى، كما موضح في الجدول (2) وهذا ما اكدته نتائج الترحيل الكهربائي ، حيث بينت نتائج امتلاك هذه العزلات حزم DNA ذات اوزان جزئية تراوحت ما بين 1400bp– 440 مقارنة مع الدليل الحجمي 100bp وكما في الشكل –٢.

تطابقت نتائج الجين *coa* مع ما وجده [8]حيث ذكروا ان غالبية عزلات *S.aureus* تكون منتجة لهذا الانزيم لكونه عامل فوعة مهم في امراضية هذه البكتريا ، وايضا تقاربت نتائج الدراسة مع ما ذكره[9] حيث استخدموا coagulase gene كعامل ضراوة مهم للمكورات العنقودية الذهبية المقاومة لمضاد المثيسلين ،وقد اشارت[10] ان معظم سلالات المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* كانت منتجة لانزيم coagulase باعتباره عامل فوعة مهم في امراضية هذه البكتريا وبنسبة 39% ويعود اختلاف نسبة انتشار الجين الى اختلاف مصدر وعدد العزلات .



شكل ٢– نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لدنل عزلات بكتريا *S.aureus* المعزولة من أخماج الجروح والحروق ودنا عزلات بكتريا *S.epidermidis* المعزولة من جلد مرضى راقدين بأستعمال بادئات متخصصة لجينات *coa* على هلام ألأكاروز بتركيز (1.5%)وفرق جهد 60 فولت لمدة ساعتين .

المصادر:

1. Nassif, X. and Sansonetti, P.J. **1986.** Correlation of the virulence of *Klebsiella Pneumonai* K1and K2 with presence of plasmid Encoding aero-bactin. *Infect.Immun*., 54(3), pp:603-608.
2. Sakai, H., Procop, G.W.,Kobayashi, N.,Togawa, D. and Bauer, T.W**. 2004.** Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Coagulase negative *Staphylococcus* in positive blood culture by real time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. *J.Clin.Microbiol*., 42(12), pp:5739-5744.
3. Collee, J.G., Fraser, A.G., Marmion, B.P. and Simmons, A. **1996.** *Practical medical microbiology*.4th ed., Short Course, pp: 245 – 258.
4. Kluytmans,J., VanBelkum, A. and Herni,V.**1997.**Nasal carriage of *Staphylococcus aureus:* Epidemiology under mechanism & Associated risks *Clin. Microbial.Rev*., 10, pp:505-520.
5. Ariyanti, D., Isrina, S.,Salasia, O. and Toto, S.F.**2011.**Characterization of hemolysin of *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin. *Journal of Biotechnology*, 16(1), pp:32-37.
6. Ohsen, K., Ziebular, W., Koller, K.P., Hell, W., Wichehans, T., and Hacker, J. **1998.** Effect of sub inhibitory concentration of antibiotic on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin sensitive & methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated. *Antimicrobial. Agent. & Chemotherapy*, 41(11), pp: 2817-2823.
7. Caizza, C.N and G.A.Otole.**2003.**Alpha-Toxin is required For bio film formation by *Staphylococcus aureus. Journal Of Bacteriology*, 185, pp: 3214-3217.
8. Goh,S.H.; Byrne,S.K.; Zhang, J.L. and Chow, A.W**.1992.** Molecular typing of *Staphylococcus aureus*, on the basic of coagulase gene polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, pp: 1642-1645.
9. Lawerence,C.,Cosseron, M.,Mimoz, O.,Buisson, , C.B.,Casta, Y., Samii, K.,Duval, and J., Laclercq, R**.1996.**Use of the coagulase gene typing method for detection of carries of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37, pp:687-696.
10. Dasilva,E.R and Dasilva,N.**2005.**Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in South eastern. Brazil. *Can .J. Vet. Res*., 69(4), pp: 260-264.