جامعة الموصل

كلية العلوم

التغاير في مورثات الضراوة لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* المقاومة للمشيلين

نور ثائر صالح محمد

رسالة ماجستير

علوم الحياة / أحياء مجهرية

بإشراف

الاستاذة الدكتورة إسراء غانم السماك

1443هـ

2022 م

الخلاصة

جمعت (100) عينة شملت (50) عينة سريرية من إصابات مختلفة تضمنت التهابات المجاري البولية ومسحات من القيح و(50) عينة من مسحات الأنف لأشخاص أصحاء ولكلا الجنسين من مستشفيات السلام والخنساء ومن مختبرات أهلية خارجية في مدينة الموصل للفترة من شهر آب 2020 إلى شهر كانون الأول 2021.

زرعت على وسط أكار الملح والمانيتول Mannitol Salt Agar (MSA) لعزل النوع *Staphylococcus.aureus* أظهرت (40) عينة مرضية و (30) عينة من الأنف نموا على وسط أكار الملح والمانيتول منها (25) عزلة مرضية كانت مخمرة للمانيتول أما العزلات الطبيعية فكانت جميعها مخمرة. وبالاعتماد على الصفات المظهرية وإنتاج أنزيم التجلط Coagulase تم تشخيص (13) عزلة مرضية و(8) عزلات طبيعية وبنسبة (52%) و (26.6%) على التوالي تابعة للنوع *Staph.aureus* كما تم تأكيد تشخيصها باستعمال جهاز الفايتك.

تم إجراء اختبار الحساسية لعزلات النوع *Staph.aureus* تجاه (14) مضادا حيويا, إذ أظهرت مقاومة عالية لبعض المضادات الحيوية مثل الـ Penicillin بنسبة (100%) لكل من العزلات المرضية والطبيعية ونسبة (61.5%) و (100%) للمضاد Erythromycin للعزلات المرضية والطبيعية على التوالي.

وكانت نسبة المقاومة للـــ Oxacillin (38.4%) و(0%) للعزلات المرضية والطبيعية على التوالي. وأظهرت جميع العزلات حساسية لكل من Vancomycin، Chloramphenicol، Ciprofloxacin، Nitrofurantion Trimethoprimsulphametoxazol Levofloxacin ، أما المقاومة للـــ Clindamycin، Gentamicin و Fusidic acid كانت بنسبة (7.6%) و (0%) وللـ Amikacin و Tetracyclin (7.6%) و (37.5%) (15.3%) و (0%) لكل من العزلات المرضية والطبيعية على التوالي.

أخذت (13) عزلة (MRSA و VRSA) مرضية مشخصة من دراسة سابقة وكذلك العزلات المرضية والطبيعية المعزولة في الدراسة ودرست قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية باستعمال وسط أكار أحمر الكونكو (CRA) وباستعمال طريقة الصفيحة العيارية (MTP). واظهرت (60%) و (25%) من العزلات المرضية و الطبيعية قدرتها لتكوين الغشاء الحيوي على وسط أكار أحمر الكونكو وكانت وجميع العزلات المرضية و الطبيعية مكونة للغشاء الحيوية بطريقة الصفيحة العيارية.

تم استعمال تقنية الـ PCR للتحري عن وجود مورثات المقاومة و مورثات عوامل الضراوة, إذا تواجدات مورثات المقاومة (*BlaZ*) و (*MecA*) في العزلات المرضية والطبيعية بنسبة (93.3%), (100%) و(33.3%), (25%) على التوالي.

أما مورثات الضراوة فتواجد المورث(*spa*) بنسبة (80%) و (100%) بينما ظهر (*pvl*) في كل من العزلات المرضية والطبيعية بنسبة(6.6%) و (50%) أما المورث (*emp*) فقد تواجد بنسبة (73%) و (75%) والمورث (*ebps*) تواجد بنسبة (47%) و (75%) والمورث (*eno*) بنسبة (93%) و (100%) أما نسبة تواجد المورث (*clfB*) فكانت (53%) و (75%) في كل من العزلات المرضية والطبيعية على التوالي. لم يتم العثور على مورثي (*clfA* ، *fnbA*) في اي من العزلات المرضية والطبيعية.

تم تحليل تتابعات القواعد النتروجينية للمورثات (*eno* و *spa*) لعدد من سلالات المكورات العنقودية الذهبية للحصول على العلاقة التطورية بين السلالات قيد الدراسة وذلك باستعمال برنامج Clustal W ضمن برنامج Molecular Evolutionary Genetics Analysis Mega7 باستعمال طريقة المعدل غير الموزون Unweighted Pair Group Method With Arithmetic UPGMA Mean.

تم التحري عن النمط الجيني للبروتين السطحي A (*spa* typing) وحساب المكررات المترادفة لمورث *spa* (*spa* tandem repeats) باستعمال برنامج (spa Typer) عبر الموقع http://spatyper.fortinbras.us كما تم التأكد من تتابعات القواعد المكررة للمورث باستخدام http://www.ridom.de/spaserver إذ أظهر المورث *spa* خمسة أنماط مختلفة وهي t975,t480,t991,t304,t386.

أوضحت العلاقة بين سلالات *Staph.aureus* ضمن المخطط الشجري اعتمادا على مورث *spa* تعنقد (3) سلالات ضمن العنقود A جميعها ضمن النمط t480 أما العنقودB فضم سلالتين وكانت ذات النمط t975 والعنقود C ضم ثلاثة سلالات لها نفس النمط 304t والسلالة D9 غير المنمطة Nontyping عند العنقود D والسلالة D10 لها النمط t386 عند العنقود E أما العنقود F ضم سلالتين نمطهما t991.

ظهرت العلاقة بين سلالات *Staph.aureus* ضمن المخطط الشجري اعتمادا على مورث (*eno*) تعنقد ثلاث سلالات G4, G5, G6 وبنسبة تشابه (100%) عند العنقود A وسلالتين G3, G1 ارتبطت كل منهما عند نسبة تشابه (100%) ضمن العنقود B وسلالة واحدة G2 في C كانت بنسبة تشابه (95%) ارتبط العنقود A مع B عند نسبة تشابه(99.99%) وكذلك ارتبطا مع العنقود C عند(99.98%) مما يدل على تقاربهما الوراثي العالي.

Abstract

One hundred (100) samples were collected from various sources, 50 clinical samples from urinary tract infections and pus and (50) samples of nasal swabs form healthy people, from Al-Salam, Al-Khansa hospitals and external laboratories in the city of Mosul City for the period from August 2020 to January 2021.

Sapmles were cultured on Mannitol Salt Agar, 40 clinical samples and 30 nasal samples showed the result for growth on this medium, 25 clinical isolates were fermented mannitol, while all the normal isolates were ferments mannitol. 13 Clinical and 8 normal isolates were diagnosed as at rate of (52%) and (26.6%) respectively that belonging to *Staphylococcus.aureus* depending on their Morphological characteristics and production of the coagulase, the diagnosis was confirmed using the VITEK system.

Antibiotic susceptibility testing was done for 14 antibiotics, high resistance to some antibiotics was appeared such as Penicilin (100%) for both clinical and normal isolates, with (61.5%) and (100%) for each clinical and normal isolate respectively.

The percentage of resistance to the Oxacillin was (38.4%) and (0%) for the clinical and normal isolates, respectively. All clinical and normal isolates showed sensitivity to each of the antibiotics Vancomycin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Trimethoprim sulphametoxazol, Nitrofurantion, Teracycline, Levofloxacin. while resistance rate to antibiotic and the resistance to Amikacin was (7.6%) and (37.5%) for both clinical and normal isolates, respectively.

Thirteen clinical isolates of MRSA and VRSA were taken from a previous study in addition to the two clinical and four normal isolates. biofilm formation for all isolates on congo red agre was (60%) and (25%) respectively, and all the clinical and normal isolates formed biofilm by using Microtiter plate method.

the presence of *BlaZ* and *MecA* genes was (93.3%), (100%), and (33.3%), (25%) and other genes in clinical and normal isolates, respectively.

The presence of the genes (*spa, PVL, emp, ebps, eno, clfB*) in both clinical and normal isolates, were (80%), (100%), (6.6%, (50%) and (73.3%), (75%, (46.6%), (75% and (93.3%), (100%), respectively.

Non of the (*ClfA, fnbA*) gene xfound in any of the clinical and normal isolates.

The pattern of *spa* gene (*spa* typing) and calculating the tandem repeats of the spa gene was investigated by using (*spa* typer) program via the website http://spatyper.fortinbras.us/) The repeating sequences of the gene were verified by using (http://www.ridom.de/spaserver).

The *spa* gene showed five different patterns, include (t975, t840, t991, t304, t386).

The relationship between *Staph.aureus* strains within the phylogenetic tree depending on *spa* gene Sequencing by using the Clustal W program within the Mega7 Molecular Evolutionary Genetics analysis program (mega 7.0) using UPGMA Unweighted pair group method with arithmetic mean show Clustering of 3 isolates within cluster A, all of them within the t480 pattern. Cluster B included two strains and with the pattern t975, and cluster C included three strains with the pattern 304t and strain D9 without pattern (nontyping) at cluster D and strain D10 with the pattern t386 at cluster E, while cluster F contains two isolates within the pattern t991.

The relationship between *Staph.aureus* strains within the phylogenetic tree depending on *eno* gene Sequencing show three strains G4, G5, G6 clustered with a percentage of similarity 100% in cluster A and two isolates G3, G1, each of them were associated with a percentage of 100% within cluster B and one isolate G2 in Cluster C, which was With a similarity rate (95%),Cluster A was associated with B at similarity rate 99.99%, and they were associated with Cluster C at 99.98%, which indicates their high genetic affinity.

University of Mosul

College of Science

Variations in virulence genes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

Noor Thaer Saleh Mohammed

M.Sc. Thesis

Biology /Microbiology

Supervised By

Prof. Dr. Esraa Ghanem Al-Sammak

1443 A.H. **2022 A.D.**