



البحر العلمي المادف دعمامة أساسية للضموض بالعراق



التحديد المظهري والجزيئي لبكتريا *Staphylococcus spp* المنتجة للهيموليسين ومقاومتها

للمضادات الحيوية

قناة محمود عطية ، علي انور احمد مصطفى

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

ali.a.mohammad4432@st.tu.edu.iq

drqanat@tu.edu.iq

الملخص

تضمنت الدراسة جمع 170 عينة ادرار وسطي من الاشخاص المصابين باخماج المسالك البولية من المرضى الراقدين والمراجعين لاستشارية مستشفى ابن سينا التعليمي ومستشفى الموصل العام في مدينة الموصل للفترة (2021/12/1 ولغاية 2022/3/30) لعزل انواع البكتريا المسببة لاجماج المسالك البولية والكشف عن قدرتهم على انتاج انزيم الهيموليسين مظهريا وجينياً اذ وجد ان 99 عينة (58.23%) اعطت نموا بكتريا و 13 عينة بنسبة (7.64%) اعطت نموا فطريا بينما كان 58 عينة (34.11%) كانت سالبة اذ كانت نسبة الاصابة باخماج المسالك البولية في الاناث اكثر من الذكور اذ كان اعداد الاناث المصابين 79 من اصل 100 عينة اما الذكور فكانت الاصابة 33 من اصل 70 عينة اذ كانت نسبة عزل البكتريا السالبة لصبغة كرام اعلى من البكتريا الموجبة اذ شملت العزلات *Escherichia coli* %30.36 *Pseudomonas aeruginosa* %6.25 *Kleibsellla pneumoniae* %2.6 *Proteus mirabilis* %1.7 *Cromobacterium violaceum* اما الانواع الموجبة لصبغة كرام فكانت *Staphylococcus.aureus* %13.39 *Staphylococcus.epidermide s* %8.93 *Staphylococcus.xylosus* وبنسبة %0.89 للانواع *Staphylococcus.lugdunensis* *Staphylococcus.auricularis* *Staphylococcus.simulans* *Staphylococcus.hominis* ، *Leuconostoc mesenteroides* وفيما يخص انتاج العزلات لانزيم الهيموليسين فقد ابدت 45 عزلة بكتيرية وبنسبة %45.45 قدرتها على انتاج انزيم الهيموليسين مظهريا وتم التحري عن جينات *hla*, *hnb*, *hld* جينيا باستخدام تقنية PCR في عزلات انواع المكورات العنقودية وبينت النتائج وجود جين *hla* في العزلات المنتخبة ماعدى نوع *Staphylococcus.lugdunensis* ووجود جين *hld* في كل الانواع المنتخبة عدى *Staphylococcus.epidermide* اما جين *hnb* فقد وجد فقط في عزلتان من *Staphylococcus.aureus* اما اختبار الحساسية للمضادات الحيوية فقد انتخبت 10 مضادات حيوية وتم تطبيقها على البكتريا التي تم انتخابها للكشف عن جيناتها الوراثية اذ ابدت مقاومة عالية للمضادات Oxacillin , Amoxicillin/clavulanic acid , Cefotaxime , ceftriaxone , Cefepime , و حساسية متفاوتة للمضاد vancomycin , methicillin .

الكلمات المفتاحية: Hemolysin , *Staphylococcus spp* , UTLs

المقدمة

الأطفال الصغار والولادات المبكرة ترتبط عدوة المسالك البولية عند النساء الحوامل بزيادة خطر الاصابة بأمراض والوفيات للام او الوليد حتى عندما تكون العدوى بدون اعراض ونشير الى ان هناك العديد من مسببات الأمراض البكتيرية مسؤولة عن عدوى المسالك البولية اهمها *Staphylococcus spp* و *Klebsiella spp* و *proteus spp* و *Enterococcus faecalis* و *E. coli* و *aeruginosa* تمتلك ممرضات المسالك البولية خصائص معينة ،

تُعرف اخماج المسالك البولية (UTIs) Urinary Tract Infections بالتغلغل الميكروبي في المسالك البولية المعقمة وهي واحدة من أكثر الالتهابات البكتيرية انتشارًا على مستوى العالم. وتشمل الالتهابات مجرى البول والمثانة والحالب والكلى وتعد سببًا مهمًا للأمراضية عند الاطفال الرضع وكبار السن من الرجال والنساء من جميع الأعمار ومن خلاله يتسبب في عواقب وخيمة تشمل العدوى المتكررة والتهابات الحوض والكلى مع تعفن الدم وتلف الكلى عند

عزل وتشخيص الانواع البكتيرية المسببة لالتهابات المسالك البولية Isolation and diagnosis of gram negative bacteria isolate from UTIs

تم زرع العينات على وسط اكار الدم Blood agar وكذلك على الاوساط الانتقائية والتقريبية للبكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ومنها وسط MacConkey agar وعلى وسط اكار المينيتول الملحي Manitol salt agar ووسط (EMB) Eosin methylene blue وحضنت الاوساط عند درجة حرارة 37 درجة مئوية ولمدة 24 ساعة ، وبعد ظهور نتائج الزرع تم اجراء الاختبارات الكيموحيوية والتي تشمل، اختبار تخمر السكريات،الثلاثي Triple sugar Iron ، واختبارات IMVIC ، والاكسيديز للبكتيريا السالبة وكذلك ، والكاتليز ، وتم تأكيد التشخيص البكتيري باستخدام نظام ViTEK 2 System ، وعدة API staph API 20E ، [6] ، [7].

اختبار الحساسية تجاه المضادات الحيوية Antibiotics Susceptibility Test

تم اجراء اختبار الحساسية للبكتيريا المعزولة تجاه المضادات الحيوية كما موضحة في جدول (1) وذلك باستخدام طريقة نشر الاقراص وكما جاء في [8]. وذلك عن طريق اخذت (3-5) مستعمرات بكتيرية فنية والتي تكون بعمر 24 ساعة وتم وضعها في انبوب معقم تحتوي على 5 مل من المحلول الملحي الفلجسي ومقارنة تعكر المحلول مع المحلول McFarland 0.5 ثم غمرت المسحة القطنية المعقمة في الانبوب الذي يحتوي على المعلق البكتيري ثم نشر هذا اللقاح على اطباق تحتوي على وسط اكار مولر-هنتون ، وبعد ذلك يترك لمدة 5 دقائق بعدها يتم وضع اقراص المضادات الحيوية على وسط اكار مولر-هنتون بواسطة ملقط المعقم وبعدها تحضن الاطباق لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية . وملاحظة التثبيت حول الاقراص بواسطة المسطرة المقاسة بوحدة المليمتر ، وتمت مقارنة النتائج الستاندرتات الموصي بها من قبل CLIS

جدول 1: المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة المجهزة من شركة Bioanalyse التركيبية

ت	اسم المضاد الحيوي	رمز المضاد	تركيز المضاد مايكرو غرام / قرص	حساس (ملم)	متوسط الحساسية (ملم)	مقاوم (ملم)
1	Amikacin	AK	10	>26	20-26	< 20
2	&Amoxicillin clavulanic acid	AMC	10/20	>35	27-35	< 27
3	Cefotaxime	CTX	30	>22	18-22	< 18
4	Ceftriaxone	CRO	10	>28	22-28	< 22
5	Cefepime	FEP	10	>32	26-32	< 26
6	Imipenem	IPM	10	>28	20-28	< 20
7	Levofloxacin	LEV	5	>28	22-28	< 22
8	Methicillin	ME	10	>34	30-34	< 30
9	Oxacillin	OX	5	>24	18-24	< 18
10	Piperacillin	PRL	100	>33	25-33	< 25
11	Rifampin	RA	5	>34	26-34	< 26
12	Tobramycin	TOP	10	>26	20-26	< 20
13	Vancomycin	VA	30	>21	17-21	< 17

مثل إنتاج المواد الرابطة والسموم التي تمكنها من استعمار وغزو المسالك البولية ، وتنتقل بين الأشخاص من خلال الاتصال الجنسي وربما من خلال الطعام أو الماء تؤدي عدوى المسالك البولية المتكررة وغير المعالجة تقود إلى مضاعفات خطيرة مثل تعفن المسالك البولية ارتفاع ضغط الدم المبكر ، إضعاف وظائف الكبيبات وأخيراً الفشل الكلوي لذلك ، فإن الاكتشاف المبكر للعدوى وعلاجها يمنع حدوث هذه المضاعفات [1] تتنوع مسببات أمراض الجهاز البولي ، فتعد بكتيريا العائلة المعوية واهمها (*E.coli*) وكذلك البكتيريا الموجبة لصبغة كرام واهمها (*Staphylococci spp*) من مسببات الأمراض الرئيسية الاحدث للاخماج المسالك البولي و في كل الفئات العمرية [2] وذلك لامتلاكها مجموعة من عوامل الضراوة التي تمكن البكتريا من غزو الجهاز البولي ومقاومة للمضادات الحيوية[3] وجد أن مجموعة كبيرة من الجينات التي تعود لعوامل الضراوة المرتبطة بالأمراضية موجودة في الكروموسوم البكتيري وتوصف بأنها جزر إمراضية (pathogenicity islands)=[4] إذ تم إجراء التحقيق في هذه الجينات عن طريق تقنية PCR المستخدمة للكشف عن جينات الضراوة باستخدام مادة أولية متخصصة ، والتي عن طريق تضخيم هذه الجينات ومن ثم تشفير لعوامل الضراوة المسببة للأمراضية[5] اذ هدفت هذه الرسالة الى عزل المسببات البكتيرية من عينات الادرار للمرضى المصابين بالتهاب المسالك البولية وتشخيصها بالاختبارات الزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية والكشف المظهري والجيني عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الهيموليسين في عزلات المكورات العنقودية المعزولة .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات Collection of samples

تم جمع 170 عينة من المرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى ابن سينا التعليمي ومستشفى الموصل العام وللفترة (2021/12/1) الى فترة 31-3-2022) حيث تم جمع 100 عينة ادرار من الاناث و70 عينة من الذكور ولمختلف الفئات العمرية.

polymerase chain reaction فحص تفاعلات سلسلة البلمرة
أجري فحص تفاعلات سلسلة البلمرة وذلك للتحري عن الجينات
الحالة للدم Hemolysin genes للبكتريا المعزولة من اخماج
المسالك البولية واهمها / *S. aureus* , *S. hemolyticus* ,
S. lugdunensis , *S. epidermidis* , *S. simulans* ,
S. auricularis , اذ تم استخدام عدة الاستخلاص الحامض النووي
DNA من قبل شركة Geneaid والبرنامج الخاص لكل جين كما
موضح في جدول رقم (2) وجدول رقم (3).

التحري عن انتاج انزيم الهيموليسين مظهرها وجزئيا
زرعت العزلات البكتيرية بطريقة التخطيط على وسط الكار الدم
المحضر مسبقا وحضن الوسط بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة
إذ كانت النتيجة موجبة بظهور هالة شفافة حول المستعمرة دليل على
امتلاك البكتريا انزيمات تحلل الدم أما في حالة عدم ظهور هالة حول
المستعمرة دليل على أن البكتريا لا تمتلك انزيمات تحلل الدم اذ
استخدمت للتحري عن انتاج انزيم الهيموليسين hemolysin من قبل
العزلات قيد الدراسة [9]

جدول 2: يوضح المواد المستخدمة في تفاعلات سلسلة البلمرة

مكوناتها	العدة المستخدمة
, GD Columns, Tube Collection W Buffer,GT Buffer,GB Buffer proteinase k, Lysozyme	عدة الاستخلاص DNA Genomic kit extraction
Taq Polymerase dNTP:(dATP,dGTP,dCTP,dTTP) MgCl2	Green master mix

جدول 3: البودائ المستخدمة في الدراسة

المصدر	Band size	Sequence primer	الجين	ت
Jarraud <i>etal.</i> , 2002	209	F CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG R CTTCCAGCCTACTTTTTATCAGT	HLA	1
Jarraud <i>etal.</i> , 2002	309	F GTGCACTTACTGACAATAGTGC R GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	HLB	2
Jarraud <i>etal.</i> , 2002	111	F AAGAATTTTATCTTAATTAAGGAAGGAGTG R TTAGTGAATTTGTTCACTGTGTCGA	HLD	3

كما تم قياس نقاوة وتركيز DNA وذلك باستخدام جهاز Nanodrop
spectrophotometer وتم ضبط تم ضبط تركيز DNA في كافة
عينات الدراسة بالتخفيف بواسطة محلول TE بفر للحصول على
التركيز المطلوب لأجراء تفاعلات الـ PCR وكان (50) نانوغرام
مايكروليتر لكل عينة.

جدول 4: الخطوات الرئيسية لبرنامج عمل PCR المستخدم قيد الدراسة

No.	Stage	Temperature	Time	Cycle number
.1	Initial denaturation المسخ الاولي	95	6 min.	1
.2	DNA Denaturation مسخ الدنا	95	45 sec.	35
.3	Annealing Primer ارتباط البادئ	(55°C) (58°C) (52°C)	1 min.	
.4	Primer Extension امتطالة	72	1 min.	1
.5	Final extension الامتطالة النهائية	72	5 min.	
.6	Hold مرحلة السيطرة	4°C	Forever	

النتائج والمناقشة
اظهرت نتائج الدراسة الحالية أن اعداد الإناث المصابين بالتهاب
المسالك البولية اكثر شيوعا بالمقارنة مع اعداد الذكور فجاءت نسبة
الاصابة في الإناث بنسبة (79%) وبقاوع 100 مريض مقارنة مع
اصابات الذكور التي كانت نسبتها (47%) وبقاوع 70 مريض وبينت
نتائج التحليل الاحصائي كما موضح في جدول (5).

جدول 5: اصابات المسالك البولية موزع عيناتها حسب الجنس

P-value	Pearson Chi-square	النسبة المئوية	الحالات الموجبة	العدد الكلي للعينات	الجنس
< 0.05	112	%47	33	70	الذكور
		%79	79	100	الإناث
		-	112	170	المجموع الكلي

باخماج المسالك البولية للفئة (31-40) و (41-50) 23% و 14.8% على التوالي

عزل و تشخيص البكتريا من المرضى المصابين باخماج المسالك البولية

كانت نتيجة زرع 170 عينة ادرار وسطي (100 الاناث و 70 ذكور) الى ظهور نمو جرثومي وان سبب تواجد النمو الجرثومي في هذه العينات الى عمر الاشخاص والجنس والحالة الاجتماعية والبيئة اما عينات الادرار التي لم يظهر فيها اي نمو جرثومي قد تكون الاصابات ناتجة عن بكتريا تحتاج الى اوساط غنية للنمو او قد تكون الاصابة فايروسية او بسبب اخذ المضادات الحيوية من قبل المريض ومن دون استشارة طبية [18] ولتحديد ان كان هناك فروق معنوية بين نسبة العينات التي ظهر فيها نمو جرثومي والعينات التي لم يظهر فيها نمو جرثومي قمنا باستخدام اختبار (Fisher's exact test) وكما موضح في جدول (6).

جدول 6: عدد العينات الموجبة النمو وسالبة النمو الجرثومي ونسبها

P-value	Fisher's exact test	النسبة المئوية	عدد العينات	نتائج الزرع
<0.05	6.12	66	112	عدد الحالات الموجبة
		34	58	عدد الحالات السالبة
		100	170	المجموع الكلي

ولقد اوضحت نتائج جدول(6) على وجود فروق معنوية بين العينات الموجبة والعينات السالبة وذلك استنادا الى القيمة الاحتمالية والتي بلغت (<0.05) اذ تقاربت نتائجنا مع دراسة [19] إذ كانت نسبة النمو الجرثومي 78.2% اما نسبة العينات التي لم يظهر فيها نمو كان 25.8% كما تقاربت نتائجنا مع نتائج دراسة [20] اذ كانت نسبة النمو الجرثومي 70.47% اما الدراسة التي اجراها [21] كانت مخالفة لدراستنا الحالية اذ كانت نسبة العينات السالبة اعلى من العينات الموجبة والتي بلغت 69.88% في حين كان نسبة النمو 30.12%.

اختبار حساسية ومقاومة العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام والمحللة للدم

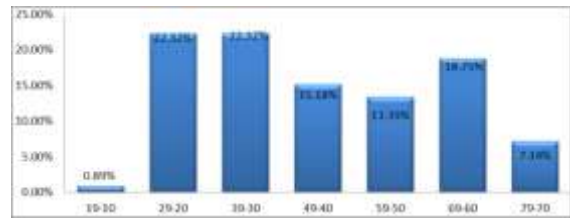
Sensitivity and resistance testing of Gram-positive and hemolytic bacterial isolates

اظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية للبكتريا الموجبة المعزولة من اخماج المسالك البولية إذ اظهرت بكتريا *S.aureus* حساسيتها للمضاد الحيوي Rifampin وللمضاد الحيوي Amikacin بنسبة 64.28% وكانت حساسيتها للمضاد الحيوي Levofloxacin 46.6% اما حساسيتها Vancomycin و Methicillin فكانت بنسبة 14.2% و 7.14% على التوالي وكذلك

اعطت مقاومة للمضادات الحيوية Amoxicillin/clavulanic (Cefotaxime, Oxacillin, Ceftriaxone, acid)

Cefepime وبنسبة عالية

يعود السبب إلى أن الإناث أكثر عرضة للإصابة بالتهاب المسالك البولية من الذكور الى قصر الاحليل لدى الاناث وقربه من فتحة الشرج مما يسهل انتقال الفلورا المعوية الى منطقة ما حول الاحليل واحداث الاصابة [10] وأن استخدام موانع الحمل وكذلك خلال فترة الحمل والولادة بسبب حدوث تغيرات هرمونية وخفض للمناعة مما يسهل حدوث اخماج المسالك البولي [11] تتفق نتائجنا مع ما توصل اليه [12] إذ أشاروا إلى أن التهاب المسالك البولية في الاناث أكثر عرضة من التهاب المسالك البولية في الذكور جاءت النتائج متقاربة مع نتائج دراسة [13] لأخماج المسالك البولية في مدينة الموصل/العراق ومنها ان اعداد الاصابة لدى الاناث اكثر من الذكور فبلغت نسبة الاصابة الاناث (74%) أما الذكور فكانت نسبة الاصابة (25%) كما اكد [14] في الدراسة التي أجريت في اوغندا إذ كانت نسبة الاصابة باخماج المسالك البولية لدى الإناث بنسبة 77% اعلى من اصابات اخماج المسالك البولية لدى الذكور التي كانت 23%. كما اظهرت مجموع الاصابات للفئات العمرية في دراستنا الحالية لمرضى المصابين بالتهابات المسالك البولية المرجعين لاستشارية مستشفى ابن سينا التعليمي ومستشفى الموصل العام في مدينة الموصل كما موضح في الشكل (1)



شكل 1: يوضح النسبة المئوية الفئات العمرية لمرضى المصابين باخماج المسالك البولية للذكور والإناث

حيث تقاربت نتائجنا مع نتائج مع دراسة [15] إذ كانت نسبة الاصابة بالأعمار (61-70) 23.62% إما الفئة العمرية (71-80) حيث كانت 6.03% جاءت نتائج الباحث [16] مطابقة مع دراستنا الحالية ضمن الفئة العمرية (31-40) سنة اذ ظهرت بنسبة 23% وكذلك بالنسبة للفئة العمرية (41-50) سنة كانت بنسبة 14.8% وهي مقاربة للدراسة الحالية كما اتفقت نتائجنا مع دراسة [14] حيث كانت اقل نسبة للإصابة بالتهابات المسالك البولية عند الفئة العمرية (19-10) سنة حيث بلغت 1.2% ويعمل سبب زيادة الاصابة الاشخاص الذين تزيد اعمارهم عن 20 عام هو التغير الهرموني و زيادة النشاط الجنسي. كما تقاربت نتائجنا مع دراسة [13] اذ كانت اعلى نسبة اصابة الالتهاب المسالك البولية في الفئة (15-28) سنة اذ كانت 34.63% واقل نسبة اصابة للفئة (14-1) سنة كما تقاربت نتائجنا مع نتائج الباحث [17] في الدراسة التي اجراها اذ كانت أكثر نسبة الاصابة باخماج المسالك البولية للفئة (21-30) سنة وبنسبة 58.4% كما تقاربت نتائجنا مع نتائج دراسة [16] التي اجريت في مدينة الموصل /مستشفى السلام التعليمي اذ كانت نسبة الاصابة

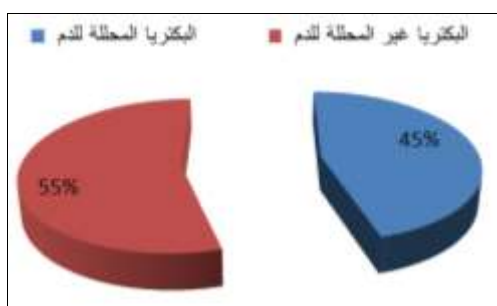
Amikacin وVancomycin ومتوسط الحساسية للمضاد الحيوي Amikacin اما بكتريا *S. hominis* و بكتريا *S. lugdunensis* فكانت ذات حساسة عالية للمضاد الحيوي Amikacin, Rifampin, Methicillin, ومتوسط الحساسية للمضاد الحيوي Vancomycin بالنسبة لبكتريا *S. lugdunensis* كما انها كانت حساسة لمضاد Levofloxacin اما بكتريا *S. hominis* فكانت مقاومة له. ان تطابقت نتائجنا مع نتائج [25] اذ كانت بكتريا *S. hominis* مقاومة للمضادات الحيوية Amoxicillin/clavulanic acid واختلفت في حساسيتها للمضادات الحيوية الاخرى.

كما جاءت نتائجنا مطابقة لنتائج [26] لبكتريا *lugdunensi* حيث كانت نسبة حساسية للمضاد Levofloxacin عالية ومقاومتها لبقية المضادات الحيوية اما بكتريا *S. simulans* فجاءت نسبتها مطابقة لما ذكره الدراسة [27] اذ كانت حساسية للمضادات Rifampin وVancomycin عالية ومقاومة للمضاد Levofloxacin على الرغم من ندرت هذه الانواع البكتيرية الا انها تسبب اصابات مختلفة كالتهاب شغاف القلب وتجرثم الدم والتهاب المسالك البولية.

الكشف عن انتاج الهيموليسين مظهرها ووراثيا

Genetic and phenotypic detection of hemolysin production

تم الكشف عن قابلية البكتريا المعزولة من اخماج المسالك البولية وقدرتها على انتاج انزيم الهيموليسين في اطباق اكار الدم الحاوية على فصائل الدم البشري وقد تبين من خلال دراستنا للعينات المعزولة من الاشخاص المصابين باخماج المسالك البولية بان 45 عزلة بكتيرية (45.45%) من المجموع الكلي للعزلات البكتيرية التي تم تشخيصها وبالبالغ عددها 99 عزلة بكتيرية كما موضح في شكل (2) لها القدرة على انتاج انزيم الهيموليسين وتحليل الدم ويظهر ذلك مظهرها من خلال تكوين هالة حول المستعمرة



شكل 2: اعداد ونسب العزلات البكتيرية موزعة حسب قدرتها على تحليل الدم

ابدت العزلات البكتيرية المنتجة لأنزيم الهيموليسين مظهرها على اطباق اكار الدم المحضرة وبالبالغ عددها 45 عزلة بكتيرية اذ كان انتاج كل من بكتريا *Staph.aureus* و *Staph.Haemolyticus* و *Staph.xylosus* و *Staph.simulans* و *Staph.lugdunensis* و *Staph.Hominis* و *Staphylococcus auricularis* و *Enterococcus* و *Leuconostoc mesenteroides spp*

وجاءت نتائجنا مقارنة لدراسة [22] اذ كانت حساسية البكتريا للمضاد الحيوي Rifampin بنسبة 80.6% ولكن تختلف من حيث المضاد الحيوي Oxacillin, Vancomycin اذ كانت حساسة البكتريا للمضادات الحيوية بنسبة 100% و 55.6% على التوالي كما تطابقت نتائجنا مع نتائج دراسة [16] اذ اعطت هذه البكتريا مقاومة عالية تجاه المضاد الحيوي Amoxicillin/clavulanic acid و cefotaxime اذ كانت بنسبة 76.1% و 71.4% على التوالي كما اختلفت في اعطاء مقاومة تجاه المضاد الحيوي Vancomycin بنسبة 23.8% كما اتفقت مع بعض الدراسات واختلفت في بعض الاخر عند دراسة مدى حساسية البكتريا لبعض المضادات ومنها دراسة [23] كما أظهرت بكتريا *S. Haemolyticus* حساسية للمضادات الحيوية (Levofloxacin, Amikacin) بنسبة 90% اذ جاء بالمرتبة الثانية المضاد الحيوي Rifampin بنسبة 80% اما المضاد الحيوي Vancomycin, Methicillin فكانتا بنسبة 40%, 20% على التوالي ولاكنها اعطيت مقاومة للمضادات الحيوية (Ceftriaxone, Cefotaxime, Amoxicillin/clavulanic acid, Cefepime Oxacillin) بنسبة 100%

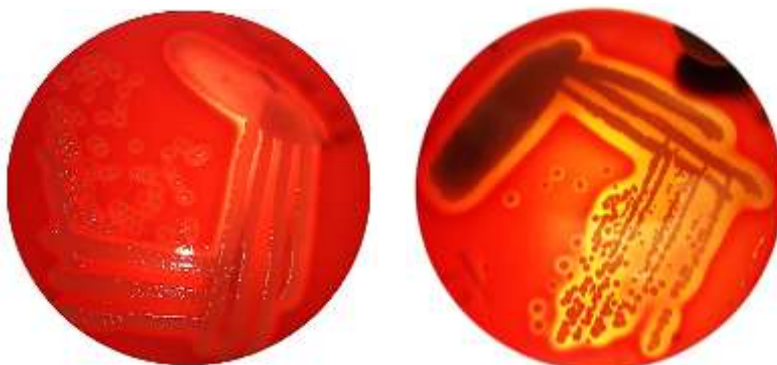
اذ جاءت نتائجنا مقارنة مع دراسة [24] اذ اظهرت البكتريا مقاومة عالية للمضاد الحيوي Amoxicillin/clavulanic ولكن اظهرت حساسية للمضادات الحيوية Levofloxacin و Amikacin اذ كان بنسبة 73.08% و 84.61% على التوالي واختلفت مع نتائجنا في المضاد الحيوي Ceftriaxone اذ كانت نسبة حساسيته 80.76%.

وفيما يخص بكتريا *S.xylosus* فقد اظهرت حساسة للمضادات الحيوية Levofloxacin, Rifampin, Methicillin, Amikacin, Vancomycin وبنسبة 33.3% اما المضادات الحيوية (Cefepime, Cefotaxime, Oxacillin, Ceftriaxone, Amoxicillin/clavulanic acid) فكانت مقاومة لها اذ تقارب مع دراسة [25] التي اجريت في مستشفى جامعة نيجيريا التعليمي في دولة نيجيريا اذ كانت اعلى متوسط حساسية للمضاد الحيوي Levofloxacin بنسبة 69.7% كما تقاربت نتائجنا [5] في الدراسة التي اجريت في مستشفى تكريت اذ كانت نسبة حساسيتها 39% Amikacin للمضاد الحيوي اما البكتريا السالبة لانزيم التجلط ذات النسب الاقل في دراستنا الحالية والتي تشمل كل من *S. Hominis*, *S. lugdunensis*, *S. simulans*, *S. auricularis* اذ كانت نسبة حساسية بكتريا

S.epidermidis للمضاد الحيوي Amikacin عالية ومتوسط الحساسية للمضاد الحيوي Cefepime Levofloxacin. هذه النتيجة جاءت مقارنة لدراسة [13] اذ كانت نسبة 69.7% للمضاد الحيوي Levofloxacin بنسبة 88.9% للمضاد الحيوي Amoxicillin/clavulanic acid واختلقه معه في نتائج المضاد الحيوي Amoxicillin/clavulanic acid اذ كانت حساسة للمضاد بنسبة 88.9% اما بكتريا *S.simulans* فكانت حساسة للمضادات الحيوية Rifampin,

من خلال ظهور هالة شفافة حول المستعمرة كما موضح في صورة (1).

Pseudomonas و *Cromobacterium violaceum* *faecalis* *aerugenosa* بنسبة 100% اما بكتريا *Staph. Epidermides* فقد كانت بكتريا واحدة فقط منتجة للانزيم وبنسبة 9% اذ لوحظ ذلك



صورة 1. تحلل الدم من نوع B-Hemolysin على وسط Blood agar

(2) وعلى جين *hla* المشفر لانتاج beta- hemolysin وبناتج تفاعلي 309 bp كما في صورة (3) وتم التحري على جين *hld* وكان الناتج التفاعلي له 111bp كما في صورة (4) ابدت نتائج تضخيم البادئات احتواء جميع عزلات بكتريا *S. aureus* على جين المشفر لانتاج الهيموليسين *hla* بنسبة عالية وبنسبة 50% من العزلات البكتيرية الحاوية على جين *hla* اما بالنسبة لجين *hld* فقد احتوت جميع العزلات البكتيرية على جين *hld* عدى بكتريا *S. epidermides*.

اذ ان لهذه الجينات دور مهم في امراضه *S. aureus* اذ يعد جين *hla* من عوامل الفوعة الرئيسية في الامراضية فينشيط ضد مجموعة من خلايا المضيف بما في ذلك كريات الدم الحمراء [33] ويكون هذا النوع من السموم مترافق في الحالات شديدة الامراضية عند الاشخاص المصابين بالتهاب المسالك البولية [34].

جاءت نتائجنا مقارنة لما حصل عليه الباحث [34] فبلغت نسبة وجود جين *hla* في بكتريا *S. aureus* 81.18% , اما جين *hld* فقد اتفقت نتائجنا مع نتائج الباحث [35] في الدراسة التي اجريت في ايران إذ شكل نسبة 40% , كما وأظهرت نتائج [36] نسبة تواجد جين *hla* 42.60%.

ولم تتفق نتائجنا مع نتائج الباحث [34] اذ كانت نسبة تواجد جين *hld* 18.18% اما بالنسبة لجين *hld* فقد اتفقت نتائجنا مع الباحث [24] اذ ان جميع عزلات بكتريا *Staph. aureus* كانت منتجة لهذا الانزيم اذ يتم انتاج *delta*-haemolysin في المراحل الالسية المتأخرة [24]

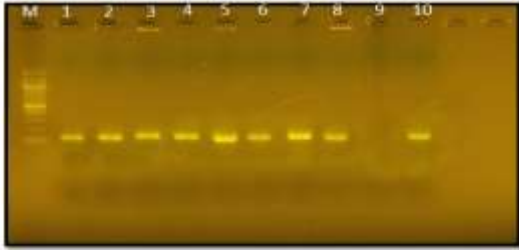
تطابقت نتائجنا مع نتائج الباحث [28] في الدراسة التي اجريت في مستشفى الرمادي التعليمي في محافظة الانبار/العراق إذ ان جميع عزلات بكتريا *Staph. aureus* والبكتريا غير المنتجة لانزيم التجلط اظهرت تحلل للدم بنسبة 100% ومن نوع B- haemolysis عدا بكتريا *Staph. Epidermides* اذ كانت جميع العزلات غير محللة للدم في دراسته كما تطابقت مع ماتوصل اليه الشمري (2014) اذ وجد ان العزلات التابعة لبكتريا *Staph. aureus* و *Staph. haemolyticus* قد حللت الدم وبنسبة 100%. كما تطابقت نتائجنا مع نتائج الدراسة [29] التي وضحت عن قابلية بكتريا *S. epidermides* على انتاج انزيم الهيموليسين كما تطابقت نتائجنا مع نتائج الدراسة [30] اذ ان باستطاعة بكتريا *S. Haemolyticus* و *S. Hominis* و *S. simulans* على انتاج انزيمات تحلل الدم وبنسبة 23% و 20% و 18% على التوالي اما بكتريا *S. xylosus* فقد تطابقت نتائجنا مع نتائج الباحث [31] في الدراسة التي اجريت في نيجيريا اذ كانت قدرة البكتريا على تحلل الدم بنسبة 50% اما بالنسبة لبكتريا *S. auricularis* فقد كانت منتجة لانزيم الهيموليسين بنسبة 100% اذ تم عزلها من قبل الباحث [32] من خراجات وكانت منتجة لانزيم الهيموليسين وامتلاكها جينات تحلل الدم

نواتج تفاعلات PCR للكشف عن الجينات المسؤولة عن انتاج الهيموليسين التابعة لجنس *Staphylococcus spp*

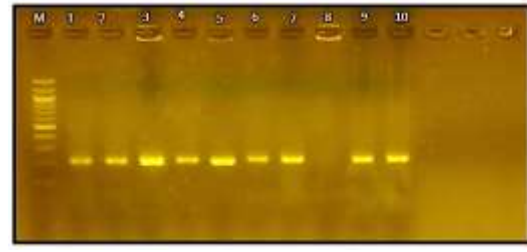
اظهرت نتائج تضخم البادئات احتواء بكتريا *staphylococcus spp* على جينات المشفرة لإنتاج انزيم الهيموليسين ومنها جين *hla* المشفر لا نتاج *Alph*- hemolysin وبناتج تفاعلي 209bp كما في صورة

جدول 7: يوضح التحري عن الجينات المسؤولة عن انتاج انزيم الهيموليسين في بكتريا *Staphylococcus spp*

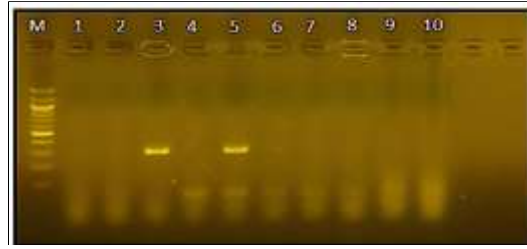
تسلسل العينات	جينات تحلل الدم	hla	hlb	hld
1	<i>S.haemolyticus</i>	Presence	Absent	Presence
2	<i>S.haemolyticus</i>	Presence	Absent	Presence
3	<i>S. aureus</i>	Presence	Presence	Presence
4	<i>S. aureus</i>	Presence	Absent	Presence
5	<i>S. aureus</i>	Presence	Presence	Presence
6	<i>S. aureus</i>	Presence	Absent	Presence
7	<i>S.auriculari</i>	Presence	Absent	Absent
8	<i>S.lugdunensis</i>	Absent	Absent	Presence
9	<i>S.epidermidis</i>	Presence	Absent	Absent
10	<i>S.simulans</i>	Presence	Absent	Presence



صورة 4: الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% ناتج تفاعل الـ PCR للجين Delta-hemolysin (hld) بناتج تفاعل bp111



صورة 2: الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% اذ ظهرت ناتج تفاعل الـ PCR للجين Alpha-hemolysin (hla) بناتج تفاعل bp209



صورة 3: الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% ناتج تفاعل الـ PCR للجين Beta-hemolysin (hla) بناتج تفاعل bp111

المصادر

- [1] Azab,K.(2021). Prevalence and relation of urinary tract infection bacterial pathogens to sex and ages among patients in three arab countries. Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences, 63(1), 194-206
- [2] Farid, A.; Naz, I.; Ashraf, A.; Ali, A.; Rehman, A.; Yasra Sarwar, Y. and Haque, A. (2015). Molecular Detection of Anti-Microbial Resistance in Local Isolates of *Staphylococcus epidermidis* From Urinary Tract Infecyions in Faisalabad Region of Pakistan. EXCLI. J., 14:697-705.
- [3] Jawetze, E.; Brooks, G.; Butel, J. and Morse, S. (2004). Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 21sted. Appleton and Lange. California. USA
- [4] Carroll, K.C.; Hobden, J.A.; Miller, S.; Morse, S.A.; Mietzner, T.A.; Detrick, B.; Mitchell, T.G.; McKerrow, J.M. and Sakanari, J.A. (2016). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 27th ed. Mc Graw- Hill. New York.
- [5] Jordivila, Karine, S.; Joaquin, R.; Horcajada, J. P.; Velasco, M.; Barraanco, M.; Moreno, A. and Mensa, J. (2004). Are- Quinolone resistant uropathogenic

- Escherichia coli* less virulent. J. infect. Dis., 186: 1039-1042.
- [6] Granato, P.a.; Morton, V. and Morello, J. A. (2019). Laboratory manual and workbook in Microbiology Application to patient care. McGraw-Hill Education, New York, USA
- [7] Chesca, A. E., Abdulina, G. G., Medetova, A. A., Kabduova, A. K., Beysembayeva, G. G., Moraru, D. D., & Sandle, T. S. (2022). Opportunistic Pathogens in Patients with Urinary Tract Infection
- [8] Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Piot, P., Heuck, C. C., Rohner, P., & Heuck, C. C. (2003). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization.
- [9] Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2007). Diagnostic microbiology (pp. 288-302). St Louis: Mosby.
- [10] Salvatore, S.; Cattoni, E.; Siesto, G.; Serati, M.; Sorice, P. and Torella, M. (2011). Urinary tract infections in women. European journal of obstetrics, gynecology and reproductive biology., 156(2):131- 136.

- [11] Dielubanza, E.J. and Schaeffer, A.J.(2011). Urinary tract infections in women. *The Medical clinics of North America.*, 95(1):27– 41
- [12] Gajdacs, M., Ábrók, M., Lázár, A., & Burián, K. (2019). Comparative epidemiology and resistance trends of common urinary pathogens in a tertiary-care hospital: a 10-year surveillance study. *Medicina*, 55(7), 356.
- [13] -Abdulwahhab, M. A., & Atiyea, Q. M. (2021). Isolation and Diagnosis of Escherichia Coli Causing Urinary Tract Infections from People of Different Ages in Mosul City. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 7017-7025.
- [14]-Martin, O.; Adamu, A. A.; Julius, T.; Josephat, N. M.; Eddie, W.; Charles, D. K.; Ezera, A. and Joel, B. (2019). Prevalence of Bacterial Urinary Tract Infections and Associated Factors among Patients Attending Hospitals in Bushenyi District, Uganda. *Hindawi International Journal of Microbiology*, 10: 1-8.
- [15]- Zubair, K. U., Shah, A. H., Fawwad, A., Sabir, R., & Butt, A. (2019). Frequency of urinary tract infection and antibiotic sensitivity of uropathogens in patients with diabetes. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 35(6), 1664
- [16] Ismael, L. A., Aubaid, S. H., & Nasir, H. M. (2022). Estimating the Level of Interleukin-22 in Sera of Patients with Uropathogenic Escherichia coli Infection in Mosul City. *Rafidain journal of science*, 31(2E).
- [17] Almkhtar, S. H. (2019). Urinary Tract Infection Among Women Aged (18-40) Years Old in Kirkuk City, Iraq. *The Open Nursing Journal*, 15: 1-8.
- [18] Al-Douri, A.Y.M. (2011). Diagnostic and Genetic study of the bacteria causing urinary tract infections in patients in tikrit city. ph. D. thesis. college of education. University of Tikrit
- [19] Elamary, R. B.; Albarakaty, F. M. and Salem, W. M. (2020). Efcacy of Acacia nilotica aqueous extract in treating bioflm forming and multidrug resistant uropathogens isolated from patients with UTI syndrome. *Scientific Reports*, 10(1): 1-14.
- [20] Ke, H.; Yun, H.; Jun-Cheng, S.; Yun-Qing, Z. and Xiao-Ming, M. (2018). Prevalence, risk factors and microorganisms of urinary tract infections in patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective study in China. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 14, 403–408
- [21] Vranic, S M; Zatric, N. and Vic, A. (2017). The Most Frequent Isolates from Out patients with Urinary Tract Infection. *Mater Sectioned*, 29(1):17- 20.
- [22] Moosavian, M.; Shoja, S.; Rostami, S.; Tdrabipour, M. and Farshadzadeh, Z. (2016). Identification of erm and msr A genes in inducible clindamycin resistance of clinical isolates of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction and D-test in Iran. *Int. J. Infect. Dis.*, 45(1):421-427
- [23] Gitau, W., Masika, M., Musyoki, M., Museve, B., & Mutwiri, T. (2018). Antimicrobial susceptibility pattern of Staphylococcus aureus isolates from clinical specimens at Kenyatta National Hospital. *BMC research notes*, 11(1), 1-5.
- [24] Sarker, S. (2021). Molecular Characterization and Antibioqram Profiling of Multidrug Resistant Staphylococcus haemolyticus Isolated from Patients with Urinary Tract Infection in Bangladesh
- [25] Onyebueke, E. A., Onyemelukwe, N. F., & Oladeji, D. S. (2019). Antibiotic susceptibility pattern of Staphylococcus species implicated in urinary tract infection in Enugu State, Nigeria. *PharmacologyOnline*, 1, 166-176
- [26] Luty, R. S., Fadil, A. G., Najm, J. M., Abduljabbar, H. H., & Kashmar, S. A. A. (2020). Uropathogens antibiotic susceptibility as an indicator for the empirical therapy used for urinary tract infections: a retrospective observational study. *Iranian Journal of Microbiology*, 12(5), 395.
- [27] Drobeniuc, A., Traenkner, J., Rebolledo, P. A., Ghazaryan, V., & Roupael, N. (2021). Staphylococcus simulans: A rare uropathogen. *IDCases*, 25, e01202.
- [28] Ghafoor, R. T. A., & Yassin, H. A. L. Study Of Some Virulence Factors And Virulence Genes Produced By Gram (+ Ve) And Gram (-Ve) Cocci Isolated From Clinical Samples In Al-Anbar Province/Iraq. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 7(09), 2020.
- [29] Szemraj, M., Grazul, M., Balcerczak, E., & Szewczyk, E. M. (2020). Staphylococcal species less frequently isolated from human clinical specimens-are they a threat for hospital patients?. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 1-10.
- [30] Azih, A., & Enabulele, I. (2013). Species distribution and virulence factors of coagulase negative Staphylococci isolated from clinical samples from the University of Benin Teaching hospital, Edo State, Nigeria. *J. Nat. Sci. Res*, 3(9), 38-44.
- [31] Kahalid, S. W., Salah, R. F., & Alshkargy, O. (2012). Physiobacteriological study of urinary tract infections of diabetic patients Type II. *Al-Qadisiyah Journal of pure science*, 17(2).
- [32] Divyakolu, S., Chikkala, R., Ratnakar, K. S., & Sriharan, V. (2019). Hemolysins of Staphylococcus aureus —An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy. *Advances in Infectious Diseases*, 9(2), 80-104.
- [33] Berube, B.J. and Wardenburg, B. J. (2013). Staphylococcus aureus alpha-Toxin: Nearly a Century of Intrigue. *Toxins (Basel)*, 5: 1140–1166.
- [34] Ariyanti, D.; Isrina, S.; Salasia, O. and Toto, S.F. (2011). Characterization of hemolysin of Staphylococcus aureus isolated from food of animal origin. *J. Bio.*, 16(1):32-37.
- [35] Moraveji, Z.; Tabatabaei, M.; Shirzad Aski, H. and Khoshbakht, R.(2014). Characterization of hemolysins of Staphylococcus strains isolated from human and bovine, southern Iran. *J. Iranian of Veterinary Res, Shiraz University.*, 15(4): 326-330.
- [36] Fei, W.; Hongjun, Y.; Bin, H.; Changfa, W.; Yundong, G.; Qifeng, Z.; Xiaohong, W. and Yanjun, Z.(2011). Study on the hemolysin phenotype and genotype distribution of Staphylococcus aureus caused bovine mastitis in shandong dairy farms. *J. Int. Appl Res Vet Med* ., 9(4):416-421.

Phenotypic and molecular determination of hemolysin-producing *Staphylococcus* spp and its resistance for antibiotics

Qanat Mahmoud Attia , Ali Anwar Ahmed Al-Qazzaz

Abstract

The study included the collection of 170 median urine samples from patients with urinary tract infections from patients who attended the Ibn Sina Teaching Hospital and Mosul General Hospital in the city of Mosul for the period (1/12/2021 until 30/3/2022) to isolate and detect the types of bacteria that cause urinary tract infections. On their ability to produce the enzyme hemolysin, both phenotypically and genetically It was found that 99 samples (58.23%) gave bacterial growth and 13 samples (7.64%) gave fungal growth while 58 samples (34.11%) were negative, as the percentage of urinary tract infections in females was to males, as the number of infected females was 79. Out of 100 samples, as for males, the infection was 33 out of 70 samples, as the percentage of isolates of Gram-negative bacteria was higher than that of Gram-positive bacteria, as the isolates were included 30.36% *Escherichia coli* 7.14% *Pseudomonas aeruginosa* 6.25% *Kleibsellla pneumoniae* 2.6% *Proteus mirabilis* 1.7% *Cromobacterium violaceum* As for the gram-positive species, they were 13.39% *Staphylococcus.aureus*, 8.93% *s Staphylococcus.epidermide*, 2.68% *Staphylococcus.xylosus*, and 0.89% for *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus lugdunensis* , *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus.simulans* , *Leuconostoc mesenteroides* , *Staphylococcus hominis* With regard to the production of hemolysin enzyme isolates, 45 bacterial isolates with a percentage of 45.45% showed their ability to produce hemolysin enzyme phenotypically. The *hla*, *hly* and *hly* genes were genetically investigated using PCR technique in isolates of staphylococcal species, and the results showed the presence of the *hla* gene in the selected isolates except for the type *Staphylococcus.lugdunensis*. The presence of the *hly* gene in all the selected species except for *Staphylococcus. epidermide*, while the *hly* gene was found only in two isolates of *Staphylococcus.aureus*. As for the antibiotic sensitivity test, 10 antibiotics were selected and applied to the bacteria that were selected to reveal their genetic genes, as they showed high resistance to the antibiotics Cefotaxime ,Ceftriaxone ,Cefepime, Oxacillin, Amoxicillin/clavulanic'acid . High sensitivity to the antibiotics Levofloxacin, Amikacin, Rifampin and with varying resistance and sensitivity to the vancomycin, methicillin.