*عزل عاثيات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين وأمكانية استخدامها في العلاج الحيوي ضد مضيفها

تاريخ الاستلام 2014/5/20 تاريخ القبول 2014/7/13

زياد متعب فجة الخزاعي
جامعة القادسية ــ كلية طب الاسنان

هند فائق عبد الامير
جامعة القادسية- قسم علوم الحياة- كلية التربية*
Hind6658@gmail.com

الخلاصة Summary :

تضمنت هذه الدراسة جمع (100) عينة من حالات سريرية مختلفة لمرضى من أعمار مختلفة ، راجعوا مستشفى الديوانية التعليمي العام للفترة من تشرين الثاني 2012 الى شباط 2013 للتحري عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة لمضاد المثيسيلين . وقد شخصت 50 عزلة من *S.aureus* تضمنت18 عزلة مصدرها الحروق و 11 عزلة من الخراجات و 18 عزلة من الجروح و 2 عزلة من الإدرار و عزلة واحدة من الأذن .

اختبرت حساسية العزلات تجاه 16 مضاداً حيوياً، جميع العزلات كانت مقاومة لمضادات Penicillin G و Ampicillin و Amoxicillin Clavulinic acid وبنسبة (100%) ، بينما كانت المقاومة لمضادات Ceftriaxone و Cefotaxime و Cephalothin بنسب (77.2%) و (72.7%) و (74.2%)على التوالي ، في حين كانت المقاومة لمضاد Erythromycin بنسبة (69.6%) ، اما المقاومة للمضادين Gentamicin و Amikacin فكانت بنسب (53%) و (48.4%) على التوالي ، بينما انخفضت المقاومة لمضادات Clindamycin و Tetracyclin و Chloramphenicol الى (48.4%) و (37.8%) و (34.8%)على التوالي ، اما المقاومة لمضادات Ciprofloxacin و Imipenem و Meropenem كانت منخفضة جداً إذ بلغت (1.5%) و (3.0%) و (21.2%)على التوالي ، بينما كانت جميع العزلات حساسة لمضاد Vancomycin بنسبة (100%).

تم التحري عن بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة لمضاد المثيسيلين Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) في جميع عزلات *S. aureus* البالغة (50) عزلة وأظهرت 30 عزلة نتيجة موجبة بأستخدام وسط CHROMagar MRSA .

خلال هذه الدراسة تم عزل أنواع مختلفة من العاثيات بالاعتماد على الاختلاف في شكل وقطر الثغرة من مجموع 100 عينه من مياه المجاري ودرست خصائصه المختلفة .

إستطاعت جزيئات العاثي البكتيري القدرة على الادمصاص في وقت بلغ أقصاه بين 3-5 دقيقة وتمتلك فترة سكون حوالي7.5 ± o.5 دقيقة ، أن جزيئات العاثي كانت ذات فعالية عالية عند اختبارها في حل الخلايا البكتيرية ، وان الفعالية بلغت أقصاها بحدود الساعتين من مزج جزيئات العاثي مع المزروع البكتيري بينما كان زمن التحلل الكلي 5 ساعات . بينت البيانات المحسوبة أن حجم التفجر كان حوالي 125 ± 18(جزيئة عاثي /خلية) في زمن يقدر 30±5 دقيقة . كما أظهرت النتائج بان عزلا ت بكتريا ال MRSA المعزولة من مياه المجاري كانت أكثر حساسية للإصابة بالعاثي من العزلات المعزولة من الحالات السريرية . أن فعالية جزيئات العاثي بلغت اعلى مستوى للفعالية في الوسط المتعادل بين 6.5 و 8.5 وبعد الأس الهيدروجيني 9 تبدأ هذه الفعالية بالانخفاض . كما أن فعالية جزيئات العاثي لم تتغير كثيراً عندما تكون درجات الحرارة بحدود 45 م° في حين لوحظ انخفاض طردي متزايد في هذه الفعالية عندما تم حضن العاثيات بدرجات حرارة 50م° و60م° وبلغ اكبر تاثير على فعالية العاثيات عند درجة حرارة 70م° وكانت نقطة نهاية فعالية العاثي في درجة حرارة 70م° بعد 8-10 دقيقة . اقل معيار لجزيئات العاثي ظهر في مدة حضانة 6 ساعات وازداد هذا المعيار بزيادة درجات الحرارة وصولاً للدرجات المثلى .

أظهرت نتائج استخلاص الحامض النووي انه من نوع DNA وظهر بشكل حزمة واحدة اي انه كروموسوم مفرد غير مقسم وزنه الجزيئي (300 دالتون).

كلمات مفتاحية
العاثيات ، المثيسيلين ، الادمصاص ، فايروسات

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

المقدمة :

تعد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) مشكلة صحية كبيرة و متزايدة في كل أنحاء العالم لتسببها بالعديد من ألاخماج المرتبطة بالمستشفيات و خاصة بوحدات العناية المركزة و وحدات الحروق فضلا على ردهات الولادة (1). يعود ذلك إلى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة Virulance factors ألتي تمكنها من اختراق حواجز الجسم الطبيعية و قوى الدفاع المناعية و الانتشار إلى أنسجة الجسم المختلفة و من هذه العوامل الأنزيمات،الذيفانات،البروتينات السطحية ومكونات الجدار الخلوي (2). و بذلك فهي تعد أكبر مسبب للعدوى المكتسبة داخل المستشفيات Nosocomial infection التي أصبحت في تزايد مستمر بسبب مقاومة بكتريا الـ MRSA لكل أصناف المضادات الحيوية المعروفة (3).

إن الإصابة بالكائنات الممرضة ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ساهم في ارتفاع معدل الوفيات مقارنة بالسلالات الحساسة ، اذ ارتفعت تلك المعدلات في مختلف بلدان العالم و بنسب كبيرة و متفاوته (4) . و تعد بكتريا الـ MRSA من الممرضات الانتهازية Opportunistic pathogen التي لها قدرة كبيرة على إحداث اخماجاً تتفاوت بين اخماج الجلد البسيطة نسبيا إلى الأمراض الجهازية المهددة للحياة Life - threatining systemic illness (5). عند توفر الظروف الملائمة لها مثل وجود انخفاض في آليات الدفاع المناعية للجسم ، إصابات الجلد كالحروق والجروح، الإصابة بكائنات مرضية أخرى كالفيروسات أو وجود أمراض مزمنة كالسرطانات (6). و إن مرضى المستشفى المصابين ببكتريا الـ MRSA يكونوا معرضين للموت بمقدار أربع مرات و أن مدة إقامتهم بالمستشفى تكون أكثر بمقدار مرتين و نصف مقارنة مع المرضى غير المصابين ببكتريا الـ MRSA (7). و إن ارتفاع معدل الإصابة ببكتريا الـ MRSA خلال السنوات الأخيرة يعود إلى انتقالها من مريض لآخر من خلال أيدي الكادر الصحي و العاملين في المستشفيات و مراكز الرعاية الصحية (8). إذ بينت إحدى الدراسات أن 50% من العاملين في المستشفيات حاملين لبكتريا الـ MRSA (9).

الفايروسات البكتيرية تتخصص لاصابة بكتريا محددة ، وهي إجبارية التطفل ، تتضاعف داخل الخلايا البكتيرية وهي بذلك تشكل ظغطاً بيئياً و وراثياً على هذه البكتريا ، يتكون جسم العاثي من الحمض النووي الرايبيRNA ، ويكون محاطاً بطبقة البروتين او البروتين الدهني الذي يحمي الحامض النووي (10).هذه الجسيمات الفايروسية يمكن ان توجد في المصادر الطبيعية مثل الماء، التربة والهواء .(13,12,11) . ان العاثيات تقتل بين 4-50% من البكتريا المنتجة لها كل يوم .ولها خصوصية عالية لسلالات بكتيرية محددة(1614 ,15 ,) . يعد استخدام العلاج بالعاثيات نهجاً بديلاً ضد الكثير من الأمراض وحققت نتائج جيدة مثل أمراض الزحار وأمراض التيفوئيد وأمراض الكوليرا و اخماج القناة البولية وحالات الحروق إذ تم فيها استخدام العاثيات إما بوضعها مباشرةً على موقع الأذى أو بأعطائها عن طريق الفم أو عن طريق الرش (17).

و بالنظر لأهمية بكتريا ال MRSA في إحداث إصابات مختلفة من الجسم ، وصعوبة علاجها والسيطرة عليها باستخدام المضادات الحياتية ، فقد هدفت الدراسة الحالية الى عزل عاثيات بكتريا ال MRSA و إمكانية استخدامها للسيطرة على هذه البكتريا من خلال المحاور التالية :

1- عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين ودراسة حساسيتها للعديد من المضادات الحيوية المختلفة .
2- عزل ووصف Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phages (MRSA) ودراسة حركيات وثباتية العاثي وتحديد طبيعة الحامض النووي له .

المواد وطرائق العمل :

جمع العينات Samples collection

جمعت 100 عينة من مستشفى الديوانية التعليمي العام في مدينة الديوانية للمدة من تشرين الثاني 2012 إلى شباط 2013 ، حيث شملت الدراسة عينات سريرية مختلفة ، تم جمعها من مناطق مختلفة من الجسم للمرضى الراقدين ولجميع الأعمار ولكلا الجنسين ، أذ أخذت العينات من

الإدرار والأذن والخراج والجروح والحروق بواسطة مسحات قطنية معقمة . فيما يخص عينات الادرار والبراز فقد تم جمع العينات في قناني بلاستكية معقمة .

العزل والتشخيص Isolation and identification

نقلت المسحات والعينات مباشرة إلى المختبر ، وتم زرعها في وسط الدم الصلب ووسط المانيتول الملحي الصلب ، وحضنت المستنبتات في ظروف هوائية وفي درجة حرارة 37 مْ ، ومدة 24 ساعة.

شخصت *S. aureus* المعزولة ، بالاعتماد على كل من Holt(18) وColle(19) وMacfaddin (20) لتشخيص بعض الصفات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية.

التحري عن *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين MRSA

تم التحري عن البكتريا المقاومة للمثيسيلين بعدة طرائق وهي كالاتي :

طريقة أقراص فحص الحساسية

تضمنت استعمال أقراص مضاد الأوكزاسيلين ومضاد السيفوكسيتين بطريقة الانتشار بالقرص (disk diffusion method) . ثم قيست أقطار التثبيط وقورنت مع القيم القياسية التي ذكرها CLSI (21) .

وسط كروم أكار CHROMagar MRSA

تم التحري عن عزلات بكتريا *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين (MRSA) بأستعمال طريقة التخطيط على الوسط الزرعي كروم أكار CHROM agar MRSA المجهز من شركة CHROM agar الفرنسية الذي يعدّ وسطاً أختيارياً لعزل وتفريق سلالات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين (MRAS) بالأعتماد على اللون.

عزل العاثي البكتيري Isolation Of Bacteriophage

عزل العاثي البكتيري من مياه المجاري ، حيث حضّر 1-5 مل من العالق البكتيري المعقم ، ورشحت العينة باستخدام ورق ترشيح ذات قطر 125 مايكرون معقمة وجافة ، للتخلص من المواد والشوائب العالقة به ، وللتقليل من التلوث الموجود كما أخذ 25مل من مياه المجاري المرشحة ، وأجري له طرد مركزي بسرعة 2500 دورة/دقيقة لمدة 10 دقيقة . مرر الراشح من خلال مرشحات ذوات ثقوب أصغر بقطر 0.22 مايكروميتر لازالة البكتريا المتواجدة في النموذج ، أضيف 20مل من الراسب إلى دورق زجاجي ذي سعة 500مل مغطى بقطعة من الألمنيوم المعدني الحاوي على 20مل من المرق المغذي المضاعف Twofold Concentrated Nutrient Broth المحضر حسب مواصفات الشركة المجهزة في نصف كمية الماء المقطر .

أخذ 1مل من المعلق البكتيري المحضر سابقاً ، وأضيف إلى مزيج الدورق الزجاجي، وحضن في درجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة ، واعتبر مزرعة أصلية "Stock Culture" . أخذت المزرعة الأصلية ورشحت بورق ترشيح ذي قطر 0.45 مايكروميتر ، ونقل 8مل من الراشح إلى أنبوبة اختبار محكمة الغلق ونظيفة ومعقمة وأضيف 0.2مل من الكلوروفورم إلى الانبوبة المحكمة الغلق بوساطة ماصة معقمة. وبهذا تم الحصول على العاثي البكتيري Bacteriophage بصورة نقية ، حفظ في الثلاجة لحين الأستعمال (24,23,22) .

جرت الآليات المتعلقة بدراسة الفايروسات المعزولة والتي شملت : تحديد المعيار الحجمي للعاثي ، تكثير العاثيات ، تنقية العاثيات الحرة ،وحفظ العاثيات طويل وقصير المدى وكذلك حركيات وخصائص العاثي التي تخص : التمرير ، حساب معدل إدمصاص العاثي ، فترة الكمون ، زمن التحلل ، حجم التفجر وفترة الكمون وثباتية العاثيات بالآعتماد على الطرائق الواردة في المصادر (32،31،30،29،28،27،26،25،24،23) .

حساسية العزلات البكتيرية للأصابة بالعاثي

Susceptibility of bacterial isolates to phage infection:

أستخدم في هذا الاختبار تركيز من العاثي حوالي 10^3 وحدة مكونة للبقعة /مل ويسمى التخفيف الروتيني (Routine test dilution (RTD)) ويمثل اعلى تركيز يفشل بالتسبب بأنحلال كامل للبكتريا تحت الاختبار. ولاختبار حساسية العزلات البكتيرية تنتخب سلالات نموذجية منفردة وتلقح في 3 مل من المرق المغذي وتحضن في مْ 37 لمدة أربع ساعات وبعدها تصب على الوسط الصلب ، ثم يتم أستخدام العاثي

بتركيز RTD بشكل نقط منفصلة وبحجم 0.05 مل على الطبق وبعدها يحضن الطبق ويترك لمدة 20 ساعة بدرجة مْ37 . النتيجة الموجبة تسجل بحساب وجود التحلل للبكتريا (37, 38).

حساسية العاثي للتغير بقيم الأس الهيدروجيني Phage sensitivity to change the values of pH :

استخدم في هذا الاختبار سلسلة من أنابيب الاختبار الحاوية على المرق المغذي وتضبط قيم pH فيها لتكون متدرجة من (2-12) مع وجود 1N HCL او 1N NaOH وتكون حاوية على جزيئات العاثي بمقدار معلوم لتعطي تركيز 10^7 وحدة مكونة للبقعة/مل حيث تحضن بدرجة حرارة مْ37 لمدة ساعة واحدة وبعدها يتم تخفيف العينة وتلقح لحساب عدد البقع والتحري عن فعالية جزيئات العاثي حيث يعبر عن فعالية العاثي بشكل النسبة المئوية القصوى للنمو. (38, 39) .

حساسية العاثي للتغير بقيم درجات الحرارة Phage sensitivity to change the values of temperatures:

تم دراسة حركيات تضاعف العاثي أو فعاليته من خلال حفظ العينة في المرق المغذي بدرجات حرارة 40,50,60 and مْ70 على التوالي وبعدها تم التحري عن نشاط جزيئات العاثي المعاملة بلحرارة عن طريق مزجها مع المزروع البكتيري وصب الخليط في اطباق زرعية وحساب اعداد البقع المتكونة بعد الحضن والتي تعطي مؤشراً على فعالية جزيئات العاثي (38).

تاثير فترة الحضانة على فعالية العاثي the effect of the incubation period on phage effectiveness:

في هذا الاختبار استخدم عيار العاثي 10^6 وحدة مكونة للبقعة/مل والذي تمت اضافته الى الخلايا البكتيرية النامية في الوسط الزرعي (10^8خلية/مل). حضن الخليط في مدة حضانة مختلفة 6,12,18,24,30,36 hr وبعدها حسبت النتائج من خلال عد البقع المتكونة (40,41) .

النتائج

عزل بكتريا الـ *S. aureus* وتشخيصها:

تم جمع (100) عينة من مصادر سريرية مختلفة شملتها الدراسة وعلى النحو الاتي (35) عينة من الإدرار، و(23) من اخماج الجروح ،و(25) من اخماج الحروق ، (7) من اخماج الأذن ،و(10) من اخماج جلدية مختلفة (الخراج) لمرضى راقدين في مستشفى الديوانية التعليمي في مدينة الديوانية خلال المدة من تشرين الثاني 2012 لغاية شباط 2013 .

أثبتت الدراسة الحالية عائديةعزلة إلى جنس المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureu* من خلال دراسة بعض الصفات الزرعية والمجهرية والفحوصات الكيموحيوية .

التحري عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين MRSA

طريقة أقراص فحص الحساسية

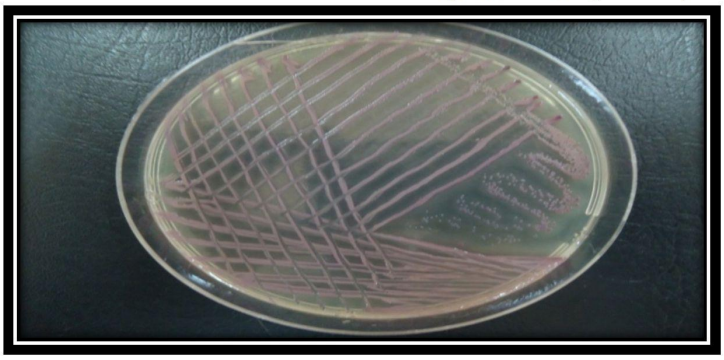
تم التحري عن صفة المقاومة للمثيسيلين لجميع عزلات *S. aureus*البالغ عددها (50) عزلة باستعمال اختبار أقراص فحص الحساسية الدوائية لمضادات الأوكزاسيلين والسيفوكسيتين (لم يتم أستعمال أقراص مضاد المثيسلين في هذا الفحص) ،أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنَ نسبة العزلات السريرية المقاومة للأوكزاسيلين والسيفوكسيتين هي (45.4%) بواقع 30 عزلة وبالتالي عدت هذه العزلات مقاومة للمثيسيلين MRSA كتحري أولي ، وكما موضح في الجدول 1 .

جدول (1): عزلات بكتريا *S. aureus* المقاومة للمثيسيلين المعزولة من حالات سريرية

المضادات	عدد العزلات (50)		
	R (%)	I (%)	S (%)
Oxacillin	30 (45.4%)	0(0.0%)	20 (54.5%)
Cefoxitin	30 (45.4%)	0(0.0%)	20 (54.5%)
Sensitive=S Intermediate= I Resistance =R			

وسط كروم أكارCHROM agar MRSA

نميت جميع عزلات *S .aureus* قيد الدراسة البالغة 50 عزلة على وسط CHROM agar MRSA اذ أظهرت (30) عزلة وبنسبة (45.4%) قدرتها على مقاومة مضاد المثيسلين والنمو على وسط (CHROM agar MRSA) وتميزها بأعطائها اللون الوردي الخاص بعزلات الـ (MRSA) ، وكما مبين في الشكل 1 .



الشكل (1) : مستعمرات بكتريا MRSA النامية على وسط CHROM agar MRSA

مقاومة عزلات الـMRSA للمضادات الحيوية

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility test

تم التحري عن الحساسية الدوائية لعزلاتMRSA تجاه 16 مضاداً حيوياً لمعرفة مدى مقاومة عزلاتMRSA وحساسيتها لبعض المضادات التي من الممكن إن تقدم بوصفها علاج ألللأخماج الناتجة عن الإصابة بها .

أظهرت النتائج وكما هو موضح في الجدول (2) مقاومة جميع عزلاتMRSA بنسبة 100% لمضادات البيتالاكتام β-lactam وهي كل من Amoxicillin/Clavulinic acid ، Ampicilln) ، Cefotaxime ، Ceftriaxone ، Cephalothin ،Penicillin G).وأظهرت نتائج الدراسة الحالية مقاومة عزلاتMRSA لمضادErythromycinبنسبة76.6% ، وكانت نسب المقاومة لمضادات Clindamycin ، Tetracycline ، Amikacin هي 56.6% ،56.6% ، 53.3% على التوالي ، اما مضادات Chloramphenicol ، Gentamicin فكانت نسبة المقاومة لكل منهما هي 46.6% ،وبلغت نسب المقاومة لمضادات Ciprofloxacin ، Imipenem ، Meropenem هي 3.3% ، 3.3% ، 20.0% على التوالي ، في حين سجلت النتائج حساسية جميع عزلاتMRSA بنسبة 100% للمضاد الحيوي Vancomycin

.

جدول (2) :مقاومة MRSA المعزولة من حالات سريرية للمضادات الحيوية

انواع المضادات الحيوية	الرمز	عدد ونسبة عزلات MRSA (%) R (%)	I (%)	S (%)
Amikacin	AK	(%53.3)16	(%0.0)0	(%46.6)14
Amoxicillin/Clavulinic acid	AMC	(%100)30	(%0.0)0	(%0.0)0
Ampicilln	AMP	(%100)30	(%0.0)0	(%0.0)0
Cefotaxime	CTX	(%100)30	(%0.0)0	(%0.0)0
Ceftriaxone	CTR	(%100)30	(%0.0)0	(%0.0)0
Cephalothin	CF	(%100)30	(%0.0)0	(%0.0)0
Ciprofloxacin	CIP	(%3.3)1	(%6.6)2	(%90.0)27
Chloramphenicol	C	(%46.6)14	(%13.3)4	(%40.0)12
Clindamycin	CD	(%56.6)17	(%3.3)1	(%40.0)12
Erythromycin	E	(%76.6)23	(%6.6)2	(%16.6)5
Gentamicin	GEN	(%46.6)14	(%3.3)1	(%50.0)15
Meropenem	MEP	(%20.0)6	(%0.0)0	(%80.0)24
Imipenem	IPM	(%3.3)1	(%0.0)0	(%96.6)29
Penicillin G	P	(%100)30	(%0.0)0	(%0.0)0
Tetracycline	TE	(%56.6)17	(%0.0)0	(%43.3)13
Vancomycin	VA	(%0.0)0	(%0.0)0	(%100)30

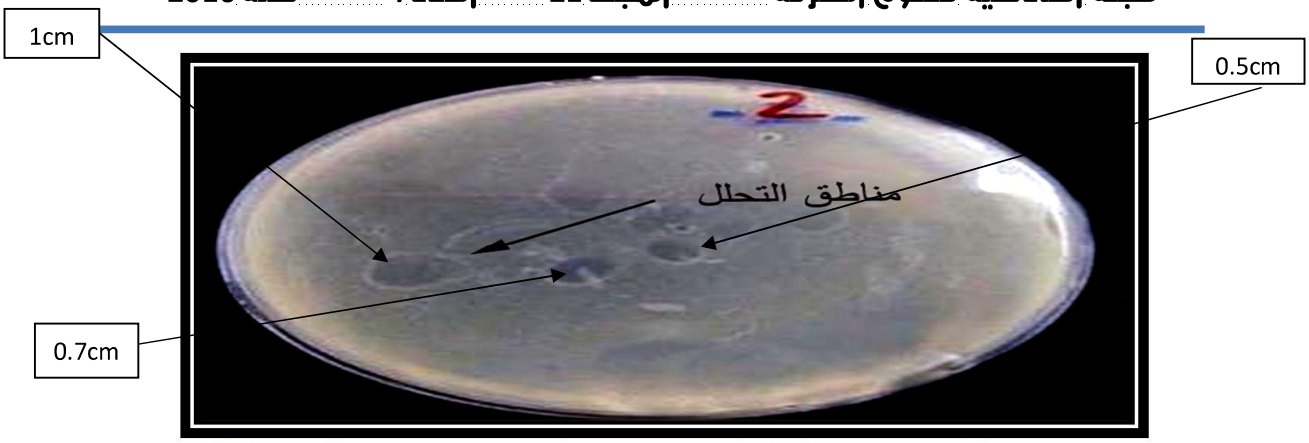
Sensitive=S Intermediate= I Resistance =R

من مناطق التحلل Plaques الواضحة ، واهملت بقية التخافيف لقلة عدد المناطق المحللة ، حيث ان العيار الحجمي للعاثي في التخافيف (10^{-4} ، 10^{-5} ، 10^{-6} ، 10^{-7}، 10^{-8}) كان يظهر مناطق تحلل قليلة . لذلك استخدم التخفيف 10^{-2} الذي كان عدد المناطق المحللة فيه متناسبة مع كمية الجرثومة ، توضح الصورة تكوين البقع Plaques للعاثي البكتيري الخاص بالنوع MRSA على وسط الاكار المغذي بعد حضن 18 ساعة في درجة حرارة 37 م° كما في الشكل (2) .

عزل عاثيات *S. aureus* MRSA :

عزل العاثي البكتيري من 50% عينة من مياه الصرف الصحي باستخدام 30 عينة من بكتريا ال MRSA وظهرت البقع Plaqus (مناطق التحلل) على سطح الاكار المغذي ، ومن فحص البقع ، كانت جميع عزلات ال MRSA عرضة للاصابة ب التحلل بالعاثي .وكان قطر بقع الاصابة بالعاثي مختلفة في الحجم .

وقد وجد ان التخفيف 10^{-2} هو افضل تخفيف حدد فيه العيار الحجمي للعاثي البكتيري المستخدم قيد الدراسة ، إذ حصل على عدد



شكل (2) تكوين البقع (Plaques) للعاثي البكتيري الخاص بالنوع MRSA على وسط الاكار المغذي بعد حضن 18 ساعة في درجة حرارة 37 م°.

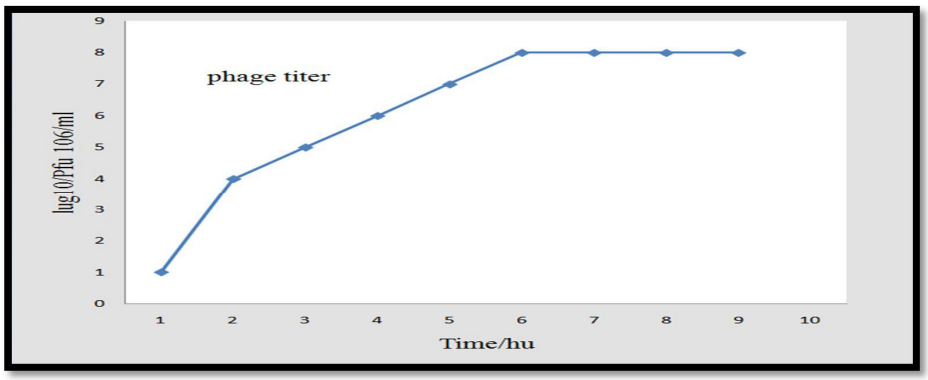
معدل ادمصاص العاثي Adsorption Rate :

ان جزيئات العاثي المعزولة قادرة على تحقيق اعلى مستوى من الادمصاص في مدة زمنية بين (3-5) دقيقة وزيادة الوقت تزيد من عدد جزيئات العاثي التي كثفت على سطح الخلايا البكتيرية بينما لوحظ بان تخفيف العينة اوهزها (shaking) يقلل من ادمصاصها كما في الشكل (3).

حركيات وخصائص العاثي Phage Kinetics and Characteristics :

التمرير (الزرع المتكرر) Passages :

بينت نتائج الدراسة المحصل عليها ان تكرار عملية زرع العاثي زادت من فعالية العاثي ولياقته ، واظهرت نتائج التمرير زيادة ملحوظة في وحدة تكوين البقع (PFU) التي وصلت الى اعلى مستوى في التمرير الخامس بينما ظهر انخفاض في الكثافة الضوئية للمزروع البكتيري .



شكل (3) معدل ادمصاص جزيئات العاثي على خلايا MRSA

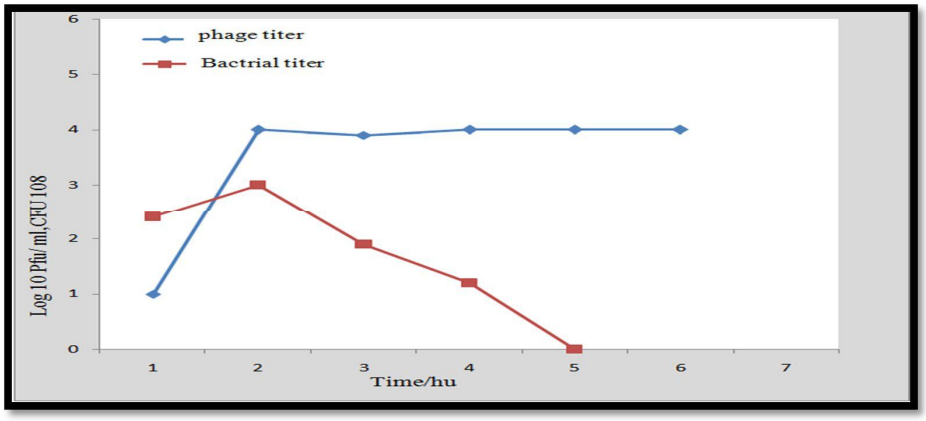
اظهرت هذه الدراسة ان جزيئات العاثي المعزولة سجلت قدرة كبيرة في تحلل الخلايا البكتيرية وهذا التحلل وصل الى اعلى معدل بعد ساعتين من خلط جزيئات العاثي مع الخلايا البكتيرية . وأظهرت ايضاً ان هناك انخفاضاً كبيراً في عدد الخلايا البكتيرية بمرور الوقت . زمن التحلل الكامل كان حوالي 5 ساعات كما في الشكل (4).

فترة الكمون Eclipse period :

أوضحت البيانات المحصل عليها رياضياً بأن جزيئات العاثي المعزولة يكون لها مدة كمون حوالي :

7.5 ±0.5 minutes

زمن التحلل Lysis time:



شكل (4) زمن التحلل لعاثي خلايا MRSA

20 ± 4 pfu\cell

خلال ثلاثة اجيال .

حساسية العزلات البكتيرية للأصابة بالعاثي

Susceptibility of bacterial isolates to phage infection :

أظهرت النتائج إن عزلات بكتريا ال MRSA والمعزولة من مياه الصرف الصحي كانت أكثر عرضة للإصابة بالعاثي من العزلات المعزولة من الحالات السريرية كما في الشكل (5)

Burst size and latent period : حجم التفجر وفترة التأخر

أظهرت البيانات الحسابية ان حجم التفجر (معدل أعداد العاثيات التي تم انتاجها من قبل الخلايا المصابة) حوالي :

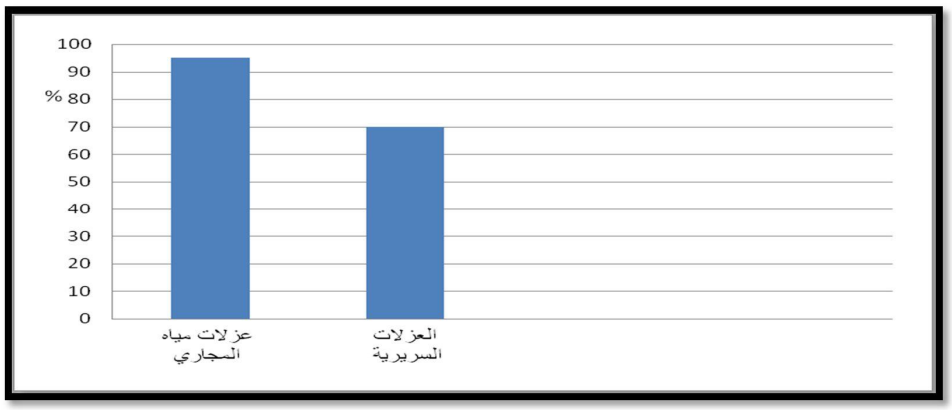
110±18 pfu\cell

في فترة زمنية حوالي :

30 ±5 minutes

Phage fitness : لياقة (ثباتية) العاثي

أظهرت البيانات الحسابية ان لياقة العاثي (معدل الزيادة في عيار العاثي) حوالي :

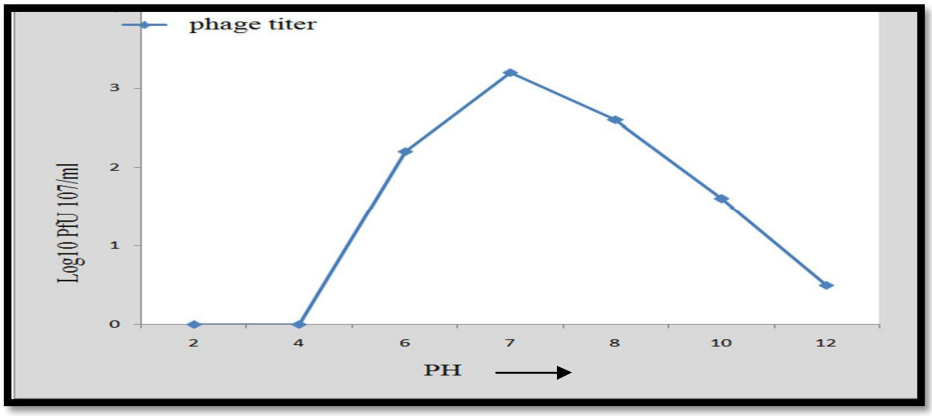


شكل (5) حساسية عزلات MRSA للأصابة بالعاثي

المتعادل في الرقم الحامضي بين 6.5-8.5 وبدئت بالانخفاض بشكل كبير بعد الرقم الحامضي 7 واصبحت هذه الفعالية ضئيلة جداً عندما قل الرقم الهيدروجيني عن 4.5 كما في الشكل (6).

Phage sensitivity to change the values of pH: حساسية العاثي للتغير بقيم الأس الهيدروجيني

ان الرقم الهيدروجيني له تاثير هام على فعالية جزيئات العاثي وهذه الفعالية وصلت الى اعلى مستوى في الوسط

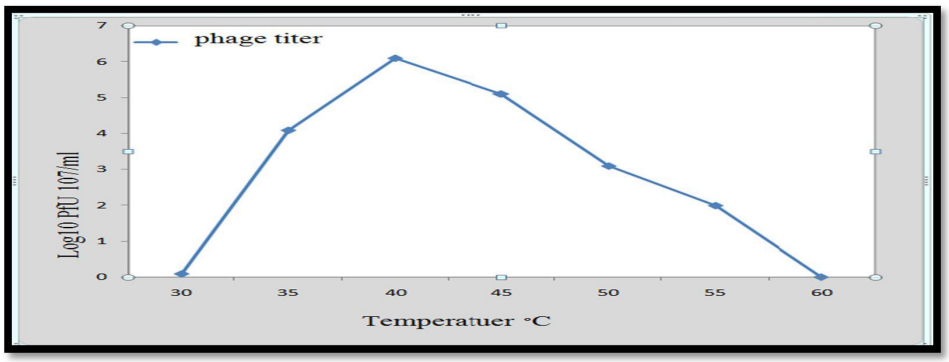


شكل (6) تاثير الرقم الهيدروجيني على فعالية عاثي ال MRSA

قيم الدرجات الحرارية يكون لها تاثير كبير على فعالية جزيئات العاثي التي انخفضت في درجة حرارة عالية . ان فعالية جزيئات العاثي كبحت عند 60مْ بعد 8-10 دقيقة كما في الشكل (7).

حساسية العاثي للتغير بقيم درجات الحرارة Phage sensitivity to change the values of temperatures:

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ان فعالية العاثي تصل الى اعلى مستوى عند درجة حرارة بين (35-45مْ) .

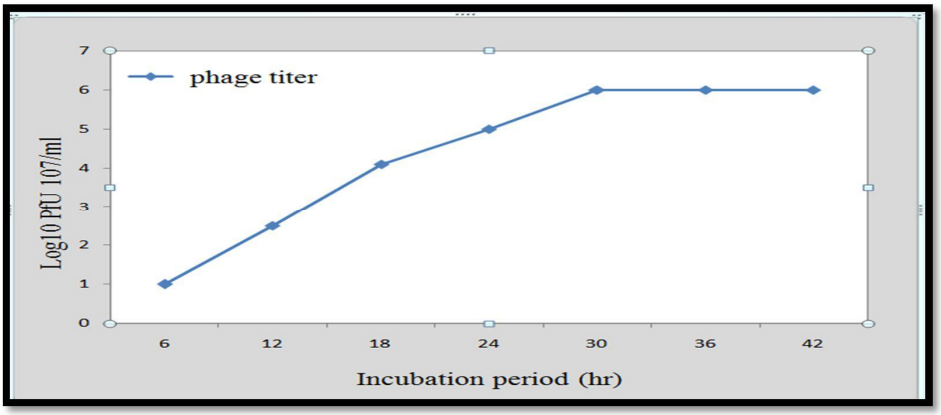


شكل (7) تاثير الحرارة على فعالية عاثي ال MRSA

حيث كان الحد الادنى لعيار العاثي في مدة حضانة (6 ساعات). تزداد فعالية جزيئات العاثي مع زيادة مدة الحضانة حتى تصل الى 30 ساعه والتي ظهر عندها العاثي فعال و أكثر استقرارا كما في الشكل (8).

تاثير فترة الحضانة على فعالية العاثي the effect of the incubation period on phage effectiveness :

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أيضا أن فترات الحضانة يكون لها تأثير كبيرعلى عيار العاثي وفعاليته ،



شكل (8) تاثير مدة الحضن على فعالية عاثي ال MRSA

مضاد الأوكزاسيلين ثابت تحت ظروف الخزن ، ومضاد السيفوكسيتين بالحقيقة هو محفز جيد لمورثة mecA المسؤولة عن المقاومة لمضاد المثيسيلين (44) . وطبقاً لذلك فأن العزلات المقاومة لمضاد Oxacillin و Cefoxitinتعَد مؤشراً اولياً على انها مقاومة لمضاد Methicillin (MRSA) .

إن نسبة MRSA في الدراسة الحالية أعلى من نسبتها في المملكة المتحدة التي بلغت (39.6% ، 40.1% ، 39.3%،39.2%) للأعوام 1990،2000،2004،2005 على التوالي (45) ، وأدنى من النسبة المسجلة من قبل Kleinوجماعته (2007) في دراسة مسحية لمستشفيات الولايات المتحدة الأمريكية للمدة (1999-2005) بلغت (62%) ، وأعلى من النسب المسجلة في دراسة الخضيري (46)ودراسة الفؤادي (47) ودراسة الحسناوي (48) التي بلغت 18.5% و 32.3% و 29.5% على التوالي .

وتم التحري عن عزلات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين(MRAS) بأستعمال الوسط الأختياري CHROM agar MRSA أذ نميت جميع عزلات S. aureus قيد الدراسة والبالغ عددها 50 عزلة على وسط CHROM agar MRSA حيث أظهرت 30 عزلة بنسبة (45.4%) قدرتها على النمو وأعطائها مستعمرات وردية اللون الخاصة بعزلاتMRSA، بينما يعمل وسط CHROM agar MRSA على تثبيط نمو المكورات العنقودية الحساسة للمثيسيلين Methicillin Susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) ولذلك يعَد وسط كروم أكار MRSA وسطاً أختيارياً لعزل

المناقشة Disscusion :

عزل بكتريا الـ S.aureus وتشخيصها :

أثبتت الدراسة الحالية عاندية 50 عزلة إلى جنس المكورات العنقودية الذهبية aureus Staphylococcus من خلال الاعتماد على التشخيص الأولي للعزلات البكتيرية واعتماداً على الصفات الفسلجية والكيموحيوية ، ووفقاً لما جاء في تصنيف(18) ، وكذلك بالاعتماد على الطرائق التي ذكرها Stukus (42) وMacFadding (20).

التحري عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين MRSA

تم التحري عن صفة المقاومة للمثيسيلين لجميع عزلات S. aureus باستعمال اختبار أقراص فحص الحساسية الدوائية لمضادات الأوكزاسيلين والسيفوكسيتين ، (لم يستخدم مضاد المثيسيلين في هذا الأختبار) نتيجة لتأثر مضاد المثيسيلين بظروف الأختباروأعطاءه نتائج خاطئة أدى الى فشل التحري عن المقاومة بأستعمال هذا المضاد (43).

يستعمل مضاد الأوكزاسيلين أكثر من مضاد المثيسيلين في التحري عن المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين لمقاومته العالية لظروف الخزن وقدرته العالية في التحري عن عزلات المكورات العنقودية ذات المقاومة غير المتجانسة (21) .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنَ نسبة العزلات السريرية المقاومة لمضاد الأوكزاسيلين و السفوكسيتين هي (45.4%) بواقع 30 عزلة وبالتالي عدت هذه العزلات مقاومة للمثيسيلين MRSA .

يفسر العلاقة بين مورثة mecA لعزلاتMRSA والمقاومة لمضادات Macrolide (49) .

وأوضحت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة المقاومة لمضادات Clindamycin ، Tetracycline ، Amikacin هي (56.6%) ، (56.6%) ، (53.3%) على التوالي ، تعد مقاومة Tetracyclineمرتبطة بوجود مورثة SCCmec الحاوية بشكل أساس على مورثة mecA . وكانت نسبة المقاومة للتتراسايكلين في الدراسة الحالية أعلى من نسبة (47) التي بلغت (40%) وأدنى من نسبة (48) التي بلغت (61%) ، أما نسبة المقاومة للكلندامايسين في الدراسة الحالية فكانت أدنى من نسبة(53) ونسبة(54) التي بلغت (96%) و (100%) على التوالي ، لكنها أعلى من نسبة (55) للأعوام 1999 ، 2001 ، 2003 ، وهي (18% ، 15% ، 20%) على التوالي . في حين كانت نسبة المقاومة لمضادAmikacin في الدراسة الحالية أعلى من نسبة(48) التي بلغت (15%) .

بينت نتائج الدراسة الحالية بأن نسبة مقاومة عزلاتMRSA لكل منChloramphenicolوGentamicin كانت (46.6%) لكل منهما ، كانت نسبة المقاومة لمضاد Chloramphenicol أعلى من نسبة (48) التي بلغت (15%) وأدنى من نسبة(46) التي بلغت (58.4%) ، بينما كانت نسبة مقاومة مضاد Gentamicin في الدراسة الحالية مقاربة مع النسبة في دراسة (56) التي بلغت (47%) ، وأعلى من نسبة (48) التي بلغت (23%) .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة مقاومة عزلاتMRSAلكل من مضاداتCiprofloxacin ، Imipenem ، Meropenem هي (3.3%) ، (3.3%) ، (20.0%) على التوالي ، حيث كانت نسبة المقاومة لمضادImipenemوMeropenem أدنى من نسبة (48) التي بلغت (7%) ، (23%) على التوالي .

أظهرت جميع عزلات MRSA حساسية عالية للمضاد الحيوي Vancomycin بنسبة (100%)، وتتفق نسبة الدراسة الحالية مع العديد من الدراسات مثل دراسة الخضيري (46) ودراسة الحسناوي (48)، وهذه النسبة تعطي مؤشرا ايجابيا لاستعمال الفانكومايسين في حالات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.

وتفريق سلالات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين(MRAS) وحتى ضمن المستويات القليلة .

مقاومة عزلاتMRSA للمضادات الحيوية :

تم التحري عن الحساسية الدوائية لعزلات MRSA البالغ عددها 30 عزلة ، باستعمال 16 نوعاً من المضادات الحيوية القياسية المختلفة ، وقد اختير هذا الاختبار لمعرفة مدى مقاومة عزلاتMRSA للمضادات الحيوية المتنوعة ومقدار الارتباط بين مقاومتها لمجموعة مضادات البيتالاكتام وبقية المضادات الحيوية الأخرى ، ومدى حساسيتها لبعض المضادات التي من الممكن إن تقدم كعلاج للأخماج الناتجة عن الإصابة بها .

أظهرت جميع عزلات MRSA في هذه الدراسة نسبة مقاومة (100%) لمضادات البيتالاكتام β-lactam وهي كل من (Ampicilln ، Amoxicillin/Clavulinic acid ، Cefotaxime ، Ceftriaxone ، Cephalothin ،Penicillin G)وكما هو مبين في جدول (2).

تقاوم عزلات MRSA عملياً جميع مضادات البيتالاكتام β-lactam والممثلة بمضادات البنسيلينات Penicillinsوالسيفالوسبورينات Cephalosporins (49,21) . تتميز العزلات المقاومة للمثيسيلين بمقاومتها لجميع أنواع مضادات البيتالاكتام التعاضدية مثل (الأموكسسيلين- حامض الكلافيولانك) (50) وتوثق العزلات الحساسة عملياً على أنّها مقاومة على الرغم من تحسسها في الزجاج لكونها سريريا لاتظهر تأثيرا فعالا ، ومعظم الدراسات أكدت على مقاومة عزلاتMRSA لجميع أنواع مضادات البيتالاكتام (51,52) .

اظهرت نتائج الدراسة الحالية مقاومة عزلات MRSAلمضاد Erythromycin بنسبة (76.6 %)،وتمتاز عزلاتMRSA بمقاومتها العالية لمضادات Macrolide ومنهامضاد Erythromycin ، وغالبا ماتكون المقاومة Erythromycin محمولة على المورثة القافزة Tn55اذ يعمل على تشفير المقاومة للأرثرومايسين والسبكتينومايسين(Spectinomycin) ، وتتواجد المورثة القافزة في (Upstream) لمعقد المورثات (mecR1-mecI-complexmecA) ، وهذا الارتباط

تشخيصية وعلاجية ممتازة لمحاربة الامراض البكتيرية (62) . فعالية العاثي أختبرت ضد 30عزلة سريرية من ال MRSA باستخدام طريقة حساب البقع . اصابة ال MRSA بواسطة العاثي أبدت بقع واضحة ، هذه البقع كانت متغيرة في القطر ،نسب حجم البقع تزداد مع زيادة كثافة المضيف البكتيري (63 ,64). تم ملاحظة التأثير المحلل للعاثي من خلال رؤية مناطق واضحة من Plaques على أطباق الأكار المغذي الملقحة بالجراثيم وهوما يعني خلو هذه المناطق من النمو الجرثومي نتيجة لعملية قتل الجراثيم من قبل العاثي .

في بعض الأحيان قد تمر الجراثيم بطفرة Mutation تفقدها مستقبلاتها المتخصصة وهذا يعكس حقيقة عدم تأثر الجراثيم بالعاثيات ، حيث لا تتأثر بعض العزلات الجرثومية بالعاثيات ، أو قد يرجع السبب الى عدم احتواء عينة مياه المجاري على العاثيات المتخصصة لهذه العزلات الجرثومية (58) .

حركيات العاثي Phage Kinetics :

في هذه التجربة مزجت البكتريا والعاثيات في نسب التي من المرجح ان تكون كل بكتريا كثفت مع عاثي واحد .علاوة على ذلك ، فمن الافضل ان تصاب البكتريا في مرحلة النمو الاسي حيث يكون الايض نشط . واظهرت النتائج ان جزيئات العاثي كانت قادرة على تحقيق اعلى مستوى من الادمصاص في فترة زمنية مابين 3-5 دقيقة وبزيادة الوقت يزداد عدد جزيئات العاثي التي كثفت على سطح الخلايا البكتيرية . اظهرت هذه الدراسة ان مدة سكون جزيئات العاثي حوالي (0.5± 7.5) دقيقة وهذا يتفق مع نتائج Garbe (26) 2010,(31) Heineman and Bull,(35) Shao and Wang .

تم تحديد معدل الادمصاص من خلال معرفة العوامل الفزيائية والكيميائية غير المحددة (درجة الحموضة ، درجة الحرارة ، وجود مادة معينة في الوسط والايونات) ويعتمد على حالة المضيف الفسيولوجية وظروف الزرع Turner and Duffy.(65,66,67) (68) ذكروا ان الحالة الفسيولوجية للبكتريا تؤثرعلى ادمصاص العاثي . سجلت جزيئات العاثي درجة عالية في تحلل الخلايا البكتيرية تحلل كامل (صافي) للبكتريا في المرق المغذي واظهرت ايضاً ان هناك انخفاظاً كبيراً في عدد الخلايا البكتيرية بمرور

عاثيات ال MRSA Isolation of MRSA Phages:

أن العاثي البكتيري يشكل مجموعة من الفايروسات التي لها العديد من المضائف الجرثومية التي تتوافر طبيعياً في الاماكن التي تتواجد فيها الجرثومة مثل امعاء الانسان ،الحيوانات، الحشرات، الفضلات،مياه المجاري والتربة(57) . ويوضح وجودها بواسطة الفعالية التحللية التي تكونها في الجرثومة الممرضة أثناء النمو الفعل. وتعتبر عوامل شديدة الخصوصية ، تعمل ضد جنس واحد من الجرثومة او انواع متعلقة بها (58) .ان قابلية الفايروسات البكتيرية (العاثيات البكتيرية) لتحليل وقتل الخلايا البكتيرية قاد الى استخدامها كعلاج فعال ضد الالتهابات ،والعديد من التجارب تم تطبيقها مع نتائج مختلفة (59) . ويتكاثر العاثي البكتيري (مثل جميع الفايروسات) فقط داخل الخلايا الحية ،وطالما ان حجمه يمنع ملاحظته مباشرة باستخدام المجهر الالكتروني فان من الضروري متابعته وملاحظة فعاليته بواسطة طرائق غير مباشرة . ولهذا الغرض فان الفائدة تؤخذ من واقع ان العاثي البكتيري الواحد يتم ادخاله الى طبقة مزدحمة من الجرثومة المتكاثرة على طبق من الاكار المغذي الذي سوف يكون مناطق تحلل واضحة تسمى plaques والتي تنتج من حقيقة ان خلية المتطفل المصابة في البداية تنغمر محررة كميات من العاثيات البكتيرية الجديدة التي تصيب الخلايا المجاورة. ان هذه العملية تتكرر بشكل دوري الى ان يقف النمو البكتيري على الطبق وذلك نتيجة لاستهلاك المواد الغذائية وتجمع المواد السامة في الطبق .

عند معاملة العاثيات البكتيرية بشكل جيد فان كل عاثي يكون منطقة تحلل plaques واحدة او اية مادة تحتوي على العاثي تغير عن طريق عمل تخفيف ، وتصب النماذج المقاسة في اطباق مع زيادة قليلة في كمية الجرثومة الحساسة . ان تعداد المناطق المحللة plaques مشابه الى تعداد مستعمرات الجرثومة (60) .

في هذه الدراسة تم عزل عاثيات ال MRSA من 50 عينة من مياه الصرف الصحي من مصادر ومواقع مختلفة . وكان هناك علاقة ايجابية بين مدى عضوية النفايات في عينة الماء وكمية عاثيات الMRSA ، ونلاحظ ذلك بلنظر الي بعض الدراسات البكتيرية (61) . ان قدرة العاثي على الزيادة في العدد خلال عمليات الاصابة يجعل للعاثي امكانية

فعالية جزيئات العاثي وهذه الفعالية وصلت الى اعلى مستوى في قيم درجة الحموضة بين 6.5-8.5 وفي درجة الحموضة اكبرمن 9 الفعالية تبدأ بالانخفاض بشكل كبير ، وفي درجة الحموضة اقل من 4.5 الفعالية تتناقص وهذه النتائج تتفق مع نتائج (74)Leverentz, (71)Al-khozai, (75)Yang .

واظهرت النتائج ان التغير الكبيرفي معدل الرقم الحامضي العالي يقلل من فعالية بعض العاثيات (76) .

تعتبراختبارات الثبات الحراري مهمة لتعريف وتصنيف العاثيات .على سبيل المثال ،العاثيات المتواجدة في درجة عالية من الثبات الحراري تكون لها فرصة اكبر للبقاء في السماد العضوي ،والتي قد تتجاوز فيها درجة الحرارة مْ70 ، وأظهرت النتائج أن فعالية جزيئات العاثي تصل الى اعلى مستوى لها في درجة الحرارة بين (45-35)مْ ،معدل درجة الحراة يكون له تاثير كبير على فعالية جزيئات العاثي التي انخفضت في درجات حرارية عالية . فعالية جزيئات العاثي كبحت عند درجة حرارة مْ60 بعد (8-10) دقيقة وهذه النتائج توافقت مع نتائج (40)Ackermann ,(71)Al-khozai,(75)Yang ,(77)Kutter and Sulaakvelidze بعض العاثيات تكون متخصصة لبكتريا Streptococcus thermophilus وLactobacillus lactis تكون فعاليتها كبيرة في درجة مْ63 في حين ان بعض العاثيات الاخرى التي تصيب هذه الانواع كشفت مقاومة عالية لنفس او اكثر شدة عند المعاملة (78, 79) .

كذلك فأن مدة الحضانة لها تاثير كبير على عيار العاثي وفعاليته ، حيث ظهر الحد الادنى من عيار العاثي في فترة حضانة 6 ساعات. حيث وجد ان فعالية العاثي تزداد بزيادة فترة الحضانة حتى تصل ال 30 ساعة . وتظهر فعالية العاثي مستقرة . وهذا يحدث بسبب تراكم بقايا البكتريا وانخفاض التغذية في الطبق . وهذه النتائج تتفق مع نتائج (27), Fiorentin (80) Huff and Donoghue.

الوقت . كان وقت التحلل الكامل حوالي 5 . هذه النتائج مشابهة تقريباً للنتائج التي حصل عليها الباحثون (69)Forde,(70)Guyader and Burch,(35)Shao and Wang,(71)Al-Khozai and Al-Hamdani) .

ان تضاعف العاثي يتاثر بالظروف الفسيولوجية مثل(الحالة الفسيولوجية للبكتريا ، تركيز العاثي في الوسط ، درجة الحموضة ، درجة الحرارة ، تركيز الاملاح و الكاتيونات) (72, 31, 69,70).

اظهرت البيانات الحسابية ان حجم التفجر (اعداد العاثيات التي نتجت من قبل الخلايا المصابة)هو 18± 125 عاثي لكل خلية بكتيرية في فترة زمنية حوالي 5-30 دقيقة . ان طول مدة الكمون وحجم التفجر علاقة معقدة ؛ طول مدة الكمون توفر المزيد من الوقت لتكاثر العاثي داخل الخلايا ، وبالتالي زيادة حجم الانفجار (72 ,73).

-الاستقرار والتذبذب في لياقة العاثي (اعداد العاثيات التي تنتج من قبل الخلايا المصابة بعد جيل واحد) كانت 4± 20 (العاثي خلال ثلاث اجيال) . اللياقة البدنية في اختبار العاثي تشير الى استقرار المعلومات الوراثية التي تمكن العاثي على مواصلة الانتشار في النظام البيئي . وهذه النتائج مماثلة تقريباً للنتائج التي تم تسجيلها من قبلBull (36)Dennehy, (33)Heineman and (26)Garbe,.

اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ان ال MRSA التي تم عزلها من مياه الصرف الصحي اكثر عرضة للاصابة بالعاثي من عزلات ال MRSA السريرية . هذه النتائج تتفق مع النتائج التي تم الحصول عليها عن طريق دراسات (38)Dutta and Ghosh,(71)Al-khozai .

ثباتية الرقم الهيدروجيني للعاثي مهم للمجموعة الميكروبيولوجية ، على سبيل المثال ، بقاء العاثيات على قيد الحياة في بيئة متغيرة في درجة الحموضة في القناة الهضمية وكذلك لاغراض عملية تتعلق بالاستخدامات العلاجية الممكنة . واظهرت البيانات الحسابية التي تم الحصول عليها ان قيم الرقم الهيدروجيني لها تاثير كبير على

المصادر:

1) **الدوري ، أشواق يونس نوري.**(2006). دراسة المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من أجسام المصورين الشعاعيين. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة تكريت.

2) **Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberg, P. C. and Winn, W. C.** (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed., J. B. Lippincott Company, Philadelphia. New York.--

3) **Enright, M. C. D.; Robinson, G.; Randle, E. J.; Feil, H.; and Spratt, B. G.** (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 7687-7692.

4) **Cosgrove,S.E. ;Sakoulas,G. ;Perencevich,E.N. ;Schwaber,M.J. ;Karchmer,A.W. and Carmeli,Y.** (2003). Comparison of mortality associated with Methicillin – resistant and Methicillin - susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia:Ameta-analysis. J. Clin. Infect. Dis.,*36*(1): 53-59.

5) **Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A.** (2004). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 23 th ed. McGraw-Hill. New York. U.S.A.

6) **Shapiro, M.; Smith, K. J., James, W. D.; Giblin, W. J.; Margolis, D. J.; Foglia, A. N., McGinley, K. and Leyden, J. J.,** (2000). Cutaneous Micro environment of human immuno deficiency viras (HIV-) Seropositive and (HIV) Seronegative individuals with special reference to *Staphylococcus aureus* colonization. J. Clin-Microbiol. 2000 Sep.; 38 : 3174.8.

7) **Pennsylvania Health Care Cost Contamination Council (PHC4).** (2006). MRSA in pennsylvania hospitals .PHC4 Research Brief , *10* :1-4 .

8) **Shanmugam,J. ;Gopal,R. and Kumar,S.S.** (2008). The Prevalence,antibiogram and Characteristion of *Staphylococcus aureus* incloding MRSA among the healthy staff , Medical students and patients from Sir Manakula Vinagagar Medicall College and Hospital (SMVMCH) ,Kalitheerthalkuppam ,Madagadipet, Puducherry. pp: 1-26.

9) **Cooper,B.S ;Ston,S.P. ;Kibbler,C.C. ;Cookson,B.D. ;Roberts,J.A. ;Medley,G.F. ;Duckworth,G.J. ;Lai,R. ;Ebrahim,S.** (2003). Systematic review of isolation policies in the hospital management of methecillin-resistant *Staphylococcus aureus*:a review of literature with epidemiological and economic modelling.Health Technology Assessment., 7(3--9): 1.

10) **Guttman, B., Raya, R. and Kutter, E.** (2005) Basic Phage Biology. Bacteriophages: *Biology and*

Applications, CRC Press, pp. 29-63.

11) **Calendar, R.** (2006). The bacteriophages. 2nd ed. Oxford University Press Inc., New York, NY.

12) **Atterbury, R.J.; Van Bergen, M.A.; Ortiz, F.; Lovell, M.A.; Harris, J.A.; Boer, A.; Wagenaar, J.A.; Allen, V.M. and Barrow, P.A.** (2007). Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol*. 73:4543-4549.

13) **Harper, D.R. and Kutter, E.** (2008). Bacteriophage: therapeutic uses. *The Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley and Sons.

14) **Merril, C.R.; Scholl, D. and Adhya, S.L.** (2003). The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 489–497, ISSN 1474-1776. Microbiolo ., 39 (2) : 591 – 595 .

15) **Bradbury, J.** (2004). ‘‘My enemy’s enemy is my friend’’: using phages to fight bacteria. *Lancet*, Vol.363, pp 624 – 625, ISSN 0140-6736.

16) **Ceyssens, P.; Miroshnikov, K.; Mattheus, W.; Krylov, V.; Robben, J.; Noben, J.; Vanderschraeghe, S.; Sykilinda, N.; Kropinski, A.; Volckaert, G.; Mesyanzhinov, V. and Lavigne, R.** (2009). Comparative analysis of the widespread and conserved PB1-like viruses infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*, 11: 2874– 2883.

17) **Frederick , C.R.**(1983). Introductory microbiology , Charles , E.Merrill publishing company , Abell and Howell Company . U.S.A.

18) **Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T. and Williams, S. T.** (1994). Bergey’s Manual of determinative bacteriology. 9th ed. Lippincott Williams and Wililkins, Baltimore, USA.

19) **Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmiom, B. P.; and Simmon, A.** (1996). Mackie and McCarteny, Practical Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone inc., USA.

20) **MacFaddin, J. F.** (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

21) **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) .** (2010) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement. M 100-S20., Wayne, Pannsylvannia; 30 (1)

22) **Cappuccino , J.G. ; and Sherman , N.**(2001) . “ Microbiology a Laboratory Manual ” .16th.ed., pp.231-234 .

23) **Benson, H. J.** (1998) . Microbiological Applications, Laboratory Manual in General

Microbiology, 7th edition, McGraw-Hill Companies.

24) **Harley, J. P. and Prescott, L. M.**(1996). Laboratory Exercises in Microbiology 3rd ed. WCB McGraw .Hill.,PP.149-186.

25) **Bachrach, G.; Leizerovici-Zigmond, M.; Zlotkin, A.; Naor, R. and Steinberg, D.** (2003). Bacteriophage isolation from human saliva. *Letters in Applied Microbiology,* Vol.36, pp 50-53, ISSN 1365-2672.

26) **Garbe, J.** (2010). Isolation of Pseudomonas aeruginosa phages and their application for the analysis of lipopolysaccharides 17th Evergreen International Phage Biology Meeting, Olympia, USA.

27) **Fiorentin, L.; Vieira, N.D. and Barioni, J.W.** (2005). Use of lytic bacteriophages to reduce *S.enteritidis* in experimentally contaminated chicken cuts. *Brazil.J.Poult*. Sci., Oct-Dec, 7(4): 255-260.

28) **Boratynski, J.; Syper, D.; Weber, B.; Lusiak, M.; Pozniak, G. and Gorski, A.** (2004). Preparation of endotoxin-free bacteriophages. *Cell Mol. Biol. Lett*, 9: 253-259.

29) **Clokie, M.R. and Kropinski, A.M.** (2009). Bacteriophages. Methods and Protocols: Vol.1: Isolation, Characterization and Interactions. Humana Press.

30) **Jothikumar, N.; Reddy, C.G.; Sundari, R.B and Saigopal, D.V.** (2000). Isolation of coliphages specific to enterotoxigenic *E.coli* (ETEC). *J.Environ.Monitoring*, 2: 372-374.

31) **Heineman, R.H. and Bull, J.J.** (2007).Testing optimality with experimental evaluation: lysis time in Bacteriophage .J. *Evolution*, Vol.61, No.7, pp.1695-1709.

32) **Moldvan, R.; McQuiston, E. and Wu, X.L.** (2007). On kinetics of phage adsorption. *J. Biophysical sciences*, Vol.93, pp.303-315.

33) **Heineman, R.H.; Molineux, I.J. and Bull, J.J.** (2005). Evolutionary robustness of an optimal phenotype: re-evolution of lysis in a bacteriophage deleted for its lysin gene. *J. Mol. Evol*. 61:181–191.

34) **Dennehy, J.J.; Friedenberg, N.A.; Holt, R.D., and Turner, P.E.** (2006). Viral ecology and the maintenance of novel host use. *Am. Nat*. 167:429–439.

35) **Shao, Y. and Wang I.N.** (2008). Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time. *J.Genetics*, Vol.108, pp.471-482.

36) **Dennehy, J.J.; Abedon, S.T. and Turner, B.E.** (2007). Host density impacts relative fitness of bacteriophage Φ6 genotype in structured habitats. *J. Evolution*, Vol. 61, No. 11, pp. 2516–2527.

37) **Budzik, J.M.** (2000). Phage isolation and investigation. *J. Dartmouth undergraduate of science.* Vol.3, No.1, pp.37-43.

38) **Dutta, M. and Ghosh, A.N.** (2007). Physiochemical characterization of *ElTor vibrio phage s20. J.Interovirology*, Vol.50, pp.264-272.

39) **Phumkhachorn, P. and Pongsak, R.** (2010). Isolation and partial characterization of a Bacteriophage infecting the shrimp pathogen *Vibrio harveyi. J. Microbiology Research.* Vol 4, No.16, pp. 1794-1800.

40) **Ackermann, H.W.; Tremblay, D. and Moineau, S.** (2004). Long-term bacteriophage preservation, World Federation for Culture Collections (WFCC) *Newsletter*, 38: 35-40.

41) **Kumari, S.; Harjai, K. and Chhibber, S.** (2009). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO specific bacteriophages isolated from sewage samples. *Am J Biomed Sci*, 1(2): 91-102.

42) **Stukus, P. E.** (1997) . Investigating microbiology. Harcout Brace and Companies.

43) **Derek, F.J. Brown, David, I. Edwards, Peter, M. Hawkey, D. Morrison, L. Ridgway, Kevin, J. Towner, and Michael, W . D .** (2005) . Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Oxford Unversity Press. J . Antimicrob. Chemother., 56:1003.

44) **Weigelt, J.A.**(2007). MRSA Informa Healthcare. USA, Inc.

45) **Kuehnert, M. J.; Hill, H. A.; and Kupronis, B. A.** (2006). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hospitalizations. United States. Rep. 121: 17-35.

46) **الخضيري ، ميعاد كاظم علي** (2008) . دراسة بكتريولوجية ووراثية للمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين المعزولة من مستشفيات مدينة النجف . رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات . جامعة الكوفة .

47) **Al-Fu'adi, A.H.H.** (2010). Phenotypic and Genotypic (*mecA* gene) of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates in Dewaniya City . M.Sc thesis. Babylon university . College of medicine .

48) **Al-hassnawi, H.H.** (2012) . Molecular Characterization of Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolated from Clinical Cases in Babylon Province . PhD. thesis. College of Medicine.University of Babylon.

49) **Katayama, Y.; Ito, T.; and Hiramatsu, K.** (2000). A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in

55) **Bratu, S.; Eramo, A.; Kopec, R.; Coughlin, E.; Ghitan, M.; and Yost, R.** (2003). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospital nursery and maternity units. *J. Clin. Microbiol.* 45: 56-67.

56) **Barada K, Hanaki H and Ikeda S.** (2007). Trends in gentamicin and arbekacin susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*and the genes encoding aminoglycoside modifying enzymes. J . Infect. Dis. Chem, 13:74-78.

57) **Vinod, M.G.; Shivu, M.M.; Umesha, K.R.; Rajeeva, B.C.; Krohne, G.; Karunasagar, I. and Karunasagar, I.** (2006). Isolation of *Vibrio harveyi* bacteriophage with a potential for biocontrol of luminous vibriosis in hatchery environments. *Aquaculture,* 255: 117–124.

58) **El-Ghoroury , A.A.; Lackany , A.S. ; Mazloum , H.A. and Abbas , A.M.A.**(1972).Principles of medical microbiology , Dar El-Maaref, Cario . 60.

59) **Massound , B.k. ; Talaat ,M.; Omar , N.Y. ; andLackany ,H.S.** (1991). Bacteriophage therapy of chronic *Pseudomonas aeraginosa* infection of the ear .J. Health. Assoc . Egypt.

60) **Brooks , M. ;and Adelberg , E.A.**(1974). Medical microbiology , *Staphylococcus aureus.* Antimicrob. Agents Chemother. 44: 1549-1555.

50) **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).** (2003b). Performance standards for antimicrobial susceptibility tests, 8th ed. Approved standard M 2-A8. NCCLS. Wayne. Pa.

51) **Lee, J. H.** (2003). Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6489-6494.

52) **Barry, A. S.** (2001). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canada progress, priorities and plans. *J. Clin. Microbiol*. 21: 122-127.

53) **Santos, K. R. N.; Teixera, L. M.; Leal, G. S.; Fonseca, L. S.; and Filho, P. P. G.** (1999). DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. *Med. Microbiol.* 48: 17-23.

54) **Deplano, A.; Witte, W.; and van-Leeuwen, W. J.** (2000b). Clonal dissemination of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Belgium and neighboring countries. *J. Clin. Microbiol. Infect.* 6:239-245.

11th ed. , Lang medical publication , California .USA.

61) **Pirnay, J.P.; Matthijs, S.; Colak, H.; Chablain, P.; Bilocq, F.; andVan Eldere, J.** (2005). Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ Microbiol*. 7: 969-980.

62) **Matsuzaki, S.; Rashel, M.; Uchiyma, J.; Ujihara, T.; Kuroda, M.; Ikeuchi, M.; Fujieda, M.; Wakiguchi, J. and Imai, S.** (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother*, 11: 211–219.

63) **Burch, C.L., and Chao, L.** (2004). Epistasis and its relationship to canalization in the RNA virus 6. *Genetics* 167: 559–567.

64) **Abedon, S.T. and Yin, J.** (2008). Impact of spatial structure on phage population growth. *In* S. T. Abedon, ed. Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K. *In press*.

65) **Yongping, S. and Ing-Nang, W.** (2008). Bacteriophage Adsorption Rate and Optimal Lysis Time. *J. genetics*. Vol. 10, No1. 1233-1239.

66) **Rakhuba, D.V.; Kolomites, E.I. and Dey, E.S.** (2010). Bacteriophage receptor, mechanism of phage adsorption and penetration to the host cell. *Polish journal of microbiology*. Vol.59, No 3: 145-155.

67) **Sillankorva, S.; Oliveira, R.; Vieira, M.J.; Sutherland, I. and Azeredo, J.,** (2004). Bacteriophage F S1 infection of *Pseudomonas fluorescens* planktonic cells versus biofilms. *Biofouling* 20: 133-138.

68) **Turner, P.E. and Duffy, S.** (2008). Evolutionary ecology of multiple phage adsorption and infection. *In* S. T. Abedon, ed. Bacteriophage ecology: population growth, evolution, and impact of bacterial viruses. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK. *In press*.

69) **Forde, S.A.; Thompson, J.M.; Holt, R.D. and Bohannan, B.J.M.** (2008). Co evolution drives temporal changes in fitness and diversity across environments in a bacteria–bacteriophage interaction. *J. Evolution*, Vol.62, No.8, pp. 1830–1839.

70) **Guyader, S. and Burch, C.L.** (2008). Optimal Foraging Predicts the Ecology but Not the Evolution of Host Specialization in Bacteriophages. *PLoS ONE* 3(4): 1935-1946.

71) **Al-khozai, Z.M; Al-Khafaf; D.M.R and Al-Hamdani, A.H.O.** (2010). Isolation and Studying of Cholera phage in Al-Diwanyia city and possibility of using it to control *Vibrio cholerae* 01 in laboratory. *J. of Al-*

Qadisiya-Pure science, Vol.4, No. 16, pp. 10-22.

72) **Chapman, M.; Moldovan, E.R. and Wu, X.L.** (2007). On Kinetics of Phage Adsorption. *Biophysical Journal* Vol. 93, P. 303–315.

73) **Wang, J.; Hu, B.; Xu, M.; Yan, Q.; Liu, S.; Zhu, X.; Sun, Z.; Reed, E.; Ding, L.; Gong, J.; Li, G.Q. and Hu, J.** (2006). Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa. International Journal of Molecular Medicine*, Vol. 17, pp 309 - 317, ISSN 1107-3756.

Lactococcus lactis phages. *J. FoodProt.* 65: 1756–1759.

80) **Ebrecht, A.C.; Guglielmotti, D.M.; Tremmel, G.; Reinheimer, J.A. and Suárez, V.B.** (2010). Temperate and virulent *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages: comparison of their thermal and chemical resistance. *Food Microbiol.* 27: 515–520.

81) **Huff, W.E.; Huff, G.R.; Rath, N.C.; Balog, J.M. and Donoghue, A.M.** (2003). Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *E.coli* respiratory infection. *Poult.Sci*, 82:1108-1112.

74) **Leverentz, B.; Conway, W.S.; Janisiewicz, W. and Camp, M.J.** (2004). Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *L.monocytogenes* on honeydew melon tissue. *J. Food Prot.* 67:1682-1686.

75) **Yang, H.; Liang, L.; Lin, S. and Jia, S.** (2010). Isolation and Characterization of a Virulent Bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii. BMC Microbiology*, 10:131, pp 2-10.

76) **Mercanti, D.J.; Guglielmotti, D.M.; Patrignani, F.; Reinheimer, J.A.,**

77) **and Quiberoni, A.** (2012). Resistance of two temperate *Lactobacillu sparacasei* bacteriophages to high pressure homogenization, thermal treatments and chemical biocides of industrial application. *Food Microbiol.* 29: 99–104.

78) **Kutter, E. and Sulakvelidze, A.** (2005). Bacteriophages Biology and Applications, CRC Press.

79) **Suárez, V.B. and Reinheimer, J.A.** (2002). Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Argentinian

*Phages isolated Staphylococcus aureus resistant to methicillin and can be used in bioremediation against hosts

Receved :20/5/2014 Accepted : 13/7/2014

*Hind Fieq Abd Alamer Ziad M. F. AL-Khozai

Biology Department , Collage of Education, Al-Qadissiay University

Hind6658@gmail.com

Abstract :

This study involved the collection of 100 samples of different clinical situations for patients of different ages, reviewed the hospital Diwaniyah general education for the period from November 1220 to February 2013 to investigate Staphylococcus aureus resistance to anti Methicillin. 50 have been diagnosed with the isolation of S.aureus included 18 isolates originating from burns 11 isolates from the cysts and 18 isolates from wounds 2 isolation of lactation and the isolation of one of the ear.

I tested the sensitivity of the isolates to 16 antibiotics, all isolates were resistant to antibiotics Penicillin G and Ampicillin and Amoxicillin Clavulinic acid and by (100%), while the resistance to antibiotics Ceftriaxone and Cefotaxime and Cephalothin rates (77.2%) and (72.7%) and (74.2%) respectively, while the resistance to the anti Erythromycin rate (69.6%), while the resistance of the two anti Gentamicin and Amikacin was proportions (53%) and (48.4%), respectively, while the decreased resistance to antibiotics Clindamycin and Tetracyclin and Chloramphenicol to (48.4%) and (37.8%) and (34.8%), respectively, while the resistance to antibiotics Ciprofloxacin and Imipenem and Meropenem was very low, as was (1.5%) and (3.0%) and (21.2%), respectively, while all isolates were sensitive to anti Vancomycin by (100%).

Been investigating the bacterium Staphylococcus aureus resistance to anti AlMethicillin Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in all S. aureus isolates adult (50) and the isolation of 30 isolates showed a positive result using the center CHROMagar MRSA.

Through this study was to isolate different types of bacteriophagology depending on the difference in the form of Qatar and the gap of the total 100 samples of sewage and studied various properties.

Managed phage bacterial molecules adsorption capacity for the time amounted to a maximum of between 3-5 minutes and has a stillness about 7.5 ± o.5 minutes, Phage molecules that have been highly effective when tested in the resolution of bacterial cells, and that the effectiveness amounted to a maximum of up to two hours of mixing Phage molecules with an implanted bacterial decomposition, while the total time was 5 hours. The calculated data showed that the volume of

blowouts was about 125 ± 18 (phage molecule / cell) at the time of an estimated 5 ± 30 minutes. The results also showed that the unarmed T. bacteria MRSA isolated from sewage were more sensitive to injury Balaathi of isolates isolated from clinical cases. That the effectiveness of molecules Phage reached the highest level of effectiveness in the middle neutral between 6 and 0.5 and 8.5 pH 9 after the event begins to decline. The effectiveness of the molecules Phage has not changed much when temperatures are up to 45°C, while there was a decrease extrusive growing in this event when it was lap bacteriophagology temperatures of 50°C and 60°C and reached the greatest impact on the effectiveness of bacteriophagology at a temperature of 70°C was the end point of effectiveness Phage at a temperature of 70°C after 8-10 minutes. Lower standard of molecules Phage appeared in 6 hours incubation period and increased the standard increase temperatures down to optimal levels.

The results of the DNA extracted from the type of DNA he appeared in one package meaning it is a single chromosome is divided molecular weight (300 Dalton.)

Key world Bacteriophagology , Methicillin , Adsorption , Viruses

Microbiology Classification QR 75-99.5

---

*The research is a part of on M.sc.thesis in the case of the second research