Genetic detection of mecA and mecC genes in MRSA among nasal carries from the medical staff at Tishreen University Hospital, Lattakia

Dr. Haissam Yazigi[*]
Dr. Youssef Zreik[**]
Lama Doya[***]

(Received 18 / 7 / 2024. Accepted 26 / 8 / 2024)

□ ABSTRACT □

Introduction: Staphylococcus aureus has emerged as one of the most important human pathogens and has been leading cause of hospital- and community-acquired infections. MRSA strains pose a major threat to hospital patients because these bacteria may be transmitted by asymptomatic carriers of medical staff working in the hospital. MRSA carrying mecA gene is resistant to most beta-lactam antibiotics. In 2007, a new strain of Staphylococcus aureus containing a gene similar to mecA(mecC) was found in England, leading to diagnostic problems. Accurate and rapid detection of MRSA among health personnel is necessary for prevention and determining effective treatment.

Objective: To detect the mecA and mecC genes among methicillin-resistant isolates of Staphylococcus aureus taken from the nasal carriers of medical staff working in the intensive care unit at Tishreen University Hospital to determine prevalence of MRSA in our hospital and limit it to reduce the material and moral burden of infection borne by health authorities and patients.

Research materials and methods: A cross-sectional descriptive study was conducted in the microbiology laboratory at Tishreen University Hospital - Latakia - Syria and the laboratory of Department of Molecular Biology and Biotechnology at the Syrian Atomic Energy Commission - Damascus. 60 nasal swabs were collected from health personnel working in the intensive care unit at Tishreen Hospital. University. Characterization of bacterial strains for detection of Staphylococcus aureus and detection of MRSA was performed using Cefoxitin by disk diffusion method. The presence of mecA gene and the absence of mecC was confirmed by performing a mutiplexPCR assay **Results:** Among 60 nasal swabs taken from health staff working in the intensive care unit at Tishreen University Hospital, there were 24 samples diagnosed as Staphylococcus aureus (40%), and among them there were 20 samples MRSA (83.3%) based on resistance to cefoxitin. 20 mecA positive MRSA samples were 100%, while all samples were mecC negative.

Keywords: multiplexPCR, MRSA, mecA, mecC

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

[*]**Professor - Department of Laboratory Medicine - Faculty of Medicine - Tishreen University - Latakia- Syria**
****Assistant Professor - Department of Laboratory Medicine - Faculty of Medicine - Tishreen University - Latakia – Syria**
*****PhD Student - Department of Laboratory Medicine - Faculty of Medicine - Tishreen University - Latakia - Syria**

الكشف الجيني عن جينات mecA,mecC في المكورات العنقودية المذهبة المقاومة للميتسللين MRSA عند الحملة الانفيين من الكادر الطبي في مشفى تشرين الجامعي اللاذقية

د.هيثم يازجي [*]
د.يوسف زريق [**]
لمى ضويا [***]

(تاريخ الإيداع 18 / 7 / 2024. قبل للنشر في 26 / 8 / 2024)

□ ملخّص □

مقدمة: برزت العنقوديات المذهبة كواحدة من أهم مسببات الأمراض البشرية وكانت السبب الرئيسي للعدوى المكتسبة في المستشفيات والمجتمع. تشكل ذراري MRSA تهديداً كبيراً للمرضى في المستشفى لأنه قد تنتقل الجراثيم عن طريق حملة لاعرضيين من الكادر الطبي العامل بالمستشفى. تعدMRSA الحاملة لجين mecA مقاومة لغالبية الصادات الحيوية المقاومة للبيتالاكتاماز .في عام 2007 تم العثور على سلالة جديدة من العنقوديات المذهبة تحتوي على جين مماثل لmecA هوmecC في إنكلترا مماأدى لمشاكل تشخيصية. الكشف الدقيق والسريع لMRSA بين الكادر الصحي ضروري من أجل الوقاية وتحديد العلاج الفعال .

الهدف: كشف جينات mecC, mecA بين العزلات المقاومة للميتسللين من العنقوديات المذهبة المأخوذة من الحملة الأنفيين من الكادر الطبي العاملين في قسم العناية المشددة في مستشفى تشرين الجامعي لمعرفة مدى انتشار mecA, mecC لدى عزلات MRSA في مشفانا والحد منها لتقليل العبء المادي والمعنوي للعدوى الذي تتحمله السلطات الصحية والمرضى.

مواد وطرائق البحث: أجريت دراسة وصفية مقطعية في مخبر الأحياء الدقيقة في مستشفى تشرين الجامعي –اللاذقية – سوريا و مخبر قسم البيولوجيا الجزيئية والتكنولوجيا الحيوية في هيئة الطاقة الذرية السورية – دمشق . تم جمع 60 مسحة أنفية من الكادر الصحي العامل في شعبة العناية المشددة في مستشفى تشرين الجامعي . تم إجراء توصيف للسلالات الجرثومية للكشف عن المكورات العنقودية المذهبة والتحري عن MRSA باستخدام Cefoxitin بطريقة الانتشار القرصي.تم الكشف عن وجود جين mecA و mecC بواسطة إجراء مقايسة mutiplexPCR.

النتائج : من بين 60 مسحة أنفية مأخوذة من الكادر الصحي العامل في شعبة العناية المشددة في مستشفى تشرين الجامعي، كان هناك 24عينة شخصت بأنها مكورات عنقودية مذهبة بنسبة (40%) ، ومن بينها كان هناك 20 عينةMRSA بنسبة 83,3% اعتماداً على المقاومة للسيفوكسيتين ، بلغت الإيجابية في عينات MRSA ل mecA 20 عينة بنسبة 100% بينما كانت كل العينات سلبية mecC.

الكلمات المفتاحية: multiplexPCR,MRSA,mecA,mecC،

حقوق النشر :مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

[*] أستاذ – قسم الطب المخبري- كلية الطب البشري- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية
[**]مدرس – قسم الطب المخبري- كلية الطب البشري- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية
[***]طالبة دكتوراه – قسم الطب المخبري- كلية الطب البشري- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية

مقدمة:

تشكل حالات العدوى التي تسببها العنقوديات المذهبة مصدر قلق وخطر على الصحة العامة في جميع أنحاء العالم . تعد المكورات العنقودية المذهبة واحدة من أهم مسببات الأمراض البشرية الرئيسية وهي مسؤولة عن حالات العدوى التي تتراوح من الخفيفة إلى المهددة للحياة.(1)

تظهر المكورات العنقودية المذهبة بشكل متزايد مقاومة للصادات الحيوية المتعددة .(2) كان يستخدم لعلاج عدوى المكورات العنقودية المذهبة الميتسللين الذي ظهر لأول مرة عام 1959 وخلال فترة وجيزة من عام 1961 ظهرت أول سلالة مكورات عنقودية مذهبة مقاومة للميتسللين MRSA في لندن .(3) يمكن لجرثومةMRSA استعمار مواقع متعددة من جسم الإنسان ولكن في معظم الأحيان تستعمر فتحات الأنف الأمامية عند حوالي 30–50% من الأشخاص الطبيعيين إضافة إلى ذلك يمكن أن يكون المضيف اللاعرضي مسبباً لمجموعة واسعة من العدوى من خلال انتقال الجراثيم منه للآخرين .(4) كما يشكل الاستعمار الأنفي للمكورات العنقودية المذهبة المقاومة للميتسلين MRSA عامل خطر لعدوى لاحقة عند الحملة الأنفيين عند ضعف مناعة المضيف (5).

تُمنح المقاومة في MRSA عن طريق اكتساب عنصر وراثي متنقل هوSCcmec (كروموسوم كاسيت المكورات العنقودية المذهبة ميك) الذي يحمل جين mecA الذي يشفر بروتين ربط البنسلين PBP2A مما يؤدي إلى تقليل الألفة لصادات البيتا لاكتام. ونتيجة لذلك يستمر الاصطناع لجدار الخلية الجرثومية في سلالات MRSA حتى مع وجود مستويات مثبطة لصادات بيتالاكتام .)6،7)

في عام 2007 تم العثور على سلالة جديدة من العنقوديات المذهبة تحتوي على جين مماثل ل mecA هو mecC في عزلة أخذت من خزان حليب جنوب غرب إنكلترا والتي منحت مقاومة لصادات بيتا لاكتام مع تشابه تسلسلي بنسبة 70% مع جين (8) . mecA وفي وقت لاحق تم عزل MRSA mecC من 14 نوعاً مختلف من الحيوانات الأليفة والبرية وفي مجموعة من حالات العدوى لدى البشر.(9)

يشفر جين mecC بروتين ربط البنسلين PBP2C الذي يختلف عن PBP2A من حيث خصائصه الرابطة للبيتا لاكتام ونشاطه الذي يعتمد على الحرارة حيث ينخفض نشاطه في درجة حرارة 37°C ولديه أربع مرات روابط أقوى للأوكساسيلين من PBP2a، لذلك عُرف 11 سلالة MRSA حاوية على جين MecC لديها حساسية للتراكيز المنخفضة من صادات البيتا لاكتام. (10)

تسعى هذه الدراسة إلى كشف جينات mecA ,mecC بين العزلات المقاومة للميتسللين من العنقوديات المذهبة المأخوذة من الحملة الأنفيين من الكادر الطبي العاملين في قسم العناية المشددة في مستشفى تشرين الجامعي بطريقة multiplex PCR

المواد والطرائق: Materials and Methods:

1. جمع العينات Sample collection:

تم أخذ 60 مسحة أنفية بواسطة ماسحة قطنية جافة معقمة من العاملين الأصحاء بدون أعراض سريرية في وحدة العناية المشددة في مستشفى تشرين الجامعي لعزل العنقوديات المذهبة . تم جمع العينات بغض النظر عن العمر والجنس . تم اختبار هذه العينات في ظروف معقمة في قسم المخبر.

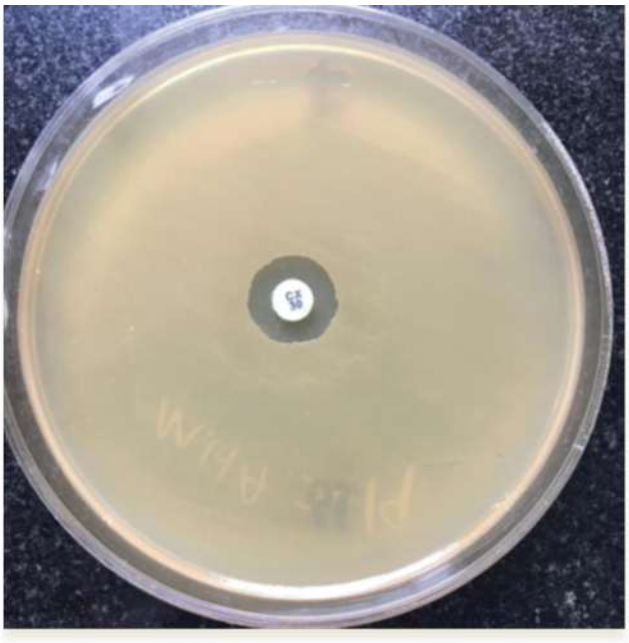
2. مكان إجراء الدراسة: أجريت الدراسة العملية في مخبر الأحياء الدقيقة في مستشفى تشرين الجامعي –اللاذقية – سوريا و مخبر قسم البيولوجيا الجزيئية والتكنولوجيا الحيوية في هيئة الطاقة الذرية السورية – دمشق.

3 توصيف السلالات الجرثومية:

تم إجراء اختبارات جرثومية للكشف عن وجود المكورات المذهبة . زرعت العينات على أغار الدم لمدة 24 ساعة هوائياً للتحقق من نمط انحلال الدم (B) . تم تحديد هوية الجرثوم من خلال مراقبة أشكال المستعمرات وتلوين غرام. تم إجراء اختبارات البيوكيميائية التقليدية بمافيها الكاتالاز و الكوأغيولاز وتخمر المانيتول للتأكد من أن العنقوديات مذهبة.

تم تحديد عينات MRSA عن طريق زرع سلالات العنقوديات المذهبة على وسط موللر هنتون لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة37° س باستخدام (Cefoxitin (30 µg وفقاً لمعايير CLSI2021)) باستخدام طريقة Kirby-Bauer (طريقة الانتشار القرصي) . (11)

تم تحديد عينات MRSA وتفسير نتائج التحسس عن طريق قياس قطر التثبيط حول القرص Cefoxitin.تم تصنيف العزلة كمقاومة (R) إذا كان قطر منطقة التثبيط ≥ 21 مم وحساساً (S) إذا كان القطر ≤ 22مم، وفقًا لإرشادات CLSI .(11) **الشكل(1)**



الشكل 1 : عزلة عنقوديات مذهبة مقاومة ل Cefoxitin

4. استخلاص DNA وكشفmecA, mecC بواسطة PCR :

تم استخلاص الحمض النووي لكل عينات ال MRSA بطريقة المعتمدة على الآزوت السائل المستخدمة من قبل Hanano et al. 2013 .(12)

تم تصميم بادئات (primers) أمامية وعكسية ل mecA و mecC في هيئة الطاقة الذرية في دمشق بعد البحث من خلال محرك NCBI للتأكد من خصوصيتها . **جدول (1)**

الجدول (1): تسلسل البادئات primers))

الجين	تسلسل البادىء 5'–3'		الحجم (bp)
mecA	TGCTATCCACCCTCAAACAGG AACGTTGTAACCACCCCAAGA		286
mecC	GAAAAAAAGGCTTAGAACGCC GAAGATCTTTTCCGTTTTCAGC		138

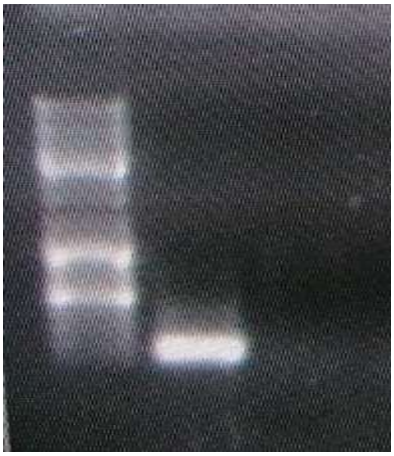
تم إجراء multiplexPCR على حجم نهائي 25 µL حيث تكون مزيج التفاعل من :
2 µL of ،1 µL (10 µM) of dNTPs)،1.5 µL (50 mg/mL) of MgSo4،µL of 10 × buffer 2.5 من 2 µL (100 ng)، 0.5 µL (5 U) Taq polymerase(Thermo Scientific)،each primer (10 µM) DNA المستخلص.

تم إجراء multiplexPCR على جهاز المدور الحراري (TECHNE, USA). وتم برمجة المدور الحراري وفق **الجدول) 2)**

الجدول(2) : مراحل تفاعل PCR

مراحل PCR	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
Initial denaturation	° 95	min 5	
Denaturation	° 95	s 30	cycles 35
Annealing	° 58	s 45	
	° 72	min 10	
Hold	° 4		

تم فصل منتجات PCR بالرحلان الكهربي في هلام الاغاروز بنسبة 1٪ ((Sigma, USA) الذي يحتوي على 1 ميكروغرام / ميكروليتر من الإيثيديوم بروميد وتم تصويرها تحت جهاز نقل الأشعة فوق البنفسجية (UV tec, Korea). **الشكل (2)**



الشكل (2): جين mecA

5.التحليل الإحصائي :

تصميم الدراسة : Observational Descriptive - cross sectional study ،التحليل الإحصائي الوصفي بما في ذلك النسب المئوية للبيانات ، تم اعتماد البرنامج IBM SPSS statistics(Version25) لحساب المعاملات الاحصائية وتحليل النتائج.

النتائج :

من بين 60 مسحة أنفية مأخوذة من الكادر الصحي العامل في شعبة العناية المشددة في مستشفى تشرين الجامعي ، كان هناك 24عينة شخصت بأنها مكورات عنقودية مذهبة بنسبة (40%) ، ومن بينها كان هناك 20 عينةMRSA بنسبة 83,3% اعتماداً على المقاومة للسيفوكسيتين ، بلغت عينات MRSA إيجابية 20 mecA عينة بنسبة 100% بينما كل العينات كانت سلبية mecC.

النتائج والمناقشة :

تعد جرثومةMRSA من العوامل المسببة للأمراض الرئيسية المرتبطة بالعدوى المستشفوية الشديدة وبسبب مقاومتها للأدوية المتعددة فإن خيارات العلاج محدودة.قد يكون الاتصال الوثيق مع العاملين في مجال الرعاية الصحية مصدراً محتملاً لعدوى MRSA المكتسبة في المستشفى حيث من الممكن نقل العديد من السلالات المسببة للأمراض عن طريق التماس مع حامل العدوى (13) لذا يعد الاكتشاف الدقيق والمبكر لمقاومة الميتسللين بين حملة العدوى ذو أهمية كبيرة في تشخيص حالات العدوى بالمكورات المذهبة. يعد جين mecA المعيار الذهبي للكشف عن عزلات MRSA.

أظهرت نتائجنا انتشاراً كبيراً للمكورات العنقودية المذهبة المقاومة للميتسللين بين الحملة الأنفيين من الكادر الطبي (20/60)بنسبة 33% . في دراسة محلية أجريت عام 2015 على الحملة الأنفيين من الطاقم الطبي في مشافي 3 محافظات سورية(13) كان معدل انتشار MRSA 9.4% ربما يعود السبب في اختلاف النسبة بين الدراستين إلى اقتصار الدراسة الأخري على استخدام الطرق التقليدية وظروف الحرب والحصار على سوريا حالياً إضافة إلى الاستخدام العشوائي للصادات الحيوية.أشارت العديد من الدراسات أن نسبة الحمل الأنفي لسلالات MRSA تتراوح بين 16,8%– 9% في جميع أنحاء العالم. (15،14)لايظهر توزع MRSA اختلافات كبيرة على المستوى العالمي فحسب بل يظهر أيضاً اختلافات بين المناطق القريبة جغرافياً. تعتبر منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط منطقة شديدة التوطن بجرثومةMRSA ومع ذلك البيانات الوبائية مقتصرة على البلدان الأوروبية وباقي بلدان جنوب وشرق حوض البحر المتوسط كانت البيانات متناثرة.(17،16)

لم تثبت دراستنا وجود جين mecC في أي عينة MRSA. وكان هناك دراسات عديدة تتشابه مع دراستنا في السودان(18) وتركيا(19) ومصر (20)حيث كان جين mecC سلبياً بينما أظهرت دراسات قليلة وجود جين mecC بين عزلات MRSA حيث أظهر بالي وزملاؤه في كشمير وجود mecC لأول مرة بنسبة 1,2% من 102 عزلة من MRSA (21) كما أظهرت دراسة أجراها خان و زملاؤه في باكستان وجود جين mecCعند 3% من عزلات MRSA (22) . يمكن تفسير عدم كشف جين mecC في دراستنا وكشفه في دراسات أخرى إلى انخفاض حجم العينة لأن انتشار mecCلايزال منخفضاً فلكشفه نحتاج لحجم عينة أكبر.

الاستنتاجات والتوصيات:

- معالجة جميع حملة العنقوديات المذهبة من الكادر الصحي خوفاً من انتقال MRSA إلى المرضى.
- يجب أن التركيز على غسل اليدين الصحي وجميع عمليات التعقيم اللازمة وإجراءات التطهير قبل وبعد التعامل مع المرضى لتخفيف معدل حالات الرعاية الصحية الناجمة عن MRSA ممايخفف العبء المعنوي والمادي للعدوى الذي يتحمله هؤلاء المرضى والسلطات الصحية

Reference

[**1**]- Vieira MA, Minamisava R, Pessoa-Júnior V et al . Methicillin-resistant Staphylococcus aureus nasal carriage in neonates and children attending a pediatric outpatient clinics in Brazil. Braz J Infect Dis, 2014 ;18(1):42-7.

[**2**]- Pourmand MR, Yousefi M, Salami SA, Amini ME . Evaluation of expression of NorA efflux pump in ciprofloxacin resistant Staphylococcus aureus against hexahydroquinoline derivative by real-time PCR. Acta Med Iran, 2014 ;52(6):424-9.

[**3**]- Buzaid N, Elzouki AN, Taher I, Ghenghesh KS. Methicillin-resistantStaphylococcus aureus (MRSA) in a tertiary surgical and trauma hospitalin Benghazi, Libya. J Infect Dev Ctries 2011;13(5):723–6.

[**4**]-. Tejiram S, Johnson LS, Mete M et al . Screening nasal swabs for methicillin resistant Staphylococcus aureus: A regional burn center's experience. Burns, 2017;43(4):771-9.

[**5**]- Ma XX, Sun DD, Wang S et al . Nasal carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among preclinical medical students: epidemiologic and molecular characteristics of methicillin-resistant S. aureus clones. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011;70(1):22-30

[**6**] Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Trends in Microbiology. 2014;22(1):42-47.

[**7**]- Kumurya AS. A potential diagnostic problem: The newly emerging [2] mecC Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus strains. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sci. 2015;10(5):84-93.

[**8**]- Kriegeskorte A, Idelevich EA, Schlattmann A, Layer F, Strommenger B, Denis O, et al. Comparison of different phenotypic approaches to screen and detect mecC- harboring methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol. 2017;56(1):e00826-17

[**9**]- Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Trends in Microbiology. 2014;22(1):42-47.

[**10**]- Milheiriço C, De Lencastre H, Tomasz A. Full-genome sequencing identifies in the geneticbackground several determinants that modulate the resistance phenotype in methicillin-resistantStaphylococcus aureus strains carrying the novel mecC gene. Antimicrob Agents Chemother.2017;61(3). doi:10.1128/AAC.02500-16

[**11**]- Humphries R, Bobenchik AM, Hindler JA, Schuetz AN. Overview of changes to the Clinical and Laboratory Standards Institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st edition. J Clin Microbiol. 2021;59(12):e0021321. doi: 10.1128/jcm.00213-21.

[**12**]- Abdulasamie Hanani, Malek Al-Arfi , Mouhnad Shaban et al .Removal of petroleum-crude oil from aqueous solution by Saccharomyces cerevisiae SHSY strain necessitates at least an inducible CYP450ALK homolog gene.Journal of basic microbiology 2013:54(5):358-368

[**13**]- Yasser M. Tabana, 1Saad S Dahham, 2Bassel Al-Hindi,2Abdulghani Al-Akkad and Mohamed B. Khadeer Ahamed Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) amongMedical Staff in Three Syrian Provinces: Damascus, Daraa and Al-Swayda. Middle-East Journal of Scientific Research 23 (8): 1756-1764, 2015

[**14**]- Alghaithy, A.A., N.E. Bilal, M. Gedebou and A.H. Weily, 2000. Nasal carriage andantibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolates from hospital and non-hospital personnel in Abha, Saudi Arabia. TransR Soc Trop Med. Hyg., 94: 504-7.

[**15**]- Mainous, A.G., W.J. Hueston, C.J. Everett and V.A. Diaz, 2006. Nasal Carriage of Staphylococcus aureus and Methicillin-Resistant S aureus in the United States, 2001-2002. Ann Fam Med., 4(2): 132-7.

[**16**]- Grundmann, H., M. Aires-de-Sousa, J. Boyce, et al 2006. Emergence and resurgence of meticillin resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. Lancet, 368: 874-85.

[**17**]-. Stefani, S., D.R. Chung, J.A. Lindsay, A.W. Friedrich A.M. Kearns, H. Westh and F.M. MacKenzie, 2012 Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) global epidemiology and harmonisation of typing methods. International Journal of Antimicrobial Agents, 39(4): 273-282

[**18**] Elhassan MM, Ozbak HA, Hemeg HA, Elmekki MA, Ahmed LM. Absence of the mecA gene in methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from different clinical specimens in Shendi City, Sudan. Biomed Res Int. 2015;2015:895860. Doi: 10.1155/2015/895860. Epub 2015 Jul 28. PMID: 26290877; PMCID: PMC4531171

[**19**] Cikman A, Aydin M, Gulhan B, Karakecili F, Kurtoglu MG, Yuksekkaya S, et al. Absence of the mecC gene in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from various clinical samples: The first multi-centered study in Turkey. Journal of Infectious and Public Health. 2019;12(4):528-33.

[**20**] Rania AA, Nsreen MK, Rasha HEl, Mona MA. Evaluation for the novel mecC methicillin resistance among methicillin resistant staphylococcal isolates in two Egyptian University Hospitals. Arch Clin Microbiol. 2017;9(1):71.

[**21**] Bali N, Borkakoty B, Bashir H, Nazir S, Wani S, Mir A, et al. Isolation of mecC gene carrying methicillin resistant Staphylococcus aureus in clinical samples from a tertiary care institute, Northern India. J Clin Diag Res. 2021;15(10):DC11-DC15

[**22**] Khan AA, Ali A, Tharmalingam N, Mylonakis E, Zahra R. First report of mecC gene in clinical Methicillin Resistant S.aureus (MRSA) from tertiary care hospital Islamabad, Pakistan. Journal of Infection and Public Health. 2020;13(10):1501-07.