



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة جزيئية وتشخيصية مقارنة لعزلات المكورات العنقودية الذهبية

من مصادر بيئية و مرضية

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة - الاحياء المجهرية

من قبل الطالبة

انسجام يعقوب كاظم الأركي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2015

بإشراف

أ . م . د . غالب أدریس عطية

أ . د . عباس عبود فرحان الدليمي

2017م

1438 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ فَإِذَا بَلَغَ أَجَلَہُنَّ فَأَمْسِكُوہُنَّ بِمَعْرُوفٍ أَوْ
فَارِقُوہُنَّ بِمَعْرُوفٍ وَأَشْہِدُوا ذَوَیْ عَدْلٍ مِّنْکُمْ
وَأَقِیْمُوا الشَّہَادَةَ لِلَّہِ ذَٰلَکُمْ یُعَظُّ بِہِ مَنْ کَانَ یُؤْمِنُ
بِاللَّهِ وَالْیَوْمِ الْآخِرِ وَمَنْ یَّتَّقِ اللَّهَ یَجْعَلْ لَّہٗ مَخْرَجًا ﴿۶﴾ وَیَرْزُقْہُ
مِنْ حَیْثُ لَا یَحْتَسِبُ وَمَنْ یُّتَوَكَّلْ عَلَى اللَّهِ فَہُوَ
حَسْبُہٗ إِنَّ اللَّهَ بِآلِغِ أَمْرِہٖ قَدُ جَعَلَ اللَّهُ لَکُلِّ شَیْءٍ
قَدْرًا ﴿۷﴾ ﴾

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ



ولا يطيب النهار الا بطاعتك...إلهي لا يطيب الليل الا بشركك

ولا تطيب الآخرة الا بعفوك...ولا تطيب اللحظات الا بذكرك

ولا تطيب الجنة الا برويتك (جلّ جلالك)

إلى مُنبَلِّغِ الرِّسَالَةِ وادى الامانة ... ونصح الامة ... الى نبي الرحمة ونور العالمين سيدنا

محمد "صلى الله عليه وسلم"

الى من كَلَّلَهُ اللهُ بالهيبة والوقار ... الى من علمني العطاء بدون انتظار

الى من احمل اسمه بكل افتخار

الى.... روح والدي الطاهرة ...

رحمه الله

إلى ملاكي في الحياة ... الى معنى الحب والحنان والتفاني ... الى بسملة الحياة ... وسر الوجود ... الى من كان دعاؤها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي ... الى الأعلى من انفاسي

امي الحبيبة

الى سندي وقوتي وملذي بعد الله ... الى من آثروني على أنفسهم

الى من أشددهم أزمي ... الى من أظهروا لي ما هو أجمل من الحياة

اخوتي واخواتي

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف المرسلين سيدنا محمد وعلى آله
الطيبين الطاهرين وصحبه أجمعين . وبعد ..
أقدم أسمى آيات الشكر والامتنان والتقدير والمحبة الى الذين حملوا أقدس رسالة في الحياة الى
الذين مهدوا لنا طريق العلم والمعرفة الى جميع اساتذتنا الافاضل
ويسعدني ويشرفني وأنا أنهي كتابة رسالتي أن أتقدم بخالص شكري وتقديري وعرفاني بالجميل الى
أستاذي الفاضل الاستاذ الدكتور عباس عبود فرحان الدليمي ، و الاستاذ المساعد الدكتور غالب
ادريس عطية لاقتراحهما موضوع البحث ومتابعتهما وتوجيهاتهما السديدة طوال مدة البحث داعية
الله أن يوفقهما لما يحبه ويرضاه .
وأقدم شكري وتقديري الى رئاسة قسم علوم الحياة المتمثلة بالأستاذ المساعد الدكتور عمار أحمد
سلطان ، وأستاذة القسم ومنتسبيه ، لما قدموه لي من عون ومساعدة .
وأوجه بوافر الشكر والامتنان الى صديقاتي العزيزات (انفال محمد ، حنان ثامر ، غفران فيصل
، شهد شاكر ، نور جاسم ، سارة ثامر) لما قدموه لي من نصح وارشاد طيلة مدة البحث .
كما أتقدم بالشكر الجزيل الى عمادة المعهد التقني ببعقوبة المتمثلة بالأستاذ المساعد
(الدكتور وضاح عامر حاتم) .
ولا يفوتني ان أشكر زميلاتي وزملائي طلبة الدراسات العليا داعية الله لهم بدوام النجاح والموفقية
واخيرا اقدم شكري العميق الى عائلتي كما اتقدم بالشكر الى اخي العزيز (يحيى) داعية من الباري
(عز وجل) أن يمن عليهم بالصحة والعافية انه سميع مجيب . وأخيراً اتقدم بخالص شكري وامتناني
الى كل من مدّ لي يد العون والمساعدة ولو بكلمة تشجيع او أشعل في طريقي نور الأمل لإتمام
هذه الرسالة .

انسجام

إقرار المشرفين على الرسالة

نشهد بأن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسة جزيئية وتشخيصية مقارنة لعزلات المكورات العنقودية الذهبية من مصادر بيئية ومرضية).التي قدمتها طالبة الماجستير (انسجام يعقوب كاظم) قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية .

التوقيع :

التوقيع :

المشرف : أ.م. د. غالب أدریس عطية

المشرف : أ. د. عباس عبود فرحان الدليمي

كلية التربية للعلوم الصرفة

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم الكيمياء / جامعة ديالى

قسم علوم الحياة / جامعة ديالى

التاريخ : / / ٢٠١٨

التاريخ : / / ٢٠١٨

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الأسم : أ . م . د. عمار أحمد سلطان

رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / ٢٠١٨

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم العلمي

أشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسة جزيئية وتشخيصية مقارنة لعزلات المكورات
العنقودية الذهبية من مصادر بيئية و مرضية) التي قدمتها طالبة الماجستير (انسجام يعقوب
كاظم) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية من قبلي .

التوقيع:

الأسم: محمد عبد الدايم صالح

اللقب العلمي : الاستاذ الدكتور

التاريخ: ٢٠١٨ ١ ١

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسة جزيئية وتشخيصية مقارنة لعزلات المكورات
العنقودية الذهبية من مصادر بيئية و مرضية) التي قدمتها طالبة الماجستير (انسجام يعقوب
كاظم) قد تمت مراجعتها من قبلي.

التوقيع:

الاسم : أنتصار يونس مهيبي

اللقب العلمي : المدرس الدكتور

التاريخ : ١ ٢٠١٨

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن رئيس وأعضاء لجنة المناقشة نقر بأننا إطلعنا على رسالة الماجستير الموسومة بـ : (دراسة جزيئية وتشخيصية مقارنة لعزلات المكورات العنقودية الذهبية من مصادر بيئية و مرضية) المقدمة من قبل الطالبة (انسجام يعقوب كاظم منصور الاركي) وقد ناقشناها في محتوياتها وفي ماله علاقة بها ونعتقد إنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية بتقدير () .

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. عمار احمد سلطان

التاريخ : / / ٢٠١٨

عضوا

التوقيع :

الاسم : أ.د. عباس عبود فرحان

التاريخ : / / ٢٠١٨

عضوا و مشرفا

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. كريم ابراهيم مبارك

التاريخ : / / ٢٠١٨

عضوا

التوقيع :

الاسم : أ.د. محمد شمخي جبر

التاريخ : / / ٢٠١٨

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. غالب ادريس عطية

التاريخ : / / ٢٠١٨

عضوا و مشرفا

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

التوقيع :

أ.م.د. نصيف جاسم محمد الخفاجي

عميد كلية التربية للعلوم الصرفة / وكالة

التاريخ : / / ٢٠١٨

الخلاصة :

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص 60 عزلة بكتيريا توزعت العزلات بين *Bacillus subtilis* والتي كانت الأكثر شيوعا حيث شخّصت 14 عزلة ، تلتها *Staphylococcus epidermidis* التي شخّصت 13 عزلة ، ثم *Bacillus cereus* اذ شخّصت في 11 عزلة بينما شخّصت 10 عزلات *Staphylococcus aureus* ، وشخّصت 7 عزلات لبكتريا *E.coli* ، بينما شخّصت 5 عزلات لبكتريا *Bacillus sphaericus* ، للفترة من 1/11/2016 ولغاية 1/2/2017 من أصل 16 عينة تم الحصول عليها من مصادر بيئية مختلفة (تربة ، مياه) تم الحصول على عينات التربة (الزراعية و غير الزراعية) من 5 مواقع مختلفة شملت عينات تربة (مندلي ، شهریان ، الوجيهية ، دلي عباس ، بهرز) وتم الحصول على عينات المياه من 3مواقع مختلفة من نهر مهروت . اذ تم التركيز في هذه الدراسة على البكتريا المرضية *Staphylococcus aureus* ذات التأثيرات الصحية السيئة على الانسان المعزولة من مصادر طبيعية (تربة ، مياه) ومقارنتها مع *Staphylococcus aureus* مرضية معزولة من مصادر سريرية مختلفة تضمنت عينات (الادار ، اخماج الجروح ، الحروق) من مستشفى بعقوبة التعليمي .

لقد أظهرت نتائج التحري عن عوامل الضراوة لبكتريا *Staphylococcus aureus* ان جميع عزلات *S. aureus* البيئية و *S. aureus* المرضية لها القابلية على انتاج الهيموليسين بنسبة 100% ، بينما كانت 6 عزلات بنسبة 60% تعود للنوع *S. aureus* البيئية و 8 عزلات بنسبة 80% تعود للنوع *S. aureus* المرضية لها القابلية على انتاج انزيم البروتيز ، اما بالنسبة لانتاج اللايبيز فكانت 2 عزلة بنسبة 20% تعود *S. aureus* البيئية و 8 عزلات بنسبة 80% تعود *S. aureus* المرضية لها القدرة على انتاجه ، اما بالنسبة للسفافيولوكاينيز فكانت 7 عزلات بنسبة 70% تعود *S. aureus* البيئية و 8 عزلات بنسبة 80% تعود *S. aureus* المرضية لها القدرة على انتاجه ، اما انتاج اليوريز فكانت جميع عزلات *S. aureus* البيئية و *S. aureus* المرضية بنسبة 100% لها القدرة على انتاجه ، وبالنسبة لانتاج البكتريوسين فكانت جميع عزلات *S. aureus* البيئية ليس لها القدرة على انتاجه و 2 عزلة وبنسبة 20% تعود *S. aureus* المرضية لها القدرة على انتاجه ، وبالنسبة لانتاج الغشاء

الحيوي فكانت 2 عزلة وبنسبة 20% تعود *S.aureus* البيئية و 10 عزلات بنسبة 100% تعود *S.aureus* المرضية لها القدرة على تكوينه ، اما بالنسبة لانتاج الانزيم المخثر للبلازما فكانت جميع عزلات *S.aureus* البيئية و *S.aureus* المرضية بنسبة 100% لها القدرة على انتاجه .

تم التحري عن حساسية العزلات تجاه ثمانية مضادات حيوية ، وقد اظهرت النتائج ان مقاومة عزلات *S.aureus* البيئية لمضاد Tobromycin ، Gentamicin و Amikacin كانت بنسبة 40% بينما كانت مقاومة *S.aureus* المرضية بنسبة 80% على التوالي لنفس المضادات ، اما مقاومة عزلات *S.aureus* البيئية لمضاد Trimethoprim sulfamethoxazole فكانت بنسبة 20% ولعزلات *S.aureus* المرضية بنسبة 100% ، بينما كانت جميع عزلات *S.aureus* البيئية غير مقاومة لمضاد Doxycycline بينما كانت المقاومة لهذا المضاد لعزلات *S.aureus* المرضية بنسبة 20% ، وقد اظهرت النتائج ان عزلات *S.aureus* البيئية مقاومة لمضاد Azithromycin بنسبة 40% بينما كانت جميع عزلات *S.aureus* المرضية مقاومة و بنسبة 100% ، بينما كانت مقاومة العزلات لمضاد Nalidixic acid بنسبة 60% لكلا النوعين ، اما مقاومة عزلات *S.aureus* البيئية لمضاد Ciprofloxacin فكانت بنسبة 20% ولعزلات *S.aureus* المرضية بنسبة 60% .

تم استخلاص الدنا الكلي للعزلات البكتيرية لبكتريا *S.aureus* البيئية والمرضية (4) عزلات باستعمال عدة استخلاص (Mini DNA Bacteria Kit) المجهز من قبل شركة Bioneer إذ كانت نقاوة الدنا المستخلص تتراوح ما بين (2-1.8) لجميع العينات المختارة . أُجري تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction) PCR من خلال استعمال عدة البوادي المتخصصة التي تستهدف التسلسل النوعي للجين التشخيصي 16srRNA ذي الوزن الجزيئي 1400 زوج قاعدي ، والتسلسل النوعي لجين *femA* ذي الوزن الجزيئي 509 زوج قاعدي ، والتسلسل النوعي لجين *nuc* ذي الوزن الجزيئي 397 زوج قاعدي . رحلت نواتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز 1% ولوحظ ظهور حزمة واحدة في جميع المسارات في الهلام بالمستوى نفسه بالنسبة للجين . بينت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وباستعمال بادى متخصص لجين 16srRNA ان جميع العزلات تحتوي على هذا الجين وبنسبة 100%

وبنفس الوزن الجزيئي 1400 زوج قاعدي ، بينما أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وباستعمال بادى متخصص لجين *femA* ان من بين (2) عزلة تعود الى *S.aureus* المرضية كانت عزلة واحدة تحتوي على هذا الجين

وبنسبة (50%) وبنفس الوزن الجزيئي 509 زوج قاعدي ، في حين كانت (2) عزلة تعود *S.aureus* البيئية لا تحتوي على هذا الجين وبنسبة 100% .

كما أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وباستعمال بادى متخصص لجين *nuc* ان من بين (2) عزلة تعود الى *S.aureus* المرضية كانت عزلة واحدة تحتوي على هذا الجين وبنسبة (50%) وبنفس الوزن الجزيئي 397 زوج قاعدي ، في حين كانت (2) عزلة تعود *S.aureus* البيئية لا تحتوي على هذا الجين وبنسبة 100% .

المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
الفصل الاول : المقدمة		
1	المقدمة	1
الفصل الثاني : استعراض المراجع		
6	Literature review استعراض المراجع	2
6	Staphylococci المكورات العنقودية	1.2
6	General Characteristic of Staphylococci الصفات العامة للمكورات العنقودية	1.1.2
8	<i>Staphylococcus aureus</i> المكورات العنقودية الذهبية	2.2
9	Epidemiology وبائية المكورات العنقودية الذهبية	1.2.2
11	Pathogenicity امراضية المكورات العنقودية الذهبية	2.2.2
13	Virulence factore staphylococci عوامل الضراوة لبكتريا المكورات العنقودية	3.2
13	Haemolysin production انتاج الهيموليسين	1.3.2
13	Protease Production انتاج البروتيز	2.3.2
14	Lipase production انتاج اللايبيز	3.3.2
14	Staphylokinase production انتاج الستافيلوكاينيز	4.3.2
14	Biofilm production انتاج الغشاء الحيوي	5.3.2
15	Bacteriocin production انتاج البكتريوسين	6.3.2
16	Coagulase production انتاج الانزيم المخثر للبلازما	7.3.2
17	Antibiotics مضادات الحياة	4.2
17	Chemical structure of Antibiotic التركيب الكيميائي لمضادات الحياة	1.4.2
18	Antibiotic Resistant for <i>Staphylococcus</i> مقاومة المكورات العنقودية لمضادات الحياة	5.2
19	Polymerase chain Reaction تقنيّة التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا	6.2

21	التشخيص الوراثي للبكتريا بواسطة جين 16srRNA والتحري عن جينات المقاومة <i>nuc</i> و <i>femA</i>	7.2
21	جين 16srRNA	1.7.2
22	جين <i>femA</i>	2.7.2
23	جين <i>nuc</i>	3.7.2
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل		
23	المواد وطرائق العمل Materials & Methods	3
24	الاجهزة والمواد المستعملة	1.3
28	طرق العمل Methods	2.3
28	طرق التعقيم Sterilization methods	1.2.3
28	المحاليل المستعملة Solutions	2.2.3
28	محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland Standerd	1.2.2.3
29	المحلول الملحي الفسلجي Physiological Saline Solution	2.2.2.3
29	محاليل صبغة كرام Gram Stain Solution	3.2.2.3
29	محلول كلوريد الصوديوم	4.2.2.3
30	المحاليل الخزنية المستعملة في الاختبارات الوراثية	5.2.2.3
31	المحاليل المستعملة في عزل الدنا البكتيري DNA – Extraction Solution	6.2.2.3
32	الانزيمات المستعملة	7.2.2.3
32	المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis Solution	8.2.2.3
33	المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR	9.2.2.3
34	كاشف انزيم الكاتاليز Catalase Reagent	10.2.2.3
35	كاشف الاوكسيديز Oxidase Reagent	11.2.2.3
35	الايوساط الزرعية Culture media	3.3
35	الايوساط الزرعية الجاهزة	1.3.3

35	الاوساط الزرعية التحضيرية	2.3.3
35	Blood agar medium وسط أكار الدم	1.2.3.3
36	Protease Production medium وسط انتاج البروتيز	2.2.3.3
36	Egg-yolk Agar medium وسط أكار صفار البيض	3.2.3.3
36	Staphylokinase production medium وسط انتاج الستافيلوكاينيز	4.2.3.3
37	Congo red medium وسط احمر الكونغو الصلب	5.2.3.3
37	Urea base Agar وسط اكار اليوريا	6.2.3.3
37	Pepton water وسط ماء الببتون	7.2.3.3
38	Collection of Sample جمع العينات	4.3
38	Samples Culture زرع العينات	5.3
39	Identification of bacterial isolates تشخيص العزلات البكتيرية	6.3
39	Morphological characteristics الصفات المظهرية	1.6.3
39	Microscopic characteristics الصفات المجهرية	2.6.3
40	Biochemical Tests الاختبارات الكيموحيوية	3.6.3
42	Preservation of bacterial isolates حفظ العزلات وادامتها	7.3
42	Slant Agar الحفظ قصير الامد	1.7.3
43	الحفظ طويل الامد (الحفظ في الكليسيرول ٢٠ %)	2.7.3
43	التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا <i>Staphylococcus aureus</i>	8.3
43	Hemolysin production اختبار قابلية البكتريا على انتاج الهيمولايسين test	1.8.3
43	Detection of Protease الكشف عن قابلية البكتريا على انتاج البروتيز Production	2.8.3
44	Detection of Lipase الكشف عن قابلية البكتيريا على انتاج اللايبيز production	3.8.3

44	الكشف عن قابلية البكتيريا على انتاج الستافيلوكاينيز Staphylokinase Production	4.8.3
44	الكشف على قابلية البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Production	5.8.3
45	الكشف عن قابلية البكتيريا على انتاج البكتريوسين Bacteriocin Production	6.8.3
45	الكشف عن قابلية البكتيريا على انتاج اليوريز Urease Production	7.8.3
45	اختبار حساسية البكتيريا لمضادات الحياة Antibiotic Suceptibility	9.3
46	استخلاص الدنا البكتيري Bacterial Extraction DNA	10.3
48	الترحيل الكهربائي للدنا البكتيري في هلام الاكاروز Gel Elcetrophoresis	11.3
49	تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)	12.3
50	الظروف المثلى لتضخيم جين 16srRNA و femA و nuc	13.3
الفصل الرابع : النتائج والمناقشة		
52	النتائج والمناقشة Result & Discussion	4
52	توزيع العزلات حسب مصدر العينة	1.4
53	التشخيص Identification	2.4
57	توزيع الانواع البكتيريا حسب مصدر العينة	3.4
59	التحري عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية Detection of some virulance factors of <i>staphylococcus aureus</i>	4.4
59	انتاج الهيمولايسين Haemolysin Production	1.4.4
60	انتاج البروتيز Protease Production	2.4.4
61	انتاج اللايبيز Lipase Prodution	3.4.4
61	انتاج الستافيلوكاينيز Staphylokinase production	4.4.4

62	Urease Production	انتاج اليوريز	5.4.4
62	Bacteriocin Production	انتاج البكتيريوسين	6.4.4
63	Biofilm Production	انتاج الغشاء الحيوي	7.4.4
64	Coagulase	انتاج الانزيم المخثر	8.4.4
66	Antibioti Sensitivity test	اختبار حساسية بكتريا المكورات العنقودية الذهبية لمضادات الحياة	5.4
72		تشخيص بكتيريا <i>Staphylococcus aureus</i> جينيا والتحري عن جينات الضراوة <i>femA</i> و <i>nuc</i> باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل P.C.R	6.4
الاستنتاجات والتوصيات			
78		الاستنتاجات	
79		التوصيات	
المصادر			
80		المصادر العربية	
82		المصادر الاجنبية	
الملاحق			
		ملحق (1) اختبار حساسية عزلات بكتيريا <i>Staphylococcus aureus</i> لمضادات الحياة	
		ملحق (2) انواع البوادي المستعملة في الدراسة	
		ملحق (3) دليل مكونات خليط التفاعل الرئيسي لـ PCR	
		ملحق (4) الدليل الحجمي المستخدم في الدراسة 100pb DNA Ladder	

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	التسلسل
8	التصنيف العلمي للبكتيريا	1.2
24	الاجهزة المستعملة في الدراسة	1.3
25	المواد الكيميائية والبايولوجية	2.3
26	الايوساط الزرعية	3.3
26	الكواشف والمحاليل	4.3
27	اقراص مضادات الحياة	5.3
27	العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة	6.3
28	الانزيمات المستخدمة في عزل الدنا البكتيري	7.3
31	محتويات عدة استخلاص الدنا البكتيري	8.3
34	تتابعات وتراكيز البوادى وحجم الناتج المتوقع لكل بادی	9.3
49	مكونات خليط التفاعل الرئيسي Master Mix	10.3
51	البرنامج الحراري لتضخيم الجينات المستخدمة في الدراسة	11.3
52	توزيع العينات ونوعها وعدد العزلات ونسبها في عينات التربة و المياه	1.4
56	الفحوصات و الاختبارات الكيموحيوية للأنواع البكتيريا المعزولة	2.4
58	توزيع الأنواع البكتيرية ونسبها المئوية حسب مصدر العينة	3.4
59	الاعداد والنسبة المئوية لعزلات بكتيريا <i>S.aureus</i> المعزولة من عينات سريرية مختلفة	4.4
65	اعداد عزلات المكورات العنقودية الذهبية المنتجة لبعض عوامل الضراوة ونسبها المئوية	5.4
71	عدد عزلات المكورات العنقودية الذهبية ونسبة مقاومتها والحساسية لمضادات الحياة	6.4

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	التسلسل
75	الترحيل الكهربائي لنواتج جين 16srRNA على هلام الاكاروز باستخدام تقنية PCR لبكتريا <i>S. aureus</i>	1.4
76	الترحيل الكهربائي لنواتج جين <i>femA</i> على هلام الاكاروز باستخدام تقنية PCR لبكتريا <i>S. aureus</i>	2.4
77	الترحيل الكهربائي لنواتج جين <i>nuc</i> على هلام الاكاروز باستخدام تقنية PCR لبكتريا <i>S. aureus</i>	3.4

قائمة المختصرات

Abbreviation	Key
<i>β-Lactamase</i>	Beta Lactamase
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CONS	Coagulase Negative Staphylococci
COPS	Coagulase Positive Staphylococci
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acitic Acid
MRSA	Methicillin Resistance <i>Staphylococcus aureus</i>
PBPs	Penicillin – Binding Protiens
S.aureus	Staphylococcus aureus
S.epidermidis	Staphylococcus epidermidis
B.subtilis	Bacillus subtilis
B.sphaericus	Bacillus sphaericus
B.cereus	Bacillus cereus
E.coli	Escherchia coli
U.T.I	Urinary Tract Infection

المقدمة

Introduction

١ - المقدمة

Introduction

تُعدّ التربة بيئة ملائمة لنمو أنواع عديدة من الكائنات الحية التي تقطن التربة وتكاثرها والتي تشمل خمس مجاميع رئيسة هي الجراثيم (bacteria) والفطريات (fungi)، الفايروسات (viruses)، الطحالب (Algae)، والابتدائيات (protozoa) (Prescott وآخرون ، 2005) . يختلف محتوى التربة من المجاميع الجرثومية إذ تحتوي على الأجناس المؤكسدة للكبريت والمثبتة للنيتروجين والجراثيم المرضية والجراثيم المنتجة للمركبات المضادة للمايكروبات وفي التربة تلعب الجراثيم دوراً في تحليل المركبات الكيميائية وفي دورات العناصر في الطبيعة وإعادتها إلى التربة مثل دورات الكربون والنيتروجين والفسفور والكبريت (Nester وآخرون ، 2001) . ومن الأنواع الجرثومية في التربة تلك التي تمتلك القابلية لتحليل المركبات العضوية عندما تكون الرطوبة عالية كالأنواع *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis*، والجراثيم المثبتة للنيتروجين والتي تكون بنوعين أما النوع المثبت للنيتروجين بصورة تكافلية مثل أفراد الجنس *Rhizobium* الذي يعيش على جذور النباتات البقولية والأنواع المثبتة للنيتروجين بصورة لا تكافلية إذ تعيش بصورة حرة مثل الأجناس *Flavobacterium*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter*, *Gluconobacteria*, *Agrobacterium* (Rodgers ، 1987). فضلاً عن أنواع لها القابلية لإنتاج مواد محددة لنمو أنواع أخرى من الجراثيم مثل *Bacillus megaterium* إذ يعمل على كبح نمو الفطريات الممرضة للنبات مثل *Rhizoctonia* و *Pseudomonas fluorescens* الكابحة لنمو *Alternaria helianthi* الممرض لنبات زهرة عباد الشمس وأنواع جرثومية ضمن الجنس

Actinomycetes كأفراد الجنس *Streptomyces* المنتج للمضادات الحيوية (Prescott وآخرون ، 2005).

كما أصبحت مياه الشرب المصدر الرئيسي لحالات الإصابة بالأمراض المختلفة ، مثل التاييفويد والكوليرا والتهاب الكبد الفيروسي وحالات الاسهال الشديد وخاصة لدى الاطفال ومعظم هذه العوامل المرضية تصل الى المياه عن طريق امعاء الانسان والحيوان وخاصة بكتريا القولون colifom والمسبقيات البرازية *Streptococcus faecalis* والبكتريا اللاهوائية *Clostridium perferingens* وهذه الانواع تعايشية طبيعية في الامعاء الغليضة للانسان والحيوان ومن المؤكد انها دلالة على التلوث الحديث للمياه (Meyers ، 1995) . كما ان وجود هذه الانواع من البكتريا وغيرها من العوامل المرضية في مياه الشرب يُعدّ ملوثاً إضافة الى انتقال التلوث عن طريق المياه الجوفية إذ تسمح خزانات المياه القدرة بنفاذ محتوياتها الى التربة المجاورة ومن ثم الى المصادر الاولى للشرب (الشبيب ، 1990) . ولا يُعد وجود كل انواع البكتريا هو مكنم الخطورة وانما يتم التركيز على البكتريا المرضية وخاصة المعوية منها والتي تسبب العديد من الامراض مثل اصابات الجهاز الهضمي ،الذنتري ،التهاب الكبد ،حمى التيفوئيد والكوليرا (Sharon وآخرون ، 2009)

تعد بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococci* من الممرضات المهمة والخطيرة وذلك بسبب قدرتها على احداث انواع مختلفة من الاصابات في انسجة واعضاء مختلفة من الجسم ، وإنّ امراضيتها لها علاقة بقدرتها على انتاج العديد من عوامل الضراوة Virulance Factor والمتمثلة في انتاج اليفانات Toxins والانزيمات خارج خلوية Extracellular enzymes التي تساعد البكتيريا وتمنحها القدرة على التضاعف

والانتشار داخل انسجة المضيف ، إضافة الى مقاومتها العالية والمتعددة لمضادات البيتا لاكتام والامينوكلايكوسايد وهذا بدوره يجعلها من الممرضات الرئيسة المسببة للاصابات بعدوى المستشفيات (Namvar) Nosocomial infection وآخرون ، (2014) .

تُعد بكتيريا المكورات العنقودية واسعة الانتشار في الطبيعة ، إذ توجد في الهواء والتربة وعلى جلد الانسان والاغشية المخاطية والقناة التنفسية وتوجد بشكل نببت طبيعي في انف وبلعوم الانسان ،و تسبب هذه البكتريا اصابات خطيرة من حالات الاصابة الجلدية العميقة وقد تنفذ الى الدم وكافة اعضاء الجسم مسببة تسمم الدم والتهابات صمامات القلب وغيرها من الامراض (Matthew ، 2012) .

إنَّ إِمراضية هذه البكتريا وقدرتها على غزو نسيج المضيف وانتشارها فيه، يعود الى امتلاكها الكثير من عوامل الضراوة كالمحفظة التي تساعد في مقاومة البكتريا لعملية البلعمة ، إضافة الى امتلاكها جدار الخلية الذي يعمل على مقاومة الجهاز المناعي للمضيف (O'Riordan و Lee ، 2004) .

كما تمتلك بعض السلالات طبقة مخاطية تساعد على عملية الالتصاق ، واستيطان الخلية البكتيرية مع خلايا المضيف ، بالإضافة الى قدرتها على انتاج العديد من الذايفانات والانزيمات خارج خلوية التي تساعد البكتيريا في احداث الاصابة . مثل الانزيم المخثر لبلازما الدم الذي يكون له القدرة على تثبيط عملية البلعمة ، فضلا عن قدرتها على انتاج انزيمات اخرى تمثل عوامل انتشار (Spreading Factors) مثل انزيم الستافيلوكاينيز ، والبروتينيز ، واللايبيز التي تسهم في غزو البكتيريا للانسجة ، وانتشار الخمج وتعمل

على انتاج ذيفانات محللة للدم نوع الفا وبيتا وكاما ودلتا ، الى جانب انتاجها ذيفانات معوية تؤدي الى التسمم الغذائي (Ryan و Ray، 2004) .

ان تلوث الجروح والحروق بالبكتريا يعد من المشكلات الصحية التي يتعرض لها المرضى الراقيدين في المستشفى لما تسببه من اخماج تُعرف باخماج المستشفيات Nosocomial infection ومن اكثر المرضى الذي يصابون بهذا النوع من الاخماج هم مرضى العناية المركزة في جميع انحاء العالم ، ولا سيما البلدان الناميّة .

وعلى الرغم من التقدم الحاصل في مجال الرعاية الطبية لمرضى الجروح والحروق فقد كان للمضادات الحيوية منذ اكتشافها الاثر الكبير في خفض معدلات هذه الالصابة ، وقد اعطت نتائج جيدة في علاجها والسيطرة عليها والحد من انتشارها بشكل وبائي ، ولكن سوء استعمال هذه المضادات بشكل غير منتظم وغير مدروس ومن دون اجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية ، ادى الى ظهور العديد من السلالات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية .

إنّ التطور الكبير في علم الاحياء الجزيئي وتقنيّات الهندسة الوراثيّة ادى الى استخدام تقنيّات متطورة وسريعة في الكشف عن جينات الفوعة او المقاومة للمضادات الحيوية والتحري عن العناصر الوراثيّة ذات العلاقة بالامراضية من دون اللجوء الى الطرائق التقليديّة في العزل والتشخيص واختبار الحساسية للمضادات الحيوية (Nassif و Sansonetti، 1986) .

وقد اجريت هذه الدراسة للاحداث الآتية :-

1- عزل وتشخيص البكتريا من عينات التربة والمياه

2- التحري عن بعض عوامل الضراوة للعنقوديات الذهبية البيئية والمرضية .

3- دراسة الحساسية الدوائية لعزلات العنقوديات الذهبية البيئية والمرضية

4- تشخيص البكتريا المعزولة من مصادر بيئية مختلفة جزيئيا باستعمال بواى متخصصة

والكشف عن جينات الضراوة و المقاومة *nuc* و *femA* بواسطة تقنية تفاعل انزيم البلمرة

المتسلسل

.

استعراض

المراجع

Literature Review

Literature Review

2- استعراض المراجع

Staphylococci

1-2 المكورات العنقودية

1-1-2 الصفات العامة للمكورات العنقودية General Characteristic of

Staphylococci

يُعدّ العالم الكسندر أوكستون Alexander ogston أول من أطلق تسمية المكورات العنقودية على بكتيريا *Staphylococcus* وذلك عام 1882 حين شاهدها لأول مرة في القيح Pus الموجود في الخراجات Abscesses وبعدها جاء في عام 1884 العالم Rosenbach الذي قام بعزلها وتتميتها في مزارع نقية ، إذ وصف نوعين من السلالات التي تعود الى هذا الجنس هما *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus albus* التي تعرف حالياً باسم *Staphylococcus epidermidis* (Lin واخرون ، 2011) .

تُعدّ المكورات العنقودية Staphylococci من الممرضات الهامة للإنسان بالإضافة الى كونها من العوامل الملوثة الواسعة الانتشار في المستشفيات . ان سبب تكوينها للعديد من الاصابات في الانسان يعود الى قابليّة بعض انواع هذه المجموعة على اختراق دفاعات الجسم وغزو انسجة الجسم وامتلاكها العوامل التي تزيد من ضراوته (Virulence) ومقاومتها العالية للمضادات الحيوية ، ومن الحالات المرضية المهمة التي تسببها هذه البكتيريا للإنسان هي اخماج القناة البولية (Urinary tract infection) اصابات انظمة نقل السوائل التهابات بطانة القلب،التجرثم الدموي (Bacteremia) متلازمة العدسات

السمية (Toxic lens syndrome) بعد وضع العدسات اللاصقة ، خراج الجلد (Skin abscesses) اصابات العين والاذن والتهاب صمام القلب الولادي (Kloos و Bannermarr، 1995) . تمتاز انواع جنس المكورات العنقودية بانها موجبة لصبغة كرام ، كروية الشكل ، غير متحركة وغير مكونة للابواغ ، عادة موجبة لانزيم الكاتليز ، غير مكونة للمحفظة او انها تكون بشكل محدود . قطر الخلية (0.5 - 1.5) مايكروميتر توجد بشكل خلايا مفردة او مزدوجة او رباعية او على شكل سلاسل قصيرة . ولكن بشكل عام فانها توجد على هيئة عناقيد غير منتظمة تشبه عناقيد العنب (Grape -like shape) وهي تصنف الى مجموعتين رئيسيتين هما موجبة لانزيم التخثر Coagulase – positive staphylococci (COPS) وتمثل المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* او هي الاكثر خطورة والأشد من الناحية الطبية وسالبة الانزيم Coagulase – Negative Staphylococci (CONS) إذ تمثل *S.epidermidis* النسبة الاعلى من بين انواع (CONS) من الناحية الطبية والسريرية والاصابة بعدوى المستشفيات وذلك لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة وقابليتها على تكوين الغشاء الحيوي على السطوح المختلفة (Namvar وآخرون ، 2014) .

Scientific Classification of

التصنيف العلمي للبكتريا

Bacteria

صنفت البكتريا بالاعتماد على (Jawetz وآخرون ، 2007) وكما مبين في الجدول

الاتي :-

جدول (1-2) التصنيف العلمي للبكتيريا

Kingdom	Eubacteria
Phylum	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Bacillales
Family	Staphylococcaceae
Genus	<i>Staphylococcus</i>
Species	<i>Staphylococcus aureus</i>

2-2 *Staphylococcus aureus* المكورات العنقودية الذهبية

تعد بكتريا *S.aureus* من أكثر انواع المكورات العنقودية إمراضية للإنسان وتتميز *S.aureus* عن بقية أنواع المكورات العنقودية بكونها موجبة لانزيم مخثر بلازما الدم (Coagulase) (Collee وآخرون ، 1996) .

وتعرف بكتريا *S.aureus* على انها خلايا كروية الشكل قطرها 1 مايكروميتر تقريبا ، موجبة لصبغة غرام ، غير متحركة (Non motile) ، غير مكونة للسبورات (Non sporforming) وعادة مكونة للمحفظة (Capsulated) (Kenneth ، 2002) . تعتبر بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* جزءا من النبيت الطبيعي للإنسان الا انها تعدّ من الجراثيم التي يمكن ان تسبب اخماجا خطيرة عند حدوث خلل او اصابات في جلد الانسان او اضطرابات في جهازه المناعي مثل التهاب السحايا meningitis وذات الرئة Pneumonia والتهاب شغاف القلب Endocarditis والتهاب المفاصل الرثياني Rheumatoid Arthritis (Ifeanyichukwu وآخرون ، 2015) .

تعيش بكتريا *S.aureus* بصورة طبيعية على الجلد والممرات التنفسية والاعشوية المخاطية ، ومعظم سلالاتها ممرضة للانسان (Irina وآخرون ، 2005) .

Epidemiology

1-2-2 الوبائية

تُعدّ الوبائية من اهم الجوانب التي يجب الاحاطة بها ، ومعرفتها بشكل واف؛ لما لذلك من أهمية للفرد و المجتمع ، و لأجل السيطرة على عوامل الانتشار ، وتصحيح المسارات التقنية في مواجهة المرض والوقاية منه ، اذ تعمل *S.aureus* على استيطان مناطق الجسم المختلفة كالانف والمجاري التنفسية والجلد بشكل طبيعي ، إذ تزداد هذه النسبة لدى الاشخاص العاملين في المستشفيات ، وتعد البكتريا المتوطنة لاكثر من موقع في الجسم أحد أهم مصادر الاخماج الكامنة ، والمشكلة الاساس هي عدم معرفة الرابط بين مواقع استيطان البكتريا وانتاج المرض ، وعلى الرغم من ذلك أمكن معرفة بعض السلالات التي تمتلك قدرة كامنة على انتاج المرض ، ولكن لا توجد وسيلة للتنبؤ بالسلالات التي قد تتحول الى سلالات مرضية (Fluit وآخرون ، 2001) .

تُعدّ المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* في حالاتها الطبيعية جزءاً من النبيت الطبيعي للانسان اذ توجد على سطح جلد الانسان والاعشوية المخاطية والماء والمنتجات الغذائية كما انها تسبب التهاب الجروح واصابات مجرى الدم وتعد *S. aureus* من الممرضات الانتهازية التي تصيب الانسان والحيوان والمسببات الرئيسة لعدوى المستشفيات (Ugwu وآخرون ، 2013 ; Thati وآخرون ، 2011) .

ان نسبة الاشخاص الحاملين Carriers للنوع *S. aureus* في مقدمة مناخرهم تقدر بـ 30% الا انها تعد من الجراثيم التي يمكن ان تسبب اخماج خطيرة عند حدوث خلل

او اضطرابات في دفاعات جسم العائل المناعية وتزداد هذه النسبة لدى الاشخاص العاملين في المستشفيات (Tong وآخرون ، 2012) .

يكون اكتساب اخماج المجتمع تلقائياً بواسطة السلالات المحمولة في فتحتي الانف ، او على سطح الجلد ، او كليهما ، أما أخماج المستشفى فمن الممكن ان تحدث من خلال اكتساب خلية مفردة من سلالات بكتريا *S.aureus* الشائعة الوجود لدى المرضى الذين خضعوا لعمليات جراحية، او المصابة الممخجين بتلك البكتريا (Bratu وآخرون ، 2003 (.

من اهم مصادر انتشار الاخماج هم المرضى المصابين بالتقرحات الممخجة التي قد تنتقل مباشرة الى المرضى الآخرين عن طريق أيادي الاشخاص العاملين في المستشفى ، وتعد المستشفيات مصدرا رئيسا للاصابات الشديدة التي تتحول بعد حصول عملية الشفاء الى حالات كامنة ،وغالبا ما تتحول البكتريا من الحالة الفعالة الى بكتريا محمولة صامتة (silent) مما يساعدها على الانتقال الى البيئة المحيطة والتوسع في الانتشار (Warshawsky وآخرون ، 2000) .

إذ اثبتت نتائج العديد من الدراسات ازدياد معدل الوفيات بسبب بكتريا *S.aureus* وخاصة في الولايات المتحدة الامريكية وبريطانيا واليابان بسبب امتلاكها للعديد من عوامل الضراوة ، فضلا عن ذلك مقاومتها للعديد من مضادات الحياة (Iwase وآخرون، 2010) .

2-2-2 الأمراض

Pathogenicity

تُعدُّ المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* من الممرضات الهامة والخطيرة في أحداث أنواع مختلفة من الاصابات وأكثرها أهمية من الناحية السريرية، وإن أمراضيتها مرتبطة بقدرتها على إنتاج العديد من عوامل الضراوة التي تشمل اليفانات والانزيمات الخارج خلوية ، مما يعطي البكتريا القدرة على التضاعف والانتشار داخل أنسجة المضيف، فضلا عن مقاومتها العالية المتعددة لمضادات الحياة ولاسيما التي تعود لمجموعة البيتالاكتام والامينوكلايكوسايد (Marcus، 2005) .

من أهم تلك اليفانات هو اليفان الحال لكريات الدم الحمراء α -Hemolysin الذي يُعدُّ من أهم عوامل ضراوة البكتريا اذ يمتاز بقدرته على أحداث الثقوب في الجدران الخلوية للخلايا مما يسهل انتشار البكتريا في أنسجة المضيف ويزيد من أمراضيتها ، وتسهم انزيمات البيتالاكتاميز β -Lactamase التي تملكها بكتريا المكورات العنقودية في مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية (Qin وآخرون، 2013) .

بلغت نسبة أمراضية *S.aureus* مايقارب 80% من الأمراض القححية المسجلة في المراكز الطبية المنتشرة في انحاء العالم كافة لا سيما المرضى الراقدين في المستشفيات ممن يعانون ضعفا في ميكانيكية دفاعات الجسم (Zhu وآخرون ، 2014) .

ان حدوث الإصابة بهذا النوع من البكتريا يكون عند دخولها الى الأنسجة وذلك عن طريق الجروح Wounds او عن طريق الخدوش Abrasions او عن طريق ملامستها لسطح الأنسجة الجلدية للعائل اذ تُحدث اضطرابا وخللا في هذه الأنسجة وذلك عن طريق افرازها لعدد من الانزيمات منها Lipase المحلل للدهون وانزيم

Hyaluronidase الذي يساعد البكتيريا على الانتشار وتحطيم المادة الاساس للنسيج

الرابط (Janstova وآخرون ، 2012) .

تسبب هذه البكتيريا العديد من الحالات المرضية للإنسان ، ومن اهم هذه الحالات هي اخماج القناة البولية (UTI) Urinary Tract Infection ومتلازمة العدسات السميّة Toxic Lens Syndrom بعد وضع العدسات والتهاب بطانة القلب والتجرثم الدموي وخراجات الجلد والتهاب صمام القلب الولادي (McGrath و Asmar ، 2011) . ويمكن القول إن ايدي الكادر الطبي الملوثة في المستشفيات تلعب دوراً هاماً في انتقال وانتشار عدوى الاصابة MRSA الى الاجهزة والوحدات الطبية وخصوصاً اجهزة القسطرة والغسيل الكلوي (Shakibaie وآخرون ، 2014) .

كما تنتج بكتريا *S.aureus* العديد من الاصابات الالتهابية غير المباشرة مسببة بذلك حدوث التسمم الغذائي (food poisoning) نتيجة لتلوث الغذاء بالذيفانات المعوية التي تنتجها ، ومن ثم حصول حالات حادة من التقيؤ الشديد والاسهال الذي قد يمتد من ساعة الى خمس ساعات وتكون الاصابة عادة من دون حمى وسريعة الشفاء فيما عدا الاشخاص المسنين والاشخاص المصابين بأمراض أخرى فيكون طريقهم الى الشفاء أبطأ قليلاً (Boynukara وآخرون ، 2007)

فضلاً عن قدرة البكتيريا على اصابة الحيوانات خاصة الابقار مسببة التهاب الضرع Mastitis (Albert ، 2000 ؛ Pamela وآخرون ، 2001) .

3-2 عوامل الضراوة لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية Virulence factors

staphylococcus aureus

Haemolysin production

1-3-2 انتاج الهيموليسين

يُعدّ انتاج الهيموليسين من انواع الذيفانات Toxins التي تفرزها بكتريا المكورات العنقودية او هو احد انواع البروتينات المفزة من الاجناس البكتيرية المرضية الذي يسهم في احداث الامراضية بشكل ناجح ، اذ يقوم بتحليل كريات الدم الحمراء Erythrocytes والصفائح الدموية Platelets ، وهناك اربعة انماط من التحلل الدموي وهي الفاهيموليسين (Alpha) الذي يعمل على نخر الجلد والاعصاب وبيتاهيموليسين (Beta) (الذي يؤثر على عملية الفسفرة وتحطيم الغشاء الخلوي لمختلف انواع الخلايا و كاماهيموليسين (Gamma) الذي يسبب تحلل خلايا اللبائن وخلايا الدم الحمراء والتركيب داخل خلوية والعضيات ودلتا هيموليسين (Delta) (Pinheiro واخرون، 2015) .

Protease Production

2-3-2 انتاج البروتيز

يُعدّ من الانزيمات الخارج خلوية Extracellular enzymes التي تقوم بكتريا المكورات العنقودية بافرازها ، ويلعب دورا في امراضيتها إذ له القدرة على تحطيم وهدم الببتيدات ضد المايكروبيّة Antimicrobial peptides المنتجة من قبل خلايا المضيف ، ويعمل على تحلل العناصر البروتينية الداخلة في تركيب الخلايا ، فضلا عن دوره في فلق الجسم المضاد من نوع IgG ومنع نشوء من خلال تحطيم السلاسل الثقيلة (Bizye واخرون، 2014)

Lipase production

2-3-3 انتاج اللايبيز

يعدّ انتاج Lipase من الانزيمات الخارج خلويّة إذ يعمل على تحليل الدهون الثلاثيّة Triacylglycerol acylhydrolases عن طريق كسر وتحطيم اصرة الاستر التي تربط جزيئات الشحم والماء الموجودة في الدهون الثلاثية مكوناً احماضاً شحميّة حرة Free acids fatty وجليسرول glycerol (Kalyani و Saraswathy، 2014).

تستطيع بكتريا المكورات العنقوديّة انتاج انزيم اللايبيز وهو عامل امراضي اذ يعمل على التداخل مع الخلايا البلعميّة ومنع عملية الابتلاع phagocytosis مانعا بذلك الاستجابة المناعية التي تظهرها هذه الخلايا ضد المكورات العنقوديّة وغيرها من البكتريا المرضيّة المنتجة لهذا الانزيم (Winny وآخرون، 2012) .

Staphylokinase production

2-3-4 انتاج الستافيلوكاينيز

ان من الانزيمات التي تمتلكها بكتريا Staphylococci انزيم Staphylokinase الذي له القابلية على تحليل خثرة الليفين Fibrin clot وهذا بدوره يسمح للبكتريا بالانتشار خلال انسجة العائل من جروح وحروق وخدوش مما يؤدي الى حدوث التهابات جلديّة (Menestrina وآخرون، 2011) .

Biofilm formation

2-3-5 تكوين الغشاء الحيوي

معظم انواع البكتيريا تشكل مجتمعات مصفوفة مغلقة ، او اغشية حيوية والتي تعرف بأل(Biofilm) والذي يمكن تعريفه بأنّه المادة المخاطيّة المتكونة من عديد السكريات الخارجيّة التي تكونها الكائنات المجهرية والتصقت بسطوح داخلية بيئية

وتتكون غالبا من نوع واحد او من عدة انواع بكتيرية تتداخل بعضها مع بعض ومع البيئة التي تعيش فيها ، تتضمن عملية تكوين الغشاء الحيوي للمكورات العنقودية عوامل مشتركة ومتزايدة تجمع بين المضيف والبكتريا (Ali ، 2012) .

يقوم الغشاء الحيوي بتوفير حماية لبقاء الخلايا البكتيرية حية في الظروف القاسية ، وبعد مسؤولاً عن 65% من الاصابات المرضية ، ومنها التهاب الاذن الوسطى والاصابات المتعلقة بالادوات الطبية والتهاب المجاري البولية والتهاب اللثة وتسوس الاسنان (Ansari واخرون ، 2011). وان اهم ما يميز البكتريا داخل الغشاء الحيوي هو امتلاكها درجة عالية من المقاومة لمضادات الحياة (Reitrer واخرون ، 2013) .

Bacteriocin production

2-3-6 انتاج البكتريوسين

عرفت ظاهرة التضاد الميكروبي (Antagonism) بين الكائنات المجهرية منذ زمن بعيد ، وقد أثارت هذه الظاهرة عناية الباحثين منذ أواخر القرن التاسع عشر عندما لاحظ كل من Joubert و Pasture عام 1877 أن لبعض سلالات البكتريا القدرة على افراز مواد سامة ، أو انزيمات محللة ، أو مواد مثبطة لنمو البكتريا (Sarika واخرون ، 2010 Lee واخرون ، 2009) .

توالت بعدها العديد من البحوث والدراسات لتفسير هذه الظاهرة ودرست طبيعة المواد المنتجة وقد عزيت الى التنافس بين نوعين من البكتريا بسبب انتاجها لهذه العوامل المضادة ، وأشار Dejong وجماعته (2006) الى أن البكتريوسينات تُعدّ عوامل مضادة للبكتريا . عُرِفَت البكتريوسينات إنها عبارة عن مركبات ذوات طبيعة بروتينية تمتلك قابلية اباداة العديد من أنواع البكتريا أو الحد من نموها (Todorov ، 2009) .

تتشابه آليات عمل البكتريوسين في تأثيرها في الخلية الهدف مع آليات عمل مضادات الحيوية فقد تعمل على الجدار الخلوي او الغشاء الساييتوبلازمي (Han وآخرون ، 2011) .

ان تأثير البكتريوسين في الخلايا البكتيرية الحساسة يكون قاتلا (bacteriocidal) (Al-Charrakh وآخرون ، 2011) أو مثبطا للنمو (bacteriostatic) (Sarika وآخرون ، 2010) . وان التغيرات التي يحدثها البكتريوسين في الفعاليات الايضية الحيوية للخلايا المعاملة به تعتمد على نوع البكتريوسين وآلية عمله (Balla وآخرون ، 2000) .

coagulase enzyme

2-3-7 الانزيم المخثر للبلازما

يفرز الانزيم المخثر للبلازما من بكتريا *S.aureus* ويُعدّ من الصفات التشخيصية الهامة لهذه البكتريا ، والانزيم عبارة عن بروتين قليل الكربوهيدرات يفرز في طور اللوغاريتمي من النمو البكتيري (Collee وآخرون ، 1996 ; Deepak وآخرون ، 2000) .

الذي يؤدي وجوده الى تجمع الفايبرونجين الموجود ضمن التركيب الكيميائي لبلازما الدم ومن ثم ترسيبه على سطح خلايا بكتريا الـ *S.aureus* على شكل شبكة من الالياف الدقيقة مكونة بذلك الخثرة ، ومن المميزات الهامة لهذا الانزيم تكوينه للاضداد ، اذ يمتلك صفة مستضدية ، والقدرة على تثبيط عملية البلعمة Phagocytosis (Nair وآخرون ، 2000) .

والانزيم المخثر للبلازما نوعان :

- الانزيم المخثر الحر (Free Coagulase) الذي يفرز خارج الخلية ويكشف عنه بفحص الانبوبة Tube Coagulase ، وينتج هذا الانزيم في جميع سلالات *S.aureus* ويشفر بواسطة جين ال *coa* (Schleifer و Kloos ، 1986) .
- الانزيم المرتبط بجدار الخلية (Bound Coagulase) ويكتشف عنه بفحص الشريحة Slid test ويعرف احيانا بالعامل المرتبط (Clumping factor) او عامل التكتل (Collee واخرون ، 1996) .

Antibiotics

4-2 المضادات الحيوية

يمكن تعريف مضادات الحياة على انها مواد كيميائية عضوية منتجة من قبل الاحياء المجهرية المختلفة ولها القدرة على قتل Bacteriocidal او تثبيط Bacteriostatic نمو الاحياء المجهرية الاخرى دون التأثير على خلايا الجسم (Singh واخرون ، 2015) .

1-4-2 التركيب الكيميائي لمضادات الحياة Chemical structure of Antibiotic

Antibiotic

ان التركيب الكيميائي للجزيئة الواحدة من مضاد الحياة تحتوي على ذرات الكربون (C) وهيدروجين (H) وقد تحتوي على كاربون (C) واوكسجين (O) ونيتروجين (N) وهي المجموعة الأكثر شيوعا وهناك ايضا جزيئات مضاد تحتوي على الكبريت (S) والفسفور (P) و تحتوي على مجاميع عضوية فعالة متمثلة في مجموعة الهيدروكسيل (OH) والكاربوكسيل (COOH) والكاربونيل (C=O) وغيرها (Okafor ، 2007)

Antibiotic Resistant for 5-2 مقاومة المكورات العنقودية لمضادات الحياة staphylococcus

ان الاستعمال الواسع والعشوائي لمضادات الحياة في علاج الاصابة بالبكتريا ادى الى نشوء العزلات المقاومة لمضادات البكتريا وظهورها السريع خاصة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* المقاومة لمجموعة البيتا لكتام Beta-Lactam (Sibanda و Okoh ، 2008) .

إذ يشكّل ظهور سلالات بكتيرية مقاومة لمضادات الحياة مصدر قلق في كافة انحاء العالم ، وان ما يزيد المشكلة سوءاً هو ان هذه المقاومة لا تقتصر على مضاد حياتي معين بل تتعداه لتشمل كل المركبات التي تعود للصنف نفسه وهذا ما يسمى بالمقاومة المتعددة للدوية (MDR) Multidrug Resistance (Girou وآخرون، 2006) .

ان مقاومة مضادات الحياة اصبحت مشكلة عالمية حسب تقارير اكدتها منظمة الصحة العالمية اذ اصبح من السهل انتقالها بين البلدان وحتى بين القارات لذلك تم تسمية مقاومة البكتريا لمضادات الحياة بكابوس البكتريا (Nightmar Bacteria) اذ يكتسب في الولايات المتحدة الامريكية حوالي مليوناً شخص إصابات مقاومة لواحد او لاكثر من مضادات الحياة (Frieden ، 2013) .

تجدر الاشارة الى أن البكتريا تكتسب مقاومتها لمضادات الحياة من مصادر خارجية عن طريق الانتقال الافقي للجينات بعملية الاقتران (Conjugation) او التحويل (Transformation) او التوصيل (Transduction) اذ تنتقل الجينات من سلالة مرضية الى اخرى غير مرضية ، او بسبب حدوث طفرات كروموسومية نتيجة الاستعمال

الواسع والعشوائي للمضادات فيؤدي الى ظهور عزلات بكتيرية طافرة تستطيع النمو حتى في تراكيز عالية من مضادات الحياة (Chambers و Deleo، 2009) .

كما تعد مضخات الدفع اهم وسائل المقاومة التي تتخذها بكتريا المكورات العنقودية في مقاومة اصناف مختلفة من مضادات الحياة وتشارك في المقاومة المتعددة للدوية لعدم تخصصها بمواد معينة . يمكن تعريف مضخات الدفع بأنها عبارة عن ناقلات بروتينية تقع في الغشاء الساييتوبلازمي في جميع انواع الخلايا لها القدرة على ازالة وطرح المواد الضارة الى خارج الخلية البكتيرية لذلك تعد وسيلة مقاومة للبكتيريا مثل طرح مضادات الحياة (Jang ، 2016) .

خلال العقود الماضية تم انتاج العديد من مضادات الحياة الا انها لم تؤد الى انخفاض نسبة الاخماج الناتجة عن الجراثيم المرضية وخصوصا *S.aureus* بسبب الكلفة الاقتصادية العالية لتلك المضادات وظهور طرق مقاومة جديدة وفي الوقت الحالي يجري تطوير عدة مضادات حديثة لمكافحة العدوى الناتجة عن سلالات (MRSA) (Rodvold و Mcconeghy ، 2014).

2-6 تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase chain Reaction ان

تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase chain Reaction

(PCR) احد اهم التطورات العملية في الهندسة الوراثية ، اذ حصل مخترعه كيري ميلس Kary mullis على جائزة نوبل سنة 1992 ، تستخدم هذه التقنية في تضخيم اي تسلسل قصير من الـ DNA ، مثلاً جين او قطعة جين ، ذلك لمرات عديدة باستخدام انزيم DNA polymerase ، تعدّ هذه التقنية ذات اهمية عالية في مجال تعريف

الجينات والتلاعب بها ، إذ يتطلب البروتوكول القياسي لهذه الطريقة شريط قالب DNA يحتوي على التتابع المطلوب تضخيمه والمتكون من عشرات أو عشرات الآلاف من النيوكليوتيدات ، و زوج من البوادي primers اللذان يرتبطان بأحد أطراف تسلسل جزيئة الدنا المراد تضخيمها ، وبوجود انزيم Taq DNA Polymerase الثابت حرارياً فضلاً عن محلول داري يمثل وسطاً لاجراء او حدوث التفاعل الذي يحتوي على القواعد النيتروجينية الاربع dNTPs (Nicholl ، 2008)

ان هذه العملية تتم بثلاث خطوات : الاولى تتضمن مسخ (Denaturation) لشريط قالب اي فك شريطيه للسماح للبوادي بالارتباط مع التتابع المكمل لها على شريط قالب ، أما الخطوة الثانية فتضم ارتباط (Annealing) البوادي مع شريطي قالب ، والثالثة التي يطلق عليها بخطوة الاستطالة (Extension) التي يبدأ من خلالها انزيم البلمرة باضافة القواعد النيتروجينية لشريط البادي من النهاية (3'-OH) الحرة (Sambrook و Russell ، 2001) .

يتم الكشف عن نواتج التفاعل باستخدام اكثر من طريقة ، ان اهمها واكثرها استعمالا هي الترحيل الهلامي Gel electrophoresis على هلام الاكاروز تستخدم هذه الطريقة للكشف عن القطع المستهدفة ، ومعرفة حجمها بالمقارنة مع قطع DNA معروفة الحجم والوزن DNA ladder ، وتكون عملية الكشف والاظهار باستعمال صبغات أو مواد مثل بروميد الاثيديوم Ethidium bromide الذي يعطي تألُقاً عند تعريضه للضوء فوق البنفسجي Ultra violet light (الخفاجي وابو المعالي ، 2013).

7-2 التشخيص الوراثي للبكتيريا بواسطة جين 16srRNA و التحري عن جينات المقاومة *femA* و *nuc*.

1-7-2 جين 16srRNA

يستخدم جين 16srRNA بشكل واسع ومتكرر لتشخيص الانواع البدائية Prokaryotic (Jongsik و اخرون ، 2007) ، ويستخدم هذا الجين في تشخيص البكتيريا و تصنيفها و تحديد علاقات القرابة بين الاجناس و الانواع و كذلك معرفة العلاقات بين الشعب القديمة جدا (Garrrity و Holt ، 2001) .

تأتي اهمية جين 16srRNA من كونه يشكل جزءاً اساسياً من وظائف الخلية إذ تحتاجه الخلية لصنع الانزيمات التي تقوم بعملية هدم سكر اللاكتوز لتحرير الطاقة و اذا لم يوجد هذا الجين في الخلية فإن البكتيريا تستخدم البروتين او سكرأ بديلاً كمصدر للطاقة ، و ان جين 16srRNA لا يكون متطابقاً و متجانساً في جميع الكائنات الحية إذ ان المجاميع التصنيفية المختلفة تمتلك مستويات مختلفة من التغيرات الموجودة في الجين وهذه التغيرات تحدث مع الوقت خلال عملية التطور و تحدث هذه التغيرات في مواقع مختلفة من جين 16srRNA ، يوجد هناك منطقة في الجين تسمى "Hot spots" تحتوي على اعداد كبيرة من الطفرات الوراثية و لا تكون هذه المنطقة متشابهة في كل الانواع (Pfister و اخرون ، 2003) .

يستخدم 16srRNA في تشخيص و تصنيف البكتيريا لعدة اسباب :-

- 1 - و جوده في أغلب انواع البكتيريا .
- 2 - وظيفته تكون ثابتة و لا تتغير مع مرور الزمن و تطور الكائنات الحية.

3 - يبلغ طول جين 16srRNA حوالي (1500 bp) و هو طويل كفاية لغرض حمل المعلومات الوراثية (Patel ، 2001) .

2-7-2 جين *femA*

يُعدّ جين *femA* من الجينات المتعددة المسؤول عن مقاومة البكتريا لـ Methicillin ويتميز عموماً بأنه يوجد في كل أنواع *S.aureus* المقاومة للميثيسيلين MRSA . ينتج جين *femA* بروتين 48KD يشارك هذا البروتين في أيض جدار الخلية ويوجد بكميات كبيرة في المجتمعات السكانية النامية بشكل نشيط (Johnson وآخرون ، 1995 ; Mathews وآخرون ، 2010) .

كما يعد *femA* واحداً من الجينات الضرورية المؤثرة عن سرعة في التحلل الذاتي autolysis (Gustafson وآخرون ، 1992) . نتائج تحليل *femA* أشار الى ان البروتين المنتج من قبل هذا الجين يرتبط بتعبير expression المستويات العالية لمقاومة الـ Methicillin بدون انتاج PBP-2 البروتينات المرتبطة بالبنسيلين المؤثر .

ان اهمية *femA* في مقاومة Methicillin تعتمد على انواع *S.aureus* حيث ان انواع *S.aureus* التي تحتوي على جين *femA* غير فعال تفقد ميزة المقاومة لـ Methicillin لكن مع transduction لجينات *femA* إعادَ ميزة المقاومة . كما اقترح التحليل الكيمياوي الحيوي ان انتاج جين *femA* قد يشترك في ايض تاليف جدار الخلايا (Maidhof وآخرون ، 1991) .

3-7-3 جين *nuc*

جين *nuc* thermonnuclease (*nuc*) يستعمل لتحديد *S.aureus* و اكتشافه كما يعرف كجين متخصص لأنواع *S.aureus* (Studer وآخرون ، 2008) .

يشفر هذا الجين لـ *thermonuclease* وهو يستعمل على نحو واسع كهدف متخصص للتعرف على *S.aureus* بواسطة PCR (Maes وآخرون ، 2002 ; Louie وآخرون ، 2002) .

جين *nuc* هو *nuclease* خارج الخلية (Wang وآخرون ، 2014) هذا الجين دائما يستعمل كهدف جزيئي للتعرف على *S.aureus* (Chikkala وآخرون ، 2012) .

جين *nuc* أختير للكشف عن *enterotoxigenic* التي تنتجها *S.aureus* . حيث أظهر جين *nuc* ارتباطا عاليا بإنتاج السموم الداخلية *enterotoxin* (Barski وآخرون ، 1996) .

موادُ العملِ و طرائقُهُ

Materials and Methods

Materials & Methods

3 مواد العمل وطرائق

3 . 1 الاجهزة والمواد المستعملة

1.1.3 الاجهزة المستعملة : استعملت الاجهزة المبينة في الجدول (3-1) في

الدراسة الحالية

اسم الجهاز	الشركة المصنعة و(المنشأ)
ثلاجة	Qean (Egypt)
جهاز الترحيل الكهربائي Gel eletrophoresis apparatus	Helena (USA)
جهاز تقطير	Lab tech (Korea)
جهاز الطرد المركزي	Hettich (Germany)
حاضنة	Memmert (Germany)
حمام مائي	Memmert (Germany)
فرن كهربائي	Memmert (Germany)
مازج	Leb. Tech (Korea)
المرشحات الدقيقة	Gallenkamp (England)
ماصات دقيقة باحجام مختلفة	Brand (Germany)
مجهر ضوئي	Olympus (Japan)
جهاز طرد مركزي دقيق	Biomeriex (France)
مقياس الاس الهيدروجيني	Walk Lab (Malaysia)
مؤسسة	Human Lab (Korea)
ميزان حساس	Sartorius (Germany)
جهاز تصور الهلام	Herolab (Germany)
جهاز البلمرة	USR
كابينة الاشعة فوق البنفسجية	Memmert (Germany)
	UV.cabinate

Biological and chemical

2.1.3 المواد الكيميائية و البايولوجية
material

استعملت المواد الكيميائية و البايولوجية المبينة في الجدول (3 - 2) في الدراسة

الحالية

المادة	الشركة المصنعة و (المنشأ)
اكار – اكار Agar	Oxoid (England)
اكاروز Agarose	BDH (England)
بروميد الاثيديوم Ethidium bromide	
بيروكسيد الهيدروجين Peroxide	Fluka (Switzerland)
ترس حامضي Tris-HCl	Bioneer (Korea)
ترس قاعدي Trise-Base	
حامض البوريك Boric Acid	
حامض الكبريتيك H ₂ SO ₄	BDH (England)
حامض الهيدروكلوريك HCl 37%	
سكروز Sucrose	
صبغة الكونغو الحمراء Congo red stain	
صبغة البروموفينول الازرق Bromophenol Blue	
كلوريد الصوديوم NaCl	
كلوريد الباريوم BaCl ₂	
كليسيرول Glycerol	
هيدروكسيد الصوديوم NaOH	

Culture Media

3-1-3 الاوساط الزرعية

استعملت الاوساط الزرعية المبينة في الجدول (3-3) في الدراسة الحالية :

الشركة المجهزة و (المنشأ)	الوسط
Himedia (India)	Blood base agar اكار الدم الاساس
	Urea agar base اكار اليوريا الاساس
	Simmon Citrate agar وسط سترات السايمون
	Manitol Salt agar اكار المانيتول الملحي
Hampshir (England)	Maconky agar اكار الماكونكي
Oxoid (England)	Nutrient agar اكار المغذي
	Nutrient broth المرق المغذي
	Muller-Hinton agar اكار مولر - هنتون
	Brain -heart infusian brath وسط نقيع القلب والدماغ
	Methyl red Voges-Proskauer MR/VP وسط

4-1-3 الكواشف والمحاليل : استعملت الكواشف والمحاليل المبينة في الجدول (4-3)

في الدراسة الحالية

الشركة المصنعة و (المنشأ)	الاسم الكاشف / المحلول
Himedia (India)	Gram Stain Solution محاليل صبغة كرام
Himedia (India)	Kovac's Indole Reagent كاشف الاندول
B.B.H (England)	Methyl red كاشف احمر المثيل
Bio-Merieux (France)	Voges-Proskauer VP1-VP2 كاشف فوكس بروسكاور

Antibiotics

5-1-3 مضادات الحياة

اقراص مضادات الحياة المستعملة واقطار منطقة التثبيط القياسية (CLSI، 2012a)
استعملت اقراص مضادات الحياة المبينة في الجدول (3 - 5) في الدراسة الحالية

الشركة المصنعة والمنشأ	قطر منطقة التثبيط بالمليمتر			تركيز القرص µg\ disc	الرمز	المضاد الحياتي
	S حساسة	I متوسطة	R مقاومة			
Bioanalysis (Turkey)	≥19	14-18	≤13	30	NA	Nalidixic acid
	≥15	13-14	≤12	10	GM	Gentamicin
	≥16	11-15	≤10	10	TS	Trimethoprim sulfamethoxazole
	≥16	13-15	≤12	30	DXT	Doxycycline
	≥22	16-21	≤15	30	ATM	Azithromycin
	≥15	13-14	≤12	10	TN	Tobramycin
	≥18	14-17	≤13	10	AK	Amoxicilin
	≥21	16-20	≤25	10	CIP	Ciprofloxacin

6-1-3 العدد المختبرية : استعملت العدد المختبرية المبينة في الجدول (3 - 6) في

الدراسة الحالية

الشركة المصنعة و (المنشأ)	العدد
مصرف الدم (دبالى)	١- دم بشري صنف AB
Bioneer (Korea)	٢- عدة Master Mix PCR وتحتوي المحاليل الكافية لاجراء 100 تفاعل كل تفاعل بحجم (20) مايكروليتر
Bioneer (Korea)	٣- عدة عزل الدنا البكتيري DNA Extaction

7-1-3 استخدمت في هذه الدراسة الانزيمات المبينة في الجدول (3 - 7):

الشركة المصنعة و (المنشأ)	الانزيمات
Bioneer-Korea	Proteinase K انزيم
Bioneer-Korea	Lysozyme انزيم

Methods

2-3 طرائق العمل :-

Sterilization methods

1-2-3 طرائق التعقيم :-

عقمت الاوساط الزرعية في جهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121°م وتحت ضغط 15 باوند/ انج² لمدة 15 دقيقة اما الادوات الزجاجية فتم تعقيمها في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 180°م لمدة ساعتين ،اي باستعمال الحرارة الجافة Dry sterilization اما المحاليل التي تتلف بدرجات الحرارة العالية فتم تعقيمها بالمرشحات الدقيقة Millipore filters sterilization اقطار 0.22 مايكروميتر.

Solutions

2-2-3 المحاليل المستعملة :-

Macfarland Standerd

1-2-2-3 محلول ثابت العكرة القياسي:-

حُضِرَ المحلول وفق ما جاء في (Bauer واخرون ،1996) كما يأتي :-
محلول (أ) اذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم في 90 مل من الماء المقطر ، واكمل الحجم الى 100 مل .

محلول (ب) حضر 1% من حامض الكبريتيك المركز (H2SO4) باضافة 1 مل من الحامض الى 90 مل من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم الى 100 مل .

أضيف 0.5 مل من محلول (أ) الى 99.5 مل محلول (ب) رج المحلول بقوة ووضع في انابيب زجاجية محكمة الغطاء لمنع التبخر وحفظت في الظلام لحين الاستعمال .
تمزج محتويات الانبوبة جيدا قبل كل استخدام .

2-2-2-3 المحلول الملحي الفسلجي Physiological Saline Solution

حضّر المحلول الملحيّ الفسلجيّ بحسب ما جاء في (Forbes وآخرون ، 2002) وذلك لاستعماله في اجراء التخافيف بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 90 مل ماء مقطر ثم اكمل الحجم الى 100 مل ، عقم بالموصدة ، وحفظ بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال .

3-2-2-3 محاليل صبغة كرام Gram Stain Solution

استعملت محاليل صبغة كرام الجاهزة من قبل شركة (S.R.A) Syrbio المتكونة من محلول صبغة البلورات البنفسجية ومحلول الايودين والكحول المطلق وصبغة السفرائين، اذ استعملت في تصبغ الشرائح الزجاجية المحضرة من المزارع البكتيرية لملاحظة خواصها وصفاتها المجهرية وتصنيفها الى موجبة وسالبة لتلك الصبغة .

4-2-2-3 محلول كلوريد الصوديوم

حضّر هذا المحلول بإذابة 0.5 غرام من كلوريد الصوديوم في 95 مل من الماء المقطر واكمل الحجم الى 100 مل ، وبعدها عقم بالموصدة ، ثم حفظ بدرجة حرارة 4م° لحين الاستعمال (Forbes وآخرون ، 2002).

5-2-2-3 المحاليل الخزينة المستعملة في الاختبارات الوراثية

حُضِرَت المحاليل الخزينة كافة حسب ما جاء في (Sambrook و Russell ، 2001 ؛ Stephenson ، 2003) وكالاتي :-

1- محلول EDTA

حُضِرَ هذا المحلول بتركيز 0.5 مولاري بإذابة 93.06 غم من مادة EDTA في 400 مل من الماء المقطر ، ثم ضبط الرقم الهيدروجيني الى 8 باستعمال NaOH 10 عياري ، واكمل الحجم الى 500 مل من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة .

2- دارئ ترس – حامض الهيدروكلوريك Tris – HCl

حُضِرَ هذا المحلول بتركيز 2 مولاري بإذابة 31.52 غم من الترس الحامضي HCl في 80 مل من الماء المقطر ، ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 7.5 باستعمال HCl المركز واكمل الحجم الى 100 مل وعقم بالمؤصدة .

3- محلول هيدروكسيد الصوديوم (10) عياري NaOH (10 N)

حُضِرَ بإذابة 40 غم من NaOH في 80 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

4- محلول دارئ TE

يتكون من 0.05 مولار Tris HCl ، 0.05 من EDTA إذ حُضِرَ 100 مل منه بأخذ 2.5 من محلول Tris – HCl المحضّر في الفقرة رقم 2 اعلاه و 1 مل

من محلول EDTA المحضر في الفقرة 1 اعلاه واكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر وعقم بالمؤصدة ويحفظ بعدها في الثلاجة في درجة 4 م°.

6-2-2-3 المحاليل المستعملة في عزل الدنا البكتيري DNA-Extraction Solution

تم استعمال عدة استخلاص ال DNA المجهزة من شركة Bionner لاستخلاص الدنا البكتيري DNA

جدول (3- 8) يوضح محتويات عدة الاستخلاص .
استخدمت في هذه الدراسة جدول مكونات عدة استخلاص الدنا البكتيريا المبينة في
جدول (3 - 8)

Kit Components	
1	Pellet cells solutions :- Gram +Buffer (30) ml
2	Lyse cells solutions :- Lysozyme (110)m.g Proteinase K (1.1)m.g + 1.1 ml (ddH2O). GB Buffer (30) ml
3	DNA Binding :- Absolute ethanol alcohol (25) ml. GD Columns (100)
4	Wash W 1 Buffer (45) ml. Wash Buffer (25) ml.
5	Elution Elution Buffer (30) ml.

7-2-2-3 الانزيمات المستعملة

- انزيم **Proteinase K** : حضر باذابة 11 ملغم في (1.1 مل) من الماء مقطر

منزوع الاستقطاب dH₂O .

- انزيم **Lysozyme** : حُضِرَ باذابة 110 ملغم في (30 مل) من Gram Buffer

ومزج جيدا وبعدها يحفظ بدرجة (4°C) ولمدة اسبوعين (للعينة الواحدة يحضر من

اذابة 4 ملغم في 200 مايكروليتر من Gram Buffer)

8-2-2-3 المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Gel electrophorasis

Solution

حُضِرَت المحاليل كافة حسب ما جاء في (Sambrook و Russel، 2001) وكالاتي :-

1- محلول (TBE) Tris – Boric acid – EDTA (TBE) 10 X

يتكون المحلول من 0,089 مولار من Tris –OH و 0,089 مولار من حامض البوريك

و 0,002 مولار من Na₂-EDTA في 800 مليلتر من الماء المقطر ، وعدل الاس

الهيدروجيني الى 8 واكمل الحجم الى 1000 مليلتر ، وعقم بالمؤصدة ، وحفظ في درجة

حرارة 4 م° لحين الاستعمال .

2- داريُّ التحميل Loading buffer 6x

حُضِرَ من 0.25 % من صبغة البروموفينول الازرق ، 30% من الكليسيروول ، 50

% TBE ، ٢٠% ماء مقطر وسكروز .

3- محلول خزين بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide Stock Solution

حُضِرَ بإذابة 0.05 غم من صبغة بروميد الاثديوم في 9 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 10 مل بالماء المقطر للمحلول على تركيز نهائي 5 ملغم / مل .

9-2-2-3 المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR

• محلول PCR per mix Master

المحضر مسبقا والمجهز من قبل شركة Bioneer (Korea) ملحوق رقم (3) والذي يتكون من :

Top DNA polymerase 2.5 U/ml

dNTPS 250 Mm

Tris – Hcl 10 mM

KCL 30 Mm

MgCl₂ 1.5 mM

• محاليل البوادی Primers Solutions

أختيرت البوادی المتخصصة والمستهدفة للجين التشخيصي (16srRNA) و جين (*femA*) و جين (*nuc*) في بكتريا *S.aureus*، وفقا لما جاء في (Hamza وآخرون , 2015)، كما موضح في جدول(3-7) . تم تحضير المحاليل الخزينة بحسب تعليمات شركة Bioneer المُجهزة لها بإستعمال dH₂O للحصول على تركيز 10pmol/μL ملحوق رقم(2) .

جدول (3 - 9) يبين تتابعات وتراكيز البوادي وحجم الناتج المتوقع لكل بادي

حسب ما ورد في Hamza و اخرون، (2015) ؛ Mert و اخرون ،

(2005).

ت	البادي	تتابع البادي $5' \rightarrow 3'$	عدد القواعد bp	حجم الناتج bp
1	16-srDNA-F	5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3	20	400
2	16-srDNA-R	5-CAAGGCATCCACCGT-3	15	
3	FemA-F	5-AGACAAATAGGAGTAATGAT-3	20	509
4	FemA-R	5-AAATCTAACACTGAGTGATA-3	20	
5	Nuc-F	5-CTGGCATATGTATGGCAATTG-3	21	397
6	Nuc-R	5-AATGCACTTGCTTCAGGACC-3	20	

تم تحضير محلول كل بادي ، وبشكل منفصل بتركيز (10 بيكومول \ مايكروليتر) ، وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين لكل بادي وإضافته إلى 90 مايكروليتر من dH2O ومُزجه جيداً وحُفظه في الثلج لحين الإستعمال في حين حُفظت المحاليل الخزينة للبوادي في درجة (-20) مع مُراعاة مزج المحلول بعد إخراجهِ من الثلج باستعمال المازج لمُجانسته قبل الاستعمال .

10-2-2-3 كاشف أنزيم الكاتاليز Catalase Reagent

حُضر من خلط (1) مل من بيروكسيد الهيدروجين المركز (30%) مع (9) مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 3% بيروكسيد الهيدروجين ، وحفظ في الثلاجة في

عبوة داكنة ،استعمل للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على انتاج انزيم الكاتاليز (Collee وآخرون ،1996) .

11-2-2-3 كاشف الاوكسيديز Oxidase Reagent

حضر أنيياً باذابة (1) غم من رباعي المثيل بارافيلين ثنائي الامين هيدركلوريك

Tetramethyl-P-phenylen diamindihydrochlorid في (90) مل من الماء

المقطر المعقم ومن ثم أكمل الحجم الى (100) مل ، استخدم هذا الكاشف للكشف عن

انتاج انزيم الاوكسيديز من قبل البكتريا (Koneman وآخرون ،1992) .

Culture media

3-3 الاوساط الزرعية

1-3-3 الاوساط الزرعية الجاهزة

حُضرت الاوساط الزرعية الجاهزة المذكورة في الفقرة (3-1-3) بحسب تعليمات

الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة بإستثناء بعض الاوساط الزرعية التركيبية التي سوف

تذكر لاحقاً , وعقمت بالمؤصدة بعدها صُبت الاطباق وحضنت بالحاضنة بدرجة حرارة

37 م° لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها ثم حفظت بدرجة حرارة 4 م° لحين

الاستعمال .

2-3-3 الاوساط الزرعية التحضيرية

Blood agar medium

1-2-3-3 وسط أكار الدم

حُضر الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة وعُقم بالمؤصدة، وبعد ان برد الى حرارة

45م° اضيف اليه دم الانسان صنف AB بتركيز 5% ثم صب في اطباق معقمة

وتركت لتبرد وتتصلب وحُفظت بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال (Brown ، 2005).

Protease Production

2-2-3-3 وسط انتاج البروتيز

حُضِرَ وسط Nutrient agar حسب تعليمات الشركة المصنعة واذيف اليه 12.5 مل من الحليب المقشوط خالي الدسم Skim milk حيث يكمل الحجم الى 100 مل ثم صُبَّ في اطباق معقمة ، يستعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة *Staphylococcus spp* على انتاج هذا الانزيم (Benson ، 2002) .

Egg-yolk Agar

3-2-3-3 وسط أكار صفار البيض

حُضِرَ وسط Nutrient agar بحسب تعليمات الشركة واذيف اليه 15 مل من صفار البيض ليكمل الحجم الى 100 مل ثم صُبَّ في اطباق معقمة يستعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة المكورات العنقودية على انتاج اللايبيز Lipase (Collee واخرون ، 1996) .

Staphylokinase production

4-2-3-3 وسط انتاج الستافيلوكاينيز

حُضِرَ وسط استهلاك الكازانين Casein hydrolytic assay باضافة 2 مل من مصل الدم البشري Serum الى 98 مل من وسط الحليب المقشوط Skim-milk ليكمل الحجم الى 100 مل بعدها صُبَّ في اطباق معقمة ، يستعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة بكتريا *Staphylococcus spp* على انتاج الستافيلوكاينيز (Rajamohan واخرون ، 2000) .

Congo red

5-2-3-3 وسط احمر الكونغو الصلب

حُضِر الوسط بحسب ماجاء في (Mathur وآخرون ، 2006) كماياتي :-

حُضِر الوسط بإذابة 37 غم من مرق نقيع القلب والدماغ واضيف اليه ٥٠ غم سكروز و 10غم من الاكار - اكار الى 900 مل من الماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م° لمدة 15 دقيقة واكمل الحجم الى لتر ويتم تعقيم محلول صبغة احمر الكونغو (0.8 غم / لتر) لوحده بالفلتره ؛ لكونه محلولاً مائياً ويتم اضافة محلول الصبغة والسكر معاً الى الوسط المعقم بعد تبريده الى درجة حرارة 55م° ومزجه جيداً ثم يصب في اطباق معقمة ، استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية المكورات العنقودية على تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) .

Urea base Agar

6-2-3-3 وسط اكار اليوريا

حضر 950 مل من وسط اكار اليوريا الاساس Urea Base agar بحسب التعليمات الواردة من الشركة المصنعة وبعد تعقيمه بالمؤصدة وتبريده الى 45 م° اضيف اليه 50 مل من محلول 40% يوريا معقمة بالترشيح باستخدام اغشية الترشيح الدقيقة (Millipore Filter) ، ثم صُبَّ بصورة مائلة في انابيب معقمة ذات اغطية محكمة ، استخدم الوسط لغرض الكشف عن قابلية العزلات على انتاج انزيم اليورييز (Li وآخرون ، 2004) .

Pepton water

7-2-3-3 وسط ماء الببتون

حُضِر بإذابة (2) غم من الببتون و 0.5 غم من كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر المعقم ، عقم بالمؤصدة بعد ضبط الأس الهيدروجيني الى 7 ، استخدم هذا الوسط في التحري عن انتاج الاندول (Koneman وآخرون ، 1992) .

Collection of Sample

4-3 جمع العينات

جمعت 10 عينات تربة زراعية وغير زراعية من (5) مواقع مختلفة في محافظة ديالى تضمنت (مندلي ، شهربان ، الوجيهية ، دلى عباس ، بهرز) وذلك بقشط 1 سم من سطح التربة وأخذت بعمق يتراوح بين 5-10 سم وقد كانت كمية العينة المأخوذة 100 غم من كل موقع من المواقع المشمولة بالدراسة ووضعت في كيس نايلون معقم ونقلت الى المختبر .

كما تم جمع 6 عينات من الماء من (3) مواقع مختلفة من نهر مهرت . تم استخدام قناني زجاجية معقمة لغرض جمع النماذج وبحجم (1) لتر وتم اتباع الطرق العلمية الصحيحة في اخذ النموذج وبعد اخذ النموذج تغلق القنينة وتوضع في اكياس نايلون معقمة وتنقل بعد ذلك الى المختبر . وقد جمعت العينات في الفترة من 2016/11/1 ولغاية 2017/2/1 وزرعت النماذج مباشرة بعد إجراء التخفيف لكل عينة لغرض التشخيص .

Samples Culture

5-3 زرع العينات

حضرت سلسلة من التخفيف العشرية وذلك باضافة 1غم من كل عينة من عينات التربة الى 9 مل من المحلول الملحي الفسلجي وكذلك تم أخذ 1مل من عينات المياه و اضافتها الى 9مل من المحلول الملحي الفسلجي ايضا. زرعت النماذج مباشرة بعد اجراء التخفيف وذلك باضافة 0.5 مل من التخفيف العشري الثاني الى سطح الوسط المغذي الصلب Nutrient agar وحضنت الاطباق في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم نقلت كل مستعمرة بكتيريا نامية الى الوسط نفسه الذي عزلت عليه لغرض

التنقية وحفظت على مائل الوسط المغذي الصلب في درجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال .
بعد ذلك تم اجراء الاختبارات والفحوصات التشخيصية المظهرية و الكيموحيوية للبكتريا

المعزولة (British Pharmacopeia ، 2010) .

كما تم عزل وتشخيص عزلات بكتيريا تعود الى بكتريا *Staphylococcus aureus* في مختبر الاحياء المجهرية في مستشفى بعقوبة التعليمي من عينات سريرية مختلفة تضمنت (الادار ، أخماج الجروح ، الحروق) وتم اجراء التشخيص لها عن طريق عمل بعض الفحوصات المظهرية والكيموحيوية اضافة لذلك تم اجراء بعض الفحوصات الخاصة للمكورات العنقودية مثل النمو على وسط المانيتول الملحي الصلب Manitol salt agar وفحص انزيم المخثر للبلازما Coagulase test .

6-3 تشخيص العزلات البكتيرية Identification of bacterial isolates

1-6-3 الصفات المظهرية Morphological characteristics

شخصت العزلات البكتيرية المعزولة والنامية مبدئياً باعتماد صفاتها الزراعية من حيث حجم المستعمرات ولونها ، وقوام المستعمرات فضلا عن قدرتها على تحليل كريات الدم الحمراء على وسط اكار الدم .

2-6-3 الصفات المجهرية Microscopic characteristics

اخضعت العزلات البكتيرية الى الفحص المجهرى من خلال اخذ مسحة صغيرة من المستعمرة ونقلها الى الشريحة الزجاجية وتصبيغها بصبغة غرام ؛ لمشاهدة نوع الصبغة وشكل الخلايا وطريقة تجميعها (Harlay و Prescott ، 2002) .

Biochemical Tests

3-6-3 الاختبارات الكيموحيوية

اجريت الفحوصات الكيموحيوية الاتية لتشخيص العزلات البكتيرية الى مستوى النوع وحسب ماجاء في (Forbes وآخرون ، 2007) .

Catalase test

1-3-6-3 اختبار الكاتاليز

نقل جزء من المستعمرة بعمر 18-24 ساعة من وسط الاكار المغذي الى شريحة زجاجية نظيفة وجافة وأضيف اليها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% وان ظهور فقاعات هوائية يعد دليلاً ايجابياً على قابلية العزلات على انتاج انزيم الكاتاليز .

Oxidase test

2-3-6-3 فحص الاوكسيديز

اجري الاختبار على ورقة ترشيح دائرية نظيفة موضوعة على طبق بتري Petridish من خلال نقل جزء من المستعمرة البكتيرية الفتية على الاكار المغذي الى ورقة ترشيح ومن ثم وضع 2-3 قطرات من كاشف الاوكسيديز فوق المستعمرة وخلطها جيداً بالعيذان الخشبية المعقمة (wooden sticks) ، وان ظهور اللون البنفسجي خلال 10-15 ثانية يعني نتيجة موجبة للفحص .

Indole test

3-3-6-3 اختبار الاندول

استخدم للكشف عن وجود الاندول ، الذي يعد احد نواتج ايض الحامض الاميني التربتوفان نتيجة لامتلاك البكتريا لانزيم التربتوفان Tryptophanase ، اذ لقح وسط ماء البيتون السائل بمزروع العزلة قيد الدراسة ، حضن الوسط بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ، ثم اضيف 5 قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's reagent على

السطح الداخلي لانبوبة الاختبار ، تعد النتيجة موجبة عند ظهور حلقة حمراء خلال ثوان من اضافة الكاشف .

Methyl red test

4-3-6-3 اختبار احمر الميثيل

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج كميات كبيرة من احماض اللاكتيك Lactic او الفورميك Formic نتيجة ايض الكلوكوز ، اذ لقع مرق MR/VP بمزروع للعزلة قد الدراسة ، حضن بدرجة 37 م° لمدة 48-72 ساعة ، ثم اضيفت خمس قطرات من كاشف احمر الميثيل ، تعد النتيجة موجبة عند تغير اللون الى الاحمر .

Voges – Proskaur test

5-3-6-3 اختبار فوكس بروسكاور

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج استيل ميثيل كاربينو (اسيتون) Aceton اذ لقع مرق MR/VP بمزروع العزلة قيد الدراسة ، حضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 48-72 ساعة .

نقل (1) مل من العالق الى انبوبة اختبار نظيفة ، اضيف اليها (0.6) مل من محلول الفانفتول (كاشف Vp1) متبوع بـ (0.2) مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 40% (كاشف Vp2) مع رجّ الانبوبة بلطف ، تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون الاحمر بعد حوالي 15 دقيقة .

Citrate Utilization test

6-3-6-3 اختبار استهلاك السترات

زرعت العزلات على مائل وسط سايمون - ستريت ، حضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، تعد النتيجة موجبة عند تحول لون الوسط من الاخضر الى الازرق ؛ لاستهلاك السترات .

Coagulase test

7-3-6-3 فحص تجلط البلازما

اجري الفحص بأخذ جزء من المستعمرة البكتيرية ونقلها الى شريحة زجاجية نظيفة وجافة واضيقت اليها قطرة من كاشف انزيم التجلط ومُزجا معا ، وعند تكتل العالق خلال مدة 10 ثوانٍ فإنها تعطي نتيجة موجبة للفحص .

8-3-6-3 اختبار النمو على وسط المانيتول الملحي Manitol Salt Agar

نُقل جزء من المزروع البكتيري بعد التشخيص الاولي الى وسط المانيتول الملحي وحُضِن بدرجة حرارة 37م° لمدة 24- 48 ساعة للتمييز بين المكورات العنقودية الذهبية الانوع الاخرى غير المخمرة للمانيتول ، يُعدّ تكون مستعمرات صفراء ذهبية على هذا الوسط نتيجة تخمرها لسكر المانيتول وتغير لون الكاشف الى الاصفر دليلاً على وجود المكورات العنقودية الذهبية اما الانواع التي لاتخمر سكر المانيتول فتظهر مستعمراتها وردية او بيضاء اللون .

Preservation of bacterial isolates

7-3 حفظ العزلات وادامتها

Slant Agar

1- 7-3 الحفظ قصير الامد

لقحت العزلات البكتيرية بعد تشخيصها على وسط الاكار المغذي على نحو مائل وبطريقة التخطيط ، وحضنت الاطباق على درجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة ، وحفظت بدرجة 4م° للاستعمال اليومي على ان تجدد العزلات على نحو دوري شهرياً بتنشيطها على وسط المرق المغذي ثم اعادة زراعتها على وسط مائل جديد لضمان بقاء نشاطها (WHO ، 2003) .

2-7-3 الحفظ طويل الامد (الحفظ في الكليسيروول 20%)

حُضرت انابيب صغيرة تحتوي 0.5 مللتر من 40% كليسيروول معقم واضيف اليه حجم مماثل من المزروع البكتيري المنقى على وسط المرق المغذي للحصول على تركيز نهائي للكليسيروول 20% ، وتم حضن الانابيب بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة بعدها حفظت الانابيب بدرجة 20- (Deep Freeze) لحين الاستعمال (Crocker و Burnett ، 2005) .

8-3 التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا *Staphylococcus aureus*

1-8-3 اختبار قابلية البكتريا على انتاج الهيمولايسين Hemolysin production test

خطط المزروع البكتيري المراد فحص قابليته على انتاج الهيمولايسين على وسط اكار الدم المحضر في الفقرة (3-2-3) وحضن بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة ، وقد قرأت النتائج بملاحظة نوع التحلل (الفا - بيتا - كاما) الظاهرة على وسط اكار الدم الذي يختلف باختلاف نوع الهيمولايسين المنتج ، فهناك تحلل كامل لكريات الدم الحمراء تسببه العزلات البكتيرية المنتجة للهيمولايسين بيتا ، اما العزلات البكتيرية المنتجة للهيمولايسين الفا فإنها تسبب تحلل جزئي لكريات الدم واما نوع كاما فالعزلات البكتيرية المنتجة له تكون غير حالة لكريات الدم (Brown ، 2005) .

2-8-3 الكشف عن قابلية البكتريا على انتاج البروتيز Detection of Protease Production

لقح وسط Skimmed milk agar المحضر وفق الفقرة (3-2-3-2) بالمستعمرات البكتيرية اذ تم عمل حفر دائرية منتظمة وحقن العالق البكتيري في هذه الحفر ، وحضنت

الاطباق في 37 م° لمدة 24 ساعة ، إنَّ ظهور هالة شفافة حول الحفر دليل النتيجة الموجبة (Benson ، 2002) .

3-8-3 الكشف عن قابلية البكتيريا على انتاج اللايبيز Lipase production

لقح وسط Egg-yolk agar المحضر وفق الفقرة (3-2-3-3) بالمستعمرات البكتيرية وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، وان ظهور تحلل حول المستعمرات البكتيرية دل على النتيجة الموجبة (Collee وآخرون ، 1996) .

4-8-3 الكشف عن قابلية البكتيريا على انتاج الستافيلوكاينيز Staphylokinase Production

أُفحَّت عزلات *Staphylococcus* على وسط Staphylokinase المحضر وفق الفقرة (4-2-3-3) وحُضنت الاطباق في 37 م° لمدة 24 ساعة قرئت النتيجة الموجبة بوجود تحلل حول المستعمرات البكتيرية النامية (Rajamohan وآخرون ، 2000) .

5-8-3 الكشف على قابلية البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Production

اختبرت قابلية العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي وذلك بنقل المستعمرة مفردة نقية الى انبوبة اختبار حاوية 5 مليلتر من محلول الفسيولوجي وبعد مقارنة عكورة النمو مع عكورة انبوبة ماكفرلاند زرع وسط احمر الكونغو الصلب بطريقة التخطيط على الوسط الصلب ثم حُضنت الاطباق في 37 م° لمدة 24 ساعة ، لوحظت بعدها النتيجة الموجبة بظهور مستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية (Mathur وآخرون ، 2006) .

6-8-3 الكشف على قابلية البكتيريا على انتاج البكتريوسين Bacteriocin production

(طريقة الانتشار في الحفر)

تم اعتماد هذه الطريقة بحسب ماجاء في (Gupta وآخرون ، 1998) للكشف عن انتاجية البكتريوسين في راشح البكتريا قيد الدراسة ، اذ زرعت الاطباق الحاوية على وسط الاكار المغذي بنشر 0.1 مليلتر من لقاح مزارع عزلات بكتريا الاختبار بالناشرالزجاجي المعقم (كلا على حدة) بعد ان ثبت عدد الخلايا المزروعة بمقدار 10^8 خلية / مليلتر ، عملت حفر على سطح الوسط وملئت كل حفرة ب 100 مايكروليتر من راشح المزرعة السائلة لعزلات البكتريا قيد الدراسة ، حضنت بعدها الاطباق بدرجة 37 م° مدة 24 ساعة . قيست مناطق التثبيط حول الحفر وقورنت مع معاملة السيطرة الحاوية على وسط الاكار المغذي غير الملحق بالبكتريا .

7-8-3 الكشف عن قابلية البكتريا لانتاج اليوريز Detection of Urease production

لقح وسط اليوريا بالمزروع البكتيري ثم حضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24-48 ساعة ، ان تحوّل لون الوسط الى اللون الوردي دليل على أيجابية الاختبار .

9-3 اختبار حساسية البكتيريا لمضادات الحياة Antibiotic Suceptibility
استعملت طريقة انتشار الاقراص (Disk diffusion) لاختبار حساسية البكتريا لمضادات الحياة المذكورة في الجدول (3-1-5) على وسط اكار مولر-هنتون بحسب

ماورد في (Morello وآخرون ، 2006) وبالاتماد على (CLSI ، 2012a) كالآتي :-

- 1- نقلت 3-5 من المستعمرات النامية على وسط الاكار المغذي بوساطة عروة ناقل الزرع الى انبوبة تحتوي 5 مل من المرق المغذي .
- 2- حُضنت الانابيب الحاوية على المزروع البكتيري السائل بدرجة 37° لمدة 24 ساعة
- 3- نُقل جزء من المزروع البكتيري السائل (0.1) مل الى انابيب تحوي المحلول الملحي الفسيولوجي ، وقورنت عكورة النمو بعكورة المحلول الثابت العكورة القياسي والذي يعطي عددا تقريبا للخلايا 1.5×10^8 خلية / مل .
- 4- نقل 100 ماكروميتر من العالق البكتيري بوساطة الماصة الدقيقة، ثم نشر بوساطة الناشر الزجاجي على سطح وسط اكار مولر - هنتون على نحو متجانس، وتركت الاطباق لتجفّ في درجة حرارة الغرفة لمدة ١٥-١٠ دقيقة .
- 5- نقلت بعدها اقراص المضادات الحيوية بوساطة ملقط معقم الى الاطباق بواقع 6-7 اقراص للطبق الواحد ، ثم حُضنت الاطباق بدرجة 37° لمدة 24 ساعة.
- 6- قرئت النتائج بقياس قطر مناطق التثبيط المتكونة حول اقراص المضادات الحيوية وقورنت اقطار التثبيط بالاعتماد على (CLSI ، 2012a) وفي ضوءه عُدَّت البكتريا حساسة (Sensitive) او متوسطة (Intermedite) او مقاومة (Resistance) .

10-3 استخلاص الدنا البكتيري Bacterial DNA extraction

تم عزل الدنا البكتيري باستعمال عدة الاستخلاص (Mini DNA Bacteria Kit) المجهزة

من شركة Bioneer وباتباع الخطوات الآتية :-

1- نقل 1 مل من العزلات البكتيرية المنمات بعمر 24 ساعة الى انابيب ابندوروف 1.5 Eppendorf مل

2- نبذت الانابيب مركزيا لمدة دقيقة بسرعة 14000 دورة / دقيقة ، بعدها اهمل الطافي

3- اضيف 200 مايكروليتر من داري GT الى انابيب ابندوروف مُزَج جيداً بواسطة المازج Vortex.

4- اضيف 20 مايكروليتر من انزيم Proteinase K المحضر وفق فقرة (7-2-2-3) الى الانابيب ثم مزجا بواسطة المازج Vortex جيداً ، ثم وضعت داخل حمام مائي Water bath لمدة عشر دقائق وبدرجة حرارة 60 م° وقلبت الانابيب ثلاث مرات كل ثلاث دقائق في اثناء فترة الحضانة .

5- اضيف 200 مايكروليتر من داري GB الى الانابيب ثم مزجا جيداً بواسطة المازج Vortex لمدة عشر ثوان ثم وضع داخل حمام مائي Water bath لمدة عشر دقائق وبدرجة حرارة 70 م° وقلبت الانابيب ثلاث مرات كل ثلاث دقائق .

6- اضيف 200 مايكروليتر من الايثانول المطلق البارد Absolute ethanol الى الانابيب ثم خلط المزيج برفق عن طريق قلب الانابيب لترسيب الدنا .

7- تم وضع عامود GD Column في انبوبة الجمع Collection tube سعة 2 مل ونقل له جميع الخليط .

8- نبذت الانابيب مركزيا لمدة دقيقتين بسرعة 14000 دورة / دقيقة بعدها نقلت المحتويات الى انبوبة جمع جديدة .

9- اضيف 400 مايكروليتر من داري W 1 الى عمود GD .

10- نبذت الانابيب مركزيا بسرعة 14000 دورة / دقيقة لمدة 30 ثانية ثم وضع عمود GD في انبوبة الجمع .

- 11- اضيف 600 مايكروليتر من دارى Wash buffer الى عمود GD .
- 12- اجري النبذ المركزي لمدة دقيقة 14000 دورة / دقيقة .
- 13- اعيد النبذ المركزي لمدة ثلاث دقائق بسرعة 14000 دورة / لمدة دقيقة لتجفيف العمود .
- 14- نقل العمود GD الى انبوبة ابندروف نظيفة 1.5 مل .
- 15- اضيف 50 مايكروليتر من دارى Elution المسخن بدرجة 70 م° مسبقا الى الانابيب وتركها الانابيب لمدة خمس دقائق ، ثم طردت مركزيا لمدة نصف دقيقة بسرعة 14000 دورة /دقيقة وبذلك يتم الحصول على الدنا .

11-3 الترحيل الكهربائي في الهلام Gel Electrophoresis

اجري الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص وفقاً لما جاء في (Russell و Sambrook ، 2001) باستعمال المحاليل المحضرة وفق الفقرة (8-2-2-3) كالاتي :-

حضر هلام الاكاروز بتركيز 1% باذابة (1 غم) من الاكاروز في (100 مل) من محلول 10 x TBE بعد تخفيفه 10 مرات للحصول على 1 x TBE ، سخن الاكاروز الى درجة الغليان وترك ليبرد الى درجة حرارة (45 م°) ، ثم اضيفت اليه صبغة بروميد الاثيديوم بتركيز نهائي 0.5 مايكروغرام / مل باستعمال المحلول الخزين المحضر لهذه الصبغة ، بعدها مزج الاكاروز جيداً . تم اعداد صفيحة لاسناد الاكاروز Tray باحاطة حافاتها بشريط لاصق وبشكل جيد ، ثم ثبت المشط Comb لتكوين الحفر Wells المعدة لتحميل العينات ثم صب الاكاروز بشكل هادئ ومستمر لتجنب حدوث فقاعات هوائية ، بعدها ترك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة، رفع المشط بهدوء ونزع الشريط اللاصق . بعدها نقل الهلام مع القالب الى حوض الترحيل الحاوي على حجم مناسب

يغطي الهلام من 1 x TBE ثم حملت العينات المعدة للترحيل (5 مايكروليتر) من قالب الدنا وخط بعدها مع (3 مايكروليتر) من دارى التحميل 6x باستعمال ماصة دقيقة Micropipette . بعدها تم اجراء عملية الترحيل الكهربائي بفرق جهد مقداره 0.5 مايكروغرام ١ مل باستعمال المحلول الخزين المحضر لهذه الصبغة بعدها مزج الاكاروز من عملية الترحيل نقل القالب لفحص الهلام بتعريضه الى مصدر للاشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator عند طول موجي 320 نانوميتر .

12-3 : تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) :

تم الكشف عن الجينات باستخدام تقنية PCR واتباع الخطوات الآتية :

١- حضر خليط التفاعل الرئيس Master Mix وذلك بإضافة المكونات الآتية في أنبوبة

معقمة كما في الجدول أدناه :

جدول (3-10) مكونات خليط التفاعل الرئيسي Master Mix

Final Concentration	Volume For 1 Tube	Materials	Concentration Manufacturer
.....	6 µL		D.W
1x	5 µL	Accupower ® PCR Premix	
10 pmol	2 µL	Primer – F (10 pmol)	
10 pmol	2 µL	Primer – R (10 pmol)	
15 µL	15 µL	Total reaction Volume	

مزجت هذه المكونات بواسطة ماصة زجاجية دقيقة Micro Pipette وذلك بسحبها عدة مرات ثم وضعت في جهاز النبذ لمدة 10 ثوان .

2- وزع الخليط على 8 أنابيب معقمة حجمها 0.5 مل ومعلمة بحسب العينات المراد دراستها وبواقع 15 µL من الخليط لكل أنبوبة. وبالخطوات الآتية :

3- اضيف (5 µL) من قالب الدنا لكل عينة في الأنبوبة المخصصة لها ، ووزع الـ Master Mix على الأنابيب قبل نقل الـ DNA لتجنب التلوث.

4- أستعمل جهاز الطرد المركزي لمدة (15 ثانية) لجمع القطرات الملتصقة بجدار أنبوبة الطرد المركزي وإنزالها إلى أسفل الأنبوبة للحفاظ على الحجم النهائي لخليط التفاعل والبالغ 20 µL .

3-13 : الظروف المثلى لتضخيم جين *nuc* ، *femA* ، *16srRNA* :

تم إجراء خطوات التضاعف للتحري عن البكتيريا *S.aureus* على مستوى الجنس وللتحري عن جينات *nuc* ، *femA* ، *16srRNA* بحسب ما جاء في (Hamza و اخرون، 2015) .

تمت برمجة جهاز PCR ، كما موضح في جدول (3-9) .

الجدول (3-11) البرنامج الحراري لتضخيم جينات *nuc* , *femA* , 16srRNA

P.C.R

بتقنية

Type of primers	PCR Conditions Temperature / Minute								
	Denaturation				Annealing		DNA-extension		Expected size of products (bp)
	One cycle		40 cycles						
	°C	Min	°C	Min	°C	Min	°C	Min	
16srRNA	94	5min	94	1min	42	1min	72	5min	1400
<i>femA</i> <i>nuc</i>	94	3min	94	1min	60	1.30 min	72	2 min	509 397

* نُقِلَ بعد ذلك (10) مايكروليتر من ناتج التضاعف للترحيل الكهربائي.

* حُفِظَ المتبقي من نواتج التضاعف في درجة (- 20 °) م.

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

٤. النتائج والمناقشة Result and Discussion

1.4 توزيع العزلات بحسب مصدر العينة

1-1-4 التربة

كان عدد عينات التربة 10 عينات ونسبة 62.5% تم أخذها من 5 مناطق مختلفة من مجموع 16 عينة استخدمت في هذه الدراسة وكان مجموع العزلات 34 عزلة ونسبة 56.6% من مجموع 60 عزلة شملت العينات انواع تربة مختلفة زراعية وغير زراعية .

2-1-4 المياه

كان عدد العينات 6 عينات ونسبة 37.5% تم اخذها من 3 مواقع مختلفة من مجموع 16 عينة تم استخدامها في هذه الدراسة وكان مجموع العزلات البكتيرية 26 عزلة ونسبة 34.3% من مجموع 60 عزلة كما في الجدول (1-4) .

جدول (1-4): توزيع العينات و نوعها و عدد العزلات و نسبها في عينات التربة

والمياه

عدد العزلات و نسبها المئوية %	عدد العينات و نسبها المئوية %	مصدر العينة (بيئية)
34 (56.6)	10 (62.5)	التربة
26 (34.3)	6 (37.5)	المياه
60	16	المجموع

3-1-4 العزلات السريرية (المرضية)

تم عزل وتشخيص 10 عزلات بكتريا تعود الى بكتريا *Staphylococcus aureus* في مختبر الاحياء المجهرية في مستشفى بعقوبة التعليمي من عينات سريرية مختلفة تضمنت عينات (الادرار ، أخماج الجروح ، الحروق) وتم اجراء التشخيص لها عن طريق عمل بعض الفحوصات المظهرية والكيموحيوية للتأكد من نقاوتها و تشخيصها .

Identification

2 - 4 التشخيص

تم تشخيص العزلات البكتيرية اعتمادا على صفاتها المجهرية من خلال ملاحظة شكل خلاياها وانتظامها وطريقة ترتيبها وتلوينها بصبغة كرام فقد وجدت خلايا بكتيريا ذات اشكال مختلفة. وأظهرت نتائج النمو المايكروبي على الوسط التفريقي MacConkey agar ظهور (53) عزلة سالبة لصبغة كرام وبنسبة 88.3% و (7) عزلات موجبة لصبغة كرام وبنسبة 11.6% .

واخضعت العزلات البكتيرية للفحوصات الكيموحيوية Biochemical test وفقا ل (Forbes وآخرون، 2007) و أظهرت نتائج تفريقية وتشخيصية للعزلات قيد الدراسة و كما يلي :-

1-2-4 اختبار الكاتاليز :-

خضعت العزلات لفحص الكاتاليز (catalase) و كانت 100% لها القدرة على تحطيم بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وتحويله الى ماء وغاز الاوكسجين وان ظهور هذه الفقاعات الغازية دليل على النتيجة الموجبة .

4-2-2 اختبار الاوكسيديز :-

اما بالنسبة لاختبار (Oxidase) فقد كانت جميع العزلات وبنسبة 100% سالبة لهذا الاختبار اي ان البكتريا ليس لها القابلية على انتاج انزيم السيتوكروم اوكسيديز (Cytochrome Oxidase) .

4-2-3 اختبار أحمر المثيل :-

كانت 17 عزلة وبنسبة 28.3% موجبة لاختبار أحمر المثيل حيث تغير لون الوسط الحاوي على البكتريا الى اللون الاحمر مباشرة بعد إضافة الكاشف اي ان للبكتريا القدرة على انتاج حامض اللاكتيك و الفورميك نتيجة أيض الكلوكوز، وكانت 43 عزلة بنسبة 71.6% سالبة لاختبار احمر المثيل .

4-2-4 اختبار فوكس بروسكاور :-

اخضعت العزلات لفحص بروسكاور وكانت 48 عزلة و بنسبة 80% موجبة لاختبار فوكس بروسكاور حيث ظهر اللون الاحمر في الوسط الحاوي على البكتريا بعد حوالي 15 دقيقة من اضافة الكاشف و هذا يدل على ان البكتريا لها القدرة على انتاج الاسيتون(اسيتيل مثيل كاربينو) بينما كانت 12 عزلات وبنسبة 20% سالبة لفحص فوكس بروسكاور إذ لم يتم ظهور اللون الاحمر بعد اضافة الكاشف .

4-2-5 اختبار الاندول :-

كانت 21 عزلة وبنسبة 35% موجبة لاختبار الاندول إذ تظهر حلقة حمراء خلال ثوان من إضافة كاشف كوفاكس اي ان البكتريا تمتلك إنزيم التربتوفانيز Tryptophanase بينما كانت 39 عزلة وبنسبة 65% سالبة لهذا الاختبار.

4-2-6 اختبار استهلاك السترات :-

كانت 40 عزلة وبنسبة 66.6% موجبة لاختبار استهلاك السترات إذ تحول لون الوسط الحاوي على البكتريا بعد (24) ساعة من الاخضر الى الازرق نتيجة لاستهلاك السترات ، وكانت 20 عزلة و بنسبة 33.3% سالبة لهذا الاختبار.

4-2-7 اختبار الهيمولايسين :-

اخضعت العزلات لفحص hemolysin بحيث نُمِّيت على وسط اكار الدم في ظروف هوائية وبدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة ، فكانت 23 و بنسبة 38.3% عزلة موجبة للنمو على هذا الوسط حيث ظهرت مستعمرات متوسطة الى كبيرة الحجم تراوحت اقطارها ما بين 1 - 3 ملم ذات حافات منتظمة وملساء ومحدبة ولماعة تحاط هذه المستعمرات بمنطقة تحلل hemolysis ، و كانت 37 عزلات فقط سالبة للنمو على هذا الوسط و بنسبة 61.6% .

و بالاعتماد على نتائج الفحوصات الكيموحيوية تم تشخيص العزلات وفقا ل (Cown و Steel، 2004) فقد توزعت العزلات بين *Bacillus subtilis* و التي كانت الاكثر شيوعا إذ شخّصت 14 عزلة و بنسبة 23.3% تلتها *epidermidis*

Staphylococcus شخصت في 13 عزلة و بنسبة 21.6%، و من ثم *Bacillus cereus* اذ شخصت في 11 عزلات وبنسبة 18.3% ، بينما شخصت 10 عزلات وبنسبة 16.6% لـ *Staphylococcus aureus* ، وشخصت 7 عزلات وبنسبة 11.6% لبكتريا *E.coli* ، أما بكتريا *Bacillus sphaericus* كانت 5 عزلات وبنسبة 8.3% كما في جدول (2-4) .

جدول (2-4) الفحوصات و الاختبارات الكيموحيوية للأنواع البكتريا المعزولة

نوع البكتريا	نسبتها عد العزلات	Gram Stain	Shape	Motility	Catalase	Oxidase	MR	VP	Indol	Citrate	Hemolysin
<i>B. subtilis</i>	14 (23.3)	+	Bacilli	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>S.epidermidis</i>	13 (21.6)	+	Cocci	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>B. cereus</i>	11 (18.3)	+	Bacilli	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i>	10 (16.6)	+	Cocci	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>E. coli</i>	7 (11.6)	-	Bacilli	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>B. sphaericus</i>	5 (8.3)	+	Bacilli	+	+	-	-	-	-	+	-

ثم اخضعت العزلات البكتيرية للفحوصات الزرعية للتفريق بين العزلات البكتيرية من اجل عزل وتمييز بكتريا *S. aureus* عن الانواع البكتيرية المعزولة بحيث نُمِّيت العزلات على وسط Manitol salt agar إذ كانت هناك 10 عزلات لها القدرة على تخمير سكر المانيتول حولت الوسط من اللون الوردي (الزهري) الى اللون الاصفر (الذهبي) وهذا يدل على ان هذه العزلات تعود الى *S.aureus* ما يميزها عن الانواع الاخرى التي لا تملك القدرة على تخمير هذا السكر (Gillespic و Hawkey ، 2006).

3-4 توزيع الانواع البكتيرية حسب مصدر العينة

1-3-4 عينات التربة

كان مجموع عزلات التربة 34 عزلة وكان عدد عزلات *B. subtilis* 10 عزلات وبنسبة 29.4% ، و عدد عزلات *B. cereus* 8 عزلات وبنسبة 23.5% ، أما عدد عزلات *S. aureus* فقد كانت 6 عزلات وبنسبة 17.6% وكذلك بلغت عدد عزلات *S. epidermidis* 6 عزلات وبنسبة 17.6% . بينما كانت عدد عزلات *E. coli* عزلتين وبنسبة 5.8% وكذلك بلغت عدد عزلات *B. sphaericus* عزلتين بنسبة 5.8% .

2-3-4 عينات المياه

كان مجموع عزلات المياه 26 عزلة حيث بلغت عدد عزلات *B. subtilis* 4 عزلات وبنسبة 15.3% ، وكان عدد عزلات *B. cereus* 3 عزلات بنسبة 11.5% ، بينما كانت عدد عزلات *S. aureus* 4 عزلات بنسبة 15.3% ، وعدد عزلات *S. epidermidia* 7 عزلات بنسبة 26.9% ، أما بالنسبة لعزلات *E. coli* فقد كانت 5

عزلات بنسبة 19.2% ، وبلغت عدد عزلات *B. sphaericus* 3 عزلات بنسبة 11.5% كما موضح في الجدول (3-4) .

جدول (3-4) توزيع الانواع البكتيريا ونسبها المئوية بحسب مصدر العينة

مصدر العينة	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E.coli</i>	<i>B. sphaericus</i>
التربة	(29.4) 10	(23.5) 8	6 (17.6)	(17.6) 6	(5.8) 2	(5.8) 2
المياه	(15.3) 4	(11.5) 3	4 (15.3)	(26.9) 7	(19.2) 5	(11.5) 3
المجموع	(23.3) 14	(18.3)11	10 (16.6)	(21.6) 13	7 (11.6)	(8.3) 5

3-3-4 العزلات السريرية (المرضية)

كان عدد عزلات *Staphylococcus aureus* المرضية التي تم الحصول عليها من عينات سريرية مختلفة تضمنت عينات (الادرار ، اخماج الجروح ، الحروق) 10 عزلات كما في الجدول (4-4) .

جدول (4-4) الاعداد والنسبة المئوية لعزلة بكتريا *S. aureus* المعزولة من عينات سريرية مختلفة .

النسبة المئوية %	عدد <i>S.aureus</i>	نوع العينة
20	2	الادرار Urine
50	5	مسحات الجروح Wound swab
30	3	مسحات الحروق Burn swabs
100	10	المجموع

4.4 التحري عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية

Detection of some Virulence factors of *Staphylococcus aureus*

1.4.4 انتاج الهيموليسين Haemolysin Production

اظهرت النتائج ان جميع عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من التربة والمياه (بيئة طبيعية) والمعزولة من المستشفى (بيئة مرضية) لها القدرة على انتاج الهيموليسين وبنسبة 100% ، كما موضح في الجدول (4-5) ، اذ تطابقت تلك النتائج مع ما توصلت له AL-Hasani ، (2011) إذ وجدت ان جميع عزلات *Staphylococcus* منتجة للهيموليسين وبنسبة 100%. توجد هناك اربعة اصناف من الهيموليسين يمتلكها جنس *Staphylococcus* وهي الفا ، و بيتا و كاما و دلتا ، اذ

يمتاز جنس المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* بامتلاكه صنف هيمولايسين بيتا وجنس *S.epidermidis* بامتلاكه صنف هيمولايسين كاما لان هذا الذايفان له القابلية على تحطيم كريات الدم الحمراء والصفائح الدموية وهو سام لبعض خلايا الانسجة ، كما ان صنف الفا له القابلية على تحليل الخلايا الملتزمة الكبيرة Macrophage (Lamont و Demuth، 2006) .

2-4-4 انتاج البروتيز Protease Production

اظهرت النتائج ان 6 عزلات بنسبة 60% تعود لـ *S.aureus* البيئية لها القدرة على انتاج هذا الانزيم تقاربت تلك النتائج مع ما توصلت له AL-Hasani ، (2011) بأن 80% من عزلات *S.aureus* منتجة لهذا الانزيم ، وقد تقاربت مع ما توصل له الحيايى ، (2014) بأن 75% من عزلات *S.aureus* منتجة لانزيم البروتيز ولم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصلت له اسماء وآخرون ، (2009) بأن من بين 35 عزلة تعود لـ *S.aureus* انتجت 10 عزلات 28.5% انزيم البروتيز .

بينما اظهرت نتائج *S. aureus* المرضية بأن 8 عزلات وبنسبة 80% لها القدرة على انتاج هذا الانزيم ، تطابقت تلك النتائج مع ما توصلت له AL-Hasani ، (2011) بأن 80% من عزلات *S.aureus* منتجة لهذا الانزيم ، وقد تقاربت مع ما توصل له الحيايى ، (2014) بأن 75% من عزلات *S.aureus* منتجة لانزيم البروتيز ولم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصلت له اسماء وآخرون ، (2009) ، بأن من بين 35 عزلة تعود لـ *S.aureus* انتجت 10 عزلات 28.5% انزيم البروتيز كما في جدول (4-5) .

يُعدّ انزيم البروتيز Protease من اهم عوامل الضراوة لما له من اهمية في احداث الاصابة وذلك من خلال تحطيمه لبروتينات المضيف مثل السلسلة الثقيلة للاميونوكلوبولينات المناعية Immunoglobulin heavy chain (اسماء واخرون ، 2009) .

3-4-4 انتاج اللايبيز Lipase Production

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان عزلتين بنسبة 20% تعود للنوع *S.aureus* البيئية منتجة لللايبيز، لم تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه AL-Hasani ، (2011) الى ان جميع عزلات ذلك النوع منتجة لهذا الانزيم .

بينما اظهرت النتائج بان 8 عزلات وبنسبة 80% تعود لـ *S. aureus* المرضية لها القدرة على انتاج هذا الانزيم تقاربت تلك النتائج مع ما توصل اليه AL-Hasani ، (2011) الى ان جميع عزلات ذلك النوع منتجة لهذا الانزيم .

يعد انزيم اللايبيز من عوامل الضراوة المهمة ويمثل اللايبيز عامل ضراوة انزيمي يسهم في عملية التغذية Nutrition او في تحرير الاحماض الدهنية الحرة free fatty acids التي لها دور في عملية الالتصاق Adherence (winny واخرون ، 2012).

4-4-4 انتاج الستافيلوكاينيز Staphylokinase production

بينت النتائج ان 7 عزلات و بنسبة 70% تعود للنوع *S.aureus* الطبيعية منتجة للستافيلوكاينيز و 8 عزلات بنسبة 80% تعود للنوع *S.aureus* انتجت انزيم الستافيلوكاينيز جدول (4-5) ، اذ تقاربت تلك النتائج من ما توصل اليه (Dezfulian

واخرون، 2012) ، الذي بين ان 7 عزلات من اصل 12 عزلة بنسبة 60% من المكورات العنقودية لها القابلية على انتاج هذا الانزيم ، اذ يعمل هذا الانزيم على تحليل خثرة الليفين (الفايبرين) Fibrin clot وبالتالي يسمح للبكتيريا المرضية بالانتشار خلال انسجة جسم العائل من خلال الجروح والحروق ما يؤدي الى حدوث التهابات جلدية (Menstrina واخرون، 2011).

Urease Production

5-4-4 انتاج اليوريز

ان قابلية البكتيريا على إنتاج إنزيم اليوريز تعد عاملاً من عوامل ضراوة البكتيريا حيث يعمل الإنزيم على تحليل اليوريا وتحرير الأمونيا القاعدية التي تعمل على رفع الأس الهيدروجيني للوسط ؛ مما يؤدي الى تغيير لون الوسط الى اللون الوردي في حالة انتاج البكتيريا لهذا الانزيم (Friedrich و اخرون ، 2005) . تختلف قابلية البكتيريا في انتاجها لهذا الانزيم إذ وجد أن جميع بكتيريا *S.aureus* لها القابلية على إنتاج هذا الإنزيم ، اذ اتفقت هذه النتائج مع (علي و اخرون ، 2007) كما في جدول (4-5).

Bacteriocin Production

6-4-4 انتاج البكتريوسين

بينت النتائج و كما هو موضح في الجدول (4-5) بأن جميع عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* البيئية غير منتجة للبكتريوسين ولم تتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه (نجيب و اخرون ، 2007) حيث كانت نسبة بكتريا *Staphylococci* المنتجة للبكتريوسين 20% .

بينما اظهرت نتائج *S. aureus* المرضية بان عزلتين وبنسبة 20% كانت منتجة للبكتريوسين اذ تطابقت تلك النتائج مع ماتوصل اليه (نجيب و اخرون ، 2007) ؛

يعود الاختلاف في نسب العزلات المنتجة بين دراسة وأخرى الى عزلات الاختبار بصورة أساسية، فقد تكون عزلة الاختبار متحسسة لنوع معين من البكتريوسين لكن إظهار الفعالية القاتلة يعزى إلى افتقارها للمستقبلات الخاصة بنقله ، أو قد ينتج لكن بكميات قليلة لا تتمكن من قتل الخلية الحساسة ، كما قد تتعرض البكتريا إلى طفرات معينة لسبب أو اخر مما قد ينتج عنه فقدان المستقبلات الخاصة للبكتريوسين وبالتالي تصبح عزلة الاختبار مقاومة (العتيبي، 2013) .

Biofilm Production

4-4-7 انتاج الغشاء الحيوي

اظهرت النتائج ان عزلتين وبنسبة 20% من عزلات *S. aureus* البيئية لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي و بطريقة احمر الكونغو جدول (4-5) اذ تقاربت تلك النتائج جزئيا مع نتائج دراسة خضر (2013) اذ وجد ان 42.8% من *S.aureus* منتجة للغشاء الحيوي .

لم تتفق تلك النتائج مع ما توصل إليه Kaya و Turkyilmaz (2006) الذي وجد ان 77.8% من عزلات *Staphylococcus* منتجة للغشاء الحيوي .

بينما اظهرت نتائج *S. aureus* المرضية ان جميع العزلات وبنسبة 100% لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي وبطريقة احمر الكونغو تقاربت تلك النتائج جزئيا مع ما توصل اليه Kaya و Turkyilmaz (2006) الذي وجد ان 77.8% من عزلات *Staphylococcus* منتجة للغشاء الحيوي .

وقد تقاربت النتائج ايضا مع نتائج الحياي، (2014) ان 25 عزلة وبنسبة 78%

تعود لجنس المكورات العنقودية منتجة للغشاء الحيوي .

Coagulase production

4-4-8 إنتاج الانزيم المخثر

اظهرت جميع عزلات *S.aureus* البيئية والمرضية بأن لها القدرة على انتاج هذا الانزيم وبنسبة 100% وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه (الابراهيم ، 2013) إذ وجد ان 100% من *S.aureus* منتجة للانزيم المخثر الحر .

تعزى امراضية المكورات العنقودية الى دورها في تحلل الدم (Mina واخرون ، 2004)
أذ يعد هذا الانزيم من عوامل الضراوة المهمة ويشكل عاملا مهما في تزويد الجراثيم بالحديد (Dhakal و Mulvey ، 2012) اذ يتداخل مع أغشية الخلايا المضيفة وهو فعال ضد العديد من انواع الخلايا بما في ذلك الخلايا الظهارية البولية (Nielubowicz و Mobley ، 2010) .

كما وجد ان البكتريا المكونة للأغشية الحيوية تشكل مشكلة كبيرة اذ انها تعمل على مقاومة الدفاعات المناعية للمضيف والمواد القاتلة للجراثيم والمضادات الحيوية (Hancock واخرون ، 2010) .

هناك عدد من الانزيمات والذيفانات الاخرى التي تنتجها بكتريا *S.aureus* التي تسهم في زيادة امراضيتها مثل الستافيلوكاينيز (Staphylokinase) الذي يحلل الفايبرين المكون للخرثرة ، اضافة الى (Proteinase) الذي يحلل البروتينات الخلوية (Humphrey ، 1997) ومن الانزيمات الاخرة التي تفرزها الانزيم الحال للدهن (Lipase) الذي يساعد على غزو هذه البكتريا لانسجة الجلد الدهنية وما تحت الجلد (Todar ، 2002) .

ومن النواتج الأخرى التي تنتجها بكتريا *S.aureus* هي انزيمات Urease التي تعد من عوامل الضراوة التي تسهل عملية انتشار الإصابة إلى الأنسجة المجاورة وبالتالي تؤدي دورا في امراضية هذه البكتريا (Murray وآخرون ، 2009 ; Brooks وآخرون ، 2007 ; Harley و Prescott ، 2002) .

جدول (4-5) اعداد عزلات *Staphylococcus aureus* المنتجة لبعض عوامل

الضراوة ونسبها المئوية .

نوع الاختبار	عدد عزلات <i>S.aureus</i> البيئية	عدد عزلات <i>S.aureus</i> البيئية المنتجة ونسبها المئوية	عدد عزلات <i>S.aureus</i> المرضية	عدد عزلات <i>S.aureus</i> المرضية المنتجة ونسبها المئوية
انتاج الهيمولايسين	10	10 (100)	10	10 (100)
انتاج البروتينز	10	6 (60)	10	8 (80)
انتاج اللايباز	10	2 (20)	10	8 (80)
انتاج الستافيلوكاينيز	10	7 (70)	10	8 (80)
انتاج اليوريز	10	10 (100)	10	10 (100)
انتاج البكتريوسين	10	0	10	2 (20)

10 (100)	10	2 (20)	10	إنتاج الغشاء الحيوي
10 (100)	10	10 (100)	10	إنتاج الانزيم المخثر

5.4 اختبار حساسية بكتريا المكورات العنقودية الذهبية لمضادات الحياة Antibiotic sensitivity test

اظهرت نتائج اختبار حساسية عزلات المكورات العنقودية الذهبية تجاه ثمانية مضادات حيائية في جدول (4-6) وملحق رقم (1) ان 6 عزلات بنسبة 60% *S.aureus* البيئية حساسة لمضاد Tobramycin في حين كانت 4 عزلات و بنسبة 40% مقاومة لهذا المضاد وقد توافقت نتائج دراستنا جزئيا مع ما توصلت اليه Jameel وآخرون ، (2015) حيث كانت نسبة الحساسية لهذا المضاد 90.9% ، بينما اظهرت نتائج *S. aureus* المرضية ان عزلتين وبنسبة 20% كانت حساسة لمضاد Tobramycin في حين ان 8 عزلات وبنسبة 80% مقاومة لهذا المضاد اذ لم تتوافق نتائج دراستنا مع ما توصل اليه Jameel وآخرون ، (2015) حيث كانت نسبة الحساسية لهذا المضاد 90.9% . ولكن هناك بعض السلالات التي قد تبدي بعض المقاومة وذلك بسبب بوجود انظمة الدفع اوعن طريق انزيمات التحويل (modifying enzyme) Majumder وآخرون، 2009).

وقد اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان عدد عزلات *S.aureus* البيئية المقاومة لمضاد Gentamycin 4 عزلات بنسبة 40% و 6 عزلات حساسة لهذا المضاد و بنسبة 60% ، وهذه تتفق مع ماتوصلت اليه زيدان واخرون ، (2009) الذي اوضح ان نسبة العزلات المقاومة لهذا المضاد 52% ، بينما لم تتفق هذه النتيجة مع دخيل و تكتوك (2009) حيث كانت نسبة مقاومة *S.aureus* لهذا المضاد 10%.

وكذلك اظهرت عزلات *S. aureus* المرضية ان 8 عزلات وبنسبة 80% كانت مقاومة لهذا المضاد وعزلتين وبنسبة 20% كانت حساسة للمضاد وقد توافقت نتائج دراستنا جزئيا مع ماتوصلت اليه زيدان واخرون ، (2009) الذي اوضح ان نسبة العزلات المقاومة لهذا المضاد 52% ، بينما لم تتفق هذه النتيجة مع دخيل و تكتوك (2009) حيث كانت نسبة مقاومة *S.aureus* لهذا المضاد 10%. وقد يعود سبب المقاومة لهذا المضاد لوجود جين يشفر لاحداث تحوير في الموقع الهدف (30s) الذي يرتبط به المضاد ويسبب نشوء المقاومة (Hanaki , 2004).

بينت نتائج الدراسة الحالية ان عدد عزلات *S.aureus* البيئية المقاومة لمضاد Trimethoprim sulfamethoxazole عزلتين بنسبة 20% و 8 عزلات بنسبة 80% حساسة لهذا المضاد و لم تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه عبد الرضا و مجيد ، (2009) اذ ان نسبة المقاومة كانت 72.26% ولم تتفق كذلك مع ما توصل اليه Jameel و اخرون،(2015) حيث كانت نسبة المقاومة 100% و لم تتفق كذلك مع مهدي، (2013) حيث كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد 66.6% ، بينما اظهرت جميع عزلات *S. aureus* المرضية وبنسبة 100% مقاومة لهذا المضاد اذ تطابقت هذه

النتائج مع ما توصل اليه Jameel و اخرون،(2015) حيث كانت نسبة المقاومة 100% ، وتقاربت هذه النتائج مع ما توصل اليه عبد الرضا و مجيد ، (2009) اذ ان نسبة المقاومة كانت 72.26% و مع نتائج مهدي ، (2013) حيث كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد 66.6% . و يعود السبب الى الاختلاف في نوع ومصدر عينات الدراسة .

لم تظهر عزلات *S.aureus* البيئية اي مقاومة لمضاد Doxycycline ، بينما كانت 10عزلات وبنسبة 100% حساسة لهذا المضاد ، وكان عدد عزلات *S.aureus* المرضية المقاومة لهذا المضاد عزلتين بنسبة 20% و 8 عزلات بنسبة 80% حساسة لهذا المضاد .

بلغت نسبة عزلات *S.aureus* البيئية المقاومة لمضاد Azithromycin 4 عزلات وبنسبة 40% و 6 عزلات وبنسبة 60% كانت حساسة لهذا المضاد وقد توافقت هذه النتائج مع ما توصل اليه الحياي ، (2014) اذ ان نسبة المقاومة كانت 52.3% و لم تتفق مع ما توصل اليه التميمي، (2012) التي كانت 78% . بينما بلغت نسبة مقاومة عزلات *S.aureus* المرضية لمضاد Azithromycin 100%، لم تتوافق هذه النتائج مع ما توصل اليه الحياي ، (2014) اذ ان نسبة المقاومة كانت 52.3% و لم تتفق مع ما توصل اليه التميمي، (2012) التي كانت 78% . ان سبب مقاومة بكتريا المكورات العنقودية لمضاد Azithromycin أنه قد تحمل جينات *ermA* و *ermB* والتي تسمى بجينات المثيلة (Methylase) التي لها القدرة على الانتقال بين المرضى او نتيجة تغير موقع الهدف لمضاد الحياة او نتيجة الاستعمال الواسع والعشوائي لهذه المضادات (Hatkar واخرون، 2014) .

و اوضحت النتائج ان عدد عزلات *S.aureus* البيئية المقاومة لمضاد Nalidixic acid 6 عزلات بنسبة 60% و 4 عزلات حساسة بنسبة 40% وكذلك اظهرت عزلات *S.aureus* المرضية النتائج نفسها 6 عزلات مقاومة بنسبة 60% و 4 عزلات حساسة بنسبة 40% لم تتفق هذه النتيجة مع دخيل و تكتوك، (2009) حيث كانت نسبة المقاومة 38% .

اوضحت نتائج الدراسات الحالية ان عدد عزلات *S.aureus* البيئية المقاومة لمضاد Ciprofloxacin كانت عزلتين بنسبة 20% و 8 عزلات بنسبة 80% حساسة للمضاد وهذه النتيجة تتفق مع ما توصلت اليه خليفة (2014) اذ بلغت نسبة مقاومة عزلاتها لهذا المضاد 17% و تتفق جزئيا مع ما توصل اليه دخيل و تكتوك، (2009) اذ بلغت نسبة مقاومة عزلاتها لهذا المضاد 38% ولكنها لم تتفق مع نتائج دراسة عبد الرضا و مجيد، (2009) اذ كانت نسبة مقاومة عزلاتها 0% . بينما اظهرت نتائج *S. aureus* المرضية ان 6 عزلات بنسبة 60% مقاومة لهذا المضاد و 4 عزلات بنسبة 40% حساسة للمضاد اذ تطابقت هذه النتائج مع نتائج دراسة زيدان واخرون، (2009) اذ كانت نسبة مقاومة عزلاتها 60% ، و لم تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه دخيل و تكتوك، (2009) اذ بلغت نسبة مقاومة عزلاتها لهذا المضاد 38% و لم تتفق مع نتائج دراسة عبد الرضا و مجيد، (2009) اذ كانت نسبة مقاومة عزلاتها 0% .

واوضحت النتائج ان عدد عزلات *S.aureus* البيئية المقاومة لمضاد Amikacin 4 عزلات و بنسبة 40% و 6 عزلات و بنسبة 60% حساسة للمضاد و تقاربت هذه النتيجة مع Jameel و اخرون،(2015) حيث كانت نسبة المقاومة 37% ، و لم تتفق

هذه النتيجة مع دخيل و تكتوك، (2009) حيث كانت نسبة المقاومة للمضاد %63 . اما بالنسبة *S. aureus* المرضية فقد كانت 8 عزلات وبنسبة %80 مقاومة لهذا المضاد و 2 عزلة وبنسبة %20 حساسة للمضاد تقاربت هذه النتيجة مع دخيل و تكتوك، (2009) حيث كانت نسبة المقاومة للمضاد %63 ، ولم تتفق مع ما توصل اليه Jameel و اخرون،(2015) حيث كانت نسبة المقاومة %37 .

من خلال نتائج الدراسة الحالية يتبين أن المقاومة تحدث نتيجة امتلاك البكتريا انزيمات المحورة المحطمة للمضادات الجرثومية Production of modifying enzymes اذ تعمل هذه الانزيمات على إيقاف عمل المضاد الجرثومي قبل وصوله الى الموقع الهدف (Majumder و اخرون،2009).

كما قد تنشأ مقاومة (المضادات الحيوية) طبيعياً عن طريق الاصطفاء الطبيعي بواسطة الطفرات العشوائية عندما يتم تكوين الجين الجديد تستطيع البكتريا تحويل المعلومات الوراثية بطريقة افقية (ما بين الكائنات الدقيقة) بواسطة تبادل البلازميد (الحمض النووي الدائري). مفعول المضاد الحيوي يشكل ضغطاً بيئياً على البكتريا لكن الطفرات التي تظهر في بعض الخلايا البكتيرية تجعلها تتجو من مفعول المضاد الحيوي ، بعد ذلك تنتقل هذه الميزة الى النسل المقبل الذي يتميز بكونه جيلاً ذا مقاومة كاملة للمضادات الحيوية . بينت عدة دراسات ان طريقة استعمال المضاد الحيوي تؤثر بصفة كبيرة على تطور عدد الكائنات الحية الدقيقة المقاومة . ان فرط استعمال المضادات الحيوية ذات الطيف الواسع ،مثل سيفالوسبورين من الجيل الثاني والثالث ، سَرع عملية تطور مقاومة الميثسليين . كما ان استعمال المضادات بشكل واسع ولفترة زمنية طويلة مكنت العقنوديات

الذهبية وغيرها من الجراثيم من تطوير المقاومة لهذه الادوية وهكذا ظهرت سلالات جديدة مقاومة . ومن الاسباب التي ساعدت في تطور هذه المقاومة استخدام جرعات دوائية أقل من الجرعات المطلوبة للقضاء على الجراثيم . هناك عوامل أخرى تتمثل في التشخيص الطبي غير الدقيق ، ووصف الطبيب أدوية غير ضرورية ، والاستعمال غير المناسب للمضادات الحيوية من قبل المريض (Criz وآخرون ، 2005) .

جدول (4-6) عدد عزلات المكورات العنقودية الذهبية ونسب مقاومتها والحساسية

لمضادات الحياة

عدد ونسبة عزلات <i>S. aureus</i> المرضية %		عدد ونسبة عزلات <i>S. aureus</i> البيئية %		مضادات الحياة
S	R	S	R	
2 (20)	8 (80)	6 (60)	4 (40)	Tobramycin
2 (20)	8 (80)	6 (60)	4 (40)	Gentamicin
0 (0)	10 (100)	8 (80)	2 (20)	Trimethopri msufamethox azol
8 (80)	2 (20)	10 (100)	0 (0)	Doxycycline
0 (0)	10 (100)	60 (60)	4 (40)	Azithromycin
4 (40)	6 (60)	4 (40)	6 (60)	Nalidixic acid

4 (40)	6 (60)	8 (80)	2 (20)	Ciprofloxacin
2 (20)	8 (80)	6 (60)	4 (40)	Amikacin

R= Resistante

S= Sensitive

4-6 تشخيص بكتريا *S.aureus* جينيا و التحري عن جينات الضراوة *femA* و *nuc*

باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل P.C.R

أُختبرت 4 عزلات من بكتريا *S.aureus* البيئية والمرضية التي تحمل التسلسلات

(1-5-23-36) ، إذ أُختبرت هذه العينات للتشخيص الجيني بواسطة جين

16srRNA و للكشف من وجود الجينات ومنها جينات الضراوة *femA*، *nuc* ، وذلك

باستخدام تقنية (PCR) وبالاتماد على البودئ (Primers) المتخصصة بجينات

femA، *nuc* والمجهزة من قبل شركة (Bioneer \ Korea) على وفق التسلسل

المصمم من قبل (Hamza و اخرون، 2015) ، وقد تم برمجة جهاز (PCR) كما هو

موضح في جدول (3-11) . وتم استعمال الدنا القالب (DNA template)

المستخلص بواسطة (Mini DNA Bacteria kit) المجهز من قبل شركة

Bioneer ، وتم الكشف عن نواتج استخلاص الدنا البكتيري باستخدام تقنية الترحيل

الكهربائي على هلام الاكاروز لبعض العينات ، واستخدم جهاز مقياس الكثافة الضوئية

Spectrophotometer إذ كانت نقاوة العينات تتراوح ما بين (2- 1.8) . رُحِّل ناتج

تفاعل البلمرة التسلسل الخاص بالجين 16srRNA على هلام الاكاروز بتركيز (1%)

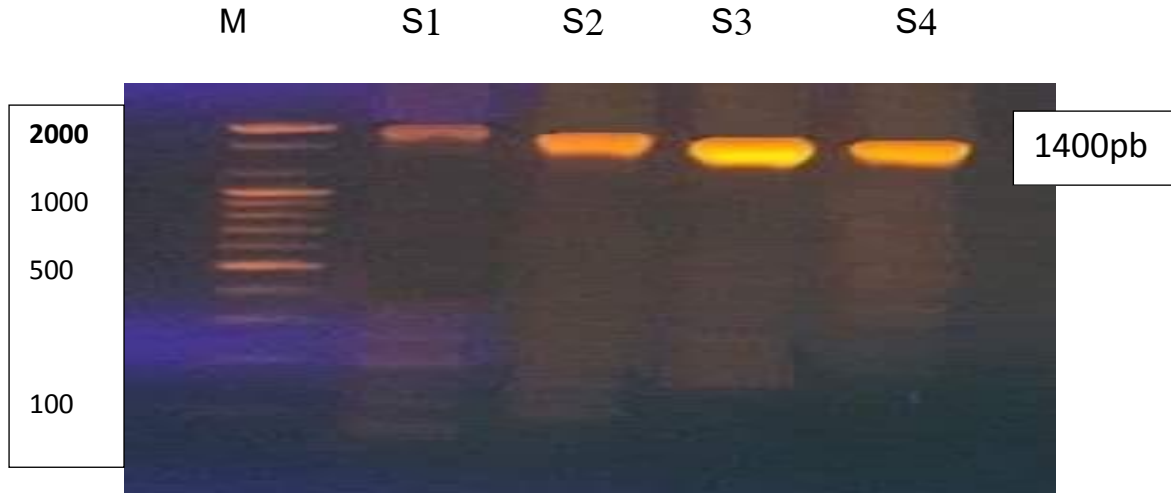
لمدة (1 ساعة) بفرق جهد قدره (100 فولت) ، إذ لوحظ ظهور حزمة واحدة من جميع الحفر وذلك بعد تعريض الهلام الى الاشعة فوق بنفسجية كما في شكل (4-1) . هذا يدل على ارتباط البادئ مع التسلسل المكمل له على شريط القالب عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder المجهز من قبل شركة (\ Bioneer Korea) .

لوحظ أنّ احجام الحزم مماثلة للحجم المتوقع هو (1400 bp) لجين 16srRNA ، وذلك عند مقارنته مع النتائج التي توصل اليها (Mert واخرون ، 2005) بينت الدراسة الحالية أنّ (4) عزلات من بكتريا *S.aureus* كانت موجبة للفحص بنسبة (100%)، أنّ جين 16srRNA هو جين تشخيصي يستخدم بشكل واسع لتشخيص الانواع البكتيرية ويستخدم كذلك في التصنيف و معرفة العلاقات بين الانواع الحية و هذا الجين لا يكون متطابقاً و متجانساً في جميع الكائنات الحية حيث توجد هناك مجموعة من التغيرات التي تحدث خلال عملية التطور (Pfister و اخرون ، 2003) ، ، كذلك بينت نتائج الترحيل الكهربائي لجينات المقاومة *femA*, *nuc* بأن جميع عزلات بكتريا *S.aureus* البيئية بنسبة (100%) كانت غير حاوية على هذه الجينات وهذه النتيجة لا تتوافق مع ماتوصل اليه (Hamza و اخرون، 2015) في العراق الذي كان مصدر عزلاته من الدم و اخماج المجاري البولية اذ كانت العزلات جميعها حاوية على جين *femA* بنسبة (100%) و جين *nuc* بنسبة (20%) .

بالنسبة لعزلات *S.aureus* المرضية فقد كانت عزلة واحدة من مجموع عزلتين استخدمت في الدراسة حاوية على جين *femA* وبنسبة (50%) وكان حجم الحزمة الناتج (509bp) وهو مطابق لحجم الناتج المتوقع (509bp) وهذه النتيجة متقاربة مع ما توصل اليه

(Hamza و اخرون، 2015) اذ كانت جميع العزلات حاوية على جين *femA* بنسبة (100%) .

اما بالنسبة لجين *nuc* فقد كانت عزلة واحدة من مجموع عزلتين استخدمت في الدراسة حاوية على جين *nuc* وبنسبة (50%) وكان حجم الحزمة الناتجة (397bp) وهو مطابق لحجم الناتج المتوقع (397bp) وهذه النتيجة متقاربة مع ما توصل اليه (Hamza و اخرون، 2015) اذ كانت عزلتين من مجموع 10 عزلات وبنسبة (20%) حاوية على هذا جين .



شكل (4-1) : الترحيل الكهربائي لنتائج جين 16srRNA على هلام الأكاروز باستخدام تقنية PCR لبكتريا *S.aureus* ، بتركيز 1% وفرق جهد 100 فولت لمدة (1) ساعة بعد التصبغ بصبغة بروميد الاثيديوم والمعرضة للأشعة فوق البنفسجية .

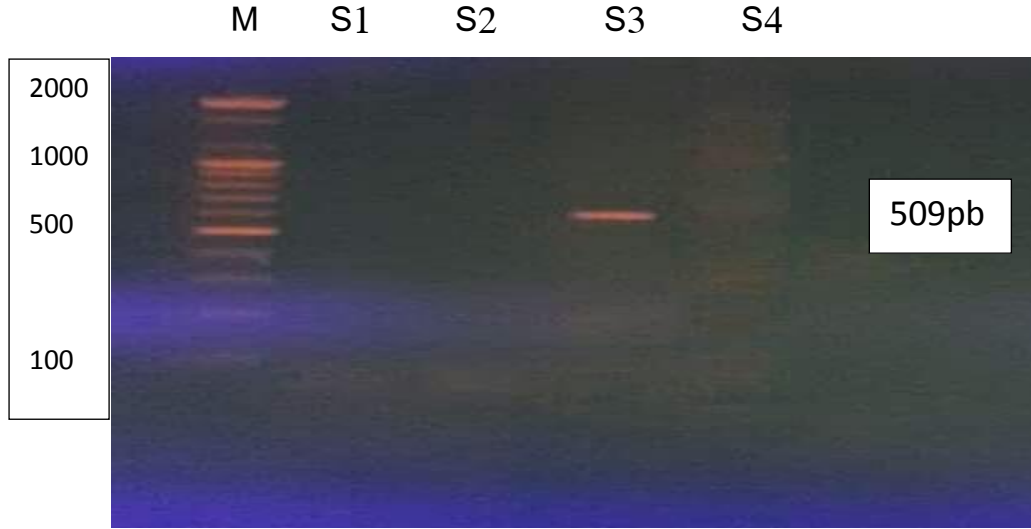
المسار (M) : Marker 100-2000bp

المسار رقم (1) : عزلة (1) *S.aureus* المرضية

المسار رقم (2) : عزلة (5) *S.aureus* المرضية

المسار رقم (3) : عزلة (23) *S.aureus* البيئية

المسار رقم (4) : عزلة (36) *S.aureus* البيئية



شكل (4-2) : الترحيل الكهربائي لنتاج جين *femA* على هلام الأكاروز باستخدام تقنية PCR لبكتريا *S.aureus* ، بتركيز 1% و فرق جهد 100 فولت لمدة (1) ساعة بعد التصبغ بصبغة بروميد الاثيديوم والمعرضة للاشعة فوق البنفسجية .

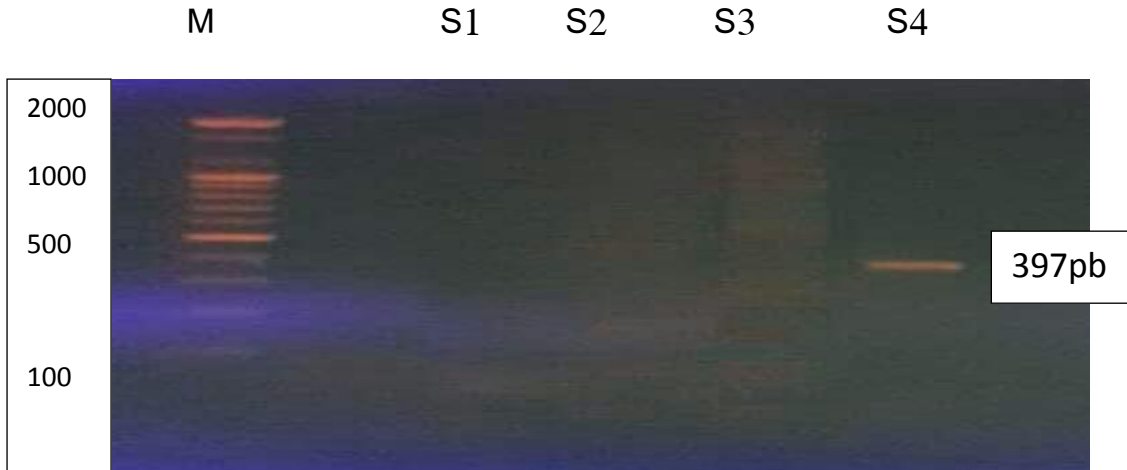
المسار (M) : Marker 100-2000bp

المسار رقم (1) : عزلة *S.aureus* البيئية (23)

المسار رقم (2) : عزلة *S.aureus* البيئية (36)

المسار رقم (3) : عزلة *S.aureus* المرضية (1)

المسار رقم (4) : عزلة *S.aureus* المرضية (5)



شكل (4-3) : الترحيل الكهربائي لنواتج جين *nuc* على هلام الأكاروز باستخدام تقنية PCR لبكتريا *S.aureus* ، بتركيز 1% وفرق جهد 100 فولت لمدة (1) ساعة بعد التصبغ بصبغة بروميد الاثيديوم والمعرضة للاشعة فوق البنفسجية .

المسار (M) : Marker 100-2000bp

المسار رقم (1) : عزلة (23) *S.aureus* البيئية

المسار رقم (2) : عزلة (36) *S.aureus* البيئية

المسار رقم (3) : عزلة (1) *S.aureus* المرضية

المسار رقم (4) : عزلة (5) *S.aureus* المرضية

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions

and

Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

١- امتلكت معظم العزلات قيد الدراسة على عدد من عوامل الضراوة مثل انتاج الهيموليسين و اليوريز و Coagulase بنسبة 100% ، كما تمتلك *S.aureus* المرضية عدد من الانزيمات و الذيفانات الاخرى التي تسهم في زيادة إمرضيتها كامتلاكها للغشاء الحيوي بنسبة 100% بينما العزلات البيئية كانت تمتلك عوامل الضراوة بنسبة قليلة او قد لاتمتلكها.

٢- أظهرت النتائج ان بكتريا *S.aureus* المرضية أكثر مقاومة للمضادات من بكتريا *S.aureus* البيئية حيث أظهرت مقاومة عالية للعديد من المضادات المستخدمة في الدراسة .

٣- امتلكت جميع العزلات قيد الدراسة على الجين التشخيصي 16srRNA

٤- امتلكت عزلات *S.aureus* المرضية جين الضراوة *femA* المسؤول عن مقاومة البكتريا لل Methicillin والمسؤول عن دوره السريع في التحلل الذاتي autolysis ، بينما أظهرت النتائج ان جميع عزلات *S.aureus* البيئية لاتحتوي على هذا الجين .

٥- كما أظهرت النتائج أيضاً أمتلاك *S.aureus* المرضية جين الضراوة *nuc* الذي يشفر لـ Thermonuclease والمسؤول عن انتاج السموم الداخلية enterotoxin ، بينما كانت جميع عزلات *S.aureus* البيئية لاتحتوي على هذا الجين .

التوصيات Recommendations

- ١- اجراء دراسة وراثية على أنواع بكتيرية مرضية سالبة لصبغة كرام .
- ٢- التحري عن جينات بعض عوامل الضراوة غير التي درست وعمل تسلسل نيوكليوتيدي لها باستخدام تقنية PCR .

المصادر

References

المصادر العربية

- اسماء ، محمود سعود ، غازي منعم عزيز الخفاجي ، زهره محمود . (2009)
 . تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم البروتيز من بكتريا *Staphylococcus aureus* AGIO المعزولة محليا . المجلة العراقية للتقانات الاحيائية . 8 (1):
 10 - 26 .
- الابراهيم ، مصطفى رعد جواد (2013) . الكشف عن بعض الجينات المسؤولة
 عن عوامل الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية في بكتريا المكورات
 العنقودية *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات سريرية مختلفة
 في مدينة الديوانية . كلية العلوم ، جامعة القادسية .
- التميمي ، احمد عيسى جعفر . (2012) . دراسة وراثية لبكتريا
Staphylococcus spp المقاومة لمضاد الفانكوميسين . رسالة ماجستير ، كلية
 التربية للعلوم الصرفة ، جامعة ديالى
- الحيايى ، سيف علي . (2014) . مقارنة وراثية وبكتريولوجية بين
Streptococcus spp و *Staphylococcus spp* المقاومة لمضادات ال
 Macrolid والمعزولة من اصابات سريرية مختلفة . رسالة ماجستير ، كلية
 التربية للعلوم الصرفة ، جامعة بغداد .
- الخفاجي ، زهرة محمود ، أبو المعالي ، حسن محمود (2013). تفاعلات
 الكوثرية
 جامعة بغداد. ٢٩٨ ص.
- الشبيب ، أسفار شهاب . (1990) . المياه والملوثات المجهريية . الدار
 الوطنية للنشر والتوزيع والإعلان.

- العتبي، دعاء عدنان كاظم .(2013) .دراسة بكتريولوجية لبعض اجناس العائلة المعوية المعزولة من صالات مستشفى الولادة في مدينة بعقوبة.رسالة ماجستير كلية التربية للعلوم الصرفة ،جامعة ديالى.
- خضر ، ايمان محمود . (2013) . التحري عن قدرة بعض الانواع البكتيرية على انتاج المادة المخاطية . كلية علوم الرافدين ، 24 : 1 - 36 - 49 .
- خليفة ، احلام عبدالله .(2014) . مضخات الدفع Effluxpump في بكتريا *Staphylococcus aureus* المقاومة للمثيسيلين رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .
- دخيل، خلود حامد و نهاد خلاوي تكتوك .(2009). عزل و تشخيص بعض الانواع البكتيرية المرافقة لالتهابات المجاري البولية عند النساء الحوامل المصابات بالسكري نوع B و مقاومتها لبعض المضادات الحيوية. مجلة الهندسة و التكنولوجيا ، المجلد ٢٧ ، العدد ١٦.
- زيدان ، اسراء علي ، القزاز ، عبدالكريم عبدالرزاق و محمد ، علي صادق . (2009) . تأثير الجمع بين مضادات الحياة على بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة سريريا . مجلة جامعة بغداد للعلوم، قسم التقنيات الاحيائية ، كلية العلوم ،جامعة بغداد ، 6 (4) .
- عبد الرضا، حسن علي ، حلا محمد مجيد . (2009) . مقارنة التأثير التنشيطي لبكتريا حامض اللبنيك و رواشحا مع بعض المضادات الحيوية ضد جرثومة المكورات العنقودية الذهبية . مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة ، المجلد الثالث، العدد الثالث.

- علي، فاطمة عبودي، عباس علي هادي، مجاهد خلف علي. (2007).

تشخيص انواع جرثومة Coagulase negative Staphylococci

المعزولة من حالات مرضية مختلفة . كلية العلوم ،جامعة تكريت.

- مهدي، داليا صلاح . (2013). مسح لإصابات التهاب المجرى البولي من

المرضى ذوي القثطار البولي الراقدن في مستشفى الحلة التعليمي العام. مجلة

جامعة بابل، العلوم الصرفة و التطبيقية، العدد ٣، المجلد ٢١.

- نجيب، ليث مصلح، أحمد محمد تركي، رأفت حمدي الحديثي. (2007). عزل

البكتريوسين من عزلات بكتيرية منتخبة و دراسة طيفها التثبيطي ضد بعض انواع

البكتريا المرضية . كلية العلوم ، جامعة الانبار، مجلة جامعة الانبار للعلوم

الصرفة، المجلد الاول ، العدد الثاني.

المصادر الاجنبية

A

- **Albert** , J. Guidry . (2000) . Promising new Mastitis Vaccines , Agricultural Research Magazine .
- **Al-Charrakh** ,A .H .; Yousif ,S .Y .and Al- Janabi ,H .S.(2011). Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocins from Klebsiella isolates from Hilla/Iraq . J. Microbial .Vol . 2(5):1-11.
- **Al-Hasani** , H . A . (2011) . Comparative Study between Methicillin – Resistaut Coagulase Positive and Negative Staphylococci . M . Sc . Theis . Collage of Scince . University of Baghdad .

- **Ali** , O.A. (2012) . Prevention of *Proteus mirabilis* Biofilm by Surfactant Solution . *Egypt Acad . J. Biology. Sci* . 4 (1) : 1-8 .
- **Ansari** , S.A. , Baqai , R., Memon , M.R. , Aziz , M and khan , M.K. (2011) . Biofilm Formation and Isolation of *Staphylococcus aureus* from blood Culture of Patient under going Oral Surgical Procedures . *J . Pak . Dent . Assoc* , 20 (3) : 181-184 .

B

- **Balla**, E. ; Dicks, L.T. ; Toit, M.D. ; Van–Dermewe, M.J. and Holzapfel, W. H. (2000). Characterization and cloning of the gene encoding enterocin 1017A and enterocin 1017B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(4): 1298-1304.
- **Bauer**, S.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C. and Truck, M.D. (1996) . Antibiotic susceptibility testing by standardized single dose method. *American Journal clinical path.*
- **Barski**, P. L.; Piechowicz, J. Galinski, and J. Kur.(1996). Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. *Mol. Cell. Probes* 10:471–475.
- **Benson**, H.G.(2002) . Microbiological Applications (Laboratory Manual in General Microbiology) .Eighth edition Published by Mc Grow-Hill New York.
- **Bizye**,A. ; Sago,A. ; Admasu,G.; Getachew,H. ; Kassa,P. ; and Amsays,M. (2014) . Isolation, Optimization and characterization of protease producing bacteria from soil

and Water in Gondar town , North west Ethiopia, *Int. Journal of bacteriology , Virology and Immunology*: (3) : 20-24

- **Boynukara**, B.; Gulhan, T.; Gurturk, K.; Alisarli, M.; and Ogun, E. (2007). Evolution of slime production by coagulase-negative staphylococci and enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from various human clinical specimens. J. Med. Microbiol. 56: 1296-1300.
- **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.
- **British pharmacopeia**,(2010). London Appendix XVI B2A409-A416, Microbial Examination of Non Sterile Products.
- **Brooks**,G.F. ; Butel,J.S.; Carroll,K.C and Mores,S.A. (2007) . Jawetz,Melinick,J.L. and Adlebergs Medical Microbiology , 24th ed.
- **Brown**, A.E.(2005). Microbiological Applications . Laborator Manual in General Microbiology . Mc Graw-Hill.New York.compaines Inc. ,1221 Avenue of the Americas, NewYork . 144-146 .
- **Burnett**, D. and Crocker, J.(2005) .The science of Laboratory Diagnostic. 2nd ed.John Wiley and sons Ltd , The Atrium.England . Uk:444-448 .

- **Chambers.H.F.** and Deleo, F.R.(2009) . Waves of Resistance : *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic **Era-Nat Rev Microbiol** . 7(9):629-641.
- . **Chikkala**, R.; George, N.O.; Ratnakar, K.S.; Iyer, R.N.; Sritharan, V.(2012). Heterogeneity in femA in the Indian Isolates of *Staphylococcus aureus* Limits Its Usefulness as a Species Specific Marker. Adv. Infect. Dis., 2, 82–88.
- **CLSI**. (2012a) .Methods for Dilution Anti microbial susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically ; Approved standard-Ninth Edition M07-A9. CLSI. Clinical and LaboratoryStandards Institute, wayne,PA. USA . 32(2) : 1-88 .
- **Collee**, J.S ; Fraser, A.G ; Marmion, B.P and simmons. A. (1996) . Mackie & Mecarthey Paractical medical microbiology . 20th ed . Vol.1. Churchill living stone . London .
- **Cowan** , S.T and Steel,K.J. (2004). Edited and rev. by Barrow, G.I., and Feltham, R.K.A., Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd edition. Dock House, The water front, Cape Town 8001, South Africa .
- **Criz, R.T.** ; Chin, J.K. ; Andes, D.R.; de Crecy Lagard, V. ; Craig, W.A. ; Romesberg FE (2005) ." Inhibition of antibiotic resistance " . *PLOS Biol* . 3 (6) : e 176 .

D

- **Dhakal**,B. K. and Mulvey, M. A.(2012). The UPEC Pore-Forming Toxin α -Hemolysin Triggers Proteolysis of Host

- Proteins to Disrupt Cell Adhesion , Inflammatory, and Survival Pathways. *Cell Host & Microbe.*, 11(1): 58-69.
- **Deepak**, S.; Samant, S. A., and Urhekar, A. D. (2000). study of coagulase positive and negative staphylococci in clinical samples. *Indian. J., Med. Sci.* 53 : 425-8.
 - **DeJong** ,A.; Sacha , A. ;Van Hijum,F.; Kok,J. and Kuipers,O. (2006). Bacteriocin genome mining tool .*Nucleic Acids Research* .34(2)234-239.
 - **Demuth** , D. R., and Lamont , R. (2006). Bacterial cell-to-cell communication Rol in virulence and Pathogenesis . *AMCM*. 10(13):97-105.
 - **Dezfulian**, A. ; Aslani, M.M. ; Oskoui, M. ; Farrokh, P. ; Azimirad, M. ; Dabiri, H. ; Salehian , M.T. and zali, M.R. (2012) . Identification and Characterization of ahigh Vancomycin – Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring Van Agene Clusterisolated from Diabetic food ulcer . *Iran. J. Basic. Med. Sci* . ,15(2) : 803-806 .

F

- **Fluit**, A. C.; Verhoef, J.; and Schmitz, F. J. (2001). Frequency of isolation and antimicrobial resistance of gram-negative and gram-positive bacteria from patients in intensive care units of 25 European university hospitals participating in the European arm of the SENTRY antimicrobial surveillance program. 1997-1998. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20: 617-625.

- **Forbes**, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld , A.S.(2007). Baily and scotts Dignostic Microbiology. 11th edition . Mosby , Inc . *Baltimore, USA*, 302-309.
- **Forbes**, B. A. ;Sahm, D. F. and Wessifeld, A. S. (2002) .
Bailey and Scotts' diagnostic microbiology . 9th ed . **Mosby** .
U.S.A. Vol.1:509 .
- **Frieden**, T. (2013) . Antibiotic Resistance Threats In the
United State , 2013 . Director , US . centers for Disease
control Prevention . **United States House of
Representatives** .
- **Friedrich** , A.W.; Koch , R.; Bielasz ewska , M.; Zhang , W.;
Karch , H. and mathys , W. (2005) . Distribution of the
urease gene cluster among and urea activity of
enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 Isolateds from
humans . *J. of Clinical Microbiology* .Vol.43,No. 2 :
pp.546-50 .

G

- **Garrity**, G. M., and J. G. Holt.(2001). The road map to
the manual, p.119–166. *In* G. M. Garrity (ed), Bergey's
manual of systematic bacteriology.Springer-Verlag,
New York, N.Y.
- **Gillespiec** , S., Hawkey,P.,(2006). Principles and Practice of
Clinical Bacteriology . Second Edition. Londen . UK .73-98
.

- **Girou** , E . ; Legrand , P . ; Soing – Altrach , s . ; Iemire , A. ; Tkoub – Scheir linck , L . ; Chai , SH . ; Dupeyron C . and Loche , C . M . (2006) . Association between hand hygiene compliance and methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* prevalence in a French rehabilitation hospital . ***Infect control Hospepidemiol*** 27 (10) : 1128 – 1130.
- **Gupta**, K. ; Hooton, T. M. and Stamm, W. E. (1998). Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community acquired urinary tract infections. *Am. Intern. Med.* 135 :pp. 41 – 50.
- **Gustafson** , J.E., Berger-Bächi, B., Strässle, A., Wilkinson, B.J. (1992) Antimicrob. Agents Chemother. Autolysis of methicillin-resistant and – susceptible *Staphylococcus aureus* .

H

- **Harley**, J. P. And Prescott , L . M. (2002). Laboratory Exercises in Microbiology . 5th. Ed. The Mc Grow – Hill companies, Inc. New York . 8 (13) : 456 – 459.
- **Hamza**, L. F.; Ali, H. A.; Ghazi, M. A.; and Zahraa , M. A.; .(2015). Molecular Study of Virulence Genes of *Staphylococcus aureus* from Various Clinical Origins by PCR. University of Babylon, Medical Journal of Babylon, Vol.12, No.3:677-688.
- **Han** ,B .; Yu , Z .; Liu ,B.; Ma ,Q. and Zhang ,R.(2011). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* YJG, isolated from the mucosa of

- the gut of healthy chickens . J. Microbiology Research .Vol .5(10), :pp.1147–1155.
- **Hanaki, H.** (2004). Epidemiology and clinical effect against beta lactam antibiotic induce. ***J. Antibiotic***. 78 (8) : 204-216.
 - **Hancock, V.;** Dahl, M.and Klemm, P. (2010). Abolition of biofilm formation in urinary tract *Escherichia coli* and *klebsiella* isolates by metal interference through competition for. Fur. Appl. Environ. Microbial., 76(12): 3836-3841.
 - **Hatkar, S . S. ;** Bansal , V . P . , Mariya , S . and Ghogare , H . S (2014). Antimicrobial profile of Inducible Clindamycin Resistant strains of *Staphylococcus aureus* ***International Journal of Health sciences & Research*** , (4) Issue : 6.
 - **Humphreys,H.** (1997) . *Staphylococcus* : Skin infection : Osteomyelitis Food poisoning , Foreign body infections . Medical Microbiology.5th ed.,Churchil Lidingston .USA.
- I
- **Ifeanyichukwu , I . ;** chika , E. ; Emmanuel , N . ,Anthonia , O. ; Ngozi, A. and Esther, U . I . (2015). Community acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (Ca – MRSA) carriage amongst tertiary School Students.

American Journal of Science and Technology , 2 (1) : 18 – 21.

- **Irina** , S .; Vinogrador , E .; Flahant , S . and Grigoris . (2005) .
Extraction and purification of fibronectin *Staphylococcus aureus* , Jour. Infect Immun .73 : 3007 - 3017 .
- **Iwase** , T . ; Uehara , Y ,; Shinji ,; Tajma , A. ; Seo , H .
; Takada , k . ; Agate, T . ; and Mizuhoe , Y. (2010) .
Staphylococcus epidermidis Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal Colonization . **Nature** .
465.

J

- **Jameel**,Zahraa Jaafar , Sura Hameed Nayef , Muthan Abdulkhader Al-Mahdawi.(2015). Study Some Virulence Factors of CO-agulase Positive *Staphylococci* and CO-agulase Negative *Staphylococci* Isolated from Different Parts of Human Body . Tikrit Journal of Pure Science 20 (4) .
- **Jang** , S . (2016) . Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications .
Journal of Microbiology , 54 : 1-8.
- **Janstova** , B . ; Necidova , L . and Janstova , B . (2012) .
Comparing the growth of *S . aureus* and Production of staphylococcal enterotoxin C in Sheeps and goats milk . **J . Microbiology . Biotechnuology and food Sciences** .: 758 – 768 .

- **Jawetz** , M . ; Adelberg , E . A . ; Brooks , G. F . ; Butel , J . S . and Morse , S . A . (2007) . Medical Microbiology . (24 th ed) . MC Graw – Hill company , New Yourk .
- **Johnson**, S.; Dominique, K. and Labischinski, H. (1995) . femA of *Staphylococcus aureus*: Isolation and Immunodetection, FEMS Microbiol Lett, 132:221-228, .
- **Jongsik**, C.; Jae-Hak, L.; Yoonyoung, J.; Mungjin, K.; Seil, K.; Byung, K.; and Young-Woon, L .(2007). EzTaxon: aweb-based tool for the identification of prokaryotec based on 16S ribosomal RNA gene Sequences. Seoul National University, Repuplic of Korea, International Journal of Systematic and Evolution Microbiology,57,2259-2261.

K

- **Kalyani** , N . and Saraswathy , N . (2014) . Production of extracellular lipase by anew strain *Staphylococcus aureus* NK – LB337 isolated from oil contaminated soil . ***African Journal of Biotechnology*** , 13 (28) : 2858 – 2866 .
- **Kenneth**, T . (2002) . The bacterial flora of Human , University of Wisconsin – Madison . Department of bacteriology .
- **Kloos**, W.E.; and Bannerman ,T.L. (1995) *Staphylococcus* and *Micrococcus* , In : Manual of clinical microbiology . Balows , A.g, w J. Housler , Jr,

K,I, Hermann, H,D,I senberg, and H.J.shadomy (eds.)
6th ed . American society for microbiology .

- **Kloos**, W. E; Schleifer, K. H. (1986) Family I. Micrococcaceae. Genus IV. Staphylococcus, Rosenbach 1884, 18AL. in Bergey's manual of systematic bacteriology, eds Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G. (Williams and Wilkins, Baltimore, Md). 2:1013–1035.
- **Koneman**, E.W; Allen, S.D; Janda, W.M; Schreckenberger, P.C and Winn, W.C.J.(1992). Color Atlas and Textbook Of Diagnostic Microbiology. (4th) ed. *J.B.Lippincott Company*. Philadelphia.

L

- **Lee** , S .S .; Oh , T .J .; Kim , J .; Kim , J .B . and Lee ,H.S .(2009) .Bacteriocin from Purple Nonsulfur Phototrophic Bacteria, *Rhodobacter capsulatus* . J. Bacteriology and Virology .Vol .39 :269 -276.
- **Li**, X.; Lockatel, C.V.; Johnson, D.E.; Lane, M.C.; Warren, J.W.&Mobley, H.L.T.(2004). Development of intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by *Proteus mirabilis*. Infect. Immun. Jan. 72(1): 66-75.
- **Lin** , C .; Bayer , A .; Cosgrave , S . E .; Daum , R . S .; Fridkin , S . K ; Gorwitz , R . J .; Kaplan , S . L .; Karchmer , A . W .; Levine , D . P .; Murray , B . E ; Ry ... , M .J .; Talan , D . A ; and chambers , H . F . (2011) . Clinical Practice Guidelines by the infectious Diseases

Society of America for the Treatment of Methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus* In fection in Adults and children . *J . Clin . Infect . Dis . Clinical Practice Guidelines* . 52 : 1- 38 .

- **Louie**, L., Goodfellow, J., Mathieu, P., Glatt, A., Louie, M. And Simor, A. E. (2002). Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 40, 2786–2790.

M

- **Maes**, N., Magdalena, J., Rottiers, S., De Gheldre, Y. And Struelens, M. J. (2002). Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci and determine methicillin resistance from blood cultures. *J Clin Microbiol* 40, 1514–1517.
- **Maidhof**, H.; Reinicke, B.; Blumel, P.; BergerBachi, B. and Labischinski H. (1991). femA, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillinresistant and methicillin-susceptible This article can be downloaded from www.ijpbs.net B - 35 *Staphylococcus aureus* strains, *Journal of Bacteriol*, 173 (11): 3507–3513.
- **Majumadar** , K. ; Wei , L. ; Annedi , S.C. ; and Kotra , L.P. (2009). Enzyme-Mediated Resistance to Antibiotics : Mechanism , Dissemination , and Prospects for Inhibition.

Editor by Robert A. Bonomo and Marcelo E. Tolmasky.
Chapter 2: 7-20 .

- **Marcus**, K. (2005). New bacteria on the block. *J. Infect. Dis.* , 192 : 811- 818
- **Matthew**, J.T. (2012). Synthesis of the accessory gene regulator auto inducing Peptide in *Staphylococcus aureus*. University of Iowa. *Int. J Antimicrob Agents*. 44 : 123 – 130
- **Mathews**, AA.; Thomas, M.; Appalaraju, B. J J, Indian Journal of Pathol Microbiol, (2010) 53:79- 82.
- **Mathur** , T. ; Singhal , S. ; Khan , S. etal. (2006) . Adverse effect of Staphylococci slime on in vitro activity of glycopeptides. *Pn. J. Infeet. Dis* 58 :353 – 7 .
- **MCGrath**, E. J and Asmar , B. I. (2011). Nosocomial infection and efflux pump contributes to the reduced Susceptibility of Laboratory – derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. *Antimicrob Agents chemother*. 49:65-71 .
- **Menestrina** , G. ; Dalla , S. and Prevost , A. (2011). Mode of Action of β . barrel pore – forming toxin of staphylococcal α . hemolysin family. *J. Toxicon*. 39 , 11: 1661-1672.
- **Mert**, S. A.; Fazil, Y. and Hatice, G. (2005). Identification of staphylococci by 16S internal transcribed spacer rRNA gene restriction fragment

length polymorphism. Journal of Medical Microbiology (2005), 54, 823–826.

- **Meyers** , A..M.D.(1995). Modern management of acute Diarrhea and dehydration in children. Amer Family physician.,51(5) : 1103 – 1115.
- **Mima**, C.; Dockrell, H.M.; Goering, R.E. and Roitt, I. (2004). Medical Microbiology. 3 rd ed. Elsevier Limited.
- **Morello** , J.K. ; Mizer , H. E and Granato , P.A. (2006). Laboratory Manual And work Book in Microbiology Application To Patient Care. 8thed. Mc Graw Hill.
- **Murray**, P. R.; Rosenthal, K. S.; and Pfaller, M. A. (2009) . John, F. K. Kennedy. Medical microbiology. 6th edition. Mosby Elsevier. U.K.

N

- **Nair**, S. P.; Williams, R. J.; and Henderson, B. (2000). Advances in our understanding of the bone and joint pathology caused by Staphylococcus aureus infection. Rheumatol. 39 :131-138.
- **Namvar** , A.E. ; Bastarahang , S. ; Abasi , N. ; Ghehi , G. sh. ; Farhadbakhtiarin , S. ; Arezi , P. ; Hosseini , M. ; Baravati, Sh. Z. ; Jokar , Z. and chermahin , S.G. (2014). Clinical Characteristics of *Staphylococcus epidermidis* : asystematic review. **GMS Hygiene and Infection control** 9(3).
- **Nassif**, X. and Sansonetti, P.J.(1986). Correlation of the virulence of Klebsiella Pneumonai K1and K2 with presence of

plasmid Encoding aero-bactin. Infect.Immun., 54(3), pp:603-608.

- **Nester**, E.W.; Denise, G. Anderson, C.; Evans Roberts, J.R.; Nancy, N. Pearsall; Martha, T. Nester. (2001). "Microbiology" 3rd McGraw-Hill Inc., 1221.
- **Nicholl** , D.S.T . (2008) . An introduction to genetic engineering . Third edition .Cambridge University press, 509pp.
- **Nielubowicz**, G.R. and Mobley, H.L.(2010). Host – pathogen infections in urinary tract infection. Nature Rev. Uro., 7(8): 430 -441 .

O

- **Okafor** , N . (2007) . Modern Industrial Microbiology and Biotechnology . *science publishers* , 5 : 77 – 89 .
- **O'Riodan**, K. and Lee, J. C. (2004). Staphylococcus aureus capsular polysaccharides. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 17 (1): 218-234.

P

- **Pamela** , R .; DVM .; MPVM . (2001) . Evaluating the effectiveness of Mastitis vaccines . Apractical guide to managing mastitis . University of Wisconis . Madison .
- **Patel, J. B.** (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identificationin the clinical laboratory. Mol. Diagn. 6:313–321.
- **Pfister**, P., Hobbie, S.; Vicens, Q.; Bottger, E. C.; and Westhof, E. (2003). Themolecular basis for A-site mutations conferring

aminoglycoside resistance:relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures.Chembiochem 4:1078–1088.

- **Pinheiro** , L . ; Brito , C . I . ; Oliveira , A . ; Martins , P . ; Pereira , V . C . ; and Rebeiro , M . (2015) . *Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus* : Molecular Detection of cytotoxion and Enterotoxin Genes . **Toxins** , 7 : 3688 – 3699 .
- **Prescott**, L.M.; Harley, T.P. and Klein, D.A. (2005). "Microbiology". 6th ed., McGraw-Hill Companies, Inc. USA.

Q

- **Qin** , R . ; Xiao , K ; Li , B . ; Jiang , W . ; Peng , W . ; Zheng , J . ; Zhon , H . (2013) . The combination of Catechin and epicatechin Callate from fructus Crataegi Potentiates beta – lactam antibiotics against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro and in vivo . **Int . J . Mol . Sci** . 14 : 1802-1821 .

R

- **Rajamohan** , G. ; Kanak , L . and Dikshit . (2000) . Role of the N-terminal region of Staphylokinase (SAK): Evidence for the participation of the N- termina region of (SAK) in the enzyme Substrate complex formation . **FEBS Letters** . 474151158 .
- **Reitrer**, K .C. ; Villa ,B. ; Silva-paim , T.; Oliveira , C. and Azevedo ,P. (2013) . Inhibition of biofilm maturation by

Linezolid in methicillin – Resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates : Comparison with other drug .
J. Medical Microbiology ; 62 :394- 399 .

- **Rodgers**, G.A. (1987). Biological nitrogen transformation in soil after repeated application of nitrification inhibitors. Zentralbl-Microbiol. 142:343-348.
- **Rodvold** , K . A and Mcconeghy , K . W. (2014) . Methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus* Therapy : Past , Present , and future . **clinic . Infect . Dis** . 58 (51) : 520 – 7 .
- **Ryan**, K. J. & Ray, C. G. 2004. Sherris Medical Microbiology. 4th ed. McGraw-HillNew York.

S

- **Sambrook** , J. and Russell , D.W. (2001) . Molecular Cloning : A Laboratory manual . 3rd edition . Cold spring Harbor , New York , 8(2) : 512-514.
- **Sarika** , A . R.; Lipton ,A .P .and Aishwarya ,M .S.(2010). Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions .J . Food Science and Technology .2(5):291-297.
- **Shakibaie** , M.R. ; Golkari , X. and Salajegheh , Gh. (2014). Antimicrobial Susceptibility , Virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolate

from hospital infections in Kerman , *Iran. Journal of Microbiology and Infection Diseases* 4(4) : 152 – 158 .

- **Sharon**, O.; Bruce,I.; Wayne, W. and Shery, W . (2009) .Drinking water :bacteria nebraska Dept.of health and Human Services,University of Nebraska,Lincoln.
- **Sibanda** , T. and okoh , A.I .(2008) . In vitro evalution of the interaction between acetone extract of Garcinia Kola seeds and some antibiotics . *African Journal of Biotechnology* , 7(11):1672-1678
- **Singh** , V .; Main, I . and Kumar , D. (2015) . Metabolic Engineering of Microorganisms for Biosynthesis of Antibiotic . *System and Synthetic* . Chapter 18 : 341-356 .
- **Stephenson** , F.H. (2003). Calculations for Molecular Biology and Biotechnology : A Guide to Mathematics in the Laboratory. 1st edition . Elsevier,USA. CH-2:18-34.
- **Studer**, E., Schaeren, W., Naskova, J., Pfaffli, H., Kaufmann, T.,and Kirchhofer, M. (2008). A longitudinal field study to evaluate the diagnostic properties of a quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay to detect *Staphylococcus aureus* in milk. J. Dairy Sci., 91: 1893-1902.

T

- **Thati** , V. ; Shivannavar , CH. T. ; and Gaddad , S.M.(2011) . Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of

tertiary care hospitals in Hyderabad . *Indian J Med Res* ,134:704-708 .

- **Todar**,K. (2002). *Staphylococcus*. J. Med. Microbiol, 1-9.
- **Todorov** ,S. D.(2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*- Production ,Genetic Organization and mode action .J . Microbiology.40:209-221.
- Tong , S. ; Chen , L. ; and Fowler , V. (2012). Colonization Pathogenicity , Host Susceptibility and Therapeutics for *Staphylococcus aureus* : what is the Clinical Relevance . *Semin . Immunopathol* . 34(2) : 185 – 200.
- **Turkyilmaz** , S. and Kaya , O. (2006) . Determination of Some Virulence factors in *Staphylococcus* spp. Isolated from Various Clinical Samples. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30:127-132 .

U

- **Ugwu** , M.C. ; Ikegbunam , M.N. ; Nduka , S.O. ; Attama , A.A. ; Ibezim , E.C. ; and Esimone , C.O. (2013). Molecular characterization and Efficacy of Antibiotic *Staphylococcus aureus* Isolated from Nostrils of Healthy Human Volunteers. *J. pharm. Sci. and Res.* 5(1) : 26-32

W

- **Wang**, H.; Kim, S.; Kim, J.; Park, S.-D.; Uh, Y.; Lee, H. (2014) Multiplex Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of

Methicillin- Resistant Staphylococci Directly from Positive Blood Cultures. J. Clin. Microbiol., 52, 1911–1920.

- **Warshawsky**, B.; Hussain, Z.; and Gregson, D. B. (2000). Hospital and community-based surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: previous hospitalization is the major risk factor. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 21 (11): 724-727.
- **Winny** , X. ; Khosasih , V. ; Suwanto , A. ; and Kim , H.K. (2012). Characterization Lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Human Facial Sebaceous skin. **J. Micro bio. Biotech.** 22(1):84-91.
- **WHO.** (2003). Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. 2nd ed. Geneva.

Z

- **Zhu** ،Y., Fan, X., Zhang, X., Jiang, X., Niu, L., Teng, M. and Li, X. (2014). Structure of Rot, a global regulator of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. Acta Crystallogr D.Biol Crystallogr. 70 (9), pp:2467- 2476.

الملاحق

Appendix

ملحق (1) اختبار حساسية عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* لمضادات الحياة

<i>S. aureus</i> البيئية								
رقم العزلة	TN	GM	TS	DXT	ATM	NA	CIP	AK
١	R	R	R	S	S	R	S	R
٢	S	S	S	S	R	R	S	S
٣	S	R	S	S	S	R	S	R
٤	R	S	S	S	R	S	R	S
٥	S	S	S	S	S	S	S	S
٦	R	S	S	S	R	R	R	S
٧	S	R	S	S	R	R	S	R
٨	S	S	R	S	S	R	S	S
٩	S	R	S	S	S	S	S	R
١٠	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. aureus</i> المرضية								
١	R	R	R	S	R	R	R	R
٢	R	R	R	S	R	R	S	R
٣	R	R	R	S	R	S	R	S
٤	R	R	R	S	R	S	R	R
٥	S	S	R	R	R	R	S	R
٦	S	R	R	S	R	S	R	R
٧	R	R	R	S	R	R	R	R
٨	R	R	R	S	R	R	R	R
٩	R	R	R	S	R	S	S	R
١٠	R	S	R	R	R	R	S	S

ملحق (2) انواع البوادي المستعملة في الدراسة



BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34522, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-8788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village Parkway, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-269-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneerusa.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewanggang-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0900
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. 0000

Order No.: 10016224

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

infal- f

AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.4 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6147.9 g/mole
Tm	56.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	104.1 ul

MALDI-TOF QC



infal- f

CAA GGC ATC CAC CGT

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	14.2 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	15mer	Molecular Weight	4521.9 g/mole
Tm	51.8 C	Volume for 100 pmoles/ul	142.0 ul

MALDI-TOF QC



infalfemA- f

AGA CAA ATA GGA GTA ATG AT

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.0 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	30.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6222.0 g/mole
Tm	47.4 C	Volume for 100 pmoles/ul	90.3 ul

MALDI-TOF QC

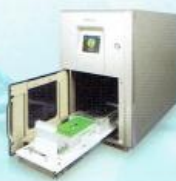


ExiProgen™

Fully Automated Protein Synthesis & Nucleic Acid Extraction System

- Express and purify up to 16 different proteins within 6 hrs
- Obtain up to 500 µg of target protein with >90% purity
- Just add plasmid DNA/PCR product for your protein

▶ 대표문의: 042-930-8695, protein-rnd@bioneer.co.kr



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Muryeongseong-ro, Deedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-0788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village Parkway, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Deewongang-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13486, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0553

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. 0000

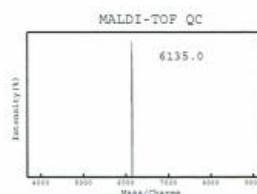
Order No.: 10016224

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

infalfemA- r

AAA TCT AAC ACT GAG TGA TA

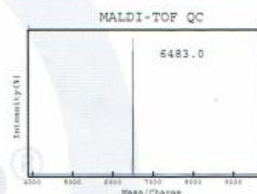
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.5 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	30.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6132.9 g/mole
Tm	47.7 C	Volume for	95.1 ul
		100 pmoles/ul	



infalNUC1- r

CTG GCA TAT GTA TGG CAA TTG

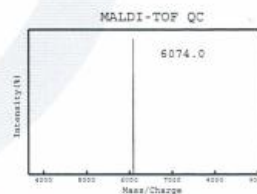
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	14.7 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	42.9 %
Length	21mer	Molecular Weight	6476.1 g/mole
Tm	54.4 C	Volume for	147.1 ul
		100 pmoles/ul	



infalNUC2- r

AAT GCA CTT GCT TCA GGA CC

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.7 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6076.9 g/mole
Tm	57.8 C	Volume for	107.1 ul
		100 pmoles/ul	



ExiProgen™

Fully Automated Protein Synthesis & Nucleic Acid Extraction System

- Express and purify up to 16 different proteins within 6 hrs
- Obtain up to 500 µg of target protein with >90% purity
- Just add plasmid DNA/PCR product for your protein

▶ 대표문의: 042-930-8695, protein-rnd@bioneer.co.kr



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

ملحق (3) دليل مكونات خليط التفاعل الرئيسي ل PCR

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

AccuPower® PCR PreMix

Bioneer Corporation
8-11, Munpyeongseoro
Daedeok-gu, Daejeon 306-220
South Korea
Tel: (Korea) 1588-9788
(International) +82-42-930-8777
Fax: +82-42-930-8600
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501 USA
Toll free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: order.usa@bioneer.com

Bioneer Trade(Shanghai) Co., Ltd
403 Room, Building 88, no.887
Zuchongzhi Road, Zhangjiang High Tech Park
PuDong New District, Shanghai 201203 China
Tel: +86-21-5080-0969
Fax: +86-21-5080-1620
E-mail: salescn@bioneer.com

Seoul Office
2nd fl. Sansu B/D, #66, Gangnamdaero
30-gil, Seocho-gu, Seoul 137-130
South Korea
Tel: +82-2-598-1094
Fax: +82-2-598-1096

Order
Domestic only: 1588-9788
E-mail: order@bioneer.co.kr
URL: www.bioneer.com

AccuPower® PCR PreMix is a new, powerful, and ready-to-use PCR reagent optimized for more accurate PCR amplifications.

Advantages

Speed

Substantial reduction in PCR setup time.

Stability

AccuPower® PCR PreMix is the powerful technology for convenient and easy to perform DNA amplification. It contains DNA polymerase, dNTPs, a tracking dye and reaction buffer in a premixed format, freeze-dried into a pellet. The patented chemical stabilizer of this product enables to maintain the activity of pre mixture for over a month even when stored at room temperature (25°C), over 2 years in the freezer.

Reproducibility and Yield

Batch manufacturing under strict ISO 9001 quality control conditions guarantees reproducibility. Minimal handling during reaction set up provides improved accuracy.

Simplicity

Each product line contains an application specific enzyme in an easy to re-suspended, lyophilized premix of dNTPs, reaction buffer, a tracking dye, and a stabilizer. The premix is ready to use, thus offering virtually no reaction set up time.

Contents

Component	Reaction size	20 µl reaction	50 µl reaction
Top DNA polymerase		1 U	2.5 U
Each: dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		250 µM	250 µM
Tris-HCl (pH 9.0)		10 mM	10 mM
KCl		30 mM	30 mM
MgCl ₂		1.5 mM	1.5 mM
Stabilizer and tracking dye			

Experimental Protocol

- Add template DNA and primers to AccuPower® PCR tube.

Concentration of template DNA and primer

	20 µl reaction	50 µl reaction
Template DNA	5 - 50 ng	10 - 100 ng
Primer	5 - 10 pmole	10 - 20 pmole

- Add distilled water to AccuPower® PCR tubes to a total volume of 20 µl or 50 µl.
- Dissolve the lyophilized blue pellet by vortexing, and briefly spin down.
- Add mineral oil. (This step is unnecessary when using a thermal cycler with top heating.)
- Perform PCR of samples.
- Load samples on agarose gel without adding a loading-dye mixture, and perform electrophoresis.

Notice to Purchaser

This enzyme is specifically optimized for increasing base incorporation rate by inactivating 5'→3' exonuclease activity. Therefore, this is not recommended to use for Real Time PCR using Taqman® probe.

Trademark

AccuPower is a trademark of Bioneer Corporation.

Ordering Information

Tube type	Reaction	Cat.No.	Description
0.2ml Tube	20 ul	K-2012	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
		K-2016	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
	50 ul	K-2013	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
		K-2017	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
0.5ml Tube	50 ul	K-2011	0.5 ml thin-wall tubes with attached cap / 100 tubes
96-well	10 ul	K-2260-1	thin-wall 96-well flat plate
		K-2260-2	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-3	thin-wall 96-well semi-skirted plate
	20 ul	K-2260-4	thin-wall 96-well flat plate
		K-2260-5	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-6	thin-wall 96-well semi-skirted plate
384-well	5 ul	K-2080-1	thin-wall 384-well full-skirted plate
	10 ul	K-2080-2	thin-wall 384-well full-skirted plate
	20 ul	K-2080-3	thin-wall 384-well full-skirted plate
Master Mix		K-2018	1 ml of 2 X Master mix solution
		K-2018-1	10 ml of 2 X Master mix solution

A complete product list appears on our web site at www.bioneer.com.

Blazing the Biotechnology Trail

ملحق (4) الدليل الحجمي المستخدم في الدراسة 100bp DNA Ladder

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

100 bp DNA Ladder

DNA Molecular Weight Markers

Headquarters

49-3 Munpyeong-dong,
Daejeon 306-220,
South Korea
Tel : +82-42-930-8777
Fax : +82-42-930-8688
E-mail : sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.

1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501 USA
Toll free: 1-877-264-4300
Fax: 1-510-865-0350
E-mail : orderusa@bioneer.us.com

Seoul Office

Samsu Building 2nd floor,
6 Yangjae-dong, Seocho-gu, Seoul
137-130, South Korea
Tel : +82-2-598-1094
Fax : +82-2-598-1096

Order

Korea Market only: 1588-9788
E-mail: order@bioneer.co.kr
Website: www.bioneer.com

[Cat. No.]
D-1030

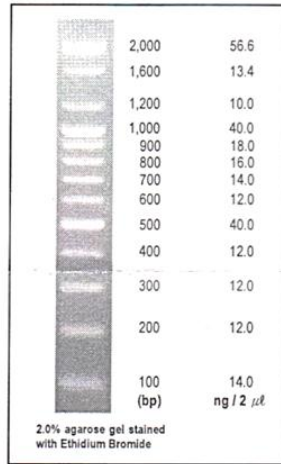
[Lot No.]
1103K

[Volume]
250 μ l

[Concentration]
135 ng/ μ l

• **Description** : 100 bp DNA Ladder is specially designed for determining the size of double strand DNA from 100 to 2,000 base pairs. The DNA Ladder consists of 13 double strand DNA fragments ranging in sizes from 100 to 1,000 bp in 100 bp increments, and additional fragments of 1,200, 1,600, 2,000 bp. The 500, 1,000 and 2,000 bp bands are two to three times brighter for easy identification

• **Application** : Size confirmation of DNA fragments.



• Features

- ready-to-use
- Recommended Loading :
1.5 - 2.0 μ l/5 mm lane width
- Typical Loading Number of Lanes :
125 - 166 (5 mm lane width)
- Range (bp) : 100 - 2,000
- Number of Bands: 13

• Storage Buffer

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 1 mM EDTA
- 2.5% Ficoll
- 0.005% Bromophenol Blue
- 0.005% Xylene Cyanol

• Storage Condition

This product is shipped on dry ice and should be stored at -20°C until use.

• **Quality control assay** : Agarose gel analysis shows that 13 bands are clearly distinguishable. The 500 bp, 1,000 bp and 2,000 bp band must be more intense than any other band.

• Note

- The DNA ladder can be applied directly onto an agarose gel.
- Do not heat before loading.
- Repeated freezing and thawing should be avoided.

• Ordering Information

[Related BIONEER DNA Molecular Weight Marker Products]

Cat. No.	Products	Cat. No.	Products
D-1010	10bp DNA Ladder, 100 μ l	D-1060	Lambda DNA / EcoR I Markers, 100 μ g
D-1020	25/100 bp Mixed DNA Ladder, 250 μ l	D-1070	Lambda DNA / EcoR I+Hind III Markers, 100 μ g
D-1030	100 bp DNA Ladder, 250 μ l	D-2510	Lambda DNA, 250 μ g
D-1035	100 bp Plus DNA Ladder, 500 μ l	D-1030-1	AccuLadder 100bp 320 μ l x 2
D-1040	1 Kb DNA Ladder, 500 μ l	D-1040-1	AccuLadder 1Kb 500 μ l x 2
D-1050	Lambda DNA / Hind III Markers, 100 μ g		

Note

For research use only. Not for Use in diagnostic or therapeutic procedures.

Bioneer shall not in any event be liable for incidental or special damage of any kind resulting from any use except on application(s).

Summary

Summary

The study was conducted during the period from the 1st of November, 2016 until the 1st of February 2017. The above isolates were obtained originally from 16 samples collected from different environments (soil, water). Soil samples were obtained (agricultural and non-agricultural) from 5 different locations included soil samples (Mandali, Shahrban, Alwogihea, Deli Abbas, Pohric) water samples were obtained from 3 different locations from the Mherot River.

The study involves isolation and identification of 60 bacterial isolates, they were distributed as follows: *Bacillus subtilis* 14 isolates; *Staphylococcus epidermidis* 13; *Bacillus cereus* 11; *Staphylococcus aureus* 10; *Escherichia coli* 7 and *Bacillus sphaericus* 5. This study focused on the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* which was isolated from the natural sources (soil, water) and was compared with *Staphylococcus aureus* isolated from clinical isolates obtained from different clinical cases included samples (Urine, Wound, Burn) from Baquba General Teaching Hospital.

The results of virulence factors of *S. aureus*, showed that all isolates both from environmental and clinical origin have the ability to produce hemolysin 100%, while 6 (60%) isolates were of environmental origin and 8 (80%) were *S. aureus* of clinical origin were able to produce protease enzyme, however, 2 (20%) isolates were *S. aureus* from environmental samples were capable of producing the lipase enzyme, 8 (80%) isolates from clinical samples were also lipase enzyme producers. Whereas the tests for staphylokinase enzyme revealed that 7 (70%) isolates from the environment samples and 8 (80%) from clinical isolates were staphylokinase producers. The tests for urease production showed that all *S. aureus* isolates both from clinical and environmental origin were urease producers, (100%). Bacteriocin production tests indicate that all *S. aureus* isolates of environmental origin were bacteriocin positive, while 2 (20%) clinical isolates were bacteriocin producers. Biofilm production showed that 2 (20%) environment isolated and 10 (100%) clinical isolates are capable of biofilm production. However, the tests for coagulase enzyme revealed that all the test isolates (100%) of the different origin were coagulase producers.

Antibiotic sensitivity tests against 8 different antibiotics showed that *S. aureus* isolates from the environment against Tobromycin, Gentamicin and Amikacin were 40% resistant, whereas, resistance

Summary

of *S.aureus* from clinical origin were 80% resistant against the same antibiotics , while the resistance of *S.aureus* isolates from environmental against Trimethoprim sulfamethoxazole was 20% while *S.aureus* clinical isolates were 100% resistant , however , all isolates from the environment were non-resistant against Doxycycline , while only 20% of *S. aureus* clinical isolates were resistant .The results also showed that all *S.aureus* isolates from the clinical were resistant against Azithromycin (100%) while only 40% of environmental isolates were Azithromycin resistants .The Nalidixic acid resistance tests showed that *S.aureus* isolates from both clinical and environmental origin were 60% resistant . Moreover , the resistance of *S.aureus* isolates from the environment against Ciprofloxacin were 20% resistant and 60% of clinical isolates were resistant .

Total DNA for the *S.aureus* isolates was extracted 4 isolates were extracted using Mini DNA Bacteria Kit which was supplied by Bioneer company , the extracted DNA purity was (1.8-2) for all the selected samples . Polymerase Chain Reaction (PCR) test were performed using several specific primers which targeted the sequence of the 16srRNA gene whose molecular weight 1400 base pair , and the specific sequence for the *femA* gene whose molecular weight is 509bp , and the specific sequence for *nuc* gene whose molecular weight is 397 base pair . The products of the multiplication were electrophoresed on Agrose gel (1%) , only one band was observed in all line in the gel in the same level of the gene . The results of PCR using specific primer for the gene 16srRNA showed that all isolated contain this gene (100%) at the same molecular weight 1400bp , while the results of PCR using specific primer for the *femA* gene revealed that among 2 isolated belong to pathogenic *S.aureus* one isolate contains this gene (50%) at the same molecular weight of 509bp , whilst 2 isolates belong to *S.aureus* from the environment do not contain this gene (100%) .

The PCR results by using specific primer for the *nuc* gene indicated that among each 2 isolated belong to pathogenic (clinical) *S.aureus* isolate one (1) isolate contain this gene (50%) at the same molecular weight of 397bp , , whilst 2 isolates belong to *S.aureus* from the environment do not contain this gene (100%) .

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Sciences
Biology Department



Molecular and Identification study comparison of
***Staphylococcus aureus* isolates from environmental**
sources and clinical

A Thesis

Submitted to the Council of College of Education for Pure Science
Diyala University In Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science In Biology / Microbiology

By

Ansejam Yaaqop Khadem Al-Araki

Supervised by

Dr. Abbas . A . Farhan Al-Dulaimi
professor

Dr. Khaleb Edress Ateae
Assist . professor

2017

1438