



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

التحري الجزئي عن بعض جينات عوامل الضراوة لبكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من عينات سريرية مختلفة

اطروحة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في علوم الحياة

من قبل الطالبة

ملاح نورالدين عيسى الفياض

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2004

ماجستير علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2016

بإشراف

أ.د. كريم ابراهيم مبارك

2021م

1443هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿هُوَ الَّذِي جَعَلَ الشَّمْسُ ضِيَاءً وَالْقَمَرَ نُورًا وَقَدَّرَهُ
مَنَازِلَ لِتَعْلَمُوا عَدَدَ السِّنِينَ وَالْحِسَابَ ۚ مَا خَلَقَ اللَّهُ
ذَٰلِكَ إِلَّا بِالْحَقِّ يُفَصِّلُ الْآيَاتِ لِقَوْمٍ يَعْلَمُونَ ﴿٥﴾﴾

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ

سورة يونس

آية 5

الإهداء

إلهي ومولاي .. لك الشكر ولك الحمد.. يا الله
إلى من علمني العطاء دون مقابل وحثني على مواصلة طريق
العلم

والدي العزيز

إلى نبع الحنان والإيثار والكرم..إلى مصدر التفاني

أمي الغالية

إلى أقرب الناس إلى قلبي..إلى من أصبح بفضلہ الحلم حقيقة

زوجي الغالي

إلى قرّة عيني..إلى رياحين ايامي..إلى نبض فؤادي

سناريه محمد- فاطمة احمد

إلى جميع من تلقيت منهم النصح والدعم

أهديكم خلاصة جهدي العلمي

شكرو وتقدير

اللهم لك الحمد حمدا كثيرا طيبا مباركا فيه، ملء السموات وملء الأرض ، أشكرك
ربي على نعمك التي لا تعد ولا تحصى ، وآلائك التي لا تحد، أحمدك ربي وأشكرك على أن
يسرت لي إتمام هذه الأطروحة على الوجه الذي أرجو أن ترضى به عني.

ثم أتوجه بالشكر إلى من رعاني طالبا في برنامج الدكتوراه ، ومعدا لهذا البحث أستاذي
ومشرفي الفاضل الأستاذ الدكتور: كريم ابراهيم مبارك، الذي له الفضل - بعد الله تعالى - لاقتراحه
موضوع البحث ومتابعته المستمرة وابدائه الملاحظات في العمل ، فله مني الشكر كله والتقدير
والعرفان.

وأتوجه بالشكر الجزيل لجميع أساتذتي الفضلاء في قسم علوم الحياة في كلية التربية للعلوم
الصرفة الذين لم يكلوا جهدا في توجيهي وإمدادي بما أحتجت إليه من معلومات. ويوجب علي
الاعتراف بالفضل أن أشكر الأساتذة الفضلاء في جامعة ديالى ، كلية التربية للعلوم الصرفة عمادة
ورئاسة قسم على إسنادهم لي طوال مدة بحثي..

ولا يفوتني ان اشكر جميع العاملين في مختبر مستشفى بعقوبة التعليمي ،واخص بالذكر
الست ثريا والست منال ،واقدم شكري الجزيل الى الدكتورة ايمان عباس في كلية العلوم لما بذلوا من
جهد في مساعدتي لاكمال اطروحتي .

واخيرا اقدم خالص شكري لعائلتي راجية الله ان يمن عليهم بالصحة والعافية ، والى كل من مد
لي يد العون، فاستحق مني شكرا.. ومن الله التوفيق.

الباحثة

إقرار المشرف

أشهد بأن الاطروحة الموسومة (التحري الجزيئي عن بعض جينات عوامل الضراوة لبكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من عينات سريرية مختلفة) للطالبة (ملاح نورالدين عيسى)، قد تمت تحت إشرافي في جامعة ديالى / كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة، وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في علوم الحياة وعليه أوصي بمناقشتها.

التوقيع:

المشرف: أ.د كريم أبراهيم مبارك

التاريخ: / / 2021

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة أرشح هذه الاطروحة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : أ. م. د. ذكرى عطا ابراهيم

التاريخ : / / 2021

اقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الاطروحة الموسومة بـ " التحري الجزئي عن بعض جينات عوامل الضراوة لبكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من عينات سريرية مختلفة " التي قدمتها طالبة الدكتوراه (ملاح نور الدين عيسى) قسم علوم الحياة .
قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصُحِّحَ ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الاطروحة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير .

التوقيع:

الاسم:

التاريخ: / / 2021

اقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الأطروحة الموسومة بـ " التحري الجزيئي عن بعض جينات عوامل الضراوة لبكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من عينات سريرية مختلفة" التي قدمتها طالبة الدكتوراه (ملاح نور الدين عيسى) قسم علوم الحياة ، قد تم مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الأطروحة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم:

التاريخ: / / 2021

اقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الاطروحة الموسومة بـ " التحري الجزيئي عن بعض جينات عوامل الضراوة لبكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من عينات سريرية مختلفة " التي قدمتها طالبة الدكتوراه (ملاح نور الدين عيسى) قسم علوم الحياة ، قد تم مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الاطروحة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم:

التاريخ: / / 2021

اقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة ،نشهد اننا اطلعنا على الاطروحة الموسومة (التحري الجزيئي عن بعض جينات عوامل الضراوة لبكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من عينات سريرية مختلفة) والمقدمة من قبل الطالبة (ملاح نور الدين عيسى) ، وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد بأنها جديرة بالقبول لنيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة بتقدير() .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : هادي رحمن رشيد

المرتبة العلمية: استاذ

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : علي جعفر سليم

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : جبار سلمان حسان

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : علاء سالم حمزة

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : عدوية فاضل عباس

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة ومشرفا

التوقيع :

الاسم : كريم ابراهيم مبارك

المرتبة العلمية: استاذ

التاريخ : / / 2021

التوقيع:

اقرار عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

الاسم : غالب ادريس عطية

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ : / / 2021

جمعت 175 عينة من مرضى مصابين بالتهابات مختلفة وبأعمار مختلفة من كلا الجنسين اذ تم اخذ 45 عينة ادرار ، 40 عينة دم ، 30 مسحة من الاذن ، 25 مسحة من الانف ، 24 مسحة من الحروق و 11 عينة قشع، في العيادة الاستشارية /مستشفى بعقوبة التعليمي /ديالى من بداية شهر نيسان 2018 الى نهاية شهر آب 2018، اوضحت نتائج التشخيص البكتريولوجي للعينات أن 40 عينة وبنسبة 22.85% اظهرت نمواً سالباً للزرع البكتيري و 135 عينة وبنسبة 77.14% أظهرت نمواً موجباً للزرع البكتيري، وكانت أعلى نسبة في البكتريا المعزولة هي بكتريا *Staphylococcus aureus* اذ بلغ العدد الكلي لها 55 عزلة وبنسبة 39% .

تم التحري عن حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* لمضاد Oxacillin فكانت 21 عزلة بنسبة 38.18% مقاومة للميثيسيلين (MRSA) و 34 عزلة بنسبة 61.81% حساسة للمضاد (MSSA) . بينت نتائج الدراسة الحالية ان نسب العزل لبكتريا *S. aureus* حسب المصدر كانت كالآتي :من الدم Blood 12 (21.81%) ، كان منها 9 (16.36%) MSSA و 3 (5.45%) MRSA، الاذن ear 13 (23.63%)، منها 7 عزلات و بنسبة (12.72%) كانت حساسة للميثيسيلين MSSA و 6 عزلات بنسبة (10.9%) MRSA، من الانف nasal 10 (18.18%) والتي كان منها 7 (12.72%) MSSA و 3 (5.45%) MRSA، من الادرار urine كانت 9 عزلات و بنسبة (16.36%)، منها 4 عزلات MSSA و بنسبة (7.27%) و 5 عزلات بنسبة (9.09%) MRSA، القشع sputum 6 (10.90%) ، كانت نسبة العزل لكل من MSSA و MRSA هي (5.45%) 3 بثلاث عزلات لكل منها ، اقل نسبة عزل لبكتريا *S. aureus* قد كانت من الحروق Burns حيث سجلت (1.81%) لبكتريا MRSA .

تم اختبار مقاومة و حساسية عزلات بكتريا *S.aureus* قيد الدراسة لتأثير 10 مضادات حيائية من مجاميع مختلفة ، بينت نتائج الدراسة الحالية ان جميع عزلات بكتريا *S.aureus* اظهرت مقاومة بنسبة 100% لمضاد Penicillin ، 47% لمضاد Ceftaroline، كانت نسبة مقاومة بكتريا MRSA لمضاد الجنتاميسين Gentamicin 100%، وبكتريا MSSA 32%، لقد بلغت نسبة مقاومة البكتريا قيد الدراسة لمضاد Azithromycin 100% في بكتريا MRSA بينما كانت 61.76% في بكتريا MSSA ، نسبة المقاومة لمضاد Tetracycline كانت متفاوتة بين بكتريا MRSA و بكتريا MSSA حيث بلغت 71.42% و 41.17% على التوالي ، بلغت نسبة المقاومة لمضاد Doxycycline في بكتريا MRSA 23.80% اما بكتريا MSSA فهي لم تقاوم المضاد نهائياً و كانت حساسة له بنسبة 100%.

اظهرت جميع عزلات بكتريا *S.aureus* قيد الدراسة و بنسبة 100% قدرتها على انتاج الغشاء الحيوي باستخدام طريقة (CRA) Congo Red Agar، وعند استخدام طريقة الانابيب كونت العزلات الغشاء الحيوي بنسبة 100% ايضا، بينما اظهرت نتائج اختبار تكوين الغشاء الحيوي باستخدام صفيحة المعايرة (MTP) لبكتريا MRSA ان ثلاث عزلات و بنسبة 14.28% كونت الغشاء الحيوي بقوة Strong و 15 عزلة بنسبة 71.42% كانت متوسطة moderate، اما الثلاث عزلات المتبقية فقد كانت ضعيفة weak، و اظهرت عزلات بكتريا MSSA ان 14.70% من العزلات قد كونت غشاء حيوي قوي strong و 55.88% متوسط moderate اما 29.41% من عزلات بكتريا MSSA فقد كونت غشاء ضعيف. وعند استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR تم تأكيد وجود جينات *ica ABC* في جميع عزلات بكتريا *S.aureus* MRSA و MSSA و بنسبة 100% .

اظهرت نتائج التحري عن الجينات المشفرة لانتاج السموم المعوية في بكتريا *S.aureus* باستخدام تقنية Multiplex-PCR ان 3(15%) كانت حاملة للجين *sea*، 4 (20%) حاملة للجين *seb*، 4 عزلات بنسبة 20% للجين *sec*، 6 (30%) للجين *sed* و 4 (20%) حاملة للجين *see*. اما عند التحري عن وجود الجينات المشفرة لانتاج السموم الحالة للدم hemolysins (*hlg, hlb*)، فقد تبين ان الجين *hlb* كان محمولاً في 20(100%) من العزلات قيد الدراسة ، اما الجين *hlg* فقد كان موجودا في 5(25%). بينما 20 (100%) كانت حاوية على الجين *luk-S* و 10 عزلات بنسبة (50%) حاملة للجين *luk-F* . اشارت نتائج الدراسة الحالية ان 9 عزلات و بنسبة 45% كانت حاملة للجين *tst*.

تم دراسة التعبير الجيني الكمي للجينات المشفرة للغشاء الحيوي والتي شملت (*ica A, ica B, ica C*) باستخدام تفاعل النسخ الكمي (qRT-PCR) لعشر عزلات من بكتريا *S.aureus* قبل و بعد معاملتها بمضاد Azithromycin بتركيز ما قبل المثبط sub MIC مقداره ($\mu\text{g/ml}$) (128)، ومضاد Gentamicin بتركيز sub MIC (16 $\mu\text{g/ml}$) . ابدت جميع عزلات بكتريا MRSA تعبيراً جينياً عالياً للجين *ica A* بعد معاملتها بمضاد Azithromycin و تراوحت قيم التعبير الجيني ما بين (1.61 – 54.86)، اما بالنسبة لعزلات بكتريا MSSA فكانت العزلات (SA35, SA48, SA50) غير معبرة بعد معاملتها بالمضاد ، بينما حافظت العزلتان (SA 31, SA 24) على قدرتها على التعبير الجيني بعد المعاملة بالمضاد، وقد بينت جميع عزلات بكتريا MRSA تعبيراً جيداً للجين *ica A* بعد معاملتها بالمضاد Gentamicin ، اما عزلات بكتريا MSSA فكانت 4 عزلات منها غير معبرة بعد المعاملة بالمضاد و عزلة واحدة بلغت قيمة التعبير الجيني لها 1.04.

أظهرت 4 عزلات لبكتريا MRSA تعبيراً جينياً جيداً للجين *ica B* ، بينما لم تعبر العزلة SA20 ، من جهة أخرى أظهرت 3 عزلات من بكتريا MSSA تعبيراً جيداً ، و توقف التعبير الجيني في العزلات (SA50,SA48) بعد معاملة العزلات قيد الدراسة بالمضاد Azithromycin ، من جهة أخرى توقف التعبير الجيني في العزلات SA14 و SA24 ، ولم تظهر أي من عزلات بكتريا MSSA تعبيراً جينياً بعد معاملتها بالمضاد Gentamicin.

تم قياس التعبير الجيني الكمي للجين *ica C* بعد معاملة العزلات قيد الدراسة بالمضاد Azithromycin فكان في SA8 (59.79) ، SA2 (14.76) ، SA16 (9.89) ، وفي عزلة SA14 (2.13) ، اما في العزلة SA20 فقد توقف التعبير الجيني، في حين تراوحت قيم التعبير الجيني ما بين (2.36 - 8.60) في اربع عزلات من بكتريا MSSA وتوقف التعبير الجيني العزلة SA35. أظهرت نتائج التعبير الجيني للجين *ica C* بعد معاملة العزلات قيد الدراسة بمضاد Gentamicin ان عزلتين فقط لبكتريا MRSA قد عبرت جينياً SA8 (64.97) و SA2 (4.42) اما باقي عزلات بكتريا MRSA فقد توقف التعبير الجيني فيها بعد معاملتها بالمضاد، في حين لم تعبر سوى عزلتين من بكتريا MSSA بعد معاملتها بالمضاد Gentamicin و هي SA50 (2.07) و SA48 (1.35).

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
الفصل الاول - المقدمة		
1-2	المقدمة	1-1
3	أهداف الدراسة Aim of study	
الفصل الثاني - استعراض المراجع		
4-5	نبذة تاريخية عن بكتريا المكورات العنقودية الذهبية <i>S.aureus</i>	1-2
5-6	الشكل المظهري لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية <i>S.aureus</i>	2-2
6	التركيب المستضدي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية <i>S.aureus</i>	3-2
6	الجدار الخلوي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية <i>S.aureus</i>	1-3-2
7	امراضية المكورات العنقودية الذهبية <i>S.aureus</i>	4-2
8	الامراض السطحية Supreficial diseases	1-4-2
8-9	الامراض الجهازية Systemic diseases	2-4-2
9	وبائية المكورات العنقودية الذهبية <i>S.aureus</i> Epidemiology of	5-2
10	عوامل الضراوة التي تنتجها بكتريا <i>S.aureus</i>	6-2
10-12	تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation	1-6- 2
12	السموم التي تنتجها بكتريا <i>S.aureus</i>	2-6-2
12	الهيموليسين Hemolysin	1-2-6-2
13	الذيفان المعوي Enterotoxin	2-2-6-2
15	ذيفان متلازمة الصدمة السمية Toxic shock syndrome toxin <i>tst-1</i>	3-2-6-2
16	الذيفان المقشر Exfoliative toxin	4-2-6-2
17	الذيفان القاتل لخلايا الدم البيض Panton-valentin leucocidin <i>PVL</i>	5-2-6-2
18	الانزيمات التي تنتجها المكورات العنقودية الذهبية	3-6-2
18	انزيم تجلط البلازما Coagulase	1-3-6-2
18	انزيم الكاتاليز Catalase	2-3-6-2
18	انزيم الستافيلوكاينيز Staphylokinase	3-3-6-2

19	الانزيم الحال للدهون Lipase	4-3-6-2
19	الانزيم الحال للدنا Deoxyribonuclease	5-3-6-2
20	انزيم الفوسفاتيز Phosphatase	6-3-6-2
20	الانزيم الحال للبروتين Protenase	7-3-6-2
20	انزيمات البيتا لاكتاميز β -Lactamases	8-3-6-2
21	انزيم اليوريز Urease	9-3-6-2
22	انزيم عامل الانتشار Hyaluranidase	10-3-6-2
22-23	المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيلين	7-2
23	الآلية تأثير مضادات الحياة على البكتريا	8-2
24	الآلية مقاومة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية للمضادات الحياتية	1-8-2
29	تفاعل البلمرة التسلسلي Polymerase chain Reaction	9-2
30	تفاعل النسخ الكمي Quantitative real time PCR	1-9-2
الفصل الثالث - المواد وطرائق العمل		
32	المواد Materials	1-3
32	الاجهزة والادوات المختبرية	1-1-3
34	المواد الكيميائية	2-1-3
35	الايوساط الزراعية	3-1-3
36	الصبغات المستخدمة	4-1-3
37	العدة المختبرية	5-1-3
38	المضادات الحياتية	6-1-3
38	اقراص المضادات الحياتية	1-6-1-3
39	مساحيق مضادات الحياة	2-6-1-3
39	المحاليل والكواشف والانزيمات	7-1-3
39	محلول الملح الفسيولوجي Normal saline	1-7-1-3
39	محاليل صبغة كرام Gram stain	2-7-1-3
40	كاشف انزيم التخثر Cuagulase reagent	3-7-1-3
40	كاشف انزيم الكاتاليز Catalase reagent	4-7-1-3

40	Oxidase reagent كاشف انزيم الاوكسيديز	5-7-1-3
41	Voges proskauer reagent كاشف فوكس بروسكاور	6-7-1-3
41	Methyl Red reagent كاشف المثيل الاحمر	7-7-1-3
41	Apl- Staph فهرس الصفات التحليلية	8-1-3
42	GP Card كاسيت لجهاز الفايثك خاص بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام	9-1-3
42	كاسيت لجهاز الفايثك خاص بفحص الحساسية للبكتريا الموجبة الكرام	1-9-1-3
42	Methods طرائق العمل	2-3
42	Sterilization التعقيم	1-2-3
42	Autoclaving sertilization التعقيم الرطب بالمؤصدة	1-1-2-3
42	Dry heat sertilization التعقيم بالحرارة الجافة	2-1-2-3
42	Filtersert sertilization التعقيم بالترشيح	3-1-2-3
42	تحضير الاوساط الزرعية	2-2-3
43	Blood agar وسط اكار الدم	1-2-2-3
43	Staphylokinase media وسط الستافيلوكاينيز	2-2-2-3
43	Protease media وسط البروتيز	3-2-2-3
44	Urea agar base وسط اكار اليوريا	4-2-2-3
44	Egg-yolk agar وسط اكار صفار البيض	5-2-2-3
44	Congo-red agar وسط اكار احمر الكونكو	6-2-2-3
44	Genetic tests الاختبارات الوراثية	3-3
44	Solutions of genetic tests المحاليل الخاصة بالاختبارات الوراثية	1-3-3
45	المحاليل المستخدمة في عزل الدنا البكتيري	2-3-3
45	المحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي	3-3-3
46	المحاليل المستخدمة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR	4-3-3
46	Primers solution محاليل البوادي	5-3-3
49	تحضير العالق البكتيري	4-3
49	Bacterial isolation العزل البكتيري	5-3
49	Sample collection جمع العينات من المرضى	1-5-3

50	زرع العينات Sample culture	2-5-3
50	تشخيص العزلات البكتيرية Identification of bacterial isolates	6-3
51	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests	1-6-3
51	اختبار انزيم الكاتاليز catalase test	1-1-6-3
51	اختبار المثيل الاحمر Meythyl-red test	2-1-6-3
51	اختبار فوكس بروسكاور Voges-proskaur test	3-1-6-3
52	اختبار تخمر السكريات Sugers fermentation test	4-1-6-3
52	اختبار انتاج انزيم تجلط البلازما Coagulase test	5-1-6-3
53	اختبار تحلل اليوريا Urea hydrolysis test	6-1-6-3
53	اختبار النمو على وسط المانيتول الملحي Growth on manitol salt agar test	7-1-6-3
53	اختبار تمييع الجيلاتين Gelatin hydrolysis test	8-1-6-3
54	اختبار اختزال النترات Nitrate reduction test	9-1-6-3
54	اختبار انزيم اللايبز والليسيثينيز Lipase and lecithinase test	10-1-6-3
55	اختبار انتاج الهيمولايسين Hemolysin production test	11-1-6-3
55	اختبار انتاج الستافيلوكاينيز Staphylokinase production test	12-1-6-3
55	اختبار انتاج البروتيز Protease production test	13-1-6-3
55	اختبار انتاج الانزيم الحال للدنا DNase production test	14-1-6-3
56	اختبار مقاومة النوفوبايوسين Novobiocin resistance test	15-1-6-3
56	تشخيص البكتريا حسب نظام Api 20 Staph	2-6-3
57	تشخيص البكتريا بجهاز الفايك Vitek2 compact	3-6-3
57	خطوات تلقيح البطاقة GP ID card	1-3-6-3
59	الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation detection	7-3
59	الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي باستخدام وسط احمر الكونكو الصلب	1-7-3
60	الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الانابيب	2-7-3
60	الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي بطريقة صفيحة المعايرة الدقيقة	3-7-3
62	فحص الحساسية للمضادات الحيوية	8-3

63	Minimal inhibitory concentration تحديد التركيز المثبط الأدنى	9-3
64	حفظ وإدامة العزلات البكتيرية	10-3
64	short time preservation الحفظ قصير الامد	1-10-3
64	Medium time preservation الحفظ متوسط الامد	2-10-3
64	Long time preservation الحفظ طويل الامد	3-10-3
65	الكشف الجزيئي عن جينات عوامل الضراوة	11-3
65	Bacterial DNA extraction استخلاص الدنا البكتيري	1-11-3
66	Gel Electro Phoresis الترحيل الكهربائي في الهلام	2-11-3
67	قياس تركيز الدنا ونقاوته	3-11-3
67	PCR تفاعل البلمرة المتسلسل	4-11-3
68	برمجة جهاز PCR	5-11-3
70	الكشف عن التعبير الجيني للجينات المشفرة لتكوين الغشاء الحيوي icaA,icaB,icaC في بكتريا <i>S.aureus</i> باستخدام q RT-PCR	12-3
70	Culturing of <i>S.aureu</i> زرع بكتريا	1-12-3
71	Extraction of RNA استخلاص الحمض النووي الريبي	2-12-3
72	q RT-PCR in one step تفاعل النسخ الكمي بخطوة واحدة	3-12-3
73	Quantitative of RNA قياس تركيز الحمض النووي الريبي	1-3-12-3
73	Primer selection انتقاء البودئ	2-3-12-3
74	q RT-PCR Master mix خليط التفاعل الرئيسي للنسخ الكمي	3-3-12-3
74	q RT-PCR Program برمجة جهاز تفاعل النسخ الكمي	4-3-12-3
75	Delta delta Ct method طريقة معادلة دورة العتبة Ct	5-3-12-3
76	Statistical analysis التحليل الاحصائي	13-3
الفصل الرابع - النتائج والمناقشة		
77	Isolation and Identification العزل والتشخيص	4
77	Isolation العزل	1-1-4
77	الكشف عن بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثسليين MRSA وبكتريا المكورات العنقودية الذهبية الحساسة للمثسليين MSSA	2-1-4

79	التشخيص Identification	2-4
79	التشخيص الزراعي Cultural characterization	1-2-4
80	التشخيص المجهرى Microscopical characterization	2-2-4
80	الاختبارات الكيموحيوية والتحري عن عوامل الضراوة لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية	3-2-4
81	تشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بنظام API- 20 Staph	4-2-4
82	تشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بجهاز المحلل الالى Vitek 2 compact	5-2-4
84	توزيع بكتريا المكورات العنقودية الذهبية حسب الجنس	3-4
85	توزيع الاصابات ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين والحساسية للميثيسيلين حسب مصدر العينة	4-4
87	اختبار حساسية بكتريا المكورات العنقودية الذهبية للمضادات الحياتية	5-4
88	اختبار حساسية بكتريا MRSA لمضادات الحياة	1-5-4
90	اختبار حساسية بكتريا MSSA لمضادات الحياة	2-5-4
92	تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لمضاد الازثرومايسين ومضاد الجنتامايسين لبكتريا <i>S.aureus</i>	3-5-4
94	التحري المظهري عن عوامل الضراوة لعزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية	6-4
97	تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation	7-4
97	طريقة الانابيب Tube method	1-7-4
97	طريقة اكار الكونكو الاحمر Congo red agar(CRA)	2-7-4
100	طريقة صفيحة المعايرة الدقيقة Microtiter plate method	3-7-4
102	الكشف الجزيئي عن بعض جينات عوامل الضراوة لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية	8-4
102	التحري عن الجينات <i>ica A, ica B, ica C</i> المشفرة لتكوين الغشاء الحيوي	1-8-4

105	الكشف الجزيئي عن الجينات <i>sea,seb,sec,sed,see</i> المشفرة لانتاج السموم المعوية في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية	2-8-4
108	الكشف الجزيئي عن الجينات <i>hlb,hlg</i> المشفرة لانتاج الهيمولايسين في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية	3-8-4
110	الكشف الجزيئي عن الجينات <i>luk-S</i> و <i>luk-F</i> المشفرة لانتاج الذايفان المحلل لكريات الدم البيض في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية	4-8-4
113	الكشف الجزيئي عن الجين <i>tsst-1</i> المشفر لانتاج ذيفان متلازمة الصدمة السمية في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية	5-8-4
114	دراسة التعبير الجيني للجينات المشفرة لتكوين الغشاء الحيوي في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية قبل وبعد معاملتها بمضاد الازثرومايسين والجنتاماييسين	9-4
114	دراسة التعبير الجيني لبكتريا <i>S.aureus</i> (MSSA, MRSA) للجين <i>ica A</i> بعد معاملتها بمضاد Azithromycin	1-9-4
118	دراسة التعبير الجيني للجين <i>ica A</i> في بكتريا MRSA و MSSA قبل و بعد معاملتها بمضاد الجنتاماييسين	2-9-4
121	دراسة التعبير الجيني لعزلات بكتريا MRSA و MSSA للجين <i>ica B</i> قبل و بعد معاملتها بالمضاد Azithromycin	3-9-4
124	دراسة التعبير الجيني لعزلات بكتريا MRSA و MSSA للجين <i>ica B</i> قبل و بعد معاملتها بالمضاد Gentamicin	4-9-4
127	دراسة التعبير الجيني للجين <i>ica C</i> في بكتريا MRSA و MSSA قبل و بعد معاملتها بالمضاد Azithromycin	5-9-4
130	دراسة التعبير الجيني للجين <i>ica C</i> في بكتريا MRSA و MSSA قبل و بعد معاملتها بمضاد Gentamicin	6-9-4
الاستنتاجات والتوصيات		
133	الاستنتاجات	
134	التوصيات	
المصادر		
135	المصادر العربية	

136	المصادر الاجنبية	
الملاحق		
163	استمارة المعلومات الخاصة بالمرضى	ملحق-1-
164	نتائج الاختبارات الخاصة بشريط API –Staph	ملحق -2-
165	نظام API 20 Staph system	ملحق -3-
166	الفحوصات الكيموحيوية بجهاز Vitek- 2 Compact	ملحق-4-
168	نتيجة التشخيص للبكتريا بواسطة جهاز Vitek 2 Compact	ملحق -5-
169	منحنى التضخيم للتعبير الجيني بتفاعل النسخ الكمي للجين 16S RNA	ملحق -6-
170	منحنى التضخيم للجين <i>ica A</i> قبل وبعد معاملة البكتريا بالمضادات	ملحق -7-
171	منحنى التضخيم للجين <i>ica B</i> قبل وبعد معاملة البكتريا بالمضادات	ملحق -8-
172	منحنى التضخيم للجين <i>ica C</i> قبل وبعد معاملة البكتريا بالمضادات	ملحق-9-
A		الخلاصة

قائمة الجداول

الصفحة	جداول الفصل الثاني استعراض المراجع	التسلسل
5	التصنيف العلمي لبكتريا <i>S.aureus</i>	1-2
الصفحة	جداول الفصل الثالث المواد وطرائق العمل	التسلسل
32	الاجهزة والادوات التي استعملت في الدراسة	1-3
34	المواد الكيميائية التي استعملت في الدراسة	2-3
35	الايوساط الزرع التي استعملت في عزل وتشخيص البكتريا	3-3
37	الصبغات المستخدمة في الدراسة	4-3
37	العدة المختبرية المستخدمة في الدراسة	5-3
38	المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة	6-3
47	تتابعات البوادى وحجم الناتج المتوقع للجينات المشفرة لتكوين الغشاء الحيوي	7-3
47	تتابعات البوادى وحجم الناتج المتوقع للجينات المشفرة لانتاج السموم المعوية	8-3
48	تتابعات البوادى وحجم الناتج المتوقع للجينات المشفرة لانتاج الذايفانات المحللة لكريات الدم البيض	9-3
48	تتابعات البوادى وحجم الناتج المتوقع للجينات المشفرة لانتاج الذايفانات الحالة لكريات الدم الحمراء	10-3
48	تتابعات البوادى وحجم الناتج المتوقع للجين المشفر لذيغان متلازمة الصدمة السمية	11-3
68	حجم مكونات خليط التفاعل الرئيسي	12-3
69	برمجة جهاز ال Uniplex- PCR	13-3
70	برمجة جهاز ال Multiplex-PCR	14-3
73	تتابعات البوادى المستخدمة في تفاعل النسخ الكمي RT-PCR q	15-3
74	مكونات خليط التفاعل الرئيسي Master mix المستخدمة للكشف عن التعبير الجيني للجينات <i>ica A, ica B, ica C</i> في عزلات بكتريا <i>S.aureus</i>	16-3
75	برمجة جهاز تفاعل النسخ الكمي q TR-PCR للكشف عن التعبير الجيني للجينات <i>ica A, ica B, ica C</i> في عزلات بكتريا <i>S.aureus</i>	17-3

الصفحة	جداول الفصل الرابع النتائج والمناقشة	التسلسل
78	مقاومة وحساسية عزلات بكتريا <i>S.aureus</i> لمضاد Oxacillin	1-4
81	نتائج الاختبارات المظهرية والكيموحيوية في بكتريا <i>S.aureus</i>	2-4
82	نتائج الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص بكتريا <i>S.aureus</i> بجهاز Vitek- 2 compact	3-4
84	اعداد والنسبة المئوية لبكتريا <i>S.aureus</i> حسب الجنس	4-4
86	اعداد والنسبة المئوية لبكتريا MRSA و MSSA حسب مصدر العينة	5-4
89	مقاومة المضادات الحياتية في بكتريا MRSA	6-4
92	مقاومة المضادات الحياتية في بكتريا MSSA	7-4
93	قيم التركيز المثبط الادنى لمضاد Gentamicin و Azithromycin	8-4
95	نتائج التحري المظهري عن عوامل الضراوة	9-4
99	تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا MRSA و MSSA بطريقة CRA	10-4
101	تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا MRSA و MSSA بطريقة MTP	11-4
119	التعبير الجيني للجين <i>ica A</i> قبل وبعد المعاملة بمضاد الازثرومايسين	12-4
122	التعبير الجيني للجين <i>ica A</i> قبل وبعد المعاملة بمضاد الجنتامايسين	13-4
123	التعبير الجيني للجين <i>ica B</i> قبل وبعد المعاملة بمضاد الازثرومايسين	14-4
126	التعبير الجيني للجين <i>ica B</i> قبل وبعد المعاملة بمضاد الجنتامايسين	15-4
129	التعبير الجيني للجين <i>ica C</i> قبل وبعد المعاملة بمضاد الازثرومايسين	16-4
131	التعبير الجيني للجين <i>ica C</i> قبل وبعد المعاملة بمضاد الجنتامايسين	17-4

قائمة الاشكال

الصفحة	الاشكال	التسلسل
12	عملية تكوين الغشاء الحيوي	1-2
98	تكوين الغشاء الحيوي على وسط CRA	1-4
103	نتائج تفاعل البلمرة PCR للجين <i>ica A</i> في بكتريا <i>S. aureus</i>	2-4
104	نتائج تفاعل البلمرة PCR للجين <i>ica B</i> في بكتريا <i>S. aureus</i>	3-4
105	نتائج تفاعل البلمرة PCR للجين <i>ica C</i> في بكتريا <i>S. aureus</i>	4-4
106	نتائج تفاعل البلمرة multiplex- PCR للجين <i>sea,b,c,d,e</i> في بكتريا <i>S. aureus</i>	5-4
109	نتائج تفاعل البلمرة PCR للجين <i>hlb</i> في بكتريا <i>S. aureus</i>	6-4
109	نتائج تفاعل البلمرة PCR للجين <i>hlg</i> في بكتريا <i>S. aureus</i>	7-4
111	نتائج تفاعل البلمرة PCR للجين <i>luk-s</i> في بكتريا <i>S. aureus</i>	8-4
111	نتائج تفاعل البلمرة PCR للجين <i>luk-F</i> في بكتريا <i>S. aureus</i>	9-4
114	نتائج تفاعل البلمرة PCR للجين <i>tst</i> في بكتريا <i>S. aureus</i>	10-4
117	تغير التعبير الجيني للجين <i>ica A</i> في بكتريا <i>S. aureus</i> قبل وبعد معاملة العزلات بمضاد الازثرومايسين	11-4
120	تغير التعبير الجيني للجين <i>ica A</i> في بكتريا <i>S. aureus</i> قبل وبعد معاملة العزلات بمضاد الجنتاميسين	12-4
123	تغير التعبير الجيني للجين <i>ica B</i> في بكتريا <i>S. aureus</i> قبل وبعد معاملة العزلات بمضاد الازثرومايسين	13-4
125	تغير التعبير الجيني للجين <i>ica B</i> في بكتريا <i>S. aureus</i> قبل وبعد معاملة العزلات بمضاد الجنتاميسين	14-4
129	تغير التعبير الجيني للجين <i>ica C</i> في بكتريا <i>S. aureus</i> قبل وبعد معاملة العزلات بمضاد الازثرومايسين	15-4
132	تغير التعبير الجيني للجين <i>ica C</i> في بكتريا <i>S. aureus</i> قبل وبعد معاملة العزلات بمضاد الجنتاميسين	16-4

قائمة المختصرات

Abbreviation	Key
μl	Microleter
bp	Base Pair
dd H ₂ O	Deionized Distilled water
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acitic Acid
EMB	Eosin-Methylene-Blue
GM	Gentamycin
L	Liter
PCR	Polymerase chain reaction
HGT	Horizontal gene transfer
rRNA	Ribosomal RNA
Mm	Millimetre
pH	Potential Hydrogen
TBE	Tris-Boricacid-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris-OH	Tris-(hydroxyl methyl) methylamine
β-Lactamase	Beta Lactamase
MTP	Microtiter plate
TM	Tube method

Introduction : المقدمة

ان بكتريا *Staphylococcus aureus* من الانواع البكتيرية الممرضة التي تعود لعائلة Staphylococcaceae والتي تقسم الى مجموعتين رئيسيتين بالاعتماد على القدرة لانتاج انزيم التجلط Coagulase positive ،المكورات العنقودية المنتجة لهذا الانزيم Coagulase positive staphylococci (CoPS) هي *Staphylococcus aureus* و *S. intermedius* و *S. hyicus* و *S. pseudointermedius* و *S. delphini* و *S. lutrae* ، اما البكتيريا غير المنتجة لانزيم التجلط Coagulase Negative Staphylococci (CoNS) فهي تتضمن *S. epidermidis* و *S. haemolyticus* و *S. capitis* (Thomer وآخرون، 2016).

تعد بكتريا *S. aureus* بكتريا موجبة لصبغة كرام، ولها قطر يتراوح بين 0.5-1.5 مايكروميتر، وهي غير متحركة وغير مكونة للسبورات ولاهوائية اختيارية (Forbes وآخرون، 2007)، ان لهذه البكتريا القدرة على الامراضية الانتهازية وهي مرتبطة بقدرتها على انتاج العديد من عوامل الضراوة التي تشمل الذيفانات Toxins والانزيمات الخارج خلوية Extracellular enzymes ، مما يعطي البكتريا قدرة على الانتشار والتضاعف داخل الانسجة الحية للمضيف ، فضلا عن مقاومتها العالية والمتعددة لمضادات الحياة ولاسيما التي تعود لمجموعة البيتا لاكتام والامينوكلايكوسايد (Chan وآخرون، 2016).

لقد ازدادت في الآونة الاخيرة مقاومة بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* لمضادات الحياة وهذا بدوره يشكل مشكلة صحية خطيرة ومن ضمنها مضاد Vancomycin والذي يستعمل بديلا لمضادات البيتا لاكتام المستخدم ضد المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* المقاومة الميثيسيلين (MRSA) (Methicillin Resistance *S. aureus*) (Kromann ولبير، 2014). تمتلك بكتريا المكورات العنقودية ايضا جينات لمقاومة السيفالوسبورينات والبنسلينات وخصوصا (Penicillin G) المسؤولة عن انتاج انزيمات البيتا لاكتام β -Lactame وهذه الجينات يكون

منشأها اما كروموسومي او بلازميدي او بسبب حدوث الطفرات الوراثية في البروتينات المرتبطة بالبنسلينات (PBPS) Penicillin Binding Proteins (Levinson، 2014) .

لقد اشارت الدراسات الى ان لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية جينات مقاومة لمضادات الامينوكلايكوسايد وعلى وجه التحديد مضاد Gentamicin والسبب في ذلك يعود لوجود جين متخصص مسؤول عن المقاومة لذلك المضاد حيث انه يعمل على تحويل موقع الهدف Target site وذلك بارتباط المضاد معه مما يؤدي الى حدوث المقاومة (Mirzaee وآخرون، 2014 ; Jaddoa و Al-Mathkhury، 2018).

ان للمكورات العنقودية الذهبية القدرة على انتاج العديد من عوامل الضراوة المسببة لعدة امراض مثل متلازمة الصدمة السمية Toxic Shock Syndrom (TSS) والذيفان المعوي Enterotoxin المسبب للتسمم الغذائي Food poisoning والذيفان المقشر exfoliative Toxin ، وهذه السموم لها القدرة على عمل ثقوب في الغشاء البلازمي لخلايا الانسجة المصابة وهذا يؤدي الى تدفق الجزيئات والفيتامينات والمواد الضرورية الى خارج الخلية وبالتالي موتها (Hamza وآخرون، 2015; Sankomkai وآخرون، 2020). ان لهذه البكتريا القدرة على انتاج الطبقة اللزجة Slyme layer وتوفر لها هذه الخاصية امكانية الالتصاق على جسم الانسان كالجلد والاعشية المخاطية وتجنبها ايضا تأثيرمضادات الحياة (Keikhaie وآخرون، 2017 ; Horvath وآخرون، 2020).

ان للمكورات العنقودية الذهبية عوامل ضراوة اخرى وهي افرازها للانزيمات التي منها انزيم اللايباز Lipase المحلل للدهون وانزيم Hyaluronidase الذي يساعد البكتريا على الانتشار من خلال تحطيم المادة الاساس للنسيج الرابط وانزيم البروتياز Protease المحلل للبروتينات وانزيم الهيموليسين Hemolysin المحلل للهيموغلوبين وايضا انزيم Staphylokinase الذي يحل خثرة الفايبرين (Diab وآخرون، 2021).

جميع عوامل الضراوة الانفة الذكر يشفر لها عن طريق جينات تكون موجودة في مناطق تدعى بالجزر الامراضية *pathogenicity islands* والتي تحمل على الكروموسوم، اوقد تحمل على البلازميدات (Jaran، 2017) .

الهدف من الدراسة Aim of the study

بالنظر لقلّة وجود دراسات جزيئية لعوامل ضراوة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية وزيادة اهميتها السريرية في مدينة بعقوبة اقترحت هذه الدراسة بهدف دراسة عوامل الضراوة في هذه البكتريا والجينات المشفرة لها وكذلك حساسية العزلات لعدد من المضادات الحيوية وباعتماد الخطوات التالية :

1. عزل وتشخيص بكتريا *Staphylococcus aureus* من عينات سريرية مختلفة .
 2- الكشف عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بالطرائق المظهرية والكيموحيوية والتحري عنها باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وهي :
 أ. الكشف عن الجينات المشفرة لتكوين الغشاء الحيوي *icaA* ، *icaB* ، *icaC* ودراسة التعبير الجيني لها.

ب - الكشف عن الجين المشفر لانتاج السموم المعوية *see A* ، *see B* ، *see C* ، *see D* ، *see E*.

ج- الكشف عن الجين المشفر لانتاج السم المسبب لمتلازمة الصدمة السمية Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST) (*tst*) .

د-الكشف عن الجينات المشفرة لانتاج السموم الحالة لكريات الدم البيضاء Pantone ValIntene Leukocidine (PVL) (*lukS-lukF*) .

هـ - الكشف عن الجينات المشفرة لانتاج السموم الحالة لكريات الدم الحمراء (*hlg-hlb*) .
 3- دراسة قابلية بكتريا *S.aureus* على التعبير الجيني لانتاج الغشاء الحيوي قبل وبعد معاملتها بمضادي الجنتاميسين والازثروميسين.

2- استعراض المراجع Literature Review

1-2 نبذة تاريخية عن بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus*

تعد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* احد انواع عائلة المكورات العنقودية التي تسمى عائلة *Micrococcaceae* ،تم وصفها لأول مرة في عام 1882م من قبل العالم الكسندر اوغستون Alexander Ogaston وذلك عندما اكتشف المسبب للمراض القححية التي تصيب الانسان واطلق عليها تسمية *Staphylococci* حيث يعني عنقود العنب (Jawets ،2013)، بعدها قام العالم Rosenbach بعزل وتنمية البكتريا في مزارع نقية في عام 1884 إذ شخص نوعين من السلالات التي تعود الى هذا الجنس هما *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus albus* التي تعرف الان بأسم *Staphylococcus epidermidis* (Forbes واخرون ، 2007) .

توصف هذه البكتريا بانها غير متحركة وغير مكونة للأبواغ وبعضها يمتلك المحفظة ، مستعمراتها كبيرة، دائرية ، ملساء الحواف ومعتمة ،اما لون المستعمرات فهو يتباين بين الابيض الكريمي والاصفر وتختفي هذه الصبغات عند تنمية البكتريا في الظروف اللاهوائية (Hassuny،2014) . تستطيع بكتريا *S. aureus* ان تخمر سكراللاكتوز والمالتوز والمانيتول منتجة حامض لكن بدون غاز . لها القدرة على اختزال النترات والمثليين الازرق وتحليل اليوريا (Levinson،2014) كما انها تمتاز بكونها موجبة لأختبار انتاج انزيم التجلط Coagulase ، وانزيم تحلل الدنا DNase ، وانزيم الكاتاليز Catalase ومنتجه للهيمولايسين Hemolysin من نوع الفا ،بيتا وكاما ،وهي سالبة لأختبار انزيم الاوكسيديز Oxidase (السعدي واخرون،2014) .

ان الصفة المميزة للعنقوديات الذهبية هو قدرة نموها على الاوساط الزرعية الحاوية على تركيز ملحي يتراوح بين (7.5-10 %) من كلوريد الصوديوم مثل وسط اكار المانيتول الملحي . وقدرتها على النمو ضمن مدى واسع من درجات الحرارة و التي تتراوح ما بين (15 - 42°م) إلا ان درجة الحرارة المثلى للنمو لها هي 37 °م وتستطيع النمو ضمن اوساط رقمها الهيدروجيني يتراوح بين (4.8 - 9.8 pH) (Cowan و Steel، 2004).

تم تصنيف البكتريا كما جاء في (Jawetz and Adelberg's, 2020) ومبين بالجدول الاتي:-

جدول (2 - 1) التصنيف العلمي لبكتيريا *S.aureus*

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

2-2 الشكل المظهري لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus*

شكل البكتريا هو كروي يتراوح قطر الخلية بين 0.5-1.5 مايكرون اما حجمها فهو يتفاوت باختلاف السلالات وعمر المزرعة والوسط الغذائي الذي تنمو عليه ،تظهر في المجهر الضوئي بهيئة مجاميع عنقودية او تجمعات صغيرة غير منتظمة عند تنميتها على الاوساط الصلبة ،بينما تظهر على هيئة سلاسل قصيرة او مزدوجة عند زرعها في المرق المغذي (Forbes

واخرون، 2007). تأخذ المستعمرات النمأة على الاوساط الصلبة شكل دائري بقطر يتراوح بين 1-4 ملم وتكون ذات سطح ناعم وحافة مستديرة مرتفعة قليلا وذلك بعد حضنها لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م، اما لون المستعمرات فهي تتفاوت بين الابيض والاصفر والذهبي، اما عند تنمية بكتيريا *S. aureus* على وسط اكار الدم فيلاحظ بان مستعمراتها تكون محاطة بمنطقة تحلل بهيئة هالة شفافة كاملة وهو ما يسمى (β -heamolysis) (Contreras واخرون، 2012).

2-3 التركيب المستضدي للبكتريا Antigenic structure:

2-3-1 الجدار الخلوي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* :

يتميز الجدار الخلوي للمكورات العنقودية الذهبية بالتعقيد وهو يتكون بصورة رئيسية من الببتيدوكلايكان (Peptidoglycan) وهو بوليمر يتكون من سكريات متعددة مرتبطة بصورة عرضية مع ببتيديات قصيرة (Truc و Walker، 2020) . وتشكل هذه الطبقة حوالي 50 % من جدار الخلية ، ويتحطم هيكل جدار الخلية الخارجي عند تعرضه لحوامض قوية اولانزيم Lysozyme (Atilano واخرون، 2010). اما المكون الثاني لجدار الخلية فهو حامض التايكويك (Teichoic acid) الذي يتكون من وحدات من Phosphohydroxy alcohol والتي تتبادل فيها مجاميع الهيدروكسيل مع الحامض الاميني الانين alanine و السكريات (Reith و Mayer، 2011، Berni: 2011 واخرون، 2021)، والمكون الاخر هو البروتين A (Protein A) وهو يشكل حوالي 6.7 % من مكونات جدار الخلية و ينتج من قبل اكثر من 95 % من سلالات بكتريا *S. aureus* حيث وجد بان لهذا البروتين القدرة على تثبيط البلعمة Phagocytosis حيث يعمل بروتين A كقناع مناعي Immunological (disguises) لحماية البكتريا ومساعدتها على البقاء (Taylor و Unakal، 2020).

2-4 أمراضية المكورات العنقودية الذهبية Pathogenecity

ان المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* هي من اكثر أنواع المكورات العنقودية إمرضية، والتي تكون جزء من النبيت الطبيعي (Normal flora) حيث توجد على الجلد وفي الانف والبلعوم وفي القناة الهضمية والتناسلية للانسان ، وتمتلك قدرة كبيرة على احداث الاخماج الانتهازية والتي تتفاوت بين خمج الجلد البسيط نسبيا الى الامراض الجهازية التي تهدد الحياة (Levinson ، 2014) . تنشأ أمراضية بكتريا المكورات العنقودية من التأثير المشترك لعدد من العوامل الخارج خلوية التي تنتجها البكتريا كالذيفانات و الانزيمات التي ذكرت سابقا (Todar ، 2008)، تزداد خطورة البكتريا عندما تتوفر الظروف الملائمة لنموها لها كوجود خلل في الدفاع المناعي للجسم ، وجود امراض مزمنة كالسرطانات وداء السكري ، اصابات الجلد والاصابة بكائنات ممرضة اخرى مثل الفايروسات، إضافة الى عوامل أخرى تساعد على احداث الخمج كضعف الحالة الصحية ، البدانة والتعرض للمواد الكيماوية والصناعية (Cho واخرون، 2010)، لقد وجد بان السلالات البكتيرية المعزولة من الاخماج الخطرة لديها العديد من عوامل الضراوة مقارنة مع سلالات الحاملين لها (Carriers) وهي التي تسبب تجرثم الدم Bacterimia وانتشار الاصابة الى الاعضاء الداخلية وقد تهدد الحياة اذا لم تتم معالجتها واليسطرة عليها بسرعة (Keikhaie واخرون، 2017).

نظرا لسرعة انتشار العنقوديات ووجود نسب كبيرة من حاملي هذه الجراثيم (30-50)% فانه من الصعب مقاومة العدوى بها ، علاوة على ذلك فانها تستطيع العيش لفترة طويلة تصل لشهور في الصديد الجاف والسوائل وهي ذات قدرة عالية على مقاومة المطهرات لذلك تعد المسبب الرئيسي لعدوى المستشفيات Nosocomial infection عن طريق الملامسة المباشرة وغير المباشرة (Das واخرون ، 2019).

بصورة عامة تتسبب المكورات العنقودية الذهبية بنوعين من الامراض هي :

2-4-1 الأمراض السطحية Superficial diseases

تتسبب بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بالعديد من الامراض السطحية والتي تشمل متلازمة الجلد السمي Scalded Skin Syndrome ، اخماج الحروق Burn Infection ، اخماج الجروح Surgical wound infection ، التهاب الجريبات folliculitis ، الدمامل Boils ، البثرات الجلدية Skin pustules وداء القوباء Impetigo ، وتكون الدمامل والبثور اكثر شيوعا عند الشباب وبخاصة الاناث منهم وقد تكون مرتبطة بالسمنة وسوء استخدام المضادات الحياتية ايضا (Shallcross وآخرون ، 2015).

لوحظ حدوث اغلب الاصابات بهذه البكتريا بعد اجراء عمليات جراحية وبخاصة بعد ان ظهرت سلالات مقاومة لمضاد الميثيسيلين Methicillin *Staphylococcus aureus* Resistant التي تستطيع مقاومة العديد من المضادات الحيوية (Boucher وآخرون ، 2014). كما يمكن القول بأن بيئة المستشفيات تلعب دورا فاعلا في انتشار وانتقال بكتريا MRSA الى الوحدات والاجهزة الطبية وبخاصة اجهزة الغسيل الكلوي والقشاطر (Shakibaie ، وآخرون ، 2014).

2-4-2 الأمراض الجهازية Systemic diseases

تحدث الامراض الجهازية نتيجة لدخول بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* الى مجرى الدم ومنها الى الاجهزة الداخلية مسببة امراض ،تسمم الدم Septicemia ،التهاب السحايا Meningitis ،التهاب المفاصل Rheumatoid ،التهاب الرئة Pneumonia ،التهاب الكلية Nephritis ، اخماج القناة البولية (UTI) Urinary Tract Infection ،التهاب الاوردة الخثري

Thrombophlebitis وذات الجنب القيحي Empyema (Tong وآخرون، 2019)، بالإضافة إلى الأمراض التي تنتج عن سموم هذه البكتيريا مثل متلازمة الصدمة السمية Toxic shock syndrome والتسمم الغذائي Food poisoning الذي ينتج عن ابتلاع الطعام الحاوي على السم المعوي للبكتيريا وتظهر أعراضه بعد فترة قصيرة تتراوح ما بين 2-6 ساعة (Argudin وآخرون، 2020).

2-5 وبائية المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* Epidemiology of

تُعد المكورات العنقودية الذهبية واحدة من أكثر مسببات الأمراض شيوعاً والتي لها القدرة على التسبب بأمراض كثيرة في الإنسان، حيث يمكنها أن تنتشر من مريض إلى آخر في المستشفى مسببة مشاكل صحية جمة، فضلاً عن ذلك فإن الأشخاص الأصحاء ليسوا بمنأى عن الإصابة بالعدوى التي تسببها المكورات العنقودية الذهبية لكونهم حاملين Carrier للبكتيريا في الأنسجة الطلائية الرطبة الموجودة الأنف (Sankomkai وآخرون، 2020).

تُعتبر المكورات العنقودية الذهبية من أكثر أنواع البكتيريا انتشاراً حيث تتواجد على سطح الأغشية المخاطية و جلد الإنسان وفي الماء والتربة وحتى في المنتجات الغذائية، كما يمكنها التسبب باخماج الجروح والحروق، وهي أيضاً من الممرضات الانتهازية التي تُصيب مناطق الجسم المختلفة في الإنسان كالاذن، الجلد، المجاري التنفسية، الرئة وشغاف القلب وتعتبر من المسببات الرئيسية لعدوى المستشفيات nosocomial infection (Shahmoradi وآخرون، 2019).

بينت دراسات عديدة أن نسبة الأشخاص الحاملين Carriers لبكتيريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* في مدخل الأنف تصل إلى 30%، وهي بذلك قد تسبب الإصابة بالاخماج عند حدوث اخفاق في الدفاعات المناعية لجسم المصاب وتزداد هذه النسبة لدى الأشخاص

العاملين في المستشفيات (Motamedi وآخرون ، 2018)، ان انتقال بكتيريا المكورات العنقودية إلى المستشفى يكون بواسطة المرضى المصابين بالاختلاج المختلفة أو قد يكون عن طريق شخص ناقل لجراثيم المرض، حيث ان الأشخاص المصابين أو الناقلين للمرض هم المصدر الرئيس للعدوى ،او يكون انتقال البكتيريا بين المرضى حتى ،عن طريق أيدي الاشخاص الذين يقومون بتقديم الرعاية الصحية عن طريق ملامستهم للمرضى المصابين ، والذي يكون سبباً رئيسياً لانتشارها في المستشفيات (Hassuny, 2014) .

تظهر الدراسات الجينومية والوبائية أن بكتيريا *S. aureus* قفزت بين الأنواع المضيفة عدة مرات خلال تاريخها التطوري وقد تضمنت اكتساباً ديناميكياً وفقداناً للجينات التكيفية الخاصة بالمضيف والتي توجد عادةً على العناصر الوراثية المتنقلة (Matuszewska وآخرون ، 2020).

2-6 عوامل الضراوة التي تنتجها بكتريا *S.aureus*

2-6-1 تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

يعرف الغشاء الحيوي Biofilm على انه تجمع حيوي للخلايا البكتيرية على سطح الاجسام يتكون من بروتينات التصاق مثل بروتين A,B Fibronectin binding proteins والحمض النووي DNA الخارج خلوي (extracellular(eDNA وعديد السكريد مثل poly-N-acetyl-D-glucosamine(PNAG) (Radlinski وآخرون ، 2020)، يسمى الغشاء الحيوي ايضا بالطبقة عديدة السكريد الخارجية (EPS) Exopolysaccharide التي تعطي للبكتريا حماية من المضادات الحيوية والمطهرات والبيئات المتغيرة خاصة في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) (Parastan وآخرون، 2020).

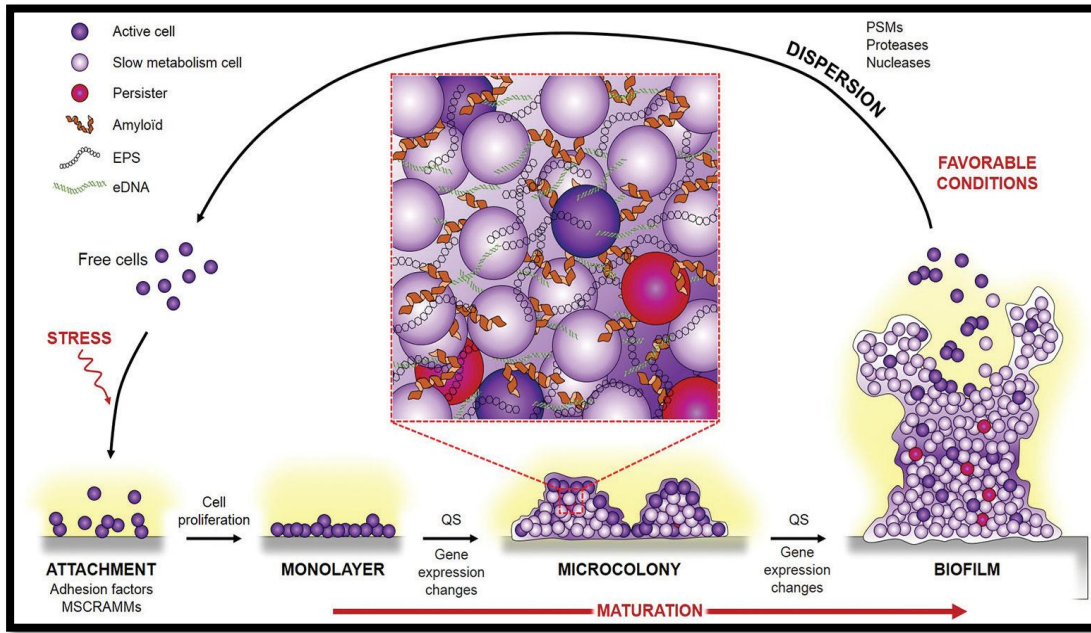
ذكر Shahmoradi وآخرون (2019) أن الغشاء الحيوي أحد عوامل الضراوة التي لها دور كبير في أحداث الأمراض في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* حيث تصبح البكتريا ذات قدرة أكبر على استعمار أنسجة الشخص المصاب بها وأكثر مقاومة للمضادات الحيوية .

تعتمد عملية تكوين الغشاء الحيوي Biofilm على حدوث آلية إدراك النصاب الحسي Quorum sensing والذي بدوره يعتمد على التعبير الجيني (gene expression)، فعند إفراز الخلايا البكتيرية لمركب عديد السكريد polysaccharide ينفصل جزيء بروتين كاشارة signal والذي يعد المحفز الذاتي لزيادة عدد الخلايا البكتيرية على السطح المصاب (Mohammed وآخرون، 2018).

أن البكتريا تستخدم حوار عن طريق النفاذية الكيميائية لبناء مصفوفة Matrex مكونة من عديد السكريد الغروي فضلا عن البروتينات والدهون والحمض النووي DNA (Foster وآخرون، 2020)، حيث تنمو التجمعات الخلوية لتصبح هيكلًا ثلاثي الأبعاد وتتضج الأغشية الحيوية الرقيقة التي تعمل كمادة لاصقة والتي يشفر لها عملية التعبير الجيني (gene expression) التي تتم عن طريق جينات الالتصاق الداخل خلوية intracellular adhesion operon وهي (ica ABCD) التي تشفر لثلاث بروتينات غشائية هي Ica ADC وبروتين واحد خارج خلوي هو Ica B (Mirzaee وآخرون، 2018).

تعد الأنواع البكتيرية المكونة للغشاء الحيوي Biofilm أقل حساسية للمضادات الحيوية من الأنواع الأخرى حيث وجد بأن 80% من الممرضات البكتيرية المكونة للغشاء الحيوي لها القدرة على أحداث الإصابة المرضية (Algburi وآخرون، 2017)، ويمكن أن يؤدي تكوين الغشاء

الحيوي Biofilm بواسطة المكورات العنقودية الذهبية الى حدوث اصابات الجروح المزمنة chronic wound infections مثل قرحة القدم السكري diabetic foot ulcer ، تقرحات الضغط pressure sores والقرحة الوريدية venous ulcers (Neopane) وآخرون (2018). يوضح الشكل (1-2) عملية تكوين الغشاء الحيوي Biofilm



شكل (1-2) عملية تكوين الغشاء الحيوي (Reffuveille وآخرون، 2017)

2-6-2 السموم التي تنتجها بكتريا *Staphylococcus aureus*

تنتج بكتريا المكورات العنقودية الذهبية العديد من السموم الخارج خلوية Extracellular

enzymes التي ثبت ان لها دور مهم في امراضية البكتريا وهي :

1-2-6-2 الهيمولايسين Haemolysin

الهيمولايسين من السموم الخارجية Exotoxins التي تقوم بتعطيم الغشاء الخلوي لكريات الدم

الحمراء بعمل ثقوب في غشاء الخلية وبالتالي تحللها ويمكن ملاحظة تأثيره عند زراعة البكتريا على

وسط اكار الدم وحضنها لمدة 24-48 ساعة بدرجة حرارة 37°م اذ تتكون هالة شفافة حول المستعمرة دلالة على تحلل كامل من نوع بيتا β -Hemolysis (Hassuny، 2014).

تحلل خلايا الدم الحمراء بشكل رئيسي بواسطة أنواع مختلفة من انزيم الهيمولايسين المعروفة باسم α ، β ، δ ، γ و γ ، الهيمولايسين ألفا هو ذيفان ذات وزن جزيئي 33 كيلو دالتون ويشفر له بواسطة الجين *hla* ، يتم إفرازه بواسطة بكتيريا *S. aureus* ، ويمكن أن يسبب امراضا سريرية ، بما في ذلك الالتهاب الرئوي pneumonia ، تعفن الدم sepsis وخراج الدماغ brain absces (Xiao وآخرون، 2016) .

ذيفان بيتا β (beta) ذو وزن جزيئي يبلغ 35 كيلو دالتون، يشفر له بواسطة الجين *hla* ، ان هذا السم يمكن ان يسبب حالات سريرية كالتهاب الرئة pneumonia وعدوى قرنية العين cornea (Hayashida وآخرون، 2009) . الهيمولايسين دلتا δ (delta) هو سلسلة ببتيدية تتكون من 26 حامض اميني يشفر له بواسطة الجين *hld* ، ولم يتم فهم آلية إفرازه بشكل كامل حتى الآن (Motamedi وآخرون، 2018).

الذيفان كما γ (gamma) يتكون من سلاسل ببتيدية مفردة monomers تتألف من الوحدات الفرعية (S,F) ويشفر لانتاج هذا السم الجين *hlg* الذي ينتقل عن طريق العناصر الوراثية المتنقلة mobile genetic elements مثل العاثيات phage (Chen وآخرون، 2017).

2-2-6-2 Enterotoxin الذيفان المعوي

الذيفانات المعوية هي مستضدات بكتيرية من النوع الخارق super antigen تنتجها المكورات العنقودية الذهبية التي لها القدرة على الارتباط بمعقد التوافق النسيجي Major MHC Histocompatibility Complex الذي يحفز بدوره الخلايا التائية T-cell على الاستجابة ومن

ثم تحرير الانترلوكين IL1 و IL2 وبالتالي تنتج اعراض للتسمم الغذائي Food poisoning والتي تظهر بشكل تقلصات في البطن والغثيان والقيء والإسهال المائي، بعد 2-4 ساعات من تناول الأطعمة الملوثة ، وتختلف في شدتها اعتماداً على الحالة الصحية للفرد وكمية السم (Loir واخرون، 2003).

تعد هذه السموم ذو طبيعة بروتينية ثابتة حرارياً ومقاومة للانزيمات الهاضمة في الامعاء، تفرزها البكتريا في الاطعمة المختلفة كالحلويات ومشتقات الالبان والمايونيز واللحوم ويوجد حتى الان عشرون نوع مصلي من هذا السم لكن ليست كلها فعالة (Mahfoozi واخرون، 2019).

الجينات المسؤولة عن التفسير للسموم المعوية لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية هي *seeA, seeB, seeC, seeD, seeE, seeH* و *seeE* اغلبها تنتقل بواسطة العناصر الوراثية المتنقلة (MGEs) mobile genetic elements والتي تتضمن العاثيات الاولى prophage ، الجزر الامراضية islands ، pathogenicity ، البلازميدات plasmids والترانسبوزونات transposons (Hamza واخرون، 2015: Machado واخرون، 2019)، ويتم استخدام العديد من التقنيات الجزيئية للكشف السريع والدقيق لعزلات المكورات العنقودية الذهبية ، بما في ذلك تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد (Multiplex-PCR) (Gandra واخرون، 2016) .

تسبب المكورات العنقودية الذهبية معظم حالات التسمم الغذائي Food poisoning ، وترجع قدرتها الامراضية إلى إنتاجها عدة أنواع مصلية من السموم المعوية ، وترتبط معظم حالات التسمم الغذائي بالمكورات العنقودية بالنمط *sea-see* ؛ ومع ذلك ، فإن *sea* هو الأكثر انتشاراً (Diab واخرون، 2021).

توجد بكتيريا *S. aureus* في الحلق والممرات الأنفية والشعر والجلد لما يقرب من 50% من الأفراد الأصحاء. لذلك ، يُفترض أن يكون الأشخاص العاملين في مجال صناعة الأغذية مصدرًا محتملاً لتلوث الاغذية ، سواء كان بشكل مباشر أو غير مباشر حيث يكونون وسيلة للعدوى البشرية ، وبالتالي قد يشكلون تهديدًا للصحة العامة (Acosta وآخرون، 2018؛ Garciaa: 2019).

2-6-2 ذيفان متلازمة الصدمة السمية (TSST-1) Toxic shock syndrome

Toxin

ذيفان متلازمة الصدمة السمية من السموم المميتة الذي تم عزله من 40 % من المكورات العنقودية الذهبية وهو مستضد خارق Super antigen يرتبط مع معقد التوافق النسيجي MHC II- المتواجد على سطح الخلايا المقدمة للمستضد كالخلية البلعمية الذي بدوره يحفز استجابة الخلايا التائية وتدفق الساييتوكينات وحدوث الصدمة السمية بالنتيجة (Kulhankova وآخرون، 2014). من اعراض المرض هو ارتفاع درجة الحرارة ، ظهور طفح ، جفاف الجلد وانخفاض ضغط الدم (Wilks وآخرون، 2017)، ان الجين المشفر لذيفان متلازمة الصدمة السمية (*tst*) يحمل على الجزر الامراضية Pathogenicity islands في كروموسوم البكتريا بواسطة الجينات الوراثية القافزة التي تسمى mobile genetic elements (Sharma وآخرون، 2019).

تم تصنيف هذا السم على أنه من أفراد عائلة المستضدات الفائقة super antigen بسبب نشاطه البيولوجي وارتباطها الهيكلي، يتخطى المستضد الفائق العرض الطبيعي وله نشاط قوي للخلايا التائية نتيجة الارتباط المباشر بمناطق معينة على الخلايا التائية وجزيئات الفئة الثانية من معقد التوافق النسيجي الرئيسي للخلايا العارضة للمستضد MHC-ClassII (Krakauer, 2019).

من المعروف أن أكثر من عشرين سمًا متميزًا من السموم المستضدة تنتجها بكتيريا *S. aureus* و يمكن أن تحمل كل من بكتريا MRSA و MSSA واحدًا أو أكثر من جينات السموم الفائقة وتختلف الآلية المسببة للأمراض وعوامل الفوعة بين MRSA و MSSA (Omar و Mohammed، 2021).

2-6-2-4 ذيفان المقشر Exfoliative toxin

هو ذيفان خارجي يسمى (Epidermolytic toxin) أو متلازمة الجلد السمطي (SSS) Scalded Skin Syndrome يتكون من مواد بروتينية يؤدي الى تسلخ أو تقشر الطبقة الخارجية للجلد (الطبقة المتقرنة للبشرة Stratum granulosom) وانفصالها عن الجسيمات الرابطة Desmosomes التي تقوم بربط الخلايا المكونة للبشرة مع بعضها البعض مسببة موتها ثم تقشرها (Asokan وآخرون، 2019) ، ان هذا المرض يحدث في الاطفال حديثي الولادة ويبدأ باحمرار وطفح يشمل الجسم كله خلال يومين الى ثلاثة ايام وبعد انفصال البشرة الخارجية تظهر منطقة من الجلد الاحمر ، و يطلق عليه ايضا بمرض رايتز Ritter's disease) Amagai وآخرون، 2000: Doudoulakakis وآخرون، 2019).

تكون الاصابة بمتلازمة الجلد السمطي في الاطفال تحت سن الخامسة في مناطق ملتحمة العين ، البلعوم ، المناطق المحيطة بالفم ، حول الشرج ، وفي حديثي الولادة يصاب الحبل السري ايضا، يكون علاج الجلد المصاب بعمل تدابير داعمة مثل السيطرة على الألم ، واعطاء السوائل الوريدية ، والعناية بالبشرة لتجنب العدوى الثانوية واعطاء المضادات الحيوية المضادة للمكورات العنقودية الذهبية ، والتي تحتوي أيضًا على مضادات لتأثير السم و تعفن الدم والوفيات نادرة بين الأطفال (Liy-Wong وآخرون، 2021).

5-2-6-2 Panton-Valentin Leucocidin (PVL) الفاتل لخلايا الدم البيض

سمي بهذا الاسم نسبة للعالمين المكتشفين له Panton-Valentin وذلك عام 1930، ويعد هذا الذيفان مركب بروتيني متعدد حيث يتألف من أربع جزيئات نوع (luk-f) وأربع جزيئات نوع (luk-s) (Valle وآخرون، 2016).

عندما يكون تركيز السم واطناً داخل الجسم فإن هذه الجزيئات ترتبط على مستقبلات موجودة على سطوح الأغشية الساييتوبلازمية لكريات الدم البيضاء متعدد الأشكال (PMNs) Polymorphonuclear cells ويسبب تحفيز فتح قنوات تدفق ايونات الكالسيوم Ca^{+2} و زيادة تركيز الايونات الحرة الداخل خلوية وبالتالي موت الخلية (Al-Soud، 2019)، اما عندما يكون تركيز السم (PVL) عاليا فانه يحفز تحرير الوسائط الالتهابية inflammatory mediators في خلايا الجلد والانسجة الرخوة كالرئتين والذي يمكن ان يؤدي الى الاصابات الجهازية كالالتهاب الرئوي الناخر (Shallcross وآخرون، 2015).

وجد بان غالبية عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية التي تسبب التهابات الجلد والأنسجة الرخوة والالتهاب الرئوي تحتوي جينات PVL ويتم التشفير لهذا الذيفان بواسطة موقع (1.9kb) F-PV-lukS الذي يتكون من جينات lukF و lukS (Gajdacs، 2019). يتجمع الذيفان على أغشية العدلات W.B.C مكونا ثقوب تؤدي الى تحلل خلايا الدفاع، بما في ذلك العدلات البشرية neutrophils، الوحيدات monocytes، و الملتهمات macrophages، و يتسبب ذيفان PVL في موت الخلايا المبرمج apoptosis من خلال تنشيط الوسائط الالتهابية (Olya وآخرون، 2021).

2-6-3 الانزيمات التي تنتجها المكورات العنقودية الذهبية

تقوم المكورات العنقودية الذهبية بإنتاج العديد من الانزيمات التي تعد من العوامل المهمة التي تنجم عنها الاصابات المرضية للإنسان لأنها تزيد من قدرة البكتيريا على اختراق أنسجة المضيف (Levinson، 2014) ، تشمل هذه الانزيمات :

2-6-3-1 أنزيم تجلط البلازما Coagulase

أنزيم تجلط البلازما هو إنزيم يُخثر بلازما الدم الإنسان والأرانب وهي الصفة التي تستخدم للتمييز بين أنواع المكورات العنقودية المختلفة ، هذا الإنزيم عبارة عن بروتين وظيفته يجلط البلازما بوجود عامل بروتيني في المصل و يعد عاملاً مهماً يشير إلى درجة إمرضيه المكورات العنقودية الذهبية (Thomer وآخرون، 2016) .

إن دور أنزيم تجلط البلازما في أحداث الأمراض هو غير معروف تماماً، ولكن هناك بعض التفسيرات التي تشير إلى أن هذا الإنزيم مسؤول عن دخول البكتيريا إلى الأنسجة و تكمن أهميته في أنه يحيط خلايا المكورات العنقودية الذهبية بالفايبرين مانعاً بهذا الخلايا البلعمية Phagocytes من التهامها ، وإن تكون حاجز الفايبرين Fibrine حول المناطق المصابة بالبكتيريا يقوم بحمايتها من الية الدفاع الخلوي للجسم و يسمح بتضاعفها في هذه المنطقة (Qin وآخرون، 2017).

2-6-3-2 أنزيم الكاتاليز Catalase

إن لهذا الإنزيم دوراً فاعلاً في حماية الخلايا البكتيرية من التأثير السمي القاتل لبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وهو ناتج نهائي لأيض الكربوهيدرات هوائياً، حيث يقوم الإنزيم بتحطيم مركب بيروكسيد الهيدروجين منتجاً بذلك أكسجين وماء، وقد لوحظ أنه عند نمو بكتيريا المكورات

العنقودية الذهبية بدرجات حرارة تتراوح ما بين 25- 32- 37 °م فان الفعالية لانزيم الكاتاليز تقل وذلك بنسبة (80 - 90) % خلال ساعة واحدة من تلقحها (Mustafa Inoculation، 2014).

2-3-6-3 أنزيم الستافيلوكاينيز (Fibrinolysin) Staphylokinase

تنتج بعض أنواع المكورات العنقودية الذهبية انزيم Fibrinolysin غير المستقر حراريا ويقوم بإذابة الخثرة الدموية باضافته لها خلال مدة (24-48) ساعة، مما يسمح بانتشار البكتريا خلال أنسجة المضيف من الجروح والحروق (Brooks وآخرون، 2007)، محلاً بذلك خثرة الفايبرين وهذا يساعد على انتشار البكتريا في مختلف الأنسجة ويزيد من القدرة على الغزو الذي تقوم به السلالات الممرضة من البكتريا و منح حرية الحركة عند انتقالها الى منطقة أخرى و منع الياف المضيف من ان تحيط بمنطقة الإصابة البكتيرية (Costa وآخرون، 2013) .

2-3-6-4 أنزيم الحال للدهون Lipase

ينتج انزيم اللايباز Lipase من قبل اغلب سلالات المكورات العنقودية الذهبية التي تكون ممرضة للإنسان، وبعد من الانزيمات الخارج خلوية حيث يقوم بتحليل الدهون الثلاثية Triacylglycerol acylhydrolases وذلك عن طريق كسر و تحطيم اواصر الاستر التي تربط جزيئات الماء و الشحم التي توجد في الدهون الثلاثية مكونة بذلك احماض شحمية حرة Free fatty acids وكليسرول glycerol (Kalyani و Saraswathy، 2014).

وهذا يسهل استعمار المكورات العنقودية الذهبية للغدد الدهنية ويعمل على منع حدوث عملية الابتلاع phagocytosis الاستجابة المناعية التي تظهرها هذه الخلايا ضد المكورات العنقودية وغيرها من البكتريا المرضية المنتجة لهذا الانزيم (Wang وآخرون، 2020).

2-6-3-5 الانزيم الحال للدنا (DNase) Deoxyribonuclease

يعد انتاج هذا الانزيم من الصفات المميزة لهذه البكتريا المرضية وله القدرة على التأثير في تركيب الحامض النووي DNA، ان المكورات العنقودية الذهبية تنتج نوعين من هذا الانزيم، الاول هو DNaseI الذي يكون حساسا للحرارة وهو يحدد امراضية المكورات العنقودية الذهبية، اما الثاني DNaseII فهو المقاوم للحرارة و يعد انتاجه من أهم صفات المكورات العنقودية الذهبية (Rosato، 2009) . وظيفة هذا الانزيم هي تكسير الحامض النووي DNA لخلايا المضيف من خلال التحلل المائي للاصرة الفوسفاتية ثنائية الاستر (phosphodiester bond) التي تربط الوحدات الرئيسية لبناء الحمض النووي DNA وتحويله الى سائل (Brooks وآخرون، 2010) .

2-6-3-6 انزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline Phosphatase

ان جميع سلالات المكورات العنقودية الذهبية تنتج هذا الانزيم الداخلى خلوي ، يستخدم النوع القاعدي منه في كثير من الدراسات لتشخيص هذه البكتريا، والسبب في ذلك هو الترابط الوثيق بين والانزيم المخثر للبلازما وهذا الانزيم حيث يعد دليلا تفريقيا مهما على القدرة الإمراضية لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية لانه يحلل النهايات الفوسفاتية لل DNA (Sohoni وآخرون، 2014).

2-6-3-7 الانزيم الحال للبروتين Proteinase

انزيم البروتينز Protease هو من الانزيمات الخارج خلوية Extracellular enzymes وله القدرة على تحطيم الببتيدات ضد مايكروبية Antimicrobial peptides التي تنتجها خلايا المضيف، وجد بان معظم سلالات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* هي حالة للبروتين وتكون على انواع هي Metallo - Protease ، Serine-Protease و Thiol-Protease ولكل نوع من هذه الأنواع خصائصه وتركيبته المتميزة (Karlsoon، 2001) .

ان من أبرز التأثيرات لانزيم البروتيز Protease من الناحية المرضية أنه يؤدي إلى تحطيم الكلوبولين Globulin المناعي ويمنع نشوء الجسم المضاد من نوع IgG وذلك من خلال تحطيمه للسلاسل الثقيلة أي يؤثر في إنتاجية الاضداد وبهذا يؤثر في الجهاز المناعي ،وهو يلعب دورا في امراضية بكتريا المكورات العنقودية ويساعد البكتريا في عملية الالتصاق بخلايا المضيف (Wang واخرون ،2020) .

2-6-3-8 انزيمات البييتالاكتيميز β -Lactamases

ان هذه الانزيمات تعمل على مهاجمة حلقة البييتالاكتام التي توجد في نواة مضادات السيفالوسبورينات والبنسلينات ليتحول المضاد الى مركب فاقد للفاعلية، ويطلق على المركب الناتج من تكسير السيفالوسبورينات اسم حامض السيفالوسبوريك Cephalosporic acid ،اما المركب المتكون من تكسير البنسلينات فيسمى حامض البنسلويك Pencilloic acid والذي يكون مستقرا اكثر من الاول الذي ينتج مركباً وسطياً غير مستقر (Moriyama واخرون ، 2019).

اشار الباحث Pham واخرون (2019) الى امكانية إنتاج سلالات هذه البكتريا لأربعة انواع من هذه الانزيمات وهي A، B، C، D وذلك بالاعتماد على الاختبارات المصلية حيث امتاز النوع A، C بطاقة تنشيط عالية، في حين وجد بأن الفعالية لطاقة التنشيط كانت واطئة للنوع B ، علما ان البنسلينات والسيفالوسبورينات المقاومة لفعل الانزيم في البكتريا هي من افضل العوامل المحفزة على انتاجه(Khan واخرون ،2018).

2-6-3-9 أنزيم اليوريز Urease enzyme

تحلل البكتريا اليوريا بواسطة انزيم اليوريز الى أمونيا وكاربامات والتي بدورها تتحلل ايضا لنتج ثنائي اوكسيد الكاربون و أمونيا ، تشفر لأنزيم اليوريز جينات واقعة على الكروموسوم البكتيري في حين ان هناك بعض الانواع من البكتريا تحمل الجينات المشفرة لهذا الانزيم على

البلازميد (Lev وآخرون، 2010).

2-6-3-10 أنزيم عامل الانتشار (Hyaluranidase (spreading factor

يدعى أيضا بعامل الانتشار لأنه يعمل على تحليل المادة الأساسية وهي حامض ال hyaluronic acid التي توجد في الانسجة الرابطة وقد وجد بان هذا الانزيم يفرز من قبل السلالات التي تنتج عددا من انزيمات اخرى مثل Protease ، Lipase و DNase ، وتكمن فعالية هذا الانزيم في التقليل من لزوجة حامض Hyaluronic acid ويدمر السكر البروتيني (Proteoglycan) في الانسجة الضامة وذلك ليسهل اختراق الانسجة من قبل البكتريا (Jawetz، 2013).

2-7 المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين MRSA

تقسم المكورات العنقودية الذهبية بشكل عام على نوعين اساسيين هما المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) والمكورات العنقودية الذهبية الحساسة للميثيسيلين (MSSA) تُعد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين MRSA من أكثر انواع البكتريا التي تمتلك مقاومة متعددة للمضادات الحيوية، في عام 1940 تم ادخال البنسلين للاستخدام الطبي وبعد عامين فقط من استخدامه ظهرت مقاومة المكورات العنقودية الذهبية في المستشفيات ثم تلتها المقاومة خارج المستشفيات (Xiao وآخرون، 2018).

توجد عدة أسباب لانتشار بكتريا المكورت العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين MRSA في المجتمعات السكانية والتي من اهمها الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية يأتي بعدها دور الانتخاب الوراثي Genetic Selection حيث تكتسب البكتريا عناصر وراثية خارج كروموسومية Extrachromosomal elements حاوية على جينات مقاومة مثل البلازميدات، الجزر الامراضية الوراثية pathogenic islands والعناصر الوراثية المتنقلة transposable genetic

elements التي تنتقل بين سلالات البكتريا عن طريق انتقال الجينات الأفقي horizontal gene transfer (Hamza وآخرون، 2015).

ان امتلاك هذه البكتريا صفة مقاومة الميثيسيلين هو لامتلاكها جين *mecA* الذي يمثل عنصر وراثي متنقل (mobile genetic element)، وقد وجد بأن جميع أنواع MRSA والتي تحمل جين *mecA* هي مقاومة لمضادات البيبتاكتام اما في الوقت الحاضر فان سلالات *S. aureus* غالبا ما تكون حساسة للميثيسيلين (Shrivastava وآخرون، 2018).

ان العلاج الناجح للمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين يبدأ بالتأكد من وجود جين *mecA* المسؤول عن المقاومة، باستخدام تقنية الـ PCR للكشف الجزيئي، ويمكن استخدام طرق بديلة تستغرق وقت أقل مثل طريقة أنتشار الأقراص التي تُستخدم للمقاومة الظاهرية للسلالات (Gajdacs، 2019).

8-2 الية تأثير مضادات الحياة على البكتريا

Mechanism of the effect of antibiotics on bacteria

هناك عدة اليات تؤثر بها مضادات الحياة على خلايا جسم الانسان ولكي يؤدي المضاد عمله يجب ان يحصل تماس مباشر بين المضاد Antibiotic والموقع الهدف Target Site له داخل الخلية البكتيرية، تقسم مضادات الحياة الى نوعين رئيسيين بالاعتماد على الية عملها وهي:

1- المضادات المثبطة Bacteriostatic : اي ان لها القدرة على تثبيط نمو خلية البكتريا و

بقائها في طور الثبوت Stationary phase و هذه الاليات تشمل :

a. مضادات حياة تعمل على تثبيط عملية صنع الاحماض النووية Inhibition of Nucleic Acid synthesis .

b. مضادات حياة تعمل على تثبيط عملية تكوين الجدار الخلوي Inhibition of cell wall synthesis

c. مضادات العاملة على تثبيط عملية صنع البروتين Inhibition of protein synthesis
اي تثبيط عملية الاستساخ (Transcription) والترجمة (Translation) (Elfeky) وآخرون (2020).

d. مضادات حياة تعمل على تثبيط عمل الغشاء الساييتوبلازمي Inhibition of cell Membran function

2- مضادات الحياة القاتلة للبكتريا Bacteriocidal: أي أن لها القدرة على قتل و تحطيم الخلية البكتيرية المرضية (Kang وآخرون، 2019).

2-8-1 آلية مقاومة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية للمضادات الحيوية

Mechanism of S.aureus resistance to antibiotics

لقد ازدادت وبشكل واضح في السنوات الأخيرة الأخماج المكتسبة في المستشفيات Nosocomial infections مما تسبب عن الإصابة ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية ذات المقاومة المتعددة لمضادات الحياة الذي نشأ عن قدرة البكتريا على الانتشار الواسع والتكاثر وإنتاج عدد من إنزيمات الـ Beta-lactamase مما أدى إلى حدوث إصابات مرضية عديدة تكون مميتة في بعض الأحيان (Marcotte ، 2013).

أن السلالات المعزولة من الأخماج الخطرة تمتلك العديد من عوامل الضراوة مقارنة مع سلالات الحاملين للبكتريا (Carriers) وقد اثبت بأن استعمال المضادات الحيوية في المستشفيات قد أدى إلى ظهور سلالات مقاومة والتي تحمل عادة من قبل الأطباء والممرضين أو المرضى (Hamza وآخرون، 2019).

لقد أظهرت سلالات *S. aureus* المعزولة من الأخماج المختلفة مقاومة ضد البنسلين بنسبة 80% وقد أدى استعمال البنسلينات التي لها القدرة على مقاومة انزيمات البييتالاكتاميز مثل Methicillin و Oxacillin إلى الحد من انتشار *S. aureus* خلال فترة الستينات من القرن الماضي (Goyal وآخرون، 2013) لكن بعد عدة سنوات على استخدام هذه المضادات ظهرت سنة 1975 بكتريا *Staph. aureus* ذات المقاومة للميثيسيلين *Methicillin resistant* *S. aureus* (MRSA) وتميزت بشدة مقاومتها للمضادات الحيوية مثل Clindamycin و Erythromycin و Tetracycline (Indrawattana و Santajit، 2016).

ان العنقوديات الذهبية هي البكتيريا الاولى التي طوّرت مقاومتها ضد البنسلين وذلك في عام 1948 بعد اربعة اعوام من تصنيعه وبيعه ، لذلك تمّ استعمال الميثيسيلين بدلا عن البنسلين لكن ظهور حالات التسمّم في كلى المصابين نتيجة استعمال الميثيسيلين ادى الى استبداله بالأوكساسيلين ، وتعد العنقوديات الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) مسؤولة عن نسبة كبيرة من الوفيات بتسمم الدم (Gajdacs وآخرون، 2019).

ان الفانكوميسين يعد المضادّ الحيوي الوحيد ذا فعالية في هذه الحالات ، لكن بالرغم من ذلك عزلت سلالات من بكتريا العنقوديات الذهبية مقاومة للفانكوميسين في اليابان وعزلت في بعض مستشفيات الولايات المتحدة الأمريكية و بريطانيا وفرنسا لهذا تمّ تطوير صنف جديد من المضادات الحيوية هو Oxazolidin في التسعينيات ومن هذه المضادات هو مضاد Linezolid الذي يمكن مقارنة فعاليته مع مضاد الفانكوميسين ضدّ المكورات العنقوديات الذهبية المقاومة للمثسلين (MRSA) (Abbasi و Zamanzad، 2017).

يمكن القول أن الاصابات البكتيرية المتكررة والمكتسبة من عدوى المستشفيات nosocomial infections وخصوصا الإصابة ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* هي السبب الرئيسي لظهور البكتريا التي تمتلك المقاومة المتعددة لأكثر من مضاد حيوي واحد وهذا بدوره يجعل من الصعب علاج الأشخاص المصابين بها (Bitrus وآخرون، 2018).

إن لبكتريا المكورات العنقودية القدرة على تطوير مقاومة ذاتية ضد صنفين أو أكثر من المضادات وارتباطها أحيانا بالإمراضية الشديدة أو الموت، وهذا يصعب علاج الإصابة الناتجة عنها بالإضافة إلى التكلفة الاقتصادية، بسبب امتلاكها اليات للمقاومة المتعددة لمضادات الحياة MDR (Tariq وآخرون، 2018).

تكون مقاومة المكورات العنقودية الذهبية للمضادات الحياتية على نوعين هما المقاومة الذاتية Intrinsic resistance والمقاومة المكتسبة Acquired resistance وإن القدرة على مقاومة المضادات لهذه البكتريا يعود لوجود جينات بلازميدية لها القدرة على الانتقال (Transmissible) أو تغيير حاجز النفاذية أو امتلاكها لأنظمة دفع للمضادات (Jaran، 2017)، حيث تكتسب البكتريا مقاومتها لمضادات الحياة عن طريق مصادر خارجية مثل انتقال الجينات الأفقي بالاقتران (Conjugation) أو التوصيل (Transduction) أو التحويل (Transformation)، و تنتقل الجينات من السلالة المرضية إلى السلالة غير المرضية، أو قد تحدث طفرات كروموسومية ظهرت نتيجة للاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية تنتج عنها مقاومة عالية للمضادات التي تستخدم في العلاج (Bojang وآخرون، 2019)، تعد المكورات العنقودية الذهبية أول بكتريا قاومت مضاد البنسلين عام 1948، حيث إن بعض السلالات من هذه البكتريا بدأت تقاوم هذا المضاد بفعل قدرتها على إنتاج إنزيمات البيتا لاكتاميز

(β - Lactamase) التي تعطل عمل البنسلين عن طريق كسر اصرة الامايد في حلقة البييتالاكتام الموجودة في البنسلينات لتحولها الى مركبات فاقدة للفعالية ويطلق على المركب الناتج من تحطيمها بـ Penicillonic Acid (Gajdacs، 2019).

هناك اليات عدة تتمكن من خلالها البكتريا مقاومة المضادات الحياتية ،ومن هذه الاليات:

1-إنتاج إنزيمات خارج خلوية Extracellular enzymes كإنزيمات الـ Beta-lactamase التي لها القدرة على جعل المضاد الحيوي غير فعال Inactivation of antibiotics حيث ان وظيفتها عمل تغيرات في بروتينات الجدار الخلوي للخلية البكتيرية وتعمل على إبقاء المضاد الحيوي في المحيط الخارجي او تحويل المضاد الحيوي الحاوي على حلقة البييتالاكتام من الشكل الفعال الى الشكل غير الفعال ، او قد يعمل المضاد على منع تخليق البروتين للبكتريا عن طريق ارتباطه بالموقع P (peptidyl site) من الوحدة الفرعية الرايبوسومية 50S (Bozdogan و Appelbaum، 2004)، او قد تتضمن الية عمل المضاد تثبيط عملية تخليق البروتين في البكتريا من خلال ارتباط المضاد بالوحدة الفرعية الرايبوسومية 30S ومنع انتقال الحمض الريبي الناقل tRNA وبالتالي لن تضاف الاحماض الامينية amino acids الى السلسلة الببتيدية النامية وهذا يوقف نمو البكتريا (Nguyen واخرون، 2014: Trajano واخرون، 2019).

2- استخدام البكتريا مسارات أيضية ثانوية مماثلة للمسارات الأصلية تكون غير متأثرة بالمضاد المستخدم عن طريق زيادة فعالية الايض المقاوم للمضاد (Mccarthy واخرون، 2015).

3- تخلص البكتريا من المضاد الحياتي بقذفه خارج الخلية بالية تسمى نظام الدفع Efflux pump system ، لقد اثبتت الدراسة التي اجريت من قبل Udo و Boswihi (2017) ان سلالات البكتريا المقاومة للميثيسيلين MRSA والمعزولة من الراقدين في المستشفيات قاومت مضاد Chloramphenicol وبنسبة كبيرة ما بين عامي 2012-2015 ،وقد وجد بان هذه

المقاومة ترجع الى فعالية انظمة الدفع Efflux pump التي لها القدرة على طرح المواد مختلفة التركيب الكيميائي الى خارج الخلية البكتيرية وهذا بدوره يمثل المقاومة المتعددة لمضادات الحياة في البكتيريا المرضية (Dinos وآخرون، 2016).

4- قدرة البكتيريا على تكوين الطبقة المخاطية اللزجة والتي تدعى بالغشاء الحيوي Biofilm والتي تمنع المضاد الحيوي من الوصول إليها (Jawetz وآخرون، 2013).

أما المقاومة المكتسبة فتحدث نتيجة لتغيرات في المادة الوراثية للبكتيريا وتكسبها صفة المقاومة لمضادات حياتية معينة، وهي تكون بنوعين:

أ- المقاومة الكروموسومية Chromosomal Resistance

يحصل هذا النوع من المقاومة عند حدوث طفرة وتكون هذه الطفرة ناجمة عن التعرض لجرعات عالية من المضاد الحيوي، أو تغيير في موقع من الكروموسوم الذي يسيطر على حساسية البكتيريا لمضاد حيوي ما يؤدي إلى اكتساب البكتيريا صفة المقاومة للمضاد، أو عن طريق غرس قطع بلازميدية داخل الكروموسوم تسمى Transposons (Bitrus وآخرون، 2018). وقد تتضمن الية المقاومة تعديل الهدف أو حدوث الطفرات في حمض الرنا الريبسي 23S rRNA وقد وجد بان معظم الطفرات المحددة في مختلف الانواع البكتيرية هي طفرات استبدال قاعدة الكوانين G الى اليوراسيل U (Jang، 2016).

ب - المقاومة خارج الكروموسومية Extra Chromosomal Resistance

البلازميدات هي عوامل وراثية خارج كروموسومية تمتلكها البكتيريا وهي مكونة من DNA حلقي ثنائي الخيط له القدرة على التضاعف والتوارث و تكون مقاومة المضاد الناتجة عن بلازميد أخطر من المقاومة عن طريق كروموسوم ،وذلك لإمكانية انتقالها من جنس بكتيري إلى جنس اخر باستخدام إحدى آليات انتقال البلازميدات الحاملة لصفة المقاومة لواحد أو أكثر من

المضادات الحياتية بين البكتريا (Gajdacs، 2019).

2-9 تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR) Polymerase chain Reaction

تعتبر تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR) Polymerase Chain Reaction احد اهم

الاختراعات في مجال الهندسة الوراثية على يد العالم كاري مولس Kary mullis في عام

1983 الذي حصل على جائزة نوبل على اثره في عام 1992، أحدثت تقنية تفاعل المتسلسل ثورة

في مجال البيولوجيا الجزيئية والبحث الطبي. نظراً لاستخدامه على نطاق واسع في مجال الهندسة

الوراثية ، تعتمد هذه التقنية في عملها على تضخيم تسلسل قصير من الحمض النووي DNA او

RNA (قد تكون جين أو قطعة من الجين) الى عدد من المرات بأستخدام أنزيم DNA

polymerase (Jalali وآخرون ، 2017) . لقد اصبح متاحا إعطاء نتائج ذات دقة عالية

وحساسية نوعية باستخدام تقنية PCR التي يتم من خلالها اختصار العديد من الاختبارات

التقليدية والتقنيات التشخيصية والتي منها الكشف عن جينات جينات عوامل الضراوة لمختلف

الانواع البكتيرية (Shahi وآخرون ، 2018) . يتطلب لاجراء هذه الطريقة شريط قالب DNA

الذي يحتوي على التتابع المطلوب تضخيمه والمتكوّن من عدد من النيوكليوتيدات ، زوج من

البودئ primers ترتبطان بأحد أطراف تسلسل جزيئة DNA المراد تضخيمها و بوجود أنزيم

Taq DNA Polymerase (الثابت حرارياً) بالإضافة الى محلول داري يمثل وسطاً لحدوث

التفاعل الذي يحتوي على القواعد النيتروجينية، ويمكن دراسة نوع واحد من الجينات باستخدام

تفاعل البلمرة التسلسلي المفرد Uniplex-PCR او دراسة مجموعة من الجينات سويا من خلال

استخدام تفاعل البلمرة التسلسلي المتعدد Multiplex-PCR (Marin وآخرون ، 2017).

يتم برمجة الجهاز من حيث درجة الحرارة وعدد الدورات والوقت اللازم لكل خطوة لان

البرمجة تختلف حسب الجين قيد الدراسة اي ان من الضروري ضبط ثلاث درجات حرارة في

جهاز PCR، ، ثم يتم الكشف عن نواتج التفاعل بإستعمال طرق معينة منها الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز Gel electrophoresis والذي من خلاله يكشف عن القطع المستهدفة و حجومها بالمقارنة مع دليل حجمي معروف الحجم (DNA ladder)، و تكون عملية الكشف بإستعمال مواد أو صبغات مثل صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide والتي تعطي تألقاً عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية Ultra violet light (Bolivar وآخرون، 2014).

9-2- 1 تفاعل النسخ الكمي (qRT-PCR) Quantitative Real time- PCR

هو تفاعل يستخدم لقياس كمية التعبير الجيني في نطاقات مختلفة من العينات من مصادر مختلفة كالدّم و الأنسجة و البكتريا و النباتات و الحيوانات عن طريق تضخيم ناتج التفاعل للكشف عن تسلسل الجين المستهدف وتحديده في الوقت الفعلي أثناء تصنيعه (Kuang، و آخرون، 2018).

ان من المهم فهم المبادئ العلمية لـ PCR وإمكانات هذه التقنية ومعرفة بروتوكولات مفصلة حول كيفية إجراء تفاعل البوليمر المتسلسل في المختبر ، بما في ذلك تقنيات عزل الحمض النووي الريبي ، وتوليف الحمض النووي الريبي وتحليل البيانات (Yamada، 2021)، وتعد هذه التقنية كواحدة من أكثر الأدوات العملية لتقدير التعبير الجيني المستخدمة حالياً عن طريق الكشف عن الحمض النووي الريبي المراسل mRNA بمستويات تعبير مختلفة باستخدام معالجات حرارية متخصصة يمكنها قياس التعبير الجيني اما في بوائى محددة باستخدام المسبار Taq-Man، او باستخدام معلومات مضيئة في الحمض النووي الريبي DNA كناتج تضخيم تفاعل البلمرة المتسلسل PCR (Lewis, Rice، 2014)، او باستخدام الاصبغ مثل صبغة SyBR-Green (Ruijter، و آخرون، 2013).

يعد رقم الدورة ct هو المقياس الفعلي لتحديد كمية قالب البدء initial template الموجود في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR، حيث يتراكم ناتج التضخيم لانتاج إشارة مضيئة قابلة للاكتشاف تسمى قيمة دورة العتبة threshold cycle، هناك علاقة عكسية بين نموذج البدء في تفاعل qRT-PCR و قيمة ct المقاسة أي انه كلما زاد حجم القالب المستهدف قل عدد الدورات المطلوبة لانتاج حقل قابل للاكتشاف (Ishii، و اخرون، 2014).

3-المواد وطرائق العمل

Materials & Methods

1-3 المواد

1-1-3 Equipments and Instrument والأدوات والأجهزة

استعملت في هذه الدراسة الاجهزة والادوات المبينة في الجدول (1-3).

جدول (1-3) الأجهزة والادوات التي استعملت في الدراسة .

الشركة المصنعة والمنشأ	الأجهزة والأدوات
Brand (Germany)	اسطوانات مدرجة Glass cylinders
AFCO (Jordan)	أطباق بتري بلاستيكية Plastic petridish
AFMA (Jordan)	أعواد خشبية Wood sticks
AFMA (Jordan)	أكواب بلاستيكية بغطاء Plastic cups
Bioneer (Korea)	أنابيب إندروف Appendrof tube
AFCO (Jordan)	انابيب اختبار بلاستيكية Plastic test tubes
Brand (Germany)	انابيب اختبار زجاجية Glass test tubes
Meheco (China)	اوراق ترشيح Filter paper
Hitachi (Japan)	ثلاجة Refrigerator
Helena U.S.A	جهاز البلمرة Termocycler
Biomeriex (France)	جهاز المحلل الآلي Autoanalyzer (Vitek2compact)
Helena (U.S.A)	جهاز ترحيل كهربائي Gel electrophoresis
Stuart (U.K)	جهاز تسخين Hot plate

Herolab (Germany)	Gel documentation	جهاز تصوير الهلام
Labtech (Korea)	Water Distillation	جهاز تقطير
Gillen kamp (England)	Centrifuge	جهاز نبذ مركزي
Memmert (Germany)	Bac T /Alter	جهاز المنبه المايكروبايولوجي
Memmert (Germany)	Incubator	حاضنة
Memmert (Germany)	Shaker water path	حمام مائي هزاز
Brand (Germany)	Glass flasks	دوارق بأحجام مختلفة
Meheco (China)	parafilm	شريط تغليف
Memmert (Germany)	Electric oven	فرن كهربائي
Visio (Korea)	Laminar hood	كابينة السلامة
Brand (Germany)	Glass cylinders	كووس زجاجية
Labtech (Korea)	Vortex	مازج
AFMA (Jordan)	pipette	ماصات
Suporior (Germany)	Pasteur pipette	ماصة باستور
Gallenkamp (England)	Millipore filters	مرشحات دقيقة
AFMA (Jordan)	Swabs without media	مسحات بدون وسط
AFMA (Jordan)	Swabs with media	مسحات مع وسط
Radiometer (Denemark)	PH- meter	مقياس الاس الهيدروجيني
Behring (Germany)	Forcep	ملقط
Herolab (Germany)	Autoclave	مؤسسة
Himedia (fndia)	Loop	ناقل بكتريا

2.1.3: المواد الكيميائية :

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

جدول (2-3) المواد الكيميائية التي استعملت في الدراسة.

الشركة المجهزة	المواد الكيميائية
B.D.H (England)	كلوريد الصوديوم NaCl
Oxiod (England)	بيروكسيد الهيدروجين H ₂ O ₂
U.S.A (Praomega)	حامض الكبريتيك H ₂ SO ₄
B.D.H (England)	البروم الازرق Bromothymol blue
B.D.H (England)	الفا- نفثول α – Nephthol
B.D.H (England)	احمر المثيل Methuyl red
B.D.H (England)	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH ₂ Po ₄
B.D.H (England)	يود (مسحوق) Iodine
B.D.H (England)	كليسيرول Glycerol
B.D.H (England)	اسيتون Acetone
B.D.H (England)	اكاروز Agarose
B.D.H (England)	كحول ايثيلي مطلق Ethanol
Fluka (Switzerland)	بارافين paraffine
B.D.H (England)	هيدروكسيد الصوديوم NaOH
Himedia (India)	يوريا Urea
B.D.H (England)	اثيلين ثنائي الامين رباعي حامض الخليك EDTA
Fluka (Switzerland)	ترس قاعدي Tirs- OH
Sigma (USA)	نشأ starch Fixation

Himedia (India)	Iodin Fixation	مثبت الايودين
Himedia (India)	Yeast extract	خلاصة الخميرة
B.D.H (England)	Glucose	كلوكوز
B.D.H (England)	Maltose	مالتوز
Difco (USA)	Tryptone	تربتون
Biolife (Italy)	Agar Agar	اكار اكار
مصرف الدم / بعقوبة	AB+ Human Blood	دم بشري صنف

3.1.3 : الاوساط الزرعية :

استعملت الاوساط الزرعية المبينة في الجدول (3-3) في عزل وتشخيص البكتريا.

جدول (3-3) الاوساط الزرعية التي استعملت في عزل وتشخيص البكتريا.

الشركة المجهزة والمنسأ	الوسط الزرعي	
Oxoid (England)	Blood agar base	اكار الدم الاساسي
Oxoid (England)	MacConky agar	ماكونكي اكار
Oxoid (England)	Neutrient agar	الاکار المغذي
Oxoid (England)	Neutrient Broth	المرق المغذي
Oxoid (England)	Egg yolk agar	اكار البيض
Himedia (India)	Nitrate broth	مرق النترات
Himedia (India)	Tryptone Soya brot	مرق تربتون الصويا
Himedia (India)	Tryptone Soya agar	اكار تربتون الصويا
Himedia (India)	Brain - Heart agar	وسط نقيع القلب والدماغ

Himedia (India)	Brain - heart infution مرق نقيع القلب والدماغ broth
Oxoid (England)	MR/VP مرق احمر الميثيل فوكس بروس كاور Methyl Red/ Vogas pros kaur broth
Himedia (India)	Simmon citrate agar وسط سايمون – سترات
Himedia (India)	pepton water ماء الببتون
Himedia (India)	Mannitol salt agar اكار المانيتول الملحي
Oxoid (England)	Nutrient Gelatin الجيلاتين المغذي
Oxoid (England)	King A agar اكار الكنك
Difco (USA)	Eosin – Methylene الايوسين الميثيلين الازرق blue agar
Himedia (India)	GelatenManitol salt agar- اكار الجيلاتين الملحي staph
B.D.H (England)	Kligler Iron agar اكار الكلكر
Oxoid (England)	Muller-Hinton agar اكار مولر – هنتون
B.D.H (England)	Urea base agar اكار اليوريا الاساسي

3-1-4 الصبغات المستخدمة :

استعملت الصبغات الموضحة في جدول (3-4) في الدراسة.

جدول (3-4) الصبغات المستخدمة في الدراسة.

المنشأ	اسم الصبغة	ت
CDH (India)	Crystal violet البلور البنفسجي	1
	Iodine Grams ايودين	2
	Safranin سفرانين	3
Himedia (India)	Congo-red احمر الكونكو	4
BDH (England)	Ethidium-Bromide بروميد الاثيديوم	5
Promega (USA)	Quantusflour صبغة التآلق الكمي	6

5.1.3 العدة المختبرية

استعملت العدة المختبرية الوضحة في جدول (3-5) في الدراسة.

جدول (3-5) العدة المختبرية

محتويات العدة	المنشأ	العدة
Go Taq ® Green Master Mix, 2x pH equal to 8.5	Promega (USA)	Master Mix PCR kit
separately: Cell Lysis Solution, Nuclei Lysis Solution, Protein Precipitation Solution, DNA Dehydration Solution and RNase A (4mg/ml).	Promega (USA)	عدة استخلاص الدنا Wizard Genomic DNA Purification Kit
Go Taq ®1-Step qRT-PCR System	Promega (USA)	العدة المستخدمة في تفاعل النسخ الكمي
SV Total RNA Isolation System.	Promega (USA)	عدة استخلاص الرنا RNA
Vitek 2 compact system kit	BioMérieux (France)	عدة جهاز المحلل الالي

6-1-3 المضادات الحيوية:

1-6-1-3 اقراص المضادات الحيوية :

استعملت اقراص المضادات الحيوية المبينة في جدول (6-3) في الدراسة حسب

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI -2018).

جدول (6-3) اقراص المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة

ت	أسم المضاد	الرمز	المنشأ	تركيز المضاد بالقرص µg	اقطار مناطق التثبيط / ملم		
					مقاومة (R)	متوسطة (I)	حساسة (s)
1	Azithromycin	AZT	Bioanalyse (Turkey)	15	≤13	14-17	≥18
2	Ciprofloxacin	CIP	Bioanalyse (Turkey)	5	≤15	16-20	≥21
3	Rifampin	RA	Bioanalyse (Turkey)	5	≤16	17-19	≥20
4	Linezolid	LZ	Bioanalyse (Turkey)	30	≤20	-	≥21
5	Chloramphenicol	C	Bioanalyse (Turkey)	30	≤12	13-17	≥18
6	Penicillin	p	Bioanalyse (Turkey)	10	≤28	-	≥29
7	Gentamicin	GM	Bioanalyse (Turkey)	10	≤12	13-14	≥15
8	Ceftaroline	CPT	Bioanalyse (Turkey)	30	≤20	21-23	≥24
9	Tetracycline	TE	Bioanalyse (Turkey)	30	≤14	15-18	≥19

≤12	13-15	≥16	30	Bioanalyse (Turkey)	DY	Doxycycline	10
≤21	-	≥22	1	Bioanalyse (Turkey)	OX	Oxacillin	11

3-1-6-2 مساحيق المضادات الحيوية

استعملت مساحيق مضادات الحياة الاتية في الدراسة الحالية :

Hary ana (India) 100 mg Gentamicin -1

Pharma International (Jordin) 250 mg Azithromycin -2

3-1-7 Solutions-Indicators and Enzymes المحاليل والكواشف والانزيمات

حضرت في هذه الدراسة العديد من المحاليل والكواشف واستخدمت الموصدة Autoclave لتعقيمها وذلك بدرجة حرارة 121 م وبضغط 15 باوند/انج² لمدة 15 دقيقة ، اما المواد والمحاليل التي تتاثر بالحرارة فقد عقمت باستخدام المرشحات الدقيقة Millipore filters بقطر 0.22 مايكروميتر .

3-1-7-1 Normal physiological saline محلول الملح الفسيولوجي

تم تحضير المحلول بإذابة (0.85) غم من كلوريد الصوديوم NaCl في 90 مل من الماء المقطر واكمل الحجم الى (100) مل ، بعدها عقم بالمؤصدة حيث تم تخفيف عينات العزلات البكتيرية ثم مقارنتها مع محلول ثابت العكورة القياسي MacFarland Standered (Brooks واخرون ، 2010).

3-1-7-2 Gram's stain solutions محاليل صبغة كرام

تم استعمال المحاليل الموصوفة في (Cowan و Steel ، 2004) بعدة تصبغ جاهزة من شركة CDH ذات منشأ هندي (India) والتي تتضمن محلول الايودين ،محلول صبغة البلور

البنفسجي ،الكحول المطلق وصبغة السفرانين ، وذلك لتصبيغ المزارع البكتيرية على الشرائح الزجاجية التي حضرت من لمعرفة الصفات المجهرية وتصنيف البكتريا الى موجبة وسالبة لصبغة كرام .

3-7-1-3 كاشف انزيم التخثر Coagulase

حضر هذا الكاشف باضافة 5مل من ماء مقطر الى قنينة حاوية على كاشف انزيم التخثر المجهزة من شركة (BDH) البريطانية وحفظت في الثلاجة (تبقى صالحة لمدة 15 يوم فقط) ،استعمل الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم Coagulase حيث يتم اخذ 0.5 مل من الانبوبة المخففة ومزجت مع مستعمرة بكتيرية وحضنت بالحاضنة لمدة 1-4 ساعة بدرجة 37م ، وجود التجلط دلالة على ايجابية النتيجة (Geo واخرون ،2007).

3-7-1-4 كاشف انزيم الكاتاليز Catalase reagent

حضر الكاشف بأضافة 1مل H₂O₂ (بيروكسيد الهيدروجين) بتركيز 30 % الى 9 مل من الماء المقطر للحصول على بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% ،حفظ في قنينة داكنة في الثلاجة ،واستخدم لمعرفة قدرة البكتريا على انتاج انزيم الكاتاليز (Collee واخرون ،1996).

3-7-1-5 كاشف انزيم الاوكسيديز Oxidase test reagent

حضر الكاشف انيا بإذابة 1 غم رباعي مثيل برفين ثنائي هيدروكلورايد في 90 مل من الماء المقطر Tetra Methyl-Para-phenylene Diamine dihydrochloride ثم اكمل الحجم الى 100 مل ،استخدم هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا لانتاج انزيم الاوكسيديز (koneman واخرون ،1997).

3-1-7-6: كاشف فوكس بروسكاور Voges proskauer reagent

يتكون الكاشف من :-

1- محلول A (هيدروكسيد البوتاسيوم KOH)

حضر بإذابة 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في 90 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر .

2 - محلول B (كاشف الفا نفثول) :

حضر المحلول بإذابة 5غم من مادة الفا نفثول في 90 مل كحول أثيلي بتركيز 99% واكمل الحجم الى 100 مل من الكحول للحصول على تركيز نهائي 40% (Forbes وآخرون ،2007).

3-1-7-7: كاشف الميثيل الاحمر Methy red reagent

حضر بإذابة 0.1 غم من احمر الميثيل في 300 مل من الكحول الاثيلي بتركيز 95% ثم اكمل الحجم الى 400 مل بأضافة الماء المقطر (MacFaddin ،2000).

3-1-8: فهرس الصفات التحليلية Analytical profile Index(ApI) Staph

وهي جميعاً مجهزة من شركة BioMeriux (Frence) و التي تضم شريط الفحص الحاوي

على عشرين حفرة متكونة من مجموعة من المواد الكيموحيوية،اضافة الى الكواشف التالية :

1-API suspension media 6ml

2-API GP medium

3-VPI +VP2 reagents

4-Nit2+Nit1 reagents

5-Zym A+Zym B reagents

3-1-9 كاسيت لجهاز الفايترك خاص بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام (GP Card)

Vitek2 Compact Cassette

3-1-10 كاسيت لجهاز الفايترك خاص لفحص الحساسية للبكتريا الموجبة لصبغة كرام

AST -P 641Card

3-2 طرائق العمل Methods

1.2.3 التعقيم Sterilization

تم التعقيم كما ورد في Cowan و steel (2004) وذلك حسب طبيعة المادة .

3-1-2-1 التعقيم الرطب (بالمؤصدة) Autoclaving sertilization

تم تعقيم الاوساط السائلة والصلبة والمحاليل الاخرى بالمؤصدة بدرجة حرارة (121) م° وتحت ضغط (15) باوند / انج² لمدة (15) دقيقة .

3-1-2-2 التعقيم بالحرارة الجافة Dry heat serilization

تم تعقيم الادوات الزجاجية التي تم استخدامها في الفرن الكهربائي (Oven) بدرجة حرارة (180) م° ولمدة ساعتين .

3-1-2-3 التعقيم بالترشيح Filtered Strilization

عقمت اليوريا والسكريات والمواد الكيميائية التي تتلف بالحرارة بطريقة الترشيح بالمرشحات الدقيقة (Millipores) ذات القطر 0.45 مايكرومتر .

3-2-2 تحضير الاوساط الزرعية

تم تحضير الاوساط الزرعية التي استخدمت في الدراسة بحسب تعليمات الشركة المصنعة المثبتة على العلب وكما جاء في Forbes وآخرون (2007) ، وضبط الاس الهيدروجيني عند 7 pH= ثم عقمت الاوساط بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط (15 باوند / انج²) لمدة 15

دقيقة بعدها بردت الى 45 م° وصبت في الاطباق ثم حفظت في الثلاجة بدرجة 4 م° لحين الاستعمال. اما الاوساط الزرعية التحضيرية فتم تحضيرها كما يلي :

1-2-2-3: وسط اكار الدم Blood base agar

استخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة لانتاج الهيموليسين Hemolysin، حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة وبعد تعقيمه بالمؤصدة وتبريده الى درجة حرارة (45) م° اضيف اليه دم بشري بتركيز 5% بعدها مزج الوسط بلطف لتلافي تكون الفقاعات الهوائية ثم صب في اطباق معقمة ، ثم حفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال (Koneman وآخرون، 1997).

2-2-2-3: وسط الستافيلوكاينيز Staphylokinase media

حُضر 98 مل من وسط الحليب المقشود Skim-milk و اضيف اليه 2 مل من مصل الدم البشري Serum ليكمل الحجم الى 100 مل وبعد تعقيمه بالمؤصدة صب في اطباق بلاستيكية معقمة ، استعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة بكتريا *Stphylococcus spp.* على انتاج انزيم الستافيلوكاينيز نتيجة استهلاكها للكارائين Casein hydrolytic (MacFaddin، 2000).

3-2-2-3 : وسط البروتيز Protease media

حُضر 75 مل وسط الاكار المغذي Nutrient agar حسب تعليمات الشركة المصنعة وتم اضافة (12.5 مل) من الحليب خالي الدسم Skim milk بعدها اكمل الحجم الى 100 مل ثم صب في اطباق معقمة ، استخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم البروتيز (Brooks وآخرون، 2010).

3-2-2-4 : وسط اكار اليوريا Urea agar

حضر 950 مل من الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة المدونة على العلبة ،وبعد تعقيمه وتبريده الى درجة حرارة 45 مْ اضيف اليه 50 مل من اليوريا وبنسبة 0.1% والتي عقت بالترشيح ، بعدها تم صب الوسط بصورة مائلة Slant في انابيب معقمة وذات اغطية محكمة الغلق (Collee واخرون ، 1996).

3-2-2-5 :وسط أكار صفار البيض Egg-yolk agar

حُضر 85 مل من وسط الاكار المغذي Nutrient agar بعدها اضيف اليه 15 مل من صفار البيض ليكمل الحجم الى 100 مل ثم صب في اطباق بلاستيكية معقمة ،استعمل الوسط للكشف عن قدرة البكتريا قيد الدراسة على انتاج انزيم اللايباز Lipase (Collee واخرون ، 1996) .

3-2-2-6 : وسط اكار احمر الكونكو Congored agar media

حضر الوسط باذابة 37 غم من وسط المرق المغذي Nutrient broth و50غم من السكروز Sucrose مع 10 غم من اكار - الاكار وذلك في 900 مل من الماء المقطر ،عقم الوسط بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121 مْ لمدة 15 دقيقة ، تم تحضير صبغة احمر الكونكو باذابة 0.8 غم من الصبغة في 100 مل من الماء المقطر وعقت ايضا بالمؤصدة ،بعد تبريد الوسط الى درجة حرارة 55 مْ اضيفت اليه الصبغة ومزجت جيدا وتم صبها في اطباق معقمة (Benson، 2002) .

3-3 :الاختبارات الوراثية Molecular tests**3-3-1 : المحاليل الخاصة بالاختبارات الوراثية Solutions of Molecular tests**

حضرت هذه المحاليل حسب ماورد في (Stepheson, 2003):

1- دارئ ترس - حامض الهيدروكلوريك HCl - Tris حضر المحلول بتركيز 2 مولاري وذلك بإذابة 31- 52 غم من الترّس الحامضي في 80 مل من الماء المقطر وتم ضبط الاس الهيدروجيني الى pH= 7.5 وذلك باستخدام حامض HCl المركز واكمل الحجم الى 100 مل وعقم بالمؤصدة.

2- محلول ثنائي امين الاثيلين رباعي حامض الخليك EDTA حضر المحلول بإذابة 0.5 مولاري ، 93.06 غم من مادة EDTA في 400 مل من الماء المقطر ثم ضبط الاس الهيدروجيني pH الى 8 باستخدام هيدروكسيد الصوديوم NaOH 10 عياري واكمل الحجم الى 500 مل من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة .

2-3-3 : المحاليل المستخدمة في عزل الدنا البكتيري

Solutions of Bacterial DNA Isolation

تم استعمال عدة الاستخلاص DNA المجهزة من شركة (Promega,USA) والجدول (5-3) يوضح مكونات عدة الاستخلاص .

3-3-3 : المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis solutions :

حضرت محاليل الترحيل الكهربائي حسب ما جاء في (Sambrook و Russel ، 2001).

1- محلول دارئ الترّس بوريت TBE (Tris Borate EDTA)

حضر المحلول بتركيز (0.089) مولاري من ترّس قاعدي Tris - oH ، 0.089 مولاري من حامض البوريك و 0.002 مولار من مادة EDTA ثم اكمل الحجم الى 1000 مل من الماء المقطر وضبط الاس الهيدروجيني pH الى 8 وعقم بالمؤصدة وحفظ بالتلاجة لحين الاستخدام .

2- صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide

حضر المحلول من إذابة 0.05 غم من صبغة بروميد الاثيديوم في 9 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 10 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 5 ملغم / مل .

3-دائى التحميل Loading Buffer :

حضر المحلول من 50 % TBE ، 0.25 % صبغة بروموفيل الازرق ، 30% كليسيرول ، 20 % ماء مقطر .

3-3-4 : المحاليل المستخدمة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR :

تم استخدام محلول PCR Master mix وهو محضر مسبقاً والمجهز من شركة Promega (USA) company والذي يتألف من :

2x Green Go Taq (Taq DNA Polymerase 0.2 µl)

dNTPs 250 mM

Tris-HCl 10 mM

KCL 30mM

Mg Cl₂ 1.5 Mm

3-3-5 : محاليل البودائى Primers Solutions

تم تحضير المحاليل الخزينة حسب تعليمات شركة Macrogen, Korea المجهزة لها وباستخدام dd H₂O للحصول على تركيز 1000 pmol/ µl ، اما محاليل البودائى بتركيز 10 بيكومول/مايكروليتر ، فقد تم تحضيرها بأخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين لكل بادئ واضافته الى 90 مايكروليتر من dd H₂O ومزجه جيداً وحفظه في الثلج لحين الاستخدام في

حين حفظت المحاليل الخزينة للبواقي في درجة 20- م مع مراعاة مزج المحلول جيداً بعد اخراجه من الثلج باستخدام المازج لمجانسته قبل الاستعمال .

جدول (3-7) تتابعات البواقي وحجم الناتج المتوقع للجينات المشفرة لتكوين الغشاء الحيوي

ت	البواقي	تتابع البواقي 5' - 3'	حجم الجين bp	المصدر
1	<i>ica</i> A-F <i>ica</i> A-R	ACACTTGCTGGCGCAGTCAA TCTGGAACCAACATCCAACA	188	(Olia <i>et al.</i> , 2020)
2	<i>ica</i> B-F <i>ica</i> B-R	TCCTTATGGCTTGATGAATGACG CTAATCTTTTTCATGGAATCCGTCC	190	(Ehterami <i>et al.</i> , 2017)
3	<i>ica</i> C-F <i>ica</i> C-R	ATGGGTATATAACTACGAACGTG CGTGCAAATACCCAAGATAAC	192	(Mirzaee <i>et al.</i> , 2014)

جدول (3-8) تتابعات البواقي وحجم الناتج المتوقع للجينات المشفرة لإنتاج السموم المعوية

ت	البواقي	تتابع البواقي 5' - 3'	حجم الجين bp	المصدر
1	<i>sea</i> -F <i>sea</i> -R	GGTTATCAATGTGCGGGTGG CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	102	(Diab <i>et al.</i> , 2021)
2	<i>seb</i> -F <i>seb</i> -R	GTATGGTGGTGTAAGTACGAGC CCAAATAGTGACGAGTTAGG	164	(Diab <i>et al.</i> , 2021)
3	<i>sec</i> -F <i>sec</i> -R	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG CACACTTTTAGAATCAACCG	451	(Houri <i>et al.</i> , 2020)
4	<i>sed</i> -F <i>sed</i> -R	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG ATTGGTATTTTTTTTCGTTC	278	(Sharma <i>et al.</i> , 2017)
5	<i>see</i> -F <i>see</i> -R	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	209	(Sharma <i>et al.</i> , 2017)

جدول (3-9) تتابع البواديء الخاصة بالجينات المشفرة للذيفانات المحللة لكريات الدم البيض PVL

ت	البادئ	تتابع البادئ 5' - 3'	حجم الجين bp	المصدر
1	<i>luk</i> F-F <i>luk</i> F-R	TGTGCTTCTACTTTCCACCAT TGTGACTGACTTTGCACCA	225	(Hassan et al.,2017)
2	<i>lukS</i> -F <i>lukS</i> -R	GGTCCATCAACAGGAGGTAAT AGGATTGAAACCACTGTGTACT	267	(Hassan et al.,2017)

جدول (3-10) تتابعات البواديء الخاصة بالجينات المشفرة للذيفانات الحالة لكريات الدم الحمراء

ت	البادئ	تتابع البادئ 5' - 3'	حجم الجين bp	المصدر
1	<i>hlb</i> -staph-F <i>hlb</i> -staph-R	GGGGCAATATAAACGCGCTG TGTCGAATCCACAACCGCTT	293	(الناشي والمنصوري، 2017)
2	<i>hlg</i> - staph-F <i>hlg</i> - staph-R	GCC AATCCGTTATTAGAAAATGC CCATAGACGTAGCAACGGAT	937	(Lina et al .,1999)

جدول (3-11)البادئء الخاص بالجين *tst* المشفر لذيغان متلازمة الصدمة السمية

البادئ	تتابع البادئ 5' - 3'	حجم الجين bp	المصدر
<i>tst</i> -1-F <i>tst</i> -1-R	ACCCCTGTTCCCTTATCATC TTTTCAGTATTTGTAACGCC	326	(Yaslianifard et al.,2017)

3-4 تحضير العالق البكتيري

تم تلقيح انابيب اختبار تحتوي كل منها على 5 مل من المحلول الملحي الفسلجي المحضر حسب الفقرة (3-1-7-1) ب 150 مايكروليتر من المزرعة البكتيرية المنمأة على الوسط المنشط لها بعمر 18 ساعة ، مزجت بالمازج وتم مقارنة عكورتها مع عكورة محلول ثابت العكرة وبذلك حضر عالق بكتيري بتركيز تقريبي للخلايا $10^8 \times 1.5$ خلية/مل ، واجراء العد الحي للخلايا في المحلول .

3-5 العزل البكتيري Bacterial isolation

3-5-1 جمع العينات من المرضى Samples collection

جمعت 175 عينة وذلك تحت الاشراف الطبي المختص في مستشفى بعقوبة التعليمي/العيادة الاستشارية في محافظة ديالى، وتضمنت 45 عينة ادرار ، 40 عينة دم ، 30 مسحة من الاذن، 25 مسحة من الانف، 24 مسحة من الحروق بالاضافة إلى 11 عينة قشع .

تم جمع عينات الانف والاذن الوسطى والحروق بواسطة المسحات (Disposable cotton swabs) واستعملت قناني بلاستيكية (Cups) معقمة لجمع عينات القشع و الادرار وانابيب خاصة لجمع عينات الدم ، وذلك بالفترة من بداية شهر نيسان 2018 الى نهاية شهر اب 2018 باعمار مختلفة ومن كلا الجنسين وسجلت المعلومات الخاصة بالمرضى من العمر والجنس ومصدر العزل في استمارات خاصة اعدت لهذا الغرض (ملحق 1)

وتم نقل العينات المأخوذة وزرعت مباشرة على الاوساط الزرعية المناسبة المعدة في المختبر التعليمي في مستشفى بعقوبة العام.

3-5-2 زرع العينات Sample culture

تم زرع العينات التي جمعت على اوساط ، اكار الدم Blood agar ، اكار الجوكليت Chocolate agar و اكار الماكونكي MacConkey agar ، ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 18-24 ساعة بظروف هوائية ولاهوائية، تم مراقبة النمو البكتيري او عدمه وذلك لغرض تشخيص النوع البكتيري.

بالنسبة لعينات الدم فقد تم استخدام جهاز الي وهو المنبه المايكروبايولوجي (Bac T/Alter) الذي استخدم للكشف عن النمو الجرثومي في الدم ، حيث يمكن ادارة البيانات اليا . وبعد مرور فترة الحضانة تظهر النتائج (موجبة / سالبة) من خلال اعطاء الجهاز لاشارات ضوئية لان عمل الجهاز يعتمد على مقياس لالوان الضوء المنعكس واجهزة استشعار لمراقبة انتاج غاز ثنائي اوكسيد الكربون المذاب في وسط النمو ، في حال كان هناك نمو بكتيري في الانابيب يكشف عنه بتغير لون جهاز الاستشعار في الجزء السفلي من الانابيب الى اللون الاصفر ، وللتأكد من نوع البكتريا يمكن زرع عينات الدم على الاوساط الصلبة (الدم ، الماكونكي ، الجوكليت) وبعدها تتقى المستعمرات البكتيرية حسب الصفات المزرعية وظروف الحضانة وتعامل بجهاز المحلل الالي (Vitek-2) (Congestri واخرون ، 2017).

3-6 تشخيص العزلات البكتيرية Identification of bacterial isolates:

شخصت العزلات البكتيرية مبدئياً اعتماداً على ما ورد في Cawon و Steel (2004) ، من خلال ملاحظة الصفات المظهرية مثل ، شكل المستعمرة ولونها ، حجمها ، قوامها ، رائحتها ، العتمة وحافاتهما على وسط أكار الماكونكي و اكار الدم ، بعدها اخضعت العزلات للفحص المجهرى

والتصبيغ بصبغة كرام للتعرف على شكلها وتفاعلها مع صبغة كرام، ومن ثم أجريت عليها الاختبارات الكيموحيوية .

3-6-1 : الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests والكشف المظهري عن عوامل

الضراوة Phynotypic detection of virulence factors

3-6-1-1 اختبار انزيم الكاتاليز Catalase test

اجري هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم الكاتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الى ماء ويتحرر غاز الاوكسجين بشكل فقاعات هوائية ، اذ نقل جزء من المزروع البكتيري بعمر 24 ساعة الى شريحة زجاجية نظيفة اضيفت اليه بضع قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3 % وذلك باستعمال ماصة باستور ، يعد تحرر فقاعات غاز الاوكسجين على سطح الشريحة دليلاً على ايجابية الاختبار (Forbes وآخرون، 2007).

3-6-1-2 اختبار احمر المثيل Methyl red test

تم تلقیح مرق MR-VP بمزروع البكتريا قيد الدراسة بعدها حضنت بدرجة 37 م° لمدة 48 - 72 ساعة واضيف اليها خمس قطرات من كاشف المثيل الاحمر ، ان تغير لون الوسط الى الاحمر هو دليل على ايجابية الاختبار ، تم عمل الاختبار للتحري عن قدرة البكتريا لانتاج الاحماض العضوية في الوسط نتيجة لتخمير سكر الكلوكوز (Macfaddin، 2000).

3-6-1-3 اختبار فوكس بروسكاور Voges-Proskaur test

لقح مرق MR/ VP بمزروع البكتريا الفتية قيد الدراسة وحضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، وبعد ذلك نقل 1 مل من العالق البكتيري الى انبوبة اختبار معقمة واضيف اليها

كاشف باريت Barritts' reagent المكون من محلول الفانثول (كاشف A) 6 قطرات ومحلول هيدروكسيد البوتاسيوم 40 % (كاشف B) باضافة 2 قطرة منه مع رج الانبوبة بلطف ،استعمل الفحص للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج مركب استيل مثيل كاربينول(اسيتون) كنتيجة لتخميرها سكر الكلوكوز إذ تعد النتيجة موجبة عند تغير لون الوسط الى الاحمر بعد 10-15 دقيقة (Alexander و Sterte ،2001).

3- 4-1-6 اختبار تخمر السكريات Sugers Fermentation test .

استعمل هذا الاختبار لمعرفة قابلية البكتريا على تخمير السكريات مثل الكلوكوز والسكروز بتركيز 1% والمضافة الى وسط ماء الببتون مع الفينول الاحمر ، حيث لقحت الانابيب بالمزروع البكتيري الفتى وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م وعدت النتيجة موجبة بتغير لون الوسط من اللون الاحمر الى الاصفر وهو دلالة على تخمر السكر (Forbes،2007)

3- 5-1-6 اختبار انتاج انزيم تجلط البلازما Coagulase test

ان هذا الاختبار تم بطريقتين :

A-طريقة الشريحة Slide coagulase method

يعد وجود انزيم مخثر البلازما صفة مهمة لتشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية ،اجري الفحص بوضع قطرة من المحلول الملحي الفسيولوجي على شريحة زجاجية نظيفة ثم نقل اليها مستعمرة من البكتريا قيد الدراسة ومزجت جيدا بصورة دائرية ،اضيف اليها قطرة من كاشف البلازما ،عدت النتيجة موجبة بحدوث التجلط خلال 15 ثانية وذلك من خلال تكون خثرة الفايبرين (Qin واخرون ،2017).

B- طريقة الانابيب Tubes coagulase test

تم تلقيح الانبوب الخاص بالفحص بالمستعمرة قيد الدراسة بعدها حضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 1-4 ساعة ،عددت النتيجة موجبة بحدوث التجلط وهو دلالة على انتاج البكتريا للانزيم في حين تركت باقي الانابيب بدرجة حرارة الغرفة الى اليوم التالي لان بعض السلالات تنتج الانزيم ببطء (MacFaddin،2000).

6-1-6-3 اختبار تحلل اليوريا Urea hydrolysis test

تم استخدام الوسط للتحري عن قابلية البكتريا قيد الدراسة على قدرتها لانتاج انزيم اليوريبيز الذي يحلل اليوريا الى امونيا وثنائي اوكسيد الكاربون ،حيث خطت الانابيب الحاوية على وسط اكار اليوريا بالمزارع البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24-48 ساعة ، ان تغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي يدل على ايجابية الاختبار (Levinsoon ، 2014).

7-1-6-3 اختبار النمو على وسط المانيتول الملحي

Growth on Manitol salt agar test

يعد هذا الوسط وسطاً انتخابياً لعزل بكتريا *S.aureus* ، خطت الاطباق الحاوية على اكار المانيتول الملحي بالبكتريا وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24-48 ساعة. تعد النتيجة موجبة بظهور هالة حول النمو البكتيري وهذا يدل على قابلية البكتريا على تخمير سكر المانيتول ، (Forbes واخرون ، 2007) .

8-1-6-3 اختبار تمييع الجيلاتين Gelatin hyolrolysis test

اجري هذا الاختبار للتحري عن قدرة البكتريا لانتاج انزيم الجيلاتينيز Gelatinase ، حيث لقحت الانابيب الحاوية على اكار الجيلاتين بالمزروع البكتيري قيد الدراسة بطريقة الطعن بعدها حضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة اسبوع الى شهر ، وتم الكشف عن حدوث تمييع الجيلاتين

بوضع الانابيب بعد فترة الحضانة في الثلاجة عند درجة حرارة 4 م° لمدة نصف ساعة ، وان بقاء التميع يشير الى قدرة البكتريا لانتاج انزيم الجيلاتينيز (Brooks وآخرون ، 2010) .

3-6-1-9 اختبار اختزال النترات Nitrate reduction test

لقح مرق وسط النترات بالمزروع البكتيري الفتى ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 م° لمدة أربعة ايام ، اضيف بعدها 1 مل من كاشف α -naphthylamine و 1 مل من كاشف sulphanil amide ، ويعد الاختبار موجباً بتحول لون الوسط الى اللون الوردي بعد 1-2 دقيقة . واجري هذا الاختبار لمعرفة قدرة العزلات البكتيرية قيد الدراسة على انتاج انزيم nitrate reductase الذي يحول النترات الى نترت (MacFaddin، 2000).

3-6-1-10 اختبار انتاج انزيم اللايباز والليستينيز

Lipase and Lecithinase production test

استخدم الفحص للتحري عن قدرة البكتريا لانتاج انزيم اللايباز والليستينيز وهو من الاختبارات المشتركة المهمة ،حيث لقح وسط اكار البيض بالمزروع البكتيري الفتى وحضنت الاطباق لمدة 24-48 ساعة بدرجة حرارة 37 م° ،استدل على انتاج انزيم الليستينيز بتكون منطقة شفافة حول المستعمرات البكتيرية النامية .بعدها تم غمر الطبق بمحلول كبريتات النحاس CuSO_4 لمدة 20 دقيقة وجفف الطبق بوضعه في الحاضنة بعد ازالة المحلول ولمدة 30 دقيقة ،تم التحري عن انتاج انزيم اللايباز المحلل للدهون بظهور اللون الازرق المخضر في مناطق نمو البكتريا (Colle وآخرون ، 1996).

3-6-1-11 اختبار انتاج الهيموليسين Hemolysin production test

تم تخطيط المزروع البكتيري الفتى على وسط اكار الدم وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، تم ملاحظة نوع التحلل (الفا - بيتا - كاما) على وسط اكار الدم، اذا تسببت العزلات البكتيرية المنتجة للهيموليسين بتحلل كامل لكريات الدم الحمراء فهو من نوع بيتا ، اما العزلات البكتيرية المنتجة للهيموليسين من نوع الفا فأنها تحلل جزئيا كريات الدم والنوع كاما تكون العزلات البكتيرية المنتجة له غير حالة لكريات الدم (Benson، 2002) .

3-6-1-12 اختبار انتاج الستافيلوكاينيز Staphylokinase Production test

تم تلقيح بكتريا *Staphylococcus* على وسط Staphylokinase ،بعدها حُضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ،وعدت النتيجة موجبة بحدوث تحلل حول مستعمرات البكتيريا النامية (Sohoni واخرون ، 2014)

3-6-1-13 اختبار انتاج البروتيز Protease Production test

لقح وسط اكار الحليب المقشود Skimmed milk agar بالمستعمرات البكتيرية قيد الدراسة بعمل حفر دائرية منتظمة وحقن العالق البكتيري فيها، بعدها حضنت الاطباق في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، عد ظهور هالة شفافة حول الحفر دليل على ايجابية الاختبار (Brown واخرون، 2005).

3-6-1-14 اختبار انتاج الانزيم الحال للدنا DNase production test

لقح وسط اكار الدنا DNase agar بالمستعمرة البكتيرية الفتية على شكل حلقات صغيرة للحصول على غزارة في النمو بحيث يكون قطر الدائرة 5-10 ملليمتر ، حضنت الاطباق في 37 م° لمدة 24 ساعة ثم اضيف اليها 1مليلتر من حامض الهيدروكلوريك المخفف بتركيز

3.6%، عدت النتيجة موجبة بظهور هالة شفافة حول المستعمرة البكتيرية بعد عدة دقائق (Brooks وآخرون ، 2010) .

3-6-1-15 اختبار مقاومة النوفايوسين Novobiocin Resistance test :

لقد العالق البكتيري بعد مقارنته مع محلول ماكفرلاند 0.5 على وسط مولر هنتون، وتم وضع اقراص النوفايوسين بتركيز 30 مايكروغرام / قرص تعد بكتريا *S. aureus* حساسة لهذا المضاد (MacFaddin ، 2000).

3-6-2 تشخيص البكتريا حسب نظام Analytic prolife Index (Apl 20-Staph)

تم استخدام هذا النظام الذي يكون بشكل شريط من البلاستيك يحوي 20 حفرة فيها مجموعة من الانزيمات والسكريات الجافة المعدة لغرض الاختبارات الكيموحيوية بالاعتماد على التصنيف الوارد في Schleifer و Kloos (1975).

A - طريقة تحضير الشريط Preparation of strip

تم وضع الماء المقطر بمقدار 5 مليلترات داخل الحفر Grooves على طول حافة الشريط وذلك لتوفير الظروف الرطبة داخلها .

B - طريقة تحضير العالق البكتيري Preparation of inoculums

لقدت مستعمرة نقية فتية من وسط اكار الدم في انبوبة تحتوي على 3 مليلترات من وسط Api Staph medium وتم مزجها جيدا بعدها قورنت مع عكورة انبوبة السيطرة ماكفرلاند MacFarland control tube (0.5) .

C- طريقة تلقيح الشريط Inoculation of strip

1- ملئ الجزء السفلي للأنابيب الصغيرة Microtubes بالعالق البكتيري بواسطة ماصة باستور .

2-ملأت الانابيب الصغيرة Microtubes الحاوية على URE ، ADH، واكملت الحفر بزيت البارافين الخاص بالنظام وذلك لتوفير ظروف نمو لاهوائية ، تم بعدها اغلاق الحاوية بغطائها الخاص وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .

D - كيفية قراءة الشريط Reading of the strip

تم كتابة النتائج التي استحصل عليها على شكل نموذج رقمي Numerical profile حيث تم توزيع الاختبارات على شكل مجاميع لكل منها ثلاثة اختيارات يؤشر لها بارقام ، وبعد اعطاء الرقم الذي يطابق التفاعل الموجب لكل منها تم الحصول على انموذج للاختبارات العشرين في الشريط مكون من 7 ارقام تقارن مع Analytical profile index وبذلك يتم معرفة النوع البكتيري من خلال الرقم المذكور .

3-6-3 تشخيص البكتريا بجهاز Vitek 2 Compact

استعمل جهاز Vitek 2 او ما يسمى بجهاز المحلل الالي (Autoanalyzer) للتشخيص التأكيدي للعزلات وذلك باستخدام GPI card (ملحق 4) ، ان هذه البطاقة صممت لتشخيص الانواع الكروية والمسبحية الموجبة لصبغة كرام ، إذ تحتوي هذه البطاقة على 64 فحصا لتفاعلات انزيمية وبايوكيميائية وتستغرق نتيجة الفحص حوالي 8 ساعات تقريبا ، هذا التشخيص يعتمد على الاختبارات المختلفة لقياس استهلاك مصادر الكربون والفعالية الانزيمية الخاصة بالنوع البكتيري .

3-6-3-1 خطوات تلقح بطاقة GP : GP ID (Card)

تم اتباع الخطوات التالية لتلقيح بطاقة GP:

1- تم زرع البكتريا على وسط اكار الدم وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .

2- تم سحب البطاقة من غلافها وسجلت رقم النماذج على السجل الخاص بالجهاز .

- 3- حضر عالق من المستعمرات البكتيرية النقية في 3 مليلتر من المحلول الملحي الفسيولوجي في انابيب اختبار بلاستيكية شفافة معقمة موضوعة على الحامل الخاص بالجهاز .
- 4- تم فحص العالق البكتيري المراد تشخيصه بواسطة جهاز العكورة الخاصة بجهاز Vitek 2 (Density check TM) بحيث تكون عكورة العالق مساوية الى (0.50 – 0.63) .
- 5- نُقلت البطاقة المتصلة بوحدة انبوب النقل (Card / transfer unit) المحمولة على حامل الانابيب والمرتبطة بها انبوبة النقل بحيث ان الجزء الشعري مغمر في انبوبة الاختبار يدوياً .
- 6- تم نقل الحامل الى داخل الجزء المخصص له وذلك لتلقيح البطاقات والذي يسمى Vacuum Chamber ، ان قطع قناة التوصيل يتم اليا من قبل الجهاز خلال مدة 10 - 15 دقيقة ، بعدها تم نقل البطاقات الى داخل Incubator لغرض الحضان بدرجة حرارة $(1.0 \pm 35.5)^\circ \text{C}$.
- 7- ان عمل النظام البصري للجهاز يتم عن طريق اسقاط عدد من الحزم الضوئية باتجاه البطاقة للتعرف على الاطوال الموجية للتفاعلات وترجمتها من خلال العكورة والتغيرات اللونية بالاضافة الى النواتج الايضية .
- 8- لاجراء فحص الحساسية للمضادات الحياتية تم سحب بطاقة (AST-P640) عن طريق انبوب نقل شعري Transfer tube ، نقل 280 مايكروليتر من العالق البكتيري الى انبوبة تحتوي 3 مل من المحلول الفسيولوجي ومزج جيداً بجهاز (Vortex) وتم غمر الانبوب الرمادي اللون داخل الانبوب الحاوي على العالق البكتيري الذي تم تخفيفه.
- 9- تم ادخال البيانات الخاصة بالشخص المريض (الاسم ، الرقم ،الردهة ،النموذج المرسل) و خزنت بجهاز الحاسوب ، ثم اخذ رقم باركود الكارد GP card والباركود AST-P640 .

10- تم نقل الحامل الحاوي على البطاقتين الى جهاز المحلل الالي الذي يتكون من غرفتين ،الاولى chamber vacuum والتي يتم فيها تلقيح بطاقات العالق البكتيري AST-P640 ، GP card بعدها يتم قطع الانبوب ،وينقل الحامل الحاوي على البطاقات الى الغرفة الثانية (Incubator) وتحضن بدرجة حرارة 35.5 م° ، يقوم الجهاز بعد ذلك بسحب البطاقات تلقائيا ويسحب الحامل الفارغ يدويا .

11- تظهر نتائج الختبارات في الجهاز بشكل + ، - ، (+) ، (-) والنتيجة بين الاقواس تشير الى ان الاختبار ضعيف .

12- تقرأ النتيجة بعد 8 ساعات ويتم طبع تقرير التشخيص للبكتريا وحساسيتها للمضادات الحياتية حسب تعليمات الشركة المصنعة (Biomerieux, 2013).

7-3 الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي Detection of biofilm formation

استخدمت في هذه الدراسة ثلاثة طرق للكشف عن تكوين الغشاء الحيوي وهي كالآتي:

7-3-1 الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي باستخدام وسط احمر الكونكو الصلب

Biofilm Production Detection by congo red agar

تم اختبار قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي بهذه الطريقة ، وذلك من خلال نقل مستعمرة مفردة نقية الى انبوبة اختبار حاوية 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسيولوجي و مقارنة العكورة مع عكورة انبوبة ماكفرلاند (0.5) ، ثم زرعت على وسط احمر الكونغو الصلب الحاوي على 0.8 g/L صبغة احمر الكونكو Congo red dye و 36 g/L من السكر Saccharose بطريقة التخطيط حُضنت الاطباق بعدها بدرجة حرارة 37 م° لمدة (24) ساعة ، عدت النتيجة موجبة عند ظهور مستعمرات سوداء اللون ذات كثافة بلورية جافة ، و تكون النتيجة سالبة عند ظهور مستعمرات حمراء (Abbasi و Zamanzad ، 2017).

3-7-2 الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الانابيب

Biofilm Production detection by tube method

تم اتباع الخطوات التالية حسب ماجاء في (Neopane وآخرون، 2018) :

1- تم تلقيح الانابيب الحاوية على 10 مل من مرق تربتون الصويا بالبكتريا قيد الدراسة ثم حضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م .

2- افرغت الانابيب من الوسط ثم اضيف اليها 10 مل من محلول صبغة البلور البنفسجي Crystal violet وتركت لعدة دقائق .

3- افرغت الانابيب من محلول الصبغة وتم غسلها بالمحلول الملحي الفسيولوجي برفق ثم قلبت على قطعة شاش نظيفة وتركت لتجف في درجة حرارة الغرفة .

4- عدت النتيجة موجبة عند تصبغ جدران الانابيب باللون البنفسجي .

3-7-3 الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي بطريقة صفيحة المعايرة الدقيقة

Biofilm production detection by Microtiter plate method

تم اتباع الخطوات الاتية في هذه الطريقة حسب ما جاء في (Torlak وآخرون 2017: Foster وآخرون، 2020) :

1- خطط المزروع البكتيري قيد الدراسة على وسط اكار تربتون الصويا Trypticase Soy agar ثم وضعت الاطباق في الحاضنة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37°م .

2- نقل 180 مايكروليتر من وسط مرق تربتون الصويا Trypticase Soy broth يحوي على

1% من الكلوكوز Glucose بواسطة ماصة دقيقة الى حفر صفيحة المعايرة Microtiter plate wells والتي عددها 96 حفرة .

- 3- اضيف 20 مايكروليتر من العالق البكتيري قيد الدراسة بعد مقارنة العكورة مع محلول ثابت العكورة القياسي ماكفرلاند (0.5) الى كل حفرة ،وعمل ثلاثة مكررات لكل عذلة مع ترك الحفر على اليمين كحفر سيطرة تحوي الوسط فقط دون تلقيح .
- 4- وضع غطاء الصفيحة cover الخاص بها ثم حضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.
- 5-بعد انتهاء فترة الحضان ازيل غطاء الصفيحة، غسلت الحفر ثلاث مرات بمحلول منظم Phosphate buffered saline لازالة الخلايا الغير ملتصقة .
- 6- تم تثبيت الخلايا الملتصقة باضافة الايثانول 95 % لمدة 20 دقيقة، بعدها اضيفت صبغة البلور البنفسجي Crystal violet بتركيز 0.1 الى الحفر وتركت لمدة 15 دقيقة .
- 7- غسلت الحفر بالماء المقطر لازالة الصبغة المتبقية ثم قلبت الصفيحة على قطعة شاش نظيفة وتركت لتجف .
- 8- اضيف 200 مايكروليتر من كحول الايثانول بتركيز 95 % للحفر لمدة 10 دقائق ثم قرأت الكثافة البصرية Optical Density (OD) بجهاز قارئ صفيحة المعايرة Microtiter-plate reader على الطول الموجي 630 نانوميتر .
- 9- تم قياس الامتصاصية و وقورنت مع قيمة السيطرة السالبة (ODc) من كل القراءات وقسمت العزلات حسب انتاجها للطبقة اللزجة حسب الامتصاصية إلى قوية Strong، متوسطة Moderate، وحسب المعادلات الاتية كما جاء في (Olia وآخرون، 2020) :

$$OD \leq ODc \text{ غير مكونة (Non) } OD \leq 0.08324$$

$$ODc < OD \leq 2 \times ODc \text{ ضعيف (weak) } OD \leq 0.16648$$

$$ODc < OD \leq 4 \times ODc \text{ متوسط (Moderate) } OD \leq 0.33296$$

$$OD > 0.33296 \text{ قوي (Strong) } 4 \times ODc < OD$$

3-8 فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotics Sensitivity test

- استعملت طريقة Kerby و Bauer القياسية لاختبارات الحساسية للمضادات الحياتية حيث استعمل وسط اكار مولر هنتون Mueller Hinton agar (MHA) حسب تعليمات الشركة المصنعة ،وبعد تبريده الى درجة 50 °م صب في اطباق بتري معقمة ، وبعد التأكد من تصلب الوسط وعدم تلوثه ،تم استخدام طريقة نشر الاقراص ووفق ماجاء في CLSI (2018) وكما يلي :
- 1-لحق 5 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي في انبوبة اختبار ب 2-3 مستعمرة من مزارع بكتيرية نقية بعمر 24 ساعة منماة على وسط اكار الدم المغذي باستخدام الناقل Loop .
 - 2- رجت الانابيب جيداً وقيست عكورة النمو بعكورة المحلول ثابت العكرة القياسي 0.5 بحيث يعطي عددا للخلايا البكتيرية تقريبا 1.5×10^8 خلية /مل وحضنت بالحاضنة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة.
 - 3- نقل 100 مايكروليتر من العالق البكتيري بواسطة الماصة الدقيقة Micropipette وتم نشره على وسط اكار مولر هنتون باستخدام قطيلة Swab بصورة متجانسة وترك طبق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق لحين جفاف المزروع .
 - 4- نقلت اقراص المضادات الحيوية الى الوسط بواسطة ملقط معقم بمعدل 4 - 5 اقراص لكل طبق .
 - 5- حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، وبعدها تم قياس اقطار مناطق التنشيط حول كل قرص وقورنت مع الجداول القياسية الواردة في (CLSI a, 2018) وعدت البكتريا حساسة S أو مقاومة R أو متوسطة I حسب هذه المواصفات.

Minimal-Inhibitory Concentration

3-9 تحديد التركيز المثبط الأدنى

التركيز المثبط الأدنى هو أقل تركيز من المضاد الذي يثبط النمو المرئي للبكتيريا، إذ تم اتباع هذه الطريقة كخطوة أولية في دراسة التعبير الجيني Gene expretion للجينات المكونة للغشاء الحيوي لبكتريا *S.aureus* وهي *ica A*, *ica B*, *ica C* باتباع طريقة التخفيف المتسلسلة المتضاعفة Double dilution method في وسط مولر هنتون الصلب وذلك بتحضير سلسلة تخفيف من المضادات الحيوية ما بين (0.5 - 1024 مايكروغرام/مل) بالنسبة لمضاد الازثرومايسين والجنتاميسين ، باستخدام مخزون المضاد الحيوي (Stock Solution) بتركيز نهائي مقداره (1 %) لكل مضاد والمحضر بأذابة 1 غم من المضاد في 90 مل من الماء المقطر بعدها اكمل الحجم الى 100 مل (Ridway, Stock ،1987). اجريت الخطوات حسب ما جاء في (Liu وآخرون ،2019) وكما يأتي :-

1- تم تحضير تراكيز متسلسلة متضاعفة تراوحت ما بين (0.5-1024) مايكروغرام / مل من مضادات الحياة (الازثرومايسين و الجنتاميسين) باضافة نسب مختلفة من المحاليل الخزنية (Stock Solution) لتلك المضادات الى وسط مولر-هنتون الصلب المعقم والمبرد الى درجة حرارة 45 م° .

2- بعد اضافة المضاد رجت الانابيب جيدا، وصبت في اطباق معقمة وحفظت بدرجة حرارة 4 م° في الثلاجة لحين الاستعمال والتي يجب استخدامها خلال 24-48 ساعة .

3- حضرت التخفيف العشرية لمزارع البكتريا باستعمال المحلول الملحي الفسيولوجي المعقم .

4- تم سحب 5 مايكروليتر من التخفيف 10^{-2} اعلاه بواسطة ماصة دقيقة ولقحت به اوساط مضادات الحياة .

- 5- كررت العملية للمزارع قيد الدراسة بالتسلسل بعمل مكررين لكل تركيز، وتركت الاطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة قبل قلب الاطباق ، وقد اعتمد اقل تركيز يمنع ظهور النمو البكتيري بعد عملية الحضان على انه التركيز المثبط الادنى.
- 6- تم مقارنة النتائج مع نقطة التوقف (Break point) وتمثل اقل تركيز يمكن ان يصله المضاد في المصل ليعطي اعلى فعالية وبعده يصبح مقاوماً وبالا اعتماد على (CLSI b)، (2018).

10-3 حفظ وإدامة العزلات البكتيرية Preservation of bacterial isolates

1-10-3 الحفظ قصير الامد Short time Perservation

زرعت مستعمرة واحدة من العزلة البكتيرية بعد تشخيصها على وسط الاكار المغذي وحضنت 37 م لمدة 24 ساعة ولفت الاطباق بشريط (Para film) باحكام وحفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م لمدة عدة اسابيع .

2-10-3 الحفظ متوسط الامد Medium Time Preservation

خطت العزلات البكتيرية على وسط الاكار المغذي المائل slant Nutrient وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ثم وضعت في الثلاجة عند درجة حرارة 4 م لمدة شهر وتم ادامة العزلات دورياً كل شهر .

3-10-3 الحفظ طويل الامد Long Time Preservation

لقحت العزلات البكتيرية في انابيب حاوية على المرق المغذي مضاف اليه الكليسيروول بتركيز 15% وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة ثم حفظت بدرجة حرارة - 20 م لأشهر (12 - 18) شهراً .

3-11 الكشف الجزيئي عن جينات عوامل الضراوة

3-11-1 استخلاص الدنا البكتيري Bacterial DNA extraction

تم عزل الدنا البكتيري حسب تعليمات عدة الاستخلاص المجهزة من شركة ABIO pure

(USA) والموضحة مكوناته في جدول (3-5) وكالاتي :-

- 1- نقل 1 مل من مزروع العزلات البكتيرية بعمر 24 ساعة الى انابيب أبندروف 1.5 مل.
- 2- طردت الانابيب مركزياً لمدة 2 دقيقة بسرعة 13000 دورة / دقيقة ، بعدها اهمل الطافي.
- 3- بعد اضافة اللايسوزايم Lysozyme اضيف 100 مايكروليتر من محلول يحضر آنياً الى الانابيب ومزجت جيداً بواسطة المازج (Vortex) .
- 4- حضنت الانابيب داخل حمام مائي Water bath لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 م مع مراعاة قلب الانابيب ثلاث مرات كل ثلاث دقائق.
- 5- اضيف 20 مايكروليتر من انزيم Proteinase K الى كل انبوبة ومزج بواسطة المازج بعدها حضنت بدرجة 56 م لمدة 30 دقيقة .
- 6- اضيف الايثانول المطلق ethanol الى العينات بمقدار 200 مايكروليتر ومزج بالمازج.
- 7- تم وضع عمود mini column في انبوبة الجمع سعة 2 مل ونقل له جميع الخليط .
- 8- طردت الانابيب مركزياً لمدة دقيقة بسرعة 6000xg دورة / دقيقة بعد ذلك نقلت المحتويات الى انبوبة جمع جديدة .
- 9- اضيف 600 مايكروليتر من دارئ BW الى عمود mini column ثم طردت الانابيب مركزياً لدقيقة واحدة بسرعة 6000xg دورة / دقيقة.
- 10- اضيف 700 مايكروليتر من محلول منظم TW وتم اعادة عمود mini column الى انبوبة الجمع .

11- نبذت الانابيب بسرعة 13000xg > لمدة دقيقة واحدة وذلك لازالة محلول الغسل ثم وضعت في انابيب سعة 1.5 مل .

12- تم اضافة 100 مل من محلول منظم AE وحضنت لمدة دقيقة بدرجة حرارة الغرفة .

13- نبذت الانابيب لمدة 5 دقائق بسرعة 5000 دورة /دقيقة ويحتفظ بالراشح وبذلك يتم الحصول على الDNA.

3-11-2 : الترحيل الكهربائي في الهلام Gel Electro Phoresis

اجري الترحيل الكهربائي للدنا البكتيري المستخلص حسب ما ورد في (Russell

و Sambrook، 2001) باستعمال المحاليل المحضرة في الفقرة (3-3-3) وكما يلي:

1- اذيب 0.7 غم من الاكاروز في 100 مل من داري TBE وسخن الى درجة الغليان وترك الهلام ليبرد لتصل درجة الحرارة الى 45م°، ثم اضيف 5 مايكروليتر من محلول صبغة بروميد الاثيديوم بتركيز 5 مايكروغرام /مل وتم مزجه جيداً .

2- اعدت صفيحة اسناد الاكاروز (Tray) وذلك باحاطة حافتي القالب بالشريط اللاصق جيداً وثبت مشط (Comb) لتكوين الحفر (Wells) على بعد واحد سنتيمتر من احدى حافتي القالب لتهيئتها لتحميل العينات ، ثم صب الهلام داخل القالب الموضوع في وضع افقي وبشكل هادىء لتجنب حدوث فقاعات، وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ،ثم رفع المشط والشريط اللاصق برفق ووضع القالب داخل حوض الترحيل الكهربائي الحاوي على حجم ملائم لتغطية الهلام من داري TBE.

3- تم تحميل عينات الدنا في حفر الهلام باستخدام ماصة دقيقة Micropipatte بعد مزج 3

مايكروليتر من داري التحميل Loading Buffer مع 10 مايكروليتر من محلول الدنا .

4- رحلت كهربائيا تحت فرق جهد قدره 100 فولت / سم ولمدة 45 دقيقة حتى تصل العينات الى ما قبل نهاية الهلام واخيرا تم نقل القالب لفحص الهلام باستخدام مصدر للأشعة فوق البنفسجية بجهاز UV-Transilluminator بطول موجي مقداره 320 نانومتر بعدها صور بالكاميرا.

3-11-3 قياس تركيز الدنا ونقاوته

Estimation of DNA concentration and purity

قيس تركيز الدنا عن طريق تخفيف العينة باضافة 495 مايكروليتر من الماء المقطر الى 5 مايكروليتر من الدنا المستخلص وقرأت الامتصاصية باستخدام الأشعة فوق البنفسجية بجهاز spectrophotometer الذي يستخدم لقياس الكثافة الضوئية (O.D) عند طوليين موجيين 280 (، 260) نانوميتر (الناشي والمنصوري، 2017)

3-11-4 تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

تم فحص العزلات التابعة لبكتريا *S.aureus* للكشف عن وجود باستعمال تقنية الـ PCR واتباع الخطوات التالية:

1- حضر خليط التفاعل الرئيسي (Master mix) وذلك باضافة مكونات الخليط في انبوب

معقمة كما في الجدول (3-12). ومزجت المكونات بواسطة ماصة زجاجية particle

pipette وذلك بسحبها عدة مرات ثم وضعت في جهاز النبذ المركزي لمدة 10 ثواني.

2- وزع الخليط على 8 أنابيب معقمة حجمها 0.5 مل ومعلمة بحسب العينات المراد دراستها

وبواقع 15 µl من الخليط لكل انبوبة واتباع الخطوات الاتية:-

3- اضيف 5 µl من قالب الدنا لكل عينة في الانبوب المخصصة لها، ووزع الـ Mastermix

على الانابيب قبل نقل الـ DNA لتجنب التلوث.

4- استعمل جهاز الطرد المركزي لمدة 15 ثانية لجمع القطرات الملتصقة بجدار انبوب الطرد

المركزي وانزلها الى اسفل الانبوب للحفاظ على الحجم النهائي لخليط التفاعل والبالغ 20

μl.

3-11-5 برمجة جهاز تفاعل البلمرة (PCR) The cyclig program

تم اجراء خطوات التضاعف للتحري عن جينات عوامل الضراوة في بكتريا *S.aureus*

بحسب ما جاء في (Mohammed وآخرون، 2018) وتمت برمجة جهاز PCR كما موضح في

الجدول (3-13) و (3-14) .

جدول (3-12) حجم مكونات خليط التفاعل الرئيسي اللازم لاجراء تفاعل PCR

اسم الجين المستهدف	حجم الخليط الرئيسي	F primer 10 pmol	R primer 10 pmol	N.F.W	حجم وتركيز القالب	الحجم النهائي
<i>ica A</i>	10 μl*	1 μl	1 μl	6 μl	2 μl (40ng)	20 μl
<i>ica B</i>	10 μl*	1 μl	1 μl	6 μl	2 μl (40ng)	20 μl
<i>ica C</i>	10 μl*	1 μl	1 μl	6 μl	2 μl (40ng)	20 μl
<i>hlg</i>	10 μl*	1 μl	1 μl	6 μl	2 μl (40ng)	20 μl
<i>hly</i>	10 μl*	1 μl	1 μl	6 μl	2 μl (40ng)	20 μl
<i>luk -S</i>	10 μl*	1 μl	1 μl	6 μl	2 μl (40ng)	20 μl
<i>luk- F</i>	10 μl*	1 μl	1 μl	6 μl	2 μl (40ng)	20 μl
<i>tst</i>	10 μl*	1 μl	1 μl	6 μl	2 μl (40ng)	20 μl

جدول (3-13) برمجة جهاز PCR – Uniplex

Hold	Final extention	Elongation	Annealing	Denaturation	Initial denaturation	اسم الجين	نوع التفاعل
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	58°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	hlb	Uniplex PCR
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	55°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	hlg	
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	55°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	tst	
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	52°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	luk-S	
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	50°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	luk-F	
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	55°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	icaA	
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	52°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	ica B	
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	55°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	ica C	
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		

ثانية : sec

دقيقة: min

جدول (14-3) برمجة جهاز Multiplex-PCR

Hold	Final extention	Elongation	Annealing	Denaturation	Initial denaturation	اسم الجين	نوع التفاعل
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	58°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	sea	Multiplex PCR
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	58°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	seb	
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	58°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	sec	
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	58°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	sed	
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		
4°C/10 min	72°C/7 min	72°C/30 sec	58°C/30 sec	95°C/30 sec	95°C/5 min	see	
One cycle	One cycle	30 cycle	30 cycle	30 cycle	One cycle		

ثانية : sec

دقيقة : min

12-3 الكشف عن التعبير الجيني للجينات المشفرة لإنتاج الغشاء الحيوي *ica A*, *ica B*,*ica C* في عزلات بكتريا *S.aureus* باستخدام تقنية تفاعل النسخ الكمي qRT-PCRDetection of *ica A*, *ica B*, *ica C* Genes Expression of *S.aureus* Isolates by Using One-step qRT-PCR1-12-3 زرع بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* Culturing of

تم زرع البكتريا بإتباع الخطوات الآتية: -

- 1- نقل 1 مليلتر من البكتريا المزروعة في المرق المغذي Nutrient Broth لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م الى انبوبة الطرد المركزي 1.5 مايكروليتر .
- 2- طردت الانابيب مركزيا عند 13000 دورة/دقيقة لمدة 2 دقيقة لترسيب الخلايا، بعدها يتم التخلص من الطافي.
- 3- إضافة كاشف Trizol (0.75 مل) الى الانبوبة و تسحب و تدفع عدة مرات بالماصة الدقيقة لضمان مجانسة العينة.

2-12-3 استخراج الحمض النووي الريبي Extraction of RNA

تم استخراج ال RNA لبكتريا *S.aureus* باستخدام عدة الاستخلاص kit extraction المجهزة من شركة (promega,USA) و بإتباع الخطوات الآتية: -

1- فصل الحمض النووي الريبي RNA separation

- a- حضنت الانابيب التي تم تحضيرها في الخطوة السابقة لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة للسماح بتفكك بروتين الحمض النووي الرايبي.
- b- إضافة الكلوروفورم Chloroform (0.2 مل) الى الانبوبة و تمت تغطيتها باحكام.
- c- رجت الانبوبة يدوياً بقوة لمدة 15 ثانية و حضنت لمدة 3 دقائق بدرجة حرارة الغرفة.
- d- نبذت الانابيب بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة.
- e- تم نقل الجزء الطافي السائل من العينة الى انبوبة جديدة.

2- ترسيب الحمض النووي الريبي RNA Precipitation

- a- تمت إضافة 0.5 مل من كحول الايزوبروبانول Isopropanol المطلق الى الانابيب.
- b- حضنت الانابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق، ثم نبذت مركزياً لمدة 10 دقائق بسرعة 12000 دورة/دقيقة.

c- تم التخلص من الطافي.

3- غسل الحمض النووي الرايبي RNA wash

a- بعد إزالة الطافي غسل الراسب بكحول الايثانول (0.5 مل) بتركيز 75%.

b- رج الخليط جيدا بجهاز المازج Vortex، ثم نبذت الانابيب بسرعة 12000 دروة/دقيقة لمدة 5 دقائق، و تم التخلص من الطافي.

c- تترك حبيبات الحمض النووي الرايبي RNA لتجف في الهواء لمدة 10 دقائق.

4- إعادة تعليق الحمض النووي الرايبي Resuspension of RNA

a- تم إعادة تعليق دقائق ال RNA في 20-50 مايكروليتر من الماء خالي RNase بواسطة الماصة الدقيقة لعدة مرات.

b- حضنت الانابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 55°م لمدة 10 دقائق، خزنت الانابيب بدرجة حرارة 20-°م لحين الاستخدام.

3-12-3 تفاعل النسخ الكمي qRT-PCR بخطوة واحدة

تم حساب و تحليل مستويات التعبير الجيني للجينات قيد الدراسة اعتمادا على تركيز mRNA، بعدها تحويلها الى cDNA تم اجراء جميع العمليات بما في ذلك تنقية الحمض النووي الرايبي RNA، و استخدم تفاعل النسخ الكمي qRT-PCR للكشف عن التعبير الجيني للجينات *ica A*, *ica B*, *ica C* في المكورات العنقودية الذهبية المعزولة باتباع الخطوات التالية:-

3-12-3 قياس تركيز الحمض النووي الرايبى RNA

تم استخدام مقياس الطيف الكمي Quantas Florometer لقياس تركيز RNA cDNA , للكشف عن جودة العينات، بإضافة 199 مايكروليتر من الصبغة المذابة Quanty flour dye لكل 1 مايكروليتر من الحمض النووي الرايبى RNA، يرج الخليط جيدا و يحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق في مكان مظلم، بعدها تقاس قيم تركيز الحمض النووي الرايبى RNA.

3-12-3 انتقاء البودى Primers Select

تم تحديد البادئات اللازمة لتفاعل النسخ الكمي التي يتم من خلالها الكشف عن التعبير الجيني للجينات *ica A*, *ica B*, *ica C* و الجين المحافظ (house keeping gene) 16S rRNA لبكتريا *S. aureus*، جميع تتابعات البادئات مذكورة في الجدول (3-15)، تم تجهيز البادئات اللازمة للدراسة من قبل شركة (promega,USA) و حضرت بالاعتماد على خطوات تحضير البودى.

جدول (3-15) تتابعات البودى المستخدمة في تفاعل النسخ الكمي q RT-PCR

اسم البادى ء	تسلسل القواعد	درجة الحرارة للاستطالة (°C)
16S RNA-F	5- GGTCTTGCTGTCACTTATAGATGG -3`	60
16S RNA-R	5`- CGGAAGATTCCTACTGCTG -3`	
<i>ica A</i> -F	5`-ACACTTGCTGGCGCAGTCAA-3`	55
<i>ica A</i> -R	5`-TCTGGAACCAACATCCAACA-3`	
<i>ica B</i> -F	5`-TCCTTATGGCTTGATGAATGACG-3`	52
<i>ica B</i> -R	5`-CTAATCTTTTCATGGAATCCGTCC-3`	
<i>ica C</i> -F	5`-ATGGGTTATAACTACGAACGTG-3`	55
<i>ica C</i> -R	5`CGTGCAAATACCCAAGATAAC-3`	

3-3-12-3 خليط التفاعل الرئيسي للنسخ الكمي qRT-PCR Master Mix

تم اختيار خليط التفاعل الرئيسي للنسخ الكمي للكشف عن التعبير الجيني للجينات *ica*

A, ica B, ica C في بكتريا *S.aureus* و مكوناته موضحة في الجدول (3-16).

جدول (3-16) مكونات خليط التفاعل الرئيسي Master mix المستخدمة للكشف عن التعبير

الجيني للجينات *ica A, ica B, ica C* في عزلات بكتريا *S.aureus*

Master mix components	Stock	Unit	Final	Unit	Volume		
					1 Sample	30.1	Samples
qPCR Master Mix	2	X	1	X	5	150.3	
RT mix	50	X	1	x	0.25	7.5	
MgCl ₂					0.25	7.5	
Forward primer	10	μM	1	μM	0.5	15.0	
Reverse primer	10	μM	1	μM	0.5	15.0	
Nuclease Free Water					1.5	45.1	
RNA		ng/μl		ng/μl	2		
Total volume					10		
Aliquot per single rxn	8μl of Master mix per tube and add 2μl of Template						

3-3-12-4 برمجة جهاز تفاعل النسخ الكمي qRT-PCR Program

تم برمجة جهاز تفاعل النسخ الكمي qRT-PCR للكشف عن التعبير الجيني للجينات

ica A, ica B, ica C في بكتريا *S.aureus* كما هو موضح في الجدول (3-17).

جدول (3-17) برمجة جهاز تفاعل النسخ الكمي q RT-PCR

الدورات	الزمن ث:د	درجة الحرارة °C	المرحلة
1	15:00	37	RT. Enzyme Activation
	05:00	95	Initial Denaturation
40	00:20	95	Denaturation
	00:20	52, 55, 60	Annealing
	00:20	72	Extension

د:دقائق ث:ثواني

3-14-3-5 طريقة دورة العتبة Delta Delta Ct Method

تعد طريقة $\Delta\Delta Ct$ من أبسط الطرق، لحساب قيم التعبير الجيني حيث انها طريقة مباشرة لمقارنة قيم دورة العتبة threshold cycle ct بين الجين المستهدف و الجين المرجعي، و تتضمن قياس كمي نسبي لعينة المعايرة (الغير معاملة) بدرجة الحرارة المثلى 37°م و مقارنتها بالعينة المعاملة حيث يتم حساب التعبير الجيني للجين المستهدف الغير معامل و مقارنته مع الجين المستهدف المعامل حسب ما جاء في (Schmittgen و Livak، 2008)، كما هو موضح في المعادلة التالية:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}})_{\text{sample}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}})_{\text{calibrator}}$$

$$\text{Folding} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Treated}} - \Delta Ct_{\text{Control}}$$

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{House Keeping gene}}$$

3-15 التحليل الاحصائي Statistical Analysis

تم التحليل الاحصائي في هذه الدراسة باستخدام برنامج SPSS و استخرجت النتائج من خلال تحليل مربع كاي chi-square و تم تحديد الفروق المعنوية p value عند مستوى دلالة <0.05 , <0.01 .

4 النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-4 العزل والتشخيص Isolation and Identification

1-1-4 العزل Isolation

شملت هذه الدراسة 175 مريضاً بأعمار مختلفة ومن كلا الجنسين حيث تم اخذ 45 عينة ادرار، 40 عينة دم، 30 مسحة من الاذن، 25 مسحة من الانف، 24 مسحة من الحروق و11 عينة قشع، كلها جمعت في العيادة الاستشارية /مستشفى بعقوبة التعليمي من بداية شهر نيسان 2018 الى نهاية شهر اب 2018. بينت النتائج الزرعية والفحوصات المختبرية للعينات تشخيص 141 عزلة بكتيرية وبانواع مختلفة ، اظهرت 40 عينة وبنسبة 22.85% نمواً سالباً للزرع البكتيري و135 عينة وبنسبة 77.14% نمواً موجباً للزرع البكتيري، وقد كانت بكتريا *Staphylococcus aureus* اعلى نسبة للبكتريا المعزولة ،حيث بلغ العدد الكلي لها 55 عزلة وبنسبة 39%.

2-1-4 الكشف عن بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثسيلين MRSA والحساسية

للمثسيلين MSSA

تم اختبار حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* لمضاد Oxacillin فكانت 21 عزلة بنسبة 38.18 % مقاومة للمثسيلين MRSA و 34 عزلة بنسبة 61.81 % حساسة للمضاد MSSA كما مبين في الجدول (1-4) .

جدول (1-4) مقاومة وحساسية عزلات بكتريا *S. aureus* لمضاد Oxacillin

النسبة المئوية %	عدد العزلات	نوع البكتريا
38.18	21	MRSA
61.81	34	MSSA
100	55	المجموع

MRSA: بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثبيلين

MSSA: بكتريا المكورات العنقودية الذهبية الحساسة للمثبيلين

ان نتائج دراستنا كانت مختلفة عن النتائج التي حصل عليها Ghasemian وآخرون

(2016) حيث كانت نسبة عزل المكورات العنقودية المقاومة للمثبيلين MRSA 19% ، ولم

تتفق مع دراسة Dagi وآخرون (2015) حيث كانت نسبة عزل بكتريا MRSA من الانف 2.9

% اما نسبة بكتريا MSSA فكانت 97.1 % ، اما في دراسة اخرى اجراها Ahmadrajabi

وآخرون (2017) فقد كانت نسبة عزل بكتريا MRSA من مصادر سريرية مختلفة 44% ، وفي

دراسة اخرى اجراها الباحث Al-Kafaji (2018) فان نسبة عزل MRSA من محافظة النجف

الاشرف قد كانت مرتفعة حيث سجلت دراسته 70% من البكتريا المعزولة ، قد يعزى اختلاف نسبة

عزل البكتريا الى اختلاف منطقة العزل من المصاب ، المنطقة الجغرافية والبيئة ووجود عوامل

الضراوة (Ugwa وآخرون، 2015).

2-4- Identification

تم تشخيص البكتريا المعزولة من مصادر سريرية مختلفة اعتمادا على صفاتها المظهرية على الاوساط الزرعية من خلال تحديد شكل وحجم المستعمرات وصفاتها المجهرية وتلونها بصبغة كرام ،وبالاعتماد على نتائج الاختبارات الكيموحيوية وكما يلي ذكره .

1-2-4 Cultural Characterization التشخيص الزراعي

تم تشخيص العزلات البكتيرية التابعة لجنس *Staphylococcus aureus* بالاعتماد على الصفات الزرعية بعد ان نميت على وسط آكار الدم Blood agar في ظروف هوائية بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة، فظهرت مستعمرات كبيرة إلى متوسطة الحجم حيث تراوح قطرها بين 1-3 ملم وذات حافات منتظمة لمساء ولماعة، ، محدبة السطح ، ومعتمة ، محاطة بمنطقة تحلل شفافة وهو يتفق مع (Morello وآخرون، 2006) .

تم نقل العزلات البكتيرية الى وسط المانيتول الملحي Mannitol salt agar الحاوي على 7.5 % NaCl وذلك للكشف عن بكتريا *S. aureus* التي لها القدرة على تحمل التركيز الملحي العالي وهي التي تغير لون الوسط من اللون الوردي الى اللون الأصفر الذهبي نتيجة تخمر سكر المانيتول ووجود كاشف الفينول الاحمر وهذا ما يميزها عن الأنواع الاخرى، أما العزلات التي لا تؤثر على لون الوسط وغير مخمرة لسكر المانيتول فأنها تعود الى *S.epidermidis* اوانواع أخرى من العنقوديات (Murray وآخرون، 2007).

2-2-4 التشخيص المجهرى Microscopical Characterization

تم تشخيص العزلات البكتيرية بالاعتماد على الصفات المجهرية من حيث شكل الخلايا، وطريقة تجمعها وتلونها بصبغة كرام وترتيبها ، أظهر الفحص المجهرى بعد التصبغ خلايا كروية الشكل ذات ترتيب عنقودي يشبه عنقود العنب Grape like shape وموجبة لصبغة كرام، وهذا يتفق مع ما ذكر في (Al-Khafaji، 2018) .

3-2-4 الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية

Biochemical Tests of *S. aureus*

بالنسبة للفحوصات الكيموحيوية لعزلات البكتريا النامية فقد أخضعت جميع العزلات لفحص الكاتاليز Catalase و كان لجميع العزلات القدرة على انتاج الانزيم وتحطيم مركب بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 (3 %) حيث ظهرت النتيجة الموجبة على شكل فقاعات غازية نتيجة تحويل المركب إلى ماء وغاز الأوكسجين وهو فحص تفريقي بين *Staphylococcus* sp. الموجبة له وبين *Streptococcus* sp. التي تكون سالبة لهذا الفحص، كما أعطت العزلات جميعها نتائج موجبة لفحص تخثر البلازما Coagulase والذي يعد فحص تفريقي بين *S. aureus* التي تكون موجبة للفحص وبين *S. epidermidis* السالبة له، فضلاً عن ذلك أعطت جميع العزلات نتائج موجبة لاختبار فوكاس- بروسكاور واختبار المثل الأحمر بينما كانت النتائج سالبة لفحص الاندول وفحص الأوكسيديز (Forbes وآخرون، 2007) كما موضحة في جدول (2-4) .

جدول (4-2) نتائج الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *Staphylococcus aureus*

النتيجة	الاختبار
(+) مكونة للفقاعات	اختبار الكاتاليز
(+) مخمرة للمانيتول	اختبار تخمر المانيتول
(+) نامية على الوسط	اختبار النمو على وسط المانيتول
(+) مكونة للتخثر	اختبار تخثر البلازما Coagulase
(-) غير منتجة للاوكسيديز	اختبار الاوكسيديز
(-) غير منتجة للاندول	اختبار الاندول
(+) مختزلة للنترات	اختبار اختزال النترات
(+)	اختبار فوكاس-بروسكاور
(+)	اختبار المثلث الاحمر

-: النتيجة سالبة

+: النتيجة موجبة

4-2-4 تشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية باستخدام نظام API 20 Staph

system

تم استخدام نظام API 20 Staph وذلك لغرض تأكيد نتائج الاختبارات السابقة الذكر

والذي يتضمن شريط حاوي على مجموعة من الانزيمات والسكريات اللازمة لاجراء الاختبارات

المختلفة والتفاعلات الكيموحيوية ، ويعتمد النظام على التصنيف الذي وضعه العالمان Kloos و

Schleifer (1975) ، حيث اظهرت النتائج تطابقا كاملا مع نتائج الفحوصات الكيموحيوية المتبعة

مسبقا في التشخيص التقليدي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* بعد تحويل نتائج

التفاعلات الى ارقام فسرت من خلال الجدول المجهز مع النظام Analytical Profile Index

كما هو موضح في ملحق (2 و 3).

5-2-4 تشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* بجهاز المحلل الالي

VITEK 2

تم اجراء الفحص التأكيدي للتشخيص الدقيق لجميع عزلات بكتريا *S. aureus* قيد الدراسة

وذلك باستخدام جهاز VITEK 2 Compact والجهاز يعطي نتائج تشخيصية تصل دقتها إلى

99 % وكما هو مبين في الجدول (3-4) وملحق رقم (5) .

جدول (4- 3) نتائج الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص بكتريا *S. aureus* في جهاز

VITEK 2 Compact

<i>S. aureus</i>	نوع الاختبار	<i>S. aureus</i>	نوع الاختبار
+	PoLyB	-	Amy+---
+	dGAL	-	PIPLC
+	dRIB	-	DxyL
+	ILATK	+	ADH1
-	LAC	+	BGLU
+	dMAL	-	APPA
-	BACL	-	CDEX

-	NoVo	-	ASPA
+	NC6.5	-	BGAR
+	dMAN	-	AMAN
+	dMNE	+	PHOS
+	MBdG	+	LeuA
-	PuL	-	ProA
-	dRAF	-	BGuRr
+	OI29R	-	AGAL
-	SAL	+	PyrA
+	SAC	-	BguR
+	dTRE	-	AlaA
-	ADH ₂ S	-	TyrA
+	OPTO	-	DsoR
		-	URE

النتيجة الموجبة: + النتيجة السالبة: -

وبعد اكمال الفحص تم التأكد من تشخيص العزلات التي تعود الى بكتريا *S. aureus*

بالاعتماد على الفحوصات المبينة في ملحق رقم(4).

4-3 توزيع الإصابة ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية حسب الجنس

لقد اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان عدد الاصابات في الاناث فاقت عدد اصابات الذكور اذ بلغت 31 إصابة ونسبة 56.36%، اما عدد اصابات الذكور فقد كانت 24 إصابة ونسبة 43.64% جدول (4-4)، اتفقت هذه النتيجة دراسة الباحثة عبد الله (2018) التي اجرته على بكتريا المكورات العنقودية *S. aureus* المعزولة من اخماج الدمامل حيث بلغت نسبة العزل عند الإناث 58.49% اما في الذكور فقد بلغت 41.51%، لكنها لم تتفق مع النتائج التي حصل عليها Ugwu (2016) حيث كانت نسبة الذكور 76.6% اما نسبة عزلها من الاناث فقد كانت 68.6%، ولم تتفق ايضا مع النتائج التي جاء بها الباحث Al-Zoubi (2015) حيث كانت النسبة الاقل للعزل عند النساء وهي 43% بينما نسبة عزل البكتريا في الذكور هي 57%، لقد اعزيت اسباب اختلاف نسب العزل في الدراسة الحالية وبين الدراسات الاخرى الى وجود عوامل عديدة كالحالة الفسلجية والنفسية للانسان ونوع الغذاء والتركيب الجيني وقد يعزى الى عدم تساوي حجم العينات من جهة واختلاف اوقات جمعها ومواقع عزلها من جهة اخرى (Joshua وآخرون، 2017).

جدول (4-4) اعداد والنسبة المئوية لبكتريا *S.aureus* حسب الجنس

النسبة المئوية %	العدد	الجنس
43.64	24	الذكور
56.36	31	الاناث
100	55	المجموع

4-4 توزيع بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* المقاومة للميثيسيلين و الحساسية

للميثيسيلين حسب مصدر العينة

Distribution of *S.aureus* (MRSA and MSSA) according to sample source

كان توزيع المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* بين العينات السريرية مختلفاً حسب المصدر و نسبة العزل، كما هو موضح في الجدول (4-5).

اوضحت النتائج بان من 55 عزلة لبكتريا *S.aureus* كانت نسبة عزل هذه البكتريا من الاذن ear (23.63%) 13، منها 7 عزلات و بنسبة (12.72%) كانت حساسة للميثيسيلين MSSA و 6 عزلات بنسبة (10.9) MRSA، لم تتوافق نسبة العزل هذه مع دراسة Tadesse و اخرون (2018) والتي كانت (6.3%) لبكتريا *S.aureus* المعزولة من الاذن.

بالنسبة لبكتريا *S.aureus* المعزولة من الدم Blood فقد كانت نسبة العزل (21.81) % 12، كان منها (16.36%) 9 MSSA و (5.45%) 3 MRSA ، و هي اقل من نسبة عزل بكتريا MRSA لدى Hassan و اخرون (2017) والتي كانت (5.6%).

اشارت نتائج الدراسة الحالية الى ان نسبة عزل بكتريا *S.aureus* من الانف nasal كانت (18.18%) 10 و التي كان (12.72%) 7 منها MSSA و (5.45%) 3 MRSA، جاءت هذه النتيجة مقارنة لنسبة عزل بكتريا *S.aureus* من العاملين في مجال الرعاية الصحية في مستشفيات اربيل حيث كانت (8.5%) (Dogramachi, 2018).

عدد عزلات بكتريا *S.aureus* المعزولة من الادرار urine كان 9 عزلات و بنسبة (16.36%)، منها 4 عزلات MSSA و بنسبة (7.27%) و 5 عزلات بنسبة (9.09%) MRSA، اما في دراسة

اجراها الباحث Odoki و اخرون (2019) فكانت نسبة عزل بكتريا *S. aureus* من نفس المصدر (31.41%) و هي اعلى من النسبة التي حصلنا عليها في الدراسة الحالية.

كانت نسبة عزل بكتريا *S. aureus* من القشع sputum 6 (10.90%) ، نسبة العزل لكل من MSSA و MRSA هي (5.45%)3، في دراسة اجرها الباحث Ghasemian و اخرون (2016) كانت نسبة عزل بكتريا *S. aureus* من القشع فقط (3%).

جدول (4-5) العدد والنسبة المئوية لبكتريا MRSA و MSSA حسب مصدر العينة

المجموع		MSSA		MRSA		مصدر العينة
%	no	%	no	%	no	
16.36	9	7.27	4	9.09	5	الادرار
21.81	12	16.36	9	5.45	3	الدم
23.63	13	12.72	7	10.9	6	الاذن
18.18	10	12.72	7	5.45	3	الانف
9.09	5	7.27	4	1.81	1	الحروق
10.90	6	5.45	3	5.45	3	القشع
100	55	61.82	34	38.18	21	المجموع

MRSA: بكتريا *S. aureus* المقاومة للميثيسيلين. MSSA: بكتريا *S. aureus* الحساسة

للميثيسيلين. no: عدد العزلات. %: النسبة المئوية

اقل نسبة عزل لبكتريا *S. aureus* قد كانت من الحروق Burns حيث سجلت عزلة واحدة (1.81%) لبكتريا MRSA و 4 عزلات بنسبة (7.27 %) لبكتريا MSSA، في حين تبقى اصابات الحروق من المشاكل الصحية الكبيرة من حيث طول فترة المعالجة من جهة و كثرة نسب

الوفيات في مختلف بلدان العالم من جهة أخرى (Forson وآخرون، 2017)، حيث أكد الباحث Mama وآخرون (2016) أن بإمكان بكتريا *S.aureus* المرور خلال نسيج الجلد بسهولة عند الإصابة بالحروق والجروح لأنها ببساطة من النبيت الطبيعي على سطح الجلد و تمتلك العديد من عوامل الضراوة التي تسهل عملية الاختراق ، لذلك فإن المضاعفات الناتجة عن التهاب الحروق تكون خطيرة جدا ومميتة مما يدعو لعلاجها انيا وبشكل مركز .

4-5 اختبار حساسية بكتريا *S.aureus* لمضادات الحياة

Antibiotics sensitivity test of *S.aureus*

تم اختبار مقاومة و حساسية عزلات بكتريا *S.aureus* قيد الدراسة لتأثير 10 مضادات حياتية من مجاميع مختلفة و التي تضمنت مضادات الامينوكلايكوسيدية Aminoglycosides (مضاد الجنتاميسين Gentamicin) ، مضادات الماكروليد Macrolides (مضاد الازثرومايسين Azithromycin)، مضادات البيتا لاکتام β -lactam (مضاد البنسلين penicillin، مضاد السيفتارولين Ceftaroline)، مضادات التتراسايكليينات Tetracyclines (مضاد التتراسايكلين Tetracycline، مضاد الدوكسيسايكلين Doxycycline)، مضادات الكوينولونات Quinolones (مضاد السبروفلوكساسين Ciprofloxacin)، مضادات الفينيكول Phenicol (مضاد الكلورامفينيكول Chloramphenicol)، مضادات الاوكزازوليدات Oxazolidinones (مضاد اللينزوليد Linezolid) و مضادات الانسامايسين Ansamycins (مضاد الريفامبسين Rifampicin).

حددت حساسية بكتريا *S.aureus* للمضادات الحياتية بالاعتماد على قياس قطر منطقة

التثبيط و مقارنتها مع ما ورد في (CLSI, 2018).

4-5-1 اختبار حساسية بكتريا MRSA للمضادات الحيوية MRSA antibiotics susceptibility test

بينت نتائج الدراسة الحالية ان جميع عزلات بكتريا MRSA قد اظهرت مقاومة بنسبة 100% لمضاد penicillin كما هو مبين في جدول (4-6)، و هي لم تتفق مع النتائج التي حصل عليها الباحث Das و اخرون (2019) حيث سجل نسبة مقاومة 93%، و هي غير مطابقة لنسبة المقاومة التي سجلتها دراسة الباحث Al-kafaji (2018) و التي كانت 90%، من جهة اخرى تقاربت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة اخرى في نسبة المقاومة لنفس البكتريا و نفس المضاد و التي بلغت 97% (Eftekhar و اخرون، 2017).

ابدت عزلات بكتريا MRSA مقاومة بنسبة 47% لمضاد Ceftaroline، و جاءت هذه النتيجة مقارنة لنتائج الباحث Lee و اخرون (2018) حيث كانت نسبة المقاومة 44%.

كانت نسبة مقاومة بكتريا MRSA لمضاد الجنتاميسين Gentamicin 100%، بينما انخفضت نسبة المقاومة هذه في بكتريا MRSA في دراسة اجراها الباحث Hassan و اخرون (2017) حيث بلغت 54.5%، ولم تختلف نسبة المقاومة كثيراً عن نسبة الدراسة السابقة الذكر حيث كانت 56.66% في دراسة Ghasemian و اخرون (2016).

اظهرت النتائج ان نسبة مقاومة البكتريا قيد الدراسة لمضاد Azithromycin قد بلغت 100% في بكتريا MRSA هذا يتفق مع ما توصل اليه الباحث Al-kafaji (2018) حيث كانت 100% ايضا لنفس البكتريا.

اشارت نتائج الدراسة الحالية الى ان نسبة المقاومة لمضاد Tetracycline بلغت 71.42% في بكتريا MRSA ، و هي اكبر من نسبة المقاومة لبكتريا *S.aureus* التي سجلها

الباحث Neopane و اخرون (2018) حيث كانت 10% فقط، في دراسة اخرى تم عزل بكتريا *S. aureus* من الدم و الجروح بلغت نسبة المقاومة لمضاد Tetracycline 58.4% (Ghasemian، و اخرون، 2015).

جدول (4-6) مقاومة بكتريا MRSA لمضادات الحياة

Antibiotics	MRSA	
	no	%
Pencillin (P)	21	100
Gentamicin(GM)	21	100
Azithromycin(AZT)	21	100
Tetracycline(TE)	15	71.42
Ciprofloxacin(CIP)	10	47.61
Ceftaroline(CPT)	10	47.61
Rifampin(RA)	6	28.57
Chloramphenicol(C)	6	28.57
Doxycycline(DY)	5	23.80
Linezolid(LZ0)	0	0
Total	21	100

MRSA:المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثسلين

لقد بلغت نسبة المقاومة لمضاد Doxycycline في بكتريا MRSA 23.80% ، هذه

النتيجة جاءت مغايرة لما توصل اليه الباحث Nazarchuk و اخرون (2020) حيث كانت نسبة

بكتريا *S. aureus* الحساسة للمضاد 65%.

هناك بيانات محدودة لدعم استخدام مضاد Doxycycline ضد الالتهابات الناجمة عن بكتريا *S.aureus* و عليه يجب في حالة استخدام المضاد الاخذ بنظر الاعتبار الحالة السريرية و نتائج الحساسية، حيث رُجح ان سبب زيادة المقاومة للمضادات الحياتية من البكتريا الى تطوير البكتريا لآليات المقاومة من خلال انتاجها لانزيمات يشفر لها جينات ذات منشأ بلازميدي او كروموسومي، او قد تلجأ الى منع نفاذية المضاد عبر تكوين الغشاء الحيوي Biofilm، و هناك اليات مختلفة تطورها البكتريا بالتزامن مع الاستخدام العشوائي او المفرط للمضادات من قبل المرضى و هذا بدوره يؤدي الى انخفاض حساسية البكتريا تجاه ذلك المضاد (Hiltunen، و اخرون، 2019).

2-5-4 اختبار حساسية بكتريا MSSA لمضادات الحياة MSSA antibiotics

susceptibility test

بينت نتائج الدراسة الحالية ان جميع عزلات بكتريا MSSA اظهرت مقاومة بنسبة 100% لمضاد penicillin كما هو مبين في جدول (4-7) وهي تتفق مع النتائج التي حصل عليها Shahmoradi و اخرون (2019) حيث كانت جميع العزلات مقاومة ايضا .اظهرت النتائج مقاومة بكتريا MSSA لمضاد Gentamicin بنسبة 32.35 %، وهي مخالفة للنتائج التي حصلت عليها Horvath و اخرون (2020) في دراسة هنغارية حيث سجلت 2% فقط كنسبة مقاومة ، في حين في دراسة اخرى قاومت بكتريا MSSA المضاد بنسبة 4.44% (Ghasemian و اخرون، 2016).

اظهرت النتائج ان نسبة مقاومة بكتريا MSSA قيد الدراسة لمضاد Azithromycin قد بلغت 61.76 % ، وهي مقارنة نوعا ما لنسبة المقاومة عند الباحث Luo و اخرون (2018) والتي

بلغت 73.91% اشارت نتائج الدراسة الحالية الى ان نسبة المقاومة لمضاد Tetracycline كانت 41.17% لبكتريا MSSA وهي مقارنة لنسبة المقاومة التي وردت في دراسة Khoramrooz وآخرون (2017) التي كانت 47.93%، اما بالنسبة لمضاد Doxycycline فان بكتريا MSSA لم تقاوم المضاد نهائياً و كانت حساسة له بنسبة 100% وقد جاءت مطابقة لدراسة (Ad وآخرون، 2019).

توصلت بعض الدراسات الى ان آلية مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية عن طريق جينات المقاومة هي من اكثر المشاكل التي تواجه اغلب المستشفيات و المراكز الصحية نتيجة لعدم التزام بعض المرضى المراجعين و الرافدين بوصفة العلاج و الفترة اللازمة للمعالجة التي يوصي بها الاطباء المختصين (Das وآخرون، 2019).

ان السبب الرئيسي في مقاومة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* للمضادات الحيوية يعود الى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي منها انتاج انزيمات البييتا لكتاميز β -Lactamase ، قدرتها على التضاعف السريع وانتاج الذيفانات Toxins التي تشمل Deoxyribonuclease ، PVL Leukocidin، Hemolysin، Lipase، Catalase، Enterotoxin ، Coagulase، Hyaluronidase، وهي جميعا تسهل عملية غزو انسجة المضيف وتسرع انتشار البكتريا ،وهو ما اكدته دراسة الباحثة Shettigar وآخرون (2016) التي اجريت في الهند على المرضى المصابين بمضاعفات مرض السكري Diabetic ، ودراسة اخرى للباحثة Hamza وآخرون (2015) على جينات الضراوة الموجودة في بكتريا *S. aureus* في مدينة الحلة في العراق حيث ذكرت بان عوامل الضراوة انفة الذكر تكون مسؤولة عن مقاومة عدد كبير من المضادات الحياتية .

جدول (4-7) مقاومة بكتريا MSSA لمضادات الحياة

Antibiotics	MSSA	
	no	%
Pencillin (P)	34	100
Azithromycin(AZT)	21	61.76
Ceftaroline(CPT)	16	47.05
Tetracycline(TE)	14	41.17
Gentamicin(GM)	11	32.35
Linezolid(LZ0)	3	8.82
Ciprofloxacin(CIP)	1	2.94
Doxycycline(DY)	0	0
Rifampin(RA)	0	0
Chloramphenicol(C)	0	0
Total	34	100

MSSA:بكتريا المكورات العنقودية الذهبية الحساسة للمنتسيلين

No : عدد العزلات

% : النسبة المئوية

4-5-3 تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) لمضاد الازثرومايسين ومضاد الجنتاميسين لبكتريا

S.aureus

تم تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى لعزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus*

بالاعتماد على نقطة التوقف (Break point) المثبتة في (b CLSI، 2018).

جدول (4-8) قيم التركيز المثبط الأدنى لمضادى Gentamicin و Azithromycin لعزلات

S. aureus

رقم العزلة	GM MIC $\mu\text{g/ml}$	AZI MIC $\mu\text{g/ml}$	BP $\mu\text{g/ml}$
1	128	512	64
2	32	512	64
3	32	256	64
4	256	1024	64
5	256	256	64
6	128	1024	64
7	32	512	64
8	64	256	64
9	32	1024	64
10	64	256	64

GM:Gentamicin

AZI:Azithromycin

BP:Break point

أشارت نتائج الدراسة الحالية وكما هو موضح في جدول (4-8) الى ان قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) لمضاد Gentamicin تراوحت ما بين (256-32) مكغم/مل ، وبقية 16 مكغم /مل للتركيز ما قبل المثبط (subMIC) ، وبذلك تطابقت مع ماتوصل اليه الباحث Jaddoa وآخرون (2018) حيث كانت قيم MIC ذاتها لنفس المضاد ، وتقاربت مع النتائج التي توصل اليها Gregorio وآخرون (2020) أذ كانت قيم MIC لمضاد Gentamicin تتراوح ما بين (256-8) مكغم/مل .

أما بالنسبة لمضاد Azithromycin فأن قيم MIC لبكتريا *S.aureus* قد تراوحت بين (256-1024) مكغم /مل للبكتريا قيد الدراسة وبلغت قيمة subMIC للمضاد 128 مكغم /مل ، وقد جاءت هذه النتائج مختلفة عن النتائج التي حصل عليها Gui وآخرون (2014) أذ تراوحت قيم MIC لمضاد Azithromycin لنفس البكتريا ما بين (64-32) مكغم/مل وبلغت قيمة subMIC في دراسته 16 مكغم/مل .

4-6 التحري المظهري عن عوامل الضراوة لعزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية

Phenotypic detection of virulence factors in *S.aureus* isolates

تم التحري عن قدرة بكتريا *S.aureus* لانتاج الانزيمات الخارج خلوية extracellular enzymes مظهرياً، و هي تضمنت: انزيم اليوريبيز uraese، انزيم تخثر البلازما coagulase، الهيموليسين Hemolysin، الدنيز DNase، البروتيز protease، و اللايباز lipase، حيث تم التحري عنها في جميع عزلات البكتريا التي تشمل 55 عذلة و كانت النتائج كما هو مبين في جدول (4-9) .

اظهرت النتائج ان بكتريا *S.aureus* قيد الدراسة كان لها القدرة و بنسبة 100% لانتاج جميع الانزيمات انفة الذكر، و هذا يتفق مع ما جاء في Sankomaki و اخرون (2020).

تم التحري عن انتاج الانزيم المخثر للبلازما Coagulase بإتباع طريقتين هما، طريقة الشريحة Slide و طريقة الانابيب Tubes، اشارت النتائج باتباع طريقة الشريحة الى ان جميع عزلات بكتريا *S.aureus* و بنسبة 100% كانت موجبة لهذا الاختبار (COPS) و هي مقارنة للنتائج التي توصل اليها Sharma و اخرون (2017). حيث كانت نسبة البكتريا المخثرة للبلازما بهذه الطريقة 95.04%.

جدول (4-9) نتائج التحري المظهري عن عوامل الضراوة

الاختبار	النتيجة
اختبار انتاج الهيمولايسين	(+)منتجة للهيمولايسين
اختبار الانزيم المحلل للدنا	(+)محللة للدنا
اختبار انتاج البروتيز	(+)منتجة للانزيم
اختبار تخثر البلازما Coagulase	(+)مكونة للتخثر
اختبار الستافيلوكاينيز	(+)منتجة للانزيم
اختبار تميع الجيلاتين	(+) مميعة للجيلاتين
اختبار انتاج اللايبيز والليسيثينيز	(+) منتجة للانزيمين
اختبار تحلل اليوريا	(+)محللة لليوريا

+: النتيجة موجبة

-: النتيجة سالبة

كانت نتائج طريقة الانابيب ايضاً ايجابية بنسبة 100%، و تقاربت مع النتائج التي حصل عليها Subramanian و اخرون (2017) التي اكدت بأن 95.37% من بكتريا *S.aureus* منتجة لهذا الانزيم، وفي دراسة يابانية كانت نسبة الالتصاق لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية بالانابيب 65.1% (Neopane و اخرون، 2018).

عندما زرعت البكتريا قيد الدراسة على وسط اكار الدم Blood agar ظهرت جميع عزلات البكتريا بشكل مستعمرات ذات صبغة ذهبية اللون تحيط بها منطقة تحلل كامل من النوع β -hemolysis مما يدل على تحلل كريات الدم الحمر حول و اسفل المستعمرات، و هذا يتفق مع دراسة (Hassuny، 2014).

اظهر اختبار تحلل الدنا ان جميع العزلات قيد الدراسة تمتلك القدرة على انتاج انزيم الدنيز DNase و بنسبة 100%، و اظهرت نتائج الزرع ان المستعمرات احاطت بها منطقة صفراء دلالة على تحلل ال DNA للبكتريا و تحوله الى نكليوتيدات nucleotides و هذا يتفق مع ما جاء في دراسة Forbes و اخرون (2007).

تم التحري عن انتاج انزيم البروتيز protease باستخدام وسط اكار الحليب المقشود skim milk agar و ظهرت النتيجة الموجبة بتحلل البروتين حول المستعمرات النامية و التي ظهرت بهيئة حلقة شفافة حولها، كانت النتيجة موجبة بنسبة 100%، حسب ما جاء في (Brooks و اخرون، 2007).

لمعرفة قدرة البكتريا قيد الدراسة على انتاج انزيم اليوريز تم استخدام وسط اليوريا السائل broth الحاوي على صبغة الفينول الاحمر phenol red، كانت النتيجة موجبة عند تحول لون الوسط الى وردي pink، دلالة على قدرة البكتريا على انتاج هذا الانزيم الذي يحول اليوريا

الموجودة في الوسط الى امونيا، اظهرت جميع عزلات بكتريا *S.aureus* و بنسبة 100% نتائج موجبة لهذا الاختبار مما جعلها تتطابق مع نتائج (Alkafaji, 2018).

4-7 تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation

لمعرفة قدرة بكتريا *S.aureus* على انتاج الغشاء الحيوي Biofilm تم استخدام الطرائق المظهرية و الجزيئية، كما يلي:

4-7-1 طريقة الانابيب Tube method

اظهرت جميع العزلات (55) عزلة وبنسبة 100 % نتيجة ايجابية لتكوين الغشاء الحيوي باستخدام الانابيب ،وهي بذلك تتفق تماما مع النتائج التي توصل اليها الباحث Manandhar وآخرون (2018) أذ ذكر ان جميع عزلات بكتريا *S.aureus* قادرة على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الانابيب ولكن بكميات مختلفة ، في حين لم تتفق مع النتائج التي حصل عليها Neopane وآخرون (2018) حيث كانت نسبة التصاق البكتريا بالانابيب 65% .

4-7-2 طريقة اكار الكونكو الاحمر Congo Red Agar(CRA)

اظهرت جميع عزلات بكتريا *S.aureus* قيد الدراسة و بنسبة 100% قدرتها على انتاج الغشاء الحيوي باستخدام طريقة CRA لكن بكميات مختلفة، حيث انتجت 17 عزلة و بنسبة 80.95% من بكتريا MRSA مستعمرات سوداء black colonies بعد زراعتها لمدة 24 ساعة على وسط CRA، شكل (4-1)، و عزلتان بنسبة 26.47% لكل من مستعمرات سوداء جدا very black و سوداء ضعيفة weak black، كما هو موضح في جدول (4-10). في دراسة اجريت لمعرفة قدرة بكتريا MRSA على انتاج الغشاء الحيوي Biofilm بنفس الطريقة، فقد كانت

نسبة العزلات المنتجة لمستعمرات سوداء 46.1%، اما 26% و 23% فكانت سوداء محمرة red black وسوداء جدا very black على التوالي (Zamanzad and Abbasi، 2017).



الشكل (4-1) تكوين الغشاء الحيوي على وسط Congo red agar

اما في دراسة اخرى اجريت في الهند لبكتريا MRSA المعزولة من التهاب البلعوم pharyngitis فقد كانت نسبة انتاج الغشاء الحيوي بهذه الطريقة هي 28%، 36.5%، 12.7% لكل من مستعمرات سوداء جدا very black، و سوداء black و سوداء محمرة red black على التوالي (Gowrishankar، و اخرون، 2016).

ان دراسة اخرى في تركيا وجدت بان 46.9% من عزلات بكتريا MRSA كونت مستعمرات سوداء black (Torlak، و اخرون، 2017).

اما في دراسة مصرية لبكتريا *S. aureus* المعزولة من الجروح فقد وجدوا بان 76% من العزلات كونت البايوفلم بنسبة 9% weak، 48% moderate و 19% strong (Mohamed، و اخرون، 2018).

بالنسبة لعزلات بكتريا MSSA قيد الدراسة فقد اظهرن النتائج التالية، كانت ثلاث عزلات و بنسبة 8.82% مكونة لمستعمرات سوداء جدا very black، 61.76% سوداء black، 26.47% سوداء ضعيفة weak black و عذلة واحدة بنسبة 2.92% كونت مستعمرات حمراء، اوضحت دراسة اجريت في ماليزيا ان نسبة 26.6% من بكتريا MSSA كونت مستعمرات سوداء جدا و هي اعلى

بكثير من النسبة التي حصلنا عليها في الدراسة الحالية، و لم تكون عزلاتهم مستعمرات حمراء بل كونت مستعمرات سوداء black و سوداء ضعيفة weak black بنسبة 63.3% و 10% على التوالي (Atshan، و اخرون، 2012).

جدول (4-10) تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا MRSA و MSSA بطريقة احمر الكونغو (CRA)

MRSA		MSSA		colour	P value
no	%	no	%		
2	9.52	3	8.82	Very black	0.655
17	80.95	21	61.76	Black	0.516
2	9.52	9	26.47	Weak black	0.035*
0	0	1	2.94	Red	0.00
21	100	34	100	Total	

*P< 0.05

4-7-3 طريقة صفيحة المعايرة الدقيقة (MTP) Microtiter Plate Method

تم اختبار قدرة 55 عزلة من بكتريا *S.aureus* على تكوين الغشاء الحيوي باستخدام صفيحة المعايرة MTP التي تحتوي على 96 حفرة wells، و كانت النتائج كما موضحة في جدول (4-11).

أخذت نتائج الدراسة الحالية بالاعتماد على قياس الامتصاصية للكثافة الضوئية (OD) Optical Density عند الطول الموجي (490) نانومتر وبعد مقارنتها بقيم السيطرة السالبة (ODc) تم تصنيف العزلات الى مجاميع كما جاء في (Olia وآخرون، 2020).

أظهرت نتائج اختبار تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا MRSA ان ثلاث عزلات و بنسبة 14.28% كونت الغشاء الحيوي بقوة Strong و 15 عزلة بنسبة بنسبة 71.42% كانت متوسطة moderate، اما الثلاث عزلات المتبقية فقد كونت غشاءً حيويًا ضعيفاً weak.

لقد اختلفت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الباحث (Mirzaee، و آخرون، 2014) حيث اشارت دراسته الى ان 29% من عزلات بكتريا MRSA قد كونت الغشاء الحيوي (قوي strong) و 23%، 11% لكل غشاء حيوي متوسط moderate و ضعيف weak على التوالي.

اما بالنسبة للنتائج التي أظهرتها عزلات بكتريا MSSA فقد كانت 5 عزلات بنسبة 14.70% مكونة لغشاء حيوي قوي strong و 55.88% كونت غشاء حيوي متوسط moderate اما 29.41% من عزلات بكتريا MSSA فقد كونت غشاءً حيويًا ضعيفاً.

و قد اختلفت نتائج الدراسة الحالية عن نتائج دراسة الباحث (Atshan، و آخرون، 2012)، فلم تكون عزلات بكتريا MSSA غشاءً حيويًا ضعيفاً، بل كونت الغشاء الحيوي بشكل قوي جدا وقوي و متوسط بنسبة 20%، 46.6% و 33.3% على التوالي.

دراسة أخرى أجريت في اميركا عن بكتريا *S.aureus* المعزولة من الاصابات البكتيرية للجلد فقد كونت الغشاء الحيوي بطريقة صفيحة المعايرة بقوة جدا و بقوة بنسبة 53% و 47% على التوالي ولم تكون غشاء حيوي ضعيف (Foster، و اخرون، 2020).

اشارت دراسة الباحث Shahmmoradi و اخرون (2019) الى ان جميع عزلات بكتريا *S.aureus* المعزولة من القصبة الهوائية trachea كانت MRSA و كونت غشاء قوي بنسبة 6%، اما العزلات المكونة للغشاء الحيوي بصورة متوسطة و ضعيفة فكانت نسبها 30% و 64% على التوالي.

جدول (4-11) تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا MRSA و MSSA بطريقة صفيحة المعايرة (MTP)

MRSA		MSSA		الالتصاق	P value
no	%	no	%		
3	14.28	5	14.70	strong	0.48
15	71.42	19	55.88	moderate	0.493
3	14.28	10	29.41	weak	0.05*
0	0	0	0	none	0.00
21	100	34	100	Total	

*P< 0.05

لم تكن هناك فروق معنوية بين طريقتي CRA و MTP، لكن كان هناك فرق معنوي بين بكتريا MRSA و MSSA عند استخدام CRA للعزلات المكونة لغشاء حيوي ضعيف weak black مقداره 0.035 عند مستوى معنوية $p<0.05$ ، ظهر فرق معنوي اخر بين بكتريا MRSA

و MSSA المكونة لغشاء حيوي ضعيف بطريقة MTP مقداره 0.05 عند مستوى معنوية $0.05 < p$.

اثبتت طريقة صفيحة المعايرة MTP بأن نتائجها أكثر دقة من طريقة CRA وطريقة الانابيب، أما اختلاف النتائج بين الدراسات المختلفة فهو يعزى الى اختلاف مصدر العزل و الظروف البيئية بين منطقة و أخرى، بالإضافة الى ان تكوين الغشاء الحيوي يعتمد بصورة رئيسية على وجود المغذيات كالكلوكوز Glucose و اللاكتوز Lactose (Lotfi، و اخرون، 2014).

4-8 الكشف الجزيئي عن بعض جينات عوامل الضراوة لبكتريا *S.aureus*

Molecular Detection For Some Virulence *S.aureus*

4-8-1 التحري عن جينات *ica ABC* المشفرة لتكوين الغشاء الحيوي

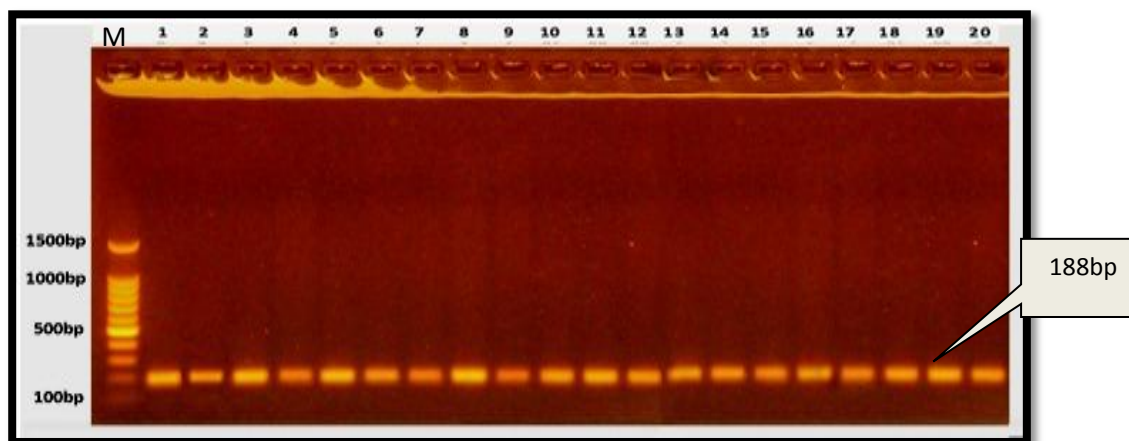
Detection of *ica ABC* genes that encodes to biofilm formation

تم دراسة تكوين الغشاء الحيوي جينيا عن طريق استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR الذي يلعب دوراً رئيسياً في دراسات علم الاحياء الدقيقة، و تم استخدامه للكشف عن نطاق واسع من الجينات ذات الاهمية و التي يستوجب دراستها لعدم وجود معلومات وافية عنها (Foster، و اخرون، 2020).

حدد تركيز الحمض النووي DNA باستخدام جهاز مقياس التآلق الكمي Quantus Fluorometer و الطيف الضوئي المجهز من شركة (Promega, USA).

اشارت النتائج الى ان تركيز الحمض النووي للمستخلصات كانت متغيرة و تراوحت بين (25-50 نانوغرام/ميكروليتر)، اما نقاوة مستخلصات الحمض النووي DNA فقد كانت جيدة و تراوحت بين (1.50-1.98) عند الطول الموجي 260/ 280 نانو متر.

تم تأكيد وجود جينات *icaABC* في جميع عزلات بكتريا *S. aureus* MRSA و MSSA و بنسبة 100% باستخدام طريقة PCR Uniplex، بينت النتائج ظهور حلقات مفردة Single band بناتج حجمه (188,190,192)bp على التوالي كما موضح في شكل (2-4) و (3-4) و (4-4).



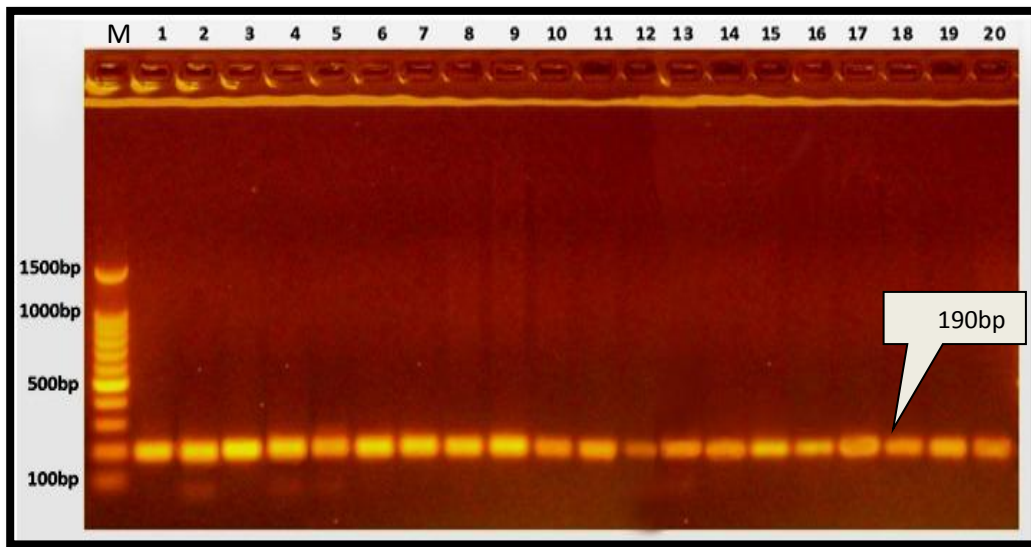
الشكل (2-4) الترحيل الكهربائي لعزلات بكتريا *S. aureus* باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد قدره 70 فولت لمدة 1.5 ساعة. حجم الناتج 188 bp. المسار M يشير الى الدليل الحجمي. رقم العزلة 1-10 نتيجة موجبة لوجود الجين *ica A* في بكتريا MRSA. رقم العزلة 11-20 يوضح النتيجة الموجبة لوجود الجين *ica A* في عزلات بكتريا MSSA.

لم تتفق هذه النتيجة مع النتائج التي توصل اليها Mirzaee و اخرون (2014) حيث كانت نسبة وجود الجين *icaA* في بكتريا MRSA 60.3%.

اما في دراسة اخرى في ايران فقد وجد بان نسبة الجينات *ica ABC* قد كانت في عزلات MRSA 76%، 69%، 64% على التوالي، اما في عزلات MSSA فقد كانت نسبة الجينات black هي 71%، 54%، 69% على التوالي (Ghasemian، و اخرون، 2016).

في دراسة أجريت في اميركا سجلت نسبة 100% لوجود جينات *ica A*, *ica B*, لكن نسبة الجين *ica C* كان 99% (Foster، و اخرون، 2020).

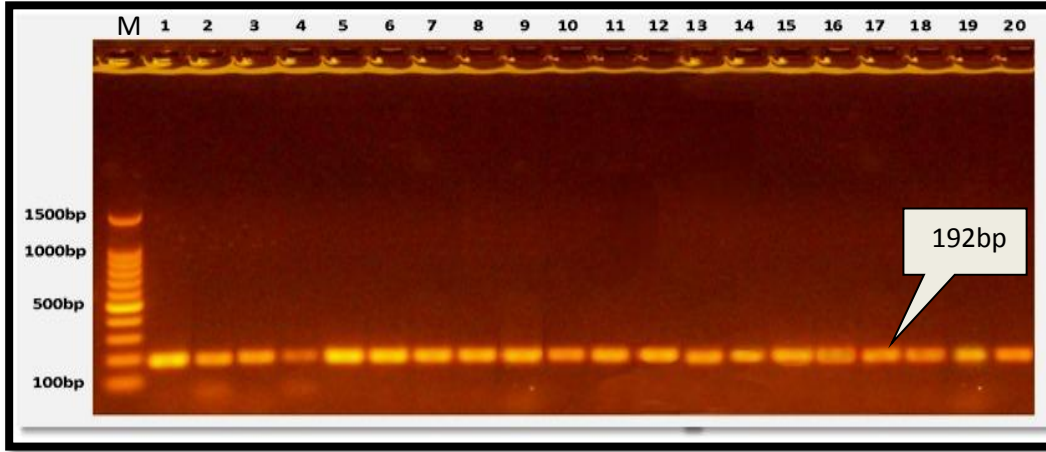
اشار الباحث Parastan و اخرون (2020) الى وجود جينات *ica ABC* بنسب عالية حيث كانت 97.59%، 99.52% و 99.04% على التوالي بناتج حجمه (1100,900,188)bp على التوالي.



الشكل (3-4) الترحيل الكهربائي لعزلات بكتريا *S. aureus* باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد قدره 70 فولت لمدة 1.5 ساعة. حجم الناتج 190bp. المسار M يشير الى الدليل الحجمي. رقم العزلة 1-10 نتيجة موجبة لوجود الجين *ica B* في بكتريا MRSA. رقم العزلة 11-20 يوضح النتيجة الموجبة لوجود الجين *ica B* في عزلات بكتريا MSSA.

بينت دراسة امريكية ان جميع عزلات بكتريا *S. aureus* و بنسبة 100% تحمل الجينات الثلاثة *ica A*, *ica B*, *ica C* ضمن عزلات بكتريا MRSA (Uribe-Garcia، و اخرون، 2019).

ان ارتفاع نسبة وجود الجينات التي تدخل في عملية تكوين الغشاء الحيوي يشير الى خطر انتشار مقاومة المضادات الحيوية المتعدد MDR بين عزلات بكتريا *S. aureus* المحلية الذي يعزى الى الاستخدام المفرط او الخاطيء للمضادات الحياتية و الذي بدوره يصعب مجابهة الامراض الناجمة عن الالتهابات البكتيرية (Keikhai، و اخرون، 2017).



الشكل (4-4) الترحيل الكهربائي لعزلات بكتريا *S. aureus* باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد قدره 70 فولت لمدة 1.5 ساعة. حجم الناتج 192 bp. المسار M يشير الى الدليل الحجمي. رقم العزلة 1-10 نتيجة موجبة لوجود الجين *ica C* في بكتريا MRSA. رقم العزلة 11-20 يوضح النتيجة الموجبة لوجود الجين *ica C* في عزلات بكتريا MSSA.

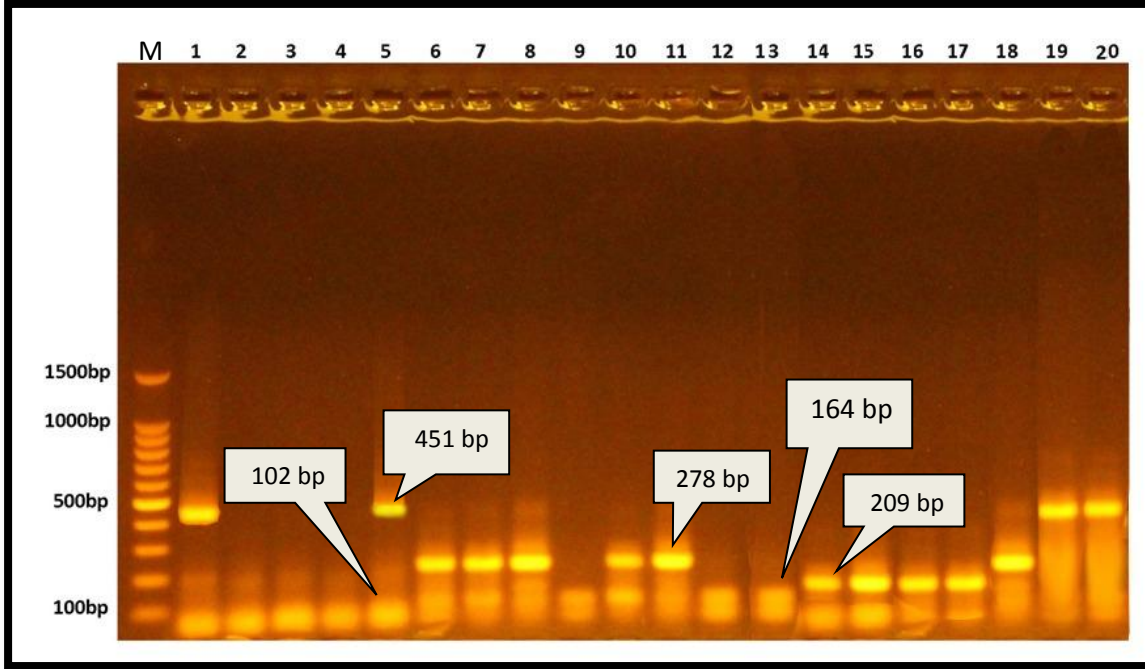
4-8-2 الكشف الجزيئي عن الجينات المشفرة لانتاج السموم المعوية

(*see, sed, sec, seb, sea*) في بكتريا *S. aureus*

Molecular Detection of Enterotoxin genes (*sea, seb, sed* and *see*) in *S. aureus* isolates

تم التحري جزيئياً باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل المضاعف multiplex PCR عن الجينات المشفرة لانتاج السموم المعوية و التي تشمل *sea, b, c, d* and *e* في 20 عزلة من بكتريا *S. aureus* قيد الدراسة، اظهرت نتائج الفحص ظهور حلقة واحدة single band بناتج

حجمه : *sea* (102 bp), *seb* (164 bp), *sec* (451 bp), *sed* (278 bp), *see* (209 bp)
كما هو موضح في الشكل (4-5) .



شكل (4-5) الترحيل الكهربائي لعزلات بكتريا *S. aureus* باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد قدره 70 فولت لمدة 1.5 ساعة. حجم الناتج *sed* (278 bp), *see* (209 bp), *sea* (102 bp), *seb* (164 bp), *sec* (451 bp). المسار M يشير الى الدليل الحجمي .
العزلات 3,4,5 نتيجة موجبة لوجود الجين *sea*، العزلات 9,10,12,13 نتيجة موجبة للجين *seb*، العزلات 1,5,19,20 نتيجة موجبة للجين *sec*، العزلات 6,7,8,10,11,18 نتيجة موجبة للجين *sed* و العزلات 14,15,16,17 نتيجة موجبة للجين *see* .

توصلت نتائج الدراسة الحالية الى ان 3 عزلات وبنسبة 15% كانت حاملة للجين *sea* ، 4 عزلات بنسبة 20% حاملة للجين *seb* ، 4 عزلات بنسبة 20% تحمل الجين *sec* ، 6 عزلات بنسبة 30% تحمل الجين *sed* و 4 عزلة بنسبة 20% حاملة للجين *see* .

لم تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه الباحث Houri و اخرون (2020) حيث تم العثور على الجينات (*sea* 51.2 %)، (*seb* 23.7 %)، (*sec* 15 %) و (*sed* 2.7 %) على التوالي.

كشفت دراسة اجريت في اربيل بواسطة Hassan و اخرون (2020) ان نسبة وجود الجينات في بكتريا *S.aureus* كانت *sea* (43.33 %)، *seb* (10 %)، *sec* (53.33 %)، *sed* (66.67 %) بينما لم يتم العثور على الجين *see* بين العزلات قيد الدراسة و كانت نسبته 0 %.

اشارت دراسة حديثة اجريت في مصر للباحث Diab و اخرون (2021) لبكتريا *S.aureus* المعزولة من ايدي Hands و انوف nasal الاشخاص العاملين في حقول الابقار الى كشف وجود جينات السموم المعوية *sea,seb,sec,sed,see* بنسبة متساوية تقريباً (63 %) من العينات المعزولة من الجلد و (64 %) من العينات المعزولة من الانف.

بينما اوضحت دراسة تايلاندية ان نسبة وجود الجينات المعوية *sea,seb,sec,sed* في عزلات بكتريا *S.aureus* قد كانت 13 % ، 33 % ، 26 % ، 0 % و 2 % على التوالي (Sankomkai، و اخرون، 2020).

اجريت دراسة في تركيا عن بكتريا *S.aureus* المعزولة من الانف nasal ان جينات السموم المعوية كانت موجودة في العزلات بالنسب *sea* (13.5 %)، *seb* (8.7 %)، *sec* (52.9 %) و *sed* بنسبة 4.8 % (Dagi، و اخرون، 2015). قامت الكثير من الدراسات حول العالم بالكشف عن جينات عوامل الضراوة المختلفة في بكتريا *S.aureus* و التي منها الجينات المشفرة لانتاج السموم المعوية enterotoxins و قد اثبتت ارتباطها بقدرة البكتريا الامراضية pathogenicity، لكن لم تثبت اهميتها في قدرة البكتريا على النمو growth (Liu، و اخرون، 2019). ان اختلاف انتشار الجينات المشفرة للسموم المعوية بين عزلات بكتريا

S.aureus بين دول العالم او حتى في البلد الواحد قد يعزى الى اسباب عدة منها الاختلاف الجغرافي بين بلد و اخر، اختلاف مصدر العزلات، دقة التقنيات المستخدمة و قد يعود الى اختلاف تنفيذ شروط الوقاية من العدوى او الخطأ في استخدام المضادات الحيوية.

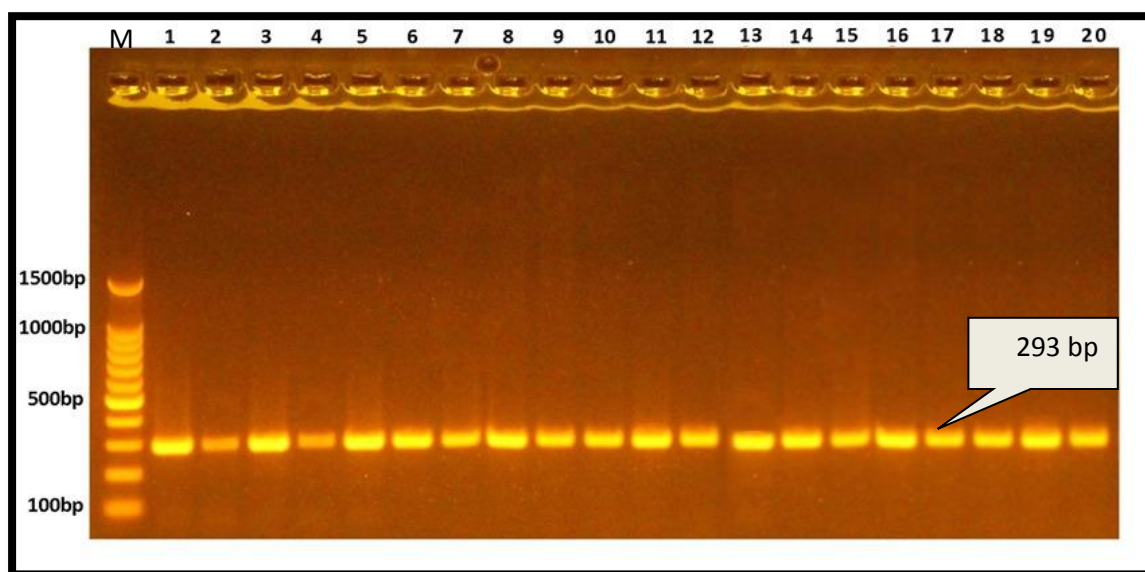
3-8-4 الكشف الجزيئي عن الجينات المشفرة لانتاج الهيمولايسين (*hlg, hlb*) في عزلات بكتريا *S.aureus*

Molecular Detection of Genes That Encodes to Hemolysin (*hlg, hlb*) in *S.aureus* Isolates

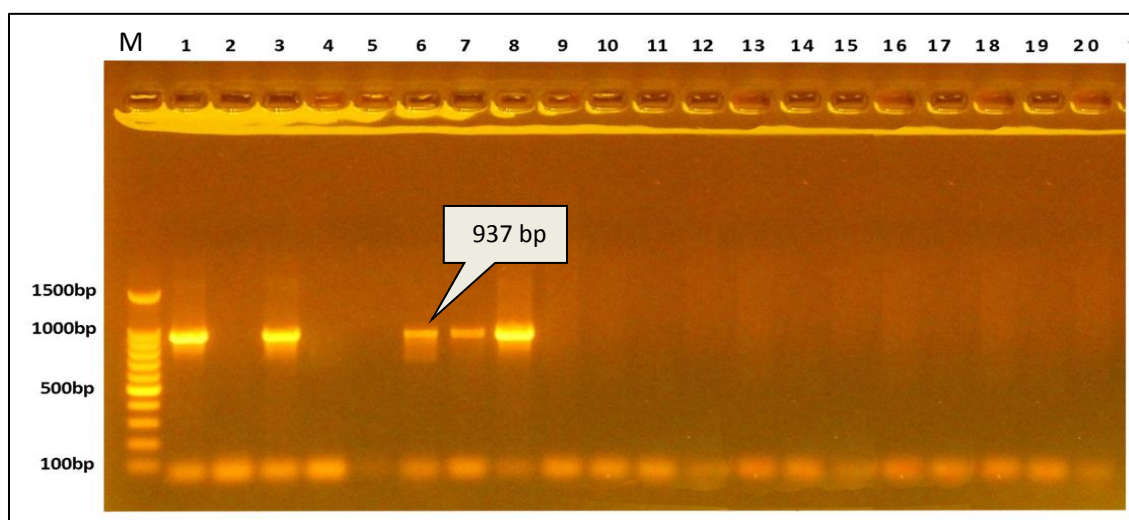
تم التحري عن وجود الجينات المشفرة لانتاج السموم الحالة للدم (*hlg, hlb*) hemolysins في 20 عزلة من بكتريا *S.aureus* وذلك باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل uniplex PCR، و اتضح من خلال النتائج ظهور حلقة مفردة single band عند ناتج بلغ حجمه *hlg* (293bp) و *hlb* (937bp)، لقد تبين ان الجين *hlb* كان محمولاً في 20 عزلة و بنسبة 100%، اما الجين *hlg* فقد كان موجودا في 5 عزلات فقط و بنسبة 25%، كما هو مبين في الشكل (4-6) و (4-7).

اجريت العديد من الدراسات حول العالم للكشف عن الجينات المسؤولة عن التحلل الدموي Hemolysin genes، فقد توصل الباحث Motamed و اخرون (2018) الى تحديد نسبة وجود الجينات *hlg* و *hlb* عند دراسته 11 عزلة لبكتريا *S.aureus* حيث كانت 5.07% و 2.89% على التوالي.

وجدت دراسة في هنغاريا بأن نسبة وجود الجين *hlb* في بكتريا MRSA كان 69.3%، اما في بكتريا MSSA فقد كانت بنسبة 49%، و نسب وجود الجين *hlg* قد كان في بكتريا MRSA (58.2%) و (59.9%) في بكتريا MSSA (Horvath، و اخرون، 2020).



شكل (4-6) الترحيل الكهربائي لعزلات بكتريا *S. aureus* باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد قدره 70 فولت لمدة 1.5 ساعة. حجم الناتج 293 bp. المسار M يشير الى الدليل الحجمي. رقم العزلة 1-10 نتيجة موجبة لوجود الجين *hly* في بكتريا MRSA والعزلات 11-20 نتيجة موجبة لوجود الجين *hly* في بكتريا MSSA .



شكل (4-7) الترحيل الكهربائي لعزلات بكتريا *S. aureus* باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد قدره 70 فولت لمدة 1.5 ساعة. حجم الناتج 937 bp. المسار M يشير الى الدليل الحجمي. العزلات 1,3,6,7,8 نتيجة موجبة لوجود الجين *hly* .

اشارت دراسة ماليزية الى ان نسبة وجود الجين *hlg* في بكتريا MRSA قد كانت 59% و هي بذلك لم تختلف كثيرا عن الدراسة السابقة (Lim، و اخرون، 2012).

من جهة اخرى توصلت دراسة عراقية الى ان الجين *hly* كان موجودا بنسبة (25%) في بكتريا *S.aureus* المعزولة من عينات القشع sputum (Hassuny، 2014)، في حين اوضحت دراسة برازيلية عن بكتريا *S.aureus* (MRSA) المعزولة عن مرضى راقدين في المستشفى الى ان الجين *hly* كان محمولا بنسبة أكبر بلغت 91.1% في هذه البكتريا (De oliveira، و اخرون، 2015).

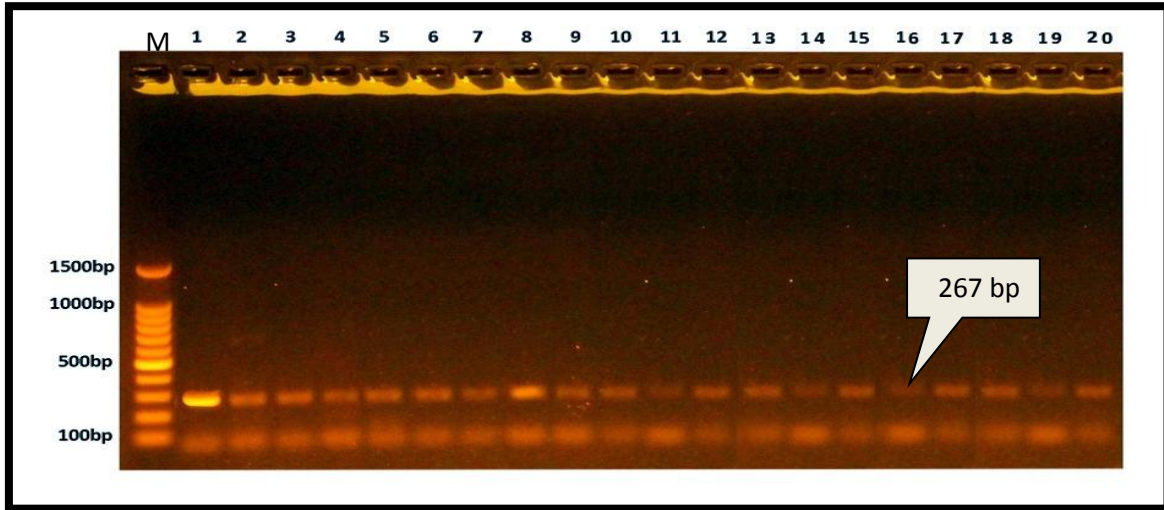
4-8-4 الكشف الجزيئي عن الجينات المشفرة لانتاج الذيفان المحلل لكريات الدم البيض (*luk-S*، *luk-F*) في بكتريا *S.aureus*

Molecular Detection of Panton-Valentin Leucocidin Toxin (*luk-S*، *luk-F*) in *S.aureus* Isolates

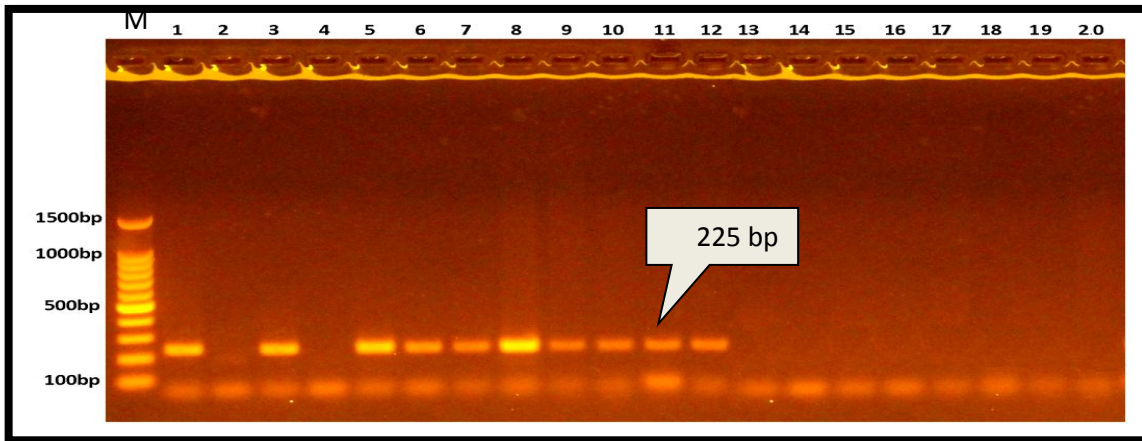
تم اجراء الكشف الجزيئي عن الجينات *luk-S*، *luk-F* بهدف معرفة توزيعها بين 20 عزلة من بكتريا *S.aureus* و كان حجم الناتج *luk-S* (267bp)، *luk-F* (225bp) .

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان 20 (100%) كانت حاوية على الجين *luk-S* و

10 عزلات بنسبة (50%) حاملة للجين *luk-F*، كما هو مبين في الشكل (4-8) والشكل (9-4) على التوالي .



شكل (4-8) الترحيل الكهربائي لعزلات بكتريا *S. aureus* باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد قدره 70 فولت لمدة 1.5 ساعة. حجم الناتج 267 bp. المسار M يشير الى الدليل الحجمي. رقم العزلة 1-10 نتيجة موجبة لوجود الجين *luk-S* في بكتريا MRSA والعزلات 11-20 نتيجة موجبة للجين *luk-S* في بكتريا MSSA .



شكل (4-9) الترحيل الكهربائي لعزلات بكتريا *S. aureus* باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد قدره 70 فولت لمدة 1.5 ساعة. حجم الناتج 225 bp. المسار M يشير الى الدليل الحجمي. رقم العزلة 1,3,5,6,,8,9,10,11,12 نتيجة موجبة لوجود الجين *luk-F*

أشارت دراسة سعودية الى انه من بين 80 عزلة من بكتريا MRSA كانت 30 عزلة بنسبة 40% حاوية على الجين PVL (*luk-S*) (Al-soud, 2019).

لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الباحث Eftekhar و اخرون (2017) حيث كانت نسبة وجود الجين PVL هي 21.4%. من جهة اخرى اجريت دراسة حول المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من عينات سريرية في مستشفيات مصر، توصلت الى معدل انتشار منخفض للجين *luk-F* بين عزلات بكتريا MSSA 11% و 12% بين عزلات MRSA (El-Essawy و اخرون، 2015).

كانت نسبة وجود الجين PVL في الفلبين بين عزلات بكتريا *S. aureus* 38% (Valle، و اخرون، 2016)، لقد اختلفت نتائج الدراسة الحالية عن النتائج التي توصل اليها Bastidas و اخرون (2019) حيث كانت نسبة الجين *Luk-S,F* واطئة فقد كانت 3.2% من بكتريا *S. aureus* المعزولة من عينات الانف nasal و البلعوم pharyng في الاكوادور.

اما في انكلترا فقد وصلت نسبة الجين PVL في عزلات بكتريا *S. aureus* الى 61.4% (Dalboe، و اخرون، 2019).

مقارنة بالدراسة الحالية و الدراسات السابقة اشارت دراسة الباحث De oliveira و اخرون (2015) الى ان الجين *luk-S* و *luk-F* كانت موجودة بنسبة منخفضة جداً بين عزلات بكتريا *S. aureus* وصلت الى 2.4% فقط.

أكدت الدراسات ان ارتفاع نسبة وجود الجين *luk-F,S* في عزلات بكتريا *S. aureus* بين الافراد المصابين بالبكتريا داخل و خارج المستشفيات هو نذير وجود فرص لانتقال العدوى من

شخص لآخر بواسطة سلالات جديدة من البكتريا، لذلك لابد من تحديد مناطق انتشار السلالات الجديدة، و مناطق عزلها و تحديد اليات المقاومة للمضادات الحياتية (Al-Soud،2019).

4-8-5 الكشف الجزيئي عن الجين *tst-1* المشفر لانتاج ذيفان متلازمة الصدمة السمية في

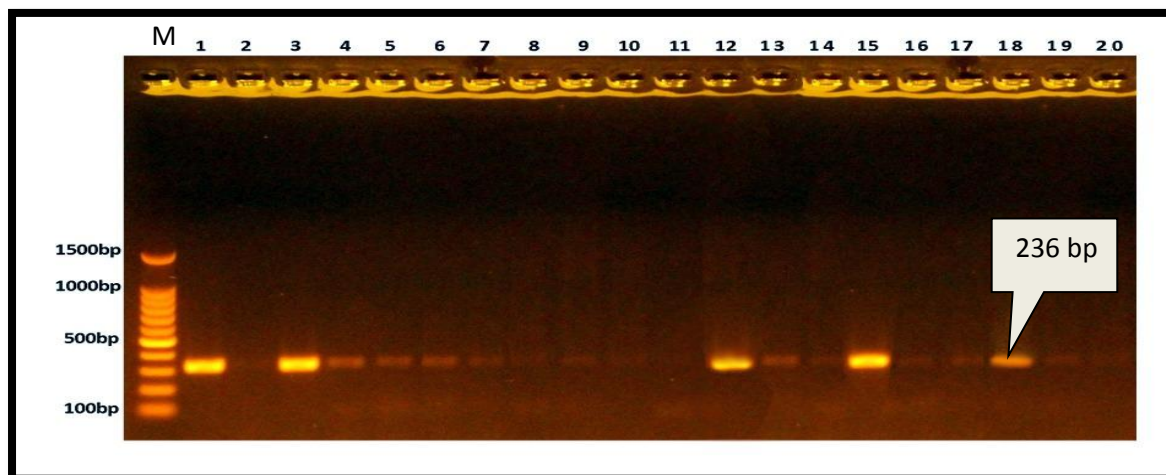
بكتريا *S.aureus*

Molecular Detection of *tst-1* Gene that incodes to Toxic Shock Syndrome Toxin in *S.aureus*

تم الكشف حزيئياً عن وجود الجين *tst* باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل uniplex PCR في 20 عزلة من بكتريا *S.aureus* و كانت النتائج ذات حجم 236bp.

اشارت نتائج الدراسة الحالية ان 9 عزلات و بنسبة 45% كانت حاملة للجين *tst* ، كما هو مبين في الشكل (4-10). تقاربت نتائج دراستنا مع النتائج التي حصل عليها Hamza و اخرون (2015) حيث كان الجين *tst* هو الاقل تكراراً بين عزلات بكتريا *S.aureus*، اما دراسة اخرى في مصر فقد سجلت نسبة 4.55% للجين *tst* في بكتريا *S.aureus* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة (Hassan، و اخرون،2017). ارتفعت نسبة وجود الجين بين عزلات بكتريا *S.aureus* في دراسة اجريت في ايران لتصل الى 51.4% و كان حجم الناتج للجين هو 326bp (Yaslianifard، و اخرون،2017)، بينما حصلت دراسة اخرى حديثة في طهران على نسبة اقل لوجود الجين 33.7%، و اثبتت هذه الدراسة ان الجينات المشفرة للسموم في بكتريا *S.aureus* لها تأثير كبير على الجهاز المناعي للانسان بالاضافة الى التأثيرات البايولوجية الاخرى (Houri، و اخرون،2020). دراسة حديثة ايضا في تايلاند اشارت الى عدم وجود الجين *tst-1* (0%) بين عزلات بكتريا *S.aureus* (Sankomkai، و اخرون،2020).

اظهرت دراسة امريكية ان نسبة وجود الجين *tst* في بكتريا *S. aureus* المعزولة من مرضى القثاطر Catheters كانت 25.4% (Contreras, و اخرون، 2012).



شكل (4-10) الترحيل الكهربائي لعزلات بكتريا *S. aureus* باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد قدره 70 فولت لمدة 1.5 ساعة. حجم الناتج 236 bp. المسار M يشير الى الدليل الحجمي. رقم العزلة 1,3,4,5,6,12,13,15,18 نتيجة موجبة لوجود الجين *tst*

4-9 دراسة التعبير الجيني للجينات المشفرة لتكوين الغشاء الحيوي في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية قبل وبعد معاملتها بمضاد الازثرومايسين والجنتاميسين

4-9-1 دراسة التعبير الجيني لبكتريا *S. aureus* (MSSA, MRSA) للجين *ica A* بعد

معاملتها بمضاد Azithromycin

Gene Expression of *ica A* Gene For MRSA And MSSA Isolates After Treating With Azithomycin

تعد هذه الدراسة من الدراسات القليلة من نوعها على مستوى العراق لدراسة التعبير الجيني الكمي باستخدام تفاعل النسخ الكمي (qRT-PCR) quantitative reverse transcription

PCR real-time لعشر عزلات من بكتريا *S. aureus* قبل و بعد معاملتها بمضاد

Azithromycin بتركيز ما قبل المثبط Sub MIC مقدار (128 µg/ml)، بعدها اجري التفاعل

باستخدام qRT-PCR و البادئات الموصوفة في الجدول (3-14).

جدول (4-12) التعبير الجيني للجين *ica A* قبل وبعد المعاملة بمضاد Azithromycin

المضاد	رقم العينة	Mean (H.K.)	Mean <i>ica A</i>	ΔCT	ΔΔCT	Folding	P value
Azithromycin	SA2	14.11	22.89	8.78	-4.07	16.83	0.038*
	SA 8	13.49	21.47	7.98	-5.78	54.86	
	SA 14	14.50	21.84	7.33	-0.69	1.61	
	SA16	13.63	20.89	7.26	-1.09	9.67	
	SA20	18.12	36.19	18.07	-3.55	11.67	
	SA24	13.36	19.77	6.41	-1.49	2.81	
	SA 31	13.92	18.82	4.90	-2.37	5.15	
	SA35	16.73	31.42	14.69	8.34	0.03	
	SA48	17.68	32.74	15.06	6.56	0.01	
	SA50	17.59	33.32	15.73	9.34	0.02	
Control	SA2	11.94	24.80	12.85	0.00	1.00	0.00
	SA 8	12.46	26.21	13.76	0.00	1.00	
	SA 14	11.99	20.02	8.02	0.00	1.00	
	SA16	12.58	20.93	8.35	0.00	1.00	
	SA20	12.54	18.93	6.39	0.00	1.00	
	SA24	12.03	19.93	7.90	0.00	1.00	
	SA 31	12.71	19.98	7.27	0.00	1.00	
	SA35	12.21	17.63	5.42	0.00	1.00	
	SA48	12.79	21.28	8.50	0.00	1.00	
	SA50	15.36	36.98	21.62	0.00	1.00	

* P value < 0.05

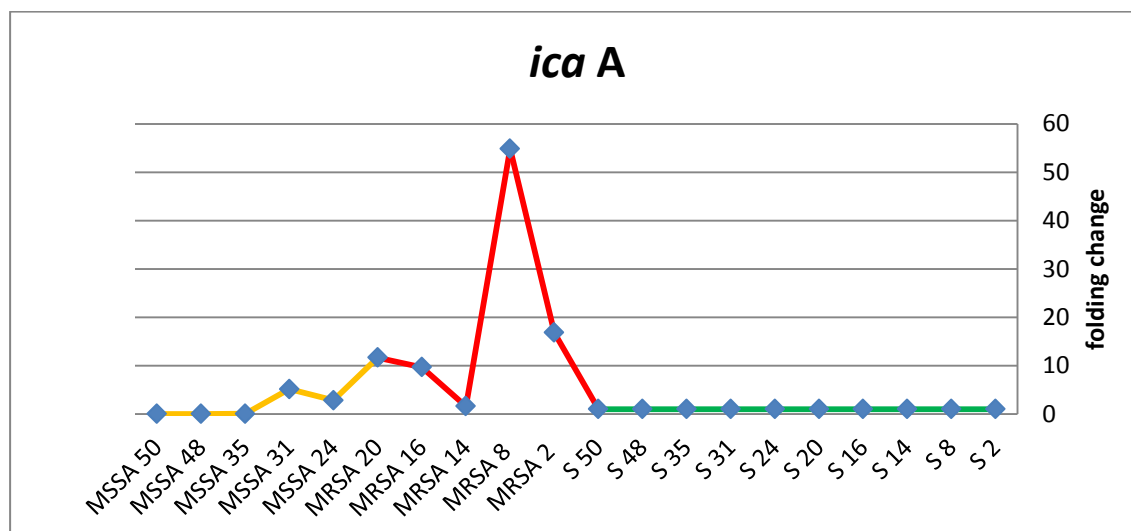
بينت النتائج تضخيماً للجين بقيمة Ct (threshold cycle) قبل معاملة العزلات بالمضاد تراوح بين (18.82 – 36.19)، ايجابية التضخيم عند عند قيمة دورة العتبة (Ct) للجين *ica A* مبينة في الملحق (7). ابدت جميع عزلات بكتريا MRSA تعبيراً جينياً عالياً بعد معاملتها بمضاد Azithromycin و تراوحت قيم التعبير الجيني ما بين (1.61 – 54.86)، اما بالنسبة لعزلات بكتريا MSSA فكانت العزلات (SA50, SA48, SA35) غير معبرة بعد معاملتها بالمضاد Azithromycin، العزلتان (SA 31, SA 24) حافظت على قدرتها على التعبير الجيني بعد المعاملة بالمضاد، كما هو مبين في الجدول (4-12).

تم تحديد التغيرات الكمية في mRNA باستخدام معادلة حد العتبة (Ct) threshold و هي $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ حسب (Wu وآخرون، 2019)، وسجل فرق معنوي عند مستوى دلالة $P < 0.05$ بين بكتريا MRSA و MSSA من حيث التعبير الجيني بعد المعاملة بمضاد الازثرومايسين بلغ (0.038).

أوضحت النتائج ان عزلات بكتريا MRSA و MSSA قد أظهرت مستويات مختلفة من المقاومة لمضاد الازثرومايسين، و هو ما كان واضحاً في عزلات بكتريا MRSA تحديداً (SA8, SA2, SA20, SA16) حيث أظهرت مستويات عالية من التعبير الجيني (9.67, 54.86, 16.83, 11.67) على التوالي ام العزلة (SA14) فقد كان التعبير الجيني فيها طبيعياً بعد المعاملة بالمضاد.

من جهة اخرى لم يلاحظ أي نشاط في التعبير الجيني في عزلات (SA50, SA48, SA35) التابعة لبكتريا MSSA، و هذا التوقف في التعبير قد يعود الى حدوث طفرة وراثية كرد فعل فسيولوجي لوجود المضاد، او الى توقف عمل الجينات الأخرى المشفرة لتكوين الغشاء

الحيوي. التغيرات في قيم التعبير للجين *ica A* قبل و بعد المعاملة بمضاد Azithromycin مبينة في الشكل (4-11).



شكل (4-11) التغيرات في التعبير الجيني للجين *icaA* قبل وبعد معاملة البكتريا بمضاد الازثرومايسين

بينت دراسة للباحث Atshan و اخرون (2021) ان التعبير الجيني لبكتريا MRSA و MSSA لم يكن ثابتاً بعد معاملة العزلات بمضاد daptomycin، حيث حافظ الجين *ica A* على مستوى التعبير في 50% من العزلات (MRSA)، اما بكتريا MSSA فقد قل التعبير الجيني فيها، في حين كان التعبير للجين (*ica C*, *ica B*) بين عزلات MRSA و MSSA.

اكنت دراسة برازيلية ان بكتريا MRSA تحمل بروتينات سطحية منها البروتينات المرتبطة بالبنسلين penicillin binding proteins لها أهمية كبيرة في تثبيط عمل مضادات الحياة من خلال الارتباط بها (Zuniga، و اخرون، 2020).

4-9-2 دراسة التعبير الجيني للجين *ica A* في بكتريا MRSA و MSSA قبل و بعد

معاملتها بمضاد الجنتاميسين

Study of Gene Expression for *ica A* gene in MRSA and MSSA Isolates Before and After Treatment with Gentamicin

تم دراسة التعبير الجيني باستخدام تفاعل النسخ الكمي (qRT-PCR) reverse transcriptase PCR لـ 5 عزلات من بكتريا MRSA (SA20, SA16, SA14, SA8, MSRA) و 5 عزلات MSSA (SA2, SA50, SA48, SA35, SA31, SA24) بعد معاملتها بمضاد gentamicin ، وبلغ التركيز قبل القاتل sub-MIC لمضاد GEN (16 µg/ml)، بإجراء تفاعل النسخ باستخدام qRT-PCR و البادئات الموصوفة في جدول (3-14).

أظهرت النتائج تضخيما للجين بقيمة Ct (threshold cycle) قبل معاملة العزلات بالمضاد Gentamicin تراوح ما بين (18.78-35.44) يبين الملحق رقم (8) إيجابية التضخيم عند قيمة دورة العتبة Ct للجين *ica A*.

أبدت جميع عزلات بكتريا MRSA تعبيراً جيداً بعد معاملتها بمضاد الجنتاميسين و تراوحت قيم التعبير الجيني Folding ما بين (1.18 - 53.34)، أما عزلات بكتريا MSSA فكانت 4 عزلات منها غير معبرة بعد المعاملة بالمضاد و عزلة واحدة بلغت قيمة التعبير الجيني لها 1.04.

سجلت فروق معنوية عند مستوى دلالة 0.05 و 0.01 بين بكتريا MRSA و MSSA حيث بلغت (0.01)، وتم تحديد قيم التغيرات الكمية في mRNA باستخدام معادلة حد العتبة (Ct) $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ كما مبين في الجدول (4-13)، والشكل (4-12).

جدول (4-13) التعبير الجيني للجين *ica A* قبل وبعد المعاملة بمضاد Gentamicin

المضاد	رقم العينة	Mean (H.K.)	Mean <i>ica A</i>	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	Folding	P value
Gentamicin	SA2	11.98	20.88	8.90	-3.95	15.44	0.01**
	SA 8	13.19	21.21	8.02	-5.74	53.34	
	SA 14	16.11	35.49	19.38	-2.23	4.70	
	SA16	13.21	20.67	7.46	-0.89	9.73	
	SA20	12.10	20.36	8.25	-0.24	1.18	
	SA24	11.76	24.73	12.96	5.06	0.03	
	SA 31	11.58	18.78	7.20	-0.07	1.04	
	SA35	11.79	19.28	7.49	2.07	0.23	
	SA48	10.56	21.96	11.40	5.01	0.03	
	SA50	12.80	24.47	13.67	5.64	0.02	
Control	SA2	11.94	24.80	12.85	0.00	1.00	0.00
	SA 8	12.46	26.21	13.76	0.00	1.00	
	SA 14	11.99	20.02	8.02	0.00	1.00	
	SA16	12.58	20.93	8.35	0.00	1.00	
	SA20	12.54	18.93	6.39	0.00	1.00	
	SA24	12.03	19.93	7.90	0.00	1.00	
	SA 31	12.71	19.98	7.27	0.00	1.00	
	SA35	12.21	17.63	5.42	0.00	1.00	
	SA48	12.79	21.28	8.50	0.00	1.00	
	SA50	15.36	36.98	21.62	0.00	1.00	

** p value < 0.01, * P value < 0.05

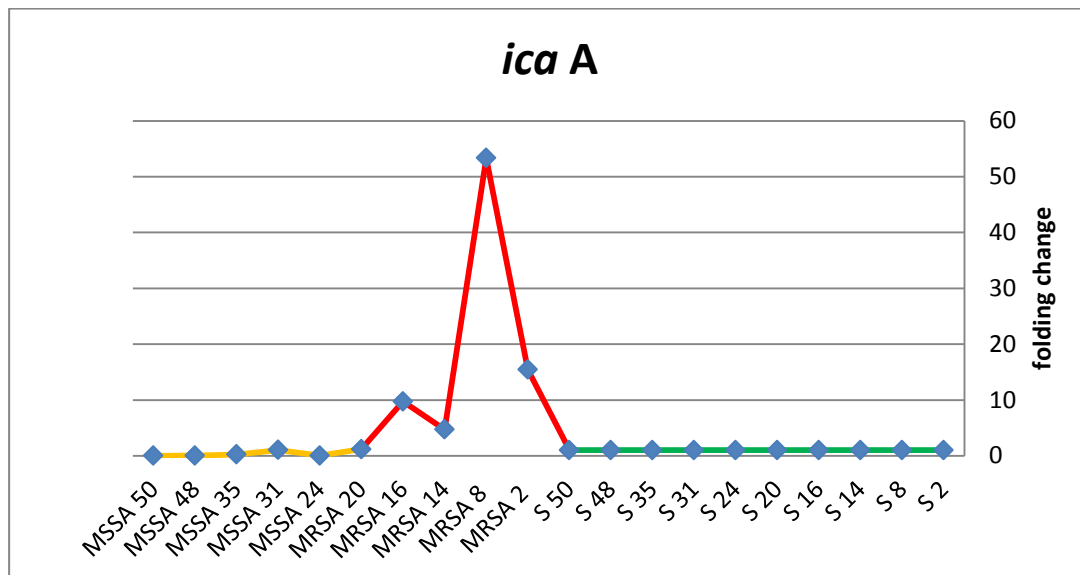
أشارت النتائج الى اظهار العزلات لمستويات مختلفة من المقاومة لمضاد

Gentamicin من خلال تغاير التعبير الجيني للجين *ica A*، حيث أظهرت عزلات بكتريا MRSA

(SA16, SA8, SA2) تعبيراً جينياً عالياً بلغ (9.73, 15.44, 53.34) على التوالي و الذي

يعود الى النشاط العالي للبكتريا، من جهة أخرى لوحظ توقف التعبير الجيني في عزلات (SA50,

SA48, SA35, SA24) التي تعود لبكتريا MSSA و الذي قد يعود الى التغيرات البيئية و
الفسلجية بوجود المضاد.



شكل (4-12) تغيرات التعبير الجيني للجين *icaA* قبل وبعد معاملة البكتريا بمضاد
الجنتاميسين

أجريت دراسة في إيطاليا عن التأثير الخلطي لمضاد الجنتاميسين ($\mu\text{g/ml } 8 = \text{MIC}$) مع المثبط N-Nonyloxypropyl ($\mu\text{g/ml } 64 \text{ MIC}$) على بكتريا MRSA و لوحظ ارتفاع في مستويات التعبير الجيني بعد المعاملة للجينات المشفرة لتكوين الغشاء الحيوي Biofilm و هذا يتفق مع النتائج التي حصلنا عليها نسبياً (Gregorio، و اخرون، 2020).

تبين مما نوقش أعلاه ان لبكتريا MRSA قدرة كبيرة على مقاومة المضاد و البقاء بمستوى امراضية اعلى من بكتريا MSSA و هذا لا يتفق مع دراسة للباحث (Tahmasebi، و اخرون، 2019) حيث توصلوا الى فقدان قدرة بكتريا MRSA و MSSA القدرة على تكوين الغشاء الحيوي بعد معاملة العزلات بمضاد Gentamicin.

4-9-3 دراسة التعبير الجيني لعزلات بكتريا MRSA و MSSA للجين *ica B* قبل و بعد

معاملتها بالمضاد Azithromycin

Gene Expression of *ica B* Gene for MRSA MRSA and MSSA Isolates Before and After Treating with Azithromycin

تم دراسة تعبير الجيني الكمي للجين *ica B* لعشر عزلات من بكتريا *S.aureus* 5) عزلات MRSA و 5 عزلات MSSA) و ذلك باستخدام تقنية النسخ الكمي qRT-PCR، تضمنت العزلات (SA20, SA16, SA14, SA8, SA2) لبكتريا MRSA، (SA50, SA48,)، (SA35, SA31, SA24) لبكتريا MSSA.

قيست كمية التعبير الجيني للعزلات قبل و بعد معاملتها بالمضاد Azithromycin عند التركيز sub-MIC (128 µg/ml) و باستخدام البادئات الموصوفة في الجدول (3-14).

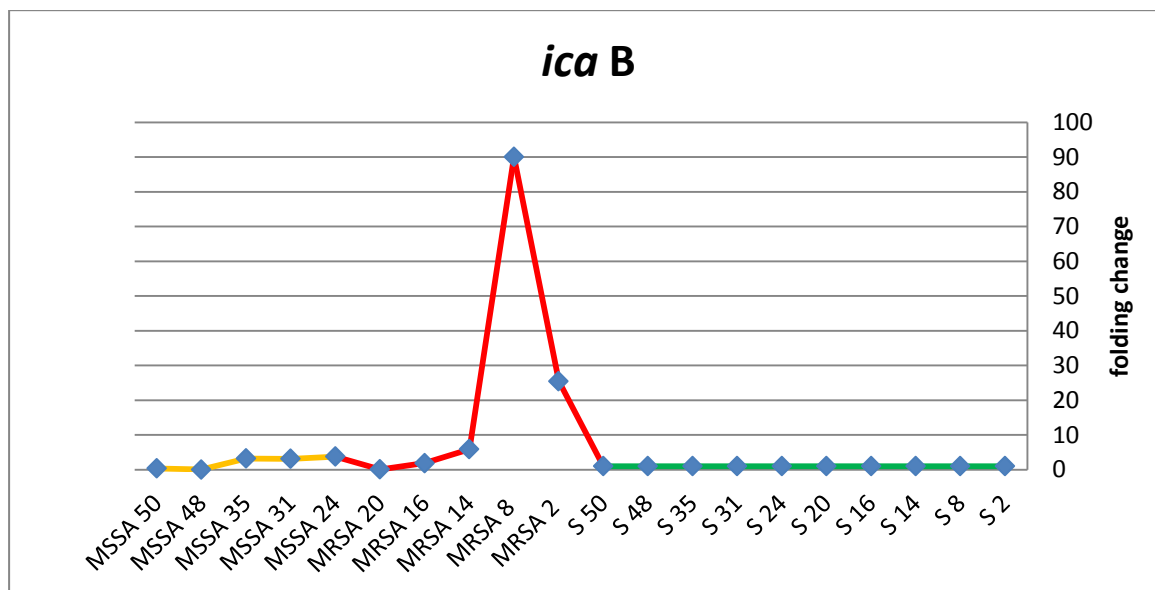
تراوحت قيم حد العتبة cycle threshold (Ct) للجين *ica B* قبل معاملة العزلات بالمضاد ما بين (20.11 – 23.77)، إيجابية التضخيم للجين *ica B* عند قيمة دورة العتبة Ct مبينة في الملحق رقم (8)، تم تحديد التغيرات الكمية في mRNA باستخدام معادلة حد العتبة Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)، كما هو مبين في الجدول (4-14).

بعد معاملة العزلات بالمضاد تم قياس التعبير الجيني الكمي فأظهرت 4 عزلات من مجموع 5 لبكتريا MRSA تعبيراً جينياً جيداً، بينما لم تظهر العزلة SA20 أي تعبيراً جينياً، من جهة أخرى أظهرت 3 عزلات من بكتريا MSSA تعبيراً جيداً، و توقف التعبير الجيني في العزلات (SA50, SA48)، بذلك لم تكن هناك فروق معنوية بين عزلات بكتريا MRSA و MSSA بعد معاملة العزلات قيد الدراسة بالمضاد Azithromycin، كما هو مبين في الشكل (4-13).

جدول (4-14) قيم التعبير الجيني للجين *ica B* قبل وبعد معاملة البكتريا بمضاد

Azithromycin

Group	Samples	Mean (H.K.)	Mean <i>icaB</i>	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	Folding	P value
Azithromycin	SA2	14.11	23.77	9.67	-4.67	25.48	0.049
	SA 8	13.49	22.32	8.83	-6.49	90.06	
	SA 14	14.50	22.45	7.94	-2.55	5.88	
	SA16	16.72	20.11	3.39	-6.18	1.86	
	SA20	15.35	23.66	8.31	-0.28	0.08	
	SA24	13.36	21.79	8.43	-1.92	3.77	
	SA 31	13.92	22.05	8.13	-1.65	3.14	
	SA35	13.63	20.77	7.14	-1.69	3.22	
	SA48	14.12	23.54	9.42	-0.19	0.05	
	SA50	12.44	22.30	9.86	-1.18	0.35	
Control	SA2	11.94	26.28	14.34	0.00	1.00	0.00
	SA 8	12.46	27.78	15.33	0.00	1.00	
	SA 14	11.99	22.49	10.50	0.00	1.00	
	SA16	12.58	22.16	9.57	0.00	1.00	
	SA20	12.54	21.13	8.59	0.00	1.00	
	SA24	12.03	22.37	10.34	0.00	1.00	
	SA 31	12.71	22.49	9.78	0.00	1.00	
	SA35	12.21	21.03	8.83	0.00	1.00	
	SA48	12.79	22.40	9.61	0.00	1.00	
	SA50	11.98	23.02	11.04	0.00	1.00	



شكل (4-13) تغير التعبير الجيني للجين *ica B* قبل وبعد معاملة البكتريا بمضاد الازثرومايسين

أظهرت العزلات البكتيرية تفاوتاً في التعبير الجيني، فقد اظهر الجين *ica B* تعبيراً عالياً بلغ (25.48 – 90.06) للعزلات SA2 و MRSA SA8 على التوالي، في حين بلغ التعبير الجيني للعزلات SA14 و SA16 5.88 و 1.86 على التوالي، اما العزلة SA20 فقد توقف تعبيرها للجين *ica B* بعد معاملتها بالمضاد Azithromycin.

عبرت ثلاث عزلات من بكتريا MSSA بقيمة (3.22, 3.14, 3.77) و هي SA35, SA24, SA31 على التوالي، بينما توقف التعبير الجيني في العزلات SA50, SA48 بعد معاملتها بالمضاد Azithromycin ، والشكل (4-13) يوضح التغير في التعبير الجيني للجين *icaB* قبل وبعد معاملة العزلات قيد الدراسة بمضاد الازثرومايسين.

أجريت دراسة إيرانية لمعرفة مدى تأثير عدة أنواع من المضادات الحياتية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm في بكتريا MRSA و MSSA، لقد لوحظ عدم وجود الجين *ica B* بعد معاملة العزلات بمضاد Erythromycin (Macrolides) ، اما من ناحية التعبير الجيني للجين

icaB فقد كان اعلى في بكتريا MRSA منه في بكتريا MSSA (Tahmasebi، واخرون، 2019).

توصل الباحث (Atshan، و اخرون، 2021) الى ان معاملة بكتريا MRSA و MSSA بمضاد Daptomycin ($\mu\text{g/ml}$ sub-MIC= 0.5) كان له تأثيرات متغايرة، فقد زاد التعبير الجيني في عزلة واحدة من اصل ثلاثة لبكتريا MSSA و عزلة واحدة من اصل ثلاثة من بكتريا MRSA بالنسبة للجين *ica B*.

بينت نتائج الدراسة الحالية ان هناك فرق معنوي قدره (0.038) عند مستوى دلالة 0.05 بين عزلات بكتريا MRSA و MSSA.

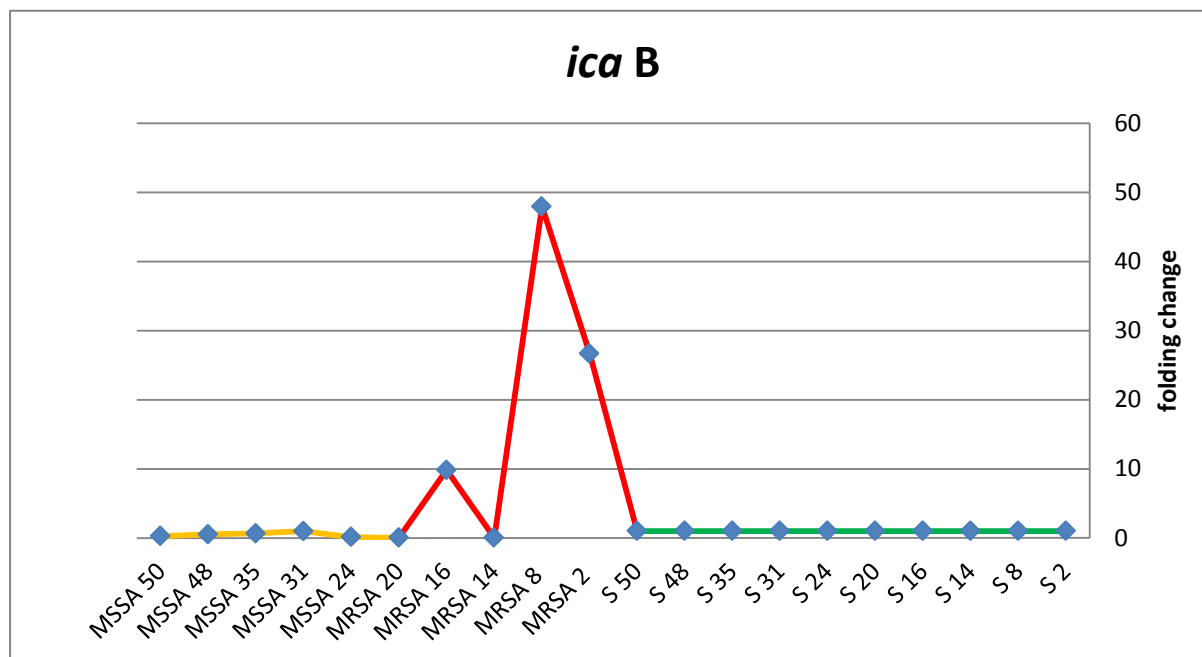
4-9-4 دراسة التعبير الجيني لعزلات بكتريا MRSA و MSSA للجين *ica B* قبل و بعد معاملة بالمضاد Gentamicin

Gene Expression of *ica B* Gene for MRSA MRSA and MSSA Isolates Before and After Treating with Gentamicin

تم دراسة تعبير الجيني الكمي باستخدام تقنية النسخ الكمي qRT-PCR للجين *ica B* لعشر عزلات من بكتريا *S. aureus* (5 عزلات MRSA و 5 عزلات MSSA) قبل و بعد معاملة بالمضاد Gentamicin و التي تضمنت (SA20, SA16, SA14, SA8, SA2) لبكتريا MRSA و (SA50, SA48, SA35, SA31, SA24) لبكتريا MSSA.

تم قياس كمية التعبير الجيني للعزلات انفة الذكر قبل و بعد معاملة بالمضاد Gentamicin لمعرفة مدى تأثيره عند التركيز sub-MIC (16) $\mu\text{g/ml}$ على عملية التعبير الجيني للجين *ica B* و ذلك باستخدام الباءات الموصوفة في جدول (3-14).

لقد تراوحت قيمة حد العتبة Ct للجين *icaB* قبل معاملة العزلات بالمضاد بين (21.19 – 27.80)، كما هو مبين في جدول (4-15) والشكل (4-14) يوضح تغيرات التعبير الجيني .



شكل (4-14) التغير في التعبير الجيني للجين *ica B* قبل وبعد معاملة البكتريا بمضاد الجنتاميسين.

أظهرت نتائج التعبير الجيني الكمي للجين *ica B* ان ثلاث عزلات من بكتريا MRSA عبرت و بقيم عالية فكانت قيمة Folding للعزلات SA2 (26.67) و SA8 (47.94)، اقل من التعبير الذي اظهرته العزلة SA16 الذي بلغ 9.83 ، بينما توقف التعبير الجيني في العزلات SA14 و SA24.

من جهة اخرى لم تظهر أي من عزلات بكتريا MSSA تعبيراً جينياً مما يدل على توقف عملية التعبير الجيني للجين *ica B* فيها بعد معاملتها بالمضاد Gentamicin، ملحق رقم (8).

جدول (4-15) قيم التعبير الجيني للجين *icaB* قبل وبعد معاملة البكتيريا بمضاد Gentamicin

Group	Samples	Mean (H.K.)	Mean <i>ica B</i>	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	Folding	P value
Gentamicin	SA2	11.98	21.58	9.60	-4.74	26.67	0.038*
	SA 8	13.19	22.93	9.74	-5.58	47.94	
	SA 14	12.80	27.80	14.99	4.49	0.04	
	SA16	13.21	22.24	9.03	-0.54	9.83	
	SA20	10.56	24.46	13.90	5.31	0.03	
	SA24	11.76	25.18	13.41	3.07	0.12	
	SA 31	11.58	21.39	9.80	0.03	0.98	
	SA35	11.79	21.19	9.40	0.58	0.67	
	SA48	12.10	22.67	10.57	0.96	0.52	
	SA50	13.07	23.18	10.11	-0.93	0.27	
Control	SA2	11.94	26.28	14.34	0.00	1.00	0.00
	SA 8	12.46	27.78	15.33	0.00	1.00	
	SA 14	11.99	22.49	10.50	0.00	1.00	
	SA16	12.58	22.16	9.57	0.00	1.00	
	SA20	12.54	21.13	8.59	0.00	1.00	
	SA24	12.03	22.37	10.34	0.00	1.00	
	SA 31	12.71	22.49	9.78	0.00	1.00	
	SA35	12.21	21.03	8.83	0.00	1.00	
	SA48	12.79	22.40	9.61	0.00	1.00	
	SA50	11.98	23.02	11.04	0.00	1.00	

* P value < 0.05

ليس لجميع المضادات الحيوية نفس التأثير على العمليات الخلوية للبكتيريا عند معاملة

بتركيز sub-MIC لأن ذلك قد يعتمد على نوع البكتيريا و مدى امتلاكها عوامل ضراوة ضد هذا

المضاد، و عليه يجب تطوير القدرة على قمع التعبير الجيني لجينات عوامل الضراوة في بكتريا *S.aureus* (Mun، و اخرون، 2016).

اكّد الباحث Otto و اخرون (2013) بأن التركيز ما قبل المثبط sub-MIC للمضاد Clindamycin له القدرة على تقليل التعبير الجيني للجينات *hla*, *pvl*, *spa* في بكتريا *S.aureus*.

4-9-5 دراسة التعبير الجيني للجين *ica C* في بكتريا MRSA و MSSA قبل و بعد معاملتها بالمضاد Azithromycin

Gene expression of *ica C* in MRSA and MSSA Isolates Before and After Treating with Azithromycin

تم التحري كمية التعبير الجيني للجين *ica C* لعشر عزلات من بكتريا *S.aureus* (خمس عزلات MRSA و خمس عزلات MSSA) قبل و بعد معاملتها بالمضاد Azithromycin عند التركيز sub-MIC (128 µg/ml) باستخدام تقنية النسخ الكمي qRT-PCR و تضمنت العزلات (SA20, SA16, SA14, SA8, SA2) لبكتريا MRSA و (SA50, SA48, SA35,) و (SA31, SA24) لبكتريا MSSA و ذلك باستخدام البادئات الموصوفة في الجدول (3-14). وقد بلغت قيم حد العتبة Ct (threshold cycle) للجين *icaC* قبل معاملة العزلات بالمضاد ما بين (24.25 – 31.12) كما هو مبين في الجدول (4-16).

بعد معاملة العزلات قيد الدراسة بالمضاد Azithromycin تم قياس التعبير الجيني الكمي فبلغ في عزلة SA8 (59.79) و العزلة SA2 (14.76) و في SA16 (9.89) و (2.13) في عزلة SA14 اما في العزلة SA20 فقد توقف التعبير الجيني للجين *ica C*.

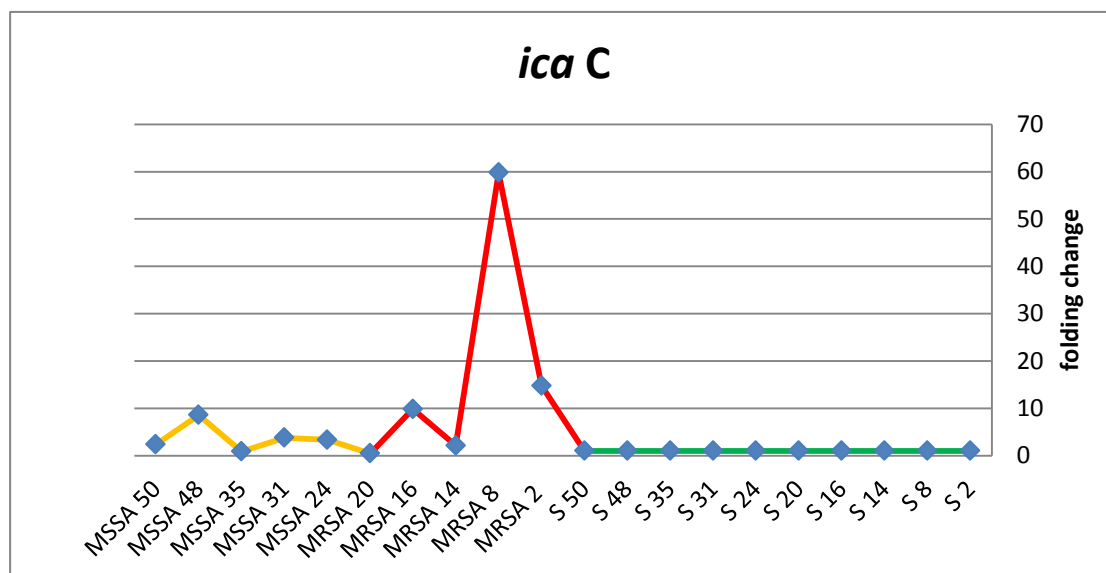
جدول (4-16) التعبير الجيني للجين *icaC* قبل وبعد معاملة البكتريا بمضاد

الازثرومايسين

Group	Samples	Mean (H.K.)	Mean <i>ica C</i>	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	Folding	P value
Azithromycin	SA2	14.11	27.13	13.02	-3.88	14.76	1.00
	SA 8	13.49	26.28	12.79	-5.90	59.79	
	SA 14	14.50	26.29	11.78	-1.09	2.13	
	SA16	13.97	26.27	12.30	0.52	9.84	
	SA20	13.86	24.39	10.53	-1.58	0.47	
	SA24	13.36	24.57	11.21	-1.74	3.33	
	SA 31	13.92	24.33	10.40	-1.91	3.77	
	SA35	13.63	25.01	11.38	0.19	0.88	
	SA48	12.92	31.12	18.20	4.62	8.60	
	SA50	13.22	24.25	11.03	-7.84	2.36	
Control	SA2	11.94	28.85	16.90	0.00	1.00	0.00
	SA 8	12.46	31.15	18.69	0.00	1.00	
	SA 14	11.99	24.87	12.88	0.00	1.00	
	SA16	12.58	24.36	11.78	0.00	1.00	
	SA20	12.54	24.65	12.11	0.00	1.00	
	SA24	12.03	24.98	12.95	0.00	1.00	
	SA 31	12.71	25.03	12.32	0.00	1.00	
	SA35	12.21	23.40	11.19	0.00	1.00	
	SA48	12.79	26.37	13.58	0.00	1.00	
	SA50	11.96	28.83	18.87	0.00	1.00	

*Pvalue<0.05

تراوحت قيم التعبير الجيني بين (2.36 – 8.60) في اربع عزلات من بكتريا MSSA في حين توقف التعبير الجيني العزلة SA35 كما هو مبين في الشكل (4-15).



الشكل (4-15) التغير في التعبير الجيني للجين *icaC* قبل وبعد معاملة البكتريا بمضاد

الازثرومايسين. : SA رمز بكتريا *S.aureus*

اشارت الدراسة الحالية الى عدم وجود فرق معنوي بين قيم التعبير الجيني في عزلات MRSA و MSSA للجين *ica C* بعد معاملتها بالمضاد Azithromycin، في حين أوضح Tahmasebi وآخرون (2019) ان العزلات الأقوى تكويناً للغشاء الحيوي Biofilm سواء كانت MRSA او MSSA هي الأكثر تعبيراً للجين *ica C*، وأكد ان عملية التعبير الجيني للغشاء الحيوي هي عملية معقدة تتحكم بها العديد من العوامل التي منها توافر المغذيات الضرورية والظروف البيئية اللازمة .

4-9-6 دراسة التعبير الجيني للجين *icaC* في بكتريا MRSA و MSSA قبل و بعد معاملتها

بمضاد Gentamicin

Gene expression of *ica C* in MRSA and MSSA Isolates Before and After Treating with Gentamicin

تمت دراسة التعبير الجيني للجين *ica C* لعشر عزلات من بكتريا *S. aureus* (5 عزلات MRSA و خمس عزلات MSSA) قبل و بعد معاملتها بالمضاد Gentamicin عند التركيز sub-MIC (16 µg/ml) باستخدام تقنية النسخ الكمي qRT-PCR، تضمنت العزلات SA20, SA16, SA14, SA8, SA2 لبكتريا MRSA و (SA50, SA48, SA35, SA31, SA24) لبكتريا MSSA. تم استخدام البادئات الموصوفة في جدول (3-14).

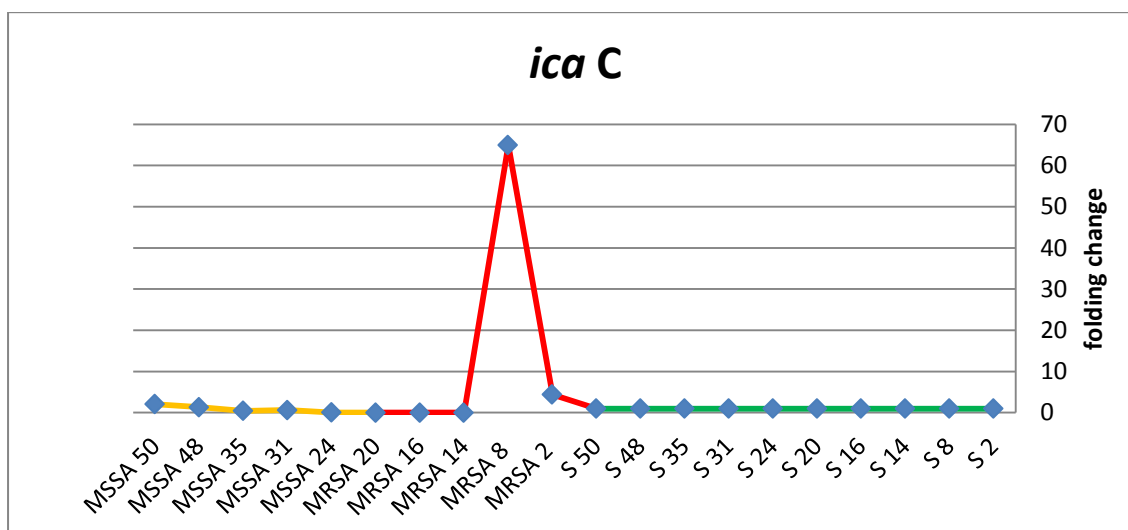
لقد تراوحت قيم حد العتبة Ct للجين *ica C* قبل معاملة العزلات بالمضاد Gentamicin ما بين (24.16 - 31.27).

أظهرت نتائج التعبير الجيني للجين *ica C* بعد معاملة العزلات قيد الدراسة بالمضاد Gentamicin بالنسبة لبكتريا MRSA ان عزلتين فقط قد عبرت جينياً SA8 (64.97) و SA2 (4.42) اما باقي عزلات بكتريا MRSA فقد توقف التعبير الجيني فيها بعد معاملتها بالمضاد، في حين لم تعبر سوى عزلتين من بكتريا MSSA بعد معاملتها بالمضاد Gentamicin و هي SA50 (2.07) و SA48 (1.35)، و بذلك فلم تكن هناك فروق معنوية بين قيمة Folding للبكتريا MRSA و MSSA بعد معاملتها بالمضاد Gentamicin، كما مبين في الجدول (4-17) والشكل (4-16).

جدول (4-17) التعبير الجيني للجين *icaC* قبل وبعد معاملة البكتريا بمضاد

الجنتاميسين

Group	Samples	Mean (H.K.)	Mean <i>ica C</i>	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	Folding	P value
Gentamicin	SA2	11.98	26.74	14.76	-2.14	4.42	1.00
	SA 8	13.19	25.86	12.67	-6.02	64.97	
	SA 14	12.80	31.10	18.30	5.42	0.02	
	SA16	12.21	31.27	19.06	7.28	0.01	
	SA20	10.56	28.58	18.01	5.90	0.02	
	SA24	11.76	28.93	17.17	4.22	0.05	
	SA 31	11.58	24.55	12.97	0.65	0.64	
	SA35	11.79	24.16	12.37	1.18	0.44	
	SA48	12.10	25.25	13.15	-0.43	1.35	
	SA50	11.22	23.21	11.99	-6.88	2.07	
Control	SA2	11.94	28.85	16.90	0.00	1.00	0.00
	SA 8	12.46	31.15	18.69	0.00	1.00	
	SA 14	11.99	24.87	12.88	0.00	1.00	
	SA16	12.58	24.36	11.78	0.00	1.00	
	SA20	12.54	24.65	12.11	0.00	1.00	
	SA24	12.03	24.98	12.95	0.00	1.00	
	SA 31	12.71	25.03	12.32	0.00	1.00	
	SA35	12.21	23.40	11.19	0.00	1.00	
	SA48	12.79	26.37	13.58	0.00	1.00	
	SA50	11.96	28.83	18.87	0.00	1.00	



الشكل (4-16) التغير في التعبير الجيني للجين *icaC* قبل وبعد معاملة البكتريا بمضاد الجنتاميسين.

ذكرت دراسة على بكتريا MRSA المعزولة من المرضى في مستشفيات بغداد ان مضاد

Gentamicin ($\mu\text{g/ml}$ 16 = sub-MIC) قادر على التقليل من التعبير الجيني للجين *hIA* و

عملية تكوين الغشاء الحيوي، و أوضحت الدراسة ان التغير كان طفيفاً أي اقل من 2 للعزلات

المكونة للغشاء الحيوي (Al-Mathkhury و Jaddoa، 2018).

من الملاحظ ان معاملة العزلات بمضاد الجنتاميسين لم يؤثر كثيراً على التعبير الجيني في

عزلات بكتريا MRSA في مرحلة استنساخ mRNA، لكن تأثيره قد ظهر بعد هذه المرحلة على

سبيل المثال مرحلة الترجمة Translation او مسار التخليق الحيوي Biosynthesis pathway،

لان ارتباط المضاد بمواقع مستهدفة على الرايبوسوم قد يسبب اضطراب طفيف في عمله، و قد

يؤدي الى أخطاء في الية الترجمة او اطلاق كميات صغيرة من الببتيدات غير المكتملة ، ملحق

رقم (9).

الاستنتاجات Conclusions

تبين من الدراسة :

1- اوضح التحري الجزيئي ان جميع العزلات امتلكت الجينات المشفرة لتكوين الغشاء الحيوي

(*icaA*, *icaB*, *icaC*) بينما تباينت نسب وجود الجينات المشفرة لعوامل الضراوة الاخرى (

tst, sea, seb, sec, sed, see, hlb, hlg, luk-s, luk-f).

2- بينت نتائج qRT-PCR إلى وجود تعبير عالٍ للجينات المشفرة لانتاج الغشاء الحيوي في

بكتريا MRSA حتى بعد معاملتها بمضادات Azithromycin و Gentamicin بينما قل

اوتوقف في عزلات MSSA بعد معاملتها بالمضادات.

3- اظهرت جميع العزلات مقاومة للبنسلين كما ابدت كافة عزلات المكورات العنقودية الذهبية

المقاومة للمثسلين مقاومة بنسبة 100 % للمضادين الجنتاميسين والازثرومايسين بينما كانت

مقاومة الحساسة للمثسلين 32 % و 61.69 % لكلا المضادين وعلى التوالي .

4- شكلت عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* اعلى نسبة من بقية الانواع

الاخرى في عينة الدراسة اذ بلغت 55عزلة (39%) من العينات الكلية .

5- بلغ عدد العزلات لبكتريا *S.aureus* المقاومة للمثسلين 21 (38.18%) والحساسة للمثسلين

34 (61.81%).

التوصيات Recommendations

- 1- اجراء الدراسات الوبائية المستمرة للتحري عن مصادر العدوى بالمكورات العنقودية الذهبية وطرائق انتقالها للحد من انتشارها .
- 2- التحري عن اليات مقاومة البكتريا لمضادات الحياة ودراسة تأثيرات مزيجاتها على البكتريا المقاومة .
- 3- التحري الجزيئي عن الجينات المشفرة لانتاج عوامل الضراوة الاخرى في البكتريا.
- 4-دراسة تأثير المستخلصات النباتية على التعبير الجيني لبكتريا *S.aureus* المنتجة للغشاء الحيوي والمقاومة للمضادات الحياتية .
- 5-تجربة تأثير المواد النانوية على التعبير الجيني لعوامل الضراوة لبكتريا *S.aureus* المقاومة للمضادلت الحياتية.

المصادر العربية

السعدي ، عادل عبيد حسون و فاضل ، عباس و كرار ، رياض و سعدي ، جمهورية. (2014).

استخلاص وتنقية البروتين المرتبط بالفايبرونكتين من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية

. مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية . 3 (22) : 1303 – 1309 .

عبد الله ، ثريا كاظم اسماعيل .(2018).الفاعلية ضد مايكروبية لبعض المستخلصات النباتية

ومضادات البيتالاكتام على بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus*

aureus المعزولة من اخماج الدمامل .رسالة دبلوم عالي .كلية العلوم –جامعة

تكريت.

الناشي ،علي عبد الرحيم و المنصوري ،ريام وسام حسن .(2017) .التحري عن الطراز المظهري

والجزئي لعوامل الضراوة لبكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.*

المحللة للدم والمعزولة من التهابات المسالك البولية في الديوانية .مجلة القادسية للعلوم

الصرفة .المجلد 22 .العدد 3 .

المصادر الاجنبية

- Abbasi** ,S. and Zamanzad ,B. (2017) .Detection of *ica* ABCD genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients Iran. *Journal Medical and Microbiol Infection Disease* . vol 3(3-4). pp:67-70.
- Acosta**, A.C.; Oliveira, P.R.; Albuquerque, L.; Silva, I.F.; Medeiros, E.S.; Costa, M.M.; Pinheiro, J.W. Jr. and Mota, R.A. (2018). Frequency of *Staphylococcus aureus* virulence genes in milk of cows and goats with mastitis. *Pesq. Vet. Bras.*vol 38(11).pp: 2029-2036.
- Ad** C. F.; Gorkum,S.V. and Vlooswijk, J. (2019).Minimal inhibitory concentration of omadacycline and doxycycline against bacterial isolates with known tetracycline resistance determinants. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. vol 94(1).pp:78-80..
- Ahmad rajabi**, R.; Khavidaki, L.; Neyestanaki, D. and Fasihi, Y. (2017). Molecular analysis of immune evasion cluster (IEC) genes and intercellular adhesion gene cluster (ICA) among methicillin-resistant and methicillin-sensitive isolates of *Staphylococcus aureus*. *J PREV.MED.HYC* .vol 58. Pp:308-314.
- Alexander**, S. K. and Sterte, D. (2001). Microbiology :A Photographic ATLAS for laboratory. Benj. Cum . Canada.
- Algburi**,A.;Comito,N.Kashtanov,D.;Leon,M. and Chikindas, M .(2017).Control of biofilm formation :Antibiotics and beyond .*Applied and Environmental Microbiology* .vol 83(3).e 02508-16.

- Al-Khafaji, A.N.**, (2018). Isolation and Identification of Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* and Detection their Ability to the Production of Virulence Factors. *Journal of University of Babylon*, 26(8),pp.100-111.
- Al-soud, W.A.** (2019). Detection of panton-valentine Leukocidin gene in Swedish isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* using Multiplex PCR assay. *Journal of Bacteriology and parasitology* .vol 10(2). pp:4172-4178.
- Al-Zoubi, M.**; Al-Tayyar, S. I.; Ali, H. E.; Al Jabali, A. and Khudairat S. (2015). Antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in Northern area of Jordan . Iran. *J. MICROBIAL*.vol 7 (5).pp: 265-272.
- Amagai, M.**; Matsuyoshi, N.; Wang, Z.;Andl,C.;Stanley,J . (2000). Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med*.vol 6.pp: 1275–1277.
- Argudin, M.**; Mendoza, M. and Rodicio, M. (2020). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *ISSN. Madpi toxins Journal* .vol 10 (2). Pp:1751-1773.
- Asokan, S.**; Eashwar, A. and Gopalakrishnan, S. (2019). Staphylococcal scalded skin syndrome-A casereport. *Indian Journal of public Health Research and Development* .vol 10 (8). Pp:1501-1509.
- Atilano ,M.**;Pedro,M.;Pereira .J.;Reed,P;Veiga,H.;Mariana,G. and Sergio,R.(2010).Teichoic acid are temporal and spatial regulators of peptidoglycan cross-linking *Staphylococcus aureus* .*Pnas.Org* .vol 107(44).pp:18991-18996.
- Atshan, S.**; Hamat, A.; Coolen, J.L.; Dykes,; Sekawi, Zamberi; Mullins, J.; Than, Leslie T.L.; Abduljaleel, A.; Kicic, Anthony.(2021).

The Role of Subinhibitory Concentrations of Daptomycin and Tigecycline in Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus* .*ANTIBIOTICS* .v 10 (1).pp: 39-40.

Atshan, S.; Shamsudin, M.; Karunanidhi, A.; Belkum, A.; Lung, L.; Sekawi, Z.; Nathan, J.; Ling, K.; Seng, J.; Ali, A.; Abduljaleel, S. and Hamat, R.(2013). Quantitative PCR analysis of genes expressed during biofilm development of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Infection Genetics and Evolution*. vol 18. pp:106-112.

Bastidas, C.; Granda, I.; Navarrete, D.; Monsalre, M.; Coral, M. and Cifuetes, S.(2019). Antibiotic susceptibility profile and prevalence of *mec A* and *Luk-S pvl Luk- F pv* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from nasal and pharyngeal sources of medical students in Ecuador. *Infection and Drug Resistance* .vol 12. pp:2553-2560.

Bauer, S.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C. and Turck, M.D. (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standerized single disk method. *American journal of clinical pathology*. vol 45(4_ts).pp: 493-496 .

Benson, A .(2002).Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology. 8th.ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., NewYork.

Berni,F.; Enotarpi,J.; Voskuilen,T.; Li,S.; Gijs A. Marel,V. and Codée,j. (2021).Synthetic carbohydrate-based cell wall components from *Staphylococcus aureus*. *Drug Discovery Today: Technologies*.vol 3.pp:1740-6749.

- Bitrus**, A.; Peter, O.; Abbas, M. and Goni, M.(2018). *Staphylococcus aureus*: A review of antimicrobial resistance mechanisms. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*. vol 4 (2). pp :43-54.
- Bojang**, A.; Baines, S.; Donovan, L.; Guerillot, R.; Steven, K.; Higgs, C.; Bottom ley, C.; Secka, O.; Schultz, M.; Silva, A.; Seemann, T.; Stinea, T.; Roca, A. and Howden, B.(2019). Genomic investigation of *Staphylococcus aureus* recovered from Gambian women and new borns following oral dose of intra-partum azithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* .vol 74 (11). Pp:3170-3178.
- Bolivar** ,A.M.; Agustina,R. and Garcia,L.P. (2014). PCR and PCR-multiplex: critical parameters and standardization protocol. *Avances en Biomedicina*.vol 3.pp:25–33.
- Boucher**, H.; Miller, L. G. and Razonable, R. R. (2014) .Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin Infect Dis. Sep*.vol 15(51). pp: 183-197.
- Bozdogan**, B. and Appelbaum, P.(2004). Oxazolidinones activity, mod of action and mechanism of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. vol 23. pp:113-119.
- Brooks**, G. I.; Butel, J. S. and Morse, S. A. (2010). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology .22nd ed. McGraw – Hill Inc. New York.
- Brooks**, G.F.; Carroll, K.C.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2007).Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology . 24th.ed. The McGraw-Hill Companies , Inc., New York.pp.224-232.

- Brown, D.F;** David; Edwards; Peter, Hawkey, M; Donald Morrison, D; Geoffrey, L. Ridgway; Towner, K. J. and Michael, W. D. Wren.,(2005) on behalf of the Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Hospital Infection Society and Infection Control Nurses Association Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* .vol 56.pp:1000–1018.
- Chan, C. L.;** Gillbert , A.; Basuino, L. Hamitton, K. and Chatterjee, S. S.(2016). PBP4 mediates high-level resistance to new generation cephalosporins in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Agents Chemother.*ACC.e00358-16 .pp:1-24.
- Chen,X.;** Wu,Z.; Zhou,Y.; Zhu,J.; Li,K.; Shao,H. and Wei,L.(2017) .Molecular and virulence characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in burn patients. *Frontiers in Laboratory Medicine*. vol 1(1) . Pp: 43-47, ISSN 2542-3649.
- Cho, J.;** Xuan C.; Miller, L. and Lucky ,N. S. (2010). Rnase 7 Can Prevent *Staphylococcus Aureus* Skin Colonization. *J. Invest. Dermatol*.vol 130(12).pp: 2703–2706.
- CLSI .** (2018). Clinical Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial susceptibility Tests for Bacteria that grow Aerobically; approved standard 11th ed. CLSI Document M07-A11, ASM Press: Wayne Pennsylvania.
- CLSI.** (2018a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th ed. CLSI standard M02. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- CLSI.**(2018b). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.USA.
- 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 .
- Congestri,F.;Pedna,M.F.;Fantini,M.;Samuelli,M.;Schiavone,P.;Torri,A.** and Sambri,V.(2017).Comparison of time to detection values between BacT/ALTER VIRTUO and BacT/ALTER 3D instruments for clinical blood culture samples .*International Journal of Infection Diseases*.vol 62.pp:1-5.
- Contreras,G.P.;** Espunes,T.S.;Perez,E.M.;Moctezuma,J.R.;Aranda ,D.A.;Abascal,E.N.and Vaca,S.(2012).Virulence markers in *Staphylococcus aureus* strains isolated from hemodialysis catheters of Mexican patients .*Advances in Microbiology* .vol 2.pp:476-487.
- Costa, A. R.; Deivid, W. F.; Batistão , R. M. ; Ribas , A. M.; Sousa1, M.; Olivia. P. and Claudia , M. B.(2013).** *Staphylococcus aureus* virulence factors and disease Microbial pathogens and strategies for combating them: *sci . tech. and edu*.pp:702-710.
- Cota, A.; Chifiriue, M.; Dinu, S.; Bucur, M.; Iordache, C.; Banu, O.; Drecea, O.; Larion, C. and Lazar, V. (2010).** Screening of molecular virulence markers in *Staphylococcus aureus* and *pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical infection.*International Journal of Molecular Sciences* .vol 11. Pp:5273-5291.

- 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 ed . Doc House, The water front , Cape Town 8001, South Africa .
- Dağı**, H. T.; Findik, D.; Demirel, G. and Arslan, U. (2015). Detection of Methicillin Resistance and Various Virulence Factors in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Nasal Carriers. *Balkan medical journal*.vol 32(2).pp: 171–175.
- Darboe**, S.; Dobreniecki, S.; Jarju, S.; Jallow, M.; Mohammed, NI.; Wathuo, M.; Ceesay B, Tweed S, Basu Roy R, Okomo U, Kwambana-Adams B, Antonio M, Bradbury RS, de Silva TI, Forrest K, Roca A, Lawal BJ, Nwakanma D and Secka ,O. (2019). Prevalence of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) and Antimicrobial Resistance in Community-Acquired Clinical *Staphylococcus aureus* in an Urban Gambian Hospital: A 11-Year Period Retrospective Pilot Study. *Front. Cell. Infect. Microbiol*.vol 9 .pp:170-177.
- Das**, M.; Sabuj, A.; Haque, Z.; Baruna, N.; Pondit, A.; Mahmud, M.; Khan, F. and Saha, S. (2019). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from human dental infection. *ISSN African Journal of Microbiology Research* .vol 13 (14). Pp:273-278.
- Diab**, M.; Ibrahim, N.; Elnaker, Y.; Zidan, S. and Saad, M.(2021). Molecular detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin genes isolated from mastitic milk and humans in El-Behira, Egypt. *International Journal of one health* .vol 7(1). pp:70-77.
- Dinos**, G.; Athanasso, C.; Missiri, D.; Giannopoulou, P.; Valchogiannis, I.; Papadopoulos, G.; papaionou, D. and Kalpaxis, D. (2016).

Chloramphenicol derivatives as antibacterial and anticancer agents: Historic problems and current solutions. *Antibiotic Journal*. vol 5.Issue 20.

Doudoulakakis, A.; Spiliopoulou, I.; Syridou, G.; Giormezis, N.; Militopoulou, M.; Lebessi, E. and Toslia, M. (2019). Emergence of Staphylococcal scalded skin syndrome associate with new toxigenic Methicillin. Susceptible *Staphylococcus aureus* clone. *Journal of Medical Microbiology* .vol 68. Pp:48-51.

Eftekhar F, Rezaee R, Azad M, Azimi H, Goudarzi H, et al. (2017). Distribution of Adhesion and Toxin Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Recovered From Hospitalized Patients Admitted to the ICU. *Arch Pediatr Infect Dis*.vol 5(1):e39349.

Ehterami,P. ;Rajabpour,M.; Jahromy,S. and Noorbakhsh ,F.(2017). Evaluation expression icaabcd biofilm formation genes in *staphylococcus aureus* by real-time PCR. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*.vol 8(4).pp:468-471.

El-Essawy, A.K.; Roshdy, R.; Abu shady, H. and Emara, A.(2015). Prevalence of panton valentine Leukocidin gene in Methicillin-Resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* isolated from Egyptian hospitals. *Egyptian Journal. Bot* .vol 55 (1). pp:1-14.

Elfeky, D.; Awad, A.; Elshobaky, M. and Elawady, B.(2020). Effect of ceftaroline, cancomycin, Gentamycin, Macrolides and ciprofloxacin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates: An in vitro study. *surgical Infections* .vol 21 (2). PP:150-157.

Forbes, B. A.; Sahm, D. F. and Weissfeld , A. S. (2007). Baily and

scotts Diagnostic Microbiology. 11th ed . Mosby , Inc . Baltimore, USA. Pp: 302-309.

Foster ,C.E.;Kok ,M.;Flores ,A.R.;Minard ,C.G.;Luna ,R.A.;Lamberth ,L.B.; Kaplan ,S.L. and Hulten K.G.(2020).Adhesion genes and biofilm formation among pediatric *Staphylococcus aureus* isolates from implant- associated infections . *Journal PLOS ONE* .vol 10 .pp:1371-1382.

Gajdacs, M. (2019). The continuing threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics Journal* .vol 8 (2). Pp:52-58.

Gandra, E.; Silva, A.F.;. and da Silva, J.A. (2016). Detection by multiplex PCR of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* in artificially contaminated milk. *Ciênc. Rural*.vol 46(8).pp: 1418-1423.

Garciaa, S.N.; Osburn, B.I. and Cullor, J.S. (2019). A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One Health*.vol 7.pp: 100086.

Geo , F. B. ; Karen, C. C. ; Janet, S. B.; Stephen, A. M. (2007) . Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical microbiology . New York : Mc Graw Hill Medical. 24th ed.

Ghasemian,A.;Peerayeh,Sh.N.;Bakhshi,B.and Mirzaee,M .(2016).Comparison of biofilm formation between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* .*Iranian Biomedical Journal* .vol 20(3).pp:175-181.

Gowrishanker,S.; Kamaladevi,A.; Balamurugan,K. and Pandia, Sh.K.(2016) .In vitro and in vivo biofilm characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from patients

associated with pharyngitis infection. *BioMed Research International* .vol (10).pp:1155-1169.

Goyal, N.; Miller, A.and Tripathi, M. J. P. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) . *The Bone & Joint J* . pp: 4-9.

Gregorio, E.; Esposito, A.; Vollaro, A.; Fenza, m.; DAlonzo, D.l Migliaccio, A.; Iula, V. Zarrilli, R. and Guaragna, A. (2020). N-Nonyloxypentyl-L-Deoxynojirimycin inhibits growth of biofilm formation and virulence factors expression of *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics* .vol 9. Pp: 362-376.

Gui, Z.; Wang, H.; Ding, T.;Wei,Z.;Xiyi,Z. and Weihua,C.(2014). Azithromycin Reduces the Production of α -hemolysin and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* . *Indian J Microbiol* .Vol 54.pp: 114–117 .<https://doi.org/10.1007/s12088-013-0438-4>.

Hamza, A.; Yoe, C.; Puah, S.; Chua, K. and Chew, C. (2019). *Staphylococcus aureus* infections in Malaysia: A review of antimicrobial resistance and characteristics of the clinical isolates, 1990-2017. *Journal antibiotics* .vol 8. Pp:128-135.

Hamza,L.F.;Al-marzoqi,A.H. ; Aziz,G.M.and Al-taee,Z.M.(2015) . Molecular study of virulence gene of *Staphylococcus aureus* isolates from various clinical origins by PCR .*Medical Journal of Babylon* .vol 12(3).pp:677-688.

Hassan ,R.; Barwa,R. ; Sokkary , M. M. and Ashraf ,D. (2017). Virulence characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from different clinical sources .*N. Egypt. J. Microbiol*.vol ,48.pp:14-30.

- Hassan, A.;** Saeed, R.; Abdulrahman, Z.; Abdulrahman, A. and Abdulla, N.(2020). Molecular detection of Enterotoxin genes sea, seb, sad and see in *Staphylococcus aureus* isolated from different clinical sources in Erbil city. *Journal of critical Reviews*. Vol 7(15) pp:4632-4639.
- Hassuny, A.** (2014). Detection of virulence factors *hla* and *hly* *Staphylococcus aureus* using PCR technique. *Medical Journal of Babylon* .vol 11 (4). Pp: 1000-1006.
- Hayashida, A.;** Bartlett, A.; Foster, T. and Park, P. (2009). *Staphylococcus aureus* beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. *American Journal of Pathology*.vol 174(2).pp: 509–518.
- Hiltunen, A.K.;** Savijoki, K.; Nyman, T.A.; Miettinen, I.; Ihalainen, P.; Peltonen, J.; Fallarero, A.(2019) .Structural and Functional Dynamics of *Staphylococcus aureus* Biofilms and Biofilm Matrix Proteins on Different Clinical Materials. *Microorganisms*.vol 7(12).pp: 584-591.
- Horvath, A.;** Dobay, O.; Sahin, T.; Juhasz, E.; Pongracz, J.; Ivan, M.; Fazakas, E. and Kristof, K.(2020). Characterization of antibiotic resistance, virulence, clonality and mortality in MRSA and MSSA blood stream infections at a tertiary-level hospital in Hungary: a 6-year. Retrospective study. *Annals of clinical Microbiology and Antimicrobials*. vol 19 (17). pp:1186-1197.
- Houri, H.;** Samadpanah, M.; Tayebi, Z.; Norouzzadeh, R.; Malekabad, E. and Dadashi, A. (2020). Investigating the toxin profiles and clinically relevant anti biotic resistance genes among

- Staphylococcus aureus* isolates using multiplex-PCR assay in in Tehran-Iran. *Journal Homepage Gene Reports* .vol19. pp:1-6.
- Ibler** , K. S. and Kromann ,B .C.(2014) . Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology .vol 7,pp: 59–64.
- Ishii**, K., Adachi, T., Yasukawa, J., Suzuki, Y., Hamamoto, H. and Sekimizu, K., (2014). Induction of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus* by pulmonary surfactant. *Infection and immunity*. 82(4). Pp:1500-1510.
- Jaddoa**, N. and Al-Mathkhury, H. (2018). Gentamicin modulates the gene expression of HLA in methicillin resistance *Staphylococcus aureus* biofilm. *Journal of Global Pharma Tennology* .vol 10 (7). Pp: 61-70.
- Jalali**,M.; Zaborowska,J. and Jalali,M.(2017). The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. ch-1. *Basic Science Methods for Clinical Researchers, Academic Press*, Pp: 1-18.
- James** H.; Karen C.; Carroll, G.(2015). Manual of clinical microbiology. *Public Health England*. 11th ed. B, III,pp:354-422.
- Jang**, S.,(2016). Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. *Journal of Microbiology*.vol 54(1), pp:1-8.
- Jaran**, A. S. (2017). Antimicrobial Resistance Patterns and Plasmid Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Clinical Specimens in Saudi Arabia. *European Scientific Journal* March 2017 edition.vol 13(9).pp: 1857 – 7881.
- Jawetz** , E . ; Brooks , G . F . ; Butel , J . S . and Morse , S . A . (2013). Jawetz , Melnick and Adelbergs Medical microbiology . 23rd ed

Mc Graw HillCom.Singapore.

Jawetz, M. and Adelberg's, E.A. (2020). Medical Microbiology. 28th ed.,
The McGraw-Hill Companies, Inc., New Yourk, USA.

Kalyani, N., & Saraswathy, N. (2014). Production of extracellular lipase by a new strain *Staphylococcus aureus* NK-LB37 isolated from oil contaminated soil. *African Journal of Biotechnology* ,vol 13(28),pp: 2858-2866.

Kang, J.; Dietz, M. and Li, B.(2019). Antimicrobial peptide (L -37) is bactericidal against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Plosone Journal* .vol 14(6). P.eo 216676.

Karlsson , A .; Saravia , O.; Tegmark , M. E . and Arvidson , S . (2001) . Decreased amounts of cell wall associated protein a and fibrinectin – binding regulation protein *Staphylococcus aureus*. sar a mutants due to up . J. Infect – Immun. 69:4742-4748.

Keikhaie, K. R . ; Sargazi ,A . ; Hassan Shahian,M.and Shahi,Z.(2017). Detection of intercellular adhesion genes (*icaA* and *icaD*) in *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Zabol-Iran .*Research in Molecular Medicine*.vol 5(1).pp:40-43.

Khan, T.; Sanchez, K.; Surana, V.; Sheje, A.; Patel, K. and Dravyakar, B.(2018). DNagyrase inhibitors progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents. *Biomed pharma Cother* .vol 103. PP:923-938.

Khoramrooz, S. S.; Dolatabad, S. A.; Dolatabad, F. M.; Marashifard, M.; Mirzaii, M.; Dabiri, H.; Haddadi, A.; Rabani, S. M.; Shirazi, H., & Darban-Sarokhalil, D. (2017). Detection of tetracycline resistance genes, aminoglycoside modifying enzymes, and

coagulase gene typing of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in the Southwest of Iran. *Iranian journal of basic medical sciences*, vol 20(8).pp: 912–919.

Kloos, W. E. and Schleifer, K. H. (1975) . Isolation and Characterization of *Staphylococcus* from human skin .II Description of four new species :*S. aureus* ,*S.capitis* , *S.hominis* and *S.simulans* . *J. Bacteriol.*vol 25.pp:62-79 .

Koneman, E.W.; Allen, S. D.; Jand, W. M.; schreckenberger, P. C. and winn, W.C. (1997). Color atlas and text book of diagnostic microbiology .5th ed., J. B. lippincot-Ravenpublishers Philadelphia, USA.

Kong, C.; Chee, C.F.; Richter, K.; Thomas, N.; Rahman, N.A.; Nathan, S. (2018). Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, UM-C162. *Sci. Rep.*vol 8.pp:213.

Krakauer, T.(2019). Staphylococcal superantigens: pyrogenic toxins induce toxic shock. *Toxins*.vol 11(3).pp:178.

Kuang, J., Yan, X., Genders, A.J., Granata, C. and Bishop, D.J., (2018). An overview of technical considerations when using quantitative realtime PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PloSone*.vol 13(5).e0196438.

Kulhan Kova, K.; King, J. and Pabon, W. (2014). Staphylococcal toxic shock syndrome. Super antigen mediated enhancement of endotoxin shock and adaptive immune suppression. *Immunol Research* .vol 10. Pp: 1202-1210.

Lee. H, Yoon E-J, Kim D, Kim JW, Lee K-J, Kim HS, Kim YR, Shin JH, Shin JH, Shin KS, Kim YA, Uh Y, Jeong SH. (2018).

Ceftaroline resistance by clone-specific polymorphism in penicillin-binding protein 2a of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* .vol 62(9).pp:485-493.

Lev, J. Jiang, Y. Yu Q, Lu. S.(2011). Structural and functional role of nickel ions in urease by molecular dynamics simulation. *J. Biol. Inorg. Chem*.vol 16(1).pp:125–135.

Levinson, W. (2014) . Review of medical microbiology and Immunology .*McGraw – Hill. New York* .13th ed. P.8.

Lewis, A.M. and Rice, K.C., (2014). Quantitative real-time PCR (qPCR) workflow for analyzing *Staphylococcus aureus* gene expression. *The Genetic Manipulation of Staphylococci* .vol 10.pp: 143-154.

Lim, K.T. and Hanifah, Y.A. and Mohd Yusof, M.Y. and Thong, Kwai Lin (2012). Investigation of toxin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. *Tropical Biomedicine*. vol 29 (2). pp. 1-8. ISSN 0127-5720.

Lina,G.; Piémont,Y.; Godail-Gamot,F.; Bes,M.; Peter, M.; Gauduchon,F. Vandenesch,F. and Etienne,J. (1999). Involvement of Pantone-Valentine Leukocidin—Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. Vol 29 (5).PP: 1128–1132.

Liu,J.;Cai,M.;;Yan,H.;;Fu,J.;;Wu,G.;;Zhao,Z.;;Zhao,Y.;;Wang,Y.;;Sun,Y.;;You ,Y.;;Lin,L.;;Huang ,J.;;Huang ,R.and Zeng,J.;;(2019).Yunnan Baiyao reduced hospital-acquired pressure ulcer via suppressing virulence gene expression and biofilm formation of

Staphylococcus aureus . *International Jornal of Midical Sciences* .vol 16(8).pp:1078-1088.

Liy-Wong, C.; Pope, E.; Weinstein, M. and Lara-Corrales, I. (2021).Staphylococcal scalded skin syndrome: An epidemiological and clinical review of 84 cases. *Pediatr Dermatol*. vol 38.pp: 149– 153.

Loir, L.; Baron, F. and Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* .vol 2 (1). Pp:7-28.

Lotfi ,G.;Hafida,H.; Nihel,K.;Abdelmonaim ,K.;Nadia,A.;Fatima,N.and Walter,Z.(2014).Detection of biofilm formation of collection of fifty strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Algeria at the university hospital of Tlemcen .*Journal of Bacteriology Research* .vol 6(1).pp:1-6.

Luo,K.;Shao,F.;Kamara,K. ;Chen,S.;Zhang,R.;Duan,G. and Yang,H. (2018).Moleular characteristics of antimicrobial resistance and virulence determinants of *Staphylococcus aureus* isolates derived from clinical infection and food .*J Clin Lab Anal*.vol 32 .pp:1-8.

MacFaddin , J . F . (2000). Biochemical test for identification of Medical bacteria 3rd ed . The williams and wilkins . Baltimor . USA.

Machado,V.;Pardo,L.;Guello,D.;Giudice,G;Luna,P.;Varela,G;Gamou,T and Schelotto ,F.(2019).Presence of genes encoding enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from food ,food establishment surfaces and cases of food borne diseases .*Rev.Inst.Med.Trop.Saopaulo*.vol 62(5).pp:1-10.

- Mahfozzi**, A.; Shirzad, A.; Kaboosi, H. and Ghaemi, E. (2019). Identification of the classical enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* in various food by multiplex-PCR assay. *International Journal of virulence Research* .vol 20 (3). No 68. Pp: 209-212.
- Manandhar**, S.; Singh, A.; Varma, A.; Pandey, S. and Shrivastava, N. (2018). Biofilm Producing Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates Augmented Prevalence of Antibiotic Resistant Cases in Tertiary Care Hospitals of Nepal. *Front. Microbiol.*vol 9.pp:2749.
- Mariana** ,N.S.; Salman ,S.A.;Neela,V.and Zamberi ,S.(2009). Evaluation of modified congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* . *African Journal of Microbiology Research*. vol 3(6) .pp:330-338.
- Mariana**, N.; Salam, .s.; Neela, V. and Zamberi, S. (2009). Evaluation of modified congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of microbiology Research* .vol 3 (6). pp:330-338.
- Marin**, M.J.; Figuero, E.; Herrera, D.; Sanz M. (2017). Quantitative Analysis of Periodontal Pathogens Using Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR). In: Seymour G., Cullinan M., Heng N. (eds) Oral Biology. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York NY . vol 1537.pp:191-202.
- Matuszewska**,M.; Gemma, G.R.; Murray, E.M.; Harrison, M. A.; Holmes, L. A.(2020). The Evolutionary Genomics of Host

Specificity in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* .vol 28(6). pp: 465-477,

McCarthy, H .; Justine, K.; Rudkin¹, N.; Black¹, S.; Laura, G .; Eoghan O’N . and James P. (2015). Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus* *Frontiers in Cellular and Infection. Journal of Microbiolog.* vol 5 (1).pp: 32-93.

Mirzaee, M. ; Peerayeh , S.N. and Ghasemian ,A.M.(2014). Detection of *ica ABCD* genes and biofilm formation in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* . *Iranian jornal of pathology*.vol 9(4) .pp:257-262.

Mohammed, A.; Mohamed, M.; Goda, A. and Mohamed, S.(2018). Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* from infected wond. Sohag. *Medical Journal* .vol 22(3). pp:163-171.

Moriyama, Y.; Ishikane, M.; Mezaki, K. and Ohmagari, N. (2019). Comparison of penicillins (penicillins G and ampicillin) and cefazolinas definitive therapy againt penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (PSSA) bacteremia in Japan: aretrospective cohort study. *Journal of Infection and Chemotherapy* .vol 26 (5). Pp:10-23.

Motamedi, H.; Asghari, B.; Tahmasebi, H. and Arabestani, M.(2018). Identification of hemolysin genes and their Association with antimicrobial resistance pattern among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in west of Iran. *Advanced Biomedical Research*. vol 7. pp:143-153.

Mun SH, Kong R, Seo YS, Zhou T, Kang OH, Shin DW, Kwon DY. (2016).Subinhibitory concentrations of punicalagin reduces

expression of virulence-related exoproteins by *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*.vol 363(22).pp:1093.

Mustafa, H.S. (2014). *Staphylococcus aureus* can produce catalase enzyme when adding to human WBCs as a source of H₂O₂ production in human plasma or serum in the laboratory. *Open Journal of Medical Microbiology* .vol 4. Pp:249-251.

Nazarchuk,O.; Nahaichuk,V.; Osadchuk,N.; Dmytriiv,N.; Dmytriiev,K. and Turzhanska ,O.(2020).Prognostic parameters of the susceptibility of *Staphylococcus spp.* to aminoglycosides and doxycycline .*Wiadomosci Lekarski* .vol 73(8). Pp:1615-1619.

Neopane ,p; Nepal,H.P.; Shresthe,R.;Uehara ,O.and Abiko,Y.(2018).In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital admitted patients and their association with antimicrobial resistance .*International Journal of General Medicine*.vol 11.pp:25-32.

Nguyen, F.; Starosta, A.; Arenz, S.; Sohmen, D.; Donhofer, A. and wolson, D. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry Journal* .vol 395 (5). PP:559-575.

Olia , A.H.; Gharhremani ,M; Ahmadi ,A. and Sharifi ,Y.(2020). Comparision of biofilm production and virulence gene distributon among community and hospital acquired *Staphylococcus aureus* isolates from north western Iran .*Infection , Genetics and Evolution* . vol 81 .pp:104262 .

Oliveira CF, de.; Morey, AT.; Santos JP.; Gomes, LVP.; Cardoso, JD.; Pinge-Filho, P.; Perugini, MRE.; Yamauchi, LM.; Yamada-Ogatta, SF .(2015). Molecular and phenotypic characteristics of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitalized patients. *J Infect Dev Ctries*.vol 9.pp:743-751.

olya, Z.; Najar-Peerayeh, S. ; Yadegar, A.(2021). Clonal diversity and genomic characterization of Pantone-valentine Leukocidin (PVL)-positive *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *BMC Infect Dis* .vol 21.pp: 372.

Omar ,N.N. and Mohammed,R.K.(2021). A Molecular Study of Toxic Shock Syndrome Toxin gene (tsst-1) in β lactam Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Iraqi Journal of Science*, Vol 62(3) . pp: 825-837.

Osman, N.; Elrayah,I.; altayb, H.; Elhaj, N.; Saleh, M.; Abuzeid, N.; Eldirdery, M. and Mohamed, Y.(2016). Detection of novel mutation in Luks panton-valentine Leukocidin gene in twelve isolates of *staphylococcus aureus* from Sudanese patients. *International Jurnal of Molecular and Clinical Mirobiology*. vol 6 (2). pp: 663-669.

Otto, MP.; Martin, E.; Badiou, C.; Lebrun, S.; Bes, M.; Vandenesch, F.; Etienne, J.; Lina, G.; Dumitrescu, O.(2013) .Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. vol 68(7).pp:1524-1532.

Ozkaya ,G.U.;Durak ,M.Z.;Akyar ,I. and Karahuna ,O.(2019). Antimicrobial susceptibility test for the determination of resistant and susceptible *S.aureus* and *Enterococcus spp.* using a multi-channel surface Plasmon resouance device .*Diagnostics Journal* . vol 9.pp:191-204.

- Parastan** ,R.;kargar,M;Solhjoo,K.and Kafiladeh,F.(2020).Asynergistic association between adhesion –related genes and multidrug resistance patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from different patients and healthy individuals.*Journal of Global Antimicrobial Resistance* .vol 22.pp:379-385.
- Pham**, T.D.; Ziova, Z. and Blaskovich, M.(2019). Royal Sciety of chemistry. *Med.Chem. Commun*.vol 7(1). PP:190-204.
- Qin**, L.; Da, F.; Fisher, E.L.; Tan, D.C.; Nguyen, T.H.; Fu, C.L. (2017) Toxin Mediates Sepsis Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. PLoS Pathog* .vol 13: e1006153.
- Radlinski**, L.; Rowe, S.; Brzozowski, R.; Wikinson, A.; Huang, R.; Eswara, P. and conlon, P.(2019). Chemical introduction of aminoglycoside uptake overcomes antibiotic tolerance and resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cell Chemical Biology* .vol 26. pp:1355-1364.
- Rajabi** , R.A. ;Khavidaki ,S. L.; Neyestanaki ,D.K. and Fasihi ,Y.(2017).Molecular analysis of immune evasion cluster(IEC) genes and intercellular adhesion gene cluster (ICA) among methicillin- resistant and methicillin- sensitive isolates of *Staphylococcus aureus* .*JPREVMED-HYG*.vol 158 .pp:308-314.
- Reffuveille**,F.; Josse,J.; Vallé,Q.; Mongaret,C. and Gangloff, C.(2017). *Staphylococcus aureus* Biofilms and their Impact on the Medical Field.Book .*INTEH* .chapter 11.pp:187-217.
- Reith**,J.and Mayer,C.(2011).Peptidoglycan turnover and recycling in gram positive bacteria .*Appl Microbiol Biotechnol*.vol 92.pp:1-11.

- Rosato, A.E.**; Plata, K. and Wegrzyn G. (2009). *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *J. Acta Biochimica Polonica*.vol 56(4).pp: 597-612.
- Ruijter, J.M.**, Pfaffl, M.W., Zhao, S., Spiess, A.N., Boggy, G., Blom, J., Rutledge, R.G., Sisti, D., Lievens, A., De Preter, K. and Derveaux, S., (2013). Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods*.vol 59(1).pp:32-46.
- Sambrook, J.** and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning : A laboratory manual* . 3rd edition . cold spring Harbor, New York, USA. Vol 5 (14) .pp:2-5.
- Sankomkai, W.**; Boonyanugomol, W.; Kraisriwattana, K.; Nuchanon, J.; Boonsam, K.; Kaewbutra, S. and Wongboot, W.(2020). Characterization of classical enterotoxins, virulence activity, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from Thai fermented pork sausages, clinical samples and healthy carriers in northeastern Thailand. *Sciend Journal* .vol 64. pp:289-297.
- Santajit , S.** and Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*.vol 1,pp:1-8.
- Schmittgen, T.** and Livak, K. . (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative (CT) method. *Nat. Protoc* .vol 3.pp: 1101–1108.
- Shahi, S.**; Vahed, S.Z.; Fathi, N. and Sharifi, S.(2018). Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in

dentistry, *International Journal of Biological Macromolecules*.
vol 117.pp:983-992.

Shahmoradi,M.; Faridifar ,P.;Shapouri,R.;Mousavi,S.V.; Ezzedin,M.and Mirzaei,B.(2019).Determining the biofilm gene profile of *Staphylococcus aureus* clinical isolates via multiplex colony PCR method .*Reports of Biochemistry and Molecular Biology* .vol 7(2).pp:181-188.

Shakibaie,M.R.; Yasser Golkari ,Y.and Salajegheh,G.(2014). Antimicrobial susceptibility, virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* isolates from hospital infections in Kerman, Iran. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*.vol 4(4).pp:152-158.

Shallcross, L. J.; Hayward, A.C.; Johnson, A.M. and Petersen, I. (2015). Incidence and recurrence of boils and abscesses within the first year .*British J. of General Practice*.pp:676-668.

Sharma, H.; Turner, C.; Siggins, M.; El-Bahrawy, M.; Pichon, B.; Kearns, A. and Sriskandan, S. (2019). Toxic shock syndrome toxin 1 evaluation and antibiotic impact in transgenic model *Staphylococcal* soft tissue infection. *Host-Microbiology* .vol 4 (5). e 00665-19.

Sharma,B.K.;Gokhale,S. and Sharma ,K.(2017).Urea fibrinogen slide coagulase test –a simple alternative method for the rapid identification of *Staphylococcus aureus* .*Journal of Gandaki Midical College –Nepal* .vol 10 (1).pp:17903.

Shettigar, K.; Jain, S.; Bhat, D.; Acharya, R.; Ramachandra, L.; Satyamoorthy, K. and Murali, T.(2016). Virulence determinants inclinical *staphylococcus aureus* from monomicrobial and

polymicrobial infections of diabetic foot ulcers. *Journal of Medical Microbiology*. vol 65(12). pp:1392-1404.

Shrivastava, S.; Shrivastava, P. and Ramasamy, J. (2018). World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Journal of Medical Society*.vol 32(1).pp: 76-76.

Sohoni, S.; Vijay, S.; Lieder, P.; Bapat , I. and Anna Eliasson, L . (2014). Low Molecular Weight Protein Tyrosine Phosphatases Control Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme Engineering* . vol 3.pp: 2-9 .

Stephenson, F.H. (2003). Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in the Laboratory. 1st edition. *Elsevier*. USA. CH-2. pp:18-34.

Subramanian,A.;Chitalia.V.;Banger,K.;Vaidya,S.;Warke,R.;Chowdhary ,A. and Deshmukh,R.(2017).Evaluation of hiaueusTM coagulase conformation kit in identification of *Staphylococcus aureus* .*Journal of Clinical and Diagnostic Research*.vol 11 (2).pp:8-13.

Tahmasebi, H.; Dehbashi, S.; Jahantigh, M. and Arabestani, M. (2019). Relationship between biofilm gene expression with antimicrobial resistance pattern and clinical specimen type based on sequence type (STs) of Methicillin-resistant *S.aureus*. *Molecular Biology Reports* .vol 19 (4). Pp: 1-12.

Tariq, S.; Rizvi, S. and Anwar, U. (2018). Tetracycline classification, structure, activity, relationship and mechanism of action as a theranostic agent for infections lesions-amini review.

Biomedical Journal of Scientific and Technical Research .vol 7
(2). PP:5787-5796.

Taylor,T.A. and Unakal,C.G.(2020).*Staphylococcus aureus*.Statpearls
publishing NCBI.Books. NBK. 441868.

Thomer, L.; Emolo, C.; Thammavongsa, V.; Kim, H.K.; McAdow, M.E.,
Yu, W. et al. (2016). Antibodies against a secreted product of
Staphylococcus aureus trigger phagocytic killing. *J. Exp.*
Med.vol 213 (3).pp:293-301.

Todar, K. (2005). Todar's online textbook of Bacteriology, University of
Wisconsin-Madiso. PP: 4-5.

Tong, S.; Campbell, A.; Bowen, A. and Davis, J. (2019). A survey of
infections diseases and microbiology clinicians in Australia and
Newzealand about the management of *Staphylococcus aureus*
bacteremia. *Clinical Infections Diseases* .vol 69 (10). Pp:1835-
1839.

Torlak ,E.;Korkut,E.;Uncu,A.and Sener,Y.(2017).Biofilm formation by
Staphylococcus aureus isolates from adental clinic in Konya
,Turkey. *Journal of Infection and Public Health*. vol 10.pp:809-
813.

Trajan, V.; Brasileiro, C.; Henriques, J.; Cota, M.; Lanza, C. and Cortes,
M. (2019). Doxycycline encapsulated in β -cyclodextrin for
periodontitis: *Clinical Trialoral Research* .vol 33. Pp:112.

Truc,D.J. and Walker ,S.(2020).Un covering the activiyies ,biological and
regulation of bacterial cell wall hydrolases and tailoring
enzymes .Harvard Medical School.*jbc.org.cgi*.vol 10.1074.783-
494.

- Udo, E.E. and Boswihi, S.S.**(2017). Antibiotic resistance trends in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Kuwait hospitals 2011-2015. *Medical principles and practice*. vol 26. pp:485-490.
- Uribe-Garcia ,G.L.; Perez ,F.M.; Martinez ,J.B.; Partida ,A.H.; Garzon ,J.; Alanis ,J.;Quezada ,R.;Paniagua ,F.V. and Vaca ,S.**(2019).Frequency and expression of genes involved in adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* strains isolated from periodontal lesions .*Journal of Microbiology ,Immunology and Infection* .vol 10.pp:1016-1025.
- Valle, D.L., Paclibare, P.A.P., Cabrera, E.C.;Rivera,W.** (2016) .Molecular and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a tertiary hospital in the Philippines. *Trop Med Health*.vol 44(3).pp:1-9.
- Wang, X.; Eagend, W. and Clee, J.** (2020). Orchestration of human macrophageNLRP-3 inflammasome activation by *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles. *PNAS La test Articles Journal* .vol 10. Pp:1073-1084.
- Wilkins, A.; Steer, A.; Smeesters, P. and Curtis, N.** (2017). Toxic shock syndrome the seven RS management and treatment. *Journal of Infection* .vol 74 (1). Pp: 147-152.
- Wu, S.; Huang, F.; Zhang, H. and Lei, L.** (2019). *Staphylococcus aureus* biofilm organization pathway. *Journal of Ortho paedic Surgery and Research* .vol 14 (10). Pp: 1-8.
- Xiao, G.; Chen, Z. and Lv, X.** (2018). Chlorhexidine-based body washing for colonization and infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant Enterococcus:

an updated meta-analysis. *Infection and drug resistance*, 11, 1473.

Xiao, M.; Zhao, R.; Zhang, Q.; Fan, X.; O'Sullivan, MV. and Li, DF. (2016). Genotypic diversity of *Staphylococcus aureus* α -hemolysin gene (hla) and its association with clonal background: Implications for vaccine development. *PLoS One.* ;11:0149112.

Yamada, T. (2021). Polymerase Chain Reaction (PCR). (eds) Fetal Morph Functional Diagnosis. Comprehensive Gynecology and Obstetrics. *Springer*, Singapore.

Yaslianifard, S.; Jabari, S.; Mirzaii, M.; Kermanian, F.; Marashi, S.; Dehaghi, N.; Alimorad, S. and Yaslianifard, S. (2017). Virulence genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from different clinical specimens in an Iranian hospital. *EC Microbiology Research Article* .vol 5 (3). Pp: 86-92.

Zuniga, E.; Benites, N.; Hora, A.; Mello, P.; Laes, M.; Oliveira, L.; Barandao, P.; Silva, S.; Taniwaki, S. and Melville, P. (2020). Expression of genes encoding resistance in *Staphylococcus spp* isolated from bovine subclinical mastitis in Brazil. *Journal of Infection In Development Countries* .vol 14 (7). Pp: 772-780.

ملحق رقم -1-

استمارة المعلومات الخاصة بالمرضى

تسلسل العينة :

اسم المريض :

العمر :

الجنس :

نوع العينة :

تاريخ جمع العينة :

منطقة العزل :

هل اخذ المريض مضادات حيائية : نعم لا:

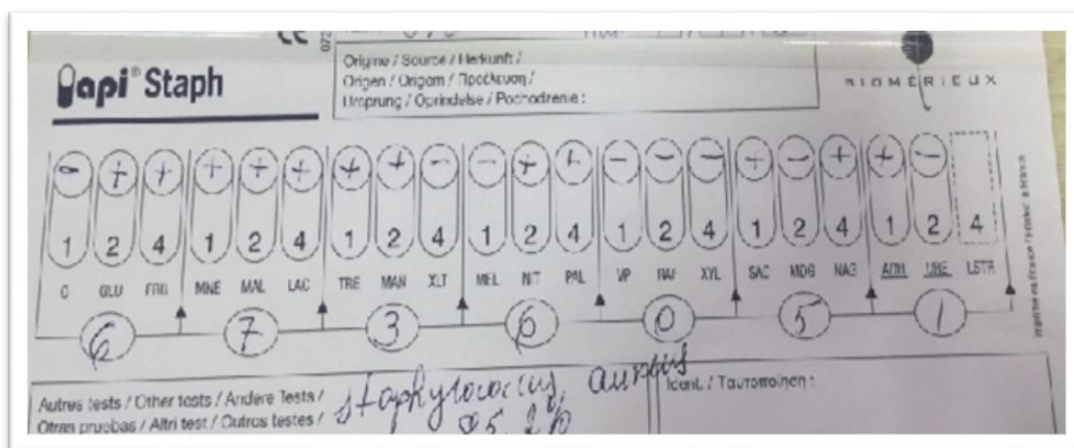
عنوان السكن :

ملحق رقم (2)

نتائج الاختبارات الخاصة بشريط API –Staph

الاختبار	الرمز	Positive نتيجة موجبة
Negative control	0	
Acidification of D-glucose	GLU	Yellow
Acidification of D-fructose	FRU	Yellow
Acidification of D-mannose	MNE	Yellow
Acidification of D-maltose	MAL	Yellow
Acidification of D-lactose	LAC	Yellow
Acidification of D-trehalose	TRE	Yellow
Acidification of D-mannitol	MAN	Yellow
Acidification of xylitol	XLT	Yellow
Acidification of D-melibiose	MEL	Yellow
Nitrate reduction	NIT	Red
Alkaline phosphatase	PAL	Violet
Acetyl-methyl-carbinol production(Voges Proskauer)	VP	Violet/pink
Acidification of D-rafinose	RAF	Yellow
Acidification of xylose	XYL	Yellow
Acidification of sucrose	SAC	Yellow
Acidification of methyl-alpha D- glycopyranoside	MDG	Yellow
Acidification of N-acetylene-glucosamine	NAG	Yellow
Arginine Dihydrolase	<u>ADH</u>	Orange, red
Urease	<u>URE</u>	Red, violet

API 20 Staph system نظام



ملحق (4)

الفحوصات الكيموحيوية بجهاز Vitek- 2 Compact

تركيز المركب	المختصر	اسم الاختبار	رقم الحفرة
0.1875 mg	AMY	D- Amygdalin	3
0.015 mg	PIPLC	Phosphatidylinositol Phospholipase C	4
0.3 mg	dXYL	D- Xylose	5
0.111 mg	ADH1	Arginine dihydrolase 1	8
0.036 mg	BGAL	β - Galactosidase	9
0.036 mg	AGLU	α -Glucosidase	11
0.0384 mg	APPA	ALaphepro arylamidase	13
0.3 mg	CDEX	Cyclo dextrin	14
0.024 mg	AspA	L-Aspartate arylamidase	15
0.00204 mg	BGAR	β - Galacto Pyranosidase	16
0.036 mg	AMAN	α -Mannosidase	17
0.0504 mg	PHOS	Phosphatase	19
0.0234 mg	LeuA	Leucine arylamidase	20
0.0234 mg	ProA	L- Proline arylamidase	23
0.0018 mg	BGURr	β - Glucaronidase	24
0.036 mg	AGAL	α - Galactosidase	25
0.018 mg	PyrA	L-Pyrrolidonyl- arylamidase	26
0.0378 mg	BGUR	B- Glucaronidase	27
0.0216 mg	AlaA	Alanine arylamidase	28
0.0276mg	TyrA	Tyrosine arylamidase	29
0.1875mg	dSOR	D- Sorbitol	30
0.15mg	URE	Urease	31
0.00093mg	POLYB	Polymixin B resistance	32
0.3 mg	dGAL	D-Galactose	37
0.3 mg	dRIB	D- Ribose	38
0.15mg	ILATk	L-Lactate alkalization	39
0.96mg	LAC	Lactose	42
0.3 mg	NAG	NAcetyl-D-glucosamine	44

0.3 mg	dMAL	D- Maltose	45
0.0006 mg	BACL	Bacitracin resistance	46
0.000075 mg	NOVO	Novobiocin resistnce	47
0.68 mg	NC6.5	Growth in 6.5 NaCL	50
0.1875 mg	dMAN	D- Mannitol	52
0.3 mg	dMNE	D- Mannose	53
0.3 mg	MBdG	Methyl-B-D-glucopyranoside	54
0.3 mg	PUL	Pullulan	56
0.3 mg	dRAF	D- Raffinose	57
0.0084 mg	O129R	(O/129Resistance Comp vibrio)	58
0.3 mg	SAL	Salicin	59
0.3 mg	SAC	Saccharose/Sucrose	60
0.3 mg	dTRE	D- Trehalose	62
0.27 mg	ADH2S	Arginine dihydrolase 2	63
0.000399 mg	OPTO	Optochin resistance	64

ملحق رقم (5) نتيجة التشخيص للبكتريا بواسطة جهاز VITIC 2 Compact

bioMerieux Customer

System #: 11612

Printed Apr 16 ,
2019

Patient Name:Aya Ali

Printed by:
Lab Admin

Isolate Group: 543-1(Approved)

Patient ID: 3183

Card Type: GP Bar Code: 4546760983217654 Testing Instrument:0000148FFB2A
(VK2C8812)

Bio number: 030005099893423762

Organism Quantity:

Selected Organism: *Staphylococcus aureus*

Comments:	

Identification Information	Card: GP	Lot number: 2420647403	Expires: 4, 2019 13:00 CDT
	Completed: Apr 1 2019 03:15 CST	STATUS: Final	Analysis Time: 7:49 hours
Selected Organism	99% Probability <i>Staphylococcus aureus</i> Bio number: 010002073763271 Confidence: Good identification		
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Bio pattern(s)			

Biochemical Details																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	-	37	dGAL	-
38	dRIB	-	39	ILATk	-	42	LAC	-	44	NAG	-	45	dMAL	-	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	-	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	-	63	ADH2s	+
64	OPTO	+															

Installed VITEK 2 Systems Version: 08.01

Therapeutic Interpretation
Guideline:

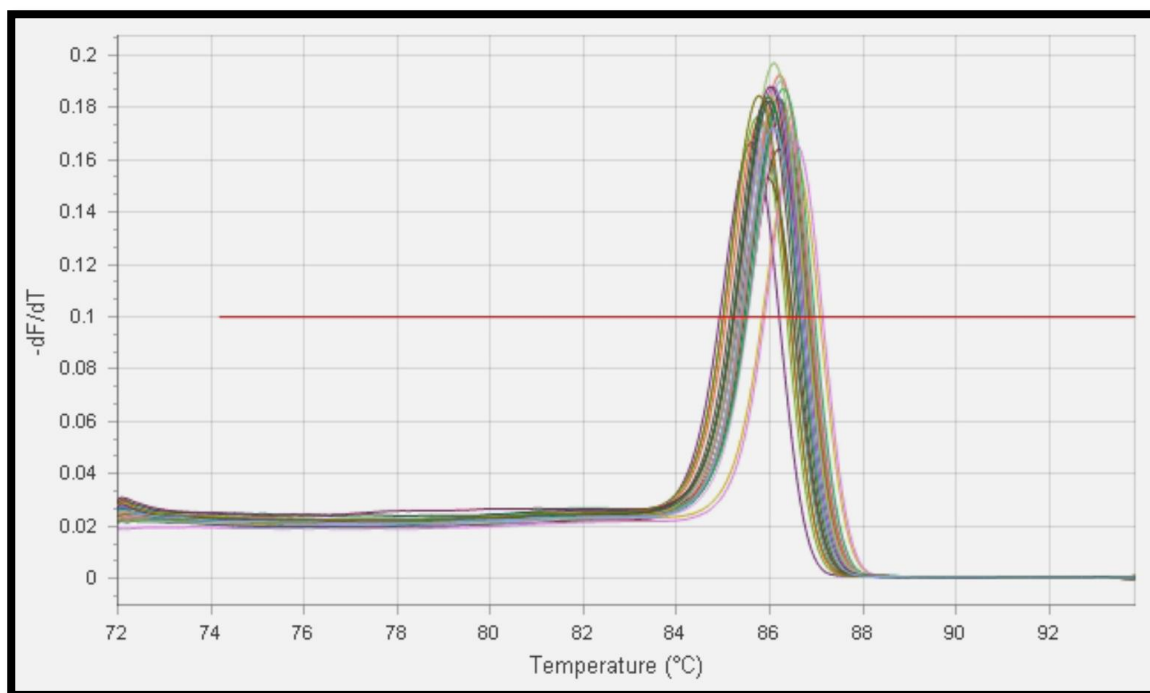
MIC Interpreting Guideline:

AES Parameter Last
Modified:

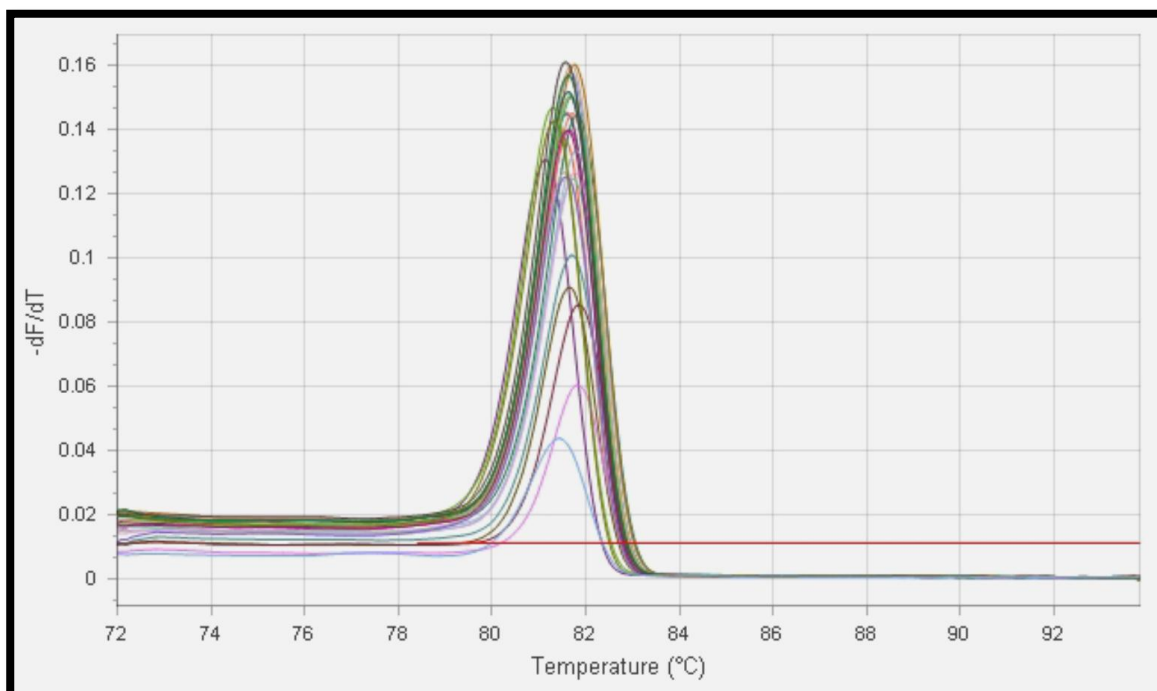
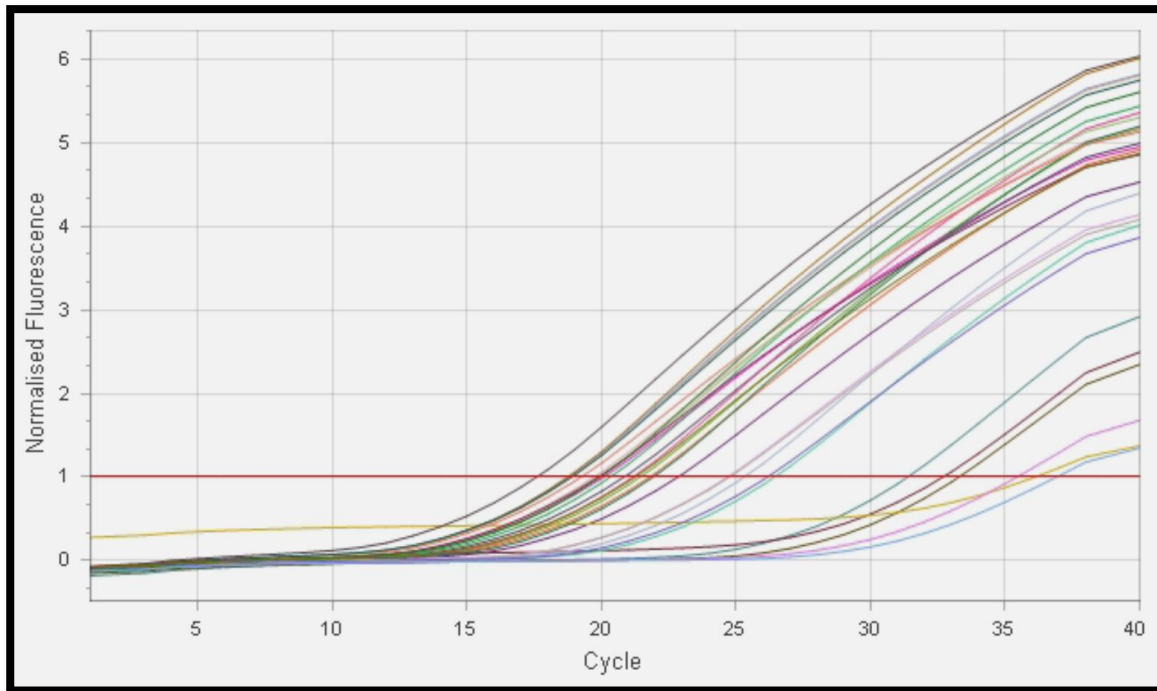
AES Parameter Set Name:

Page 1 of
1

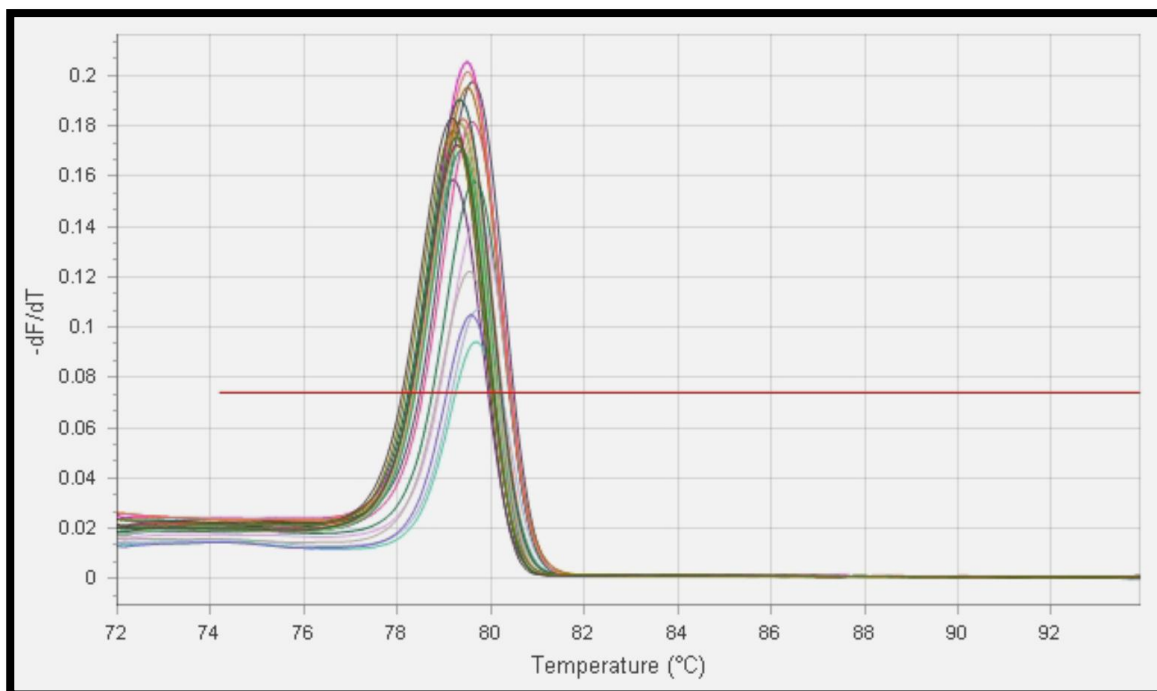
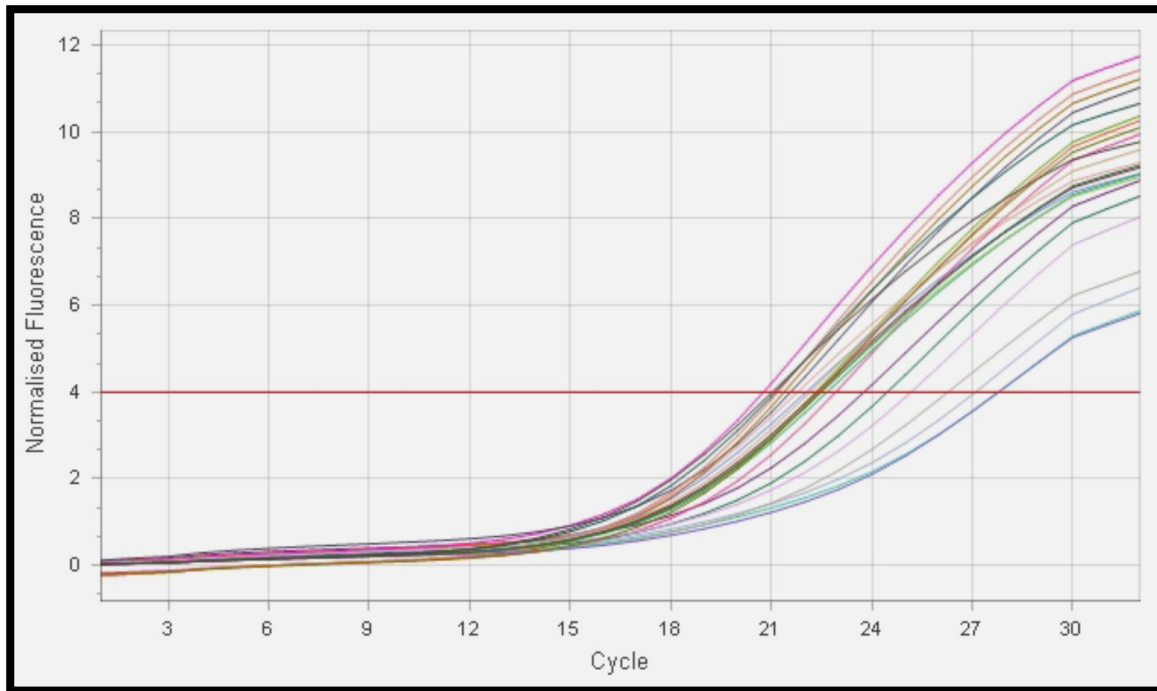
ملحق رقم (6) منحنى التضخيم للتعبير الجيني بتفاعل النسخ الكمي للجين 16 s RNA



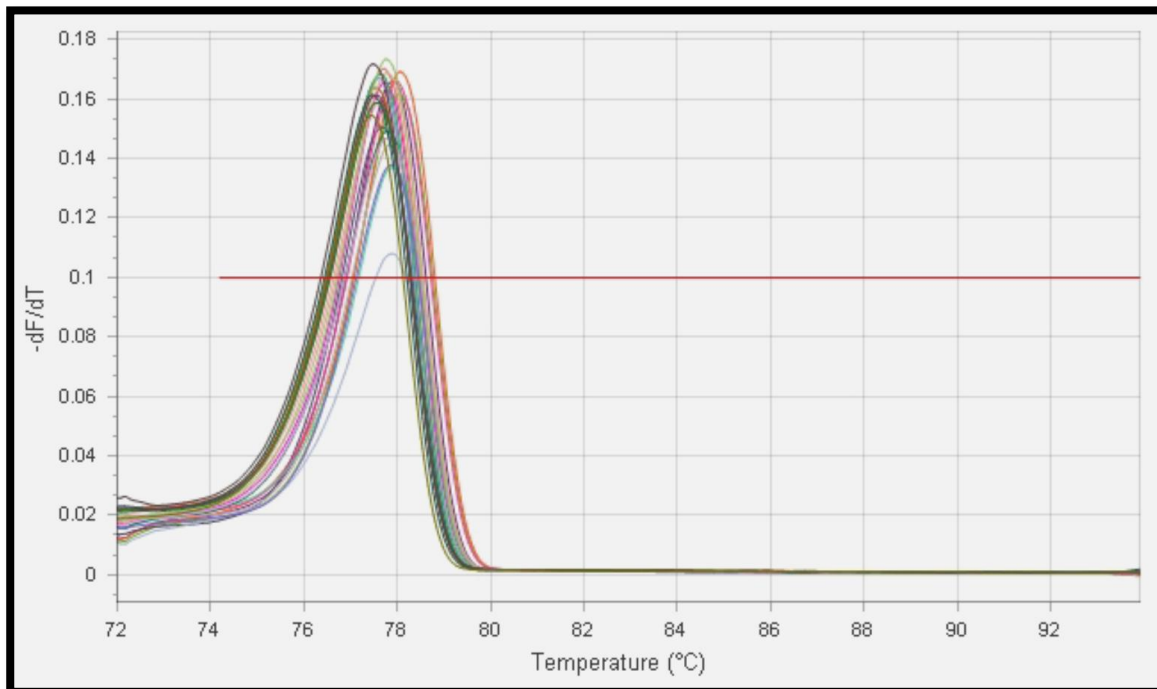
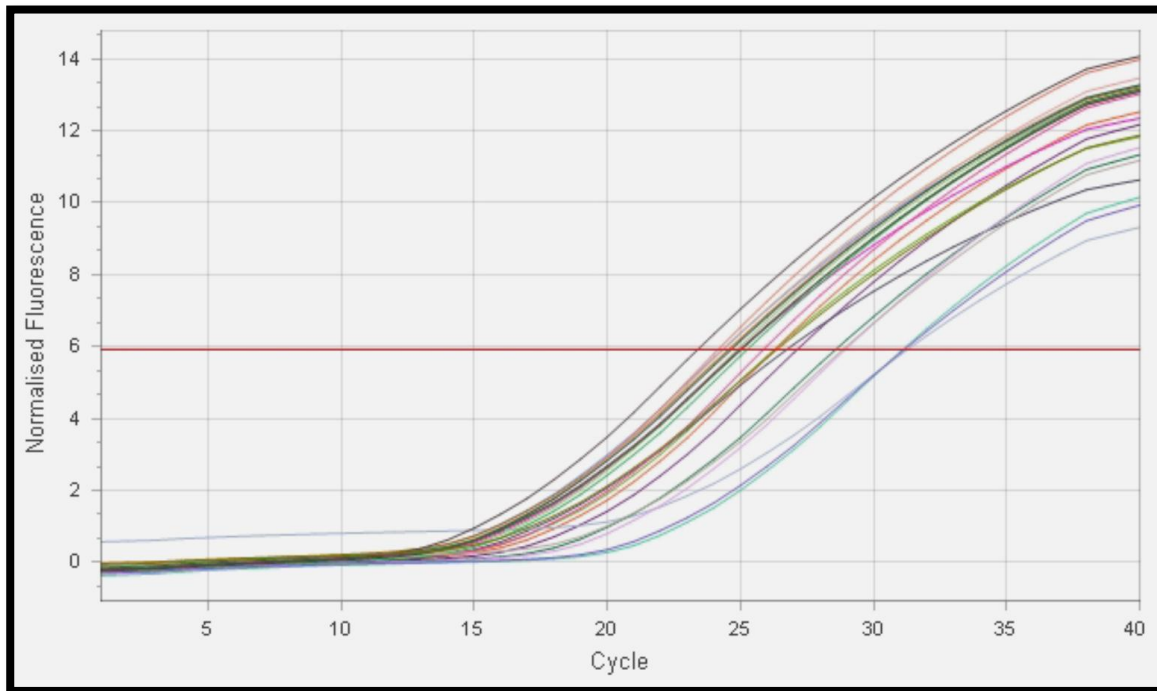
ملحق رقم (7) منحنى التضخيم للجين *ica A* قبل وبعد معاملة البكتريا بالمضادات الحيوية



ملحق رقم (8) منحنى التضخيم للجين *ica B* قبل وبعد معاملة البكتريا بالمضادات الحيوية



ملحق رقم (9) منحنى التعبير الجيني للجين *ica C* قبل وبعد معاملة العزلات بالمضادات الحيوية



Summary

Summary

The study included 175 samples, collected from different clinical sources of different ages and from both sexes, they were 45 urine samples, 40 blood samples, 30 swabs from ear, 25 swabs from nasal, 24 swabs from burns and 11 samples were taken from sputum, all of them were collected in the consulting clinic / Baquba Teaching Hospital / Diyala from April 2018 to August 2018, The results of the bacteriological diagnosis of the samples showed that 40 samples, at a rate of 22.85% were negative growth of bacterial culture, and 135 samples, at a rate of 77.14%, showed a positive growth of bacterial culture, and the highest percentage of the isolated bacteria was *Staphylococcus aureus*, as the total number 55 isolates (39%).

The sensitivity of *S. aureus* isolates to Oxacillin was tested, so 21 (38.18%) isolates were methicillin-resistant (MRSA) and 34 isolates, (61.81%) were methicillin-susceptible (MSSA).

The results of current study showed that the isolation ratios of *S. aureus* according to the source were as follows: Blood 12 (81-21%), of which 9 (16.36%) MSSA and 3 (5.45%) MRSA, 13 (23.63%) ear, 7 isolates (12.72%) were sensitive to MSSA, and 6 isolates (10.9%) MRSA, from nasal 10 (18.18%), 7 (12.72%) MSSA and 3 (5.45%) MRSA, urine UTI was 9 isolates (16.36%), of which 4 isolates were sensitive to methicillin with a percentage (7.27%) and 5 isolates (9.09%) methicillin-resistant, sputum 6 (10.90%), the isolation rate for both MSSA and MRSA

Summary

was (5.45%) 3, the lowest percentage of *S. aureus* was isolated from Burns, as it was recorded (1.81%) for MRSA.

S.aureus isolates were tested for their susceptibility to 10 antimicrobial agents by standard disk diffusion method. The results showed that all *S. aureus* isolates showed 100% resistance to penicillin, 47% to Ceftaroline, the rate of MRSA resistance to Gentamicin was 100%, while MSSA bacteria resisted the antagonist by 32%, the percentage of resistance of the bacteria under study to Azithromycin was 100% in MRSA bacteria while it was 61.76% in MSSA bacteria. The rate of resistance to Tetracycline was different between MRSA and MSSA bacteria, as it reached 71.42% and 41.17%, respectively, the percentage of resistance to Doxycycline in MRSA was 23.80%, while MSSA bacteria did not completely resist the antagonist and were 100% sensitive to it.

All isolates of *S.aureus* bacteria under study showed 100% for ability to produce biofilm using the CRA method, but in different quantities, and 100% biofilm was formed when using the tube method, the results of the biofilm formation test using the microtiter plate (MTP) of MRSA showed Three isolates(14.28%) formed the biofilm with strong strength, and 15 isolates (71.42%) were moderate, while the remaining three isolates formed a weak biofilm , as for the results shown by MSSA isolates, 5 isolates (14.70%) were formed a strong biofilm with 55.88%, moderate biofilm(29.41%) of MSSA isolates, as it formed a weak biofilm.

Depending on PCR investigations the current results showed that presence of *ica* A,B,C genes was confirmed in all *S. aureus* MRSA and MSSA isolates at 100%.

The results of the investigation of genes encoding for the production of enterotoxins in *S.aureus* were,sea 3(15%),seb 4(20%),sec 4(20%),sed 6(30%) and see 4(20%).

Summary

The presence of genes encoded to produce hemolysins (*hlg*, *hly*) was investigated, and it was found that the *hly* gene was carried in 20(100%) of isolates under study, , while the *hlg* gene was present in 5(25%) of isolates.

The results of the investigation of genes encoding for the production of leukolytic toxin showed that 20 (100%) contained the *luk-S* gene and an isolation rate of 10(50%) was containing the *luk-F* gene.

The results of the current study indicated that 9 (45%) of isolates was carrying the *tst* gene that encodes for the production of the toxic shock syndrome toxin.

Quantitative gene expression was studied using quantitative reverse transcription (real-time PCR) of 10 *S. aureus* isolates before and after treatment with Azithromycin at sub MIC concentration ($\mu\text{g} / \text{ml}$ 128), and antagonist. Gentamicin at sub MIC concentration (16 $\mu\text{g} / \text{ml}$) to determine the effect of these antagonists on the amount of gene expression of genes encoded for biofilm production.

All MRSA isolates showed high genomic expression of the *ica A* gene after treatment with Azithromycin, and the gene expression values ranged between (54.86 - 1.61). As for the isolates of MSSA bacteria, the isolates (SA50, SA48, SA35) were not expressed after treatment with the antagonist, while the two isolates were maintained (SA 31, SA 24) on its ability to express gene after treatment with an antagonist

All MRSA isolates showed good expression of the *icaA* gene after treatment with Gentamicin, and the folding gene expression values ranged between (53.34 - 1.18), in MSSA isolates were 4 of them unexpressed after treatment with the antagonist and one isolate had a gene expression value of 1.04.

Summary

4 isolates out of a total of 5 MRSA bacteria showed good gene expression for the *icaB* gene, while the SA20 isolate did not show any gene expression. On the other hand, 3 MSSA isolates showed good expression, and gene expression was stopped in the isolates (SA50, SA48), so there were no significant differences between MRSA and MSSA isolates after treating the isolates under study with Azithromycin.

The results of the quantitative gene expression of the *ica B* gene showed that three isolates of MRSA crossed, at high values, so the value of Folding SA2 (26.67) and SA8 (47.94) was less than the expression shown by the isolate SA16, it reached 9.83, while the gene expression was stopped in the isolates SA14, and SA24. on the other hand, none of the MSSA isolates showed a gene expression, indicating that the gene expression process of the *ica B* gene in it was stopped after treatment with Gentamicin.

After treating isolates under study with Azithromycin, the quantitative gene expression of the *ica C* gene was measured, in the isolation SA8 (59.79), the isolate SA2 (14.76), in the isolate of SA16 (9.89) and (2.13) in isolation of SA14, while in isolate SA20 the gene expression was stopped, while the gene expression values ranged between (8.60 - 2.36) in four isolates of MSSA bacteria and the gene expression was stopped by isolation.

The results of the gene expression of the *ica C* gene after treating isolates under study with Gentamicin, showed that only two MRSA isolates genetically crossed SA8 (64.97) and SA2 (4.42). As for the rest of the MRSA isolates, their gene expression stopped after treatment with the antagonist, while they did not express. Only two isolates of MSSA after treatment with Gentamicin were expressed, SA50 (2.07) and SA48 (1.35).

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



**Molecular detection of some virulence factor genes in
Staphylococcus aureus isolated from different clinical
specimens**

A Thesis

submitted to the council of College of Education for Pure Science
, University of Diyala in partial fulfillment of the requirements of
the degree of Doctorate of Philosophy
of Science in biology

By

Melah Noor Al-deen Essa Al Fayad

B.Sc. in Biology / University of Diyala
(2003-2004)

M.Sc.Biology/ College of Education for pure Science/
University of Diyala 2016

Supervised by

Dr. Karem Ibrahim Mubarak

Professor

1443

2021