



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة بغداد  
كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم  
قسم علوم الحياة

# دراسة بكتريولوجية لمرضى التهاب السحايا عند الأطفال

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم - جامعة بغداد  
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير في علوم الحياة / الأحياء  
المجهرية

من قبل

**عباس حميد شكور الونداوي**

بكالوريوس علوم في علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة الموصل  
2001-2000

باشراف

الاستاذ المساعد الدكتورة لى عبد الهادي زوين

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ مَنْ عَمِلَ صَالِحًا مِّنْ ذَكَرٍ أَوْ أَنْتَىٰ وَهُوَ

مُؤْمِنٌ فَلَنُحْيِيَنَّهٗ حَيٰوةً طَيِّبَةً ۗ

وَلَنَجْزِيَنَّهُمْ أَجْرَهُمْ بِأَحْسَنِ مَا كَانُوا

يَعْمَلُونَ ﴿٩٧﴾

صدق الله العظيم

سورة النحل

الآية (٩٧)

## اقرار المشرف

أشهد بأن إعداد هذه الرسالة تم تحت إشرافي في قسم علوم الحياة - كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم - جامعة بغداد، وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة - علم الاحياء المجهرية.

التوقيع:

اسم المشرف: د. لمى عبد الهادي زوين

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: قسم علوم الحياة - كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم

التاريخ: ٢٠١٩ / ٥ / ١٢

## توصية رئيس قسم علوم الحياة

استناداً إلى التوصية أعلاه أشرح هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: د. ثامر عبد الشهيد محسن

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم - جامعة بغداد

التاريخ: ٢٠١٩ / ٥ / ١٢

## إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها، وقيما له علاقة بها ووجدنا بأنها جديرة بالقبول لنيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة - علم الاحياء المجهرية.


التوقيع:   
الاسم: د. رنا مجاهد عبد الله  
اللقب العلمي: استاذ  
العنوان: جامعة بغداد / كلية التربية للعلوم الصرفة  
(البن الهيثم) / قسم علوم الحياة  
(عضواً)

التوقيع:   
الاسم: د. أحمد محمد رشيد  
اللقب العلمي: استاذ  
العنوان: السيد القاسم العلمي / المنصور  
(رئيساً)

التوقيع:   
الاسم: د. علي الهادي زهير  
اللقب العلمي: استاذ مساعد  
العنوان: جامعة بغداد / كلية التربية للعلوم الصرفة  
(البن الهيثم) / قسم علوم الحياة  
(عضواً / المشرف)

التوقيع:   
الاسم: د. محمد حسان فياض  
اللقب العلمي: مدرس  
العنوان: جامعة بغداد / كلية التربية للعلوم الصرفة  
(البن الهيثم) / قسم علوم الحياة  
(عضواً)

مصافحة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم

التوقيع:   
الاسم: د. حسن احمد حسن  
اللقب العلمي: استاذ

التاريخ: 2019 / 5 / 14



# شكر وتقدير

الحمد لله على ما انعم وله الشكر على ما الههم...

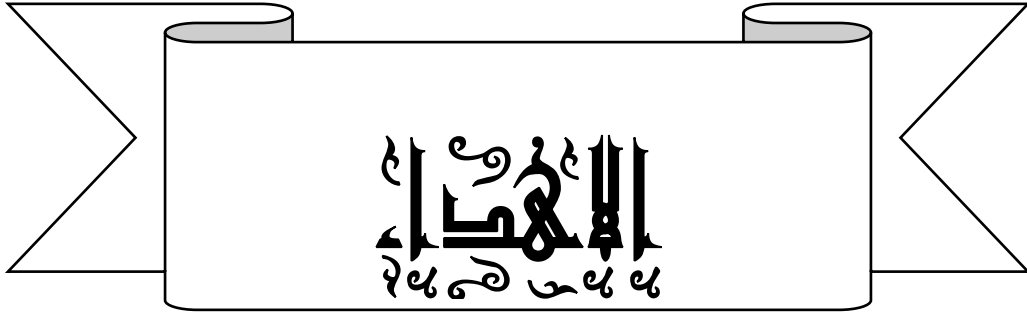
بعد هذا الجهد المتواضع لا يسعني الا ان أتقدم بجزيل الشكر والامتنان الى المشرفة الأستاذ المساعد الدكتورة لمى عبد الهادي زوين لاقتراحها موضوع البحث واشرفها وتوجيهاتها لاكمال البحث.

اقدم جزيل شكري وامتناني الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم)/ جامعة بغداد والى الدكتور ثامر عبد الشهيد محسن رئيس قسم علوم الحياة وجميع الأساتذة الافاضل كما اقدم خالص شكري واحترامي الى منتسبي قسم علوم الحياة كافة، ومنتسبي مستشفى حماية الطفل التعليمي في مدينة بغداد الطبية، لا سيما منتسبي مختبر زراعة سائل النخاع الشوكي وهم كل من البكتريولوجي رقية عبد الله كريم ورئيس بكتريولوجي خلود إبراهيم محمد ومساعد مختبر نشوى رزوقي حمودي وتقني تحليلات مرضية اسراء محمد خليل والبايولوجي نور هادي علوش ومساعد مختبر اقدم زينب جعفر وتقني تحليلات مرضية هدى عزيز جبار.

والى كل من مد يد العون لي من الالهل والأصدقاء واخيراً وفق الله كل من سار في درب

العلم والعمل لما فيه مرضاة الله.

عباس



۱۱

من... اجمهر نفسه لبنائنا... وانهاك قواه... لتقوى

ابن التمهيد

من... سهرت للاجل نومنا... وضعت للاجل انا... نحيا

امى المحونة

من... اشرقتهم في امرى... وشروا بهم ازرى

اخواتى العزيزات

من... تربعت على امرئ قلبي... من ودا مناصى

زوجتي الغالية

من عم... فلذات كبري... وزينة الحياه الدنيا

علي ومصطفى وحوال

من علمني ووجهني للتظاهر هذا العمل... في ابهى صورة

مترقي الفاضلة أ.ب.و. لمى عبد الحادي زوين

عبد الحادي زوين

## الخلاصة

جمعت 248 عينة سريرية لسائل النخاع الشوكي (CSF) من الأطفال الوافدين الى مستشفى حماية الطفل التعليمي/ مجمع مدينة الطب بمحافظة بغداد، في المدة من الثامن من تموز ولغاية الاول من تشرين الاول 2018. وتم زرع العينات على أوساط زرعية ملائمة ثم درست الصفات المزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية على المستعمرات النامية، ومن ثم شخصت العزلات البكتيرية باستعمال جهاز الفايك 2- Compact Vitek .system

اظهرت النتائج نمو 42 عزلة بكتيرية مرضية توزعت الى 6 أنواع ومنها 16 عزلة تعود لبكتيريا *Staphylococcus spp.* وبنسبة 38.1%، وتوزعت العزلات حسب النوع اذ بلغت عزلات *Staphylococcus epidermidis* 16/7 (43.75%) وعزلات كل من *Staphylococcus hominis* و *Staphylococcus haemolyticus* 16/3 (18.75%) وعزلات *Staphylococcus aureus* 16/2 (12.5%) وعزلات *Staphylococcus warneri* 16/1 (6.25%). اما العزلات الأخرى كانت عزلة واحدة من *Pseudomonas putida* و *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumonia* وبنسبة 2.38% وعزلتين من *Burkholderia cepacia* و *Acinetobacter baumannii* وبنسبة 4.76% و 19 عزلة كانت اجناس أنواع بكتيرية اخرى وبنسبة 45.24%. اختبرت حساسية العزلات البكتيرية *Staphylococcus spp.* للمضادات الحيوية فأظهرت النتائج مقاومة اتجاه المضاد الحيوي Levofloxacin, Tobramycin, Gentamicin, Oxacillin, Benzylpenicillin Fusidic Acid, Tetracycline, Clindamycin, Erythromycin, Moxifloxacin, Trimethoprim و Rifampicin, وبنسبة تراوحت بين (100-14.28)%, في حين كانت حساسة بنسبة 100% لكل من المضاد Vancomycin و Teicoplanin و Linezolid

و Tigecycline و Nitrofurantion. لوحظ أيضاً وجود (4, 1, 2, 1) انماط مقاومة متعددة للمضادات الحيوية لبكتيريا *S. epidermidis* و *S. aureus* و *S. haemolyticus* و *S. hominis* و *S. warneri* على التوالي ، اما عزلة *S. epidermidis* فلم تظهر أي مقاومة متعددة للمضادات الحيوية.

تم دراسة قابلية البكتيريا *Staphylococcus* spp. على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الزرع النسيجي باستعمال ثلاثة اوساط زرعية وهي Luria Broth و Trypton soy Broth المحضر بتركيزين 0.25% و 2% كلوكوز، وكانت قدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي باستعمال وسط زرعي Luria broth لبكتيريا *S. epidermidis* و *S. aureus* و *S. haemolyticus* و *S. hominis* و *S. warneri* والتي بلغت 7/7 (100%) و 2/1 (50%) و 3/2 (66.66%) و 3/1 (33.33%) و 1/1 (100%) غير مكونة للغشاء الحيوي على التوالي. اما باستعمال وسط زرعي Tryptone soya broth (T.S.B) الحاوي 0.25% سكر الكلوكوز، لبكتيريا *S. epidermidis* و *S. aureus* و *S. haemolyticus* و *S. hominis* والتي بلغت 7/6 (88.71%) و 2/2 (100%) و 3/2 (66.66%) و 3/3 (100%) ضعيفة التكوين على التوالي، فيما لم تظهر بكتيريا *S. warneri* القدرة على تكوين الغشاء الحيوي. اما عند استعمال وسط T.S.B الحاوي 2% سكر الكلوكوز، فقد أظهرت جميع عزلات بكتيريا *Staphylococcus* spp. قدرتها الضعيفة على تكوين الغشاء الحيوي نسبة 100%.

وعند دراسة تأثير التركيز المثبط الأدنى والتركيز القاتل الأدنى للمضاد الحيوي Erythromycin وبالتركيزين 8 و 16 مايكروغرام/ مل ضد بكتيريا *Staphylococcus* spp. المكونة للغشاء الحيوي، فقد اظهرت ان المضاد اعطى تأثيراً تثبيطياً في البكتيريا المكونة للغشاء الحيوي. وعند دراسة قابلية البكتيريا على الالتصاق باستعمال اطباق Polystyrene فقد كانت اعداد الخلايا الملتصقة لبكتيريا *S. epidermidis* و *S. aureus* و *S. haemolyticus* و

*S. hominis* و *S. warneri* بلغت (230 و 3 و أكبر 300 و 62 و 40) خلية /مل على التوالي. اما عند استعمال خط خلوي Vero cell line اذ بينت نتائج الدراسة الحالية وفق زراعة التخافيف البكتيرية (100:1) في بكتيريا *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* و *S. warneri* بلغت (9 و  $300 \leq 300$  و 30 و 292) خلية /مل على التوالي. درست قابلية عزلات *Staphylococcus spp.* على حركة الانتشار وظهرت النتائج قابليتها على الحركة بالانتشار فضلا عن اعطاء اشكال مختلفة حسب نوع البكتيريا فكانت حركة الانتشار تراوحت في بكتريا *S. epidermidis* من 7.7-16.5 ملمتر، وبكتريا *S. aureus* تراوح بين 8.97-16.0 ملمتر، وبكتيريا *S. haemolyticus* تراوح بين 8.0-14.6 ملمتر، وفي بكتريا *S. hominis* تراوح بين 10.3-16.5 ملمتر، وفي *S. warneri* بلغ 16.8 ملمتر. الكشف الجزيئي عن الجينات، فقد اظهرت جميع العزلات احتواءها على جين *eno* الذي يشفر الى بروتين ارتباط طبقة Laminin (Laminin binding protein)، واما جين *bap* الذي يشفر الى البروتين المشارك في تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm association protein (Bap)، فقد اظهرت نتائج الدراسة الحالية عدم امتلاك اي من العزلات البكتيرية *Staphylococcus spp.* للجين. في حين كان جين *cna* الذي يشفر لبروتين الارتباط الكولاجين (Collagen binding protein (Cna)، امتلاك بكتيريا *S. aureus* وبنسبة (50%)، وعند الكشف عن جين *clfA* الذي يشفر الى عامل التلازن Clumping factor A (ClfA) A اذ كانت بكتيريا *S. aureus* تمتلك هذا الجين بنسبة 100% اما جين *icaA* الذي يشفر لجين الالتصاق داخل خلوي Intercellular adhesion gene A اذ نلاحظ امتلاك بكتيريا *S. aureus* جين *icaA* بنسبة (100%)، وفي *S. epidermidis* بنسبة (57.1%)، اما عزلات بكتيريا *S. hominis* و *S. warneri* و *S. haemolyticus* لم تظهر امتلاكها لجين *icaA*.

## قائمة المحتويات

رقم الصفحة	العنوان	التسلسل
أ	الخلاصة	
د	قائمة المحتويات	
ي	قائمة الجداول	
ل	قائمة الاشكال	
م	قائمة المختصرات	
الفصل الاول		
1	المقدمة	-1
الفصل الثاني/ استعراض المراجع		
4	استعراض المراجع Literatures Review	-2
4	الوصف التشريحي للجهاز العصبي المركزي	1-2
5	سائل النخاع الشوكي	2-2
5	التهاب السحايا	3-2
6	الاعراض السريرية لمرضى التهاب السحايا عند الاطفال	4-2
6	الفحوصات الكيميائية لمرضى التهاب السحايا	5-2
7	الانواع البكتيرية المعزولة من مرضى التهاب السحايا	6-2
7	الانواع السائدة	1-6-2
7	جنس المكورات العنقودية Genus: <i>Staphylococcus</i>	1-1-6-2
8	بكتيريا <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1-1-1-6-2
9	عوامل الضراوة لبكتيريا <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1-1-1-1-6-2
11	بكتيريا <i>Staphylococcus aureus</i>	2-1-1-6-2
12	بكتيريا <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3-1-1-6-2
13	بكتيريا <i>Staphylococcus homini</i>	4-1-1-6-2
14	بكتيريا <i>Staphylococcus warneri</i>	5-1-1-6-2
14	مقاومة عزلات بكتيريا <i>Staphylococcus spp.</i> للمضادات الحيوية	2-1-6-2
17	قابلية عزلات بكتيريا <i>Staphylococcus spp.</i> على تكوين الغشاء الحيوي	3-1-6-2
19	قابلية عزلات بكتيريا <i>Staphylococcus spp.</i> على	4-1-6-2



	الالتصاق	
22	الانواع البكتيرية الاقل سيادة والمعزولة من الاطفال المصابين بالتهاب السحايا.	2-6-2
22	<i>Escherichia coli</i>	1-2-6-2
22	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2-2-6-2
23	<i>Burkholderia cepacia</i>	3-2-6-2
23	<i>Pseudomonas putida</i>	4-2-6-2
23	<i>Klebsiella pneumonia</i>	5-2-6-2
<b>الفصل الثالث</b>		
25	المواد وطرائق العمل Materials and Methods	-3
25	المواد	1-3
25	الأجهزة والأدوات المختبرية Tools and Instruments	1-1-3
26	المواد الكيميائية Chemical materials	2-1-3
26	الأوساط الزرعية Cultures media	3-1-3
27	الصبغات والمحاليل Stains and Solution	4-1-3
27	الكواشف Reagents	5-1-3
28	العدد Kits	6-2-3
28	الخطوط الخلوية السرطانية Cancer cell lines	7-1-3
29	المضادات الحيوية Antibiotics	8-1-3
29	مواد اخرى	9-1-3
30	تسلسل بواديء الجينات	10-1-3
30	طرائق العمل Methods	2-3
30	التعقيم Sterilization	1-2-3
31	تحضير المحاليل Preparation of solutions	2-2-3
31	المحلول الفسلجي الملحي Normal saline	1-2-2-3
31	محلول داريء الفوسفات الملحي Phosphate Buffered saline (PBS)	2-2-2-3
31	محلول صبغة Crystal violet solution	3-2-2-3
31	محلول العكارة القياسي مكفرلانند McFarland standard solution	4-2-2-3
32	محاليل المضادات الحيوية	5-2-2-3
32	محلول التريسين - فرسين Trypsin-Versene Solution	6-2-2-3

33	Sodium bicarbonate محلول بيكربونات الصوديوم solution	7-2-2-3
33	Tris borate EDTA Buffer (1X) TBE محلول دارى	8-2-2-3
33	Primers solutions محاليل البادئات	9-2-2-2
33	Preparation of cultural تحضير الأوساط الزرعية media	3-2-3
33	Ready made media تحضير الأوساط الزرعية الجاهزة	1-3-2-3
33	Laboratory Prepared تحضير الأوساط الزرعية التركيبية media	4-2-3
34	Blood agar وسط اكار الدم	1-4-2-3
34	Chocolate agar وسط اكار الشكولاتة	2-4-2-3
35	Urea agar وسط اليوريا الصلب	3-4-2-3
35	وسط الجيلاتين	4-4-2-3
35	وسط تربتون الصويا السائل الحاوي 0.25% كلوكوز	5-4-2-3
35	وسط تربتون الصويا السائل الحاوي 2% كلوكوز	6-4-2-3
35	Spreading وسط اختبار	7-4-2-3
36	Rosswell Park Memorial Institute, 1640 وسط (RPMI -1640)	8-4-2-2
36	Clinical Sample collection جمع العينات السريرية	5-2-3
36	عزل وتشخيص عزلات البكتريا المسببة لمرض السحايا Isolation and Identification of meningitis Bacteria	6-2-3
36	Samples culture زرع العينات	1-6-2-3
37	Morphological characteristics الصفات المظهرية	2-6-2-3
37	Microscopic examination الفحص المجهرى	3-6-2-3
37	Biochemical test الاختبارات الكيموحيوية	4-6-2-3
37	Catalase test فحص الكتاليز	1-4-6-2-3
37	Oxidase test فحص الأوكسيديز	2-4-6-2-3
38	Indol test اختبار الأندول	3-4-6-2-3
38	Methyl Red Test اختبار أحمر المثل	4-4-6-2-3
38	Voges –Proskauer Test اختبار الفوكس بروسكاور	5-4-6-2-3
39	Citrate utilization Test اختبار استهلاك السترات	6-4-6-2-3

39	اختبار إنتاج أنزيم اليوريز Urease test	7-4-6-2-3
39	اختبار تخمر السكريات على وسط Kligler Iron Agar	8-4-6-2-3
40	اختبار إنتاج انزيم الجلاتينيز Gelatinase	9-4-6-2-3
40	اختبار إنتاج الانزيم المخثر البلازما Coagulase test	10-4-6-2-3
40	اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>Staphylococcus</i> spp. للمضاد Novobiocin	11-4-6-2-3
40	النمو في درجة حرارة 15°م و 45°م	12-4-6-2-3
41	النمو على وسط المانتول الملحي الصلب	13-4-6-2-3
41	تشخيص عزلات البكتريا المسببة لمرض السحايا لدى الاطفال باستعمال جهاز الفايتهك Compact system Vitek -2	7-2-3
43	حفظ العزلات البكتيرية Preservation of Bacteria isolates	8-2-3
43	الحفظ قصير الأمد Short period culture	1-8-2-3
43	الحفظ طويل الأمد Long period culture	2-8-2-3
43	فحص اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لعزلات البكتريا المسببة لمرض السحايا باستعمال التركيز المثبط الأدنى: MIC Sensitivity Test for meningitis bacterial by MIC:	9-2-3
44	اختبار قدرة عزلات بكتريا ( <i>Staphylococcus</i> spp.) على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm	10-2-3
46	اختبار مقاومة بكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp. المكونة للغشاء الحيوي للمضاد Erythromycin	11-2-3
47	اختبار حركة الانتشار	12-2-6
47	اختبار قدرة عزلات بكتريا ( <i>Staphylococcus</i> spp.) على الالتصاق Adhesion	13-2-3
47	اختبار الالتصاق على اطباق Polystyrene	1-13-2-3
47	اختبار الالتصاق على الخلايا الطلائية السرطانية	2-13-2-3
49	الكشف الجزيئي عن بعض جينات بكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp.	14-2-3
49	استخلاص DNA الجينوم لبكتريا <i>Staphylococcus</i> spp.	1-14-2-3

	Genomic DNA extraction of <i>Staphylococcus</i> spp. bacteria	
50	الكشف الجزيئي عن بعض جينات <i>Staphylococcus</i> spp. باستعمال جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل (PCR)	2-14-2-3
54	الترجيل الكهربائي في هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis.	3-14-2-2
<b>الفصل الرابع</b>		
55	النتائج والمناقشة Results and Discussion	-4
55	جمع العينات وعزل وتشخيص البكتيريا في سائل النخاع الشوكي من أطفال مرضى بالتهاب السحايا Collection of samples, isolation and identification of bacteria in spinal cord from children with meningitis	1-4
55	الصفات المظهرية Morphological Characteristics	1-1-4
55	الفحص المجهرى Microscopic examination	2-1-4
56	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical test system	3-1-4
57	التشخيص بعدة الفايك (GP, GN) Diagnosis by Vitek-2	4-1-4
60	الحساسية للمضادات الحيوية Sensitivity of Antibiotic	2-4
71	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية Multi drugs resistance for antibiotic	3-4
72	قابلية عزلات بكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp. على تكوين الغشاء الحيوي	4-4
76	مقاومة عزلات بكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp. للمكونات للغشاء الحيوي للمضادات الحيوية.	5-4
77	قابلية عزلات البكتيريا على حركة الانتشار	6-4
80	قابلية عزلات بكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp. على الالتصاق	7-4
84	الكشف الجزيئي لبعض الجينات في أنواع بكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp.	8-4
<b>الاستنتاجات والتوصيات</b>		
93	الاستنتاجات	

94	التوصيات	
95	المصادر	

## قائمة الجداول

رقم الصفحة	العنوان	رقم الجدول
25	الاجهزة والادوات المختبرية.	1-3
26	المواد الكيميائية.	2-3
26	الايوساط الزراعية.	3-3
27	الصبغات.	4-3
27	الكواشف.	5-3
28	العدد المختبرية.	6-3
28	الخطوط السرطانية.	7-3
29	المضادات الحيوية.	8-3
29	مواد اخرى استعملت في الدراسة الحالية.	9-3
30	البودئ	10-3
51	خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين <i>eno</i> .	11-3
52	خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين <i>bap</i> .	12-3
52	خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين <i>cna</i> .	13-3
53	خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين <i>clfA</i> .	14-3
53	خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين <i>icaA</i> .	15-3
56	اختبارات الكيموحيوية لبكتيريا <i>Staphylococcus spp.</i>	1-4
57	الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا السالبة لصبغة كرام	2-4
62	حساسية عزلات بكتريا <i>S.epidermidis</i> للمضادات الحيوية باستعمال التركيز المثبط الادنى (MIC) باستعمال جهاز Vitek-2.	3-4
63	حساسية عزلات بكتريا <i>S. aureus</i> للمضادات الحيوية باستعمال التركيز المثبط الادنى (MIC).	4-4
64	حساسية بكتريا <i>S. haemolyticus</i> للمضادات الحيوية باستعمال التركيز المثبط الادنى (MIC).	5-4
65	حساسية عزلات بكتريا <i>S. hominis</i> للمضادات الحيوية باستعمال التركيز المثبط الادنى (MIC).	6-4
66	حساسية عزلات بكتريا <i>S. warneri</i> للمضادات الحيوية باستعمال التركيز المثبط الادنى (MIC).	7-4



72	انماط المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لعزلات بكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp.	8-4
73	قدرة عزلات بكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp. على تكوين الغشاء الحيوي في وسط Luria broth.	9-4
73	قدرة عزلات بكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp. على تكوين الغشاء الحيوي في وسط TSB المضاف له 0.25% كلوكوز.	10-4
74	قدرة عزلات بكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp. على تكوين الغشاء الحيوي في وسط TSB الحاوي على 2% كلوكوز.	11-4
78	قابلية عزلات بكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp. على الانتشار في وسط TSB الحاوي على 0.24% من الاكار.	12-4
81	اعداد الخلايا البكتيرية لبكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp. الملتصقة على اطباق Polystyrene.	13-4
82	اعداد الخلايا البكتيرية لبكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp. الملتصقة باستعمال خط الخلايا الطلائية Vero cell line.	14-4
87	النسب المئوية للجينات المتواجدة في أنواع بكتيريا <i>Staphylococcus</i> spp.	15-4

## قائمة الاشكال

رقم الصفحة	العنوان	رقم الشكل
58	النسبة المئوية للعزلات البكتيرية المعزولة من سائل النخاع الشوكي.	1-4
59	النسبة المئوية لعزلات بكتيريا <i>Staphylococcus spp.</i>	2-4
77	مقاومة عزلات بكتيريا <i>Staphylococcus spp.</i> المكونة للغشاء الحيوي للمضاد Erythromycin.	3-4
80	حركة الانتشار لبكتيريا <i>Staphylococcus spp.</i>	4-4
82	التصاق الخلايا البكتيرية <i>Staphylococcus spp.</i> على الخلايا الطلائية.	5-4
88	الترحيل الكهربائي لنتاج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>Staphylococcus spp.</i> باستعمال بادئ primer لجين <i>eno</i> (302 زوج قاعدة). باستعمال هلام الاكاروز 1% و فرق جهد 100 فولت لمدة 75 دقيقة.	6-4
89	الترحيل الكهربائي لنتاج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>Staphylococcus aureus</i> باستعمال بادئ primer لجين <i>clfA</i> (292 زوج قاعدة) وجين <i>can</i> 423 زوج قاعدة. باستعمال هلام الاكاروز 1% و فرق جهد 100 فولت لمدة 75 دقيقة.	7-4
91	الترحيل الكهربائي لنتاج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا <i>Staphylococcus aureus</i> باستعمال بادئ primer لجين <i>icaA</i> (1315 زوج قاعدة) باستعمال هلام الاكاروز 1% و فرق جهد 100 فولت لمدة 75 دقيقة.	8-4

## قائمة المختصرات

المختصرات	المصطلحات
Aap	Accumulation associated protein
AMPs	Antimicrobial peptides
AIP	Autoinducer peptide
Bap	Biofilm association protein
Bap	Biofilm associated protein
BBB	Blood brain barrier
BHIA	Brain Heart Infusion Agar
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
CNS	Central nervous system
CSF	Cerebrospinal fluid
CifA	Clumping factor A
CONS	Coagulase Negative Staphylococcus
EcpA	Cysteine protease
CNF1	cytotoxic necrotizing factor 1
DHFR	Dihydrofolate reductase
DHPS	dihydropteroate synthetase
EfG	Elongation factor G
SEIL	Enterotoxin – like toxin
SEC 3	Enterotoxin C3
eDNA	extracellular DNA
Embp	Extracellular matrix binding protein
FAME	Fatty acid modifying enzyme activity
ICVS	Intensive care unit
Embp	Intracellular matrix-binding protein
KIA	Kligler Iron Agar
LBB	Luria Bertani Broth
MSCRAMMs	Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules
MIC	Minimum inhibitory concentration
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
NlpI	New lipoproteins
OMPA	Outer membrane protein
PNS	Peripheral nervous system
PBP	Penicillin binding protein
PW	Peptone water
PSms	Phenol soluble modulins
PBS	Phosphate Buffer Saline

PGA	Poly- $\gamma$ - glutamic acid
PCR	Polymerase chain reaction
PIA	Polysaccharide intercellular adhesion
QS	Quorum Sensing agar
RFIP	Restriction fragment length polymorphism
RPMI-1640	Rosswell Park Memorial Institute 1640
SdrG	Serine –aspartate repeat protein
sesI	Surface protein I
FnBP A, B	Surface-located fibronectin binding protein A, B
TA	Teichoic acid
TSS	Toxic Shock Syndrome
TBE	Tris Borate EDTA
TSA	Tryptone Soy Agar
TSB	Tryptone Soy Broth

الفصل الأول

المقدمة

**Introduction**

## 1- المقدمة

التهاب السحايا Meningitis هو احد الامراض التي تصيب الجهاز العصبي المركزي Central nervous system (CNS) يتسبب بشكل رئيس من الإصابة ببعض اجناس البكتريا و Mycobacteria والفطريات والفايروسات والطفيليات التي تؤدي الى احداث حالات مرضية ومن ثم الوفاة. تشكل الاصابات البكتيرية النسبة الاكبر من بقية الأنواع الأخرى اذ تبلغ 56.6% والفايروسات 30.2% (Long et al., 2018).

اشار (Robertson et al. (2018 الى اصابة 2,907,146 شخصاً سنوياً بمرض التهاب السحايا في كل انحاء العالم كانت اكثرها في افريقيا اذ بلغت عدد الاصابات 100000 /65 شخصاً وبنسبة (95%) واقلها في الولايات المتحدة الامريكية وكندا اذ بلغت اصابة 100000/2 شخصاً، في حين بين (Khan (2017a ان نسبة الوفيات تصل 12% ومعظم الحالات كانت جراء اجراء عمليات جراحية للجملعة العصبية وكانت بكتيريا *Staphylococcus* السالبة لفحص تخثر بلازما الدم اكثر الانواع عزلا من مرضى التهاب السحايا.

اما (Rhie et al. (2017 فقد بين ان هناك انواع بكتيرية مسببة لمرض التهاب السحايا ومنها بكتريا *Escherichia coli* بلغت 41.3% وبكتيريا *Streptococcus agalactiae* بلغت 27.7% وبكتيريا *Staphylococcus aureus* بلغت 27.1% اذ كانت الاكثر شيوعا في الاطفال اقل من 3 اشهر، مشيراً الى ان الاطفال دون عمر 5 سنوات كانت بكتيريا *S.aureus* هي السائدة في احداث المرض في اطفال كوريا وبنسبة 62.8%، وبيّن ان الاشخاص الاكثر عرضة لهذا المرض او غزو البكتيريا هم ذو النقص المناعي الفطري والمكتسب، وفي العلاج الستيرويدي او الكيماوي والخدج وكذلك الاطفال الذين يعانون من التركيب التشريحي غير الطبيعي لطبقات السحايا وتسرب السائل النخاع الشوكي.



خلايا المكورات العنقودية كروية تبلغ اقطارها بين 0.5 – 1.5 مايكرومتر، تتواجد بشكل مفرد او ازواج او بشكل سلاسل قصيرة وتكون تجمعات غير منتظمة على شكل عناقيد عنكب، وهي موجبة لصبغة كرام، غير متحركة، مكونة للكبسولة او محدودة التكوين، اختيارية هوائية (Carroll, 2013). معدل تواجد بكتريا المكورات العنقودية ربما يكون ضيقاً او واسعاً، اذ يعتمد على النوع الخاص او تحت النوع، بعضها يمكن ان يعزل من المنتجات الحيوانية المختلفة وكذلك من المصادر البيئية المختلفة مثل (التربة، الرمل، الغبار، الهواء، الماء الطبيعي، وكذلك من الملابس) (Lee et al., 2018). بعض انواع المكورات العنقودية تكون انتهازية تسبب الامراض كالدمل، الحصف (داء جلدي)، انحلال البشرة السمي، التهاب الأمعاء، التهاب الثدي، التهاب المثانة، التهاب البروستات، التهاب المخ، التهاب السحايا، تجرثم الدم (Josse et al., 2017)، ان بكتريا *Staphylococcus spp.* تمتلك عوامل ضراوة عديدة ومن اهمها بروتينات متعددة الوظائف تشترك في استعمار اسطح المضيف كالبروتين المشترك في تراكم البكتيريا Accumulation associated protein (Aap) والبروتين المرتبط الخارج خلوي Extracellular matrix binding protein (Embp) كونها اكثر العوامل بقاءً وتأثيراً (Büttner, 2015).

ولقلة وجود دراسات محلية في التحري عن الانواع البكتيرية المسببة او المرافقة لمرضى التهاب السحايا ولاسيما عند الاطفال حديثي الولادة والرضع لذا هدفت الدراسة الحالية الى اجراء دراسة بكتريولوجية عامة عن مرضى التهاب السحايا ومعرفة الانواع البكتيرية السائدة والتي تمثلت باتباع الخطوات الاتية:

1. جمع عينات سائل النخاع الشوكي (Cerebrospinal fluid (CSF) من الاطفال دون سن الخمس سنوات.

2. عزل وتشخيص البكتريا بالطرائق المزرعية والكيموحيوية واستعمال جهاز الفايتك.

3. دراسة حساسية العزلات للمضادات الحيوية باستعمال التركيز المثبط الأدنى MIC في جهاز الفايتهك للبكتريا السائدة.

4. دراسة بعض عوامل الضراوة للبكتريا السائدة (تكوين الغشاء الحيوي، الالتصاق على السطوح الحية وغير الحية وقابلية على الحركة بالانتشار).

5. التحري عن بعض جينات الضراوة للبكتريا السائدة (*cna* الذي يشفر إلى

Intercellular adhesion، *icaA* الذي يشفر إلى Collagen binding protein

gene A، و *eno* الذي يشفر إلى Laminin binding protein و *clfA* الذي يشفر إلى

Clumping factors A و *bap* الذي يشفر إلى Biofilm associated protein).

الفصل الثاني

استعراض المراجع

**Literature Review**

## 2: استعراض المراجع

### 1-2: الوصف التشريحي للجهاز العصبي المركزي

يتكون الجهاز العصبي Nervous system من جزأين أساسيين هما الجهاز العصبي المركزي (Central nervous system (CNS) والجهاز العصبي المحيطي Peripheral nervous system (PNS) والجهاز العصبي المحيطي يتكون من الأعصاب Nerves والعقد العصبية Neural ganglia المرتبطة بالدماع والحبل الشوكي. فيما يتكون الجهاز العصبي المركزي من الدماغ Brain الذي يقع ضمن تجويف القحف Cranium والحبل الشوكي Spinal cord الذي يقع ضمن القناة العصبية Neural canal.

يتألف الدماغ من ثلاثة أقسام وهي الدماغ الأمامي Prosencephalon الذي يتميز إلى جزأين ثانويين هما (الدماغ الانتهائي Telencephalon والدماغ البيني Diencephalon)، والدماغ المتوسط Mesencephalon والدماغ المؤخر Rhombencephalon الذي يتميز إلى جزئين ثانويين أيضاً هما (الدماغ البعدي Metencephalon والدماغ النخاعي Myelencephalon) (Patestas and Gartner, 2006). ويمثل الدماغ الانتهائي المخ Cerebrum ويوجد في منتصفه شق طولي يدعى بالشق المخي الطولي Longitudinal cerebral fissure الذي يقسم المخ إلى قسمين متماثلين هما نصفي كرة المخ Cerebral hemispheres تكونان على شكل حوصلتين مرتبطتين مع بعضهما وتحاط الحوصلتين من الخارج بالسحايا Meninges. أما الدماغ البيني فإنه يتألف من ثلاثة مناطق وهي فوق المهاد Epithalamus ويمثل الجزء الظهري للدماغ البيني (سقفه)، أما المنطقة الثانية للدماغ البيني تمثل المهاد Thalamus والتي تمثل الجزء الجانبي السميك من الدماغ البيني والمنطقة الثالثة تمثل تحت المهاد Hypothalamus وهي الجزء البطني من الدماغ البيني (القاع).

أما الدماغ المتوسط يحتوي في الداخل على المسال المخي Cerebral aqueduct ويتكون الدماغ المؤخر من الدماغ البعدي الذي يتكون من المخيخ Cerebellum الذي يقع في جزئه الظهرى والجسر Pons الذي يقع في جزئه البطني، اما الدماغ النخاعيني فانه يكون النخاع المستطيل Medulla oblongata (Weller *et al.*, 2018; Junqueira and Carneior, 2005).

يحيط بالدماغ والحبل الشوكي ثلاث طبقات متكونة من النسيج الضام تسمى السحايا والتي تحمي الدماغ، الام الجافية Dura matter وهي عبارة عن غطاء سميك يغطي الدماغ تغطية خارجية قوية اما الطبقة الثانية فتسمى الام العنكبوتية Arachnoid matter وهي طبقة متكونة من نسيج ليفي على شكل خيوط شعرية متداخلة تسمى الحواجز العنكبوتية، التي تقع بين الام الجافية من الخارج والام الحنون من الداخل وتفصل عن الام الجافية بفراغ يدعى الفسحة تحت الجافية Subdural space مليئة بالسائل الدماغي الشوكي، اما الطبقة الثالثة والتي تدعى الام الحنون Pia matter وهي غشاء رقيق غير نفاذ يغطي الدماغ (Adeeb *et al.*, 2012).

## 2-2: سائل النخاع الشوكي CSF Cerebrospinal fluid

وهو عبارة عن سائل لالون له ولا رائحة ويحتوي على الماء بشكل اساسي وشوارد والعناصر الموجودة في الدم فضلا عن الاوكسجين وثنائي اوكسيد الكاربون الذائبين، يمكن الحصول عليه من خلال طبقات الام الجافية والعنكبوتية بوساطة وخز المنطقة القطنية (البزل القطني) Lumber puncture وذلك لتجنب تلف النسيج الوسطي المركزي للحبل الشوكي والاعوية الدموية المغذية للنسيج العصبي المركزي (Shenoy *et al.*, 2017).

## 3-2: التهاب السحايا

وهو عبارة عن التهاب الاغشية المغلفة للدماغ والحبل الشوكي والسائل النخاعي الشوكي والتي تعرف بالسحايا Meninges، تحدث التهابات السحايا بفعل الاصابات الفيروسية او البكتيرية،

الا ان الاصابات التي تحدث بفعل البكتريا تكون اكثر حدة من الاصابات الفيروسية، وان اغلب الاصابات البكتيرية تحدث بفعل *Staphylococcus*، *Streptococcus* و *Mycobacterium* (Meningitis, 2001).

#### 2-4: الاعراض السريرية لمرضى التهاب السحايا عند الاطفال

اشارت العديد من الدراسات الى ان اعراض التهاب السحايا في الاطفال حديثي الولادة هي تسارع ضربات القلب (Tachycardia) الى اكثر من 160 / دقيقة او تباطؤ ضربات القلب (Bradycardia) اقل من 100 / دقيقة، واعراض تنفسية مثل الشخير، انقباضات تنفسية، تسارع التنفس (Tachypnea) إذ يكون اكثر من 60 مرة/ دقيقة او انقطاع التنفس لاكثر من 20 ثانية، فضلاً عن اعراض الجهاز العصبي المركزي تتمثل بالبكاء الشديد أو البكاء بصوت عالٍ، انتفاخ اليافوخ وحدوث تشنجات، فضلاً عن اعراض اخرى وهي الكسل، قلة القدرة على الرضاعة، عدم وجود حركات تلقائية، ارتفاع درجة الحرارة اكثر من 38°م أو انخفاض درجات الحرارة، ازرقاق وانتفاخ البطن وصداع شديد وتقيؤ ونوبات مع فقدان الوعي وتخشب الرقبة (Bhagat et al., 2015; Kumar et al., 2018; Dashti et al., 2017;

#### 2-5: الفحوصات الكيميائية لمرضى التهاب السحايا

بينت البحوث ان الفحوصات الكيميائية بالنسبة لسائل CSF تكون نسبة سكر الكلوكوز فيه اقل من نسبته في بلازما الدم تقريباً 50% وعدد كريات الدم البيض اكثر من 10 خلية/ملمتر مكعب، في حين تكون نسبة البروتين اكثر من 80 ملغرام/ دسي لتر (Bhagat et al., 2015)، اما (Ma and Yohoshuva (2016) فقد أشار الى ان غالبية الحالات المصابة بالسحايا تكون نسبة الكلوكوز في CSF اقل من نسبة الكلوكوز بالدم، في حين تكون نسبة البروتين عالية واكثر من نسبته في مصل الدم. أشار Khan et al. (2017a) الى ان الفحوصات الكيميائية التي يجب



اجراؤها على عينة السائل CSF هي نسبة سكر الكلوكوز التي تكون منخفضة بنسبة اقل من او يساوي 40 ملغرام/دسي لتر، ازدياد في مستوى البروتين الى اكثر من او يساوي 60 ملغرام/دسي لتر، وان فحص عدد كريات الدم البيض تكون اكبر من او يساوي 100 خلية/ملمتر مكعب واحد. كما اشار (2017) *Dashti et al.* الى كيفية التعامل مع عينة CSF، إذ قسم كمية CSF الى جزأين، يتم فحص الجزء الاول باستخدام الفحص الزرعي وتصيغه بصبغة كرام او استعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Polymerase chain reaction، اما الجزء الاخر فتجرى له فحوصات قياس نسبة سكر الكلوكوز التي تكون اقل من او يساوي 40 ملغرام/دسي لتر وفحص نسبة البروتين والتي تكون اكثر من او يساوي 80 ملغرام/دسي لتر، اما فحص عدد كريات الدم البيض التي تكون اكثر من او يساوي 300 خلية/ملمتر مكعب، اما (2018) *Kumar et al.* فقد اشار الى ان معدل نسبة سكر الكلوكوز في CSF الاشخاص المصابين بالسحايا بلغ 56 ملغرام/دسي لتر، في حين كانت النسبة في الاصحاء 75 ملغرام/دسي لتر، اما معدل نسبة البروتين فكان 174 ملغرام/دسي لتر في حين كانت في الاصحاء 46 ملغرام/دسي لتر.

## 2-6: الانواع البكتيرية المعزولة من مرضى التهاب السحايا

### 2-6-1: الانواع السائدة

#### 2-6-1-1: جنس المكورات العنقودية *Genus: Staphylococcus*

تبلغ اقطار خلايا المكورات العنقودية بين (0.5-1.5) مايكرومتر، تتواجد بشكل مفرد او ازواج او بشكل سلاسل قصيرة من (3-4) خلايا وتكون تجمعات غير منتظمة على شكل عنائيد عنب، وهي موجبة لصبغة كرام، غير متحركة، مكونة للكبسولة او محدودة التكوين، اختيارية لا هوائية فيما عدا *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* و *Staphylococcus saccharolyticus* فهي لاهوائية اجبارية، معظم سلالات المكورات العنقودية تنمو بوجود 10%

من ملح كلوريد الصوديوم NaCl ودرجة حرارة بين 18-40°م. تمتاز كونها موجبة لفحص الكاتاليز Catalase وسالبة لفحص الاوكسيداز Oxidase (Carroll, 2013).

تتواجد طبيعياً وبشكل رئيس على الجلد وغدد الجلد والاعشوية المخاطية للحيوانات ذوات الدم الحار، معدل تواجد بكتريا المكورات العنقودية ربما يكون ضيقاً او واسعاً، اذ يعتمد على النوع الخاص او تحت النوع، بعضها يمكن ان يعزل من المنتجات الحيوانية المختلفة مثل (اللحم، الحليب، الجبن) وكذلك من المصادر البيئية المختلفة مثل (التربة، الرمل، الغبار، الهواء، الماء الطبيعي، وكذلك من الملابس) (Lee et al., 2018).

تكون بعض انواع المكورات العنقودية انتهازية تسبب الامراض منها الدمامل، الحصف (داء جلدي)، انحلال البشرة السمي، التهاب الرئة، التهاب العظم والنقي، التهاب القلب وعضلة القلب، التهاب شغاف القلب، التهاب الأمعاء، التهاب الثدي، التهاب المثانة، التهاب البروستات، التهاب عنق الرحم، التهاب المخ، التهاب السحايا، تجرثم الدم، خراجات العضلات والجلد، التهاب المسالك التناسلية البولية، التهاب الجهاز العصبي المركزي (Yarwood et al., 2002; Josse et al., 2017).

### 1-1-1-6-2: بكتيريا *Staphylococcus epidermidis*

تمتاز بكتيريا *S. epidermidis* كونها غير ضارة وهي من البكتيريا المتعايشة، اذ تتواجد بنسبة كبيرة على جلد الانسان، وتحت ظروف معينة ولا سيما عند استعمال اجهزة الاعطاء والاجهزة المزروعة في جسم الانسان باستطاعتها الاستعمار والغزو والانغراس، وظهورها بشكل بكتريا مرضية (Büttner et al., 2015). تصنف بكتريا *S. epidermidis* مع البكتيريا السالبة لاختبار تخثر بلازما الدم (Coagulase Negative Staphylococcus (CoNS) لها دور بارز في احداث الاصابات السريرية، والتي تعود الى امتلاكها عوامل ضراوة متنوعة (Namvar et al., 2014). تسبب بكتيريا *S. epidermidis* مرض التهاب السحايا عن طريق العدوى المكتسبة في

المستشفيات ولاسيما باجهزة الاعطاء (Noguchi *et al.*, 2018)، وذلك لقدرتها على تكوين الغشاء الحيوي على الاجهزة الطبية المغروسة داخل جسم المريض، ومن خلية واحدة ممكن ان تنتشر بوساطة مجرى الدم لتبدأ الاستعمار في اماكن مختلفة من الجسم التي تؤدي الى مرض تعفن الدم، والتهاب السحايا والتهاب عضلة القلب (Becker *et al.*, 2014).

## 1-1-1-1-6-2: عوامل الضراوة لبكتيريا *Staphylococcus epidermidis*

### 1. انزيم البروتيز *Protease*

يملك انزيم البروتيز وظيفتين رئيسيتين هما تزويد الكائنات الحية بالمغذيات الببتيدية واشتراكه في احداث امراضية بوساطة ميكانيكيات مختلفة (Martnez-Garcia *et al.*, 2017). وتمتلك بكتريا *S.epidermidis* ثلاثة انواع من البروتينات وهي سيرين بروتيز *Serine protease*، الذي يحلل الببتيدات المضادة للبكتريا *Antimicrobial peptides (AMPs)* وسيستين بروتيز *Cysteine protease EcpA* الذي يحلل مولد الليفين *Fibrinogen* وعامل نظام المتمم *C5 Metalloprotease (SepA)* (Lai *et al.*, 2007; Dubin *et al.*, 2001)، وبروتيز المعدني *Operon* (Martnez-Garcia *et al.*, 2017) وهي انزيمات خارج خلوية تشفر بوساطة *Operon* (Martnez-Garcia *et al.*, 2017).

### 2. *Fatty acid modifying enzyme activity*

تفرز بكتريا *S.epidermidis* الانزيمات المحورة للاحماض الدهنية *Fatty acid-modifying enzyme (FAME)* التي تعمل على ازالة سمية الاحماض الدهنية المضادة للبكتريا (Chamberlain and Brueggemann, 1997) ان البروتينات او الجينات المسؤولة عن فعالية *FAME* غير معروفة (Otto, 2012).

### 3. Toxins

تعود معظم امراضية السلالات السريرية لبكتريا *S.epidermidis* الى امتلاكها ذيفان Enterotoxin – like toxin (SEIL) وذيفان Enterotoxin C3(SEC3) فضلاً عن Delta toxin (Vuong *et al.*, 2004).

### 4. Phenol – soluble modulins (PSMs)

تعد مجاميع PSMs ببتيدات حلزونية امفوتيرية تتواجد في انواع المكورات العنقودية ولها القابلية على تحلل كريات الدم الحمر والبيض وتغيير تعبير الساييتوكينات (Vuong *et al.*, 2004).

### 5. Poly- $\gamma$ - glutamic acid (PGA)

يتكون PGA من وحدات متكررة من حامض الكلوتاميك الذي يرتبط بوساطة مجموعة الكربوكسيل (Ashiuchi and Misono, 2002)، يتواجد PGA في العديد من الكائنات الدقيقة ولا سيما في البكتريا المحبة للملح Halophilic (Oppermann-Sanio and Steinbüchel, 2002). ورغم ان البحوث منذ عام 2005 قد اشارت الى ان هذا العامل اكتشف فقط في بكتريا *Bacillus anthracis* الا انه حالياً مكتسباً في بكتريا *S.epidermidis* (Kocianova *et al.*, 2005). يعمل PGA على حماية البكتريا من التهرب من الانظمة المناعية لاسيما عملية البلعمة (Makino *et al.*, 1989). في حين اشارت دراسة (Kocianova *et al.*, 2005) ان PGA في بكتريا *S.epidermidis* يتكون من وحدات (D- and L-glutamic acid)، ووجوده مهم لمقاومة البكتريا للبتيدات المضادة والخلايا العدلة في جسم المضيف، الا انه ليس له دور في تكوين الغشاء الحيوي.

## 6. Teichoic acid (TA)

يوجد على سطح البكتريا الموجبة لصبغة كرام ويتكون من وحدات الفوسفيت Phosphate والرابيتول او الكليسول (Otto, 2012). لحمض التكويك دور مزدوج في بكتريا المكورات العنقودية وهو دور فسيولوجي وامراضي اذ يشارك في عملية الالتصاق والاستعمار والالتهاب (Weidenmaier and Peschel, 2008; Gross *et al.*, 2001)، ويعمل في بكتريا *S.epidermidis* على الالتصاق بالفايبرونكتين (Hussain *et al.*, 2001).

## 7. Entracellular matrix-binding protein (Embp)

يعد Embp من البروتينات المرتبطة بين خلوية وهو من البروتينات العملاقة التي يبلغ وزنها الجزيئي 1MDa (Williams *et al.*, 2002)، يتضمنه جزء بروتيني يبلغ وزنه الجزيئي 460KDa كيلو دالتون مسؤول عن عملية الغزو (Christner *et al.*, 2010)، فضلاً عن دوره في الالتصاق بالفايبرونكتين Fibronectin وله دور في مرحلة الالتصاق والتجمع خلال تكوين الغشاء الحيوي (Christner *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2002).

## 2-1-1-6-2: بكتيريا *Staphylococcus aureus*

وهي مكورات موجبة لصبغة كرام، غير متحركة تستوطن منطقة المنخرين وطيات الجلد والقناة الهضمية، ويمكن ان تحمل بوساطة الكلاب والقطط والاغنام والماشية والدواجن (Weese and Duijkeren, 2010; Van Belkum *et al.*, 2009). تسبب بكتريا *S.aureus* التهاب الجلد والانسجة الرخوة والتي تكون اكثر الامراض شيوعاً اذ تؤدي الى التهاب حويصلات الشعر (Folliculitis) ومتلازمة تقشر الجلد Scalded skin syndrome فضلاً عن التهاب انسجة بطانة القلب والعظام والمفاصل، تجرثم الدم ومتلازمة الصدمة اليفانية Toxic Shock Syndrome (TSS) (Khan *et al.*, 2017a).

تحدث بكتريا *S.aureus* التهاب الجروح من خلال امتلاكها انزيم Hyaluronidase الذي يعمل على تحلل حامض Hyaluronic في الجلد والانسجة الرخوة (Neuman *et al.*, 2011)، فضلاً عن امتلاكها العديد من بروتينات عوامل الالتصاق Adhesion factor وهذا ما اشار اليه Foster *et al.* (2014) و Al-Mebairik *et al.* (2016). إذ ان نشوء المرض غالباً ما يحدث نتيجة التصاق خلايا البكتريا ثم يتبعه الانغراس وتكوين المستعمرات في انسجة المضيف لذا فان احد انواع بروتينات الالتصاق الرئيسية لبكتريا *S.aureus* والمرتبطة تساهمياً بطبقة الببتيدوكلايكان هو ما يطلق عليه Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) والذي يعمل على الالتصاق بالمواد الخارج الخلوية للمضيف مثل الفايبرونيكتين والفايبرينوجين والكولاجين.

تمتلك بكتريا *S.aureus* بروتين Protein A الذي يعد احد عوامل الضراوة وحماية البكتريا من الجهاز المناعي (Votintseva *et al.*, 2014)، ويساعد الخلايا البكتيرية على الالتصاق بخلايا المضيف (Claro *et al.*, 2013)، ويبلغ وزنه الجزيئي 42 كيلو دالتون ويشفر له جين يدعى *spa*، اما بروتين Fibronectin binding protein A, B (FnBP) يعد من البروتينات التي تشارك في تكوين الغشاء الحيوي في سلالات المكورات العنقودية المقاومة للميثاسلين (Al-Mebairik *et al.*, 2016).

### 3-1-1-6-2: بكتريا *Staphylococcus haemolyticus*

بكتريا *S.haemolyticus* وهي مكورات غير مخترة لبلازما الدم (CoNS) وواحدة من اهم مسببات عدوى المستشفيات اذ تشترك مع الامراض الناتجة من أجهزة الاعطاء في مجرى الدم (Takeuchi *et al.*, 2005)، تتسبب بكتريا *S.haemolyticus* تسمم الدم وهو من الاصابات التي تسبب الوفاة في المرضى الراقدين بالمستشفيات (Dellinger *et al.*, 2008)، والتهاب غشاء البريتون Peritonitis، التهاب الاذن Otitis (Fei Da *et al.*, 2017)؛

Ocular infection التهاب العيون وUrinary tract infection التهاب البولية (Panda and Singh, 2016; Makki *et al.*, 2011).

تمتلك بكتريا *S.haemolyticus* تراكيب متنوعة على سطحها الخلوي مثل Lipoteichoic acid الموجودة على سطح البكتريا الموجبة لصبغة كرام الذي يكون مسؤولاً عن بعض الاعراض المصاحبة لتسمم الدم مثل الحمى (Fournier and Philpott, 2005). تمتاز بكتريا *S.haemolyticus* بقدرتها على الالتصاق على سطوح خلايا المضيف وان معظمها تستطيع ان تتغرز بالخلايا الطلائية، فضلا عن انتاجها انزيم اللستينز Lecithinase والبروتيز Protease (Krzyminska *et al.*, 2015). ولها جينات تشفر لبناء انزيمات لتكوين المحفظة Poly- $\gamma$ -glutamate capsule التي تقوم بحماية البكتريا من ببتيدات مضادات البكتريا (Takeuchi *et al.*, 2005).

#### 4-1-1-6-2: بكتريا *Staphylococcus hominis*

بكتريا *S. hominis* هي مكورات غير مخثرة لبالزما الدم (CoNS) (Szcuka *et al.*, 2018)، اذ تستوطن جلد الانسان والاعشية المخاطية، ولكنها انتهازية ممرضة قادرة على احداث مدى واسع من الامراض لدى الاشخاص ذوي المناعة المنخفضة (Szcuka *et al.*, 2014)، وتسبب اصابات مجرى الدم، بطانة القلب، غشاء البريتون، التهاب العظام والتهاب المفاصل (Becker *et al.*, 2014)، تسبب عدوى المستشفيات من خلال الادوات الطبية فضلا عن قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm على تلك الأدوات (Szcuka *et al.*, 2014)، ويعد تكوين الغشاء الحيوي على الادوات الطبية او على انسجة المضيف من اهم عوامل ضراوة بكتريا *S.hominis* (Fredheim *et al.*, 2009) (Szcuka *et al.*, 2014).

تمثل مادة Polysaccharide intercellular adhesion (PIA) التي تكونها البكتريا بوساطة الانزيمات التي لها اوبيرون *ica operon* دوراً في تكوين الغشاء الحيوي فضلاً عن قدرة البكتريا على الالتصاق Adhesion والغزو Invasion وكذلك انتاجها للذيفانات خارج خلوية Extracellular toxins والتي تحدث ضرر للخلايا الطلائية للمضيف (Szczuka *et al.*, 2018).

### 5-1-1-6-2: بكتريا *Staphylococcus warneri*

وصفت بكتريا *S.warneri* عام 1975 من قبل Kloos و Schleifer و (Kloos and Schleifer, 1975)، اذ تعد من البكتريا غير المخثرة لبلازما الدم (CoNS) (Campoccia *et al.*, 2010). توجد بكتريا *S.warneri* على جلد الاشخاص الاصحاء (Nagase *et al.*, 2002)، ويمكن ان تعزل من اللعاب والاسنان ومن مسحات الانف اذ يعد تواجدها شائعاً بعد بكتريا *S.epidermidis* و *S.hominis* (Ohara-Nemoto *et al.*, 2008). تسبب بكتريا *S.warneri* تجرثم الدم الناتج من عدوى المستشفيات المقترنة بوجود اجهزة القسطرة مثل مقسطرات اجهزة غسيل الكلى والتهاب بطانة القلب والتهاب السائل النخاع الشوكي CSF (Kuvhenguha *et al.*, 2017). تمتلك العديد من عوامل الضراوة منها تكوينها جزيئات من سكريات متعددة خارج خلوية Extracellular polysaccharide والتي تعرف Slime التي تسمح للبكتريا بالالتصاق على الاسطح البلاستيكية الملساء، وتكوين المستعمرات على أدوات القسطرة والصمامات القلبية الاصطناعية وأدوات ضبط نبضات القلب والاطراف الاصطناعية (Cunha *et al.*, 2006; Vogel *et al.*, 2000).

### 2-1-6-2: مقاومة عزلات بكتريا *Staphylococcus spp.* للمضادات الحيوية

تؤدي الامراض المعدية الى الوفاة الا ان الظهور والانتشار الواسع في المقاومة للمضادات الحيوية ادى الى ارتفاع نسبة الوفيات (Campanini-Salinas *et al.*, 2018). ان التقديرات



السنوية تشير الى ان بحلول 2050 تكون الامراض التي تسببها البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية تصل الى عشرة ملايين حالة في السنة (O'Neill, 2014).

أشار (Griffith and Levinson (1949) انه في عام 1949 سجلت حالة وفاة بفعل *S.epidermidis* وهذا يعود الى امتلاكها انزيم Penicillinase الذي يشفر له جين يطلق عليه *blaZ*، فضلاً عن التعبير الاضافي للبروتينات المرتبطة بالبنسلين Penicillin binding protein (PBP) والتي تعمل على زيادة مقاومة البكتيريا (للبنسلين والسيفالوسبورينات والكاربابانيم) مما يؤدي الى قلة الفة PBP للارتباط بالمضاد الحيوي مما يزيد من مقاومتها، ويتم التعبير ايضاً عن PBP2 بفعل جين *mecA polymorphism* الذي يكون محمولاً على العناصر الوراثية المتحركة (Katayama *et al.*, 2000) Mobile genetic element designated.

اشار (Corse and Williams (1968) ان البنسلين يعد واحداً من اهم المضادات التي انتخبت لمعالجة الاصابات التي تحدث بفعل بكتريا *Staphylococcus* الا انه في عام 1968 اصبحت هناك زيادة عالية في مقاومة البكتيريا لمجموعة البنسلينات، وهذا يعود الى اليتين وهما انتاجها لانزيم البيتا لاكتاميز  $\beta$ -lactamase الذي يعطل عمل البنسلين بوساطة تحليل حلقة  $\beta$ -lactam ring للمضاد والالية الاخرى المرتبطة بالعزلات البكتيرية البشرية تتمثل بامتلاكها جين *mecA* الذي يشفر الى البروتين المرتبط بالبنسلين (Penicillin-binding protein PBP2a) (Olsen *et al.*, 2006). كما اشار (Becker *et al.* (2014) ان البكتريا CoNS المعزولة من المصادر البشرية والحيوانية تعد مستودعاً للعديد من العناصر الوراثية التي تكسبها صفة المقاومة ليست فقط لمضادات البيتا لاكتام وانما لجميع المضادات الحيوية، والتي تعد ذات اهمية كبيرة للانسان وذلك بسبب قابليتها على الانتقال في الطبيعة مما يساعد على انتشار المقاومة.

تختلف مقاومة البكتريا السالبة لصبغة كرام عن مقاومة البكتريا الموجبة لصبغة كرام اذ تتضمن اكثر اليات مقاومتها هو تغيير موقع الهدف في حين تمتاز البكتريا السالبة انتاجها انزيمات

المقاومة (Fisher and Mobashery, 2016; Ogawara, 2015)، وان النقل الافقي لمجموعة جينات Sec بين انواع بكتريا *Staphylococcus* يعمل على جعل بكتريا CoNS مستودعاً لجينات المقاومة، لاسيما وان هذا النوع من النقل يحدث بين بكتريا *S.aureus* وبكتريا CoNS وهذا يؤدي الى ظهور وانتشار سريع في المقاومة للمضادات الحيوية من قبل بكتريا CoNS (Fowoyo and Ogunbanwo, 2017).

أشار (2000) Von Eiff *et al.* و Kaiser *et al.* (2004) ان مقاومة بكتريا CoNS للمضادات الحيوية ومنها Penicillin و Oxacillin و Ciprofloxacin و Clindamycin و Erythromycin و Gentamicin يعود الى امتلاكها انزيم البيتا لاكتام.

اما فيما يتعلق بالمضادات Linezolid فان حدوث طفرة نقطية في الوحدة الصغيرة 23srRNA تؤدي الى مقاومة البكتيريا CoNS للمضاد الحيوي (Becker *et al.*, 2014). أشار (2002) O'Brien *et al.* ان حساسية بكتيريا *Staphylococcus* الى المضاد الحيوي Fusidic acid تعود الى ارتباط المضاد بعامل الاستطالة Elongation factor G ومن ثمّ يثبط تحضير تخليق الببتيدات خلال مرحله الترجمة، وان مقاومه البكتيريا للمضادات يكون عن طريق طفرة كروموسومية في جين *fusA* الذي يشفر الى عامل الاستطالة G لذا تمنع عمليه ارتباط المضاد به (Koripella *et al.*, 2012). اما مقاومة البكتيريا *Staphylococcus* للمضاد Rifampicin فتعود الى احداث طفره نقطيه في مناطق نسق القراءة لجين *LipoB* الذي يشفر الى وحدة  $\beta$ -RNAPolymerase، والتي ينتج عنها احماض امينية تعمل على الارتباط بالمضاد الحيوي (Tupin *et al.*, 2010). اما (2003) Butaye *et al.* و (2003) Connell *et al.* فقد أشاروا الى ان مقاومة بكتريا *Staphylococcus* للمضاد Tetracycline يعود الى امتلاك البكتريا جينات قافزة *tet* و *otr* التي تكسب الخلايا البكتيرية حماية للرايوسومات فضلا عن تفعيل مضخة الدفع الفعالة Active efflux pump.

اما مضادات Fluoroquinolones فقد أشار كل من Pan and Fisher (1998) و Lowy (2003) الى ان مقاومة بكتريا *Staphylococcus* للمضاد يعود الى طفرة كروموسومية للوحدات الفرعية والتي تتمثل *gryA* و *gryB* لانزيم DNAgyrase و *parc* و *pare* لانزيم Topoisomerase والتي تؤدي دوراً رئيساً في مقاومة البكتيريا للمضاد Fluoroquinolones فضلاً عن حث مضخات الدفع المتعدد للادوية Multi drug efflux pump.

أشار (2001) Huovinen ان المضاد Trimethoprim/ Sulfamethoxazole والذي يعمل على تثبيط تخليق حامض الفوليك Folic acid من خلال تثبيط انزيم Dihydrofolate reductase (DHFR) وانزيم Dihydropterot synthase (DHPS) اللذان يشفران لهما من خلال الجينات المكتسبة *dfrA*, *dfrG*, *dfrk*, *dfrB*. ان جميع اليات المقاومة تعود الى امتلاكها انزيمات البيتا لاكتاميز  $\beta$ -lactamase او تحويل الموقع المستهدف Modification target او تفعيل مضخة الدفع Active efflux pump او التعطيل الانزيمي للادوية Enzymatic deactivation او تحويل بروتينات الارتباط بالبنسلينات Penicillin binding protein (Foster, 2017; Hooper and Jacoby, 2015).

### 3-1-6-2: قابلية عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* على تكوين الغشاء الحيوي

يعرف الغشاء الحيوي بأنه مجموعة من خلايا بكتيرية التصقت مع بعضها بواسطة انتاج خليط من المواد الخارج خلوية تتكون من السكريات والبروتينات والمادة النووية الخارج خلوية extracellular DNA (eDNA) (Otto, 2013)، وهذه الطبقات العدة تتكون في مراحل تبدأ من التصاق الخلايا البكتيرية وتكاثرها ونضجها نتيجة ارسال اشارات تعرف بادراك النصاب Quorum Sensing (QS) والمسؤول عن تكوين الغشاء الحيوي نتيجة اتصال خلايا بكتيرية باخرى وتنظيمها بشكل يسمح بارسال إشارة (Ammann et al., 2018; Foster, 2016). في حين اشار Rohde et al. (2010) و Harris et al. (2016) الى ان تكوين الغشاء يحدث بثلاث مراحل تتمثل بالتصاق

البكتيريا على السطح وتكوين مستعمرات يتم من خلال تراكم الخلايا البكتيرية مع بعضها وتكوينها تراكيب ثلاثية الابعاد مكونة من طبقات متعددة من المواد الخارج خلوية ثم نضجها وفك تركيب الغشاء الحيوي وانفصال الخلايا لاستيطان مناطق أخرى.

اما (Arciola *et al.*, 2001) فأشار الى ان تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا *Staphylococcus* يعود الى انتاجها للطبقة اللزجة Slime layer فضلا عن تكوينها كبسولة، ويتوسط تخليقها اوبيرون *ica* الذي يشفر الى سكر يد متعدد الالتصاق بين الخلوي (PIA) الذي يتكون من  $\beta$ -1-6 glucosaminylglycan بفعل انزيم Glucosaminyl transferase. اشارت العديد من الدراسات ان تكوين الغشاء الحيوي خلال مرحلة الالتصاق Attachment والتراكم Accumulation والنضوج Maturation يتم بوساطة العديد من المواد منها (PIA) (Heilmann *et al.*, 1996; 2003) و (Aap) و (Embp) و (Rohde *et al.*, 2005) و (Christner *et al.*, 2010)، اما في مرحلة الانفكاك وانفصال الخلايا البكتيرية فتكون بوساطة Serine protease (Iwase *et al.*, 2010) و (FnBPA, B) و (Geoghegan *et al.*, 2013) و (EcpA) و (Metalloprotease (SepA) و (Martinez-Garcia, 2018).

اما (Periasamy *et al.*, 2012) و (Otto, 2012) فقد اشار الى دور كل من (PSms) و ببتيدات المستحلبات Surfactant peptides المنتج من بكتريا *Staphylococcus* في تحلل تركيب الغشاء الحيوي داخل وخارج الجسم الحي، وهذا ما اشار اليه (Moormeier *et al.*, 2014) ان انزيم Protease يكون حساساً في المرحلة الاولى من تكوين الغشاء الحيوي بينما على النقيض من ذلك فان بروتينات سطح الخلايا Cell surface associated proteins تعمل على فرط انتشار الخلايا البكتيرية التي فيما بعد تصل الى مرحلة النضوج اذ تترتب الخلايا بشكل بنية مؤلفة من

طبقات عدة ثم يبدأ عمل انزيم Protease في تحلل الغشاء الحيوي، يتضمن تكوين الغشاء الحيوي مجموعة من المركبات:

1. PIA وهو احد السكريات الرئيسية في بكتريا *S.epidermidis* والذي يدعى بسكريات

الالتصاق المتعددة بين الخلية Polysaccharide intracellular adhesion او Poly-

N-acetyl glucosamine الذي يشفر له من قبل جين *ica* او برون (*icaA, D, B, C*)

(Conlon *et al.*, 2002)، مشيراً ان وجوده يقلل من فعالية البيبتيدات المضادة للبكتريا

والقضاء من قبل الخلايا العدلة في جسم المضيف.

2. Bap homologue protein Bap/BhP يعد Bap/Bhp احد اكثر عوامل الضراوة

لبكتريا *S.epidermidis* وله دور في تكوين الغشاء الحيوي ويدعى ببروتين المشارك في

تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm associated protein (Bap)، ويدعى ايضاً ببروتين

الالتصاق السطحي ويبلغ وزنه الجزيئي 239 كيلو دالتون، ويساهم في الالتصاق والتجمع

عند تكوين الغشاء الحيوي (Cucarella *et al.*, 2001)، ويتواجد جين *bap* فقط في

سلالات *S.epidermidis* و *S.aureus* المعزولة من الابقار المصابة بالتهاب الضرع

(Tormo *et al.*, 2005). وهناك بروتين يضاهاي Bap يدعى Bhp الذي يتواجد في

بعض سلالات *S.epidermidis*، لكنه لا يساهم في تكوين الغشاء الحيوي

(Lasa and Penades, 2006).

#### 4-1-6-2: قابلية عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* على الالتصاق

تمتلك البكتريا القابلية على الالتصاق بجميع الاسطح الطبيعية والصناعية، وهذا يعود الى

عدة اسباب اهمها هو محاولة البقاء حية، اذ ان التصاق البكتريا على اسطح الانسجة الرخوة وتجوييف

الغم والاسنان تعد عملية حفاظ على عيوشية البكتريا (Busscher and Van der Mei, 2012).

يمثل التصاق البكتريا بالاسطح خطوة البداية في تكوين الغشاء الحيوي لذلك يعد عامل ضراوة مهم

لاسيما اذا كان مضيف الالتصاق هو الانسان، اذ ان المرضى الذين يعانون من نقص المناعة او المرضى المسنين الذين تجرى لهم عمليات جراحية او استعمالهم انابيب القسطرة وهما يعدان اكثر ضررا بفعل البكتريا الملتصقة (Busscher and . Van der Mei, 2009).

ان ضراوة عملية الالتصاق تعود الى تحفيز البكتريا الملتصقة على انتاج خليط من المواد الخارجية الافراز Extracellular polymeric substances (EPSs) مثل السكريات المتعددة والبروتينات والاحماض النووية والدهون (Flemming and Wingender, 2010)، وان انتاج هذه المواد او البوليمرات المتعدد من قبل البكتريا الملتصقة يؤدي الى تكوين الغشاء الحيوي مما يجعلها اكثر مقاومة للمضادات الحيوية والانظمة المناعية (Rodriguez-Martinez and Pascual, 2006). التصاق البكتريا بالاسطح تتم بفعل تداخلات بين الخلايا وامتلاكها جزيئات نوعية (Tchesnokova *et al.*, 2011)، وفي بعض الاحيان يتوسط بين هذه التداخلات قوى نوعية او غير نوعية منها قوى الكترولستاتيكية، قوى فاندرفالز وهيدروجينية فضلاً عن قوى الحركة البراونية Brownian motion force (Bos *et al.*, 1999). في حين اشار (Flemming and Wingender (2010 ان وجود مجموعة الاستيل Acetyl group في السكريات المتعددة الخارج الخلوية EPs تعمل على زيادة الالتصاق فضلاً عن سكريات الالتصاق المتعددة بين الخلوية (PIA) الذي يزيد من قابلية البكتريا على الالتصاق على الاسطح الحية وغير الحية.

اما (Otzen and Nielsen (2008 فقد وجد دور Amyloid في عملية التصاق البكتريا على سطح خلايا المضيف. في حين اشار (Vilain *et al.* (2009 الى دور المادة النووية DNA في عملية الالتصاق. اما (Vaudaux *et al.* (1995 فقد اشار الى دور بروتين ربط الفايبيرينوجين Fibrinogen binding protein او ما يسمى عامل التكتل Clumping factor (*clfA*, B) في بكتريا *S. aureus* على الالتصاق بسطوح Polyethylene و Polyvinyl، والالتصاق

بطبقات Fibrinogen و Fibronectin و Collagen الموجودة على سطح خلايا المضيف (Darouiche, 2004). في حين أشار Heilmann *et al.* (1997) الى دور Autolysin في epidermidis (ATIE) في التصاق بكتريا *S.epidermidis* على سطوح Polystyrene ولكن ليس الزجاج، اما Teichoic acid فإنه يعمل على التصاق البكتريا على كلا السطحين. وأشار Harapanahalli *et al.* (2015) الى ان التعبير الجيني لجين *icaA* في بكتريا *S.epidermidis* يكون بشكل اعلى في الوسط الحاوي على اسطح Polyethylene من وسط Polymethacrylate. أشار Hall-Stoodley *et al.* (2004) الى ان MSCRAMMS تتوسط عملية الالتصاق على سطح المضيف الحاوي على مستقبلات عدة تتمثل بالبروتينات والبروتينات السكرية الموجودة في بلازما الدم والصفائح الدموية او القالب الخارج خلوي للمضيف Host extracellular matrix. اشار Nuryastuti *et al.* (2011) الى قابلية السلالات البكتيرية التي تحدث اصابات Biomaterial associated infection (BAI) من الالتصاق واستعمار السطوح وتكوين الغشاء الحيوي.

ان الخلايا البكتيرية لها القدرة على الاستفادة من البروتينات ومنها التي تطلق اثناء حدوث الجروح والالتهابات مما يساعدها على الالتصاق واستعمار المضيف والحفاظ على عيوشتها ويمكن ان يطلق على هذه الخاصية بالعدوى الشبيهة بتكوين الغشاء الحيوي biofilm-like infect (Hall-Stoodley, 2004)، مشيراً الى ان مرحلة الالتصاق في بكتريا *S.aureus* و *S.epidermidis* تعتمد على الخصائص الكيموحيوية لبوليمرات الاسطح الحية وغير الحية وعلى طبيعة سطح الخلايا البكتيرية.

## 2-6-2: الانواع البكتيرية الاقل سيادة والمعزولة من الاطفال المصابين بالتهاب السحايا

### *Escherichia coli* :1-2-6-2

وهي بكتريا عسوية سالبة لصبغة كرام تستوطن القناة الهضمية للانسان والحيوان (Carroll, 2013)، وتعد البكتريا *E.coli* من النبيت الطبيعي لقولون الحيوانات ذات الدم الحار وبصورة تكافلية مع المضيف (Olesen, 2017)، وتسبب اصابات معوية وخارج معوية متنوعة فمنها أصابة المسالك البولية وتجثم الدم Bacteremia والتهاب السحايا الذي يعد من الامراض المميتة في انحاء العالم لا سيما في الاطفال حديثي الولادة، وذلك يعود لقدرتها على احداث تجثم الدم ونخر الحاجز الدموي الدماغي لاسيما للانواع التي تنتج  $\beta$ -lactamase (TEM-CTX) وكذلك ايضاً لقدرة بكتريا *E.coli* على اختراق الحاجز الدموي الدماغي Blood brain barrier (BBB) يعود الى امتلاكها الاسواط نوع 1 و P و S (Fimbria Type 1, P, S) وبروتين Outer membrane protein (OMPA) و New lipoproteins I (NlpI) وعامل التنخر المعوي Cytotoxic necrotizing Protein Factor1 (CNF1)، والسكريات المتعددة المكونة للكبسولة من نوع K1 التي غالبا ما تشترك مع الانواع المصلية (O45, O1, O16, O7, O18) (Kim, 2016).

### *Acinetobacter baumannii* :2-2-6-2

بكتريا *A. baumannii* غير معوية، عسوية، سالبة لصبغة كرام، هوائية تتواجد في التربة والماء وغالباً ما تعزل من الجلد والاغشية المخاطية والافرازات المخاطية وفي بيئة المستشفى (Carroll, 2013)، وهي من البكتريا المتعايشة والشائعة في احداث عدوى المستشفيات (Ceylan et al., 2017)، تعد *A.baumannii* من البكتريا الانتهازية لاسيما في الاشخاص المرضى الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي والراقدين في وحدات العناية المركزة Intensive care unit (ICVS) (Humphreys and Towner, 1997)، فضلا عن احداثها التهاب



المسالك البولية والتهاب الأنسجة الرخوة (Harding et al., 2018). أشار Kim et al. (2009) الى ان نسبة الاصابة ببكتريا *A.baumannii* في وحدات الرعاية الصحية لمرضى التهاب السحايا بلغ 10% مع ارتفاع نسبة الوفيات الى نسبة تراوحت بين 15-71%، وهذا ما أشار اليه Ceylan et al. (2017) ارتفاع نسبة الوفيات بسبب اصابات الجهاز العصبي المركزي ببكتريا *A.baumannii* المقاومة للمضادات الحيوية.

### ***Burkholderia cepacia* :3-2-6-2**

بكتريا *B.cepacia* عصوية سالبة لصبغة كرام، غير متحركة، هوائية، غير مخمرة لسكر اللاكتوز واسعة الانتشار في البيئة وتتواجد في الماء والتربة والنباتات تعد من الكائنات الدقيقة التي تنمو بصورة سريعة في البيئات قليلة المادة الغذائية مما يمكنها من البقاء حية في البيئة القاسية (Jaafar et al., 2017).

### ***Pseudomonas putida* :4-2-6-2**

بكتريا *P. putida* عصوية سالبة لصبغة كرام، هوائية غير مخمرة لسكر اللاكتوز تتواجد في البيئات ومن ضمنها التربة (Khan et al., 2017b)، تمتاز بقابليتها على استعمار الاسطح غير الحية في المستشفيات، وتسبب امراض عدوى المستشفيات لاسيما في الاشخاص الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي، فضلاً عن قدرتها على غزو الجسم عن طريق الادوات الطبية الموضوعة في المرضى وتعد من البكتريا النادرة التي تسبب التهاب السحايا (Yoshino et al., 2011).

### ***Klebsiella pneumonia* :5-2-6-2**

بكتريا *K.pneumonia* سالبة لصبغة كرام عصوية وتكون شائعة في احداث اصابات التهاب السحايا ولاسيما في الاشخاص الذين لديهم رضوض في الرأس واجراء عمليات جراحية في الجهاز العصبي والمرضى الذين لديهم ضعف في الجهاز المناعي (Barichello et al., 2014)، فضلاً عن احداثها التهاب الكبد الفيروسي والتهاب الرئة واصابات مجرى الدم. ذكر Ku et al. (2017)

ان بكتريا *K. pneumonia* التي تسبب التهاب السحايا يعود الى تكوينها المحفظة وانتاجها انزيمات بيتا لاکتاميز واسعة الطيف وانزيمات البنسلينيز والايروبكتين Aerobactin.

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

**Materials and**

**Methods**

### 3: المواد وطرائق العمل Materials and Methods

#### 3-1: المواد

#### 3-1-1: الأجهزة والأدوات المختبرية Tools and Instruments

جدول (3-1): الأجهزة والأدوات المختبرية.

ت	أسماء الأجهزة والأدوات	بلد المنشأ
1	أنابيب اختبار Test tubes	China
2	أطباق زرع بكتيري Petri dish	China
3	ثلاجة Refrigerator	Italy(ALS)
4	جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis	USA
5	جهاز تقطير Water Distillator	Brazil(GLF)
6	جهاز طرد مركزي صغير Eppendroff centrifuge	Germany (Hetich)
7	جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)	USA
8	جهاز الفايترك Vetik -2 Compact System	Biomeriux (USA)
9	جهاز قياس الكثافة Densichek-Plus	Biomeriux (USA)
10	جهاز ELISA Enzyme Linked Immunsorbent Assay	Germany
11	حاضنة Incubator	Germany (Fisher )
12	حمام مائي Water bath	Germany
13	دوارق وفلاسكات وبيكرات مختلفة الاحجام	China
14	شرائح مجهرية Microscope slide	China
15	كاميرا رقمية Digital camera	Optima (Japan)
16	كابينة تعقيم هواء Laminar flow hood	Spain(Telstar Bio)
17	مازج دوار Vortex	Italy
18	ماصات دقيقة Micro Pipettes	Germany
19	مجهر ضوئي Light microscope	Japan(Olympus)
20	مسخن حراري ممغنط Stirrer plates hot	Stuart-UK
21	مصدر الأشعة فوق البنفسجية Trans illuminator UV	Japan (Optima)
22	مؤصدة Autoclave	Japan(Hirayama)
23	ميزان كهربائي حساس Sensitive electric balance	Germany (KERN)
24	ناقل معدني وبلاستيكي Loop	China

## 2-1-3: المواد الكيميائية Chemical materials

جدول (2-3): المواد الكيميائية.

ت	اسم المادة	بلد المنشأ
1	ثنائي امين الاثيلين رباعي حامض الخليك Ethylene Diamine tetra acetic acid (EDTA)	المركز العراقي لاجتاث السرطان والوراثية الطبية
2	المصل البقري Bovine serum	المركز العراقي لاجتاث السرطان والوراثية الطبية
3	بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate	BDH
4	تربسين Trypsin	المركز العراقي لاجتاث السرطان والوراثية الطبية
5	جيلاتين Gelatin	Spain
6	حامض الكبريتيك Sulfuric acid	India
7	سكر الكلوكوز Glucose	Germany
8	كحول اثيلى مطلق 99% Absolute ethanol	China
9	كحول الميثانول المطلق Absolute Methanol	UAE
10	كحول ايثانول (70%) Ethanol	BDH(England)
11	كلوريد الباريوم المائى Barium chloride	India
12	كلوريد الصوديوم Sodium chloride	Spain
13	مادة الاكار - الاكار Agar-Agar	England
14	يوريا Urea	Germany

## 3-1-3: الأوساط الزرعية Cultures media

جدول (3-3): الأوساط الزرعية.

ت	اسم الوسط	الشركة المصنعة أو المنشأ
1	وسط أساس اليوريا الصلب Base Urea agar	Germany
2	وسط نقيع القلب والدماغ الصلب Brain heart infusion agar	Himedia
3	وسط مولر هنتون السائل Mueller Hinton Broth(MHB)	Himedia
4	وسط مولر هنتون الصلب Mueller Hinton Agar(MHA)	Himedia
5	وسط لوريا بيرتاني السائل Luria Bertani Broth(LBB)	Himedia
6	وسط مانيتول الملحى الصلب Mannitol Salt agar	Himedia
7	وسط المثيل الأحمر - فوكس بروسكاور Methyl red Voges Proskuor	India(CDH)
8	وسط أساس الدم الصلب Blood Agar Base	Germany(Direvo)

Holand(Saluca)	Tryptone soy broth	وسط تريبتون الصويا السائل	9
Himedia	Kliglar iron agar	وسط الحديد - ثنائي السكر الصلب	10
Biomark	Simmon's citrate agar	وسط سترات السيمون الصلب	11
Biomark	Peptone water	وسط ماء الببتون	12
Himedia	MacConkey agar	وسط الماكونكي الصلب	13
Holand(Saluca)	Nutrient agar	وسط المغذي الصلب	14
Holand(Saluca)	Nutrient agar broth	الوسط المغذي السائل	15
Himedia	Brain heart infusion broth	وسط نقيع القلب والدماغ السائل	16

### 4-1-3: الصبغات والمحاليل Stains and Solution

جدول (3-4): الصبغات.

الشركة المصنعة	اسم الصبغة	ت
Germany	Crystal Violet dye	1 صبغة البنفسج البلوري
Promega (USA)	Loading dye	2 صبغة التحميل
Promega	Ethidium promide dye	3 صبغة بروميد الايثيديوم
Germany	Crystal Violet Stain والـسفرانين Iodin والأيودين وKحول الايثيلي Ethyl (alcohol 96%)	4 عدة صبغة كرام (صبغة البنفسج البلوري)

### 5-1-3: الكواشف Reagents: استخدمت الكواشف الجاهزة والمعدة من قبل الشركات المصنعة

إزاء كل منها في الجدول الآتي:

جدول (3-5): الكواشف.

الشركة المصنعة أو المنشأ	الكاشف	ت
BioMerieux	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> بيروكسيد الهيدروجين	1
BioMerieux	N, N, N, N-Tetra-Methyl-P-Phenylen Diamine Dihydro Chloride	2
India	VogesProskauer reagent كاشف فوكس بروسكأور (يتألف من مركبين:- VP1 من الفا نفثول وماء مقطر VP2 - هيدروكسيد البوتاسيوم وكحول مطلق)	3
India	Para- Kovac`s reagent كاشف كوفاكس (يتألف من dimethyl amino benzaldehyd و Isoamyl (alcohol	4
India	Methyl red كاشف المثل الاحمر	5

## Kits: العدد 6-1-3

## جدول (6-3): العدد المختبرية.

الشركة المصنعة	نوع الاستعمال	اسم عدة التشخيص	ت
BioMerieux	لتشخيص البكتريا السالبة لصبغة كرام	VITEK- 2 GN card	1
BioMerieux	لتشخيص البكتريا الموجبة لصبغة كرام	VITEK- 2 GP card	2
BioMerieux	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	VITEK-2ASTcard	3
Promega	-----	عُدة فحص Go taq Green master mix PCR	4
Promega	عدة استخلاص DNA	عدة استخلاص DNA الجينومي Genomic Extraction kit تضم المحاليل كافية لأجراء 100 فحص وهي: GT Buffer, GB Buffer, W1 Buffer, Wash Buffer, Elution Buffer, Proteinase K وكذلك يضم فلاتر GD Columns وأنايب الجمع Tubes Collection	5

## Cancer cell lines السرطانية: الخطوط الخلوية السرطانية 7-1-3

## جدول (7-3): الخطوط السرطانية.

المصدر	خط الخلايا
المركز العراقي لبحاث السرطان والوراثة الطبية	استعمل خط الخلايا السرطاني Verocell المنمأة على وسط Rosswell Park Memorial Institute RPMI-1640 المدعم بـ 10% مصل بقرى serum bovine واسعملت بعد تكون الطبقة الاحادية الكاملة (Confluent Monolayer).

## 8-1-3: المضادات الحيوية Antibiotics

جدول (8-3): المضادات الحيوية المستعملة بالدراسة والمجهزة من شركة BioMerieux الفرنسية.

الرمز او التركيز	اسم المضاد	ت
BPC	Benzylpenicillin	1
OX	Oxacillin	2
GM	Gentamicin	3
TOB	Tobramycin	4
LEV	Levofloxacin	5
(MXF)	Moxifloxacin	6
E	Erythromycin	7
CLI	Clindamycin	8
LZD	Linezolid	9
TEC	Teicoplanin	10
VA	Vancomycin	11
TE	Tetracycline	12
TGC	Tigecycline	13
FT	Nitrofurantion	14
FuA	Fusidic Acid	15
RIF	Rifampicin	16
SXT	Trimethoprim+Sulfamethoxazole	17
500 ملغرام	Erythromycin	18
100000 وحدة عالمية	Penicillin	19
1000 ملغرام	Streptomycin	20
30 مايكروغرام	Novobiocin	21

## 9-1-3: مواد اخرى

جدول (3-9): مواد أخرى استُعملت في الدراسة الحالية.

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم المادة	ت
Promega, US	الدليل الحجمي زوج قاعدة 100 DNA Ladder (1000 – 100bp)	1
BioMerieux	محلول ملحي فسلجي قياسي Stander Normal Saline	2
Germany	دارئ الفوسفات الملحي Phosphate Buffer saline	3
Promaga	دارئ الترحيل الكهربائي Trisborat EDTA Bufferedd (TBE)	4
GEMA (Spain)	وحدات الترشيح Millipore filters	5
Promaga	محاليل البادئات Primers solution	6



## 10-1-3: تسلسل بواديء الجينات

## جدول (10-3): البواديء.

المصدر	حجم الناتج زوج قاعدة	تتابع البادئ Primer sequence (5'-3')	اسم الجين	
Nemati <i>et al.</i> (2009)	1315	CCTAACTAACGAAAGGTAG	F	icaA
		AAGATATAGCGATAAGTGC	R	
Nemati <i>et al.</i> (2009)	292	ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT	F	clfA
		CGTTTCTCCGTAGTTGCATTG	R	
Salaberry <i>et al.</i> (2015) Zuniga <i>et al.</i> (2015)	302	ACGTGCAGCAGCTGACT	F	eno
		CAACAGCATCTTCAGTACCTTC	R	
Zuniga <i>et al.</i> (2015) Salaberry <i>et al.</i> (2015)	971	CCCTATATCGAAAGGTGTAGAATTG	F	pab
		GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	R	
Zuniga <i>et al.</i> (2015) Salaberry <i>et al.</i> (2015)	423	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC	F	cna
		AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	R	

## 2-3: طرائق العمل Methods

## 1-2-3: التعقيم Sterilization:

عقمت الأوساط الزرعية والمحاليل المستعملة في هذه الدراسة، باستعمال جهاز المؤصدة

(Autoclave) بحرارة 121م° وضغط 15 باوند /أنج<sup>2</sup> لمدة 15 دقيقة، فيما استعملت طريقة

الترشيح بمرشحات دقيقة نوع Millipore filter قطر فتحتها 0.22 مايكرومتر للمواد التي تتأثر

بدرجات الحرارة العالية.

**2-2-3: تحضير المحاليل Preparation of solutions****1-2-2-3: المحلول الفسلجي الملحي Normal saline**

أذيب 8.5 غم من كلوريد الصوديوم NaCl في 1 لتر من الماء المقطر، ثم عقم بوساطة المؤصدة، بعدها حفظ بدرجة 4 °م لحين الاستعمال.

**2-2-2-3: محلول داريء الفوسفات الملحي Phosphate Buffered saline (PBS)**

أذيب 0.986 غم من مادة (PBS) في 100 مل من الماء المقطر ذي الرقم الهيدروجيني 7.4، ثم عقم بوساطة المؤصدة وحفظ في الثلاجة بدرجة 4 °م لحين الاستعمال.

**3-2-2-3: محلول صبغة Crystal violet solution**

أذيب 0.25 غم من مادة Crystal violet في 100 مل من الماء المقطر ثم حفظ في درجة 4 °م لحين الاستعمال استخدم المحلول في الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm من قبل العزلات البكتيرية (Cucarella *et al.*, 2002).

**4-2-2-3: محلول العكارة القياسي مكفرلاند McFarland standard solution**

أ- اذيب 1 غرام من مادة كلوريد الباريوم المائي BaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O في 100 مل من الماء المقطر.

ب- اذيب 1 مل من حامض الكبريتيك المركز H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> في 100 مل من الماء المقطر، بعدها

حُضرت التراكيز المطلوبة وكالاتي (Stock and Ridgway, 1987):-

NO.6	NO 0.5	المواد
0.6	0.05	BaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O (مل)
9.4	9.95	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (مل)
18	1.5	كثافة الخلايا البكتيرية (10 <sup>8</sup> /مل)

No.Tube number:

**5-2-2-3: محاليل المضادات الحيوية****\*محلول الارثرومايسين**

حضر المضاد الارثرومايسين Erythromycin باذابة 500 ملغرام في 5 مليلتر من كحول

الايثانول المركز واستعمل كمحلول خزين Stock solution (Cucarella et al., 2004).

**\*محلول البنسلين Penicillin Solution**

اذيبت محتويات عبوة ذات 100000 وحدة عالمية من Benzylpenicillin في 5 مل

ماء مقطر وحفظ المحلول بدرجة -18 °م.

**\*محلول الستربتومايسين Streptomycin Solution**

اذيب 1 غرام من ستربتومايسين في 5 مل ماء مقطر وحفظ بدرجة -18 °م.

**6-2-2-3: محلول التريبسين - فرسين Trypsin-Versene Solution**

وهو مكون من محلولين:

1. محلول التريبسين: اذيب 2 غرام من التريبسين في كمية من داريء الفوسفات الملحي

المحضر في فقرة (2-2-2-3) واكمل الحجم به الى 100 مل وعقم بالترشيح من خلال

مرشح بكتريولوجي ذي مسامات بقطر 0.22 مايكرون وحفظ بدرجة -20 °م.

2. محلول الفرسين: اخذ 1 غرام من Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid

(EDTA) واذيب في كمية من الماء المقطر واكمل الحجم به الى 100 مل وعقم

بالمؤصدة بحرارة 121°م وضغط 15 باوند/ انج<sup>2</sup> لمدة 15 دقيقة وحفظ بدرجة -20 °م.

قبل اجراء الفحص مزج 20 مل من محلول التريبسين و10 مل من محلول الفرسين و370

مل من محلول داريء الفوسفات الملحي المحضر في فقرة (2-2-2-3) وعقم بالترشيح باستعمال

مرشح بكتريولوجي ذي مسامات بقطر 0.22 مايكرون.

**7-2-2-3: محلول بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate solution**

اذيب 4.4 غم من مادة بيكاربونات الصوديوم  $\text{NaHCO}_3$  في 100 مل من الماء المقطر وحفظ بدرجة 4 °م.

**8-2-2-3: محلول دارئ TBE (1X) Tris borate EDTA Buffer**

خفف دارئ TBE من 10X إلى 1X لغرض استعماله في الترحيل الكهربائي Gel electrophoreses وذلك بأخذ 100 مل من دارئ TBE (10X) Tris Borate EDTA Buffered المجهز من قبل شركة المصنعة Promega وأضيف له 900 مل من الماء المقطر المعقم وحفظ في درجة 4 °م لحين الاستعمال.

**9-2-2-3: محاليل البادئات Primers solutions**

حضرت محاليلها الخزينة حسب تعليمات الشركة المصنعة Promega وباستعمال الماء المقطر اللأأيوني Nuclease-free water المعقم للحصول على تركيز 100 بيكومول/مايكروليتر، وحضر محلول كل بادئ وبشكل منفصل بتركيز 10 بيكومول/مايكروليتر وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين Stock لكل بادئ وإضافته إلى 90 مايكروليتر من الماء المقطر اللأأيوني، ومزج جيداً وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال وحفظت المحاليل الخزينة للبادئ في درجة -20 °م مع مراعاة مزج المحلول بعد إخراجها من الثلج باستعمال المازج Vortex لمجانسته قبل الاستعمال.

**3-2-3: تحضير الأوساط الزرعية Preparation of cultural media****1-3-2-3: تحضير الأوساط الزرعية الجاهزة Ready made media**

حضرت الأوساط الزرعية الجاهزة وفقاً لتعليمات الشركات المجهزة وشملت كلاً من وسط الماكونكي الصلب MacConkey agar، ووسط أساس الدم الصلب Blood Base agar، ووسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain Heart Infusion Broth (BHIB) ونقيع القلب

والدماغ الصلب Brain Heart Infusion Agar (BHIA) والوسط المغذي الصلب  
 Nutrient agar، والسائل Nutrient Broth ووسط تربتون الصويا الصلب Tryptone Soy  
 Agar (TSA)، ووسط ماء البيبتون (Peptone water (PW)، ووسط تربتون الصويا السائل  
 Tryptone Soy Broth (TSB)، وسط سترات سيمون الصلب Simmons's citrate agar،  
 ووسط الحديد-ثنائي السكر الصلب Kliglar iron agar (KIA)، ووسط أساس اليوريا الصلب  
 Base urea agar، ووسط المولرهننتون السائل Mueller Hinton Broth (MHB)، والصلب  
 Mueller Hinton Agar (MHA)، ووسط لوريا بيرتاني السائل Luria Bertani Broth  
 (LBB)، ووسط مانتول الملحي الصلب Mannitol Salt Agar ووسط المثيل الأحمر فوكس  
 بروسكار Methyl red Voges Proskauer MRVP، إذ عقت جميع هذه الأوساط الزرعية  
 بوساطة جهاز المؤصدة تحت ظروف درجة حرارة 121 °م وضغط 15 باوند/انج<sup>2</sup>.

### 4-2-3: تحضير الأوساط الزرعية التركيبية Laboratory Prepared media

#### 1-4-2-3: وسط اكار الدم Blood agar

اذيب 40 غم من وسط اساس الدم الصلب في 1000 مل من الماء المقطر حسب  
 تعليمات الشركة المجهزة، وعقم بوساطة جهاز المؤصدة، وبعد تبريده الى حرارة 45 °م، ثم اضافة  
 5% من دم الانسان ومزج بطريقة جيدة ومن ثم صبها باطـباق معقمة وترك ليتصلب  
 (Tiwari et al., 2009).

#### 2-4-2-3: وسط اكار الشكولاتة Chocolate agar

اذيب 28 غم من وسط الاكار المغذي الصلب في 950 مل من الماء المقطر حسب  
 تعليمات الشركة المجهزة ومن ثم تعقيمه بالمؤصدة، وبعد ذلك يبرد الى حرارة 65 °م ويضاف له  
 5% من دم الانسان ويمزج جيدا ومن ثم يبرد ويصب في اطباق معقمة، وترك ليتصلب  
 (Tiwari et al., 2009).

**3-4-2-3: وسط اليوريا الصلب Urea agar**

أذيب 24 غم من وسط أساس اليوريا الصلب في 950 مل من الماء المقطر حسب تعليمات الشركة المجهزة وعقم بوساطة جهاز المؤصدة، وبعد تبريده الى درجة حرارة 55°م أكمل الحجم الى اللتر بإضافة 50 مل من مادة اليوريا Urea بتركيز (40%) المحضرة بإذابة 40 غم من مادة اليوريا في 100 مل وتعقيمها بوساطة وحدات الترشيح Millipore filters قطر فتحتها 0.22 مايكروميتر وأضيفت الى وسط اليوريا الصلب وصبت في أنابيب معقمة.

**4-4-2-3: وسط الجيلاتين Gelatin agar**

أذيب 12 غرام من الجيلاتين و2.5 غرام من وسط السائل المغذي في 100 مل من الماء المقطر، ثم وزع في انابيب اختبار وعقم بوساطة جهاز المؤصدة (MacFaddin, 2000).

**5-4-2-3: وسط تربتون الصويا السائل الحاوي 0.25% كلوكوز**

أذيب 3 غرام من تربتون الصويا السائل و0.25 غرام من سكر الكلوكوز في 100 مل من الماء المقطر وعقم بوساطة جهاز المؤصدة (Cucarella *et al.*, 2002).

**6-4-2-3: وسط تربتون الصويا السائل الحاوي 2% كلوكوز**

أذيب 3 غرام من تربتون الصويا السائل و 2 غرام من سكر الكلوكوز في 100 مل من الماء المقطر وعقم بوساطة جهاز المؤصدة (Cucarella *et al.*, 2004).

**7-4-2-3: وسط اختبار Spreading**

أذيب 30 غم من وسط التربتون الصويا السائل و2.4 غم من الاكار اكار في 1000 مل من الماء المقطر وعقم بوساطة جهاز المؤصدة ومن ثم صبها باطباق وترك ليتصلب (Kaito and Sekimizu, 2007).

**8-4-2-3: Rosswell Park Memorial Institute, 1640 (RPMI -1640) وسط**

اذيب 10.3 غرام من وسط (RPMI-1640) الحاوي على دارئ هيبس (HEPES) وحامض الكلوتامين (L-glutamine) واذيف لها 0.5 مل محلول البنسلين كما في فقرة (5-2-2-3) و0.5 مل محلول الستربتومايسين المحضر في فقرة (5-2-2-3) و10 مل محلول  $\text{NaHCO}_3$  (المحضر في فقرة 7-2-2-3) فضلا عن المصل البقري Bovine serum الذي يضاف حسب الغرض من استعماله بنسبة 10% واكمل الحجم الى لتر ماء مقطر معقم ثم عقت بالترشيح باستعمال مرشح بكتريولوجي ذي مسامات بقطر 0.22 مايكرون.

**5-2-3: جمع العينات السريرية Clinical sample collection**

جمعت 248 عينة سريرية لسائل النخاع الشوكي (CSF) من Cerebrospinal fluid من الأطفال في مستشفى حماية الطفل التعليمي في مجمع مدينة الطب بمحافظة بغداد، من الثامن من تموز ولغاية الاول من تشرين الأول 2018، وتم اخذ العينات من قبل أطباء اختصاص.

**6-2-3: عزل وتشخيص البكتريا لمرضى التهاب السحايا****Isolation and identification of meningitis bacteria****1-6-2-3: زرع العينات Samples culture**

زرعت جميع عينات السائل النخاع الشوكي على وسط اكار الدم المحضر في الفقرة (1-4-2-3) وكذلك وسط ماكونكي الصلب المحضر في الفقرة (1-3-2-3) ووسط الشكولاتة الصلب المحضر في الفقرة (2-4-2-3)، بطريقة التخطيط Streaking method بمعدل تكرارين لكل عينة. حضان المكرر الاول لكل عينة هوائياً وبدرجة 37°م لمدة 24 ساعة، اما المكرر الثاني فحضان لاهوائياً في اسطوانة النمو اللاهوائية Candle Jar وبدرجة 37°م لمدة 24 ساعة، بعد ظهور النمو نقلت مستعمرة واحدة وزرعت على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب المحضر في الفقرة (1-3-2-3).

### 2-6-2-3: الصفات المظهرية Morphological characteristics

تم ملاحظة صفات المستعمرات النامية على وسط (الدم الصلب والماكونكي الصلب والشكولاتة الصلب) من ناحية الشكل والحجم واللون للمستعمرات (Forbes *et al.*, 2007).

### 3-6-2-3: الفحص المجهرى Microscopic examination

تم اخذ مسحة من المستعمرات النامية على وسط (الدم الصلب والماكونكي الصلب والشكولاتة الصلب) وتم صبغها بصبغة كرام Gram stain بعد فرشها على شريحة زجاجية مع قطرة من المحلول الملحي المعقم وبعد جفافها ثبتت بأمرارها على اللهب ثلاث مرات بصورة سريعة، ثم فحصت تحت المجهر باستعمال العدسة الزيتية بقوة تكبير نهائي 1000x لمشاهدة تفاعلها مع صبغة كرام وشكل الخلايا البكتيرية وترتيبها (Forbes *et al.*, 2007).

### 4-6-2-3: الاختبارات الكيموحيوية Biochemical test

#### 1-4-6-2-3: فحص الكتاليز Catalase test

أجري الاختبار بوضع جزء من المستعمرات البكتيرية المراد اختبارها على شريحة زجاجية نظيفة ثم اضيف لها قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% (حضر بأخذ 1 مل من محلول بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 30% واكمل الحجم الى 10 مل ماء مقطر)، وان تصاعد فقاعات غاز الأوكسجين دلالةً على النتيجة الموجبة للاختبار وقدرة العزلة على إنتاج إنزيم الكتاليز (Forbes *et al.*, 2007).

#### 2-4-6-2-3: فحص الأوكسيديز Oxidase test

اجري هذا الفحص بنقل مستعمرة بكتيرية نامية على وسط الماكونكي الصلب والدم الصلب المحضر في الفقرة (1-3-2-3) و(1-4-2-3) بوساطة ناقل بلاستيكي إلى سطح ورقة ترشيح مشبعة بكاشف الأوكسيديز N, N, N, N-Tetra-Methyl-P-Phenylen Diamine Dihydro Chloride المجهز من شركة BioMerieux. ان عدم ظهور اللون البنفسجي خلال



10-5 ثوان دلالة على سلبية الفحص وعدم قدرة العزلة على إنتاج إنزيم Cytochrome oxidase (Forbes *et al.*, 2007).

### 3-4-6-2-3: اختبار الأندول Indol test

لقحت أنابيب حاوية على وسط ماء البيتون حسب تعليمات الشركة المنتجة بالبكتريا النامية على وسط الماكونكي الصلب وحضنت بدرجة 37°م ولمدة 24-48 ساعة، وبعد ذلك اضيفت 5 قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's reagent، وإنَّ عدم ظهور حلقة حمراء اعلى الأنابيب تشير إلى عدم قدرة العزلات على إنتاج الأندول من الحامض الأميني التربتوفان، وهي دلالة على النتيجة السالبة للاختبار (Forbes *et al.*, 2007).

### 3-4-6-2-3: اختبار أحمر المثيل Methyl Red Test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط سائل أحمر المثيل - فوكس بروسكاور المحضر في الفقرة (3-2-3-1) بالبكتريا النامية على وسط الماكونكي ثم حضنت لمدة 24 ساعة في حرارة 37°م ثم أضيف لكل انبوب 5-6 قطرات من كاشف أحمر المثيل Methyl Red وظهور اللون الأحمر دليل على إيجابية الفحص (Forbes *et al.*, 2007).

### 3-4-6-2-3: اختبار الفوكس بروسكاور Voges –Proskauer Test

لقحت أنابيب حاوية على MRVP المحضر في الفقرة (3-2-3-1) بالبكتريا النامية على وسط الماكونكي ومن ثم حضنت الأنابيب بحرارة 37°م لمدة 24 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضانة تم إضافة ستة قطرات من كاشف VP1 وقطرتين من كاشف VP2 الى الوسط. ثم رجبت الأنابيب وتترك لمدة خمسة دقائق ظهور اللون الاحمر دليل على ايجابية الاختبار (Forbes *et al.*, 2007).

**6-4-6-2-3: اختبار استهلاك السترات Citrate utilization Test**

أجري الاختبار بتلقيح وسط السترات السيمون الصلب المحضر في الفقرة (1-3-2-3) بالبكتريا النامية على وسط الماكونكي الصلب بطريقة التخطيط وحضنت بدرجة 37°م ولمدة 24 ساعة. ان تحول لون كاشف Bromothymol blue من الأخضر إلى الأزرق دليل على إيجابية الفحص (Forbes *et al.*, 2007).

**7-4-6-2-3: اختبار انتاج أنزيم اليوريز Urease test**

أجري الاختبار بتلقيح وسط اليوريا المحضر في الفقرة (3-4-2-3) بالبكتريا النامية على وسط الماكونكي الصلب بطريقة التخطيط ثم حضنت في درجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة. تحول لون الوسط إلى الوردي دليل على إيجابية الفحص من خلال تحول لون كاشف الفينول الاحمر Phenol red الموجود في الوسط والذي يدل على وجود أنزيم Urease (Forbes *et al.*, 2007).

**8-4-6-2-3: اختبار تخمر السكريات وإنتاج غاز ثنائي اوكسيد الكربون وكبريتيد الهيدروجين****Kligler Iron Agar**

أجري الاختبار بتلقيح الوسط الحديد ثنائي السكر الصلب المحضر في الفقرة (1-3-2-3) بالبكتريا النامية على وسط الماكونكي الصلب بطريقة الطعن والتخطيط وحضنت بدرجة 37°م ولمدة 24 ساعة. اعتمدت النتيجة على اساس التغيرات في الدالة الحامضية pH في القعر والسطح المائل للوسط. تقرأ النتيجة من خلال نوع التخمر وتغير لون الكاشف الفينول الأحمر إلى اللون الأصفر وإنتاج أو عدم إنتاج غاز CO<sub>2</sub> وتكوين راسب أسود H<sub>2</sub>S (Forbes *et al.*, 2007).

**9-4-6-2-3: اختبار إنتاج انزيم الجلاتينيز Gelatinase**

اجري الاختبار بتلقيح وسط الجيلاتين والمحضر في الفقرة (3-2-4-4) بالبكتيريا *Staphylococcus spp.* وحضنت الانابيب بحرارة 37°م وبعد انتهاء مدة الحضان بردت الى درجة 4°م. بقاء الوسط بحالته السائلة دل على ايجابية الاختبار (Forbes et al., 2007).

**10-4-6-2-3: اختبار إنتاج الانزيم المخثر للبلازما Coagulase test**

أجري الاختبار باستعمال الشريحة الزجاجية للتحري عن إنتاج الانزيم المخثر للبلازما بمزج مستعمرة مفردة مع بكتريا *Staphylococcus spp.* مع قليل من بلازما دم الإنسان ويعد التفاعل موجب إذا حصل تخثر خلال (10) ثواني، كما تم عمل سيطرة سالبة بمزج البكتريا مع قطرة من المحلول الفسيولوجي المعقم (Forbes et al., 2007).

**11-4-6-2-3: اختبار حساسية بكتريا *Staphylococcus spp.* للمضاد Novobiocin**

لقتح انابيب حاوية على المحلول الفسلجي وفورنت كثافة النمو مع انابيب مكفرلاند والذي يعطي عدد مقداره  $1.5 \times 10^8$  وحدة تكوين المستعمرة، وغمست المسحة القطنية Cotton swab في العالق البكتيري ثم ضغطت على جدار الانبوب ثم لطح طبق المولرهننتون الصلب بتخطيط القطنة على سطح الوسط وتركت الاطباق لتجف ثم وضع قرص المضاد الحيوي Novobiocin على سطح الوسط باستعمال ملقط معقم. حضنت الاطباق بحرارة 37°م لمدة 24 ساعة وسجلت النتائج بقياس اقطار منطقة التثبيط Inhibition zone.

**12-4-6-2-3: النمو في درجة حرارة 15°م و 45°م**

زرعت بكتريا *Staphylococcus spp.* بطريقة التخطيط اطباق حاوية على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب المحضر في الفقرة (3-2-3-1). وحضنت بعض الأطباق بدرجة حرارة 15°م والأخرى بدرجة حرارة 45°م لمدة 24 ساعة، ويعد وجود النمو دليلاً على ايجابية الفحص.

### 13-4-6-2-3 النمو على وسط المانتول الملحي الصلب

زرعت بكتريا *Staphylococcus spp.* على وسط المانتول الملحي الصلب المحضر في الفقرة (1-3-2-3) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة. لوحظ وجود او عدم وجود النمو وتخمير سكر المانتول.

### 7-2-3: تشخيص البكتيريا المسببة لمرض السحايا لدى الاطفال باستعمال جهاز الفايترك

#### Compact system Vitek –2

شخصت العزلات البكتيرية باستعمال جهاز الفايترك Vitek-2 إذ يتكون من مكونين أساسيين، هما: الآلة Instrument وجهاز الكمبيوتر، والآلة تتكون من خمسة مكونات أساسية هي: لوحة التحكم Keypad

- باب المليء Fill Door ويتم فيه انتقال العينة من أنابيب الاختبار إلى داخل البطاقة Kit بواسطة أنبوب ناقل موجود في البطاقة وتستمر هذه العملية 70 ثانية.
- باب التحميل Load Door ويتم فيه قطع الأنبوب الناقل الموجود على البطاقة ونقل البطاقة إلى داخل الحاضنة وتستمر هذه العملية 3-5 دقيقة.
- باب دخول المستخدم User access Door ويتم فيه الحضان وقياس التغيرات التي تطرأ على البطاقة نتيجة لنمو البكتريا لإعطاء النتيجة.
- باب النفايات Waste Door ويتم فيه تجميع البطاقات بعد الانتهاء من التحاليل وإعطاء النتيجة.

استعمل هذا الجهاز في تأكيد تشخيص العزلات واختبار الحساسية للمضادات الحيوية ويتم التشخيص من خلال عدتين ملحقتين بالجهاز إحداهما خاصة بالتشخيص (هي GN card و GP)، والأخرى خاصة بفحص الحساسية (هي AST-P580 card)، تحتوي عدة التشخيص على 64 حفرة يوجد فيها وسط مجفف ودليل لوني تجرى فيه الاختبارات الكيموحيوية

ويسجل الجهاز التغيرات اللونية الحاصلة نتيجة لنمو البكتريا في جدول، بينما تحتوي عدة اختبار الحساسية للمضادات الحيوية على 18-20 مضاداً حيوياً موزعاً على 64 حفرة ويكون لكل مضاد أكثر من تركيز ويسجل الجهاز التغيرات الحاصلة في العكورة بعد نمو البكتريا.

### • تشخيص البكتريا المسببة لمرض السحايا للأطفال

#### Identification of meningitis Bacteria

أجريت الاختبارات على النحو الآتي:

1. تحضير المزرعة البكتيرية : زُرعت العزلات على وسط اكار الدم والماكونكي الصلب بطريقة التخطيط، وحُضِنَتْ بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة، بعدها أخذت أنبوبة اختبار بلاستيكية شفافة ووُضِعَ فيها 3 مل من محلول الفسلجي الملحي Normal saline المجهز من الشركة المصنعة (BioMerieux) ومُلئت الأنبوبُ بوساطة Dispensette ثم اخذت مستعمرتان منفردة بوساطة لوب بلاستيكي معقم ووُضِعَتْ في الأنبوب لعمل عالق (Suspension) ثم قيست الكثافة بوساطة جهاز (Densichek™ plus) الى ان تكون كثافته بين (0.50-0.63) وبعدها تنقل البطاقة المتصلة بوحدة أنبوب النقل وتثبت على حامل خاص لغرض إدخالها داخل الجهاز.

2. بعد تحضير العينة تُدخل إلى باب المليء لتنتقل العينة من أنابيب الاختبار إلى داخل البطاقة بعدها تنقل البطاقات يدوياً إلى باب التحميل ثم يقوم الجهاز بقطع أنبوبة النقل، بعدها تحضن بدرجة 37°م وتُقرأ النتيجة بين 4-6 ساعة.

**8-2-3: حفظ العزلات البكتيرية Preservation of Bacteria isolates****1-8-2-3: الحفظ قصير الأمد Short period culture**

زرعت العزلات البكتيرية على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب المحضر في الفقرة (1-3-2-3) بشكل مائل Slant بطريقة التخطيط، وحُضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة، وبعد الحضانة حُفظت بدرجة حرارة 4°م وجددت العزلات شهرياً (Forbes *et al.*, 2007).

**2-8-2-3: الحفظ طويل الأمد Long period culture**

للحفاظ على عزلات البكتيريا المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب السحايا لمدة طويلة، استعمل وسط تريبتون الصويا السائل المحضرة في الفقرة (1-3-2-3) وعقم بالمؤصدة Autoclave ، ثم لقت الأنابيب الحاوية على الوسط الزرع بالبكتيريا، وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م وبعد النمو يضاف إليها الكليسيروول بنسبة 20% المعقم وحفظت بعدها بالتجميد (Feltham *et al.*, 1978) المحورة).

**9-2-3: فحص اختبار الحساسية للمضادات الحيوية للبكتيريا المسببة لمرض السحايا باستعمال****التركيز المثبط الأدنى MIC:****Sensitivity Test for meningitis bacterial by MIC:**

يتألف جهاز الفايترك كما في الفقرة (7-2-3) وأجري الاختبار على النحو الآتي:

1. تحضير المزرعة البكتيرية: زرعت العزلات بطريقة التخطيط على وسط الدم الصلب المحضر في الفقرة (1-4-2-3) وحضنت بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة، بعدها أخذت انبوتان من الكان تيوب Kan tube ووضع فيها 3 مل من محلول الملح Normal saline المجهز من قبل الشركة المصنعة (BioMerieux). إذ ملئت الأنابيب بوساطة Dispensette ثم أخذت مستعمرتان منفردة بوساطة ناقل بلاستيكي معقم ووضعت في الأنابيب لعمل عالق بكتيري (Suspension) ثم قيست الكثافة بوساطة

جهاز (Densichek<sup>TM</sup> plus) إذ تكون كثافته بين (0.63-0.50) ثم نقل حجم ثابت من الأنبوبة الأولى إلى الأنبوبة الثانية الخاصة بفحص الحساسية بوساطة ماصات دقيقة Micropipettes بحجم (280 مايكروليتر) خاصة بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام وهكذا بالنسبة لجميع الأنابيب وبعدها نقلت البطاقة المتصلة بوحدة أنبوب النقل وثبتت على حامل خاص لغرض إدخالها داخل الجهاز .

2. بعد تحضير العينة تم إدخالها إلى باب المليء لنتقل العينة من أنابيب الاختبار إلى داخل البطاقة بعدها تنقل البطاقات يدوياً إلى باب التحميل ثم يقوم الجهاز بقطع أنبوبة النقل بعدها تحضن بدرجة حرارة 37 °م وتقرأ النتيجة بين 6-12 ساعة لقياس التحسس للمضادات الحيوية.

### 10-2-3: اختبار قدرة بكتيريا (*Staphylococcus spp.*) على تكوين الغشاء الحيوي

#### Bioflim

اختبرت قابلية العزلات البكتيرية لتكوين الغشاء الحيوي وفقاً لما جاء في الطريقة المحورة لـ (Cucarella et al. (2002)، وذلك باستعمال أطباق المعايرة الدقيقة Microtiter plate تم تنشيط العزلات على وسط تربتون الصويا السائل المحضر في الفقرة (1-3-2-3) حضنت العزلات لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 °م أُجري الاختبار بإضافة الوسط الزراعي الحاوي على العزلات المنشطة بمقدار 40 مايكروليتر لكل حفرة و 160 مايكروليتر من (وسط تربتون الصويا السائل الحاوي على 0.25% سكر الكلوكوز المحضر في الفقرة (3-4-2-3) ووسط تربتون الصويا السائل الحاوي على 2% سكر الكلوكوز المحضر في الفقرة (3-4-2-3) ووسط لوريا السائل المحضر في الفقرة (1-3-2-3) من أطباق المعايرة بواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة) مع إضافة معامل سيطرة (وسط زرع غير حاوٍ على العزلات البكتيرية بمقدار 200 مايكروليتر في الحفرة لكل عزلة بكتيرية). وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 °م بعدها تم

التخلص من محتويات الحفر وغسلت ثلاث مرات بمحلول داريء الفوسفات الملحي المحضر في الفقرة (2-2-2-3) المعقم تركت لتجف ثم اضيف لكل حفرة من الحفر صبغة Crystal violet المحضر في الفقرة (3-2-2-3) بمقدار 200 مايكروليتر لمدة دقيقة واحدة بعدها سكبت الصبغة واضيف 200 مايكروليتر من كحول الايثانول المركز وبعدها تم قراءة الكثافة الضوئية بجهاز (Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA reader) لجميع المحتويات تحت الطول موجي 570 نانومتر لتحديد كثافة العزلات وقدرتها على انتاج الغشاء الحيوي Bioflim، ثم أجريت الحسابات وفق الفقرات الاتية وحسب طريقة (Martins et al. (2013):

1. تعد العزلة غير مكونة للغشاء الحيوي Non-adherent إذا كان معدل انحراف الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة او يساوي (Optical Density control (ODc) أكبر من معدل قراءة العزلة.
2. تعد العزلة ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي Weakly adherent إذا كان معدل انحراف الكثافة الضوئية للعزلة أكبر من (ODc) وأصغر من (2×ODc).
3. تعد العزلة متوسطة التكوين للغشاء الحيوي Moderately adherent إذا كان معدل انحراف الكثافة الضوئية للعزلة أكبر من (2×ODc) وأصغر من (4×ODc).
4. تعد العزلة شديدة التكوين للغشاء الحيوي Strong adherent إذا كان معدل انحراف الكثافة الضوئية للعزلة OD أكبر أو يساوي (4 × ODc).



3-2-11: اختبار مقاومة بكتيريا *Staphylococcus spp.* المكونة للغشاء الحيوي للمضاد**Erythromycin**

اتبعت طريقة Cucarella *et al.* (2004) للكشف عن حساسية بكتيريا

*Staphylococcus spp.* المكونة للغشاء الحيوي للمضادات الحيوية باستعمال اطباق المعايرة

الدقيقة كالآتي:

1. لقم وسط التريبتون الصويا السائل المحضر في الفقرة (3-2-3) ببكتيريا

*Staphylococcus spp.* ثم حضنت بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة.

2. باستخدام اطباق المعايرة Microtiter plate، وضع في حفرة العمود الاول والثاني والثالث

لطباق المعايرة 25 مايكروليتر من الفقرة (1) ثم اضيف 175 مايكروليتر من وسط التريبتون

الصويا السائل الحاوي على 2% كلوكوز المحضر في الفقرة (3-2-3-4-6).

3. حضنت اطباق المعايرة بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة ثم تم تفريغ محتوى الحفر وغسلها

بالماء المقطر ووضع في حفرة العمود الاول 200 مايكروليتر من وسط مولر هنتون

السائل المحضر في الفقرة (3-2-3) وفي الحفرة الثانية 100 مايكروليتر من وسط

مولر هنتون و100 مايكروليتر من MIC للمضاد Erythromycin بتركيز 8 مايكروغرام

/مل وفي الحفرة الثالثة 100 مايكروليتر من وسط مولر هنتون و100 مايكروليتر من

Minimum bactericidal concentration (MBC) للمضاد Erythromycin

بتركيز 16 مايكروغرام /مل.

4. حضنت اطباق المعايرة بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة.

5. قيست الكثافة الضوئية باستعمال جهاز الايليزا على الطول الموجي 600 نانومتر.

**12-2-3: اختبار حركة الانتشار Spreading test**

زرعت العزلات البكتيرية *Staphylococcus spp.* على وسط الانتشار المحضر في الفقرة (3-2-4-7) بوضع 100 مايكروليتر من العالق البكتيري في مركز الطبق ثم حضنت الاطباق بحرارة 37م° لمدة 24 ساعة وقيس قطر المستعمرة الثانية بالملمتر (Kaito and Sekimizu, 2007).

**13-2-3: اختبار قدرة بكتريا *Staphylococcus spp.* على الالتصاق Adhesion**

تم الاختبار بأجراء الطريقتين الآتيتين:

**1-13-2-3: اختبار الالتصاق على اطباق Polystyrene**

- اتبعت طريقة (2001) Cucarella *et al.* المحورة لاختبار قدرة بكتريا *Staphylococcus spp.* على الالتصاق في سطح اطباق Polystyrene وكالاتي:-
1. لقع وسط TSB الحاوي 0.25% كلوكوز المحضر في الفقرة (3-2-4-5) بالمستعمرات البكتيرية ثم حضنت بحرارة 37م° لمدة 24 ساعة.
  2. وضع 10 مل من الفقرة (1) في اطباق Polystyrene وحضنت بحرارة 37م° لمدة ساعة واحدة.
  3. فرغت الاطباق من الوسط الزرعي ثم غسلت ثلاث مرات بدارىء الفوسفات الملحي.
  4. ثبتت الخلايا البكتيرية باستعمال الميثانول المركز ثم صبغت بصبغة كرام وفحصت الاطباق تحت العدسة الزيتية بقوة تكبير 100X.

**2-13-2-3: اختبار الالتصاق على الخلايا الطلائية السرطانية**

استخدمت الطريقة المتبعة في المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية من قبل Cucarella *et al.* (2004) والمحوارة:

1. فرغت قناني الزرع النسيجي الحاوي على الخلايا السرطانية من الوسط الزرع RPMI-1640 وغسلت بمحلول داريء الفوسفات الملحي المحضر في الفقرة (3-2-2-2) ثم اضيف 200 مايكروليتر من محلول ترابين - فرسين المحضرة في الفقرة (3-2-2-6) وحركت ببطء ثم حضنت بحرارة 37°م لمدة 3 دقائق لتفكيك الخلايا الملتصقة بجدار قنينة الزرع النسيجي، والحصول على خلايا سرطانية واطيف له 15 مل من وسط نمو RPMI-1640 جديد المحضر في الفقرة (3-2-4-8) المدعم بـ 10% مصل بقري ثم حركت القنينة جيداً.
2. نقل 200 مايكروليتر من قنينة الزرع النسيجي الى حفر طبق معايرة الزرع النسيجي Microtiter Plate 96 Wells باستخدام ماصة دقيقة.
3. حضنت الاطباق بحرارة 37°م لمدة تتراوح بين 18-24 ساعة الى حين التصاق الخلايا في الحفرة بعدها تم التخلص من الوسط الزرع القديم واطيف 200 مايكروليتر من وسط RPMI-1640 جديد والحواوي على العالق البكتيري لبكتريا *Staphylococcus spp.* (المحضرة بتلقيح انايب حاوية على المحلول الفسلجي وضبطت كثافة النمو مع انايب عكورة مكفرلاند والذي يعطي عدد مقداره  $1.8 \times 10^6$  وحدة تكوين المستعمرة) وحضنت الاطباق بحرارة 37°م لمدة 2 ساعة.
4. افرغت الاطباق من الوسط الزرع واطيف 200 مايكروليتر من محلول ترابين - فرسين المحضر في الفقرة (3-2-2-6) وحركت القناني ببطء لمدة 1 دقيقة لتفكيك الخلايا الملتصقة ثم اجريت سلسلة من تخافيف (0, 10:1, 100:1) وزرعت على وسط الدم الصلب وحضنت بحرارة 37°م لمدة 24 ساعة ولقراءة النتيجة حُسب عدد المستعمرات لكل طبق.

3-2-14: الكشف الجزيئي عن بعض جينات بكتيريا *Staphylococcus spp.*3-2-14-1: استخلاص DNA الجينوم لبكتيريا *Staphylococcus spp.***Genomic DNA extraction of *Staphylococcus spp.* bacteria**

استُعملت عدة Wizard Genomic DNA Purification Kit الذي جهّزته الشركة

(Promega (USA) لاستخلاص DNA الجينومي للعزلات البكتيرية وأتبع الخطوات على النحو

الآتي:

1. زرعت العزلات البكتيرية المراد استخلاص DNA منها على وسط تربتون الصويا السائل

المحضر في الفقرة (3-2-3-1) وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 37°م.

2. سحب 1.7 مل من المزروع البكتيري بواسطة ماصة دقيقة Micropipette إلى أنابيب

الابندورف المعقمة Max 2000 ml.

3. وضعت أنابيب الابندورف في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة دقيقة واحدة

وبسرعة 13000 دورة / دقيقة وأهمل الطافي.

4. أضيف 100 مايكروليتر من محلول الاماهة DNA- rehydration و 100 مايكروليتر

Lysozyme ومزج بواسطة جهاز المازج Vortex.

5. حضنت الانابيب لمدة 30 دقيقة في الحاضنة بدرجة 37°م.

6. وضعت انابيب الابندورف في جهاز الطرد المركزي لمدة 2 دقيقة بـ 13000 دورة/ دقيقة

واهمل الطافي.

7. اضيف 600 مايكروليتر من محلول Nuclei Lysis ومزجت جيدا.

8. حضنت في حمام مائي بدرجة 70°م لمدة نصف ساعة ثم بردت لدرجة حرارة الغرفة.

9. اضيف 3 مايكروليتر من انزيم RNAase. وحضنت بـ 37°م لمدة 15 دقيقة.

10. اضيف 200 مايكروليتر من محلول ترسيب البروتين ومزجت بوساطة الجهاز المازج. وحضنت بحرارة -3 م° ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 5 دقائق واهمل الطافي.
11. اضيف 600 مايكروليتر من Isopropanol ومزج بجهاز المازج ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 2 دقيقة.
12. اضيف 600 مايكروليتر من كحول الايثانول 70% ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة 2 دقيقة بسرعة 13000 دورة/ دقيقة.
13. سحب الايثانول وتركت الانابيب في درجة حرارة الغرفة.
14. اضيف 100 مايكروليتر من محلول الاماهة Rehydration لمدة ساعة واحدة بحرارة 65 م°.
15. حفظ الدنا DNA وهي خطوة الحصول على الـ DNA مذاباً في 100 مايكروليتر من محلول الاماهة بحرارة -4 م° لحين الاستعمال.
- 2-3-14-2: الكشف الجزيئي عن بعض جينات *Staphylococcus spp* باستعمال جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل (PCR)**
- حُضر خليط تفاعل PCR لبوادئ الجينات (*cna* الـ الذي يشفر إلى Collagen binding protein، و *icaA* الذي يشفر إلى Intercellular adhesion gene A، و *eno* الذي يشفر إلى Laminin binding protein و *clfA* الذي يشفر إلى Clumping factors A و *bap* الذي يشفر إلى Biofilm associated protein) بخلط 10 مايكروليتر من Master Mix والمجهز من شركة Promega و 1 مايكروليتر من الباديء الامامي للجين و 1 مايكروليتر من الباديء العكسي للجين و 5 مايكروليتر من الماء المقطر اللايوني و 3 مايكروليتر من Template DNA المستخلص في الفقرة (2-3-14-1)، يصبح الحجم النهائي للخليط 20

مايكروليتر، بعد ذلك مزجت محتويات أنابيب PCR جيداً باستعمال المازج Vortex ثم وضعت في جهاز PCR وبرمج الجهاز لكل جين بشكل منفصل. ضُبطت ظروف التضاعف للتحري عن الجينات بشكل منفصل لكل جين على النحو الآتي:

1. خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين *eno* بحسب ما ذكره كل من *Salaberry et al.*

(2015) و *Zuniga et al.* (2015) وأُتبعَت الخطوات الموضحة في الجدول (3-11):

جدول (3-11): خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين *eno*.

الوقت	عدد الدورات	درجة الحرارة	مراحل PCR
5 دقائق	دورة واحدة	94°م	1-مرحلة مسخ الدنا الأولي Initial Denaturation
30 ثانية	30 دورة	94°م	2-مرحلة مسخ الدنا Denaturation
30 ثانية		55°م	3-مرحلة الالتحام Annealing
30 ثانية		72°م	4-مرحلة الاستطالة Extension
7 دقيقة	دورة واحدة	72°م	5-مرحلة الاستطالة النهائية Final Extension
10 دقيقة	—	4°م	6-مرحلة السيطرة Hold

2. خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين *bap* بحسب ما ذكره كل من *Salaberry et al.* (2015) و *Zuniga et al.* (2015) وأتبعت الخطوات الموضحة في الجدول (3-12).

جدول (3-12): خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين *bap*.

الوقت	عدد الدورات	درجة الحرارة	مراحل PCR
5 دقائق	دورة واحدة	94°م	1-مرحلة مسخ الدنا الأولى Initial Denaturation
30 ثانية	30 دورة	94°م	2-مرحلة مسخ الدنا Denaturation
30 ثانية		62°م	3-مرحلة الالتحام Annealing
30 ثانية		72°م	4-مرحلة الاستطالة Extension
7 دقيقة	دورة واحدة	72°م	5-مرحلة الاستطالة النهائية Final Extension
10 دقيقة	–	4°م	6-مرحلة السيطرة Hold

3. خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين *cna* بحسب ما ذكره كل من *Salaberry et al.* (2015) و *Zuniga et al.* (2015) وأتبعت الخطوات الموضحة في الجدول (3-13).

جدول (3-13): خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين *cna*.

الوقت	عدد الدورات	درجة الحرارة	مراحل PCR
5 دقائق	دورة واحدة	94°م	1-مرحلة مسخ الدنا الأولي Initial Denaturation
30 ثانية	30 دورة	94°م	2-مرحلة مسخ الدنا Denaturation
30 ثانية		55°م	3-مرحلة الالتحام Annealing
30 ثانية		72°م	4-مرحلة الاستطالة Extension
7 دقيقة	دورة واحدة	72°م	5-مرحلة الاستطالة النهائية Final Extension
10 دقيقة	–	4°م	6-مرحلة السيطرة Hold

4. خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين *clfA* حسب ما ذكر *Nemati et al.* (2009) وأُتبعَت الخطوات الموضحة في الجدول (3-14).

جدول (3-14): خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين *clfA*.

الوقت	عدد الدورات	درجة الحرارة	مراحل PCR
5 دقائق	دورة واحدة	95 م°	1- مرحلة مسخ الدنا الأولى Initial Denaturation
30 ثانية	30 دورة	95 م°	2- مرحلة مسخ الدنا Denaturation
30 ثانية		55 م°	3- مرحلة الالتحام Annealing
30 ثانية		72 م°	4- مرحلة الاستطالة Extension
10 دقيقة	دورة واحدة	72 م°	5- مرحلة الاستطالة النهائية Final Extension
10 دقيقة	-	4 م°	6- مرحلة السيطرة Hold

5. خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين *icaA* بحسب ما ذكره *Nemati et al.* (2009) وأُتبعَت الخطوات الموضحة في الجدول (3-15).

جدول (3-15): خطوات التضاعف الجيني للتحري عن جين *icaA*.

الوقت	عدد الدورات	درجة الحرارة	مراحل PCR
5 دقيقة	دورة واحدة	95 م°	1- مرحلة مسخ الدنا الأولى Initial Denaturation
30 ثانية	30 دورة	95 م°	2- مرحلة مسخ الدنا Denaturation
30 ثانية		49 م°	3- مرحلة الالتحام Annealing
30 ثانية		72 م°	4- مرحلة الاستطالة Extension
7 دقيقة	دورة واحدة	72 م°	5- مرحلة الاستطالة النهائية Final Extension
10 دقيقة	-	4 م°	6- مرحلة السيطرة Hold

بعدها نُقل 5 مايكروليتر من ناتج تضاعف كل جين إلى الترحيل الكهربائي على هلام

.Agarose الاكروز



### 3-14-2-3: الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis

أجري الترحيل الكهربائي للجينات الناتجة من تفاعل البلمرة المتسلسل وفق طريقة

(2015) *Salaberry et al.* المحورة على النحو الآتي:

حضر هلام الاكاروز بتركيز 1% وذلك بإذابة (1 غم) من الاكاروز في 100 مل من دارئ TBE (1X) المحضر في الفقرة (3-2-2-8) وسخن الاكاروز لدرجة الغليان وترك ليبرد لدرجة الحرارة 55-60°م ثم اضيف له 0.5 مايكروليتر من صبغة بروميد الايثيديوم ذات تركيز 10 مايكروغرام /مللتر.

1. اعدت صفيحة إسناد الاكاروز Tray ووضع المشط Comb وثبت بشكل جيد لتكوين

الحفر wells وصب الاكاروز بهدوء في الصفيحة لمنع حدوث فقاعات هوائية وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة.

2. رفع المشط بهدوء من الاكاروز المتصلب ونقل الاكاروز مع القالب إلى حوض الترحيل

الكهربائي وملئ الحوض المستعمل بمحلول TBE (1X) المحضر في الفقرة (3-2-2-8) إذ يغطي سطح هلام الاكاروز بالكامل.

3. نقل 5 مايكروليتر من ناتج تضاعف الجينات المراد تحميلها ووضعها في الحفر

المخصصة لها وكذلك نقل 5 مايكروليتر من الدليل الحجمي DNA Ladder (100bp) ووضع في أول حفرة والذي استعمل لتحديد أحجام قطع DNA الموجودة بعدها شغل الجهاز ومرر التيار الكهربائي بفرق جهد 75 فولت ولمدة 75 دقيقة.

4. بعد انتهاء وقت الترحيل نقل الهلام ووضع في جهاز لفحصه باستعمال مصدر للأشعة

فوق البنفسجية UV-Trans illuminator والمجهزة بكاميرا رقمية عند طول موجي 312 نانوميتر وصورت النتائج.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

**Results and  
Discussion**

## 4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

### 1-4: جمع العينات وعزل وتشخيص البكتيريا في سائل النخاع الشوكي من أطفال

#### مرضى التهاب السحايا

### Collection of samples, isolation and identification of bacteria in spinal cord from children with meningitis

اخضعت للدراسة 248 عينة سريرية تم الحصول عليها من مستشفى حماية الأطفال/ مجمع مدينة الطب. شملت العينات المرضى من الأطفال الذين يعانون من التهاب السحايا ولمدة من الثامن من تموز 2018 الى الاول من تشرين الاول 2018، زرعت العينات مباشرة على وسط الماكونكي الصلب والدم الصلب والشكولاتة الصلب وحضنت بدرجة 37°م ولمدة 24 ساعة، شخصت جميع العزلات اعتماداً على الصفات المزرعية والمظهرية للمستعمرات والصفات المجهرية للمسحات البكتيرية، بينت نتائج الزرع ظهور نمو في 42 عينة، شخصت باستعمال جهاز Vitek-2 (GN; GP) وكانت النتائج كالآتي:

#### 1-1-4: الصفات المظهرية Morphological characteristics

ظهرت بعض العزلات باللون الوردى على وسط الماكونكي الصلب والآخرى عديمة اللون اعتماداً على قدرتها على تخمر او عدم تخمر سكر اللاكتوز، في حين ظهرت بعض العزلات ببيضاء اللون أو رصاصي أو بلون كريمي على اوساط الدم الصلب والشكولاتة الصلب.

#### 2-1-4: الفحص المجهرى Microscopic examination

ظهرت البكتيريا تحت المجهر الضوئي عند قوة تكبير 100X بعد عملية التصبغ بصبغة كرام باللون الاحمر للبكتيريا السالبة لصبغة كرام وباللون البنفسجي للبكتيريا الموجبة لصبغة كرام.

## 3-1-4: الاختبارات الكيموحيوية Biochemical test

يوضح الجدول (1-4) ظهور جميع عزلات *Staphylococcus* spp. سالبة لفحص Oxidase وموجبة لفحص Catalase، كما اظهر النوع البكتيري *S.aureus* و *S.haemolyticus* نتيجة موجبة لانتاج انزيم الجيلاتينيز Gelatinase عدا بكتيريا *S.warneri* فكانت سالبة وبكتيريا *S.epidermidis* و *S.hominis* كانت متغايرة. اما انتاج انزيم Haemolysin فكان النوعين البكتيريين *S.epidermidis* و *S.hominis* محلل للدم من نوع بيتا  $\beta$  وكاما  $\gamma$ . اما النوعين *S.aureus* و *S.warneri* فكانا من النوع كما  $\gamma$ ، وبكتيريا *S.haemolyticus* من نوع بيتا  $\beta$ . وقد اتضح عدم قدرة *Staphylococcus* spp. على النمو بدرجة حرارة 15°م في حين اظهرت قابليتها على النمو بدرجة 45°م. في حين أظهرت جميع عزلات بكتيريا *Staphylococcus* spp. نموها على وسط المانتول الملح الصلب وتخمرها لسكر المنتول في عزلات بكتيريا *S.aureus*. اما فحص المضاد الحيوي Novobiosin فقد كانت جميع عزلات *Staphylococcus* spp. حساسة له. اما فحص تخثر بلازما الدم Coagulase فكانت جميع الانواع البكتيرية سالبة لهذا الفحص فيما عدا بكتيريا *S.aureus* فكانت موجبة للفحص.

جدول (1-4): اختبارات الكيموحيوية لبكتيريا *Staphylococcus* spp.

تخمير سكر Mannitol	النمو على وسط Mannitol Salt agar	Coagulase	Novobiocin	درجة الحرارة		Haemolysin	Gelatinase	Catalase	Oxidase	نوع البكتيريا
				45°م	15°م					
-	+	-	S	-, +	-	$\beta, \gamma$	-, +	+	-	<i>S.epidermidis</i>
+	+	+	S	+	-	$\gamma$	+	+	-	<i>S.aureus</i>
-	+	-	S	-, +	-	$\beta$	+	+	-	<i>S.haemolyticus</i>
-	+	-	S	+	-	$\beta, \gamma$	-, +	+	-	<i>S.hominis</i>
-	+	-	S	+	-	$\gamma$	-	+	-	<i>S.warneri</i>

(-) : سالبة الفحص, (+) : موجبة الفحص, (S) : حساسة الفحص, ( $\beta$ ) : تحلل الدم بيتا, ( $\gamma$ ) : تحلل الدم كاما.

اما الجدول (2-4) يوضح الاختبارات الكيموحيوية للبكتيريا السالبة لصبغة كرام اذ ان

العزلات البكتيرية *Burkholderia cepacia* و *Acinetobacter baumannii*

*Pseudomonas putida* سالبة لاختبار الاندول واحمر المثيل وفوكاس بروسكاور وإنتاج اليوريز ومتغايرة لاختبار استهلاك السترات، اما بكتريا *Klesiella pneumonia* كانت سالبة لاختبار الاندول واحمر المثيل وموجبة لاختبار فوكس بروسكاور واستهلاك السترات وانتاج انزيم اليوريز. في حين كانت بكتريا *Escherichia coli* موجبة لاختبار احمر المثيل وسالبة لاختبار فوكس بروسكاور والسترات واليوريز، اما في وسط KIA فكانت جميع العزلات غير منتجة لغازي  $H_2S$  و  $CO_2$  وغير مخمرة لسكر الكلوكوز عدا بكتيريا *Klesiella pneumonia* و *Escherichia coli* فهي مخمرة، وكانت جميع العزلات موجبة لفحص الكاتليز، وكانت *Pseudomonas putida* و *Burkholderia cepacia* موجبة التفاعل لاختبار الاوكسيدز.

جدول (2-4): الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا السالبة لصبغة كرام.

Oxidase	Catalase	KIA				Urase	Citrate	MR-VP		Indol	نوع البكتريا
		H <sub>2</sub> S	CO <sub>2</sub>	Bottom	slant			voges proskauer	Methyl red		
/	+	-	-	K	K	-	±	-	-	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>
+	+	-	-	K	K	-	±	-	-	-	<i>Burkholderia cepacia</i>
+	+	-	-	K	K	-	±	-	-	-	<i>Pseudomonas putida</i>
/	+	-	-	A	A	+	+	+	-	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
/	/	-	-	A	A	-	-	-	+	/	<i>Escherichia coli</i>

(-) : سالبة التفاعل و(+) : موجبة التفاعل و(±) : متغايرة التفاعل و Acid:(A) و Alkaline : (K) .KIA :Kliglar Iron

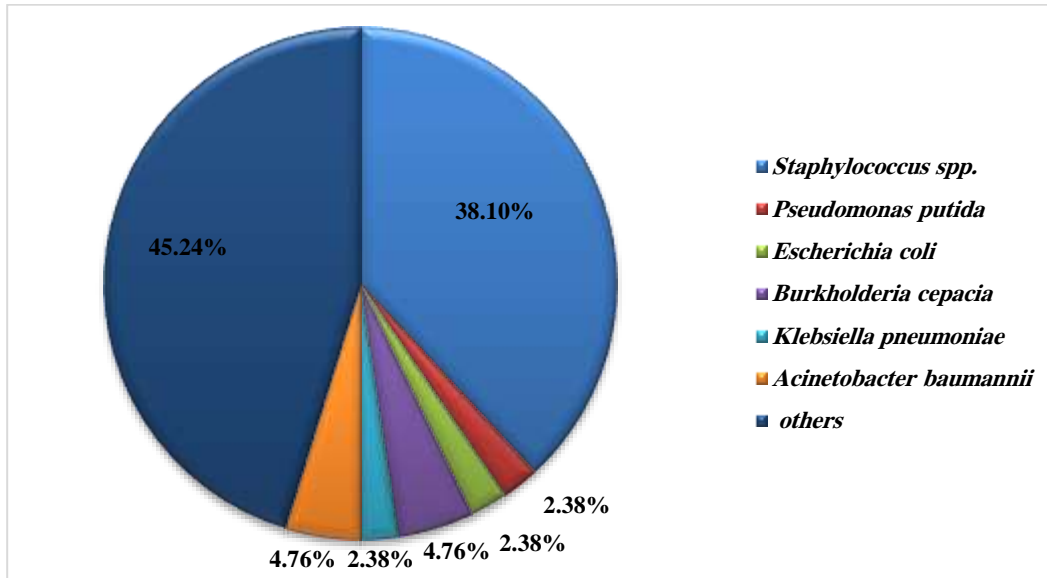
Agar

#### 4-1-4: التشخيص بعدة الفايتهك Dignosis by Vitek- 2 (GP, GN)

لغرض تشخيص العزلات البكتيرية المعزولة من سائل النخاع الشوكي CSF تشخيصاً تأكيدياً باستعمال جهاز الفايتهك وذلك عن طريق مجموعة من الفحوصات الكيموحيوية اذا وضحت نتائج الجهاز وجود نتائج متغايرة حسب اجناس وانواع البكتيريا، وبينت النتائج الحصول على 16 عزلة تابعة لبكتيريا *Staphylococcus spp.* وبنسبة 38.1% وعزلة واحدة *Pseudomonas putida* و *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumonia* بنسبة 2.38% وعزلتين من

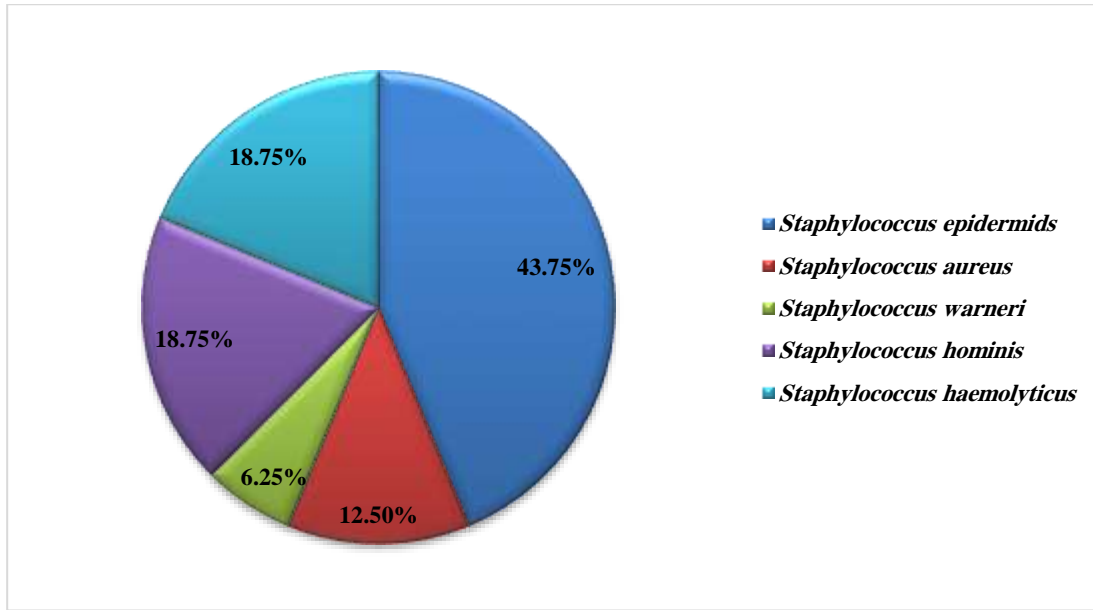
*Burkholderia cepacia* و *Acinetobacter baumannii* بنسبة 4.76% و 19 عزلة كانت أنواع أخرى تضمنت كل من:

*Enterococcus faecium*, *Streptococcus thoralensis*, *Kocuria kristinae*, *Leclercia adecarboxylata*, *Rothia dentocariosa*, *Globicatella sulfidifaciens*, *Pantoea spp.*, *Pantoea agglomerans*, وبنسبة 45.24% (شكل 1-4).



شكل (1-4): النسبة المئوية للعزلات البكتيرية المعزولة من سائل النخاع الشوكي.

في حين اظهرت النتائج وكما موضحة في الشكل (2-4) ان عدد عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* كان 16 من بين 42 عزلة وبلغ توزيع العزلات حسب النوع *S. epidermidis* (%43.75) 16/7 و *S. hominis* (%18.75) 16/3 و *S. haemolyticus* لكتيهما و *S. aureus* (%12.5) 16/2 و *S. warneri* (%6.25) 16/1.



شكل (4-2): النسبة المئوية لعزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.*

وهذا ينطبق مع نتائج Khan *et al.* (2017a) ان اكثر العزلات سيادة كانت المكورات العنقودية السالبة لفحص انزيم تخثر البلازما (CoNS) المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب السحايا، مشيراً الى ان اسباب الإصابة كانت عدوى المستشفيات وعدوى المجتمعات. في حين أشار Reta and Zeleke (2016) في دراسته ان نسبة عزل بكتيريا (CoNS) من سائل النخاع الشوكي للاطفال حديثي الولادة بلغت حوالي 4% فيما بلغت 5% لبكتيريا *S.aureus*، مبينا في الوقت نفسه ان نسبة العزل تختلف حسب وزن الطفل ونوع الإصابة، بينما وجد Rhie *et al.* (2017) ارتفاع نسبة بكتيريا *S. aureus* لتصل الى 27.1% في الاطفال التي تقل اعمارهم عن ثلاثة اشهر، في حين بلغت نسبتها 20.5% في الاطفال التي تتراوح اعمارهم بين (3-59) شهراً و26.8% في اطفال باعمار 5 سنوات واكثر، وأشار Khan *et al.* (2017a) الى ارتفاع نسبة الإصابة ببكتيريا (CoNS) نتيجة عدوى المستشفيات وان 90% من (CoNS) المعزولة تكون مقاومة للمضاد الحيوي Oxacillin، مشيراً الى ان سبب ازدياد الإصابة ببكتيريا *Staphylococcus* هو بسبب مقاومتها للمضادات الحيوية Oxacillin، وكذلك عدم توفر

اللقاحات لهذه البكتيريا، وهذا كان دليل واضح لقلة الإصابة ببكتيريا *Haemophilus influenzae* وذلك لتوفر اللقاح الملائم لها.

ان اختلاف نسب العزل بين دراسة واخرى مع نسب العزل لهذه الدراسة قد يعود الى نوع العينة التي تم عزل البكتيريا منها تناول المضادات الحيوية وتتغير في امكانية التشخيص لبعض المختبرات في العزل والتشخيص فضلاً عن ان بعض الأنواع من *Staphylooccus* spp. يكون توأجدها في بيئة الجلد اكثر ك *S. epidermidis* مقارنة بالانواع الأخرى (Rhie et al., 2017; Reta and Zeleke, 2016).

#### 2-4: الحساسية للمضادات الحيوية Sensitivity of Antibiotic

اظهرت النتائج التي حصل عليها باستعمال جهاز الفايترك (Vitek 2) المتضمن الكارت التشخيصي AST-P580 على 17 مضادا حيويًا لمعرفة مدى حساسية العزلات البكتيرية لتلك المضادات الحيوية وقيست حساسية العزلات البكتيرية للمضادات باستعمال التركيز المثبط الأدنى Minimum inhibitory concentration (MIC) للمضاد وتأثيره في البكتيريا.

بينت النتائج ان جميع العزلات كانت حساسة Sensitive بنسبة 100% لعدد من المضادات المستعملة في الدراسة وهي Linezolid و Teicoplanin و Vancomycin و Tigecycline و Nitrofurantion و Benzylpenicillin. بينما اختلفت بعض العزلات البكتيرية فكانت مقاومة Resistance او متوسطة Intermediate. بينما كانت نسبة المقاومة اتجاه المضاد الحيوي Oxacillin بنسبة 85.7% والمضاد Gentamicin بنسبة 28.57% والمضاد Tobramycin بنسبة 21.42% والمضاد الحيوي Levofloxacin بنسبة 28.57% والمضاد Moxifloxacin بنسبة 14.28% والمضاد Erythromycin بنسبة 85.7% والمضاد Clindamycin بنسبة 42.85% والمضاد Tetracycline بنسبة 28.57% والمضاد Fusidic



Acid بنسبة 64.28% والمضاد Rifampicin بنسبة 35.71% والمضاد Trimethoprim بنسبة 28.57% وكما هو موضح في الجدول (4-3).

ومن الجدول نفسه يتبين ان هناك مقاومة لسبعة عزلات من بكتيريا *S.epidermidis* للمضاد Benzylpenicillin وبتركيز اكبر من أو يساوي 0.5 ملغرام/مل و Oxacillin وبتركيز اكبر أو يساوي 4 ملغرام/مل، و 3 عزلات مقاومة اتجاه Gentamicin وبتركيز اكبر من أو يساوي 16، و 3 عزلات مقاومة اتجاه المضاد Tobramycin وبتركيز اكبر أو يساوي 16 ملغرام/مل، و 3 عزلات مقاومة للمضاد Levofloxacin وبتركيز اكبر من أو يساوي 4 و 8 ملغرام/مل، وعزلة واحدة مقاومة للمضاد Moxifloxacin وبتركيز 2 ملغرام/مل وكانت 6 عزلات مقاومة للمضاد Erythromycin وبتركيز اكبر أو يساوي 8 ملغرام/مل، و 4 عزلات للمضاد Clindamycin اذ ان عزلتين منها بتركيز اكبر أو يساوي 8 ملغرام/مل وعزلتين بتركيز اقل او يساوي 0.25 ملغرام/مل، و 2 عزلة مقاومة للمضاد Tetracycline وبتركيز أكبر أو يساوي 16 ملغرام/مل، و 4 عزلات مقاومة للمضاد Fusidic Acid 3 منها بتركيز أكبر أو يساوي 32 ملغرام/مل وعزلة واحدة بتركيز 8 ملغرام/مل، اما المضاد Rifampicin فكانت 4 عزلات مقاومة له بواقع 3 بتركيز اكبر أو يساوي 32 ملغرام/مل وعزلة واحدة بتركيز 16 ملغرام/مل. اما المضاد Trimethoprim فكانت عزلة واحدة مقاومة له وبتركيز أكبر أو يساوي 320 ملغرام/مل. اما المضاد Nitrofurantion و Tigecycline و Vancomycin و Teicoplanin و Linezolid المضاد لم تظهر عزلات *S.epidermidis* اي مقاومة اتجاهها.

جدول (3-4): حساسية بكتريا *S.epidermidis* للمضادات الحيوية باستعمال التركيز المثبط الأدنى (MIC) باستعمال جهاز Vitek-2.

(S) الحساسية			(I) المتوسطة			(R) المقاومة			اسم المضاد الحيوي
MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	
-	-	-	-	-	-	<=0.5	100	7	Benzylpenicillin
-	-	-	-	-	-	<=4	100	7	Oxacillin
4 >=0.5	42.85	3	8	14.2 8	1	<=16	42.85	3	Gentamicin
4 >=1	42.85	3	8	14.2 8	1	<=16	42.85	3	Tobramycin
0.25	57.14	4	-	-	-	<= 8,4	42.85	3	Levofloxacin
>=0.25	57.14	4	1	28.5 7	2	2	14.28	1	Moxifloxacin
>=0.25	14.28	1	-	-	-	<=8	85.71	6	Erythromycin
>=0.25	42.85	3	-	-	-	(2)<=8 (2)>=0.25*	57.14	4	Clindamycin
(2)1 (5)2	100	7	-	-	-	-	-	-	Linezolid
(3)>=0.5 (2)4 (1)8	85.71	6	16	14.2 8	1	-	-	-	Teicoplanin
(4)1 (1)2 (2)>=0.5	100	7	-	-	-	-	-	-	Vancomycin
(3)2 (2)>=1	71.42	5	-	-	-	<=16	28.57	2	Tetracycline
(3)0.25 (2)0.5 (2)>=0.12	100	7	-	-	-	-	-	-	Tigecycline
>=16	100	7	-	-	-	-	-	-	Nitrofurantion
>=0.5	42.85	3	-	-	-	(3)<=32 (1)8	57.14	4	Fusidic Acid
(2)>=0.5 (1)>=10	42.85	3	-	-	-	(3)<=32 (1) 16	57.14	4	Rifampicin
>=10	85.71	6	-	-	-	<=320	14.28	1	Trimethoprim/ Sulphonamides

\*نتيجة الفحص غير مطابقة

اما بكتيريا *S.aureus* كما في الجدول (4-4) فقد اظهرت عزلتان مقاومتها اتجاه المضاد الحيوي Benzylpenicillin وبتركيز اكبر او يساوي 0.5 ملغرام/مل، واطهرت عذلة واحدة مقاومتها للمضاد Oxacillin وبتركيز أكبر أو يساوي 4 ملغرام/مل، وعزلتين مقاومة للمضاد Erythromycin وبتركيز أكبر أو يساوي 8 ملغرام/مل وابدت عذلة واحدة مقاومتها للمضاد Clindamycin وبتركيز اقل او يساوي 0.25 ملغرام/مل. ولم تظهر كل من العزلتين اي مقاومة اتجاه كل من المضادات Gentamicin و Tobramycin و Levofloxacin و Moxifloxacin

Tigecycline و Tetracycline و Vancomycin و Teicoplanin و Linezolid و Nitrofurantion و Fusidic Acid و Rifampicin و Sulfamethoxazole / Trimethoprim.

جدول (4-4): حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* للمضادات الحيوية باستعمال التركيز المثبط الأدنى (MIC).

الحساسية (S)			المتوسطة (I)			المقاومة (R)			اسم المضاد الحيوي
MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	
-	-	-	-	-	-	≤0.5	100	2	Benzylpenicillin
≥0.25	50	1	-	-	-	≤4	50	1	Oxacillin
≥0.5	100	2	-	-	-	-	-	-	Gentamicin
≥1	100	2	-	-	-	-	-	-	Tobramycin
0.25, ≥0.12	100	2	-	-	-	-	-	-	Levofloxacin
≥0.25	100	2	-	-	-	-	-	-	Moxifloxacin
-	-	-	-	-	-	≤8	100	2	Erythromycin
≥0.25	50	1	-	-	-	≥0.25*	50	1	Clindamycin
2	100	2	-	-	-	-	-	-	Linezolid
≥0.5	100	2	-	-	-	-	-	-	Teicoplanin
1, ≥0.5	100	2	-	-	-	-	-	-	Vancomycin
≥1	100	2	-	-	-	-	-	-	Tetracycline
≥0.12	100	2	-	-	-	-	-	-	Tigecycline
32, ≥16	100	2	-	-	-	-	-	-	Nitrofurantion
≥0.5	100	2	-	-	-	-	-	-	Fusidic Acid
≥0.5	100	2	-	-	-	-	-	-	Rifampicin
≥10	100	2	-	-	-	-	-	-	Trimethoprim/ Sulphonamides

\* نتيجة الفحص غير مطابقة

اما عزلات بكتيريا *S. haemolyticus* كما في الجدول (4-5) التي بلغت عزلتين أظهرت مقاومتها اتجاه المضاد الحيوي Benzylpenicillin وبتركيز اكبر او يساوي 0.5 ملغرام/مل، وعزلتين مقاومة للمضاد Oxacillin وبتركيز اكبر او يساوي 4 ملغرام/مل، وعزلة واحدة مقاومة للمضاد Gentamicin وبتركيز اكبر او يساوي 16 ملغرام/مل، وعزلة واحدة مقاومة للمضاد Levofloxacin وبتركيز اكبر او يساوي 8 ملغرام/مل، وعزلة واحدة مقاومة للمضاد Moxifloxacin وبتركيز 2 ملغرام/مل، وعزلة واحدة مقاومة للمضاد Erythromycin وبتركيز اكبر او يساوي 8 ملغرام/مل، وعزلة واحدة مقاومة للمضاد Clindamycin وبتركيز اقل او

يساوي 0.25 ملغرام/ مل، وعزلة واحدة مقاومة للمضاد Tetracycline وبتركيز اكبر او يساوي 16 ملغرام/مل، وعزلتين مقاومة للمضاد Fusidic Acid وبتركيز 16 ملغرام/مل، وعزلة واحدة مقاومة للمضاد Rifampicin وبتركيز اكبر او يساوي 32 ملغرام/ مل، وعزلة واحدة مقاومة للمضاد Sulfamethoxazole Trimethoprim/ وبتركيز اكبر او يساوي 320 ملغرام / مل. ولم تظهر اي من العزلتين مقاومتها لكل من المضادات Tobramycin و Linezolid و Teicoplanin و Vancomycin و Nitrofurantion.

جدول (4-5): حساسية عزلات بكتريا *S. haemolyticus*\*\* للمضادات الحيوية باستعمال التركيز المثبط الأدنى (MIC).

(S) الحساسية			(I) المتوسطة			(R) المقاومة			اسم المضاد الحيوي
MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	
-	-	-	-	-	-	<=0.5	100	2	Benzylpenicillin
-	-	-	-	-	-	<=4	100	2	Oxacillin
1	50	1	-	-	-	<=16	50	1	Gentamicin
>=1	50	1	8	50	1	-	-	-	Tobramycin
>=0.12	50	1	-	-	-	<=8	50	1	Levofloxacin
>=0.25	50	1	-	-	-	2	50	1	Moxifloxacin
0.5	50	1	-	-	-	<=8	50	1	Erythromycin
>=0.25	50	1	-	-	-	>=0.25	50	1	Clindamycin
2	100	2	-	-	-	-	-	-	Linezolid
4	100	2	-	-	-	-	-	-	Teicoplanin
,1 >=0.5	100	2	-	-	-	-	-	-	Vancomycin
>=1	50	1	-	-	-	<=16	50	1	Tetracycline
>=0.12	50	1	-	-	-	-	-	-	Tigecycline*
>=16	100	2	-	-	-	-	-	-	Nitrofurantion
-	-	-	-	-	-	16	100	2	Fusidic Acid
>=0.5	50	1	-	-	-	<=32	50	1	Rifampicin
>=10	50	1	-	-	-	<=320	50	1	Trimethoprim/ Sulphonamides

\* نتيجة الفحص غير مطابقة

\*\* نتيجة الفحص لعزلتين

في حين أظهرت النتائج في جدول (4-6) عزلتان من بكتيريا *S.hominis* مقاومة اتجاه

المضاد الحيوي Benzylpenicillin وبتركيز اكبر او يساوي 0.5 ملغرام / مل، والمضاد

Oxacillin وبتركيز اقل او يساوي 0.25 ملغرام / مل وبتركيز اكبر او يساوي 4 ملغرام/ مل،  
 والمضاد Erythromycin وبتركيز اكبر او يساوي 8 ملغرام/ مل، والمضاد Fusidic Acid  
 وبتركيز 16,8 ملغرام/ مل، وعزلة واحدة مقاومة للمضاد Sulfamethoxazole  
 Trimethoprim/ وبتركيز اكبر او يساوي 320 ملغرام/ مل، في حين لم تظهر اي من العزلتين  
 اي مقاومة لكل من المضادات Gentamicin و Tobramycin و Levofloxacin  
 و Moxifloxacin و Clindamycin و Linezolid و Teicoplanin و Vancomycin  
 و Tetracycline و Tigecycline و Nitrofurantion و Rifampicin.

جدول (4-6): حساسية عزلات بكتريا *S. hominis*\* للمضادات الحيوية باستعمال تركيز مثبط  
 الادنى (MIC).

(S) الحساسية			(I) المتوسطة			(R) المقاومة			اسم المضاد الحيوي
MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	
-	-	-	-	-	-	<=0.5	100	2	Benzylpenicillin
-	-	-	-	-	-	<=4 >=0.25	100	2	Oxacillin
>=0.5	100	2	-	-	-	-	-	-	Gentamicin
>=1	100	2	-	-	-	-	-	-	Tobramycin
,0.25 >=0.12	100	2	-	-	-	-	-	-	Levofloxacin
>=0.25	100	2	-	-	-	-	-	-	Moxifloxacin
-	-	-	-	-	-	<=8	100	2	Erythromycin
>=0.25	100	2	-	-	-	-	-	-	Clindamycin
2	100	2	-	-	-	-	-	-	Linezolid
4	100	2	-	-	-	-	-	-	Teicoplanin
>=0.5	100	2	-	-	-	-	-	-	Vancomycin
>=1	100	2	-	-	-	-	-	-	Tetracycline
>=0.12	100	2	-	-	-	-	-	-	Tigecycline
>=16	100	2	-	-	-	-	-	-	Nitrofurantion
-	-	-	-	-	-	8,16	100	2	Fusidic Acid
>=0.5	100	2	-	-	-	-	-	-	Rifampicin
>=10	50	1	-	-	-	<=320	50	1	Trimethoprim/ Sulphonamides

\* نتيجة الفحص لعزلتين

في حين اظهرت عزلة بكتيريا *S.warneri* مقاومتها اتجاه المضاد Benzylpenicillin  
 وبتركيز اكبر او يساوي 0.5 ملغرام/مل، وللمضاد Erythromycin وبتركيز اكبر أو يساوي 8  
 ملغرام/مل، والمضاد Tetracycline وبتركيز اكبر او يساوي 16 ملغرام/ مل والمضاد Fusidic

Acid وبتركيز 16 ملغرام/مل، والمضاد Trimethoprim/ Sulfamethoxazole وبتركيز اكبر او يساوي 320 ملغرام / مل.

ولم تظهر هذه العزلة مقاومة تذكر للمضادات Oxacillin و Gentamicin و Tobramycin و Levofloxacin و Moxifloxacin و Clindamycin و Linezolid و Teicoplanin و Vancomycin و Tigecycline و Nitrofurantion و Rifampicin (جدول 7-4).

جدول (7-4): حساسية عزلات بكتريا *S. warneri* للمضادات الحيوية باستعمال التركيز المثبط الأدنى (MIC).

(S) الحساسية			(I) المتوسطة			(R) المقاومة			اسم المضاد الحيوي
MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	MIC- µg/ml	النسبة %	العدد	
-	-	-	-	-	-	≤0.5	100	1	Benzylpenicillin
≥0.25	100	1	-	-	-	-	-	-	Oxacillin
≥0.5	100	1	-	-	-	-	-	-	Gentamicin
≥1	100	1	-	-	-	-	-	-	Tobramycin
≥0.12	100	1	-	-	-	-	-	-	Levofloxacin
≥0.25	100	1	-	-	-	-	-	-	Moxifloxacin
-	-	-	-	-	-	≤8	100	1	Erythromycin
≥0.25	100	1	-	-	-	-	-	-	Clindamycin
2	100	1	-	-	-	-	-	-	Linezolid
2	100	1	-	-	-	-	-	-	Teicoplanin
≥0.5	100	1	-	-	-	-	-	-	Vancomycin
-	-	-	-	-	-	≤16	100	1	Tetracycline
0.25	100	1	-	-	-	-	-	-	Tigecycline
≥16	100	1	-	-	-	-	-	-	Nitrofurantion
-	-	-	-	-	-	16	100	1	Fusidic Acid
≥0.5	100	1	-	-	-	-	-	-	Rifampicin
-	-	-	-	-	-	≤320	100	1	Trimethoprim/ Sulphonamides

اظهرت دراسة (Abdulkader et al. (2017) ان جميع العزلات البكتيرية مقاومة بنسبة 100% لمجموعة البنسلينات ومنها Penicillin والمضاد Benzylpenicillin وهذا ما اتفقت مع نتائج الدراسة الحالية اذ كانت مقاومة بكتيريا *S.aureus* وبكتيريا (CoNS) بنسبة 100%، واكدت الدراسة نفسها مقاومة البكتيريا *S. aureus* و CoNS بنسبة 50% و 60%

للمضاد Gentamicin على التوالي الذي يعود لمجموعة Aminoglycoside، وبنسبة 16.7 % و 40% للمضاد Vancomycin الذي يعود الى مجموعة Glycopeptides على التوالي، اما الدراسة الحالية بينت ان نسبة المقاومة للمضاد Gentamicin و Vancomycin كانت 28.57% و 0% على التوالي. في حين اظهرت دراسة (Jiang *et al.* (2017) ان مقاومة بكتيريا *S. epidermidis* و *S. haemolyticus* و *S. aureus* و *S. hominis* للمضاد الحيوي Gentamicin قد بلغت 32.2% و 50% و 0% و 0% على التوالي، اما الدراسة الحالية فقد بلغت 42.85% و 50% و 0% و 0% على التوالي، وللمضاد Vancomycin فقد بلغت نسبة مقاومة العزلات البكتيرية 0%، وهذا يتوافق مع الدراسة الحالية اذ بلغت نسبة مقاومة 0% (100% حساسة).

كما اظهرت دراسة (Abdulkader *et al.* (2017) ان مقاومة بكتيريا *S. aureus* و CoNS بلغت 16.7% و 40% للمضاد Levofloxacin على التوالي، والذي يعود الى مجموعة Fluoroquinolones. في حين اشار (Jiang *et al.* (2017) ان نسبة مقاومة عزلات بكتيريا *S. epidermidis* و *S. haemolyticus* و *S. aureus* و *S. hominis*، للمضاد Levofloxacin كانت 44.6% و 87.5% و 0% و 40% على التوالي، مشيراً الى ان المقاومة باستعمال طريقة انتشار القرص للمضادات Rifampicin و Linezolid في بكتريا *S. epidermidis* كانت 0% لكلا المضادين. اما الدراسة الحالية فان نسبة المقاومة بلغت 42.9% و 50% و 0% و 0% للعزلات البكتيرية أعلاه مع المضاد Levofloxacin على التوالي، وان نسبة المقاومة بلغت 0% للمضاد Linezolid لجميع عزلات الدراسة.

اما المضاد Moxifloxacin فكانت نسبة مقاومة عزلات بكتيريا *S. epidermidis* و *S. haemolyticus* و *S. aureus* و *S. hominis* هي 55.6% و 75% و 0% و 40% على

التوالي (Jiang *et al.*, 2017)، اما الدراسة الحالية بلغت 14.3% و 50% و 0% و 0% على التوالي.

اما المضاد Clidamycin فقد بلغت مقاومة عزلات بكتيريا *S.epidermidis* و *S.haemolyticus* و *S.aureus* و *S.hominis* 38.9% و 62.5% و 80% و 60% على التوالي (Jiang *et al.*, 2017)، في حين بينت الدراسة الحالية ان نسبة مقاومته للمضاد نفسه كانت 57.2% و 50% و 50% و 0% على التوالي. مشيراً ايضاً ان المضاد الحيوي Erythromycin كانت مقاومة عزلات بكتيريا *S. aureus* و *S. epidermidis* هي 94.4% و 80% على التوالي في حين كانت مقاومة بكتريا *S. haemolyticus* و *S. hominis* هي 100% على التوالي، في حين بينت الدراسة الحالية مقاومتها للمضاد نفسه كانت 85.7% و 100% و 50% و 100% على التوالي.

اما المضاد Tetracycline فكانت مقاومة عزلات بكتيريا *S.epidermidis* و *S.haemolyticus* و *S.aureus* و *S.hominis* اذ تبلغ 66.7% و 50% و 80% و 40% على التوالي. في حين بينت الدراسة الحالية مقاومتها للمضاد نفسه كانت 28.58% و 50% و 0% و 0% على التوالي.

اوضح (Campoccia *et al.* (2010) ان بكتيريا *S. warneri* كانت حساسة للمضاد الحيوي Gentamicin و Erythromycin و Clidamycin و Vancomycin بنسبة 100%، وهي نسبة حساسية عزلات الدراسة الحالية نفسها. اشار (Widerström *et al.* (2012) الى ان التباين في العزلات البكتيرية Staphylococci السريرية هو مقاومتها للمضادات الحيوية ولاسيما *S.aureus*، بينت النتائج للدراسة الحالية بان جميع العزلات البكتيرية *Staphylococcus spp.* مقاومة للمضاد الحيوي Benzylpenicillin وغالبا ما يكون مقاوم للمضاد Oxacillin وهما من مضادات البنسلينات التي تعود الى مجموعة  $\beta$ -lactam ويعود ذلك الى انتاجها انزيمات البيتا



لاكتاميز  $\beta$ -lactamase، وهذا ما ذكره (Foster (2017) ان بكتريا *S.aureus* لها القدرة على انتاج انزيمات  $\beta$ -lactamase الذي يحلل اواصر  $\beta$ -lactam وبذلك يحطم فعالية المضاد الحيوي. اما مقاومة العزلات للمضادين Tobramycin وGentamicin اللذين يعودان الى مجموعة Aminoglycoside وهي من مجاميع المضادات التي تستهدف الريبوسوم البكتيري فيكون من خلال احداث خطأ في نسق القراءة خلال عملية الترجمة (Foster, 2017)، كما اشار Jensen and Lyon (2009) ان مقاومة بكتيريا *S.aureus* الى مجموعة Aminoglycoside تعود الى امتلاكها انزيمات التي تشفر بواسطة عناصر جينية متحركة Mobile genetic elements.

اوضحت نتائج الدراسة الحالية بان بعض عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* مقاومة لكل من المضادين Levofloxacin وMoxifloxacin اللذين ينتميان الى مجموعة Fluoroquinolones التي تشترك في احداث تغيير جيني لانزيم Topoisomerase وكذلك زيادة التعبير عن مضخة الدفع Efflux pump الداخلية (Hooper, 2002) (Foster, 2017; Hooper and Jacoby, 2015).

كما بينت الدراسة الحالية بان العزلات البكتيرية كانت مقاومة للمضادين الحيويين Clindamycin وErythromycin واللذان يعودان الى مجموعة Macrolides، اشار Wilson (2009; 2014) بان مجموعة Macrolides تعمل كحاجز يعيق تخليق جزيئات Polypeptide خلال عملية الترجمة ومقاومة البكتريا الى مجموعة Macrolides تعود الى احداث طفرة في موقع الريبوسوم الصغير 23S rRNA او البروتين الريبوسومي (Fyfe et al., 2016).

اما مقاومة بعض بكتريا *Staphylococcus spp.* لمضاد Tetracycline فتعود الى ان التتراسايكلينات ترتبط مع الوحدة الصغيرة 30S للريبوسوم القريبة من الموقع الذي يتم فيه التعرف

على الشفرة mRNA من قبل الشفرة المضادة في الامينو اسيل (aa) Amino asyl في tRNA (Nguyene *et al.*, 2014; Wilson, 2009). بينما ذكر (Speer *et al.* (1992) ان مقاومة البكتريا الى المضاد Tetracycline تعود الى احداث تغير في موقع الريبوسومات أو انتاج انزيمات تثبط فعالية التتراسايكليينات Tetracycline inactivation enzyme او تحد من وصول المضاد الى الريبوسوم.

اما المضاد الحيوي Fusidic acid فقد اظهرت بعض عزلات *Staphylococcus spp.* مقاومة للمضاد الحيوي ويعزى ذلك الى ارتباط المضاد بعامل الاستطالة Elongation factor G (EfG) وان حدوث طفرة في الجين الذي يشفر EfG، والذي يمنع المضاد من الارتباط بالهدف واحداث المقاومة (Fernandes, 2016; Nagaev *et al.*, 2001).

اما المضاد الحيوي Rifampicin فقد اظهرت بعض عزلات البكتيريا *Staphylococcus spp.* مقاومة لهذا المضاد الذي يعمل على الارتباط في موقع بيتا  $\beta$  subunit الخاص بانزيم RNA polymerase (Foster, 2017) وهذا يقود الى اذ تظهر البكتريا المقاومة لهذا المضاد احداث عدة طفرات متعاقبة على الحامض الاميني المسؤول عن ارتباط المضاد بالهدف (Russell *et al.*, 2014; Wichelhaus *et al.*, 1999). اما ظهور بعض العزلات البكتيرية المقاومة للمضاد Trimethoprim/Sulphonamides الذي يقوم بتنشيط تخليق Dihydrofolate reductase (DHFR) و Dihydropteroate synthase (DHPS) المسؤولين عن تكوين حامض الفوليك Folic acid، فيرجع سبب المقاومة الى التغير الجيني لانزيم (DHPS) (Foster, 2017; Capasso and Supuran, 2013).

اما المضاد الحيوي Vancomycin و Teicoplanin والذي كانت جميع العزلات حساسة اتجاهه، مما يجعل استعمالهما في الوقت الحالي احد الخيارات العلاجية المستعملة في علاجات حالات الاصابة ببكتريا *Staphylococcus spp.* المعزولة من مرضى السحايا.

### 3-4: المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية

#### Multi drugs resistance for antibiotic

من خلال النتائج التي تم التوصل اليها في الجدول (4-8) والذي يبين فيه انماط المقاومة لبكتيريا *Staphylococcus spp.* اذ يلاحظ وجود 4 انماط مقاومة متعددة للمضادات الحيوية لبكتيريا *S. epidermidis*، اذ كان النمط الاول وجود عزلة واحدة قاومت 10 مضادات حيوية، اما النمط الثاني فقد أظهرت احدى العزلات مقاومتها لـ 9 مضادات حيوية، اما النمط الثالث والرابع فكانت عزلتين مقاومة 7 و 5 مضادات حيوية على التوالي. كما لوحظ وجود عزلات ذات مقاومة متعددة لـ 3 مضادات في بكتريا *S. aureus*. اما بكتيريا *S. haemolyticus* فقد اظهر النمط الاول في عزلة واحدة وكانت مقاومة 11 مضاد حيوي وعزلة اخرى مقاومة لـ 3 مضادات حيوية. كما لوحظ وجود نمطين مقاومة متعددة للمضادات الحيوية لبكتيريا *S. hominis*، اذ كان النمط الاول وجود عزلة واحدة مقاومة 5 مضادات حيوية، اما النمط الثاني فكان مقاوماً للمضادات الحيوية اذ كان 4 مضادات لعزلة واحدة. واطهرت النتائج ايضاً ان عزلة واحدة لبكتيريا *S. warneri* تحمل النمط المتعدد لمقاومة بعض المضادات الحيوية والذي بلغ 5 مضادات حيوية، أظهرت النتائج وجود عزلة واحدة من *S. epidermidis* لم تظهر مقاومة متعددة للمضادات الحيوية، كما ان امتلاك بكتيريا *Staphylococcus spp.* مقاومة متعددة للمضادات الحيوية يعود الى امتلاكها عدد من الاليات ومنها التعطيل الانزيمي للادوية، تحويل المواقع المستهدفة، مضخة الدفع وتغير في نفاذية الاغشية (Foster, 2017).

جدول (4-8): انماط المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لعزلات بكتيريا *Staphylococcus* spp.\*.

النمط	نوع العزلة	عدد العزلات	المضادات الحيوية	عدد المضادات
1	<i>S.epidermidis</i> (37)	1	BPC, OX, LEV, MXF, E, CLI, TE, FuA, RIF, SXT.	10
2	<i>S.epidermidis</i> (3)	1	BPC, OX, GM, TOB, LE, E, CLI, TE, FuA.	9
3	<i>S.epidermidis</i> (19,38)	2	BPC, OX, GM, TOB, E, CLI, RIF.	7
4	<i>S.epidermidis</i> (22,30)	2	BPC, OX, E, LEV, FuA, RIF.	5
1	<i>S.aureus</i> (14,18)	2	BPC, OX, E, CLI.	3
1	<i>S.haemolyticus</i> (39)**	1	BPC, OX, GM, LEV, MXF, E, CLI, TE, FuA, RIF, SXT.	11
2	<i>S.haemolyticus</i> (36)	1	BPC, OX, FuA.	3
1	<i>S.hominis</i> (4)**	1	BPC, OX, E, FuA, SXT.	5
2	<i>S.hominis</i> (10)	1	BPC, OX, E, FuA.	4
1	<i>S.warneri</i> (20)	1	BPC, E, TE, FuA, SXT.	5

BPC = Benzylpenicillin, OX = Oxacillin, TOB = Tobramycin, LEV = Levofloxacin, MXF = moxifloxacin, E =Erythromycin, CLI = clindamycin, LZD =linezolid, GM =Gentamicin, TEC = Teicoplanin, VA = Vancomycin, TE =Tetracycline, SXT = Trimethoprim+sulfamethoxazole, FUA = Fusidic Acid, RIF = rifampicin.

\* الأنماط مقسمة حسب الأنواع البكتيرية

\*\* توجد عزلة واحدة لم يذكر لها MIC

#### 4-4: قابلية عزلات بكتيريا *Staphylococcus* spp. على تكوين الغشاء الحيوي

تباينت نتائج الدراسة الحالية في قدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي من وسط لوريا السائل كانت العزلات البكتيرية لبكتيريا *S. epidermidis* جميعها غير مكونة للغشاء الحيوي 7/7(100%)، في حين كانت 2/1 (50%) لبكتيريا *S. aureus* غير مكونة للغشاء الحيوي و2/1 (50%) ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي. وكانت 3/2 (66.67%) لبكتيريا *S.haemolyticus* غير مكونة للغشاء الحيوي و3/1 (33.33%) ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي. أما بكتيريا *S.hominis* فكانت 3/1 (33.33%) غير مكونة و3/2 (66.66%) ضعيفة التكوين، وبكتيريا *S. warneri* كانت 1/1 (100%) غير مكونة للغشاء الحيوي. كما في الجدول (4-9).

جدول (4-9): قدرة عزلات بكتيريا *Staphylococcus.spp.* على تكوين الغشاء الحيوي في

وسط Luria broth .

نوع البكتيريا	العدد الكلي	غيرمكون		ضعيف		متوسط		قوي	
		النسبة %	عدد	النسبة %	عدد	النسبة %	عدد	النسبة %	عدد
<i>S. epidermidis</i>	7	100	7	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	2	50	1	50	1	-	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	3	66.67	2	33.33	1	-	-	-	-
<i>S.hominis</i>	3	33.33	1	66.66	2	-	-	-	-
<i>S. warneri</i>	1	100	1	-	-	-	-	-	-

اما عند تنمية العزلات على وسط التريبتون الصويا السائل (TSB) الحاوي 0.25% سكر الكلوكوز فقد بينت نتائج الدراسة الحالية قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm، اذ ان العزلات البكتيرية لبكتيريا *S.epidermidis* كانت 7/1 (14.29%) غير مكونة و 7/6 (85.71%) ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي، وبكتريا *S. aureus* و *S.hominis* فكانت 2/2 (100%) و 3/3 (100%) ضعيفة التكوين على التوالي.

اما بكتيريا *S. haemolyticus* فكانت 3/1 (33.33%) غير مكونة للغشاء الحيوي و 3/2 (66.67%) كانت ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي، وبالنسبة لبكتيريا *S. warneri* كانت 1/1 (100%) غير مكونة للغشاء الحيوي، كما في الجدول (4-10).

جدول (4-10): قدرة عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* على تكوين الغشاء الحيوي في

وسط TSB الحاوي 0.25% كلوكوز.

نوع البكتيريا	العدد الكلي	غيرمكون		ضعيف		متوسط		قوي	
		النسبة %	عدد	النسبة %	عدد	النسبة %	عدد	النسبة %	عدد
<i>S. epidermidis</i>	7	14.29	1	85.71	6	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	2	-	-	100	2	-	-	-	-
<i>S.haemolyticus</i>	3	33.33	1	66.67	2	-	-	-	-
<i>S.hominis</i>	3	-	-	100	3	-	-	-	-
<i>S. warneri</i>	1	100	1	-	-	-	-	-	-

كما اظهرت نتائج قدرة العزلات البكتيرية في وسط لوريا السائل فكانت 16/12 (75%) غير مكونة للغشاء الحيوي و 16/4 (25%) ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي. في حين ان نسبة بكتيريا *Staphylococcus spp.* غير المكونة للغشاء الحيوي كانت 16/3 (18.75%) وضعيفة التكوين للغشاء الحيوي كانت 16/13 (81.25%) في وسط TSB الحاوي 0.25% سكر الكلوكوز. كما ان تكوين الغشاء الحيوي باستعمال وسط TSB الحاوي 2% سكر الكلوكوز فقد كانت جميع عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي وبنسبة 100% كما في الجدول (4-11).

جدول (4-11) قدرة عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* على تكوين الغشاء الحيوي في وسط TSB الحاوي على 2% كلوكوز.

نوع البكتيريا	العدد الكلي	غيرمكون		ضعيف		متوسط		قوي	
		النسبة %	عدد	النسبة %	عدد	النسبة %	عدد	النسبة %	عدد
<i>S. epidermidis</i>	7	-	-	100	7	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	2	-	-	100	2	-	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	3	-	-	100	3	-	-	-	-
<i>S. hominis</i>	3	-	-	100	3	-	-	-	-
<i>S. warneri</i>	1	-	-	100	1	-	-	-	-

اشار Felipe *et al.* (2017) في دراسته ان نسبة تكوين الغشاء الحيوي في بكتيريا *S. aureus* بلغت 35% قوية و 45% متوسطة في حين كانت عزلات بكتيريا السالبة لاختبار تخثر البلازما CoNS بنسبة 51% و 29% قوية ومتوسطة التكوين على التوالي. اظهرت دراسة (2018) Manandhar *et al.* بان قدرة بكتيريا *Staphylococcus spp.* على تكوين الغشاء الحيوي بلغت 5.6% قوية و 24.3% متوسطة و 70.1% ضعيفة او غير مكونة للغشاء الحيوي، وفي الدراسة نفسها بينت نسبة تكوين الغشاء الحيوي باستعمال وسط TSB كانت 2.5% لبكتيريا *S. aureus* و 7.9% لبكتيريا CoNS قوية على التوالي، في حين ازداد تكوين

الغشاء الحيوي في وسط TSB الحاوي 1% سكر الكلوكوز بنسبة 19% لبكتيريا *S.aureus* و16.4% لبكتيريا CoNS.

أظهرت دراسة (Arciola *et al.* (2001) بان وجود جين *icaA* له دور مهم في ضراوة البكتيريا ولاسيما بكتيريا *Staphylococcus* المعزولة من عينات سريرية اذ يؤدي الى انتاج مادة Slime التي تعمل على تكوين الغشاء الحيوي على اسطح الادوات الطبية، وهذا ما أشار اليه (Dobinsky *et al.* (2003) في ان اختلاف تكوين الغشاء الحيوي يعود لعدة عوامل منها نوع السلالة البكتيرية، اوبيرون *icaADBC* والتعبير عن الانزيمات التي تشفر لسكريات الالتصاق بين الخلية PIA والتي تعتمد على الظروف البيئية.

أظهرت دراسات تبين ارتباط وجود جين *icaA* بتكوين الغشاء الحيوي في العزلات السريرية لبكتيريا *Staphylococcus* (O'Gara, 2007; Olivera and Cunha, 2010). في حين اشار Kim (2008) الى امتلاك بكتيريا *S.aureus* جين *ica* بنسبة 100% وفي الوقت ذاته كانت جميع العزلات التي تمتلك جين *ica* غير قادرة على تكوين الغشاء الحيوي مشيراً الى ان ذلك يعود الى ان بكتيريا *Staphylococcus* تعد من الكائنات التي لها القابلية على التكيف مع الظروف والقدرة على تغيير الخصائص المظهرية والجينية بشكل اكبر لاسيما عند تعرضها الى تراكيز من المضادات الحيوية.

في حين اشار (Khodaparasts *et al.* (2016) ان تكوين الغشاء الحيوي من قبل بكتيريا *S.epidermidis* يعود الى امتلاكها بروتين (SesC) *S. epidermidis* Surface protein C، بينما اشار (Qi *et al.* (2018) الى ان تكوين الغشاء الحيوي لبكتيريا *S.epidermidis* يعود الى امتلاكها جين *icaA* وارتفاع نسبته في العزلات التي تمتلك جين *S.epidermidis* Surface protein I (sesI) الذي يعد احد عوامل ضراوتها، مشيراً الى ان دراسات عديدة تبين عدم امتلاك بكتيريا *S.epidermidis* المعزولة من اشخاص اصحاء لبروتين

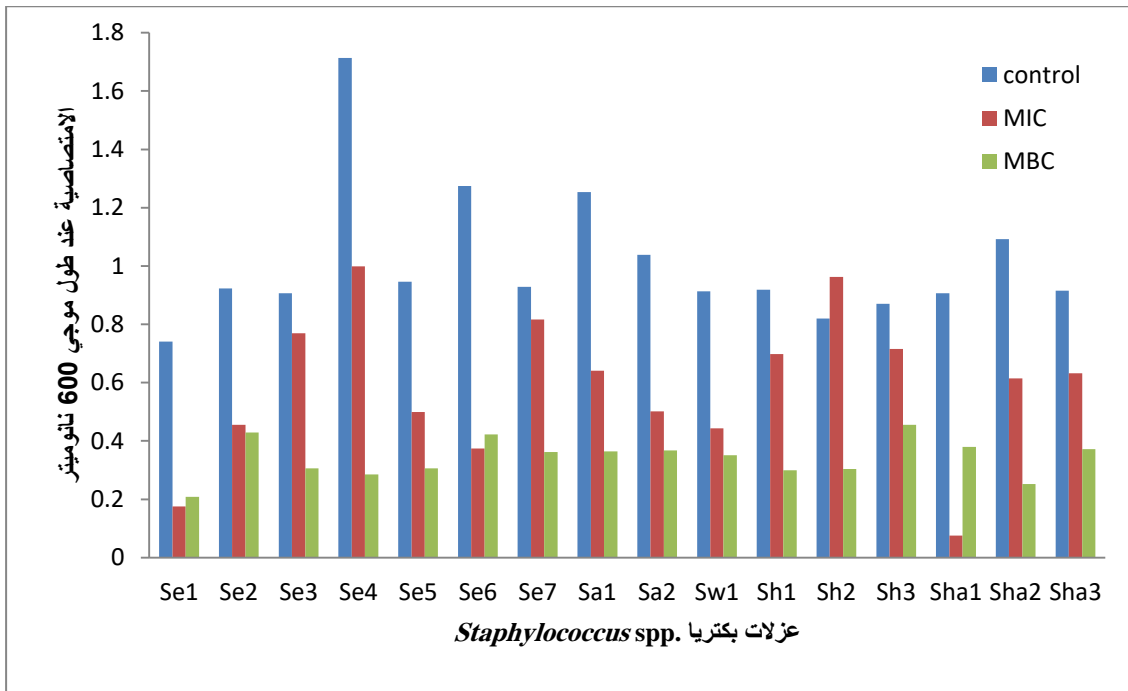
SesI مما يجعلها غير مكونة للغشاء الحيوي، وان قابلية تكوين الغشاء الحيوي في بكتيريا *S. epidermidis* لا يختلف كثيرا عند تتميتها على وسط TSB او TSB الحاوي 1% كلوكوز.

#### 5-4: مقاومة عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* المكونة للغشاء الحيوي

##### للمضاد Erythromycin

عند دراسة تاثير المثبط الادنى للمضاد الحيوي Erythromycin وبتركيز (8) مايكروغرام/مل ضد تكوين الغشاء الحيوي لعزلات بكتريا *Staphylococcus spp.* قيد الدراسة، أوضحت النتائج ان المضاد Erythromycin اظهر تأثيراً تثبيطياً في تكوين الغشاء الحيوي، وفي هذه اشارة الى ان الغشاء الحيوي كان حساساً للمضاد الحيوي بنسب تختلف حسب النوع البكتيري والسلالة وقد يعود هذا التثبيط الى ان تكوين الغشاء الحيوي كان ضعيفاً وحسب ماهو مبين في شكل (3-4)، فيما ابدى التأثير القاتل الادنى للمضاد Erythromycin وبتركيز (16) مايكروغرام/ مل ارتفاعاً في نسبة التثبيط وهذا قد يعود الى ارتفاع تراكيز المضاد (Cucarella et al., 2004)، فضلاً عن ضعف تكوين الغشاء الحيوي من قبل بكتريا *Staphylococcus spp.*، كما تبين النتائج ان نسبة التثبيط في التركيز المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى لم تصل الى حدود دنيا وهذا يعود الى قابلية الغشاء الحيوي في حماية الخلايا البكتيرية للمضادات الحيوية (شكل 3-4)، وقد أوضحت النتائج ان نسب التثبيط (اعتماداً على الامتصاصية) تختلف حسب الأنواع والسلالات وهذا قد يعود الى مقاومتها للمضادات الحيوية (He et al., 2014)، وامتلاكها او عدم امتلاكها جينات مسؤولة عن تكوين الغشاء الحيوي فضلاً عن البروتينات السطحية التي تمتلكها أنواع بكتريا *Staphylococcus spp.* والمسؤولة عن تكوين الغشاء الحيوي.





شكل (3-4): مقاومة عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* المكونة للغشاء الحيوي للمضاد

### Erythromycin

Se= *S.epidermidis*, Sa= *S.aureus*, Sh= *S.hominis*, Sha= *S.haemolyticus*, Sw= *S.warneri*, MIC= Minimum inhibition concentration, MBC= Minimum bactericidal concentration.

### 6-4: قابلية عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* على حركة الانتشار

يبين الجدول (4-12) قابلية عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* على حركة الانتشار في وسط التريبتون الصويا السائل الحاوي 0.24% من مادة الاكار، اذ بلغت حركة انتشار عذلة واحدة من بكتيريا *S.epidermidis* (16.5) ملم، وكان معدل حركة انتشار 3 عزلات (10.3) ملم، وعزلتين منها (9.2) ملم، في حين بلغت قابلية حركة انتشار عذلة واحدة (7.8) ملم. اما قابلية حركة انتشار عذلة واحدة من بكتيريا *S.aureus* تراوحت بين (8.97–16.00) ملم، بينما بلغ في العذلة الاخرى (12.4) ملم. اما بكتيريا *S.haemolyticus* فقد بلغت قابلية عذلة واحدة على حركة الانتشار (14.6) ملم، وعذلة ثانية بلغت (13.6) ملم، وعذلة ثالثة تراوحت قابلية حركة الانتشار بين (8.0 – 10.2) ملم. اما بكتيريا *S.hominis* فكانت قابلية حركة انتشار عذلة واحدة

منها تتراوح بين (14.1-16.6) ملم، وعزلة ثانية تتراوح بين (10.3-14.4) ملم، وعزلة ثالثة بلغت (10.7) ملم. اما العزلة البكتيرية *S.warneri* فقد بلغت قابلية حركة انتشارها بين (12.0-16.8) ملم.

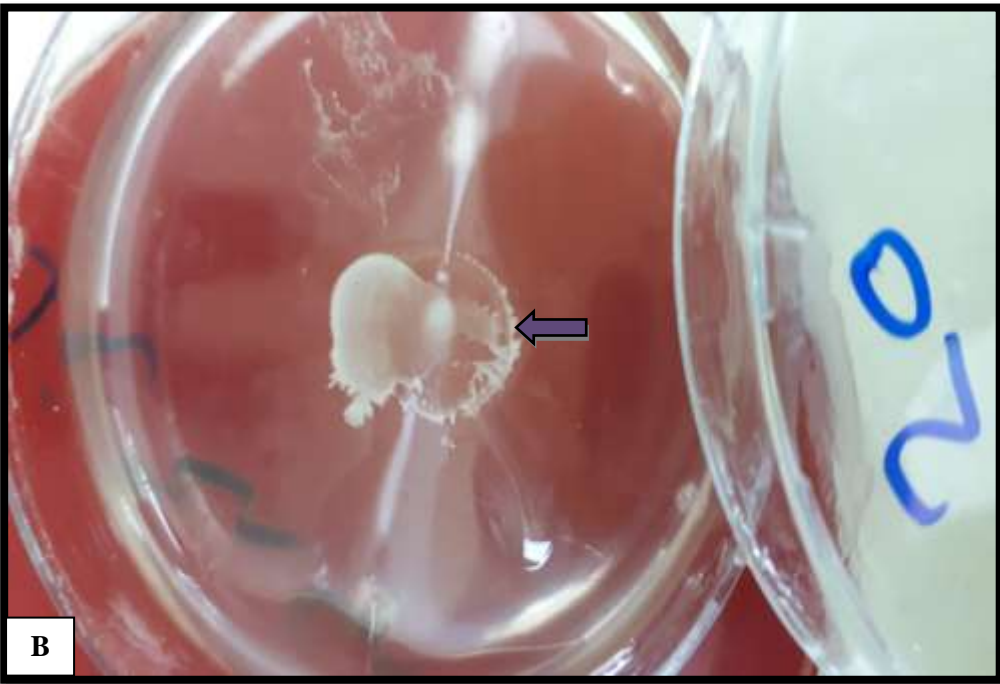
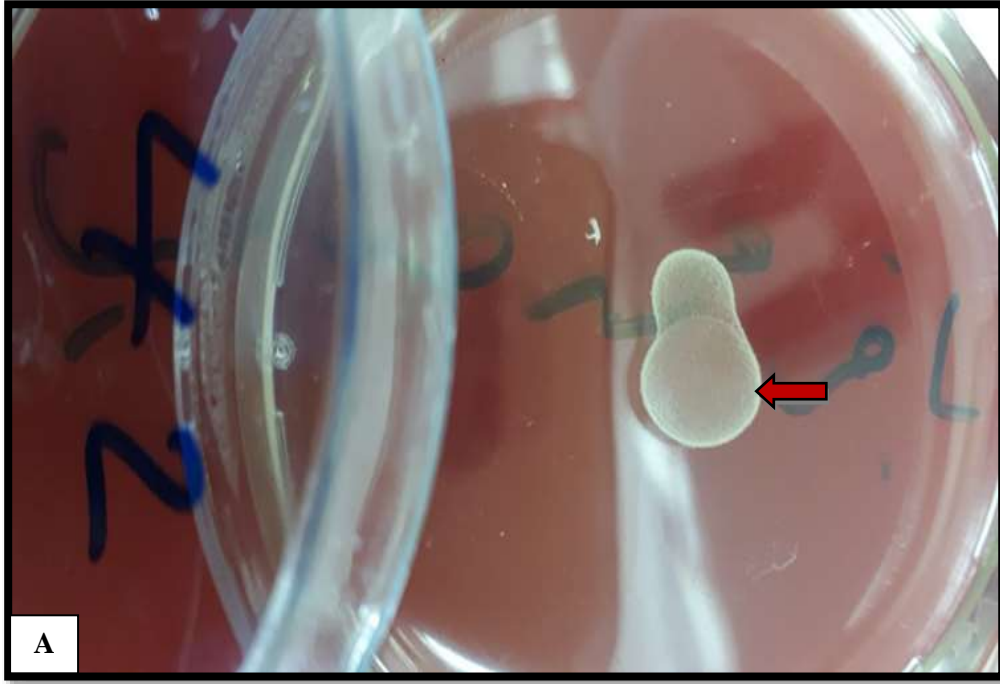
جدول (4-12): قابلية عزلات بكتريا *Staphylococcus spp.* على حركة الانتشار في وسط تربتون الصويا السائل الحاوي 0.24% من مادة الاكار.

العزلة	قطر حركة الانتشار (mm)	العزلة	قطر حركة الانتشار (mm)
<i>S.epidermidis</i> (3)	9.4, 9.3	<i>S.aureus</i> (18)	11.0, 12.4
<i>S.epidermidis</i> (7)	7.7, 7.8	<i>S.haemolyticus</i> (36)	8.0, 10.2
<i>S.epidermidis</i> (19)	10.4, 10.4	<i>S.haemolyticus</i> (39)	14.1, 14.6
<i>S.epidermidis</i> (22)	8.1, 10.0	<i>S.haemolyticus</i> (41)	13.60, 13.60
<i>S.epidermidis</i> (30)	9.30, 10.6	<i>S.hominis</i> (10)	14.1, 16.5
<i>S.epidermidis</i> (37)	15.6, 16.5	<i>S.hominis</i> (4)	10.6, 10.7
<i>S.epidermidis</i> (38)	9.5, 9.0	<i>S.hominis</i> (42)	10.3, 14.4
<i>S.aureus</i> (14)	8.97, 16.0	<i>S.warneri</i> (20)	12.0, 16.8

لوحظ من نتائج الدراسة الحالية اختلاف الانواع البكتيرية في قابليتها على حركة الانتشار، وبالرغم من ان انواع بكتريا *Staphylococcus* غير قادرة على الحركة الا انها قادرة على الحركة بالانتشار وهذا يعود الى امتلاكها او تكوينها بعض المركبات التي تساعد خلاياها على حركة الانتشار، وهذا ما اشار اليه Kaito *et al.* (2008). دور حامض التكويك Teichoic acid في انتشار مستعمرات بكتيريا *Staphylococcus*، مشيراً الى ان اختلاف سرعة مستعمرات البكتيريا على حركة الانتشار يعود الى تكيف كل سلالة على بيئة المضيف. اما Pollitt *et al.* (2015) فقد اشار الى ان حركة الانتشار ترتبط ارتباطاً وثيقاً بأدراك النصاب Quorum Sensing agr والذي يحدث بفعل حاث ذاتي يعود الى (AIP) Autoinducer peptide مثل Phenol soluble modulins الذي يعمل Biosurfactant كمستحلب يقلل من الشد السطحي (Tsompanidou *et al.*, 2011; Kaito *et al.*, 2011)، فضلاً عن امتلاكها جين *Fudoh* gene الذي يؤدي دوراً في تشييط حركة الانتشار (Kaito *et al.*, 2008).

كما لوحظ من الشكل (A4-4) اختلاف انواع حركة الانتشار باختلاف الانواع البكتيرية والسلالات للنوع الواحد وهذا يعود الى دور المستحلبات التي تعمل على زيادة اندماج الماء مما يؤدي الى توسيع المستعمرة والعمل على تشكيل مذيلات يحمل الخلايا البكتيرية باتجاه الخارج كمعلق بكتيري (Pollitt et al., 2015).

اما Lin et al. (2016) فقد اشار الى ان بكتيريا *S.aureus* يمكن ان تعطي شكل المذنب اثناء حركتها بالانتشار على وسط زرع قليل الصلابة وهذا ناتج من تكوين العديد من الطبقات Multilayer التي تؤدي الى تجمع الخلايا بشكل متراص كثيف مما يؤدي الى توليد قوة دافعة باتجاه الامام، مشيراً ايضاً الى ظهور مستعمرات بكتيريا *Staphylococcus* بشكل حافة محاطة بحلقة من المستحلب اثناء حركتها بالانتشار (شكل B4-4). اشار Omae et al. (2014) ان قابلية بكتيريا *S.aureus* على الحركة بالانتشار تزيد من زيادة مساحة استعمار خلايا المضيف، فضلاً عن دورها في امراضية البكتيريا.



شكل (4-4): حركة الانتشار لبكتيريا *Staphylococcus* spp. A: حركة المذنب ←،

B: حركة متعدد الطبقات Multilayer ←.

7-4: قابلية عزلات بكتيريا *Staphylococcus* spp. على الالتصاق

اختبرت قابلية عزلات بكتيريا *Staphylococcus* spp. على الالتصاق، بطريقتين اولهما

قابلية عزلات بكتيريا *Staphylococcus* spp. المعزولة من سائل النخاع الشوكي CSF على

الالتصاق باطباق Polystyrene واعتمدت النتيجة بعد فحص الاطباق تحت المجهر على قوة تكبير 100X. فكان اعداد الخلايا الملتصقة لكل عزلة بكتيرية على مادة Polystyrene موضعاً في الجدول (4-13).

جدول (4-13): اعداد الخلايا البكتيرية لبكتيريا *Staphylococcus spp.* الملتصقة على

#### اطباق Polystyrene.

نوع البكتيريا	معدل عدد الخلايا الملتصقة في الحقل الواحد
<i>S. epidermidis</i>	230
<i>S. aureus</i>	3
<i>S. haemolyticus</i>	<300
<i>S. hominis</i>	62
<i>S. warneri</i>	40

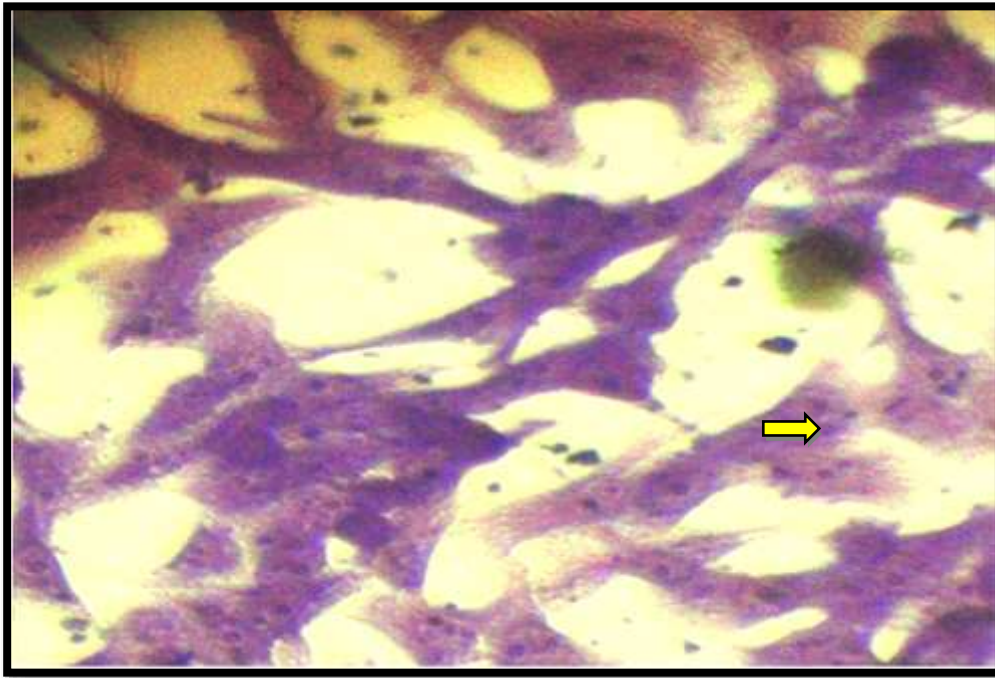
بينت نتائج الدراسة ان اعداد الخلايا الملتصقة لبكتيريا *S. epidermidis* قد بلغ 230 خلية/حقل، اما خلايا بكتيريا *S. aureus* فقد بلغ عددها 3 خلية/حقل، في حين بلغت في بكتيريا *S. haemolyticus* اكثر من 300 خلية/حقل، وفي بكتيريا *S. hominis* كان 62 خلية/حقل، واخيراً عدد الخلايا في الحقل الواحد لبكتيريا *S. warneri* بلغ 40 خلية/حقل.

اما عند اختبار قدرة العزلات البكتيرية *Staphylococcus spp.* على الالتصاق باستعمال الخلايا الطلائية. اذ زرعت الخلايا البكتيرية *Staphylococcus spp.* على خلايا طلائية معدة مسبقاً (Vero cell line)، واجريت سلسلة من التخفيف بنسبة (0) و (10:1) و (100:1) وزرعت على وسط اكار الدم وبعد الحضان تم حساب المستعمرات النامية كما في الجدول (4-14) والشكل (4-5).

جدول (4-14): اعداد الخلايا البكتيرية لبكتيريا *Staphylococcus spp.* الملتصقة باستعمال

خط الخلايا الطلائية Vero cell line.

عدد الخلايا البكتيرية لكل تخفيف			نوع البكتيريا
100:1	10:1	صفر	
9	85	300<	<i>S. epidermidis</i>
300<	300<	300<	<i>S. aureus</i>
300<	300<	300<	<i>S. haemolyticus</i>
30	120	300<	<i>S. hominis</i>
292	300<	300<	<i>S. warneri</i>



شكل (4-5) التصاق الخلايا البكتيرية *Staphylococcus spp.* على الخلايا الطلائية.

بينت نتائج الدراسة الحالية وفق زراعة التخفيف البكتيرية فكانت في بكتيريا *S. epidermidis* عند التخفيف صفر فإن عدد الخلايا الملتصقة اكثر من 300 خلية، في حين كانت 85 خلية عند تخفيف (10: 1) و 9 خلايا عند تخفيف (100:1). كان عدد الخلايا البكتيرية *S. aureus* و *S. haemolyticus* الملتصقة على الخلايا الطلائية اكثر من 300 خلية في تخفيف (صفر) و (10:1) و (100:1).

اما بكتيريا *S.hominis* فقد كان عدد الخلايا البكتيرية الملتصقة بالخلايا الطلائية اكثر من 300 خلية بكتيرية وذلك عند التخفيف صفر، اما في تخفيف (10:1) فقد بلغت 120 خلية، في حين كانت 30 خلية في تخفيف (100:1). اما عدد الخلايا البكتيرية في *S.warneri* كان أكثر من 300 خلية لكل من تخفيف (صفر) و(10:1)، في حين كان 292 خلية في تخفيف (100:1).

اشار (2015) Ghasemian *et al.* الى قابلية بكتيريا *S.aureus* و *S.epidermidis* على الالتصاق ببروتينات Fibrinogen و Fibronectin والبروتينات المتعددة التي تغطي طبقة انسجة المضيف ويعود ذلك الى امتلاكها MSCRAMMS، في حين اشار (2008) Otto الى ان قابلية الالتصاق تعود الى امتلاكها (PIA) Polysaccharide intercellular adhesin، اما (2001) Cucarella *et al.* فقد اوضح قابلية بكتيريا *S.aureus* للالتصاق على خلايا المضيف الى امتلاكها جين *bap* الخاص بتخليق البروتين المساهم بتكوين الغشاء الحيوي Biofilm associated protein الذي يكون مسؤولاً عن الالتصاق وتكوين الغشاء الحيوي، في حين اشار (2002) Cucarella *et al.* الى العزلات البكتيرية التي تمتلك جين *bap* لم تظهر قابليتها على الالتصاق بسطح الخلايا المضيف مقارنة مع العزلات البكتيرية التي لاتمتلك ذلك الجين ولايعود ذلك الى انخفاض مستوى التعبير الجيني لبروتينات MSCRAMM التي تؤدي دوراً كبيراً في عملية التصاق البكتيريا على سطح المضيف، وانما وجود بروتينات Bap تعمل على تداخلها مع MSCRAMM ويمنع عملية الالتصاق.

في حين اشار (2014) Becker *et al.* و (2015) Büttner *et al.* ان قابلية بكتيريا *S.epidermidis* على الالتصاق بخلايا المضيف يعود الى امتلاكها Serine–aspartate repeat protein (SdrG) و AtIE و Ebps و Embp.



وبين (2001) Hussain *et al.* بأن لحامض التكويك Teichoic acid دوراً في التصاق بكتيريا *S. epidermidis* بأسطح خلايا المضيف المغلفة ببروتين Fibronectin. كما اشار (2008) Otto الى انه يمكن تقليل التصاق الخلايا البكتيرية على الاسطح بتغيير من طبيعة السطح. اما (2018) Qi *et al.* فقد أشار الى ان قابلية بكتيريا *S. epidermidis* للالتصاق بخلايا المضيف تعود الى امتلاكها بروتين (*SesI*) *S. epidermidis* surface protein 1. يلاحظ من النتائج ان قابلية عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* على الالتصاق يختلف باختلاف العزلات نفسها وباختلاف الانواع فضلا عن الاختلاف حسب طبيعة السطح المستعمل بالدراسة وهذا قد يعود لعدة عوامل تعود الى امتلاك الخلية نفسها لانواع مختلفة من بروتينات التي تساعد على الالتصاق والظروف البيئية.

#### 4-8: الكشف الجزيئي لبعض الجينات في أنواع بكتيريا *Staphylococcus spp.*

استخلص DNA من عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* باستعمال عدة استخلاص DNA الجينومي Wizard Genomic DNA Purification kit المجهزة من شركة Prommega (USA)، للكشف عن الجينات (*bap*, *clfA*, *icaA*, *cna*, *eno*) في العزلات البكتيرية قيد الدراسة باستعمال طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. بعد ان اجري التفاعل التضاعفي لسلاسل DNA بحجم نهائي 5 مايكروليتر، وباستعمال البواديء Primers المتخصصة لبكتيريا *Staphylococcus spp.*، اذ استهدف التسلسل النوعي لجينات قيد الدراسة لغرض الكشف عن العزلات التي تمتلك هذه الجينات، وبعد اجراء برنامج التفاعل رحل ناتج التضاعف على الاكاروز Agarose بتركيز 1% لمدة 75 دقيقة بفرق جهد 100 فولت، وعند فحص الاكاروز تحت الاشعة فوق البنفسجية كانت النتائج كالآتي:

الكشف الجزيئي عن جين *eno* الذي يشفر الى بروتين الارتباط بطبقة Laminin (Laminin binding protein)، اذ اظهرت النتائج ان جميع العزلات تمتلك جين *eno*



وبلغ 16/16 (100%) كما في جدول (4-15)، وذلك بظهور حزمة واحدة بالمستوى نفسه لجميع العزلات البكتيرية هذا يدل على ارتباط البرايمرات Primers مع التسلسل المكمل له في شريط DNA واستعمل الدليل الحجمي Lader (100-1500) زوج قاعدة، إذ انها متساوية في الوزن الجزيئي للحزم الناتجة 302 زوج قاعدة عند مقارنتها بالدليل الحجمي كما في الشكل (4-6). اشارت دراسات عديدة الى وجود العديد من الجينات التي تشفر الى مركبات ذات علاقة بعملية الالتصاق ومنها جين *eno* الذي يعد احد عوامل ضراوة بكتيريا *Staphylococcus spp.*، وهذا ما أشار اليه (Ghasemian et al. (2015) من ان بكتيريا *S.aureus* تحمل جين *eno* بنسبة 59%. في حين اشار (Kumar et al. (2011) الى امتلاك بكتيريا *S. aureus* المعزولة من ابقار مصابة بالتهاب الضرع لجين *eno* بنسبة 100% مشيراً في الوقت نفسه الى امتلاك العزلات البكتيرية المعزولة من مصادر سريرية وغير سريرية لجين *eno* بالنسب نفسها وهذا يعود الى قابلية انتشار الجين ما بين العزلات البكتيرية.

اما جين *bap* الذي يشفر الى البروتين المشارك في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm (Bap) association protein، فقد اظهرت نتائج الدراسة الحالية عدم امتلاك اي من العزلات البكتيرية *Staphylococcus spp.* لجين *bap* كما في الجدول (3-15) وهذا ما اشار اليه (Vautor et al. (2008) ان نسبة وجود جين *bap* في العزلات البكتيرية السريرية تكون معدومة. في حين اشار (Salaberry et al. (2015) الى امتلاك بكتيريا *Staphylococcus* السالبة لفحص تخثر بلازما الدم المعزولة من ماعز مصاب بالتهاب الضرع لجين *eno* و *bap* بنسبة 73.2% و 94.8% على التوالي، وكما اشار (Cucarella et al. (2004) الى امتلاك بكتيريا *S.aureus* المعزولة من حليب الابقار المصابة بالتهاب الضرع جين *bap* بنسبة 25.6%، وان امتلاك بكتيريا *S.aureus* لجين *bap* يعمل على استعمار والتصاق البكتيريا بخلايا الغدد اللبنية للابقار فضلا عن دوره في تقليل حساسية بكتيريا *S.aureus* للمضادات الحيوية، مشيراً الى

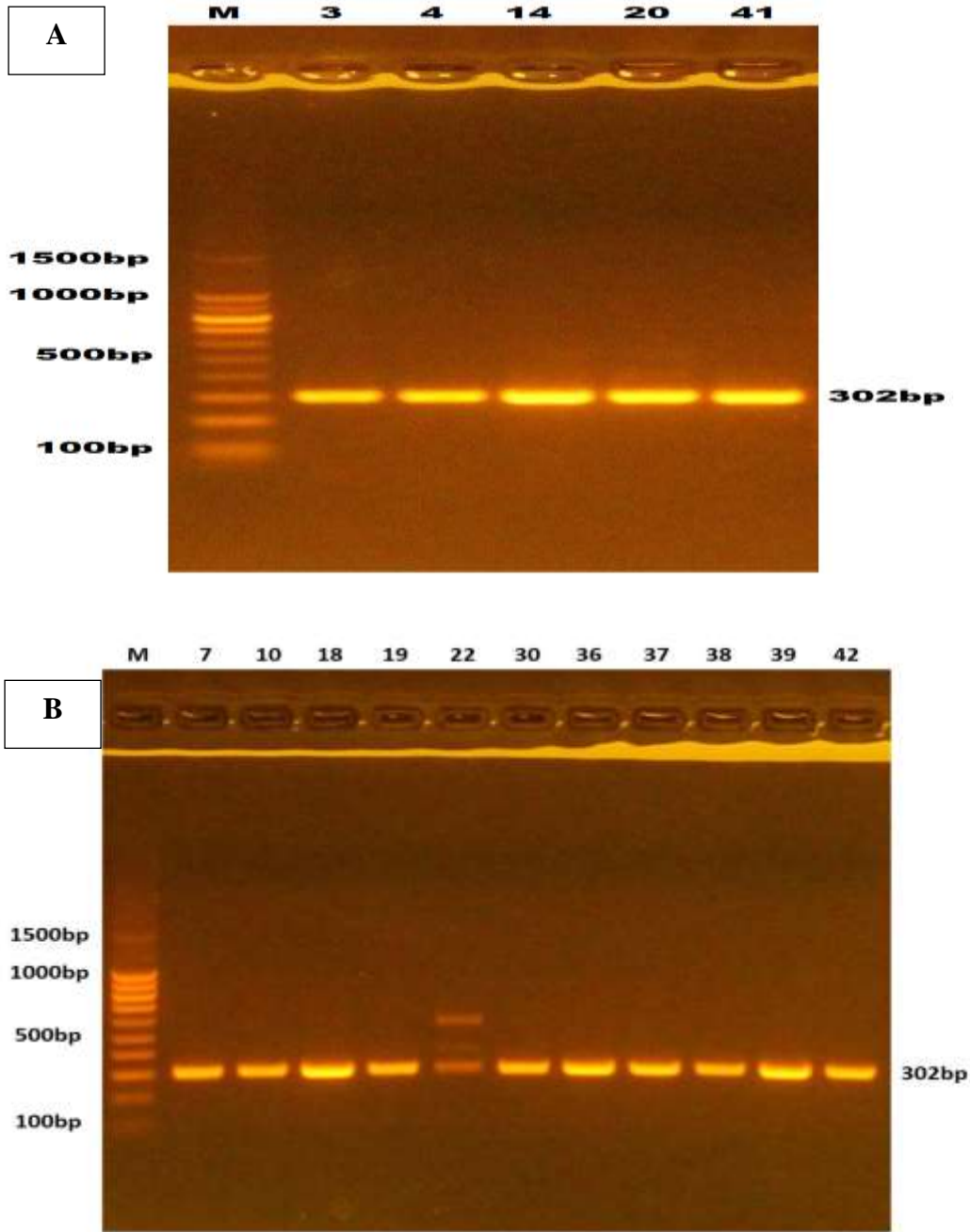
وجود اختلاف في امتلاك عزلات بكتيريا *S.aureus* المعزولة من مصادر سريرية وحيوانية عند اجراء التتميط الجيني بوساطة استعمال التباين الوراثي لاطوال قطع الانزيمات القاطعة Restriction fragment length polymorphism (RFLP) للجين *coa* الذي حدد وجود وعدم وجود جين *bap* و *icaA*. موضحاً الى قلة نسبة تواجد جين *bap* بين انواع بكتيريا *Staphylococcus* المعزولة من الابقار المصابة بالتهاب الضرع وعدم وجوده في العزلات البكتيرية المعزولة من المصادر السريرية.

في حين اشار Vautor et al. (2008) الى ان اي من عزلات بكتيريا *S.aureus* المعزولة من ابقار مصابة بالتهاب الضرع لاتملك جين *bap*، وذلك يعود الى عدم انتشار جين *bap* بين عزلات بكتيريا *S.aureus* بالرغم من امكانية حمله على العناصر القافزة فضلا عن عدم امكانية انتقال جين *bap* بين العزلات البكتيرية بالانتقال الافقي Horizontal gene transfer.

اما الشكل (4-7) يبين امتلاك بكتيريا *S. aureus* لجين *cna* الذي يشفر لبروتين ارتباط الكولاجين (Cna) Collagen binding protein ذو وزن جزيئي 423 زوج قاعدة، وجين *clfA* الذي يشفر الى عامل التلازن Clumping factor A (ClfA) A ذو وزن جزيئي 292 زوج قاعدة (Nemati et al., 2009). اظهرت النتائج امتلاك بكتيريا *S.aureus* جين *cna* اذ بلغ 2/1 (50%) وجين *clfA* بلغ 2/2 (100%) كما في الجدول (4-15)، وهذا ما اشار اليه Zuniga et al. (2015) ان نسبة تواجد جين *cna* في بكتيريا *S.aureus* كان 100% واما Ghasemian et al. (2015) فقد أشار الى ان نسبة وجود جين *cna* في بكتيريا *S.aureus* بلغ 82%. في حين اشار Kumar et al. (2011) امتلاك بكتيريا *S. aureus* المعزولة من ابقار مصابة بالتهاب الضرع لجين *cna* بنسبة 8.8%. اما دراسة Salaberry et al. (2015) اشارت الى نسبة تواجد جين *cna* في بكتيريا *Staphylococcus spp.* كان 0.8%.

جدول (4-15): النسب المئوية للجينات المتواجدة في أنواع بكتريا *Staphylococcus spp.*

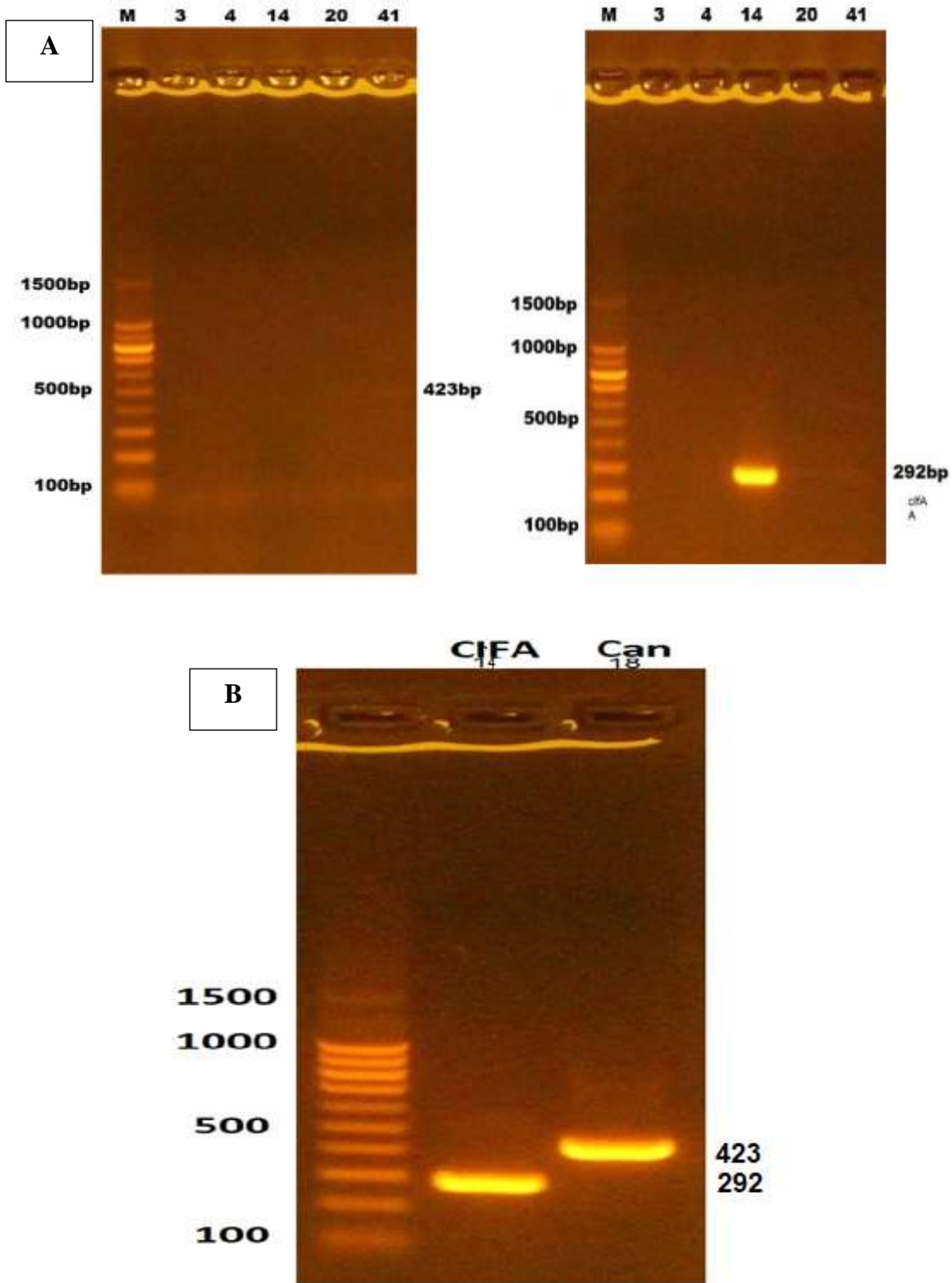
النسبة المئوية	عدد العزلات الموجبة للكشف للجين	عدد العزلات الكلي	نوع البكتيريا	الجين
100	16	16	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Eno</i>
0	0	16	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Bap</i>
50	1	2	<i>S. aureus</i>	<i>Can</i>
100	2	2	<i>S. aureus</i>	<i>clfA</i>
57.1	4	7	<i>S. epidermidis</i>	<i>ica</i>
100	2	2	<i>S. aureus</i>	
0	0	3	<i>S. hominis</i>	
0	0	3	<i>S. haemolyticus</i>	
0	0	1	<i>S. warneri</i>	



شكل (4-6): الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا *Staphylococcus* spp. باستخدام بادئ primer لجين (302 زوج قاعدة) *eno*. باستخدام هلام الاكاروز 1% و فرق جهد 100 فولت لمدة 75 دقيقة.

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة A، المسارات 3، 4، 14، 20، 41 تمثل نتائج تضخيم جين *eno* لعزلات *S.epidermidis* و *S.hominis* و *S.aures* و *S.warneri* و *S.haemolyticus* على التوالي.

B: تمثل المسارات 7، 10، 19، 22، 30، 37، 38، 39، 36، *S.haemolyticus* ، *S.epidermidis* ، *S.aureus* ، 18، *S.hominis* ، 42.

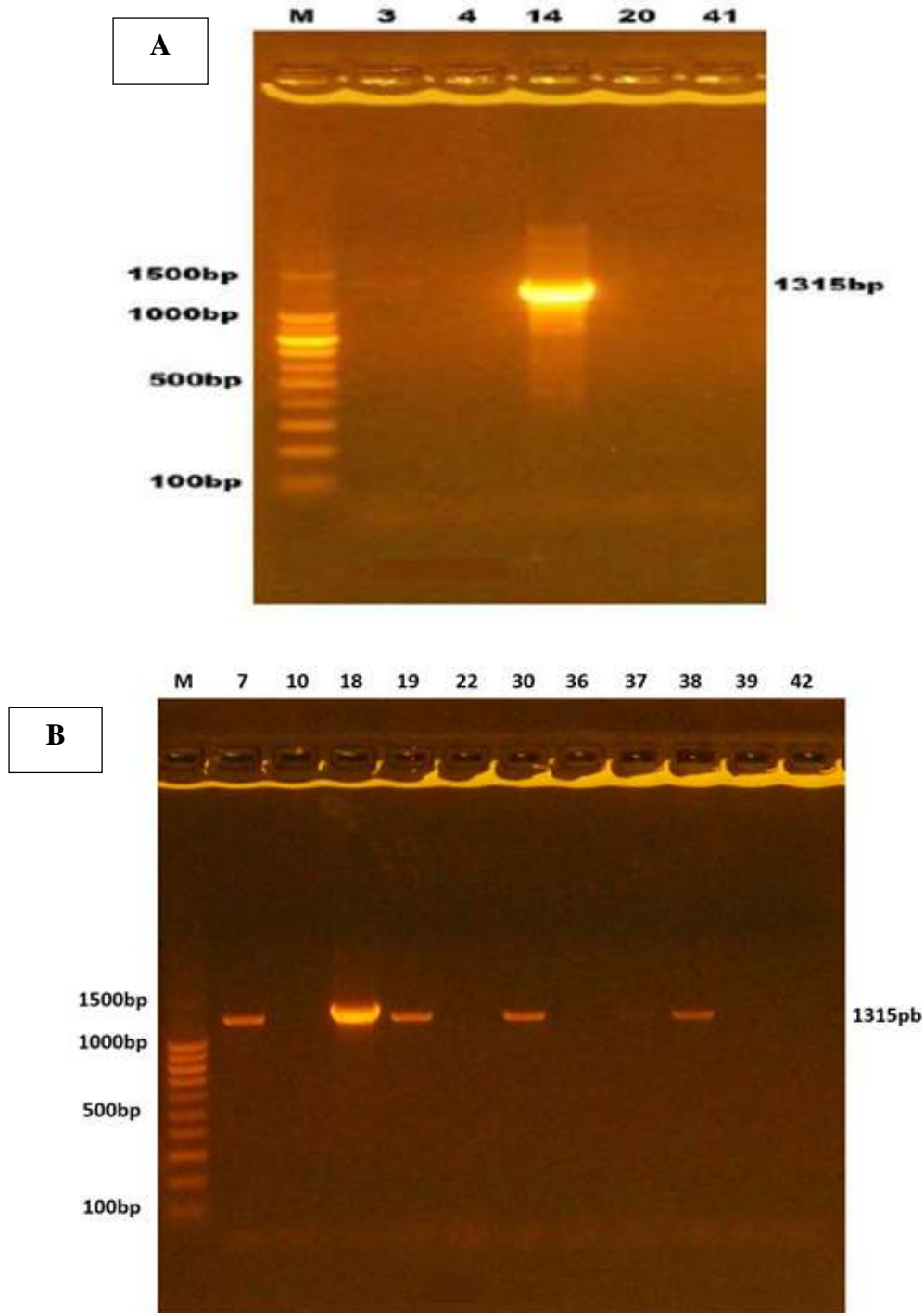


شكل (4-7): الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا *Staphylococcus aureus* باستخدام بادئ primer لجين (292 زوج قاعدة) *clfA* وجين (423 زوج قاعدة) *cna* باستخدام هلام الاكاروز 1% و فرق جهد 100 فولت لمدة 75 دقيقة. المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة, A: المسار 14 يمثل ناتج تضخيم جين *can*, B: المسار 18 يمثل ناتج تضخيم جين *clfA* بكتيريا *S.aureus*. *S.aureus*

اما جين *clfA* فقد اشارت دراسة (Nemati (2009) و (Pereyra و Ote *et al.* (2011) و (2016) *et al.* الى امتلاك بكتيريا *S.aureus* لهذا الجين بنسبة 96.6% و 100% و 90% على التوالي. في حين اشار (Kumar *et al.* (2011) امتلاك بكتيريا *S. aureus* المعزولة من ابقار مصابة بالتهاب الضرع لجين *clfA* بنسبة 93.33%، وهذا ما وجد (Ghasemian *et al.* (2015) امتلاك بكتيريا *S.aureus* لجين *clfA* بنسبة 100% مشيرا الى دوره في الالتصاق واستعمار خلايا المضيف، في حين اشار (Pereyra *et al.* (2016) الى ان وجود جين *clfA* يزيد من امراضية بكتيريا *S.aureus*.

اما الشكل (4-8) فبين الكشف الجزيئي لجين *icaA* الذي يشفر لجين الالتصاق داخل خلوي Intercellular adhesion gene A وبوزن جزيئي 1315 زوج قاعدة. اذ لوحظ من النتائج اختلاف في نسب تواجد جين *icaA* في العزلات البكتيرية المعزولة من سائل النخاع الشوكي CSF اذ نلاحظ امتلاك بكتيريا *S.aureus* جين *icaA* اذ بلغ 2/2 (100%) كما في الجدول (4-15)، وهذا ما أشار اليه (Pereyra *et al.* (2016) الى امتلاك بكتيريا *S.aureus* جين *icaA* بنسبة 95%. اظهرت الدراسة الحالية ان نسبة وجوده في بكتيريا *S.epidermidis* بلغ 7/4 (57.1%) كما في الجدول (4-15)، وهذا ما أشار اليه (Du *et al.* (2013) ان نسبة بكتيريا *S.epidermidis* التي تمتلك جين *icaA* بلغت 41.3%. و اشار (Iorio *et al.* (2011) الى امتلاك بكتيريا *S. aureus* و *S.epidermidis* جين *icaA* بنسبة (85.1%) و (33.3%) على التوالي. في حين اشار (Qi *et al.* (2018) الى امتلاك بكتيريا *S.epidermidis* جين *icaA* بنسبة 76.9%.

اما عزلات بكتيريا *S.hominis* و *S.warneri* و *S.haemolyticus* لم تظهر امتلاكها لجين *icaA* في الدراسة الحالية كما في الجدول (4-15). في حين اشار (Pinheiro (2016) في دراسته الى امتلاك بكتيريا *S.haemolyticus* الى جين *icaA* بنسبة 6%.



شكل (8-4) الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لعزلات بكتيريا *Staphylococcus aureus* باستخدام بادئ primer لجين (1315 زوج قاعدة) *icaA*. باستخدام هلام الاكاروز 1% وفرق جهد 100 فولت لمدة 75 دقيقة.

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة, A: المسار 14 يمثل ناتج تضخيم جين *icaA* لبكتيريا *S.aureus*. B: المسار 18 يمثل ناتج تضخيم جين *icaA* لبكتيريا *S.aureus*. ومسار 7، 19، 30، 38 يمثل ناتج تضخيم جين *icaA* لبكتيريا *S.epidermidis*.

أظهرت دراسة (Arciola *et al.* (2001) بان وجود جين *icaA* دور مهم في ضراوة البكتيريا لاسيما بكتيريا *Staphylococcus* المعزولة من عينات سريرية اذ يؤدي الى انتاج مادة Slime التي تعمل على تكوين الغشاء الحيوي على اسطح الادوات الطبية، في حين أشار (Pereyra *et al.* (2016) الى ان قدرة بكتيريا *S.aureus* على احداث التهاب الضرع المزمن يعود الى كمية التعبير الجيني عن بعض جينات عوامل الضراوة ومنها جين *clfA* و *icaA* والتي تختلف من سلالة الى أخرى للنوع نفسه فضلا عن مرحلة ووقت التعبير الجيني. ذكر Chokr *et al.* (2006) ان العزلات البكتيرية السالبة لتخثر بلازما الدم تمتلك جين *icaA* بنسبة 73% شملت (*S.epidermidis* و *S.hominis* و *S.warneri* بنسبة 81.5 % و 50% و 50%) على التوالي في حين كانت نسبته 100% في بكتريا *S.aureus*، مبينا في الوقت نفسه قابلية تلك العزلات على انتاج سكريات الالتصاق بين الخلوية.



الاستنتاجات والتوصيات

# Conclusions and Recommendations

## الاستنتاجات:

1. شيوع عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* في عينات سائل النخاع الشوكي CSF لمرض التهاب السحايا لاسيما غير المخثرة لبلازما الدم مثل بكتريا *S.epidermidis*، *S.haemolyticus*، *S.hominis* و *S.warneri*.
2. اظهرت عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* حساسية للمضادات الحيوية Linezolid و Teicoplanin و Vancomycin و Tigecycline و Nitrofurantion وبنسبة 100% ولجمي الأنواع قيد الدراسة.
3. تعتمد قابلية تكوين الغشاء الحيوي لبكتيريا *Staphylococcus spp.* على نوع الوسط الزراعي المستعمل.
4. لا توجد علاقة بين تكوين الغشاء الحيوي ومقاومة المضاد الحيوي Erythromycin ولاسيما في حالة تكوين الغشاء الحيوي بشكل ضعيف.
5. قابلية عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* في الالتصاق على السطوح الحية وغير الحية والحركة بالانتشار وبأقطار واشكال مختلفة تعتمد على النوع البكتيري والسلالة.
6. امتلاك عزلات بكتيريا *Staphylococcus spp.* قيد الدراسة كافة لجين *eno* بينما كانت جميعها تمتلك جين *clfA* و *icaA* وامتلاك بعض سلالات *S.aureus* لجين *cna* بينما امتلاك البعض من *S.epidermidis* لجين *icaA* وعدم امتلاك جميع الأنواع الجين *bap*.

## التوصيات

1. اعتماد اختبارات Latex agglutination في الكشف عن الانواع البكتيرية في عينات سائل النخاع الشوكي CSF.
2. دراسة قابلية بكتيريا *Staphylococcus spp.* على الالتصاق في خلايا جسم الكائن الحي.
3. اجراء دراسات مستفيضة حول قابلية أنواع بكتريا *Staphylococcus spp.* على الالتصاق باستعمال عدد اكثر من العزلات ومن مصادر مختلفة واستعمال أنواع سطح مختلفة.
4. اجراء بحوث ودراسات مستفيضة عن مقاومة بكتيريا *Staphylococcus spp.* المكونة للغشاء الحيوي للمضادات الحيوية.
5. اجراء بحوث عن علاقة بعض الجينات مثل (*fnbA*) الذي يشفر لبروتين الارتباط A بالفايرونكتين، وجين *fnbB* الذي يشفر لبروتين الارتباط B بالفايرونكتين وجينات اخرى تشفر لبروتينات الالتصاق وتكوين الغشاء الحيوي).
6. اجراء دراسات حول الإصابات الفايروسية لمرضى التهاب السحايا

المصادر

**References**

## المصادر

- Abdelkader, M.M.; Aboshanab, K.M.; El-Ashry, M.A. and Aboulwafa, M.M. (2017). Prevalence of MDR pathogens of bacterial meningitis in Egypt and new synergistic antibiotic combinations. *J. Plos One.*, 12(2):1-20.
- Adeeb, N.; Mortazavi, M.M.; Tubbs, R.S. and Cohen-Gadol, A.A. (2012). The cranial dura mater: a review of its history, embryology, and anatomy. *Childs. Nerv. Syst.*, (2012) 28: 827–837.
- Al-Mebairik, N.F.; El-Kersh, T.A.; Al-Sheikh, Y.A. and Marie, M.A.M. (2016). A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 27:50-56.
- Ammann, C.G.; Neuhauser, D.; Eberl, C.; Nogler, M. and Coraça-Huber, D. (2018). Tolerance towards gentamicin is a function of nutrient concentration in biofilms of patient-isolated *Staphylococcus epidermidis*. *Folia Microbiologica*, (2018) 63:299–305.
- Anuradha, M. (2014). *Leclercia adecarboxylata* Isolation: Case Reports and Review. *J. Clin. Diagn. Res.*, 8(12):3-4.
- Arciola, C.R.; Baldassarri, L. and Montanro, L. (2001). Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. *J. Clin. Microbiol.*, 39 (6): 2151–2156.
- Ashiuchi, M. and Misono, H. (2002). Biochemistry and molecular genetics of poly- $\gamma$ -glutamate synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59:9–14.
- Barichello, T.; Simões, L.R.; Valvassori, S.S.; Generoso, J.S.; Aveline, P.E.D.V.; Dominguni, D.; Elias, S.G.; Vilela, M.C.; Quevedo, J. and Teixeira, A.L. (2014). *Klebsiella pneumoniae* meningitis induces memory impairment and increases pro-inflammatory host response

- in the central nervous system of Wistar rats. *J. Med. Microbiol.*, (63): 111–117.
- Becker, K.; Heilmann, C. and Peters, G. (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.*, 27(4): 870–926.
- Bhagat, R.; Hussain, S.Q.; Gattoo, I.A. and Wani, S.A. (2015). Incidence of meningitis in late onset sepsis. *Int. J. Contemp. Pediatr.*, 2(2):96-102.
- Bien, J.; Sokolova, O. and Bozko, P.(2011). Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *J. Pathog.*, 2011:1-13.
- Bos, R.; van der Mei, H.C. and Busscher, H.J. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS. Microbiol. Immunol.*, 23 (1999):179-230.
- Brescó, M.S.; Harris, L.G.; Thompson, K.; Stanic, B.; Morgenstern, M.; O’Mahony, L.; Richards, R.G.; and Moriarty, T.F.(2017). Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in *Staphylococcus epidermidis* Device-Related Infection. *Front. Microbiol.*, 8(1401):1-24.
- Busscher, H.J. and Van der Mei, H.C. (2009). Biofilms and biomaterials; mechanisms of medical device related infections. *Biomaterials*, 30(25): 4247-4248.
- Busscher, H.J. and Van der Mei, H.C. (2012). How Do Bacteria Know They Are on a Surface and Regulate Their Response to an Adhering State?. *PLoS. Pathog.*, 8(1):1-3.
- Butaye, P.; Cloeckert, A. and Schwarz, S. (2003). Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 22 (2003): 205-210.

- Büttner, H.; Mack, D. and Rohde, H. (2015). Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front. Cell Infect. Mi.*, 5(14): 1-15.
- Campanini-Salinas, J.; Andrades-Lagos, J.; Rocha, G.G.; Choquesillo-Lazarte, D.; Dragnic, S.B.; Faúndez, M. Alarcón, P.; Silva, F.; Vidal, R.; Salas-Huenuleo, E.; Kogan, M.; Mella, J.; Gajardo, G.R.I. and Vásquez-Velásquez, D. (2018). A New Kind of Quinonic-Antibiotic Useful Against Multidrug-Resistant *S. aureus* and *E. faecium* Infections. *Molecules*, 23 (1776): 1-19.
- Campoccia, D.; Montanaro, L.; Visai, L.; Corazzari, T.; Poggio, C.; Pegreff, F.; Maso, A.; Pirini, V.; Ravaioli, S.; Cangini, I.; Speziale, P. and Arciola, C.R. (2010). Characterization of 26 *Staphylococcus warneri* isolates from orthopedic infections. *Int. J. Artif. Organs*, 33 (9): 575-581.
- Capasso, C. and Supuran, C.T. (2013). Sulfa and trimethoprim-like drugs – antimetabolites acting as carbonic anhydrase, dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase inhibitors. *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* 1-9.
- Carroll, K.C. (2013). Bacteriology. In: Brooks, G.F.; Butel, J.S.; Morse, S.A. and Mietzner, T.A. (eds.). *Medical Microbiology*. The McGraw-Hill Companies, Inc. 149-406.
- Ceylan, B.; Arslan, F.; Sipahi, O.R.; Sunbul, M.; Örmən, B.; Hakyemez, I.N.; Turunc, T.; Yıldız, Y.; Karsen, H.; Karagöz, G.; Tekin, R.; Hızarcı, B.; Turhan, V.; Şenol, Ş.; Öztoprak, N.; Yılmaz, M.; Özdemir, K.; Mermer, S.; Kökoğlu, Ö.F. and Mert, A. (2016). Variables determining mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* meningitis/ventriculitis treated with intrathecal colistin. *Clin. Neurol. Neurosurg.* : 1-25.
- Ceylan, B.; Arslan, F.; Sipahi, O.R.; Sunbul, M.; Örmən, B.; Hakyemez, I.N.; Turunc, T.; Yıldız, Y.; Karsen, H.; Karagöz, G.; Tekin, R.;

- Hızarc, B.; Turhan, V.; Şenol, Ş.; Öztoprak, N.; Yılmaz, M.; Özdemir, K.; Mermer, S.; Kökoglu, Ö.F. and Mert, A. (2017). Variables determining mortality in patients with *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin Neuro.*, 153: 43-49.
- Chamberlain, N.R. and Brueggemann, S.A. (1997). Characterization and expression of fatty acid modifying enzyme produced by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.*, 46 (1 997): 693-697.
- Chokr, A.; Watie, D.; Eleaume, H.; Pangon, B.; Ghnassia, J.; Mack, D. and Jabbouri, A. (2006). Correlation between biofilm formation and production of polysaccharide intercellular adhesin in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Int. J. Med. Microbiol.*, 296 (2006): 381–388.
- Choudhary, M.; Choudhary, B.K.; Bhojar, S.; Kale, S.B.; Chaudhari, S.P.; Bera, B.C.; Jain, A. and Barbuddhe, S.B. (2018). Isolation and Characterization of multi-drug resistant *Leclercia* species from Animal clinical case. *Lett. Appl. Microbiol.*, 66(1): 44-48.
- Christner, M.; Franke, G.C.; Schommer, N.N.; Wendt, U.; Wegert, K.; Pehle, P.; Kroll, G.; Schulze, C.; Buck, F.; Mack, D.; Aepfelbacher, M. and Rohde, H. (2010). The giant extracellular matrix-binding protein of *Staphylococcus epidermidis* mediates biofilm accumulation and attachment to fibronectin. *Mol. Microbiol.*, 75(1): 187–207.
- Claro, T.; Widaa, A.; McDonnell, C.; Foster, T.J.; O'Brien, F.J. and Kerrigan, S.W. (2013). *Staphylococcus aureus* protein A binding to osteoblast tumour necrosis factor receptor 1 results in activation of nuclear factor kappa B and release of interleukin-6 in bone infection. *Microbiol.*, 159: 147–154.
- Conlon, K.M.; Humphreys, H. and O'Gara, J.P. (2002). Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 216 (2002): 171-177.



- Connell, S.R.; Tracz, D.M.; Nierhaus, K.H. and Taylor, D.E. (2003). Ribosomal Protection Proteins and Their Mechanism of Tetracycline Resistance. *47(12): 3675–3681.*
- Corse, J. and Williams, R.E. (1968). Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci and micrococci. *J. Clin. Path., (21): 722-728.*
- Cucarella, C.; Solano, C.; Valle, J.; Amorena, B.; LASA, I. and Penades, J.R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *J. Bacteriol., 183(9): 2888–2896.*
- Cucarella, C.; Tormo, M.A.; Knecht, E.; Amorena, B.; Íñigo Lasa, I.; Foster, T.J. and Penadés, J.R. (2002). Expression of the Biofilm-Associated Protein Interferes with Host Protein Receptors of *Staphylococcus aureus* and Alters the Infective Process. *Infect. Immun., 70(6): 3180–3186.*
- Cucarella, C.; Tormo, M.A.; U´beda, C.; M. Trotonda, P.; Monzo´n, M.; Peris, C.; Amorena, B.; Lasa, I. and Penade´s, J.R. (2004). Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun., 72(5): 2177–2185.*
- Cunha, M.L.R.S.; Rugolo, L.M.S.S. and Lopes, C.A.M. (2001). Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 101(6): 661-668.*
- Cunha, M.L.R.S.; Rugolo, L.M.S.S. and Lopes, C.A.M. (2006). Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101(6): 661-668.*
- Darouiche, R.O. (2004). Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *N. Engl. J. Med. 2004(350):1422-1429.*
- Dashti, A.S.; Alizadeh, S.; Karimi,A.; Khalifeh, M. and Shoja, S.A. (2017). Diagnostic value of lactate, procalcitonin, ferritin, serum-C-reactive protein, and other biomarkers in bacterial and viral meningitis. *J. Med., 96(35):1-7.*

- Dellinger, R.P.; Levy, M.M.; Carlet, J.M.; Bion, J.; Parker, M.M.; Jaeschke, R.; Reinhart, K.; Angus, D.C.; Brun Buisson, C.; Beale, R.; Calandra, T.; Dhainaut, J.F.; Gerlach, H.; Harvey, M.; Marini, J.J.; Marshall, J.; Ranieri, M.; Ramsay, G.; Sevransky, J.; Thompson, B.T.; Townsend, S.; Vender, J.S.; Zimmerman, J.L. and Vincent, J.L. (2008). Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med.*, 34:17–60.
- Dobinsky, S.; Kiel, K.; Rohde, H.; Bartscht, K.; Knobloch, J.K.M. Horstkotte, M.A. and Mack, D. (2003). Glucose-Related Dissociation between *icaADBC* Transcription and Biofilm Expression by *Staphylococcus epidermidis*: Evidence for an Additional Factor Required for Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis. *J. Bacteriol.*, 185(9): 2879–2886.
- Du, X.; Zhu, Y.; Song, Y.; Li, T.; Luo, T.; Sun, G.; Yang, C.; Cao, C.; Lu, Y. and Li, M. (2013). Molecular Analysis of *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated from Community and Hospital Environments in China. *PLOS ONE*, 8(5): 1-10.
- Dubin, G.; Dorota Chmiel, D.; Mak, P.; Rakwalska, M.; Rzychon, M. and Dubin, A. (2001). Molecular Cloning and Biochemical Characterisation of Proteases from *Staphylococcus epidermidis*. *Biol. Chem.*, 382: 1575 – 1582.
- Eiff, C.V; Arciola, C. R.; Montanaro, L.; Becker, K. and Campoccia, D. (2006). Emerging *Staphylococcus* species as new pathogens in implant infections. *Int. J. Artif. Organs*, 29 (4): 360-367.
- Fei Da, F.; Joo, H.; Cheung, G.Y.C.; Villaruz, A.E.; Rohde, H.; Luo, X. and Michael Otto, M. (2017). Phenol-Soluble Modulin Toxins of *Staphylococcus haemolyticus*. *Front Cell Infect Microbiol.*, 7(206): 1-11.

- Felipe, V.; Morgante, C.A.; Somale, P.S.; Varroni, F.; Zingaretti, M.L.; Bachetti, R.A.; Correa, S.G. and Porporatto, C. (2017). Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. *Microb. Pathog.*, 104:278-286.
- Feltham, R. K. A.; Power, A.K.; Pell, P.A. and Sneath, P. H. A. (1978). A Simple Method for Storage of Bacteria at -76°C. *J. Appl. Bacteriol.*, 44(2): 313-316.
- Fernandes, P. (2016). Fusidic Acid: A Bacterial Elongation Factor Inhibitor for the Oral Treatment of Acute and Chronic Staphylococcal Infections. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.*, 6:1-17.
- Fisher, J.F. and Mobashery, S. (2016). b-Lactam Resistance Mechanisms: Gram-Positive Bacteria and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.*, 6:1-19.
- Flemming, H.C. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8(2010): 623-633.
- Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2007). *Diagnostic microbiology*. Elsevier. Houston Texas.
- Foster, T.J. (2016). The remarkably multifunctional fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 35(12):1923-1931.
- Foster, T.J. (2017). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol. Rev.*, 41(3): 430–449.
- Foster, T.J.; Geoghegan, J.A.; Ganesh, V.K. and Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12(1): 49–62.
- Fournier, B. and Philpott, D.J. (2005). Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18(3): 521–540.

- Fowoyo, P.T. and Ogunbanwo, S.T. (2017). Antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from Nigerian traditional fermented foods. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 16(4):1-7.
- Fredheim, E.G.A.; Klingenberg, C.; Rohde, H.; Frankenberger, S.; Gaustad, P.; Flægstad, T. and Sollid, J.E. (2009). Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.*, 47(4): 1172–1180.
- Fyfe, C.; Grossman, T. H.; Kerstein, K. and Sutcliffe, J. (2016). Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens. *Cold Spring Harbor Perspec. Med.*, 6(10): 1-37.
- Geoghegan, J.A.; Monk, I.R.; O’Gara, J.P. and Foster, T.J. (2013). Subdomains N2N3 of Fibronectin Binding Protein A Mediate *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Adherence to Fibrinogen Using Distinct Mechanisms. *J. Bacteriol.*, 195 (11): 2675–2683.
- Ghasemian, A.; Peerayeh, S.N.; Bakhshi, B. and Mirzaee, M. (2015). The Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) Genes among Clinical Isolates *Staphylococcus aureus* from Hospitalized Children. *J. Pathol.*, 2015; 10(4): 258 – 264.
- Griffith, G.C. and Levinson, D.C. (1949). Subacute Bacterial Endocarditis A Report on 57 Patients Treated with Massive Doses of Penicillin. *Cal. State. J. Med.*, 71(6): 403-408.
- Gross, M.; Cramton, S.E.; Gotz, F. and Peschel, A. (2001). Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infect. Immun.*, 69(5): 3423–3426.
- Hall-Stoodley, L.H.; Costerton, J.W. and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2(2004): 95-108.
- Harapanahalli, A.K.; Chen, Y.; Li, J.; Busscher, H.J. and van der Mei, H.C. (2015). Influence of Adhesion Force on *icaA* and *cidA* Gene

- Expression and Production of Matrix Components in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(10): 3369-3378.
- Harding, C.M.; Hennon, S.W. and Feldman, M.F. (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat. Rev. Microbiol.*, 16(2):91-102.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M. (2002). *Laboratory Exercises in Microbiology*. 5<sup>th</sup> edition. McGraw-Hill INC: 466 pp.
- Harris, L.G.; Murray, S.; Pascoe, B.; Bray, J.; MERIC, G.; Magerios, L.; Wilkinson, T.S.; Jeeves, R.; Rohde, H.; Schwarz, S.; Lencastre, H.; Miragaia, M.; Rolo, J.; Bowden, R.; Jolley, K.A.; Maiden, M.C.J.; Mack, D. and Sheppard, S.K. (2016). Biofilm Morphotypes and Population Structure among *Staphylococcus epidermidis* from Commensal and Clinical Samples. *PLoS. ONE*, 11(3): 1-15.
- He, H.; Sun, F.; Wang, Q.; Liu, Y.; Xiong, L. and Xia, P. (2014). Erythromycin resistance features and biofilm formation affected by subinhibitory erythromycin in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*: 1-8.
- Heilmann, C.; Hussain, M.; Peter, G. and Gotz, F. (1997). Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.*, 24(5): 1013-1024.
- Heilmann, C.; Schweitzer, O.; Gerke, C.; Vanittanakom, N.; Mack, D. and Gotz, F. (1996). Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.*, 20(5): 1083-1091.
- Heilmann, C.; Thumm, G.; Chhatwal, G.S.; Hartleib, J.; Atter, A.U. and Peters, G. (2003). Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol.*, (149): 2769–2778.

- Herman-Bausier, P.H.; Pietrocola, G.; Foster, T.J.; Speziale, P. and Dufrêne, Y.F. (2017). Fibrinogen Activates the Capture of Human Plasminogen by Staphylococcal Fibronectin-Binding Proteins. *mBio.*, 8(5): 1-12.
- Hooper, D.C. (2002). Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect. Dis.*, 2: 530–538.
- Hooper, D.C. and Jacoby, G.A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann. N Y. Acad. Sci.*, 1354(1): 12–31.
- Humphreys, H. and Towner, K.J. (1997). Impact of *Acinetobacter* spp. in intensive care units in Great Britain and Ireland. *J. Hosp. Infect.*, 37: 281-286.
- Huovinen, P. (2001). Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clin. Infect. Dis.*, 2001; 32:1608-1614.
- Hussain, M.; Heilmann, C.; Peters, G. and Herrmann, M. (2001). Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized Fibronectin. *Microb. Pathog.*, 31: 261–270.
- Iorio, N.L.P.; Lopes, A.P.C.N.; Schuenck, R.P.S.; Barcellos, A.G.; Olendzki, A.N.; Lopez, G.L. and Santos, K.R.N. (2011). A combination of methods to evaluate biofilm production may help to determine the clinical relevance of *Staphylococcus* in blood cultures. *Microbiol. Immunol.*, 2011; 55: 28-33.
- Iwase, T.; Uehara, Y.; Shinji, H.; Tajima, A.; Seo, H.; Takada, K.; Toshihiko Agata, T. and Mizunoe, Y. (2010). *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature*, 465: 346-349.
- Jaafar, D.; Rizkallah, M.; Atallah, F.; Bachour, F.; Barakat, A.; Maalouf, G. and Matta, M. (2017). Lumbar Spondylodiscitis Caused by *Burkholderia cepacia* in a Previously Healthy Patient. *J. Orthop. Case. Rep.*, (1396950):1-3.

- Jensen, S.O. and Lyon, B.R. (2009). Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.*, 4(5): 565-582.
- Jiang, H.; Su, M.; Kui, L.; Huang, H.; Qiu, L.; Li, L. Ma, J. Du, T.; Fan, M.; Sun, Q. and Liu, X.(2017). Prevalence and antibiotic resistance profiles of cerebrospinal fluid pathogens in children with acute bacterial meningitis in Yunnan province, China, 2012-2015. *PLoS ONE*, 12(6): 1-13.
- Josse, J.; Laurent, F. and Diot, A. (2017). Staphylococcal Adhesion and Host Cell Invasion: Fibronectin-Binding and Other Mechanisms. *Front. Microbiol.*, 8 (2433): 1-8.
- Junqueira, L. C. and Carneiro, J. (2005). Basic histology. Text and atlas. 11<sup>th</sup> ed. Mc Graw-Hill Companies U.S.A: 502 pp.
- Kaiser, A.M.; Schultsz, C.; Kruithof, G.J.; Debets-Ossenkopp, Y. and Vandenbroucke-Grauls, C. (2004). Carriage of resistant microorganisms in repatriates from foreign hospitals to The Netherlands. *Clin. Microbiol. Infect.*, 10: 972–979.
- Kaito, C. and Sekimizu, K. (2007). Colony Spreading in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 189(6): 2553-2557.
- Kaito, C.; Omae, Y.; Matsumoto, Y.; Nagata, M.; Yamaguchi, H.; Aoto, T.; Ito, T.; Hiramatsu, K. and Sekimizu, K. (2008). A Novel Gene, *fudoh*, in the SCCmec Region Suppresses the Colony Spreading Ability and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*., 3(12):1-8.
- Kaito, C.; Saito, Y.; Nagano, G.; Ikuo, M.; Omae, Y.; Hanada, Y.; Han, X.; Kuwahara-Arai, K.; Hishinuma, T.; Baba, T.; Ito, T.; Hiramatsu, K. and Sekimizu, K. (2011). Transcription and Translation Products of the Cytolysin Gene *psm-mec* on the Mobile Genetic Element SCCmec Regulate *Staphylococcus aureus* Virulence. *PLoS Pathog.*, 7(2): 1-19.



- Karen C. and Carroll, K.C. (2013). Bacteriology. In: Brooks, G.F.; Butel, J.S.; Morse, S.A. and Mietzner, T.A. (eds.). Medical Microbiology. The McGraw-Hill. Companies, Inc.149-406.
- Kashani, A. Chitsazan, M.; Che, K. and Garrison, R.C. (2014). *Leclercia adecarboxylata* Bacteremia in a Patient with Ulcerative Colitis. Case. Rep. Gastrointest. Med., 2014(457687):1- 4.
- Katayama, Y.; Ito,T. and Hiramatsu, K. (2000). A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother., 44(6): 1549–1555.
- Khan, F.Y.; AbuKamar, M. and Anand, D. (2017b). Nosocomial *Pseudomonas putida* Meningitis: A Case Report and Literature Review. Oman. Med. J., 32(2):167-169.
- Khan, F.Y.; Abu-Khattab, M.; Almaslamani, E.A.; Hassan, A.A.; Mohamed, S.F.; Elbuzdi, A.A.; Elmaki, N.Y.; Anand, D. and Sanjay, D. (2017a). Acute Bacterial Meningitis in Qatar: A Hospital-Based Study from 2009 to 2013. Biomed. Res. Int.: 1-8.
- Khodaparast, L.; Khodaparast, L.; Shahrooei, M.; Stijlemans, B.; Merckx, R.; Baatsen, P.; O’Gara, J.P.; Waters, E.; Mellaert, L.V. and Eldere, J.V. (2016). The Possible Role of *Staphylococcus epidermidis* LPxTG Surface Protein SesC in Biofilm Formation. PLoS ONE., 11(1):1-18.
- Kim, B.N.; Peleg, A.Y.; Lodise, T.P.; Lipman, J.L.; Li, J.L.; Nation, R. and Paterson, D.L. (2009). Management of meningitis due to antibiotic-resistant *Acinetobacter* species. Lancet Infect Dis 2009, 9: 245–255.
- Kim, J.H.; Kim, C.H.; Hacker, J. Ziebuhr, W.; Lee, B.K. and Cho, S.H. (2008). Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. J. Microbiol. Biotechnol., 18(1): 28-34.



- Kim, K.S. (2016). Human Meningitis-Associated *Escherichia coli*. *EcoSal. Plus.* 7(1):1-25.
- Kloos, W.E. and Schleifer, K.H. (1975). Isolation and Characterization of Staphylococci from Human Skin. *Int. J. Syst. Microbiol.*, 25(1):62-79.
- Kocianova, S. Vuong, C.; Yao, Y.; Voyich, J.M.; Fischer, E.R.; DeLeo, F.R. and Otto, M. (2005). Key role of poly- $\gamma$ -DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Invest.*, 115(3): 688–694.
- Koripella, R.K.; Chen, Y.; Peisker, K. Koh, C.S.; Selmer, M. and Sanyal, S. (2012). Mechanism of Elongation Factor-G-mediated Fusidic Acid Resistance and Fitness Compensation in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 287(36): 30257–30267.
- Krzyminska, S.; Ewa Szczuka, E.; Dudzinska, K. and Kaznowski, A. (2015). Virulence and the presence of aminoglycoside resistance genes of *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from clinical specimens. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107: 857–868.
- Ku, Y.; Chuang, Y.; Chen, C.; Lee, M.; Yang, Y.; Tang, H. and Yu, W. (2017). *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Meningitis: Epidemiology, Virulence and Antibiotic Resistance. *Sci. Rep.*, 7(6634):1-10.
- Kumar, M.; Das, K. B. and Kumar, D. (2018). Meningeal Signs –It’s Validity in Suspected Meningitis. *J. Neurosci. Clin. Res.*, 3(1): 1-3.
- Kumar, R.; Yadav, B.R.; Anand, S.K. and Singh, R.S. (2011). Prevalence of adhesin and toxin genes among isolates of *Staphylococcus aureus* obtained from mastitic cattle. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, (2011) 27:513–521.
- Kuvhenguhwa, M.S. Belgraveb, K.O.; Shah, S.U.; Bayer, A.S. and Miller, L.G. (2017). A Case of Early Prosthetic Valve Endocarditis Caused

- by *Staphylococcus warneri* in a Patient Presenting With Congestive Heart Failure *Cardiol. Res.*, 8(5):236-240.
- Lai, Y.; Villaruz, A.E.; Min Li, M.; Cha, D.J.; Sturdevant, D.E. and Otto, M. (2007). The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol. Microbiol.*, 63(2): 497–506.
- Lasa, I. and Penadés, J.R. (2006). Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Microbiol. Res.*, 157 (2006): 99–107.
- Lee, I.T.; Lin, C.C.; Yang, C.C.; Hsiao, L.D.; Wu, M.Y. and Chuen-Mao Yang, C.M. (2018a). Resveratrol Attenuates *Staphylococcus aureus*-Induced Monocyte Adhesion through Downregulating PDGFR/AP-1 Activation in Human Lung Epithelial Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(10): 1-16.
- Lim, Y.; Jana, M.; Luong, T.T. and Lee, C.Y. (2004). Control of Glucose- and NaCl-Induced Biofilm Formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 186(3): 722–729.
- Lin, M.H.; Ke, W.J.; Liu, C.C. and Yang, M.W. (2016). Modulation of *Staphylococcus aureus* spreading by water. *Sci. Rep.*, 6(25233):1-9.
- Long, F.; Kong, M.; Wu, S.; Zhang, W.; Quanfeng Liao, Q.; Peng, Z.; Li Nan, L.; Liu, Y.; Wang, M.; Chao He, C.; Wu, Y.; Lu, X. and Kang, M. (2018). Development and validation of an advanced fragment Analysis based assay for the detection of 22 pathogens in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis and encephalitis. *J. Clin. Lab. Anal.*:1-10.
- Lowy, F.D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.*, 111(9): 1265–1273.
- Ma, B.S. and Yohoshuva, A. (2016). Comparative Biochemical Profile of cerebrospinal Fluid and Serum in the Diagnosis of Pyogenic Meningitis. *Pharma Innov. J.*, 5(2): 01-04.

- MacFaddin, J.F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. Lippincott Williams and Wilkins, A wolters Kluwer company. New York.
- Makino, S.; Uchida, I.; Terakado, N.; Sasakawa, C. and Yoshikawa, M. (1989). Molecular Characterization and Protein Analysis of the cap Region, Which Is Essential for Encapsulation in *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol., 171(2): 722-730.
- Makki, A.R.; Sharma, S.; Duggirala, A.; Prashanth, K.; Garg, P. and Das, T. (2011). Phenotypic and Genotypic Characterization of Coagulase Negative Staphylococci (CoNS) Other than *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Ocular Infections. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 52(12): 9018–9022.
- 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., 9(2749): 1-9.
- Martinez-Garcia, S.; Martinez, R.; Cancino-Diaz, M.E. and Cancino-Diaz, J.C. (2018). Extracellular proteases of Staphylococcus epidermidis: roles as virulence factors and their participation in biofilm. APMIS. 126(3): 177-185.
- Martins, M.; McCusker, M.P.; McCabe, E.M.; O’Leary, D.; Duffy, G. and Fanning, S. (2013). Evidence of Metabolic Switching and Implications for Food Safety from the Phenome(s) of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 Cultured at Selected Points across the Pork Production Food Chain. Appl. Environ. Microbiol., 79(18): 5437–5449.
- Masri, A.; Alassaf, A.; Khuri-Bulos, N.; Zaq, I.; Hadidy, A. and Bakri, F.G. (2018). Recurrent meningitis in children: etiologies, outcome, and lessons to learn. Childs. Nerv. Syst., 34(8):1541-1547.
- Meningitis. (2001). Paediatrics & child health, 6(3): 126-127.

- Moormeier, D.E.; Bose, J.L.; Horswill, A.R.; and Bayles, K.W. (2014). Temporal and Stochastic Control of *Staphylococcus aureus* Biofilm Development. *mBio.*, 5(5):1-12.
- Nagaev, I.; Björman, J.; Andersson, D.I. and Hughes, D. (2001). Biological cost and compensatory evolution in fusidic acid-resistance *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, 40(2): 433-439.
- Nagase, N.; Sasaki, A.; Yamashita, K.; Shimizu, A.; Wakita, Y.; Kitai, S. and Kawano, J. (2002). Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *J. Vet. Med. Sci.*, 64(3): 245-250.
- Namvar, A.E.; Bastarahang, S.; Abbasi, N.; Ghehi, G.S.; Farhadbakhtiaran, S.; Arezi, P.; Hosseini, M.; Baravati, S.Z. Jokar, Z. and Chermahin, S.G. (2014). Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS*, 9(3):1-10.
- Nemati, M.; Hermans, K.; Devriese, L.A.; Maes, D. and Haesebrouck, F. (2009). Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from poultry. *Avian Pathol.*, 38(6): 513-517.
- Neuman, M.G.; Nanau, R.M.; Oruña, L. and Coto, G. (2011). *In vitro* Anti-Inflammatory Effects of Hyaluronic Acid in Ethanol-Induced Damage in Skin Cells. *J. Pharm Pharmaceut. Sci.*, 14(3): 425-437.
- Nguyen, F.; Starosta, A.L.; Arenz, S.; Sohmen, D., Döhnhofer, A. and Wilson, D.N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol. Chem.*, 395(5): 559–575.
- Noguchi, T.; Nagao, M.; Yamamoto, M.; Matsumura, Y.; Kitano, T.; Kondo, A.T. and Ichiyama, S. (2018). *Staphylococcus epidermidis* meningitis in the absence of a neurosurgical device secondary to catheter-related bloodstream infection: a case report and review of the literature. *J. Med. Case. Rep.*, 12(106):1-5.

- Nuryastuti, T.; Krom, B.P.; Aman, A.T.; Busscher, H.J. and Van der Mei, H.C. (2011). Ica-expression and gentamicin susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on orthopedic implant biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 96(2): 365- 371.
- O'Brien, F.G.; Price, C.; Grubb, W.B. and Gustafson, J.E. (2002). Genetic characterization of the fusidic acid and cadmium resistance determinants of *Staphylococcus aureus* plasmid pUB101. *J. Antimicrob. Chemother.*, 50: 313–321.
- O’Gara, J.P. (2007). *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 270 (2007):179–188.
- O’Neill, J. (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.
- Ogawara H. (2015). Penicillin-binding proteins in Actinobacteria. *J. Antibiot.*, 68: 223–245.
- Ohara-Nemoto, Y.; Haraga, H.; Kimura, S. and Nemoto, T.K. (2008). Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal–oral trafficking of the bacteria. *J. Med. Microbiol.*, 57: 95–99.
- Olesen, B. (2017). Characterization of four *Escherichia coli* clonal groups. Thesis. Department of Clinical Microbiology. Herlev and Gentofte Hospital. University of Copenhagen, Denmark: 28pp.
- Oliveira, A. and Cunha, M.L.R.S. (2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC. Res. Notes.*, 3 (260):1-8.
- Olsen, J.E.; Christensen, H. and Aarestrup, F.M. (2006). Diversity and evolution of bla<sub>Z</sub> from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57: 450–460.
- Omae, Y.; Sekimizu, K. and Kaito, C. (2014). Identification of *Staphylococcus aureus* Colony- Spreading Stimulatory Factors from Mammalian Serum. *PLoS ONE*, 9(5):1-9.

- Oppermann-Sanio, F.B. and Steinbüchel, A. (2002). Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. *Naturwissenschaften.*, 89:11–22.
- Ote, I.; Taminiau, B.; Duprez, J.N.; Dizier, I. and Mainil, J.G. (2011). Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*, 153(3-4): 285-292.
- Otto, M. (2008). Staphylococcal Biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 322: 207–228.
- Otto, M. (2012). Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin. Immunopathol.*, 34(2): 201-214.
- Otto, M. (2013). Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Ann. Rev. Med.*, 2013. (64):1–14.
- Otzen, D. and Nielsen, P.H. (2008). We find them here, we find them there: Functional bacterial amyloid. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65 (2008): 910 – 927.
- Pan, X. and Fisher, L.M. (1998). DNA Gyrase and Topoisomerase IV Are Dual Targets of Clinafloxacin Action in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 42 (11): 2810–2816.
- Panda, S. and Singh, D. V. (2016). Whole-Genome Sequences of *Staphylococcus haemolyticus* Isolated from Infected Eyes and Healthy Conjunctiva in Bhubaneswar, India. *Genome announcements*, 4(2): e00099-16.
- Patestas, M.A. and Gartner, L.P. (2006). *A Textbook of Neuroanatomy*. Blackwell Science Ltd. USA: 454 pp.
- Pereyra, E.A.L.; Picech, F.; Rennaa, M.S.; Baravalle, C.; Andreotti, C.S.; Romina Russic, Calvinho, L.F.; Diez, C. and Dallard, B.E. (2016). Detection of *Staphylococcus aureus* adhesion and biofilm-producing

- genes and their expression during internalization in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.*, 183: 69-77.
- Periasamy, S.; Joo, H.S.; Duong, A.C.; Bach, T.H.L.; Tan, V.Y.; Chatterjee, S.S.; Cheung, G.Y.C. and Michael Otto, M. (2012). How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *PNAS.*, 109 (4): 1281–1286.
- Pinheiro, L.; Brito, C.I.; Oliveira, A.; Pereira, V.C. and Cunha, M.L.R.S. (2016). *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: detection of biofilm genes and biofilm formation in blood culture isolates from patients in a Brazilian teaching hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 86(1):11-4.
- Pollitt, E.J.G.; Crusz, S.A. and Diggle, S.P. (2015). *Staphylococcus aureus* forms spreading dendrites that have characteristics of active motility. *Sci Rep.*, 5(17698):1-12.
- Popoca, E.O.F.; Garc'ia, M.M.; Figueroa, S.R.; Medell'in, A.M.; Trujillo, H.S.; Rojas, H.V.S. and Dur'an, N.R. (2012). *Pantoea agglomerans* in Immunodeficient Patients with Different Respiratory Symptoms. *Sci. World J.*, 2012, (156827):1-8.
- Qi, X.; Jin, Y.; Duan, J.; Hao, Z.; Wang, S.; Guo, Y.; Lv, J.; Hu, L.; Wang, L. and Yu, F. (2018). *SesI* May Be Associated with the Invasiveness of *Staphylococcus epidermidis*. *Front. Microbiol.*, 8(2574):1-10.
- Reta, M.A. and Zeleke, T.A. (2016). Neonatal bacterial meningitis in Tikur Anbessa Specialized Hospital, Ethiopia: a 10-year retrospective review. *Springerplus* (2016) 5:(1971):1-6.
- Rhie, K.; Choi, E.H.; Cho, E.Y.; Lee, J.; Kang, J.H.; Kim, D.S.; Kim, Y.J.; Ahn, Y.; Eun, B.W.; Oh, S.H.; Cha, S.H.; Hong, Y.J.; Kim, K.N.; Kim, N.H.; Kim, Y.K.; Kim, J.H.; Lee, T.; Kim, H.M.; Lee, K.S.; Kim, C.S.; Park, S.E.; Kim, Y.M.; Oh, C.E.; Ma, S.H.; Jo, D.S.; Choi, Y.Y. and Lee, H.J. (2017). Etiology of Invasive Bacterial Infections



- in Immunocompetent Children in Korea (2006–2010): a Retrospective Multicenter Study. *J Korean Med. Sci.*, 6(45):1-13.
- Robertson, F.C.; Lepard, J.R.; Mekary, R.A.; Davis, M.C.; Yunusa, I.; Gormley, W.B.; Baticulon, R.E.; Mahmud, M.R.; Misra, B.K.; Rattani, A.; Dewan, M.C.; and Park, K.B. (2018). Epidemiology of central nervous system infectious diseases: a meta-analysis and systematic review with implications for neurosurgeons worldwide. *J. Neurosurg.*, () :1-20.
- Rodriguez-Martinez, J.M. and Pascual, A. (2006). Antimicrobial resistance in bacterial biofilms. *Rev. Med. Microbiol.*, 2006. (17): 65–75.
- Rohde, H.; Frankenberger, S.; Zähringer, U. and Mack, D. (2010). Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur. J. Cell Biol.*, 89 (2010) 103–111.
- Rohde, H.; Burdelski, C.; Bartscht, K.; Hussain, M.; Buck, F.; Horstkotte, M.A.; Knobloch, J.K.M.; Heilmann, C.; Herrmann, M. and Mack, D. (2005). Induction of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.*, (2005)55(6): 1883–1895.
- Rupp, M.E.; Ulphani, J.S.; Fey, P.D. and Mack, D. (1999). Characterization of *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin/Hemagglutinin in the Pathogenesis of Intravascular Catheter-Associated Infection in a Rat Model. *Infect. Immun.*, 67(5): 2656–2659.
- Russell, C.D.; McLean, A.L.; Saunders, C. and Laurenson, I.F. (2014). Adjunctive rifampicin may improve outcomes in *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a systematic Review. *J. Med. Microbiol.*, (2014). 63:841–848.



- Salaberry, S.R.S.; Saldenber, A.B.S.; Zuniga, E.; Melville, P.A.; Santos, F.G.B.; Guimar~aes, E.C.; Gregori, F. and Benites, N.R. (2015). Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastitis. *Microb. Pathog.*, 85 (2015): 35-39.
- Shenoy, A.; Desai, H. and Mandvekar, A. (2017). Cerebrospinal Fluid – A Clinicopathologic Analysis. *J. Assoc .Physicians. India*, 65: 40-44.
- Shin, G.; You, M.; Lee, H. and Lee, C. (2012). Catheter-Related Bacteremia Caused by Multidrug-Resistant *Leclercia adecarboxylata* in a Patient with Breast Cancer. *J. Clin. Microbiol.*, 50(9):3129-3132.
- Siwakoti, S.; Sah, R.; Rajbhandari, R.S. and Basudha Khanal, B. (2018). *Pantoea agglomerans* Infections in Children: Report of Two Cases. *Case. Rep. Pediatr.*, 2018, (4158734):1- 3.
- Speer, B.S.; Shoemaker, N.B. and Salyers, A.A. (1992). Bacterial Resistance to Tetracycline: Mechanisms, Transfer, and Clinical Significance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4(5): 387-399.
- Stokes, E. J. and Ridgway, G. (1987). *Clinical Bacteriology*, 6<sup>th</sup> edn. Edward Arnold, London: 215 pp.
- Szczuka, E.; Ska, S.K.; Bogucka, N. and Kaznowski, A. (2018). Multifactorial mechanisms of the pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* isolated from bloodstream infections. *Antonie. Van. Leeuwenhoek.*, 111:1259–1265.
- Szczuka, E.; Telega, K. and Kaznowski, A. (2014). Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiol.*, 60(1):1-5.
- Takeuchi, F.; Watanabe, S.; Baba, T.; Yuzawa, H.; Ito, T.; Morimoto, Y.; Kuroda, M.; Cui, L.; Takahashi, M.; Ankai, A.; Baba, S.; Fukui, S.; Lee, J.C. and Hiramatsu, K. (2005). Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* Uncovers the Extreme Plasticity of Its Genome and the Evolution of Human-Colonizing Staphylococcal Species. *J. Bacteriol.*, 187(21): 7292–7308.

- Tchesnokova, V.; Aprikian, P.; Kisiela, D.; Gowey, S.; Korotkova, N.; Thomas, W. and Sokurenko, E. (2011). Type 1 Fimbrial Adhesin FimH Elicits an Immune Response That Enhances Cell Adhesion of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 79(10): 3895–3904.
- Tiwari, R.P.; Hoondal, G.S. and Tewari, R. (2009). Laboratory in microbiology and biotechnology. Bharat Shushan Abhlshek Publications. New Delhi: 193 pp.
- Tormo, M.A.; Knecht, E.; Goetz, F.; Lasa, I. and Penades, J.R. (2005). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer?. *Microbiol.*, (151): 2465–2475.
- Tsompanidou, E.; Sibbald, M.J.J.B.; Chlebowicz, M.A.; Dreisbach, A.; Back, J.W.; Dijn, J.M.; Buist, G. and Denham, E.L. (2011). Requirement of the *agr* Locus for Colony Spreading of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 193(5): 1267–1272.
- Tupin, A.; Gualtieri, M.; Roquet-Banères, F.O.; Morichaud, Z.; Brodolin, K. and Leonetti, J. (2010). Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35 (2010): 519–523.
- van Belkum, A.; Melles, D.C.; Nouwen, J.; van Leeuwen, W.B.; van Wamel, W.; Vos, M.C.; Wertheim, H.F.L. and Verbrugh, H.A. (2009). Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Genet. Evol.*, 9: 32–47.
- Vaudaux, P.E.; Francois, P.; Proctor, R.A.; McDevitt, D.; Foster, T.J.; Albrecht, R.M.; Lew, D.P.; Wabers, H. and Cooper, S.L. (1995). *Infect. Immun.*, 63(2): 585–590.
- Vautor, E.; Abadie, G.; Pont, A. and Thiery, R. (2008). Evaluation of the presence of the bap gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species. *Vet. Microbiol.*, 127 (2008): 407–411.

- Vilain, S.; Pretorius, J.M.; Theron, J. and Brozzel, V.S. (2009). DNA as an Adhesin: *Bacillus cereus* Requires Extracellular DNA To Form Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(9): 2861–2868.
- Vogel, L.; Sloos, J.H.; Spaargaren, J.; Suiker, I. and Dijkshoorn, L. (2000). Biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with catheter related bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 36: 139–141.
- Von Eiff, C.; Reinert, R.R.; Kresken, M.; Brauers, J.; Hafner, D. and Peters, G. (2000). Nationwide German Multicenter Study on Prevalence of Antibiotic Resistance in Staphylococcal Bloodstream Isolates and Comparative In Vitro Activities of Quinupristin-Dalfopristin. *J. Clin. Microbiol.*, 38(8): 2819–2823.
- Votintseva, A.A.; Fung, R.; Miller, R.R.; Knox, K.; Godwin, H.; Wyllie, D.H.; Bowden, R.; Crook, D.W. and Walker, A.S. (2014). Prevalence of *Staphylococcus aureus* protein A(*spa*) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire. *BMC Microbiol.*, 14(63):1-11.
- Vuong, C.; Dürr, M.; Carmody, A.B.; Peschel, A.; Klebanoff, S.J. and Otto, M. (2004). Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines proinflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cell Microbiol.*, 6(8): 753–759.
- Weese, J.S. and van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.*, 140: 418–429.
- Weidenmaier, C. and Peschel, A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions *Nat. Rev. Microbiol.*, 6: 276- 287.
- Weller, R.O.; Sharp, M.M.; Christodoulides, M.; Carare, R.O. and Möllgard, K. (2018). The meninges as barriers and facilitators for the

- movement of fluid, cells and pathogens related to the rodent and human CNS. *Acta. Neuropathol.*, 135(3):363-385.
- Wichelhaus, T.A.; Schafer, V.; Brade, V. and Boddingtonhaus, B. (1999). Molecular Characterization of *rpoB* Mutations Conferring Cross-Resistance to Rifamycins on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 43(11): 2813–2816.
- Widerström, M.; Wiström, J.; Sjöstedt, A. and Monsen, T. (2012). Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, (2012) 31:7–20.
- Williams, R.J.; Henderson, B.; Sharp, L.J. and Nair, S.P. (2002). Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.*, 70(12): 6805–6810.
- Wilson, D.N. (2009). The A–Z of bacterial translation inhibitors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 44(6): 393–433.
- Wilson, D.N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12: 35-48.
- Yarwood, J.M.; McCormick, J.K.; Paustian, M.L.; Kapur, V. and Schlievert, P.M. (2002). Repression of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator in Serum and *in vivo*. *J. Bacteriol.*, 184(4): 1095–1101.
- Yoshino, Y.; Kitazawa, T.; Kamimura, M.; Tatsuno, K.; Ota, Y. and Yotsuyanagi, H. (2011). *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. *J. Infect. Chemother.*, (2011) (17):278–282.
- Zuniga, E.; Melville, P.A.; Saldenber, A.S; Laes, M.A.; Gonsales, F.F.; Salaberry, S.R.S.; Gregori, F.; Brandao, P.E.; Santos, F.G.B.; Lincopan, N.E. and Benites, N.R. (2015). Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in

Staphylococcus spp. isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. *Microb. Pathog.*, 89 (2015): 1-6.

## Summary

The present study including collected 248 clinical samples of cerebrospinal fluid (CSF) from patients, from the Child Protection Teaching Hospital in the Medical City Complex in Baghdad. For the period of July to October 2018. All isolates were identified depending on macroscopic, microscopic, biochemical tests and definite with Vitek-2 compact system. Forty two isolates were obtained from samples showed a growth in 42 samples. Sixteen isolates belongs to *Staphylococcus* spp. 38.1%, the number of the percentage of according to species as follow: 7/16(43.75%) of *S.epidermidis*, 3/16(18.75%) of *S.hominis* and *S.haemolyticus*, 2/16 (12.5%) of *S.aureus*, 1/16(6.25%) of *S.warneri*. Whereas the Gram negative was 1(2.38%) isolate of *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, and 2(4.76%) isolates, *Burkholderia cepacia* and *Acinetobacter baumannii*, and 19(45.24%) isolates were other. These isolates showed differences in susceptibility to antibiotics, the results showed all isolates were resistance to Benzylpenicillin, Oxacillin, Gentamicin, Tobramycin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Erythromycin, Clindamycin, Tetracycline, Fusidic Acid, Rifampicin and Trimethoprim were (14.28-100)% While they were sensitive 100% for Linezolid, Teicoplanin, Vancomycin, Tigecycline and Nitrofurantoin. Four different antibiotic resistance patterns were observed for *S. epidermidis*, one pattern for *S.aureus*, two patterns for *S.haemolyticus* and one pattern for *S. warneri*

These isolates were tested for ability to biofilm formation by using Luria Broth and tryptone soy Broth supplemented with 0.25% and 2% glucose. The ability of the isolates to form biofilm with Luria broth, for *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S.hominis* and *S. warneri* were 7 / 7( 100%), 1/2(50%), 2 / 3 (66.66%), 1/3 (33.33%), 1/1 (100%) were not forming biofilm respectively. As for using a tryptone soya broth TSB

supplemented with 0.25% sugar glucose, Bacterial isolates of *S.epidermidis*, *S. aureus*, *S. haemolyticus* and *S.hominis* were 6/7 (85.71%), 2/2 (100%), 2/3 (66.66%) and 3/3 (100%) were weakly biofilm formed respectively. When using TSB medium supplemented with 2% glucose, *Staphylococcus* spp. isolates were all 100% weakly biofilm formed. The study showed the effect of MIC and MBC of Erythromycin (8)  $\mu\text{g/mL}$  and (16)  $\mu\text{g/mL}$  against *Staphylococcus* spp. Constituent of the biofilm. In the current study, the antibiotic showed the inhibitory effect in the bacteria that forming the biofilm. When studying the susceptibility of bacteria to adhesion using Polystyrene dishes, The numbers of adherent cells were *S.epidermidis*, *S.aureus*, *S.haemolyticus*, *S.hominis* and *S.warneri* (230,3,  $\geq 300$ , 62, 40) cell / field. As for when using a Vero cell line of epithelial cells. The results of current study according to the cultivation of bacterial dilutions (1:100) was in *S.epidermidis* *S.aureus* and *S.haemolyticus*, *S.hominis* and in *S. warneri* was (9,  $\geq 300$ ,  $\geq 300$ , 30'292) cells and examined the ability of *Staphylococcus* spp. isolates to spreading. The results showed their mobility (motility) as well as giving different forms depending on the species of bacteria, the spreading of *S.pidermidis* was 7.7-16.5 mm, *S.aureus* ranged between 8.97 -16.0 mm, *S.haemolyticus* ranged between 8.0-14.6 mm, *S.hominis* ranged between 10.6 - 16.3 mm and *S.warneri* reached 16.8 mm As for molecular detection genes of the entire isolates contained *eno* gene, which encoded to (Laminin binding protein). The gene *bap* that encodes to Biofilm association protein (Bap), the results of our current study showed that none of the bacterial isolates of *Staphylococcus* spp. has the gene. While the *cna* gene was encoded to Collagen binding protein (Cna), *S.aureus* possess *cna* (50%). When detecting *clfA* gene that encodes to Clumping factor A (ClfA), *S.aureus* have this gene 100%. The gene *icaA* which encodes Intercellular adhesion gene A. As we note the possession of bacteria *S.aureus* gene *icaA* (100%),

in *S.epidermidis* (57.1%), *S.hominis*, *S.warneri* and *S.haemolyticus* isolates, they did not possess gene *icaA*.



Ministry of Higher Education and Scientific Research  
University of Baghdad  
College of Education for Pure Science  
(Ibn Al-Haitham)  
Department of Biology



# **Bacteriological Study of Meningitis Patients in Children**

*A thesis*

*Submitted to the College of Education for Pure Science (Ibn Al-Haitham)*

*University of Baghdad in Partial Fulfillment of the Requirement of*

*the Master Degree of Science*

*In*

*Biology / Microbiology*

**By**

**Abbas Hameed Shakor Al-Wandawy**

(B.Sc., University of Mosul, 2001)

***Supervised By***

**Ass. Prof. Dr. Luma A. Zwain**

1440 A.H.

2019 A.G