التحري عن الطراز المظهري* والجزيئي لعوامل الضراوة لبكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* spp. المحللة للدم والمعزولة من التهابات المسالك البولية في الديوانية

أ.م علي عبد الرحيم الناشي ريام وسام حسن المنصوري

قسم علوم الحياة – كلية التربية – جامعة القادسية

الخلاصة:

جمعت 180عينة ادرار من المرضى المراجعين الى مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والاطفال التعليمي في مدينة الديوانية للفترة من ٢٠١٥/٩/١ ولغاية ٢٠١٦/١/٣١ ولكلا الجنسين، لعزل بكتريا المكورات العنقودية المسببة لالتهاب المجاري البولية ولتحديد عوامل ضراوتها مظهرياً وجزيئياً، وجد ان120 بنسبة (66.66%) عينة اعطت نمواً بكتيرياً معنوياً، بينما كانت 60 بنسبة (33.33%) عينة سالبة. وقد وجد ان 24 عزلة عائدة لبكتريا *Staphylococcus* spp. توزعت على 20عزلة بنسبة (16.67%) تعود لبكتريا *Staphylococcus aureus* و4 عزلات بنسبة (3.33%) عائدة لبكتريا *Staphylococcus haemolyticus* من المجموع الكلي للعينات الموجبة للزرع، كانت العزلات المنتجة للهيمولايسين والحالة للدم قد شملت جميع عزلات *Staph. aureus* و *Staph. haemolyticus*، وباستعمال تقنية سلسلة تفاعل البلمرة (PCR) ثبت ان الجينين *hlB* و *hlA* موجودان في بكتريا *Staphylococcus* spp. وهما يشفران لإنتاج الهيمولايسين، اذ تميزت جميع عزلات *Staph. aureus* المحللة للدم باحتوائها على الجين *hlA* بنسبة (100%) وعلى الجين *hlB* بنسبة (40%)، وعند اجراء الكشف عن جينات الهيمولايسين في *Staph. haemolyticus* ظهر وجود الجين *hlA* فيها بنسبة (75%)، والجين *hlB* فيها بنسبة (25%). تم التحري عن بعض عوامل الضراوة المرتبطة بإمراضيه العزلات البكتيرية المحللة للدم التي شملت تكوين المحفظة، تلازن خلايا الدم الحمراء وانتاج الغشاء الحيوي. انتجت عزلات *Staph. aureus*، *Staph. haemolyticus* المحفظة بنسبة (40% ، 25%) على التوالي وقد بينت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروق معنوية بينهما عند مستوى ($P>0.05$)، اما فيما يتعلق بقدرة العزلات على تلازن خلايا الدم الحمراء فتميزت *Staph. aureus* بقدرتها على احداث التلازن وبنسبة (30%) في حين كانت جميع عزلات *Staph. haemolyticus* غير قادرة على احداث التلازن وقد بينت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى ($P<0.05$). كما اظهرت الانواع البكتيرية المحللة للدم القدرة على انتاج الغشاء الحيوي بنسب مختلفة، اذ بلغت نسبة العزلات المنتجة للغشاء الحيوي (45% و 50%) لبكتريا *Staph. aureus* و *Staph. haemolyticus* على التوالي.

الكلمات المفتاحية: بكتريا المكورات العنقودية، التهاب المسالك البولية، جينات الهيمولايسين، عوامل الضراوة.

* بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

المقدمة: Intoduction

يعد خمج المسالك البولية احد المشاكل الصحية التي يتعرض لها نسبة كبيرة من افراد المجتمع البشري والذي يقدر عددهم بالملايين سنويا (1). وتعد السبب الاكثر شيوعا لعدوى المستشفيات وبنسبة مئوية تصل الى ٣٥% (2). تكون المكورات العنقودية من اهم المسببات لهذا الخمج (3). اذ تعد هذه البكتريا من الممرضات الانتهازية لاخماج المسالك البولية المكتسبة عن طريق المستشفى، كما وتلعب بيئة المستشفى دورا مهما في تحديد الانواع المشتركة في التهابات الجهاز البولي (4). تعزى امراضية المكورات العنقودية الى قدرتها في تحلل الدم (5). اذ يعد هذا الانزيم من عوامل الضراوة المهمة ويشكل عاملاً مهماً في تزويد الجراثيم بالحديد (6). أذ يتداخل مع اغشية الخلايا المضيفة وهو فعال ضد العديد من انواع الخلايا، بما في ذلك الخلايا الظهارية البولية (7). كما تنتج هذه البكتيريا المحفظة التي تعد من عوامل الضراوة التي تتوسط العديد من العمليات البايولوجية بين البكتريا ومحيطها الخارجي، أذ انها تؤدي دوراً مهماً في تثبيط عملية البلعمة (8). ومن عوامل الضراوة هو وجود عوامل الالتصاق كالاهلاب والتي تعد الاخرى من العوامل التي ترسخ الغزو الجرثومي لخلايا المضيف وفي حالة عدم التصاقها فأنها سوف تزال بواسطة المخاط والسوائل الاخرى التي تغسل سطح النسيج (9). كما وجد ان البكتريا المكونة للأغشية الحيوية تشكل مشكلة كبيرة اذ انها تعمل على مقاومة الدفاعات المناعية للمضيف والمواد القاتلة للجراثيم والمضادات الحيوية (10).

ونظراً لخطورة الاصابة ببكتريا المكورات العنقودية التي يتعرض لها الجهاز البولي في الانسان وامتلاكها لآليات متعددة ومتغيرة في احداث أخماج سريعة فقد أرتأينا القيام بهذه الدراسة لعزل بكتريا المكورات العنقودية من التهابات المسالك البولية والكشف عن الاساس الجزيئي الذي يشفر الى عوامل الضراوة المسببة للأمراض.

المواد وطرائق العمل: Materials and Methods

جمع العينات: Collection of samples

جمعت 180 عينة ادرار وسطي midstream من المرضى المراجعين للعيادات الاستشارية والراقدين في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والاطفال في مدينة الديوانية والذين يعانون من التهاب المسالك البولية للفترة من ٢٠١٥/٩/١ ولغاية ٢٠١٦/١/٣١، وقد جمعت عينات الادرار في انابيب بلاستيكية معقمة ومحكمة الاغلاق ثم علمت الانابيب بأرقام ونقلت عينات الادرار الى المختبر خلال مدة لا تتجاوز نصف ساعة.

العزل والتشخيص Isolation and identification

زرعت عينات الادرار بأخذ ملئ حلقة الناقل من العينة وزرعت على وسطي Blood agar و MacConkey agar بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة 24 ساعة. شخصت العزلات بالاعتماد على ماورده MacFaddin (11) وForbes وجماعته (12) أستناداً الى الصفات المظهرية والزرعية والكيموحيوية. كما شخصت العزلات البكتيرية باستخدام نظام API staph للتفريق بين الانواع العائدة للمكورات العنقودية.

التحري عن قابلية البكتريا على انتاج الانزيم الهيمولايسين Haemolysin production

اجري هذا الاختبار أستناداً الى Hughes & Seniror (13). أذ نبذ مقدار5 ملليلتر من عينة الدم المسحوبة آنيا" باستخدام انابيب بلاستيكية حاوية على مانع تخثر الدم (3%) من سترات الصوديوم للتخلص من البلازما والحصول على راسب كريات الدم الحمراء، غسلت الخلايا ثلاثة مرات بالمحلول الملحي الفسلجي مع ترسيب الخلايا بالنبذ المركزي بعد كل غسلة، استخدمت كريات الدم الحمراء بنسبة 5% لتحضير وسط اكار الدم، زرعت العزلات بطريقة التخطيط على وسط اكار الدم وحضنت الاطباق لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ، ان كلا النوعين من التحلل الفا وبيتا يظهران بشكل هالة شفافة حول المستعمرة وهذا دلالة على ايجابية الفحص عدا ذلك سجل عدم القدرة على التحلل.

استخلاص الحامض النووي البكتيري Bacterial genomic DNA extraction

تم استخلاص الحمض النووي (DNA) من البكتريا باستخدام العدة الجاهزة Presto™ Mini gDNA (Bacteria Kit) المجهزة من شركة Geneaid (USA) وحسب تعليمات الشركة المجهزة، واجري الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص باستعمال جهاز Nano drop spectrophotometer الخاص بالكشف وقياس تركيز الأحماض النووية أذ جرى الكشف عن الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي DNA وقياس نقاوته من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين (260– 280) نانوميتر.

البادئات Primers

صممّتْ بادئات خاصة بالتحري عن الجينات الحالة للدم في هذه الدراسة وذلك باستعمال موقع NCBI– Gen Bank (وبرنامج Primer3 plus) وكذلك استعملت وجُهِّزت جميع البادئات من شركة Bioneer الكورية كما مبين في الجدول(١).

جدول (١): البادئات المستخدمة في هذا الدراسة.

Primer	Sequence		Amplicon
hlA–staph	F	TGGTTTAGCCTGGCCTTCAG	190bp
	R	ATTTGCACCAATAAGGCCGC	
hlB–staph	F	GGGGCAATATAAACGCGCTG	293bp
	R	TGTCGAATCCACAACCGCTT	

تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة

حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة باستعمال عدة الـ AccuPower® PCR PreMix المجهزة من قبل شركة الـ Bioneer الكورية حسب تعليمات الشركة كما موضح في الجدول (٢).

جدول (٢): مكونات تفاعل سلسلة البلمرة وأحجامه.

PCR master mix		Volume
DNA template		5µL
Primers	F. primer	1.5µL
	R. primer	15µL
PCR water		12µL
Total		**20µL**

الترحيل الكهربائي الهلامي Gel electrophoresis

أجري الترحيل الكهربائي بأستعمال هلام الاكاروز المحضر بنسبة 1.5% تحت فرق جهد 100 فولت وتيار 80 امبير ولمدة ساعة واحدة وذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product.

الكشف عن عوامل الضراوة Detection of virulence factors

انتاج المحفظة Capsule formation

كشف عن انتاج المحفظة وذلك باستعمال تحضيرات الحبر الهندي، أذ مزجت كمية صغيرة من النمو البكتيري المأخوذ من مستعمرة عمرها 24 ساعة مع قطرة صغيرة من محلول الملحي الفسلجي على شريحة زجاجية نظيفة، ثم اضيف للشريحة قطرة من الحبر الهندي ومزجت باستخدام عروة الناقل ووضع فوقها غطاء الشريحة الزجاجي، ترك السائل لينتشر بشكل طبقة خفيفة تحت الغطاء الزجاجي وفحصت الشريحة تحت العدسة الزيتية، ان وجود هالة شفافة حول الخلية البكتيرية غير مصبوغة بالحبر الهندي تعد دليلا على وجود المحفظة(١٤).

اختبار تلازن كريات الدم الحمراء Haemagglutination test

كشف عن تلازن كريات الدم الحمراء باستخدام الطريقة التي وصفها Duguid وجماعته(15)، اذ لقحت انبوبة اختبار حاوية على 5 ملليلتر من المرق المغذي 1% بالعزلة البكتيرية المراد اختبارها وحضنت بدرجة 37 م لمدة 48 ساعة للحصول على اهلاب كثيفة، غسل الدم البشري فصيلة O ثلاث مرات بالمحلول الفسلجي وعلق بنسبة 3%، ثم وضعت قطرة من عالق كريات الدم الحمراء على شريحة زجاجية نظيفة واضيف لها قطرة من المرق المغذي المزروع بالبكتريا المراد اختبارها ورجت الشريحة لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة، ان وجود التماسك دليل على ايجابية الاختبار.

اختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation test

اجري هذه الاختبار للكشف عن قابلية البكتريا على تكوين الأغشية الحيوية، باستعمال طريقة الانابيب Tube method تكون النتيجة الموجبة عندما تتكون الاغشية الحيوية على الجدران الداخلية وقعر الانابيب بشكل طبقة بنفسجية، اذ نقلت المستعمرات النامية للبكتريا الى انابيب أختبار زجاجيه حاوية على وسط Tryptic soy broth المضاف اليه سكر الكلوكوز بتركيز 1% وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة. بعد انتهاء فترة الحضن سكبت العينات وغسلت الانابيب بمحلول الفوسفات الملحي المنظم Phosphate buffer saline ثم جففت وصبغت بصبغة البنفسجي البلوري بتركيز1% ولمدة ثلاث دقائق بعدها سكبت الصبغة الزائدة وغسلت بالماء المقطر الخالي من الايونات بعدها وضعت الانابيب بشكل مقلوب لتجف اذ تتكون الاغشية الحيوية في قعر الانابيب والجدران الداخلية بشكل طبقة بنفسجية (16).

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

أُخضعت جميع نتائج الدراسة للتحليل الإحصائي لمعرفة الاختلافات المعنوية استعمل اختبار مربع كاي Chi-square test لهذا الغرض وقد حددت الاختلافات المعنوية عند مستوى احتمال 5% (17).

النتائج و المناقشة Results and Discussion

اظهرت نتائج زرع 180عينة ادرار وسطي ان 120 عينة (66.66%) من المجموع الكلي اظهرت نمواً بكتيرياً، اما نماذج الادرار التي لم تظهر نمواً جرثومياً فبلغت 60 (33.33%) وقد اوضحت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية من ناحية عدد الحالات الموجبة والسالبة للزرع عند مستوى معنوية ($P<0.05$). شخصت العزلات البكتيرية المسببة لأخماج المسالك البولية وذلك بعد زراعتها وتنقيتها بالاعتماد على الخصائص المزرعية للمستعمرات على الاوساط الصلبة، كما اعتمدت الخصائص المجهرية من خلال الفحص المجهري لمعرفة أشكال الخلايا البكتيرية المعزولة وترتيبها وصبغها بصبغة كرام، بالنسبة للمكورات العنقودية *Staphylococcus* spp. فقد اظهر الفحص المجهري للخلايا المصبوغة بصبغة كرام انها مكورات موجبة لصبغة كرام مرتبة بشكل ازواج او عناقيد، ثم استعملت مجموعة من الفحوصات الكيموحيوية حسب الطرائق التي اوردها MacFaddin (11) وForbes وجماعته (12) وكما هو مبين في الجدول(3).

جدول (٣) الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص البكتريا المعزولة من اخما ج المسالك البولية.

العزلات البكتيرية	الاختبارات الكيموحيوية											
	Gram stain	Catalase	Oxidase	Urease production	Hemolysis	Goagulase	Manitole salt agar	Novobiocin sensetive	IMVC Tests			
									Indol	Citrate utilization	Methyl red	Voges – Proskauer
E.coli	-	+	-	-	+ -	/	/	/	+	-	+	-
S. aureus	+	+	-	+ -	+	+	+	S	/	/	/	/
Klebsiella spp.	-	+	-	+	-	/	/	/	-	+	-	+
Enterobacter spp.	-	+	-	-	-	/	/	/	-	+	-	+
S. haemolyticus	+	+	-	-	+	-	-	S	/	/	/	/
Proteus .mirabilis	-	+	-	+	-	/	/	/	-	+	+	-

تبين النتائج الموضحة في الجدول(٤) الجراثيم المعزولة من اخماج المسالك البولية واعدادها ونسبة تواجدها في النماذج اذ بينت نتائج الزرع ان *E.coli* قد حققت اعلى نسبة عزل 44.17% تلتها *S. aureus* بنسبة 16.67% ثم *Kleibssela* spp. بنسبة 14.17% اما بكتريا *Enterobacter* spp. فبلغت نسبة تواجدها 13.33% والنسبة 8.33% كانت من نصيب بكتريا *Proteus. mirabilis* *بينما كانت نسبة التواجد 3.33% لبكتريا S. haemolyticus*

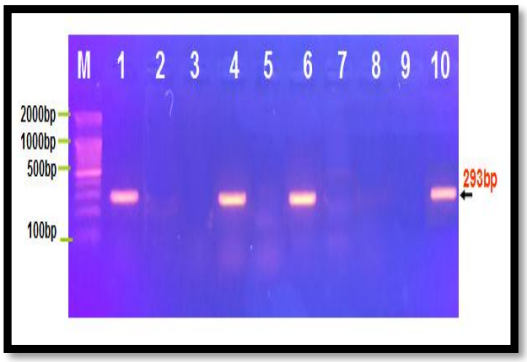
جدول (٤) البكتريا المعزولة من التهابات المسالك البولية.

العزلات البكتيرية	العدد	النسب المئوية%
E.coli	53	%44.17
Staph .aureus	20	%16.67
Kleibsella spp.	17	%14.17
Enterobacter spp.	16	%13.33
Proteus .mirabilis	10	%8.33
Staph .haemolyticus	4	%3.33
المجموع	120	%100

ولما كان الهدف الاساسي من البحث هو التحري عن بكتريا المكورات العنقودية المسببة لالتهاب المسالك البولية لذا تم التركيز على الانواع التابعة لهذا الجنس لتحقيق هدف الدراسة. اذ اظهرت نتائج العزل والتشخيص ان 24 عزلة تعود لجنس المكورات العنقودية توزعت على (20) عزلة وبنسبة (16,67%) تعود لبكتريا *S.aureus* و (4) عزلات بنسبة (3.33%) تعود لبكتريا *S.haemolyticus* من المجموع الكلي للعينات الموجبة للزرع . جاءت هذه النتائج متفقة مع ما حصلت عليه المعيني (18) اذ كانت نسبة عزل بكتريا *S.aureus* من الادرار(16.7%)، كما انها مقاربة للنتيجة التي حصل عليها Aziz (19) اذ بلغت نسبة عزل هذه البكتريا (19.23%). كما جاءت هذه النتائج مقاربة للنتيجة التي توصلت اليها الشمري(20) اذ عزلت بكتريا *S.haemolyticus* بنسبة (4.75%)، كما ان نتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصل اليه Ocokoru وجماعته (21) اذ بلغت نسبة عزل بكتريا S.haemolyticus 2.5%.

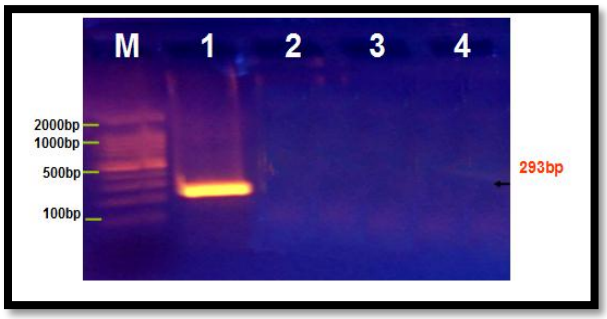
اظهرت النتائج ان كل عزلات بكتريا *S. aureus* و *S. haemolyticus*. قد حللت الدم مظهرياً وبنسبة (100%)، جاءت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه الشمري(20) الذي وجد ان جميع العزلات العائدة لبكتريا *S.aureus* وبكتريا *S. haemolyticus* قد حللت الدم بنسبة 100%، في حين لم تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه العامري (22) اذ وجد ان نسبة 19% من *S. aureus* منتجة للهيمولايسين. اما من الناحية الجينية فقد انتخبت 10 عزلات من بكتريا *S. aureus* لكونها كانت اكثر فعالية ووضوحاً في تحلل الدم لغرض التحري عن الجينات المشفرة لانتاج الهيمولايسين باستخدام تقنية PCR وباستعمال بادئات متخصصة. أذ اظهرت نواتج تضخيم البادئات احتواء جميع العزلات وبنسبة 100% على الجين المشفر لانتاج الهيمولايسين *hlyA* (صورة 1) ، ونسبة 40% من العزلات البكتيرية حاوية على الجين *hlB* (صورة 2)، وجاءت هذه النتيجة مقاربة لما حصل عليه Ariyanti وجماعته (23) أذ ذكروا ان إمراضيه هذه البكتريا تعزى الى انتاجها لانزيم الهيمولايسين اذ وجدوا ان نسبة الجينات المشفرة لانتاج *hlA* كانت (81.18%)، في حين لا تتفق نتائجنا معه فيما يتعلق بنسبة الجين *hlB* اذ وجدوا ان هذا الجين شكل نسبة (18.18%). وكذلك تتفق نتائج هذه الدراسة مع توصل اليه Su'od (24) اذ سجل وجود الجين hly في معظم عزلات *S aureus*. أذ يعد الجين *hlA* عامل الفوعة الرئيسي في التسبب بأمراضية *S. aureus* فهو ينشط ضد مجموعة من الخلايا المضيفة بما في ذلك خلايا الدم الحمراء والخلايا وحيدة النواة والخلايا الظهارية(25). اذ يكون الالفا هيمولايسين hlA مترافقاً مع الحالات السريرية الشديدة عند مرضى التهاب المسالك البولية (26).

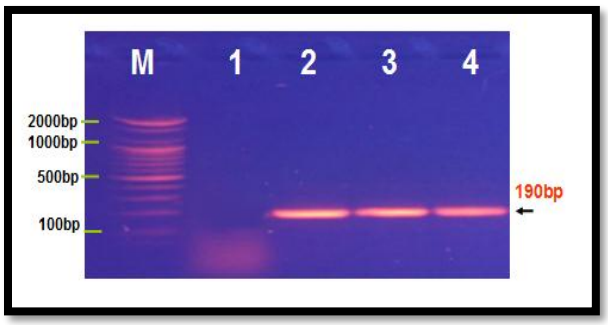
الصورة (١): صورة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز (1.5%) والذي يظهر نتائج فحص الـ PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع *hlyA* في عزلات جرثومة *S.aureus*. حيث يمثل M: Marker (2000-100bp)، الحفر من (1-10) عزلات البكتريا الموجبة للفحص بناتج 190bp.



الصورة (٢): صورة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز (1.5%) والذي يظهر نتائج فحص ال PCR الخاص بالتحري عن الجين الحال للدم من نوع *hlyB* في عزلات جرثومة *S.aureus*. حيث يمثل M: Marker (2000-100bp)، الحفر من (1، 4، 6، 10) عزلات البكتريا الموجبة للفحص بناتج 293bp.

اما بالنسبة لبكتريا *S. haemolyticus* فقد تم التحري عن الجينات المشفرة لانتاج الهيمولايسين *hlA* و *hlB* باستخدام تقنية PCR، أذ اظهرت نواتج تضخيم الجينين احتواء العزلات على الجين المشفر hlA بنسبة (75%)، اما الجين *hlb* فقد شكل نسبة (25 %) (صورة 3). ان وجود الجينات *hla* و*hlb* في المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* والمكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر تكون هامة لهذه العزلات في التسبب بإصابات او عدوى المكورات العنقودية التي تسبب الامراض المختلفة التي تصيب الانسان والحيوان(23).





الصورة (٣) يمثل صور الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز(1.5%) والذي يظهر ناتج فحص الـ PCR الخاص بالتحري عن الجينات الحالة للدم *hlA* و *hlB* في عزلات بكتريا *S. haemolyticus*. حيث يمثل M: Marker (2000-100bp)، الحفر من (2-4) عزلات البكتريا الموجبة لفحص التحري عن *hlA* وبناتج (190Bp)، والحفرة (1) عزلات البكتريا الموجبة لفحص التحري عن *hlB* وبناتج (293bp).

جرى التحري عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها العزلات البكتيرية كما في الجدول (5) اذ اظهرت نتائج الفحص ان 8 عزلات وبنسبة (40%) من *S. aureus* كانت قادرة على انتاج المحفظة وعزلة واحدة وبنسبة (25%) من *S.haemolyticus* لها القدرة على انتاج المحفظة وقد بينت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروق معنوية بينهما عند مستوى (P>0.05)، جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه AL-Rubaey(28) الذين وجدوا ان 42% من *S. aureus* هي قادرة على انتاج المحفظة. كما بينت النتائج الموضحة بالجدول (5) ان *S. aureus* اظهرت قابلية على تلازن كريات الدم

الحمراء بنسبة 30%، في حين لم تعطي العزلات التابعة لبكتريا *S.haemolyticus* اي قابلية على تلازن كريات الدم الحمراء، وقد بينت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى ($P<0.05$) وهذه النتائج مخالفة لنتيجة العزاوي والدليمي (29) اذ لم تظهر عزلاتهم التابعة لبكتريا *S. aureus* القدرة على تلازن كريات الدم الحمراء.

تم اجراء اختبار التحري عن قابلية العزلات البكتيرية على تكون طبقة الغشاء الحيوي كما في الجدول (٥) اذ اظهرت 9 عزلات وبنسبة 45% من *S. aureus* نتيجة موجبة للاختبار، اما فيما يتعلق ببكتريا *S. haemolyticus* فقد اظهرت عزلتان منها فقط القدرة على انتاج الغشاء الحيوي وبنسبة 50%، جاءت نتائج هذه الدراسة فيما يتعلق ببكتريا *S. aureus* ادنى مما توصلت اليه Al-Omari وجماعته (30) اذ وجدوا ان نسبة عزلاتها المنتجة للغشاء الحيوي بطريقة الانبوب بلغت 87.5%، كما ان نتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصل اليه Silva وجماعته(31) اذ وجدوا ان نسبة *S. haemolyticus* المنتجة للغشاء الحيوي بلغت 60%.

جدول (٥) يبين بعض عوامل الضراوة للمكورات العنقودية

العزلات البكتيرية	العدد الكلي	عوامل الضراوة		
		انتاج المحفظة العدد(%)	تلازن كريات الدم الحمراء العدد (%)	انتاج الغشاء الحيوي العدد(%)
S. aureus	20	(40)8 a	(٣٠)6 a	(٤٥) ٩ a
S. haemolyticus	4	(25)1 a	(٠)0 b	(٥٠) ٢ a
المجموع	٢٤	(37.5)٩	(٢٥)٦	(45.8)11

الحروف المتشابهة تشير الى عدم وجود اختلافات معنوية ($P>0.05$).
الحروف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية ($P<0.05$).

نستنتج من هذه الدراسة ان المكورات العنقودية المعزولة من اخماج المسالك البولية ذات قدرة على تحليل الدم مما يعطي معظم سلالاتها ضراوة عالية في الامراضية وان هذه الامراضية المتميزة بتحلل خلايا الدم الحمراء مشفرة جينياً على المستوى الجزيئي.

نوصي بأجراء دراسات اخرى على انواع بكتريا المكورات العنقودية تتضمن تحديد عوامل الضراوة الاخرى مثل قدرتها على انتاج انزيمات Hyalurinidase، Lipase، Leukocidin،Deoxyribonuclase و Collagenase وغيرها. واختبار مقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية وتأثير ذلك على انماط تحلل الدم.

المصادر: References

1-Boyko, E. J.; Fihn, S. D.; Scholes, D.; Abraham, L. and Monsey,B. (2005). Risk of urinary tract infection and asymptomatic bacteriuria among diabetic and nondiabetic postmenopausal women. Am. J. Epidemiol., 161:557-564.

2-Patricia, M. (2014). Bailey and Scott's Diagnostic microbiology.13th ed. Mosby Elsevier. China. pp.1193.

3- Farid, A.; Naz, I; Ashraf,A.; Ali, A.; Rehman, A.; Yasra Sarwar, Y. and Haque, A. (2015). Molecular Detection of Anti-Microbial Resistance in Local Isolates of *Staphylococcus epidermidis* From Urinary Tract Infecyions in Faisalabad Region of Pakistan. EXCLI. J., 14:697-705.

4-Nimmo, G. and Coombs, G. (2008). The Australian society for Microbiology Inc., 29 (3):6-10.

5-Mims, C.; Dockrell, H.M.; Goering, R.E. and Roitt, I. (2004). Medical Microbiology. 3rd ed. Elsevier Limited.

6-Dhakal,B. K. and Mulvey, M. A.(2012). The UPEC Pore-Forming Toxin α-Hemolysin Triggers Proteolysis of Host Proteins to Disrupt Cell Adhesion , Inflammatory, and Survival Pathways. Cell Host & Microbe., 11(1): 58-69.

7-Nielubowicz, G.R. and Mobley, H.L.(2010). Host – pathogen infections in urinary tract infection. Nature Rev. Uro., 7(8): 430 -441 .

8-Ahmed, N.; Dawson, M.; Smith, G. and Wood, E. (2007). Biology of Disease. Taylor & Francis group., pp: 25-41.

9-Carroll, K.C.; Hobden, J.A.; Miller, S.; Morse, S.A.; Mietzner, T.A.; Detrick,B.; Mitchell,T.G.; McKerrow, J.M. and Sakanari, J.A. (2016). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 27th ed. Mc Graw-Hill. New York.

10-Hancock, V.; Dahl, M.and Klemm, P. (2010). Abolition of biofilm formation in urinary tract *Escherichia coli* and *klebsiella* isolates by metal interference through competition for. Fur. Appl. Environ. Microbial., 76(12): 3836-3841.

11-MacFaddin, J.F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3nd ed. the Williams and Wilkins. London.

12-Forbes, B. A.; Daniel, F. S. and Alice, S. W. (2007). Bailey and scott's diagnostic microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier company. USA.

13-Seniror, B. W. and Hughes, C. (1987). Production and properties of haemolysin from clinical isolates of of Proteus. J. Med. Microbiol., 24:17-25.

14-Atlas, R.; Parks, L. and Brown, A. (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology., 1st ed. Mosby. USA.

15-Duguid, J.; Clegg, S. and Wilson, M. (1979). The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. J Med Microbiol., 12: 213-27.

16-Hassan, A.; Usman, J.; Kaleem, Fatima.; Omair, M.; Khalid, A. and Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz. J. Infect. Dis., 15(4): 305-311.

17-Schielfer, W.C.(1980). Statistics for the biological sciences.2nd ed. Addison .Wesley publComp. California. London.

18- المعيني، اسماء محمد سعود. (٢٠٠٦). دراسة كيموحيوية على انزيم البروتيز من بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة محلياً. رسالة ماجستير. معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية. جامعة بغداد. العراق

19-Aziz, S.A. (2013). Bacterial Urinary tract Infection in Diabetic Patients in AL – Najaf City. A thesis. Collage of Medicine. University of Kufa.

20- الشمري، زهراء باسم شاكر. (٢٠١٤). دراسة بكتريولوجية وجزيئية للمسببات البكتيرية المعزولة من مرضى

التهاب المجاري البولية في النجف. رسالة ماجستير. كلية العلوم . جامعة الكوفة. العراق

21-Ocokoru,C.; Onzima, R.; Govule, P. and Katongole, S. (2015). Prevalence and Drug Susceptibility of Isolates of Urinary Tract Infections Among Febrile Under-Fives in Nsambya Hospital, Uganda. Open Science Journal of Clinical Medicine., 3(6): 19

22- العامري، عباس عطية حمودي. (٢٠٠٥). دراسة الاصابات البكتيرية في الجهاز التنفسي لمرضى زرع الكلية. رسالة ماجستير. كلية التربية ابن الهيثم. جامعة بغداد.

23-Ariyanti, D.; Isrina, S.; Salasia, O. and Toto, S.F. (2011).Characterization of hemolysin of *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin. Journal of Biotechnology., 16(1) :32-37.

24-Su'od, A. M. (2005). Biochemical Study of Protease produced From Local Isolate of *Staphylococcus aureus*. Msc. Thesis. Baghdad University. Iraq.

25-Berube, B.J. and Wardenburg, B. J. (2013). *Staphylococcus aureus* alpha-Toxin. Nearly a Century of Intrigue. Toxins (Basel)., 5:1140-1166.

26-Marrs, C.; Zhang, L. and Foxman, B. (2005). *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E.coli* (UPEC) pathotypes. FEMS Microbiol. Lett., 252:183-190.

28- AL- Rubaey, N.K.F.; Sabri, M. and AL-Rubaey, O.K.(2007). Isolation and Charactization of Bacteria from Patients of Conjunctivitis in Hilla.Province. Med. J. Babylon., 4(1): 44-63.

29 - العزاوي، سندس عادل ناجي والدليمي، عباس عبود فرحان. (٢٠٠٧). دراسة بعض عوامل الضراوة في البكتريا الملوثة للحروق. مجلة الفتح. ٢٩: ١- ١٢.

30- Al-Omari, A.W.; Mohamad, A.M. and Raoof, W.M.(2013). Detection of Biofilm Formation in some Pathogenic Bacteria Using Tube and Congo Red Agar Methods. Rafidain Journal of science., 24(6): 55-65.

31-Silva, P.V.; Cruz, R .S.; Keim, L.S.;De Paula, G.R.; Carvalho, B.T.F.; Coelho, L.R.; Carvalho, M.C.D.; Rosa, J.M.C.; Sa Figuriredo, A.M .and Teixeria, L.A. (2013). The antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genotypic profiles of *Staphylococcus haemolyticus* from bloodstream infections. Men .Inst. Oswaldo Cruz. Rio .de. Janeiro., 108 (6): 812-816.

*Detection of phenotypic and molecular fashioned virulence factors of the bacterium *Staphylococcus* spp. Analyst of blood and isolated from urinary tract infections in Diwaniya

Asst. prof. Ali Abed Al-Rahim Al-Nashi **Riyam Wissam Hassan Al- Mansouri**

Department of Biology - College of Education - University of Qadisiyah

Riyamw0@gmail.com

Collected 180 samples of urine from reviewers patients to Diwaniya Teaching Hospital and Women's Hospital and children education in the city of Diwaniya, for the period from 01/09/2015 until 31/01/2016 and both sexes, To isolate the bacterium *Staphylococcus* spp. that causes inflammation of the urinary tract and to determine the virulence factors phenotypic and molecular, It found that the rate of 120 (66.66%) samples gave moral growth of bacteria, while 60 increased by (33.33%) a negative sample. It has been found that the isolation of 24 belonging to the bacteria *Staphylococcus* spp. Distributed on 20 isolated by (16.67%) belonging to the bacteria *Staphylococcus aureus* and 4 isolates by (3.33%) belonging to the bacteria *Staphylococcus haemolyticus* of the total samples positive for culture, The isolates producing hemolysin and hemolytic has included all isolates of *Staph. aureus* and *Staph. haemolyticus*, Using polymerase chain reaction technique (PCR) proved that genes *hlB* and *hlA* exist in bacteria *Staphylococcus* spp. They encoded to produce hemolysin as it was characterized by all isolates of *Staph. aureus* analyst blood its proximity to the gene *hlA* by (100%) and the gene *hlB* by (40%), when you make detection of genes hemolysin in *Staph. haemolyticus* appears having gene *hlA* the rate of (75%) and gene *hlB* which increased by 25%. The investigation of some virulence factors associated with pathodenicity of bacterial isolates analyst for the blood which included the formation capsule, agglutination of red blood cells and the production of biofilm. produced isolates *Staph. aureus* and *Staph. haemolyticus* capsule (40%, 25%) respectively the results of statistical analysis showed no significant differences between them at the level of ($P > 0.05$), As for the ability of the isolates the agglutination of red blood cells marked by *Staph. aureus* ability to events agglutination and by (30%) while the all isolates of *Staph. haemolyticus* unable to events agglutination the results of statistical analysis showed that there were significant differences at the level ($P<0.05$). also showed bacterial species, an analyst for the blood the ability to produce biofilm at different rates, As it reached isolates producing biofilm ratio (45% and 50%) of bacteria *Staph. aureus* and *Staph. haemolyticus* respectively.

Key words: *Staphylococcus* spp. , Urinary tract infections, Hemolysin genes, virulence factor.

*The Research is a part of on M.Sc. thesis in the caso of the second researcher.

بسم الله الرحمن الرحيم

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية / كلية العلوم
مجلة القادسية / العلوم الصرفة
هيئة التحرير

جمهورية العراق

MINISTRY OF EDUCATION
& SCIENTIFIC RESERG
UNIVERSITY OF AL-QADISIYA
COLLAGE OF SCIENES
JOURNAL OF AL-QADISIYA
PURE SCIENES
EDITION BOARD

العدد: ٢٠٤/٤٩٠٨

التاريخ ١٧/ ١١ / ٢٠١٦

استمارة قبول البحث والنشر

إلى /السيد علي عبد الرحيم المحترم / الست ريام وسام حسن المحترمة
جامعة القادسية / كلية التربية

م/ قبول نشر

نهديكم أطيب التحيات :-
تدارست هيئة التحرير البحث المقدم من قبلكم والموسوم :

التحري عن الطراز المظهري والجزيئي لعوامل الضراوة لبكتريا المكورات العنقودية Staphylococcus spp. المحللة للدم والمعزولة من التهابات المسالك البولية في الديوانية

وبعد الاطلاع على أراء المقيمين تقررت في جلستها المرقمة / المنعقدة \ \ ما يلي :-

- قبول البحث في المجلة وسوف ينشر في المجلد / العدد / لسنة . في إعداد القادمة
- إجراء التعديلات المقترحة من قبل المقيمين وإعادته ألينا للبت به بشكل نهائي .
- رفض البحث لعدم صلاحية نشره في المجلة .

أ. د فؤاد منحر علكم
رئيس التحرير
/ / ٢٠١٦