

Isolation and molecular characterization of some pathogenic skin bacteria

Dr. Omiema Nasser*

Dr. Imad Alhadad**

Dr. Tamim Hammad***

Hassn Aldali****

(Received 10 / 8 / 2023. Accepted 5 / 12 / 2023)

□ ABSTRACT □

Three types of skin bacteria were isolated and profiled from pathological samples received at Tishreen University Hospital in Lattakia Governorate during the period from (1/4-1/10/2022), and the bacterial isolates were distinguished by some characteristics based on their staining by the Gram method, and according to the color characteristics on the Specific and selective cultures, some biochemical properties and PCR technology.

The results showed the isolation of two types of cocci, and these isolates are (A) *Staphylococcus aureus* type and (B) *Staphylococcus epidermidis*, Gram-positive and type (C) *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-negative, during an incubation period that lasted (24-72) hours. And that at a temperature of (37) °C.

Key words: Skin bacteria, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* , Polymerase chains reaction (PCR), Analytical Profile Index, pathological samples .



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

* Professor , Higher Institute for Environmental Research in Tishreen University. Lattakia, Syria

** Professor , Faculty of Pharmacy , Al-Baath University, Homs, Syria.

*** Professor , faculty of Pharmacy , Tishreen University, Lattakia, Syria

****PhD student Higher Institute for Environmental Research in Tishreen University. Lattakia, Syria

hassnaldali@tishreen.edu.sy

عزل بعض الجراثيم من الجلد وتوصيفها جزيئياً

- د. أميمة ناصر*
د. عماد حداد**
د. تميم حماد***
حسن عصام الدالي****

(تاريخ الإيداع 10 / 8 / 2023. قبل للنشر في 5 / 12 / 2023)

□ ملخص □

تم عزل وتتميط ثلاثة أنواع من الجراثيم المعزولة من الجلد من عينات مرضية واردة إلى مشفى تشرين الجامعي في محافظة اللاذقية خلال الفترة الممتدة من (2022/10/1-4/1)، وميزت العزلات الجرثومية ببعض الخصائص اعتماداً على تلوينها بطريقة غرام، وتبعاً للخصائص اللونية على المستنبتات النوعية والانتقائية وبعض الخصائص الكيميائية الحيوية (API) وتقانة الـ PCR.

بينت النتائج عزل ثلاثة أنواع من الجراثيم وهذه العزلات هي (A) المكورات العنقودية الذهبية، والنوع (B) المكورات العنقودية البشرية، والنوع (C) عصيات القيق الأزرق (الزائفة الزنجارية)، عصيات سالبة صبغة غرام، وذلك خلال فترة حضانة استمرت (24-72) ساعة، وذلك عند درجة حرارة (37) مئوية.

الكلمات المفتاحية: جراثيم معزولة من الجلد، المكورات العنقودية البشرية، المكورات العنقودية الذهبية، الزائفة الزنجارية، التفاعل التضخمي التسلسلي (PCR)، تقانة API، عينات مرضية.

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



* أستاذ - المعهد العالي لبحوث البيئة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

** أستاذ - كلية الصيدلة - جامعة البعث - حمص - سورية.

*** أستاذ - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

**** طالب دكتوراه - المعهد العالي لبحوث البيئة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية hassnaldali38@tishreen.edu.sy

مقدمة:

يعد الجلد خط الدفاع الأول يحمي الجسم من المؤثرات الخارجية، يعيش على الجلد عدد من الميكروبات، تختلف أنواعها تبعاً لمكان وجودها في الجلد، ويمكن أن يصل تعداد مستعمرات الجراثيم الهوائية من المناطق الرطبة مثل الإبط إلى 10^7 خلية/سم²، في حين قد تحتوي المناطق الجافة مثل الساعد أو الذراع على 10^2 خلية/سم² أو أقل من الجراثيم لكل سم²، كما توجد الجراثيم اللاهوائية أيضاً على جلد الإنسان، حيث يصل تعداد المستعمرات الجرثومية إلى 10^6 خلية/سم² (Grice and Segre, 2011; Hannigan, 2015). وبالرغم من أن العديد من أنواع الجراثيم تُلامس الجلد أو تستقر عليه، تبقى غير قادرة على إصابة الإنسان بالعدوى عادة عندما تحدث الإصابة بالعدوى الجرثومية الجلدية، والتي تتعلق بمناعة الجسم، والعوامل البيئية، والفوعة المرضية لهذه الجراثيم، يُمكن أن يتراوح حجم العدوى بين بضع صغيرة جداً إلى إصابة تُغطّي كامل سطح البدن، وكذلك الأمر بالنسبة إلى خطورتها، فهي تتراوح بين حالة غير مؤذية إلى حالة تُشكّل تهديداً على الحياة (Harris et al., 2002). تحدث حالات العدوى البكتيرية الجلدية عندما تدخل البكتيريا البدن عبر جُريبات الشعر، أو الشقوق الصغيرة في الجلد، والتي تتجمّع عن الخدوش والثقوب والجراحة، والحروق وسعفات الشمس، عضّات الحيوانات أو لسعات الحشرات والجروح، والاضطرابات الجلدية الموجودة مسبقاً، يمكن أن يُصاب الأشخاص بعدوى جرثومية في الجلد عند مشاركتهم في مجموعة متنوعة من الأنشطة، مثل البستنة في التربة الملوثة أو السباحة في بركة أو بحيرة أو محيط ملوثة (Scharschmidt and Fischbach, 2013)

الجراثيم المدروسة**المكورات العنقودية البشرية *Staphylococcus epidermidis***

هي جراثيم لاهوائية اختيارية، غير متحركة، تخمر الغلوكوز لاهوائياً، غير قادرة على تشكيل الأبواغ، إيجابية الكاتالاز، تتوضع بشكل تجمعات كروية تشبه عنقود العنب، إيجابية صبغة غرام، غير حالة للدم DNase، سلبية المخثران، وغير قادرة على تخمير المانيتول، هي من الفلورا الطبيعية للجلد والأغشية المخاطية عند الإنسان وبعض الحيوانات. تترافق انتانات هذه الجراثيم مع الأعضاء الصناعية بشكل عام، حيث تتظاهر بإنتان دم، وانتانات بولية وجلدية، مثل التهابات الفثرة في المسالك البولية تؤدي إلى التهاب المسالك البولية الخطيرة وإفراز القيح، يصبح التبول مؤلماً للغاية تصيب بشكل أساسي مضعفي المناعة، ولدى متعاطي الأدوية عن طريق الحقن الوريدية، وتكتسب الغنتانات في مراكز الرعاية الصحية، تشمل عوامل الفوعة قدرتها على تشكيل بيوفيلم من خلال إنتاجها لمركبات سطحية ومركبات خارج خلوية تحفز ارتباط الجراثيم وادمصاصها على السطوح البلاستيكية للأجهزة الصناعية (Caio et al., 2014).

المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*

خلايا كروية الشكل إيجابية صبغة غرام، تتجمع على هيئة عناقيد عشوائية، غير متحركة وغير محاطة بمحفظة، ولا تشكل أبواغاً وأغلب الأنواع لا هوائية اختيارياً، الدرجة المثلى للحرارة بين (35-37) درجة مئوية، إيجابية الكاتالاز، والأكسيداز، تكون على وسط الآغار المغذي صفراء ناعمة لامعة، يستخدم وسط MSA (manitol salt agar) لعزل العنقوديات، حيث تحول العنقوديات الذهبية لون الوسط المغذي من أحمر إلى أصفر، فهي تخمر سكر المانيتول، تفرز سموماً تسبب تفكك الكريات الحمراء، أي تمتلك خاصية تحلل الدم من النمط بيتا، وتظهر حولها على الآغار المدمى هالات صافية نسبياً، وهي إيجابية المخثران، تسبب العنقودية الذهبية الأمراض من خلال غزو النسيج وإنتاج السموم، حيث تدخل موقع الإنتان من خلال الفتحات، أو جروح الجلد بما في ذلك جروح العمليات الجراحية أو تأكل الجلد. تعدّ الخراجات المكونة من جراثيم وكريات دم بيضاء محاطة بأنسجة وفيبيرين هي نموذجية ووصفية لإنتانات العنقوديات

(Bosi, 2016). تسبب المكورات العنقودية الذهبية التهابات القيحية والخراجات، الجروح والحروق، يمكن للجراثيم أن تنتشر بواسطة التلامس مع القيح الصادر من جرح ملتهب، أو عن طريق التلامس، أو مع أدوات تم استعمالها من قبل أشخاص مصابين، مثل الأقمشة والأغطية والملابس والأدوات الرياضية، قد تنتقل الجرثومة عبر الدم إلى الرئتين، العظام، الكبد، الدماغ والقلب. تنتج عدداً من السموم والمركبات التي تترافق مع أنواع محددة من الانتانات، وتطرح هذه المركبات من الخلايا الحية إلى النسيج المحيطة خارج الخلية، تكون الانتانات غالباً قيحية تترافق مع إحممرار، وذمة وترفع حروري في المنطقة المصابة، تعد إنتانات الجلد الأكثر شيوعاً بالعنقوديات الذهبية، وتندرج شدة الإصابة من الدمامل، والتهاب الجريبات الشعرية (الجلجل)، والتهاب النسيج الخلوي (البثور)، ويصل إلى التهاب النسيج الرخوة (القوباء، الدمامل، العد الشائع، متلازمة الجلد المحروق) (Harris et al., 2002; Singh et al., 2014).

عصيات القيح الأزرق (الزائفة الزنجارية) *Pseudomonas aeruginosa*

جراثيم واسعة الانتشار، هي أكثر الجراثيم إمرأضاً للبشر، ومسؤولة عن أحماج شديدة معقدة للمعالجة، وتشكل (10-20)% من أحماج المشافي (Alves et al., 2015)، وكثيراً ماتصيب المصابين بالأورام والحروق الشديدة، أو المصابين بعوز مناعي، تعيش هذه التربة في المياه والتربة، وتفضل الأوساط الرطبة، كما توجد بشكل طبيعي، ولكن بكميات قليلة في الأنبوب الهضمي للإنسان والحيوان، كما يمكن أن توجد على سطح الجلد السليم، ولذلك تكون مسؤولة عن التقيحات الجلدية عند الإصابة بالجروح (Gupta and Garg, 2017). هي إيجابية الأكسيداز، لاتخمر الغلوكوز، ولاتحرر الأندول، لاتطلق غاز كبريت الهيدروجين H_2S ، تصطنع الكاتالاز. تنمو على الأوساط العادية، وتعطي مستعمراتها رائحة اللوز، أو رائحة زهر المشمش تنمو على وسط سيمون سترات، وتفرز صبغ أزرق Pyocyanine وصبغ أخضر Pyoverdine.

يمكن أن تصيب هذه الجراثيم أي نسيج، أو أي عضو في الجسم، وتحدث آفات موضعية نتيجة لفاذ الجرثوم عبر الجلد، إذ تسبب تهيج وتقرحات جلدية، والتهاب الأنسجة الرخوة، والتهاب الجروح وتلوثها وتقيحها، ويكون لون القيح أزرق إلى أزرق مخضر، إذ تسبب عدوى جلدية خطيرة، يمكن أن تستمر هذه العدوى لفترة طويلة إذا لم يتم علاجها بشكل صحيح، مما يؤدي إلى تفاقم الأعراض وتفتي العدوى إلى مناطق أخرى من الجسم، ويمكن أن تنتشر من الخمج الموضعي إلى الدم مؤدية إلى إنتان دموي، وتصل نسبة الوفيات عند حدوث إنتان دموي إلى (80%)، كما تسبب التهاب المجاري البولية والتناسلية، التهاب الأذن، إنتانات معوية، وتسبب التهاب قرنية العين لدى مضعفي المناعة (Singh et al., 2015). إذ تتميز هذه الجراثيم بقدرتها على إنتاج مجموعة واسعة من الإنزيمات والسموم التي تسهم في تدمير الخلايا الحية والنسيج، وتعزز الاستجابة الالتهابية في المنطقة المصابة. كما أنها تنتج مادة البيوفيلم، وهي عبارة عن إفرازات جرثومية خارجية من طبيعة متعددة السكاريد تفرزها الجراثيم وتغطي بها سطحها الخارجي كوسيلة دفاعية تساعدها في حماية نفسها من العوامل المؤثرة الخارجية، وفي مقاومة الصادات الحيوية (Hill et al., 2005; Zolfaghari et al., 2015; Nicholas et al., 2018; Deziel et al., 2020)

أهمية البحث وأهدافه

أهمية البحث:

تنتشر الكثير من الجراثيم الممرضة الانتهازية في المستشفيات ودور الرعاية الصحية وحدات العناية المركزة، وتؤدي في كثير من الحالات لمشكلات صحية خطيرة عند الإنسان.

يواجه الأشخاص المرضى وذوي المناعة المنخفضة العدوى بهذه المسببات الممرضة، ويؤدي ذلك لمضاعفات شديدة تتزامن بانتانات جلدية وأمراض جهازية يصعب علاجها مع ظهور حالات المقاومة للصادات الحيوية. تتطلب عملية تشخيص هذه العدوى وأمراضها، تحديد العامل المسبب بأسرع وقت لاتخاذ الإجراءات العلاجية المناسبة، وبعد تمييز العزلات الجرثومية المنتشرة في هذه البيئات والمسببة للأمراض المرافقة من الأهداف الهامة، لأنها تكشف خصائص وميزات الجراثيم الممرضة وعوامل الفوعة، وتسهم في تحديد الصادات الحيوية المؤثرة عليها.

أهداف البحث:

- عزل بعض أنواع الجراثيم من الانتانات الجلدية في العينات الواردة إلى مشفى تشرين الجامعي.
- تمييز الجراثيم المعزولة باستخدام تقنية PCR.

طرائق البحث ومواده

1-أخذ العينات:

جمعت العينات المرضية من الانتانات الجلدية الواردة إلى مشفى تشرين الجامعي في محافظة اللاذقية، بهدف عزل الجراثيم منها وتوصيفها.

2- الطرائق التقليدية لتصنيف العزلات الجرثومية:

صنفت الجراثيم وفق الطرائق التقليدية اعتماداً على الخواص الشكلية (عصوي، كروي)، ونمط التجمع (مفرد، ثنائي، سلسلي)، ونمط تخمير السكريات، بالإضافة إلى دراسة هذه الجراثيم على أوساط مغذية عامة ونوعية وانتقائية مثل Blood agar, Macconkey Agar, Motility Agar, Nutrient Agar, Nutrient Broth) بطريقة صبغة غرام، وبعد الحصول على مستعمرات نقية تم انتقاء مستعمرات مفردة، وأجري لها اختبارات كيميائية حيوية وفق مجموعة التحليل التشخيصي Staph, API Analytical Profile Index، وحضنت بدرجة حرارة (37) درجة مئوية لمدة (24) ساعة، وتمت مراقبة النتائج لمدة (72) ساعة إضافية للتأكد من عملية التخمر، وبالاعتماد على دليل بيرجي (Cowan, 1974; Cappuccino et al. 1996; Garrity et al., 2004; Garrity et al., 2005)

3- الطرائق الحديثة لتصنيف السلالات الجرثومية المعزولة:

تعتمد الطرائق الحديثة لتصنيف الجراثيم على محتوى هذه الجراثيم من الأحماض النووية DNA وتسلسلها، وتتمتع هذه الطريقة بدقة أكبر في تمييز الجراثيم، والتي تمتلك تنوعاً واختلافاً كبيرين في المادة الوراثية يساعدان في تمييزها عن بعضها، حيث يتم ترحيل المادة الوراثية للجراثيم على هلامية ويطبق عليها ضمن الرحلان الكهربائي (gel-electrophoresis) بعد القيام بعملية تضخيم مورثي لمورثة محافظة (Harris et al., 2002).

3-1- استخلاص الـ DNA الجينومي البكتيري:

- استنبت مستعمرة بكتيرية معزولة في وسط الاستنبتات في الدرجة 37°م، ليلة كاملة.
- أخذ 1.5 مل من المستنبت البكتيري وثقل لمدة 20 ثانية بسرعة 9000 rpm.
- وضع فوق الراسب البكتيري 500 مكل من موفي الـ TE وأضيف 50 مكل من الليزوزيم (10 ملغ/مل).
- رج المزيج جيداً ثم ترك لمدة ساعتين في حمام مائي، في الدرجة 37°م.
- ترك ليلة كاملة في الدرجة 50°م.

- أضيف 25 مكل من البروتيناز K (20 ملغ/مل)، وحضن المزيج في الدرجة 37°م لمدة ساعة.
- أضيف 25 مكل من الـ SDS (25%) مع الحضن لمدة ساعة.
- أضيف 200 مكل من الـ NaCl (5 مول).
- أضيف 750 مكل من المزيج فينول-كلوروفورم مع المزج الجيد.
- ثقل المزيج بسرعة 13000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق.
- أضيف إلى الطافي (الحاوي على المادة الوراثية) 450 مكل من الإيزوبريانول وثقل المزيج بسرعة 13000 دورة/د لمدة 45 دقيقة. أضيف إلى الراسب 1 مل من الإيتانول 70%.
- ثقل المزيج بسرعة 13000 rpm لمدة 5 دقائق في الدرجة 4°م، ثم ترك الراسب حتى يجف.
- أضيف 20 مكل من موقى الـ TE وحفظ المزيج في المجمدة لحين الاستخدام. (Caio *et al.*, 2014; Green and Sambro, 2017).

2-3- الـ PCR:

حضر مزيج تفاعل الـ PCR بحجم نهائي 25 ميكروليتر وفق الآتي:
 (0.2 mM dNTPs, 1 μ l; Primer 5`20 Pmol/ μ l, 1 μ l; Primer 3`20 Pmol/ μ l, 1.5 μ l; MgSO₄)
 ؛(50mM, 0.2 μ l; High fidelity DNA polymerase 5 U, 1X Buffer 10X, H₂O; up to 25 μ l
 ومزج بشكل جيد. أضيف إلى المزيج 100 ng/ μ l من الـ DNA الجينومي المُستخلص. تم التضخيم وفق برنامج الـ PCR الذي يتألف من خمس وثلاثين دورة ، كما هو مُوضح في الجدول (1).

الجدول (1) البرنامج الزمني المستخدم في تفاعل التضخيم

	Steps	Temperature	Time
	Initial denaturation	95	3 min
35 cycle	Denaturation	95	45 sec
	Annealing	52-60	45 sec
	Extension	72	1 min
	Final extension	72	10 min
	Hold	4	∞

3-3- تصميم المرئسات:

تم تصميم المرئسات لمورثة من المورثات المدروسة في جينوم بعض العوامل الممرضة، كما هو موضح في الجدول (2)، وذلك بالمقارنة مع تسلسل هذه المورثة في عدة أنواع جرثومية باستخدام برامج حاسوبية متخصصة (اسم البرنامج، Bioinformatics)، حيث تم تصنيع هذه المرئسات بمخابر هيئة الطاقة الذرية السورية (Morgan *et al.*, 2014; Xiaojuan *et al.*, 2016)

الجدول (2) المرئسات المستعملة في تفاعل التضخيم المورثي

<i>Pseudomonas</i> sp.	GACGGGTGAGTAATGCCTA	16S rDNA	618	54
	CACTGGTGTTCCTTCCTATA			
<i>P. aeruginosa</i>	TTCCCTCGCAGAGAAAACATC	algDGDP	520	52
	GCGATTGATGGTGATACGGTT			
<i>Staphylococcus</i> sp.	GGAATTCAAAGKAATTGACGGGGGC	16S rDNA	479	60
	CGGGATCCCAGGCCCGGGAACGTATTCAC			
<i>Staph. aureus</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT	nuc	270	52
	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC			
	TTTCGCCTTATTTACTTGG			

النتائج والمناقشة:

1- نتائج الزرع الجرثومي والفحص المجهري:

بينت النتائج ظهور جراثيم العينات المرضية على الأوساط المغذية الانتقائية والنوعية، مثل وسط تشابمان والأبوزين أزرق الميتيلين (EMB)، بعد ذلك وبهدف تنمية الجراثيم عليها تم اعتماد تلوينها بطريقة صبغة غرام، حيث تبين أن السلالة الجرثومية الأولى المعزولة (A) هي عبارة عن مكورات عنقودية إيجابية لصبغة غرام، والسلالة الجرثومية الثانية (B) مكورات عنقودية إيجابية صبغة غرام، بينما السلالة الجرثومية الثالثة (C) هي عصيات سالبة صبغة غرام.

2- نتائج اختبارات API للعزلات الجرثومية:

يبين الجداول (3)،(4)،(5) اختبارات مجموعة التشخيص التحليلي API التي تم إجراؤها للعزلات الجرثومية الثلاث.

الجدول (3) الاختبارات الكيميائية الحيوية للعزلة الجرثومية (A)

Colony diameter >5 mm in 48h	Pigment	Aerobic Growth	An-aerobic Growth	Growth at 15 °C	Growth at 45 °C	10% NaCl	15% NaCl
+	+	+	+	+	+	+	+
VP	Arginine	Urea	Coagulase-rabbit plasma	Esculine	Gelatine	Catalase	Oxidase
+	+	+	+	-	+	+	-
Fructo	Galacto	Gluco	Glycer	Lacto	Malto	Mannito	Manno
+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalo	Xylo	Arabino	Cellobio	Raffino	Sucro	Nitrate	Hemolysis
+	-	-	-	-	+	+	+

تم عزل المكورات العنقودية الذهبية وتتميطها تبعاً لاختبارات API. Staph، كما هو موضح في الجدول (4)، وبذلك توافقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة (Badri *et al.*, 2014) التي سجلت انتشار هذه الجرثومة داخل أقسام المشفى، وخاصة أقسام الجراحة، كما توافقت مع نتائج (Jansen, 2013) وتسببها للعديد من الأمراض الجرثومية كالتهاب الجروح والحروق، والدمامل، والتهاب الشغاف، والتهاب المجاري البولية.

الجدول (4) الاختبارات الكيميائية الحيوية للعزلة الجرثومية (B)

Colony diameter >5 mm in 48h	Pigment	Aerobic Growth	An-aerobic Growth	Growth at 15 °C	Growth at 45 °C	10% NaCl	15% NaCl
-	-	+	+	-	+	+	-
VP	Arginine	Urea	Coagulase-rabbit plasma	Esculine	Gelatine	Catalase	Oxidase
+	+	+	-	-	+	+	-
Fructo	Galacto	Gluco	Glycer	Lacto	Malto	Mannito	Manno
+	+	+	+	+	+	-	+
Trehalo	Xylo	Nitrate	Cellobio	Sucro	Arabino	Raffino	Hemolysis
-	-	-	-	+	-	-	-

تم عزل المكورات العنقودية وتميؤها تبعاً لاختبارات API. Staph، كما هو موضح في الجدول (5)، والشكل (4) وبذلك توافقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة (Caio *et al.*, 2014). التي سجلت انتشار هذه الجرثومة في معظم حالات الجروح وتقرحات الجلد في الحالات المرضية الواردة إلى المشفى.

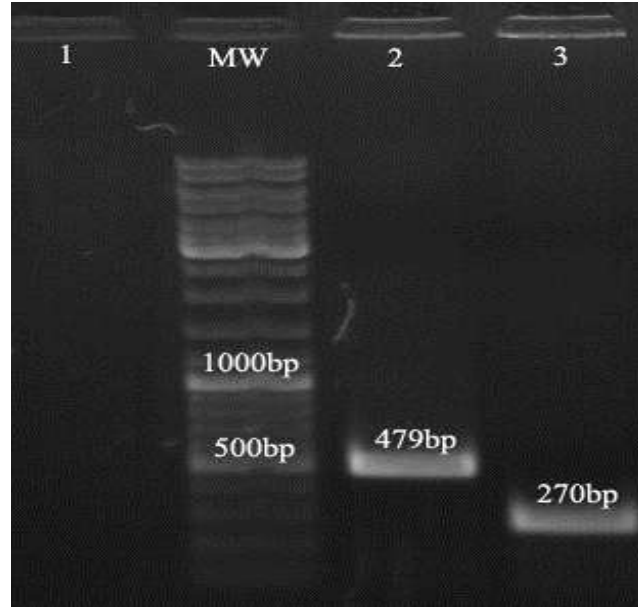
الجدول (5) الاختبارات الكيميائية الحيوية للعزلة الجرثومية (C)

Motility	Hemolysis	Fluorescent	Growth at 4 °C	Growth at 41 °C	Growth on MacConkey	Arginine	H2S
+	+	+	-	+	+	+	-
Ornithine	Esculine	Gelatine	Catalase	Urea	Oxidase	Acetate	Arabino
-	-	+	+	+	+	+	-
Glycero	Gluko	Inosito	Malto	Mannito	Manno	Sorbito	Sucro
+	+	-	-	+	-	-	-
Starch	Indol	Nitrate	Citrate	Fructo	Trehalo	Xylo	
-	-	+	+	+	-	-	

تم عزل الزائفة الزنجارية وتميؤها تبعاً لاختبارات API، كما هو موضح في الجدول (5)، وبذلك توافقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة (Singh *et al.*, 2015). التي سجلت تواجد هذه الجرثومة في معظم حالات تقبج الجلد في بعض الحالات المرضية الواردة إلى المشفى.

3- نتائج الطرائق الحديثة لتصنيف السلالات الجرثومية المعزولة:

أظهرت نتائج تحليل نواتج تفاعل البلمرة التي أجري تفاعل PCR للعينات الجرثومية باستخدام مرشحات لمورثات محافظة ضمن الجنس وهي مورثة 16srDNA للجنس *Staphylococcus* حسب (Mignard & Flandrois, 2006)، إذ تعد هذه المورثة قاعدة تحدد أماكن ارتباط البروتينات الريبوزومية، كما أن لها دور في بدء عملية تركيب البروتينات وتساهم في ربط تحت الوحدين 30s و 50s بالتالي تم التأكيد على أن العزلة الجرثومية (A) هي *Staphylococcus aureus* والعزلة الجرثومية (B) هي *Staphylococcus epidermidis*، كما هو مبين في الشكل (1)، وبذلك توافقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة كل من Singh وآخرون (2014)، ودراسة Caio وآخرون (2014). والعزلة الجرثومية (C) *Pseudomonas aeruginosa*، وبذلك توافقت مع Zolfaghari وآخرون (2015)، كما هو موضح في الشكل (2).



الشكل (1): المسار 1: شاهد سلبي، المسار 2: عزلة *Staphylococcus sp.*، المسار 3: عزلة *Staph. aureus*، المسار MW: واسم جزيئي معياري 100 bp.



الشكل (2): المسار 1: عزلة *Pseudomonas sp.*، المسار 2: عزلة *P. aeruginosa*، المسار MW: واسم جزيئي معياري 100 bp.

الاستنتاجات والتوصيات:

- 1- تم عزل وتنميط الجراثيم الآتية: (A) *Staphylococcus aureus*، (B) *Staphylococcus epidermis*، (C) *Streptococcus pyogenes* من العينات المرضية المختبرة في مشفى تشرين الجامعي نتيجة عمليات الزرع والتلوين والاختبارات البيوكيميائية (API).
- 2- تم تأكيد تنميط العزلات في اختبار البلمرة المتسلسل PCR.
- 3- تعد تقانة PCR من أفضل وأدق الطرائق في تحديد المحتوى الجيني وتغيراته عند تشخيص الجراثيم الممرضة.

Reference

1. Alves P, Bernardo M, Pereira L. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms establishment in different materials used in endotracheal tubes. Rev Port Pneumol, 21(1):3-9.
2. Badri, R.M. (2014). Identification and Characterization of Bacteria Air Pathogens from Homes in Some Areas of the Baghdad City. International Journal of Advanced Research, Vol. 2, No. 6, 384- 388.
3. Bosi, E. (2016). Comparative genome-scale modelling of *Staphylococcus aureus* strains identifies strain-specific metabolic capabilities linked to pathogenicity. Proc. Natl Acad. Sci. USA 113, E3801–E3809.
4. Caio Fernando De Oliveira; Thiago Galvão Da Silva Paim; Keli Cristine Reiter; Alexandre Rieger; And Pedro Alves D'azevedo. (2014). Evaluation of Four Different and Extraction Methods in Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. Jan-Feb.Vol. 56, No.1, 29–33.
5. Cappuccino, James And Sherman, Natalie. (1996). Microbiology: a laboratory manual 5th.
6. Cowan, S. T. (1974). Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd edn. Cambrid, ge: Cambridge University Press. London.
7. Deziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R. (2020). Arhl is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. Microbiology (Reading).146 . P (11):3237-3249.
8. Garrity G. M.; Bell J. A. And Lilburn T. G. (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition, Springer, New York Berlin-Heidelberg, 401.
9. Garrity G. M.; Brenner D. J.; Krieg N.R.; Staley J. T. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, USA, 2nd Edition, Vol. 2, P. 1-1135.
10. Garrity G. M.; Bell J. A. And Lilburn T. G. (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition, Springer, New York Berlin-Heidelberg, 401.
11. Garrity G. M.; Brenner D. J.; Krieg N.R.; Staley J. T. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, USA, 2nd Edition, Vol. 2, P. 1-1135.
12. Green MR, Sambro J. (2017). Isolating Dna From Gram-Negative Bacteria. Cold Spring Harb Protoc. Jan 3;2017(1).
13. Grice, E. A. & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. Nat. Rev. Microbiol. 9, 244–253.
14. Gupta V, Garg R. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* infections in children: Epidemiology, diagnosis and management. Indian J Pediatr. 84(8):588-596. doi:10.1007/s12098-017-2315-5
15. Hannigan, G. D. (2015). The human skin double-stranded dna virome: topographical and temporal diversity, genetic enrichment, and dynamic associations with the host microbiome. mBio 6, e01578-15 (2015).
16. Harris, G.; Foster, S.J.; Richards I, R.G. (2002). An Introduction to *Staphylococcus aureus*, and Techniques for Identifying and Quantifying *S. aureus* Adhesins In Relation to Adhesion to Biomaterials. European Cells and Materials, Vol. 4, P. 39-44.

17. Hill D, Rose B, Pajkos A. (2005). Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. J Clin Microbiol. 43(10):5085-5090.
18. Jansen, K. U., Girgenti, D. Q., Scully, I. L. & Anderson, A. S. (2013). Vaccine review: “*Staphylococcus aureus* vaccines: problems and prospects”. Vaccine 31, 2723–2730.
19. Mignard S; Flandrois Jp. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial 626 identification: a 30-month experiment. J Microbiol Methods. Vol. 67, 574-581.
20. Morgan F, Kevin M, and Jane L.(2014). Designing PCR Primers Painlessly .J Microbiol Biol Educ. 15(1): 28–29.
21. Nicholas. M, M.; Brahmchetna B. And Ruxana .T, S. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. Am J Respir Cell Mol Biol. Vol. 58, No. 4, 428–439.
22. Scharschmidt, T. C. and Fischbach, M. A. (2013). What lives on our skin: ecology, genomics and therapeutic opportunities of the skin microbiome. Drug Discov. Today Dis. Mech. 10, e83–e89.
23. Singh, G.K.; Bopanna, B.D.; Rindhe, G. (2014).Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* - human pathogen from clinical samples by RAPD markers. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci, Vol. 3, No. 2, P. 349-354.
24. Singh, I.; Jaryal, S.C.; Thakur, K.; Sood, A.; Grover, P.S.; Bareja, R. (2015). Isolation and Characterization of Various *Pseudomonas* species from Distinct Clinical Specimens. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences, Vol. 14, No. 6P. 80-84.
25. Xiaojuan Yang , Jumei Zhang , Shubo Yu , Qingping Wu, Weipeng Guo, Jiahui Huang and Shuzhen Cai. (2016.). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Retail Ready-to-Eat Foods in China. Front. Microbiol. 7:816.
26. Yuan, S., Cohen, D. B., Ravel, J., Abdo, Z. & Forney, L. J. (2012). Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. PLoS ONE 7, e33865.
27. Zolfaghari PS, Packer S, Singer M, Nair SP, Bennett J, Street C. (2015). Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and antibiotic resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 34(10):1969-1975.

