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

الكشف المظهري والجزيئي لتكوين الأغشية الحيوية في المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* المعزولة سريرياً

رسالة مقدمة الى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة
لمياء خالد محمد

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى 2002

بإشراف
أ. م. د. علي جعفر سليم

2023 م **1445 هـ**

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Diyala
College of Education for Pure Science
Biology department

Phenotypic and Molecular Detection of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates

A Thesis

Submitted to the Council of College of Education for Pure Science, University of Diyala in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree of Science in Biology

By

Lameaa Khalid Muhammad

B.Sc. Biology
University of Diyala 2002

Supervised By

Assist. Prof
Dr. Ali Jaffar Saleem

2023 AD **1445 AH**

1. المقدمة Introduction

تعد المكورات العنقودية الذهبية واحدة من أهم الكائنات المجهرية المرضية التي تشارك في العدوى المكتسبة من المستشفيات (hospital acquired infection (HAI والمكتسبة من المجتمع (community acquired infection (CAI (Miller واخرون، 2020). لقد كانت ولا تزال من مسببات الأمراض و سببًا رئيساً للوفاة في المستشفيات. فضلاً عن تسببها بالعدوى المجتمعية، إذ تشمل العديد من الالتهابات السريرية منها: تجرثم الدم، والتهابات العظام المفصلية، والالتهابات الرئوية، والتهابات الجلد، والتهاب الشغاف المعدي، فضلاَ عن بعض الأمراض، بما في ذلك خراج فوق الجافية، والتهابات المسالك البولية urinary tract infection (UTI)، ومتلازمة الصدمة السامة، والتهاب الأذن الوسطى، والتهاب السحايا (Rasheed وآخرون، 2020). تُعرف المكورات العنقودية الذهبية بأنّها تنتج مجموعة واسعة من عوامل الضراوة مثل السموم المعوية enterotoxins، وانزيمات تحلل الدم Hemolysins، والبروتينات اللاصقة السطحية surface protein adhesins، وعوامل أخرى تسهل بدء عملية المرض والتهرب المناعي وتدمير أنسجة المضيف، والتي تساهم في نوع وشدة عدوى المكورات العنقودية (Cheung وآخرون، 2021).

إنّ قابلية المكورات العنقودية الذهبي المكونة للغشاء الحيوي لها دور كبير في إمراضيه البكتريا. تُكون المكورات العنقودية الذهبية بُنية معقدة من الأغشية الحيوية خارج الخلية التي توفر بيئة آمنة وعملية تمامًا لتشكيل المستعمرات الدقيقة Microcolonies، وتغذيتها، وإعادة استعمار الخلايا اللاطئة sessile cells بعد انتشارها. يحمي الغشاء الحيوي خلايا المكورات العنقودية الذهبية من الظروف غير الملائمة، مثل التغيرات في

درجة الحرارة، ونقص العناصر الغذائية، والجفاف، والأهم من ذلك، أنه يحمي الخلايا من تأثير المضادات الحيوية (Idrees وآخرون، 2021). أصبحت الادوية غير فعالة بشكل متزايد جزئيًا أو كلياً ضد المكورات العنقودية الذهبية لعدم قدرة المضادات الحيوية على إختراق الأغشية الحيوية المحيطة بالخلايا البكتيرية. وقد ساهم هذا التحمل المتزايد للمضادات الحيوية في ظهور وتطور المقاومة للمضادات الحيوية، كما أنّ للأغشية الحيوية أدوار أُخرى، مثل التهرب من الجهاز المناعي المضيف الفطري، والتي تؤدي إلى التهابات مزمنة، والقدرة على التكيف من خلال تطور الجينات وتبادل المواد الوراثية، (Idrees وآخرون، 2021).

تشارك العديد من الجينات التي تملكها هذه البكتريا في إنتاج الأغشية الحيوية وصيانتها، وأكثرها دراسة على نطاق واسع هي جينات الالتصاق بين الخلايا (intracellular adhesion)، (Tang وآخرون، 2013). يتم التوسط في تركيب polysaccharide intracellular adhesin (PIA) بوساطة موقع الالتصاق بين الخلايا intracellular adhesion locus (ica)، والذي يشتمل على أربع جينات أساسية، وهي *icaA*، و *icaD*، و *icaB*، و *icaC*، فضلاً عن الجين التنظيمي regulator (*icaR*). تقوم هذه الجينات بالتشفير إلى البروتينات المقابلة ICAA، و ICAD، و ICAB، و ICAC. يتم تسهيل إنتاج المادة اللزجة من خلال التعبير المشترك لجينات *icaA*، و *icaD*. لم يتم توضيح دور *icaB* بشكل كامل ، لكن *icaC* يعمل كمستقبل للسكريات receptor for polysaccharide (Atshan وآخرون، 2012). لقد ثبت أن السلالات التي تحتوي على جينات icaADBC هي منتجة محتملة للأغشية الحيوية . فضلاً عن ذلك، يعدُّ البروتين المرتبط بالأغشية الحيوية ica أمرًا حيويًا

للارتباط الأساسي primary attachment بتكوين الغشاء الحيوي في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية (Bissong و Ateba، 2020).

وتهدف الدراسة الى الكشف المظهري عن قدرة المكورات العنقودية الذهبية على انتاج الاغشية الحيوية ومقاومتها المتعددة للمضادات و الكشف الجزيئي عن اوبرون icaABCD، وحسب الخطوات الاتية:

1. عزل المكورات العنقودية الذهبية من عينات مختلفة (حروق، وجروح، وادرار، ودم، واذن)، وتشخيص المكورات العنقودية الذهبية مظهرياً وجينياً بوساطة جين *16S rRNA* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).
2. تحديد حساسية عزلات المكورات العنقودية الذهبية لأنواع مختلفة من المضادات الحيوية، والتحليل الشجيري Dendogram لحساسية البكتيريا للمضادات الحيوية.
3. الكشف عن قدرة البكتيريا على إنتاج الغشاء الحيوي بثلاث طرائق (وسط احمر الكونكو وطريقة الانابيب وطريقة اطباق المعايرة الدقيقة).
4. الكشف الجزيئي لجينات *icaA، icaB، icaC، icaD* التي تساهم في إنتاج الغشاء الحيوي.

Summery

About one hundred ninety (190) clinical samples were collected from different sources (wounds, burns, urine, ear and blood) for patients with various infections from Baquba Teaching Hospital, the Consulting Clinic and Al-Batoul Teaching Hospital in Diyala Governorate for the period from September 15/ 2022 to December 15/ 2022. The primary diagnosis was made by culturing on blood agar medium, and mannitol salt agar as a selective medium. The samples were cultivated on the appropriate culture media by streaking method and according to the phenotypic and biochemical examinations as well as molecular tests to ensure their purity and diagnosis. , In addition to that, the bacteria cells appeared under the microscope to be spherical in shape, clustered in the form of grape clusters, after staining them with gram stain, which facilitated the initial isolation of this bacteria, as well as its fermentation for mannitol sugar, and biochemical tests such as oxidase and catalase. Fifty (26%) isolates of *Staphylococcus aureus* were diagnosed and isolated. The isolates were molecularly identified using the *16S rRNA* gene, and the results showed that all of these isolates were 100% carriers of the gene.

All *Staphylococcus aureus* isolates were investigated for antibiotic sensitivity, using the disc diffusion method. The isolates under test showed a high resistance 100% to Oxacillin (OX), while resistance rates to Chloramphenicol (C), Nitrofurantoin (F), Azithromycin (AZM), Vancomycin (VA), Clindamycin (DA), Trimethoprime-sulfamethoxazdle (TME), Gentamicin (CN), Rifampin (RA), Doxycycline (DOX), Ceftaroline (FEP), and Teicoplanin (TEC) were 16%, 4%, 92%, 4%, 60%, 72%, 44%, 48%, 44%, 80%, 42% respectively. The Dendogram were analyzed for bacterial antibiotic sensitivity. The ability of *S. aureus* isolates to produce various

virulence factors, such as: hemolysin, biofilm, and coagulase, was investigated. All the isolates under study were coagulase producers and showed β-hemolysis. The results also showed that 29 (58%) of the isolates produced biofilm on Congo red medium, while all isolates were 100% biofilm producer using micro-titer plate method. The ability of *S. aureus* of five isolates from different sources (one isolate from each source) to biofilm formation was examined using expired blood and plasma, and the results showed that all five isolates were 100% biofilm producers on blood and plasma of all blood groups. The blood group O was the highest in productivity, followed by the A and B groups, while the AB blood group was the weakest in productivity.

Twenty four (24) isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* bacteria, which showed multi-drug resistance by disc method were selected for genetic detection of the presence of biofilm genes, including intracellular adhesion (ica) genes, which are within the biological operator icaABCD using multiplex polymerase chain reaction (PCR). The detection results showed that 20 out of 24 isolates under study 83%, were carriers of the *icaA* and *icaB* genes, and the percentage of the *icaC* gene in the isolates was 17 (70%), as well as the rate of *icaD* gene in the isolates under study was 19 (79%). DNA sequencing of *16SrRNA* gene was conducted for a number of isolates, and the results revealed the presence of a number of Point mutations.