

الكشف مظهريا وجينيا عن أهم عوامل الضراوة لبعض أنواع البكتيريا المعزولة من أظافر الأطفال المصابين بالإسهال

أ.د محمد نظير معروف
جامعة تكريت / كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

اريج منصور زعيان
جامعة تكريت / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

الخلاصة

جُمِعَت 120 عينة من أظافر الأطفال المصابين بالإسهال تحت سن خمس سنوات ، تم الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج بعض عوامل الضراوة مظهرياً والتي شملت ، Hemolysin ، *Staphylococcus aureus* ، *Biofilm* ، *Urease* ، *Lipase* ، *Lecithinase* ، *Protease* للدم ومكونة للغشاء الحيوي ومنتجة لليوريز واللايبيز واللسثينز بنسبة بلغت 64 % ، 50 % ، 78 % ، 31 % ، 35 % على التوالي ، اما *Escherichia coli* فكانت محللة للدم بنسبة 28.6 % ومكونة للغشاء الحيوي بنسبة 42.9 % ومنتجة لليوريز بنسبة 71.4 % ، اما *Pseudomonas aeruginosa* فكانت منتجة للهيمولايسين والغشاء الحيوي والبروتيز واللايبيز بنسبة 100 % ومنتجة لليوريز بنسبة 33.3 % واللسثينز بنسبة 66.6 % . اظهرت نتائج الكشف عن جين *hla* المسؤولة عن تشفير Hemolysin في بكتريا *Staph.aureus* بنسبة 66.6 % ، بينما كانت نسبة وجود الجين *ndvB* المسؤولة عن التشفير لتكوين *Biofilm* في بكتريا *E.coli* بنسبة 50 % ، كما تم الكشف عن جينات *plcH* ، *pelA* ، المسؤولة عن تشفير Hemolysin ، *Biofilm* ، في بكتريا *P.aeruginosa* والتي ظهرت بنسبة 100 % ، 100 % على التوالي .
الكلمات المفتاحية : البكتريا المسببة للإسهال ، جينات الضراوة ، عوامل الضراوة .

Phenotype and Genotype Detection About the most Important Virulence Factors For Some Bacteria Species which isolated from Children's Nails infected with Diarrhea

Areej M. Zaiean 1 ، Prof.Dr. Mohammed N.Maarroof 2
1 Tikrit University / College of Science , Biology Department
2 Tikrit University / College of Education for pure Sciences , Biology Department

Abstract:

collection 120 samples from children's nails infected with Diarrhea under the age of five. The ability of Bacterial isolates to product some virulence factors , including hemolysin , biofilm , urease , lipase , lecithinase , protease ,showed that *Staphylococcus aureus* was producing hemolysin ,biofilm , lipase and lecithinase rate 64%, 50%, 78%, 31%, 35% respectively , while *Escherichia coli* was producing hemolysin within 28.6%, biofilm 42.9%, urease 71.4%, *Pseudomonas aeruginosa* was producing hemolysin , biofilm , protease and lipase within 100%, urease 33.3%, lecithinase 66.6%. The results showed that the percentage of *hla* gene responsible for the encoded of hemolysin in *staph.aureus* 66.6% ,while percentage of *ndvB* gene responsible for the encoded of *Biofilm* in *E.coli* rate 50%,respectively, and also evaluated the presence of virulence gene *plcH* ,*pelA* responsible for the encoded of Hemolysin , *Biofilm* in *P.aeruginosa* rate 100%,100% respectively.

Keywords: Diarrheal bacteria ,Virulence genes , Virulence factors.

المقدمة

ان الامراض التي تنتقل عن طريق الأغذية تساهم في انتشار الأمراض والوفيات للإنسان بالإضافة الى تكاليف العناية الصحية [1,2]. الأيدي هي وسيلة رئيسية لنقل الميكروبات المختلفة بما في ذلك الأنواع المعوية [3]، تحدث الأصابات المختلفة عن طريق اليدين والأظافر nails وتلعب الأيدي الملوثة دوراً رئيسياً في انتقال الأمراض عن طريق الفم والبراز [4]، ويعد تلوث اليدين البرازي أحد الطرق المهمة التي يتعرض لها الأطفال للإصابة بالأمراض البكتيرية [5]. تؤدي العادات غير الصحية لمعظم الناس الى أصابات مختلفة عن طريق اليدين والأظافر nails. ترتبط 80 ٪ من الأمراض بسوء النظافة المنزلية والشخصية [6]. يعد غسل اليدين قبل أعداد الطعام فرصة مهمة بشكل خاص للوقاية من الإسهال في مرحلة الطفولة، يستلزم غسل اليدين بعد التغوط وقبل تناول الطعام بمعدل 32 غسلًا لليدين يومياً ويستهلك 20 لتراً من الماء يومياً [7]، يؤدي غسل اليدين بالصابون إلى تقليل خطر الإصابة بأمراض الإسهال بنسبة 42-47 ٪ [8]. يعتبر الإسهال Diarrhea من المشاكل الطبية الخطيرة والواسعة الانتشار في العالم اذ يكون الاطفال الذين تتراوح اعمارهم بين شهر - خمس سنوات هم الأكثر عرضة لهذا المرض ولا سيما الاطفال الرضع الذين هم بين ستة اشهر - سنتين [9]. تفرز البكتيريا ما يسمى بعوامل الضراوة Virulence factor لاحداث المرض ، والتي تدمر الخطوط الدفاعية للمضيف، ومنها أنزيم Protease الذي يحلل الروابط الببتيدية Peptide bonds وبالتالي يمكن ان تتحلل البروتينات والببتيدات [10] ،

وكذلك افرازها لإنزيم الهيمولايسين الذي يحلل أغشية الخلايا عن طريق تكوين ثقب Pore former ، والذي يهاجم خلايا الدم الحمراء erythrocyte، ويعتبر من السموم الخارج خلوي Exotoxin [11] ، والتصاق البكتيريا على السطح الحيوي او الغير حيوي ومغلقة في مصفوفة رطبة من البروتينات والسكريات والأحماض النووية من خلال تكوينها الغشاء الحيوي Biofilm [12,13] ، بالإضافة إلى إفرازها الأنزيم المحلل لليوريا Urease [14].

المواد وطرائق العمل

- جمع العينات Collection of Samples

تم جمع 120 عينة من عينات الأظافر المأخوذة من الأطفال المصابين بالإسهال دون السنة الخامسة من كلا الجنسين المراجعين إلى مستشفى صلاح الدين العام للمدة من بداية شهر أيلول 2018 إلى نهاية تشرين الثاني 2018 .

- التشخيص Identification

الفحص المظهري Morphological examination

تم تحديد المستعمرات البكتيرية المعزولة بحسب الشكل واللون وتجمعها على وسط اكار الماكونكي ونوع انحلال الدم على وسط أكار الدم [15] .

الفحص المجهرى Microscopic examination

تم استخدام الفحص المجهرى لتصنيف البكتيريا إلى كروية وعصوية وإلى بكتيريا سالبة لكرام أو موجبة لكرام . على أساس تصبيغها بصبغة كرام، وحجمها ، وشكلها ، وترتيب الخلايا [15]

الاختبارات البايوكيموحيوية Biochemical tests :

[16,17]

اختبار الكاتاليز، اختبار الأوكسيدز، اختبار الأندول، اختبار الميثيل الأحمر، اختبار الفوكس

نشاطاً لا تعطي نتيجة إلا إذا تركت لمدة 3 أيام أو أكثر ، واستعمل الاختبار للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم اليوريز الذي يحلل اليوريا إلى أمونيا وثاني أكسيد الكربون، حيث إن الأمونيا ترفع الرقم الهيدروجيني للوسط [15].

التحري عن إنتاج الأنزيم الهاضم للبروتين Protease
تم عمل حفر ثقوب بواقع 4 ثقوب للطبق الواحد، إذ تم عمل الثقوب بواسطة ثاقب فليني معقم بقطر 5 ملم ، وتم رفع أقراص الأكار وتم هملها . تم أخذ بواسطة ماصة دقيقة Micro pipette 0.1 مل من مزروع البكتريا وتم وضعها في الحفرة ، وحضنت الأطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ولحظ حول الحفر مناطق التحلل ، تم استخدام وسط [19] Skim milk agar.

التحري عن إنتاج أنزيم الليسين Lecithinase
تم تلقيح وسط مح البيض Egg Yolk agar بالبكتريا المعزولة، وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24-48 ساعة ، أن تكون مناطق رائقة حول المستعمرات النامية تدل على فعالية أنزيم الليسين [16].

التحري عن إنتاج أنزيم اللايباز Lipase
بعد تلقيح وسط مح البيض Egg Yolk agar بالبكتريا ، وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24-48 ساعة، تم غمر الطبق لمدة 20 دقيقة بمقدار كافٍ من محلول مشبع بكبريتات النحاس (CUSO₄)، بعد ذلك تم إزالة المحلول الفائض ، وجفف الطبق لمدة 30 دقيقة في الحاضنة، وإن ظهور لون أزرق مخضر حول مناطق النمو يدل على تحلل الدهون بواسطة أنزيم اللايباز [16].

- بروسكاور، اختبار استهلاك السترات ، اختبار اليوريز ، اختبار الحركة ، اختبار تخمر السكريات ، اختبار أنزيم التجلط. وقد شملت العينات البكتيرية 112 عينة اعطت نمواً بكتيريا من مجموع العينات الأجمالي .

تشخيص العزلات بنظام Vitek 2 compact system
استعمل نظام Vitek 2 compact system لتأكيد تشخيص العزلات ، إذ يستخدم لتشخيص البكتريا الموجبة والسالبة لكروم من خلال عدد Kit خاص بالنظام ، ويحتوي هذا kit على 64 ثقبا ويوجد فيها وسط جاف وبطاقة تشخيص لونية تحدث فيه الاختبارات البايوكيميائية ويدون الجهاز التغير في اللون .

التحري عن عوامل الضراوة

Determination of Virulence Factor

تم التحري عن بعض عوامل الضراوة والتي شملت : Hemolysin ، Urease ، Protease ، Biofilm ، Lipase ، Lecithinase باستخدام الاوساط الزرعية المختبرية المختلفة.

التحري عن إنتاج الأنزيم المحلل للدم Hemolysin
تم زرع البكتريا على أطباق أكار الدم Blood agar plate المحتوية على دم الإنسان ، وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ، وبعد الاختبار إيجابياً عند ظهور منطقة الانحلال حول المستعمرة [18].

التحري عن إنتاج أنزيم اليوريز Urease Test
أجري الاختبار بتلقيح مائل أكار اليوريا بالبكتريا ، بطريقة الطعن والتخطيط ، وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 37 م، وبعد الفحص إيجابياً عند تغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي ، وإن العزلات المحللة لليوريا تحول بسرعة لون الوسط إلى الوردي خلال 2-3 ساعة ، أما العزلات الأقل

- التحري عن تكوين الغشاء الحيوي Detection of Biofilm Formation

طريقة الأنبوب Tube method

تم إجراء هذه الطريقة وفقاً [20]، وهي طريقة نوعية لاكتشاف الأغشية الحيوية، تم تلقيح البكتريا المعزولة في 10 مل مرق Trypticase Soy Broth في أنابيب الاختبار، ثم حضنت الأنابيب بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة، وبعد التحضين تم صب الأنابيب وغسلها بمحلول ملحي بالفوسفات (PH 7.3) وتجنيفها ثم تصبيغها بال violet 0.1% ثم غسل الصبغة الزائدة بالماء منزوع الأيونات، ثم جففت الأنابيب في وضع مقلوب، ثم تم تسجيل نتائج الاختبار لطريقة الأنبوب وفقاً لنتائج سلالات التحكم، وتم اعتبار تكوين الغشاء الحيوي موجباً عندما يكون الغشاء واضحاً ويصطدم بالجدار وأسفل الأنبوب.

عزل الدنا البلازميدي Plasmid DNA Isolation

تم استخدام عدة استخلاص DNA المجهزة من شركة (Promega, USA) في عزل DNA البلازميدي للعضلات البكتيرية.

البادئات Primers

استخدمت البادئات النوعية كما مبين بالجدول (1) في تحديد تسلسل جينات *Hla* في بكتريا *S.aureus* و *ndvB* في بكتريا *E.coli* و *plcH* و *pelA* في بكتريا *P.aeruginosa* لعوامل الضراوة قيد الدراسة وهي Hemolysin، Biofilm.

تحضير خليط تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

استعمل PCR master mix المجهاز من شركة Promega، حضر تفاعل PCR لكل بادئ بحجم 25 مايكروليتر حسب تعليمات الشركة المجيزة لل PCR master mix كما مبين في الجدول (2) ووضع مزيج التفاعل في أنابيب خاصة بتفاعل PCR بحجم 200 مايكروليتر ثم نبذت في جهاز الطرد المركزي centrifuge لمدة 7 ثواني لترسيب قطرات تفاعل PCR الموجودة على جدار الأنبوب، ثم وضعت الأنابيب الحاوية على خليط التفاعل في جهاز PCR وضبط الجهاز على البرنامج الخاص لكل primer كما موضح في الجدول (3).

جدول (1): تسلسلات البادئات المستخدمة

Prim- er	Virulence factor	Nucleotide sequences (5' - 3')	Bacteria contain- ing the gene	Amplic on size (bp)	Refer- ences
Hla	Hemolysin	F:GGTTTAGCCTGGCCTTC R:CATCACGAAGCTCGTTCG	Staph . aureus	500	[21]
ndvB	Biofilm	F:GGACAGGGCAAGGTTTATT R:GGTTATACTCAGCAGCACTATC	E.coli	463	Original
PlcH	Hemolysin	F:GCACGTGGTCATCCTGATGC R:CCAGTAGGCGTCGACGTAC	P.aerugi- nosa	608	[22]
PelA	Biofilm	F:CTGGAACAGCCAGGTAATG R:CGGCTTGACCTTGAGTTT	P.aerugi- nosa	950	[23]

جدول (2) : مكونات تفاعل PCR Master mix

ت	المكونات	الحجم (25 مايكروليتر)
1	Forward primer	1 مايكروليتر
2	Reverse primer	1 مايكروليتر
3	DNA template	2 مايكروليتر
4	Master mix	12.5 مايكروليتر
5	Distill water	8.5 مايكروليتر

جدول (3) خطوات تفاعل البلمرة المتسلسلة لكل primer

Primer	Cycles	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extention
Hla	30	94°C / 5min	94°C / 45sec	50°C / 45sec	72°C / 60sec	72°C / 7min
ndvB	35	95°C / 3min	95°C / 45sec	57°C / 60sec	72°C / 60sec	72°C / 7min
plcH	30	94°C / 3min	94°C / 30sec	55°C / 60sec	72°C / 60sec	72°C / 5min
pelA	35	95°C / 5min	95°C / 30sec	50°C / 30sec	72°C / 30sec	72°C / 7min

النتائج والمناقشة

الكشف عن عوامل الضراوة

Virulence Factor

تم استخدام الأوساط الزرعية للكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج بعض عوامل الضراوة وهي: -انزيم الهيمولايسين Hemolysin enzyme الذي يحلل كريات الدم الحمراء ، أنزيم اليورير Urease الذي يحلل اليوريا الى أمونيا وثنائي أوكسيد الكربون ، وهضم البروتينات من خلال إنتاج إنزيم protease اذ تم التحري عنه في بكتريا *P.aeruginosa* فقط ، انزيم اللستينيز

وبعد انتهاء وقت التفاعل رفعت العينات من جهاز PCR ورحلت بأستخدام Electro phoresis ، ثم اخذ 5 مايكروليتر من DNA المتضاعف ومزج مع 3 مايكروليتر من محلول التحميل ووضع في حفر هلام الأكاروز بتركيز 1.5 ٪ وأضيف الدليل الحجمي marker ويضبط عند فرق جهد 45 فولت / سم وتيار 60 أمبير / سم لمدة 10 دقائق ثم ضبطت عند فرق جهد 120 فولت / سم وتيار 200 أمبير / سم لمدة 45 دقيقة ، وبعد ذلك فحص الهلام بجهاز عارض الهلام Gel Documentation وهذا الجهاز مجهز بكاميرا لتصوير النتائج.

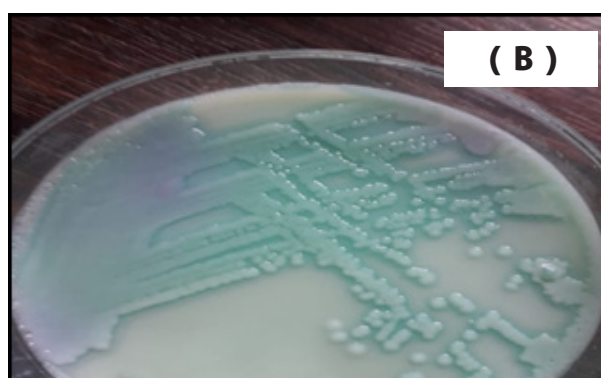
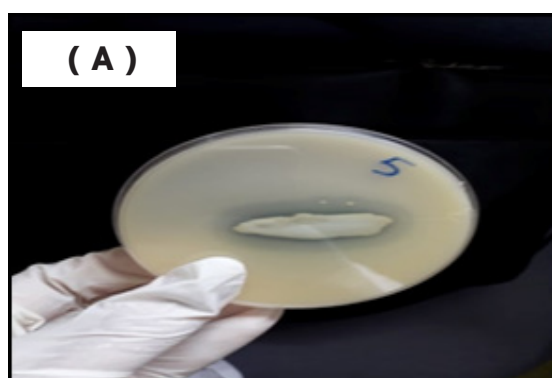
واللايبيز اللذان تم التحري عنهما باستخدام وسط
اكار صفار البيض ، اذ تقوم البكتريا المنتجة لانزيم
اللسثيز بتحليل الدهون المفسفرة في أغشية الخلايا
مما يؤدي الى تحلل النسيج وموته ، اما البكتريا
المنتجة لانزيم اللايبيز فتعمل على تحطيم الدهون
مما يسهل على البكتريا اختراق أنسجة الجلد ،
وماتحت الجلد . انتاج الغشاء الحيوي كما مبين في
الجدول (4).

جدول (4): الأعداد والنسب المئوية لقابلية العزلات البكتيرية
قيد الدراسة على انتاج بعض عوامل الضراوة

أنواع البكتريا المعزولة	العدد الكلي	% Virulence factor					
		Hemolysin هيموليسين	Biofilm	Protease	Urease	Lipase	Lecithinase
Staph.aureus	50	(64)32	(50)25	/	(78)39	(62)31	(70)37
E.coli	7	(28.6)2	(42.9)3	/	(71.4)5	0)0	(0)0
P.aeruginosa	3	(100)3	(100)3	(100)3	(33.3)1	(100)3	(66.6)2

وبنسبة 50 ٪ مكونة للغشاء الحيوي و 39 وبنسبة
78 ٪ منتجة لليوريز كما تبين انها منتجة لأنزيمي
اللايبيز واللسثيز بنسبة 62 ٪ ، 70 ٪ وبواقع 35 ،
31 على التوالي كما في الصورة (1).

أظهرت نتائج التحري عن عوامل الضراوة
للعزلات البكتيرية ان 32 عزلة وبنسبة 64 ٪ من
عزلات *Staph.aureus* محللة للدم و 25 عزلة

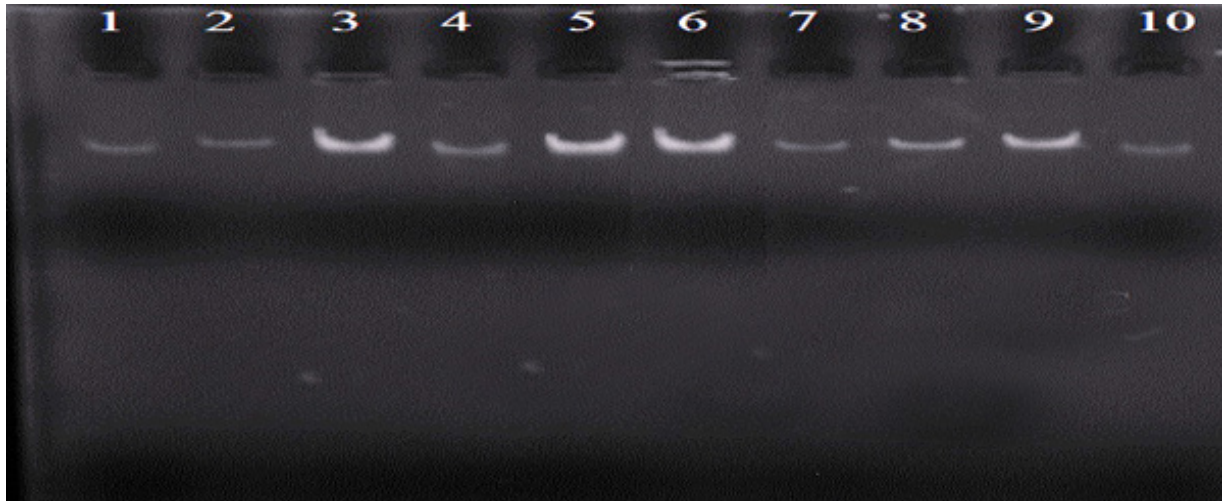


صورة (1) انتاج عوامل الضراوة من قبل بكتريا *Staph.aureus* (A) Lecithinase. Lipase (B).

لصبغة كرام للتحري عن جينات عوامل الضراوة والتي تضمنت أربع عزلات من بكتريا *E.coli* وثلاث عزلات لكل من بكتريا *Staph. aureus* و *P.aeruginosa* ، بإستخدام عدة Kit الأستخلاص الجاهزة، وتم التأكد من عزل الحامض النووي DNA البلازميدي بترحيل العينات على هلام الأكاروز بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي Electro-phoresis كما في الصورة (2)، تم أستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للتحري عن الجينات المسؤولة عن التشفير لعوامل الضراوة وهي الهيمولايسين *Hla* في بكتريا *Staph. aureus* والغشاء الحيوي *ndvB* في بكتريا *E.coli* والهيمولايسين *plch* والغشاء الحيوي *pelA* في بكتريا *P.aeruginosa* .

اما بكتريا *E.coli* فقد اظهرت قدرتها على انتاج انزيمات الهيمولايسين والغشاء الحيوي واليوريز بنسبة 28.6 % ، 42.9 % ، 71.4 % على التوالي وسالبة لباقي عوامل الضراوة . كما اظهرت النتائج ان جميع عزلات *P.aeruginosa* منتجة لكل من انزيم الهيمولايسين والغشاء الحيوي والبروتيز واللاييز بنسبة 100 % ومنتجة لانزيم اليوريز بنسبة 33.3 % وبواقع عزلة واحدة ومنتجة لانزيم اللستين بنسبة 66.6 % وبواقع عزلتين .

التحري عن جينات عوامل الضراوة بأستخدام تقنية التضاعف السلسلي لانزيم بلمرة الدنا تم استخلاص الدنا البلازميدي لعشرة عزلات مختلفة من البكتريا الموجبة والسالبة



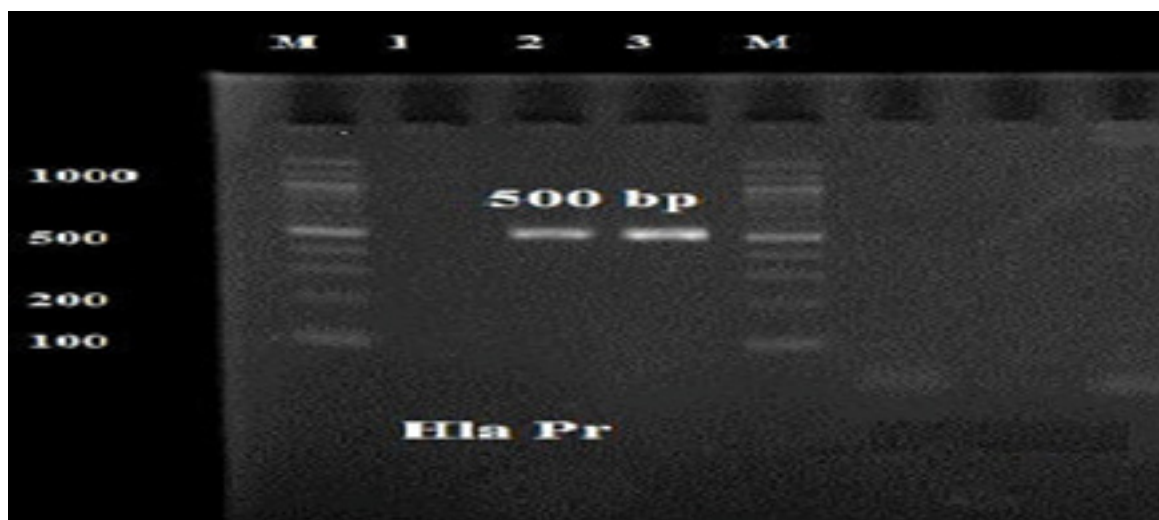
صورة (2) : الترحيل الكهربائي لد DNA البلازميدي للعزلات البكتيرية .

- | | |
|-------------------|------------------|
| P.aeruginosa - 2 | P.aeruginosa - 1 |
| E.coli - 4 | P.aeruginosa - 3 |
| E.coli - 6 | E.coli - 5 |
| Staph.aureus - 8 | E.coli - 7 |
| Staph.aureus - 10 | Staph.aureus - 9 |

كما في الصورة (3). ووجد بنسبة (81.18 %) من قبل [24] ، وهذا يعني ان بعض عزلات *Staph. aureus* المعزولة من الأظافر لها القدرة على تحليل الدم مما يجعلها أكثر ضراوة وقدرة على إحداث التهابات شديدة لدى المرضى ، حيث ينشط جين *hla* ضد مجموعة من الخلايا المضيئة بما في ذلك كريات الدم الحمراء والخلايا وحيدة النواة ، إذ يكون هذا الجين مترافقاً مع المرضى [25].

التحري عن جين *hla* المشفر لإنتاج الهيمولايسين في بكتريا *Staph. aureus*

تم الكشف عن جين *hla* المسؤول عن إنتاج الهيمولايسين في بكتريا *Staph. aureus* بحجم جزيئي 500 bp وتم ضبط Annealing Temperature عند درجة 50 م. رحل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل على هلام الأكاروز وظهرت حزم البادىء في عزلتين وبنسبة (66.6 %).

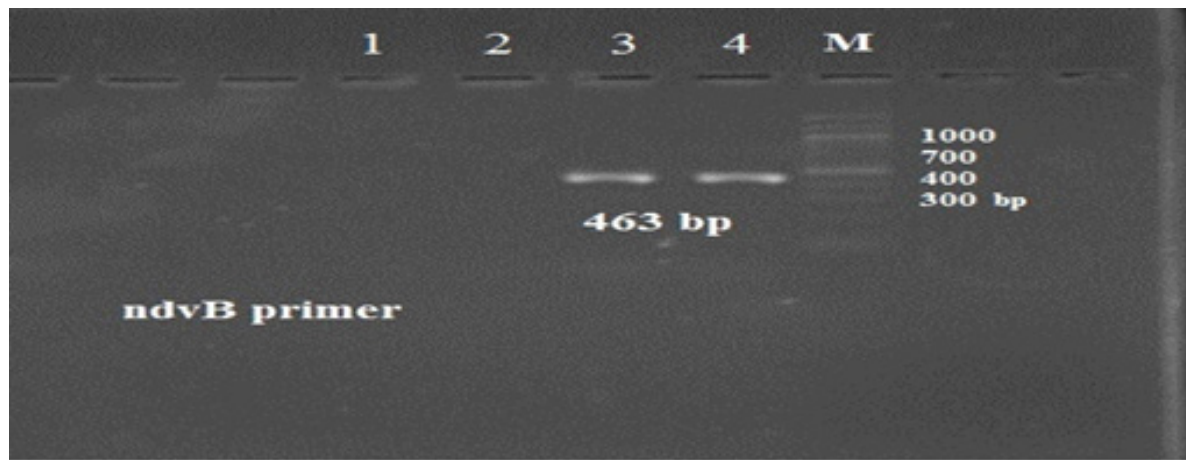


صورة (3) : الترحيل الكهربائي لتضخيم PCR لجين *hla* في بكتريا *Staph. aureus* على هلام الأكاروز بتركيز (1.5 %) .

من الجينات المهمة إذ يشفر لأنتاج الغشاء الحيوي إذ يعتبر واحد من أهم عوامل الضراوة التي يمتلكها *E. coli* ، إذ يمنح الغشاء الحيوي العزلات البكتيرية العديد من الصفات مثل مقاومة المضادات الحياتية وإمكانية التعبير عن العديد من عوامل الضراوة ومقاومة عمليات الألتهاام الخلوي وغيرها من دفاعات المضيف [27].

التحري عن جين *ndvB* المشفر لأنتاج الغشاء الحيوي في بكتريا *E. coli*

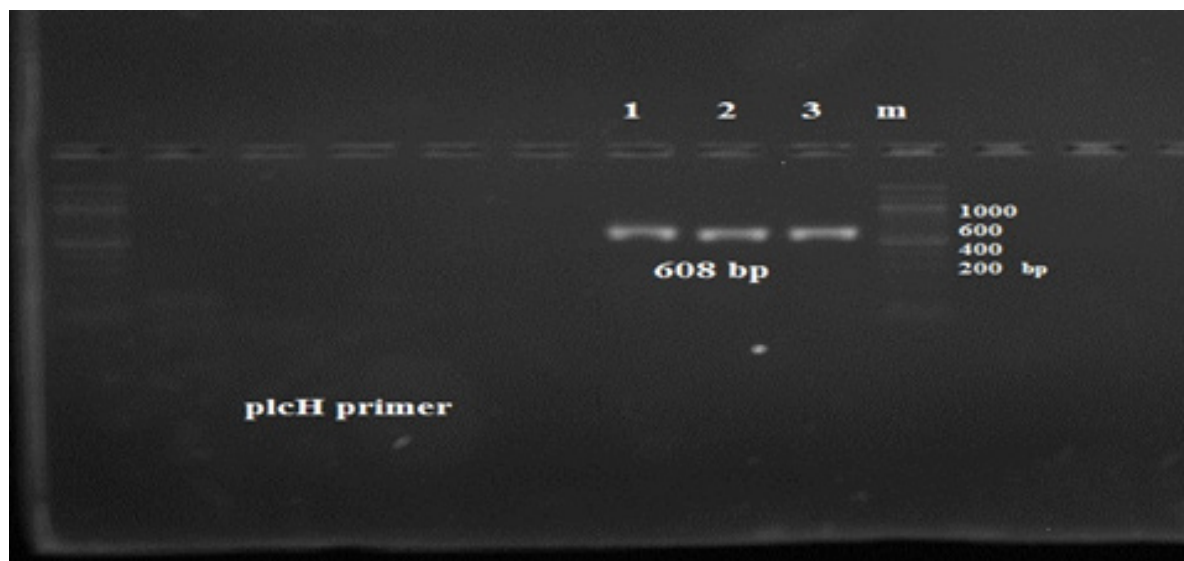
تم الكشف عن جين *ndvB* في بكتريا *E. coli* بحجم جزيئي 463 bp وتم ضبط Annealing Temperature عند درجة 57 م. رحل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل على هلام الأكاروز وظهرت حزم البادىء في عزلتين بنسبة (50 %) كما في الصورة (4) وكانت اعلى قليلاً مما جاء به [26] إذ وجدوا الجين بنسبة (41.66 %) ، يعتبر *ndvB*



صورة (4): الترحيل الكهربائي لتضخيم PCR لجين *ndvB* في *E. coli*
على هلام الأكاروز بتركيز (1.5 %).

التحري عن جين *plcH* المشفر لإنتاج الهيمولايسين
في بكتريا *P. aeruginosa*
تم الكشف عن وجود جين *plcH* المسؤول
عن إنتاج الهيمولايسين في بكتريا *P. aeruginosa*
بحجم جزيئي 608bp وتم ضبط

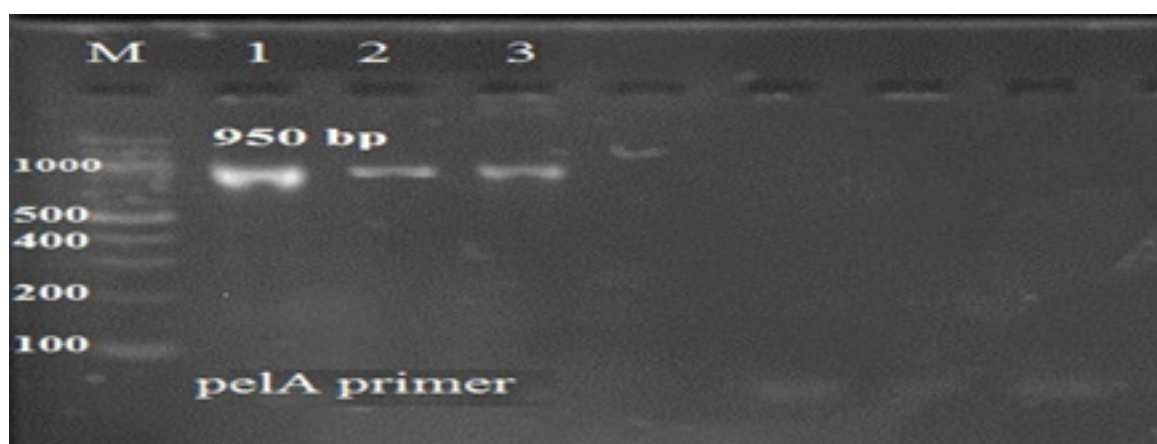
Temperature Annealing عند 55 م. رحل
ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR على هلام
الأكاروز وظهرت حزم الجين في جميع العزلات
وبنسبة 100 % كما في الصورة (5).



صورة (5): الترحيل الكهربائي لتضخيم PCR لجين *plcH*
في بكتريا *P. aeruginosa* على هلام الأكاروز بتركيز (1.5 %).

وظهرت حزم الجين ونسبة بلغت 100 % اي ظهرت في جميع عزلات *P.aeruginosa* كما في الصورة (6). جاءت هذه النتيجة متطابقة تماماً مع دراسة [28] اذ وجدوا ان نسبة الجينات المشفرة لانتاج *pelA* هي 100% ، كذلك جاءت النتيجة مقارنة لدراسة [29] اذ تحرا الباحثان عن وجود الجين بنسبة 97.8 %.

التحري عن جين *pelA* المشفر لانتاج الغشاء الحيوي في بكتريا *P.aeruginosa*
تم الكشف عن جين *pelA* المسؤول عن انتاج الغشاء الحيوي في بكتريا *P.aeruginosa* بحجم جزيئي 950 bp وتم ضبط Annealing Temperature عند درجة 50 م. رحل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل على هلام الأكاروز



صورة (6): الترحيل الكهربائي لتضخيم PCR لجين *pelA* في بكتريا *P.aeruginosa* على هلام الأكاروز بتركيز (1.5 %).

المصادر

1. Bean, N . H . , Goulding, J . S . , Lao, C . and Angulo, F . J . (1996). Surveillance for foodborne disease outbreak , United states. Morbidity and Mortality Weekly Report, 45: 1 – 55.
2. Campbell, M.E., Gardner, C.E., Dwyer, J.J., Isaacs, S.M., Kruegger, P .D. and Ying J.Y. (1998). Effectiveness of public health interventions in food safety . A systematic review . can . J. public health, 89: 197 – 202.
3. Prescott L.M; Harley J.P; Klein D.A (2005). Microbiology. 6 th ed . Tim McGraw-Hill co. New Delhi. Pp: 675.
4. Ray S.K., Amarchand R., Srikanth J. and Majumdar K.K. (2011). A study on prevalence of bacteria in the hands of children and their perception on hand washing in two schools of Bangalore and Kolkata . Indian Journal of public Health, 55 (4): 293 – 297.

12. **Tendolkar, P. M; Baghdayan, A. S., and Shankar, N.** (2006). Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology*, 188(6): 2063–2072.
13. **Mohamed, A. J., and Hung, D. B.** (2007). Biofilm formation by *Enterococci*. *Journal of medical microbiology*, 56 (12) : 1581 – 1588.
14. **AL-Charrahk, A . H . ; Yousif, S . Y . and AL – Janabi, H . S .** (2011) . Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocines from *Klebsiella* isolation from .Hilla/Iraq. *J. Microbial.* 2, Nuo. 5,1 – 11.
15. **Alfred, E. B.** (2005) .Bensons microbiological applications in laboratory manual in general microbiology .9 th ed.McGraw–Hill. Companies.U.S.A
- 16.**Cruickshank, R . ; Dugid, J . P.; Marmion, B . P . and Swain R. H. A**(1975) . *Medical Microbiology* .Vol .2.The practice of Medical microbiology. 12 th Churchill Living . England.
17. **Mahon,C. R.; Lehman, D. C.; Manuselis, G.** (2011). *Textbook of Diagnostic Microbiology* .4 th ed., W.B Saunders Company, China.
18. **Koneman, E . W . ; Allen, S . D . Janda, W . M . ; Schreckenber, P . C . and Winn, W . C .** (1997) . *Color Atlas & textbook of diagnostic*
5. **Langford , RM.** (2009).Hand–washing and its impact on child health in Kathmandu, Nepal. Doctoral thesis ,Durham University.
6. **Patel H. R., Daniel P. S., Anand I.S. and Patel C. N.** (2010). Role of community pharmacist in assessing the awareness of hand hygiene in rural area. *Journal of Global pharma Technology*, 2 (5): 59 – 61.
7. **Graeff JA,Elder JP , Booth EM,San Francisco CA, Jossey Bass** (1993). *Communication for Health and Behavior Change : A Developing country perspective.*
- 8.**Curtis V, and Cairncross S.**(2003). Effect of washing hands with soap on diarrhea risk in the community: A systematic review.*Lancrt Infect Dis.*; 3: 275 – 81.
- 9.**AL-Kaby,F.J.**(2000).A study on diarrhea in relation to malnutrition in children under 2 years in Baghdad.,M. se.Thesis stbmitted of the college of medicine university of Al-Mustansiriya.
- 10.**Mims,C.A.;Playfair,J.H.L.;Wakelin,D.; Williams, R. and Anderson, R. M.** (1993). *Medical Microbiology* . Mobsy, London.
11. **Tomita,T.and Kamio,Y.** (1997). Molecular Biology of pore –forming cytolysine from *staphylococcus aureus*, alpha and gamma – hemolysin and leukocidin – *Biosci. Biotechnol. Biochem* .vol 61 (4): 565.

- human and bovine , Southern Iran .
Iranian Journal of veterinary Research .
Vol.15. No.(4) p: 326 – 330.
26. **Al-Shuwaikh , A.M.; Ibrahim , I. A. J. and Al-Shuwaikh , R.M.** (2015). Detection of *E. coli* and Rotavirus in Diarrhea among children Under Five years Old. Iraqi Journal of Biotechnology., Vol.14 , No .1, 85 – 92.
27. **Hanna , A.; Bergo, M.; Stout , V. and Razatos , A.** (2003). Role of capsule colonic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* .Appl. Environ .Microbiol . 69: 4474 – 4481.
28. **Al-Sheikhly, M . A . A . H . ; Musleh, L. N. and Harith, J . F .** (2019) . Assessment of *pelA* –carried *Pseudomonas aeruginosa* isolates in respect to biofilm formation .Iraqi Journal of Science ,Vol.60 , No .6, pp: 1180 – 1187.
29. **Maita, P. and Boonbumrung, K.** (2014). Associated between biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates versus antibiotic resistance and genes involved with biofilm .Journal of Chemical and Pharma ceutical Research, 6 (5): 1022– 1028.
- Microbiology 5 th ed . J . B . Lippincott Comp . , Philadelphia .
19. **Lennette, E . H . ; Balow, S . A . ; Hausler. W . J . and Shadouy (eds.)** . (1985). Manual of clinical Microbiology. American Society for microbiology , Washington D.C.
20. **Christensen, G . D . ; Simpson, W . A . ; Bison, A . L . and Beachey, E . H .** . (1982). Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surface. Infect Immune 37: 318 – 26.
21. **Booth, M. C., Pence, L. M, Mahasreshti, P., Callegan, M. C., Gilmore, M.S.** (2001). Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection . Infection and immunity , 69(1), 345 – 352.
22. **Fazeli, N . and Momtaz, H .** (2014) . Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. Iranian Red Crescent Medical Journal, 16 (10).
24. **Ariyanti , D. ; Isrina , S. ; Salasia , O.; Toto, S.F.** (2011). Characterization of haemolysin of *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin . Journal of biotechnology 16 (1): 32 – 37.
25. **Moravej, Z. ; Tabatabaei, M.; Shirzad, A. and Khoshbakht, R.** (2015) . Characterization of hemolysins of *Staphylococcus* strains isolated from