جامعة كربلاء

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التوصيف الجزيئي للبكتريا المرضية المعزولة من اخماج العيون في محافظة كربلاء

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

إيناس حمود عبود ضياء الدين

بكالوريوس علوم حياة – جامعة بغداد ٢٠٠٢

بإشراف

أ.د. وفاء صادق محسن الوزني

١٤٤٥هـ **٢٠٢٣م**

بسم الله الرحمن الرحيم

وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ
وَالْمُؤْمِنُونَ وَسَتُرَدُّونَ إِلَى عَالِمِ الْغَيْبِ
وَالشَّهَادَةِ فَيُنَبِّئُكُمْ بِمَا كُنْتُمْ تَعْمَلُونَ

صدق الله العلي العظيم

سورة التوبة الآية (١٠٥)

إقرار المشرف

أشهد بأن اعداد هذه الرسالة الموسومة (التوصيف الجزيئي للبكتريا المرضية المعزولة من اخماج العيون في محافظة كربلاء) قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة كربلاء بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة.

التوقيع:

الاسم: د. وفاء صادق محسن الوزني

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: 25/ 9 / 2023

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات أعلاه، أحيل هذه الدراسة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: د. خالد علي حسين

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ: 25 / 9 / 2023

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة، نشهد أننا اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة (التوصيف الجزيئي للبكتريا المرضية المعزولة من اخماج العيون في محافظة كربلاء) وناقشنا الطالبة (ايناس حمود عبود) في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 2023/8/16 ونرى أنها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في علوم الحياة.

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع:

الاسم: د. علي عطية عبد

المرتبة العلمية: استاذ

مكان العمل: جامعة كربلاء / كلية العلوم

التاريخ :25 / ٩ / 2023

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم: د. عبير ظاهر ناجي

المرتبة العلمية: استاذ

مكان العمل:جامعة كربلاء/ كلية الطب

التاريخ :25 / ٩ / 2023

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. سالم حسين حسن

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل:جامعة الفرات الأوسط/ المعهد التقني كربلاء

التاريخ:25 / ٩ / 2023

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :

الاسم : د. وفاء صادق محسن

المرتبة العلمية: استاذ

مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية العلوم

التاريخ :25 / ٩ / 2023

مصادقة عميد كلية العلوم / جامعة كربلاء

التوقيع:

الاسم: د. جاسم حنون هاشم العوادي

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: جامعة كربلاء/ كلية العلوم

التاريخ28/ ٩ / 2023

الإهداء

الى هيبتي ورفعة شأني ..... وأوتاد عزي .... الى من احمل اسمه بكل افتخار ....

والدي الغالي.

الى نبع الحنان الصافي ..... ومن كانت الجنة تحت قدميها .....

والدتي العزيزة.

الى رفيق دربي.....ومن كاتفني ونحن نشق الطريق نحو النجاح .... وبه استمد قوتي وعزيمتي..

زوجي الحبيب.

الى قرة عيني وفؤادي..... وزينتي في الحياة .....

أولادي علي ودينا وفاطمة.

أهدي جهدي هذا

إيناس ٢٠٢٣

شكر وتقدير

الحمد لله الذي تجلى للقلوب بالعظمة، واحتجب عن الابصار بالعزة، واقتدر على الأشياء بالقدرة، والصلاة والسلام على سيدنا محمد (ص)وعلى اله الاطهار.

وبعد:

فأني اشكر الله وافر الشكر أن وفقني وأعانني على إتمام هذه الرسالة، ثم أتقدم اولاً بالشكر والتقدير الى رئاسة جامعة كربلاء وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة لأتاحتهم لي الفرصة بإكمال دراستي.

ثم أتوجه بالشكر والعرفان بالجميل الى استاذتي ومشرفتي الفاضلة الأستاذ الدكتور وفاء صادق محسن الوزني المحترمة لتفضلها بالأشراف على هذه الرسالة التي منحتني الكثير من وقتها ومتابعتها المستمرة ونصائحها العلمية طيلة مدة البحث الأثر الكبير في إتمام هذا العمل، واسال الله العلي القدير ان يجازيها خير الجزاء وان يكتب صنيعها في موازين حسناتها ويمتعها بوافر الصحة والعافية.

ومن الوفاء ان أتقدم بوافر التقدير وعظيم الامتنان الى الدكتور علي عبد الكاظم الغانمي لمساعدته الكبيرة وارشاداته القيمة لي اسال الله ان يمده بالصحة والعافية انه سميع مجيب.

واتقدم بالشكر الجزيل لمنتسبي وزارة الصحة في مختبر الصحة العامة في كربلاء المقدسة واخص بالذكر الست اميرة والى جميع كادر شعبة المختبرات وحدة الاحياء المجهرية في مستشفى الامام الحسن المجتبى (ع) والى استشارية العيون لمساعدتهم في جمع العينات السريرية ولابد ان اشير بالشكر والعرفان الى الدكتور حيدر علي القرعاوي وكل من قدم لي يد العون والمساعدة ... وذكره قلبي ولم يذكره قلمي، سوآءا في مرحلة البحث او الكتابة لما قدموه لي من مساعدة جعلها الله لهم في موازين حسناتهم.

وأخيرا أقدم وافر شكري وتقديري وامتناني لعائلتي على تشجيعهم ودعمهم وصبرهم معي طيلة فترة دراستي سائلة الباري عز وجل ان يديمهم لي ذخرا.

ايناس ٢٠٢٣

الخلاصة

Summary

الخلاصة

تتعرض العين الى أنواع مختلفة من الكائنات الحية الدقيقة وان لعدوى سطح العين عواقب مدمرة اذ لم يتم معالجتها بالمضادات الحيوية في مرحلة مبكرة ويمكن ان تؤدي هذه الأخماج الى العمى لذا تم إجراء الدراسة الحالية بهدف التحري عن أهم الأحياء المجهرية البكتيرية المسببة لأخماج العيون في محافظة كربلاء المقدسة وتحديد ضراوتها، كذلك التحري الجزيئي عن انتشار جينات المقاومة للمضادات الحيوية وجينات الضراوة في العزلات البكتيرية الأكثر شيوعاً في احداث إصابات العيون البكتيرية ، و جمعت لهذا الغرض ١٦٩ مسحةً من المرضى المصابين باخماج العيون ومن ثلاث مناطق (الملتحمة، والقرنية، و الاجفان) بعد أن تم تشخيصهم سريرياً من قبل الأطباء الاختصاص تراوحت أعمارهم بين (١-٧٥) سنة ولكلا الجنسين من الوافدين لمستشفى الإمام الحسن المجتبى (ع)،ومستشفى الهندية العام ومركز السيدة زينب (ع) التخصصي للعيون في محافظة كربلاء المقدسة للمدة من اب٢٠٢٢ ولغاية كانون الثاني ٢٠٢٣.

وقد أظهرت النتائج المتعلقة بزرع العينات وجود نمو بكتيري في (٤٥%)٧٦ عينة من مجموع عينات الأخماج العينية التي تم جمعها بينما لم يظهر نمو في (٥٥%)٩٣ عينة تم من خلالها الحصول على (٥٣.٩٤%)٤١عينة موجبة لصبغة غرام، و(٤٦.٠٥%)٣٥ عينة سالبة لصبغة غرام وكل العزلات البكتيرية تم تشخيصها بالاعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية للمستعمرات عند نموها على الأوساط الزرعية العامة والانتقائية فضلاً عن إجراء العديد من الاختبارات الكيموحيوية التي تم من خلالها تأكيد تشخيص العزلات الأكثر ترددا بواسطة جهاز الفايتك ٢ Vitek .

وأظهرت النتائج سيادة بكتريا *Staphylococcus aureus* بواقع (٢٨.٩٠%)٢٢ عينة تتبعها بكتريا *Staphylococcus epidermidis* بواقع (٢٥%)١٩ عينة ثم بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بواقع (٢٣.٦٠%)١٨ عينة و(١٥.٧٠%)١٢عزلة تعود لبكتريا *Escherichia coli*، وتم الحصول على (٥.٢٠%)٤ عزلة لبكتريا *Klebsiella pneumoniae*و(١.٣٠%)١ عزلة لبكتريا *Serratia marcescens*.

اجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية للعزلات البكتيرية الأكثر ترددا في هذه الدراسة، وهي كل من بكتريا *Staphylococcus aureus* وبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام جهاز الفايتك، إذ كانت معظم العزلات البكتيرية متعددة المقاومة

للمضادات الحيوية، إذ كانت كل عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* مقاومة بنسبة ١٠٠% لمضادات Amoxicillin, Amoxicillin\ Clavulanic acid وBenzylpenicillin بينما وجد أن مضادات Rifampicinو Linezolid وTeicoplanin وTigecycline هي الأكثر فعالية ضد هذه البكتريا، وأما عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* كانت مقاومة ١٠٠% تجاه مضادات Amoxicillinو Amoxicillin\ Clavulanic acid وPiperacillin بينما كانت حساسة تجاه Colistin و Imipenem وMeropenem.

ووجد في هذه الدراسة فروق معنوية بين الفئات العمرية للمرضى على مستوى احتمالية (p=٠.٠٢١)وكانت الفئة العمرية (٢٥-٤٩) سنة هي الأكثر إصابة ، كما كان الجنس ومكان الإقامة (الريف او المدينة) له تأثير على توزيع الإصابات البكتيرية لدى المصابين باخماج العيون اذ كانت الإصابات في الذكور هي الأعلى وكذلك في المدينة وظهر فرق معنوي واضح على مستوى احتمالية (p=٠.٠٤٥ وp=٠.٠٢٨) على التوالي بين توزيع عدد الإصابات البكتيرية حسب موقع الإصابة في العين سواء أكانت ملتحمة، قرنية أم اجفان بينما لم يكن هنالك فرق معنوي بين نوع البكتريا المعزولة وموقع الإصابة البكتيرية في العيون على مستوى احتمالية (p=٠.٠٣٤).

أما بالنسبة لعوامل الخطورة المدروسة والمتمثلة بالصدمة، وأمراض سطح العين كحالة جفاف العين، وارتداء العدسات اللاصقة فضلاً عن الامراض الجهازية كداء السكري وإصابات الجهاز التنفسي فقد لوحظ من خلال النتائج إنّ هنالك اِرتباط معنوي كبير على مستوى احتمالية (p=٠.٠١٢) بين تلك العوامل وحدوث الإصابة البكتيرية في العيون.

كما ظهر أيضا وجود ارتباط معنوي كبير بين عوامل الخطورة المدروسة ومواقع الإصابة البكتيرية في العين من ملتحمة، وقرنية واجفان وكانت الصدمة هي الأكثر ارتباطاً مع خمج الملتحمة على مستوى احتمالية(p=٠.٠٢٢) بينما لم يكن هنالك ارتباط معنوي بين عمر المصاب وجنسه وعوامل الخطورة على مستوى احتمالية (p=٠.٧٤٢).

امتلكت العزلات البكتيرية عوامل ضراوة مهمة ذات علاقة في احداث إصابات العيون منها قابليتها على انتاج الأغشية الحيوية وذيفان حال الدم وبينت النتائج الإحصائية الحالية ارتباطا بين قابلية العزلات البكتيرية على انتاج الاغشية الحيوية وموقع الإصابة البكتيرية في العين بينما

لم يكن هنالك ارتباط معنوي بين قابلية العزلات البكتيرية على انتاج ذيفان حال الدم وموقع الإصابة العينية.

استعملت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لإجراء اِختبار التحري عن وجود الجينات المشفرة للمقاومة للمضادات الحيوية ، والجينات المشفرة لعوامل الضراوة لكل عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية والزوائف الزنجارية لمعرفة مدى انتشار وتوزيع هذه الجينات في العزلات البكتيرية التي تصيب العين ، فقد بينت النتائج إنّ ٩٥.٤% من عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* تحمل الجين *mecA* من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه ٣١٠bp وهي مقاومة للمثيسيلين MRSA وان ٧٢.٧% تحمل جين *ermA* وهي بذلك تملك مقاومة لمضادات المايكروليدات من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه ٦٤٥bp وبذلك اكتسبت بكتريا المكورات العنقودية الذهبية مقاومة متعددة للمضادات الحيوية. أما مورثات الضراوة المهمة في احداث إمراضيه العين وهو جين *SEA*و*hlb* من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل فقد وجد ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه ٣٠٩bp و١٠٢bpعلى التوالي لعزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية وبنسبة ٧٧.٢% و ٦٨.١ على التوالي.

وأما بالنسبة لمورثات الضراوة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* فظهر وجود جين *exoA* و*LasB* بنسبة ١٠٠% من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه ٣٩٦bp و٣٠٠bp على التوالي، وتمت دراسة العلاقة بين وجود جينات مقاومة المضادات الحيوية وجينات مورثات الضراوة وقابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على إنتاجية الاغشية الحيوية.

تضمنت الدراسة الحالية أن الأجناس البكتيرية الموجبة لصبغة غرام هي الأكثر شيوعاً من الاجناس البكتيرية السالبة لصبغة غرام في احداث اخماج العيون المختلفة، كما تبين اِمتلاك العزلات البكتيرية المدروسة على عوامل ضراوة مهمة متمثلة بإنتاج الهيمولايسين وتكوين الاغشية الحيوية ومورثات ضراوة تزيد من شدة الإصابة البكتيرية في العين فضلاً عن امتلاكها جينات مقاومة ساعدتها على مقاومة المضادات الحيوية.

قائمة المحتويات

التسلسل	المحتويات	الصفحة
	الفصل الأول /المقدمة	١
	الفصل الثاني / استعراض المراجع	
٢-١	العين The Eye	٤
٢-٢	المكونات المناعية في العيون Immunological components of the eyes	٥
٢-٣	النبيت الطبيعي في العيونThe normal flora in the eyes	٧
٢-٤	العوامل المهيئة لأخماج العيون Predisposing Factors to eye infections	٨
٢-٥	اخماج العيون Eye infection	١٠
٢-٦	أنواع اخماج العيونTypes of eye infection	١١
٢-٦-١	خمج ملتحمة العين Conjunctivitis	١١
٢-٦-١-١	خمج ملتحمة العين البكتيري Bacterial conjunctivitis	١١
٢-٦-١-٢	خمج ملتحمة العين الفيروسي Viral conjunctivitis	١٣
٢-٦-٢	خمج القرنية Keratitis	١٣
٢-٦-٣	خمج الاجفان Lid infection	١٤
٢-٦-٤	خمج الكيس الدمعي Dacryocystitis	١٥
٢-٧	المسببات البكتيرية الشائعة لأخماج العيون Common bacterial etiology of eye infections	١٥
٢-٧-١	المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*	١٧
٢-٧-٢	المكورات العنقودية البشروية البيضاء *Staphylococcus epidermidis*	١٨
٢-٧-٣	الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*	١٩
٢-٧-٤	الاشريكيا القولونية *Escherichia coli*	٢١
٢-٧-٥	الكلبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae*	٢٢
٢-٧-٦	بكتيريا السيراتية الذابلة *Serratia marcescens*	٢٣
٢-٨	مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية Bacterial resistance to antibiotics	٢٣
٢-٩	عوامل الضراوة المساعدة في احداث خمج العين	٢٥
٢-٩-١	ذيفان حال الدم Haemolysin	٢٥
٢-٩-٢	تكوين الاغشية الحيوية Biofilm formation	٢٥
٢-١٠	مورثات مقاومة المضادات الحيوية للمكورات العنقودية الذهبية	٢٦
٢-١٠-١	مورث *mecA* المقاومة للمثيسيلين Methicillin Resistance Gene	٢٦
٢-١٠-٢	مورث *ermA* المقاومة للاريثروميسين Erythromycin Resistance Gene	٢٧
٢-١١	المورثات المشفرة لعوامل الضراوة في بكتريا *S.aureus* و *P.aeruginosa*	٢٧
٢-١١-١	مورث *hlb*	٢٧

٢-١١-٢	مورث *SEA*	٢٨
٣-١١-٢	مورث *exoA*	٢٨
٤-١١-٢	مورث *LasB*	٢٩
	الفصل الثالث / المواد وطرائق العمل	
١-٣	المواد Materials	٣١
١-١-٣	الأجهزة والأدوات المختبرية Equipment and Laboratory apparatus	٣١
٢-١-٣	المواد ذات الاستخدام الواحد Disposable Materials	٣٣
٣-١-٣	المواد الكيميائية والصبغات Chemicals material and stain	٣٤
٤-١-٣	العدد Kits	٣٥
٥-١-٣	الأوساط الزرعية Culture Media	٣٦
٦-١-٣	المضادات الحيوية Antibiotics	٣٧
٧-١-٣	المواد والمحاليل المستخدمة في الكشف عن هيمولايسين بيتا وفعاليته	٣٨
١-٧-١-٣	الوسط المعرف كيميائيا Chemical defined medium	٣٨
٢-٧-١-٣	عالق كريات الدم الحمراء RBC suspension	٣٨
٣-٧-١-٣	المنحنى القياسي لتحلل الدم باستخدام تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم	٣٨
٨-١-٣	البادئات Primers	٤٠
٩-١-٣	تصميم الدراسة Study design	٤٢
٢-٣	طرائق العمل Methods	٤٣
١-٢-٣	جمع العينات السريرية Collection of clinical samples	٤٣
٢-٢-٣	التعقيم Sterilization	٤٣
٣-٢-٣	تحضير الأوساط الزرعية Preparation of Culture Media	٤٤
١-٣-٢-٣	الأوساط الزرعية الجاهزة Ready Made Media	٤٤
١-١-٣-٢-٣	وسط غراء الماكونكي MacConkey Agar	٤٤
٢-١-٣-٢-٣	وسط غراء المانيتول الملحي Mannitol salt Agar	٤٤
٣-١-٣-٢-٣	وسط غراء المغذي Nutrient Agar	٤٤
٤-١-٣-٢-٣	وسط غراء الستريت Simmons Citrate Agar	٤٤
٢-٣-٢-٣	الأوساط الزرعية التركيبية Laboratory Prepared Media	٤٥
١-٢-٣-٢-٣	وسط غراء الدم الأساس Blood Agar Base	٤٥
٢-٢-٣-٢-٣	وسط اكار الستريمايدCetrimide Agar	٤٥
٣-٢-٣-٢-٣	وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brian- Heart infusion broth	٤٥
٢-٣-٢-٣-	وسط غراء اليوريا Urea Agar	٤٥

٤		
٣-٢-٤	المحاليل الكيميائية والكواشف Chemical Solution and Reagent	٤٦
٣-٢-٤-١	المحلول الملحي الفسيولوجي Normal Saline	٤٦
٣-٢-٤-٢	محلول ماكفرلاند(٠.٥Macfarland Solution)	٤٦
٣-٢-٤-٣	دارئ الفوسفات الملحي Phosphate Buffer Saline	٤٦
٣-٢-٤-٤	كاشف الكاتليزCatalase reagent	٤٦
٣-٢-٤-٥	كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent	٤٦
٣-٢-٤-٦	صبغة غرام Gram stain	٤٧
٣-٢-٤-٧	محلول صبغة البنفسج البلوري	٤٧
٣-٢-٤-٨	كاشف احمر المثيلMethyl Red reagent	٤٧
٣-٢-٤-٩	كاشف فوكس بروسكاورVoges-Proskaure reagent	٤٧
٣-٢-٥	زرع المسحات Swab Culture	٤٧
٣-٢-٦	تشخيص العزلات البكتيرية Identification of bacterial isolates	٤٨
٣-٢-٦-١	الصفات الزرعية Cultural characteristics	٤٨
٣-٢-٦-٢	الفحوصات المجهرية Microscopic Examination	٤٨
٣-٢-٦-٣	الفحوصات الكيموحيويةBiochemical tests	٤٨
٣-٢-٦-٣-١	فحص الكاتليزCatalase test	٤٨
٣-٢-٦-٣-٢	فحص الاوكسيديزOxidase test	٤٩
٣-٢-٦-٣-٣	فحص انتاج انزيم التجلطCoagulase test	٤٩
٣-٢-٦-٣-٤	اختبار الاندول Indole test	٤٩
٣-٢-٦-٣-٥	اختبار فوكس بروسكاورVoges-Proskaure test	٤٩
٣-٢-٦-٣-٦	اختبار احمر المثيل Methyl red test	٤٩
٣-٢-٦-٣-٧	اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test	٥٠
٣-٢-٦-٣-٨	اختبار انزيم اليوريزUrease test	٥٠
٣-٢-٦-٣-٩	اختبار تحلل الدم Hemolysis test	٥٠
٣-٢-٧	تشخيص البكتريا المعزولة بجهاز الفايتكVitek-٢ system	٥٠
٣-٢-٨	حفظ العزلات البكتيرية وادامتها Preservation and Maintenance of bacterial isolates	٥١
٣-٢-٩	اختبار الحساسية لمضادات الميكروبات Antimicrobial susceptibility test	٥٢

٣-٢-١٠	التحري عن عوامل الضراوة في العزلات البكتيرية	٥٢
٣-٢-١٠-١	التحري عن قابلية العزلات البكتيرية لتكوين الغشاء الحيوي(Biofilm)	٥٢
٣-٢-١٠-٢	التحري عن انتاج ذيفان حال الدم Hemolysin	٥٥
٣-٢-١١	فحص تفاعل سلسلة انزيم البلمرة PCR test	٥٦
٣-٢-١١-١	استخلاص الحمض النووي البكتيري Bacterial Genomic DNA extraction	٥٦
٣-٢-١١-٢	تحضير مزيج سلسلة تفاعل البلمرةPCR Master Mixture	٥٨
٣-٢-١١-٣	الترحيل الكهربائي في الهلام Gel Electrophoresis	٦٠
٣-٢-١١-١-٣	الكشف عن نواتج التضاعف	٦٠
٣-٢-١٢	التحليل الاحصائي Statistical analysis	٦١
	الفصل الرابع / النتائج والمناقشة	
٤-١	نسبة العزل البكتيري	٦٣
٤-٢	توزيع إصابات العيون البكتيرية حسب العمر	٦٤
٤-٣	توزيع إصابات العيون البكتيرية حسب الجنس	٦٥
٤-٤	توزيع إصابات العيون البكتيرية حسب مكان الاقامة	٦٦
٤-٥	توزيع إصابات العيون البكتيرية حسب موقع الإصابة في العين	٦٨
٤-٦	العلاقة بين نوع العزلات البكتيرية ومواقع الإصابة في العيون	٦٩
٤-٧	تشخيص العزلات البكتيرية المسببة لأخماج العيون	٧١
٤-٧-١	التشخيص المجهري والمظهري للعزلات البكتيرية	٧١
٤-٧-٢	التشخيص الكيموحيوي للعزلات البكتيرية	٧٣
٤-٧-٣	التشخيص باستعمال جهاز الفايتك Vitek٢system	٧٤
٤-٨	الأنواع البكتيرية المشخصة في هذه الدراسة	٧٤
٤-٩	اختبار حساسية العزلات البكتيرية الأكثر ترددا(*S.aureus* و*P.aeruginosa*) لأخماج العيون للمضادات الحيوية	٧٧
٤-١٠	علاقة عوامل الخطورة بمعدل إصابات العيون البكتيرية	٨١
٤-١١	علاقة عوامل الخطورة للمريض مع موقع الإصابة البكتيرية	٨٤
٤-١٢	علاقة عمر وجنس المصاب مع عوامل الخطورة	٨٥
٤-١٣	الكشف عن عوامل الضراوة البكتيرية	٨٧
٤-١٣-١	التحري عن قابلية الاجناس البكتيرية لإنتاج الاغشية الحيوية	٨٧
٤-١٣-١-١	العلاقة بين مواقع الإصابة البكتيرية في العين وقابلية العزلات البكتيرية على انتاج الاغشية الحيوية	٩٢
٤-١٣-٢	انتاج ذيفان حال الدم Hemolysin production	٩٣
٤-١٣-٢-١	العلاقة بين مواقع الإصابة البكتيرية في العين وقابلية العزلات البكتيرية على انتاج ذيفان حال الدم	٩٨
٤-١٤	الكشف الجزيئي عن مقاومة المضادات الحيوية لعزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية قيد الدراسة	٩٩
٤-١٥	الكشف الجزيئي عن بعض مورثات الضراوة في العزلات البكتيرية قيد الدراسة	١٠١
٤-١٦	العلاقة بين قابلية العزلات البكتيرية المدروسة على انتاج الاغشية الحيوية ووجود جينات الضراوة والمقاومة	١٠٧

٤-١٧	العلاقة بين قابلية العزلات البكتيرية المدروسة على انتاج ذيفان حال الدم ووجود جينات الضراوة والمقاومة	١٠٩
	الفصل الخامس / الاستنتاجات والتوصيات	
٥-١	الاستنتاجات Conclusions	١١٢
٥-٢	التوصيات Recommendation	١١٣
	المصادرReferences	١١٤
	الملاحق	

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
٢-١	تشريح العين	٥
٢-٢	اليات عمل المضادات الحيوية	٢٤
٢-٣	اليات مقاومة المضادات الحيوية في البكتريا	٢٥
٣-١	المنحنى القياسي للتحلل الدموي باستخدام تراكيز متدرجة من ملح كلوريد الصوديوم	٤٠
٣-٢	مخطط توضيحي لخطوات العمل المتبعة في هذه الدراسة	٤٢
٤-١	نسبة العينات الموجبة والسالبة للزرع البكتيري	٦٤
٤-٢	الأنواع البكتيرية المعزولة من اخماج العيون المختلفة	٧٥
٤-٣	حساسية عزلات بكتريا *S.aureus* المعزولة من اخماج العيون تجاه المضادات الحيوية	٧٩
٤-٤	حساسية عزلات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من اخماج العيون تجاه المضادات الحيوية	٨١
٤-٥	تكوين الاغشية الحيوية بطريقة الانبوبة	٨٨
٤-٦	انتاج الاغشية الحيوية بطريقة اطباق المعايرة	٨٨
٤-٧	الفعالية التحللية لذيفان حال الدم عند ٥٠% لبكتريا *S.aureus*	٩٦
٤-٨	الفعالية التحللية لذيفان حال الدم عند ٥٠% لبكتريا *P.aeruginosa*	٩٧
٤-٩	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* بإستعمال البادئ النوعي لجين bp(٣١٠) *mecA* ، بتركيز هلام (١.٥%) وفولتية (٧٠) فولت لمدة (٥٠) دقيقة	١٠٠
٤-١٠	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* بإستعمال البادئ النوعي لجين bp(٦٤٥)*ermA* ، بتركيز هلام (١.٥%) وفولتية (٧٠) فولت لمدة (٥٠) دقيقة	١٠١
٤-١١	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* بإستعمال البادئ النوعي لجين bp(٣٠٩)*hlb* ، بتركيز هلام (١.٥%) وفولتية (٧٠) فولت	١٠٢

	لمدة (٥٠) دقيقة	
١٢-٤	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *S.aureus* بإستعمال البادئ النوعي لجين bp(١٠٢)*SEA* ، بتركيز هلام (١.٥%) وفولتية (٧٠) فولت لمدة (٥٠) دقيقة	١٠٣
١٣-٤	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *P.aeruginosa* بإستعمال البادئ النوعي لجين bp(٣٠٠)*LasB* ، بتركيز هلام (١.٥%) وفولتية (٧٠) فولت لمدة (٥٠) دقيقة	١٠٤
١٤-٤	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *P.aeruginosa* بإستعمال البادئ النوعي لجين bp(٣٩٦)*exoA* ، بتركيز هلام (١.٥%) وفولتية (٧٠) فولت لمدة (٥٠) دقيقة	١٠٥
١٥-٤	توزيع الجينات المتنوعة لبكتريا *S.aureus* المعزولة من اخماج العيون	١٠٦
١٦-٤	توزيع الجينات المتنوعة لبكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من اخماج العيون	١٠٧

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
١-٣	الأجهزة والادوات المختبرية	٣١
٢-٣	المواد ذات الاستخدام الواحد	٣٣
٣-٣	المواد الكيميائية والصبغات	٣٤
٤-٣	العدد	٣٥
٥-٣	الأوساط الزرعية	٣٦
٦-٣	المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة	٣٧
٧-٣	التراكيز المتدرجة من محلول كلوريد الصوديوم وقيمة الامتصاصية لكل تركيز مع التحلل الدموي بنسبة (٥٠%)	٣٩
٨-٣	بادئات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية	٤٠
٩-٣	بادئات بكتريا الزائفة الزنجارية	٤١
١٠-٣	مكونات مزيج Master Mix المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل	٥٨
١١-٣	المكونات اللازمة لتفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR	٥٩
١٢-٣	خطوات التفاعل الخاصة بالبوادئ	٥٩
١-٤	توزيع عدد الإصابات البكتيرية حسب عمر المرضى	٦٥
٢-٤	توزيع عدد الإصابات البكتيرية حسب جنس المرضى	٦٦
٣-٤	توزيع عدد الإصابات البكتيرية حسب مكان الإقامة	٦٧
٤-٤	العلاقة بين الفئات العمرية مع الجنس ومحل الإقامة	٦٨
٥-٤	عدد الإصابات البكتيرية حسب موقع الإصابة في العين	٦٩
٦-٤	العلاقة بين نوع العزلات البكتيرية ومواقع الإصابة في العيون	٧٠
٧-٤	الاختبارات الكيموحيوية المستعملة لتشخيص البكتريا المعزولة	٧٤
٨-٤	عدد الإصابات البكتيرية للعين حسب عوامل الخطر	٨٣
٩-٤	علاقة مواقع الإصابة البكتيرية في العين مع عوامل الخطورة المدروسة	٨٥
١٠-٤	علاقة عمر وجنس المصاب مع عوامل الخطورة	٨٦

٤-١١	قابلية تكوين الاغشية الحيوية حسب معدل الكثافة الضوئية OD	٨٩
٤-١٢	معدل الامتصاصية لعزلات بكتريا *S.aureus* المنتجة للأغشية الحيوية عند ٦٣٠nm	٨٩
٤-١٣	معدل الامتصاصية لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة للأغشية الحيوية عند ٦٣٠nm	٩١
٤-١٤	العلاقة بين انتاج الاغشية الحيوية ومواقع الإصابة البكتيرية في العين	٩٣
٤-١٥	علاقة مواقع الإصابة البكتيرية في العين مع كمية ذيفان حال الدم المنتج من قبل العزلات الجرثومية المدروسة	٩٨
٤-١٦	العلاقة بين انتاج الاغشية الحيوية وجينات المقاومة والضراوة لبكتريا *S.aureus*	١٠٨
٤-١٧	العلاقة بين انتاج الاغشية الحيوية وجينات الضراوة لبكتريا *P.aeruginosa*	١٠٩

قائمة المختصرات

الاسم الكامل	المختصر
Base pair	bp
Chemical defined medium	CDM
Distilled Water	DW
Enzyme –Linked Immunosorbent Assay	ELISA
Gram negative identifier	GN-ID
Gram positive identifier	GP-ID
Immunoglobulin A	IgA
Immunoglobulin G	IgG
Methyl red	MR
Nano gram	ng
Pencillin Binding Protein	PBP
Phosphate Buffer Saline	PBS
Polymerase chain reaction	PCR
Tris\Borate\EDTA	TBE
VITEL-٢antibiotic sensitivity card	VITEK-٢AST Card
Voges-Proskaure	VP

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

المقدمة

تعد العين جزءً تشريحياً فريداً تتعرض بإستمرار للعوامل البيئية الخارجية، وتعد امراض العين مع مضاعفاتها بسبب الكائنات الحية الدقيقة مشكلة صحية كبيرة في كل انحاء العالم إذ يمكن أن تلحق اخماج العين الضررَ ببنية العين مما قد يؤدي الى ضعف الرؤية او حتى العمى إذا تم تشخيصها وعلاجها بشكل غير صحيح (Diriba *et al.*,٢٠٢٠).

وعلى الرغم من ان العين محمية بعدد من آليات الدفاع الطبيعية من خلال التدفق المستمر للدموع الذي يحتوي على مركبات مضادة للبكتريا إلا إنّ العديد من الأشخاص يعانون من عدد من الالتهابات بسبب كون سطح العين غني بالمغذيات وبالتالي فإنه يدعم مجموعة متنوعة من الكائنات الحية الدقيقة التي تشكل فلورا العين الطبيعية والتي يتم تنظيم نموها، وبالتالي منع العدوى إلاّ إنّ هذه الكائنات الحية الدقيقة تحت أوضاع مختلفة يمكن أن تتسبب في إمراضيه العين (Murugan *et al.*,٢٠١٠).

إنّ أكثر أجزاء العين تضررًا بسبب الكائنات الحية الدقيقة هي الملتحمة (Conjunctiva)والجفن (Eye lid) والقرنية (Cornea)ويعد خمج الملتحمة (Conjunctivitis)وخمج الجفن (Blepharitis) وخمج كيس الدمع(Dacryocystitis) أكثر المظاهر شيوعًا لعدوى العين الخارجية (Mariotti *et al.*,٢٠٠٩).

ويمكن أن تحدث اخماج العيون المختلفة نتيجة التعرض إلى مجموعة متنوعة من الاحياء المجهرية إذ تشتمل على البكتريا والفيروسات والفطريات والطفيليات، لكن البكتيريا هي المساهم الرئيس في اخماج العيون بسبب عوامل الضراوة التي تملكها البكتريا أو بسبب ضعف آليات دفاع المضيف نتيجة التعرض الى صدمات ، وأمراض سطح العين و ارتداء العدسات اللاصقة فضلاً عن قلة النظافة الشخصية وعمر المصاب ونمط الحياة والوضع الاجتماعي والاقتصادي وقد تكون هذه العدوى أحادية او متعددة الجراثيم وبالتالي يمكن أن تؤدي إلى فقدان البصر (Kumurya and lawan,٢٠٢٣).

تعد البكتيريا الموجبة لصبغة غرام والسالبة لصبغة غرام من العوامل الرئيسة المسببة لعدوى العين ومن بين أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام برزت بكتريا *Staphylococcus aureus* بوصفها المسبب الأكثر شيوعا لعدوى العين البكتيرية فقد تميزت بإنتاجها لذيفان حال الدم بيتا (Hemolysin) الذي يسبب تحلل لخلايا الدم الحمر وقدرتها على تكوين الأغشية

الحيوية التي تجنب البكتريا الجهاز المناعي للمضيف وزيادة التحمل والمقاومة لمضادات البكتريا التي يتم تسهيلها عن طريق انتاج الأغشية الحيوية وكلها سمات خطيرة ترتبط ارتباطاً وثيقاً بالأمراضية الناجمة عن بكتريا المكورات العنقودية الذهبية (Zheng *et al.*,٢٠٢١).

ومن جهة أخرى تتصدر بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* قائمة أنواع البكتريا السالبة لصبغة غرام والتي تتمكن من غزو العين واحداث الإصابة مثل انتاج ذيفان حال الدم الذي يحطم الدهون وتكوين الأغشية الحيوية التي تقضي بالنهاية الى خمج القرنية أو الملتحمة وغالبا ما يصبح علاج عدوى العين تحديا بالنظر لقدرة هذه البكتريا على مقاومة المضادات الحيوية بشكل كبير عبر الاليات الذاتية أو المكتسبة ولاسيما في خمج القرنية (Subedi *et al.*,٢٠١٨).

وقد ظهرت سلالات مقاومة من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية والزائفة الزنجارية لأكثر من مضاد حيوي من خلال امتلاكها للبلازميدات الناقلة التي انتجت سلالات مقاومة او امتلاكها جينات ذات مقاومة تلقائية للمضادات الحيوية أو آليات تغير موقع الهدف وبذلك تعد مشكلة متزايدة من الناحية الطبية لصعوبة السيطرة على الامراض فقد أدى انتشار المضادات الحيوية للعدوى البكتيرية والفيروسية أو الوقاية منها بشكل عشوائي وسوء إستعمالها إلى ظهور زيادة عالمية في مقاومة المضادات الحيوية (Ayehubizu *et al.*,٢٠٢١). وإنّ زيادة معدلات الإصابة بالبكتريا لم تكن بسبب مقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية فحسب وإنما لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي تزيد من شدة إمراضيتها، ومن هذه العوامل هي انزيمات الهيمولايسين وقابليتها على تكوين الاغشية الحيوية وانتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز (Aubais Aljelehawy *et al.*,٢٠٢١).

هذا إلى جانب مورثات الضراوة إذ يشفر *LasB* الى انزيم(Elastase) الذي يهاجم بروتينات حقيقية النواة مثل الايلاستين (Elastin)وكولاجين(Collagen) مما يسبب عدوى حادة عند الإصابة ببكتريا الزائفة الزنجارية (Hassuna *et al.*,٢٠٢٠) بينما يشفر *exoA* الى ذيفانات خارجية تلعب دوراً مهماً في تحلل الانسجة وإحداث الامراضية عند الإصابة ببكتريا الزائفة الزنجارية (Elmouaden *et al.*,٢٠١٩) ،كما تنتج بكتريا المكورات العنقودية الذهبية انزيمات البيتالاكتاميز مع *mecA* ومقاومة مضادات الارثرومايسين من قبل الجين *ermA* فضلاً عن انتاجها الذيفانات المعوية التي يشفر لها من قبل جين *SEA*التي تزيد من شدة الامراضية (Sabouni *et al.*,٢٠١٤: Aubais Aljelehawy *et al.*,٢٠٢١) .

وبالنظر لأهمية العين في حياة الإنسان ولخطورة الالتهاب على العين بكل اجزاءها وأيضا لخطورة بعض الأحياء المجهرية المتسببة في اخماج العيون، ولقلة الدراسات المتعلقة بهذا الموضوع في محافظة كربلاء المقدسة كان هدف هذه الرسالة هو إجراء دراسة جزيئية لأهم عوامل الضراوة والمقاومة لأكثر الأنواع البكتيرية شيوعاً في احداث تلك الإصابات

هدف الدراسة Aim of study :

١- عزل الأنواع البكتيرية الهوائية المسؤولة عن اخماج العيون المختلفة وتشخيصها وفقا لخصائصها المظهرية والكيموحيوية، فضلاً عن تشخيصها باستعمال جهاز الفايتك وتحديد الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة غرام الأكثر شيوعاً في احداث إصابات العيون.

٢- دراسة حساسية ومقاومة الأنواع البكتيرية الأكثر شيوعاً المعزولة من اخماج العيون تجاه المضادات الحيوية المختلفة باستخدام جهاز الفايتك.

٣- التحري عن بعض عوامل الضراوة للبكتريا الأكثر تردداً في احداث اخماج العيون نوعياً وكمياً.

٤- دراسة العلاقة بين عوامل الخطورة المرتبطة بالمرضى وتردد حصول الإصابات البكتيرية في العيون.

٥- دراسة جزيئية لأهم مورثات الضراوة التي تلعب دوراً مهماً في زيادة قدرة الأجناس البكتيرية لأحداث إصابات العين بأستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

٦- دراسة جزيئية لمورثات المقاومة للمضادات الحيوية للأجناس البكتيرية المعزولة من اخماج العيون بأستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

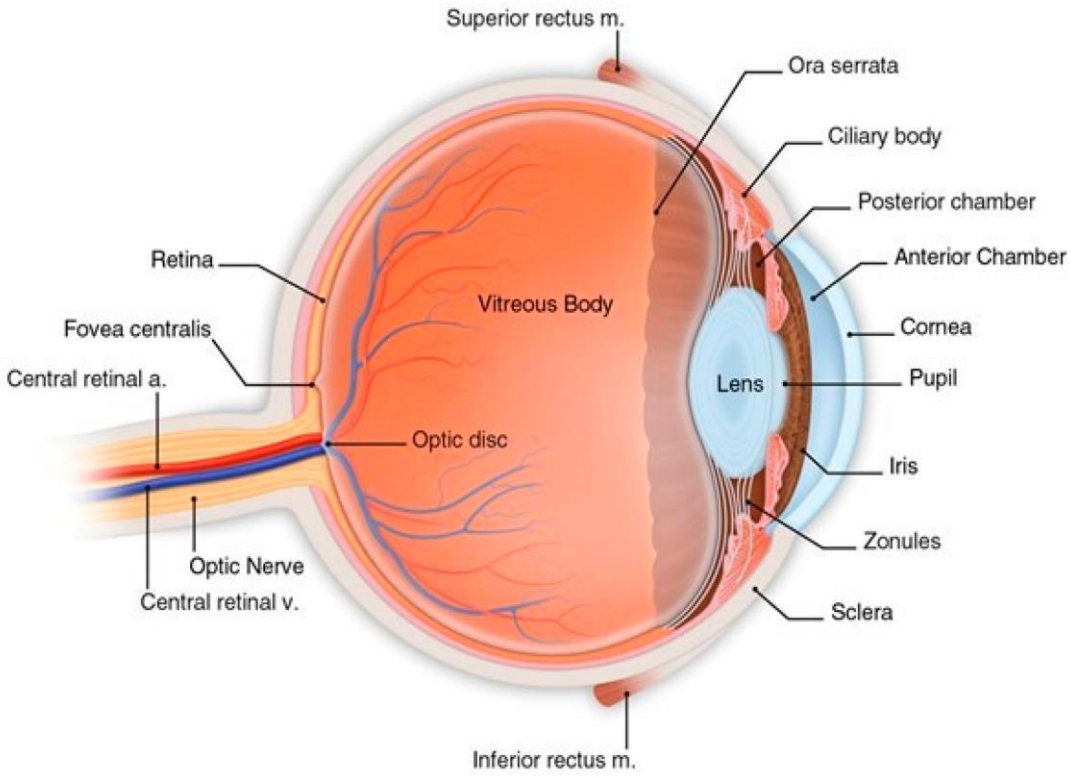
٢-١: العين The Eye

العين عضو من أعضاء جسم الانسان معقد التركيب تقع داخل هيكل عظمي وقائي من الجمجمة (Skull) ممثلا بالمدارات (Orbits)وتحتوي العين على كرة ليفية صلبة تحافظ على شكلها يصل قطر العين الامامي الخلفي (٢٢-٢٧)ملم ومحيطها (٦٩-٨٥) ملم وهنالك ست عضلات تتصل بالغلاف الخارجي من العين وتسيطر على التحكم وتوجيه حركة العين في مستويات أفقية ورأسية (Fernald.,٢٠٠٦;Kels *et al.*,٢٠١٥) تتألف العين نسيجياً من ثلاث طبقات رئيسة، الطبقة الأولى هي طبقة خارجية مؤلفة من نسيج ليفي ضام يشمل القرنية(Cornea) والصلبة (Sclera)، وإما الطبقة الثانية فهي الطبقة الوسطى الوعائية تشمل القزحية(Iris)، والجسم الهدبي (Ciliary body) والمشيمية(Choroid) ثم الطبقة الثالثة وهي طبقة داخلية عصبية تشمل الشبكية (Retina) التي تجهز بالدم من اوعية المشيمية وكذلك من الاوعية الشبكية، وبين هذه الطبقات الثلاث تقع الحجرات الامامية(Anterior chamber) ، والحجرات الخلفية (Posterior chamber)، والعدسة (Lens) والتجويف الزجاجي (Vitreous cavity).

يتكون سطح العين من القرنية، الصلبة والأنسجة التي تغطيها كما موضح في الشكل (٢-١) وبذلك تغطى الصلبة التي تمثل بياض العين المعتم بغشاء الملتحمة (Conjunctiva)، وأما القرنية فهي شفافة تسمح بمرور اشعة الضوء إلى كرة العين وصولاً إلى الشبكية من خلال الانكسار الذي يحدث للأشعة الضوئية، وهي لا تحتوي على أوعية دموية وإنما تأخذ حاجتها من الغذاء عن طريق الترشيح من الخليط المائي (Aqueous humour) الذي يغطي الردهة الامامية والخلفية، وإن حدوث أي ضرر للقرنية يقلل من شفافيتها مؤديا الى عتمة العدسة (Cataract)، وتغطي الاجفان (Lids)الجزء الامامي للعين وتحتوي على الغدد التي تنتج الدموع كما يحافظ النسيج الضام الخارجي الكثيف للعين على هيكلية وشكل كرة العين ويجعلها مقاومة تجاه الضغط المسلط من السوائل الداخلية (Remington and Goodwin, ٢٠٢١).

والملتحمة عبارة عن غشاء مخاطي رقيق شفاف وهي تغطي المنطقة الامامية من مقلة العين عدا القرنية وتعمل كحاجز مادي فيزيائي للحد من دخول الأجسام الغريبة ومسببات الامراض إلى أنسجة العين العميقة ، وللملتحمة دور نشط من الناحية المناعية فهي تزود الجسم بمكونات مناعية وبذلك وصفت بأنها الحارس المناعي للعين (Downie *et al.*,٢٠٢١)، و هذه الطبقة الشفافة تكون غنية بالأوعية الدموية والاعصاب لهذا فهي مهمة لحماية العين وترطيبها

(Chen and Hong,٢٠١٦) كما تغطي الملتحمة السطح الداخلي للجفون العلوية والسفلية والجزء الخارجي من سطح الصلبة (Leal *et al.*,٢٠٢١).



الشكل (٢-١): تشريح العين (Petrillo *et al.*,٢٠٢٠)

٢-٢: المكونات المناعية في العيون Immunological Components Of The Eyes

العين عضو فريد محمي من العوامل الخارجية ويمتلك العديد من العناصر المناعية والآليات التنظيمية التي تعمل معا لأنشاء توازن مناعي يثبط النمو الميكروبي في الغشاء المخاطي لسطح العين ويحافظ على الرؤية الطبيعية ومع ذلك فانه يتعرض لمجموعة من مسببات الامراض التي يمكن ان تتغلب على الحماية المناعية (Royer *et al.*,٢٠٢٠)، والعين مدعمة بجهاز مناعي مخاطي دقيق يساعد في منع الضرر أو الحد منه من خلال اِستجابة مناعية ذاتيه (Innate Immunity) واِستجابة مناعية مكتسبة (Adaptive Immunity) ، وتلعب الاستجابة المناعية الذاتية دوراً مهماً في تنشيط الإستجابة المناعية المكتسبة (Streilein and Stein,٢٠٠٠).:

١ـ الاستجابة المناعية الذاتية Innate Immunity

تشكل المناعة الذاتية خط الدفاع الأول التي تعمل على تقليل الاستيطان الميكروبي لسطح العين من قرنية وملتحمة، وإنّ عناصر هذه المناعة موجودة منذ الولادة وهي توفر نظام حماية غير محدد تشمل الدموع (tears) وأعصاب القرنية (corneal nerves) والحركيات الخلوية (cytokines) (Abid and Ewadh,٢٠١٢)، وتكون بشكل إمّا حواجز فيزيائية مثل المدار العظمي للعين (bony orbit) والاجفان (eyelids)او كيميائية في الدموع (Tears). إنّ الدمع مع حركة الاجفان يعمل على طرد المواد الغريبة التي تدخل الى العين إذ يحتوي الدمع على البروتينات المضادة للميكروبات وتشمل الانزيمات الحالة (Lysozyme)، اللاكتوفيرين (Lactoferin، الدفنسين(Defenisines)،بيتا لا يسين(Beta-lysin) فضلاً عن الاجسام المضادة الافرازية (IgA)وبذلك يعمل على تقليل المحتوى الميكروبي من سطح العين (Akpek and Gottsch,٢٠٠٣)،والوظيفة الرئيسة للدموع هو منع جفاف القرنية وتقليل الالتهابات كما ان مستوى الكلوبيولين المناعي IgA يكون اعلى تركيزا في الدموع مما هو في المصل إذ يرتبط افراز IgA بالبكتريا ويمنع التصاق البكتريا بالخلايا الطلائية ، وتحتوي الدموع أيضا على IgG الذي يلعب دوراً مهماً مع IgA في تحيد بعض الفيروسات والبكتريا ،وقد تم وصف الفلم المسيل للدموع (Tear film) على انه مكون من ثلاث طبقات هي مادة مخاطية (Mucin)، وطبقة دهنية وطبقة مائية (Galletti and De Paiva,٢٠٢١). فان(Mucin) عبارة عن بروتينات سكرية محبة للماء تبلغ نسبة الكربوهيدرات فيه ٥٠-٨٠% وله دور مهم في تلين العين ومنع جفافها، كما تقوم غدة ميبومان (Meibomian) وغدة مول (Moll) بإنتاج المكون الدهني في الفلم المسيل للدموع (Bolaños- *et al.*,٢٠١٥).

وتوفر أعصاب القرنية (Corneal nerves) الحماية للقرنية من خلال تحفيز إطلاق الببتيدات العصبية التي تحفز نشاط الحركيات الخلوية (Cytokines) وتساهم في الحفاظ على التوازن المناعي للعين (De Paiva *et al.*,٢٠٢٢) فضلاً عن توسط أعصاب القرنية في انتاج الدموع وافرازها (Al-Aqaba *et al.*,٢٠١٩).

أما الحركيات الخلوية فهي عبارة عن بروتينات سكرية (Glycoproteins) متكونة من سلاسل ببتيدية لها اوزان جزيئية تتراوح بين (١٠-٥٠) كيلو دالتون تعمل على تنظيم المناعة الذاتية والمكتسبة من خلال تنظيم مهام الخلايا اللمفاوية البائية (B- cell) والخلايا التائية (T cell)، هنالك سبعة أنواع من الحركيات الخلوية (Sprague and Khalil,٢٠٠٩).وهي تعمل على تجنيد الخلايا المناعية والالتهابية لتدمير المسبب الميكروبي من خلال انتاج الببتيدات المضادة للميكروبات التي تتسبب في تمزيق الغشاء الميكروبي من خلال تفاعل الكتروستاتيكي

للبتيد موجب الشحنة مع الغشاء الميكروبي سالب الشحنة (Redfern *et al.*,٢٠١٠)، و تضم الخلايا المناعية الذاتية نوعين من خلايا البلعمة (Phagocytosis)وهما خلايا البلعم الكبير (Macrophages) والخلايا العدلة متعددة الانوية (Polymorphonuclear)اللذان يقومان بعملية البلعمة وبذلك تقتل وتهضم المسببات الميكروبية عن طريق ملامستها ، وهنالك أنواع أخرى من الخلايا المناعية الذاتية مثل الخلايا المتغصنة (Dendritic cell) والخلايا القاتلة الطبيعية (Natural killer cell) وهذه العناصر تتعرف على مجموعة متنوعة من إشارات الخطر اثناء حصول العدوى واصابة الانسجة (Palomar *et al.*,٢٠١٩).

٢- الاستجابة المناعية المكتسبة Adaptive Immunity

شكلت المناعة المكتسبة خط الدفاع الثاني عندما تفشل المناعة الذاتية في السيطرة على النمو الميكروبي عندها تتمكن الكائنات الحية الدقيقة من عبور حواجز المناعة الذاتية وبذلك تتحفز المناعة الخلوية Cell immunity والمناعة الخلطية Humoral immunity المتخصصة لمقاومة العوامل المرضية المحددة (Bolaños- *et al.*,٢٠١٥)، إذ تعتمد المناعة الخلوية على تطور الخلايا التائية المساعدة (T helper cell) بنوعيها الأول والثاني، بينما تعتمد المناعة الخلطية على تحول الخلايا اللمفية البائية (B-lymphocyte) الى خلايا بلازمية Plasma cell منتجة للأجسام المضادة مثل IgA (Knop,٢٠٠٧).

تتأثر صحة العين وتنظيمها المناعي بعمر المريض وجنسه بشكل كبير إذ إنّ الشيخوخة تغير التوازن المناعي لسطح العين وبذلك يتغير التواجد الميكروبي فيها (Wen *et al.*,٢٠١٧). وإنّ قدرة سطح العين على مكافحة العدوى البكتيرية تتراوح بين عدة دقائق إلى عدة ساعات كاستجابة ذاتية فورية عند حدوث الإصابة أو تتراوح بين ٢٤ -٤٨ ساعة نتيجة لحدوث الاستجابة المناعية المكتسبة (Perez *et al.*,٢٠١٣).

٢-٣: النبيت الطبيعي في العيون The normal flora in the eyes

إن معرفة النبيت الطبيعي لسطح العين ضروري لامتلاكه الدور المهم في آليات الدفاع عن نظام سطح العين كون العين تشابه الاغشية المخاطية الأخرى بوجود النبيت الطبيعي فيها (Mazin *et al.*,٢٠١٦) إذ يلعب دوراً مناعياً مهماً وتمثل حاجزا ضد غزو العوامل الممرضة الأخرى من بكتريا، وفايروسات و فطريات وطفيليات أولية (Aragona *et al.*,٢٠٢١)، ولا يسبب النبيت الطبيعي اخماج في الحالات الطبيعية كما إنّه يتنافس مع البكتريا الممرضة على

الموقع والمغذيات فضلاً عن إفرازه المواد المضادة للجراثيم والمواد الكيميائية التي تثبط نموها (Sthapit *et al.*,٢٠١٤).

يلعب النبيت الطبيعي دوراً وقائيا في منع انتشار الأنواع المسببة للأمراض ويحافظ على التوازن الميكروبي لسطح العين وعند حدوث أي اضطراب لسطح العين بفعل عوامل المضيف او البيئة مثل تقدم العمر، فمتلازمة جفاف العين التي تقلل المحتوى الدمعي للعين مع تقليل المركبات المضادة للميكروبات وارتداء العدسات اللاصقة فضلاً عن العوامل البيئية مثل حدوث صدمة (Trauma) او جرح في أنسجة العين فإنها جميعا تؤثر على النبيت الطبيعي للعين (Lu and Liu,٢٠١٦).

أشارت الدراسات ان بكتريا *Corynebacterium* موجودة بوفرة على سطح العين مع نسبة اقل من *Staphylococcus spp.*، *Streptococcus spp.*، *Acinetobacter spp.*، *Pseudomonas aeruginosa* وهذه البكتريا موجودة في مواقع مختلفة من سطح العين أو على الملتحمة أو حافة الجفن وتتغير نسبة وجودها حسب عمر الشخص في حين لا يؤثر الجنس على تواجدها (Capriotti *et al.*,٢٠٠٩;Ozkan *et al.*,٢٠١٩).

٢-٤: العوامل المهيئة للأخماج العيون predisposing Factors to eye infections.

يتعرض سطح العين بإستمرار لمختلف أنواع الكائنات الحية الدقيقة والأوضاع الخارجية كبقية أجزاء الجسم الأخرى لهذا يوصف بأنه بيئة مخاطية تحمي العين وتبقي القرنية رطبة وامنة (Royer *et al.*,٢٠٢٠)، وإنّ البيئة داخل العين تكون معقمة بسبب هيكلها التشريحي المغلق والحماية التي يوفرها حاجز الدم في شبكية العين لكن بالرغم من ذلك تتعرض الى الإصابة بسبب أوضاع غير طبيعية او تلوث اثناء الجراحة (Li *et al.*,٢٠٢٠). فإصابات العيون إما تكون خارجية المنشأ(Exogenous) نتيجة لاستعمال الأشياء الملوثة ودخول ميكروبات الى داخل العين او تكون داخلية المنشأ (Endogenous)نتيجة لإصابة الجسم ويقوم الدم في حالة وجود إصابة بكتيرية بتوزيع المسببات البكتيرية الى انحاء الجسم كافة بما فيها العين (Jackson,٢٠١٩).

إن انخفاض مناعة الجسم نتيجة لقلة النظافة الشخصية وأوضاع المعيشة السيئة، وانخفاض الوعي والوضع الاقتصادي السيئ يؤدي الى انخفاض مقاومة الجسم للأحياء المجهرية الممرضة التي تتعرض لها العين (Tesfaye *et al.*,٢٠١٣). فتتعرض العين للهواء الذي يحمل

الغبار والكائنات الحية الدقيقة مثل البكتريا والفطريات المسببة للأخماج خاصة عند وجود خدش او جرح في انسجة بطانة العين مما يؤدي الى تلف بارز في العين (Hameed,٢٠٢٠).

كما ترتفع معدلات الإصابة بعدوى العين البكتيرية لدى مرضى السكري كخمج القرنية المعدي وخمج الملتحمة المعدي الحاد لان محتوى البروتين خاصة البروتينات المضادة للميكروبات في الدموع يتغير مما يغير الحاجز الكيميائي للعين (Kallo *et al.*,٢٠٢١). فضلاً عن حصول إصابة للعين من قبل الكائنات المجهرية الممرضة الانتهازية في حالات متعددة مثل حالات تقدم العمر (Wen *et al.*,٢٠١٧)، وتناول الكحول والتدخين (Peragallo *et al.*,٢٠١٣)،و امراض نقص المناعة المكتسبة (الايدز) (Chodosh *et al.*,٢٠٠٨) وأمراض الغدة الدرقية (Naik *et al.*,٢٠١٩) ، واِستعمال العدسات اللاصقة من العوامل المهمة التي تغير التوازن الميكروبي لسطح العين وتزيد فرصة وجود الاحياء المجهرية الممرضة المقاومة للمضادات الحيوية وحدوث إصابات العين كخمج الجفن، وخمج الملتحمة وخمج القرنية القرحي الذي يهدد البصر (Juhong *et al.*,٢٠٢٢).

إنّ متلازمة جفاف العين تسبب فقدان التوازن في الغشاء الدمعي مما يؤدي الى التبخر المفرط للدموع حيث تؤثر في افرازات غدة ميبومان (Meibomian) المسؤولة عن الافرازات الزيتية للفلم المسيل للدموع ويسهل غزو العين من قبل الميكروبات (Dong *et al.*,٢٠١٩).

كما إنّ خمج ملتحمة العين يحصل نتيجة انتقال البكتريا الممرضة التي تصيب البطانة الحرشفية للأنف الى العين وكذلك وجود علاقة بين إصابة العين مع إصابات الانف والأذن الوسطى لوجود اِرتباط بين الفم والانف بالبلعوم والعينين (Hu *et al.*,٢٠٢١) ، كما يوجد في كيس الملتحمة بكتريا مماثلة لتلك الموجودة في الجهاز التنفسي العلوي والجلد وهي غالباً ما تكون بكتريا Staphylococcus spp. او Corynebacterium spp. أيضا تحتوي حواف واكياس الملتحمة للأشخاص الاصحاء على مسببات الامراض السالبة لصبغة كرام والتي تحدث العدوى والخمج عندما يكون لها قابلية لمقاومة آليات الدفاع للعين بسبب ضعف مناعة الجسم بشكل عام (Elzen *et al.*,٢٠١٢).

أظهرت الدراسات الحديثة إمكانية انتقال الميكروبات اثناء عملية التنفس أو من الأجزاء السفلية من الجسم (بما في ذلك الجلد) إلى مناطق أخرى مثل سطح العين عبر تدفق الهواء، كما إنّ ارتداء القناع يرتبط بزيادة أعراض جفاف سطح العين ويمهد لحدوث اخماج العين (Ozkan *et al.*,٢٠٢٢). بسبب تغير في المادة المخاطية (Mucin) بشكل كبير بعد ارتداء قناع الوجه إمّا

بسبب فرط في ثاني أوكسيد الكاربون الذي يعد مساهماً في الانزعاج السطحي للعين ويحفز الالتهاب أو بسبب هواء الزفير الذي يهرب الى اعلى حافة القناع محفز ظروف التبخر على سطح العين مما يسبب جفاف العين ويؤدي الى الالتهاب وعدم الراحة (Dsouza *et al.*,٢٠٢٢).

٢-٥: اخماج العيون Eye Infection

تتعرض العين الى العديد من الإصابات الميكروبية على الرغم من امتلاكها دفاعات مناعية، بايوكيميائية وفيزيائية ضد الاحياء المجهرية، إذ تعمل أهداب الجفن (Eyelashes) أولاً كمرشح للأوساخ وجزيئات التلوث لكي تمنع دخولها للسطح البصري كما إن عملية فتح وغلق العين اللاإرادي ينشأ عندما تلتصق الاجسام الغريبة بالأهداب، وإما الخط الدفاعي الثاني فيتمثل بالدموع المفرزة من العين كوسيلة حماية لغسل العين وقتل البكتريا الملوثة وذلك لاحتوائها على انزيم اللايسوزايم القاتل للجراثيم.

كما تعد الاجفان والملتحمة التي تتكون من نسيج ذي خلايا ظهارية كثيرة تتقشر باستمرار عند حدوث إصابة يعد خط دفاع ثالث يمنع غزو الميكروبات ويؤدي الى فصل الميكروبات الملتصقة بالطبقات السطحية الخارجية للعين (Ewadh p *et al.*, ٢٠١٤) . وعند فشل تلك الخطوط في منع الإصابة ذات الأصل الميكروبي تتطور إصابات جرثومية متنوعة منها فايروسيه مثل الفايروس الغدي (Adenovirus) الذي يسبب خمج الملتحمة وهي لا تتطلب أي مضاد حيوي لعلاجها (Watson *et al.*,٢٠١٨) وأخرى إصابات بكتيرية التي قد تصيب عينا واحدة او كلا العينين وتعد الإصابة البكتيرية المسبب الرئيس لأخماج العيون وأكثر الأخماج شيوعاً هو خمج ملتحمة العين(Conjunctivitis) خمج الجفن(Blepharitis) الذي يحدث نتيجة انتقال البكتريا الموجودة على البشرة الى بويصلة شعرة الرمش ثم يأتي بعدهما خمج القرنية (Keratitis) وربما تسبب هذه الإصابات خطراً شديداً على البصر (Watson *et al.*,٢٠١٨). كما تشترك بكتريا التراخوما (*Chlamydia trachomatis*) في الإصابات البكتيرية للعيون (Satpathy *et al.*,٢٠١٧) فضلاً عن المسببات الفطرية والطفيلية التي تصيب العين عند الاستعمال الطويل للمضادات الحيوية واستخدام العدسات اللاصقة التي تضعف من دفاعات العين (Klotz *et al.*,٢٠٠٠: Zhong *et al.*,٢٠٠٧).

ومن الممكن اختصار خطوات حصول الخمج أولاً بالتصاق المسبب الميكروبي يتبعه بعد ذلك اختراقه للغلاف الخلوي الخارجي بوسائل فيزيائية كالأهلاب ووجود طبقة الدهون متعدد

السكريد أو وسائل انزيمية أو الاثنين معا كذلك افراز الذيفانات (Toxins) ولأنّ الدهون المفسفرة والبروتينات هي وحدات كيميائية أساس للغشاء الخلوي للمضيف لهذا تعمل انزيمات الحالة للدهون المفسفرة (Phospholipases) وانزيمات البروتئيز الحالة للبروتين (Proteinases) إلى جانب انزيمات الحالة للدم (Hemolysin)المحللة لكريات الدم الحمراء على تحطيم هذه الوحدات اثناء الغزو الميكروبي لخلايا المضيف والتسبب بالأمراضية (Casadevall and Pirofski,٢٠٠٩).

٢-٦: أنواع اخماج العيون Types of eye infection

٢-٦-١: خمج ملتحمة العين Conjunctivitis

خمج الملتحمة الذي يسمى العين الحمراء (Red eye) أو العين الوردية(Pink eye) الذي ينطوي على التهاب الطبقة الرخوة التي تغطي صلبة العين وتبطن الجفون من الداخل وقد يصيب إحدى العينين أو ينتشر إلى العين الأخرى (Hameed,٢٠٢٠)، و يسبب حدوث تهيج، حكة، إحساس بجسم غريب، وسيلان أو افرازات للعين، و معظم الحالات عند البالغين ناتجة عن عدوى فيروسيه ولكن الأطفال أكثر عرضة للمسبب البكتيري (Epling,٢٠١٢). إنّ خمج ملتحمة العين الفيروسي هو الأكثر شيوعاً وإفرازاته مائية بينما يعد خمج ملتحمة العين البكتيري ثاني أكثر الأسباب شيوعاً وإفرازاته قيحية او مخاطية (Azari *et al.*,٢٠١٣)، وتشير بعض الدراسات الى إنّ ٢-٣% من المرضى المراجعين للرعاية الأولية هم يعانون من احتقان الملتحمة الذي يعود إلى أسباب عدة إما مرتبطة بالحساسية أو التهابات سطح العين وغيرها (Singh *et al.*,٢٠٢١) كما بلغت نسبة الإصابة بخمج الملتحمة (٣٥%) في دراسة محلية قام بها (Khalil *et al.*,٢٠١٧).

ويقسم خمج ملتحمة العين الى أنواع عدة حسب الاحياء المجهرية المسببة:

٢-٦-١-١: خمج ملتحمة العين البكتيري Bacterial Conjunctivitis

هو من الامراض الشائعة يصيب الأشخاص بكل الاعمار إذ تبدأ الإصابة بعين واحدة ثم تنتقل إلى العين الأخرى وأغلب الحالات تتشافي بصورة ذاتية إلا إنّ تناول العلاج يقلل من شدة الأعراض ومدة المرض (Tarabishy *et al.*,٢٠٠٨)، و يصنف خمج الملتحمة البكتيري حسب مساره وشدته إلى خمج ملتحمة العين البكتيري فوق الحاد (Hyper Acute Bacterial Conjunctivitis) وخمج ملتحمة العين البكتيري الحاد (Acute Bacterial

Conjunctivitis) فضلاً عن خمج ملتحمة العين البكتيري المزمن (Chronic Bacterial Conjunctivitis) كما جاء في (Tarabishy *et al.*,٢٠٠٨).

إن بكتريا *Neisseria gonorrhoeae* هي المسبب الأكثر شيوعاً لخمج ملتحمة العين فوق الحاد ويحدث غالبا عند حديثي الولادة ويتطلب علاج جهازي فوري (Bhat and Jhanji,٢٠٢١) وكذلك عند الأشخاص النشطين جنسيا (Godoy-Mancilla *et al.*,٢٠٢٢) والذي يتميز ببداية مفاجئة غزيرة وسميكة مع افراز صديدي (اصفر- مخضر) واحتقان عيني، تسمم كيميائي (Chemosis) وأحيانا تكون غشاء التهابي (Hovding.٢٠٠٨).

أما خمج ملتحمة العين البكتيري الحاد وهو الأكثر شيوعاً فيتميز بحرقة، وإفرازات قيحية صفراء إلى بيضاء اللون مع إفرازات دمعية يرافقها نتوءات صغيرة من النوى الليفية الوعائية على جفن الملتحمة وتتراوح مدة ظهور اعراضه من ٣-٤ أسابيع تقريباً (Hovding,٢٠٠٨;Abid and Ewadh,٢٠١٢).

كما تعد كل من بكتريا *S.aureus ,S. epidermidis S. saprophyticus* مسببات شائعة عند المراهقين والبالغين بينما بكتريا *Streptococcus pneumonia ,Haemophilus influenza* شائعة عند الأطفال اما بكتريا *Moraxella catarrhalis , P. aeruginosa* فتكثر عند مستعملي العدسات اللاصقة كما ويلاحظ هذا النوع بكثرة عند الأطفال وطلاب المدارس (Decory *et al* .,٢٠٢٠)، وتشير الدراسات ان ٥٠-٧٠% من إلتهاب ملتحمة العين الحاد هو بكتيري (Math and Rauth,٢٠١٩) كما تشير دراسة أخرى إلى إنّ ٧١% من إصابات العين لدى الأطفال هي خمج ملتحمة العين البكتيري الحاد (Johnson *et al.*,٢٠٢٢).

بينما خمج ملتحمة العين البكتيري المزمن تستمر اعراضه ل ٤ أسابيع حيث تميل الملتحمة في هذه الإصابة الى الاحمرار، الافرازات المعتدلة او الخفيفة مع التصاق الرموش صباحا كما إنّ بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidis* هي الأكثر شيوعا لهذا النوع من الإصابة (Hovding.٢٠٠٨) وإنّ خمج ملتحمة العين البكتيري هو الأكثر شيوعاً من ضمن أنواع الأخماج الأخرى بنسبة (٣٠.٧٦%) كما جاء في دراسة قام بها Math and Rauth (٢٠١٩)و اشارت دراسة أخرى إلى حدوث خمج ملتحمة العين البكتيري بنسبة ٧٢% من بين المصابين باخماج الملتحمة (Liang *et al.*,٢٠١٦) ، وأكدت

دراسة في اثيوبيا إنّ خمج الملتحمة البكتيري وخمج الاجفان هما أكثر أنواع التهابات العين الخارجية شيوعاً (Ayehubiz *et al.*,٢٠٢١) .

٢-٦-١-٢: خمج ملتحمة العين الفيروسي Viral Conjunctivitis

يمثل هذا النوع ما يقارب ٦٠-٧٥% من خمج ملتحمة العين المعدي الذي ينتقل عن طريق الاتصال المباشر بالفيروس أو انتقال الفيروس عبر الهواء والماء مثل حمامات السباحة ،إذ يسبب الاحمرار، واحتقان الأوعية الدموية، وإفرازات العين، و رهاب الضوء وقد تتكون الأغشية الكاذبة وتستمر تلك الأعراض الى ما يقارب من ١٠-١٤ يوماً كما إنّ ٩٠% من الأخماج الفيروسية لدى الأطفال سببها الفيروس الغدي(Adeno virus)وهو المسبب الأكثر شيوعا في خمج الملتحمة وأما فيروس الهربس البسيط(Herpes simplex virus)فيسبب ١.٣-٤.٨% من حالات خمج الملتحمة الحاد، وإنّ فيروس الحماقي النطاقي (Varicella zoster virus) مسؤول أيضا عن خمج ملتحمة العين كما أظهرت الدراسات الأخيرة إنّ ١-٦% من خمج الملتحمة يرتبط مع الفيروس التاجي(Corona virus) (Solano *et al.*,٢٠١٧; Marinos *et al.*,٢٠١٩;Ying *et al.*,٢٠٢١) كانت نسبة انتشار الفيروس الغدي(Adenoviral) من ٦٥-٩٠% من حالات عدوى العين الفيروسية كما جاء في هذه الدراسة (Yeu and Hauswirth,٢٠٢٠) ينتشر خمج ملتحمة العين الفيروسي في فصل الصيف كما يرتبط بنزلات البرد وتزداد الإصابات خلال الشتاء واوائل الربيع (Janicijevic *et al.*,٢٠١٧) كانت نسبة انتشار خمج الملتحمة الفيروسي ٨٨.٧% من حالات خمج الملتحمة في هذه الدراسة (Balasopoulou *et al.*,٢٠١٧).

٢-٦-٢: خمج القرنية Keratitis

هو إصابة الغشاء الشفاف الذي يغطي بؤبؤ العين والقزحية بمسبب بكتري أو فطري، يصيب الأشخاص بمختلف الأعمار من أطفال وكبار، وأهم اعراضه الألم، والاحمرار، وعدم وضوح الرؤية يصاحبه إفرازات دمعية وقيحية مع رهاب الضوء (Lin *et al.*,٢٠١٩)، وقد يؤدي إلى فقدان البصر بشكل دائم إذا لم يشخص مبكرا مما يتطلب زراعة القرنية حسب ما جاء عند (Austin *et al.*,٢٠١٧). وإنّ حدوث تلف لأنسجة القرنية هو بسبب أنتاج السموم

البكتيرية والانزيمات المحللة للبروتين و الكولاجين(Collagen) وهو مكون كيميائي مهم في أنسجة القرنية (Karring *et al.*,٢٠٠٤)،إذ يبدأ الغزو البكتيري للقرنية من خلال اتصال أجزاء من البكتيريا متمثلة بالشعيرة(Pili) او الخمل (Fimbriae) بالخلايا الطلائية للقرنية مما يسهل ارتباط البكتريا بمستقبلات سطح الخلية المضيفة ، وإنّ لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية والزائفة الزنجارية قدرة كبيرة على الالتصاق بالقرنية مقارنة مع الأنواع البكتيرية الأخرى (Livingston *et al.*,٢٠١٩).

وتحدث إصابة القرنية عند حدوث خدش او عند استعمال مساحيق التجميل كما إنّ ارتداء العدسات اللاصقة غير النظيفة والمعقمة من أكثر العوامل المسببة لخمج القرنية فضلاً عن بعض أمراض سطح العين، وجراحة القرنية، و بعض الامراض الجهازية مثل السكر وقلة المناعة هذه جميعا تغير من آليات الدفاع لسطح العين وتسمح للبكتريا بغزو القرنية وتكثر تلك الإصابات في البلدان الصغيرة (Tuft *et al.*,٢٠٢٢) ، وقد ذكرت دراسات أجريت في استراليا، و أوربا والولايات المتحدة الامريكية إنّ (٦٤.٦-٩٠.٦) % من الأخماج القرنية هي بسبب البكتريا (Ghosh *et al.*,٢٠٢٢)، وأيضا في دراسة أخرى قام بها(Livingston *et al.*,٢٠١٩) وصلت نسبة العزل البكتيري من القرنية الى (٩٠%). ولعل أهم الأنواع البكتيرية التي تسبب خمج القرنية هي *Staphylococcus aureus* و*Pseudomonas aeruginosa* و*Streptococcus pneumonia* (Peng *et al*,٢٠١٨). كما كانت نسبة العزل البكتيري من القرنية (٦٤.٧٦%) في دراسة محلية أجريت على المرضى الذين يعانون من خمج القرنية والمراجعين لمستشفى ابن الهيثم التعليمي للعيون في بغداد (Al-Shakarchi *et al.*,٢٠١٥).

٢-٦-٣: خمج الاجفان Lid infection

هو عدوى تصيب حافة الجفن ويكون سبب شائع للانزعاج والتهيج بين الناس من كل الاعمار، والأعراق، والاجناس بشكل عام ولا يهدد البصر لكن إذا ترك دون علاج فقد يتسبب في اعتلال القرنية، وتورم القرنية وتقرحها وتغيرات دائمة في شكل الجفن (Muntz *et al.*,٢٠٢١).يصنف خمج الاجفان حسب الموقع التشريحي الى نوعين الأول خمج الجفن الامامي ويؤثر على قاعدة الرموش والبصيلات ويكون المسبب الميكروبي البكتيري هو الرئيس(Amescua *et al.*,٢٠١٩) بينما النوع الثاني هو خمج الجفن الخلفي يؤثر على حافة الجفن الخلفية ويحدث بسبب عدة عوامل منها خلل وظيفي في غدة ميبومان (Meibomian gland)مما يؤثر على إفراز(meibum) الذي يلعب دوراً مهماً في ابطاء تبخر الفلم المسيل

للدموع ،و هذا التغير في الوظيفة الوقائية يترك العين عرضة للتلف السطحي وعدم الراحة ، وهنالك عوامل أخرى مثل فايروس الهربس البسيط(Herpes simplex virus)وفايروس الحماق النطاقي (Varicella zoster virus)حسب ما ذكر في هذه الدراسة (Pflugfelders *et al.*,٢٠١٤) ، وخمج الاجفان واسع الانتشار يتميز باحمرار، وحكة مع رموش دهنية وقشرية، يمكن أن يتسبب بفقدان رموش العين وهذه الاصابة لا تبقى في موقعها ويمكن ان تنتقل إلى موقع آخر من العين (Durand,٢٠١٣). ان بكتريا المكورات العنقودية سلبية الخثرة(*Staphylococcus epidermidis*) والمكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) هي أكثر الأنواع المعزولة في المرضى المصابين بخمج الاجفان (De Paula *et al.*,٢٠٢٠). كما بلغت نسبة اخماج الجفون بين ٣٧-٤٧% في دراسة أجريت في الولايات المتحدة (Pflugfelders *et al.*,٢٠١٤). بينما بلغت نسبة خمج الجفن (٣٢.٩٥%) في دراسة محلية قام بها (Abid and Ewadh,٢٠١٢).

٢-٦-٤: خمج الكيس الدمعي Dacryocystitis

هو عدوى تصيب الكيس الانفي الدمعي من العين وغالباً ما يحدث بسبب انسداد القناة الانفية الدمعية المرتبط بتشوه في القناة الدمعية او إصابة في العين نتيجة عدوى ميكروبية او صدمة وأهم أعراضه الم، و احمرار، و تورم على الجانب الداخلي من الجفن السفلي، وانتفاخ، واحتقان السائل الدمعي وبدوره يؤدي الى زيادة سماكة الجراثيم وتراكمها ويكون بشكلين حاد ومزمن (Assefa *et al.*,٢٠١٥)كما ينتج عنه حمى ،تغير في حدة البصر وفقدان الرؤية المحيطية ، ان البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام تتسبب بحدوث خمج الكيس الدمعي (Mohammed *et al.*,٢٠٢٠) كما تعد اكثر المسببات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام المسؤولة عن احداث تلك الإصابة هي *Staphylococcus aureus* بينما بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*هي من اكثر المسببات المرضية بين البكتريا السالبة لصبغة كرام كما جاء في (Chung *et al.*,٢٠١٩)، وقد أظهرت دراسة محلية ان نسبة الإصابة بخمج الكيس الدمعي البكتيري بلغت (٣%) في دراسة أجريت في بغداد (Khalil *et al.*,٢٠١٧) بينما بلغت نسبة الإصابة بخمج كيس الدمع المزمن (٤٠%) في دراسة إيرانية (Eshraghi *et al.*,٢٠١٤).

٢-٧: المسببات البكتيرية الشائعة لأخماج العيون Common bacterial etiology of eye infections

تعد البكتريا المسبب الرئيس لأخماج العيون في جميع انحاء العالم وتنتج إما من عدوى أحادية أو متعددة الميكروبات وترتبط بالعديد من العوامل بما في ذلك العدسات اللاصقة، والصدمة، والجروح، والعمليات الجراحية، والعمر، وحالة جفاف العين وانسداد القناة الانفية الدمعية المزمن (Galvis *et al.*,٢٠١٤).

وترتبط البكتريا بشكل عام بالعديد من أنواع العدوى العينية مثل خمج الملتحمة (Conjunctivitis)، وخمج القرنية (Keratitis)، وخمج باطن المقلة (Endophthalmitis)، خمج الجفن (Lid infection)، خمج كيس الدمع (Dacryocystitis) والنسيج الخلوي المداري من خلال التصاق البكتريا وغزوها للأغشية والخلايا الظهارية لامتلاكها عوامل تساعدها على الالتصاق واختراق المضيف (Bertino,٢٠٠٩).

وقد ذكر كل من (Teweldemedhin *et al.*,٢٠١٧) و (Leung *et al.*,٢٠١٨) إنّ البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام على حد سواء تتسبب باخماج العيون في الأطفال، والبالغين والشيوخ. ومن الأنواع البكتيرية التي تصيب العيون هي:

S. aureus, S. epidermidis, Streptococcus pneumonia ، Streptococcus viridians, N. gonorrhoeae, P. aeruginosa, Proteus ssp., K. pneumonia, E. coli, Haemophilus influenza.

كما لوحظ إنّ البكتريا الموجبة لصبغة كرام هي المسبب الرئيس لأخماج العيون ولاسيما بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* والتي تحتاج الى علاج فوري بإستعمال المضادات الحيوية الموضعية (Ayehubizu *et al.*,٢٠٢١: Mohammed *et al.*,٢٠٢٠)، إذ أشارت تلك الدراسات الى ان المسببات البكتيرية هي الأكثر شيوعاً لدى غالبية المرضى في المناطق الريفية وتصل نسبتها ٤٦.٨٢% بينما نسبة الإصابة نتيجة الوضع الاجتماعي والاقتصادي المنخفض ٥١.٦١%. وذلك بسبب التعامل المباشر مع الحيوانات من جهة، وقلة التثقيف وضعف معرفة المجتمع بخمج الملتحمة لهذا فإن الإصابات بالمناطق الريفية أعلى من الإصابات في المناطق الحضرية (Di rs Pedesaan,٢٠١٣: Dias *et al.*,٢٠٢٢).

وتبعا للدراسات التي أجريت، في جنوب إيطاليا حول إصابات العيون بلغت الإصابات البكتيرية (٥.٧٧%)، وإنّ ٥٤.٥%هي بكتريا موجبة لصبغة كرام بينما ٤٤.٨%هي عزلات بكتيرية سالبة لصبغة كرام وان بكتريا *s. aureus* هي البكتيريا السائدة ثم تليها بكتريا *P. aeruginosa* في حين شكلت الإصابات الفطرية ١١% فقط (D'Oria *et al.*,٢٠٢٢). بينما

في دراسة أخرى أجريت في مدينة صنعاء اكدت ان ٣٠.١٪ *S. aureus*، *S. epidermidis* ٨.٢٪، ٢٦.٧٪ *P. aeruginosa*، ٧.٥٪ *E. coli*، ١.٤٪ *Proteus*، *Streptococcus pneumoniae* ٦.٢٪ (Alshamahi *et al.*,٢٠٢٠). ومن أبرز الأنواع البكتيرية شيوعا في احداث اخماج العيون هي: -

٢-٧-١: المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*

واحدة من مسببات الأمراض البشرية المهمة في كل من المستشفيات والمجتمعات لقدرتها على التكيف والتهرب من الجهاز المناعي (Afzal *et al.*,٢٠٢٢)، وهي بكتريا موجبة لصبغة غرام كروية قطرها يتراوح بين ٠.٥-١ ميكروميتر تترتب بشكل مفرد او عناقيد غير متحركة وغير مكونة للسبورات تكون إما هوائية أو لاهوائية اختيارية تكون مستعمراتها بيضاء الى صفراء اللون ومعظمها محلله للدم من نوع بيتا عند تنميتها على وسط غراء الدم (Gnanamani *et al.*,٢٠١٧)

غالبية المكورات العنقودية منتجة لأنزيم تجلط الدم (Coagulase) وهو عامل ضراوة مهم يحمي الجرثومة من هجمات الجهاز المناعي داخل جسم العائل كما يساعد في التعرف على الكائن الحي وتميزه فضلاً عن إنها إيجابية لفحص (Catalase) وسالبة لفحص(Oxidase). كما تنمو جيداً عند التراكيز الملحية العالية ٧.٥-١٠% كلوريد الصوديوم(NaCl) ولها القدرة على تخمير سكر المانيتول حيث تنتج حامض عند تنميتها على وسط أكار المانيتول (Mannitol Salt Agar) ويتحول إلى اللون الأصفر بوجود كاشف الفينول الأحمر (Zurita *et al.*,٢٠١٠).

تسبب *Staphylococcus aureus* العديد من الآفات منها خمج الجلد، خمج الانسجة الرخوة، تسمم الدم، خمج الشغاف القلبي، اخماج العيون، اخماج رئوية، اخماج الجهاز التنفسي وأخماج الجهاز العصبي المركزي (Cheung *et al.*,٢٠٢١). تعد *Staphylococcus aureus* المسبب الأكثر شيوعاً في إصابات العيون لقدرتها على إصابة القناة الدمعية، الجفن، الملتحمة، القرنية، الغرف الامامية والخلفية للعين، الحجرة الزجاجية ويعد خمج باطن المقلة وخمج الملتحمة هي الأكثر تهديداً بسبب قدرتها على التسبب في فقدان حدة البصر أو حتى العمى

كما جاء عند كل من Ondusko *et al.*,٢٠١٨; Astley *et al.*,٢٠١٩; Petrillo *et al.*,٢٠٢١) ان بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين (MRSA) هي الأكثر ترددا في إصابات العيون في أمريكا وأستراليا (Afzal *et al.*,٢٠٢٢).

وإن ٢٠% من البشر يحملون بكتريا المكورات العنقودية الذهبية في الجزء الأمامي من الغشاء المخاطي للأنف طوال حياتهم و٦٠% يصابون بها بشكل متكرر لكونها من الممرضات الانتهازية (Zecconi and Scali ٢٠١٣).بسبب امتلاكها القدرة على غزو انسجة المضيف ثم تتضاعف وتنتشر خلال هذه الانسجة بعد أن تنتج مواداً خارج خلوية (Extracellular Substances)هي الانزيمات والذيفانات مثل انزيم تجلط الدم (Coagulase)الذي يساهم في انتاج بروتين الليفيين الذي يغطي الموقع المصاب ، ويحمي البكتريا من آليات دفاع المضيف مما يزيد من تمركزها ضمن الانسجة المصابة إلى جانب انزيمات , lipase, proteinase penicillinase, hyaluronidase وStaphylokinase ، Phosphatase وإما الذيفانات فتشمل الذيفان الحال للدم (Hemolysins) الذي يدمر خلايا الدم الحمر والذيفانات المعوية(Enterotoxins) كما تنتج الذيفان القاتل لخلايا الدم البيض (Leucocidin) وبروتين A الموجود ضمن الجدار الخلوي وتنتج ذيفان متلازمة الصدمة السمية ١ Toxic Shock (SyndromeToxin(TSST-١)) وإن عوامل الضراوة هذه هي التي تزيد من تمسك البكتريا بخلايا المضيف والتهرب من دفاعاته كما تحول انسجة المضيف إلى مغذيات تعتمد عليها اثناء نموها.(Otto,٢٠١٤;Ondusko *et al.*,٢٠١٨; Jenul and Horswill,٢٠١٩)

وعامل ضراوة آخر مهم في احداث الامراضية هو بروتين (Fibronectin binding protein) المسؤول عن تكوين الغشاء الحيوي(Biofilm)لأنه يساعد البكتريا في الالتصاق واحداث الامراضية في الانسان والحيوان (Al-mebairik *et al.*,٢٠١٦)، ولها القدرة على مقاومة مضادات البيتا لاكتام لقدرتها على انتاج انزيم (Beta-lactamase) وامتلاكها جين (*MecA*) مما يزيد من مقاومتها للمضادات الحيوية (Monecke *et al.*,٢٠١٦).

٢-٧-٢: المكورات العنقودية البشروية البيضاء ***Staphylococcus epidermidis***

بكتريا كروية موجبة لصبغة كرام غير منتجة لأنزيم تجلط الدم Coagulase وموجبة لفحصCatalase موجودة بكثرة على الجلد والاغشية المخاطية للإنسان وتعتبر من النبيت الطبيعي له (Otto,٢٠٠٩). تعد من مسببات الامراض الانتهازية التي تسبب عدوى المستشفيات

في الوقت الحاضر إذ تسبب الإصابة من حين لأخر، وتسبب عدة آفات منها خمج مجرى الدم، خمج القلب والاوعية الدموية، خمج العين، خمج الانف والاذن والحنجرة (Vuong and Otto,٢٠٠٢). كذلك الإصابات المرتبطة باستخدام الأجهزة الطبية مثل القسطرة الوريدية المحيطية والمركزية والصمامات الاصطناعية وأجهزة القلب (Byrd *et al.*,٢٠١٧).

ان المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* والمكورات العنقودية البشروية *S. epidermidis* وتعد من المسببات المهمة التي تسبب أمراض سطح العين مثل خمج الملتحمة، خمج القرنية، خمج باطن المقلة كما ذكرت الدراسات ان ٢٧.٤% تكون من إصابات العيون ببكتريا المكورات العنقودية البشروية البيضاء (Duggirala *et al.*,٢٠٠٧; Al-Dhaheri *et al.*,٢٠١٦; Deguchi *et al.*,٢٠١٨). وإن ٨٠%من الإصابات العينية ببكتريا *S. epidermidis* وفقا للمعاهدة الوطنية الامريكية للصحة هو بسبب قابليتها على تكوين الاغشية الحيوية (Biofilm) (Cao *et al.*,٢٠١٨). وإنتاج مادة مخاطية (Slime) التي تساعدها على الالتصاق (Nayak *et al.*,٢٠١١) وتوفر لها الحماية من دفاعات المضيف بمنع البلعمة ونشاط الببتيدات البشرية المضادة للميكروبات وبذلك تحميها من الجهاز المناعي للمضيف والمضادات الحيوية (Otto,٢٠١٢). كما تنتج الذيفان الحال للدم (Hemolysin) وعلى الأقل ثلاث أنواع من انزيمات(Proteases) المهمان في احداث امراض القرنية وتلفها حسب ما جاء في (Caballero *et al.*,٢٠٢١).

٢-٧-٣: الزوائف الزنجارية *Psedomonas aeruginosa*

بكتريا سالبة لصبغة كرام، مستقيمة او بشكل قضبان منحنية، غير مكونة للسبورات، قطرها يتراوح بين (٠.٨-٠.٥) × (٣-١.٥) ميكروميتر متحركة تملك اسواطاً، موجبة لفحص(Oxidase) و(Catalase)، هوائية اختيارية تنمو في نطاق حراري يتراوح بين ٣٧-٤٢ درجة مئوية (Adilabdulhady and Kadhim, ٢٠٢٢)، وتفرز صبغات مهمة في التشخيص السريري والمختبري هماpyocyanin وpyoverdin (Levinson,٢٠١٤).

تعد *P. aeruginosa* كائن ممرض انتهازي يسبب إصابات شديدة لاسيما في المستشفيات أي لها دور في عدوى المستشفيات (Nosocomial Infection) لأنها تفضل البيئات الرطبة والمرضى الذين يعانون من امراض الدم الخبيثة، القسطرة، المرضى الذين يتناولون علاجات لمدة طويلة من المثبطات المناعية والاشعاع، الجروح، الحروق، الخراجات كما تسبب خمج الأذن وأمراض الجهاز التنفسي والجهاز البولي ولأنها تظهر مقاومة عالية للمضادات الحيوية

فلها دور رئيس في الالتهابات التي تحدث حول العالم (Bassetti *et al.*,٢٠١٨). هي واحدة من أهم الجراثيم التي تصيب العين وتسبب لها اضراراً بليغة وهي المسبب لخمج القرنية البكتيري (Bacterial Keratitis) ويحدث في المرضى الذين يعانون من امراض العين الموجودة مسبقا مثل مرضى ما بعد جراحة العيون او الاستعمال الطويل للعدسات اللاصقة والعناية غير الكافية التي تؤدي الى حصول خدش في القرنية، إذ تبدأ الإصابة عندما تلتصق البكتريا بالخلايا الظهارية للقرنية ثم تنتج المستعمرات ويبدأ عندها غزو النسيج موضعيا وانتشارها خلاله (Streeter and Katouli,٢٠١٦).

إن ٢٠% من إصابات العيون البكتيرية و٦٨% من اخماج القرنية المصاحبة لارتداء العدسات اللاصقة هي بسبب بكتريا*P. aeruginosa* كما جاء في هذه الدراسة (Subedi *et al.*,٢٠١٨). وتم عزلها أيضا من خمج الملتحمة للأطفال حديثي الولادة (Yazici *et al.*,٢٠١٧) وتسبب خمج باطن المقلة(Endophthalmitis) وخمج النسيج الخلوي المداري لهذا تعد من عوامل الخطر الرئيسة ولاسيما في الهند والبلدان النامية تبعا لهذه الدراسة لان متطلباتها الغذائية منخفضة وتتحمل مجموعة من الظروف الفيزيائية لذا من الصعب القضاء عليها (Naik *et al.*,٢٠٢١) كما تمتلك تلك البكتيريا العديد من الصفات التي تزيد من إمراضيتها وضراوتها مثل:

١- مقاومتها الذاتية للمضادات الحيوية

تظهر بكتريا *P. aeruginosa* آليات عدة تكسبها مقاومة متعددة للمضادات الحيوية من خلال انخفاض نفاذية المضادات الحيوية عبر الغشاء الخلوي للبكتريا، والتعبير عن أنظمة التدفق وإنتاج الانزيمات المعطلة للمضادات الحيوية وتحويرات في الهدف بواسطة التشفير الكروموسومي اومحددات مقاومة منقولة وراثيا (El Zowalaty *et al.*,٢٠١٥). لقد زادت مقاومتها المتعددة للأدوية (Multiple drug resistance) بشكل كبير في السنوات الأخيرة وأصبحت تشكل تهديدا رئيسا في كل انحاء العالم (Potron *et al.*,٢٠١٥)، ولعل واحدة من آليات المقاومة الشائعة في *P. aeruginosa* هي اكتساب جينات المقاومة عن طريق النقل الأفقي للجينات مما أدى إلى ظهور النمط الظاهري (Multiple drug resistance) التي حدت من الخيارات العلاجية للعدوى بالإضافة الى قدرتها على تكوين أغشية حيوية قوية (Moustafa *et al.*,٢٠٢١).

٢- عوامل الضراوة المختلفة التي تمتلكها

هذه البكتريا تمتلك العديد من عوامل الضراوة منها إفراز الانزيمات المحللة للبروتين (Proteases) مثل: انزيم البروتيز القاعدي (Alkaline protease) والايلاستيز(Elastase) او الذيفانات الخارجية (Exotoxin A) وهو عامل ضراوة مهم في إصابات العين والذيفان الحال للدم (Hemolysin) فضلاً عن النوع الرابع من الأهلاب (Pilli IV)، (Flagellin) وعديد السكاريد الدهني (Lipopolysaccharide)الذي ينتج من قبل البكتريا ويزيد من الاستجابة الالتهابية لقرنية المضيف ، إذ تعمل هذه الانزيمات والذيفانات على تدمير النسيج الضام وتدهور العوامل المناعية للمضيف والهروب منها كما تلعب صبغة Pyoverdin وهي نوع من حامض الحديد الذي تنتجه بكتريا الزائفة الزنجارية ويساهم في ضراوتها ، ولاسيما في عدوى القرنية اذ تساعد على تدمير الاغشية الطلائية للقرنية من خلال دورها في إزالة الحديد من المضيف مما يتسبب في تلف الميتوكوندريا ويضعف انتاج (ATP) وكذلك تعزز هذه الصبغة من انتاج الاغشية الحيوية (Ruiz-Roldan *et al.*,٢٠٢٠: Yeung *et al.*,٢٠٢٠: Dave *et al.*,٢٠٢٠). كذلك تقوم بكتريا الزائفة الزنجارية بإنتاج الاغشية الحيوية (Biofilm) (Kugadas *et al.*,٢٠١٩). التي لها دور مهم في مقاومة عملية البلعمة (Phagocytosis) ومقاومة اختراق المضادات الحيوية لها (Wilton *et al.*,٢٠١٦).

ومن العوامل الأخرى التي تمتلكها بكتريا*P. aeruginosa* هي نظام الإفراز من النوع الثالث((T٣SS) Type ٣ secretion system) وسمومه التي يتم حقنها مباشرة في سيتوبلازم الخلايا المضيفة مما يزيد من شدة الإصابة (Dave *et al.*,٢٠٢٠).

٢-٧-٤: الاشريكيا القولونية *Escherichia coli*

هي بكتريا عصوية قصيرة سالبة لصبغة كرام تنمو بشكل جيد تحت الظروف المثلى (Jang *et al.*,٢٠١٧). هوائية أو لاهوائية اختيارية، متحركة، موجبة لفحص Catalaseوسالبة لفحص Oxidase، مخمرة لسكر اللاكتوز، تعيش بصورة طبيعية في الجزء السفلي من قناة الجهاز الهضمي (Khan and Steiner٢٠٠٢).

تعد *E. coli* من الممرضات الانتهازية الأكثر شيوعا في العالم، فهي السبب الرئيس لعدوى المستشفيات وأمراض الجهاز البولي فهي تهاجم المسالك البولية وتسبب خمج المثانة، خمج الحوض والكلية بسبب امتلاكها عوامل ضراوة محمولة على البلازميدات الكبيرة أو مناطق معينة تسمى الجزر الممرضة على الكروموسوم (Farshad *et al.*,٢٠١٢). وترتبط أيضا باخماج العيون كخمج باطن المقلة، خمج الملتحمة وخمج القرنية لقدرتها على تكوين الأغشية

الحيوية ونتيجة لضعف الجهاز المناعي أو أصابع اليد الملوثة فضلاً عن العدسات اللاصقة الملوثة وقد ظهرت مؤخراً إن الاشريكية القولونية العينية كانت مقاومة لواحد أو أكثر من المضادات الحيوية (Ranjith *et al.*,٢٠١٧). أكدت العديد من الدراسات على عزل *E. coli* من إصابات خمج الملتحمة والقرنية وكيس الدمع كعامل ممرض، كما إن بعض الإصابات ارتبطت بخمج العين الوليدي المكتسب من المستشفيات أو نتيجة لأخذ الإصابة من أمهات يعانون من اخماج المسالك البولية كما ذكر عند كلا من (Dias *et al.*,٢٠١٣;Teweldemedhin *et al.*,٢٠١٧;Ranjith *et al.*,٢٠١٩) وتم عزلها أيضا من حالات مصابة بخمج كيس الدمع المزمن في دراسة أجريت في مصر (Amin *et al.*,٢٠١٣) وشكلت نسبة ٢٢.٧% في دراسة محلية أجريت في بابل (Abid and Ewadh,٢٠١٢) تمتلك بكتريا الاشريكيا القولونية العديد من عوامل الضراوة التي مكنتها من احداث الإصابات العينية منها الذيفانات الخارجية (Exotoxin) والانزيمات مع وجود عوامل الالتصاق التي تمكنها من احداث الإصابة بالإضافة الى أنظمة سحب الحديد التي تملكها كما تستخدم نظام الافراز النوع الثالث ٣ (Type secretion system(T٣SS)) لزيادة ضراوتها (Gebisa *et al.*,٢٠١٩; Issa and Almayah,٢٠٢٠).تمتلك أيضا جينات مقاومة للمضادات الحيوية تكسبها صفة مقاومة متعددة للأدوية كمضادات البيتا لاكتام وغيرها (Poirel *et al.*,٢٠١٨).

٢-٧-٥: الكلبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae*

بكتريا عصوية سالبة لصبغة كرام غير متحركة، غير مكونة للسبورات يتراوح عرضها بين (٠.٣-١) مايكروميتر وطولها بين (٠.٦-٦) مايكروميتر. سالبة لفحص Oxidase ليس لها القابلية على تحليل الدم لاهوائية اختيارية بينما تخمر السكريات اللاكتوز السكروز الغلوكوز تتميز بمستعمرات كبيرة وردية مستديرة مخاطية على وسط الماكونكي مما يشير الى قابليتها على تخمر اللاكتوز (Sharma *et al.*,٢٠١٥).

تسبب هذه البكتريا ١٤-٢٠% من الأخماج المتعلقة بالجهاز التنفسي، القناة الصفراوية السفلية، الجروح والمسالك البولية ويزداد خطر الإصابة بعدوى المكورات الرئوية بشكل كبير في حالة وجود الأجهزة الطبية مثل معدات دعم التنفس والقسطرة المستعملة في أجنحة الأطفال حديثي الولادة والقسطرة البولية (Vuotto *et al.*,٢٠١٧) ولها القدرة في احداث إصابات مختلفة مثل خمج ملتحمة العين، خمج السحايا وتعفن الدم (Lenchenko *et al.*,٢٠٢٠) ، تعد المكورات الرئوية المسبب البكتيري الأكثر شيوعا لخمج باطن المقلة الداخلي نتيجة لانتشار

الجراثيم على الجزء الخلفي من العين (Bhikoo *et al.*,٢٠٢١) ، و ضعف الجهاز المناعي للمضيف مما يضعف عملية البلعمة(Phagocytosis)نتيجة اصابته بأمراض مستعصية مثل مرض السكري أو خراج الكبد القيحي (Fang *et al.*,٢٠٠٧) وقد تنتقل الى القرنية خاصة اذا صاحبه التهاب رئوي بسبب بكتريا *S.aureus* (Zhou *et al.*,٢٠١٨). وتمتلك هذه البكتريا العديد من عوامل الضراوة التي مكنتها من احداث الامراضية وهي مستضدات المحفظة التي لها دور في حماية البكتريا من عملية البلعمة (Paczosa and Mecsas,٢٠١٦) مع الأهداب التي تساعد في التصاق البكتريا بالخلايا الطلائية للمضيف وتساهم مع الذيفانات الداخلية مثل عديد السكريد الدهني (Lipopolysaccharide(L.P.S.)) في تكوين الأغشية الحيوية، وكلاهما يشكلان أهم عوامل الضراوة (Wang *et al.*,٢٠٢٠) فضلاً عن نظام امتصاص الحديد(Siderophores) الذي يوفر الحديد للبكتريا ويعزز نموها في أنسجة المضيف (Clegg and Murphy,٢٠١٧) كما تمتاز بمقاومتها العالية تجاه المضادات الحيوية (Effah *et al.*,٢٠٢٠).

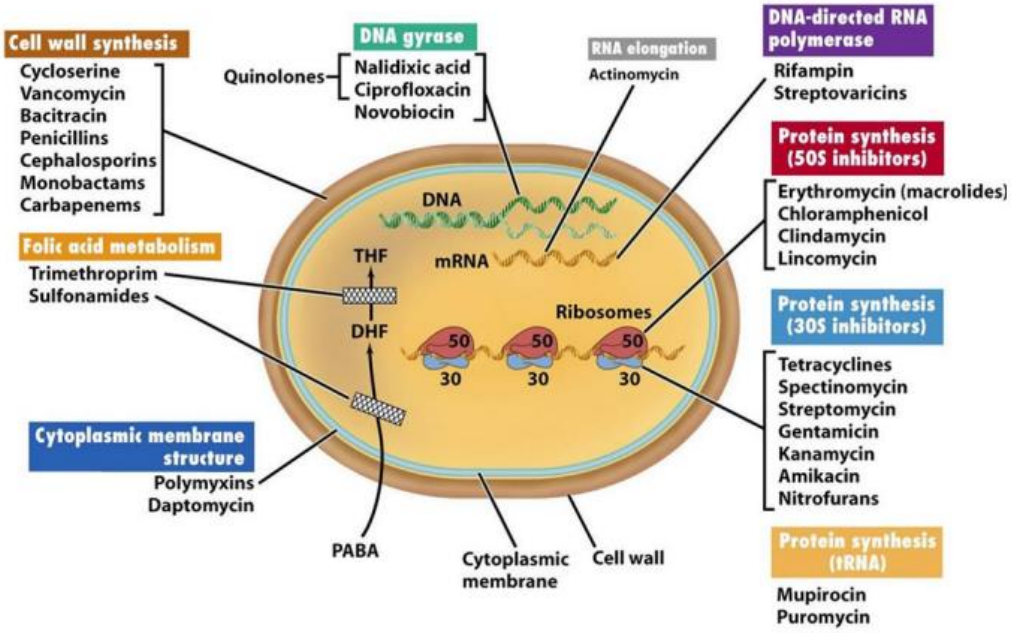
٢-٧-٦: السيراتية الذابلة *Serratia marcescens*

بكتريا عصوية سالبة لصبغة كرام، غير مكونة للسبورات سالبة لفحص Oxidase، تنتج صبغة حمراء مميزة هي صبغةProdigiosin (Khanna *et al.*,٢٠١٣). متحركة، موجبة لفحصCatalase ، مستعمراتها تكون بيضاء، وردية او حمراء(Grimont,٢٠١٥).

وتعد من مسببات الأمراض البكتيرية العينية مثل خمج القرنية، خمج الملتحمة وخمج باطن مقلة العين كما جاء في هذه الدراسة (Atta *et al.*,٢٠٢١) نتيجة لتعرض العين الى جروح شديدة أو تنتقل من خلال الايدي الملوثة تحديداً في وحدات العناية للأطفال حديثي الولادة واستعمال العدسات اللاصقة وإن ١٨-٢٣%من مرتدي العدسات اللاصقة تسبب لهم خمج القرنية(Mahlen,٢٠١١) ، بسبب امتلاكها لعوامل ضراوة مكنتها من احداث الامراضية وهي قابلية الالتصاق مع انتاج عديد السكريد الدهني (L.P.S.) ، كما تنتج الانزيمات التي تزيد من ضراوتها مثل (Lipase,Chitinase,Chloroproxidase)وانزيمات المقاومة للمضادات الحيوية(Cristina *et al.*,٢٠١٩) ، وانزيمات المحللة للبروتين (Protease)فضلاً عن الذيفانات مثل ذيفان الحال للدم (Hemolysin) و ذيفان (Serralysin)القاتل لخلايا الثدييات والذي يسبب تلف لمكونات الجهاز المناعي البشري كما جاء في هذه الدراسة (Shank *et al.*,٢٠١٥).

٢-٨: مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية Bacterial resistance to antibiotics

المضادات الحيوية هي مركبات عضوية تنتج من قبل كائن حي دقيق واحد والذي عند التراكيز المنخفضة تمنع نمو أو تكون قاتله للكائنات الحية الدقيقة الأخرى، وحديثا شملت مضادات الميكروبات التي يتم انتاجها جزيئياً او كلياً من خلال الوسائل الاصطناعية، إذ تقوم المضادات الحيوية بقتل أو تثبيط النمو البكتيري من خلال آليات عدة (Etebu and Arikekpar,٢٠١٦) كما موضحة في الشكل (٢-٢) دون أن تؤثر على خلايا جسم الإنسان.



شكل (٢-٢): اليات عمل المضادات الحيوية (Etebu and Arikekpar,٢٠١٦)

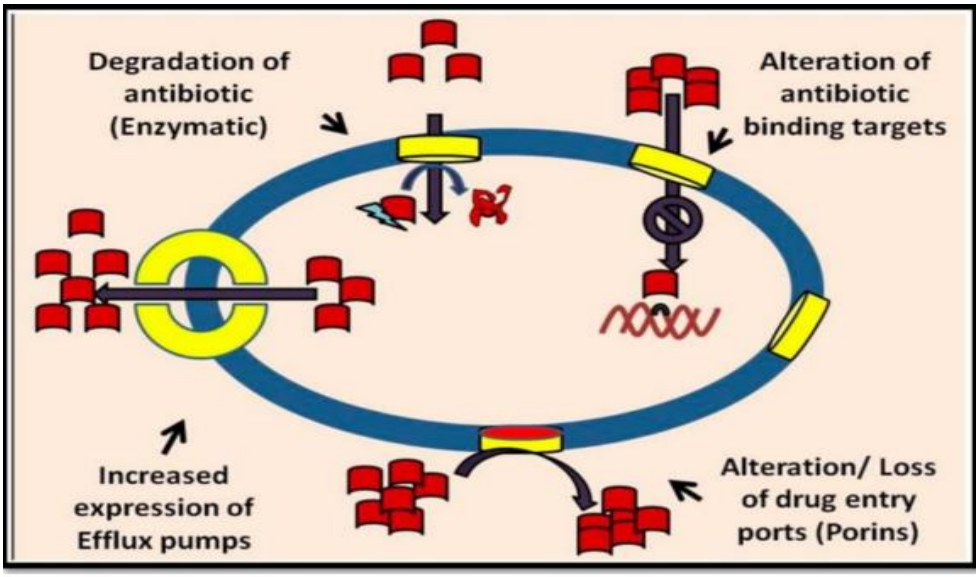
ان استعمال المضادات الحيوية لعلاج الأخماج البكتيرية أصبح أكثر صعوبة من أي وقت مضى بسبب زيادة انتشار المقاومة للمضادات الحيوية بسبب الافراط والاستعمال غير المناسب لها (Sklavounos *et al.*,٢٠٢١)، إذ يوجد نوعان من المقاومة للمضادات الحيوية:

١- المقاومة الطبيعية Natural resistance: وهي موجودة أصلاً في الكروموسوم يشفر لها بواسطة جينات محمولة على الكروموسوم، وتعد مقاومة متوارثة تنتقل من جيل الى آخر.

٢- المقاومة المكتسبة Acquired resistance: تنتج عندما تكتسب البكتريا بلازميدات تحمل جينات تشفر للمقاومة أو نتيجة حدوث طفرة في الجينات المحمولة على الكروموسوم أو بسبب

العناصر القافزة (Transposable elements) التي تحول البكتريا الحساسة الى بكتريا مقاومة للمضادات (Odumosu *et al.*,٢٠١٣).

وتمتلك البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام عدة آليات تقاوم من خلالها المضادات الحيوية من خلال خفض نفاذية الغشاء الخارجي لوجود أنظمة تدفق (Efflux pumps)، وهي مضخات خاصة في الجدار البكتيري تقلل تركيز المضاد الحيوي في السايتوبلازم (Pontes *et al.*,٢٠٢٠)، وافراز انزيمات البيتا لاكتام(Beta-lactamases) التي تحطم حلقة البيتا لاكتام وهي أكثر آليات المقاومة انتشارا، وتشمل مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات (Tang *et al.*,٢٠١٤;Blair *et al.*,٢٠١٥). كذلك التغير في موقع الهدف الذي يعمل عليه المضاد الحيوي كما موضح بالشكل (٢-٣)، لهذا فان المضادات الحيوية الموضعية واسعة الطيف تكون فعالة في علاج إصابات العيون، وتقلل من مدة المرض وتكرار حدوثه (Azari *et al.*,٢٠١٣). هنالك دراسات اكدت على استعمال المضادات الحيوية هذه (Chloramphenicol, Fusidic acid and Tobramycin) في علاج إصابات العيون (Andersson *et al.*,٢٠١٨).



شكل (٢-٣): آليات مقاومة المضادات الحيوية في البكتريا (Andersen *et al.*,٢٠١٥)

٢-٩: عوامل الضراوة المساعدة في احداث خمج العين Virulence Factors:

٢-٩-١: ذيفان حال الدم (Haemolysin)

هو سم خارجي (Toxin) يدمر الغشاء الخلوي لخلايا الدم الحمر يفرز من قبل البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام من خلال تكوين ثقوب في الغشاء الخلوي (Ibrahim *et*

al.,٢٠٢٠) محرراً بذلك الهيموغلوبين الذي يوفر الحديد للنمو الميكروبي ويسبب نخر الجلد كما يتداخل مع العمليات الدفاعية داخل جسم الإنسان ، إذ يهاجم الخلايا المناعية للمضيف ويمنعها من أداء وظيفتها (Truan *et al.*,٢٠١٣) هنالك أربع أشكال من ذيفان حال الدم الفا، بيتا، كاما و دلتا والتي تلعب دوراً مهماً في الامراضية البكتيرية (Campbell *et al.*,٢٠١٩) وتنتج غالبية بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* المرتبطة بالإصابات العينية البيتا هيمولايسين(β-hemolysin) الذي يحلل الدم بالكامل (Truan *et al.*,٢٠١٣; Divyakolu *et al.*,٢٠١٩) و يصل وزنه الجزيئي الى ٣٥٠٠٠ دالتون (Dinges *et al.*,٢٠٠٠).

٢-٩-٢: تكوين الأغشية الحيوية Biofilm Formation

الغشاء الحيوي هو تجمع ميكروبي منظم ملتصق بالسطوح ومحاط ببوليمرات خارج خلوية تحتوي على سكريات، بروتينات والحمض النووي خارج الخلية (Extra cellular DNA (eDNA) ويساعد الغشاء الحيوي على حدوث الإصابة من خلال حماية الخلايا من العوامل البيئية الضارة بما في ذلك المضادات الحيوية والجهاز المناعي للمضيف (Schilcher and Horswill,٢٠٢٠) وتساعد البوليمرات الخارج خلوية على تثبيت الغشاء الحيوي بالسطح مما يوفر للبكتريا الحماية وتتكون الاغشية الحيوية من خلال ثلاث خطوات تبدأ بالالتصاق ثم نضوج الغشاء الحيوي الرقيق ، وبعدها التشتت (Gheorghe *et al.*,٢٠١٨)و يعد تكوين الأغشية الحيوية استراتيجية مهمة تستعمل من قبل أنواع من البكتريا للبقاء على قيد الحياة عند التعرض للمركبات المضادة للميكروبات، وإن بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* لهما القابلية على تكوين الأغشية الحيوية خلال الإصابات العينية كما جاء في هذه الدراسة (Heidari *et al.*,٢٠١٨).

٢-١٠: مورثات مقاومة المضادات الحيوية للمكورات العنقودية الذهبية

٢-١٠-١: مورث *mecA* المقاومة للمثيسيلين (Methicillin Resistance Gene)

MecA هو مورث يحفز من ضراوة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* عندما يشفر للبروتين الرابط للبنسيلين (Pencillin Binding Protein PBP٢a) الذي يشترك في البناء الحيوي للجدار الخلوي ، وهو صفة مميزة لسلالات MRSA إذ يحمل على الكروموسوم البكتيري (Naji and Abdal kareem٢٠٢١) وتسمى المنطقة التي يقع فيها هذا

الجين بالشريط الكروموسومي للمكورات العنقودية *Staphylococcal* Cassette (Chromosomes Mec (SCCmec) ، ويتم تنظيمه من خلال المورثات التنظيمية مثبط المورث (mecI)ومحرض المورث (mecRI) (Hiramatsu *et al.*,٢٠١٤)الموجودة ضمن الاوبرون (*mecA* operon) المحمول على الشريط الكروموسومي البكتيري(Monecke *et al.*,٢٠١٦) ان PBP٢a ذو الوزن الجزيئي العالي لديه الفه منخفضة تجاه المضادات الحيوية من مجموعة البيتا لاكتام ، وتشمل البنسلينات (Penicillins) السيفالوسبورينات (Cephalosporins) وغيرها الذي يغير من موقع تفاعل مجموعة البيتا لاكتام كما يشكل طبقة الببتيدوكلايكان في جدار البكتريا ويعمل مع انزيمات البيتا لاكتام (β-lactamase) التي تحلل حلقة بيتا لاكتام وتبطل فعالية المضادات الحياتية وذلك يزيد من ضراوة البكتريا (Uehara,٢٠٢٢).

٢-١٠-٢: مورث *ermA* المقاومة للاريثروميسين (Erythromycin (Resistance Gene

مورث *erm* هو مختصر للمثيلة الرايبوسومية للاريثروميسين (erythromycin ribosome methylation) وهو على أنواع عدة منها (*erm A, erm B, erm C*)، وإن مورث *ermA* يشفر مثيلة لربط الحامض النووي الرايبوسومي غير منقوص الاوكسجين (Methylation of ٢٣rRNA binding) وبدوره يشفر لمقاومة المضاد الحيوي الاريثروميسين الذي ينتمي الى مجموعة المايكروليدات (Macrolides) (Abbas *et al.*,٢٠١٥; Florez-cuadrado *et al.*,٢٠١٧) تضم مجموعة المايكروليدات المضادات الحيوية هذه ((macrolide, lincosamide, streptogramin B(MLSB) ، وقد ظهرت المقاومة لهذه المضادات فضلاً عن مضادات البيتا لاكتام بشكل متزايد لدى بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين(Wang *et al.*,٢٠٢١) ويحمل هذا المورث بواسطة العنصر المتنقل(transposon) المرتبط ب(Tn٥٥٤) (Wang *et al.*,٢٠٢١) كما توجد ثلاث اليات مقاومة لمجموعة المضادات الحيوية المايكروليدات : أولا آلية التدفق النشط (efflux pump) ، ثانيا آلية تعطيل الدواء وثالثا آلية تعديل موقع الربط الرايبوسومي بواسطة المثيلة أو الطفرة في المورث(٢٣srRNA) الذي يشفر لها جين (*ermA*)(Ghanbari *et al.*,٢٠١٦).

٢-١١: المورثات المشفرة لعوامل الضراوة في بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa*

٢-١١-١: مورث *hlb*

هو مورث يقع على الجزء الكروموسومي (٤ kb clai) من الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA)ويشفر لإنتاج الذيفان حال الدم الخارجي (Hemolysin) من نوع بيتا، وهو بروتين مكون من ٣٣٠ حامض اميني ويصل وزنه الجزيئي الى ٣٩٠٠٠ دالتون (Dinges *et al.*,٢٠٠٠) تزداد الفعالية السمية له عند حضنه بدرجة حرارة اقل من ١٠ مْ بعد حضنه عند درجة حرارة ٣٧مْ ، لذلك يعد ذيفان حال الدم بيتا متغير ويسمى الحار-البارد (Hot-Cold hemolysin) ويسمى أيضا sphingomyelinase و تفرزه غالبية بكتريا *S. aureus* ،و يظهر نشاط انحلالي عالٍ ضد كريات الدم الحمراء في الأغنام ولكن ليس كريات الدم الحمراء في الارانب وأيضا يسبب تلف الخلايا الكيراتينية مما يساعد البكتريا على استعمار جلد الثدييات (Abril *et al.*,٢٠٢٠)، ويحطم أيضا خلايا اللمفاوية(Lymphocyte) والخلية وحيدة النواة (Monocyte) وخلايا الدم متعددة النوية (PMNL) للإنسان، ويحطم الدهون الاسفنجية (Sphingomyelin) لأغشية الخلايا حقيقية النوى مما يزيد من إمراضيه بكتريا المكورات العنقودية الذهبية ولاسيما إصابة القرنية (Divyakolu *et al.*,٢٠١٩).

٢-١١-٢: مورث *SEA*

مورث يشفر للذيفانات المعوية العنقودية (Staphylococcal enterotoxin A)، وتعد من الذيفانات الداخلية التي تنتجها بكتريا *S. aureus* (Baz *et al.*,٢٠٢١).إذ يقع هذا المورث على عناصر وراثية إضافية هي عاثيات بكتريا (Prophage) (Szemraj *et al.*,٢٠٢٠)، وإن (Enterotoxin A) هو بروتين احادي السلسلة يتكون من ٢٣٣ حامض اميني ويصل وزنه الجزيئي الى ٢٧٠٧٨ دالتون (Friedman *et al.*,٢٠١١) و الذيفان المعوي له دور في إصابات العيون ويسبب قرحة القرنية(Fujishima.,٢٠١٢;Sabouni *et al.*,٢٠١٤) من خلال النقل الافقي للمورثات التي تكسبها صفة إفراز الذيفان المعوي مما يزيد من ضراوة البكتريا ، لأنها تلعب دورا في تعديل المناعة وتقرح القرنية، وتعد من المواد فائقة الضخ (Superantigens) لان لها قدرة على ربط جزيئات معقد التوافق النسيجي الرئيس من الدرجة الثانية مما ينشط الخلايا التائية(T-cell)واطلاق الحركيات الخلوية (Cytokines) ، ويتسبب

بحدوث الحمى وانخفاض ضغط الدم (Johuson *et al.*,٢٠٢١) ويرتبط الذيفان المعوي كثيرا بالتسمم الغذائي أي الامراض التي تنتقل عن طريق الطعام (Srimongkol *et al.*,٢٠٢٠) بسبب مقاومته العالية للأنزيمات المحللة للبروتين (Argudin *et al.*,٢٠١٠) ويزداد وجوده في سلالات المكورات العنقودية المقاومة للمثيسيلين(MRSA)(Afzal *et al.*,٢٠٢٢) .

٢-١١-٣: مورث *exoA*

عبارة عن مورث يشفر للذيفانات الخارجية (exotoxin A) موجود في أكثر من ٩٠% من عزلات بكتريا *P. aeruginosa* (Mokhtari and Amini,٢٠١٩) يشفر له من قبل مورث (*tox A*) ويعد من عوامل الضراوة الأكثر سمية، هو ذيفان يثبط تخليق البروتين في خلية المضيف (Kadim and Abed,٢٠٢٢) عن طريق التسبب في ارتباط (ADP-ribosylation) لعامل استطالة ٢ من حقيقيات النوى وتعطيله (Tanom *et al.*,٢٠١٣) وهو المسؤول عن نخر الأنسجة (Ghazaei *et al.*,٢٠٢١)، و يبلغ الوزن الجزيئي لهذا البروتين ٦٦ كيلو دالتون (Jahromi *et al.*,٢٠١٨) ويلعب دوراً رئيساً في إمراضيه بكتريا *P. aeruginosa* التي تصيب مناطق مختلفة من اجسام الكائنات الحية مثل الدم، الجروح، العين وخمج القرنية (Pillar and Hobden,٢٠٠٢;Yousefi –Avarvand *et al.*,٢٠١٥).

٢-١١-٤: مورث *LasB*

هو عنصر الزنك المعدني (zinc metallo protease)وهو مورث يشفر لأنزيم(Elastase)، يمثل بروتينات خارجية (Exoprotein) ويبلغ الوزن الجزيئي للبروتين ٣٣ كيلو دالتون (Galdino *et al.*,٢٠١٩)واحد ذيفانات بكتريا *P. aeruginosa* التي تلعب دوراً مهماً في احداث الامراضية وحصول تلف شديد في الانسجة عند غزوها من قبل البكتريا (Khattab *et al.*,٢٠١٥) لأنه يعمل على تحليل بروتينات عدة للمضيف مثل الايلاستين (Elastin) الذي له دور مهم في سلامة الاوعية الدموية والمسؤول عن مرونتها وكذلك مرونة الرئة، والكولاجين (Collagen) الذي يعمل على الحفاظ على سلامة الأغشية (Kessler and Safrin,٢٠١٤) و يحلل المادة المخاطية (Mucin)الذي يمثل حاجز وقائي للقرنية والعين فضلاً عن بروتينات السطح(Surfactant protein) التي تساعد في إزالة البكتريا من سطح العين (Dave *et al.*,٢٠٢٠)وقد أظهرت الدراسات إن تحطيم بروتينات المضيف بواسطة (Elastase) المنتج من قبل بكتريا الزائفة الزنجارية له دور رئيس في مسار عدوى العين ويعد من عوامل الضراوة الرئيسة التي تسبب تلف الانسجة وتدميرها ولاسيما في خمج القرنية

(Thibodeaux *et al.*,٢٠٠٧)بسبب تحلل الكلوبيولين المناعي (Immunoglobulins) والفايبرين (Fibrin)(Ratajczak *et al.*,٢٠٢١)ان *Las B* له دور في تكوين الأغشية الحيوية من خلال تنشيط (Nucleoside diphosphate kinase) داخل الخلية البكتيرية والتي يتم تنظيمهما بواسطة آلية استشعار النصاب (Quorum sensing) (Cathcart *et al.*,٢٠١١) .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods

٣- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

٣-١: المواد Materials

٣-١-١: الأجهزة والأدوات المختبرية Equipments and Laboratory apparatus

الأجهزة والأدوات المختبرية المستعملة في هذه الدراسة مبينة في جدول (٣-١)

جدول (٣-١): الأجهزة والأدوات المختبرية

ت	اسم الجهاز او الأداة	الشركة المصنعة	المنشأ
١	أسطوانة زجاجية متدرجة Graduated Glass cylinder	Jlassco	India
٢	الثلاجة Refrigerator	Beko	Turkey
٣	جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis unit	Amersham	Sweden
٤	جهاز الطرد المركزي البارد عالي السرعة High Speed Cold centrifuge	Eppendorf	Germany
٥	جهاز الطرد المركزيCentrifuge	Hittich	Germany
٦	جهاز الفايتك ٢Compact Vitek	Biomerieux	Italy
٧	جهاز تفاعل انزيم البلمرة PCR	biobase	China
٨	جهاز تقطيرWater Distiller	Kottermann	Germany
٩	جهاز طرد مركزي صغيرMicro-centrifuge	Hittich	Germany
١٠	جهاز قراءة للأليزا ELISA reader	Human	Germany
١١	جهاز قياس الحموضةPH meter	Getrohm AG	England

١٢	جهاز قياس الضوء الطيفي Spectrophotometer	Tuder	Korea
١٣	حاضنةIncubator	Memmert	Germany
١٤	حامل انابيب Plastic rack	Meheco	China
١٥	حمام مائي Water bath	Memmert	Germany
١٦	دورق زجاجي Glass Beaker	Iwaki glass	Japan
١٧	دورق مخروطي Conical flasks	BBL	USA
١٨	صفيحة ساخنة Hot plate	Stuart	England
١٩	فرن Oven	Memmert	Germany
٢٠	كابينة الزرع المجهري Biological safety cabinet	Bio air	Italy
٢١	كاميرا رقمية Digital camera	Samsung	China
٢٢	مازجVortex mixer	Heidolph	Germany
٢٣	ماصات Pipette	Slammed	Germany
٢٤	مايكرويف Microwave	Gosonic	China
٢٥	مجمدة Deep freeze	Als	Italy
٢٦	مجهر ضوئي Light microscope	Olympus	England
٢٧	مصباح بنزن Burner	Himedia	India
٢٨	المؤصدة Autoclave	Hirayama	Japan
٢٩	ميزان حساس Balance sensitive	Sartorious	Germany
٣٠	الناقل الزرعي القياسي Standard wire loop	Himedia	India

٣-١-٢: المواد ذات الاستعمال الواحد Disposable Materials

المواد ذات الاستعمال الواحد المستخدمة في هذه الدراسة مبينة في جدول (٣-٢)

الجدول (٣-٢): المواد ذات الاستعمال الواحد

ت	اسم المادة	الشركة	المنشأ
١	اطباق بلاستيكية Disposable petri dishes	Afco-Dipo	Jordan
٢	اطراف الماصة الدقيقة Micropipette tips	Slamed	Germany
٣	انابيب ابندروفEppendrof tube	Sartorius	Germany
٤	انابيب مختبرية (Tubes)حجم ١٠ مل	Afco-Dipo	Jordan
٥	شرائح المجهر Microscope slide	Sail Brand	China
٦	غطاء شريحة زجاجيةcover slide	Sail Brand	China
٧	قطن طبي Cotton	HDA	China
٨	قفازات مطاطية Latex Gloves	Broche	Malaysia
٩	مسحة قطنية مع وسط ناقل Sterile Transport Medium Swab	Amies	China
١٠	ورق ترشيحFilter paper	Sartorius	Germany

٣-١-٣المواد الكيميائية والصبغات Chemicals material and Stain

جدول (٣-٣) يبين اهم المواد الكيميائية والمحاليل والصبغات المستعملة في هذه الدراسة

جدول (٣- ٣): المواد الكيميائية والصبغات

ت	اسم المادة	الشركة	المنشأ
١	انزيم تحليل الخلايا lysozyme	Biobasic INC	U.S.A
٢	بيروكسيد الهيدروجين hydrogen peroxide (H_2O_2)	BDH	England
٣	سلم الدنا -١٠٠(DNA Marker Ladder ١٥٠٠bp)	Add bio	Korea
٤	صبغة احمر المثيلMethyl Red	BDH	England
٥	صبغة التحميلLoading dye	Intron	Korea
٦	صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide dye	Promega	U.S.A.
٧	الفانفثول Alpha-naphthol	BDH	England
٨	كاشف الاوكسيديز Oxidase Reagent	BDH	England
٩	كاشف كوفاكس Kovacs Reagent	Himedia	India
١٠	كحول الايثانول المطلقAbsolute ethanol	Himedia	India
١١	كليسيرولGlycerol	BDH	England
١٢	ماء منزوع الأيونات Deionize Water	Add bio	Korea
١٣	محاليل صبغة كرام Gram stain	Syrbio	France
١٤	محلول الترحيل الدارئ-Tris-Borate EDTA(TBE) buffer	Biobasic Inc.	U.S.A
١٥	المحلول الملحي الفسلجيNormal saline	Pioneer	Iraq
١٦	مياه خالية من النيوكلياز Nuclease free water	Add bio	Korea
١٧	هلام الاكاروزAgarose	Promega	U.S.A

١٨	هيدروكسيد البوتاسيوم Potassium Hydroxide	BDH	England

٣-١-٤: العُدد Kits

جدول (٣-٤) يبين اهم العُدد المستعملة في هذه الدراسة

جدول (٣-٤): العُدد Kits

ت	العُدد Kits	الشركة	المنشأ
١	عدة استخلاص الحمض النووي الجيني Genomic DNA extraction kits	Intron	Korea
٢	Taq master mix	Bioneer	Korea
٣	اشرطة جهاز الفايتك Vitek٢gram positive Vitek٢ gram negative Vitek٢ Antimicrobial susceptibility test	Biomirieux,INC	France

٣-١-٥: الأوساط الزرعية Culture Media

جدول (٣-٥) يبين كل الأوساط الزرعية المستعملة في عزل البكتريا في هذه الدراسة

جدول (٣-٥): الأوساط الزرعية

ت	اسم الوسط	الشركة	المنشأ
١	غراء الدم الأساس Blood agar base	Himedia	India
٢	وسط نقيع القلب والدماغ Brain-Heart infusion broth	Himedia	India
٣	غراء السترايمايدCetrimide agar	Himedia	India
٤	غراء الماكونكيMacConkey agar	Himedia	India
٥	غراء المانيتولMannitol salt agar	Himedia	India
٦	الغراء المغذيNutrient agar	Himedia	India
٧	غراء السيمون Simmons citrate agar ستريت	Himedia	India
٨	غراء اليوريا الاساسUrea-base agar	Himedia	India
٩	الوسط السائل المغذي Nutrient Broth	Himedia	India
١٠	وسط ماء الببتون المغذي Peptone water broth	England	Oxoid
١١	وسط احمر المثيل – فوكس بروسكاور السائل Methyl red-Voges proskauer	England	Oxoid

٣-١-٦: المضادات الحيوية Antibiotics

كل المضادات الحيوية التي استعملت في هذه الدراسة لاختبار الحساسية مجهزة من شركة BioMerieux الفرنسية المبينة في جدول (٣-٦)

جدول (٣-٦): المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة

ت	اسم المضاد	الرمز	ت	اسم المضاد	الرمز
١	Amoxicillin	AM	١٩	Piperacillin	PIP
٢	Amoxicillin-Clavulanic Acid	AMC	٢٠	Levofloxacin	LEV
٣	Benzylpenicillin	penG	٢١	Imipenem	IEM
٤	Oxacillin	OXC	٢٢	Ticarcillin	T
٥	Cefalexin	FOX	٢٣	Norfloxacin	NOR
٦	Cefixime	FOX	٢٤	Meropenem	MEM
٧	Cefpodoxime	CEP	٢٥	Moxifloxacin	MOX
٨	Cefepime	FEP	٢٦	Erythromycin	E
٩	Cefadroxil	CED	٢٧	Clindamycin	CD
١٠	Cefotaxime	CTX	٢٨	Linezolid	LIN
١١	Ciprofloxacin	CIP	٢٩	Vancomycin	VAN
١٢	Colistin	C	٣٠	Clarithromycin	CLR
١٣	Ceftazidime	CAZ	٣١	Tetracycline	TE
١٤	Ticarcillin\Clavulanic acid	TIM	٣٢	Tigecycline	TGC
١٥	Amikacin	AK	٣٣	Fusidic Acid	FA
١٦	Gentamicin	CN	٣٤	Rifampicin	RA
١٧	Tobramycin	TOB	٣٥	Trimethoprim\Sulfamethoxazole	TS
١٨	Teicoplanin	TEC	٣٦	Azithromycin	AZM

٣ ـ١ـ٧: المواد والمحاليل المستعملة في الكشف عن هيمولايسين بيتا وفعاليته:

٣ـ١ـ٧ـ١: الوسط المعرف كيميائيا ((Chemical defined medium(CDM)

المادة	الوزن بالغرام
فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين (K_2HPO_4)	٢.٣
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4)	٠.٧٨
كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$	١
كبريتات المغنسيوم ($MgSO_4$)	٠.١
بنزوات الصوديوم ($Na_3C_6H_5O_7$)	٠.٦

حضر الوسط كما جاء في (Synder and Koch,١٩٦٦) بإضافة كل من هذه المواد المذكورة آنفاً إلى ٩٠٠ مل من الماء المقطر وأكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل وضبط الرقم الهيدروجيني إلى ٧.٤ وعقم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة (١٢١مْ) وضغط (١٥ باوند/انج^2) لعشر دقائق وبعد ذلك تم إضافة ٠.٢ % سكر الكلوكوز الذي تم تعقيمه مسبقا باستخدام مرشح دقيق (Millipore filter) قطر ثقوبه (٠.٤٥) مايكروميتر.

٣ـ١ـ٧ـ٢: عالق خلايا الدم الحمر RBCs suspension

جمع (١٠) مل من دم الأغنام ووضع في قنينة حاوية على مادة مانعة للتخثر، وبعدها تم فصل كريات الدم الحمراء بواسطة جهاز النبذ المركزي بسرعة (١٢٠٠دورة / دقيقة) ولعشر دقائق ثم غسلت بمحلول دارئ الفوسفات الملحي وعلقت به بنسبة (٢%).

٣ـ١ـ٧ـ٣: المنحنى القياسي لتحلل الدم باستخدام تراكيز متدرجة من كلوريد الصوديوم

رسم المنحنى القياسي لتحلل الدم كما جاء في (Norddin *et al.*,٢٠١٠) ، إذ حضرت تراكيز متدرجة من محلول كلوريد الصوديوم باستخدام الماء المقطر ، ثم مزج (٣) مل من كل تركيز ملحي من هذه التراكيز مع (١) مل من خلايا الدم الحمر المغسولة والمعلقة بالدارئ الفسلجي، بعدها حضنت الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة لساعة واحدة ، ثم رسبت الأنابيب على سرعة (١٢٠٠ دورة /دقيقة) ل ٣٠ دقيقة، بعدها قرأت الامتصاص للراشح بعد فصله عن الراسب على طول موجي (٤١٢nm)، علماً إن أول أنبوبة وضع فيها ماء مقطر مع عالق خلايا

الدم الحمر فقط، وأخذت الامتصاصية لها أيضا، لاستخراج التراكيز التي سببت تحلل دموي بنسبة ٥٠% كما في الجدول (٣-٧) وحسب العلاقة الآتية:

$$\text{Hemolysis}٥٠٪=\frac{A}{A١}*١٠٠٪$$

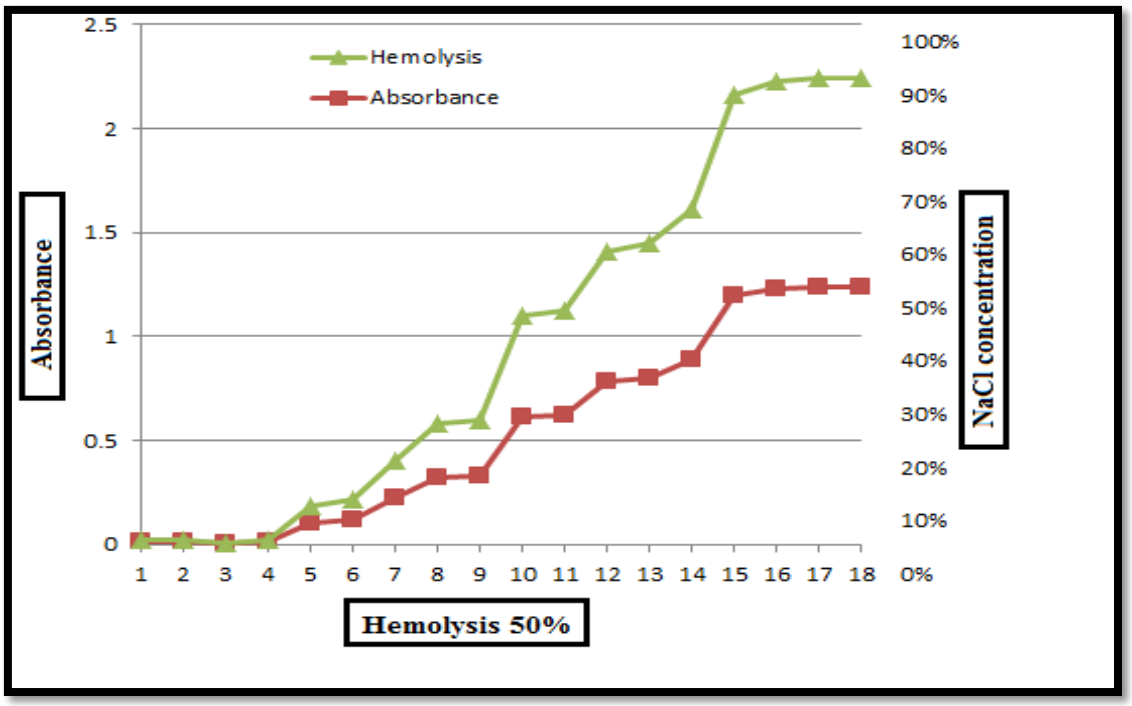
ان A: تمثل قيمة الامتصاص الصغرى.

A١: تمثل قيمة الامتصاص العظمى.

جدول (٣-٧): التراكيز المتدرجة من محلول كلوريد الصوديوم وقيمة الامتصاصية لكل تركيز مع التحلل الدموي بنسبة (٥٠%)

رقم الانبوبة	تركيز كلوريد الصوديوم (غم/ ١٠٠ مل)	الامتصاصية على طول موجي (٤١٢nm)	التحلل الدموي بنسبة(٥٠%)
١	٠.٩٠٪	٠.٠١٢	٠.٩٧
٢	٠.٨٥٪	٠.٠١١	٠.٨٩
٣	٠.٨٠٪	٠.٠٠٢	٠.١٦
٤	٠٧٥٪	٠.٠١١	٠.٨٩
٥	٠.٧٠٪	٠.١٠١	٨.١٤
٦	٠.٦٥٪	٠.١١٩	٩.٥٩
٧	٠.٦٠٪	٠.٢٢١	١٧.٨١
٨	٠.٥٥٪	٠.٣٢١	٢٥.٨٧
٩	٠.٥٠٪	٠.٣٣١	٢٦.٦٧
١٠	٠.٤٥٪	٠.٦١١	٤٩.٢٣
١١	٠.٤٠٪	٠.٦٢١	٥٠.٠٤
١٢	٠.٣٥٪	٠.٧٨١	٦٢.٩٣
١٣	٠.٣٠٪	٠.٨٠١	٦٤.٥٤
١٤	٠.٢٥٪	٠.٨٩١	٧١.٨
١٥	٠.٢٠٪	١.١٩٨	٩٦.٥٤
١٦	٠.١٥٪	١.٢٣٣	٩٩.٣٦
١٧	٠.١٠٪	١.٢٤١	١٠٠

١٨	٠.٠	١.٢٤١	١٠٠



←الشكل (٣-١): المنحنى القياسي للتحلل الدموي باستخدام تراكيز متدرجة من ملح كلوريد الصوديوم

٣-١-٨: البادئات Primers

البادئات المستعملة في هذه الدراسة تم تجهيزها من شركة (Macrogen) الكورية وتشمل

- **بادئات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* والموضحة في جدول (٣-٨):**

جدول (٣-٨): بادئات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية

اسم البادئ	تسلسل القواعد النيتروجينية ٥`_____٣`		حجم الناتج(bp)	المصادر
MecA	F	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA	٣١٠	Braoios,*et al.*٢٠٠٩
	R	CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA		
hl b	F	GTGCACTTACTGACAATAGTGC	٣٠٩	Jarraud, *et al.*٢٠٠٢
	R	GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT		
SEA	F	GGT TAT CAA TGT GCG GGT GG	١٠٢	Nam, *et*

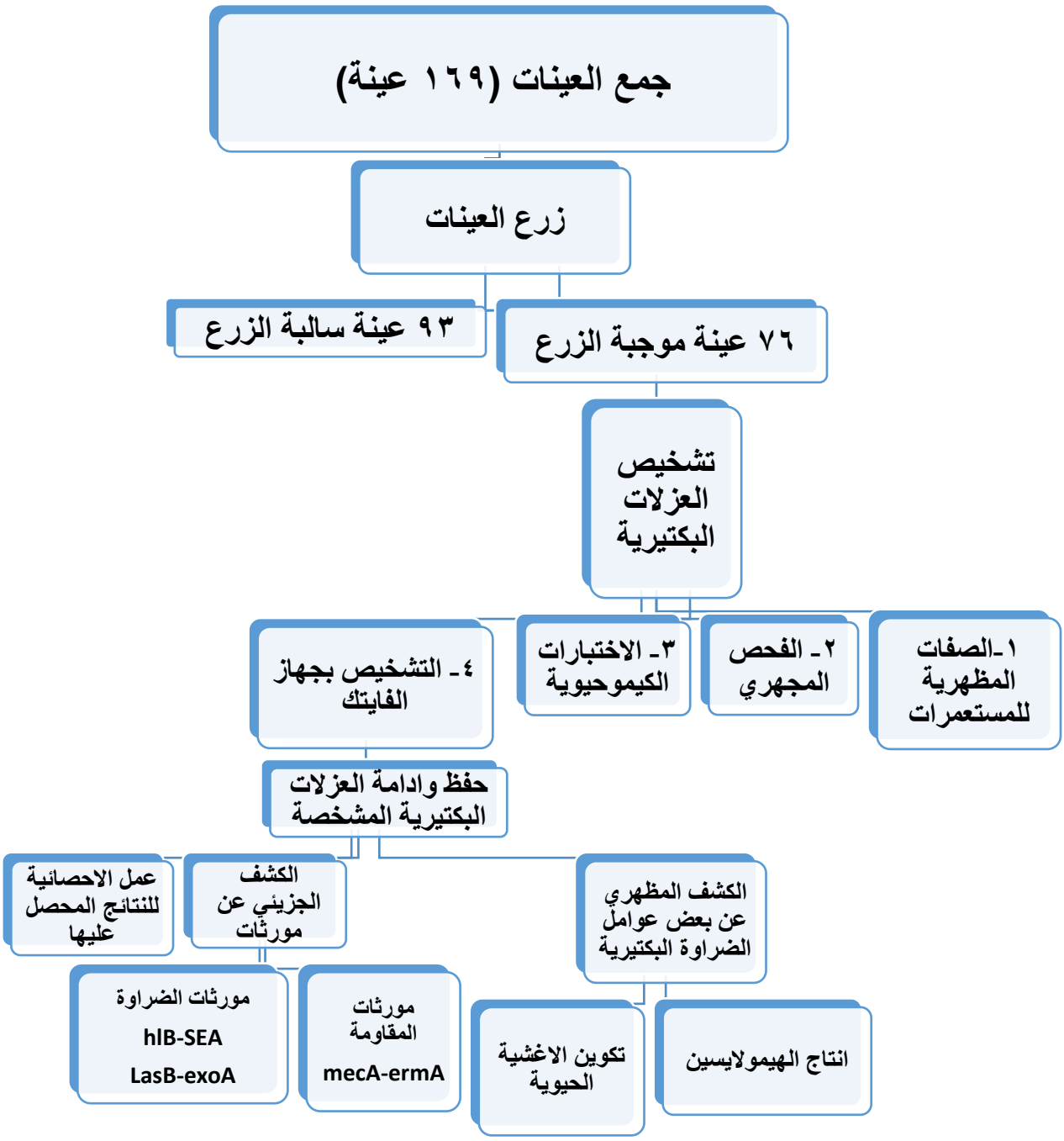
*al.*٢٠١١				
		R	CGG CAC TTT T TT CTC TTC GG	
Safain, ٢٠٢٠	٦٤٥	F	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	*ermA*
		R	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA	

- **بادئات بكتريا الزائفة الزنجارية *P. aeruginosa* الموضحة في جدول (٣-٩):**

جدول (٣-٩): بادئات بكتريا الزائفة الزنجارية

المصادر	حجم الناتج(bp)	تسلسل القواعد النيتروجينية ٥`_____٣`		اسم البادئ
Ghazaei,٢٠٢١	٣٩٦	F	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC	*Exo A*
		R	CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT	
Ghazaei,٢٠٢١	٣٠٠	F	GGAATGAACGAAGCGTTCTC	*Las B*
		R	GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG	

٣-١-٩ :تصميم الدراسة Study design



شكل (٣-٢): مخطط توضيحي لخطوات العمل المتبعة في هذه الدراسة

٣-٢: طرائق العمل Methods

٣-٢-١: جمع العينات السريرية Collection of clinical samples

جمعت (١٦٩) مسحةً من المرضى المصابين باخماج العيون ومن ثلاث مناطق هي الملتحمة ، القرنية والاجفان و المراجعين لاستشارية العيون في مستشفى الحسن المجتبى (ع)، مستشفى الهندية العام ومركز السيدة زينب (ع)التخصصي للعيون في محافظة كربلاء المقدسة ،إذ تراوحت أعمارهم من (١-٧٥) سنةً ومن كلا الجنسين ذكور وأنات للمدة من آب ٢٠٢٢ ولغاية كانون الثاني ٢٠٢٣ ، وإعتمادا على التشخيص الطبي من قبل الأطباء الاختصاص عملت استمارة خاصة لكل مريض تضمنت بعض المعلومات المهمة التي شملت إسم المريض ، العمر ، الجنس ، السكن و الامراض المزمنة وكما مبين في الاستمارة رقم (١) الملحق ، وبعد ذلك جمعت العينات باستعمال مسحات قطنية معقمة وذلك بتدويرها على الجزء المصاب بلطف ، كما جاء في (Gwenhure and shepherd,٢٠١٩) ثم نقلت المسحات مع وسطها الزرعي الناقل(Transport media) إلى مختبر الأحياء المجهرية في مستشفى الحسن المجتبى(ع) من أجل زرعها على الاوساط العامة وسط غراء الدم (Blood agar) و التفريقية وسط الماكونكي (MacConkey agar) والانتقائية (وسط المانيتول Mannitol salt agar ووسط الستريمايد Cetrimide agar) وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعةً لغرض تنمية وعزل البكتيريا.

٣-٢-٢: التعقيم Sterilization

تم التعقيم باستعمال ثلاثة طرق (Barer and Irving,٢٠١٨):

A – التعقيم بالحرارة الرطبة Wet Hot Sterilization

تم تعقيم كل الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة والتي لا تتأثر بالحرارة باستعمال جهاز المؤصدة Autoclaveوبدرجة حرارة ١٢١م وضغط ١٥ باوند/انج٢ لمدة ١٥ دقيقة.

B – التعقيم بالحرارة الجافة Dry Hot Sterilization

عقمت المواد الأخرى مثل الأدوات الزجاجية بالفرن الكهربائي Oven بدرجة حرارة ١٦٠م لساعتين.

C – التعقيم بالترشيح Filtration Sterilization

عقمت المحاليل التي تتأثر بالحرارة بواسطة مرشحات دقيقة (Millipore filters) بقطر ٠.٢٢ مايكروميتر.

٣-٢-٣: تحضير الأوساط الزرعية Preparation of Culture Media

٣-٢-٣-١: الأوساط الزرعية الجاهزة Ready Made Media

٣-٢-٣-١-١: وسط غراء الماكونكي MacConkey Agar

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بإذابة ٥١.٥ غم من الوسط في لترمن الماء المقطر وعقم بجهاز المؤصدة ثم ترك ليبرد الى درجة (٥٠-٤٥) مْ، وصب بعدها في اطباق معقمة. واستعمل هذا الوسط كوسط تفريقي لعزل البكتريا السالبة لصبغة كرام وتشخيصها من خلال قدرتها على تخمر سكر اللاكتوز (Jacob *et al.*,٢٠٢٠).

٣-٢-٣-١-٢: وسط غراء المانيتول الملحي Mannitol salt Agar

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة ١٠٨ غم من الوسط في لتر من الماء المقطر، وعقم بجهاز المؤصدة ثم ترك ليبرد الى درجة (٥٠-٤٥) مْ وصب بعدها في اطباق معقمة، استعمل كوسط انتقائي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية لعزلها وتشخيصها من خلال قابليتها على تحمل ملوحة الوسط لاحتوائه على نسبة عالية من الاملاح التي تثبط نمو أنواع أخرى من البكتريا فضلا عن قابليته على تخمر سكر المانيتول وتحويل لون الوسط الى اللون الأصفر (Ayeni *et al.*,٢٠١٧).

٣-٢-٣-١-٣: وسط غراء المغذي Nutrient Agar

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة ٢٨غم من الوسط في لتر من الماء المقطر وعقم بجهاز المؤصدة ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة (٥٠-٤٥) مْ وصب بعدها في اطباق وانابيب معقمة وبعدها استعمل في تنمية وحفظ العزلات البكتيرية (MacFaddin,٢٠٠٠).

٣-٢-٣-١-٤: وسط غراء الستريت Simmons Citrate Agar

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة ٢٤.٢٨ غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر، وعقم بجهاز المؤصدة ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة (٤٥-٥٠) مْ ثم وزع في انابيب نظيفة ومعقمة وبعدها ترك ليتصلب بصورة مائلة واستعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على استخدام السترات كمصدر وحيد للكاربون (Cheng *et al.*,٢٠١٢).

٣-٢-٣-٢: الأوساط الزرعية التركيبية Laboratory Prepared Media

٣-٢-٣-٢-١: وسط غراء الدم الأساس Blood Agar Base

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بإذابة ٤٠ غم من مسحوق الوسط في لتر من الماء المقطر ثم تم تعقيمه في المؤصدة وبعد انتهاء عملية التعقيم برد الى درجة حرارة (٤٠-٤٥) مْ واضيف اليه نسبة ٥% من دم الانسان ثم صب في اطباق معقمة واستعمل كوسط اغنائي في عزل وتشخيص البكتريا فضلا عن ملاحظة قدرة البكتريا على تحلل خلايا الدم الحمر من خلال مناطق تحلل الدم (Hemolysis) (Niederstebruch *et al.*,٢٠١٧).

٣-٢-٣-٢-٢: وسط اكار الستريمايد Cetrimide Agar

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة ٤٦.٧ غم من الوسط في لتر من الماء المقطر ثم اضيف اليه ١٠ ميللتر من الكليسيرول وبعدها عقم بجهاز المؤصدة ثم ترك ليبرد الى درجة (٤٥-٥٠) مْ وصب بعدها في أطباق معقمة، استعمل كوسط انتقائي لعزل وتشخيص بكتريا الزوائف الزنجارية (Hashim,٢٠١٣).

٣-٢-٣-٢-٣: وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brian-Heart infusion broth

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة ٣٧ غم من الوسط في لتر من الماء المقطر، عقم بجهاز المؤصدة ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة (٤٥-٥٠) مْ ووزع في انابيب معقمة وتم استخدام هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط العزلات البكتيرية فضلاً عن حفظ هذه العزلات بعد إضافة ١٥-٢٠% جليسيرول الى الوسط السائل بعد تعقيمه (ALmayyahi,٢٠١٨)

٣-٢-٣-٢-٤: وسط غراء اليوريا Urea Agar

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة ٢٤ غم من اكار اليوريا الأساس في لتر من الماء المقطر، وعقم بجهاز المؤصدة ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة (٤٥) مْ وبعدها تم إضافة ٥٠ مل من محلول اليوريا (٤٠%)المعقم بالترشيح وصب بعد ذلك في انابيب معقمة بمقدار ٥مل لكل انبوبة واستخدم هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم Urease الذي يحلل اليوريا الى امونيا وثاني أوكسيد الكاربون (MacFaddin,٢٠٠٠).

٣-٢-٤: المحاليل الكيميائية والكواشف Chemical Solution and Reagent

٣-٢-٤-١: المحلول الملحي الفسيولوجي Normal Saline

حضر المحلول الملحي بإذابة ٠.٨٥ غم من كلوريد الصوديوم NaCl في ٥٠ مل من الماء المقطر، وبعد اكتمال ذوبانه أكمل الحجم الى ١٠٠ مل من الماء المقطر (Suwansaksri *et al.*,٢٠٠٣).

٣-٢-٤-٢: محلول ماكفرلاند (٠.٥ Macfarland Solution)

تم الحصول على محلول ماكفرلاند (٠.٥) جاهز من مختبر الصحة العام في دائرة صحة كربلاء المقدسة، واستعمل هذا المحلول للوصول الى عدد تقريبي للخلايا البكتيرية يقدر (٠.٥ $X10^8$) خلية لكل مليليتر (Esther and Fatima,٢٠٢٠).

٣-٢-٤-٣: دارئ الفوسفات الملحي Phosphate Buffer Saline(PBS)

حضر الدارئ بإذابة ٨ غم من كلوريد الصوديوم، ٠.٣ غم من فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين و١.١٢ غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في ٥٠٠ مليلتر تقريبا من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى اللتر وتم ضبط رقمه الهيدروجيني الى ٧.٢، وبعد ذلك عقم بجهاز المؤصدة ثم حفظ بدرجة حرارة ٤ م لحين الاستعمال (MacFaddin,٢٠٠٠).

٣-٢-٤-٤: كاشف الكاتليز Catalase reagent

حضر الكاشف وذلك بخلط ٣ مل من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2في ١٠٠ مل من الماء المقطر واستعمل للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم الكاتليز (Tille,٢٠١٥).

٣-٢-٤-٥: كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent

حضر الكاشف انيا بإذابة ١ غم من مادة رباعي مثيل بارا فنيلين ثنائي امين ثنائي هيدروكلورايد (Tetra methyl P-phenylen diamine dihyrochlorid) في ١٠٠ مل من الماء المقطر في قنينة معتمة واستخدم بعد ذلك للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم الاوكسيديز (Tille,٢٠١٥).

٣-٢-٤-٦: صبغة غرام Gram Stain

استعملت هذه الصبغة الجاهزة المتكونة من (صبغة البنفسج البلوري Crystal Violet، محلول الأيودين Iodine Solution، الكحول المطلق وصبغة السفرانين Sufranine) لدراسة الخصائص المظهرية للبكتريا المعزولة ولغرض تفريق البكتريا الى سالبة أو موجبة لصبغة غرام.

٣-٢-٤-٧: محلول صبغة البنفسج البلوري

حضر محلول صبغة البنفسج البلوري بتركيز ٠.١% وذلك بإذابة ٠.١ غم من الصبغة في ١٠ مل من الميثانول المطلق وبعد ذوبانه بصورة تامة أكمل الحجم الى ١٠٠ مل بالماء المقطر اذ استعمل هذا المحلول للتحري عن قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي (Wood and Leesbug,٢٠١٠).

٣-٢-٤-٨: كاشف احمر المثيل Methyl Red reagent

حضر بإذابة ٠.١ غم من صبغة احمر المثيل في ٣٠٠ مل من ٩٥% كحول اثيلي ثم أكمل الحجم الى ٥٠٠ مل باستخدام الماء المقطر، وتم استخدامه للكشف عن التحلل الكلي لسكر الكلوكوز (MacFaddin,٢٠٠٠).

٣-٢-٤-٩: كاشف فوكس بروسكاور Voges- Proskaure reagent

ويتكون من محلولين:

محلول (A) هيدروكسيد البوتاسيوم KOH: حضر بإذابة ٤٠ غم من المادة في ٩٠ مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى ١٠٠ مل.

محلول (B)الفا نفثول Alpha-nephthol : حضر بإذابة ٥ غم من المادة في ٩٠ مل من الكحول الاثيلي بتركيز ٩٩% ثم أكمل الحجم الى ١٠٠ مل باستعمال الكحول نفسه .

واستعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز وإنتاج Acetyl Methyl Carbinol في اختبار الفوكس – بروسكاور (MacFaddin,٢٠٠٠).

٣-٢-٥: زرع المسحات Swab Culture

تم زراعة المسحات المأخوذة من عيون المصابين على وسط غراء الدم Blood agar وغراء الماكونكي MacConkey agar بطريقة التخطيط وحضنت بدرجة حرارة ٣٧م° لمدة ٢٤ ساعة من اجل التحري عن البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام.

٣-٢-٦: تشخيص العزلات البكتيرية Identification Of Bacterial Isolates

شخصت البكتريا بالاعتماد على الصفات الزرعية والمجهرية بالإضافة الى الفحوصات الكيموحيوية وكما يلي:

٣-٢-٦-١: الصفات الزرعية Cultural Characteristics

تم دراسة الصفات المظهرية للعزلات البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية أولا بالاعتماد على الصفات المظهرية التي تتضمن شكل، لون المستعمرة، حجم المستعمرة وحافاتها وارتفاعها وقوامها ورائحتها (Jasim,٢٠٢٠).

٣-٢-٦-٢: الفحوصات المجهرية Microscopic Examination

اجري الفحص المجهري للخلايا البكتيرية تحت المجهر من خلال عمل مسحة بكتيرية ثم تصبيغها بصبغة غرام بواسطة نقل جزء من المستعمرة البكتيرية بواسطة عروة الناقل Loop إلى شريحة زجاجية نظيفة وبعد تثبيتها بالحرارة وتصبيغها فحصت تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي لمعرفة شكل وترتيب الخلايا البكتيرية وطبيعة تفاعلها مع الصبغة (Froböse *et al.*,٢٠٢٠).

وبعد التشخيص الاولي تم زرعها على الأوساط الانتقائية المتمثلة بوسط غراء المانيتول الملحي (Mannitol salt Agar) (Sivaraman *et al.*,٢٠٢١).

ووسط غراء السترايمايد (Cetrimide Agar) لتميز وتشخيص بكتريا *P. aeruginosa* لأنه لا يسمح بنمو أي نوع اخر من البكتريا (Alonso *et al.*,٢٠٢٠).

٣-٢-٦-٣: الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

٣-٢-٦-٣-١: فحص الكاتليز Catalase test

نقل جزء من مستعمرة بكتيرية بعمر (١٨-٢٤) الى شريحة زجاجية ومن ثم وضع فوقها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين ٣% ان ظهور الفقاعات دلالة على إيجابية الفحص وان البكتريا لها القابلية على انتاج انزيم Catalase الذي يحلل كاشف H_2O_2 الى اوكسجين وماء (Reiner,٢٠١٠).

٣-٢-٦-٣-٢: فحص الاوكسيديز Oxidase test

وضعت قطرة من كاشف الاوكسيديز على ورقة ترشيح نظيفة ثم نقل جزء من المستعمرة البكتيرية بواسطة عود خشبي معقم على ورقة الترشيح ان تحول لون المستعمرة الى اللون البنفسجي خلال ثواني د ليل على إيجابية الفحص (Shields and Cathcart,٢٠١٠).

٣-٢-٦-٣-٣: فحص انتاج انزيم التجلط Coagulase test

وضع ٠.٥ مل من بلازما دم الانسان في انابيب معقمة ثم نقلت مستعمرة بكتيرية بعمر (١٨ -٢٤) ساعة بواسطة عود خشبي معقم الى الانابيب الحاوية على البلازما وبعد مزجها جيداً حضنت بدرجة حرارة (٣٥-٣٧) مْ لمدة أربع ساعات ان تجلط البلازما دليل على إيجابية الفحص (Katz,٢٠١٠).

٣-٢-٦-٣-٤: اختبار الاندول (Indole test)

لقح وسط ماء الببتون السائل المحضر حسب تعليمات الشركة بمستعمرة بكتيرية بواسطة عروة الناقل المعقم ثم حضن الوسط بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ الى ٤٨ ساعة بعد ذلك تمت إضافة خمس قطرات من كاشف كوفاكس على السطح الداخلي للأنبوبة ان ظهور حلقة حمراء خلال ثوان دليل على إيجابية الفحص وان البكتريا لها القابلية على تحويل الحامض الاميني Tryptophan الى Indole نتيجة لأمتلاكها انزيم Tryptophanases (MacWilliam,٢٠١٢).

٣-٢-٦-٣-٥: اختبار فوكس بروسكاور Voges-Proskaure test

لقح وسط MR-VP المحضر حسب تعليمات الشركة بالبكتريا المراد فحصها ثم حضن بعد ذلك لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧ مْ ومن ثم اضيف لها ٠.٦ مل من محلول كاشف الفا نفثول و٠.٢ مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم ويمزجان معا في انبوبة الاختبار ان تحول لون الوسط من اللون الأصفر الى اللون الوردي دليل على إيجابية الفحص (McDevitt,٢٠٠٩).

٣-٢-٦-٣-٦: اختبار احمر المثيل Methyl red test

لقح وسط MR-VP بالبكتريا المراد فحصها ثم حضن بعد ذلك لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧ مْ ثم أضيفت ٥ قطرات من كاشف احمر المثيل وعند ظهور اللون الأحمر دليل على إيجابية الفحص وإن البكتريا لها القدرة على تخمر سكر الكلوكوز وإنتاج الاحماض (McDevitt,٢٠٠٩).

٣-٢-٦-٣-٧: اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

لقح وسط غراء السترات السيمون المائل Simmons citrate slant بالبكتريا المراد الكشف عن قابليتها على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون ثم حضنت بعد ذلك لمدة (٢٤-٤٨) ساعة بدرجة حرارة ٣٧ مْ ان تغير لون الوسط من الأخضر الى الأزرق دلالة على إيجابية الفحص (MacWilliams,٢٠٠٩).

٣-٢-٦-٣-٨: اختبار انزيم اليوريز Urease test

تم تلقيح وسط اكار اليوريا المائل Urea agar slant بالمستعمرة البكتيرية المراد الكشف عن قابليتها على انتاج انزيم Urease المحلل لليوريا ثم حضنت بعد ذلك لمدة (٢٤-٤٨) ساعة بدرجة حرارة ٣٧ مْ ان تغير لون الوسط الى اللون الوردي دلالة على إيجابية الفحص (MacFaddin,٢٠٠٠).

٣-٢-٦-٣-٩: اختبار تحلل الدم Hemolysis test

زرعت البكتريا على وسط غراء الدم Blood agar بطريقة التخطيط ثم حضنت بعد ذلك لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧مْ في ظروف هوائية للكشف عن قدرة البكتريا المعزولة

على تحليل خلايا الدم الحمر وملاحظة نوع التحلل حول المستعمرات البكتيرية كامل اوجزئي (Zhang *et al.*,٢٠١٦).

٣-٢-٧: تشخيص البكتريا المعزولة بجهاز الفايتك Vitek-٢ system

جهاز الفايتك من الأجهزة الدقيقة في التشخيص الجرثومي، ويعطي نتائج دقيقة تصل نسبة دقتها الى ٩٩% في وقت قصير، يحتوي على بطاقات الكترونية Card خاصة لكل نوع من الأحياء المجهرية ويتم العمل بها حسب تعليمات الشركة المصنعة :BioMerieux Company (France) وكما يلي:

١- تحضير العالق البكتيري المراد تشخيصه من خلال نقل (٢-٣) مستعمرة بكتيرية بعمر ١٨-٢٤ ساعة الى انبوبة معقمة تسمى أنبوب البولستيرين (Polystyrene tube) تحتوي ٣ مل من المحلول الملحي الفسيولوجي المعقم Normal saline ثم يمزجان معا بواسطة جهاز المازج Vortex.

٢- قياس عكورة العالق البكتيري بجهاز ضبط العكورة (Densi-Chek) وضبطها بين (٠.٥-٠.٦٣ ماكفرلاند، ثم نقل مقدار من هذا المزيج الى بطاقات خاصة بكل نوع.

٣- يتم تشخيص البكتريا الموجبة لصبغة غرام بكاسيت (GP-Gram positive identifier ID) وتشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام بكاسيت (GN-Gram negative identifier ID) ثم يتم غمر حامل الكاسيت في انبوبة العالق وادخاله الى غرفة محكمة الاغلاق في جهاز الفايتك وحضانته عند درجة حرارة ٣٥ مْ وتستمر لمدة أقصاها ٨ ساعات ثم يتم تحليل البيانات باستعمال قاعدة بيانات جهاز الفايتك التي تحدد الكائن الحي بشكل دقيق بعد بدأ الحضانة وبعد ذلك يتم طباعة التقرير آليا الذي يوضح نتيجة التشخيص (Putra *et al.*,٢٠٢٠).

٣-٢-٨: حفظ العزلات البكتيرية وادامتها Preservation and Maintenance of bacterial isolates

A – الحفظ قصير الامد Short Term Storage

حفظت العزلات البكتيرية المشخصة على وسط الغراء المغذي المائل بعد تلقيحه بالعزلات البكتيرية بطريقة الطعنة وحضنت في درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ١٨ساعة ثم نقلت الى الثلاجة في

درجة حرارة ٤ مْ وتكرر عملية الحفظ من اجل الإبقاء على حيوية العزلات وتجنب تلوثها كل ٣-٤ اسابيع (Zhgun *et al.*,٢٠٢٠).

B - الحفظ طويل الأمد Long Term Storage

لغرض حفظ العزلات البكتيرية لمدة طويلة دون حصول أي ضرر أو تغير في الصفات الوراثية استعمل وسط نقيع القلب –الدماغ السائل المعقم والمضاف له الكليسيرول Glycerol بنسبة ١٥-٢٠% وبعد تلقيحها بالعزلات البكتيرية تحضن لمدة ٤ ساعات ثم تسد بأحكام بواسطة شريط شمعي لاصق (Parafilm) وتحفظ بدرجة حرارة -٢٠ مْ لمدة (٤-٦) أشهر (Al-Mayyahi,٢٠١٨).

٣-٢-٩: اختبار الحساسية لمضادات الميكروبات

Antimicrobial Susceptibility Test (AST)

استعمل جهاز الفايتك لتقدير حساسية و مقاومة عزلات بكتريا *S. aureus* وعزلات بكتريا *P. aeruginosa* وفقا لما جاء في (Pincus,٢٠٠٦) باستعمال البطاقة الخاصة بفحص الحساسية للمضادات الحيوية (Antibiotic sensitivity test card) التي تحتوي على المضادات الحيوية الموزعة على (٦٤) حفرة ويكون لكل مضاد اكثر من تركيز ويتم تسجيل التركيز المطلوب و تسجيل النتائج حسب تعليمات شركة BioMerieux .

طريقة العمل:

١- نميت عزلات بكتريا *S. aureus* وعزلات بكتريا *P. aeruginosa* على الوسط المغذي السائل (Nutrient broth) وحضنت لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧ مْ.
٢- وضع ٣ مل من المحلول الملحي الفسلجي (Normal saline)في انبوبة Kan tube ثم اخذت المستعمرة البكتيرية بواسطة عروة الناقل Loop ووضعت في الانبوبة لعمل عالق بكتيري ثم كرر قياس عكورته بواسطة جهاز Densichek ٢Vitek لتكون (٠.٥-٠.٦٣).
٣- أخذ ٢٨٠ مايكرو ليتر من العالق واضيف الى الانبوب الخاص بال (Antimicrobial Susceptibility Test) في حالة كانت العزلة البكتيرية موجبة لصبغة غرام.
٤- اخذ ١٤٥ مايكرو ليتر من العالق واضافته الى الأنبوب الخاص بال (Antimicrobial Susceptibility Test) في حالة كانت العزلة البكتيرية سالبة لصبغة غرام.

٥- يتم ادخال الأشرطة مع الأنابيب الى الجهاز وبعدها يتم طباعة تقرير اختبار الحساسية والمقاومة للمضادات الحيوية.

٣-٢-١٠: التحري عن عوامل الضراوة في العزلات البكتيرية Investigation of virulence factors in bacterial isolates:

٣-٢-١٠-١: التحري عن قابلية العزلات البكتيرية لتكوين الغشاء الحيوي Investigation of the ability of bacterial isolates to form a biofilm.

تم التحري عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة *S. aureus*، *P. aeruginosa*على تكوين الغشاء الحيوي بطريقتين:

A- التحري بطريقة الانبوبة (Tube method):

تم اجراء هذه الطريقة وفقا لما جاء به (Mathur *et al.*,٢٠٠٦: Bose *et al.*,٢٠٠٩)للتحري عن قابلية العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة نوعية وكما يأتي:

١- حضر وسط مرق نقيع القلب والدماغ ووزع في انابيب اختبار بواقع ٥ مل لكل أنبوبة ولقحت الأنابيب بعد ذلك بالعزلات البكتيرية الفتية ثم حضنت بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة.

٢- سكب بعد ذلك المحتوى الزرعي وغسلت الانابيب ٣ مرات بدارئ الفوسفات الملحي (PBS) المحضر في الفقرة (٣-٢-٤-٣) وتركت لتجف.

٣- تم ملئ الأنابيب بصبغة البنفسج البلوري Crystal violet (٠.١%) وتركت لمدة ١٠ دقائق ثم غسلت الانابيب بالماء المقطر الخالي من الأيونات وتم قلب الانابيب لتجف.

٤- ان ظهور طبقة بنفسجية على الجدران الداخلية وفي قعر الانبوبة دلالة على قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي حيث يحدد شدة اللون المتكون على جدران الأنابيب قابلية البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي مقارنة بالأنابيب الفارغة كسيطرة سالبة.

B- التحري بطريقة اطباق المعايرة (Micro titer plate method):

تم اعتماد هذه الطريقة للتحري الكمي عن قابلية العزلات البكتيرية على تكوين الأغشية الحيوية كما وصفت من قبل (Kord *et al.*,٢٠١٨) مع بعض التحوير وكما يأتي:

١- حضر وسط مرق نقيع القلب والدماغ المضاف اليه ١% كلوكوز ووزع في أنابيب اختبار بواقع ٥مل لكل أنبوبة ولقحت الأنابيب بالعزلات البكتيرية الفتية ثم حضنت بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة ثم نقل ١٠٠ مايكرو ليتر من النمو البكتيري الى أنبوبة حاوية ٢ مل من المحلول الملحي الفسلجي وقورنت عكورته بمحلول ماكفرلاند القياسي McFarland ذو تركيز٠.٥.

٢- نقل ٢٠٠مايكروليترمن كل عالق بكتيري مخفف الى كل حفرة بواقع أربع مكررات لكل عزلة مع عمل أربع حفر سيطرة Control تحتوي فقط على وسط مرق نقيع القلب والدماغ غير المزروع لغرض المقارنة، وبعدها حضنت الصفيحة من بعد تغطيتها بصورة جيدة في الحاضنة لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ مْ.

٣- سكب العالق البكتيري الموجود في الحفر للتخلص من الخلايا البكتيرية غير الملتصقة وغسلت الحفر بالمحلول الملحي الفسلجي المتعادل بواقع ثلاث مرات ثم تركت لتجف لمدة ١٥ دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

٤- أضيفت ٢٠٠ مايكرو ليتر من محلول صبغة البنفسج البلوري المحضرة في فقرة (٣-٢-٤-٧) وبتركيز ٠.١% لكل حفرة ثم تركت لتجف قليلا.

٥- سكبت الصبغة ثم غسلت الحفر بالماء المقطر ثلاث مرات ليتم التخلص من الصبغة غير المرتبطة ثم تركت تجف في درجة حرارة الغرفة.

٦- اضيف ٢٠٠ مايكرو ليتر من الايثانول المطلق ٩٦ % في كل حفرة تحتوي خلايا بكتيرية ملتصقة ومصبغة بصبغة البنفسج البلوري لتجريد الصبغة.

٧- قيست الامتصاصية عند طول موجي ٦٣٠ نانوميتر باستعمال جهاز الاليزا وحددت كفاءة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي عن طريق مقارنة القراءات التي تم الحصول عليها حسب ماياتي:

- تعد العزلة البكتيرية غير مكونة للغشاء الحيوي إذا كان معدل الكثافة الضوئية لمعامل السيطرة أكبر أو يساوي معدل الكثافة الضوئية للعزلة ($ODc \geq OD$).
- تعد العزلة البكتيرية ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي إذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة أكبر من معدل الكثافة الضوئية للسيطرة أو أصغر أو يساوي من ضعفي الكثافة الضوئية للسيطرة ($ODc < OD \leq ٢xODc$).
- تعد العزلة البكتيرية متوسطة التكوين للغشاء الحيوي إذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة أكبر من ضعفين الكثافة الضوئية للسيطرة أو أصغر أو يساوي أربعة اضعاف السيطرة ($٢xODc < OD \leq ٤xODc$).

- تعد العزلة البكتيرية شديدة التكوين للغشاء الحيوي إذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة أكبر من أربعة اضعاف معدل السيطرة (OD>٤xODc).

٣-٢-١٠-٢: التحري عن انتاج ذيفان حال الدم Hemolysin Production:

تحضير الراشح البكتيري:

زرعت العزلات البكتيرية في ٥ مل من الوسط المحضر وفق الفقرة (٣-١-٧-١) ثم حضنت بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة باستعمال حاضنة هزازة على سرعة (١٢٠ دورة/ دقيقة) ثم أخذ الراشح بعد إجراء الطرد المركزي المبرد على سرعة (٣٠٠٠ rpm) لمدة ٣٠ دقيقة وعند درجة حرارة ٤ مْ وتم بعدها ترشيح الراشح باستعمال ورق ترشيح قطر ثقوبه (٠.٢٢) مايكروميتر كما جاء عند (مسلم، ٢٠٠٥) وبعدها تم قياس فعالية الهيمولايسين للراشح بطريقتين:

١- الاختبار شبه الكمي للتحلل الدموي (Semi-quantitative assay of hemolysis).

وضع ٥ مايكرو ليتر من الراشح المحضر مسبقا في حفر يبلغ قطرها ٥ ملم على وسط غراء الدم الحاوي على دم اغنام وتم حضن الاطباق بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة ثم قيست مناطق التحلل حول الحفر (Barer *et al.*,١٩٨٦: Asao *et al.*,١٩٨٤).

٢- الاختبار الكمي للتحلل الدموي (Quantitative assay of hemolysis)

تم اختبار الفعالية التحللية للهيمولايسين كميا بعمل سلسلة من التخافيف المضاعفة كما جاء في (Bizani and Brandelli,٢٠٠١: May *et al.*,٢٠٠٠):

١- خفف الراشح الخام المحضر مسبقا بعمل سلسلة من التخافيف المضاعفة من (١:١٠) الى (١:١٢٨٠) باستعمال دارئ الفوسفات الملحي (PBS) المحضر وفق الفقرة (٣-٢-٤-٣).

٢- رسبت خلايا الدم الحمر من عينة الدم والمسحوبة آنيا باستعمال أنابيب بلاستيكية حاوية على مادة (٣% سترات الصوديوم) مانعة التخثر، من اجل التخلص من البلازما باستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة ١٢٠٠ دورة / الدقيقة لمده ١٥ دقيقة، ثم غسلت ثلاث مرات بمحلول دارئ الفوسفات الملحي (PBS)وتم اجراء الطرد المركزي المبرد في كل مرة بسرعة ١٢٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٢ دقيقة ثم علقت خلايا الدم الحمر بنسبة ٢% في نفس الدارئ.

٣- تم مزج ٤٠٠ مايكرو لترمن كل تخفيف من تخافيف الراشح البكتيري مع ١٠٠ مايكرو ليتر من عالق خلايا الدم الحمر المحضرة في الخطوة الثانية أعلاه في أنابيب زجاجية معقمة وجافة وحضنت لمدة (٣٠) دقيقة بدرجة حرارة (٣٧) مْ.

٤- تم ترسيب بقايا خلايا الدم الحمر بسرعة ١٢٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٣٠ دقيقة وتم فصل الراشح ثم قيست الكثافة الضوئية له على طول موجي ٥٤٣ نانوميتر لقياس لون الهيموغلوبين المتحرر.

٥- تم تحديد الفعالية التحليلية من خلال أخذ مقلوب أعلى تخفيف أعطى تحلل كامل لخلايا الدم الحمر مقارنة بالسيطرة السالبة (المتكونة من خلط ١٠٠ مايكرو ليتر من عالق خلايا الدم الحمر مع ٤٠٠ مايكرو ليتر من ٠.٩% محلول ملحي) عندها حسبت نسبة التحلل لكل تخفيف وفق المعادلة السابقة في الفقرة (٣-١-٨-٣).

٣-٢-١١: فحص تفاعل سلسلة انزيم البلمرة PCR Test

أجري الفحص للكشف عن بعض مورثات عوامل الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية عند بكتريا (*P. aeruginosa , S.aureus*) وكالاتي:

٣-٢-١١-١: استخلاص الحامض النووي البكتيري Bacterial Genomic DNA Extraction

تم استخلاص الحامض النووي DNA من العزلات البكتيرية الأكثر تردداً في هذه الدراسة وذلك باستعمال عدة الاستخلاص Genomic DNA extraction kit المجهزة من شركة (ADD BIO) الكورية وحسب الخطوات الآتية:

١- نميت العزلات البكتيرية في ٥ مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل brain heart infusion broth وحضنت بدرجة حرارة٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة.

٢- نقل ١ مل من الوسط الزرعي الحاوي على الخلايا النامية الى أنابيب ابندروف قياس ١.٥ مل معقمة ثم نبذت بجهاز الطرد المركزي (Eppendrofe Centrifuge) بسرعة ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة لغرض جمع الخلايا البكتيرية والتخلص من الراشح (Supernatant).

٣- اضيف ٥٠٠ مايكرو ليتر من محلول اللايسوزايم المنظم lysozyme buffer و٢٠ ميكرو ليتر من انزيم اللايسوزايم lysozyme(٥٠ ملغم / مل) الى العينة ثم غلقت أنابيب الابندروف جيداً ومزج الخليط بواسطة المازج vortex لمدة ٥ ثوان هذه الإضافة فقط للبكتريا الموجبة لصبغة غرام.

٤- تم حضن الأنابيب في حمام مائي بدرجة ٣٧ مْ لمدة ٦٠ دقيقة.

٥- نبذت محتويات الأنابيب بجهاز الطرد المركزي بسرعة ١٣٠٠٠دورة/ دقيقة ولمدة ٣ دقائق وتم التخلص من الراشح.

٦- اضيف ٢٠٠ مايكرو ليتر من محلولLysis Solution و٢٠ مايكرو ليتر من Proteinase K Solution (٢٠ ملغم /مل) الى العينة ومزجت بواسطة المازج لمدة ٥ ثوان.

٧- تم حضن الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة ٥٦ مْ لمدة ١٠ دقائق.

٨- اضيف ٢٠٠ مايكرو ليتر من محلول Binding Solution و٢٠٠ مايكرو ليتر من كحول الايثانول المطلق الى المزيج المتحلل وتم مزجهم جيدا بالمازج لمدة ١ دقيقة ثم نبذ بجهاز الطرد المركزي على سرعة ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٣ دقائق.

٩- نقل ٥٠٠ مايكرو ليتر من الراشح في الابندروف الى أنابيب الجمع (Collection Tubes) سعة ٢ مل الحاوية على أعمدة ذات مصفى لتنقية الحامض النووي GD Filter Column مجهزة مع العدة.

١٠- وضعت أنابيب الجمع مع فلاتر الاعمدة التي تحتوي على الخليط في جهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة ١٣٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ١ دقيقة وتم التخلص من نواتج الخلايا المتحللة ثم نقل فلتر العمود الحاوي على الحامض النووي الى انبوبة جمع (Collection tube).

١١- اضيف ٥٠٠ مايكرو ليتر من محلول الغسيل الأول Washing ١ Solution المجهز مع العدة الى فلتر العمود الحاوي على الحامض النووي لغسل الحامض النووي ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة ١٣٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ١ دقيقة وتم التخلص من المحتويات ثم اضيف ٥٠٠ مايكرو لتر من محلول الغسيل الثاني Washing ٢ Solution

المضاف اليه مسبقا كحول الايثانول والمجهز مع العدة الى العمود الحاوي على الحامض النووي ونبذ أيضا بجهاز الطرد المركزي بسرعة ١٣٠٠٠ دورة/ دقيقة ولمدة ١ دقيقة.

١٢- تم التخلص من المواد الموجودة في أنابيب الجمع ثم وضع فلتر العمود الحاوي على الحامض النووي في أنبوبة جمع جديدة ونبذت في جهاز الطرد المركزي بسرعة ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١ دقيقة لغرض تجفيف العينة.

١٣- نقلت فلاتر الأعمدة الحاوية على الحمض النووي الى أنابيب ابندروف معقمة سعة ١.٥ مل واضيف ١٠٠ مايكرو ليتر من محلول الاذابة Elution Buffer المجهز مع العدة وترك لمدة ٥ دقائق ليتم امتصاص كل محلول الاذابة من قبل الأعمدة ثم وضعت بجهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١ دقيقة لإذابة الحامض النووي DNA ثم تم حفظ الحامض النووي بدرجة حرارة -٢٠ مْ لحين اجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة PCR.

٣-٢-١١-٢: تحضير مزيج سلسلة تفاعل البلمرة PCR Master Mixture

A- تحضير محلول البادئ (Preparation Primer)

حضر محلول البوادئ الذي يتكون من Reverse، Forward حسب تعليمات الشركة المصنعة (Chromogen) وذلك بأخذ ١٠ مايكرو ليتر من كل بادئ واضافتها الى أنبوبة ابندروف جديدة حاوية على ٩٠ مايكرو ليتر من الماء منزوع الايونات Deionize Water للحصول على Working Solution ذو حجم ١٠٠ مايكرو ليتر ويحفظ بدرجة حرارة -٢٠ مْ لحين الاستعمال كما تحفظ محاليل البوادئ الخزينة في درجة -٢٠ مْ.

B- مزيج Master Mix

تم استعمال مزيج (Master Mix) المجهز من شركة (Add bio) الكورية والموضحة مكوناته في الجدول (٣-١٠):

جدول (٣-١٠): مكونات مزيج Master Mix المستعمل في تفاعل البلمرة المتسلسل

المكونات	تركيزه
Taq DNA Polymerase	٢.٥ U\ml
Each:dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	٢.٥ Mm for each

Reaction Buffer(١٠x)	١x
Gel loading buffer	١x

C- تحضير PCR Product

حضر مزيج تفاعل PCR في الأنابيب الموجودة في العدة وهو يحتوي على جميع المكونات اللازمة لأجراء التفاعل كما موضح في الجدول التالي (٣-١١):

جدول (٣-١١) المكونات اللازمة لتفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR

المكونات	التركيز	الكمية (مايكروليتر)
DNA sample	١٠٠-٢٠٠ ng	٣
Primer(F)	١٠ Pico mole	١.٥
Primer(R)	١٠ Pico mole	١.٥
Nuclease free water	-	٩
Master Mix	-	١٠
Total volume	-	٢٥

D- اجراء تفاعل البلمرة (PCR Assay)

تغلق الأنابيب وتمزج بعناية بجهاز المازج vortex لمدة ١٠ ثوان ثم تدخل في جهازPCR Thermocycler لأجراء التفاعل وباستعمال البرنامج المناسب في التضاعف وخطوات التفاعل الخاصة بكل بادئ كما موضح في الجدول (٣-١٢).

جدول (٣-١٢): خطوات التفاعل الخاصة بالبوادئ

نوع الخطوة	درجة الحرارة(مْ)	الوقت	عدد الدورات
Initial denaturation	٩٥	٥ دقيقة	١
Denaturation	٩٥	٣٠ ثانية	

Annelaling	*mecA*	٥٥	٤٥ ثانية	٣٥
	hlb	٥٥		
	SEA	٦٠.٤		
	ermA	٥٤.٦		
	LasB	٦٠.٨		
	exoA	٦١		
Extension	٧٢		٥٥ ثانية	
Final extension	٧٢		٥ دقيقة	١

٣-٢-١١-٣: الترحيل الكهربائي في الهلام (Gel Electrophoresis):

A- الصبغة المستعملة

إستعملت صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide) المجهزة من شركة Bio BASIC INC.

B- تحضير TBE buffer ١x

تم تحضيره من المحلول الخزين TBE buffer(١٠x) بإضافة ١٠٠ مل من المحلول الخزين إلى ٩٠٠ مل من الماء المقطر المعقم.

C- تحضير هلام الاكاروز بتركيز ١.٥%:

تم تحضير هلام الاكاروز كما جاء بالطريقة الموصوفة من قبل (Green and Sambrook,٢٠١٩) مع بعض التحوير:

١- تم اذابة ١.٥ غم من الاكاروز في ١٠٠ مل من محلول TBE buffer ١x بواسطة تسخين المزيج الى درجة الغليان.

٢- تم تبريد المزيج الى درجة حرارة (٤٥-٥٠) مْ ثم أضيفت اليه ٣ مل صبغة بروميد الاثيديوم ومزجا جيداً.

٣- تم تحضير صفيحة لأسناد الاكاروز (Tray) وثبت فيها المشط (Comb)لتكوين الحفر (Wells) الخاصة لتحميل العينات وصب مزيج الاكاروزبشكل هادئ ثم ترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة.

٤- تم رفع المشط بهدوء وبعدها نقل الهلام مع القالب الى حوض الترحيل وغطي ببفر الترحيل TBE على ارتفاع ١ ملم لأجراء عملية الترحيل الكهربائي.

٣-٢-١١-٣-١: الكشف عن نواتج التضاعف Detection of multiplication products:

تم الكشف عن نواتج التضاعف بترحيل العينات على هلام الاكاروز المحضر بتركيز ١.٥% وذلك بإضافة ٥ مايكرو ليتر من ناتج التفاعل (PCR product) المراد ترحيله لكل حفرة بالإضافة الى تحميل ٥ مايكرو ليتر من الدليل الحجمي (DNA Ladder). تم ترحيل النواتج والدليل الحجمي كهربائيا بفرق جهد ٧٠ فولت لمدة ٥٠ دقيقة ثم فحص الهلام بعد انتهاء عملية الترحيل في غرفة مظلمة من خلال تعرضه لمصدر للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي ٢٦٠ نانوميتر وبعدها تم تصوير الهلام باستعمال كاميرا رقمية Digital camera، ثم قدرت الأحجام الجزيئية لقطع DNA المتضاعفة بالمقارنة مع مواقع الحزم للدليل الحجمي القياسي (DNA Ladder) والمرحل مع نواتج التضاعف.

٣-٢-١٢: التحليل الاحصائي Statistical Analysis

حللت نتائج الدراسة الحالية بتطبيق اختبار مربع كأي Chi- square test لتقيم الارتباط بين أي متغيرين فئويين وتم تحديد القيمة المعنوية p-value**تساوي** او تقل عن ٠.٠٥.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results & Discussion

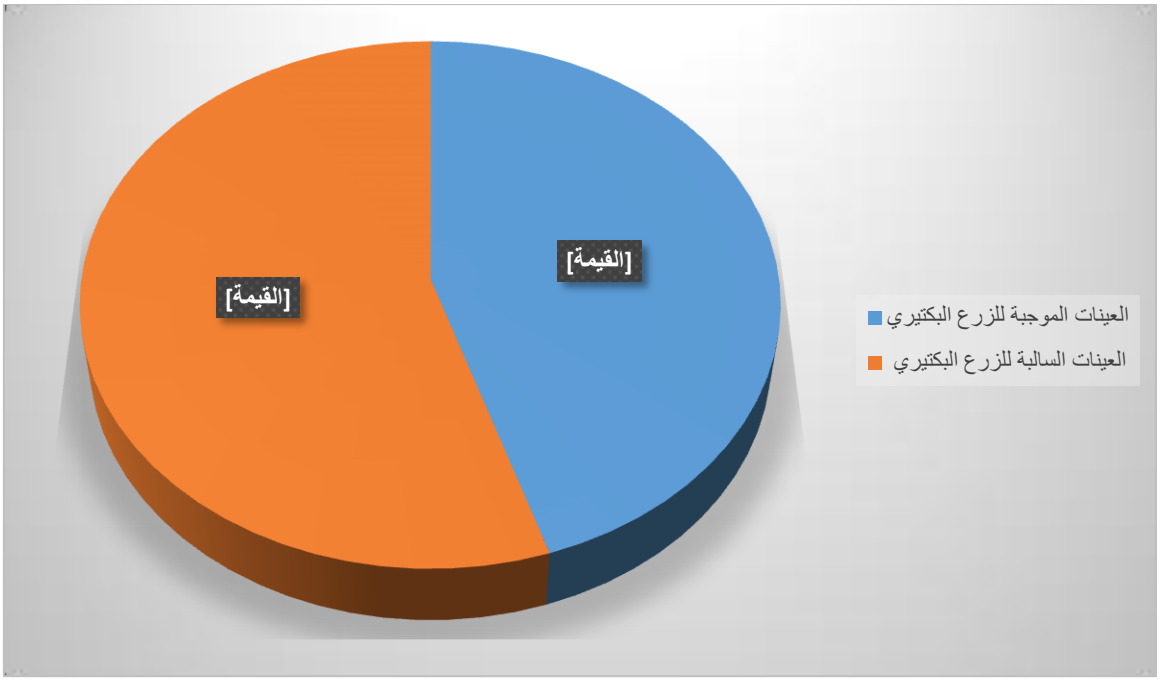
٤- النتائج والمناقشة Results and discussion

٤-١: نسبة العزل البكتيري Bacterial isolation rate :

جمعت ١٦٩ مسحةً من المرضى المصابين باخماج العيون المختلفة والمراجعين لمستشفى (الامام الحسن المجتبى (ع)، مستشفى الهندية العام ومركز السيدة زينب (ع) التخصصي للعيون) في محافظة كربلاء المقدسة من اب ٢٠٢٢ ولغاية كانون الثاني ٢٠٢٣ بعد تشخيصهم سريرياً من قبل الأطباء الاختصاص، وبعد زراعة العينات المجموعة على الأوساط الزرعية أظهرت النتائج إن ٧٦ (٤٥%)عينة أعطت نمواً بكتيريا بينما لم يظهر أي نمو في ٩٣ (٥٥%)عينة وكما موضح بالشكل (٤-١).

وجاءت نسبة العزل المنخفضة في هذه الدراسة مقاربة لدراسة محلية قام بها Alash (٢٠١٥) الذي أكد على انخفاض نسبة إصابات العيون البكتيرية مقارنة مع نسبة الاصابات الفيروسية والفطرية، وكذلك مع دراسة أجريت في الولايات المتحدة الامريكية التي كانت نسبة العزل البكتيري فيها ٣٣% فقط مقارنة ببقية الإصابات الجرثومية بينما لم تتوافق مع نتائج دراسة محلية أخرى أعطت نسبة نمو بكتيري مرتفعة تصل الى (٩٢.١%) (Abid and Ewadh,٢٠١٢).

ويعتقد إنّ ارتفاع نسبة العزل السالبة في هذه الدراسة إلى اقتصار الدراسة الحالية على بيان نسبة الإصابة بالمسببات البكتيرية الهوائية فقط فضلاً عن اشتراك إصابات العيون التحسسية غير الميكروبية والاصابات الفطرية والفيروسية ببعض الأعراض السريرية المتماثلة كما جاء مماثلاً في بعض الدراسات (Hom *et al.*,٢٠١٢; Rae *et al.*,٢٠١٩) فضلاً عن المسببات البكتيرية اللاهوائية، وإصابات ناتجة عن الكلاميديا (Pickering *et al.*,٢٠١٩).



شكل (٤-١): نسبة العينات الموجبة والسالبة للزرع البكتيري

٤-٢: توزيع إصابات العيون البكتيرية حسب العمر Distribution of bacterial eye infections according to the age

بينت نتائج الدراسة الحالية الموضحة بالجدول (٤-١) بأنّ هنالك فرق معنوي في متوسط العمر بين مجموعات الدراسة عند مستوى احتمال (p=٠.٠٢١) اظهر تواتر مرضى اخماج العيون توزيعاً متتالياً بين الأعمار المختلفة ، إذ كانت أعلى نسبة عزل بكتيري (٤٣.٤٢%)٣٣عزلة في الفئات العمرية ٢٥-٤٩ سنة، تلتها نسبة الإصابة في الفئة العمرية ١-٢٤ سنة والبالغة (٣٥.٥٣%) ٢٧عزلة، إذ يعتقد ان المعدل المرتفع للإصابة لديهم مرتبط بكثرة النشاطات التي يقومون بها كاللعب والأعمال والممارسات الرياضية والسباحة مع قلة الاهتمام بنظافة العيون خصوصا عند الاعمار الصغيرة ،كما يسبب التماس المباشر بين أصابع اليد مع الأدوات الملوثة انتقال التلوث إلى العين فضلاً عن ارتداء العدسات اللاصقة من قبل الشباب مقارنة بكبار السن، وهذه النتيجة جاءت مقاربة للدراسة التي قام بها Bajracharya وجماعته (٢٠٢٠) والذين اكدوّا إنّ متوسط العمر لإصابات العيون البكتيرية كان (٤٧)سنة ، كما توافقت النتيجة الحالية مع دراسة عراقية في محافظة بابل التي قام بها Kareem وآخرون (٢٠٢٢) والتي أوضحوا من خلالها ان اخماج العيون تحدث بشكل متكرر في الفئات العمرية بين (٢٠-٤٩) سنة مقارنة بالفئة العمرية (٥٠-٧٥) التي سجلت أقل عدد من الإصابات بنسبة ٢١% .

بينما جاءت هذه النتيجة غير متوافقة مع نتائج دراسة أخرى توصلت إلى إن متوسط العمر في المرضى المصابين هو (٨.٥) سنة فقط (Muluye *et al.*,٢٠١٤).

جدول (٤-١): توزيع عدد الإصابات البكتيرية حسب عمر المرضى.

	الفئات العمرية (سنة)	عدد المصابين N (%)	p-value
العمر	١-٢٤	٢٧ (٣٥.٥٣٪)	٠.٠٢١
	٢٥-٤٩	٣٣ (٤٣.٤٢٪)	
	٥٠-٧٥	١٦ (٢١.٠٥٪)	

٤-٣: توزيع إصابات العيون البكتيرية حسب الجنس Distribution of bacterial eye infections according to the gender

أظهرت نتائج الدراسة الحالية المبينة في الجدول (٤-٢) وجود فروقات معنوية في توزيع مرضى العيون حسب الجنس بين مجموعات الدراسة على مستوى احتمال p=٠.٠٤٥ وكان معدل انتشار اخماج العيون في الذكور أعلى مما في الاناث ،إذ وجد إن عدد الذكور المصابين(٦٠.٥٣%) ٤٦ وهي أعلى من عدد الاناث المصابات باخماج العيون الذين بلغ عددهم(٣٩.٤٧%)٣٠ ،وجاءت هذه النتيجة متقاربة مع العديد من البحوث الأخرى التي اكدت إنّ إصابات العيون البكتيرية أكثر شيوعاً عند الذكور والتي وصلت الى ٦٠.١% في دراسة أجريت في محافظة البصرة (Mahdi *et al.*,٢٠٢١) الشيء الذي جاء مماثل لما توصلت إليه دراسة أجريت في المملكة العربية السعودية التي لوحظ فيها إن نسبة الإصابة عند الذكور بلغت ٥٦.٥% (Almizel *et al.*,٢٠١٩) مع ذلك كانت نتائجنا تناقض دراسة في إيران أكدت إن نسبة الإناث هي الأعلى (Hedayati *et al.*,٢٠١٥) ،وإن ارتفاع نسبة إصابة لدى الذكور يعود إلى تعرضهم لعوامل بيئية يمكن أن تزيد من خطر الإصابة بسبب قيامهم ببعض المهن مثل عمال بناء أو الزراعة أو اللذين يعملون في الهواء الطلق اكثر عرضة للتلامس مع البكتريا، فضلاً عن

وجود عوامل وراثية ومناعية متمثلة بحالات نقص المناعة الأولية المرتبطة بكروموسوم X والتي تجعل الذكور المصابين عرضة للعدوى البكتيرية اكثر من غيرهم ، إلى جانب عوامل هرمونية متمثلة بمستوى الهرمونات الستيرويدية التي تتغير على مدى العمر ،إذ إن ارتفاعها وتحديداً هرمون الاندروجين بعد البلوغ يجعل الذكور يتأثرون بشكل أكثر تكرارا وقوة بالعدوى البكتيرية (Dias *et al.*,٢٠٢٢).

جدول (٤-٢): توزيع عدد الإصابات البكتيرية حسب جنس المرضى

	المجاميع	عدد المرضى N(%)	p-value
الجنس	الذكور	٤٦ (٦٠.٥٣٪)	٠.٠٤٥
	الاناث	٣٠ (٣٩.٤٧٪)	
	المجموع	٧٦(١٠٠٪)	

٤-٤: توزيع إصابات العيون البكتيرية حسب مكان الإقامة Distribution of bacterial eye infections regarding the place of residence

إن عدد الإصابات باخماج العيون البكتيرية تختلف باختلاف منطقة السكن في المدينة او الريف ،فقد ظهرت فروقات معنوية في توزيع المرضى حسب محل الإقامة على مستوى احتمالية p=٠.٠٢٨ ، إذ بلغ عدد المصابين في المناطق الحضرية(٤٩(٦٤.٤٧% ،بينما كان عدد المصابين من المناطق الريفية (٢٧(٣٥.٥٣% كما موضح بالجدول (٤-٣) ،وجاءت هذه النتيجة متوافقة مع دراسة أجريت في محافظة بغداد ، إذ كانت نسبة العزل البكتيري في مركز المدينة أعلى من الريف والبالغة ٩٢.٥%(Rahama *et al.*,٢٠١٧) ، ومع دراسة محلية أخرى قام بها (Majeed and Zaman,٢٠٢٠) في كركوك مؤكدة إن نسب الإصابة في المدينة أعلى من الريف ، وعللوا ذلك بسبب الازدحام الكبير في المدينة مما يجعل من الصعب الحفاظ على النظافة الشخصية، وتجنب التلوث البكتيري لذلك فإنّ البكتيريا يكون لها الفرصة بالانتشار بسهولة في البيئة غير النظيفة ،كما تعمل العوامل البيئية القاسية من ارتفاع درجات الحرارة والرياح الجافة والغبار الى تهيج العين الذي يعد عاملاً مهيئاً لزيادة احتمالية الإصابة بالعدوى

البكتيرية فضلاً عن نقص النوم والتغذية السيئة التي تعمل على اضعاف الجهاز المناعي مما يجعل من الصعب محاربة العدوى البكتيرية آنيا.

إنّ هذه النتيجة لا تتوافق مع دراسة محلية أخرى في محافظة بابل وجدت أن نسبة الإصابات البكتيرية في العين كانت اعلى في المناطق الريفية والبالغة (٧٤.٣%) مقارنة في المدينة (Kareem *et al.*,٢٠٢٢).

جدول (٤-٣): عدد الإصابات البكتيرية حسب مكان الإقامة.

	المجموعات	عدد الاصابات N(%)	p-value
مكان الاقامة	الريف	٢٧ (٣٥.٥٣٪)	٠.٠٢٨
	المدينة	٤٩ (٦٤.٤٧٪)	
	المجموع	٧٦(١٠٠٪)	

وعند دراسة العلاقة بين الفئات العمرية مع الجنس ومكان الإقامة للمصابين باخماج العيون لوحظ في الجدول (٤-٤) أن هنالك ارتباطاً كبيراً بين عمر المرضى المصابين باخماج العيون فيها إذ كان المصاب ذكر أو انثى مع مكان اقامتهم في المدينة او الريف بعدوى العين البكتيرية (p =٠.٠٢٢)، وكانت الفئة العمرية من (٢٥-٤٩) للذكور في المدينة هي الأكثر شيوعاً للإصابة البكتيرية.

جاءت هذه النتيجة متوافقة مع دراسة في اليابان كان فيها ارتباط بين عمر المصاب وجنسه مع الإصابة البكتيرية (Hoshi *et al.*,٢٠١٦)، لكن جاءت نتيجة الدراسة الحالية غير متوافقة مع دراسة في اثيوبيا بينت عدم وجود ارتباط بين عدوى العين بالفئات العمرية ومحل الإقامة (الريف، والمدينة) لدى المشاركين في هذه الدراسة من مختلف الاعمار (Mohammed *et al.*,٢٠٢٠). كما كانت غير متوافقة أيضا مع دراسة اخرى قام بها (Juhong *et al.*,٢٠٢٢) بأنه لا يوجد ارتباط معنوي بين عمر المصاب وجنسه مع الإصابة البكتيرية في اخماج العيون.

جدول (٤-٤): العلاقة بين الفئات العمرية مع الجنس ومحل الاقامة

الفئات العمرية (سنة)	المدينة N(٤٩)		الريف N(٢٧)		Chi squared	P value
	الذكور N(٢٨)	الاناث N(٢١)	الذكور N(١٨)	الاناث N(٩)		
١_٢٤	٩	٥	٩	٤	٥.٣٤٨	٠.٠٢٢* (SIG)
٢٥-٤٩	١٤	٩	٧	٣		
٥٠-٧٥	٥	٧	٢	٢		
المجموع	٢٨	٢١	١٨	٩		

٤-٥: توزيع إصابات العيون البكتيرية حسب موقع الإصابة في العين Distribution of bacterial eye infections according to the location of the infection in the eye

بينت النتائج الموضحة في الجدول (٤-٥) واعتمادا على التشخيص الطبي وجود فروقات معنوية في تواتر توزيع المرضى وعدد الإصابات حسب موقع الإصابة على مستوى احتمالية (p = ٠.٠٣٤)، وإن خمج الملتحمة هو السائد مقارنة ببقية الأنواع، إذ بلغ عدد المرضى المصابين (٦٨.٤٢%)٥٢ تلاه خمج الاجفان الذي وصل الى (٢٣.٦٨%)١٨، بينما بلغ عدد المرضى المصابين بخمج القرنية (٧.٨٩%)٦ وهو النوع الأقل انتشاراً.

إن ارتفاع نسبة اخماج الملتحمة يعود الى تأثر الملتحمة بشكل كبير بالمناخ والأوضاع البيئية أو الأمراض الوبائية مما يؤدي إلى انتقال البكتريا بشكل مباشر من الأشخاص المصابين أو ينتج من تكاثر غير طبيعي في النبيت الطبيعي للملتحمة نتيجة للتعرض للحالات المثبطة للمناعة والصدمات التي تزيد من فرصة تطور إصابة الملتحمة الجرثومي ، إذ تتوافق هذه

النتيجة مع دراسة محلية في محافظة السليمانية كان فيها نسبة خمج الملتحمة هو الأعلى و بمختلف الاعمار (Hassan and Majid.,٢٠١٨) ،وكذلك تتوافق مع دراسة محلية أخرى كانت فيها نسبة خمج الملتحمة هو الأعلى (Abid and Ewadh,٢٠١٢) ،بينما لا تتوافق مع دراسة قام بها Bharathi وآخرون (٢٠١٠) والذي كانت فيه نسبة إصابات خمج الاجفان هي الأعلى (٨٨%) مقارنة ببقية الانواع.

جدول (٤-٥): عدد الإصابات البكتيرية حسب موقع الإصابة في العين.

	المجموعات	عدد الإصابات N(%)	p-value
موقع الاصابة	الملتحمة	٥٢ (٦٨.٤٢٪)	٠.٠٣٤
	الاجفان	١٨ (٢٣.٦٨٪)	
	القرنية	٦ (٧.٨٩٪)	

٤-٦: العلاقة بين نوع العزلات البكتيرية ومواقع الإصابة في العيون The relationship between the type of bacterial isolates and sites of infection in the eyes

بينت النتائج الحالية عدم وجود ارتباط معنوي بين نوع البكتريا المعزولة وموقع الإصابة البكتيرية في العين وهي الملتحمة ، الاجفان والقرنية وعلى مستوى احتمالية (p ٠.٤٨٥=) وكما موضح في جدول (٤-٦) فعلى الرغم من ذلك كانت اكثر الأنواع البكتيرية انتشاراً وتسبباً في خمج ملتحمة العين هي جنس *S. aureus* (١٩.٧٤%)١٥ ،بينما شكلت بكتريا *S. epidermidis* و*P. aeruginosa* و*E. coli* و*K. pneumoniae* و *S. marcescens* نسبة (١٥.٧٩%)١٢، (١٤.٤٧%)١١، (١١.٨٤%)٩ ، (٥.٢٦%)٤ ، (١.٣٢%)١على التوالي في حين كانت اقل نسبة لإصابات العيون والبالغة ١.٣٢% عائدة لبكتريا *S. marcescens* .

وأكدت العديد من الدراسات على زيادة نسبة بكتريا *S. aureus* في الملتحمة بالرغم من الاختلاف في نسبة العزل عند الباحثين فجاءت نتائج دراستنا متوافقة مع دراسة محلية (Agha,٢٠٢٠) أجريت في أربيل بينت ان أكثر مسببات خمج الملتحمة هي بكتريا المكورات العنقودية الذهبية وكذلك متوافقة مع دراسة أخرى بينت ان *S. aureus* هي المسبب السائد لخمج الملتحمة (Leung *et al.*,٢٠١٨). في حين لا تتوافق نتائج دراستنا الحالية مع نتائج دراسة أجريت في الولايات المتحدة الامريكية التي اشارت الى ان بكتريا *Haemophilus influenzae* هي الأكثر سيادة في إصابات خمج الملتحمة (Haas *et al.*,٢٠١٢).

إن كثرة تواجد بكتريا *S. aureus* في الملتحمة قد يعود الى وجودها بشكل طبيعي في الجهاز التنفسي العلوي مثل الانف، وبسبب القرب التشريحي بين العين والممرات الانفية ولأنهما يرتبطان معا عبر القناة الانفية الدمعية فقد تنتقل البكتريا من الأنف الى العين مؤدية الى إصابة الملتحمة ومنطقة الجفن (Belser *et al.*,٢٠١٢ : Taylor and Unakal,٢٠٢٢) فضلاً عن قدرتها على انتاج الذيفانات والانزيمات والبروتينات القادرة على احداث أضرار جسيمة للأنسجة والأعضاء ، وتحور الاستجابة المناعية من خلال تغير نفاذية أغشية خلايا المضيف من خلال انتاجها السمي الذي يمكنها من مقاومة الخلايا المناعية وتتجاوز الحواجز الظهارية الشيء الذي يعزز نمو البكتريا وانتشارها (Astley *et al.*,٢٠١٩).

جدول (٤-٦): العلاقة بين نوع العزلات البكتيرية ومواقع الإصابة في العيون

العزلات البكتيرية	موقع الإصابة			Chi squared	p value
	القرنية N(%)	الاجفان N(%)	الملتحمة N(%)		
S.aureus	٢ (٢.٦٣٪)	٥ (٦.٥٨٪)	١٥ (١٩.٧٤٪)	٣.٤٥٦	٠.٤٨٥*
S.epidermidis	٠ (٠.٠٠٪)	٧ (٩.٢١٪)	١٢ (١٥.٧٩٪)		
P.aeruginosa	٣ (٣.٩٥٪)	٤ (٥.٢٦٪)	١١ (١٤.٤٧٪)		
E.coli	١ (١.٣٢٪)	٢ (٢.٦٣٪)	٩ (١١.٨٤٪)		
K.pneumoniae	٠ (٠.٠٠٪)	٠ (٠.٠٠٪)	٤ (٥.٢٦٪)		
S.marcescens	٠ (٠.٠٠٪)	٠ (٠.٠٠٪)	١ (١.٣٢٪)		
المجموع	٦	١٨	٥٢		

سجلت بكتريا المكورات العنقودية غير القادرة على انتاج انزيم (COagulase)، ولاسيما *S. epidermidis* اعلى نسبة عزل (٩.٢١%)٧ من خمج الاجفان تلتها بكتريا *S. aureus* بنسبة (٦.٥٨%)٥، في حين سجلت بكتريا *E. coli* المعزولة من خمج الاجفان بأقل نسبة عزل (٢.٦٣%)٢ وهذه النتيجة جاءت متوافقة مع ما توصلت إليه دراسة سابقة في مدريد (Peral *et al.*,٢٠١٦) كانت فيها بكتريا *S. epidermidis* هي الأكثر عزلاً من الاجفان.

إن الجفن والملتحمة تحوي على نبيت جرثومي طبيعي يتم التحكم فيه من خلال آلية خاصة من قبل المضيف لذا فان أي خلل في تلك الالية يساهم في حدوث خمج الجفن او خمج الملتحمة (Bharathi *et al.*,٢٠١٠).

واحتلت بكتريا *P. aeruginosa* المرتبة الأولى بنسبة(٣.٩٥%)٣ من مجموع البكتريا المعزولة من خمج القرنية تلتها بكتريا *S. aureus* بنسبة(٢.٦٣%)٢ بينما شكلت بكتريا *E. coli* أقل نسبة وهي (١.٣٢%)١ ،وإن نتائج دراستنا جاءت مقاربة لما ذكره Ismael *et al.* (٢٠١٧) في دراسة محلية حيث أكد إن بكتريا *P. aeruginosa* هي أهم المسببات البكتيرية لأخماج القرنية وبنسبة عزل بلغت ٤٧.٥% كما جاءت متقاربة مع دراسة أجريت في تركيا التي كان فيها عزلات بكتريا *P. aeruginosa* هي الأكثر عزلا (Karaca *et al.*,٢٠٢٠) على النقيض من هذه النتيجة فقد بينت دراسة سابقة في النيبال إن بكتريا *S. epidermidis* هي العزلة الأكثر شيوعاً في خمج القرنية (Dhakwa *et al.*,٢٠١٢) .

تعود نسبة العزل العالية لبكتريا *P. aeruginosa* من خمج القرنية لقدرتها على الالتصاق بخلايا المضيف وأنسجته بسبب امتلاكها لعوامل ضراوة مثل انزيم البروتييز(Protease) وانزيم الالستييز (Elastase) إلى جانب قابليتها العالية على تحليل الدم مع العناية غير المناسبة للعدسات اللاصقة، إذ لها القابلية على مقاومة المحلول المنظف للعدسات اللاصقة وتلتصق بالعدسات وتنتشر من خلال تكوين طوافات دهنية لدى مستخدمي العدسات (Teweldemedhin *et al.*,٢٠١٧).

٤-٧: تشخيص العزلات البكتيرية المسببة لأخماج العيون Diagnosis of bacterial isolates causing eye infections

٤-٧-١: التشخيص المجهري والمظهري للعزلات البكتيرية Microscopic and phenotypic diagnosis of bacterial isolates

اسفرت نتائج الزرع الميكروبي على وسط غراء الدم ،ووسط غراء الماكونكي بعد مدة حضن ٢٤ ساعةً بدرجة حرارة ٣٧ مْ الحصول على ٧٦ عزلةً بكتيرية شخصت هذه العزلات البكتيرية المسببة لأخماج العيون وبعد تشخيصا اوليا بالاعتماد على الخصائص المزرعية للمستعمرات كشكل المستعمرة و قوامها وقابليتها على تخمير سكر اللاكتوز على الأوساط الصلبة، إذ تم الحصول على مستعمرات دائرية ومحدبة براقة ذات لون اصفر – ذهبي وكذلك مستعمرات دائرية ومحدبة ذات لون ابيض – رمادي مع حافات منتظمة ملساء على وسط غراء الدم مع تحلل دموي واضح بسبب قابليتها على انتاج الهيمولايسين وتحليل خلايا الدم الحمراء (Markey *et al.*,٢٠١٣)، كما تم انماء العزلات على وسط غراء المانيتول(Mannitol salt agar)،إذ امتازت مستعمرات *S.aureus* النامية على وسط المانيتول بمستعمرات صفراء اللون براقة وتحول لون كاشف الفينول الأحمر من اللون الوردي إلى الأصفر نتيجة لقدرتها على تخمير سكر المانيتول بسبب انتاجها للحامض (Taylor and Unakal, ٢٠٢٢) وأما بكتريا *S.epidermidis* فتظهر بشكل مستعمرات صغيرة غير مخمرة لسكر المانيتول (Chabi and Momtaz,٢٠١٩).

كما ظهرت بكتريا *P. aeruginosa* بشكل مستعمرات شاحبة دائرية ملساء ذات لون أصفر باهت على وسط غراء الماكونكي لعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز او تكون بشكل مستعمرات خضراء اللون نتيجة إفرازها صبغة Pyocyanin مع رائحة تشبه رائحة العنب والتي نقلت على وسط الستريمايد كونه وسط انتقائي لاحتوائه على مادة (Cetrimide) المثبطة لنمو أنواع البكتريا كافة، ولكنها تسمح لنمو بكتريا الزوائف الزنجارية فقط والتي ظهرت مستعمراتها بلون اخضر مزرق كما أعطت معظم الزوائف الزنجارية تحللاً كاملاً للدم من نوع بيتا على وسط اكار الدم مما يؤكد على قدرتها في انتاج الهيمولايسين وتحليل خلايا الدم الحمراء ، كما ظهرت بشكل عصيات سالبة لصبغة كرام عند الفحص المجهري للخلايا الجرثومية (Procop *et al.*,٢٠٢٠). أما مستعمرات بكتريا *E. coli* فقد نمت على وسط الماكونكي الانتقائي لهذه البكتريا (لأنه يحتوي على صبغة البنفسج البلوري مع املاح الصفراء) بشكل مستعمرات صغيرة دائرية الشكل ملساء وجافة ذات لون وردي بسبب قدرتها على تخمر سكر اللاكتوز، وأما عند تصبيغها بصبغة غرام وفحصها بالمجهر الضوئي فتظهر بشكل عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام (McFadden,٢٠٠٠;Jacob *et al.*,٢٠٢٠).

أما بكتريا *K. pneumoniae* فقد كانت مستعمراتها كبيرة الحجم مع حافات منتظمة وردية اللون ذات قوام مخاطي لوجود المحفظة على وسط الماكونكي، وأما مجهريا فظهرت على شكل عصيات سالبة لصبغة كرام (Martin and Bachman,٢٠١٨).

في حين كونت بكتريا *Serratia marcescens* مستعمرات كبيرة محدبة مخاطية وغير محللة للدم على وسط غراء الدم بينما على وسط الماكونكي فتظهر شاحبة اللون لعدم قدرتها على تخمر سكر اللاكتوز وذات رائحة تشبه رائحة البطاطا المتعفنة أو رائحة السمك مع وجود صبغة حمراء نتيجة لإنتاجها لصبغة Prodigiosin وتحت المجهر الضوئي ظهرت بشكل عصيات سالبة لصبغة كرام (Roy *et al.*,٢٠١٤; Grimont,٢٠١٥).

٤-٧-٢: التشخيص الكيموحيوي للعزلات البكتيرية Biochemical diagnosis of bacterial isolates

تم اجراء العديد من الفحوصات الكيموحيوية على العزلات البكتيرية قيد الدراسة لغرض التشخيص المبدئي لها وفقا للطرائق التي وصفت من قبل (Collee *et al.*,١٩٩٦) وكما مبين في الجدول (٤-٧).

استعملت صبغة غرام لتصبيغ العزلات البكتيرية اذ أعطت بكتريا *S. aureus* و*S. epidermidis* نتيجة موجبة بينما أعطت *P. aeruginosa* و *E. coli* و *K. pneumoniae* و*S. Marcescens* نتيجة سالبة، كما أعطت كل العزلات نتيجة موجبة لفحص الكاتيليز (Catalase)، بينما أعطت كل العزلات نتيجة سالبة لفحص الاوكسيديز(Oxidase) ماعدا بكتريا *P. aeruginosa* أعطت نتيجة موجبة، كما أعطت بكتريا *S. aureus* فقط نتيجة موجبة لفحص انزيم تخثر الدم (COagulase) والذي يعد واحد من عوامل الضراوة(Katz,٢٠١٠) في حين كانت العزلات الأخرى سالبة لهذا الفحص.

بينت نتائج فحص تحلل اليوريا ان بكتريا *S. aureus* و *S. epidermidis* و *K. pneumoniae* أعطت نتيجة موجبة بينما العزلات الأخرى أعطت نتيجة سالبة، كما كانت كل العزلات البكتيرية لها القابلية على تحليل الدم ماعدا بكتريا *K. pneumoniae* وأعطت نتيجة سالبة في حين أعطت بكتريا *E. coli* نتيجة موجبة لفحص الاندول فقط بينما كانت سالبة لفحص السترات، وأعطت بكتريا *E. coli* نتيجة موجبة لفحص احمر المثيل، كما أعطت بكتريا *K. pneumoniae* و*S. marcescens* نتيجة موجبة لاختبار الفوكس بروسكاور فقط.

جدول (٤-٧): الاختبارات الكيموحيوية المستعملة لتشخيص البكتريا المعزولة

ت	العزلات البكتيرية	الاختبارات الكيموحيوية								
		Gram stain	Catalase	Oxidase	CO agulase	Urease	Hemolysis	Indol	Simmon citrate	M-R	V-P
١	***S. aureus***	+	+	-	+	+	+	/	/	/	/
٢	***S.epidermidis***	+	+	-	-	+	+	/	/	/	/
٣	***P.aeruginosa***	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
٤	***E.coli***	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
٥	***K.pneumoniae***	-	+	-	/	+	-	-	+	-	+
٦	***S.marcescens***	-	+	-	/	-	+	-	+	-	+

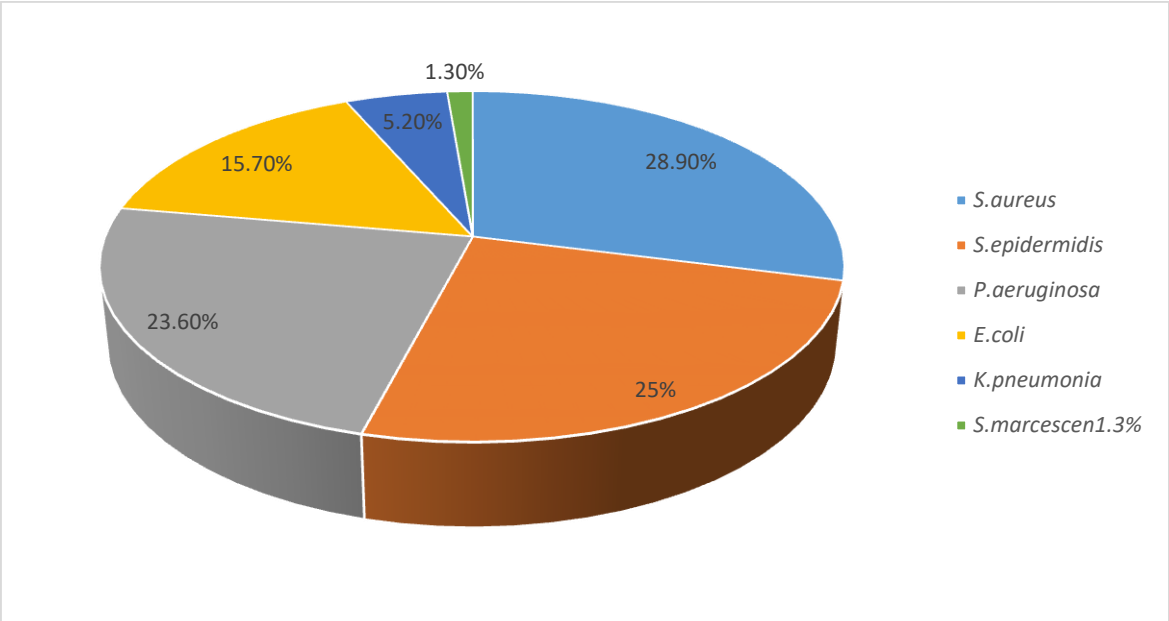
الرمز: (+) نتيجة موجبة، (-) نتيجة سالبة، (/) عدم اجراء الاختبار

٤-٧-٣: التشخيص باستعمال جهاز الفايتك VITEK ٢ system

تم التشخيص النهائي للعزلات البكتيرية الأكثر تردداً في دراستنا الحالية وهما *S. aureus* و *P. aeruginosa* باستعمال جهاز الفايتك اذ تم تشخيص البكتريا الموجبة والبكتريا السالبة لصبغة كرام بطريقة أسهل وأكثر دقة باستعمال بطاقات (GP-GN) التي تحوي على ٦٤ فحصاً كيمو حيوياً متخصصاً وكما مبين في الملحق رقم (٢) والملحق رقم (٣) ،إذ كان معدل احتمالية التشخيص عالية وصلت الى (٩٩%) لبكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* و أكدت نتائج الاختبارات المعمول بها في هذا النظام النتائج التي حصلنا عليها من الاختبارات الكيموحيوية.

٤-٨: الأنواع البكتيرية المشخصة في هذه الدراسة Bacterial species identified in this study

اسفرت نتائج العزل والتشخيص السابقة الذكر والمعتمدة على الخصائص المظهرية والمجهرية فضلاً عن الفحوصات الكيموحيوية عن وجود نمو بكتيري بنسبة (٤٥%) من أصل ١٦٩ مسحةً مأ خوذه من المصابين باخماج العيون من ثلاث مناطق مختلفة الملتحمة والجفن والقرنية تم من خلالها تشخيص (٥٣.٩٤%)٤١ عزلة بكتيرية موجبة لصبغة غرام وهي الأعلى سجلت فيها بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* (٢٨.٩٤%)٢٢ عزلة و هي تمثل البكتريا الأكثر عزلاً من اخماج العيون تلتها بكتريا المكورات العنقودية البشروية البيضاء*S.epidermidis* (٢٥%)١٩ بينما ظهرت (٤٦.٠٥%)٣٥ عزلة بكتيرية سالبة لصبغة غرام كانت فيها بكتريا *P.aeruginosa* (٢٣.٦٨%)١٨الأكثر عزلاً من مجموعة العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام ، وجاءت بالمرتبة الثالثة من ناحية العزل البكتيري ثم بكتريا *E.coli* (١٥.٧٠%)١٢ وبكتريا *K.pneumoniae* (٥.٢٠%)٤ في ما ظهرت لدينا عزلة بكتيرية واحدة فقط لبكتريا *S.marcescens* بنسبة (١.٣٠%)١ وحسب ما موضح بالشكل (٤-٢).



الشكل (٤-٢): الأنواع البكتيرية المعزولة من اخماج العيون المختلفة

جاءت نسبة عزل البكتريا الموجبة لصبغة غرام في دراستنا الحالية أقل من النسبة التي حصل عليها Grandi وآخرون (٢٠٢١) في دراسة لهم أجريت في إيطاليا، إذ كانت نسبة البكتريا

الموجبة لصبغة غرام ٧٣.٥% والتي تمثل العزلات السائدة، في حين كانت البكتريا السالبة لصبغة غرام هي السائدة بنسبة ٦٨.٢% في دراسة أجريت في نيجيريا (Kumurya and Lawan,٢٠٢٣).

وتعد نسبة عزل بكتريا *S. aureus* في دراستنا الحالية متقاربة لما حصل عليه (Alshamahi *et al.*,٢٠٢٠) في دراسة لعزل المسببات البكتيرية من المرضى المصابين باخماج العيون والمراجعين لأحدى مستشفيات صنعاء في اليمن، والتي كانت فيها نسبة عزل هذه البكتريا ٣٠.١% وكانت السائدة ومقاربة لنسبة عزل بكتريا *P. aeruginosa* ، إذ كانت ٢٦.٧% كما بينت هذه الدراسة إنّ البكتريا الموجبة لصبغة غرام هي الأكثر عزلا ٥٢.١% تلتها البكتريا السالبة لصبغة كرام بنسبة ٤٧.٩% والتي كانت متوافقة مع نتائج دراستنا الحالية، وجاءت نسبة عزل بكتريا *S. aureus* متوافقة مع دراسة محلية أجريت في مستشفى ابن الهيثم التخصصي للعيون في بغداد والتي بلغت ٢٩% (Khalil *et al.*,٢٠١٧) ،بينما كانت نسبة بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة في هذه الدراسة أعلى مما حصل عليه (Ewadh *et al.*,٢٠١٤) في دراسة المسببات البكتيرية في اخماج العيون المعزولة من مستشفيات بابل والتي بلغت ١.٧٠% في حين كانت هي السائدة بنسبة ٣٨.٨% في دراسة عن العدوى البكتيرية للعين أجريت في غينيا من قبل(Osei *et al.*,٢٠٢٢)

كما جاءت نسبة بكتريا المكورات العنقودية سالبة الخثرة *S. epidermidis* المعزولة في دراستنا الحالية متقاربة مع دراسة أجريت في اثيوبيا بلغت نسبة عزلها ٢٣.١% (Ayehubizu *et al.*,٢٠٢١) ومتوافقة مع دراسة أخرى احتلت فيها *S. epidermidis* المركز الثاني بنسبة ٢٩.١% من العزل البكتيري (Bhattacharyya *et al.*,٢٠٢٠).

بينما كانت نسبة بكتريا *E. coli* المعزولة في دراستنا الحالية أعلى من نسبتها في دراسة محلية أجريت في مستشفيات بغداد والتي بلغت ٢.٥% (Al-Mishhadani *et al.*,٢٠٢٠).

جاءت بكتريا *K. pneumoniae* المعزولة من اخماج العيون في دراسة أجريت في اثيوبيا مقاربة لما تم الحصول عليه في دراستنا الحالية بنسبة ٤.٦% (Mohammed *et al.*,٢٠٢٠)، وأما بالنسبة لبكتريا *S. marcescens* فقد عزلت بنسبة واطئة جدا مقارنة ببقية العزلات وكانت أقل مما حصل عليه (٢٠٢٠) Petrillo *et al.* في دراسة عن إصابات العيون في

مستشفيات إيطاليا كانت نسبة عزلهم ٤.١% قد يرجع ذلك نتيجة تعرض العين لجرح عن طريق أداة حادة ملوثة.

إنّ نسبة الزيادة في العزل البكتيري الموجب لصبغة غرام يرجع الى إنّ بعض منها يشكل جزءاً من النبيت الطبيعي لجلد الإنسان واغشيته المخاطية (Bryant and Woods,٢٠٠٨) فضلاً عن التركيب الكيميائي لجدار البكتريا الموجبة لصبغة غرام المتكون من طبقة سميكة من الببتيدوكلايكان(Peptidoglycan) إلى جانب الأحماض الدهنية (Lipoteichoic acid) مع احماض التكويك اسيد (Teichoic acid) التي تشكل المكونات الرئيسة لجدار الخلية مقارنة مع جدار البكتريا السالبة مما يحميها من المضادات الحيوية قدر الإمكان ويساعدها في عملية اجتياح ونخر للأنسجة العينية وبذلك تتثبط عملية البلعمة (Rohde,٢٠١٩).

ومن خلال دراستنا الحالية كانت بكتريا *S. aureus* هي المسبب الرئيس لأخماج العيون ضمن البكتريا الموجبة لصبغة كرام، ويعزى ذلك إلى وجودها بصورة طبيعية على الجلد والانف لمعظم الأفراد الاصحاء إذ إنّ ١٥% من السكان يحملونها في الفتحات الامامية وتتحمل النمو في درجات حرارة عالية تصل الى ٤٠ مْ فقد تصبح مرضية تحت أوضاع معينة من نقص مناعة أو أمراض جهازية يتعرض لها الإنسان وظهور سلالات بكتيرية ذات مقاومة للعديد من المضادات الحيوية مما يزيد من نسبة انتشارها (Taylor and Unakal,٢٠٢٢).

بينما كانت بكتريا *P. aeruginosa* هي الأكثر عزلاً من اخماج العيون ضمن البكتريا السالبة لصبغة كرام ويعود ذلك الى انتشارها على نطاق واسع في البيئة ولاسيما الإصابات المكتسبة من المستشفيات وقدرتها على التكيف مع الأوضاع البيئية وامتلاكها مقاومة متعددة للأدوية (Bereket *et al.*,٢٠١٢) ،وأيضا بسبب امتلاكها للعديد من عوامل الضراوة كإنتاج الانزيمات مثل انزيم (Collagenase) وانزيم (Protease)اللذان يعملان على زيادة التصاق البكتيريا بخلايا المضيف ، وبذلك يزيد من فرصة حدوث خمج الملتحمة والقرنية الثانوي (Bharathi *et al.*,٢٠١٠) .

٤-٩: اختبار حساسية العزلات البكتيرية الأكثر ترددا (*S. aureus* و *P. aeruginosa*) لأخماج العيون للمضادات الحيوية

استعمل نظام الفايتك (Vitek ٢) لتحديد حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* تجاه عدد من المضادات الحيوية فقد بينت النتائج الموضحة في الشكل (٤-٣) إنّ

كل عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية كانت حساسة بنسبة ١٠٠% للمضادات Rifampicinو Linezolid وTeicoplanin وTigecycline و٩٥.٤% لمضاد Trimethoprim\Sulfamethoxazole و٩٠.٩% لمضادات Levofloxacin و Moxifloxacinو Norfloxacin و Vancomycinو٨١.١% لمضادات Tetracycline و Ciprofloxacinونسبة ٦٨.١% لمضاد Gentamicin.

ومن جانب آخر فقد تفاوتت تلك العزلات في مقاومتها للمضادات الحيوية قيد الدراسة، إذ بلغت نسبة المقاومة ١٠٠ % لكل من Amoxicillin وAmoxicillin\Clavulanic acid و Benzylpenicillinو Ticarcillin\Clavulanic acid وبنسبة ٩٥.٤% لكل من Oxacillin والسيفالوسبورينات من الجيل الأول والثاني والثالث والرابع المستعملة في هذه الدراسة وبنسبة ٧٧.٢ لمضاد Fusidic Acid و٧٢.٧% لمضادات Azithromycin وClarithromycinو Erythromycin وبنسبة ٦٣.٦% لمضاد Clindamycin.

من ملاحظة الشكل المذكور سابقاً يتضح إن كل العزلات المتحصل عليها من هذه الدراسة كانت حساسة لمضاد Linezolid وتتفق هذه الدراسة مع ما ذكره Mohamed *et al.* (٢٠٢٠)، إذ إنّ عزلات بكتريا *S. aureus* المتحصل عليها من مرضى خمج الملتحمة بإحدى مستشفيات مصر كانت حساسة بنسبة ١٠٠% للمضاد قيد الدراسة، كما تم الحصول على نسبة الحساسية ذاتها لبكتريا *S. aureus* المعزولة من العيون في إيران (Nazari-Alam *et al.*,٢٠٢١).

يعدLinezolid من مضادات Oxazolidinones التي تتميز بقدرتها على اختراق الانسجة بشكل ممتاز، إذ يعمل هذا المضاد على تثبيط بناء البروتين البكتيري من خلال الارتباط بالوحدة الفرعية الرايبوسومية ٥٠S المواجهة مع الوحدة الفرعية ٣٠S وبالتالي يمنع من تكوين معقد البدء الوظيفي ٧٠S، وبذلك يمنع انتاج البروتين ويمنع تكاثر البكتريا (Zahedi Bialvaei *et al.*,٢٠١٧).

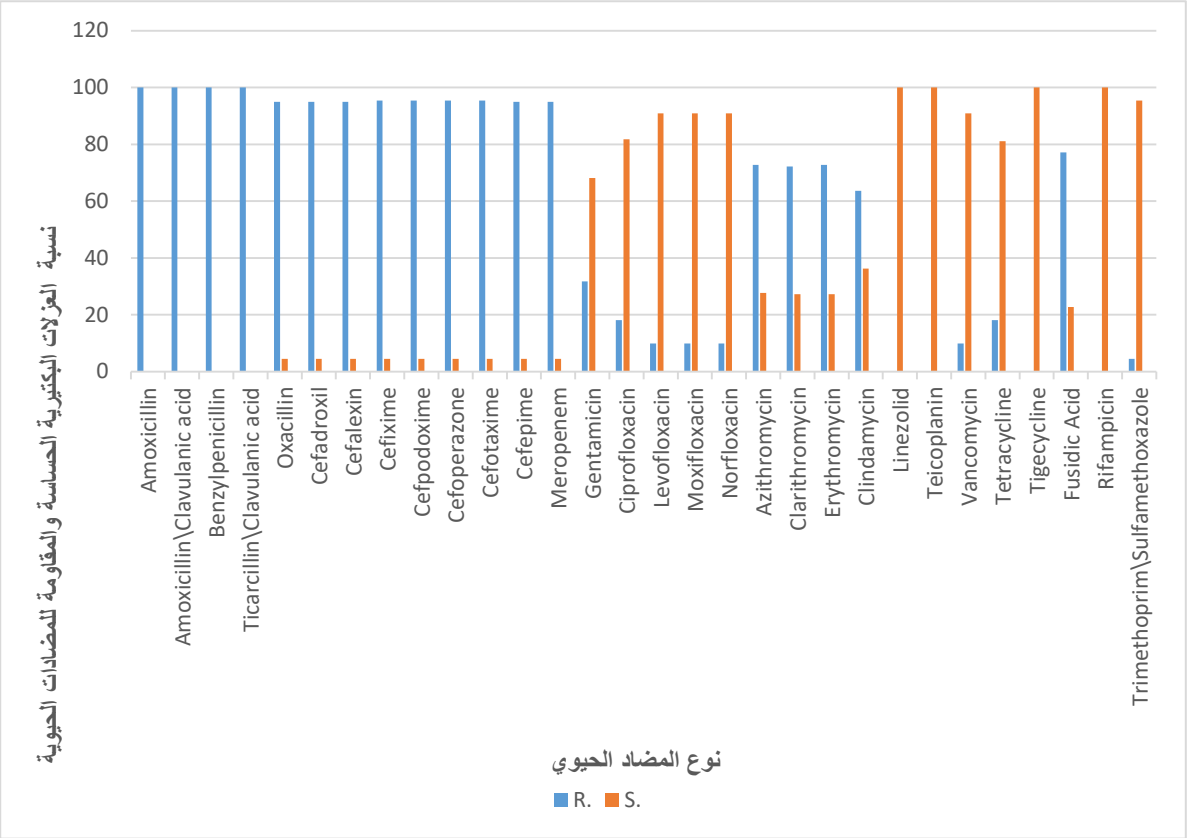
وبالرجوع للشكل المذكور آنفاً يلاحظ إنّ كل عزلات بكتريا *S. aureus* حساسة بنسبة ١٠٠% لمضاد Tigecycline الذي يعود إلى صنف Glycylcyclines وهو واسع الطيف ضد مسببات الأمراض التي يصعب علاجها مثل المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين (Stein and Babin chak,٢٠١٣)، ويشتق من مضادات Tetracycline، ويظهر نشاطاً

تثبيطياً من خلال إرتباطه العكسي بالوحدة الفرعية الرايبوسومية ٣٠s ويثبط ترجمة البروتين (Rose and Rybak,٢٠٠٦).

ويلاحظ من الشكل (٤-٣) أيضا بأن كل عزلات بكتريا *S. aureus* كانت مقاومة بنسبة ١٠٠% لمضاد Amoxicillin\Clavulanic acid، وتتفق هذه النتيجة مع دراسة سابقة أجريت في إيطاليا تم الحصول على ذات النسبة (Petrillo *et al.*,٢٠٢٠).

إنّ قدرة العزلات البكتيرية على مقاومة مضادات البنسيلين تتحقق بآليات عدة منها قدرتها على انتاج انزيمات β- Lactamase التي تحلل حلقة البيتا لاكتام وتغير بروتينات ربط البنسلين الموجودة ضمن مجموعة البنسلينات الذي يعمل على تعطيل المضاد (Guo *et al.*,٢٠٢٠) ، فضلاً عن آلية تغير الهدف مع انخفاض تقارب للمضاد الحيوي اوتغير في المضاد خلال البكتريا من خلال مضخات التدفق (Steward *et al.*,٢٠٠٥)

كذلك كانت عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية مقاومة بنسبة ٧٢.٧% لكل من المضاد الحيوي Erythromycin و Azithromycinو Clarithromycin تقوم تلك المضادات التي تعود لمجموعة المايكروليدات بتثبيط تخليق البروتين في الخلية البكتيرية من خلال الارتباط بالوحدة الفرعية الرايبوسومية ٥٠S ان عملية الربط هذه تمنع نشاط انزيم Peptidyl transferase ،وتتداخل مع انتقال الاحماض الامينية اثناء ترجمة البروتينات وتجميعها لهذا فإنّ آلية مقاومته تعني أنّ البكتريا إما أن تمتلك واحدة من مورثات المقاومة وهي *ermA*التي تعمل من خلالها على تحوير في الحامض النووي الرايبوسومي (rRNA)حول موقع الارتباط عند نفق الخروج الذي يهاجر من خلاله البروتين الناشئ حتى يخرج من الريبوسوم، أو عن طريق آليات مقاومة إضافية هي طفرات الحذف أو الادخال في البروتين الرايبوسومي الذي يغير من شكل نفق خروج البروتين المصنع (Halfon *et al.*,٢٠١٩) .



شكل (٤-٣): حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* المعزولة من اخماج العيون تجاه المضادات الحيوية.

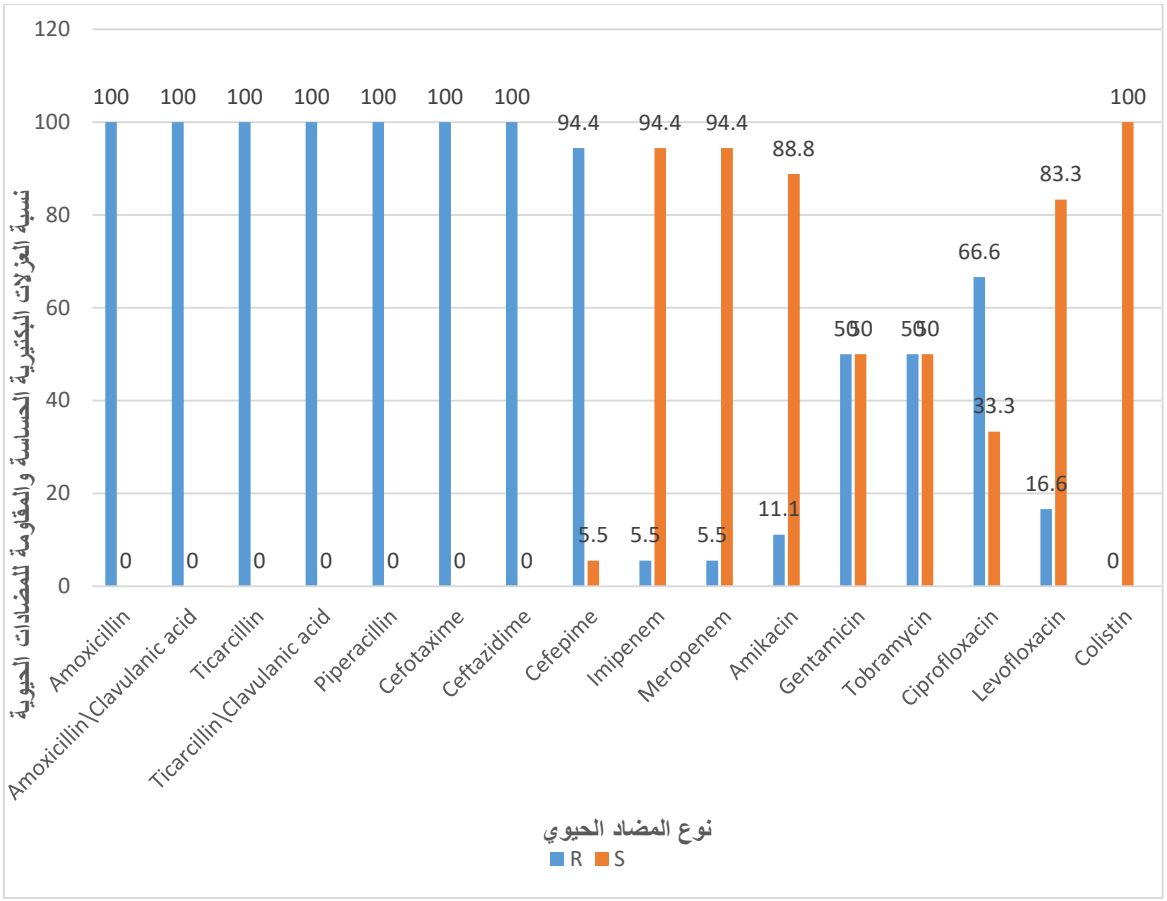
وأما الشكل (٤-٤) فيوضح أن كل عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية حساسة لمضاد Colistin بنسبة ١٠٠% الذي يعد من مجموعة Polymixin E ،وهو من المضادات الفعالة جداً ضد بكتريا *P. aeruginosa* ويستعمل في العلاج الموضعي لأخماج القرنية كما مبين في هذه الدراسة (Egrilmez and Yildirim-Theveny,٢٠٢٠)، إذ يرتبط مضاد الكولستين موجب الشحنة من خلال تفاعل الكهروستاتيكي مع مجموعة الفوسفات سالبة الشحنة للدهون المكونة لطبقة الغشاء الحيوي عديد السكاريد الشحمي (LPS) في غشاء الخلية السالبة لصبغة كرام ،ويزيح المضاد الكاتيونات ثنائية التكافؤ من الكالسيوم $Ca^{+٢}$ والمغنيسيوم $Mg^{+٢}$ بطريقة تنافسية مما يضعف هيكل عديد السكاريد الشحمي (LPS) ثلاثي الأبعاد مؤدياً إلى نضوح محتويات الخلية البكتيرية وموتها (Andrade *et al.*,٢٠٢٠).

وأيضا بينت نتائج دراستنا الحالية إنّ معظم العزلات كانت حساسة لمضاد Imipenem وMeropenem بنسبة ٩٤.٤%، وهذه النسبة تتوافق في جزء منها مع دراسة في الصين وجدت إن عزلات بكتريا *P. aeruginosa* حساسة تجاه مضادImipenem بنسبة عالية تصل إلى

١٠٠%، إذ تعود هذه المضادات الى مجموعة Carbapenem وهي صنف من مضادات البيتا لاكتام (Xu *et al.*,٢٠٢١)، بينما انخفضت حساسية هذه العزلات إلى ٨٨.٨% و٨٣.٣% على التوالي لمضادي Amikacin و Levofloxacinوهذه النتيجة تتوافق في جزء منها مع دراسة قام بها(Farhan *et al.*,٢٠٢١) كان فيها مضاد Amikacin أكثر الادوية فعالية مع أقل نسبة مقاومة٢٨.٩%.

وقد أظهرت الدراسة الحالية إن عزلات *P. aeruginosa* لديها معدلات مقاومة عالية جدا للمضادات الحيوية المستعملة في هذه الدراسة، إذ كانت العزلات مقاومة ١٠٠% لمضادات Amoxicillin و Amoxicillin\Clavulanic acid و Ticarcillinو Ticarcillin\Clavulanic acid و Piperacillin ،وهذه النتائج تتفق مع دراسة في السودان كانت فيها نسبة المقاومة لمجموعة البنسلينات ١٠٠% لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* (Mohager *et al.*,٢٠١٦) ،كما أظهرت النتائج أنها مقاومة لمضادات السيفالوسبورينات بنسبة ١٠٠% لمضاد Ceftazidime و Cefotaxime ونسبة ٩٤.٤% لمضاد وCefepime،إذ تتولد المقاومة تجاه مضادات السيفالوسبورينات من خلال انتاج انزيمات البيتا لاكتام β- Lactamase المشفر لها كروموسوميا أوعن طريق البلازميدات المحمولة في البكتيريا التي تقوم بتحليل حلقة البيتا لاكتام (Pfeifer *et al.*,٢٠١٠).

بينما كانت مقاومة العزلات البكتيرية ٦٦.٦% بالنسبة لمضاد Ciprofloxacin ينتمي هذا المضاد إلى مجموعة مضادات Fluoroquinolone ويستعمل بصورة شائعة في علاج العديد من الالتهابات ومنها اخماج العيون، وإن الاستعمال المكثف لهذا المضاد أدى إلى ازياد مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* من خلال آليتان هما تعديل في موقع الهدف والافراط في التعبير عن تنظيم مضخات التدفق ويحدث من خلال الطفرات في الجينات المنظمة لمضخات التدفق (Rhman *et al.*,٢٠١٩) جاءت هذه النسبة غير متوافقة مع دراسة مصرية كانت نسبة حساسية هذا المضاد تجاه عزلات بكتريا *P. aeruginosa* هي ٨٣.٣% (Badawi *et al.*,٢٠١٧).



شكل (٤-٤): حساسية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من اخماج العيون تجاه المضادات الحيوية.

٤-١٠: علاقة عوامل الخطورة بمعدل إصابات العيون البكتيرية The relationship of risk factors with the rate of bacterial eye infections

بينت النتائج الموضحة في الجدول (٤-٨) بان هنالك فرقاً معنوياً كبيراً على مستوى احتمال (p =٠١٢)بين عوامل الخطورة مثل الصدمة(Trauma) ، أمراض سطح العين ،ارتداء العدسات اللاصقة، داء السكري ، إصابات الجهاز التنفسي وأسباب غير معروفة التي تزيد من فرصة الإصابة البكتيرية ،إذ ظهرت علاقة بعض العوامل التي يعاني منها المرضى بزيادة فرصة الإصابة باخماج العيون البكتيرية و كانت اكثر العوامل ارتباطاً بتطور اخماج العيون هي صدمات العين(٣٠.٢٦%)٢٣ ويعتقد إن ارتفاع تردد اخماج العين البكتيرية المرافقة لتعرض العين للحوادث المفاجئة والإصابات الرياضية او إصابات ناجمة عن العمل في المجال الزراعي الذي يكون العمال والمزارعين فيه اكثر عرضة الى المواد النباتية والاجسام الغريبة (Ting *et*

(*al.*,٢٠٢١) كما تزداد في الدول منخفضة الدخل لتصل الى (٧٧.٥%) (Bourcier *et* . (*al.*,٢٠٠٣

وتعد أمراض سطح العين العامل الثاني الأكثر شيوعاً (٢٢.٣٧%)١٧ المرافق لتطور خمج العيون البكتيري وتعد حالة جفاف العين هي الأكثر تردداً بسبب الطقس الحار الجاف وانخفاض نسبة الرطوبة مع انتشار استعمال مكيفات الهواء وتلوث الهواء والتعرض المتكرر لأشعة الشمس فضلاً عن استعمال الكمبيوتر لأكثر من (٦) ساعات يومياً، وهذه العوامل مجتمعة تساعد في حدوث العدوى البكتيرية المرتبطة مع فقدان التوازن في الفلم المسيل للدموع وتعرضه للتبخر السريع خاصة في بيئتنا الحارة الجافة (Alkhaldi *et al.*,٢٠٢٢)، وقد توافقت نتائج دراستنا الحالية مع(Teweldemedhin *et al.*,٢٠١٧) الذي أكد ارتباط امراض سطح العين والصدمات العينية بحدوث العدوى البكتيرية.

إن ارتداء العدسات اللاصقة كان مرافقاً ل (١٩.٧٤%)١٥ حالةً من إصابات العيون البكتيرية والتي تتطور، إذ لم يتم تنظيف وتطهير وتخزين العدسات اللاصقة بشكل صحيح مما يسبب الإصابة بخمج الملتحمة والقرنية والجفن البكتيري، كما إن الإفراط في استعمال العدسات والنوم بيها يزيد من تردد الإصابة وخطورتها (Juhong *et al.*,٢٠٢٢).

وتتوافق هذه النتائج مع دراسة محلية أخرى كانت فيها صدمات العيون هي الأكثر شيوعاً (٣٩.٦٩%)، تلتها ارتداء العدسات اللاصقة (١٧.٢٥%)في محافظة بغداد (Ismael and Mohamead,٢٠٢٢)، بينما لا تتوافق مع دراسة أجريت في دولة الامارات وجدت أن ارتداء العدسات اللاصقة هو عامل الخطر الرئيس لالتهاب القرنية بنسبة (٣٧%) (Elhanan *et* .(*al.*,٢٠١٦

ووجد ارتباط ملحوظ بين إصابات العيون البكتيرية وبعض الامراض الجهازية مثل داء السكري، والتي كانت بنسبة (١٣.١٦%)١٠ هي أقل مما حصل عليه (Khalil *et al.*,٢٠١٧) في دراسة محلية أجريت في مستشفى ابن الهيثم التخصصي للعيون في بغداد، كما تزيد الامراض الجهازية من خطر الإصابة بالعدوى البكتيرية بشكل عام بما في ذلك خمج العيون البكتيري، و كانت بنسبة(٥.٢٦%)٤ في الدراسة الحالية وذلك لأنها تضعف جهاز المناعة للجسم بشكل عام فضلاً عن ما يسببه داء السكري من ضرر في الأوعية الدموية الموجودة في الملتحمة وحدوث تغيرات في سطح العين مثل إنخفاض استقرار الفيلم المسيل للدموع وإفرازه وانخفاض حساسية القرنية (Misra *et al.*,٢٠١٦) كما يغير مستوى العديد من بروتينات الدموع التي

تشكل جزء من الحاجز الكيميائي للعين (Kello *et al.*,٢٠٢١)،وقد تكتسب العين العدوى من الإصابات البكتيرية في منطقة البلعوم الانفي فضلاً عن ما تسببه العدوى الفيروسية من ضعف في مقاومة العين للاستعمار البكتيري ، وبالتالي تسمح بزيادة نسبة العدوى البكتيرية فيها (Hovding,٢٠٠٨)ففي دراسة قام بها(Buznach *et al.*,٢٠٠٥) وجد تطابق بين البكتريا الموجودة في البلغم مع البكتريا المعزولة من العين ووجد ارتباط بين التهاب الملتحمة مع التهاب الاذن الوسطى وعدوى الجهاز التنفسي .

إضافة لذلك أظهرت النتائج الحالية عن وجود (٩.٢١%)٧ حالات من المرضى المصابين بالتهابات العيون البكتيرية غير المرتبطة باي من عوامل الخطورة المذكورة جاءت هذه النتيجة متوافقة مع دراسة محلية أخرى كانت نسبة الإصابات غير المقترنة بعوامل الخطورة ٨.٢٤% (Ismael and Mohamead,٢٠٢٢).

جدول (٤-٨): عدد الإصابات البكتيرية للعين حسب عوامل الخطر

عوامل الخطر	عدد الإصابات N(%)	Chi squared	p value
الصدمة	٢٣ (٣٠.٢٦٪)	٤.٥٣	٠.٠١٢*
امراض سطح العين	١٧ (٢٢.٣٧٪)		
العدسات اللاصقة	١٥ (١٩.٧٤٪)		
مرض السكري	١٠ (١٣.١٦٪)		
إصابات الجهاز التنفسي	٤ (٥.٢٦٪)		
أسباب غير معروفة	٧ (٩.٢١٪)		
المجموع	٧٦(١٠٠٪)		

٤-١١: علاقة عوامل الخطورة للمريض مع موقع الإصابة البكتيرية The relationship of the patient's risk factors with the location of the bacterial infection

أظهرت النتائج الحالية وجود ارتباط معنوي بين عوامل الخطورة المدروسة في هذه الدراسة التي يعاني منها المرضى المصابين باخماج العيون البكتيرية مع مواقع الإصابة المتمثلة بالملتحمة، الاجفان والقرنية (p =٠.٠٢٢) كما موضحة بالجدول (٤-٩) ، إذ كانت أكثر عوامل الخطورة ارتباطاً مع خمج الملتحمة هي صدمة العين بنسبة (٢٢.٣٦%)١٧، تلتها أمراض سطح العين (١٥.٧٩%)١٢ ، في حين كان ارتداء العدسات اللاصقة سببا في حدوث خمج الملتحمة بنسبة (١٣.١٦%)١٠ جاءت هذه النتيجة متوافقة مع دراسة قام بها (Shin *et al.*,٢٠١٦) كانت فيها العدسات اللاصقة سبباً بحدوث خمج الملتحمة البكتيري .

بينما جاءت إصابات الجهاز التنفسي بأقل نسبة حدوث لخمج الملتحمة (٣.٩٥%)٣ وكانت تلك النتيجة غير متوافقة مع دراسة قام بها (Haas *et al.*,٢٠٠٥) اللذين وجدوا ارتباط خمج الملتحمة بإفرازات الجهاز التنفسي اعلى من نتائج الدراسة الحالية.

أما بالنسبة لأمراض سطح العين فهي المسبب الأكثر تردداً مع خمج الاجفان (٦.٥٧%)٥، تلاها الصدمة (٥.٢٦%)٤ جاءت نتيجة دراستنا متوافقة مع دراسة (Nattis *et al.*,٢٠١٩) الذي وجد أن هنالك ارتباط بين أمراض سطح العين وخمج الاجفان. وايضا مع دراسة قام بها(Zilliox *et al.*,٢٠٢٠)اللذين وجدوا ارتباط امراض سطح العين مع خمج الجفن والملتحمة، ثم جاءت الأمراض الجهازية مثل داء السكري (٣.٩٥%)٣ والاصابات التنفسية بأقل نسبة (١.٣٢%)١ بينما سجل ارتداء العدسات اللاصقة والالتهابات غير المرتبطة باي من عوامل الخطورة المذكورة نسبة (٢.٦٣٪)٢ و(٣.٩٥٪)٣ على التوالي.

وأظهرت النتائج أيضا ارتباط خمج القرنية مع ارتداء العدسات اللاصقة، والتي بلغت (٣.٩٥%)٣ تلاها وجود الصدمة (٢.٦٣%)٢، وجاءت هذه النتيجة متوافقة مع دراسة قام بها(Ting *et al.*,٢٠٢١)كان ارتداء العدسات اللاصقة اهم سبب لحدوث خمج القرنية الميكروبي تلتها الصدمة بينما سجلت الامراض الجهازية المتمثلة بداء السكري أقل نسبة (١.٣٢%) ١.

جدول (٤-٩): علاقة مواقع الإصابة البكتيرية في العين مع عوامل الخطورة المدروسة

عوامل الخطورة	موقع الإصابة			Chi squared	P- value
	الملتحمة N(%)	الاجفان N(%)	القرنية N(%)		
الصدمة	١٧(٢٢.٣٦٪)	٤ (٥.٢٦٪)	٢ (٢.٦٣٪)	٤٢٨.٤٠٪	٠.٠٢٢*
امراض سطح العين	١٢ (١٥.٧٩٪)	٥(٦.٥٧٪)	٠ (٠.٠٠٪)		
العدسات اللاصقة	١٠ (١٣.١٦٪)	٢ (٢.٦٣٪)	٣ (٣.٩٥٪)		
داء السكري	٦ (٧.٨٩٪)	٣ (٣.٩٥٪)	١ (١.٣٢٪)		
إصابات الجهاز التنفسي	٣ (٣.٩٥٪)	١ (١.٣٢٪)	٠ (٠.٠٠٪)		
أسباب غير معروفة	٤ (٥.٢٦٪)	٣(٣.٩٥٪)	٠ (٠.٠٠٪)		
المجموع	٥٢	١٨	٦		

٤-١٢: علاقة عمر وجنس المصاب مع عوامل الخطورة The relationship of age and gender of the patient with risk factors

أظهرت النتائج الحالية عدم وجود ارتباط معنوي كبير بين عمر المصاب وجنسه مع عوامل الخطورة المتمثلة بالصدمة، وأمراض سطح العين، ارتداء العدسات اللاصقة، داء السكري، إصابات الجهاز التنفسي فضلاً عن الأسباب غير المعروفة التي تزيد من فرصة اصابته البكتيرية على مستوى احتمالية(p=٠.٧٤٢) كما موضح بالجدول (٤-١٠)، مع ذلك كانت الصدمة للذكور في عمر (٢٥-٤٩) هي الأكثر شيوعا وقد يرجع الى ارتباط الذكور بمزاولة أعمال متنوعة أو اثناء ممارستهم الأنشطة الرياضية او حوادث السيارات او التعامل مع الاخرين، و جاءت هذه النتيجة متوافقة في جزء منها مع دراسة في نيوزيلندا كان فيها معدل الصدمة في الذكور اعلى من الصدمة في الاناث لكن بمعدل عمر بين (١٥-٢٠) سنة (Pandita and Merriman,٢٠١٢). بينما كانت غير متوافقة مع دراسة سابقة بينت ارتباط صدمة العين وأمراض سطح العين مع الذكور أكثر من الاناث (Ayehubizu *et al.*,٢٠٢١).

إما بالنسبة لأمراض سطح العين فكانت نتيجة دراستنا متوافقة مع دراسة سابقة كانت أمراض سطح العين تبلغ ٨٠% فيها التي بينت إنه لا توجد علاقة بين أمراض سطح العين مع عمر المصاب وجنسه (Horng *et al.*,٢٠١٤)، بينما كان استعمال العدسات اللاصقة واحد من عوامل الضراوة المرتبطة بشكل كبير مع الاناث الشابات في دراسة سابقة أجريت في الصين (Zhu *et al.*,٢٠١٨).

وأما الأمراض الجهازية مثل داء السكري فجاءت نتيجة دراستنا الحالية متقاربة مع دراسة قام بها (Wang *et al.*,٢٠١٨) على مرضى السكري الذين يعانون من عدوى القرنية، إذ لم يكن هنالك فرق معنوي كبير بين توزيع الجنس في مرضى السكر مع الإصابة العينية لكن كانت هنالك فروقات في العمر اذ سجلت الدراسة الحالية ان الإصابات تزداد بعمر (٥٠-٧٥) سنة.

إن أمراض الجهاز التنفسي جاءت بنسب متقاربة أيضا بين الذكور والاناث، وهذه لا تتوافق مع دراسة قام بها (Alter *et al.*,٢٠١١) كانت فيها إصابات الجهاز التنفسي مرتبطة بالعمر، وأما نسبة الإصابات غير المرتبطة بالعوامل السابقة الذكر فتركزت في الفئة العمرية (١-٢٤) سنة، مما يشير ذلك إلى إمكانية إصابة العين بالعدوى البكتيرية التي تلعب دوراً نشطاً بإمراضيه العين باي عمر او جنس (Deepthi and Prabagaran,٢٠٢٠).

جدول (٤-١٠): علاقة عمر وجنس المصاب مع عوامل الخطورة

عوامل الخطورة	١_٢٤ سنة		٢٥-٤٩ سنة		٥٠-٧٥ سنة		Chi squared	P value
	ذكور N	اناث N	ذكور N	اناث N	ذكور N	اناث N		
الصدمة	٨	٠	١٢	٢	١	٠	١.٢٨٣	٠.٧٤٢
امراض سطح العين	٣	٢	٣	١	٣	٥		
العدسات اللاصقة	٢	٤	٢	٧	٠	٠		
داء السكري	٠	٠	١	٢	٤	٣		
اصابات الجهاز التنفسي	١	٢	٠	١	٠	٠		
أسباب غير معروفة	٤	١	٢	٠	٠	٠		
المجموع	١٨	٩	٢٠	١٣	٨	٨		

.

٤-١٣: الكشف عن عوامل الضراوة البكتيرية Detection of bacterial virulence factors

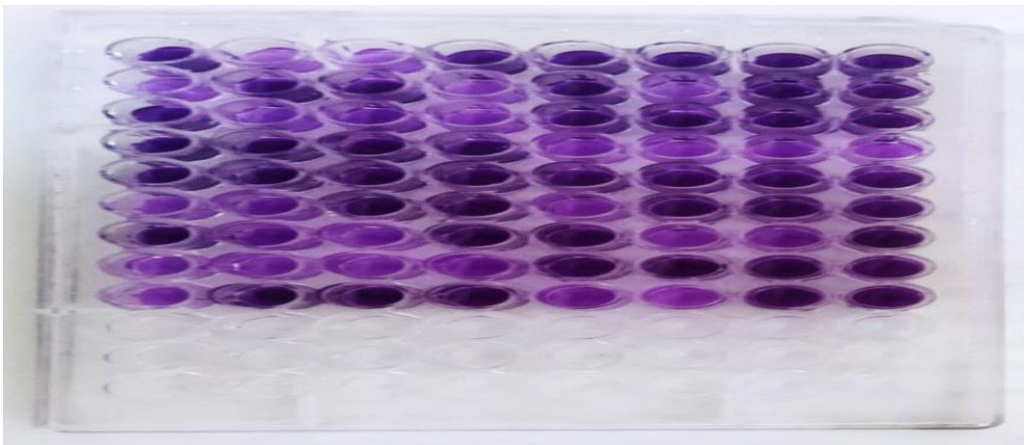
أجريت اختبارات التحري عن انتاج بعض من عوامل الضراوة للأجناس البكتيرية الأكثر تردداً في هذه الدراسة والتي تلعب دورا مهما في إمراض العيون والمتمثلة بكل من بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* وكما يأتي:

٤-١٣-١: التحري عن قابلية الاجناس البكتيرية لإنتاج الاغشية الحيوية Investigation of the ability of bacterial species to produce biofilms

تم التحري عن قابلية عزلات بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* على تكوين الاغشية الحيوية وذلك باستعمال طريقة الأنابيب اولاً والتي تعد اختباراً نوعياً(Qualitatively) للكشف عن قدرة تكوين الأغشية الحيوية على أساس سمك وكثافة الاغشية الحيوية المرتبطة بالجدار الداخلي لأنبوبة الاختبار، اذ تكون النتيجة موجبة عندما تتكون الأغشية الحيوية بشكل طبقة بنفسجية على الجدران الداخلية وقعر أنابيب الاختبار، وأظهرت نتائج الدراسة الحالية إن كل من عزلات بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* قادرة على انتاج الأغشية الحيوية بنسبة ٨٦.٣٦% و٩٤.٤٤% على التوالي وكما موضح في الشكل (٤-٥) وهذه الاغشية مهمة في بقاء واستقرار البكتريا في المنطقة المصابة الشيء الذي يعزز إمراضيتها ، وجاءت هذه النتيجة متقاربة مع دراسة محلية كانت فيها قابلية بكتريا *S. aureus* المعزولة من عينات سريرية على تكوين الأغشية الحيوية بنسبة ٨٧.٥% (M Raoof *et al.*,٢٠١٣)، كما تنسجم نتائج الدراسة الحالية أيضا مع ما حصل عليه كل من(Raksha *et al.*,٢٠٢٠) الذين وجدوا إن كل عزلات بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* المعزولة من مرتدي العدسات اللاصقة لها قابلية عالية على انتاج الاغشية الحيوية بكفاءة عالية و(Zuberi and Nadeem,٢٠١٧) اللذين أكدوا إن كل عزلات بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* المعزولة من العدسات اللاصقة وملحقاتها تعطي نتائج موجبة لفحص تكوين الأغشية الحيوية بطريقة الانبوبة، ولتأكيد تلك النتيجة تم اختبار قدرة العزلات المدروسة على انتاج الاغشية الحيوية كمياً باستعمال طريقة اطباق المعايرة Micro titer plate method

شكل (٤-٥): تكوين الاغشية الحيوية بطريقة الانبوبة (Tube method)

والتي تعد اختباراً كمياً (Quantitative assay) للكشف عن قابلية بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* على تكوين الأغشية الحيوية ، اذ يعطي قيمة رقمية للامتصاصية على طول موجي (٦٣٠) نانوميتر باستعمال جهاز قارئ الاليزا (ELISA reader) لتحديد كمية الاغشية الحيوية المتكونة من بعد التصاقها على سطوح اطباق المعايرة الموضحة بالشكل(٤-٦) ، وتمثل قيم الامتصاصية سمك الأغشية الحيوية المنتجة من قبل العزلات البكتيرية ،و هذه الطريقة تعد طريقة قياسية وأكثر دقة وحساسية من طريقة الأنابيب (Kord *et al.*,٢٠١٨)إذ إن تكوين الأغشية الحيوية يعد واحد من عوامل الضراوة المهمة للبكتريا التي تقوم بإنتاجه اذ يمثل الخطوة الأولى لبدء الالتهاب وحدوث المرض ،لأنه يقوم بتوفير حماية ذاتية للبكتريا ضد الخلايا البلعمية وبذلك تستمر الإصابة (Nemati *et al.*,٢٠٠٩)، كما تزداد قابلية البكتريا على تحمل العلاج بالمضادات الحيوية لأنها تعمل كحواجز تمنع من وصول المضاد الحيوي الى الخلايا البكتريا (Mirzaee *et al.*,٢٠١٤).



شكل (٤-٦): انتاج الاغشية الحيوية بطريقة اطباق المعايرة

وأظهرت النتائج الحالية إن كل عزلات بكتيريا *S. aureus* المدروسة (٢٢ عزلة) كانت لها القابلية على انتاج الأغشية الحيوية وبنسبة ١٠٠% كما مبين في الجدول (٤-١٢) لكن بدرجات متفاوتة من خلال مقارنتها مع السيطرة السالبة، إذ تراوحت الإنتاجية بين الانتاج المتوسط للأغشية الحيوية وبنسبة (٢٧.٢٧%)٦ عزلات من البكتريا اما الإنتاجية القوية بنسبة (٧٢.٧٢%)١٦ من العزلات وكما مبين في الجدول (٤-١٢).

وتقاربت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة سابقة وصلت نسبت انتاج عزلات بكتريا *S. aureus* المعزولة من اخماج سطح العين إلى ٨١.٢% (Khalil and Sonbol,٢٠١٤) كما توافقت ايضا مع نتائج دراسة (Azmi *et al.*,٢٠١٩) التي كانت فيها كل عزلات بكتريا *S. aureus* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة منتجة للأغشية الحيوية بنسبة ١٠٠% في حين كانت نسبة انتاجية بكتريا *S. aureus* للأغشية الحيوية المعزولة من مواقع مختلفة لأخماج العيون أقل من النتائج الحالية، إذ سجلت نسبة ٥١.٩%فقط (Hou *et al.*,٢٠١٢)، في حين جاءت نتائج الدراسة الحالية غير متوافقة مع دراسة أجريت في اثيوبيا كانت نسبة الإنتاجية للأغشية الحيوية من قبل عزلات بكتريا المكورات العنقودية المعزولة من إصابات سطح العين ٣١%فقط (Diriba *et al.*,٢٠٢٠).

جدول (٤-١١) قابلية تكوين الأغشية الحيوية حسب معدل الكثافة الضوئية OD

قابلية تكوين الغشاء الحيوي	معدل OD
عدم تكوين الغشاء الحيوي	OD≤٠.٠٦٢
ضعيف	٠.٠٦٢<OD≤٠.١٢٤
متوسط	٠.١٢٤<OD≤٠.٢٤٨
قوي	OD>٠.٢٤٨

جدول (٤-١٢) معدل الامتصاصية لعزلات بكتريا *S. aureus* المنتجة للأغشية الحيوية عند ٦٣٠nm.

العزلات البكتيرية	معدل قيم الامتصاصية عند ٦٣٠nm
St١	٠.٢٨٩
St٢	٠.٢٥٣
St٣	٠.٣٢٧

St٤	٠.٢٥١
St٥	٠.٣٠٩
St٦	٠.٢٦٠
St٧	٠.٢٦٢
St٨	٠.٢٢٧
St٩	٠.٣٤٢
St١٠	٠.٣٦٥
St١١	٠.٢٤٣
St١٢	٠.٢٩٢
St١٣	٠.٢٤٨
St١٤	٠.٢٤٢
St١٥	٠.٣٢٠
St١٦	٠.١٦٣
St١٧	٠.٣٥٢
St١٨	٠.٣٠٧
St١٩	٠.١٧٨
St٢٠	٠.٣٤٩
St٢١	٠.٢٨٣
St٢٢	٠.٣٤٥

أيضا أظهرت النتائج الحالية الموضحة بالجدول (٤-١٣) إن كل عزلات بكتريا *P. aeruginosa* والبالغة (١٨) عزلة منتجة للأغشية الحيوية بنسبة ١٠٠% وتميزت اغلب العزلات بإنتاجية قوية للغشاء الحيوي وبنسبة (٨٣.٣٣%)١٥ من العزلات في حين كانت (١٦.٦٦%)٣ عزلات ذات إنتاجية متوسطة للأغشية الحيوية، و توافقت هذه النتيجة مع عدة دراسات منها محلية في الانبار كانت فيها بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من إصابات العيون هي الأكثر ارتباطا بتكوين الأغشية الحيوية(Al-Janabi *et al.*,٢٠١٣) كما ذكر (Alwan,٢٠٢٠) ان عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة

لها القدرة على تكوين الأغشية الحيوية بنسبة ٩٢% وكذلك دراسة غير محلية وجدت ان بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من الملتحمة والقرنية لها القابلية على تكوين الأغشية الحيوية بنسبة ٨٥.٧%(Mahdi *et al.*,٢٠٢١) في حين جاءت غير متوافقة مع دراسة قام بها Hou *et al.*,(٢٠١٢) كانت فيها العزلات السريرية العينية غير منتجة للأغشية الحيوية، أيضا سجلت دراسة سابقة إن ٤٠% من عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من اخماج سطح العين كانت شديدة التكوين للغشاء الحيوي (Diriba *et al.*,٢٠٢٠).

جدول (٤-١٣) معدل الامتصاصية لعزلات بكتريا*P. aeruginosa* المنتجة للأغشية الحيوية عند ٦٣٠nm

العزلات البكتيرية	معدل قيم الامتصاصية عند ٦٣٠nm
Pa١	٠.٣٦٢
Pa٢	٠.٢٥٣
Pa٣	٠.٣٠٧
Pa٤	٠.٢٦٠
Pa٥	٠.٣٤٣
Pa٦	٠.٢٠٩
Pa٧	٠.١٧٦
Pa٨	٠.٣٥
Pa٩	٠.٣٦٨
Pa١٠	٠.٣٥٤
Pa١١	٠.٢٨٣
Pa١٢	٠.٢٨٩
Pa١٣	٠.٣٠
Pa١٤	٠.٢٦٩
Pa١٥	٠.٣٥٤
Pa١٦	٠.٢١٢
Pa١٧	٠.٢٦١
Pa١٨	٠.٣٠٥

٤-١٣-١-١: العلاقة بين مواقع الإصابة البكتيرية في العين وقابلية العزلات البكتيرية على انتاج الأغشية الحيوية The relationship between sites of bacterial infection in the eye and the ability of bacterial isolates to produce biofilms

يظهر الجدول (٤-١٤) وجود ارتباطاً معنوياً على مستوى احتمالية (p =٠.٠٢٢) بين قابلية العزلات البكتيرية المدروسة *S. aureus* و*P. aeruginosa* على انتاج الأغشية الحيوية ومواقع الإصابة البكتيرية في العين (الملتحمة، الاجفان والقرنية)، إذ كانت (٥٩.٠٩%)١٣ من بكتريا*S. aureus* و(٥٥.٥٥%)١٠ من عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من الملتحمة ذات إنتاجية قوية للأغشية الحيوية في حين وجد ان العزلات البكتيرية المعزولة من الاجفان كانت نسبة انتاجها للأغشية الحيوية متوسطة وبلغت (١٨.١٨٪)٤ و(١١.١١%)٢ على التوالي.

أما الاجناس البكتيرية (*P. aeruginosa* و *S. aureus*) المعزولة من اخماج القرنية كانت ذا قابلية قوية على انتاج الأغشية الحيوية و بنسبة (١٦.٦٦%)٣ و(٩.٠٩%)٢ على التوالي ،و يلاحظ من نتيجة الدراسة الحالية زيادة قابلية العزلات البكتيرية على تكوين الأغشية الحيوية في الملتحمة باعتبارها جزء من سطح العين الغني بالمغذيات لذا فهو يدعم مجموعة متنوعة من الكائنات الدقيقة ، إذ تلتصق الاغشية الحيوية بالأسطح التي توفر مصدرا إضافيا للعناصر الغذائية وبالتالي تحافظ على البكتريا في حالة مثالية وتصبح محمية من البلعمة (Murugan *et al.*,٢٠١٠) جاءت نتائج الدراسة الحالية غير متوافقة مع دراسة قام بها(Diriba *et al.*,٢٠٢٠) كانت فيها عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية والزائفة الزنجارية المعزولة من الملتحمة منتجة للأغشية الحيوية بنسبة (٣١%،٤٠%) فقط على التوالي . كما جاءت غير متوافقة مع دراسة أخرى تراوحت إنتاجية الأغشية الحيوية لتلك العزلات المسببة لأخماج القرنية لدى مرتدي العدسات اللاصقة بين ضعيفة الى متوسطة الإنتاجية (El-Ganiny *et al.*,٢٠١٧). يعتقد ان الاختلاف في شدة تكوين الأغشية الحيوية حسب مناطق الإصابة وحسب الأنواع البكتيرية يعود الى الإشارات البيئية التي تعزز من تكوينها وهي المحتوى الغذائي، درجة الحرارة، توفر الاوكسجين، الحديد وغيرها (Behlav and Gilmore,٢٠٠٨).

جدول (٤-١٤) العلاقة بين انتاج الاغشية الحيوية ومواقع الإصابة البكتيرية في العين

انتاج الاغشية الحيوية		موقع الاصابة				Chi squared	P value
		الملتحمة N(%)	الاجفان N(%)	القرنية N(%)	المجموع		
S.aureus	ضعيف	٠	٠	٠	٠	٦.٤٥٣	٠.٠٢٢
	متوسط	٢(%٩.٠٩)	٤ (%١٨.١٨)	٠	٦		
	قوي	١٣ (%٥٩.٠٩)	١(%٤.٥٤)	٢(%٩.٠٩)	١٦		
P.aeruginosa	ضعيف	٠	٠	٠	٠		
	متوسط	١(%٥.٥٥)	٢ (%١١.١١)	٠	٣		
	قوي	١٠ (%٥٥.٥٥)	٢ (%١١.١١)	٣ (%١٦.٦٦)	١٥		

٤-١٣-٢: انتاج ذيفان حال الدم Hemolysin production

بينت نتائج الدراسة الحالية ان عزلات بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* قادرة على انتاج ذيفان حال الدم نوعيا ومعظمها يكون بشكل هالة شفافة حول مستعمرات البكتريا النامية على وسط غراء الدم (تحلل من نوع β- Hemolysin) كما وصفت من قبل (Moraveji *et al.*,٢٠١٤) و بنسبة ١٠٠% لبكتريا *P. aeruginosa* التي تعبر عنه بشكل (Hemolytic phospholipase C) كونه سم خارجي (Sphingomyelinase) الذي يظهر خصوصية قوية للخلايا البطانية مسببا انحلال واضح لخلايا الدم الحمر للإنسان والأغنام بالإضافة الى كونه سام للخلايا العدلة (Neutrophils) والبلاعم (Macrophage) (Vasil *et al.*,٢٠٠٩) جاءت نتائج الدراسة الحالية متقاربة مع ما توصلت إليه دراسة محلية Flayyih *et al.*,٢٠١٣))، والتي لاحظت ان كل عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من خمج

العين منتجة لذيفان حال الدم من نوع بيتا، أيضا كانت كل عزلات بكتريا *S. aureus* منتجة لذيفان حال الدم وبنسبة ١٠٠% على وسط غراء الدم ومن نوع بيتا (Vandenesch et al.,٢٠١٢) أيضا جاءت هذه النتيجة متقاربة مع دراسة كل من (Bertelloni *et al.*,٢٠٢١) و (Moraveii *et al.*,٢٠١٤)التي أعطت فيهما عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية نسبة تحلل عالية وصلت الى ١٠٠% و٩٠% على التوالي.

تتأثر قابلية البكتريا على انتاج ذيفان حال الدم بعوامل عدة أهمها نوع الدم المستخدم فقد لوحظ ان دم الأغنام يعطي مناطق تحلل أوضح وأكبر من دم الإنسان، نظراً لاختلاف التركيبة الدهنية لأغشية خلايا الدم الحمر في الثديات بين الأنواع ،إذ اشارت بعض الدراسات الى ان سبب الاختلاف في تأثر خلايا الدم الحمر تجاه بيتا هيمولايسين يعود الى اختلاف محتويات السفينغوميلين (Sphingomyelin) في خلايا الدم الحمر، اذ تتميز اغشية الخلايا الحمر للأغنام بانخفاض الفوسفاتيديل كولين (Phosphatidyl choline) ومحتويات عالية من السفينغوميلين مقارنة بالأغشية نفسها للأنواع الأخرى لهذا فإن خلايا الدم الحمر للأغنام هي الأكثر تأثراً تجاه فعل الذيفان حال الدم نوع بيتا لما تحويه من نسبة أكبر من السفينغوميلين (Dinges *et al.*,٢٠٠٠: Yamaguchi *et al.*,٢٠٢٣) فضلاً عن مصدر العزلة البكتيرية كما جاء في هذه الدراسة التي أكدت إن العزلة البشرية تنتج ذيفان حال الدم بكمية أكبر مقارنة ببقية العزلات (Milivojevic *et al.*,٢٠١٨) و نوع العزلات البكتيرية وحالة نموها في وسط معين اذ يؤثر نوع الوسط على إنتاجية ذيفان حال الدم كما ان مدة الحضن ، درجة الحرارة وكمية الاوكسجين المتوفرة كل هذه العوامل تلعب دورا مهما في انتاج الذيفان (Ali-vehmas *et al.*,٢٠٠١) كما يعتمد معدل انحلال الدم على تركيز الذيفان ، درجة الحرارة ،درجة الحموضة وتركيز ايونات الكالسيوم وخلايا الدم الحمر، اذ تؤثر تركيز ايونات الكالسيوم على تكوين الأغشية الحيوية والنشاط الانحلالي لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية (Cavelieri *et al.*,١٩٨٤; Lee *et al.*,٢٠١٦).

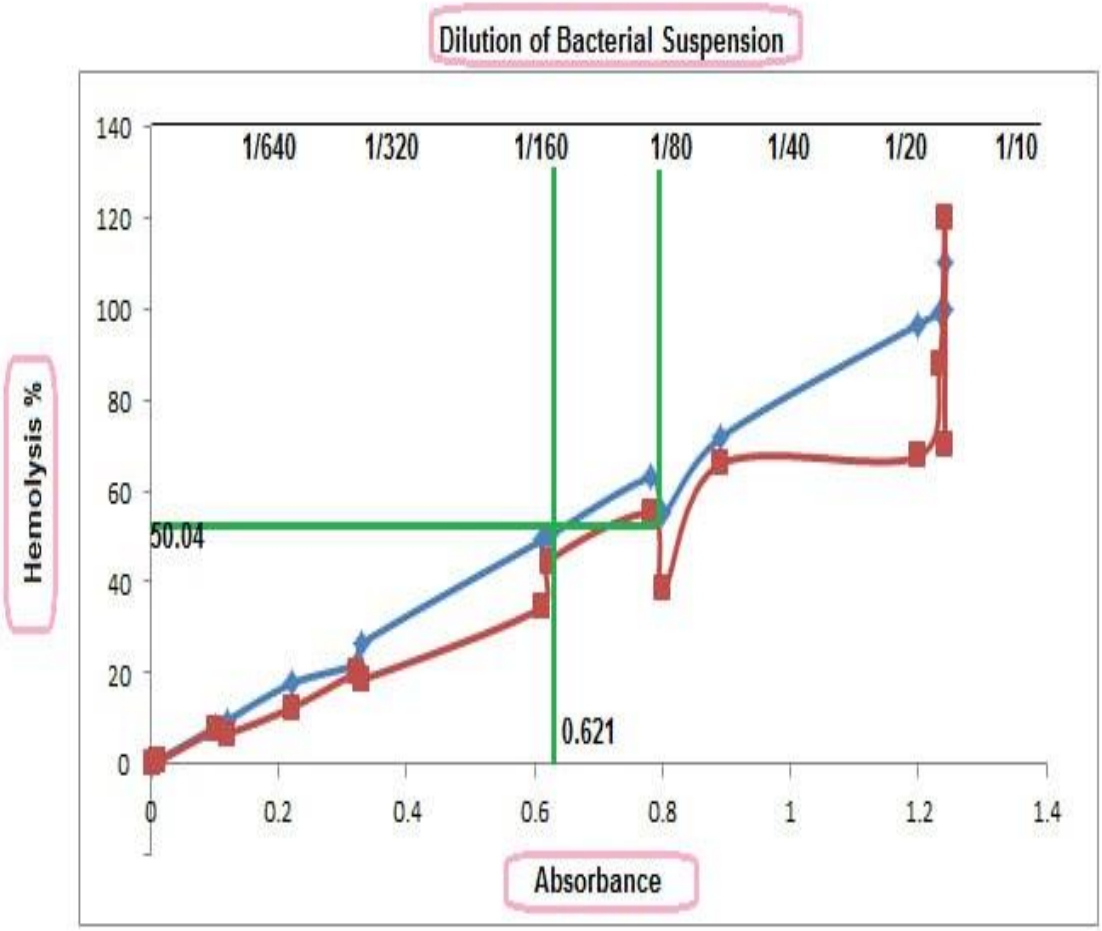
يعد ذيفان حال الدم عوامل الضراوة المهمة في إمراضيه البكتريا ، إذ يحلل خلايا الدم الحمر مما يسبب تحطيم الخلايا أو الانسجة ويسهل من انتشار البكتريا وامتصاص العناصر الغذائية ،اذ يساعد الهيمولايسين في نضح الحديد وبذلك يسمح لها بالتغلب على دفاعات المضيف والتهرب منها (Divyakolu *et al.*,٢٠١٩) وبعد التحري عن انتاج الذيفان نوعياً من خلال ملاحظة منطقة التحلل الواضحة للعزلات البكتيرية تم تقدير كمية الذيفان المنتج كميا ، و تم التقدير بطريقتين تم قياس كمية الذيفان المنتج من قبل عزلات بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa*

عن طريق قياس قطر التحلل المنتج على وسط غراء الدم الحاوي على دم أغنام ، إذ إن قطر التحلل يعكس كمية الذيفان المنتج فكلما زادت كمية الإنتاج زاد قطر التحلل الدموي حول الحفرة التي وضع فيها الراشح البكتيري كما لوحظ ان عزلتي من بكتريا *S. aureus* أظهرت منطقة تحلل واضحة ، إذ أعطت العزلة St٣ أعلى قطر لمنطقة التحلل بلغ٢٨.٣ ملم ثم تلتها العزلة St ١٥ بقطر ٢٣.٤ ملم ثم بقية العزلات . جاءت هذه النتيجة غير متوافقة مع دراسة مصرية حول عزل بكتريا المكورات العنقودية من مصادر سريرية مختلفة كان فيها انتاج انزيم ذيفان حال الدم بيتا بنسبة ٤٨.١% فقط من العزلات (Desouky *et al.*,٢٠١٤)في حين لوحظ أيضا أن اقطار التحلل الدموي لبكتريا *P. aeruginosa* أقل مقارنتا ببكتريا *S. aureus* والبالغة ١٨.٧و ٢٤.٤ للعزلتين P٩ وp٢٤ على التوالي، و جاءت هذه النسبة منسجمة مع دراسة الباحث (Georgescu *et al.*,٢٠١٦) الذي وجد إن نسبة انتاج بيتا الهيمولايسين لبكتريا الزائفة الزنجارية هي الأعلى على وسط غراء الدم للأغنام والبالغة ٩٢,٣% إذ بين إن ذيفان حال الدم يلعب دوراً مهماً في نشر العدوى لأن هذا الانزيم يشكل مسامات أو ثقوب على أغشية الخلايا فيسهل غزو الزائفة الزنجارية الى الخلايا حقيقية النواة مما يحمي البكتريا من آليات دفاع المضيف والعلاج بالمضادات الحيوية (Rodulfo *et al.*,٢٠١٩) كذلك توافقت النتائج الحالية مع دراسة أخرى أجريت في نيجيريا كانت فيها بكتريا المكورات العنقودية الذهبية هي السائدة في انتاج الهيمولايسين مقارنة ببكتريا الزائفة الزنجارية (Tula *et al.*,٢٠٢٣).

وعند قياس كمية الذيفان كمياً عن طريق تحديد فعالية ذيفان حال الدم المنتج من خلال اخذ معكوس أعلى تخفيف يعطي تحللاً كاملاً، فقد تم تحديد درجة التحلل الدموي عن طريق قياس امتصاص الهيموغلوبين المنطلق في الراشح على طول موجي ٥٤٣ نانوميتر (Costabile,٢٠١٠)، وأظهرت نتائج الدراسة الحالية إن الفعالية التحللية لأنزيم حال الدم في الراشح للعزلات St ٣ و St١٥بلغت ١٦٠ و٨٠ وحدة تحلل/ مل على التوالي والتي تمثل مقلوب أعلى تخفيف أعطى تحلل واضح لخلايا الدم الحمر مقارنةً ببقية العزلات كما موضح بالشكل (٤-٧).

وانسجمت نتيجة الدراسة الحالية للفعالية التحللية للهيمولايسين لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية من الدراسة التي قام بها (Elhakim *et al.*,٢٠٢١) الذي حدد إن أعلى تخفيف اعطى النشاط الانحلالي لخلايا الدم كان ١:٤٠ علما إن الوسط المحدد كيميائيا (Chemical defined medium) وسطاً أمثل لإنتاج الذيفان بوصفه يعمل على زيادة انتاج الذيفان لاحتوائه على كل

المعادن الضرورية لتعزيز النمو البكتيري، وبالتالي زيادة قدرتها على انتاج الذيفان الذي يرفع نسبة التحلل (Devaux *et al.*,٢٠١٨).



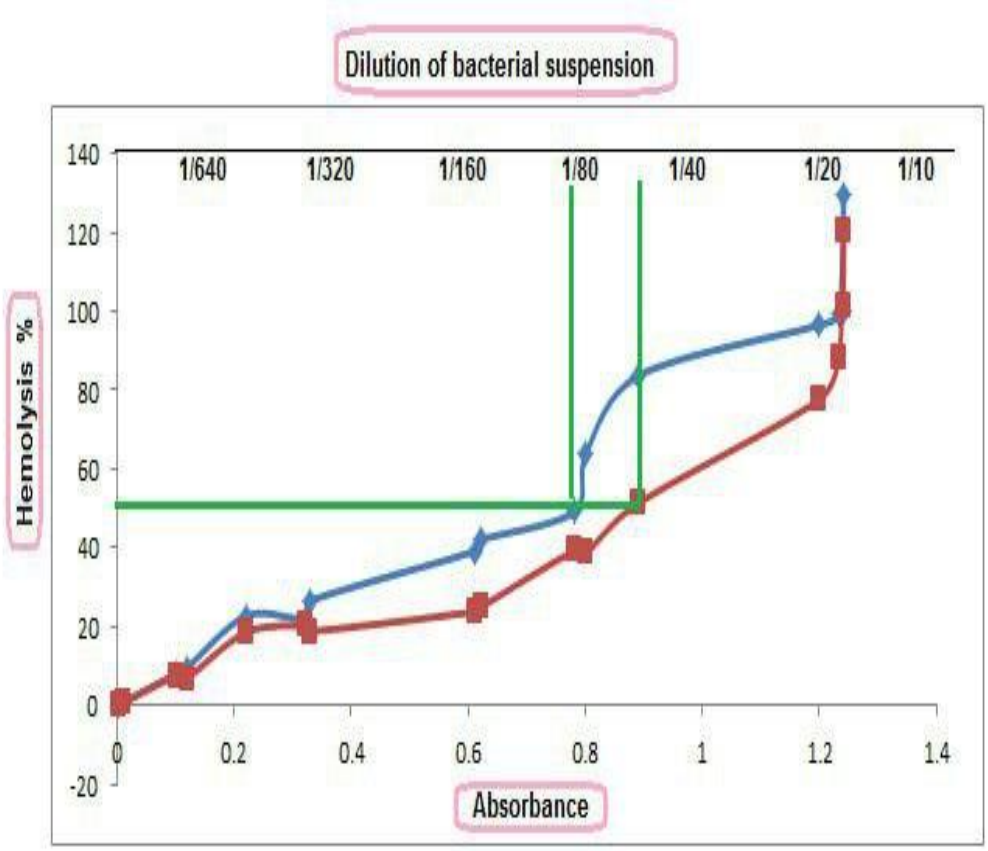
شكل (٤-٧) الفعالية التحللية لذيفان حال الدم عند ٥٠% لبكتريا *S. aureus*

بينما كانت الفعالية التحللية لعزلتين من بكتريا *P. aeruginosa* هما Pa١ وPa٩ ٨٠و٦٠ وحدة تحلليه/ مل على التوالي وهي الأعلى مقارنة ببقية العزلات وكما موضح بالشكل (٤-٨).

وأكدت هذه النتائج القابلية العالية للعزلات البكتيرية على إفراز ذيفان حال الدم بيتا إلى الوسط الذي تعيش فيه بوصفه يمثل أهم عوامل الضراوة التي تفرزها البكتريا إلى البيئة الخارجية التي تحيط بالبكتريا لأنه يعمل على السفينغوميلين فإن هذا الذيفان يزعزع استقرار الطبقة ثنائية الدهون في الغشاء البلازمي للخلايا مما يسبب عدم انتظام ميوعة الغشاء البلازمي (Kong *et al.*,٢٠١٦)، وعند مقارنة الفعالية التحليلية بين

العزلات المدروسة لوحظ إن الفعالية التحليلية لذيفان حال الدم بيتا المفرز من عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية أعلى من الفعالية التحليلية لعزلات بكتريا الزائفة الزنجارية هذا يؤكد ما توصل اليه بعض الباحثون الذين أكدوا إن أعلى نسبة لعزلات بكتريا الزوائف الزنجارية المنتجة لذيفان حال الدم هي تلك المعزولة من خمج المسالك البولية مقارنةً بتلك المعزولة من مصادر سريرية أخرى كأخماج العيون (Mittal *et al.*,٢٠٠٩: Morin *et al.*,٢٠٢١).

جاءت نتيجة الاختبار الكمي ذيفان حال الدم متوافقة مع نتائج الاختبار شبه الكمي، وهذا ما اكدته معظم الدراسات التي بينت دور ذيفان حال الدم وفعاليته على خلايا الدم الحمر لوصفها تمثل الخلايا الأكثر ملائمة لمعايرة السموم الحالة للخلايا لكونها متوفرة بسهولة فضلاً عن إنها الهدف الأساس للبكتريا الممرضة التي تفرز الذيفان وتسبب بذلك اضرار بالغة (Bernheimer,١٩٨٨)،و نتائج دراستنا الحالية تشير إلى إن ذيفان حال الدم بيتا هو السائد في هذه الدراسة كون اغلب الإصابات البكتيرية كانت في ملتحمة العين وهذا ما أكده الباحث (Ocallaghan *et al.*,١٩٩٧) بينما السم حال الدم الفا المفرز من قبل بكتريا المكورات العنقودية الذهبية يرتبط بشدة مع إصابات القرنية في حين السم حال الدم بيتا يرتبط مع إصابات الصلبة.



شكل (٤-٨): الفعالية التحللية لذيفان حال الدم عند٥٠% لبكتريا *P. aeruginosa*

٤-١٣-٢-١: العلاقة بين مواقع الإصابة البكتيرية في العين وقابلية العزلات البكتيرية على انتاج ذيفان حال الدم The relationship between sites of bacterial infection in the eye and the ability of bacterial isolates to produce hemolysin

يتضح من نتائج الدراسة الحالية عدم وجود ارتباط معنوي عند مستوى احتمالية (p=٠.٧٣٦ و p=٠.٨٣٦) على التوالي بين قابلية البكتيريا على انتاج ذيفان حال الدم من قبل عزلات بكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* و مواقع الإصابة البكتيرية في العين المدروسة في هذه الدراسة والموضحة بالجدول (٤-١٥)على الرغم من إن أعلى فعالية تحليله للهيمولايسين من قبل بكتريا *S. aureus* كانت في الملتحمة وبلغت ١٦٠ وحدة تحلل / مل إذ يعتقد إن غنى طبقة الملتحمة بالأوعية الدموية (Chen and Hong,٢٠١٦) يزيد من ضراوة العزلات البكتيرية في هذه المنطقة ،ويزيد من إمراضيتها ،وجاءت هذه النتيجة متوافقة مع دراسة

محلية سابقة في بابل كانت فيها عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية منتجة للهيمولايسين بنسبة ٦٨.٤% في الملتحمة (Al-Rubaey *et al.*,٢٠٠٧). فيما كانت اعلى فعالية تحليله للهيمولايسين من قبل بكتريا الزوائف الزنجارية كانت أيضا في الملتحمة وبواقع ٨٠ وحدة تحلل/مل.

جدول (٤-١٥): علاقة مواقع الإصابة البكتيرية في العين مع كمية ذيفان حال الدم المنتج من قبل العزلات الجرثومية المدروسة.

	انتاج الهيمولايسين	الملتحمة (N)	الاجفان (N)	القرنية (N)	Chi squared	P value
S .aureus	١\١٠	١٤	٥	١	١.٢٨٤	٠.٧٣٦
	١\٢٠	٠	٠	٠		
	١\٤٠	٠	٠	٠		
	١\٨٠	٠	٠	١		
	١\١٦٠	١	٠	٠		
P .aeruginosa	١\١٠	٩	٤	٣	١.٨٣١	٠.٨٣٦
	١\٢٠	٠	٠	٠		
	١\٤٠	١	٠	٠		
	١\٨٠	١	٠	٠		
	١\١٦٠	٠	٠	٠		

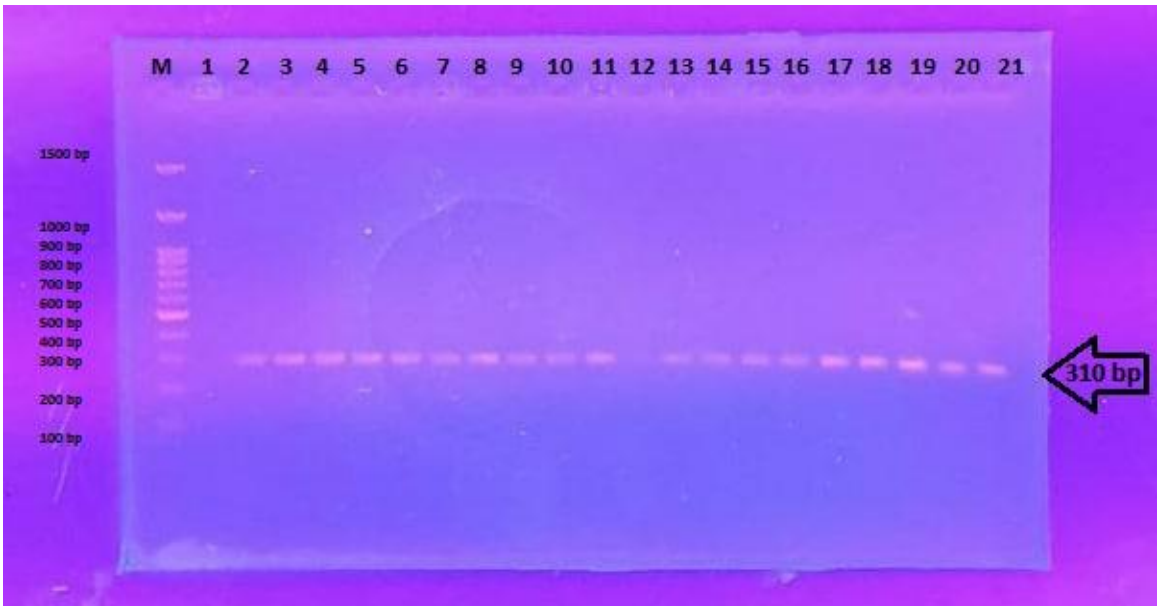
٤-١٤: الكشف الجزيئي عن مقاومة المضادات الحيوية لعزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية قيد الدراسة Molecular detection of antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates under study.

أوضحت النتائج الحالية إمكانية استخلاص DNA من هذه العزلات البكتيرية بنجاح باستخدام Genomic DNA extraction kit من خلال تقنية PCR التي تتميز بوصفها تقنية بسيطة وسريعة (Kashir and Yaqinuddin,٢٠٢٠).

واستعملت تقنية PCR في هذه الدراسة للكشف عن وجود مورثة *mec A* في بكتريا *S. aureus* يوضح الشكل (٤-٩) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR ،والتي يتبين من خلالها إن البوادئ (Primer) الخاص بالمورث *mec A* كان ناجحاً في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج ذو حجم ٣١٠bp ،وعند ملاحظة ناتج الترحيل يتبين إن ٢١ عزلة بكتيرية من بكتريا

المكورات العنقودية قيد الدراسة تحوي جين *mecA* أي بنسبة ٩٥.٤% ،وهذه الطريقة تعد مثالية لتحديد مقاومة المثيسيلين في عزلات بكتريا *S. aureus* وتحديد السلالات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (MRSA) من خلال التشفير الى بروتين PBP-٢a ،وهو بروتين مرتبط بالبنسلين أو لأنزيم أساسي لجدار الخلية البكتيرية يحفز إنتاج الببتيدوكلايكان في جدار الخلية البكتيرية. لذلك يستمر PBP-٢A في تحفيز تخليق جدار الخلية البكتيرية حتى في وجود العديد من المضادات الحيوية. نتيجة لذلك، يمكن أن تنمو سلالات المكورات العنقودية الذهبية التي تصنع PBP-٢A في وجود العديد من المضادات الحيوية، تميل سلالات MRSA إلى أن تكون مقاومة للمثيسيلين، الأوكساسيلين والسيفالوسبورينات.

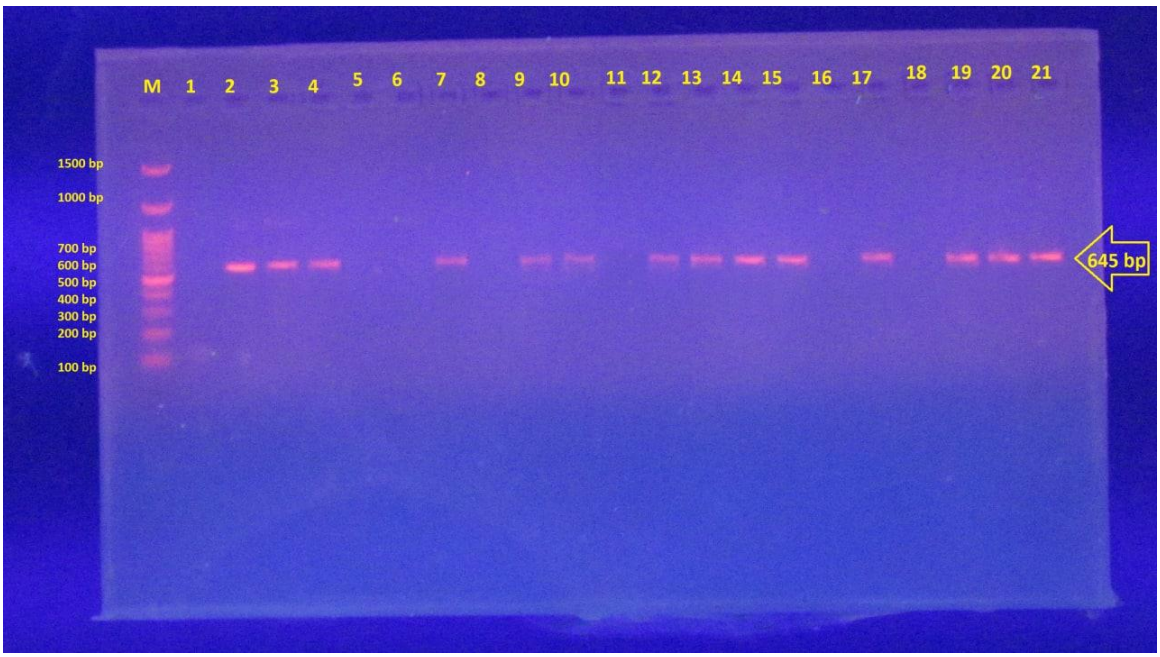
جاءت هذه النسبة المرتفعة مقاربة للعديد من الدراسات التي اكدت زيادة انتشار سلالات MRSAالتي تعد المسبب الرئيس لأخماج العيون من ٣٤% الى ٥٣% في دول مختلفة من العالم منها إيران، والولايات المتحدة، والهند وتايوان مما تسبب في زيادة معدلات مقاومة المضادات الحيوية شائعة الاستعمال (Vola *et al.*,٢٠١٣: Hsiao *et al.*,٢٠١٥: Faridi *et al.*,٢٠١٨). بينما لا تتوافق مع دراسة محلية في النجف التي كان وجود جين *mecA* فيها بنسبة ٤٥.٤٥% فقط في العزلات البكتيرية المسببة لإصابة العيون Almakhzoomy *et al.*,٢٠١٨).



الشكل (٤-٩): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *S. aureus* باستعمال البوادئ النوعية لجين *mecA* (٣١٠bp)، بتركيز هلام (١.٥%)، وفولتية (٧٠) فولت لمدة (٥٠) دقيقة.

كما تم استعمال تقنية PCR في هذه الدراسة للكشف عن وجود جين *ermA* الخاص ببكتريا *S. aureus* ويوضح الشكل (٤-١٠) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي تبين من خلالها ان البادئ (Primer) الخاص بالجين *ermA* كان ناجحاً في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه٦٤٥bp.وعند ملاحظة الشكل ذاته يتضح أن جين *ermA* يوجد في ١٦ عزلة بكتيرية بنسبة ٧٢.٧% ويقوم بالتشفير إلى مثيلة الحامض النووي الرايبوسومي (٢٣s rRNA -methylation) التي تمنع من ارتباط المضاد الحيوي بالهدف الرايبوسومي، وبذلك ينتج تعديل في موقع الهدف (Mamman *et al.*,٢٠٢٢).

وقد أكدت العديد من الدراسات وجود جين *ermA* في العزلات البكتيرية المعزولة من اخماج العيون، ولكن بنسب مختلفة من دولة الى أخرى فقد بلغت نسبته ٦٧.٩%في مصر(Assefa,٢٠٢٢) وبنسبة ٥٧.١% في دراسة سابقة في إيران (Khashei *et al.*,٢٠١٨)، وإن نتيجة دراستنا الحالية جاءت غير متوافقة مع دراسة بولندية كان فيها جين *ermA* موجود بنسبة ١٥.٦% فقط من عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من المرضى المصابين باخماج العيون من المقيمين وغير المقيمين في المستشفيات (Klos *et al.*,٢٠١٩).



الشكل (٤-١٠): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *S. aureus* باستعمال البوادئ النوعية لجين *ermA* (٦٤٥ bp)، بتركيز هلام (١.٥%)، وفولتية (٧٠) فولت لمدة (٥٠) دقيقة

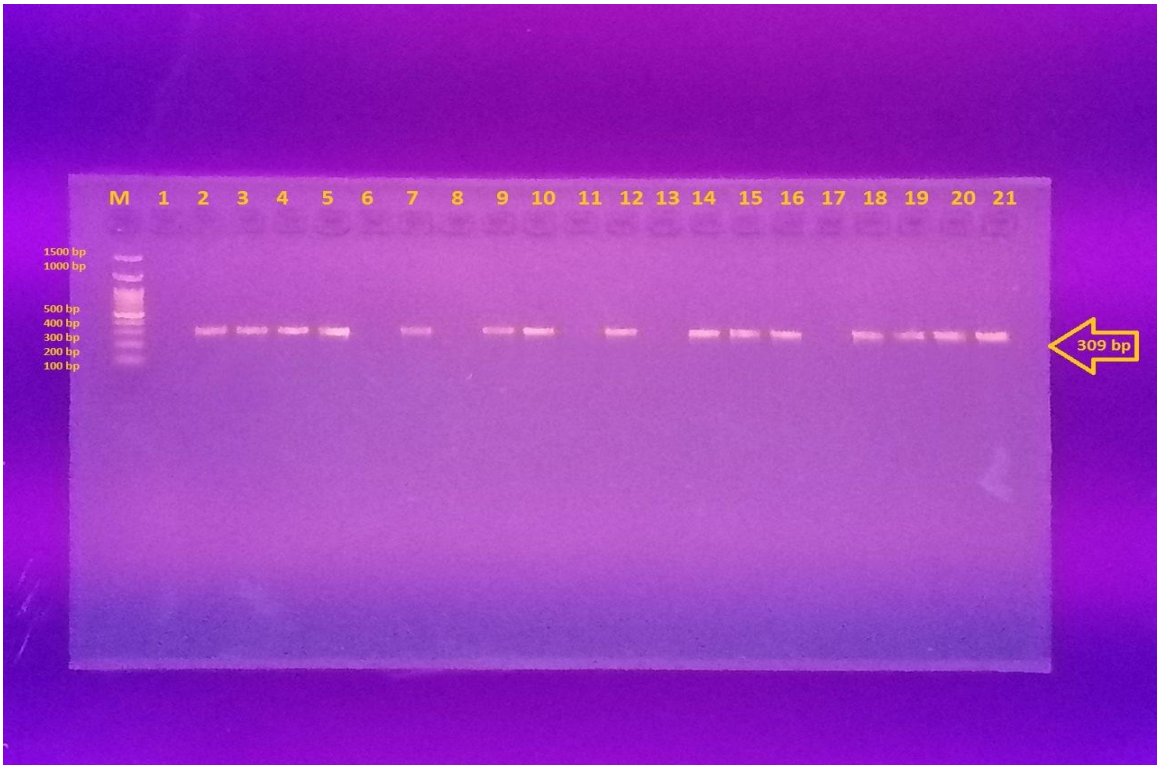
٤-١٥: الكشف الجزيئي عن بعض مورثات الضراوة في العزلات البكتيرية Molecular detection of some virulence genes in the bacterial isolates

اما فيما يخص مورثات الضراوة في ٢٢عزلة بكتيرية من بكتريا *S. aureus* و١٨عزلة بكتيرية تعود لبكتريا *P. aeruginosa* وبعد استخلاص DNA من العزلات البكتيرية قيد الدراسة باستعمال العدة (Kit) واجراء الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز تم ملاحظة الاوزان الجزيئية للحزم الناتجة وقورنت مع الدليل الحجمي.

ايضاً في هذه الدراسة تم الكشف عن وجود مورث الضراوة *hl b* الخاص ببكتريا *S. aureus* يوضح الشكل (٤-١١) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي تبين من خلالها ان البادئ (Primer) الخاص بالجين *hlb* كان ناجحاً في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه bp ٣٠٩.

كما يتبين أن ١٧ عزلة بكتريه فقط تحوي جين *hlb* بنسبة ٧٧.٢% الذي يشفر إلى انتاج الذيفان الخارجي الهيمولايسين من نوع بيتا القادر على تحليل الغشاء البلازمي الدهني السفينغوميلين (Sphingomyelin) لخلية المضيف مما يزيد من ضراوة البكتيريا ويدمر خلايا الدم الحمر مطلقا بذلك الهيموغلوبين الحر، لهذا يعد هذا السم من اهم عوامل الضراوة ذات العلاقة بالتهابات الجهاز التنفسي (خمج الرئة) وعدوى العين (Motamedi *et al.*,٢٠١٨: Astley *et al.*,٢٠١٩).

جاءت نتيجة الدراسة الحالية متقاربة مع نتائج عدد من الدراسات العالمية كتلك التي أجريت في مدينة شنغهاي الصينية، اذ بلغ فيها وجود جين *hlb* ٧٥% في بكتريا *S. aureus* المعزولة من الانسجة الرخوة (Liu *et al.*,٢٠١٢) بينما في دراسة برازيلية وجدت أن جين *hlb* هو الأكثر انتشاراً نسبة ٨٣% من بين جينات الضراوة التي تمت دراستها لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية(Monterio *et al.*,٢٠١٩) ، كما وجد في دراسة محلية في محافظة دهوك ان جين *hlb* موجود بنسبة ٩٦.١% في عزلات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من إصابات العين للمرضى العراقيين بينما لا تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع دراسة في ايران كانت نسبة وجود جين *hlb* فقط ٧.٩٧% في عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة (Motamedi *et al.*,٢٠١٨) .



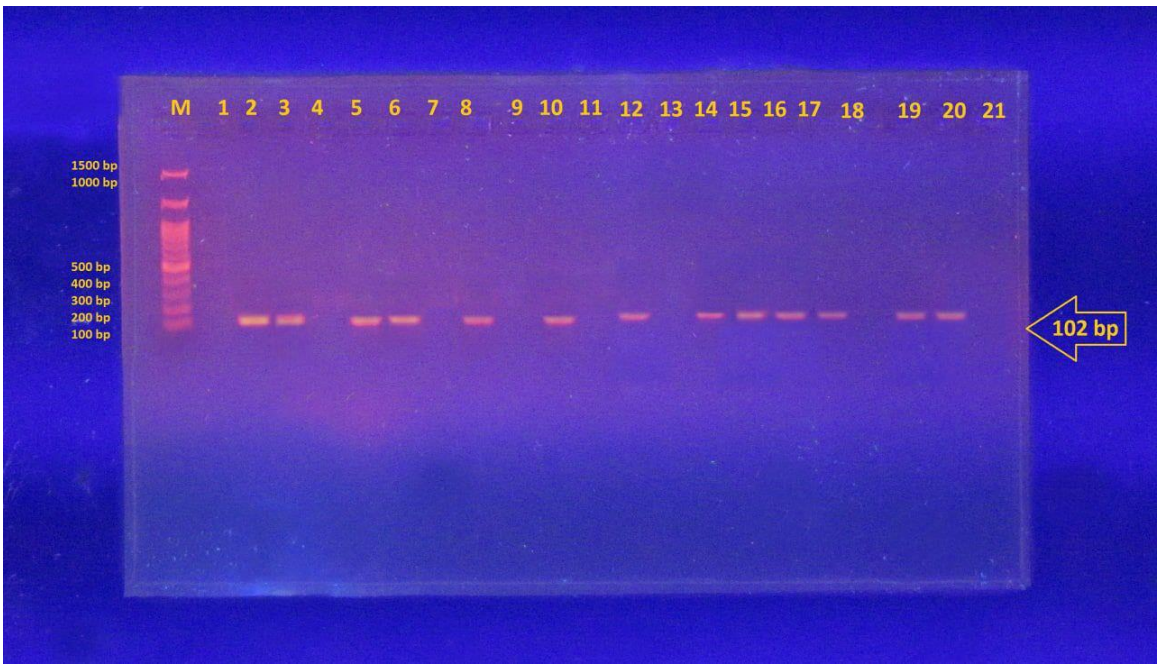
الشكل (٤-١١): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *S. aureus* باستعمال البوادئ النوعية لجين *hlb*(٣٠٩bp)، بتركيز هلام (١.٥%)، وفولتية (٧٠) فولت لمدة (٥٠) دقيقة.

وعند ملاحظة الشكل (٤-١٢) يتبين ان ١٥ عزلة من أصل ٢٢ عزلة امتلكت جين *Sea* بنسبة ٦٨.١% الذي يمثل مورث ضراوة خاص ببكتريا *S. aureus* والذي تم الكشف عنه باستعمال البادئ (Primer) الخاص بالجين*Sea* ، وكان ناجحا في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه ١٠٢ bp.

وتميز هذا الجين بالتشفير إلى السموم المعوية (Enterotoxin A) التي تفرزها بكتريا *S. aureus*، فقد أظهرت بعض الدراسات إن السموم المشفرة عن طريق جين *Sea* تولد استجابة مناعية أعلى، الشيء الذي يؤدي الى تلف انسجة المضيف مقارنة بالسموم المعوية الأخرى (Ferry *et al.*,٢٠٠٥)

كما أظهرت دراسة أخرى عزل هذا الجين من إصابات العيون، إذ تم عزله بنسبة ٥٣% من إصابات العيون في ايران(٢٠٢٢ ,Afzal *et al*، كما تم عزله بنسبة عالية أيضا بلغت ٨٧.٥% بدراسة محلية من اخماج العين (Ewadh *et al.*,٢٠١٤)، بينما لا تتوافق النتائج

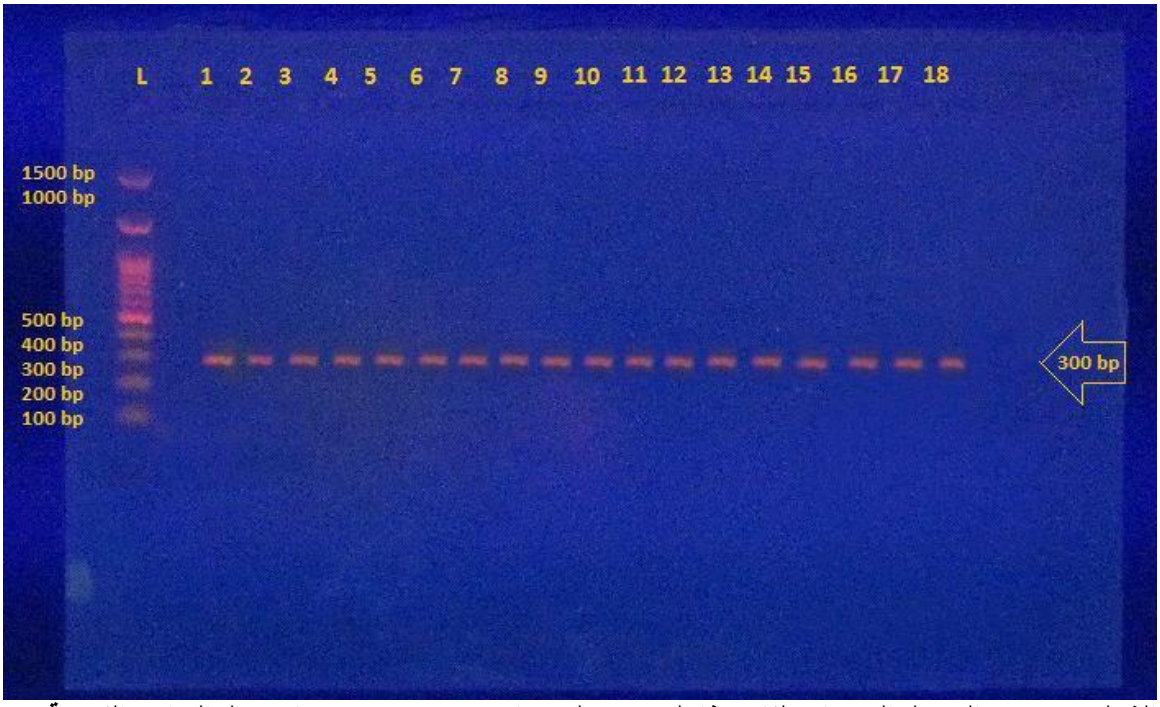
الحالية مع دراسة سابقة كانت فيها نسبة وجود جين *Sea* ٣٧.٥% فقط في بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من إصابات تجرثم الدم والانسجة الرخوة (Ferry *et al.*,٢٠٠٥).



الشكل (٤-١٢): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *S. aureus* باستعمال البوادئ النوعية لجين *Sea*(١٠٢bp)، بتركيز هلام (١.٥%)، وفولتية (٧٠) فولت لمدة (٥٠) دقيقة.

ايضاً تم الكشف عن وجود جين *LasB* الخاص ببكتريا *P. aeruginosa* ويوضح الشكل (٤-١٣) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي تبين من خلالها ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه ٣٠٠bp.

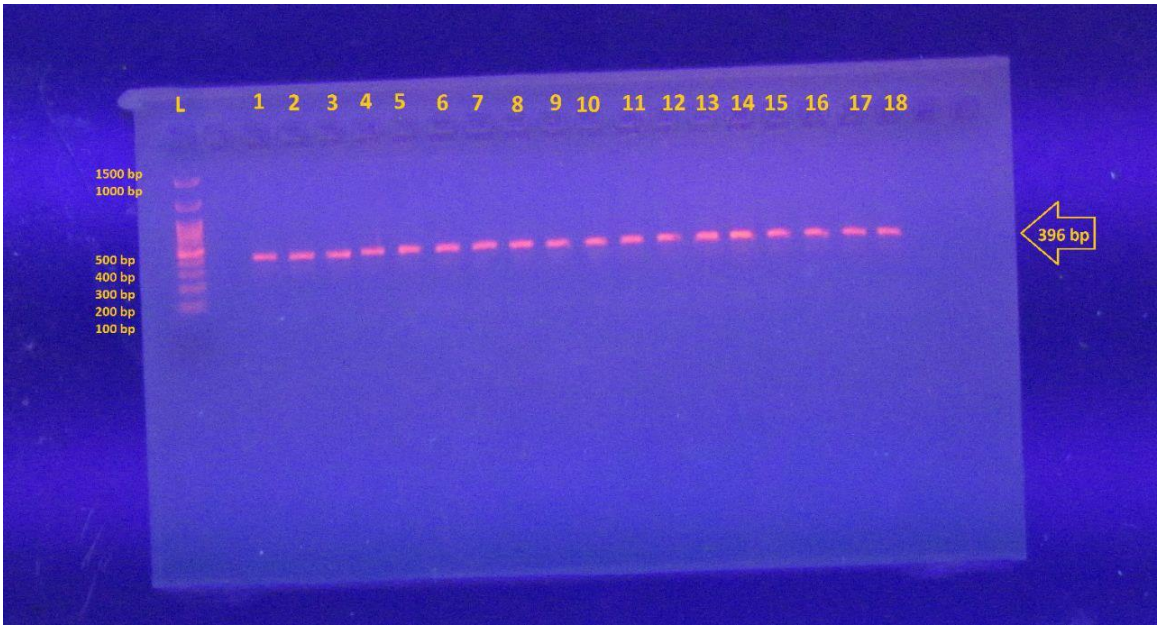
فقد ظهران كل عزلات بكتريا *P. aeruginosa* تملك الجين *LasB* بنسبة ١٠٠% والذي يشفر لإنتاج انزيم Elastase الذي يحطم بروتين Elastin ويدمر أنسجة العين ونخرها بصورة سريعة معززاً بذلك تحرير العناصر الغذائية لنمو البكتيريا فضلاً عن تأثيره بالاستجابة المناعية الطبيعية للمضيف (Cathcart *et al.*,٢٠١١)مما يزيد من ضراوة وإمراضيه بكتريا *P. aeruginosa* ،واحداث ضرر في أنسجة العين خلال مرحلة الإصابة بها(Das *et al.*,٢٠٢٢) ،جاءت نتيجة دراستنا متوافقة مع دراسة عالمية أجريت في الهند كانت فيها كل عزلات بكتيريا *P. aeruginosa*المعزولة من إصابات العين تملك جين *LasB* (Dave *et al.*,٢٠٢٠) بينما لا تتفق مع دراسة محلية كانت فيها نسبة جين *LasB* في عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من خمج العين ١١.٥%فقط (Alsaaedi *et al.*,٢٠١٥).



الشكل (٤-١٣): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *P. aeruginosa* باستعمال البوادئ النوعية لجين *LasB* (٣٠٠bp). بتركيز هلام (١.٥%)،وفولتية (٧٠) فولت لمدة (٥٠) دقيقة.

اما الشكل (٤-١٤) فيشير الى نجاح البادئ الخاص بالجين *exoA* في تضخيم هذا الجين من خلال ظهور ناتج PCR بحجم ٣٩٦bp ،فقد تبين ان كل عزلات بكتريا *P. aeruginosa* قيد الدراسة تحوي جين*exoA* بنسبة ١٠٠% كما إن وجود هذا الجين يعني ان البكتريا لها القابلية على تشفير انتاج ذيفان خارجي نشط يعرف (ADP-ribosylation)مسؤول عن السمية التي تولدها بكتريا *P. aeruginosa* عند اصابتها لأنسجة العين من خلال منع خلية المضيف من تخليق البروتين الضروري لتكوينها وبذلك التحفيز على موت خلية المضيف وزيادة الامراضية للعين (Hilliam *et al.*,٢٠٢٠)، وبما أن هذا الجين يحمل على بلازميدات فإن وجوده بهذه النسبة العالية قد يعود إلى آليات التبادل الوراثي من عملية تحول أو اقتران التي تزيد من توفر الجين في البكتريا (Matar *et al.*,٢٠٠٢).

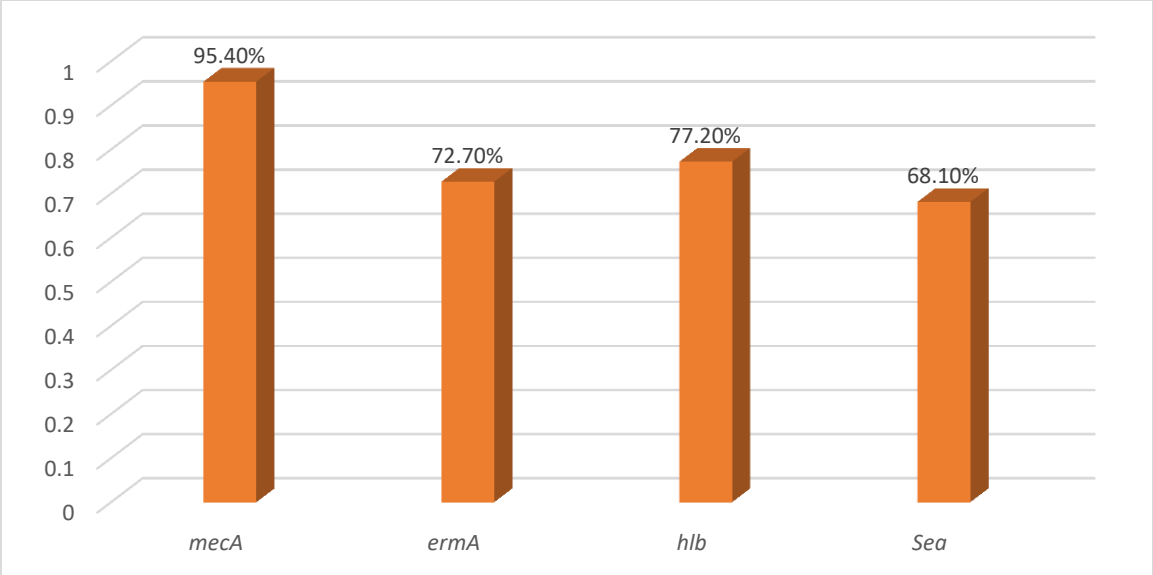
وقد جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع دراسة أجريت في إيران كانت فيها كل عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من خمج العين تمتلك جين *exoA* بنسبة ١٠٠ %(Heidari *et al.*,٢٠١٨)، في حين كانت نسبة جين *exoA* ٣٠.٤% في عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من اخماج العيون في دراسة هندية (Naik *et al.*,٢٠٢١).



الشكل (٤-١٤): الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR لبكتريا *P. aeruginosa* باستعمال البوادئ النوعية لجين *exoA*(٣٩٦bp)، بتركيز هلام (١.٥%)، وفولتية (٧٠) فولت لمدة (٥٠) دقيقة.

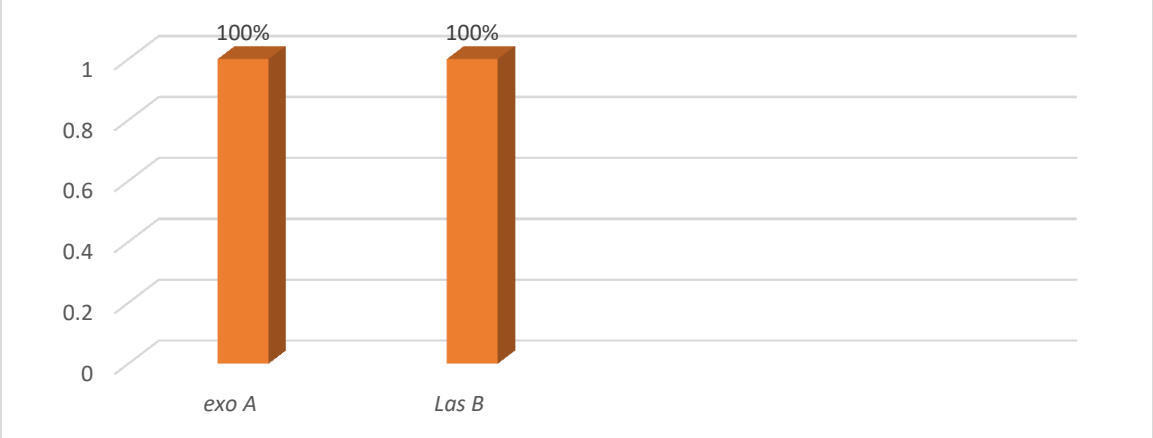
من خلال النتائج التي توصلنا إليها عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في الدراسة الحالية فإن الجينات المتنوعة المدروسة لعزلات بكتريا *S. aureus* المعزولة من مناطق مختلفة لإصابات العين البكتيرية والموضحة بالشكل (٤-١٥) كان فيها *mecA* أعلى نسبة (٩٥.٤%) وهذا ما أكدّه (Faridi *et al.*,٢٠١٨) بان عزلات MRSA هي التهديد الرئيس في التهابات العيون من خلال مقاومتها للمضادات الحيوية من مجموعة البيتا لاكتام ، تلاه جين *hlb* بنسبة (٧٧.٢%) الذي يعد أهم عامل ضراوة يحفز من إقامة العدوى لدى البشر والحفاظ عليها مما يجعلها مقاومة للمضادات الحيوية وهذا ما أكده (Motamedi *et al.*,٢٠١٨) على أن وجود جينات الضراوة المشفرة لذيفان حال الدم يرتبط بشكل كبير بمقاومة المضادات الحيوية مما يجعل *mecA* و*hlb* عاملان مهمان في احداث الإصابة لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية ،ويزيد من إمراضيتها. وقد توافقت هذه النتيجة أيضا مع دراسة قام بها الباحث (Monteiro *et al.*,٢٠١٩) الذي أكد من خلالها ان *mecA* أهم جين مقاومة للمضادات الحيوية وأكثرها انتشاراً في كل انحاء العالم بينما كان جين *hlb* هو الجين الرئيس من بين جينات الضراوة بنسبة ٨٣%، ثم جاء بعدهما جين *ermA* (٧٢.٧%) واقل جين تواجدا كان *Sea* بنسبة (٦٨.١%) ،وهذه النتيجة جاءت متوافقة مع دراسات عدة والتي اكدت على ضراوة بكتريا المكورات العنقودية الذهبية من خلال امتلاكها مقاومة الارثرومايسين وانتاجها للسموم القوية

كالسم المعوي مما سبب في زيادة ضراوة البكتريا وحدوث إصابات شديدة في العين وصعوبة علاجها (Aggarwal *et al.*,٢٠١٩: Peterson *et al.*,٢٠١٩)، كما قد يكون وجود جين *Sea* بنسبة أقل من الجينات المدروسة الاخرى لارتباطه بصورة مباشرة مع حالات التسمم الغذائي (Srimongkol *et al.*,٢٠٢٠).



الشكل(٤-١٥): توزيع الجينات المتنوعة لبكتريا *S. aureus* المعزولة من اخماج العيون.

أما بالنسبة الى مورثات الضراوة لبكتريا *P. aeruginosa* فقد جاءت النتيجة متماثلة بنسبة ١٠٠% لجين *exoA* و*Las B* حسب ما موضح بالشكل(٤-١٦) وهذه النتيجة جاءت متوافقة مع دراسات سابقة عدة كانت فيها جينات الضراوة الأكثر شيوعاً بين سلالات بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من خمج القرنية وأخماج أخرى هي *exoA* و*Las B* التي تلعب دوراً مهماً في الامراضية بوصف ان *Las B* هو البروتياز الذي له دور مهم في تلف القرنية فضلاً عن الذيفان الخارجي *exoA*الذي يتم إفرازه بواسطة نظام الافراز من النوع الثالث (TTSS) المنتجة من قبل بكتريا الزائفة الزنجارية في عدوى العين وخاصة خمج القرنية (Khosravi : *et al.*,٢٠١٦; Badamchi *et al.*,٢٠١٧; Heidari *et al.*,٢٠١٨).



شكل(٤-١٦): توزيع الجينات المتنوعة لبكتريا*P. aeruginosa* المعزولة من اخماج العيون.

٤-١٦: العلاقة بين قابلية العزلات البكتيرية المدروسة على انتاج الأغشية الحيوية ووجود جينات الضراوة والمقاومة

The relationship between the ability of the studied bacterial isolates to produce biofilms and the presence of virulence and resistance genes.

يتضح من الجدول (٤-١٦) إن عزلات بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية التي لها القدرة على تكوين الاغشية الحيوية المتوسطة والقوية ترتبط بشكل رئيس مع زيادة المقاومة تجاه المضادات الحيوية ،اذ بلغت نسبة وجود جينات المقاومة*mecA* و*erm A* الى (١٠٠%) في العزلات البكتيرية المنتجة للأغشية الحيوية ،وإن وجود الجينات المقاومة للمضادات الحيوية بنسبة مرتفعة مع قابلية العزلات البكتيرية على انتاج الأغشية الحيوية يزيد من ضراوة العزلات البكتيرية وصعوبة علاجها ،وهذا ما أكدته العديد من الدراسات كانت فيها عزلات بكتريا المكورات العنقودية المقاومة للمثيسيلين والحاوية جين *mec A* جميعها منتجة للأغشية الحيوية (Gaire *et al.*,٢٠٢١ :Azmi *et al.*,٢٠١٩)،كما إن وجود جينات مقاومة الارثرومايسين وخاصة *erm A* يسهل تكوين الأغشية الحيوية في عزلات MRSA المقاومة للاريثروميسين الذي أكدته دراسة سابقة قام بها (Sun *et al.*,٢٠١٨) ، إذ إن العزلات المنتجة للأغشية الحيوية تكون أكثر تحمل للمضادات الميكروبية (١٠٠-١٠٠٠) مرة مما يسبب في صعوبة اختراق المضاد الحيوي وبالتالي قتلها (Anderl *et al.*,٢٠٠٠).

وأظهرت النتائج أيضا إن مورثات الضراوة موجودة بنسب مرتفعة في عزلات المكورات العنقودية الذهبية ، إذ شكل جين *hlb* نسبة (٧٥%) في العزلات شديدة التكوين للغشاء الحيوي أعلى من نسبة وجود جين *Sea* الذي كانت نسبته (٦٢.٥%)، بينما جاءت النسبة

متساوية فقد بلغت (٨٣.٣%) في العزلات متوسطة الإنتاج للغشاء الحيوي ،وجاءت هذه النتيجة متوافقة مع دراسة من قبل (Ando *et al.*,٢٠٠٤) كانت فيها الأغشية الحيوية أعلى في العزلات البكتيرية التي تملك جين *hlb* كونها منتجة للذيفان من نوع بيتا الذي يحفز بقوة تكون الأغشية الحيوية في الجسم الحي كون بيتا هيمولايسين يملك آليتان للعمل الأولى ذات النشاط (Sphingomyelinase) والثانية ذات نشاط (DNA biofilm ligase) الرابط في الأغشية الحيوية (Herrera *et al.*,٢٠١٦) ، إذ يشكل السم روابط تساهمية متقاطعة مع نفسه في وجود الحامض النووي المتمثل بنشاط (DNA biofilm ligase) بغض النظر عن نشاط (Sphingomyelinase) مما ينتج عنه مصفوفة البروتين النووي (Nucleoprotein matrix) حسب ما جاء في هذه الدراسة (Huseby *et al.*,٢٠١٠) إن عوامل الضراوة لا تعمل بشكل مستقل وإنما تقع تحت سيطرة نظام الإشارات البكتيرية (Quorum sensing) الذي يقوم بتنظيم عوامل الضراوة مع انتاج الأغشية الحيوية مما يزيد من ضراوة العزلات البكتيرية التي تصيب العين (Chadha *et al.*,٢٠٢٢).

جدول (٤-١٦): العلاقة بين انتاج الاغشية الحيوية وجينات المقاومة والضراوة لبكتريا *S. aureus*.

جينات الضراوة		جينات مقاومة المضادات الحيوية		انتاج الاغشية الحيوية
Sea	*hlb*	*ermA*	*mecA*	
٠	٠	٠	٠	Weak(n=٠,٠.٠)
٥(٨٣.٣٪)	٥(٨٣.٣٪)	٦(١٠٠٪)	٥(٨٣.٣٪)	Moderate(n.=٦,٢٧.٢٪)
١٠(٦٢.٥٪)	١٢(٧٥٪)	١٠(٦٢.٥٪)	١٦(١٠٠٪)	Strong(n.=١٦,٧٢.٧٪)

أما بالنسبة لعزلات بكتريا *P. aeruginosa* فقد بينت نتائج الدراسة الحالية الموضحة في الجدول(٤-١٧) إن مورثات الضراوة *exoA* و*Las B* يوجدان بنسبة (١٠٠%) في العزلات البكتيرية قوية الإنتاج للأغشية الحيوية والمتوسطة الإنتاج للأغشية الحيوية مما يفسر زيادة ضراوتها وقابليتها العالية لإنتاج الاغشية الحيوية ، إذ يعمل *Las B* على تنشيط النيوكليوسيدة ثنائية الفوسفات الجانبي (Nucleoside diphosphate kinase) الذي يولد الطاقة الازمة بشكل (GTP) لإنتاج الالجينات (Alginate) التي تعد من أهم مكونات مصفوفة عديد السكاريد الخارجي (Exopolysaccharides) المطلوب لتكوين الأغشية الحيوية وبذلك يعزز من تكوين الأغشية الحيوية جزئيا من خلال تنظيم (Rhamnolipid)(Yu *et al.*,٢٠١٤)

وهذه النتيجة تتوافق مع دراسة مصرية كانت فيها نسبة تواجد المورثان *exoA* و*Las B* هما الأعلى في العزلات البكتيرية المنتجة للأغشية الحيوية والمعزولة من إصابات مختلفة منها إصابات العين (Abd El-Aziz *et al.*,٢٠٢٣)، بينما جاءت النتيجة غير متوافقة مع النتيجة التي توصل اليها(Nasir moghadas *et al.*,٢٠١٨) فقد كانت كل عزلات بكتريا الزائفة الزنجارية تحمل جين (*exoA*)، بينما كانت غير منتجة للأغشية الحيوية في العزلات البكتيرية المعزولة من الإصابات العينية مما يؤكد عدم ارتباطه مع كمية الأغشية الحيوية المنتجة من قبل البكتريا في حالة انتاجها.

جدول (٤-١٧): العلاقة بين انتاج الاغشية الحيوية وجينات الضراوة لبكتريا *P. aeruginosa*

جينات الضراوة		انتاج الاغشية الحيوية
Las B	*Exo A*	
٠	٠	Weak(n=٠,٠.٠)
٣(١٠٠٪)	٣(١٠٠٪)	Moderate(n=٣,١٦.٦٪)
١٥(١٠٠٪)	١٥(١٠٠٪)	Strong(١٥,٨٣.٣٪)

٤-١٧: العلاقة بين قابلية العزلات البكتيرية المدروسة على انتاج ذيفان حال الدم ووجود جينات الضراوة والمقاومة The relationship between the ability of the studied bacterial isolates to produce hemolysin and the presence of virulence and resistance genes.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود جين مقاومة المثيسيلين *mecA* ،وجين مقاومة الاريثروميسين *ermA* في عزلة *S. aureus* والتي سجلت أعلى فعالية تحليلية ،إذ جاءت هذه النتيجة متوافقة مع (Bae *et al.*,٢٠٢١) الذي أكد أن الجينات المشفرة لذيفان حال الدم تؤثر بشكل كبير على نمط المقاومة للمضادات لهذا يزيد سم حال الدم بشكل غير مباشر من مقاومة البكتيريا ضد المضادات الحيوية من خلال التأثير على نشاطها ،والتسبب في ظهور سلالات مقاومة ،وإن المبدأ الأساس في التنظيم الفعال لكل من مقاومة المضادات الحيوية والضراوة هو القدرة على الإحساس والاستجابة للبيئة الخارجية من قبل البكتريا ،كما إن انتاج الهيمولايسين يؤدي إلى اشكال مقاومة مختلفة تتأثر بالعديد عوامل مثل درجة الحرارة والأوضاع البيئية التي تؤثر على المقاومة وبالتالي حدوث الامراضية و متزامنا مع العديد من الدراسات التي اكدت

على دور عوامل الضراوة في تطوير مقاومة المضادات الحيوية لدى البشر ومنها ذيفان حال الدم وأكدت إن هذا الذيفان من نوع الفا ودلتا وبيتا هي الأكثر شيوعاً (Koch *et al.*,٢٠١٤: Motamedi *et al.*,٢٠١٨).

أما بالنسبة لبكتريا الزائفة الزنجارية فيتضح إن مورثات *exoA* و*LasB* موجودة في العزلتين المنتجتين لذيفان حال الدم بنسبة عالية مما يزيد من إمراضيه البكتريا للعين ،إذ تعمل مع الهيمولايسين الذي يكسر الدهون الموجودة في أنسجة العين ويتلف الأوعية الدموية، كما يقوم (Elastin) بتحليل المواد المخاطية التي تغطي سطح العين من ملتحمة وقرنية وكذلك مادة الكولاجين غير الخلوية الأساسية في تركيب العين مسبب تلف لخلايا العين فضلاً عن تثبيط الاستجابة المناعية مع السموم الخارجية التي تثبط تخليق البروتين مؤدي إلى نخر الأنسجة (Dave *et al.*,٢٠٢٠; Das *et al.*,٢٠٢٢).

وجاءت نتيجة دراستنا الحالية متوافقة مع دراسة مصرية كان فيها ارتباط بين وجود جين *exoA* مع ذيفان حال الدم من نوع بيتا (El-Halim and Nora.٢٠٢١). وجاءت النتيجة أيضا متوافقة مع (Jahromi *et al.*,٢٠١٨) وكانت فيها العزلات البكتيرية تملك جين *LasB* الهيمولايسين بنسبة ١٠٠%. بينما كانت غير متوافقة مع العديد من الدراسات الأخرى ثبت فيها وجود جينات الضراوة هذه في عزلات الزائفة الزنجارية أقل من وجود جين ذيفان حال الدم (Faraji *et al.*,٢٠١٦; Elmouaden *et al.*,٢٠١٩) وإن وجود هذه المورثات في عزلات بكتريا الزائفة الزنجارية التي تعد من عوامل الضراوة المفرزة غير المرتبطة بالخلايا تعمل معاً في زيادة الامراضية من خلال تلف الأنسجة وانتشارها وتوفير العناصر الغذائية التي تطلبها البكتيريا في المراحل المبكرة من العدوى (Abdeen,٢٠١٧) ،وإن انحلال الدم بواسطة الهيمولايسين يزيد من توفر الحديد في البيئة البكتيرية ،وهذا يسهل إمكانية بقاء البكتريا على قيد الحياة وغزو أنسجة المضيف يحرر الهيموغلوبين الحاوي على عنصر الحديد الذي يتم تخلبه بواسطة (pyoverdin) ،ووجود الحديد ينشط تنظيم التعبير عن *exoA* فقد اثبتت هذه الدراسة إن استيعاب الحديد هو واحد من العوامل المهمة لبكتريا الزائفة الزنجارية مما يسمح باستعمار المضيف (Michalska and Wolf,٢٠١٥) .

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusion & Recommendations

٥-١: الاستنتاجات Conclusions

١- إن بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* وبكتريا الزوائف الزنجارية *P. aeruginosa* هما الأجناس البكتيرية الأكثر شيوعاً في إحداث إصابات العيون البكتيرية في محافظة كربلاء المقدسة.

٢- أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن كل من المضاد الحيوي Linezolid وRifampicin وTeicoplanin وTigecycline وSulfamethoxazole\ Trimethoprim هي الأكثر فعالية تجاه عزلات بكتريا المكورات العنقودية الذهبية، في حين كل من المضاد الحيوي Colistin وImipenem وMeropenem هي الأكثر فعالية تجاه عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من اخماج العيون.

٣- تميزت عزلات بكتريا *S. aureus* و*P . aeruginosa* المعزولة من إصابات العيون بقدرتهما العالية على إنتاج سم الهيمولايسين وتكوين الأغشية الحيوية كأحد عوامل الضراوة.

٤- وجود ارتباط معنوي بين عوامل الخطورة المدروسة (الصدمة –امراض سطح العين – ارتداء العدسات اللاصقة – داء السكري –امراض الجهاز التنفسي) وتردد إصابات العيون البكتيرية، إذ كانت صدمات العيون هي الأكثر ارتباطاً مع الإصابات الجرثومية المتكررة.

٥-امتلاك العزلات البكتيرية المدروسة على مورثات الضراوة (*hlb,SEA,LasB,exoA*) والمقاومة للمضادات الحيوية (*mecA,ermA*) بنسب عالية مما يؤكد ضراوتها وقدرتها على احداث اخماج العيون.

٥-٢: التوصيات Recommendation

١-دراسة الاحياء المجهرية الأخرى من غير البكتريا التي تغزو العين كالفيروسات والفطريات فضلاً عن البكتريا اللاهوائية.

٢-إجراء المزيد من الدراسات الجزيئية على بكتريا المكورات العنقودية الذهبية والزائفة الزنجارية في ما يخص عوامل الضراوة المتعلقة بإمراضيتهما بِاستعمال التقنيات الحديثة مثل Real time PCR.

٣- إجراء دراسة مناعية تهتم بالتغيرات في بعض المعاير المناعية الموضعية والجهازية المرافقة لإصابات العيون مثل أنواع الانترلوكينات وغيرها.

٤- إيجاد علاجية بديلة لاستخدام المضادات الحيوية.

المصادر

References

- **المصادر العربية:**

- مسلم، ساهرة نصيف. (٢٠٠٥). دراسة وراثية وكيموحيوية على الهيمولايسين المنتج من بكتريا*Aeromonas hydrophila* والمعزولة من المياه السطحية والمصابين بالإسهال. أطروحة دكتوراه –كلية العلوم –الجامعة المستنصرية.

- **المصادر الأجنبية:**

- **Abbas,** A., Srivastava, P., & Nirwan, P. S. (٢٠١٥). Prevalence of MLSB resistance and observation of *erm A* & *erm C* genes at A tertiary care hospital. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, ٩(٦), DC٠٨.
- **Abd El-Aziz**, M. B., Ibrahim, H. A., Mohammed, S. Y., & Hegab, A. S. (٢٠٢٣). Virulence Factors and Biofilm Formation in Multi-drug Resistant Pseudomonas Aeruginosa. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, ٣١١٧-٣١٢٦.
- **Abdeen**, M. M. D. (٢٠١٧). *Detection of Some Virulence Genes of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Different Clinical Specimens by Multiplex PCR, Khartoum, Sudan* (Doctoral dissertation, Sudan University of Science & Technology).
- **Abid,** A. J., & Ewadh, R. M. (٢٠١٢). Etiology of bacterial eye infections and determination of immune response of infected patient. *Medical Journal of Babylon*, ٩(٤), ٧٩٩-٨٠٥.
- **Adilabdulhady, D., & Kadhim**, H. M. (٢٠٢٢). Molecular Detection of Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Different Clinical Cases and Test Antibiotics Sensitivity on the Bacterial Growth. *Pakistan Journal of Medical & Health Sciences*, ١٦(٠٦), ٥٨٧-٥٨٧.
- **Afzal,** M., Vijay, A. K., Stapleton, F., & Willcox, M. D. (٢٠٢٢). Genomics of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Infectious and Non-Infectious Ocular Conditions. *Antibiotics*, ١١(٨), ١٠١١.

- **Aggarwal,** S., Jena, S., Panda, S., Sharma, S., Dhawan, B., Nath, G., ... & Singh, D. V. (٢٠١٩). Antibiotic susceptibility, virulence pattern, and typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from variety of infections in India. *Frontiers in microbiology*, ١٠, ٢٧٦٣.
- **Agha,** N. F. S. (٢٠٢٠). Conjunctivitis among Rural and Urban School Children in Erbil Governorate/Iraq. *Diyala Journal of Medicine*, ١٨(١), ٥٨-٦٩.
- **Akpek,** E. K., & Gottsch, J. D. (٢٠٠٣). Immune defense at the ocular surface. *Eye*, ١٧(٨), ٩٤٩-٩٥٦.
- **Al-Aqaba**, M. A., Dhillon, V. K., Mohammed, I., Said, D. G., & Dua, H. S. (٢٠١٩). Corneal nerves in health and disease. *Progress in retinal and eye research*, ٧٣, ١٠٠٧٦٢.
- **Alash,** S. A. A. A. A. (٢٠١٥). Study the prevalence of bacterial conjunctivitis in Iraq. *Iraqi journal of science*, ٥٦(٤C), ٣٣٧١-٥.
- **Al-Dhaheri**, H. S., Al-Tamimi, M. D., Khandekar, R. B., Khan, M., & Stone, D. U. (٢٠١٦). Ocular pathogens and antibiotic sensitivity in bacterial keratitis isolates at King Khaled Eye Specialist Hospital, ٢٠١١ to ٢٠١٤. *Cornea*, ٣٥(٦), ٧٨٩-٧٩٤.
- **Ali-Vehmas**, T., Vikerpuur, M., Pyörälä, S., & Atroshi, F. (٢٠٠١). Characterization of hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitic milk. *Microbiological research*, ١٥٥(٤), ٣٣٩-٣٤٤.
- **Al-Janabi,** A. O. F., Al-Ani, S. F., & Imad, S. (٢٠١٣). Biofilms Formation on Contact Lenses: Clinical and Bacteriological Study. *Diy. JM*, ٥(٢), ١١-١٨.
- **Alkhaldi,** S. A., Allam, K. H., Radwan, M. A., Sweeney, L. E., & Alshammeri, S. (٢٠٢٢). Estimates of dry eye disease in Saudi Arabia based on a short questionnaire of prevalence, symptoms, and risk

factors: The Twaiq Mountain Eye Study I. *Contact Lens and Anterior Eye*, ١٠١٧٧٠.

- **Al-makhzoomy**, T. A. K., & Al-Kraety, I. A. A. (٢٠١٨). Molecular study on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from conjunctivitis patients. *Al-Kufa University Journal for Biology*, ١٠(٣).
- **Al-Mayyahi,** A. W. (٢٠١٨). *Detection of (exoT, exoY, exo S and exoU) Genes In Pseudomonas aeruginosa Isolate From Different Clinical Sources* (Doctoral dissertation, M. Sc. Thesis Submitted to the Council of the Institute of Genetic Engineering and Biotechnology For Post Graduate Studies, University of Baghdad. ٦٠-٦٣).
- **Al-Mebairik**, N. F., El-Kersh, T. A., Al-Sheikh, Y. A., & Marie, M. A. M. (٢٠١٦). A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Reviews in Medical Microbiology*, ٢٧(٢), ٥٠-٥٦.
- **Al-Mishhadani**, M. A., Karhoot, J. M., Al-Hadithi, F. M., & Mohammed, S. J. (٢٠٢٠). MICROBIAL STUDY OF CONJUNCTIVITIS IN IRAQI PATIENTS. *Plant Archives*, ٢٠(٢), ٢٦٩٠-٢٦٩٣.
- **Almizel,** A., Alsuhaibani, F. A., Alkaff, A. M., Alsaleh, A. S., & Al-Mansouri, S. M. (٢٠١٩). Bacterial profile and antibiotic susceptibility pattern of bacterial keratitis at a tertiary hospital in Riyadh. *Clinical Ophthalmology*, ٢٥٤٧-٢٥٥٢.
- **Alonso**, B., Fernández-Barat, L., Di Domenico, E. G., Marín, M., Cercenado, E., Merino, I., ... & Guembe, M. (٢٠٢٠). Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia. *BMC infectious diseases*, ٢٠, ١-٨.

- **Al-Rubaey**, N. K. F., Sabri, M., & Al-Rubaey, Q. K. (٢٠٠٧). Isolation and characterization of bacteria from patients with conjunctivitis in Hilla Province. *Medical Journal of Babylon*, ٤(١-٢), ٣٦-٤٤.
- **Al–Saa'edi,** A. H., Al-Abaadi, M. C., Karhoot, J. M., & Al-Sakarchi, F. (٢٠١٥). Study of *Pseudomonas areuginosa* proteases enzymes in corneal ulceration by using real-time PCR. *Iraqi Postgraduate Medical Journal*, ١٤(٢).
- **Al-Shakarchi**, F. I., Hussein, M. A., & Al-Shaibani, A. B. (٢٠١٥). Profile of microbial keratitis at a referral center in Iraq. *Al-Nahrain Journal of Science*, ١٨(١), ١٤١-١٤٧.
- **Alshamahi,** E. Y. A., Al-Shamahy, H. A., Musawa, Y. A., & Al-Shami, H. Z. (٢٠٢٠). Bacterial causes and antimicrobial sensitivity pattern of external ocular infections in selected ophthalmology clinics in Sana'a city. Universal J Pharm Res ٢٠٢٠; ٥ (٣): ١٢-١٦. *Pharm Res*, ٩(٣), ١٢-١٦.
- **Alter**, S. J., Vidwan, N. K., Sobande, P. O., Omoloja, A., & Bennett, J. S. (٢٠١١). Common childhood bacterial infections. *Current problems in pediatric and adolescent health care*, ٤١(١٠), ٢٥٦-٢٨٣.
- **Alwan,** A. H. (٢٠٢٠). DETECTION OF CASP-٥ GENE AS INFLAMMATORY FACTOR IN IRAQI PATIENTS WITH PSEUDOMONAS AERUGINOSA INFECTIONS. *Pakistan Journal of Biotechnology*, ١٧(١), ٣٣-٤٠.
- **Amescua**, G., Akpek, E. K., Farid, M., Garcia-Ferrer, F. J., Lin, A., Rhee, M. K., ... & Mah, F. S. (٢٠١٩). Blepharitis preferred practice pattern®. *Ophthalmology*, ١٢٦(١), P٥٦-P٩٣.
- **Amin,** R. M., Hussein, F. A., Idriss, H. F., Hanafy, N. F., & Abdallah, D. M. (٢٠١٣). Pathological, immunohistochemical and microbiologicalal analysis of lacrimal sac biopsies in patients with

chronic dacrocystitis. *International journal of ophthalmology*, ٦(٦), ٨١٧.

- **Anderl,** J. N., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (٢٠٠٠). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, ٤٤(٧), ١٨١٨-١٨٢٤.
- **Andersen,** J. L., He, G. X., Kakarla, P., KC, R., Kumar, S., Lakra, W. S., ... & Varela, M. F. (٢٠١٥). Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, Vibrio cholerae and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens. *International journal of environmental research and public health*, ١٢(٢), ١٤٨٧-١٥٤٧.
- **Andersson,** J., Hofsli, M., Gade, U. L., Heegaard, S., & Pottegård, A. (٢٠١٨). Use of topical ocular antibiotics in young children: a Scandinavian drug utilization study. *Acta Ophthalmologica*, ٩٦(٨), ٧٨٩-٧٩٤.
- **Ando,** E., Monden, K., Mitsuhata, R., Kariyama, R., & Kumon, H. (٢٠٠٤). Biofilm formation among methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from patients with urinary tract infection. *Acta Medica Okayama*, ٥٨(٤), ٢٠٧-٢١٤.
- **Andrade,** F. F., Silva, D., Rodrigues, A., & Pina-Vaz, C. (٢٠٢٠). Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges. *Microorganisms*, ٨(١١), ١٧١٦.
- **Aragona,** P., Baudouin, C., Del Castillo, J. M. B., Messmer, E., Barabino, S., Merayo-Lloves, J., ... & Labetoulle, M. (٢٠٢١). The ocular microbiome and microbiota and their effects on ocular surface pathophysiology and disorders. *Survey of Ophthalmology*, ٦٦(٦), ٩٠٧-٩٢٥.

- **Argudín,** M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (٢٠١٠). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, ٢(٧), ١٧٥١-١٧٧٣.
- **Asao,** T. S. U. T. O. M. U., Kinoshita, Y. O. S. H. I. O., Kozaki, S. H. U. N. J. I., Uemura, T. A. K. A. S. H. I., & Sakaguchi, G. E. N. J. I. (١٩٨٤). Purification and some properties of Aeromonas hydrophila hemolysin. *Infection and Immunity*, ٤٦(١), ١٢٢-١٢٧.
- **Assefa**, M. (٢٠٢٢). Inducible Clindamycin-Resistant *Staphylococcus aureu*s Strains in Africa: A Systematic Review. *International Journal of Microbiology*, ٢٠٢٢.
- **Assefa,** Y., Moges, F., Endris, M., Zereay, B., Amare, B., Bekele, D., ... & Belyhun, Y. (٢٠١٥). Bacteriological profile and drug susceptibility patterns in dacryocystitis patients attending Gondar University Teaching Hospital, Northwest Ethiopia. *BMC ophthalmology*, ١٥(١), ١-٨.
- **Astley**, R., Miller, F. C., Mursalin, M. H., Coburn, P. S., & Callegan, M. C. (٢٠١٩). An eye on *Staphylococcus aureus* toxins: roles in ocular damage and inflammation. *Toxins*, ١١(٦), ٣٥٦.
- **Atta,** S., Perera, C., Nayyar, S., Kowalski, R. P., & Jhanji, V. (٢٠٢١). An ١٨-Year Overview of *Serratia marcescens* Ocular Infection. *Eye & Contact Lens*, ٤٧(٨), ٤٧١-٤٧٥.
- **Aubais Aljelehawy**, Q. H., Hadi Alshaibah, L. H., & Abbas Al-Khafaji, Z. K. (٢٠٢١). Evaluation of virulence factors among *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with urinary tract infection in Al-Najaf Al-Ashraf teaching hospital. *Cellular, Molecular and Biomedical Reports*, ١(٢), ٧٨-٨٧.
- **Austin,** A., Lietman, T., & Rose-Nussbaumer, J. (٢٠١٧). Update on the management of infectious keratitis. *Ophthalmology*, ١٢٤(١١), ١٦٧٨-١٦٨٩.

- **Ayehubizu,** Z., Mulu, W., & Biadglegne, F. (٢٠٢١). Common bacterial causes of external ocular infections, associated risk factors and antibiotic resistance among patients at ophthalmology unit of Felege Hiwot Referral Hospital, Northwest Ethiopia: a cross-sectional study. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, ١١(١), ١-١٠.
- **Ayeni**, F. A., Andersen, C., & Nørskov-Lauritsen, N. (٢٠١٧). Comparison of growth on mannitol salt agar, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, VITEK® ٢ with partial sequencing of ١٦S rRNA gene for identification of coagulase-negative staphylococci. *Microbial pathogenesis*, ١٠٥, ٢٥٥-٢٥٩.
- **Azari,** A. A., & Barney, N. P. (٢٠١٣). Conjunctivitis: a systematic review of diagnosis and treatment. *Jama*, ٣١٠(١٦), ١٧٢١-١٧٣٠.
- **Azmi,** K., Qrei, W., & Abdeen, Z. (٢٠١٩). Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Palestinian patients. *BMC genomics*, ٢٠, ١-١٢.
- **Badamchi**, A., Masoumi, H., Javadinia, S., Asgarian, R., & Tabatabaee, A. (٢٠١٧). Molecular detection of six virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in children with urinary tract infection. *Microbial pathogenesis*, ١٠٧, ٤٤-٤٧.
- **Badawi,** A. E., Moemen, D., & El-Tantawy, N. L. (٢٠١٧). Epidemiological, clinical and laboratory findings of infectious keratitis at Mansoura Ophthalmic Center, Egypt. *International journal of ophthalmology*, ١٠(١), ٦١.
- **Bae**, J., Jin, H., Kim, J., Park, M., Lee, J., & Kim, S. (٢٠٢١). Molecular Characteristics and Exotoxins of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomedical Science Letters*, ٢٧(٤), ١٩٥-٢٠٧.

- **Bajracharya,** L., Bade, A. R., Gurung, R., & Dhakhwa, K. (٢٠٢٠). Detection of biofilm producing staphylococci: need of the hour. *Journal of clinical and diagnostic research*, ٣(٦), ١٩١٥-١٩٢٠.
- **Balasopoulou,** A., Kokkinos, P., Pagoulatos, D., Plotas, P., Makri, O. E., Georgakopoulos, C. D., & Vantarakis, A. (٢٠١٧). A molecular epidemiological analysis of adenoviruses from excess conjunctivitis cases. *BMC ophthalmology*, ١٧, ١-٧.
- **Barer,** M. R., & Irving, W. (٢٠١٨). *Medical Microbiology E-Book: A Guide to Microbial Infections*. Elsevier Health Sciences.
- **Barer,** M. R., Millership, S. E., & Tabaqchali, S. (١٩٨٦). Relationship of toxin production to species in the genus Aeromonas. *Journal of medical microbiology*, ٢٢(٤), ٣٠٣-٣٠٩.
- **Bassetti,** M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (٢٠١٨). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context*, ٧.
- **Baz,** A. A., Bakhiet, E. K., Abdul-Raouf, U., & Abdelkhalek, A. (٢٠٢١). Prevalence of enterotoxin genes (SEA to SEE) and antibacterial resistant pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in Assiut city of Egypt. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, ٢٢(١), ١-١٢.
- **Behlau**, I., & Gilmore, M. S. (٢٠٠٨). Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Archives of Ophthalmology*, ١٢٦(١١), ١٥٧٢-١٥٨١.
- **Belser,** J. A., Gustin, K. M., Maines, T. R., Pantin-Jackwood, M. J., Katz, J. M., & Tumpey, T. M. (٢٠١٢). Influenza virus respiratory infection and transmission following ocular inoculation in ferrets. *PLoS Pathogens*, ٨(٣), e١٠٠٢٥٦٩.
- **Bereket,** W., Hemalatha, K., Getenet, B., Wondwossen, T., Solomon, A., Zeynudin, A., & Kannan, S. (٢٠١٢). Update on

bacterial nosocomial infections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, ١٦(٨), ١٠٣٩-٤٤.

- **Bernheimer,** A. W. (١٩٨٨). [٣٠] Assay of hemolytic toxins. In *Methods in enzymology* (Vol. ١٦٥, pp. ٢١٣-٢١٧). Academic Press.
- **Bertelloni**, F., Cagnoli, G., & Ebani, V. V. (٢٠٢١). Virulence and antimicrobial resistance in canine *staphylococcus spp*. Isolates. *Microorganisms*, ٩(٣), ٥١٥.
- **Bertino** Jr, J. S. (٢٠٠٩). Impact of antibiotic resistance in the management of ocular infections: the role of current and future antibiotics. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*, ٣, ٥٠٧.
- **Bharathi,** M. J., Ramakrishnan, R., Shivakumar, C., Meenakshi, R., & Lionalraj, D. (٢٠١٠). Etiology and antibacterial susceptibility pattern of community-acquired bacterial ocular infections in a tertiary eye care hospital in south India. *Indian journal of ophthalmology*, ٥٨(٦), ٤٩٧-٥٠٧.
- **Bhat, A., & Jhanji,** V. (٢٠٢١). Bacterial conjunctivitis. In *Infections of the Cornea and Conjunctiva* (pp. ١-١٦). Springer, Singapore.
- **Bhattacharyya,** A., Sarma, P., Sarma, B., Kumar, S., Gogoi, T., & Kaur, H. (٢٠٢٠). Bertelloni, F., Cagnoli, G., & Ebani, V. V. (٢٠٢١). Virulence and antimicrobial resistance in canine *staphylococcus spp*. Isolates. *Microorganisms*, ٩(٣), ٥١٥., ٩٩(٧).
- **Bhikoo,** R., Ingram, P. R., Cunningham, W., Gounder, P., Host, B., & Chen, F. K. (٢٠٢١). Risk of *Klebsiella pneumoniae* endogenous endophthalmitis during bacteremia: implications for screening. *Infection & Chemotherapy*, ٥٣(٢), ٣٨١.
- **Bizani, D., & Brandelli,** A. (٢٠٠١). Antimicrobial susceptibility, hemolysis, and hemagglutination among Aeromonas spp. isolated from water of a bovine abattoir. *Brazilian Journal of Microbiology*, ٣٢, ٣٣٤-٣٣٩.

- **Blair,** J., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (٢٠١٥). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, ١٣(١), ٤٢-٥١.
- **Bolaños-Jiménez**, R., Navas, A., López-Lizárraga, E. P., de Ribot, F. M., Peña, A., Graue-Hernández, E. O., & Garfias, Y. (٢٠١٥). Ocular surface as barrier of innate immunity. *The open ophthalmology journal*, ٩, ٤٩.
- **Bose,** S., Khodke, M., Basak, S., & Mallick, S. K. (٢٠٠٩). Detection of biofilm producing staphylococci: need of the hour. *Journal of clinical and diagnostic research*, ٣(٦), ١٩١٥-١٩٢٠.
- **Bourcier,** T., Thomas, F., Borderie, V., Chaumeil, C., & Laroche, L. (٢٠٠٣). Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of ٣٠٠ cases. *British Journal of Ophthalmology*, ٨٧(٧), ٨٣٤-٨٣٨.
- **Braoios,** A., Fluminhan, A., & Pizzolitto, A. C. (٢٠٠٩). Multiplex PCR use for *Staphylococcus aureus* identification and oxacillin and mupirocin resistance evaluation. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, ٣٠٣-٣٠٧.
- **Bryant,** K. A., & Woods, C. R. (٢٠٠٨). Healthcare-acquired infections due to gram-positive bacteria. *The Pediatric infectious disease journal*, ٢٧(٥), ٤٥٥-٤٥٦.
- **Buznach,** N., Dagan, R., & Greenberg, D. (٢٠٠٥). Clinical and bacterial characteristics of acute bacterial conjunctivitis in children in the antibiotic resistance era. *The Pediatric infectious disease journal*, ٢٤(٩), ٨٢٣-٨٢٨.
- **Byrd,** A. L., Deming, C., Cassidy, S. K., Harrison, O. J., Ng, W. I., Conlan, S., ... & Kong, H. H. (٢٠١٧). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcus epidermidis strain diversity underlying pediatric atopic dermatitis. *Science translational medicine*, ٩(٣٩٧), eaal٤٦٥١.

- **Caballero,** A. R., Tang, A., Bierdeman, M., O'Callaghan, R., & Marquart, M. (٢٠٢١). Correlation of *Staphylococcus epidermidis* Phenotype and Its Corneal Virulence. *Current Eye Research*, *٤٦*(٥), ٦٣٨-٦٤٧.
- **Campbell,** A. J., Dotel, R., Blyth, C. C., Davis, J. S., Tong, S. Y. C., & Bowen, A. C. (٢٠١٩). Adjunctive protein synthesis inhibitor antibiotics for toxin suppression in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic appraisal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *٧٤*(١), ١-٥.
- **Cao,** Y., Su, B., Chinnaraj, S., Jana, S., Bowen, L., Charlton, S., ... & Chen, J. (٢٠١٨). Nanostructured titanium surfaces exhibit recalcitrance towards *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Scientific reports*, *٨*(١), ١-١٣.
- **Capriotti**, J. A., Pelletier, J. S., Shah, M., Caivano, D. M., & Ritterband, D. C. (٢٠٠٩). Normal ocular flora in healthy eyes from a rural population in Sierra Leone. *International ophthalmology*, *٢٩*(٢), ٨١-٨٤.
- **Casadevall, A., & Pirofski,** L. A. (٢٠٠٩). Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage–response framework. *Journal of water and health*, *٧*(S١), S٢-S١٨.
- **Cathcart,** G. R., Quinn, D., Greer, B., Harriott, P., Lynas, J. F., Gilmore, B. F., & Walker, B. (٢٠١١). Novel inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB: a potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonal infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *٥٥*(٦), ٢٦٧٠-٢٦٧٨.
- **Cavalieri**, S. J., Bohach, G. A., & Snyder, I. S. (١٩٨٤). *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiological reviews*, *٤٨*(٤), ٣٢٦-٣٤٣.

- **Chabi,** R., & Momtaz, H. (٢٠١٩). Virulence factors and antibiotic resistance properties of the *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from hospital infections in Ahvaz, Iran. *Tropical medicine and health*, ٤٧(١), ١-٩.
- **Chadha**, J., Harjai, K., & Chhibber, S. (٢٠٢٢). Revisiting the virulence hallmarks of *Pseudomonas aeruginosa*: a chronicle through the perspective of quorum sensing. *Environmental Microbiology*, ٢٤(٦), ٢٦٣٠-٢٦٥٦.
- **Chen,** Y., & Hong, X. (٢٠١٦). Effects of carvedilol reduce conjunctivitis through changes in inflammation, NGF and VEGF levels in a rat model. *Experimental and Therapeutic Medicine*, ١١(٥), ١٩٨٧-١٩٩٢.
- **Cheng**, V. C., Yam, W. C., Tsang, L. L., Yau, M. C., Siu, G. K., Wong, S. C., ... & Yuen, K. Y. (٢٠١٢). Epidemiology of *Klebsiella oxytoca*-associated diarrhea detected by Simmons citrate agar supplemented with inositol, tryptophan, and bile salts. *Journal of Clinical Microbiology*, ٥٠(٥), ١٥٧١-١٥٧٩.
- **Cheung,** G. Y., Bae, J. S., & Otto, M. (٢٠٢١). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, ١٢(١), ٥٤٧-٥٦٩.
- **Chodosh,** J., Chintakuntlawar, A. V., & Robinson, C. M. (٢٠٠٨). Human eye infections. *Encyclopedia of Virology*, ٤٩١.
- **Chung,** S. Y., Rafailov, L., Turbin, R. E., & Langer, P. D. (٢٠١٩). The microbiologic profile of dacryocystitis. *Orbit*, ٣٨(١), ٧٢-٧٨.
- **Clegg,** S., & Murphy, C. N. (٢٠١٧). Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, ٤٣٥-٤٥٧.
- **Costabile**, M. (٢٠١٠). Measuring the ٥٠٪ haemolytic complement (CH٥٠) activity of serum. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (٣٧), e١٩٢٣.

- **Collee,** J.G., Miles, R.S., & Watt, B. (١٩٩٦). Tests for identification of bacteria. Mackie *and McCartney practical medical microbiology*, ١٤,١٣١-٤٩.
- **Cristina,** M. L., Sartini, M., & Spagnolo, A. M. (٢٠١٩). *Serratia marcescens* infections in neonatal intensive care units (NICUs). *International journal of environmental research and public health*, ١٦(٤), ٦١٠.
- **D'Oria,** F., Buonamassa, R., Rizzo, T., Boscia, F., Alessio, G., & Guerriero, S. (٢٠٢٢). Bacterial isolates and antimicrobial susceptibility pattern of ocular infection at a tertiary referral hospital in the South of Italy. *European Journal of Ophthalmology*, ١١٢٠٦٧٢١٢٢١١٠٦١٣٩.
- **D'Souza**, S., Vaidya, T., Nair, A. P., Shetty, R., Kumar, N. R., Bisht, A., ... & Ghosh, A. (٢٠٢٢). Altered ocular surface health status and tear film immune profile due to prolonged daily mask wear in health care workers. *Biomedicines*, ١٠(٥), ١١٦٠.
- **Das,** A. V., & Joseph, J. (٢٠٢٢). The microbiological landscape and epidemiology of ocular infections in a multi-tier ophthalmology network in India: an electronic medical record driven analytics report. *Eye*, ١-٦.
- **Das,** S., D'Souza, S., Gorimanipalli, B., Shetty, R., Ghosh, A., & Deshpande, V. (٢٠٢٢). Ocular Surface Infection Mediated Molecular Stress Responses: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, ٢٣(٦), ٣١١١.
- **Dave,** A., Samarth, A., Karolia, R., Sharma, S., Karunakaran, E., Partridge, L., ... & Roy, S. (٢٠٢٠). Characterization of ocular clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from non-contact lens related keratitis patients from South India. *Microorganisms*, ٨(٢), ٢٦٠.

- **de Paiva,** C. S., St Leger, A. J., & Caspi, R. R. (٢٠٢٢). Mucosal immunology of the ocular surface. *Mucosal Immunology*, ١-١٥.
- **de Paula,** A., Oliva, G., Barraquer, R. I., & de la Paz, M. F. (٢٠٢٠). Prevalence and antibiotic susceptibility of bacteria isolated in patients affected with blepharitis in a tertiary eye centre in Spain. *European Journal of Ophthalmology*, ٣٠(٥), ٩٩١-٩٩٧.
- **DeCory,** H. H., Sanfilippo, C. M., Proskin, H. M., & Blondeau, J. M. (٢٠٢٠). Characterization of baseline polybacterial versus monobacterial infections in three randomized controlled bacterial conjunctivitis trials and microbial outcomes with besifloxacin ophthalmic suspension ٠.٦٪. *PloS one*, ١٥(٨), e٠٢٣٧٦٠٣.
- **Deepthi,** K. G., & Prabagaran, S. R. (٢٠٢٠). Ocular bacterial infections: Pathogenesis and diagnosis. *Microbial pathogenesis*, ١٤٥, ١٠٤٢٠٦.
- **Deguch**i, H., Kitazawa, K., Kayukawa, K., Kondoh, E., Fukumoto, A., Yamasaki, T., ... & Sotozono, C. (٢٠١٨). The trend of resistance to antibiotics for ocular infection of *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci, and Corynebacterium compared with ١٠-years previous: A retrospective observational study. *PLoS One*, ١٣(٩), e٠٢٠٣٧٠٥.
- **Desouky**, S. E., El-Gamal, M. S., Mohammed, A. F., & Abu-Elghait, M. A. (٢٠١٤). Determination of some virulence factors in *Staphylococcus spp*. isolated from clinical samples of different Egyptian patients. *World Appl Sci J*, ٣٢, ٧٣١-٧٤٠.
- **Devaux,** L., Sleiman, D., Mazzuoli, M. V., Gominet, M., Lanotte, P., Trieu-Cuot, P., ... & Firon, A. (٢٠١٨). Cyclic di-AMP regulation of osmotic homeostasis is essential in Group B Streptococcus. *PLoS genetics*, ١٤(٤), e١٠٠٧٣٤٢.

- **Dhakwa,** K., Sharma, M. K., Bajimaya, S., Dwivedi, A. K., & Rai, S. K. (٢٠١٢). Causative organisms in microbial keratitis, their sensitivity pattern and treatment outcome in western Nepal. *Nepalese Journal of Ophthalmology*, ٤(١), ١١٩-١٢٧.
- **di RS Pedesaan**, A. K. K. (٢٠١٣). The Incidence of Conjunctivitis in Rural Hospital Compared with Urban Hospital ١ January-٣١ December.
- **Dias,** C., Gonçalves, M., & João, A. (٢٠١٣). Epidemiological study of hospital-acquired bacterial conjunctivitis in a level III neonatal unit. *The Scientific World Journal*, ٢٠١٣.
- **Dias,** S. P., Brouwer, M. C., & van de Beek, D. (٢٠٢٢). Sex and gender differences in bacterial infections. *Infection and Immunity*, ٩٠(١٠), e٠٠٢٨٣-٢٢.
- **Dinges,** M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. (٢٠٠٠). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, ١٣(١), ١٦-٣٤.
- **Diriba,** K., Kassa, T., Alemu, Y., & Bekele, S. (٢٠٢٠). In vitro biofilm formation and antibiotic susceptibility patterns of bacteria from suspected external eye infected patients attending ophthalmology clinic, Southwest Ethiopia. *International journal of microbiology*, ٢٠٢٠, ١-١٢.
- **Divyakolu,** S., Chikkala, R., Ratnakar, K. S., & Sritharan, V. (٢٠١٩). Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An update on their biology, role in pathogenesis and as targets for anti-virulence therapy. *Advances in Infectious Diseases*, ٩(٢), ٨٠-١٠٤.
- **Dong,** X., Wang, Y., Wang, W., Lin, P., & Huang, Y. (٢٠١٩). Composition and diversity of bacterial community on the ocular surface of patients with meibomian gland dysfunction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, ٦٠(١٤), ٤٧٧٤-٤٧٨٣.

- **Downie**, L. E., Bandlitz, S., Bergmanson, J. P., Craig, J. P., Dutta, D., Maldonado-Codina, C., ... & Wolffsohn, J. S. (٢٠٢١). BCLA CLEAR-Anatomy and physiology of the anterior eye. Contact Lens and Anterior Eye, ٤٤(٢), ١٣٢-١٥٦.
- **Duggirala,** A., Kenchappa, P., Sharma, S., Peeters, J. K., Ahmed, N., Garg, P., ... & Hasnain, S. E. (٢٠٠٧). High-resolution genome profiling differentiated *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients with ocular infections and normal individuals. *Investigative ophthalmology & visual science*, ٤٨(٧), ٣٢٣٩-٣٢٤٥.
- **Durand,** M. L. (٢٠١٣). Endophthalmitis. *Clinical Microbiology and Infection*, ١٩(٣), ٢٢٧-٢٣٤.
- **Effah,** C. Y., Sun, T., Liu, S., & Wu, Y. (٢٠٢٠). Klebsiella pneumoniae: an increasing threat to public health. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, ١٩(١), ١-٩.
- **Egrilmez,** S., & Yildirim-Theveny, Ş. (٢٠٢٠). Treatment-resistant bacterial keratitis: challenges and solutions. *Clinical Ophthalmology*, ٢٨٧-٢٩٧.
- **El Zowalaty,** M. E., Al Thani, A. A., Webster, T. J., El Zowalaty, A. E., Schweizer, H. P., Nasrallah, G. K., ... & Ashour, H. M. (٢٠١٥). *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiology*, ١٠(١٠), ١٦٨٣-١٧٠٦
- **El-Ganiny**, A. M., Shaker, G. H., Aboelazm, A. A., & El-Dash, H. A. (٢٠١٧). Prevention of bacterial biofilm formation on soft contact lenses using natural compounds. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, ٧, ١-٧.
- **Elhakim,** Y. A., Ali, A. E., Hosny, A. E. D. M., & Abdeltawab, N. F. (٢٠٢١). Zinc Deprivation as a Promising Approach for Combating

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Pilot Study. *Pathogens*, ١٠(١٠), ١٢٢٨.

- **El-Halim**, A., & Nora, Z. (٢٠٢١). Phenotypic and molecular characteristics of *Pseudomonas Aeruginosa* isolated from burn unit. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, ٣٠(١), ١٩-٢٨.
- **Elhanan**, M. M., Nabi, A., Tayara, F., & Alsharhan, M. (٢٠١٦). Bacterial keratitis risk factors, pathogens and antibiotic susceptibilities: a ٥-year review of cases at Dubai hospital, Dubai. *Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology*, ٧(٤), ١-٥.
- **Elmouaden,** C., Laglaoui, A., Ennanei, L., Bakkali, M., & Abid, M. (٢٠١٩). Virulence genes and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in the Northwestern of Morocco. *The Journal of Infection in Developing Countries*, ١٣(١٠), ٨٩٢-٨٩٨.
- **Elzen,** A. A. G., & Abdalla, A. M. (٢٠١٢). Isolation and Identification of Pathogenic Bacteria that Cause External Ocular Infections in Sabha City Libya. Journal of the Nigerian Optometric Association, ١٢, ٦-٩.
- **Epling,** J. (٢٠١٢). Bacterial conjunctivitis. BMJ clinical evidence, ٢٠١٢.
- **Eshraghi**, B., Abdi, P., Akbari, M., & Fard, M. A. (٢٠١٤). Microbiologic spectrum of acute and chronic dacryocystitis. *International journal of ophthalmology*, ٧(٥), ٨٦٤.
- **Esther, N., & Fatima**, T. (٢٠٢٠). Evaluation of phytochemicals and activity index of some plant leaf extracts on typhoidal and non-typhoidal *Salmonella* isolates from selected hospitals in Bauchi, Nigeria. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, ١٠(٢), ١٢٠-١٢٩.

- **Etebu,** E., & Arikekpar, I. (٢٠١٦). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int J Appl Microbiol Biotechnol Res*, *٤*(٢٠١٦), ٩٠-١٠١.
- **EwadhP,** R. M., AldraghiP, W. A., & AbidP, A. J. (٢٠١٤). Genetic Study of The Etiology of Some Bacterial Pathogens in People with Inflammation of The Eye and to Investigate The Prevalence of The *SEA* gene. *Iraqi journal of biotechnology*, *١٣*(٢), ٢٣-٣٤.
- **Fang,** C. T., Lai, S. Y., Yi, W. C., Hsueh, P. R., Liu, K. L., & Chang, S. C. (٢٠٠٧). *Klebsiella pneumoniae* genotype K١: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clinical infectious diseases*, *٤٥*(٣), ٢٨٤-٢٩٣.
- **Faraji,** F., Mahzounieh, M., Ebrahimi, A., Fallah, F., Teymournejad, O., & Lajevardi, B. (٢٠١٦). Molecular detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with Cystic Fibrosis and burn wounds in Iran. *Microbial pathogenesis*, *٩٩*, ١-٤.
- **Farhan**, S. M., Raafat, M., Abourehab, M. A., Abd El-Baky, R. M., Abdalla, S., El-Gendy, A. O., & Azmy, A. F. (٢٠٢١). Effect of imipenem and amikacin combination against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, *١٠*(١١), ١٤٢٩.
- **Faridi,** A., Kareshk, A. T., Fatahi-Bafghi, M., Ziasistani, M., Ghahraman, M. R. K., Seyyed-Yousefi, S. Z., ... & Kalantar-Neyestanaki, D. (٢٠١٨). Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in clinical samples of patients with external ocular infection. *Iranian Journal of Microbiology*, *١٠*(٤), ٢١٥.
- **Farshad,** S., Ranjbar, R., Japoni, A., Hosseini, M., Anvarinejad, M., & Mohammadzadegan, R. (٢٠١٢). Microbial susceptibility, virulence factors, and plasmid profiles of uropathogenic Escherichia

coli strains isolated from children in Jahrom, Iran. *Archives of Iranian medicine*, ١٥(٥), ٣١٢-٣١٦.

- **Fernald,** R. D. (٢٠٠٦). Casting a genetic light on the evolution of eyes. *Science*, ٣١٣(٥٧٩٥), ١٩١٤-١٩١٨.
- **Ferry**, T., Thomas, D., Genestier, A. L., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., & Etienne, J. (٢٠٠٥). Comparative prevalence of superantigen genes in *Staphylococcus aureus* isolates causing sepsis with and without septic shock. *Clinical infectious diseases*, ٤١(٦), ٧٧١-٧٧٧.
- **Flayyih,** M. T., Yousif, H. S., & Subhi, I. M. (٢٠١٣). Antimicrobial effects of black tea (Camellia sinensis) on Pseudomonas aeruginosa isolated from eye infection. *Iraqi Journal of Science*, ٥٤(٢.٢٠١٣), ٢٥٥-٢٦٥.
- **Florez-Cuadrado,** D., Ugarte-Ruiz, M., Meric, G., Quesada, A., Porrero, M. C., Pascoe, B., ... & Sheppard, S. K. (٢٠١٧). Genome comparison of erythromycin resistant Campylobacter from turkeys identifies hosts and pathways for horizontal spread of erm (B) genes. *Frontiers in Microbiology*, ٨, ٢٢٤٠.
- **Friedman,** M., Rasooly, R., Do, P. M., & Henika, P. R. (٢٠١١). The Olive Compound ٤-Hydroxytyrosol Inactivates *Staphylococcus Aureus* Bacteria and *Staphylococcal* Enterotoxin A (*SEA*). *Journal of food science*, ٧٦(٨), M٥٥٨-M٥٦٣.
- **Froböse,** N. J., Bjedov, S., Schuler, F., Kahl, B. C., Kampmeier, S., & Schaumburg, F. (٢٠٢٠). Gram staining: a comparison of two automated systems and manual staining. *Journal of clinical microbiology*, ٥٨(١٢), e٠١٩١٤-٢٠.
- **Fujishima,** H., Okada, N., Dogru, M., Baba, F., Tomita, M., Abe, J., ... & Saito, H. (٢٠١٢). The role of *Staphylococcal* enterotoxin in

atopic keratoconjunctivitis and corneal ulceration. *Allergy*, ٦٧(٦), ٧٩٩-٨٠٣.

- **Abril,** A., G. Villa, T., Barros-Velázquez, J., Cañas, B., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P., & Carrera, M. (٢٠٢٠). *Staphylococcus aureus* exotoxins and their detection in the dairy industry and mastitis. *Toxins*, ١٢(٩), ٥٣٧.
- **Gaire**, U., Thapa Shrestha, U., Adhikari, S., Adhikari, N., Bastola, A., Rijal, K. R., ... & Banjara, M. R. (٢٠٢١). Antibiotic Susceptibility, Biofilm Production, and Detection of mec A Gene among *Staphylococcus aureus* Isolates from Different Clinical Specimens. *Diseases*, ٩(٤), ٨٠.
- **Galdino,** A. C. M., de Oliveira, M. P., Ramalho, T. C., de Castro, A. A., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. (٢٠١٩). Anti-virulence strategy against the multidrug-resistant bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: pseudolysin (elastase B) as a potential druggable target. *Current Protein and Peptide Science*, ٢٠(٥), ٤٧١-٤٨٧.
- **Galletti,** J. G., & de Paiva, C. S. (٢٠٢١). The ocular surface immune system through the eyes of aging. *The Ocular Surface*, ٢٠, ١٣٩-١٦٢.
- **Galvis,** V., Tello, A., Guerra, A., Acuña, M. F., & Villarreal, D. (٢٠١٤). Antibiotic susceptibility patterns of bacteria isolated from keratitis and intraocular infections at Fundación Oftalmológica de Santander (FOSCAL), Floridablanca, Colombia. *Biomedica*, ٣٤, ٢٣-٣٣.
- **Georgescu**, M., Gheorghe, I., Curutiu, C., Lazar, V., Bleotu, C., & Chifiriuc, M. C. (٢٠١٦). Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from chronic leg ulcers. *BMC infectious diseases*, ١٦(١), ٣-٩.

- **Ghanbari,** F., Ghajavand, H., Havaei, R., Jami, M. S., Khademi, F., Heydari, L., ... & Havaei, S. A. (٢٠١٦). Distribution of erm genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan, Iran. *Advanced biomedical research*, ٥.
- **Ghazaei,** C. (٢٠٢١). Molecular Analysis of Pathogenic Genes (*lasB* and *exoA)* in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Animal and Human Samples and Determination of Their Resistance Pattern. *Journal of Clinical Research in Paramedical Sciences*, ١٠(٢).
- **Gheorghe,** I., Popa, M., & Măruţescu, L. G. (٢٠١٨). Molecular features of virulence and resistance mechanisms in nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus*. In *Staphylococcus Aureus*. London, UK: IntechOpen.
- **Ghosh,** A. K., Thammasudjarit, R., Jongkhajornpong, P., Attia, J., & Thakkinstian, A. (٢٠٢٢). Deep learning for discrimination between fungal keratitis and bacterial keratitis: DeepKeratitis. *Cornea*, ٤١(٥), ٦١٦.
- **Gnanamani,** A., Hariharan, P., & Paul-Satyaseela, M. (٢٠١٧). Staphylococcus aureus: Overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach. *Frontiers in Staphylococcus aureus*, ٤(٢٨), ١٠-٥٧٧٢.
- **Godoy-Mancilla,** J., Oyarzun-Barrientos, C., Marín-Cornuy, M., Carrasco-Sanhueza, E., & Águila-Torres, P. (٢٠٢٢). Bacterial eye infections associated with sexual transmission infections: A review. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología (English Edition)*, ٩٧(١), ١٧-٢٧.
- **Grandi**, G., Bianco, G., Boattini, M., Scalabrin, S., Iannaccone, M., Fea, A., ... & Costa, C. (٢٠٢١). Bacterial etiology and antimicrobial

resistance trends in ocular infections: A ٣٠-year study, Turin area, Italy. *European Journal of Ophthalmology*, ٣١(٢), ٤٠٥-٤١٤.

- **Green**, M. R., & Sambrook, J. (٢٠١٩). Analysis of DNA by agarose gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, ٢٠١٩(١), pdb-top١٠٠٣٨٨.
- **Grimont,** F., & Grimont, P. A. (٢٠١٥). *Serratia*. *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*, ١-٢٢.
- **Guo,** Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (٢٠٢٠). Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, ١٠, ١٠٧.
- **Gwenhure**, T., & Shepherd, E. (٢٠١٩). Principles and procedure for eye assessment and cleansing. *Nursing Times*, ١٨-٢٠.
- **Haas**, J., Larson, E., Ross, B., See, B., & Saiman, L. (٢٠٠٥). Epidemiology and diagnosis of hospital-acquired conjunctivitis among neonatal intensive care unit patients. *The Pediatric infectious disease journal*, ٢٤(٧), ٥٨٦.
- **Haas,** W., Gearinger, L. S., Hesje, C. K., Sanfilippo, C. M., & Morris, T. W. (٢٠١٢). Microbiological etiology and susceptibility of bacterial conjunctivitis isolates from clinical trials with ophthalmic, twice-daily besifloxacin. *Advances in therapy*, ٢٩, ٤٤٢-٤٥٥.
- **Halfon,** Y., Matzov, D., Eyal, Z., Bashan, A., Zimmerman, E., Kjeldgaard, J., ... & Yonath, A. (٢٠١٩). Exit tunnel modulation as resistance mechanism of *S.aureus* erythromycin resistant mutant. *Scientific Reports*, ٩(١), ١١٤٦٠.
- **Hameed**, F.A. (٢٠٢٠). Bacteriological study of eye infection in Baghdad city. Medico-legal update,٢٠٢٠, vol.٢٠, No.٣.
- **Hashim,** I., & Pharma, S. (٢٠١٣). Microbiological culture media in pharmaceutical industry. *Foster city, USA: OMICS Group eBooks*.

- **Hassan,** T. M., & Majid, B. T. (٢٠١٨). Identification of Common Aerobic Bacterial Isolates among Conjunctivitis in Sulaymaniyah Province/Iraq. *Iraqi Journal of Medical Sciences*, ١٦(٢).
- **Hassuna,** N. A., Mandour, S. A., & Mohamed, E. S. (٢٠٢٠). Virulence constitution of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Upper Egypt. *Infection and drug resistance*, ٥٨٧-٥٩٥.
- **Hedayati,** H., Ghaderpanah, M., Rasoulinejad, S. A., & Montazeri, M. (٢٠١٥). Clinical presentation and antibiotic susceptibility of contact lens associated microbial keratitis. *Journal of Pathogens*, ٢٠١٥.
- **Heidari,** H., Hadadi, M., Ebrahim-Saraie, H. S., Mirzaei, A., Taji, A., Hosseini, S. R., & Motamedifar, M. (٢٠١٨). Characterization of virulence factors, antimicrobial resistance patterns and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus spp*. strains isolated from corneal infection. *Journal francais d'ophtalmologie*, ٤١(٩), ٨٢٣-٨٢٩.
- **Herrera**, A., Vu, B. G., Stach, C. S., Merriman, J. A., Horswill, A. R., Salgado-Pabón, W., & Schlievert, P. M. (٢٠١٦). *Staphylococcus aureus* β-toxin mutants are defective in biofilm ligase and sphingomyelinase activity, and causation of infective endocarditis and sepsis. *Biochemistry*, ٥٥(١٧), ٢٥١٠-٢٥١٧.
- **Hilliam**, Y., Kaye, S., & Winstanley, C. (٢٠٢٠). *Pseudomonas aeruginosa* and microbial keratitis. *Journal of medical microbiology*, ٦٩(١), ٣-١٣.
- **Hiramatsu**, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A., & Baba, T. (٢٠١٤). Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *Journal of Infection and Chemotherapy*, ٢٠(١٠), ٥٩٣-٦٠١.

- **Hom,** M. M., Nguyen, A. L., & Bielory, L. (٢٠١٢). Allergic conjunctivitis and dry eye syndrome. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, ١٠٨(٣), ١٦٣-١٦٦.
- **Horng**, C., Tsai, K. L., Chou, H. J., & Chou, S. T. (٢٠١٤). The observation for ocular surface diseases in respiratory care center in one regional teaching hospital in Southern Taiwan. *Life Sci J*, ٦(١١), ٦٧٢-٩.
- **Hoshi,** S., Hashida, M., & Urabe, K. (٢٠١٦). Risk factors for aerobic bacterial conjunctival flora in preoperative cataract patients. *Eye*, ٣٠(١١), ١٤٣٩-١٤٤٦.
- **Hou,** W., Sun, X., Wang, Z., & Zhang, Y. (٢٠١٢). Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. *Investigative ophthalmology & visual science*, ٥٣(٩), ٥٦٢٤-٥٦٣١.
- **Høvding,** G. (٢٠٠٨). Acute bacterial conjunctivitis. *Acta ophthalmologica*, ٨٦(١), ٥-١٧.
- **Hsiao,** C. H., Ong, S. J., Chuang, C. C., Ma, D. H., & Huang, Y. C. (٢٠١٥). A comparison of clinical features between community-associated and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis. *Journal of Ophthalmology*, ٢٠١٥.
- **Hu,** Y. L., Lee, P. I., Hsueh, P. R., Lu, C. Y., Chang, L. Y., Huang, L. M., ... & Chen, J. M. (٢٠٢١). Predominant role of Haemophilus influenzae in the association of conjunctivitis, acute otitis media and acute bacterial paranasal sinusitis in children. *Scientific Reports*, ١١(١), ١-٦.
- **Huseby,** M. J., Kruse, A. C., Digre, J., Kohler, P. L., Vocke, J. A., Mann, E. E., ... & Earhart, C. A. (٢٠١٠). Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal

biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, ١٠٧(٣٢), ١٤٤٠٧-١٤٤١٢.

- **Ibrahim,** N. H., Turki, A. M., & Abd Al-Rahman, J. (٢٠٢٠). Molecular and Phenotypic Detection of Some of the Coded Genes for Virulence Factors in Mrsa and Mssa Isolated from Different Clinical Cases. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, ١٤(٤), ١٨٣٥.
- **Ismael,** M. C., & Mohameed, E. S. (٢٠٢٢). Predisposing Factors and aetiologic diagnosis of eye's Infection in Baghdad city/Iraq. *Texas Journal of Multidisciplinary Studies*, ٥, ٨١-٨٦.
- **Ismael**, M. C., Ibrahim, A. H., Kadim, R. L., & Mubarak, E. A. (٢٠١٧). Study of causative bacterial agents and risk factors predisposing to bacterial keratitis in Iraq. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*, ٥٩(١), ٨٧-٨٩.
- **Issa,** A. H., & Almayah, A. A. (٢٠٢٠). New Virulence Factor of Normal Flora E. Coli. *Systematic Reviews in Pharmacy*, ١١(٢).
- **Jackson,** T. L. (Ed.). (٢٠١٩). *Moorfields manual of ophthalmology*. JP Medical Ltd.
- **Jacob,** M. E., Keelara, S., Aidara-Kane, A., Matheu Alvarez, J. R., & Fedorka-Cray, P. J. (٢٠٢٠). Optimizing a screening protocol for potential extended-spectrum β-lactamase Escherichia coli on MacConkey agar for use in a global surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology*, ٥٨(٩), e٠١٠٣٩-١٩.
- **Jahromi,** S. I. P., Mardaneh, J., Sharifi, A., Pezeshkpour, V., Behzad-Behbahani, A., Seyyedi, N., ... & Khosravani, S. A. (٢٠١٨). Occurrence of a multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa strains in hospitalized patients in southwest of Iran: Characterization of resistance trends and virulence determinants. *Jundishapur Journal of Microbiology*, ١١(٤).

- **Jang,** J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (٢٠١٧). Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of applied microbiology*, ١٢٣(٣), ٥٧٠-٥٨١.
- **Janicijevic,** K. M., Kocic, S., Radovanovic, S., Vasiljevic, D., Djonovic, N., & Vulovic, T. S. (٢٠١٧). PREVENTION OF ADENOVIRAL EYE INFECTION-REVIEW. *SANAMED*, ١٢(١), ٥١-٥٦.
- **Jarraud,** S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., ... & Vandenesch, F. (٢٠٠٢). Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection and immunity*, ٧٠(٢), ٦٣١-٦٤١.
- **Jasim,** R. A., & Jasim, R. M. (٢٠٢٠). ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC BACTERIA INFECTION AND TREATMENT BY ACTIVE SUBSTANCES ISOLATED FROM AGARICUS BISPORUS FUNGI. *Plant Archives*, ٢٠(١), ٢٧٣٢-٢٧٣٥.
- **Jenul, C., & Horswill,** A. R. (٢٠١٩). Regulation *of Staphylococcus aureu*s virulence. *Microbiology spectrum*, ١(٢), ٧-٢.
- **Johnson**, D., Liu, D., & Simel, D. (٢٠٢٢). Does this patient with acute infectious conjunctivitis have a bacterial infection?: the rational clinical examination systematic review. *JAMA*, ٣٢٧(٢٢), ٢٢٣١-٢٢٣٧.
- **Johnson,** W. L., Sohn, M. B., Taffner, S., Chatterjee, P., Dunman, P. M., Pecora, N., & Wozniak, R. A. (٢٠٢١). Genomics of *Staphylococcus aureus* ocular isolates. *PloS one*, ١٦(٥), e٠٢٥٠٩٧٥.
- **Juhong,** J., Mordmuang, A., Jewboonchu, J., Rattanathamma, P., Narkkul, U., Karnjana, K., & Udomwech, L. (٢٠٢٢). Rub and Rinse

Contact Lenses Before Wearing as a Protective Regimen Against Contact Lens-Related Eye Infections. *Clinical Ophthalmology*, ٥٦٧-٥٧٧.

- **Kadim**, D., & Abed, K. (٢٠٢٢). Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Iraqi patients: Literature Review. *مجلة العلوم الأساسية*, ٢٢١-٢٣٢.
- **Kalló,** G., Varga, A. K., Szabó, J., Emri, M., Tőzsér, J., Csutak, A., & Csősz, É. (٢٠٢١). Reduced Level of Tear Antimicrobial and Immunomodulatory Proteins as a Possible Reason for Higher Ocular Infections in Diabetic Patients. *Pathogens*, ١٠(٧), ٨٨٣.
- **Karaca, I**., Selver, O. B., Palamar, M., Egrilmez, S., Aydemir, S., & Yagci, A. (٢٠٢٠). Contact Lens–Associated Microbial Keratitis in a Tertiary Eye Care Center in Turkey. *Eye & Contact Lens*, ٤٦(٢), ١١٠-١١٥.
- **Kareem** Rhumaid, A., Alak Mahdi Al-Buhilal, J., AL-Rubaey, N. K., & Yassen AL-Zamily, K. (٢٠٢٢). Prevalence and antibiotic susceptibility of pathogenic bacteria associated with ocular infections in adult patients. *Archives of Razi Institute*, ٧٧(٥), ١٩١٧-١٩٢٤.
- **Karring,** H., Thøgersen, I. B., Klintworth, G. K., Enghild, J. J., & Møller-Pedersen, T. (٢٠٠٤). Proteomic analysis of the soluble fraction from human corneal fibroblasts with reference to ocular transparency. *Molecular & Cellular Proteomics*, ٣(٧), ٦٦٠-٦٧٤.
- **Kashir,** J., & Yaqinuddin, A. (٢٠٢٠). Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-١٩. *Medical hypotheses*, ١٤١, ١٠٩٧٨٦.
- **Katz,** D. S. (٢٠١٠). Coagulase test protocol. *American Society for Microbiology Laboratory Protocols. Available online: https://www. asmscience. org/content/education/protocol/protocol*, ٣٢٢٠.

- **Kels,** B. D., Grzybowski, A., & Grant-Kels, J. M. (٢٠١٥). Human ocular anatomy. Clinics in dermatology, ٣٣(٢), ١٤٠-١٤٦.
- **Kessler, E., & Safrin,** M. (٢٠١٤). Elastinolytic and proteolytic enzymes. In *Pseudomonas Methods and Protocols* (pp. ١٣٥-١٦٩). Humana Press, New York, NY.
- **Khalil,** M. A., & Sonbol, F. I. (٢٠١٤). Investigation of biofilm formation on contact eye lenses caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, ١٧(٦), ٧٧٦-٧٨٤.
- **Khalil, Z.** K., Dewan, E. K., Ali, T. M., & Al-Kamil, S. S. (٢٠١٧). Prevalence and Identification of Some Ocular Bacterial Infections in Baghdad City. *Iraqi Journal of Science*, ٢٠٦١-٢٠٦٩.
- **Khan,** M. A., & Steiner, T. S. (٢٠٠٢). Mechanisms of emerging diarrheagenic Escherichia coli infection. *Current Infectious Disease Reports*, ٤(٢), ١١٢-١١٧.
- **Khanna,** A., Khanna, M., & Aggarwal, A. (٢٠١٣). Serratia marcescens-a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, ٧(٢), ٢٤٣.
- **Khashei,** R., Malekzadegan, Y., Sedigh Ebrahim-Saraie, H., & Razavi, Z. (٢٠١٨). Phenotypic and genotypic characterization of macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance among clinical isolates of *staphylococci* in southwest of Iran. *BMC Research Notes*, ١١(١), ١-٦.
- **Khattab,** M. A., Nour, M. S., & ElSheshtawy, N. M. (٢٠١٥). Genetic identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes among different isolates. *J Microb* Biochem *Technol*, ٧(٥), ٢٧٤-٧.
- **Khosravi**, A. D., Shafie, F., Montazeri, E. A., & Rostami, S. (٢٠١٦). The frequency of genes encoding exotoxin A and exoenzyme S in

Pseudomonas aeruginosa strains isolated from burn patients. *Burns*, ٤٢(٥), ١١١٦-١١٢٠.

- **Kłos,** M., Pomorska-Wesołowska, M., Romaniszyn, D., Chmielarczyk, A., & Wójkowska-Mach, J. (٢٠١٩). Epidemiology, Drug Resistance, and Virulence of Isolated from Ocular Infections in Polish Patients. *Polish Journal of Microbiology*, ٦٨(٤), ٥٤١-٥٤٨.
- **Klotz**, S. A., Penn, C. C., Negvesky, G. J., & Butrus, S. I. (٢٠٠٠). Fungal and parasitic infections of the eye. *Clinical microbiology reviews*, ١٣(٤), ٦٦٢-٦٨٥.
- **Knop,** E., & Knop, N. (٢٠٠٧). Anatomy and immunology of the ocular surface. *Immune Response and the Eye*, ٩٢, ٣٦-٤٩.
- **Koch**, G., Yepes, A., Förstner, K. U., Wermser, C., Stengel, S. T., Modamio, J., ... & Lopez, D. (٢٠١٤). Evolution of resistance to a last-resort antibiotic in *Staphylococcus aureus* via bacterial competition. *Cell*, ١٥٨(٥), ١٠٦٠-١٠٧١.
- **Kong,** C., Neoh, H. M., & Nathan, S. (٢٠١٦). Targeting Staphylococcus aureus toxins: a potential form of anti-virulence therapy. *Toxins*, ٨(٣), ٧٢.
- **Kord,** M., Ardebili, A., Jamalan, M., Jahanbakhsh, R., Behnampour, N., & Ghaemi, E. A. (٢٠١٨). Evaluation of biofilm formation and presence of ica genes in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Osong public health and research perspectives*, ٩(٤), ١٦٠.
- **Kowalski,** R. P., Nayyar, S. V., Romanowski, E. G., & Jhanji, V. (٢٠٢٢). Anti-Infective Treatment and Resistance Is Rarely Problematic with Eye Infections. *Antibiotics*, ١١(٢), ٢٠٤.
- **Kumurya,** A. S., & Lawan, K. A. (٢٠٢٣). Prevalence of Bacterial Ocular Infections among Patients Attending Eye Clinic of Aminu Kano Teaching Hospital and Murtala Muhammad Specialist

Hospital, Kano. In *Eye Diseases-Recent Advances, New Perspectives and Therapeutic Options*. IntechOpen.

- **Leal** Jr, S. M., Rodino, K. G., Fowler, W. C., & Gilligan, P. H. (٢٠٢١). Practical guidance for clinical microbiology laboratories: diagnosis of ocular infections. Clinical Microbiology Reviews, ٣٤(٣), e٠٠٠٧٠-١٩.
- **Lee**, J. H., Kim, Y. G., Yong Ryu, S., & Lee, J. (٢٠١٦). Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of Staphylococcus aureus. *Scientific reports*, ٦(١), ١٩٢٦٧.
- **Lenchenko,** E., Blumenkrants, D., Sachivkina, N., Shadrova, N., & Ibragimova, A. (٢٠٢٠). Morphological and adhesive properties of Klebsiella pneumoniae biofilms. *Veterinary world*, ١٣(١), ١٩٧.
- **Leung,** A. K., Hon, K. L., Wong, A. H., & Wong, A. S. (٢٠١٨). Bacterial conjunctivitis in childhood: etiology, clinical manifestations, diagnosis, and management. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, ١٢(٢), ١٢٠-١٢٧.
- **Levinson,** W. (٢٠١٤). *Review of medical microbiology and immunology*. McGraw-Hill Education.
- **Li,** J. J., Yi, S., & Wei, L. (٢٠٢٠). Ocular microbiota and intraocular inflammation. *Frontiers in Immunology*, ١١, ٦٠٩٧٦٥.
- **Liang,** Q., Lu, X., Wang, M., Tian, L., Labbé, A., & Hu, A. (٢٠١٦). Study of infectious conjunctivitis among children in rural areas of Qinghai province. *Science China Life Sciences*, ٥٩, ٥٤٨-٥٥٤.
- **Lin,** A., Rhee, M. K., Akpek, E. K., Amescua, G., Farid, M., Garcia-Ferrer, F. J., ... & Mah, F. S. (٢٠١٩). Bacterial keratitis preferred practice pattern®. *Ophthalmology*, ١٢٦(١), P١-P٥٥.
- **Liu**, Q., Han, L., Li, B., Sun, J., & Ni, Y. (٢٠١٢). Virulence characteristic and MLST-agr genetic background of high-level

mupirocin-resistant, MRSA isolates from Shanghai and Wenzhou, China. *PloS one*, ١٧(٥), e٣٧٠٠٥.

- **Livingston,** E. T., Mursalin, M. H., & Callegan, M. C. (٢٠١٩). A pyrrhic victory: The PMN response to ocular bacterial infections. *Microorganisms*, ٧(١١), ٥٣٧.
- **Lu,** L. J., & Liu, J. (٢٠١٦). Focus: microbiome: human microbiota and ophthalmic disease. *The Yale journal of biology and medicine*, ٨٩(٣), ٣٢٥.
- **M Raoof**, W., M Mohamad, A., & W Al-Omari, A. (٢٠١٣). Detection of biofilm formation in some pathogenic bacteria using tube and congo red agar methods. *Rafidain Journal of science*, ٢٤(١٢), ٥٥-٦٥.
- **MacFaddin,** J.F. (٢٠٠٠). Biochemical tests for identification of medical bacteria. ٣nd ed. the Williams and Wilkins. London.
- **MacWilliams,** M. P. (٢٠٠٩). Citrate test protocol. *American Society for Microbiology*.
- **MacWilliams,** M. P. (٢٠١٢). Indole test protocol. *American Society for Microbiology, Washington, DC*.
- **Mahdi**, M. A., Abd Al-Abbas, M. J., & Alsamak, A. M. (٢٠٢١). Biofilm Forming Bacteria Isolated From Human Eye Conjunctivitis and Keratitis Cases and their Ability to Adhere on Contact Lenses in vitro. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, ١٥(٣), ١٠٠٥-١٠١٢.
- **Mahlen,** S. D. (٢٠١١). *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clinical microbiology reviews*, ٢٤(٤), ٧٥٥-٧٩١.
- **Majeed,** S. N., & Zaman, N. A. (٢٠٢٠). *Adenovirus* and Bacterial Pathogens Isolated from Eye Infections. *Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, ١١(٤), ٥٣٨-٥٤١.

- **Mamman**, G. P., Angulu, C. N., Musa, G., & Angulu, S. (٢٠٢٢). Identification and antibiotic susceptibility profile of methicillin and erythromycin resistant genes in clinical and environmental strains of *Staphylococcus aureus* in Minna Nigeria. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, ١٥(١), ١٩٥-٢٠١.
- **Marinos,** E., Cabrera-Aguas, M., & Watson, S. L. (٢٠١٩). Viral conjunctivitis: a retrospective study in an Australian hospital. *Contact Lens and Anterior Eye*, ٤٢(٦), ٦٧٩-٦٨٤.
- **Mariotti,** S. P., Pascolini, D., & Rose-Nussbaumer, J. (٢٠٠٩). Trachoma: global magnitude of a preventable cause of blindness. *British Journal of Ophthalmology*, ٩٣(٥), ٥٦٣-٥٦٨.
- **Markey,** B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (٢٠١٣). *Clinical veterinary microbiology e-book*. Elsevier Health Sciences.
- **Martin,** R. M., & Bachman**,** M. A. (٢٠١٨). Colonization, infection, and the accessory genome of Klebsiella pneumoniae. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, ٨, ٤.
- **Matar**, G. M., Ramlawi, F., Hijazi, N., Khneisser, I., & Abdelnoor, A. M. (٢٠٠٢). Transcription levels of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A gene and severity of symptoms in patients with otitis externa. *Current Microbiology*, ٤٥, ٣٥٠-٣٥٤.
- **Math**, S. S., & Rauth, S. G. (٢٠١٩). Study of organisms isolation from acute bacterial conjunctivitis cases. *Indian Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology*, ٥(٣), ٣١٨-٣٢١.
- **Mathur,** T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T., & Rattan, A. (٢٠٠٦). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian journal of medical microbiology*, ٢٤(١), ٢٥-٢٩.

- **May,** A. K., Gleason, T. G., Sawyer, R. G., & Pruett, T. L. (٢٠٠٠). Contribution of *Escherichia coli* alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. *Infection and immunity*, ٦٨(١), ١٧٦-١٨٣.
- **Mazin,** O. M., Lemya, A. K., & Samah, O. M. (٢٠١٦). External ocular bacterial infections among Sudanese children at Khartoum State, Sudan. African Journal of Microbiology Research, ١٠(٤٠), ١٦٩٤-١٧٠٢.
- **McDevitt,** S. (٢٠٠٩). Methyl red and voges-proskauer test protocols. *American Society for Microbiology*, ٨.
- **Michalska**, M., & Wolf, P. (٢٠١٥). *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in microbiology*, ٦, ٩٦٣.
- **Milivojevic**, D., Šumonja, N., Medić, S., Pavic, A., Moric, I., Vasiljevic, B., ... & Nikodinovic-Runic, J. (٢٠١٨). Biofilm-forming ability and infection potential of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animals and humans. *Pathogens and Disease*, ٧٦(٤), fty٠٤١.
- **Misra**, S. L., Braatvedt, G. D., & Patel, D. V. (٢٠١٦). Impact of diabetes mellitus on the ocular surface: a review. *Clinical & experimental ophthalmology*, ٤٤(٤), ٢٧٨-٢٨٨.
- **Mittal,** R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., & Harjai, K. (٢٠٠٩). Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Journal of infection and public health*, ٢(٣), ١٠١-١١١.
- **Mirzaee**, M., Najar Peerayeh, S., & Ghasemian, A. M. (٢٠١٤). Detection of icaABCD genes and biofilm formation in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Pathology*, ٩(٤), ٢٥٧-٢٦٢.

- **Mohamed**, M. S., Mostafa, H. M., Mohamed, S. H., Abd El-Moez, S. I., & Kamel, Z. (٢٠٢٠). Combination of silver nanoparticles and vancomycin to overcome antibiotic resistance in planktonic/biofilm cell from clinical and animal source. *Microbial Drug Resistance*, ٢٦(١١), ١٤١٠-١٤٢٠.
- **Mohamed,** S., Elmohamady, M. N., Abdelrahman, S., Amer, M. M., & Abdelhamid, A. G. (٢٠٢٠). Antibacterial effects of antibiotics and cell-free preparations of probiotics against *Staphylococcus aureus* and Staphylococcus epidermidis associated with conjunctivitis. *Saudi Pharmaceutical Journal*, ٢٨(١٢), ١٥٥٨-١٥٦٥.
- **Mohammed,** A. A., Ali, M. M., & Zenebe, M. H. (٢٠٢٠). Bacterial etiology of ocular and periocular infections, antimicrobial susceptibility profile and associated factors among patients attending eye unit of Shashemene comprehensive specialized hospital, Shashemene, Ethiopia. *BMC ophthalmology*, ٢٠(١), ١-٨.
- **Mokhtari, A., & Amini, K**. (٢٠١٩). Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains as a multidrug resistant (MDR) bacterium and evaluating the prevalence of ESBLs and some virulence factors encoding genes by PFGE and ERIC-PCR methods. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, ١٨(٣), ١٥٨٠.
- **Monecke,** S., Jatzwauk, L., Müller, E., Nitschke, H., Pfohl, K., Slickers, P., ... & Ehricht, R. (٢٠١٦). Diversity of SCC mec elements in *Staphylococcus aureus* as observed in South-Eastern Germany. *PLoS One*, ١١(٩), e٠١٦٢٦٥٤.
- **Monteiro**, A. D. S., Pinto, B. L., Monteiro, J. D. M., Ferreira, R. M., Ribeiro, P. C., Bando, S. Y., ... & Abreu, A. G. (٢٠١٩). Phylogenetic and molecular profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bloodstream infections in Northeast Brazil. *Microorganisms*, ٧(٧), ٢١٠.

- **Moraveji**, Z., Tabatabaei, M., Aski, H. S., & Khoshbakht, R. (٢٠١٤). Characterization of hemolysins of *Staphylococcus* strains isolated from human and bovine, southern Iran. *Iranian journal of veterinary research*, ١٥(٤), ٣٢٦.
- **Morin**, C. D., Déziel, E., Gauthier, J., Levesque, R. C., & Lau, G. W. (٢٠٢١). An organ system-based synopsis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Virulence*, ١٢(١), ١٤٦٩-١٥٠٧.
- **Mohager,** M. O., Kaddam, L. A., & Mohager, S. O. (٢٠١٦). External ocular bacterial infections among Sudanese children at Khartoum State, Sudan. *African Journal of Microbiology Research*, ١٠(٤٠), ١٦٩٤-١٧٠٢.
- **Motamedi,** H., Asghari, B., Tahmasebi, H., & Arabestani, M. R. (٢٠١٨). Identification of hemolysine genes and their association with antimicrobial resistance pattern among clinical isolates of Staphylococcus aureus in West of Iran. *Advanced biomedical research*, ٧.
- **Moustafa**, D. A., Wu, A. W., Zamora, D., Daly, S. M., Sturge, C. R., Pybus, C., ... & Greenberg, D. E. (٢٠٢١). Peptide-conjugated phosphorodiamidate morpholino oligomers retain activity against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in vitro and in vivo. *MBio*, ١٢(١), e٠٢٤١١-٢٠.
- **Muluye,** D., Wondimeneh, Y., Moges, F., Nega, T., & Ferede, G. (٢٠١٤). Types and drug susceptibility patterns of bacterial isolates from eye discharge samples at Gondar University Hospital, Northwest Ethiopia. *BMC research notes*, ٧, ١-٥.
- **Muntz,** A., Sandford, E., Claassen, M., Curd, L., Jackson, A. K., Watters, G., ... & Craig, J. P. (٢٠٢١). Randomized trial of topical periocular castor oil treatment for blepharitis. *The Ocular Surface*, ١٩, ١٤٥-١٥٠.

- **Murugan,** K., Usha, M., Malathi, P., Al-Sohaibani, A. S., & Chandrasekaran, M. (٢٠١٠). Biofilm forming multi drug resistant *Staphylococcus spp*. among patients with conjunctivitis. *Polish Journal of Microbiology*, ٥٩(٤), ٢٣٣.
- **Naik,** M. N., Vasanthapuram, V. H., Joseph, J., & Murthy, S. I. (٢٠١٩). Microbial keratitis in thyroid eye disease: clinical features, microbiological profile, and treatment outcome. *Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery*, ٣٥(٦), ٥٤٣-٥٤٨.
- **Naik**, P., Pandey, S., Gagan, S., Biswas, S., & Joseph, J. (٢٠٢١). Virulence factors in multidrug (MDR) and Pan-drug resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa*: a cross-sectional study of isolates recovered from ocular infections in a high-incidence setting in southern India. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, ١١(١), ١-١١.
- **Naji** Hasan, R., & Abdal Kareem Jasim, S. (٢٠٢١). Detection of Panton-Valentine leukocidin and *MecA* Genes in Staphylococcus aureus isolated from Iraqi Patients. *Archives of Razi Institute*, ٧٦(٤), ١٠٥٤-١٠٥٩.
- **Nam**, E. H., Chung, T. H., Kim, J. H., Park, S. H., Kim, H. E., Youn, H. Y., ... & Hwang, C. Y. (٢٠١١). Profile of the *Staphylococcal* Exotoxin Gene and its Relation with Canine Atopic Dermatitis. *Journal of Veterinary Clinics*, ٢٨(٢), ١٩٦-٢٠٣.
- **Nasirmoghadas**, P., Yadegari, S., Moghim, S., Esfahani, B. N., Fazeli, H., Poursina, F., ... & Safaei, H. G. (٢٠١٨). Evaluation of biofilm formation and frequency of multidrug-resistant and extended drug-resistant strain in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Isfahan. *Advanced Biomedical Research*, ٧.
- **Nattis**, A., Perry, H. D., Rosenberg, E. D., & Donnenfeld, E. D. (٢٠١٩). Influence of bacterial burden on meibomian gland

dysfunction and ocular surface disease. *Clinical Ophthalmology*, ١٢٢٥-١٢٣٤.

- **Nayak,** N., Satpathy, G., Nag, H. L., Venkatesh, P., Ramakrishnan, S., Nag, T. C., & Prasad, S. (٢٠١١). Slime production is essential for the adherence of *Staphylococcus epidermidis* in implant-related infections. *Journal of Hospital Infection*, ٧٦(٢), ١٥٣-١٥٦.
- **Nazari-Alam,** A., Badie, F., Shaeri, M., Moniri, R., Akbari, H., & Mansoori, M. (٢٠٢١). The Bacterial Profile and Microbial Susceptibility of Acute and Chronic Dacryocystitis in Matini Hospital, Kashan, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, ١٤(٥).
- **Nemati,** M., Hermans, K., Devriese, L. A., Maes, D., & Haesebrouck, F. (٢٠٠٩). Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from poultry. *Avian Pathology*, ٣٨(٦), ٥١٣-٥١٧.
- **Niederstebruch**, N., Sixt, D., Benda, B. I., & Banboye, N. (٢٠١٧). A suitable blood agar containing human blood especially for the use in laboratories of developing countries. *The Journal of Infection in Developing Countries*, ١١(٠٥), ٣٩٩-٤٠٦.
- **Norddine,** H., Ghita, B., Younes, Z., Abdallah, N., Nourichafi, N., Mifdal, H., ... & Mounia, O. (٢٠١٠). Analyses of the effect of para-phenylenediamine Takaout roumia on the osmotic stability of human erythrocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, ٢(٧), ١٠١-١٠٧.
- **O'Callaghan,** R. J. (٢٠١٨). The pathogenesis of *Staphylococcus aureus* eye infections. *Pathogens*, ٧(١), ٩.
- **O'Callaghan,** R. J., Callegan, M. C., Moreau, J. M., Green, L. C., Foster, T. J., Hartford, O. M., ... & Hill, J. M. (١٩٩٧). Specific roles of alpha-toxin and beta-toxin during *Staphylococcus aureus* corneal infection. *Infection and immunity*, ٦٥(٥), ١٥٧١-١٥٧٨.

- **Odumosu,** B. T., Adeniyi, B. A., & Chandra, R. (٢٠١٣). Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa from* Southwest Nigeria. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, ١٢(١), ١-٧.
- **Ondusko**, D. S., & Nolt, D. (٢٠١٨). Staphylococcus aureus. *Pediatrics in review*, ٣٩(٦), ٢٨٧-٢٩٨.
- **Osei** Duah Junior, I., Tchiakpe, M. P., Borquaye, L. S., Amoah, K., Amankwah, F. K. D., Kumah, D. B., ... & Akuffo, K. O. (٢٠٢٢). Clinical characteristics of external bacterial ocular and periocular infections and their antimicrobial treatment patterns among a Ghanaian ophthalmic population. *Scientific Reports*, ١٢(١), ١٠٢٦٤.
- **Otto,** M. (٢٠٠٩). Staphylococcus epidermidis—the'accidental'pathogen. *Nature reviews microbiology*, ٧(٨), ٥٥٥-٥٦٧.
- **Otto,** M. (٢٠١٢, March). Molecular basis of Staphylococcus epidermidis infections. In *Seminars in immunopathology* (Vol. ٣٤, No. ٢, pp. ٢٠١-٢١٤). Springer-Verlag.
- **Otto,** M. (٢٠١٤). Staphylococcus aureus toxins. *Current opinion in microbiology*, ١٧, ٣٢-٣٧.
- **Ozkan,** J., Willcox, M., & Coroneo, M. (٢٠٢٢). A comparative analysis of the cephalic microbiome: The ocular, aural, nasal/nasopharyngeal, oral and facial dermal niches. *Experimental Eye Research*, ٢٢٠, ١٠٩١٣٠.
- **Ozkan,** J., Willcox, M., Wemheuer, B., Wilcsek, G., Coroneo, M., & Thomas, T. (٢٠١٩). Biogeography of the human ocular microbiota. *The ocular surface*, ١٧(١), ١١١-١١٨.

- **Paczosa**, M. K., & Mecsas, J. (٢٠١٦). Klebsiella pneumoniae: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, ٨٠(٣), ٦٢٩-٦٦١.
- **Palomar,** A. P. D., Montolío, A., Cegoñino, J., Dhanda, S. K., Lio, C. T., & Bose, T. (٢٠١٩). The innate immune cell profile of the cornea predicts the onset of ocular surface inflammatory disorders. *Journal of clinical medicine*, ٨(١٢), ٢١١٠.
- **Pandita**, A., & Merriman, M. (٢٠١٢). Ocular trauma epidemiology: ١٠-year retrospective study. *The New Zealand Medical Journal (Online)*, ١٢٥(١٣٤٨).
- **Peng,** M. Y., Cevallos, V., McLeod, S. D., Lietman, T. M., & Rose-Nussbaumer, J. (٢٠١٨). Bacterial keratitis: isolated organisms and antibiotic resistance patterns in San Francisco. *Cornea*, ٣٧(١), ٨٤. **Peragallo,** J., Biousse, V., & Newman, N. J. (٢٠١٣). Ocular manifestations of drug and alcohol abuse. *Current opinion in ophthalmology*, ٢٤(٦), ٥٦٦.
- **Peral,** A., Alonso, J., García-García, C., Niño-Rueda, C., & Del Bosque, P. C. (٢٠١٦). Importance of lid hygiene before ocular surgery: qualitative and quantitative analysis of eyelid and conjunctiva microbiota. *Eye & Contact Lens*, ٤٢(٦), ٣٦٦.
- **Perez,** V. L., Saeed, A. M., Tan, Y., Urbieta, M., & Cruz-Guilloty, F. (٢٠١٣). The eye: a window to the soul of the immune system. *Journal of autoimmunity*, ٤٥, ٧-١٤.
- **Peterson,** J. C., Durkee, H., Miller, D., Maestre-Mesa, J., Arboleda, A., Aguilar, M. C., ... & Alfonso, E. (٢٠١٩). Molecular epidemiology and resistance profiles among healthcare-and community-associated Staphylococcus aureus keratitis isolates. *Infection and drug resistance*, ٨٣١-٨٤٣.

- **Petrillo,** F., Folliero, V., Santella, B., Franci, G., Foglia, F., Trotta, M. C., ... & Galdiero, M. (٢٠٢٠). Prevalence and antibiotic resistance patterns of ocular bacterial strains isolated from pediatric patients in University Hospital Of Campania "Luigi Vanvitelli," Naples, Italy. *International Journal of Microbiology*, ٢٠٢٠, ١-٦.
- **Petrillo,** F., Pignataro, D., Di Lella, F. M., Reibaldi, M., Fallico, M., Castellino, N., ... & Boccia, G. (٢٠٢١). Antimicrobial susceptibility patterns and resistance trends of staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci strains isolated from ocular infections. *Antibiotics*, ١٠(٥), ٥٢٧.
- **Petrillo,** F., Pignataro, D., Lavano, M. A., Santella, B., Folliero, V., Zannella, C., ... & Galdiero, M. (٢٠٢٠). Current evidence on the ocular surface microbiota and related diseases. *Microorganisms*, ٨(٧), ١٠٣٣.
- **Pfeifer**, Y., Cullik, A., & Witte, W. (٢٠١٠). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International journal of medical microbiology*, ٣٠٠(٦), ٣٧١-٣٧٩.
- **Pflugfelder,** S. C., Karpecki, P. M., & Perez, V. L. (٢٠١٤). Treatment of blepharitis: recent clinical trials. *The ocular surface*, ١٢(٤), ٢٧٣-٢٨٤.
- **Pickering,** H., Palmer, C. D., Houghton, J., Makalo, P., Joof, H., Derrick, T., ... & Holland, M. J. (٢٠١٩). Conjunctival microbiome-host responses are associated with impaired epithelial cell health in both early and late stages of trachoma. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, ٩, ٢٩٧.
- **Pillar,** C. M., & Hobden, J. A. (٢٠٠٢). Pseudomonas aeruginosa exotoxin A and keratitis in mice. *Investigative ophthalmology & visual science*, ٤٣(٥), ١٤٣٧-١٤٤٤.

- **Pincus**, D. H. (٢٠٠٦). Microbial identification using the bioMérieux Vitek® ٢ system. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association*, ١-٣٢.
- **Poirel,** L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (٢٠١٨). Antimicrobial resistance in Escherichia coli. *Microbiology Spectrum*, ٦(٤), ٦-٤.
- **Pontes,** M. H., & Groisman, E. A. (٢٠٢٠). A physiological basis for nonheritable antibiotic resistance. *MBio*, ١١(٣), e٠٠٨١٧-٢٠.
- **Potron,** A., Poirel, L., & Nordmann, P. (٢٠١٥). Emerging broad-spectrum resistance in Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology. *International journal of antimicrobial agents*, ٤٥(٦), ٥٦٨-٥٨٥.
- **Procop,** G. W., Church, D. L., Hall, G. S., & Janda, W. M. (٢٠٢٠). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Jones & Bartlett Learning.
- **Putnam,** C. M. (٢٠١٦). Diagnosis and management of blepharitis: an optometrist's perspective. *Clinical Optometry*, ٨, ٧١.
- **Putra,** A. R., Effendi, M. H., Koesdarto, S., Suwarno, S., Tyasningsih, W., & Estoepangestie, A. T. (٢٠٢٠). Detection of the extended spectrum β-lactamase produced by Escherichia coli from dairy cows by using the Vitek-٢ method in Tulungagung regency, Indonesia. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, ٣٤(١), ٢٠٣-٢٠٧.
- **Rae,** N., Kenny, C., & Muldoon, E. G. (٢٠١٩). Can intravenous antifungal therapy be safely used in the outpatient parenteral antimicrobial therapy (OPAT) setting?. *Mycoses*, ٦٢(٣), ١٩٦-٢٠٣.
- **Rahama,** H. A., Ali, Q. A. N., & Mustafa, A. A. (٢٠١٧). Molecular Study of Most Common Pathogenic Bacteria Isolated From Conjunctivitis Patients In Baghdad. *Al-Kufa University Journal for Biology*, ٩(٣).

- **Raksha,** L., Gangashettappa, N., Shantala, G. B., Nandan, B. R., & Sinha, D. (٢٠٢٠). Study of biofilm formation in bacterial isolates from contact lens wearers. *Indian Journal of Ophthalmology*, ٦٨(١), ٢٣.
- **Ranjith,** K., Arunasri, K., Reddy, G. S., Adicherla, H., Sharma, S., & Shivaji, S. (٢٠١٧). Global gene expression in Escherichia coli, isolated from the diseased ocular surface of the human eye with a potential to form biofilm. *Gut Pathogens*, ٩(١), ١-١٥.
- **Ranjith,** K., Ramchiary, J., Prakash, J. S., Arunasri, K., Sharma, S., & Shivaji, S. (٢٠١٩). Gene targets in ocular pathogenic Escherichia coli for mitigation of biofilm formation to overcome antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*, ١٠, ١٣٠٨.
- **Ratajczak,** M., Kaminska, D., Dlugaszewska, J., & Gajecka, M. (٢٠٢١). Antibiotic resistance, biofilm formation, and presence of genes encoding virulence factors in strains isolated from the pharmaceutical production environment. *Pathogens*, ١٠(٢), ١٣٠.
- **Redfern,** R. L., & McDermott, A. M. (٢٠١٠). Toll-like receptors in ocular surface disease. *Experimental eye research*, ٩٠(٦), ٦٧٩-٦٨٧.
- **Rehman,** A., Patrick, W. M., & Lamont, I. L. (٢٠١٩). Mechanisms of ciprofloxacin resistance in Pseudomonas aeruginosa: new approaches to an old problem. *Journal of Medical Microbiology*, ٦٨(١), ١-١٠.
- **Reiner,** K. (٢٠١٠). Catalase test protocol. *American society for microbiology*, ١-٦.
- **Ruiz-Roldán,** L., Rojo-Bezares, B., de Toro, M., López, M., Toledano, P., Lozano, C., ... & Sáenz, Y. (٢٠٢٠). Antimicrobial resistance and virulence of Pseudomonas spp. among healthy animals: Concern about exolysin ExlA detection. *Scientific reports*, ١٠(١), ١-١١.

- **Remington**, L. A., & Goodwin, D. (٢٠٢١). Clinical Anatomy and Physiology
- **Rodulfo,** H., Arcia, A., Hernández, A., Michelli, E., Martinez, D. D. V., Guzman, M., ... & Donato, M. D. (٢٠١٩). Virulence factors and integrons are associated with MDR and XDR phenotypes in nosocomial strains of Pseudomonas aeruginosa in a Venezuelan university hospital. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, ٦١.
- **Rohde,** M. (٢٠١٩). The Gram-positive bacterial cell wall. *Microbiology Spectrum*, ٧(٣), ٧-٣.
- **Rose,** W. E., & Rybak, M. J. (٢٠٠٦). Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, ٢٦(٨), ١٠٩٩-١١١٠.
- **Roy,** P., Ahmed, N. H., & Grover, R. K. (٢٠١٤). Non-pigmented strain of Serratia marcescens: an unusual pathogen causing pulmonary infection in a patient with malignancy. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, ٨(٦), DD٠٥.
- **Royer,** D. J., Montgomery, M. L., & Carr, D. J. (٢٠٢٠). Mucosal Regulatory System for Balanced Ocular Immunity. *Mucosal Vaccines*, ٢٩٩-٣١٢.
- **Sabouni,** F., Mahmoudi, S., Bahador, A., Pourakbari, B., Sadeghi, R. H., Ashtiani, M. T. H., ... & Mamishi, S. (٢٠١٤). Virulence factors of Staphylococcus aureus isolates in an Iranian referral children's hospital. *Osong public health and research perspectives*, ٥(٢), ٩٦-١٠٠.
- **Safain**, K. S. (٢٠٢٠). *Detection of antibiotic resistance spectrum and resistance genes for aminoglycoside, macrolide, and β-lactam antibiotics using wound swab samples* (Doctoral dissertation, Brac University).

- **Satpathy,** G., Behera, H. S., & Ahmed, N. H. (٢٠١٧). Chlamydial eye infections: Current perspectives. *Indian Journal of Ophthalmology*, ٦٥(٢), ٩٧.
- **Schilcher, K., & Horswill,** A. R. (٢٠٢٠). Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, ٨٤(٣), e٠٠٠٢٦-١٩.
- **Shanks,** R. M., Stella, N. A., Hunt, K. M., Brothers, K. M., Zhang, L., & Thibodeau, P. H. (٢٠١٥). Identification of SlpB, a cytotoxic protease from Serratia marcescens. *Infection and immunity*, ٨٣(٧), ٢٩٠٧-٢٩١٦.
- **Sharma,** S. K., Mudgal, N. K., Sharma, P., & Shrngi, B. N. (٢٠١٥). Comparison of phenotypic characteristics and virulence traits of Klebsiella pneumoniae obtained from pneumonic and healthy camels (Camelus dromedarius). *Adv. Anim. Vet. Sci*, ٣(٢), ١١٦-١٢٢.
- **Shields,** P., & Cathcart, L. (٢٠١٠). Oxidase test protocol. *American Society for Microbiology*, ١-٩.
- **Shin**, H., Price, K., Albert, L., Dodick, J., Park, L., & Dominguez-Bello, M. G. (٢٠١٦). Changes in the eye microbiota associated with contact lens wearing. *MBio*, ٧(٢), e٠٠١٩٨-١٦.
- **Singh,** R. B., Liu, L., Anchouche, S., Yung, A., Mittal, S. K., Blanco, T., ... & Dana, R. (٢٠٢١). Ocular redness–I: Etiology, pathogenesis, and assessment of conjunctival hyperemia. *The Ocular Surface*, ٢١, ١٣٤-١٤٤.
- **Sivaraman,** G. K., Muneeb, K. H., Sudha, S., Shome, B., Cole, J., & Holmes, M. (٢٠٢١). Prevalence of virulent and biofilm forming ST٨٨-IV-t٢٥٢٦ methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones circulating in local retail fish markets in Assam, India. *Food Control*, ١٢٧, ١٠٨٠٩٨.

- **Sklavounos,** A. A., Nemr, C. R., Kelley, S. O., & Wheeler, A. R. (٢٠٢١). Bacterial classification and antibiotic susceptibility testing on an integrated microfluidic platform. *Lab on a Chip*, ٢١(٢١), ٤٢٠٨-٤٢٢٢.
- **Snyder, I. S., & Koch,** N. A. (١٩٦٦). Production and characteristics of hemolysins of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, ٩١(٢), ٧٦٣-٧٦٧.
- **Solano**, D., Fu, L., & Czyz, C. N. (٢٠١٧). Viral conjunctivitis.
- **Sprague,** A. H., & Khalil, R. A. (٢٠٠٩). Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical pharmacology*, ٧٨(٦), ٥٣٩-٥٥٢.
- **Srimongkol,** G., Ditmangklo, B., Choopara, I., Thaniyavarn, J., Dean, D., Kokpol, S., ... & Somboonna, N. (٢٠٢٠). Rapid colorimetric loop-mediated isothermal amplification for hypersensitive point-of-care Staphylococcus aureus enterotoxin A gene detection in milk and pork products. *Scientific reports*, ١٠(١), ١-١١.
- **Stein**, G. E., & Babinchak, T. (٢٠١٣). Tigecycline: an update. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, ٧٥(٤), ٣٣١-٣٣٦.
- **Steward,** C. D., Raney, P. M., Morrell, A. K., Williams, P. P., McDougal, L. K., Jevitt, L., ... & Tenover, F. C. (٢٠٠٥). Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of Staphylococcus aureus. *Journal of clinical microbiology*, ٤٣(٤), ١٧١٦-١٧٢١.
- **Sthapit,** P. R., & Tuladhar, N. R. (٢٠١٤). Conjunctival flora of normal human eye. *JSM Ophthalmol*, ٢(٢), ١٠٢١.

- **Streeter,** K., & Katouli, M. (٢٠١٦). Pseudomonas aeruginosa: a review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment.
- **Streilein,** J. W., & Stein-Streilein, J. (٢٠٠٠). Does innate immune privilege exist? *Journal of leukocyte biology*, ٦٧(٤), ٤٧٩-٤٨٧.
- **Subedi,** D., Vijay, A. K., & Willcox, M. (٢٠١٨). Overview of mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: an ocular perspective. *Clinical and Experimental Optometry*, ١٠١(٢), ١٦٢-١٧١.
- **Subedi,** D., Vijay, A. K., & Willcox, M. (٢٠١٨). Study of disinfectant resistance genes in ocular isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Antibiotics*, ٧(٤), ٨٨.
- **Sun**, X., Lin, Z. W., Hu, X. X., Yao, W. M., Bai, B., Wang, H. Y., ... & Zheng, J. X. (٢٠١٨). Biofilm formation in erythromycin-resistant Staphylococcus aureus and the relationship with antimicrobial susceptibility and molecular characteristics. *Microbial pathogenesis*, ١٢٤, ٤٧-٥٣.
- **Suwansaksri**, J., Nithiuthai, S., Wiwanitkit, V., Soogarun, S., & Palatho, P. (٢٠٠٣). The formol-ether concentration technique for intestinal parasites: comparing ٠.١ N sodium hydroxide with normal saline preparations. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, ٣٣, ٩٧-٩٨.
- **Szemraj,** M., Grazul, M., Balcerczak, E., & Szewczyk, E. M. (٢٠٢٠). Staphylococcal species less frequently isolated from human clinical specimens-are they a threat for hospital patients?. *BMC Infectious Diseases*, ٢٠(١), ١-١٠.
- **Tang,** S. S., Apisarnthanarak, A., & Hsu, L. Y. (٢٠١٤). Mechanisms of β-lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major

community-and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Advanced drug delivery reviews*, ١٧١, ٣-١٣.

- **Tanom,** A., Farajnia, S., Peerayeh, S. N., & Majidi, J. (٢٠١٣). Cloning, expression and characterization of recombinant exotoxin A-flagellin fusion protein as a new vaccine candidate against Pseudomonas aeruginosa infections. *Iranian biomedical journal*, ١٧(١), ١.
- **Tarabishy,** A. B., & Jeng, B. H. (٢٠٠٨). Bacterial conjunctivitis: a review for internists. *Cleveland Clinic journal of medicine*, ٧٥(٧), ٥٠٧.
- **Taylor,** T. A., & Unakal, C. G. (٢٠٢٢). Staphylococcus aureus. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- **Tesfaye,** T., Beyene, G., Gelaw, Y., Bekele, S., & Saravanan, M. (٢٠١٣). Bacterial profile and antimicrobial susceptibility pattern of external ocular infections in Jimma University specialized hospital, Southwest Ethiopia. *American Journal of Infectious Diseases and Microbiology*, ١(١), ١٣-٢٠.
- **Teweldemedhin,** M., Gebreyesus, H., Atsbaha, A. H., Asgedom, S. W., & Saravanan, M. (٢٠١٧). Bacterial profile of ocular infections: a systematic review. *BMC ophthalmology*, ١٧(١), ١-٩.
- **Thibodeaux,** B. A., Caballero, A. R., Marquart, M. E., Tommassen, J., & O'Callaghan, R. J. (٢٠٠٧). Corneal virulence of Pseudomonas aeruginosa elastase B and alkaline protease produced by Pseudomonas putida. *Current eye research*, ٣٢(٤), ٣٧٣-٣٨٦
- **Tille,** P. (٢٠١٥). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- **Ting,** D. S. J., Ho, C. S., Deshmukh, R., Said, D. G., & Dua, H. S. (٢٠٢١). Infectious keratitis: an update on epidemiology, causative

microorganisms, risk factors, and antimicrobial resistance. *Eye*, ٣٥(٤), ١٠٨٤-١١٠١.

- **Truan,** D., Vasil, A., Stonehouse, M., Vasil, M. L., & Pohl, E. (٢٠١٣). High-level over-expression, purification, and crystallization of a novel phospholipase C/sphingomyelinase from Pseudomonas aeruginosa. *Protein expression and purification*, ٩٠(١), ٤٠-٤٦.
- **Tuft,** S., Somerville, T. F., Li, J. P. O., Neal, T., De, S., Horsburgh, M. J., ... & Kaye, S. (٢٠٢٢). Bacterial keratitis: identifying the areas of clinical uncertainty. *Progress in Retinal and Eye Research*, ٨٩, ١٠١٠٣١.
- **Tula**, M. Y., Filgona, J., Kyauta, S. E., & Elisha, R. (٢٠٢٣). Screening for some virulent factors among bacterial isolates from surfaces of hospital fomites and hands of healthcare workers. *Cellular, Molecular and Biomedical Reports*, ٣(١), ٩-١٦.
- **Uehara**, Y. (٢٠٢٢). Current Status of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCC mec). *Antibiotics*, ١١(١), ٨٦.
- **Vandenesch**, F., Lina, G., & Henry, T. (٢٠١٢). Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, ٢, ١٢.
- **Vasil,** M. L., Stonehouse, M. J., Vasil, A. I., Wadsworth, S. J., Goldfine, H., Bolcome III, R. E., & Chan, J. (٢٠٠٩). A complex extracellular sphingomyelinase of Pseudomonas aeruginosa inhibits angiogenesis by selective cytotoxicity to endothelial cells. *PLoS pathogens*, ٥(٥), e١٠٠٠٤٢٠.
- **Vola**, M. E., Moriyama, A. S., Lisboa, R., Vola, M. M., Hirai, F. E., Bispo, P. J. M., & Höfling-Lima, A. L. (٢٠١٣). Prevalence and antibiotic susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus

aureus in ocular infections. *Arquivos brasileiros de oftalmologia*, ٧٦, ٣٥٠-٣٥٣.

- **Vuong,** C., & Otto, M. (٢٠٠٢). Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes and infection*, ٤(٤), ٤٨١-٤٨٩.
- **Vuotto**, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F., ... & Varaldo, P. E. (٢٠١٧). Biofilm formation and antibiotic resistance in Klebsiella pneumoniae urinary strains. *Journal of applied microbiology*, ١٢٣(٤), ١٠٠٣-١٠١٨.
- **Wang,** B., Yang, S., Zhai, H. L., Zhang, Y. Y., Cui, C. X., Wang, J. Y., & Xie, L. X. (٢٠١٨). A comparative study of risk factors for corneal infection in diabetic and non-diabetic patients. *International journal of ophthalmology*, ١١(١), ٤٣.
- **Wang,** G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (٢٠٢٠). The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, ١٧(١٧), ٦٢٧٨.
- **Watson,** S., Cabrera-Aguas, M., & Khoo, P. (٢٠١٨). Common eye infections. *Australian prescriber*, ٤١(٣), ٦٧.

- **Wang,** H., Zhuang, H., Ji, S., Sun, L., Zhao, F., Wu, D., ... & Chen, Y. (٢٠٢١). Distribution of erm genes among MRSA isolates with resistance to clindamycin in a Chinese teaching hospital. *Infection, Genetics and Evolution*, ٩٦, ١٠٥١٢٧.
- **Wen,** X., Miao, L., Deng, Y., Bible, P. W., Hu, X., Zou, Y., ... & Wei, L. (٢٠١٧). The influence of age and sex on ocular surface microbiota in healthy adults. *Investigative ophthalmology & visual science*, ٥٨(١٤), ٦٠٣٠-٦٠٣٧.
- **Wilton,** M., Charron-Mazenod, L., Moore, R., & Lewenza, S. (٢٠١٦). Extracellular DNA acidifies biofilms and induces

aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, ٦٠(١), ٥٤٤-٥٥٣.

- **Wood,** M. J., & Leesbug, F. L. (٢٠١٠). Laboratory Manual for General Microbiology.
- **Xu,** S., Guo, D., Liu, X., Jin, X., Shi, Y., Wang, Y., ... & Zhang, H. (٢٠٢١). Ocular pathogens and antibiotic resistance in microbial keratitis over three years in Harbin, Northeast China. *Acta Ophthalmologica*, ٩٩(٨), ٩٠٩-٩١٥.
- **Yamaguchi**, T., Hirakawa, R., & Ochiai, H. (٢٠٢٣). Correlation between sphingomyelin and the membrane stability of mammalian erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, ٢٦٥, ١١٠٨٣٣.
- **Yazici,** B., Orucov, N., & Ibrahimzade, G. (٢٠١٧). Neonatal orbital abscess secondary to Pseudomonas Aeruginosa conjunctivitis. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, ٣٣(٣), e٦٤-e٦٦.
- **Yeu,** E., & Hauswirth, S. (٢٠٢٠). A review of the differential diagnosis of acute infectious conjunctivitis: implications for treatment and management. *Clinical Ophthalmology*, ٨٠٥-٨١٣.
- **Yeung,** J., Gadjeva, M., & Geddes-McAlister, J. (٢٠٢٠). Label-Free Quantitative Proteomics Distinguishes General and Site-Specific Host Responses to Pseudomonas aeruginosa Infection at the Ocular Surface. *Proteomics*, ٢٠(٢), ١٩٠٠٢٩٠.
- **Ying,** N. Y., Idris, N. S., Muhamad, R., & Ahmad, I. (٢٠٢١). Coronavirus disease ٢٠١٩ presenting as conjunctivitis. *Korean journal of family medicine*, ٤٢(٦), ٤٨٧.
- **Yousefi-Avarvand,** A., Khashei, R., Ebrahim-Saraie, H. S., Emami, A., Zomorodian, K., & Motamedifar, M. (٢٠١٥). The frequency of

exotoxin A and exoenzymes S and U genes among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Shiraz, Iran. *International journal of molecular and cellular medicine*, ٤(٣), ١٦٧..

- **Yu**, H., He, X., Xie, W., Xiong, J., Sheng, H., Guo, S., ... & Zhang, K. (٢٠١٤). Elastase LasB of Pseudomonas aeruginosa promotes biofilm formation partly through rhamnolipid-mediated regulation. *Canadian journal of microbiology*, ٦٠(٤), ٢٢٧-٢٣٥.
- **Zahedi Bialvaei**, A., Rahbar, M., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., & Samadi Kafil, H. (٢٠١٧). Linezolid: a promising option in the treatment of Gram-positives. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, ٧٢(٢), ٣٥٤-٣٦٤.
- **Zecconi, A., & Scali,** F. (٢٠١٣). Staphylococcus aureus virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. *Immunology letters*, ١٥٠(١-٢), ١٢-٢٢.
- **Zhang,** H., Zheng, Y., Gao, H., Xu, P., Wang, M., Li, A., ... & Du, H. (٢٠١٦). Identification and characterization of Staphylococcus aureus strains with an incomplete hemolytic phenotype. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, ٦, ١٤٦.
- **Zheng**, J., Shang, Y., Wu, Y., Wu, J., Chen, J., Wang, Z., ... & Yu, Z. (٢٠٢١). Diclazuril inhibits biofilm formation and hemolysis of Staphylococcus aureus. *ACS Infectious Diseases*, ٧(٦), ١٦٩٠-١٧٠١.
- **Zhgun,** A., Avdanina, D., Shumikhin, K., Simonenko, N., Lyubavskaya, E., Volkov, I., & Ivanov, V. (٢٠٢٠). Detection of potential biodeterioration risks for tempera painting in ١٦th century exhibits from State Tretyakov Gallery. *PLoS One*, ١٥(٤), e٠٢٣٠٥٩١.
- **Zhong,** W. X., Sun, S. Y., Zhao, J., Shi, W. Y., & Xie, L. X. (٢٠٠٧). Retrospective study of suppurative keratitis in ١٠٥٤ patients. *[Zhonghua yan ke za zhi] Chinese journal of ophthalmology*, ٤٣(٣), ٢٤٥-٢٥٠.

- **Zhou,** Y., Wang, X., Shen, J., Lu, Z., & Liu, Y. (٢٠١٨). Endogenous Endophthalmitis caused by Carbapenem-resistant Hypervirulent Klebsiella Pneumoniae: a case report and literature review. *Ocular Immunology and Inflammation*.
- **Zhu,** Q., Yang, B., Deng, N., Li, Y., Wang, T., Qi, H., & Liu, L. (٢٠١٨). The use of contact lenses among university students in Chengdu: Knowledge and practice of contact lens wearers. *Contact Lens and Anterior Eye*, *٤١*(٢), ٢٢٩-٢٣٣.
- **Zilliox**, M. J., Gange, W. S., Kuffel, G., Mores, C. R., Joyce, C., de Bustros, P., & Bouchard, C. S. (٢٠٢٠). Assessing the ocular surface microbiome in severe ocular surface diseases. *The ocular surface*, *١٨*(٤), ٧٠٦-٧١٢.
- **Zuberi**, S. N., & Nadeem, S. G. (٢٠١٧). Detection of biofilm forming ability of bacterial isolates from contact lenses and their accessories. *J Bacteriol. Parasitol*, *٨*(٥), ٣٢١.
- **Zurita,** J., Mejía, C., & Guzmán-Blanco, M. (٢٠١٠). Diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Latin America. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *١٤*, ٩٧-١٠٦.

الملاحق

Appendices

استمارة رقم (١):

استمارة معلومات المرضى

اسم المريض:

الجنس:

العمر:

مكان السكن: المدينة : الريف:

هل المرض مدخن:

هل يعاني المرض من السكر:

هل يعاني المريض من إصابات الجهاز التنفسي:

هل يعاني المريض من الضغط:

أسباب الإصابة الاخرى في العين:

هل توجد امراض أخرى في العين:

هل استخدم مضادات حيوية:

ملحق رقم (٢)

bioMérieux Customer:

مختبر ميديكا التخصصي
Microbiology Chart Report

Printed September 2, 2022 3:35:46 AM CDT

Patient Name: enas, 2
Location:
Lab ID: 1346

Patient ID: 1346
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Staphylococcus aureus

Source: eye swab

Collected:

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	4.83 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	99% Probability	**Staphylococcus aureus**		
	Bionumber:	050402023663231		
ID Analysis Messages				

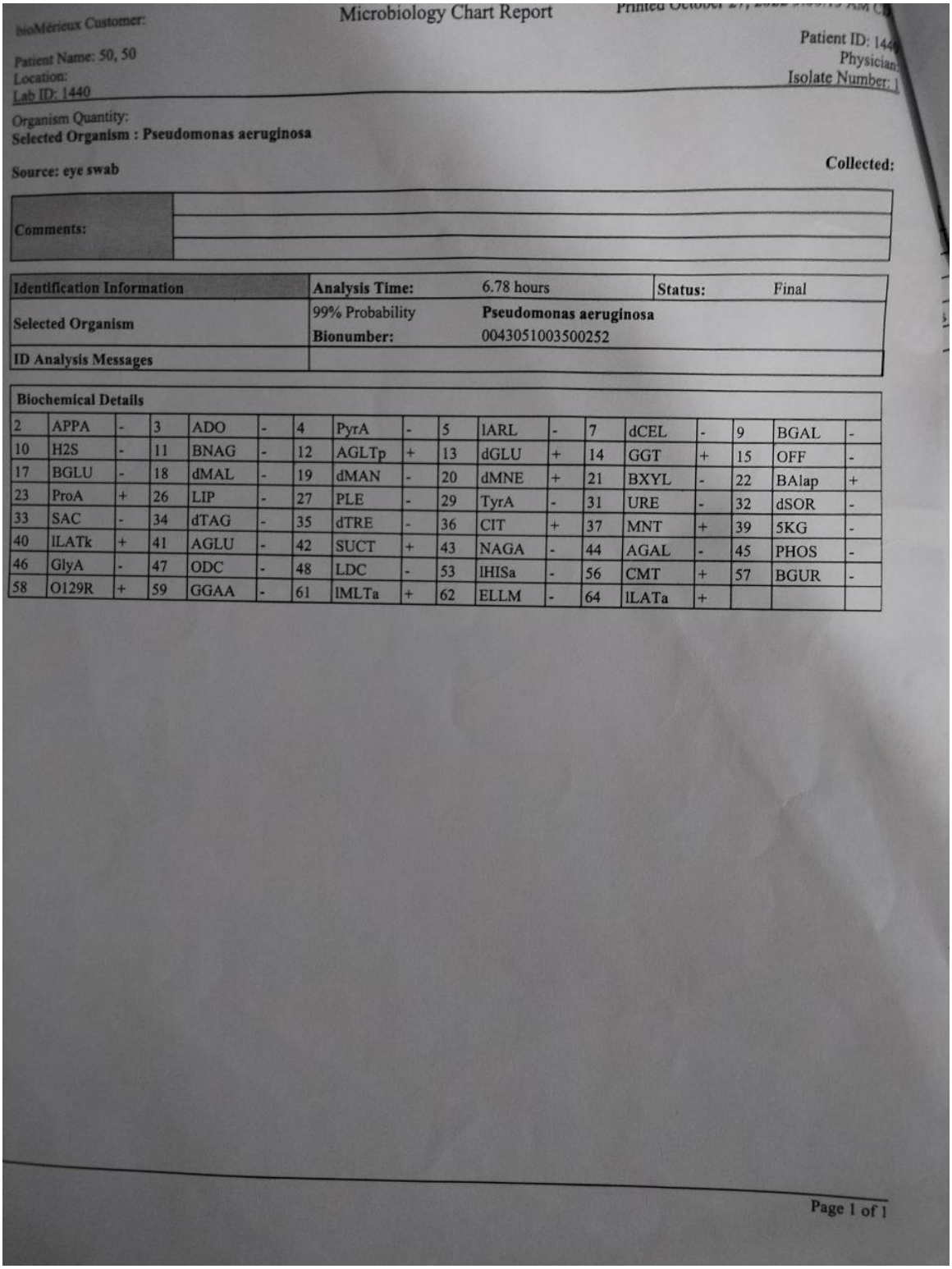
Biochemical Details

2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	(-)	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	-
38	dRIB	+	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	NAG	-	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

مختبر ميديكا التخصصي

Page 1 of 1

ملحق رقم (٣)



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed October 27, 2022 [illegible]

Patient Name: 50, 50
Location:
Lab ID: 1440

Patient ID: 144[illegible]
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa

Source: eye swab

Collected:

Comments:	

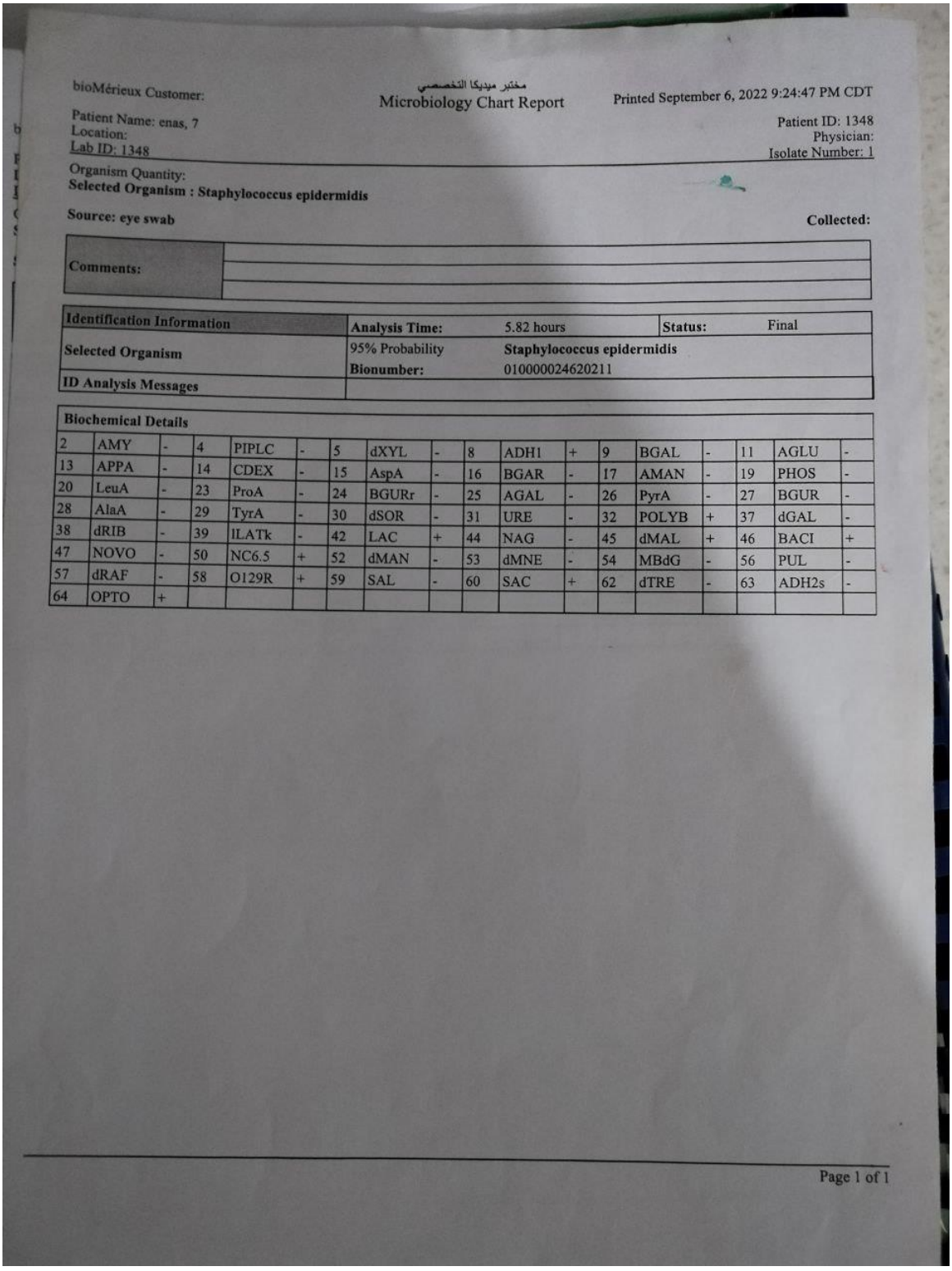
Identification Information	**Analysis Time:**	6.78 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	99% Probability	**Pseudomonas aeruginosa**		
	Bionumber:	0043051003500252		
ID Analysis Messages				

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	+	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	+
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	+	62	ELLM	-	64	lLATa	+			

Page 1 of 1

ملحق رقم (٤)



bioMérieux Customer:

مختبر ميديكا التخصصي
Microbiology Chart Report

Printed September 6, 2022 9:24:47 PM CDT

Patient Name: enas, 7
Location:
Lab ID: 1348

Patient ID: 1348
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Staphylococcus epidermidis

Source: eye swab

Collected:

Comments:	

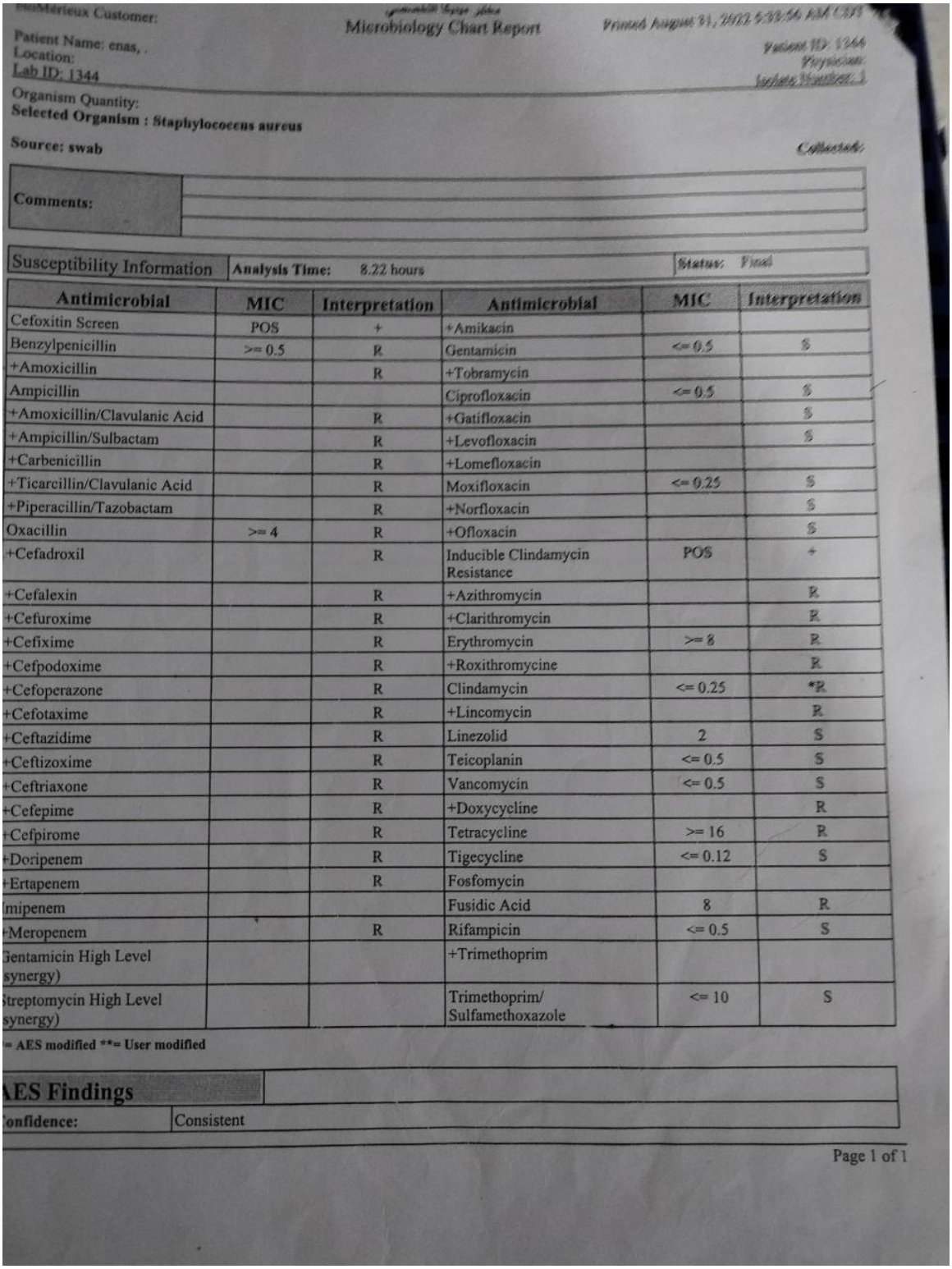
Identification Information	**Analysis Time:**	5.82 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	95% Probability	**Staphylococcus epidermidis**		
	Bionumber:	010000024620211		
ID Analysis Messages				

Biochemical Details

2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	-
38	dRIB	-	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	-	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	-	54	MBdG	-	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	-	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Page 1 of 1

ملحق رقم (٥)



bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed August 31, 2022 5:32:56 AM CDT

Patient Name: enas, .
Location:
Lab ID: 1344

Patient ID: 1344
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Staphylococcus aureus

Source: swab

Collected:

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 8.22 hours	**Status:** Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Cefoxitin Screen	POS	+	+Amikacin		
Benzylpenicillin	>= 0.5	R	Gentamicin	<= 0.5	S
+Amoxicillin		R	+Tobramycin		
Ampicillin			Ciprofloxacin	<= 0.5	S
+Amoxicillin/Clavulanic Acid		R	+Gatifloxacin		S
+Ampicillin/Sulbactam		R	+Levofloxacin		S
+Carbenicillin		R	+Lomefloxacin		
+Ticarcillin/Clavulanic Acid		R	Moxifloxacin	<= 0.25	S
+Piperacillin/Tazobactam		R	+Norfloxacin		S
Oxacillin	>= 4	R	+Ofloxacin		S
+Cefadroxil		R	Inducible Clindamycin Resistance	POS	+
+Cefalexin		R	+Azithromycin		R
+Cefuroxime		R	+Clarithromycin		R
+Cefixime		R	Erythromycin	>= 8	R
+Cefpodoxime		R	+Roxithromycine		R
+Cefoperazone		R	Clindamycin	<= 0.25	*R
+Cefotaxime		R	+Lincomycin		R
+Ceftazidime		R	Linezolid	2	S
+Ceftizoxime		R	Teicoplanin	<= 0.5	S
+Ceftriaxone		R	Vancomycin	<= 0.5	S
+Cefepime		R	+Doxycycline		R
+Cefpirome		R	Tetracycline	>= 16	R
+Doripenem		R	Tigecycline	<= 0.12	S
+Ertapenem		R	Fosfomycin		
Imipenem			Fusidic Acid	8	R
+Meropenem		R	Rifampicin	<= 0.5	S
Gentamicin High Level synergy)			+Trimethoprim		
Streptomycin High Level synergy)			Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	<= 10	S

= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Consistent

Page 1 of 1

ملحق رقم (٦)

bioMérieux Customer:

مختبر ميديكا التخصصي
Microbiology Chart Report

Printed October 27, 2022 9:42:15 AM CDT

Patient Name: 50, 50
Location:
Lab ID: 1441

Patient ID: 1441
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa

Source: eye swab

Collected:

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 13.38 hours	**Status:** Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
+Amoxicillin		R	Imipenem	2	S
+Amoxicillin/Clavulanic Acid		R	Meropenem	0.5	S
+Ampicillin/Sulbactam		R	Amikacin	<= 2	S
Ticarcillin	>= 128	R	Gentamicin	<= 1	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Tobramycin	<= 1	S
Piperacillin	>= 128	R	Ciprofloxacin	<= 0.25	S
+Piperacillin/Sulbactam			+Gatifloxacin		
+Cefadroxil		R	+Levofloxacin		S
+Cefradine		R	+Lomefloxacin		
+Cefuroxime		R	+Marbofloxacin		
+Cefixime		R	+Norfloxacin		S
+Cefpodoxime		R	+Ofloxacin		S
+Cefotaxime		R	Pefloxacin		
Ceftazidime	>= 64	R	Minocycline		
+Ceftriaxone		R	Colistin	1	S
Cefepime	16	*R	Rifampicin		
Aztreonam			Trimethoprim/ Sulfamethoxazole		
+Ertapenem		R			

***= AES modified **= User modified**

AES Findings	
Confidence:	Consistent

Page 1

Summary

The eye is exposed to different types of microorganisms, and the ocular surface infection has devastating consequences, as it is not treated with antibiotics at an early stage, and these infections can lead to blindness. Therefore, the current study was conducted with the aim of investigating the most important bacterial microorganisms that cause eye infections in the holy governorate of Karbala and determine its virulence, as well as molecular investigation of the prevalence of antibiotic resistance genes and virulence genes in the bacterial isolates most common in causing bacterial eye infections. Clinically diagnosed by specialized doctors, their ages ranged between (١-٧٥) years and for both sexes from the arrivals to Imam Al-Hassan Al-Mujtaba Hospital (PBUH), Al-Hindiya General Hospital and Al-Sayeda Zainab (PBUH) Eye Center in the Holy Karbala Governorate for the period from August ٢٠٢٢ to January ٢٠٢٣.

The results related to culture showed the presence of bacterial growth in٧٦ (٤٥٪) samples of the total samples of ocular infections that were collected, while no growth appeared in٩٣ (٥٥٪) samples from which٤١ (٥٣.٩٤٪) Gram-positive samples were obtained, and٣٥ (٤٦.٠٥٪) Gram-negative samples and all bacterial isolates were diagnosed based on the morphological and microscopic characteristics of the colonies when grown on general and selective culture media, in addition to conducting several biochemical tests through which the diagnosis of the most frequent isolates was confirmed by the Vitek ٢ system.

The results showed the dominance of *Staphylococcus aureus* with ٢٢(٢٨.٩٠%) samples, followed by *Staphylococcus epidermidis* with١٩(٢٥٪) samples, then *Pseudomonas aeruginosa* with ١٨(٢٣.٦٠٪)

samples ,١٢ (١٥.٧٠٪) isolates belonging to *Escherichia coli*, ٤(٥.٢٠٪) isolates of *Klebsiella pneumoniae* and ١(١.٣٠٪) of isolates of *Serratia marcescens.*

An antibiotic sensitivity test was carried out for the most frequent bacterial isolates in this study, which are *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, using the Vitek٢system, as most of the bacterial isolates were multi-resistant to antibiotics, as all *Staphylococcus aureus* isolates were ١٠٠٪ resistant to Amoxicillin antibiotics. Amoxicillin \ Clavulanic Acid, Benzylpenicillin while it was found that Rifampicin, Linezolid, Teicoplanin and Tigecycline are the most effective against these bacteria, and the insulation of *Pseudomonas aeruginosa* was ١٠٠٪ resistance towards Amoxicillin, Amoxicillin \ Clavulanic Acid, Piperacillin while she was sensitive to Colistin, Imipenem and Meropenem.

In this study, significant differences were found between the age groups of patients at the level of probability (p = ٠.٠٢١), and the age group (٢٥-٤٩) years was the most infected, and the gender and place of residence (rural or arban) had an effect on the distribution of bacterial infections among people with infection The eyes, as infections were higher in males and also in the arban, and a clear significant difference appeared at the level of probability (p = ٠.٠٤٥ and p = ٠.٠٢٨), respectively, between the distribution of the number of bacterial infections according to the site of infection in the eye, whether it was conjunctiva, cornea or eyelids, while there was no difference Significant between the type of bacteria isolated and the site of bacterial infection in the eyes at the level of probability (p = ٠.٠٣٤).

As for the studied risk factors represented in trauma, ocular surface diseases such as dry eyes, wearing contact lenses, as well as systemic

diseases such as diabetes mellitus and respiratory infections, it was observed through the results that there is a significant correlation at the level of probability (p = ٠.٠١٢) between these factors and the occurrence of infection. bacteria in the eyes.

There was also a significant correlation between the studied risk factors and the sites of bacterial infection in the eye from the conjunctiva, cornea and eyelids. Likelihood level (p = ٠.٧٤٢).

Bacterial isolates possessed important virulence factors related to eye infections, including their ability to produce biofilms and hemolytic toxin. The current statistical results showed a correlation between the ability of bacterial isolates to produce biofilms and the site of bacterial infection in the eye, while there was no significant correlation between the ability of bacterial isolates to kill Hemolytic toxin production and ocular site of infection.

The polymerase chain reaction (PCR) technique was used to conduct an investigation test for the presence of genes encoding antibiotic resistance, and genes encoding for virulence factors for all isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* to find out the extent and distribution of these genes in the bacterial isolates that infect the eye. The results showed that ٩٥.٤٪ of the isolates *Staphylococcus aureus* bacteria carrying the *mecA* gene through the appearance of a PCR product of size ٣١٠ bp, which is resistant to methicillin MRSA, and that ٧٢.٧٪ carry the gene *ermA*, and thus it has resistance to anti-macrolides through the emergence of a PCR product of size ٦٤٥ bp, and thus *Staphylococcus aureus* bacteria acquired multiple resistance to antibiotics. As for the important virulence genes in causing eye pathogenesis, the *hlb* gene and *SEA*, by polymerase chain reaction, it was found that the PCR output was ٣٠٩ bp and ١٠٢ bp, respectively, for

Staphylococcus aureus isolates, with a percentage of ٧٧.٢٪ and ٦٨.١٪, respectively.

As for the virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa*, the presence of the *exoA* and *LasB* genes showed ١٠٠٪ through the appearance of a PCR product with a size of ٣٩٦ bp and ٣٠٠ bp, respectively.

The current study included that Gram-positive bacterial species are more common than Gram-negative bacteria in causing different eye infections, and the studied bacterial isolates possess important virulence factors represented by hemolysin production, biofilm formation, and virulence genes that increase the severity of bacterial infection in the eye as well. About having resistance genes that helped her resist antibiotics.

University of Karbala

College of Science

Department of Biology

Molecular characterization of pathogenic bacteria isolated from eye inflammation in Karbala province

A thesis

Submitted to the council of the

College of Science – University of Karbala

In partial of fulfillment of requirements for degree of Master of Science in Biology

By

Inas Hammood Abbood DheyAuldeen

BSc. Baghdad University ٢٠٠٢

Supervised by

Prof.

Dr. Wafaa Sadiq Mohsin Alwazni

٢٠٢٣ AD **١٤٤٥ AH**