



ISSN: 1608-9391  
e-ISSN: 2664-2786

Received:18/8/2020  
Accepted:13/9/2020

## مقارنة بين ثلاث طرق للتحري عن تكوين الغشاء الحيوي لأنواع بكتريا العنقوديات السالبة لأنزيم التجلط

\*احمد عبدالله حمادي

مديرية تربية محافظة نينوى/ وزارة التربية/ العراق

\*\*محسن ايوب عيسى

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

\*E-mail: abdullaahmedabdulla43@gmail.com

\*\*E-mail: drmuhsin68@yahoo.com

### الملخص

اجريت هذه الدراسة بهدف التحري عن قابلية العنقوديات السالبة لانزيم التجلط اجريت هذه الدراسة بهدف التحري عن قابلية العنقوديات السالبة لانزيم التجلط  
Coagulase Negative Staphylococci (CoNS) على تكوين الغشاء الحيوي الذي  
يعد من عوامل الضراوة الاساسية في امراضيتها. استخدمت ثلاث طرق لهذا الغرض هي  
طريقة الانبوبة، طريقة احمر الكونغو وطريقة صفيحة الزرع النسيجي. اختبرت 37 عزلة  
تابعة للأنواع المختلفة لهذه البكتريا شملت *Staphylococcus epidermidis*، *S.*  
*S. sciuri*، *S. lentus*، *S. hominis*، *S. haemolyticus*، *S. saprophyticus*  
اظهرت نتائج طريقة الانبوبة ان معظم العزلات (64.5%) اعطت نتيجة موجبة متوسطة  
واخرى كانت موجبة ضعيفة (32.3%) ولم تظهر ست عزلات فقط القدرة على تكوين  
الغشاء الحيوي، بينما في طريقة وسط احمر الكونغو اظهرت غالبية العزلات نتيجة موجبة  
متوسطة (89.3%) وكانت هناك تسع عزلات منها سالبة في تكوين الغشاء الحيوي، اما  
طريقة صفيحة الزرع النسيجي فقد تراوحت النتائج ما بين نسبة (62.9%) موجبة متوسطة ونسبة  
(31.4%) موجبة ضعيفة ولم تتمكن عزلتان فقط من تكوين الغشاء الحيوي بهذه الطريقة. وعند  
مقارنة كفاءة الطرق الثلاث في اظهار قابلية عزلات CoNS في تكوين الغشاء الحيوي تبين  
ان طريقة صفيحة الزرع النسيجي كانت الاكثر كفاءة بنسبة (94.6% ) تلتها طريقة الانبوبة  
(83.8%) ثم وسط احمر الكونغو الصلب (75.7%).

**الكلمات الدالة:** الغشاء الحيوي، العنقوديات السالبة لانزيم التجلط، طرق التحري عن الغشاء  
الحيوي.

## المقدمة

تنمو الأحياء المجهرية غالباً في بيئاتها المختلفة بهيئة غشاء حيوي Biofilm ملتصقة مع بعضها ومتفاعلة فيما بينها حيث يعد هذا الشكل من النمو ذا أهمية كبيرة لها كونه يوفر حماية ومغذيات أكثر ويعمل كطبقة حماية تسمح للبكتيريا بمقاومة المضادات الحيوية والجذور الحرة للأوكسجين والمطهرات والظروف غير الملائمة، ولكن بالمقابل نموها بهذا الشكل يسبب أضراراً اقتصادية وصحية عديدة (Kour *et al.*, 2020). وفي أغلب الإصابات المزمنة تتواجد البكتيريا بهيئة أغشية حيوية أكثر من تواجدها بصورة حرة وأنواع كثيرة من البكتيريا الممرضة والمسؤولة عن أمراض خطيرة في مختلف أنحاء الجسم تستطيع تكوين الأغشية الحيوية لتزيد من ضرورتها ومدة بقائها من خلال الالتصاق على الأسطح الحية وغير الحية كالأنسجة المختلفة والقناطر وغيرها من التراكيب المستخدمة داخل أجسام المرضى (Yong *et al.*, 2019).

هنالك العديد من الطرق المستخدمة للتحري عن تكوين الغشاء الحيوي إذ تعتبر كل من طريقة الانبوبة واحمر الكونغو و صفيحة الزرع النسيجي من أكثر الطرق المظهرية المستخدمة لهذا الغرض حيث تعد طريقة الانبوبة للتحري عن الغشاء الحيوي من الطرق النوعية البسيطة والسهلة لتحديد تكوين الغشاء الحيوي إذ ان شكل النمو هو الذي يحدد وجود الغشاء الحيوي لكن قراءة النتائج تتطلب دقة عالية (Stepanovi *et al.*, 2000 ؛ عواد ونجيب، 2016)، بينما يعتمد مبدأ طريقة احمر الكونغو على قابلية صبغة احمر الكونغو على التفاعل والأرتباط مع السكريات المخاطية التي تعمل على ربط الخلايا مع بعضها والتي تدعى Polysaccharide Intercellular Adhesins (PIA) وهذا يؤدي الى تغيير لون المستعمرات الى اللون الأسود الجاف ذو اللعة المعدنية مع تغير شكل المستعمرات لتصبح خشنة ومتعرجة (Darwish and Asfour, 2013 ؛ حياوي، 2018)، كما استخدمت طريقة صفيحة الزرع النسيجي لتحديد قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي على الأسطح غير الحية بوصفها طريقة كمية يحدث فيها الالتصاق غالباً في قاعدة الحفرة وبصورة اقل على الجدران ويكشف عن كمية الغشاء الحيوي المتكون بصورة غير مباشرة بدلالة قيم الامتصاصية Optical density (حياوي، 2018)

تزايدت أهمية الغشاء الحيوي في البكتيريا المرضية من الناحية الصحية بشكل كبير مع استخدام البدائل الطبية داخل الجسم إذ شكلت ما يعرف بالإصابات المتعلقة بالأجهزة الطبية ولعل من أهم أنواع البكتيريا المرضية التي برزت في هذا المجال منذ عقود هي مجموعة المكورات العنقودية السالبة لانزيم التجلط Coagulase Negative Staphylococci (CoNS) التي اكتسبت أهميتها المرضية مع زيادة استخدام الادوات والبدائل الطبية داخل اجسام المرضى خاصة كبار السن والمثبطين مناعياً، ومن أهم أنواعها هي *S. epidermidis*، *S. saprophyticus*، *S. haemolyticus*، *S. hominis*، *S. xylosus* وغيرها (Inikori، 2019 ؛ Becker *et al.*، 2020) إذ ان ضراوة الـ CoNS تكمن بقدرتها على الالتصاق والاستعمار وتكوين الغشاء الحيوي أكثر من قابليتها على انتاج بقية الانواع من عوامل الضراوة سواء على السطوح غير الحية (سلطان وخلف، 2005؛ Vanaparti and Sadawarte, 2019).

ونظراً للأهمية الصحية المتزايدة لمجموعة بكتيريا المكورات العنقودية السالبة لانزيم التجلط والدور الاساسي للغشاء الحيوي في امراضيتها فقد اجري هذا البحث بهدف التحري عن قابلية انواع هذه البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي وتحديد افضل الطرق المستخدمة لهذا الغرض.

## المواد وطرائق العمل

### العزلات البكتيرية

استخدم في هذا البحث (37) عزله تابعة لأنواع بكتيريا العنقوديات السالبة لانزيم التجلط CoNS معزولة ومشخصة في دراسة سابقة في قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة الموصل، وتضمنت مصادر عزلها عينات مرضية (دم، ادرار، جروح) وبدائل طبية (قناطر بولية، انبوب القصبه الهوائية، أنبوب تغذية المعدة) فضلاً عن الأجهزة والأدوات الجراحية، وشملت الانواع

لكل منها، *S. sciuri* (عزلة3) و *S. lentus* (عزلة2).  
*Staphylococcus epidermidis* (عزلة12)، *S. saprophyticus* (عزلة8)، و *S. hominis* و *S. haemolyticus* (عزلة6)

### طرائق العمل

1- **طريقة الانبوب Tube Method**: اجريت طريقة العمل استنادا الى ما ذكره (Hassan et al., 2011 ؛ حياوي، 2018) وكما يلي: علقت مستعمرة حديثة النمو من كل عزلة في انابيب اختبار زجاجية حاوية (1.5) مل من وسط مرق الصويا (TSB) Tryptone Soy broth (India/Himedia)، وحضنت بدرجة حرارة (37 °م) لمدة (24) ساعة بعدها أزيل الوسط وغسلت الانابيب بالمحلول الملحي وجففت وصبغ السطح الداخلي للانبوب بصبغة الكريستال البنفسجية (0.1%) لمدة (15 - 20) دقيقة. ولوحظ التصاق الصبغة على سطح الانبوب الداخلي الذي يعد دليلا على تكوين الغشاء الحيوي وقيمت النتائج على اساس درجة الأصطباغ.

2- **طريقة وسط احمر الكونغو الصلب Congo Red Agar Assay** : حسب ما ذكر (Marianal et al., 2009) حضر وسط احمر الكونغو الصلب من مكوناته واجريت طريقة العمل بتلقيح الوسط المحضر بالعزلات البكتيرية والتحصين بدرجة حرارة (37°م) لمدة (24-48) ساعة وقيمت النتائج بملاحظة التغير في لون الوسط وشكل المستعمرات النامية، اذ تظهر العزلات الموجبة مستعمرات ذات لون اسود جاف وبارق (Freeman et al., 1989؛ Mariana et al., 2009).

3- **طريقة صفيحة الزرع النسيجي Microtiter plate biofilm assay** : اجريت طريقة العمل كما جاء في (Stepanović et al., 2007 ؛ Lotfi et al., 2014) اذ حضر اللاقح البكتيري باستخدام وسط TSB الحاوي على الكلوكوز (1%) واستخدم جهاز المطياف الضوئي بطول موجي (625) نانوميتر لضبط الامتصاصية ما بين (0.08-0.1) ثم بعدها نقل (200) مايكروليتر من المعلق البكتيري الى حفر صفيحة Microtiter (ثلاث حفر لكل عزلة بكتيرية) كذلك اضيف الوسط المعقم فقط الى بعض الحفر واعتبرت كحفر سيطرة سالبة، بعد التحصين بدرجة حرارة (37°م) لمدة (24-48) ساعة سكب الوسط وغسلت الحفر ثلاث مرات باستخدام المحلول الملحي الفسيولوجي وثبت الغشاء الحيوي المتكون باستخدام محلول Sodium Acetate (2%) ثم صبغ باستخدام صبغة الكريستال البنفسجية (0.1%) لمدة (20) دقيقة واستخلصت الصبغة الملتنقة بأضافة (200) مايكرو ليتر من الإيثانول (95%) ثم قيس الامتصاصية عند طول موجي (630) نانوميتر باستخدام جهاز قارئ الاليزا (USA/ Biotek) ELIZA Reader وسجلت القيم، ثم استخرجت قيمة Cutoff للنتائج اعتمادا على ما ذكره (Christensen et al., 1985)، وقيمت النتائج كما يلي:

عندما يكون معدل الامتصاصية للعينة مساويا لقيمة Cutoff عدت سالبة (غير مكونة للغشاء الحيوي).

- عندما يكون معدل الامتصاصية للعينة أعلى من قيمة Cutoff تُعد موجبة ضعيفة.
- عندما يصل معدل الامتصاصية للعينة ضعف قيمة Cutoff تُعد موجبة متوسطة.
- عندما يصل معدل الامتصاصية للعينة أكثر من 4 × قيمة Cutoff تُعد موجبة قوية .

### النتائج والمناقشة

يوضح (الجدول 1) والصورة (1) نتائج اختبار طريقة الانبوب Tube Method حيث يلاحظ ان غالبية العزلات (83.8%) اعطت نتيجة موجبة لهذا الاختبار وان احدى عزلات *S. epidermidis* المعزولة من الفتحة البولية اظهرت قدرة عالية (موجبة قوية) على تكوين الغشاء الحيوي بهذه الطريقة وان اكثرية العزلات (64.5%) اعطت نتيجة موجبة متوسطة والبقية (32.3%) كانت موجبة ضعيفة ولم تظهر ست عزلات القدرة على تكوين الغشاء الحيوي. يعد وجود المادة المخاطية في قعر الأنبوبة وجدانها بعد الغسل دليلا على قدرة انتاج وتكوين الغشاء الحيوي اذ ان انواع من البكتريا تستطيع النمو بشكل ساكن وملتنق في نفس الوقت على سطح الجدار الزجاجي للأنبوبة وتشكل حلقة سطحية من النمو وكذلك تظهر نمو كثيف في اسفل

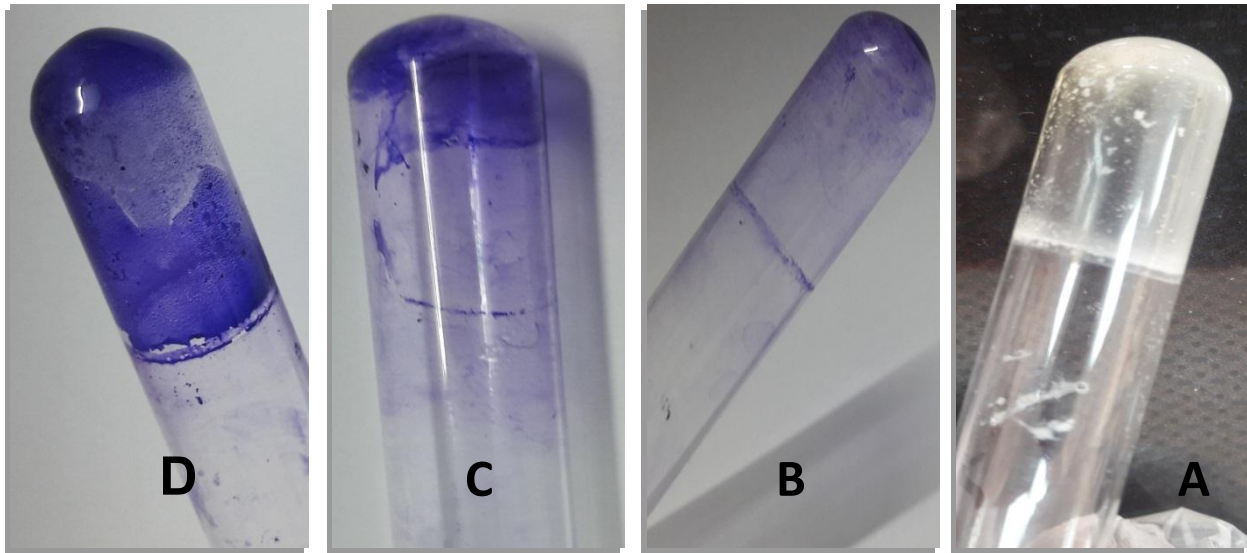
الأنبوية وقد استُخدم وسط TSB لقدرته على توفير متطلبات تكوين الغشاء الحيوي اذا ما قورن مع بقية الأوساط ولعل السبب في ذلك يرجع الى احتواء هذا الوسط على بروتين غني بالترينوفان و وجود سكر الكلوكوز واللذان اثبتا اهميتهما في زيادة قدرة *S. epidermidis* على الالتصاق (حياوي، 2018)، وفسرت نتائج الاختبار اعتمادا على (Christensen *et al.*, 1982).

تعد مجموعة Staphylococci بصورة عامة لاهوائية اختيارية اي تستطيع النمو في الظروف الهوائية واللاهوائية ولكن تفضل الظروف الهوائية لذلك يلاحظ توزيع النمو في جميع اجزاء الأنبوية وخاصة في المنطقة السطحية مكونة ما يعرف بال Pellicle، مع ذلك لم تظهر قسم من العزلات هذه الطبقة السطحية وهذا لا يعني انها غير مكونة للغشاء الحيوي اذ أشار (Christensen *et al.*, 1982) ان وجود مثل هذه الطبقة السطحية او ما يسمى Floating Biofilms لا يعتبر ضروريا للحكم على البكتريا المدروسة *S. epidermidis* انها غير منتجة للغشاء الحيوي حيث ان وجود المادة المخاطية في قعر الأنبوية وجدرانها بعد الغسل هو مؤشر قدرة تكوين الغشاء الحيوي ولا تمثل هذه الظاهرة اهمية في عملية تكون هذا الغشاء في مجموعة Staphylococci (Stepanović *et al.*, 2007) هذا يقودنا الى استنتاج ان البكتيرية اللاهوائية اختيارية المكونة للغشاء الحيوي قد تكون اكثر اهمية من البكتريا الهوائية في مجال تكوين الغشاء الحيوي حيث ذكر (Cramton *et al.*, 2001)، ان التعبير الجيني وتكون PIA يزداد في الظروف اللاهوائية مثل هذه الظروف تكون مرتبطة بشكل كبير مع تكون الغشاء الحيوي حيث يقل تركيز الأوكسجين بشكل كبير ضمن طبقات الغشاء الحيوي.

توافقت نتائج دراستنا الحالية مع نتائج (Stepanović *et al.*, 2000) التي بينت ان معظم عزلات الـ CoNS كانت موجبة لإنتاج الغشاء الحيوي بطريقة الأنبوية، كما اكد (Oliveira and Cunha, 2010) ان طريقة الأنبوية من الطرق الملائمة للتحري عن وجود الغشاء الحيوي في هذا النوع من البكتريا.

الجدول 1: نتائج التحري عن تكوين عزلات CoNS الغشاء الحيوي بطريقة الانبوبة

تقييم النتيجة	نتيجة الاختبار	رقم العزلة	مصدر العزل	انواع البكتريا
موجبة متوسطة	++	1	قطاظر بولية	<i>S. epidermidis</i>
موجبة قوية	+++	2		
موجبة متوسطة	++	3		
موجبة متوسطة	++	4		
موجبة متوسطة	++	5	انبوب القصبه الهوائية	
موجبة متوسطة	++	6	الأجهزة والأدوات الجراحية	
موجبة ضعيفة	+	7		
موجبة متوسطة	++	8	ادرار	
سالبة	-	9		
موجبة متوسطة	++	10		
موجبة متوسطة	++	11	جروح	
موجبة متوسطة	++	12		
موجبة متوسطة	++	1	قطاظر بولية	<i>S. haemolyticus</i>
موجبة متوسطة	++	2		
موجبة ضعيفة	+	3	انبوب تغذية المعدة	
سالبة	-	4	الأجهزة والأدوات الجراحية	
موجبة متوسطة	++	5	ادرار	
موجبة ضعيفة	+	6		
موجبة متوسطة	++	1	قطاظر بولية	<i>S. saprophyticus</i>
موجبة متوسطة	++	2	انبوب القصبه الهوائية	
سالبة	-	3	الأجهزة والأدوات الجراحية	
سالبة	-	4	ادرار	
موجبة ضعيفة	+	5		
موجبة ضعيفة	+	6		
موجبة متوسطة	++	7		
موجبة ضعيفة	+	8	جروح	
موجبة متوسطة	++	1	قطاظر	<i>S. hominis</i>
موجبة متوسطة	++	2		
موجبة ضعيفة	+	3	الاجهزة والادوات الجراحية	
موجبة ضعيفة	+	4	دم	
موجبة متوسطة	++	5		
سالبة	-	6	خرجات جروح	
موجبة متوسطة	++	1	الاجهزة والادوات الجراحية	<i>S. lentus</i>
موجبة متوسطة	++	2		
موجبة ضعيفة	+	3	ادرار	
سالبة	-	1	دم	<i>S. sciuri</i>
موجبة ضعيفة	+	2	ادرار	



الصورة 1: النتائج الموجبة لاختبار تكون الغشاء الحيوي بطريقة الأنوبية اذ تمثل (A) طبقة الغشاء الحيوي والطبقة السطحية Pellicle قبل الصبغ بالكريستال البنفسجية (0.1%) بينما تمثل بقية الصور تدرج تكوين الغشاء الحيوي على الأنوبية الزجاجية حيث: (B) موجبة ضعيفة (C) موجبة متوسطة (D) موجبة قوية.

بالنسبة لطريقة وسط احمر الكونغو الصلب Congo Red Agar يوضح الجدول (2) والصورة (2) النتائج التي تم الحصول عليها بهذه الطريقة، حيث يلاحظ ان نسبة (75.7%) من العزلات المدروسة اعطت نتيجة موجبة، ثلاث عزلات منها تابعة لـ *S. epidermidis* كانت موجبة قوية، بينما غالبية العزلات الموجبة الاخرى (89.3%) كانت موجبة متوسطة وكانت هناك تسعة عزلات تابعة لكل انواع الـ CoNS المدروسة سالبة لهذا الاختبار. فسرت نتائج هذا الاختبار اعتمادا على (Darwish and Asfour, 2013) الذي ذكر ان تحديد درجة تكوين الغشاء الحيوي في عزلات الـ CoNS والمكورات العنقودية بصورة عامة يعتمد على لون وشكل المستعمرات حيث تصنف العزلات الى اربعة انماط وهي مستعمرات سوداء ذات شكل متعرج او خشن وقوام جاف اعتبرت مكونة للغشاء الحيوي بدرجة قوية اما العزلات التي اعطت مستعمرات حمراء جافة خشنة او سوداء ناعمة اعتبرت ذات قدرة متوسطة على تكوين الغشاء الحيوي بينما العزلات التي اعطت مستعمرات حمراء مشرقة ذات قوام وشكل املس اعتبرت سالبة اي غير مكونة للغشاء الحيوي ومما يجدر ذكره ان المستعمرات الحمراء او النبيذية التي تمتلك خلفية سوداء اعتبرت سالبة اعتمادا على (Atshan et al., 2012).

ان كمية السكريات المنتجة في طريقة وسط احمر الكونغو تعكس مدى قدرة البكتريا على انتاج الغشاء الحيوي وتختلف الفترة المطلوبة لظهور المستعمرات التي تشير الى انتاج الغشاء الحيوي حسب نوع البكتريا، مثلا تحتاج *S. epidermidis* (24) ساعة بينما *S. aureus* تحتاج (48-72) ساعة (Arciola et al., 2001). ان اول من استخدم هذا الوسط مع بكتريا *S. epidermidis* الباحث Freeman وجماعته عام (1989) لتشخيص المادة المخاطية المتكونة وبين ان سبب التغيرات اللونية لوسط احمر الكونغو والتي تحدث في المراحل الأخيرة للتخصين تكون نتيجة لطرح نواتج افضية ثانوية، كما ذكر (Hassan et al., 2011) ان اضافة كمية كبيرة من السكر الى هذا الوسط يعزز من تكوين السكريات الخارجية المتعددة.

ذكر (كودي وآخرون، 2018) ان طريقة احمر الكونغو لا ينبغي ان تستخدم لتحديد قدرة العزلات البكتيرية على انتاج الغشاء الحيوي لانها قد تعطي نتائج غير حقيقية، وعلى العموم فعند الاطلاع على اغلب نتائج الدراسات السابقة لوحظ ان هنالك اختلاف كبير بين الباحثين في تفسير نتائج طريقة وسط احمر الكونغو وهذا يتفق مع ما اشار اليه (Darwish and Asfour, 2013).

فالباحث (Zhou et al., 2013) بين ان من مجموع 22 عزلة عائدة الى *S. epidermidis* كانت (15) عزلة موجبة لإنتاج الغشاء الحيوي بطريقة احمر الكونغو ولوحظ ان النتائج التي وجدها الباحث Knobloch وجماعته في عام (2002) والتي تضمنت اختبار قدرة (128) عزلة عائدة الى *S. aureus* لإنتاج الغشاء الحيوي بطريقة احمر الكونغو ان هذه الطريقة حددت قدرة مانسبته (3.8%) فقط من العزلات على انتاج الغشاء الحيوي لذا نصح بعدم الاعتماد على هذه الطريقة (العمرى، 2013). ذكر (Oliveira and Cunha, 2010) ان نسبة العزلات المكونة للغشاء الحيوي كانت (73%) بطريقة احمر الكونغو بينما وجد (Pedroso et al., 2016) ان نسبة (96.5%) من عزلات الـ CoNS كانت مكونة للغشاء الحيوي بهذه الطريقة. ايضا وجد (Seng et al., 2017) ان ما نسبته (90.7%) من عزلات الـ CoNS كونت غشاء حيوي حسب تقدير طريقة اكار احمر الكونغو.

**فيما يتعلق بطريقة صفيحة الزرع النسيجي Microtiter plate biofilm assay** فان قيم الأمتصاصية التي تم الحصول عليها قورنت مع قيمة Cutoff التي تمثل الحد الفاصل بين النتيجة الموجبة والسالبة والتي تساوي تقريبا (0.125) نانومتر، لذا فأن القيم الأقل او التي تساوي هذه القيمة تعتبر سالبة والقيم التي تقع بين (0.125) و (0.250) اعتبرت مكونة للغشاء الحيوي بشكل ضعيف اما القيم التي تقع بين (0.250) و (0.500) فقد مثلت العزلات ذات القابلية المتوسطة على تكوين الغشاء الحيوي والقيم التي اعطت امتصاصية اكثر من (0.500) نانومتر اعتبرت عزلات ذات قدرة عالية على تكوين الغشاء الحيوي (Christensen et al., 1985).

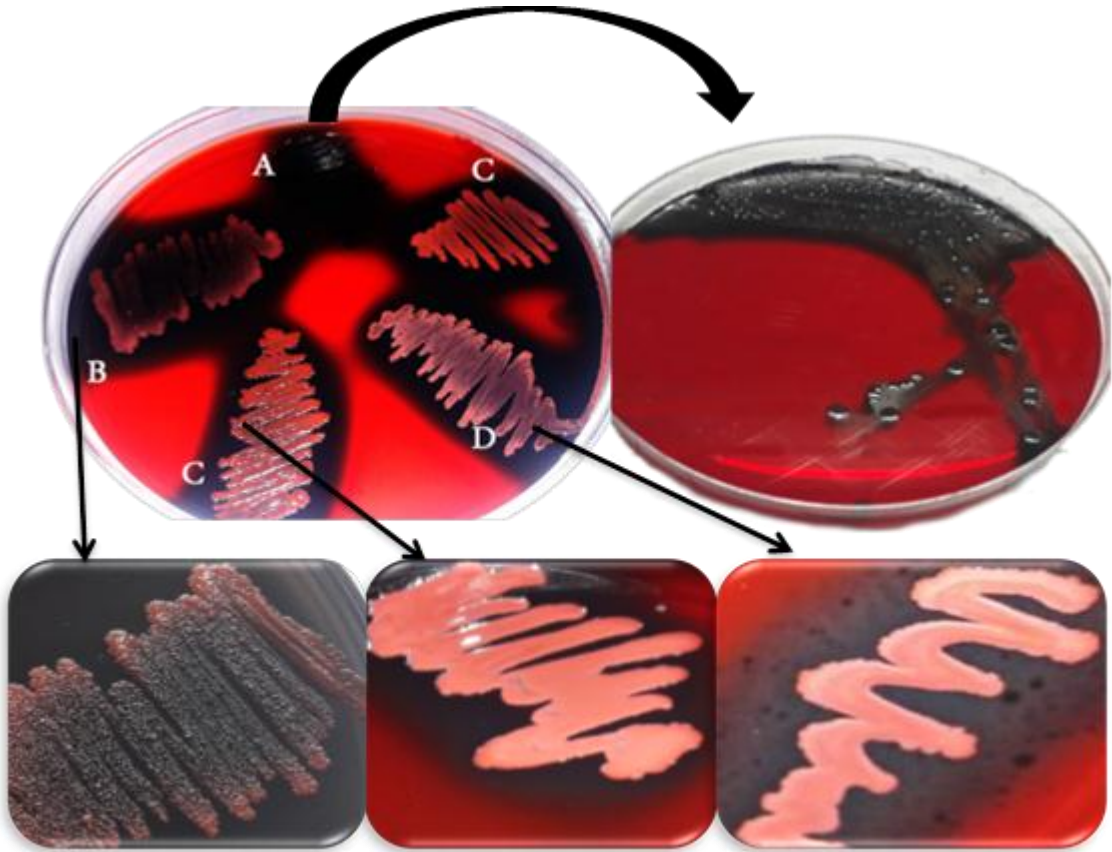
الجدول (3) والصورة (3) يوضحان النتائج التي تم الحصول عليها حيث اظهرت معظم العزلات (94.6%) نتائج موجبة لتكوين الغشاء الحيوي بهذه الطريقة، ابدت عزلتان منها تابعتان الى *S. epidermidis* نتيجة موجبة قوية اما بقية النتائج الموجبة فقد تراوحت ما بين نسبة (62.9%) موجبة متوسطة ونسبة (31.4%) موجبة ضعيفة بينما عزلتان لم تتمكننا من تكوين الغشاء الحيوي وكانت نتيجتهما سالبة.

ان ظهور عزلات من البكتريا *S. epidermidis* ذات قابلية قوية على تكوين الغشاء الحيوي ضمن نتائج الدراسة الحالية يتفق مع نتائج دراسات Christensen الذي استخدم في عام (1985) السلالة القياسية ATCC 35984 *S. epidermidis* التي اعطت قدرة عالية على تكوين الغشاء الحيوي، ووجد (Pedroso et al., 2016) ان (100%) من عزلات الـ CoNS مكونة للغشاء الحيوي بطريقة صفيحة الزرع النسيجي مثل هذه النسب العالية ايضا كانت في نتائج (Zatout et al., 2020) حيث وجد ان نسبة عزلات الـ CoNS المكونة للغشاء الحيوي بلغت 89.4%، كما ذكر (Stepanović et al., 2007) كودي وآخرون، (2018) ان طريقة صفيحة الزرع النسيجي للتحري عن وجود الغشاء الحيوي افضل من طريقة الانبوبة اذ تعطي نتائج اكثر قبولا وتصورا عن قدرة الـ CoNS لتكوين الغشاء الحيوي كونها اكثر دقة وحساسية. كما وجد (Seng et al., 2017) ان ما نسبته (88.6%) من عزلات الـ CoNS كونت غشاءً حيويًا حسب تقدير طريقة صفيحة الزرع النسيجي فضلا عن نتائج Stepanović (et al., 2000) التي اوضحت ان جميع عزلاتها كونت غشاءً حيويًا بطريقة صفيحة الزرع النسيجي.

الجدول 2: نتائج التحري عن تكوين عزلات CoNS للغشاء الحيوي بطريقة اكار احمر الكونغو

تقييم النتيجة	لون وشكل المستعمرات	رقم العزلة	مصدر العزل	انواع البكتريا
قوية	سوداء خشنة	1	قناطر بولية	<i>S. epidermidis</i>
قوية	سوداء خشنة	2		
متوسطة	حمراء خشنة	3		
قوية	سوداء خشنة	4		
متوسطة	سوداء ناعمة	5	انبوب القصبة الهوائية	
متوسطة	حمراء خشنة	6	الأجهزة والأدوات الجراحية	
متوسطة	سوداء ناعمة	7		
متوسطة	سوداء ناعمة	8	ادرار	
سلبية	حمراء ذات قوام وشكل املس	9		
متوسطة	حمراء خشنة	10		
متوسطة	سوداء ناعمة	11		
سلبية	حمراء ذات قوام وشكل املس	12	جروح	
متوسطة	سوداء ناعمة	1	قناطر بولية	<i>S. haemolyticus</i>
سلبية	حمراء ذات قوام وشكل املس	2		
متوسطة	سوداء ناعمة	3	انبوب تغذية المعدة	
متوسطة	سوداء ناعمة	4	الأجهزة والأدوات الجراحية	
متوسطة	سوداء ناعمة	5	ادرار	
متوسطة	سوداء ناعمة	6		
متوسطة	حمراء خشنة	1	قناطر بولية	<i>S. saprophyticus</i>
سلبية	حمراء ذات قوام وشكل املس	2	انبوب القصبة الهوائية	
متوسطة	حمراء خشنة	3	الأجهزة والأدوات الجراحية	
سلبية	حمراء ذات قوام وشكل املس	4	ادرار	
متوسطة	سوداء ناعمة	5		
متوسطة	حمراء خشنة	6		
متوسطة	سوداء ناعمة	7	خراجات جروح	
سلبية	حمراء ذات قوام وشكل املس	8		
سلبية	حمراء ذات قوام وشكل املس	1	قناطر بولية	<i>S. hominis</i>
متوسطة	سوداء ناعمة	2		
متوسطة	حمراء خشنة	3	الاجهزة والادوات الجراحية	
متوسطة	حمراء خشنة	4	دم	
متوسطة	سوداء ناعمة	5		
متوسطة	سوداء ناعمة	6	جروح	
متوسطة	سوداء ناعمة	1	الاجهزة والادوات الجراحية	<i>S. lentus</i>
متوسطة	حمراء خشنة	2		
سلبية	حمراء ذات قوام وشكل املس	3	ادرار	
متوسطة	حمراء خشنة	1	دم	<i>S. sciuri</i>
سلبية	حمراء ذات قوام وشكل املس	2	ادرار	



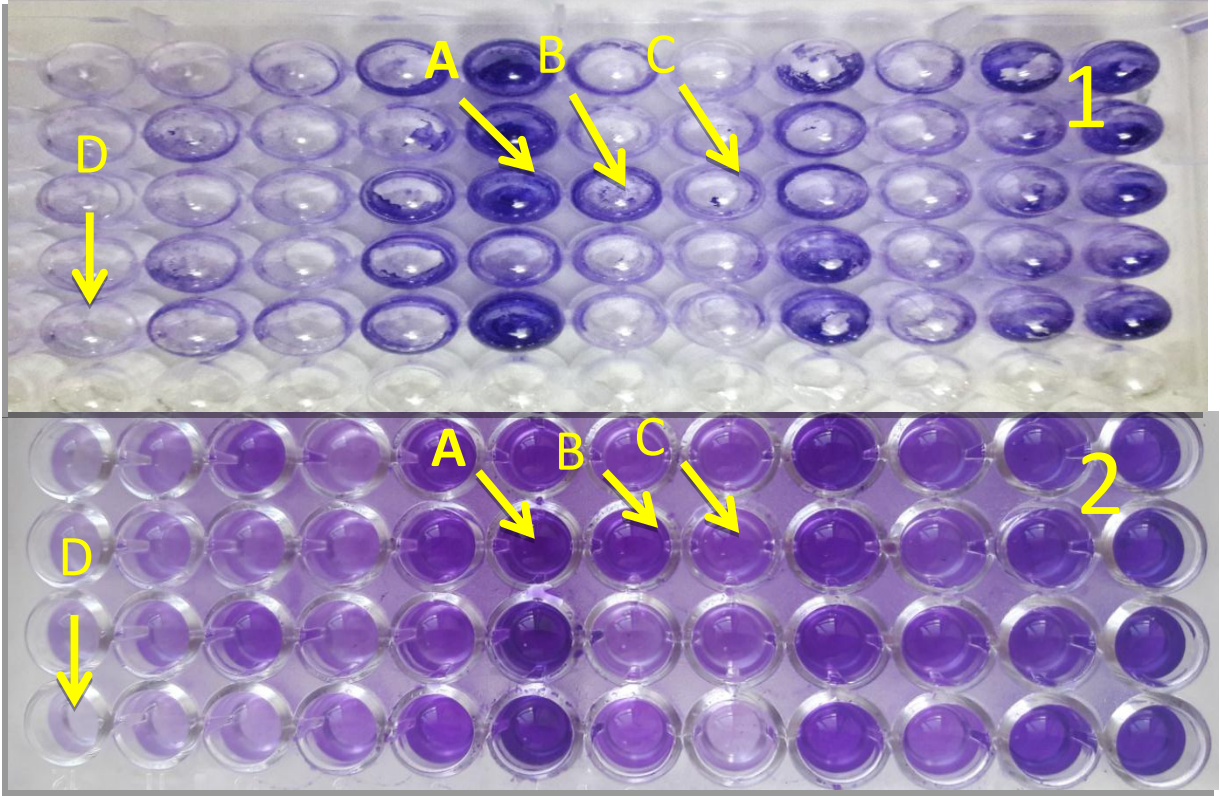


الصورة 2: النتائج التي تم الحصول عليها على وسط احمر الكونغو بعد 24 ساعة من التحضين وهي: (A) مستعمرات سوداء داكنة ذات شكل ناعم منتظم (موجبة متوسطة) (B) مستعمرات سوداء ذات حواف غير منتظمة متعرجة وشكل خشن وقوام جاف (موجبة قوية) (C) مستعمرات حمراء اللون او نبيذية ذات قوام املس منتظمة (سالبة) (D) مستعمرات حمراء جافة ذات حواف متعرجة وشكل غير منتظم (موجبة متوسطة)

اختبرت طريقة صفيحة الزرع النسيجي قدرة الـ CoNS الالتصاق على البوليستيرين بينما طريقة الأنبوبة اختبرت قدرتها للالتصاق على الزجاج وقد ذكر (Becker *et al.*, 2020) ان كلا المادتين خاص البوليستيرين يدخلان في صناعة الأدوات الطبية كما اشار الباحث ان وجود تركيب autolysinE (atIE) على سطح بكتريا *S. epidermidis* يمكنها من الالتصاق على Polystyrene. اتفقت نتائجنا بصورة ملحوظة مع ما وجدته (Gad *et al.*, 2009) حيث استنتج ان عزلات Staphylococci المعزولة من القناطر البولوية لديها قدرة اعلى من تلك المعزولة من الادرار على تكوين الغشاء الحيوي بعد اختبار قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة صفيحة الزرع النسيجي واستخدام المجهر الالكتروني.

الجدول 3: نتائج التحري عن تكوين عزلات CoNS للغشاء الحيوي بطريقة صفيحة الزرع النسيجي

انواع البكتريا	مصدر العزل	رقم العزلة	الامتصاصية عند 630 نانومتر	تقييم النتيجة
<i>S. epidermidis</i>	قتاطر بولية	1	0.646	موجبة قوية
		2	0.601	موجبة قوية
		3	0.251	موجبة متوسطة
		4	0.280	موجبة متوسطة
	انبوب القصبية الهوائية	5	0.260	موجبة متوسطة
	الأجهزة والأدوات الجراحية	6	0.213	موجبة ضعيفة
		7	0.284	موجبة متوسطة
	ادرار	8	0.322	موجبة متوسطة
		9	0.296	موجبة متوسطة
		10	0.353	موجبة متوسطة
	خراجات جروح	11	0.248	موجبة ضعيفة
		12	0.405	موجبة متوسطة
<i>S. haemolyticus</i>	قتاطر بولية	1	0.295	موجبة متوسطة
		2	0.320	موجبة متوسطة
	انبوب تغذية المعدة	3	0.200	موجبة ضعيفة
	الأجهزة والأدوات الجراحية	4	0.288	موجبة متوسطة
	ادرار	5	0.410	موجبة متوسطة
		6	0.350	موجبة متوسطة
<i>S. saprophyticus</i>	قتاطر بولية	1	0.250	موجبة متوسطة
	انبوب القصبية الهوائية	2	0.128	موجبة ضعيفة
	الأجهزة والأدوات الجراحية	3	0.122	سالبة
	ادرار	4	0.259	موجبة متوسطة
		5	0.133	موجبة ضعيفة
		6	0.255	موجبة متوسطة
		7	0.160	موجبة ضعيفة
	جروح	8	0.254	موجبة متوسطة
<i>S. hominis</i>	قتاطر بولية	1	0.289	موجبة متوسطة
		2	0.213	موجبة ضعيفة
	الاجهزة والادوات الجراحية	3	0.111	سالبة
	دم	4	0.260	موجبة متوسطة
		5	0.129	موجبة ضعيفة
	خراجات جروح	6	0.290	موجبة متوسطة
<i>S. lentus</i>	الاجهزة والادوات الجراحية	1	0.140	موجبة ضعيفة
		2	0.258	موجبة متوسطة
	ادرار	3	0.260	موجبة متوسطة
<i>S. sciuri</i>	دم	1	0.129	موجبة ضعيفة
	ادرار	2	0.126	موجبة ضعيفة



الصورة 3: توضح كمية الغشاء الحيوي المتكون بطريقة صفيحة الزرع النسيجي حيث (1) توضح الاغشية الحيوية مصطبغة بصبغة Crystal Violet والتي تظهر في قعر الحفر وجدرانها بينما (2) توضح كمية الصبغة المذابة بعد اضافة الميثانول ويشير (A) الى النتيجة الموجبة القوية بينما (B) الموجبة المتوسطة (C) موجبة ضعيفة (D) سالبة.

يوضح (الجدول 4) النسب المئوية لتكوين الغشاء الحيوي لأنواع الـ CoNS باستخدام الطرق الثلاث حيث وجد ان جميع الطرق فعالة في تحديد قدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي وبنسب تقديرية مختلفة لكن طريقة صفيحة الزرع النسيجي اعتبرت افضل طريقة كونها اعطت اعلى نسبة لتكوين الغشاء الحيوي حيث أبدت (35) عزلة نتيجة موجبة بنسبة (94.6%) بينما فقط عزلتان اعطتا نتيجة سالبة بنسبة (5.4%) تلتها طريقة الانبوبة التي كشفت عن قدرة (31) عزلة على تكوين الغشاء الحيوي بنسبة (83.8%) واعطت ستة عزلات نتيجة سالبة بنسبة (16.2%) اما بالنسبة لطريقة وسط احمر الكونغو فقد شكلت اقل نتيجة موجبة لتكوين الغشاء الحيوي بنسبة (75.7%) وعدد (28) عزلة وعلى الرغم من ذلك فقد اعطت الطريقة الاخيرة اعلى نسبة (10.7%) للنتيجة الموجبة القوية، ان هذه النسبة العالية من النتيجة السالبة لطريقة وسط احمر الكونغو قد يعود الى عدم وضع نمط تفسيري للنتيجة الموجبة الضعيفة كما هو الحال في بقية الطرق من قبل اغلب الباحثين بينما اعتبر (حياوي، 2018) ان المستعمرات الحمراء او النيذية التي تمتلك خلفية سوداء ذات قدرة ضعيفة على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة وسط احمر الكونغو.

تقاربت نتائج الطرق الثلاثة من ناحية ان اعلى نمط تكوين غشاء حيوي هو النتيجة الموجبة المتوسطة وهذا يتفق مع النتائج التي تم الحصول عليها في اغلب الدراسات السابقة مثل ( Abdel Halim *et al.*, 2018; Rampelotto *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2018 ; Hassan *et al.*, 2011) كما اشار كل هؤلاء الى ان طريقة صفيحة الزرع النسيجي اعطت اعلى نتيجة موجبة لتكوين الغشاء الحيوي لعزلات CoNS عند مقارنتها مع الطرق الاخرى.

الجدول 4: النسب المئوية لنتائج عزلات CoNS في الطرق الثلاثة المستخدمة للتحري عن وجود الغشاء الحيوي

النسبة المئوية (%) لنتائج عزلات CoNS			نوع الطريقة
السالبة	الموجبة القوية	الموجبة الكلية	
16.2	3.2	83.8	طريقة الانبوبة
24.3	10.7	75.7	طريقة وسط احمر الكونغو
5.4	5.7	94.6	طريقة صفيحة الزرع النسيجي

اعتبرت طريقة الصفيحة حساسة ودقيقة وذلك لأنه يتم فيها قياس الكثافة الضوئية التي تشير بطريقة غير مباشرة الى كمية الغشاء الحيوي المتكون فهي تحدد كمية الغشاء الحيوي بدقة اكثر اضافة الى امكانية اجراء مكررات لكل عذلة وحتى اعادة التجربة للحصول على نتائج اكثر وضوحا وقبولاً، بينما في طريقة الانبوبة يتم فيها تحديد كمية الغشاء الحيوي المتكون بصورة مرئية (بالعين المجردة) ويمكن عدها بطريقة نوعية، كما ان طريقة القياس الضوئية قد تكون نتائجها اكثر واقعية اذا ما قورنت مع طريقة وسط احمر الكونغو التي تشير الى النتيجة الموجبة بمجرد انتاج المادة المخاطية ولكنها قد توضح تفاصيل اكثر لعملية تكون الغشاء الحيوي وحدث تغيرات فسلجية (شكل المستعمرات وقوامها).

كما ذكر (De Silva et al., 2002) ان طريقة صفيحة الزرع النسيجي أفضل من طريقة وسط احمر الكونغو للتحري عن قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي اذ استنتج نفس الباحث من خلال نتائجه ان هذه الطريقة تحدد بصورة واضحة قدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي واحداث الاصابة.

#### المصادر العربية

حياوي، عمر غياث محمد قاسم (2018). التحري المظهري والجزيئي عن عامل الضراوة الـ Biofilm في بعض الجراثيم المرضية المعزولة من مصادر مختلفة. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

سلطان، نادية محمود؛ خلف، صبحي حسين (2005). التصاق المكورات العنقودية السالبة لأنزيم التجلط على الخلايا الظهارية البولية للإنسان. مجلة علوم الرافدين. 16(8)، 184-190.

العمرى، عائشة وميض رمزي (2013). التحري عن الجراثيم المكونة للأغشية الحيوية في المرضى مستخدمي القناطر البولية ودراسة مقاومتها لبعض المضادات الحيوية باستخدام طبق مصنع محلياً. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة تكريت، العراق.

عواد، فاطمة عبد العزيز؛ نجيب، ليث مصلح (2016). دراسة تأثير زيت الزنجبيل على محتوى البلازيم والغشاء الحيوي لبكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* المعزولة من الأسنان. مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة. 10 (3)، 39-46.

كودي، محمد كامل؛ حسن، مثنى حامد؛ نادر، محمد إبراهيم (2018). تأثير المستخلص الكحولي لنبات إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) وعكبر النحل (Propolis) في تثبيط الغشاء الحيوي لبكتريا *Staphylococcus aureus* و *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من مرضى التهاب المجاري البولية. مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة. 12(1)، 40-53.

#### المصادر الاجنبية

Abdel Halim, R.M.; Kassem, N.N.; Mahmoud, B.S. (2018). Detection of biofilm producing staphylococci among different clinical isolates and its relation to methicillin susceptibility. *Op. access Macedonian J. Med. Sci.*, 6(8),1335.

- Arciola, C.R.; Baldassarri, L.; Montanaro, L. (2001). Presence of *icaA* and *icaD* Genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.*, **39**(6), 2151-2156.
- Atshan, S.S.; Nor Shamsudin, M.; Sekawi, Z.; Lung, L.T.T.; Hamat, R.A.; Karunanidhi, A.; Mateg, A. A.; Ghaznavi-Rad, E.; Ghasemzadeh-Moghaddam, H.; Chong Seng, J.S.; Nathan, J.J. (2012). Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Biotech.*, **2012**.10.
- Becker, K.; Both, A.; Weißelberg, S.; Heilmann, C.; Rohde, H. (2020). Emergence of coagulase-negative Staphylococci. *Exp. Rev. Anti-Infective Therapy*. **18**(4), 349-366.
- Christensen, G.D.; Simpson W.A.; Bisno A.L.; Beachey E.H. (1982). Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *J. Infect. Immun.*, **37**(1), 318-326.
- Christensen, G.D.; Simpson W.A.; Younger J.J.; Baddour L.M.; Barrett F.F.; Melton D.M.; Beachey E.H. (1985). Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: A Quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.*, **22**(6), 996-1006.
- Cramton, S.E.; Ulrich, M.; Götz, F.; Döring, G. (2001). Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.*, **69**(6), 4079-4085.
- Darwish, S.F.; Asfour, H.A. (2013). Investigation of biofilm forming ability in Staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Sci. World J.*, **2013**.9.
- De Silva, G.D.I.; Kantzanou, M.; Justice, A.; Massey, R.C.; Wilkinson, A.R.; Day, N.P.J.; Peacock, S.J. (2002). The *ica* operon and biofilm production in Coagulase-Negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.*, **40**(2), 382-388.
- Freeman, D.J.; Falkiner, F.R.; Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by Coagulase Negative Staphylococci. *J. Clin. Pathology*. **42**(8), 872-874.
- Gad, G.F.M.; El-Feky, M.A.; El-Rehewy, M.S.; Hassan, M.A.; Abolella, H.; Abd El-Baky, R.M. (2009). Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *J. Infect. Dev. Ctries.*, **3**(05), 342-351.
- Hassan, A.; Usman, J.; Kaleem, F.; Omair, M.; Khalid, A.; Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian J. Infectious Dis.*, **15**(4), 305-311.
- Inikori, G.V. (2019). Antimicrobial Resistance and Distribution Of *mecA* Gene among Clinical and Carriage Coagulase Negative Staphylococci Isolates. MSc. Thesis, College of Science. University of Ghana. Ghana.
- Kour, D.; Rana, K.L.; Kaur, T.; Yadav, N.; Yadav, A.N.; Rastegari, A.A.; Saxena, A.K. (2020). "Microbial Biofilms: Functional Annotation and Potential Applications in Agriculture and Allied Sectors". In. "New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms". Elsevier. USA.
- Lotfi, G.; Hafida, H.; Nihel, K.; Abdelmonaim, K.; Nadia, A.; Fatima, N.; Walter, Z. (2014). Detection of biofilm formation of a collection of fifty strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Algeria at the University Hospital of Tlemcen. *J. Bacteriol. Res.*, **6**(1), 1-6.
- Mariana, N.S.; Salman, S.A.; Neela, V.; Zamberi, S. (2009). Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **3**(6), 330-338.
- Oliveira, A.; Cunha, M.D.R.S. (2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in Coagulase-Negative Staphylococci. *BMC Res. Notes.*, **3**(1), 8-1.

- Pedroso, S.H.S.P.; Sandes, S.H.C.; Luiz, K.C.M.; Dias, R.S.; Serufo, J.C.; Farias, L.M.; Carvalho, M.A.R.; Bomfim, M.R.Q.; Santos, S.G. (2016). Biofilm and toxin profile: A phenotypic and genotypic characterization of Coagulase-Negative Staphylococci isolated from human bloodstream infections. *Micro. Pathogenesis.*, **100**(2016), 312-318.
- Rampelotto, R.F.; Lorenzoni, V.V.; Silva, D.D.C.; Coelho, S.S.; Wust, V.; Garzon, L.R.; Nunes, M.S.; Meneghetti, B.; Brites, P.C.; Hörner, M.; Hörner, R. (2018). Assessment of different methods for the detection of biofilm production in Coagulase-Negative Staphylococci isolated from blood cultures of newborns. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.*, **51**(6), 761-767.
- Seng, R.; Kitti, T.; Thummeepak, R.; Kongthai, P.; Leungtongkam, U.; Wannalerdsakun, S.; Sitthisak, S. (2017). Biofilm formation of methicillin-resistant Coagulase Negative Staphylococci (MR-CoNS) isolated from community and hospital environments. *PLoS One*, **12**(8), 0184172-0184183.
- Shrestha, L.B.; Bhattarai, N.R.; Khanal, B. (2018). Comparative evaluation of methods for the detection of biofilm formation in Coagulase-Negative Staphylococci and correlation with antibiogram. *Infect. Drug Resist.*, **11**, 607-613.
- Stepanović, S.; Dakić, I.; Djukić, S.; Lozuk, B.; Svabić-Vlahović, M. (2002). Surgical wound infection associated with *Staphylococcus sciuri*. *Scandinavian J. Infect. Dis.*, **34**(9), 685-686.
- Stepanović, S.; Vuković, D.; Dakić, I.; Savić, B.; Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods.*, **40**(2), 175-179.
- Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Bonvventura, G.D.; Djukić, S.; Ćirković, I.; Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by Staphylococci. *Apmis*, **115**(8), 891-899.
- Vanaparathi, N.; Sadawarte, K. (2019). Medically important Coagulase-Negative Staphylococci. *Intern. J. Clin. Biomed.*, **5**(2), 1-8.
- Yong, Y.Y.; Dykes, G.A.; Choo, W.S. (2019). Biofilm formation by Staphylococci in health-related environments and recent reports on their control using natural compounds. *Crit. Rev. Microbiol.*, **45**(2), 201-222.
- Zatout, A.; Djibaoui, R.; Kassah-Laouar, A.; Benbrahim, C. (2020). Coagulase Negative Staphylococci in Anti-Cancer Center, Batna, Algeria: antibiotic resistance pattern, biofilm formation, and detection of *mecA* and *icaAD* genes. *Afr. J. Clin. Exp. Microbiol.*, **21**(1), 21-29.
- Zhou, S.; Chao, X.; Fei, M.; Dai, Y.; Liu, B. (2013). Analysis of *S. Epidermidis icaA* and *icaD* genes by polymerase chain reaction and slime production: a case control study. *BMC infectious Dis.*, **13**(1), 242.
-

## Comparison of Three Biofilm Detection Methods in Coagulase Negative Staphylococci Species

**Ahmed A. Hammadi**

*Nineveh Education Directorate/ Ministry of Education/ Iraq*

**Mohsin A. Essa**

*Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul*

### ABSTRACT

This study was conducted with the aim of investigating the ability of Coagulase Negative Staphylococci (CoNS) for the detection of biofilms, which are considered as the main virulence factor in their pathogenicity. Three methods were used for this purpose, the tube method, congo red agar and tissue culture plate method. Thirty-seven isolates of the following bacteria were tested, which includes *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lentus* and *S. sciuri*. The results of the tube method showed that most isolates (64.5%) gave a moderate positive result, (32.3%) was weak positive and six isolates showed no ability to form biofilm, the congo red method showed that, the majority of isolates were a moderate positive result (89.3%) and nine isolates were negative for biofilm formation. As for the tissue culture plate method, the results ranged between (62.9%) a moderate positive and (31.4%) a weak positive, while only two isolates could not form biofilm. When comparing the efficiency of the three methods in detecting the ability of CoNS isolates to form biofilm, it was found that tissue culture plate method was the most efficient (94.6%), followed by the tube method (83.8%), and the congo red (75.7%).

**Keywords:** Biofilm, Coagulase Negative Staphylococci, Biofilm Detection Methods.