الكشف مظهريا وجينيا عن اهم عوامل الضراوة لبعض انواع البكتريا المعزولة من اظافر الاطفال المصابين بالاسهال

اريج منصور زعيان [1] ، أ.د مُحَمَّد نظير معروف [2]

[1] قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ،جامعة تكريت .

[2] قسم علوم الحياة ، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة تكريت .

mohammednather78@yahoo.com

areejaldoury@gmail.com

الخلاصة

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

الكلمات المفتاحية :البكتريا المسببة للأسهال ، جينات الضراوة ، عوامل الضراوة.

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

Areej M. Zaiean [1] , **Prof.Dr. Mohammed N.Maaroof** [2]

[1] Biology Department, College of Science , Tikrit University .

[2] Biology Department, College of Education for pure Sciences , Tikrit University.

ABSTRACT

collection 120 samples from children's nails infected with Diarrhea under the age of five. The ability of Bacterial isolates to product some virulence factors , including hemolycin , biofilm , urease , lipase , lecithinase , protease ,showed that *Staphylococcus aureus* was producing hemolycin ,biofilm , lipase and lecithinase rate 64%, 50%, 78%, 31%, 35% respectively , while *Escherichia coli* was producing hemolycin within 28.6%, biofilm 42.9%, urease 71.4%, *P*seudomonas *aeruginosa* was producing hemolycin , biofilm , protease and lipase within 100%, urease 33.3%, lecithinase 66.6%. The results showed that the percentage of *hla*

gene responsible for the encoded of hemolysin in *staph.aureus* 66.6% ,while percentage of *ndvB* gene responsible for the encoded of Biofilm in E.coli rate 50%,respectively, and also evaluated the presence of virulence gene *plcH* ,*pelA* responsible for the encoded of Hemolysin , Biofilm in *P.aeruginosa* rate 100%,100% respectively.

Keywords: Diarrheal bacteria ,Virulence genes , Virulence factors.

المقدمة

ان الامراض التي تنتقل عن طريق الأغذية تساهم في انتشار الأمراض والوفيات للأنسان بالاضافة الى تكاليف العناية الصحية [1,2]. الأيدي هي وسيلة رئيسية لنقل الميكروبات المختلفة بما في ذلك الأنواع المعوية [3]، تحدث الأصابات المختلفة عن طريق اليدين والأظافر nails وتلعب الايدي الملوثة دوراً رئيسياً في أنتقال الأمراض عن طريق الفم والبراز [4]، ويعد تلوث اليدين البرازي أحد الطرق المهمة التي يتعرض لها الأطفال للاصابة بالامراض البكتيرية [5] .تؤدي العادات غير الصحية لمعظم الناس الى أصابات مختلفة عن طريق اليدين والأظافر nails . ترتبط 80% من الأمراض بسوء النظافة المنزلية والشخصية [6]. يعد غسل اليدين قبل أعداد الطعام فرصة مهمة بشكل خاص للوقاية من الأسهال في مرحلة الطفولة،يستلزم غسل اليدين بعد التغوط وقبل تناول الطعام بمعدل 32 غسلاً لليدين يومياً ويستهلك 20 لتراً من الماء يومياً [7] , يؤدي غسل اليدين بالصابون إلى تقليل خطر الأصابة بإمراض الأسهال بنسبة 47%-42[8]. يعتبر الأسهال Diarrhea من المشاكل الطبية الخطيرة والواسعةالانتشار في العالم اذ يكون الاطفال الذين تتراوح اعمارهم بين شهر –خمس سنوات هم الأكثر عرضة لهذا المرض ولاسيما الاطفال الرضع الذين هم بين ستة اشهر –سنتين [9].تفرز البكتريا مايسمى بعوامل الضراوة Virulence factor لاحداث المرض ، والتي تدمر الخطوط الدفاعية للمضيف، ومنها أنزيم Protease الذي يحلل الروابط الببتيدية Peptide bonds وبالتالي يمكن ان تتحلل البروتينات والببتيدات [10] ، وكذلك افرازها لإنزيم الهيمولايسين الذي يحلل أغشية الخلايا عن طريق تكوين ثقوب Pore former ، والذي يهاجم خلايا الدم الحمراء erythrocyte ، ويعتبر من السموم الخارج خلوي Exotoxin [11] ، والتصاق البكتريا على السطح الحيوي او الغير حيوي ومغلفة في مصفوفة رطبة من البروتينات والسكريات والأحماض النووية من خلال تكوينها الغشاء الحيوي Biofilm [12, 13] ، بالأضافة إلى أفرازها الأنزيم المحلل لليوريا Urease [14].

المواد وطرائق العمل

جمع العينات Collection of Samples

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

التشخيص Identification

الفحص المظهري Morphological examination

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

الفحص المجهري Microscopic examination

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

الاختبارات البايوكيموحيوية Biochemical tests :[16,17]

اختبار الكاتاليز، اختبار الأوكسديز، اختبار الأندول ، اختبار المثيل الأحمر، اختبار الفوكس – بروسكاور، اختبار استهلاك السترات ، اختبار اليوريز ، اختبار الحركة ، اختبار تخمر السكريات ، اختبار انزيم التجلط.وقد شملت العينات البكتيرية 112 عينة اعطت نمواً بكتيريا من مجموع العينات الأجمالي .

تشخيص العزلات بنظام Vitek 2 compact system

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

التحري عن عوامل الضراوة Determination of Virulence Factor

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

التحري عن إنتاج الأنزيم المحلل للدم Hemolysin

تم زرع البكتريا على أطباق أكار الدم Blood agar plate المحتوية على دم الإنسان ، وحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة ، ويعد الاختبار إيجابياً عند ظهور منطقة الانحلال حول المستعمرة[18].

التحري عن إنتاج أنزيم اليوريز Urease Test

أجري الاختبار بتلقيح مائل أكار اليوريا بالبكتريا ، بطريقة الطعن والتخطيط ، وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 37 مْ، ويعد الفحص إيجابياً عند تغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي ، وإنَّ العزلات المحللة لليوريا تحول بسرعة لون الوسط إلى الوردي خلال 2-3 ساعة ، أما العزلات الأقل نشاطاً لاتعطي نتيجة إلّا إذا تركت لمدة 3 أيام أو أكثر ، واستعمل الاختبار للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم اليوريز الذي يحلل اليوريا إلى أمونيا وثاني أوكسيد الكاربون، حيث إنّ الأمونيا ترفع الرقم الهيدروجيني للوسط [15].

التحري عن أنتاج الأنزيم الهاضم للبروتين Protease

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

التحري عن انتاج أنزيم اللسثنيز Lecithinase

تم تلقيح وسط مح البيض Egg Yolk agar بالبكتريا المعزولة، وحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 48-24 ساعة ، أنْ تكونَ مناطق رائقة حول المستعمرات النامية تدل على فعّالية أنزيم اللسيثنيز [16].

التحري عن انتاج أنزيم اللاييز Lipase

بعد تلقيح وسط مح البيض Egg Yolk agar بالبكتريا ، وحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24-48 ساعة، تم غمر الطبق لمدة 20 دقيقة بمقدار كافٍ من محلول مشبع بكبريتات النحاس (CUSO4) ، بعد ذتك تم إزالة المحلول الفائض ، وجفف الطبق لمدة 30 دقيقة في الحاضنة، وإنَّ ظهور لونٍ ازرقٍ مخضر حول مناطق النمو يدل على تحلل الدهن بواسطة أنزيم اللاييز[16].

التحري عن تكوين الغشاء الحيوي Detection of Biofilm Formation

طريقة الأنبوب Tube method

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

عزل الدنا البلازميدي Plasmid DNA Isolation

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

البادئات Primers

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

تحضير خليط تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

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

جدول (1) : تسلسلات البادئات المستخدمة.

Primer	Virulence factor	Nucleotide sequences (5'-3')	Bacteria containing the gene	Amplicon size (bp)	References
Hla	Hemolysin	F:GGTTTAGCCTGGCCTTC R:CATCACGAACTCGTTCG	*Staph .aureus*	500	[21]
ndvB	Biofilm	F:GGACAGGGCAAGGTTTAT T R:GGTTATACTCAGCAGCAC TATC	*E.coli*	463	Original
PlcH	Hemolysin	F:GCACGTGGTCATCCTGAT GC R:CCAGTAGGCGTCGACGTA C	*P.aeruginosa*	608	[22]
PelA	Biofilm	F:CTGGAACAGCCAGGTAAT G GGCTTGACCTTGAGTTT	*P.aeruginosa*	950	[23]

جدول(2) : مكونات تفاعل PCR Master mix .

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

جدول (3) خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل لكل primer

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

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

النتائج والمناقشة

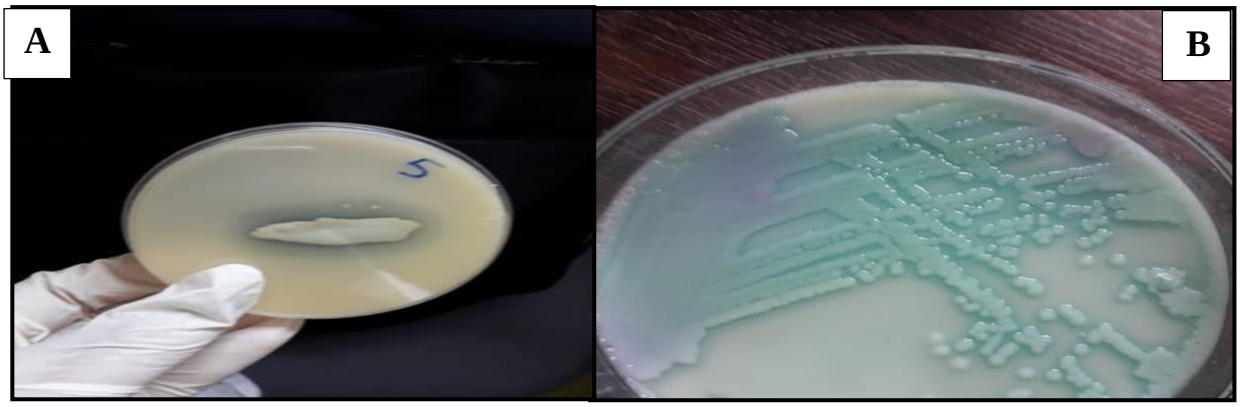
الكشف عن عوامل الضراوة Virulence Factor

تم استخدام الأوساط الزرعية للكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على انتاج بعض عوامل الضراوة وهي :-انزيم الهيمولايسين Hemolycin enzyme الذي يحلل كريات الدم الحمراء ،أنزيم اليورير Urease الذي يحلل اليوريا الى أمونيا وثنائي أوكسيد الكربون ، وهضم البروتينات من خلال أنتاج إنزيم protease اذ تم التحري عنه في بكتريا *P.aeruginosa* فقط ، انزيم اللسثنيز واللاييز اللذان تم التحري عنهما باستخدام وسط اكار صفار البيض ، اذ تقوم البكتريا المنتجة لانزيم اللسثنيز بتحليل الدهنيات المفسفرة في اغشية الخلايا مما يؤدي الى تحلل النسيج وموته ، اما البكتريا المنتجة لانزيم اللاييز فتعمل على تحطيم الدهون مما يسهل على البكتريا اختراق انسجة الجلد ، وماتحت الجلد . انتاج الغشاء الحيوي كما مبين في الجدول (4).

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

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

اظهرت نتائج التحري عن عوامل الضراوة للعزلات البكتيرية ان 32 عزلة وبنسبة 64% من عزلات *Staph.aureus* محللة للدم و 25 عزلة وبنسبة 50 % مكونة للغشاء الحيوي و 39 وبنسبة 78% منتجة لليوريز كما تبين انها منتجة لأنزيمي اللاييز واللسثنيز بنسبة 62 % ، 70% وبواقع 35 ، 31 على التوالي كما في الصورة (1).

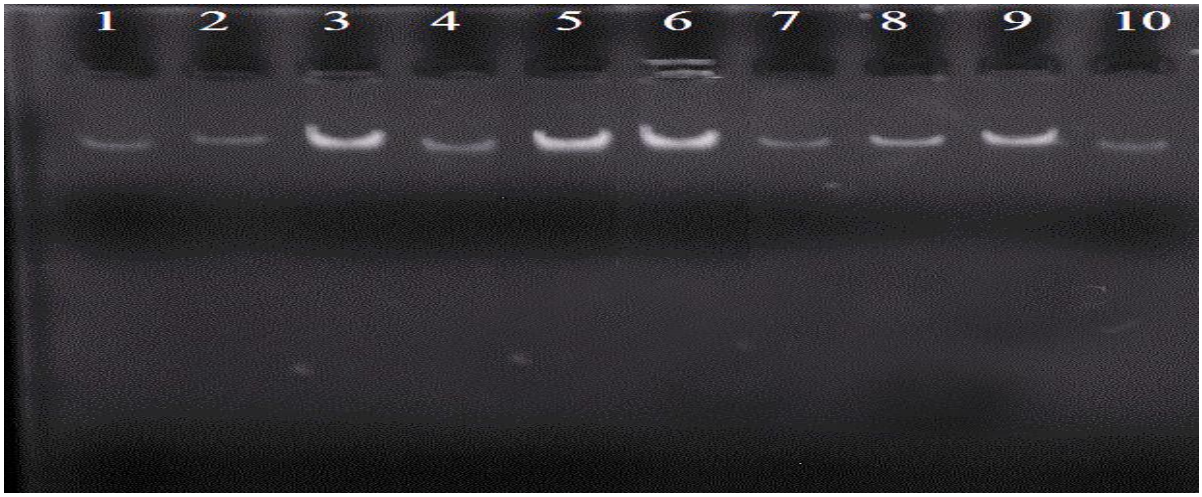


صورة (1) انتاج عوامل الضراوة من قبل بكتريا *Staph.aureus* (A).Lecithinase (B).Lipase

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

التحري عن جينات عوامل الضراوة بأستخدام تقنية التضاعف السلسلي لانزيم بلمرة الدنا

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

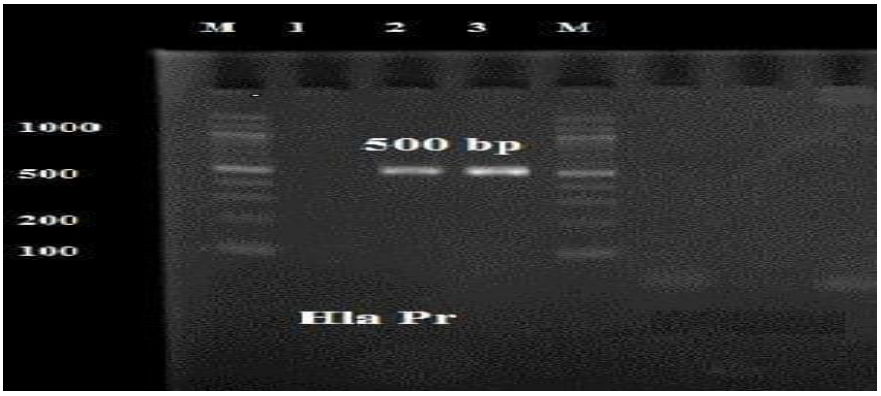


صورة (2) : الترحيل الكهربائي لل DNA البلازميدي للعزلات البكتيرية .

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

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

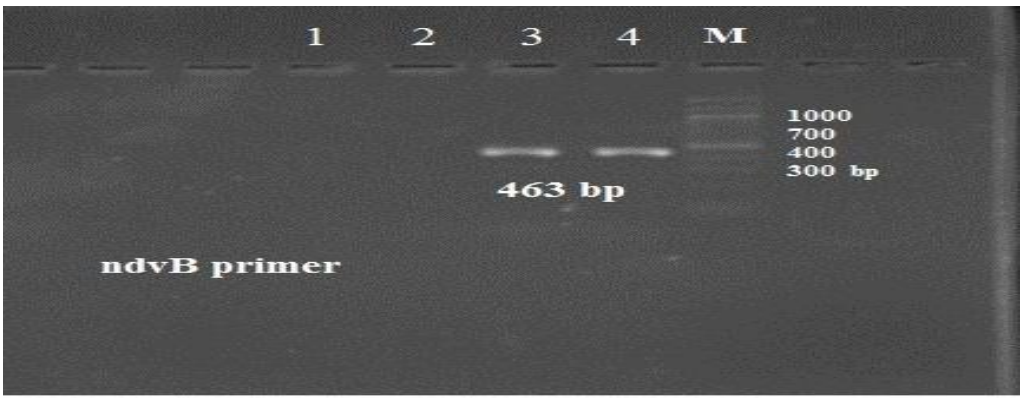
تم الكشف عن جين *hla* المسؤول عن انتاج الهيمولايسين في بكتريا *Staph.aureus* بحجم جزيئي 500 bp وتم ضبط Annealing Temperature عند درجة 50 مْ . رحل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل على هلام الأكاروز وظهرت حزم البادىء في عزلتين وبنسبة (66.6%) كما في الصورة (3) . ووجد بنسبة (81.18%) من قبل[24] ، وهذا يعني ان بعض عزلات *Staph. aureus* المعزولة من الأظافر لها القدرة على تحليل الدم مما يجعلها اكثر ضراوة وقدرة على احداث التهابات شديدة لدى المرضى ، حيث ينشط جين *hla* ضد مجموعة من الخلايا المضيفة بما في ذلك كريات الدم الحمراء والخلايا وحيدة النواة ،اذ يكون هذا الجين مترافقاً مع المرضى [25].



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

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

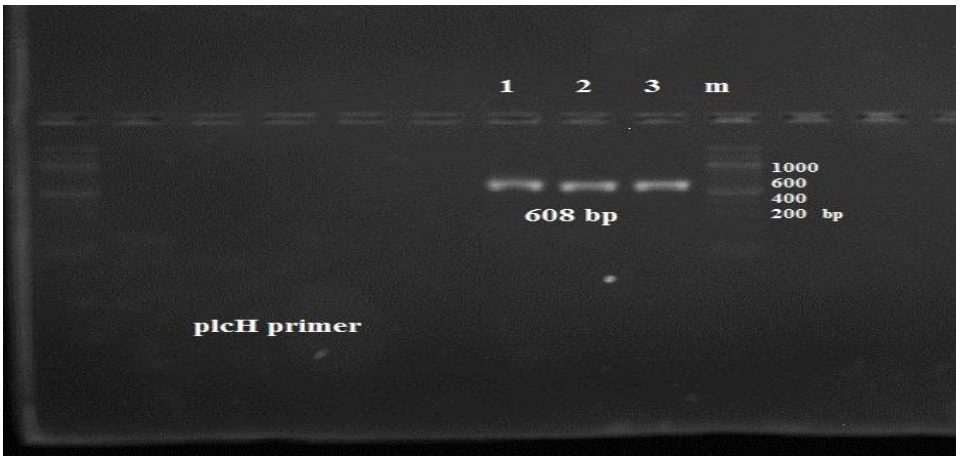
تم الكشف عن جين *ndvB* في بكتريا *E.coli* بحجم جزيئي 463 bp وتم ضبط Annealing Temperature عند درجة 57 مْ. رحل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل على هلام الأكاروز وظهرت حزم البادىء في عزلتين بنسبة (50%) كما في الصورة (4) وكانت اعلى قليلاً مما جاء به [26] اذ وجدوا الجين بنسبة (41.66%) ، يعتبر *ndvB* من الجينات المهمة اذ يشفر لأنتاج الغشاء الحيوي اذ يعتبر واحد من أهم عوامل الضراوة التي يمتلكها *E.coli* ، اذ يمنح الغشاء الحيوي العزلات البكتيرية العديد من الصفات مثل مقاومة المضادات الحياتية وإمكانية التعبير عن العديد من عوامل الضراوة ومقاومة عمليات الألتهام الخلوي وغيرها من دفاعات المضيف[27].



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

التحري عن جين *plcH* المشفر لأنتاج الهيمولايسين في بكتريا *P.aeruginosa*

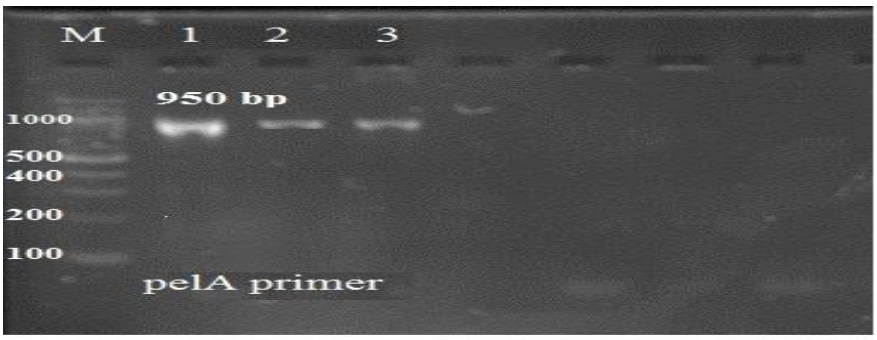
تم الكشف عن وجود جين *plcH* المسؤول عن انتاج الهيمولايسين في بكتريا *P.aeruginosa* بحجم جزيئي 608bp وتم ضبط Annealing Temperature عند 55 مْ. رحل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR على هلام الاكاروز وظهرت حزم الجين في جميع العزلات وبنسبة 100 %كما في الصورة(5).



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

التحري عن جين *pelA* المشفر لأنتاج الغشاء الحيوي في بكتريا *P.aeruginosa*

تم الكشف عن جين *pelA* المسؤول عن انتاج الغشاء الحيوي في بكتريا *P.aeruginosa* بحجم جزيئي 950 bpوتم ضبط Annealing Temperature عند درجة 50 مْ .رحل ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل على هلام الأكاروز وظهرت حزم الجين وبنسبة بلغت 100 % اي ظهرت في جميع عزلات *P.aeruginosa* كما في الصورة (6).جاءت هذه النتيجة متطابقة تماماً مع دراسة [28] اذ وجدو ان نسبة الجينات المشفرة لأنتاج pelA هي 100% ، كذلك جاءت النتيجة مقاربة لدراسة [29] اذ تحرا الباحثان عن وجود الجين بنسبة 97.8 %.



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

المصادر

1.**Bean**, **N** . **H** . , **Goulding**, **J** . **S** . , **Lao**, **C** . **and Angulo**, **F** . **J** . (**1996**) .Surveillance for foodborne disease outbreak , United states.Morbidity and Mortality Weekly Report, 45: 1-55.

2.**Campbell**,**M**.**E**.,**Gardner**,**C**.**E**.,**Dwyer**,**J**.**J**.,**Isaacs**,**S**.**M**.,**Kruegger**, **P**.**D**. **and Ying J**.**Y**.(**1998**).Effectiveness of public health interventions in food safety .Asystematic review .can .J.public health,89:197-202.

3.**Prescott L**.**M;Harley J**.**P;Klein D**.**A**(**2005**).Microbiology. 6 th ed .Tim McGraw-Hill co.New Delhi.Pp:675.

4.**Ray S**.**K**.,**Amarchand R**.,**Srikanth J**. **and Majumdar K**.**K**.(**2011**).A study on prevalence of bacteria in the hands of children and their perception on hand washing in two schools of Bangalore and Kolkata .Indian Journal of public Health,55(4):293-297.

5.**Langford** ,**RM**.(**2009**).Hand-washing and its impact on child health in Kathmandu,Nepal.Doctoral thesis ,Durham University.

6.**Patel H**.**R**.,**Daniel P**.**S**.,**Anand I**.**S**. **and Patel C**.**N**.(**2010**).Role of community pharmacist in assessing the awareness of hand hygiene in rural area.Journal of Global pharma Technology,2(5):59-61.

7.**Graeff JA**,**Elder JP** , **Booth EM**,**San Francisco CA**, **Jossey Bass** (**1993**).Communication for Health and Behavior Change : A Developing country perspective.

8.**Curtis V**, **and Cairncross S**.(**2003**).Effect of washing hands with soap on diarrhea risk in the community: A systematic review.Lancrt Infect Dis.;3:275-81.

9.**AL-Kaby**,**F**.**J**.(**2000**).A study on diarrhea in relation to malnutrion in children under 2 years in Baghdad.,M.se.Thesis stbmitted of the college of medicine university of Al-Mustansiriya.

10.**Mims**,**C**.**A**.**;Playfair**,**J**.**H**.**L**.**;Wakelin**,**D**.**;Williams**,**R**. **and Anderson** ,**R**.**M**.(**1993**).Medical Microbiology .Mobsy,London.

11. **Tomita**,**T**.**and Kamio**,**Y**.(**1997**).Molecular Biology of pore – forming cytolysine from *staphylococcus aureus* ,alpha and gamma-hemolysin and leukocidin –Biosci.Biotechnol.Biochem .vol 61(4):565.

12. **Tendolkar**,**P**.**M;Baghdayan**,**A**.**S**.,**and Shankar**,**N**.(**2006**).Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis* .Journal of bacteriology ,188(6): 2063-2072.

13. **Mohamed** ,**A**.**J**.,**and Hung**,**D**.**B**.(**2007**).Biofilm formation by *Enterococci*.Journal of medical microbiology ,56(12):1581-1588.

14. **AL–Charrakh**, **A** . **H** . **; Yousif**, **S** . **Y** . **and AL–Janabi**, **H** . **S** .(**2011**) . Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocines from *Klebsiella* isolation from .Hilla/Iraq.J.Microbial.2,Nuo.5,1-11.

15. **Alfred** , **E**.**B**.(**2005**) .Bensons microbiological applications in laboratory manual in general microbiology .9 th ed.McGraw-Hill.Companies.U.S.A

16. **Cruickshank**, **R** . **; Dugid**, **J** . **P** . **; Marmion**, **B** . **P** . **and Swain R**.**H**.**A**(**1975**) . Medical Microbiology .Vol .2.The practice of Medical microbiology .12 th Churchill Living .England.

17. **Mahon,C.R.; Lehman,D.C.; Manuselis,G.(2011)**.Textbook of Diagnostic Microbiology .4 th ed.,W.B Saunders Company ,China.

18. **Koneman**, **E** . **W** . **; Allen**, **S** . **D** . **Janda**, **W** . **M** . **; Schreckenberg** , **P** . **C** . **and Winn**, **W** . **C** . (**1997**) . Color Atlas & textbook of diagnostic Microbiology 5 th ed . J . B . Lippincott Comp . , Philadelphia .

19. **Lennette**, **E** . **H** . **; Balow**, **S** . **A** . **; Hausler**. **W** . **J** . **and Shadouy** (**eds**.).(**1985**).Manual of clinical Microbiology. American Society for microbiology ,Washington D.C.

20. **Christensen**, **G** . **D** . **; Simpson**, **W** . **A** . **; Bison**, **A** . **L** . **and Beachey**, **E** . **H** . (**1982**).Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surface. Infect Immune 37: 318-26.

21.**Booth**,**M**.**C**.,**Pence**,**L**.**M**,**Mahasreshti**,**P**.,**Callegan**,**M**.**C**.,**Gilmore**,**M**.**S**. (**2001**). Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection . Infection and immunity ,69(1),345-352.

22.**Fazeli**, **N** . **and Momtaz**, **H** . (**2014**) .Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. Iranian Red Crescent Medical Journal,16(10).

24.**Ariyanti** , **D**. **; Isrina** , **S**. **; Salasia** , **O**.**;Toto**,**S** .**F**. (**2011**) . Characterization of haemolysin of *Staphylococcus aureus* isolated from food of animal origin . Journal of biotechnology 16(1):32-37.

25.**Moravej**, **Z**. **; Tabatabaei**, **M**.**;Shirzad** , **A**.**and Khoshbakht**, **R**.(**2015**) . Characterization of hemolysins of *Staphylococcus* strains isolated from human and bovine , Southern Iran . Iranian Journal of veterinary Research . Vol.15.No.(4) p: 326-330.

26.**Al-Shuwaikh** , **A**.**M**.**; Ibrahim** , **I**. **A**. **J**.**and Al-Shuwaikh** , **R**.**M**.(**2015**). Detection of *E .coli* and Rotavirus in Dirrhea among children Under Five years Old. Iraqi Journal of Biotechnology., Vol.14 , No .1, 85-92.

27.**Hanna** , **A**.**; Bergo**, **M**.**; Stout** , **V**. **and Razatos** , **A**.(**2003**). Role of capsule colonic acid in adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* .Appl. Environ .Microbiol . 69: 4474-4481.

28.**Al-Sheikhly**, **M** . **A** . **A** . **H** . **; Musleh**, **L**. **N**. **and Harith**, **J** . **F** . (**2019**) . Assessment of pelA –carried *Pseudomonas aeruginosa* isolates in respect to biofilm formation .Iraqi Journal of Science ,Vol.60 , No .6, pp:1180-1187.

29.**Maita**, **P**. **and Boonbumrung** ,**K** .(**2014**). Associated between biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates versus antibiotic resistance and genes involved with biofilm .Journal of Chemical and Pharma ceutical Research, 6(5):1022-1028.