وقائع المؤتمر العلمي السنوي الثالث لكلية التربية الاساسية
في مجال العلوم الصرفة والموسوم:
(مؤتمر كلية التربية الاساسية في مجال العلوم الصرفة)
وتحت شعار
(بالعلوم الصرفة نبني واقعا معرفيا متجددا)
يومي الاحد والاثنين 21-2026/6/22

العلاقة بين عوامل الضراوة وتكوين الغشاء الحيوي ومقاومة المضادات الحيوية في بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* المعزولة من الحروق

نـورعباس خضير أ.م.د.أسمـاء عزت سليم
قسم العلوم /كلية التربية الأساسية /الجامعة المستنصرية
asmaa.edbs@uomustansiriyah.edu.iq noorabbas24@uomustansiriyah.edu.iq
07901987283 07805027966

مستخلص البحث:
تهدف هذه الدراسة إلى تقييم العلاقة بين عوامل الضراوة، وتكوين الغشاء الحيوي، ومقاومة المضادات الحيوية في عزلات بكتيريا ***Pseudomonas aeruginosa*** و ***Staphylococcus aureus*** المعزولة من مرضى الحروق. شملت الدراسة 30 عزلة بكتيرية (15 عزلة لكل نوع) تم الحصول عليها من مستشفيات مختلفة للفترة من 15-11-2025 الى 10-02-2026 ثم أعيد تأكيد تشخيصها مختبرياً بالاختبارات المظهرية والكيموحيوية المعتمدة في مختبر الأبحاث والدراسات في قسم العلوم، كلية التربية الاساسية، الجامعة المستنصرية. أظهرت ***S. aureus*** قدرة ضراوة عالية؛ إذ أنتجت جميع العزلات (100%) إنزيم الكواكيوليز(Coagulase) ، الجيلاتينيز، اليوريز، الدنايز، والهيمولايسين، مقابل 73.3% للبروتييز، و 46.7% لليسيثينيز، و 33.3% للايبيز. وفيما يخص مقاومة المضادات الحيوية، سجلت ***S. aureus*** مقاومة تامة للبنسلين (100%)، ومقاومة عالية للإريثرومايسين (86.7%)، مع ظهور سلالات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (***Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*** - MRSA) بعدد (7 عزلات) وبنسبة (46.7%)، مع حساسية عالية للكوتريموكسازول.(93.3%) في المقابل، أظهرت ***P.aeruginosa*** نمطاً شديد المقاومة بنسبة 100% للسيبروفلوكساسين والجنتامايسين والليفوفلوكساسين، و 93.3% للإيميبينيم، مع إنتاج فائق لعوامل الضراوة (100% للجيلاتينيز والهيمولايسين، و 93.3% للايبيز، و 66.7% للبروتييز . ***P.aeruginosa*** تكويناً قوياً للغشاء الحيوي وبنسبة 40% بطريقة الأنبوب، بينما كانت النسبة 40% لبكتريا ***S. aureus*** بطريقة الكونغو الأحمر.أجري التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS v.27 ، وشمل حساب التكرارات والنسب المئوية، واختبار Chi-square لدراسة العلاقة بين عوامل الضراوة ومقاومة المضادات، واختبار Cohen's Kappa لقياس درجة الاتفاق بين طريقتي الكشف عن الغشاء الحيوي. أظهر اختبار كابا اتفاقاً عالياً في ***P. aeruginosa (P<0.001, k=0.720)*** واتفاقاً متوسطاً في ***S. aureus*** (P=0.030, k=0.419) كما كشف التحليل عن ارتباط إيجابي دال إحصائياً بين القدرة على تكوين غشاء حيوي قوي ومستوى المقاومة المتعددة للأدوية (Multidrug-Resistant - MDR)في كلا النوعين.(P<0.05)

الكلمات المفتاحية:*Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*، الحروق، عوامل الضراوة، الغشاء الحيوي، مقاومة المضادات.
بحث مستل من رسالة ماجستير

المقدمة:

الحروق هي إصابات ناتجة عن تعرض الجلد أو الأنسجة لعوامل حرارية أو كيميائية أو كهربائية أو إشعاعية، وتمثّل من أكثر الإصابات شيوعاً في العالم، كما تُعدّ عدوى الحروق من أبرز مشكلات الصحة العامة نظراً لسهولة تلوث الأنسجة المصابة وما يترتب عليها من مضاعفات قد تصل إلى تعفّن الدم والوفاة. تُعدّ بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* من أكثر مسببات عدوى الحروق انتشاراً في المستشفيات، وتشتركان في قدرة عالية على التكيّف والبقاء في البيئات العلاجية الصعبة. *P. aeruginosa* بكتيريا سالبة الغرام عصوية الشكل متحركة بواسطة سوط قطبي، وتُعدّ من مسببات العدوى المكتسبة من المستشفيات المرتبطة بمعدلات وفيات عالية، وقد أدرجتها منظمة الصحة العالمية ضمن قائمة أولويات البكتيريا المقاومة المتعددة الأدوية التي تتطلب تطوير خيارات علاجية جديدة (*Qin et al*.، 2022). تمتلك *P. aeruginosa* منظومة متكاملة من عوامل الضراوة تشمل إنزيمات خارج خلوية (بروتييز، لايبيز، جيلاتينيز، هيمولايسين) ومنظومات إفراز نوع III وVI، فضلاً عن قدرتها الفائقة على تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm)، وهو تجمّع منظّم من الخلايا البكتيرية داخل مصفوفة متعدد السكريد الخارجي (Exopolysaccharide). يُسهم الغشاء الحيوي في حماية البكتيريا من خلايا المناعة ومن فعل المضادات الحيوية، وتُقدَّر مقاومة الخلايا داخل الغشاء الحيوي بما يفوق مقاومة نظيراتها الطليقة بعشرات إلى مئات الأضعاف (*Thi et al*.، 2020؛ *Liao et al*.، 2022).

أما بكتريا *S. aureus* فهي بكتيريا موجبة لصبغة غرام كروية الشكل تتخذ ترتيب العناقيد، وتُعدّ من أخطر المسببات المرضية في عدوى الحروق والجروح والدم. وتمتاز بامتلاكها مجموعة متنوعة من عوامل الضراوة من أبرزها إنزيم الكواكيوليز (Coagulase) الذي يحوّل الفيبرينوجين إلى فيبرين فيحمي البكتيريا من البلعمة، إضافة إلى الهيمولايسين، والدنايز، والجيلاتينيز، واليوريز، والبروتييز، واللايبيز، وذيفانات جلدية متنوعة (Guo *et al*.، 2020). كما تشكّل السلالات المقاومة للميثيسيلين (MRSA) تحدياً سريرياً كبيراً بسبب امتلاكها جين *mecA* المرمِّز لبروتين ربط البنسلين المعدّل PBP2a. هناك علاقة معقّدة بين عوامل الضراوة وتكوين الغشاء الحيوي ومقاومة المضادات الحيوية، إذ أشارت دراسات حديثة إلى أن العزلات المنتجة لعوامل ضراوة متعددة تكون عادةً أكثر قدرة على تكوين غشاء حيوي قوي وأكثر مقاومةً للمضادات الحيوية مقارنة بالعزلات محدودة الضراوة (Nassar et al., 2022؛ Edwar et al., 2023). يُعزى ذلك إلى أن الجينات المسؤولة عن الضراوة وتلك المسؤولة عن المقاومة كثيراً ما تُحمَل على بلازميدات أو جزر إمراضية مشتركة، كما أن البيئة داخل الغشاء الحيوي تُحفّز التعبير التنظيمي لكلتا المجموعتين (Liao et al., 2022).

سجّلت دراسات متعدّدة في العراق انتشاراً واسعاً لعدوى الحروق بـ *P. aeruginosa* و *S. aureus* مع ارتفاع ملحوظ في معدلات المقاومة للمضادات الحيوية في السنوات الأخيرة. ومن هنا جاءت هذه الدراسة لتقييم العلاقة الإحصائية بين عوامل الضراوة الإنزيمية، وتكوين الغشاء الحيوي، ومقاومة المضادات الحيوية في عزلات *P. aeruginosa* و *S. aureus* المعزولة من مرضى

الحروق، بهدف فهم آليات الترابط بين هذه الخصائص وتوفير قاعدة علمية يمكن الاعتماد عليها في رسم سياسات العلاج ومكافحة العدوى.

طرائق العمل:

جمع العزلات البكتيرية وتأكيد التشخيص:

تم الحصول على 30 عزلة بكتيرية من صالة الحروق في المستشفيات (مدينة الطب،الفلوجة التعليمي،اليرموك التعليمي) موزّعة بالتساوي بين *Pseudomonas aeruginosa* (15 عزلة) و *Staphylococcus aureus* (15 عزلة)، ومن ثم أُعيد تأكيد تشخيصها مختبرياً في مختبر الابحاث والدراسات العليا، قسم العلوم، كلية التربية الأساسية، الجامعة المستنصرية. شمل التشخيص الزرع على الأوساط الانتقائية (Cetrimide Agar وMacConkey Agar لـ *P. aeruginosa*، وMannitol Salt Agar وBlood Agar لـ *S. aureus*)، والفحص المجهري بعد الصبغ بصبغة غرام، إلى جانب الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية (Oxidase، catalase، IMViC test) وفقاً لما ورد في (Tille, 2017).

الكشف عن عوامل الضراوة لكلا النوعين:

1. اختبار الكواكيوليز (Coagulase): الخاص بـ *S. aureus* باستخدام عدة HiMedia FD248 عبر خلط 0.5 مل من الكاشف المعاد ترطيبه مع 0.05 مل من مزرعة مرق ليلية وحضنها عند 37°م، ويُعدّ إيجابياً بتكون خثرة خلال 4 ساعات.(HiMedia, 2022)
2. اختبار البروتييز (Protease): أُجري بزرع مستعمرة بكتيرية حديثة النمو عمرها 24 ساعة على وسط صفار البيض (Egg Yolk Agar) وحضنها عند 37°م لمدة 48 ساعة، ويُعد الاختبار إيجابياً عند ظهور هالة شفافة حول المستعمرة.(Aryal, 2022)
3. اختبار اللاييز (Lipase): أُجري بنفس الطريقة على وسط صفار البيض مع إضافة قطرات من محلول كبريتات النحاسCuSO4 بتركيز 1% ويُعد الاختبار إيجابياً عند ظهور مستعمرات ذات لمعان لؤلؤي قزحي.(Faiz et al., 2020)
4. اختبار الليسيثينيز (Lecithinase): أُجري على وسط صفار البيض أيضاً، ويُعدّ إيجابياً بظهور منطقة ترسب غير ذائبة تحيط بالمستعمرة.(Aryal, 2022)
5. اختبار اليوريز (Urease): أُجري بتلقيح أنابيب وسط (Urease Agar Base) المحضرة على شكل وسط صلب مائل (Agar Slant) وحضنها عند 37°م لمدة 24 ساعة، ويُعد إيجابياً عند تحول لون الوسط من البرتقالي إلى الوردي.(Tille, 2017)
6. اختبار الجيلاتينيز (Gelatinase): أُجري بتلقيح أنابيب وسط الجيلاتين وحضنها عند 37°م لمدة 24 ساعة ثم وضعها في الثلاجة عند 4°م لمدة 30 دقيقة، ويُعدّ إيجابياً إذا بقي الوسط سائلاً.(حميد،2017).
7. اختبار الهيمولايسين (Hemolysin): أُجري بزرع العزلات على وسط الدم الصلب Blood Agar وحضنها عند 37°م لمدة 24 ساعة، ويُعدّ إيجابياً عند ظهور تحلل تام للدم من نوع بيتا- β hemolysis المتمثل بمناطق تحلل شفافة حول المستعمرات.(Moraveji et al., 2014)

8. اختبار الدنايز (DNase): أُجري الاختبار بزرع العزلات على وسط الدنايز الجاهز (DNase Agar) المجهز من شركة (HiMedia)، وحُضنت الأطباق عند 37°م لمدة 24 ساعة. يُعد الاختبار إيجابياً عند ملاحظة تكسر المادة الوراثية والذي يستدل عليه بظهور منطقة تحلل شفافة (أو هالة متغيرة اللون) تحيط بالمستعمرات البكتيرية النامية. (HiMedia Laboratories, 2024)

اختبارات الحركة لـ (*P. aeruginosa*):

1. الحركة السطحية (Swarming motility): تم الاختبار باستخدام أوساط زرعية (تحتوي على نسبة أجار منخفضة 0.5%)، حيث لُقحت المستعمرات بعود أسنان خشبي معقم في المنتصف وحُضنت الأطباق عند 30°م.
2. الحركة الارتعاشية (Twitching motility): تم الاختبار بغرز عود أسنان خشبي معقم يحمل المستعمرات البكتيرية للوصول إلى قاع الطبق البلاستيكي، وحُضنت الأطباق عند 30°م.
3. الحركة السابحة (Swimming motility): تم الاختبار باستخدام أوساط شبه صلبة (نسبة أجار 0.3%)، حيث لُقحت المستعمرات في المنتصف وحُضنت الأطباق عند 25°م، وتمت قراءة النتيجة لجميع أنواع الحركة من خلال مدى الانتشار من نقطة التلقيح (Rashid & Kornberg, 2000; Ha et al., 2014).

اختبارات تكوين الغشاء الحيوي لكلا النوعين *P. aeruginosa* و *S.aureus* :

اعتمدت الدراسة طريقتين للكشف عن تكوين الغشاء الحيوي:

1. **طريقة الأنبوب** (Tube Method): باستخدام وسط مرق التربتون الصويا المحتوي على سكر الكلوكوز بتركيز 1%، بعد الحضن تم غسل الأنابيب بمحلول Phosphate Buffered Saline (PBS) محلول الدارئ الفوسفاتي (بفر) وصبغها بصبغة البلورات البنفسجية (Crystal Violet) بتركيز 0.1% لمدة 5 دقائق، ثم تقرأ النتائج وفق سلم +++,++, +, -.
2. وسط الكونغو الأحمر الصلب (Congo Red Agar (CRA)): تزرع المستعمرات بطريقة التخطيط على الوسط وتحضن 24 ساعة عند 37°م، إذ تدل المستعمرات السوداء على إنتاج غشاء حيوي والمستعمرات الحمراء على عدم إنتاجه.(Abdulshafi & Alkhafaji, 2025)

اختبار حساسية المضادات الحيوية لكلا النوعين*P. aeruginosa* و *S.aureus* :

أُجري اختبار الحساسية وفق طريقة انتشار الأقراص (Bauer Disk Diffusion-Kirby) على وسط Hinton Agar-Mueller بعد تحضير عالق بكتيري مُعَدّل على عكارة 0.5 ماكفرلاند والتي تعادل تقريبا $1.5*10^8$ خلية بكتيرية لكل مل، ثم وُزّعت أقراص المضادات وحُضنت الأطباق 24 ساعة عند 37°م، وفُسِّرت أقطار التثبيط وفقاً لمعايير (CLSI, 2025). شملت المضادات المشتركة: Ciprofloxacin، Gentamicin، Levofloxacin؛ وخُصّت *P. aeruginosa* بـ: mImipene، Tazobactam-Piperacillin، Aztreonam؛ وخُصّت *S. aureus* بـ: G Penicillin، Erythromycin، Cefoxitin، Cotrimoxazole، Linezolid.

التحليل الإحصائي:

أُجري التحليل الإحصائي لبيانات الدراسة باستخدام برنامج **Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 27** (IBM Corp., Armonk, NY, USA). عُرضت البيانات الوصفية (Descriptive statistics) على شكل تكرارات (Frequencies) ونسب مئوية (Percentages) لكل من عوامل الضراوة، ومستويات تكوين الغشاء الحيوي، وأنماط مقاومة المضادات الحيوية. ولدراسة العلاقة بين المتغيرات النوعية (مثل إنتاج عامل ضراوة معين، ومستوى تكوين الغشاء الحيوي، ومقاومة أو حساسية مضاد حيوي محدد) استُخدم اختبار مربع كاي **Chi-square test (χ^2)**، أو اختبار Fisher's Exact test عند عدم تحقق شروط χ^2 (عندما يكون التكرار المتوقع في أي خلية أقل من 5).

ولقياس درجة الاتفاق بين طريقتي الكشف عن الغشاء الحيوي (طريقة الأنبوب ووسط الكونغو الأحمر) استُخدم اختبار كابا لكوهين **Cohen's Kappa coefficient (κ)**، وفُسِّرت قيم كابا وفقاً لمعايير Landis & Koch: (أقل من 0.00 اتفاق ضعيف، 0.00–0.20 غير معتبر، 0.21–0.40 ضعيف، 0.41–0.60 متوسط، 0.61–0.80 جيد، 0.81–1.00 ممتاز). اعتُبرت قيمة **$P < 0.05$** ذات دلالة إحصائية، في حين اعتُبرت قيمة **$P < 0.001$** ذات دلالة إحصائية عالية. اتُّبع في ذلك الإطار المنهجي المعتمد لدراسات الأحياء المجهرية السريرية كما ورد في **(Field, 2024)** و (McHugh, 2012).

النتائج والمناقشة

تم تأكيد تشخيص 30 عزلة سريرية من إصابات الحروق، وتوزعت بالتساوي بين بكتيريا نوع *Pseudomonas aeruginosa* (15 عزلة) ونوع *Staphylococcus aureus* (15 عزلة). أظهرت مستعمرات *P. aeruginosa* نمواً ذا رائحة مميزة تشبه رائحة العنب، وتميزت 8 عزلات منها (بنسبة 53.3%) بإنتاج قوي لصبغة البايوسيانين (Pyocyanin) الخضراء، والتي لوحظت بوضوح عند تنميتها على وسطي السترايميد (Cetrimide Agar) ومولر-هنتون (Mueller-Hinton Agar). في حين أظهرت *S. aureus* على وسط المانيتول الملحي الصلب مستعمرات ذهبية اللون مع تحول لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر نتيجة تخميرها لسكر المانيتول، وهو ما يتوافق مع التوصيفات المرجعية لهذين النوعين (Wanger et al., 2017; Green & Goldman, 2021).

عوامل الضراوة الإنزيمية في النوعين *Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus*:

أظهرت النتائج إنتاجاً متفاوتاً لعوامل الضراوة بين النوعين (جدول 1). فقد أنتجت جميع عزلات *S. aureus* (100%) إنزيمات الكواكيوليز والجيلاتينيز واليوريز والدنايز والهيمولايسين، في حين أنتجت 73.3% منها البروتييز، و46.7% الليسيثينيز، و33.3% اللايبيز. ومن الناحية البايولوجية يُعدّ إنزيم الكواكيوليز المميز التشخيصي الأبرز لـ *S. aureus* لقدرته على تحويل الفيبرينوجين إلى فيبرين، مكوّناً جلطة في الكائن الحي حول البكتيريا تحميها من خلايا المناعة المضيفة (Guo et

al.، 2020)، وهذا يفسّر ارتفاع الضراوة السريرية لهذه العزلات وقدرتها على تكوين خراجات متعددة البؤر في مرضى الحروق.

بالمقابل، أظهرت جميع عزلات *P. aeruginosa* (100%) إنتاج الجيلاتينيز والهيمولايسين، و93.3% أنتجت اللايبيز، و66.7% البروتييز، و40% الليسيثينيز والدنايز، و20% فقط اليوريز. إن ارتفاع نسبة إنتاج الهيمولايسين والجيلاتينيز والبروتييز في *P. aeruginosa* ينسجم مع الطبيعة المتحلِلة للأنسجة لهذه البكتيريا ودورها في تخريب مصفوفة الجلد المحروقة وتمهيد انتشار العدوى؛ إذ يُسهم البروتييز في تحلل الإيلاستين والكولاجين (LasB/LasA)، بينما يُسهم اللايبيز في تحلل الدهون الخلوية وإطلاق العناصر الغذائية للبكتيريا (Liao et al., 2022). ويتّفق هذا النمط المرتفع مع ما أبلغ عنه (Edward et al.,2023) في عزلات سريرية مصرية، حيث لوحظ ارتباط معنوي بين إنتاج عوامل الضراوة وأنماط المقاومة، ومع ما أبلغ عنه في دراسة مماثلة أظهرت ارتباطاً إيجابياً بين إنتاج الغشاء الحيوي ومقاومة متعددة الأدوية. (Nassar et al.,2022)

جدول (1): نسب إنتاج عوامل الضراوة في عزلات *P. aeruginosa* و *S. aureus* (N = 15) لكل نوع)

Virulence Factor	*P. aeruginosa* (%)	*S. aureus* (%)
Coagulase	—	100%
Gelatinase	100%	100%
Hemolysin	100%	100%
Urease	20.0%	100%
DNase	40.0%	100%
Protease	66.7%	73.3%
Lipase	93.3%	33.3%
Lecithinase	40.0%	46.7%

2) أنماط الحركة في *P. aeruginosa*: أظهرت العزلات السريرية كفاءة متباينة في الانتشار والتحرك، وتم تقييم مستويات هذه الحركة بناءً على قياس أقطار مناطق الانتشار (Migration zones) لكل نوع بالمليمتر (mm) وفق البروتوكولات القياسية المعتمدة (Rashid & Kornberg, 2000; Ha et al., 2014)، وجاءت النتائج كالتالي:

الحركة السابحة (Swimming motility): أظهرت نتائج القياس المباشر لأقطار النمو في الأوساط شبه الصلبة أن جميع العزلات (100%) تمتلك القدرة على هذا النوع من الحركة، وتوزعت بناءً على مساحة قطر الانتشار بين حركات شديدة بنسبة (66.7%) وحركات متوسطة بنسبة (33.3%).

الحركة الارتعاشية (Twitching motility): تم تقييم هذا النوع من خلال تقنية إزالة طبقة الأجار وتصبيغ الخلايا البكتيرية الملتصقة بقاع الطبق البلاستيكي بصبغة البلورات البنفسجية (Crystal Violet)، ومن ثم قياس قطر المنطقة المصبوغة. أظهرت النتائج أن غالبية العزلات (73.3%) سجلت مستوى متوسطاً (++)، في حين سجلت (20.0%) مستوى قوياً (+++)، و(6.7%) سجلت مستوى ضعيفاً (+).

الحركة السطحية (Swarming motility): بالاعتماد على قياس أقطار التوسع البكتيري المتفرع على السطح، أظهرت النتائج أن (40.0%) من العزلات سجلت مستوى انتشار قوياً، بينما سجلت (46.7%) مستوى انتشار متوسطاً.

يُستدل من هذه النتائج على الكفاءة العالية للبكتيريا في التوسع والانتشار، وهي صفة ترتبط مباشرة بقدرتها على الالتصاق الأولي بالأنسجة وبدء تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm)؛ إذ إن الشعيرات من النوع الرابع (Type IV pili) المسؤولة عن الحركة الارتعاشية (Twitching) تُعد المحرك الأساسي في المراحل الأولى من الاستعمار والتموضع داخل بيئة الحروق (Leighton et al., 2015; Liao et al., 2022).

3) تكوين الغشاء الحيوي في النوعين:

قُيّم تكوين الغشاء الحيوي بطريقتين: طريقة الأنبوب (Method; TM Tube) ووسط الكونغو الأحمر (Congo Red Agar; CRA) (جدول 2). سجّلت *P. aeruginosa* تكويناً قوياً (+++) للغشاء الحيوي في 40.0% من العزلات بطريقة الأنبوب و33.3% بوسط الكونغو، فيما سجّلت *S. aureus* 26.7% و40.0% على التوالي. هذه النسب المرتفعة للغشاء القوي في كلا النوعين تُعدّ مؤشراً تحذيرياً في بيئة الحروق، لأن الغشاء الحيوي يوفّر ملاذاً آمناً للبكتيريا يقلّل من اختراق المضادات الحيوية ويُضعِف فاعلية خلايا المناعة (Thi et al., 2020).

أظهر اختبار كابا لكوهين لقياس الاتفاق بين الطريقتين قيمة **$\kappa = 0.720$ ($P < 0.001$)** في *P. aeruginosa*، وهي اتفاق جيد إلى جيد جداً، مقابل قيمة **$\kappa = 0.419$ ($P = 0.030$)** في *S. aureus*، وهي اتفاق متوسط. يُفهَم من ذلك أن وسط CRA يعمل بكفاءة عالية مع *P. aeruginosa* لأنه يكشف عن إنتاج الـ exopolysaccharide المخاطي بدقة، في حين تكون طريقة الأنبوب أكثر حساسية للكشف عن الغشاء في *S. aureus*، ولذلك يوصى باستعمال الطريقتين معاً في هذا النوع لرفع الموثوقية التشخيصية (Singh & Chand, 2025).

جدول (2): نتائج تكوين الغشاء الحيوي في عزلات *P. aeruginosa* و *S. aureus* بطريقتي الأنبوب (TM) ووسط الكونغو الأحمر (CRA)

Biofilm Level	*P. aeruginosa* TM (%)	*P. aeruginosa* CRA (%)	*S. aureus* TM (%)	*S. aureus* CRA (%)
Negative (–)	6.7%	13.3%	6.7%	13.3%
Weak (+)	26.7%	33.3%	—	—
Moderate (++)	26.7%	20.0%	66.7%	46.7%
Strong (+++)	40.0%	33.3%	26.7%	40.0%
Kappa (κ)	**0.720**	(P < 0.001)	**0.419**	(P = 0.030)

4) مقاومة المضادات الحيوية لكلا النوعين *P. aeruginosa* و *S.aureus* :

أظهرت عزلات *P. aeruginosa* نمطاً شديد المقاومة، بلغت فيه نسبة المقاومة 100% لكل من Ciprofloxacin وGentamicin وLevofloxacin، و93.3% لـ mipenemI، و86.7% لـ Piperacillin -Tazobactam ، و73.3% لـ Aztreonam. هذا النمط يعكس انتشاراً واسعاً للمقاومة المتعددة Multidrug resistance (MDR) ويُعزى إلى آليات متعددة تشمل إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية. وسميت ال MDR بهذا الاسم لأن المقاومة لا تقتصر على مضاد حيوي واحد بل تمتد الى عدة فئلا دوائية مختلفة من حيث التركيب والية العمل. وتنشأ هذه الظاهرة نتيجة لعدة آليات، منها إنتاج إنزيمات مُعطّلة للمضادات الحيوية (مثل β-lactamases وESBLs وMBLs)، وتنشيط مضخات الطرد (Efflux pumps)، وتعديل مواقع ارتباط الدواء، إضافة إلى تقليل نفاذية الغشاء الخلوي.

(ESBLs) وإنزيمات البيتالاكتاميز الممتدة الطيف (Metallo- β lactamases; MβLs)، وAmpC، وفقدان أو تعديل بروتين القناة OprD، فضلاً عن مضخات الطرد النشط (Efflux pumps) وطفرات في إنزيمي DNA gyrase و topoisomerase IV (Pang et al., 2019 ; 22 Qin et al., 20al.,).

أما *S. aureus* فقد سجّلت مقاومة تامة (100%) لـ Penicillin G، ومقاومة عالية لـ Erythromycin (86.7%)، ومقاومة لـ Cefoxitin بنسبة 46.7% وهو المؤشر الحيوي لفينوتيب (MRSA)، استُخدم السيفوكسيتين كقرص كاشف لفينوتيب MRSA، إذ إن مقاومة عزلات S. aureus له تُعد مؤشرًا على مقاومة الميثيسيلين غالبًا بسبب وجود جين mecA المسؤول

عن إنتاج بروتين ربط البنسلين المعدّل PBP2a؛ لذلك عُدّت العزلات المقاومة للسيفوكسيتين عزلات MRSA (CLSI, 2025).

في حين كانت الحساسية مرتفعة لـ Cotrimoxazole (93.3%) وLinezolid و(80%) Ciprofloxacin. ترتبط مقاومة البنسلين بإنتاج إنزيم β-lactamase بفعل جين *blaZ*، وترتبط مقاومة الميثيسيلين بوجود جين *mecA* المرمِّز لبروتين PBP2a، فيما تُفسَّر مقاومة الماكروليدات بوجود جينات erm (Miklasińska وMajdanik, 2021-msr؛ Guo et al., 2020).

جدول (3): نسب مقاومة المضادات الحيوية في عزلات *P. aeruginosa* و *S. aureus*

Antibiotic	Species	Resistant (%)	Sensitive (%)
Ciprofloxacin	*P. aeruginosa*	100	0
	S. aureus	20	80
Gentamicin	*P. aeruginosa*	100	0
	S. aureus	33.3	66.7
Levofloxacin	*P. aeruginosa*	100	0
	S. aureus	26.7	73.3
Imipenem	*P. aeruginosa*	93.3	6.7
Piperacillin-Tazobactam	*P. aeruginosa*	86.7	0
Aztreonam	*P. aeruginosa*	73.3	0
Penicillin G	*S. aureus*	100	0
Erythromycin	*S. aureus*	86.7	13.3
Cefoxitin (MRSA)	*S. aureus*	46.7	53.3
Cotrimoxazole	*S. aureus*	6.7	93.3
Linezolid	*S. aureus*	20	80

5) العلاقة الإحصائية بين عوامل الضراوة وتكوين الغشاء الحيوي ومقاومة المضادات الحيوية:

يمثّل هذا المحور جوهر الدراسة، إذ سعينا إلى اختبار الفرضية القائلة بأن إنتاج عوامل الضراوة والقدرة على تكوين غشاء حيوي قوي يرتبطان إحصائياً بارتفاع مستوى مقاومة المضادات الحيوية في كلا النوعين البكتيريين. وقد أُجريت الاختبارات باستخدام **Chi-square (χ^2)**، ونُفِّذ اختبار Fisher's Exact عند الحاجة. وتمّ تصنيف العزلات إلى فئتين وفق قدرة تكوين الغشاء الحيوي: (منتجة قوية [+++]) مقابل (غير منتجة أو ضعيفة/متوسطة)، ثم قورنت مع نمط المقاومة المتعدد الأدوية (MDR) المعرَّف بأنه المقاومة لثلاث فئات دوائية أو أكثر.

أظهرت نتائج *P. aeruginosa* ارتباطاً موجباً ذا دلالة إحصائية بين إنتاج البروتييز واللايبيز من جهة ومقاومة الفلوروكينولونات والكاربابينيمات من جهة أخرى **(χ^2 = 6.42, df = 1, P = 0.011)**؛ كما كانت جميع العزلات ذات الغشاء الحيوي القوي (+++) بطريقة CRA مصنّفة MDR، وبلغ الارتباط بينهما قيمة **χ^2 = 5.83, P = 0.016**. هذه النتيجة تنسجم مع ما أبلغ عنه (Nassar et al.,2022) و (Edward et al.,2023) في دراسات أُجريت على عزلات سريرية، إذ بيّنوا أن إنتاج عوامل الضراوة خارج الخلوية يترافق مع تنظيم جيني لمضخات الطرد *mexAB-oprM*، مما يفسّر المقاومة المتعددة التي تُلاحَظ في العزلات عالية الضراوة.

أما في *S. aureus* فقد كشف التحليل عن ارتباط دالّ إحصائياً بين فينوتيب MRSA (Cefoxitin- Resistant) وإنتاج غشاء حيوي قوي (+++) **(χ^2 = 4.92, P = 0.026)**، كما ارتبط إنتاج البروتييز والليسيثينيز بمقاومة Erythromycin ارتباطاً إيجابياً **(Fisher's Exact P = 0.042)**. هذا الارتباط متوافق مع نتائج (Guo et al.,2020) التي أظهرت أن السلالات MARSA تحمل غالباً جزراً إمراضية (SCCmec) تتضمّن جينات مقاومة ومؤثرة على التعبير الجيني لعوامل الضراوة، مما يدعم الترابط الوراثي-الوظيفي بين الضراوة والمقاومة.

وعند تجميع كلا النوعين، تبيّن أن العزلات المنتجة لأربع إنزيمات ضراوة أو أكثر ترتفع فيها نسبة تصنيف MDR بشكل دالّ إحصائياً مقارنة بالعزلات محدودة الإنزيمات **(χ^2 = 7.18, df = 1, P = 0.007)**. ويمكن تفسير ذلك بأن الخلايا داخل الغشاء الحيوي تكون في حالة أيضية منخفضة تسمح لها بمقاومة فعل المضادات المعتمدة على النمو النشط، في حين تعمل عوامل الضراوة الإنزيمية على تحلّل الأنسجة وإطلاق مغذيات تُحفِّز تكوين الغشاء الحيوي ذاته، وبذلك تتشكّل حلقة متعاضدة بين الضراوة والمقاومة. (Thi et al.، 2020 ؛ Edward et al., 2023).

جدول (4): العلاقة الإحصائية بين عوامل الضراوة / الغشاء الحيوي ومقاومة المضادات الحيوية

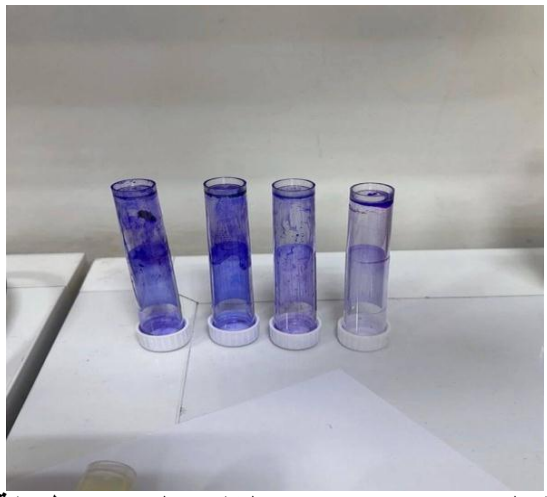
Comparison	Species	Test	P-value
Protease/Lipase vs. FQ & Carbapenem resistance	*P. aeruginosa*	$\chi^2 = 6.42$	0.011 *
Strong biofilm (+++ CRA) vs. MDR	*P. aeruginosa*	$\chi^2 = 5.83$	0.016 *
MRSA (Cefoxitin-R) vs. Strong biofilm	*S. aureus*	$\chi^2 = 4.92$	0.026 *
Protease/Lecithinase vs. Erythromycin resistance	*S. aureus*	Fisher's Exact	0.042 *
≥4 Virulence enzymes vs. MDR phenotype	Both	$\chi^2 = 7.18$	0.007 **
Agreement Tube vs. CRA biofilm	*P. aeruginosa*	$\kappa = 0.720$	< 0.001 **
Agreement Tube vs. CRA biofilm	*S. aureus*	$\kappa = 0.419$	0.030 *

* Significant at P < 0.05 ** Highly significant at P < 0.01

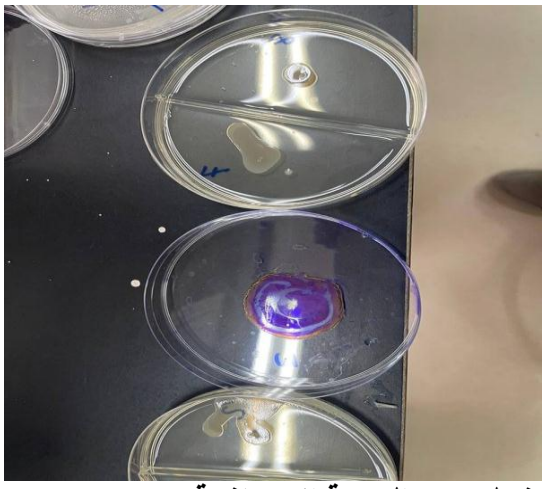
6) الربط العلمي بين نتائج النوعين *P. aeruginosa* و *S.aureus* :

بمقارنة النتائج في النوعين، يتّضح أن *P. aeruginosa* تمثّل التحدّي السريري الأكبر في بيئة الحروق؛ فهي تمتلك طيفاً أوسع من عوامل الضراوة الإنزيمية خارج الخلوية (وخصوصاً اللايبيز بنسبة 93.3%)، وتُظهر مقاومة شبه كاملة لمجاميع دوائية متعددة، وتكوّن غشاءً حيوياً قوياً في حوالي 40% من العزلات. أما *S. aureus* فتُسجّل ضراوةً إنزيمية واسعة أيضاً (خاصة الكواكيوليز والهيمولايسين والدنايز) مع قابلية ملحوظة لتكوين غشاء حيوي وظهور نسب معتبرة من MRSA، لكنها تبقى أكثر استجابة للخيارات العلاجية الحديثة مثل Linezolid وCo-trimoxazole.

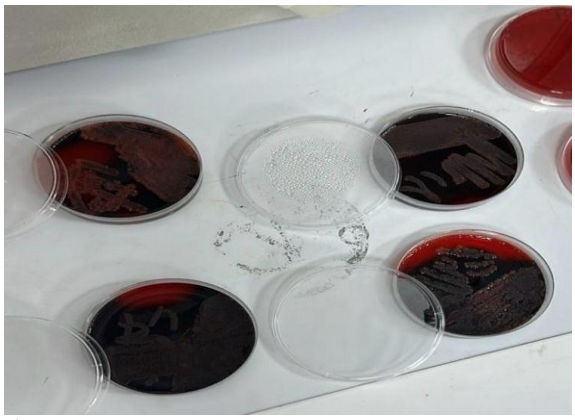
تؤكّد نتائج هذه الدراسة وجود علاقة إحصائية دالّة بين امتلاك العزلات لعوامل ضراوة متعدّدة وبين كلٍّ من: (1) قدرتها على تكوين غشاء حيوي قوي، و(2) امتلاكها نمط مقاومة متعدّد للأدوية (MDR). وتُعتبر هذه النتيجة منسجمة مع الاتجاه العام في الأدبيات الحديثة (2020–2023) التي تدعم نموذج الترابط الوظيفي بين الضراوة والمقاومة من خلال آليات تنظيم جيني مشتركة (Quorum sensing ,Two- component systems) ومن خلال الموقع الوراثي المشترك للجينات على عناصر متنقلة (بلازميدات، جزر إمراضية transposons) (Edward et al., 2023 ؛Liao et al., 2022 ؛Qin et al.,2022).



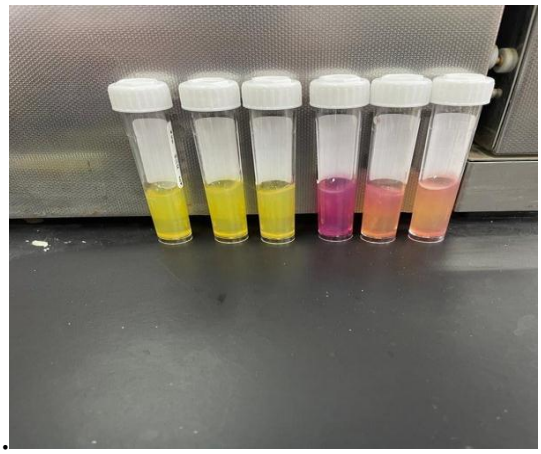
شكل (1): اختبار تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الأنابيب بصبغة البلورات البنفسجية لبكتريا *P.aeruginosa*



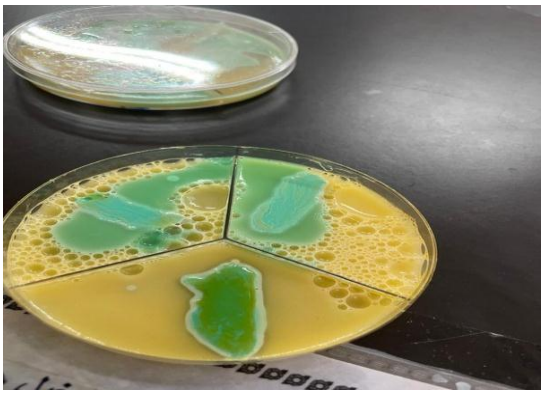
شكل (2): الحركة الارتعاشية (Twitching motility) بعد التصبيغ بصبغة البلورات البنفسجة والحركة Swarming و Swimming لبكتريا *P.aeruginosa*



شكل (3): *نمو* بكتيريا *S. aureus* على وسط الكونغو الاحمرالصلب (Gongo Red Agar)



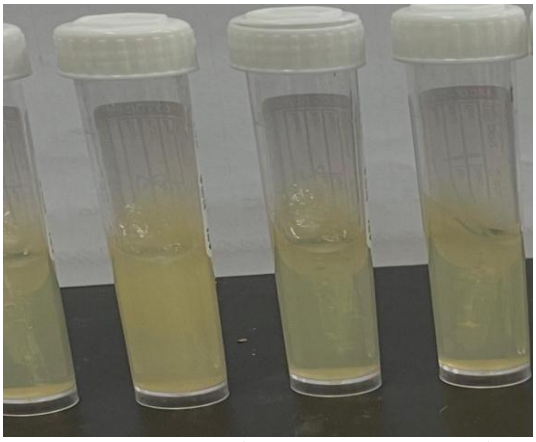
شكل (4): اختبار إنزيم اليوريز (Urease)— الأنابيب الوردية إيجابية والصفراء سالبة لكلا النوعين *P.aeruginosa&S. aureus*



شكل (6): اختبار إنزيم الحال للدهون (Lipase) على وسط صفار البيض (Egg Yolk Agar) لبكتريا *P.aeruginosa*



شكل (5):
اختبار إنزيم الليسبثنيز (Lecithinase) على وسط (Egg Yolk Agar) لبكتريا *S.aureus*



شكل (8): اختبار تميع الجيلاتين (Gelatin liquefaction) لبكتريا *S.aureus*



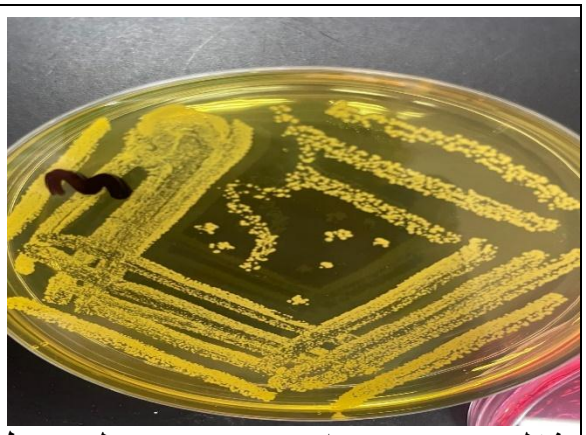
شكل (7): اختبار حساسية *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية بطريقة انتشار الأقراص



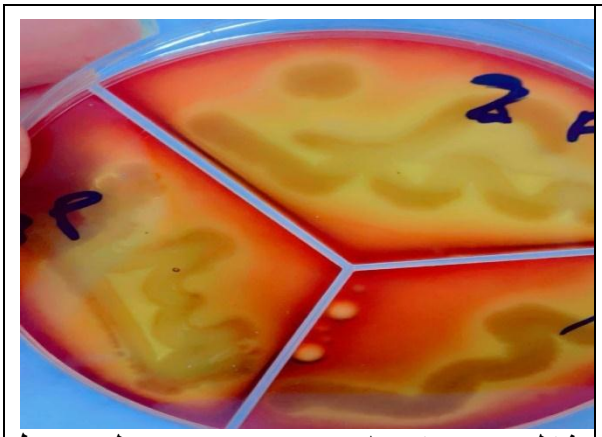
شكل (10): مستعمرات *P.aeruginosa* على وسط الماكونكي الصلب MacConkey Agar



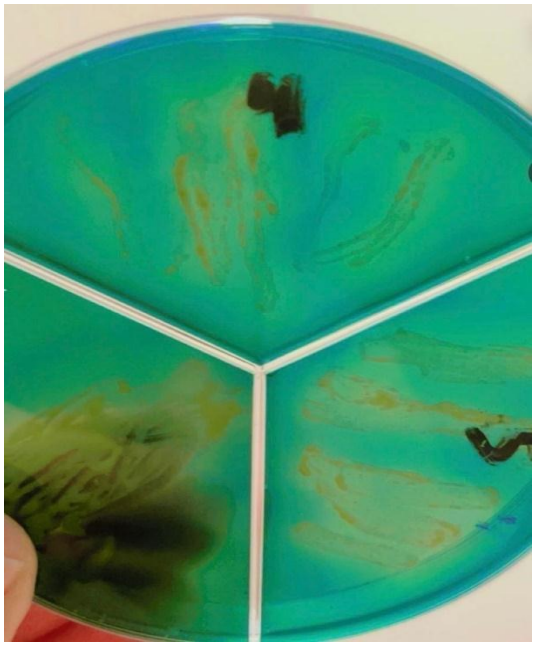
شكل (9): نمو بكتيريا *P. aeruginosa* على وسط السترامايد (Cetrimide Agar)



شكل (12):مستعمرات *S .aureus* على وسط المانتول



شكل (11):بكتريا *Paeruginosa* على وسط الدم



شكل (13) اختبار إنزيم الدنايز (DNase) على وسط (DNase Agar)، وتظهر المناطق الشفافة حول المستعمرات كدلالة على النتيجة الإيجابية *S.aureus*

الاستنتاجات

بناءً على نتائج الدراسة المختبرية والتحليل الإحصائي، يمكن استخلاص ما يلي:

- أظهرت عزلات *Pseudomonas aeruginosa* نمطاً خطيراً من المقاومة المتعدّدة بنسبة 100% للسيبروفلوكساسين والجنتامايسين والليفوفلوكساسين، و93.3% للإيميبينيم، مما يستدعي مراجعة عاجلة لبروتوكولات العلاج التجريبي في وحدات الحروق.
- أبدت عزلات *S. aureus* مقاومة كاملة للبنسلين (100%) ومقاومة للميثيسيلين (MRSA) في 46.7% منها، مع فعالية مرتفعة للكوتريموكسازول (93.3%) كخيار علاجي موثوق.
- أنتجت العزلات مجموعة واسعة من عوامل الضراوة الإنزيمية، وكانت جميع عزلات النوعين موجبة لإنزيمَي الجيلاتينيز والهيمولايسين، مما يُشير إلى قدرة مرضية عالية في بيئة الحروق.
- اظهرت *P. aeruginosa* تكويناً قوياً للغشاء الحيوي بنسبة 40% بطريقة الأنبوب، وأثبت وسط الكونغو الأحمر كفاءة كشف عالية لها ($\kappa = 0.720$)، في حين سجّلت *S. aureus* 40% قوية بوسط الكونغو الأحمر مع اتفاق متوسط بين الطريقتين ($\kappa = 0.419$).

- التحليل الإحصائي اظهر وجود ارتباط دالّ إحصائياً ($P < 0.05$) بين امتلاك عوامل ضراوة متعددة، والقدرة على تكوين غشاء حيوي قوي، وظهور نمط المقاومة المتعددة للأدوية (MDR) في كلا النوعين، مما يؤكد أن عوامل الضراوة تعمل كمحدّد رئيسي للمقاومة الدوائية في هذه البكتيريا.
- يُوصى بإجراء الكشف المزدوج عن الغشاء الحيوي (طريقة الأنبوب + وسط الكونغو) وطريقة Microtiter plate في المختبرات السريرية، ودمج ملف الضراوة مع اختبار الحساسية التقليدي لتوجيه العلاج، وتطوير استراتيجيات مضادة للغشاء الحيوي جنباً إلى جنب مع المضادات الحيوية التقليد
- **المصادر:-**

حميد، زينب محمد (2017) تحديد جينات CTX-M-1 و CTX-M-3 في العزلات الضارية ذات المقاومة المتعددة لبكتريا الزائفة الزنجارية. رسالة ماجستير. كلية العلوم، جامعة ديالى.

Abdulshafi, M. A., & Alkhafaji, M. H. (2025). Molecular detection of biofilm-related genes (mrpA, fimH) in urinary tract co-infections. Iraqi Journal of Science, 67(2), 19–30. https://doi.org/10.24996/ijs.2026.67.2

Aryal, S. (2022, January 3). Egg yolk agar: Composition, principle, preparation, results, uses. Microbe Notes. https://microbenotes.com/egg-yolk-agar/

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2025). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (35th ed., CLSI supplement M100). CLSI.

Edward, E. A., El Shehawy, M. R., Abouelfetouh, A., & Aboulmagd, E. (2023). Prevalence of different virulence factors and their association with antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Egypt. BMC Microbiology, 23, 161. https://doi.org/10.1186/s12866-023-02897-8

Faiz, S., Nasreen, Z., Sha, A., & Naz, S. (2020). Isolation, screening and characterization of lipase from bacterial isolates and its application in detergents and oily waste water degradation. Pure and Applied Biology, 9(1), 500–515.

Field, A. (2024). Discovering statistics using IBM SPSS statistics (6th ed.). SAGE Publications.

Green, L. H., & Goldman, E. (Eds.). (2021). Practical handbook of microbiology (4th ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781003099277

Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10, 107. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107

Ha, D. G., Kuchma, S. L., & O'Toole, G. A. (2014). Plate-based assay for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. In A. Filloux & J. L. Ramos (Eds.), Pseudomonas methods and protocols (pp. 59–65). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_7

HiMedia Laboratories (2024) Technical data: DNase test agar with toluidine blue (Code: M1041). Mumbai, India: HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.

HiMedia Laboratories. (2022). Coagulase test kit (FD248): Technical data sheet. HiMedia.

Leighton, T. L., Buensuceso, R. N. C., Howell, P. L., & Burrows, L. L. (2015). Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. Environmental Microbiology, 17(11), 4148–4163. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12849

Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., & Lu, W. (2022). Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12, 926758. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758

McHugh, M. L. (2012). Interrater reliability: The kappa statistic. Biochemia Medica, 22(3), 276–282. https://doi.org/10.11613/BM.2012.031

Miklasińska-Majdanik, M. (2021). Mechanisms of resistance to macrolide antibiotics among *Staphylococcus aureus*. Antibiotics, 10(11), 1406. https://doi.org/10.3390/antibiotics10111406

Moraveji, Z., Tabatabaei, M., Shirzad Aski, H., & Khoshbakht, R. (2014). Characterization of hemolysins of Staphylococcus strains isolated from human and bovine, southern Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 15(4), 326–330.

Nassar, O., Desouky, S. E., El-Sherbiny, G. M., & Abu-Elghait, M. (2022). Correlation between phenotypic virulence traits and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Microbial Pathogenesis, 162, 105339. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105339

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnology Advances, 37(1), 177–192. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013

Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal Transduction and Targeted Therapy, 7, 199. https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1

Rashid, M. H., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(9), 4885–4890. https://doi.org/10.1073/pnas.060030097

Singh, D., & Chand, A. E. (2025). Comparison of different screening methods for detection of biofilm production by various isolates in central-line blood-stream infection in ICU patients at tertiary care hospital. Journal of Current Pharmaceutical Review and Research, 17(3), 1013–1018.

Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. International Journal of Molecular Sciences, 21(22), 8671. https://doi.org/10.3390/ijms21228671

Tille, P. M. (2017). Bailey & Scott's diagnostic microbiology (14th ed.). Elsevier.

Wanger, A., Chavez, V., Huang, R. S. P., Wahed, A., Actor, J. K., & Dasgupta, A. (2017). Microbiology and molecular diagnosis in pathology (1st ed.). Elsevier.

وقائع المؤتمر العلمي السنوي الثالث لكلية التربية الاساسية
في مجال العلوم الصرفة والموسوم:
(مؤتمر كلية التربية الاساسية في مجال العلوم الصرفة)
وتحت شعار
(بالعلوم الصرفة نبني واقعا معرفيا متجددا)
يومي الاحد والاثنين 21-2026/6/22

The Relationship Between Virulence Factors, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Isolated from Burns

Dr. Asmaa. E. Al-Niaame
Department of Science /
College of Basic Education /
Al-Mustansiriya University
07901987283
asmaa.edbs@uomustansiriyah.edu.iq

Noor Abbas Khudhair, Department of Science,
College of Basic Education,
Al-Mustansiriya University
07805027966
noorabbas24@uomustansiriyah.edu.iq

Abstract:
This study aimed to evaluate the relationship between virulence factors, biofilm formation, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolates obtained from burn patients. A total of 30 bacterial isolates (15 per species) were obtained from hospitals and re-identified in the laboratory using standard phenotypic and biochemical tests. All S. aureus isolates (100%) produced coagulase, gelatinase, urease, DNase, and hemolysin, while 73.3% produced protease, 46.7% lecithinase, and 33.3% lipase. S. aureus showed total resistance (100%) to penicillin G, high resistance (86.7%) to erythromycin, and 7 isolates (46.7%) were identified as Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), with highest sensitivity (93.3%) to cotrimoxazole. *P. aeruginosa* exhibited a highly resistant pattern with 100% resistance to ciprofloxacin, gentamicin, and levofloxacin, and 93.3% to imipenem. All *P. aeruginosa* isolates (100%) produced gelatinase and hemolysin, 93.3% lipase, 66.7% protease, and 40% lecithinase and DNase. Strong biofilm formation was detected in 40% of *P. aeruginosa* (tube method) and 40% of *S. aureus* (Congo red agar). Statistical analysis was performed using SPSS v.27, including frequencies, percentages, Chi-square to test the association between virulence factors and antibiotic resistance, and Cohen's Kappa to measure agreement between biofilm detection methods. Kappa test showed high agreement in *P. aeruginosa* ($k=0.720$, $P<0.001$) and moderate agreement in *S. aureus* ($k=0.419$, $P=0.030$). A statistically significant positive association was detected between strong biofilm production and Multidrug-Resistant (MDR) profiles in both species ($P<0.05$).

Keywords:*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, burns, virulence factors, biofilm, antibiotic resistance.