تأثير اشعة الليزر في انزيم الكاتليز وانزيم مخثر البلازما وانزيم الهيمولايسين والغشاء الحيوي ومقاومة بكتريا *Staphylococcus aureus* للمضادات الحيوية المعزولة من التهاب القرنية القيحي

ضمياء محمودابراهيم
الجامعة المستنصرية / كلية التربية الأساسية
منيرة جلوب العبادي
جامعة بغداد/ وحدة الابحاث والمناطق الحارة
سوزان فوزي كاظم
كلية اليرموك الجامعة/ طب الأسنان

الملخص:

هدفت هذه الدراسة الى التحري عن بعض عوامل الضراوة (انزيم الهيمولايسين , الغشاء الحيوي ، انزيم الكاتليز وانزيم المخثر للبلازما), فضلا عن الحساسية للمضادات الحياتية لعزلات بكتيريا *S.aureus* المعزولة من اصابات التهاب القرنية القيحي (Keratitis) قبل وبعد التعرض لتاثير اشعة ليزر النيموديوم, كذلك دراسة المحتوى البلازميدي لها .

جمعت مائة واثنتا عشرة عينة من مرضى يعانون من التهابات القرنية القيحي، من المختبرات التعليمية في مستشفى ابن الهيثم للعيون في بغداد للمدة من تشرين الاول 2012 ولغاية شباط 2013 ، حيث تم الحصول على 21 (18.75%) عزلة من بكتيريا *S.aureus* من مجموع العزلات البكتيرية التي عزلت.

أظهرتُ عُزلات بكتيريا *S.aureus* حساسية مختلفة ضدّ (12) مضاد حيوي شائع مستعمل,واتسمت كُلّ العزلات البكتيرية بمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية, أذ تتراوحُ مِنْ ثلاثة إلى ثمانيةَ مضادات حيوية.

أظهرت نتائج الكشف عن عوامل الضرواة المرتبطة ببكتيريا *S.aureus* قابليتها جميعا وبنسبة (100%) لانتاج الفا الهيمولايسين, الغشاء الحيوي ، انزيم الكاتليز وانزيم المختر للبلازما

اختيرت خمس عزلات بكتيريا *S.aureus* عشوائيا لدراسة تاثير اشعة الليزر النيموديوم ولاوقات تعرض مختلفة وبجرعة (40) واط عليها حيث ادت المعاملة بالليزر الى تقليل قطر منطقةِ التثبيط لاغلب المضادات المستعملة في حين اصبحت العزلات المختارة بصورة عشوائية للدراسة حساسة بنسبة (100%) لمضاد Ciprofloxacin و مقاومة بنسبة (100%) لباقي المضادات الحيوية المستخدمة بعد 5 دقائق من وقت التعرض لليزر.

كما ادى التعرض لهذا النوع من الليزر الى اختزال قابلية انتاج الهيمولايسين في العزلات *S.aureus* بعد 5 دقائق من التشعيع وبنسبة تتراوح مابين (50–75%) بينما قلت النسبة المئوية لانتاج الغشاء الحيوي الى النصف بعد التعرض لمدة 5 دقائق.

أظهرتُ النتائج بان الليزر لم يمتلك اى تاثير في قابلية البكتريا على انتاج انزيمي الكاتليز ومختر البلازما عند أي وقت من اوقات التعرض لليزر المستخدم.

ادى التعرض لليزر لعزلات *S.aureus* الى اختفاء حزم (الدنا) البلازميدي الصغيرة في بعض العزلات واختفاء حزم (الدنا) البلازميدي الكبيرة والصغيرة في العزلات الاخرى في اوقات مختلفة من التعرض لاشعة الليزر.

كلمات البحث: المكورات العنقودية الذهبية، ليزر، بعض, عوامل ضراوة، التهاب، قرنية ، قيحي.

المقدمة :

تتكون العين من عدة تراكيب داخليه وخارجية تشمل الجفون ، المنظمة ، صلبة العين، القرنية ، الشبكية والغدد الدمعية .تتنوع إصابات العين وأسبابها وأهمها التهابات

الجفون ، المنظمة ، القرنية الناتجة من اهمال الشخص او استخدام بعض العدسات التجميلية التي تكون ملوثة او اهمال تعليمات الطبيب بعد العمليات او اهمال العلاج عند حدوث اصابة بسيطة بالعين او فرك العين وهي غير نظيفة او غير معقمة ، وتعد الإصابات الناتجة عن العدسات اللاصقة من الأمراض المهمة التي تحدث للعين إذ تعود أهميتها إلى حقيقة كونها تؤدي في الغالب إلى مضاعفات خطرة مما ينتج حدوث عتمة في العين وخفض حدة البصر (Barr , 2005).

عادة ما تشفى الخدوش التي تحدث في القرنية نتيجة دخول جسم غريب او الاستخدام الخاطئ للعدسات تلقائيا الا ان تطورها يؤدي الى التهابات خطيرة قد ينتج عنه فقدان البصر وقد يرافق هذه الالتهابات تعقيدات تنتهي الى تقرح القرنية الجرثومي الناتج من تحطم مكوناتها وتراكيبها بفعل الملوثات المايكروبية المختلفة للعدسات اللاصقة (بكتريا ، فطريات ، طفيليات ، فايروسات) الملتصقة على اسطحها وتكوين الغشاء الحيوي الذي يتأثر بعدة عوامل اهمها مواد العدسات اللاصقة وشحنة اسطحها وكذلك نوع المسبب المايكروبي حيث تختلف قابلية الالتصاق من جنس الى اخر واحيانا من سلاله الى اخرى في المسبب المايكروبي لذلك قد يتطلب علاج التهاب القرنية الجرثومي الى دخول المريض المستشفى او اجراء عملية جراحيه لزراعة القرنية لاعادة الرؤية للعين بسبب الاصابة, اذ يعد التهاب القرنية الجرثومي من اخطر المضاعفات المدمرة للبصر(Yi-chiao *et al.* , 2006 ; Alasteir & Phili , 2009) .

يُعد التهاب القرنية من الالتهابات المهمة التي تحدث للعين, وقد يرافق هذا الالتهاب تعقيدات تؤدي الى تقرح القرنية مما يؤدي الى خطورة فقدان البصر وتتنوع مسببات التهاب القرنية والعوامل الموثرة فيه ونتيجة لهذا تحدد انواعه, ويعد التهاب القرنية المتسبب بفعل البكتريا Bacteria keratitis احد انواعه المهمة (Dart *et al.* , 1991)

كما و يُعد جنس المكورات العنقودية Staphylococcus من اكثر الامراض شيوعا في العين حيث تسبب الالتهابات لكل من الجفون والمنظمة والقرنية وذلك لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة Virulence factors مثل الانزيمات :

Coagulase , Lipase , Hemolysine الذي اهم انواعه Alpha-toxin وسم تقشر الجلد Exofoliatin والسموم المعوية Enterotoxine (Forbes *et al.* , 2007) .

ويعد العلاج باستعمال الاشعة الضوئية Photodynamic therapy علاج حديث نوعاما حيث لم يمض على استخدامه سوى اربعين عاما الا انه تطور بشكل كبير ولاسيما العلاج بالليزرLaser اضافة الى استعمالاته في المجالات المختلفة في علوم الفيزياء والكيمياء والتكنولوجيا وغيرها.اما اهم استعمالاته الطبية فهي في علاج حصى الكلى (Kidney stone treatment) وعلاج العين (Eye treatment) اضافة لاستعماله في العلاج الجراحي(Lombard *et al.* , 1985) .

توجد العديد من الدراسات حول استعمالات الليزر وتاثيراته في الاحياء المجهرية ولاسيما الاحياء الممرضة وتطبيقاته الطبية على المستوى العالمي (Al-Dulaymi, 2005, Al-Derajy, 2009, Al-Rassam, 2010).

توجد بعض الدراسات المحلية القليلة في هذا المجال الا انه لاتوجد دراسة محلية تتناول تأثير اشعة الليزر في البكتريا المسببة لالتهابات العيون وفي ضراوتها وبالتالي من خلال هذه الدراسة يمكن الربط مابين تاثير استخدام الليزر في علاج اصابات العيون وتاثيره في البكتريا المسببة لهذه الالتهابات على المستوى الفسلجي والجزيئي.

المواد وطرق العمل:

العزلة والتعرف على البكتيريا: 112 عينة جمعت من المرضى المصابين بالتهاب القرنية القيحي بطريقة Scraping من مستشفى ابن الهيثم للعيون التعليمي خلال الفترة من تشرين الاول 2012 إلى شباط 2013.تم تشخيصها وفقا الى الشكل ولون وحجم المستعمرة البكتيرية ، حواف وارتفاع المستعمرة باستعمال وسط نقيع القلب والدماغ (Himedia) ، وسط أكار الدم،وسط المانيتول الملحي ووسط DNase وصبغة كرام و جهاز الفايتك [BIOMERIEUX] التي قد استخدم أيضا لتاكيد تشخيص هذه العزلات (Baily & Scotts , 2014) . وكذلك اجريت العديد من الاختبارات بما في ذلك: اختبار الكاتليز، اختبار تخمر المانيتول، اختبار مختر البلازما اختبار الاوكسيديز

واختبار تحلل الدم على أكار الدم أيضا للتعرف على هذه العزلات (Atlas *et al* , 1995).

مقايسة الحالة الدموية لسموم هيمولايسين (طريقة اطباق العيارية)

نشطت جميع عزلات بكتريا *S.aureus* بتنميتها بمرق نقيع القلب والدماغ بحرارة 37 م لمدة 18 ساعة. ثم استخلص راشح كل عزلة بعد تنميتها بمرق نقيع القلب والدماغ بدرجة حرارة 37 م لمدة 18 ساعة, بالنبذ المركزي المبرد (سرعة 7000 دورة/دقيقة ولمدة 15 دقيقة). جمع راشح كل عزلة في انبوبة اختبار معقمة, وتم عمل مقايسة الحالة الدموية (Hemolysin Assay) لكل نموذج لتحديد العزلات المنتجة لسم الفا باستخدام عالق الدم الحمراء للارانب والانسان كلا على حدة (Johnson *et al.* 2002). اجريت مقايسة الحالة الدموية لتحديد وجود سموم الفا الهيمولايسين في رواشح عزلات بكتريا *S.aureus* المسببة لالتهاب القرنية القيحي, اذ تم اجراوها على وفق ما جاء في(1962) Kumar and Lindorfer و(1979) Johnson *et al.* وذلك باستخدام اطباق المعايرة الصغيرة (Microtiter Plates) وكما يأتي:

أ- حضرت تخافيف مضاعفة ($\frac{1}{2} \leftarrow \frac{1}{1024}$) لراشح كل عزلة (بواقع مكررين) وبمقدار 50 مايكروليتر/ حفرة من حفر الصف الواحد للطبق باستخدام دارئ الفوسفات الملحي (PBS), كما تم عمل سيطرة باستخدام (PBS) بوضع 50 مايكروليتر في كل من الحفرة (1و2) من كل صف من صفوف طبق المعايرة.

ب_ اضيف لكل حفرة 50 مايكروليتر من PBS و 50 مايكروليتر من محلول 2% عالق كريات الدم الحمراء المحضر في الفقرات (3-1-7-1) و(3-7-1-2) للانسان والارنب لكل من الطبق الأول, الثاني على التوالي.

ج_ وضعت جميع اطباق المعايرة في الحاضنة بحرارة 37 م لمدة 15 دقيقة(في حالة الأطباق الخاصة بكريات الدم الحمراء للانسان) , ولمدة 60 دقيقة (في حالة الأطباق الخاصة بكريات الدم الحمراء للأرانب) لتشخيص سم ألفا, وبعد انتهاء فترة الحضن, تركت جميع الأطباق بحرارة 4 م لمدة 2-18 ساعة, حددت بعدها عيارية التحلل الدموي بمعكوس أعلى تخفيف للراشح سبب تحلل لكريات الدم الحمراء,

وقدرت وحدة التحلل الدموي (Hemolytic Unit) (HU)/ مل من الراشح على وفق المعادلة الاتية:

❖ وحدة التحلل الدموي (HU)/ مل = معكوس اعلى تخفيف يعطي تحليل ×10.

تكوين الغشاء الحيوي(Biofilm):-

تم الكشف عن قابلية هذه العزلات لانتاج الغشاء الحيوي باعتماد طريقة الانابيب , التي اعتمدت من قبل (Christensen,1982). وذلك بزرع 5 ملليلتر من وسط المرق المغذي للعزلات *S.aureus* وبدرجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة . ثم تم التخلص من محتويات الانبوبة بعناية تامة واضافة صبغة البلور البنفسجي(Crystal violet 1%) لكل انبوب لمدة 15 دقيقة . ومن ثم يسكب محتويات الانبوبة من الصبغة بعناية تامة وتركها لمدة لحين جفاف الصبغة ومن ثم يلاحظ تكوين الغشاء الحياتي بشكل طبقة ملتصقة بالجدار الداخلي للانبوب بالعين المجردة وقد عمل سيطرة باستخدام 5 ملليلتر من وسط المرق المغذي بدون حقنها بالبكتريا.

❖ سمك وشدة لون الغشاء يعتمد على كمية الغشاء الحيوي المنتج من قبل البكتريا.

الحساسية للمضادات الحيوية

استخدمت طريقة (Kirby &Bauer ,1996) لاختبار حساسية العزلات البكتيرية لمضادات الحياة . تم استخدام أقراص المضادات الحيوية في جدول (1) خلال هذه الدراسة:

ت	أقراص المضادات الحياتية	الرمز	التركيز µg/disk
1	Rifampin	RA	5
2	Cefotaxime	CTX	10
3	Tetracycline	TE	10
4	Trimethoprim	TMP	10
5	Chloramphenicol	C	10
6	Ciprofloxacin	CIP	10
7	Erythrmycin	E	15

10	DA	Clindamycin	8
10	CN	Gentamycin	9
10	VA	Vancomycin	10
30	CRO	Ceftraxone	11
25	AM	Ampicillin	12

التشعيع بليزر النيموديوم Nd-YAG LASER Irradiation

تم اختبار 5 عزلات من عزلات بكتريا *S.aureus* قيد الدراسة التي نميت على وسط المرق المغذي Nutrient agar وحُضِنَتِ بدرجة (37°م) لمدة (24) ساعة, وبعدها نُقِلت هذا العزلات على وسط (BHIb) بواسطة الناقل وبحجم 1 × 10^8 CFU/ ml في انبوبة انبدروف لغرض التشعيع باستخدام جهاز ليزر النيموديوم مستمر الموجة ذي طول موجي 1064 نانوميتر وقدرة 40 Mwt, وشُعِّعت الانابيب الحاوية على البكتريا وذلك بتعريضها الى حزمة اشعة الليزر المنبعث من الجهاز وبطول الموجي 532 نانومتير وكان الضوء المستخدم هو الضوء الاخضر وهو مشابه لما يستخدم في مستشفى ابن الهيثم مثل ليزر الاركون الاخضر Argon Laser وليزر الياج Yag Laser للعلاج وسلط الضوء مباشرة على العينات وقد أُجرِيَ هذا التشعيع بدرجة حرارة المختبر وشُعِّعت الخلايا لفترات زمنية مختلفة (4،3،2،1 و5) دقيقة وبواقع مكررين لكل عزلة وتم مقارنة النتائج مع عينات السيطرة بدون تسليط اشعة الليزر عليها.

الاختبارات ما بعد التشعيع Post Irradiation Tests

بعد الانتهاء من عملية التشعيع تم التحري عن مدى تأثير الإشعاع على العزلات البكتيرية في تكوين انزيم الكاتليز وانزيم مختر البلازما وعلى قابليتها في تكوين الغشاء الحيوي وفي تحديد قابلية العزلات على انتاج سم الفا هيمولايسين و وكذلك درس تاثيرها على حساسيتها للمضادات الحيوية .

النتائج والمناقشة

عزل العينات وتشخيصها Isolation and Identification

جُمِعَت في الدراسة الحالية 112 مسحة من مرضى التهاب القرنية القيحي من كلا الجنسين (ذكور واناث) ومن كلا العينين والتي تراوحت اعمارهم ما بين 3 اشهر – 70 سنة للمدة من 2012/10/1 ولغاية 2013/2/1.

بينت نتائج العزل والتشخيص للنماذج (112) التي عزلت من مرضى التهاب القرنية القيحي والتي شملتها الدراسة ، ان 103 نموذج (91.96%) كانت موجبة للنمو الجرثومي وتوزعت مابين 97 نموذج (94.17%) اعطت نمو بكتيري فيما كانت النماذج الموجبة للنمو الفطري 6 وبنسبة (5.83%) . اما النماذج ال9 التي لم يظهر فيها اي نوع من النمو الجرثومي فشكلت بنسبة (8.03%) من المجموع الكلي للعزلات.

اظهرت نتائج التشخيص باستخدام صبغة كرام ان 50 عزلة (51.54%) من نماذج العزلات البكتيري كانت سالبة لصبغة كرام في حين بلغت العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام 47 عزلة(48.45%).

اما نتائج التشخيص للعزلات التي اعطت نمو بكتيري باستخدام الطرق الكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية اظهرت وجود 21 عزلة (21.64%) تعود للنوع *S. aureus* وهي متناول دراستنا الحالية و26 عزلة (26.80%) كانت تعود لكل من *Streptococcus Spp.* و *Staphylococcus Spp.* و *Bacillus Spp* و 32 عزلة (32.98%) *Pseudomonas Spp.* و18 عزلة (18.55%) كانت تتوزع مابين *E. coli* و *Serratia marcescens*.

شخصت بكتريا *S.aureus* زرعيا اعتمادا على الصفات المظهرية والكيموحيوية والفسلجية. فعند تنميتها على وسط اكار الدم تميزت مستعمرات هذه البكتيريا عن غيرها بكونها تسبب تحلل تام لكريات الدم الحمراء (β-hemolysis) حول المستعمرة فقط وهذا ما يتفق مع Qin *et al.*, (2003) .كذلك تمكنت البكتريا من النمو على وسط أكار المانيتول الملحي Mannitol salt agar الذي يعُدّ وسطاً انتقائياً يصلح للعزل الأولي لمجموعة المكورات العنقودية مفرقاً النوع *S.aureus* عن الأنواع الأخرى لهذه المجموعة إذ يتميز هذا الوسط باحتوائه على كلوريد الصوديوم Nacl بتركيز 7.5 % الذي يعمل على تثبيط نمو الأحياء المجهرية الأخرى والبكتريا السالبة والموجبة غير المتحملة للملوحة العالية إذ تتميز بكتريا *S.aureus* عن سائر

أنواع جنس المكورات بقدرتها على تخمير سكر المانيتول وتحويل الوسط من اللون الوردي إلى اللون الأصفر لوجود سكر المانيتول في الوسط. كما نمت البكتريا في وسط الـDNase فتتميز هذا المستعمرات بتحلل الوسط لقدرتها على تحلل الدنا الموجود في الوسط وذلك بتحول اللون الازرق للوسط الى اللون الشاحب لوجود المثيل الازرق (WHO,2003).

اظهرت جميع عزلات بكتريا *S.aureus* نتيجة سالبة لفحص الاوكسيديز Oxidase دلالة على عدم امتلاك العزلات البكتيرية المشخصة لانزيم السايتروكروم اوكسيديز ، وكذلك اجري فحص الكاتليز Catalase وكانت النتيجة موجبة لجميع العزلات المشخصة دلالة على ان العزلات المشخصة تمتلك انزيم الكاتليز الذي يحول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 السام الى ماء وغاز O_2 والتي ظهرت بشكل فقاعات على الشريحة المحضرة وكذلك اجري فحص مختر البلازما Coaglase بنوعية المرتبط والحر وكانت النتيجة موجبة لجميع العزلات المشخصة دلالة على ان العزلات المشخصة تمتلك انزيم مختر البلازما. مع العلم ان نتائج الاختبارات البكتريا جميعها تتفق مع ماذكره (Baily & Scotte , 2014) .

تشخيص البكتريا باستخدام جهاز الفايتك Vitek-2 System :

تم اختيار عشرة عزلات من بكتريا *S.aureus* (التي شخصت بالطرق البايوكيميائية التقليدية) عشوائيا وتم تاكيد التشخيص بها باستخدام جهاز الفايتك (Vitek-2 System) باستخدام (64) فحص بايوكيميائي ، اظهرت نتائج هذا الاختبار (9) عزلات اكدت عائديتها الى بكتريا *S.aureus* و عزلة واحدة فقط شخصت بانها من نوع *S.lentus*.

دراسة تاثير بعض عوامل ضراوة بكتريا *S.aureus* قبل وبعد تاثير اشعة الليزر :-

تم دراسة انتاج عوامل الضراوة في جميع العزلات بكتريا *S.aureus* (21) التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة. ولكن استخدمت فقط 5 عزلات (اختيرت عشوائيا) من بكتريا *S.aureus* والتي تم تاكيد تشخيصها باستخدام جهاز Vitek-2 System لغرض

دراسة تاثير اشعة الليزر (النيموديوم) في قابليتها على انتاج عوامل الضراوة التي شملتها هذه الدراسة .

قابلية بكتريا *S.aureus* على انتاج انزيم الكاتليز Catalase وانزيم مختز البلازما Coaglase:-

اظهرت العزلات (21) من بكتريا *S.aureus* التي عزلت من التهاب القرنية القيحي جميعها ان لها القابلية على انتاج انزيم الكاتليز وانزيم مختز البلازما (100%) لكونهما من الانزيمات والكشوفات الكيميائية الحياتية الاساسية لبكتريا *S.aureus* وهذه النتيجة جاءت متوافقة تماما لجميع البحوث التي اجريت على دراسة الفعاليات الكيميائية الحياتية لبكتريا *S.aureus* (Colle *et al.* , 1996 ; Bailey & Scotts , 2007).

تاثير اشعة الليزر(النيموديوم) في قابلية عزلات*S.aureus* لانتاج انزيم الكاتليز Catalase وانزيم مختز البلازما Coaglase:-

يبين الجدول(2) نتائج تاثير اشعة الليزر(النيموديوم) في قابلية انتاج العزلات الخمسة (التي اختيرت للدراسة) لبكتريا *S.aureus* لانتاج انزيم الكاتليز وانزيم مختز البلازما حيث وجد عدم وجود اي تاثير لهذه الاشعة في انتاج الانزيمين مقارنة بانتاج هذا الانزيمين قبل التعرض للاشعة ولجميع الفترات الزمنية (1،2،3،4 و5) التعرض التي استخدمت. ولوحظ ان هذه النتيجة جاءت متوافقة بنسبة (100%) مع بحث Ismail *et al.* (2012) عند دراسة تاثير اشعة الليزر ثنائي الصمام (805) نانوميتر لنفس فترات التعرض اعلاه في قابلية انتاج البكتريا لهذين الانزيمين.

جدول (2) قابلية عزلات*S.aureus* على انتاج انزيم الكاتليز ومختز البلازما قبل وبعد التعرض لاشعة الليزر (النيموديوم)

رمز العزلة	قبل التعرض للاشعة	زمن التعرض لاشعة ليزر النيموديوم(دقيقة)				
		1	2	3	4	5
S1	+	+	+	+	+	+
S2	+	+	+	+	+	+
S3	+	+	+	+	+	+

S4	+	+	+	+	+	+
S5	+	+	+	+	+	+
+: القابلية على انتاج انزيم الكاتليز ومختر البلازما						

قابلية بكتريا *S.aureus* على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm:

استخدمت طريقة أنبوب الاختبار المستخدمة للكشف عن قدرة بكتريا *S.aureus* في تكوين الغشاء الحيوي وأظهرت العزلات التي عزلت من الأشخاص المصابين بالتهاب القرنية القيحي قابليتها على تكوين الغشاء الحيوي ان لها القابلية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm بنسبة (100%) ولكن بدرجات متفاوتة من حيث الكمية ، حيث اظهرت 15(71.43%) من بكتريا *S.aureus* انتاجية عالية للغشاء الحيوي ، في حين ان 6(28.57%) من العزلات انتجت الغشاء الحيوي بكميات اقل مقارنة بالسيطرة.

حيث وجد ان نتائجنا لم تتفق (Taj *et al.*, 2012) عند استخدامة لنفس طريقة الكشف عن قابلية بكتريا *S.aureus* على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm وكانت العينات ماخوذة من اماكن مختلفة من الجسم غير العين وجد ان نسبة تكوين البكتريا للغشاء الحيوي تشكل نسبة (54.68%) من مجمل العينات.

بينما وجد (Deepti Singhal *et al.* ,2011) ان (70%) من العزلات لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي لبكتريا *S.aureus* بينما (60%) من العزلات لها قابلية لانتاج الغشاء الحيوي لعدة احياء مجهرية مثل *Haemophils influenza* و*Pseudomonas aeruginosa* مع بكتريا *S.aureus*.

تاثير اشعة الليزر على قابلية بكتريا *S.aureus*في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm:-

درس تاثير اشعة الليزر(النيموديوم) على قابلية عزلات *S.aureus* (الخمسة) في تكوين الغشاء الحيوي وبفترات زمنية مختلفة (4،3،2،1 و5) دقائق. بينت النتائج (جدول 3) عدم وجود اي تاثير لاشعة الليزر النيموديوم في تكوين الغشاء الحيوي من قبل جميع العزلات عند اوقات التعرض للاشعة(3،2،1 و4) دقائق. وكذلك عد وجود اي تغيير في مقدار الغشاء الحيوي المتكون من قبل العزلات (S_1 ، S_4 و S_5) حيث انخفضت الانتاجية الى حدود النصف تقريبا (من خلال الرويا بالعين المجردة) وعند

زمن التعرض 5 دقائق فقط. ومن خلال مقارنة نتائج هذه الدراسة مع دراسات اخرى تناولت تاثير اشعة الليزر بانواعه المختلفة في تكوين الغشاء الحيوي ولانواع بكتيرية مختلفة ومن مصادر اصابة متعددة.

جدول (3) قابلية بكتريا S.aureus على تكوين الغشاء الحيويBiofilm قبل وبعد التعرض لاشعة الليزر (النيموديوم)

رمز العزلة	قبل التعرض للاشعة	زمن التعرض لاشعة ليزر النيموديوم (دقائق)				
		1	2	3	4	5
S1	++	++	++	++	++	+
S2	+	+	+	+	+	+
S3	+	+	+	+	+	+
S4	++	++	++	++	++	+
S5	++	++	++	++	++	+

++: انتاجية عالية للغشاء الحيوي

+: انتاجية منخفضة للغشاء الحيوي

قابلية بكتريا *S.aureus* على انتاج سم الفا المحللة للدم Alpha Hemolysine toxins:-

استخدم اختبار مقايسة الحالة الدموية باستخدام اطباق المعايرة الدقيقة لتحديد قابلية عزلات *S.aureus* (21) التي تم عزلها من التهاب القرنية القيحي باستخدام عالق 2% لكريات الدم الحمراء للارانب والانسان كلا على حدة وفق ماجاء في الفقرة (3-1-7-1 و3-1-7-2).

اظهرت العزلات ال(21) لبكتريا *S.aureus* قابليتها على انتاج سم الفا المحلل للدم ولكن بدرجات متفاوتة عند قياسها بطريقة مقايسة الحالة الدموية، اعطت (4) عزلات اعلى انتاجية لهذا السم وبعيارية 64 بينما اعطت (13) عزلة انتاجية متوسطة للسم وبعيارية 32 في حين اعطت (4) عزلات اقل انتاجية وبلغت عيارية السم فيها 8 فقط.

جاءت نتائج الدراسة الحالية مخالفة لدراسة العبيدي(2006) إذ كانت29(69%) عزلة منتجة للهيمولايسين من العدد الكلي للعزلات البالغ (42) عزلة تابعة للنوع *S.aureus* وكذلك لنتائج دراسة الحميداوي (2005) اذ كانت نسبة انتاج سموم الهيمولايسين (60%) بينما كانت نتائج الشويخ (2002) مطابقة تماما لنتائج الدراسة الحالية حيث اشارت نسبة انتاج سموم هيمولايسين (100%) لعزلات *S.aureus*

وجاءت دراسة الغالبي (2005) مقاربة لنتائجنا حيث كانت نسبة تحلل عزلات *S.aureus* المعزولة من حالات مرضية مختلفة هي (96%).

تاثير اشعة الليزر في قابلية بكتريا S.aureus على انتاج سموم المحللة للدم Alpha Hemolysine toxins:-

الجدول (4) يبين نتائج تاثير اشعة الليزر (النيموديوم) في قابلية عزلات بكتريا *S.aureus* (الخمسة) في انتاج سم الفا وفي تحديد عيارته مقارنة مع انتاجية وعيارته قبل التعرض لتلك الاشعة. حيث لوحظ عدم وجود تاثير في انتاج السم وفي عيارته ولجميع العزلات الخمسة عند التعرض لاشعة ليزر النيموديوم عند زمن تعرض (1و2) دقيقة ولكن عند زمن التعرض (3) دقيقة لوحظ حدوث انخفاض في عيارية السم ولجميع العزلات وبحدود النصف 50% (32 Hu/ml) لكل من العزلتين (S_1 وS_2) وبمقدار الربع 25% (16 Hu/ml) لكل من العزلتين (S_3 وS_4) وانخفضت بمقدار 75% للعزلة (S_5).

عند زمن 4 دقائق استمر الانخفاض بانتاج السم 50% كما كان عليه في زمن (3) دقائق لكل من العزلات (S_1، S_3 وS_4) في حين ان الانتاجية للسم والعيارية له لم تتغير لكل من العزلتين (S_2 وS_5) ، اما عند زمن التعرض (5) دقائق انخفضت الانتاجية بشكل كبير ولجميع العزلات ويتراوح الانخفاض مابين (50-75)% عما كان عليه عند زمن التعرض (4) دقائق.

عند مقارنة هذه النتائج مع ماتوصل اليه الباحثون في هذا المجال وجد حدوث توافق نوعا ما مع ماتوصل اليه Ismail واخرون (2012) عند دراستهم لتاثير اشعة ليزر ثنائي الصمام (805) نانوميتر في قابلية انتاجة بكتريا *S.aureus* المعزولة من مرضى الجروح والحروق الخمجية لسموم هيمولايسين ، اذ وجدوا حدوث انخفاض في انتاج السم بمقدار (40%) عند التعرض للاشعة في زمن (5) دقائق .

في حين وجد Tubby واخرون (2009) ان انتاج سموم الهيمولايسين من قبل بكتريا *S.aureus* المعزولة من الجروح قد تثبط بصورة تامة بعد استخدام اشعة الليزر الضوئي بوجود صبغة الميثيلين الزرقاء .

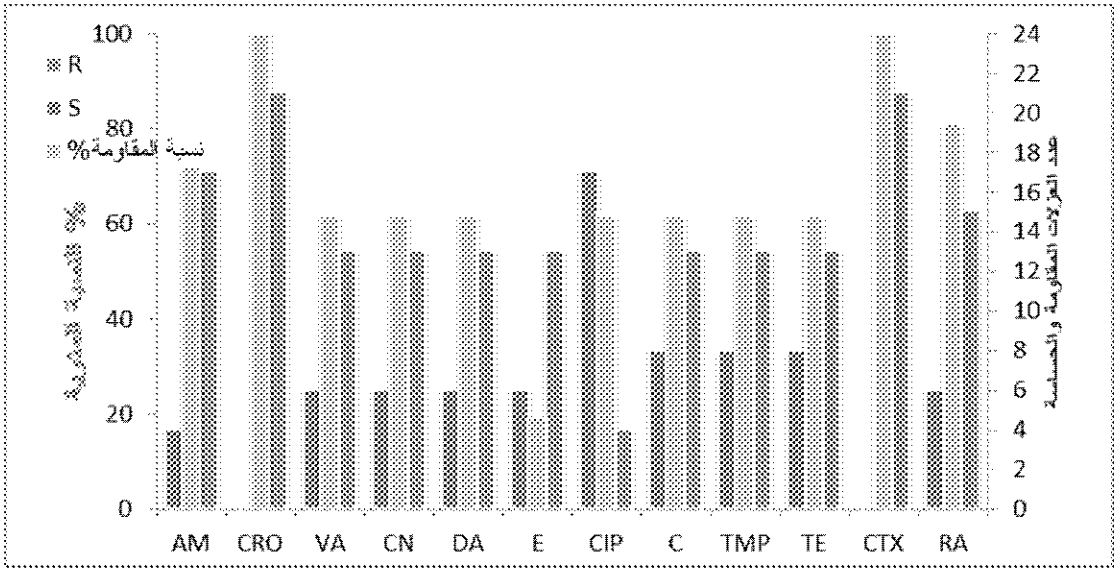
جدول (4) قابلية بكتريا *S.aureus* على انتاج سم الفا المحللة للدم قبل و بعد التعرض لاشعة الليزر النيموديوم.

رمز العزلة	قبل التعرض للاشعة	زمن التعرض لاشعة ليزر النيموديوم (دقائق)				
		1	2	3	4	5
S1	64	64	64	32	16	8
S2	64	64	64	32	32	8
S3	32	32	32	16	8	4
S4	32	32	32	16	8	4
S5	16	16	16	8	8	2

*عيارية السم : هي مقلوب اعلى تخفيف للسم يعطي تحلل لكريات الدم الحمراء

اختبار حساسية و مقاومة بكتريا *S.aureus* للمضادات الحيوية Antibiotic disc:-

تم اجراء اختبار حساسية عزلات بكتريا *S.aureus* (21) للمضادات الحيوية بطريقة الاقراص لتحديد مدى حساسية او مقاومة العزلات البكتيرية تجاه (12) نوع من المضادات الحيوية اعتمادا على قياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر (ملم) المحيطة باقراص المضادات المستخدمة ومقارنتها باقطار التثبيط القياسية الواردة في NCCLS (2012) شكل (1)



شكل(1): يوضح حساسية ومقاومة عزلات *S.aureus* (21) قبل التعرض لاشعة ليزر النيموديوم.

يعزى سبب مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية المختلفة إلى قدرتها على منع التأثير القاتل للمضاد بوساطة آليات متعددة ، وتتمثل بتثبيط فعل المضاد عن طريق إنتاج إنزيمات مثبطة مثل إنزيمات البيتالاكتاميز ، أو بتغير المسار الأيضي الخلوي ،أو بتغير موقع ارتباط المضاد الحيوي داخل الخلية البكتيرية ،أوقد يكون عن طريق تغير نفاذية الغشاء الخلوي،أو ميكانيكيات أخرى غير شائعة في بكتريا S.aureus (Wise , 1999 ; Hawkey , 2000).

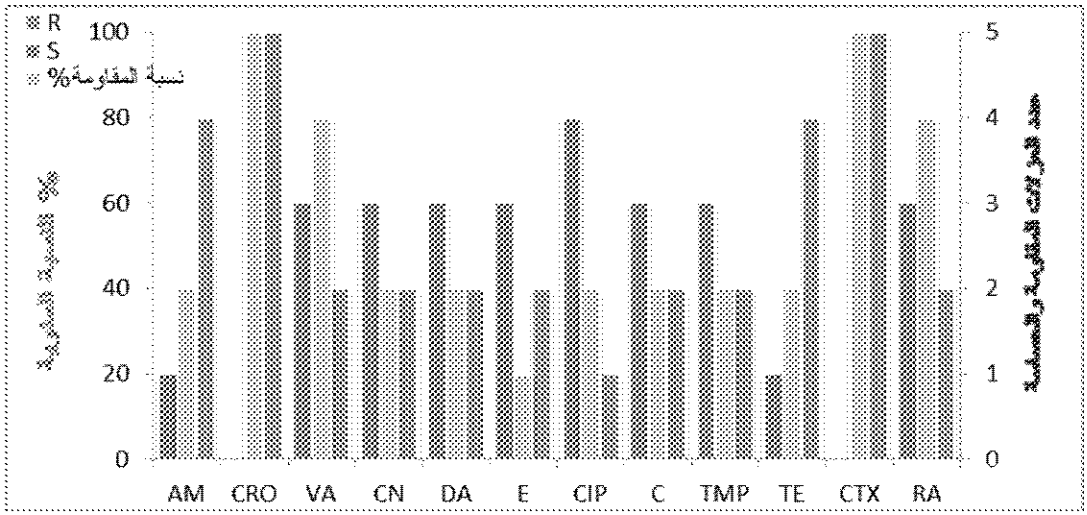
أظهرت نتائج هذه الدراسة ان بكتريا ال *S.aureus* ذات مقاومة عالية لمضادات البيتالاكتام بكافة أنواعها التقليدية والواسعة الطيف, وإن أهم الميكانيكيات التي تلجأ إليها هذه البكتريا لمقاومة مضادات البيتالاكتام هي إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز التي تعمل على كسر حلقة البيتالاكتام وإبطال عمل المضاد الحيوي فضلاً عن ذلك فإن بكتريا *S.aureus* تمتلك إليه أخرى في مقاومة هذه المجموعة من المضادات الحيوية تشتمل بتحوير بروتينات الجدار المرتبطة بالبنسلينPenicllin Binding Proteins فتكون اقل الفه للارتباط بالمضاد الحيوي (Giust *et al* , 1999), وإن الجينات المسؤولة عن مقاومة مضادات البيتالاكتام ولاسيما البنسلينات قد تكون كروموسومية أو بلازميدية (Archer & Pennel ,1999).

تاثير اشعة الليزر في حساسية و مقاومة بكتريا ***S.aureus*** للمضادات الحيوية **Antibiotic disc:**

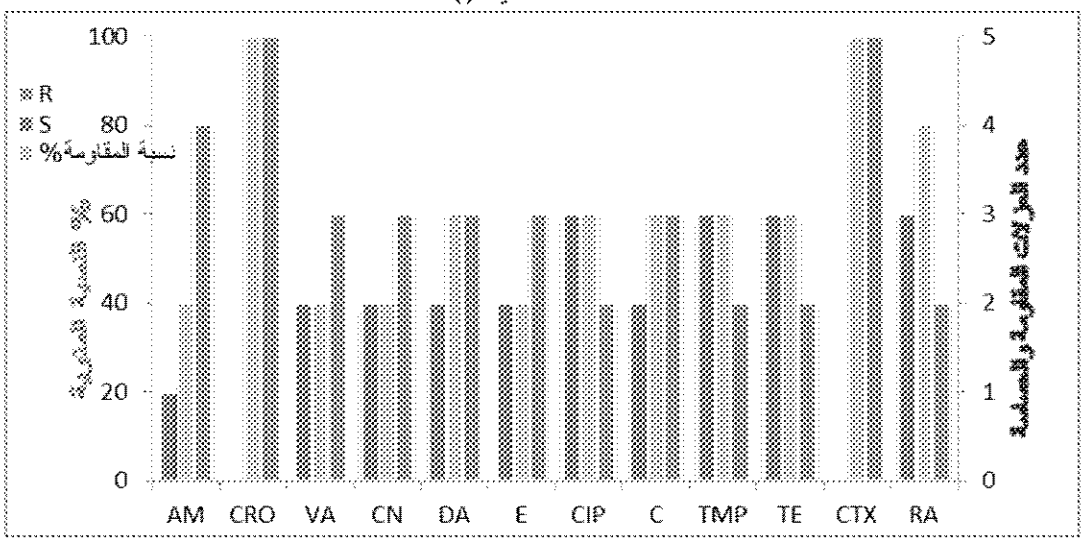
درس تأثير أشعة ليزر النيموديوم في حساسية العزلات الخمسة لبكتريا *S.aureus* عند التعرض له بفترات (1،2،3،4،5) دقائق واظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ماياتي:

عدم وجود تاثير لاشعة الليزر في مقاومة العزلات جميعها لمضادات Rifampin ، Ceftraxone، Chloamphenicol، Trimethopime، Cefotaxime و Ampicilli عند زمن التعرض (1) دقيقة مقارنة بنتائج المقاومة والحساسية لهذه المضادات قبل التعرض لاشعة الليزر (شكل 2).في حين كانت هناك تاثير لهذه الاشعة في مقاومة العزلات البكترية لمضاد Tetracycline ، Ciproflaxacin ،

Erythromycin ، Clindomycin ، Gentamycin و Vancomycin **بنسبة 80% ، 20% ، 40% ، 40% ، 40% ، 40% على التوالي.**



المضاد الحيوي (أ)



المضاد الحيوي (ب)

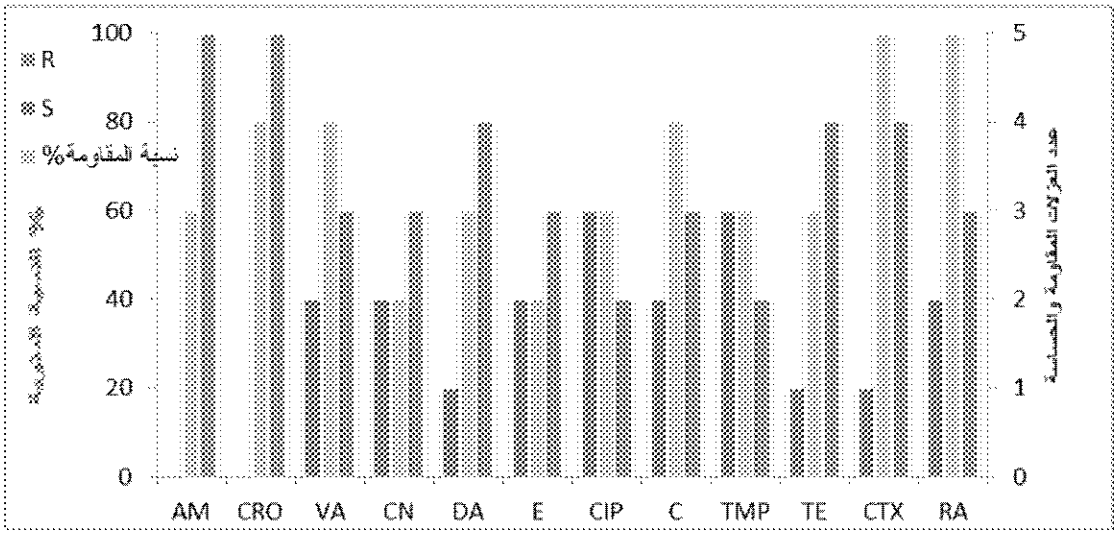
شكل(2): يوضح حساسية ومقاومة عزلات *S.aureus* (5) قبل وبعد التعرض لاشعة ليزر النيموديوم عند (1) دقيقة .

(أ) حساسية ومقاومة العزلات البكتيرية قبل التعرض لاشعة الليزر.

(ب) حساسية ومقاومة العزلات البكتيرية بعد التعرض لاشعة الليزر عند(1) دقيقة.

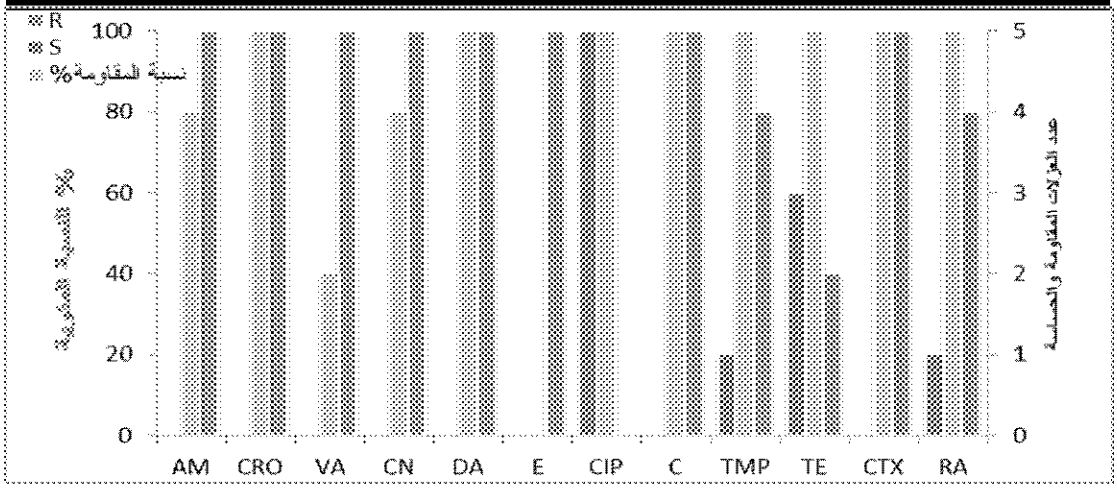
بينما لوحظ عدم وجود تاثير لاشعة الليزر في مقاومة العزلات جميعها للمضادات Tetracycline ، Trimethoprime و و Ceftraxone **عند زمن تعرض (2) دقيقة**

مقارنة بقبل التعرض لاشعة الليزر في حين كان هنالك تاثير لهذه الاشعة في مقاومة العزلات البكترية لمضادات Rifampin ، Chloamphenicol ، Cefotaxime ، Gentamycin ، Clindomycin،Erythromycin،Ciproflaxacin ،Ampicillin Vancomycin وبنسبة 60% ، 60% ، 80% ، 100% ، 40% ، 60% ، 80% ، 60% ، 60% على التوالي (شكل 3).



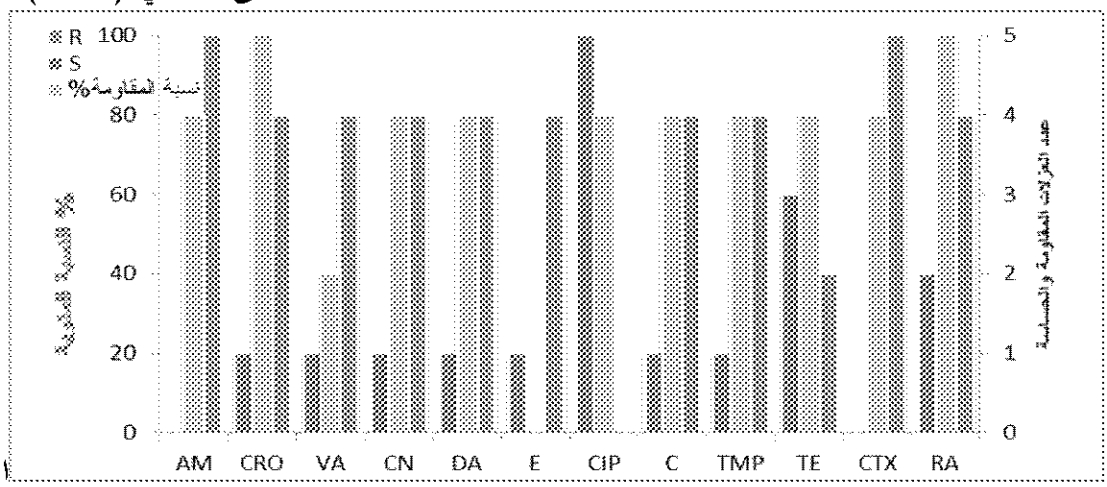
شكل(3): حساسية و مقاومة بكتريا *S.aureus* للمضادات الحيوية **Antibiotic disc** عند التعرض (2) دقيقة لاشعة ليزر النيموديوم.

اما عند زمن تعرض (3) دقيقة فلم يظهر تاثير لهذه الاشعة على مقاومة بكتريا *S.aureus* مقارنة بقبل التعرض لهذه الاشعة على المضاديين Ceftraxone وCefotaxime (شكل4) في حين كانت هناك تاثير لهذه الاشعة في مقاومة البكتريا لمضادات Rifampin، Ampicillin، Ciproflaxacin، Erythromycin، Clindomycin، Gentamycin ، Vancomycin، Tetracycline، Trimethoprime و Chloamphenicol وبنسب 80% ، 100% ، 0% ، 100% ، 100% ، 100% ، 40% ، 80% ، 100% على التوالي .



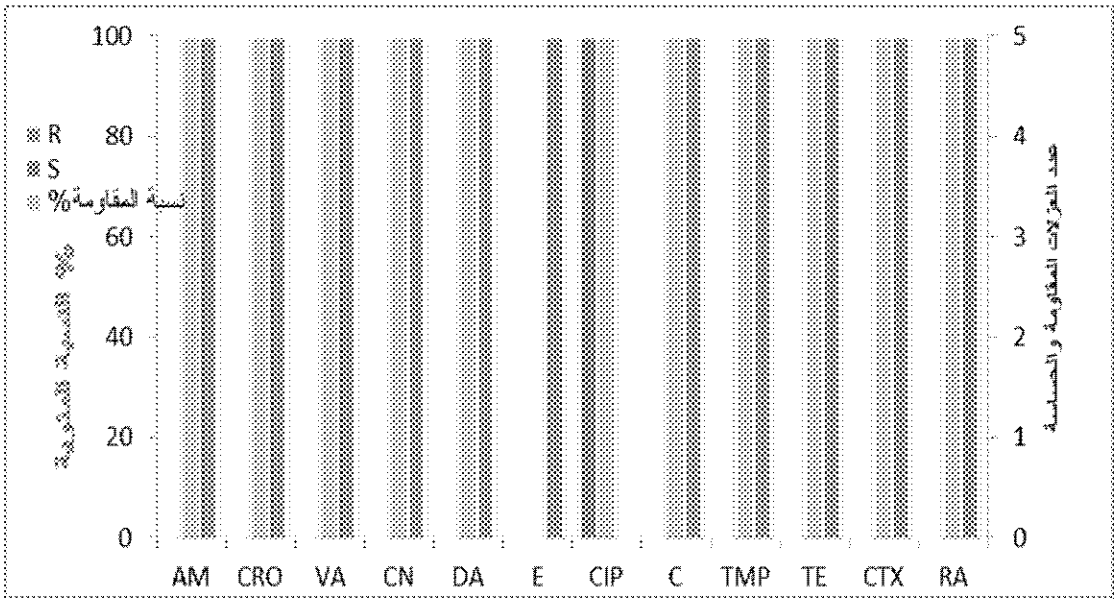
شكل(4): حساسية و مقاومة بكتريا *S.aureus* للمضادات الحيوية Antibiotic disc عند التعرض (3) دقيقة لاشعة ليزر النيموديوم.

فقد وجد عدم ظهور تاثير في مقاومة بكتريا *S.aureus* **مقارنة بقبل التعرض لاشعة ليزر النيموديوم لمضاد** Cefotaxime **في الدقيقة الرابعة في حين ظهر تاثير لهذه الاشعة في مقاومة البكتريا لمضادات** Ciproflaxacin، Ampicillin، Rifampin، Tetracyclin، Vancomycin، Gentamycin، Clindomycin، Erythromycin، Chloamphenicol ، Trimethoprime، Ceftraxone و**بنسبة** 80% ، 100% ، 0% ، 80% ، 80% ، 80% ، 80% ، 40% ، 80% ، 80% ، 80% ، 80% **على التوالي (شكل5).**



شكل(5): حساسية و مقاومة بكتريا *S.aureus* للمضادات الحيوية Antibiotic disc عند التعرض (4) دقيقة لاشعة ليزر النيموديوم.

بينما تبين ان عزلات بكتريا *S.aureus* تصبح مقاومة لجميع المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة عند الدقيقة الخامسة ماعدا مضاد Ciproflaxacin الذي تصبح البكتريا حساسة له بنسبة (100%) شكل (4-9) وقد يعود سبب الى الية عملُ Ciprofloxacinعلى قَتل الجَراثيم التي تُسبِّب العدوى. و ذلك عن طريق تثبيط إنزيم يُسمَّى غيراز gyrase الحمض النَّووي الجُرثومي ويشارك هذا الإنزيمُ في تكرُّر وإصلاح المادَّة الوراثيَّة (DNA) للجَراثيم؛ فإذا كان هذا الإنزيمُ لا يعمل، لا يمكن للجَراثيم إعادةَ إصلاح نفسها أو الانقسام والتَّكاثر، وبهذا يقتل الدواءُ الجراثيمَ ويُوقفها(Brook *et al.* , 2001).



شكل(5): حساسية و مقاومة بكتريا *S.aureus* للمضادات الحيوية Antibiotic disc عند التعرض (5) دقيقة لاشعة ليزر النيموديوم.

فقد وجد ملا خليل(2012) ان بكتريا *S.aureus* قد فقدت قدرتها للنمو على أوساط المضادات الحيوية المختلفة حيث تحولت جميع البكتريا الى حساسة للمضادات الحيوية وبذلك تعطي هذه النتائج مؤشراً ايجابياً لاستخدام اشعة الليزر مع المضادات الحيوية في حالة عدم استجابة الحالة المرضية للعلاج بالمضادات الحيوية فقط وهذا ما لاحظه أيضاً عددً من الباحثين Al – Saiejh *et al.* 2001; Al –Shalchy & Hajin, 2001) .

بينما اظهرت الباحث(2012) Ismail *et al.* عند دراسة تاثير اشعة الليزر ثنائي الصمام (805) نانوميتر على زيادة حساسية المضادات Gentamycin ،Chloamphenicol ، Ciproflaxin و Nifrofurantoin بزيادة وقت التعرض .

في حين وجد الباحث Jay (2012) بان حالات الالتهاب بالعنقوديات الذهبية بعد عملية الليزك قليلة جدا حيث بدأ تسجيل بعض حالات في 2001 بالاصابة (MRSA) بعد عملية الليزك وذكر ايضا ان العلاج بالمضادات الحياتية بعد عملية الليزك تكون صعبة جدا وذلك لزيادة في مقاومة العنقوديات الذهبية للمضادات الحياتية بعد العلاج بالليزك لذلك من الضروري جدا مراقبة التلوث الذي يحث في العين بعد عملية الليزك بسبب هذه الحالة لذلك يجب تحديد المضاد الملائم للعلاج.

وقد يعود سبب ظهور هذه الزيادة او النقصان في مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية إلى حدوث طفرات وراثية سببت عدم قدرة هذه العزلات من النمو على اوساط المضادات الحيوية أو قد يكون تأثير أشعة الليزر على جدار الخلية سببت في فقدانه للعديد من خواصه او تاثير اشعة الليزر في البلازميدات المسؤولة على المقاومة او الحساسية لهذه المضادات.

المحتوى البلازميدي:

تم استخلاص المحتوى البلازميدي من عزلات بكتريا *S.aureus* (S_1، S_2، S_3، S_4 وS_5) قبل وبعد تعريضها لاشعة ليزر النيموديوم ولاوقات تعرض (1،3 و5) دقيقة، حيث استعملت طريقة عزل الدنا البلازميدي البكتري وتقدير تركيز الدنا ونقاوته وفحصت العينات بعد ترحيلها كهربائيا باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 0.6 % وبفرق جهد 60 فولت/ سم^2 .

ان امتلاك البكتريا لعوامل الضراوة وكذلك صفة المقاومة للمضادات الحيوية وبعض الانزيمات المهمة تعد مؤشرات اساسية في الدراسات الوبائية إذ تبين مدى انتشار هذه العوامل بين اجناس النوع الواحد والمعزولة من مختلف المصادر، لذا تم اللجوء لدراسة المحتوى البلازميدي للعينات الخمسة المختارة بصورة عشوائية لدراسة تاثير اشعة الليزر عليها قبل وبعد استخدام الليزر وذلك لامتلاك بكتريا *S.aureus* عدة عوامل ضراوة مهمة وكذلك عدة انزيمات ولامتلاكها صفة مقاومة لعدة مضادات حياتية.

فقد وجدنا عند التعرض لاشعة الليزر لفترة تعرض 5 دقائق فقدان الحزم البلازميدية الكبيرة للعزلات (S1، S2 وS3) مقارنة مع الحزم البلازميدية لهذه العزلات قبل تعرضها لاشعة الليزر .بينما ان العزلتين (S_4 وS_5) فقدت الحزم البلازميدية الكبيرة في حين فقدت العزلة (S_4) الحزم البلازميدية الصغيرة في الدقيقة الثالثة بينما العزلة (S_5) فقدت الحزم البلازميدية الصغيرة في الدقيقة الخامسة عند ترحيله على هلام الاكاروز مع الدليل الحجمي.

وبذلك نستنتج ان العزلات البكتيرية قد فقدت البلازميدات بعد عملية التعرض لاشعة اليزر في الدقيقة الخامسة مما يفسر سبب فقدان البكتريا او تغير الانتاجية لعوامل الضراوة بعد استخدام اشعة الليزر وكذلك قد يكون تحول العزلات البكتريا من حساسة للمضادات الحياتية الى مقاومة بعد عملية التعرض لهذا النوع من الاشعة لان معظم الجينات المسوولة عن المقاومة والحساسية للمضادات الحيوية تقع على البلازميدات وايضا من الممكن ان يوثر الليزر على الجينات المحمولة في البكتريا مما يودي الى تغيير الية او احداث طفرات في الجينات المسؤولة عن المقاومة والحساسية للمضادات الحياتية وكذلك المسؤولة عن بعض عوامل ضراوة البكتريا.

التوصيات : Recommendations

- ❖ اجراء المزيد من الدراسات حول تاثير الليزر بانواعه المختلفة في عوامل الضراوة للانواع البكتيرية الاخرى المسببة للالتهاب القرنية القيحي.
- ❖ اجراء دراسات معمقة في تاثير اشعة الليزر في مقاومة البكتريا بانواعها المختلفة للمضادات الحيوية .
- ❖ استخدام الطرق الجزيئية الحديثة في تشخيص الاصابات الجرثومية المسببة للالتهابات العين المختلفة في المستشفيات المحلية وذلك لدقة تشخيصها وقصر الفترة الزمنية اللزمة لاجرائها.
- ❖ اجراء العديد من التجارب لايجاد افضل جرعة وفترة زمنية للمعاملة باشعاع الليزر النيموديوم للتاثير في جميع عوامل الضراوة للبكتريا المسببة للالتهابات العين مع مراعاة تاثيراته الجانبية الموثرة في العين.
- ❖ التوسع في دراسة تاثير الانواع المختلفة من اشعة الليزر في الدنا البلازميدي لجميع المسببات الجرثومية للامراض وامكانية استخدامه في تحضير اللقاحات المختلفة للامراض المتسببة بفعل هذه الجراثيم.

المصادر

- الحميداوي ، طالب فالح حسن(2005). النشاط الهيمولايسيني لبكتريا اشيريشيا القولون المسببة لالتهابات المجاري البولية ومقاومتها لمضادات الحياة.أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- الشويخ ,رنا مجاهد عبد الله (2006). عزل وتشخيص بعض أنواع البكتريا المسببة لالتهاب الأذن الوسطى المزمن مع دراسة جزيئية لبعض أنواعها. رسالة ماجستير , كلية العلوم , الجامعة المستنصرية.
- العبيدي , رغد عبد اللطيف عبد الرزاق (2006). دراسة عوامل الضراوة للبكتريا المعزولة من الأدوات المستخدمة في رعاية الأطفال الخدج. رسالة ماجستير , كلية العلوم , الجامعة المستنصرية. (116) صفحة.
- الغالبي , أحلام علي صخي (2005). تقييم كفاءة محطات إسالة المياه في بعض مدن القادسية باستخدام المؤشرات البكتريولوجية والكيميائية. رسالة ماجستير , كلية التربية , جامعة القادسية.(128) صفحة.
- ملا خليل، عمار خالد شهاب(2012). عزل وتشخيص بعض مسببات اخماج الجروح ودراسة تاثير ليزرNd-YAG على هذه المسببات. رسالة ماجستير،كلية العلوم_ جامعة تكريت.
- **Alastair , K.O. and Phlip , J .M. (2009)** . Oxford Hand Book of Ophthalmology (2nd ed) .
- **Al-Deraji,S.Z.S.(2009).** Photosensitization of oxacillin resistance and non-resistance S. aureus isolated from wound using diode laser and indocyanine green .M.S.C. Thesis. Inst. Laser post graduate studies. Baghdad University.
- **Al-Dulaymi,M.F.(2005).**Study the effect of He-Ne on some virulence factors of S. aurous and E.coli. Thesis institute of laser for post graduate studies. Baghdad University.
- **Al-Rassam , Y.Z.(2010).** The effect of laser light on virulence factors and antibiotic susceptibility of locally isolated Pseudomonas aeruginosa. Applied Science Research. 6(8):1298-1302.
- **Al-Shalchy, A.K. and Hajim, K.I. (2001).** The user of He – Ne laser therapy in the treatment of the Trigeminal Neuralgia (T.N.). First National conference for the medical application of laser. Al-Kindy college Medicine.
- **Al-Siejh, A.M. ; Tulfah, N.A.L. ; Niby, H.A. and Al-kelaby, A. (2001).** Efficiency of He – Ne laser irradiation in the management of Diabetic foot ulcer. First National conference for the medical application of laser. Al-Kindy college of Medicine.
- **Archer, G .L . and Pennel , E.(1999).** Detection of Methicillin resistance in staphylococci by using DNA probe Antimicrob. Agent mother. 34:1720–1724.
- **Atlas, R.M.; Brown, A.F. and Parks, L.C.(1995).** Laboratory manual Experimental microbiology. Mosby – year Book, Ine. St.Louis.
- **Barr, J. (2005).**2004Annual Report. Contact lens spectrum.
- **Brooks, G. F., Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001).** Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology (22nded). McGraw- Hill. U.S.A. P. 197-202.

- **Christensen, G.D.; Simpson, W.A. ; Bisno, A.L. ; and Beachey E.H. (1982).**Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect. Immun.**37**(1):318-326.
- **Collee, G., Marmion, B.P.; Fraser, A. G. and Simmons, A. (1996).** Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology (14th ed.) Churchill Livingstone. New York, p. 245-261.
- **Dart, J. K. G.; Stapleton, F. and Minassian, D. (1991).** Contact lens and other risk factors in microbial keratitis. Lancet.338:650.
- **Deepti Singhal, MS; Andrew Foreman, BMBS; Josh-Jervis B., MBBS; Peter-John W., MD.(2011).** *Staphylococcus aureus* Biofilms: Nemesis of Endoscopic Sinus Surgery. Laryngoscope. The American Laryngological, Rheological and Otological Society, Inc.
- **Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2007).** Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology (12th ed) Mosby. U.S.A. p.285-296.
- **Giusti, D . M .; Pacifico L .;Tufi , D .; Panero , A . and Chisa , C. (1999).**Phenotypic detection of nasocmialmec A- Positive Coagulse negative *Staphylococci* from neonants . J . Antimicrob. Chemother ., 44 :351 – 358 .
- **Hawkey, P . M . (2000).** Mechanisms of resistance to antibiotics Intensive care med – 26 Suppl : 59 .
- **Ismail ; Munira , CH.; Sinai ,W.; Faheema J.; Khawla I. (2012).** Effect of Diode Laser (805) nm on alpha-toxin production and antibiotic sensitivity of Staphylococcus aureus. Iraqi J. of Science. Vol 53.No 2.2012.Pp754-758.
- **Jay, C.; Rudd, M.D.; Majid, M.D.(2002).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* keratitis after laser in situ keratomileusis. USA, J. Cataract Refract Surg. Vol.27(3): 471-473.
- **Johnson, A. G.; Zieglar, R. J.; Lukasewycz, O. A. and Hawley, L. B. (2002).** Board Review Series Microbiology and Immunology. 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins Awolters Kluwer Company. 88.
- **Lombard, G.F., Tealdi, S. and Lanotte ; .M.M.(1985).**The treatment of neurosurgical infectious by laser and prophyrine .In photodynamic Therapy of tumor and other disease ed. Jori, G. and Padova , P.C.A, Edizioni Liberia Progetto.
- **NCCLS(2012).**National Committee For Clinical Laboratory Standard. Performa nee standard for antibiotic susceptibility testing .Villanova , P.A.
- **Patricia , M. Tille(2014).** Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Mosby.
- **Taj, Y.; Essa, F.; Aziz,F.; Kazimi,S.U.(2012).**Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Dow Medical College Karachi. Immunology and Infectious Disease Research Laboratory(IIDRL). Department of Microbiology, University of, Karachi , Pakistan. J. Infect. Dev. Ctries.5(6):403-409.
- **Tubby, S.; Wilson, M. and Sean, P.N. (2009).** Introduction of Staphylococcus virulence factors using a light activated and microbial agents. J.BMC Microbiology 9:21.
- **WHO (2003).** Basic laboratory procedures in clinical bacteriology . (2nd ed). Genova .
- **Wise, R. (1999).** Areview of the mechanisms of the action and resistance of antimicrobial agents can . Resp . J . 6 . Supp 1 :20 A .
- **Yi-chiao, L.; Alina, Z. Brian, J.Ch. ;Neil, R.; Frank, J.M. and Kathleen, A.M.(2006).** Hazardovs contact. Acase of visual loss following psadumonas keratitis from novelty contact lens wear.

The effect Of Laser In Catalase enzyme and Coaglase enzyme and Alpha Hemolysin and Biofilm and Sensitive of antibiotic of *Staphylococcus aureus* isolated From Keratitis Supperative

Abstract:

The aims of this study was to investigated the occurrence of some virulence factors (Hemolysin, Biofilm, Catalase and coagulase) and antibiotics sensitivity pattern of *S.aureus* isolates (isolated from Suppurative keratitis infection) before and after exposure to Nd-Yag laser and study the plasmid profile of these isolates.

One hundred and twelve samples were collected from patient suffering from suppurative corneal infections, from teaching laboratories in Ibn Al-Haytham Eye specialty hospital in Baghdad for the period from October 2012 until February 2013. Twenty-one isolates of *S.aureus* was identified according to their characteristics.

The Isolates showed different susceptibility against (12) commonly used antibiotics ; all the bacterial isolates were multi-drug resistance ranging from three to eight antibiotics

The results of virulence associated factors of *S.aureus* indicate the ability of many isolates of *S.aureus* was (100%) for the production of hemolysin, Biofilm, Catalase and Catalase.

Selected five isolates were randomly assigned to study the effect of laser Nd-Yag .The diameter of inhibition zone decrease for almost of the used antibiotics beside some isolates became resistance except ciprofloxacin still sensitive after 5 min of laser exposure time.

The hemolysin activity of irradiated isolates was reduce after 5 minutes of irradiation to (50−75%), while I susceptibility of the isolates of high productivity on the production of biofilm reduce to the half after 5 minutes of exposure.

Laser irradiation haven't any effect at any exposure time on the ability of produce catalase and coagulase enzymes after 5 minutes of irradiation.

Plasmid profile of *S.aureus* Irradiated isolates illustrated disappearing of the small bands of DNA plasmid in some isolates but

disappearance of large and small band of DNA plasmid in some isolates in different irradiation times.