



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ميسان - كلية العلوم
قسم علوم الحياة

العلاقة التضادية بين *Neisseria* و *Lactobacillus spp*
و *gonorrhoeae* وعلاقتها ببعض عوامل الضراوة و الانترلوكينات في
النساء المصابات بالالتهابات المهبلية في محافظة ميسان

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم / جامعة ميسان

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

رغد عبدالواحد كبيان

بكالوريوس علوم حياة

بإشراف

الأستاذ الدكتور زهره عدنان داخل

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

نَرْفَعُ دَرَجَاتٍ مِّنْ نَّشَأٍ ۖ وَفَوْقَ كُلِّ ذِي
عِلْمٍ عِلْمٌ

صدق الله العلي العظيم

سورة يوسف الآية (76)

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار مشرفين

نقر بأن اعداد هذه الرسالة الموسومة: -

العلاقة التضادية بين *Neisseria* و *Lactobacillus spp* و *gonorrhoeae* وعلاقتها ببعض عوامل الضراوة و الانترلوكينات في النساء المصابات بالالتهابات المهبالية في محافظة ميسان

المقدمة من قبل الطالبة (رغد عبد الواحد كبيان)

قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ميسان كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

التوقيع:

الأسم: الأستاذ الدكتور زهرة عدنان داخل

المرتبة العلمية: أستاذ

الاختصاص الدقيق:

التاريخ:

توصية رئيس القسم

بالنظر لتوصية المشرفين احيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة

التوقيع:

الأسم: د. ميثم عبد الكاظم دراغ

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

المنصب: رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ:

شكر وتقدير

قال تعالى في كتابه المجيد (ولقد اتينا لقمان الحكمة ان اشكر لله ومن يشكر فانما يشكر لنفسه) {لقمان12} ، الشكر لله وكفى والصلاة والسلام على حبيبه المصطفى وآله وصحبه ومن وفى ، اما بعد : من الوفاء ان يرد الفضل لاصحابه ، فاجزل الشكر وأوفره الى استاذتي الفاضلة د زهرة عدنان خلف لما قدمته من توجيهات ومعلومات قيمة ساهمت في اثراء موضوع بحثي هذا حتى وصلت الى قطف ثمرة هذا الزرع الطيب متمنية لها دوام التوفيق وجزاها الله عني خير الجزاء.

كما ويسعدني ان أتقدم بخالص شكري وتقديري إلى عمادة كلية العلوم/ جامعة ميسان لرعايتها وتقديمها التسهيلات لطلبة الدراسات العليا ووافر الشكر والامتنان الى جميع كادر قسم علوم الحياة في كلية العلوم وفي مقدمتهم رئيس القسم الدكتور ميثم عبد الكاظم دراغ.

والشكر موصول الى كادر مختبر الاحياء المجهرية في مستشفى الزهراوي ومستشفى الطفل ومستشفى الصدر العام في محافظة ميسان لما أبدوه من تعاون ومساعدته.

اهداء

إلى من شرفني بحمل أسمه ورحل قبل أن يرى ثمرة غرسه ..والذي رحمه الله
إلى من هو ظلي حين يرهقني التعب ..زوجي حفظه الله
إلى بذرة الفؤاد وامل الغد ..ابنائي الاحبة
إلى مرشدتي في هذه الخطوات ...استاذتي العزيزة (د زهرة)
إلى عائلتي الكريمة التي ساندنتي ولاتزال ...اخوتي واخواتي
إلى كل من ساندني ومد لي يد العون ولو بكلمة طيبة
إلى كل هولاء اهدي ثمرة هذا الجهد المتواضع ، واتمنى من الله (جل جلاله) أن
تكون هذه الرسالة نافذة علم إلى بحوث قادمة.

الْخُلَاصَةُ

الخلاصة

تعد بكتريا السيلان *Neisseria gonorrhoea* من البكتريا التي تسبب امراض خطيرة تصيب كلا الجنسين وتنتقل عن طريق الاتصال الجنسي والتي تسبب مرض السيلان . وتهدف هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص *Neisseria gonorrhoea* و *Lactobacillus spp* من مريضات اللواتي عانين من افرازات مهبلية مائية watery في مظهرها وخضراء اللون أو صفراء اللون مع ألم أو حرقان عند التبول ، وبعضهن كُن يعانين من ألم في منطقة أسفل البطن ونزيف من الرحم إثناء فترة الطمث. جمعت 140 عينة من النساء الوافدات الى مستشفى العمارة العام في محافظة ميسان، تراوحت أعمارهن بين 20 - 50 سنة ، ضمن الفترة من 2022-10-28 ولغاية الى 2023-5-13، شخّصت العزلات البكتيرية بالطرائق التقليدية، و بعدها تم تشخيص الجينات الثلاثة Opa و TfpC و Por A بنقانة تفاعل البلمرة المتسلسلا العكسي الكمي-RT-PCR وأجريت بعض الفحوصات المظهرية، والمجهريّة، والبايوكيميائية والجزيئية، إذ تم الحصول على 30 (17.64%) من العدد الاجمالي للعزلات تعود إلى بكتريا *Neisseria gonorrhoea* كنتائج إيجابية، في حين أظهرت 140 عينة أخرى (82%) من العينات نتائج سلبية في الزرع المختبري، كانت جميع العينات الموجبة لبكتريا السيلان الجنسي والعيّنات السالبة أيضاً حاوية على البكتريا العصوية *Lactobacillus spp* بنسبة 170 (100%) الا ان اعدادها كانت مختلفة في العينات الموجبة عند فحص العينات بطريقة المسحة البكتيرية الجافة Dry amount technique المصبوغة بصبغة كرام، إذ تم ملاحظة أن العينات الموجبة الحاوية على عدد قليل من بكتريا *Lactobacillus spp* (>100 بكتريا/ حقل مجهري) فإنها تحتوي على عدد عالي نسبيا من بكتريا *N.gonorrhoeae* ما يقارب (50 - 100 زوج بكتريا/ حقل مجهري field)، أما العينات التي اعداد بكتريا *Lactobacillus spp* عالي (<=100 بكتريا/ حقل مجهري) فإنها تحتوي على عدد قليل نسبيا من بكتريا *N.gonorrhoeae* ما يقارب (16 - 24 زوج بكتريا/ حقل مجهري field).

وتشير تقديرات دراستنا الى أن الإصابة قد سجلت في صفوف النساء البالغات التي تتراوح أعمارهن ما بين

20-50 سنة بنسبة 10-60%. بينما كانت نسبة الإجهاض لديهن ما بين 10-50% وبعدها مرات إجهاض من 1 إلى 4 مرات، إلا أن تلك النسوة لم تكن يعانين من العقم، إذ كان عدد الأطفال لديهن يتراوح من 1 طفل إلى 6 أطفال وبنسبة 3.33-26.67%. كما كانت الإصابة بهذه البكتيريا عند المريضات التي لديهن أمراضاً مزمنة كالضغط وداء السكري بنسبة 6.67%، وبنسبة 86.67% لم تكن يعانين من أي مرض مزمن. ويتضح من خلال النتائج، وبعد إجراء الفحوصات البيوكيماوية يدوياً، فضلاً عن استعمال جهاز VIETK2 System، أن جميع عزلات *Neisseria gonorrhoeae* قد أعطت نتيجة سالبة لاختبار أنزيم اليوريز، كما أظهرت العزلات نتيجة موجبة لاختبار الأوكسيداز *oxidase test*، فضلاً عن ذلك أعطت العزلات البكتيرية نتيجة إيجابية لاختبار الكاتليز *catalase test*. أما فيما يخص إنتاج بكتيريا *N.gonorrhoeae* للأحماض وأنزيمات أخرى، فقد تم تأكيد تشخيصها بوساطة جهاز الفايتهك. إذ أُختبرت حساسية جميع بكتيريا السيلان قيد الدراسة تجاه اثنا عشر مضاداً حيوياً، أظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية أن البكتيريا كانت متعددة المقاومة للمضادات الحيوية. (Multidrug MDR) *resistance*، ففي الدراسة الحالية كانت معظم عزلات بكتيريا *N. gonorrhoeae* مقاومة للمضادات الحيوية بنسبة 100% لكل من *Ceftriaxone*، *Ceftazidime*، *Tetracycline* في حين كانت أقل بنسبة مقاومة 73.3% تجاه *Azithromycin* و 10% تجاه *Ciprofloxacin*. من نتائج الدراسة الحالية، ظهرت مستويات الأنترليوكينات IL-6 و IL-8 و IL-10 في مصل النساء المصابات ببكتيريا *N.gonorrhoeae* عالياً جداً مقارنة مع مجموعة السيطرة. أظهرت النتائج باستخدام جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي RT-PCR كتعبيراً عن جينات *opa* و *TfpC* و *porA*، وإستخدام 16Sr RNA كجينات للتعبير الثابت للمقارنة (Housekeeping gene)، ارتفاعاً في التعبير الجيني في الجينات الثلاثة مقارنة بالعينة السيطرة في حين لوحظت الفروقات بين الجينات، إذ أعطى جين *TFpC* أعلى تعبير جيني 441.47 مقارنة بالجينين *Opa* و *PorA* الذين أعطيا 100.723 و 71.02 على التوالي .

وقد استنتج من هذه الدراسة ان جميع العزلات الموجبة والسالبة لبكتيا السيلان تحتوي على البكتريا اللبنية كما اظهرت بكتريا السيلان مقاومة متفاوتة لانواع مختلفة من المضادات الحيوية. كما وجدت الدراسة ان انترلوكين 8 سجل اعلى ارتفاعا وكان اعلى تعبيراً للجينات الثلاثة هو لجين TfpC.

قائمة المحتويات		
الصفحة	الموضوع	التسلسل
	الإهداء	
	شكر وتقدير	
	الخلاصة	
الفصل الأول: المقدمة		
1	المقدمة	.1
الفصل الثاني: استعراض المراجع		
	استعراض المراجع	2
5	Sexually Transmitted Diseases الأمراض المنقولة جنسيا (STDs)	1-2
6	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2-2
6	الصفات العامة لبكتريا السيلان البنية	1-2-2
8	تصنيف <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2-2-2
9	Pathogenicity الأمراض	3-2-2
12	عوامل ضراوة النايسريا البنية	4-2-2
15	تشخيص بكتريا السيلان الجنسي البنية <i>N. gonorrhoeae</i> Diagnosis of	5-2-2
15	Clinical samples العينات السريرية	2-2-5-1
19	زرع العينات السريرية باستخدام الأوساط الزرعية الانتقائية	2-5-2-2
22	Nucleic Acid فحصات تضخيم الحمض النووي Amplification Tests (NAATs)	3-5-2-2
22	Serology الفحوصات المصلية	4-5-2-2
22	<i>N. gonorrhoeae</i> المناعة ضد	5-2-2

27	Treatment العلاج	6-2-2
28	وبائية <i>N. gonorrhoeae</i> والوقاية والسيطرة	7-2-2
30	<i>Lactobacillus acidophilus</i> بكتريا العصيات اللبنية	3-2
30	<i>Lactobacillus acidophilus</i> الصفات العامة لبكتريا	1-3-2
31	العلاقة بين النايسريا البنية وبكتريا العصيات اللبنية الحمضية	4-2
الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل		
32	المواد وطرق العمل	3
32	Materials المواد	1-3
32	الأجهزة والأدوات Equipment and Apparatus	1-1-3
33	المواد الكيميائية والصبغات Chemical Materials and Stains	2-1-3
34	الأوساط الزرعية Culture Media	3-1-3
35	أقراص المضادات الحيوية Antibiotic Discs	4-1-3
36	المواد والمعدات المستخدمة في قياس الانترلوكينات	5-1-3
38	تسلسلات البودئ للكشف عن الجينات المدروسة Primer sequences	6-1-3
39	طرائق العمل Methods	2-3
39	تحضير الكواشف والمحاليل والأوساط الزرعية	1-2-3
39	تحضير الكواشف والمحاليل	1-1-2-3
41	تحضير الأوساط الزرعية (Preparation of Culture Media)	2-1-2-3
41	الأوساط أنية التحضير (Readymade Media)	1-2-1-2-3
41	جمع العينات Collection of specimens	2-2-3
41	تشخيص العزلات البكتيرية (Identification of bacterial isolates)	3-2-3
42	الفحص المظهري (Morphological examination)	1-3-2-3
42	الفحص المجهرى (Microscope Examination)	2-3-2-3
42	الاختبارات البايوكيميائية (Biochemical Tests)	3-3-2-3
42	اختبار الكاتاليز (Catalase Test)	1-3-3-2-3

43	اختبار الاوكسيديز (Oxidase Test)	2-3-3-2-3
43	اختبار الحركة (Motility Test)	3-3-3-2-3
44	تحضير العالق البكتيري (Preparation of Inoculum)	1-4-2-3
44	طريقة تحضير العالق البكتيري ومقارنته مع محلول مكفر لاند القياسي	2-4-2-3
45	إختبار حساسية ومقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية	3-4-2-3
46	تأكيد تشخيص بأستخدام نظام Vitek2	4-4-2-3
48	قياس الأنترليوكينات 6 و 8 و 10	5-2-3
50	الدراسة الجينية لعزلات الناييريا Genetic Study of Neisseria Isolates	6-2-3
50	استخلاص الحمض الريبي RNA extraction	1-6-2-3
52	قياس تركيز ونقاوة الحمض النووي الريبي	2-6-2-3
53	تحويل الحمض النووي الريبوزي الى الدنا المتمم	3-6-2-3
55	طريقة عمل الكشف الكمي عن النيسيريا بوساطة تفاعل البوليمراز المتسلسل بالزمن الحقيقي	4-6-2-3
56	تحضير الخليط الرئيس Master Mix Preparation	1-4-6-2-3
56	RT-PCR Cycling Program	2-4-6-2-3
56	الاختبارات الإحصائية Statistical analyses	7-2-3
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة		
57	النتائج والمناقشة	1
57	العزل والتشخيص Isolation and Identification	1-4
60	انتشار الإصابة بكتريا <i>Neisseria gonorrhoeae</i> حسب الفئات العمرية	2-4
63	الصفات المزرعية لبكتريا الناييريا البنية	3-4
66	الصفات المظهرية والمزرعية لبكتريا العصيات اللبنية الحمضية	4-4
69	الفحوصات البايوكيميائية لبكتريا السيلان البنية والعصيات اللبنية الحمضية	5-4
72	اختبار الحساسية لعزلات بكتريا <i>L. acidophilus</i> و <i>N. gonorrhoeae</i> للمضادات الحيوية	6-4

76	متوسط الأنترليوكينات المختلفة بين المجموعات المدروسة	7-4
80	تفاعل البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي RT-PCR	8-4
80	استخلاص الـ RNA لتفاعل البلمرة المتسلسل العكسي الكمي	1-8-4
80	التعبير الجيني لجينات <i>opa</i> و <i>TfpC</i> و <i>porA</i>	2-8-4
90	العلاقة بين بكتريا <i>N. gonorrhoeae</i> واجناس بكتريا العصيات اللبنية <i>Lactobacillus spp</i>	9-4
الاستنتاجات والتوصيات		
94	Conclusions الاستنتاجات	----
95	Recommendations التوصيات	----
المصادر		
96	References المصادر	----
124	الملاحق	----
124	ملحق رقم 1	
125	ملحق رقم 2	
126	ملحق رقم 3	
127	ملحق رقم 4	
128	ملحق رقم 5	
129	ملحق رقم 6	
130	ملحق رقم 7	
131	نموذج استبيان	-----

قائمة الجداول		
الصفحة	العنوان	التسلسل
8	التصنيف العلمي للنايسريا البنية <i>N. gonorrhoeae</i>	1-2
16	نوع العينات السريرية وطرق جمعها للتشخيص المختبري لمرض السيلان	2-2
21	تقنيات تضخيم الحمض النووي (NAATs) المعتمدة من إدارة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) للكشف عن النيسرية البنية ونوع النماذج السريرية المعتمدة في كل فحص	3-2
32	الأجهزة والأدوات المختبرية المستعملة في الدراسة الحالية	1-3
33	المواد الكيميائية والصبغات المستعملة في الدراسة الحالية	2-3
34	الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة الحالية	3-3
35	أقراص المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة الحالية (المصنعة من قبل الشركة التركية (Bioanalyse)	4-3
36	المواد والمعدات المستخدمة لقياس انتروكين 6	5-3
36	المواد والمعدات المستخدمة في قياس انتروكين 8	6-3
37	المواد والمعدات المستخدمة لقياس انتروكين 10	7-3
38	تسلسلات بوائى الجينات المستعملة في الدراسة الحالية	8-3
45	كثافة العد التقريبي للخلايا ومحلول مكفر لاند القياسي	9-3
48	سلسلة التخفيف التي أجريت على المحلول القياسي لانتروكين 6	10-3
49	سلسلة التخفيف التي أجريت على المحلول القياسي لانتروكين 8	11-3
49	سلسلة التخفيف التي أجريت على المحلول القياسي لانتروكين 10	12-3
54	خليط التفاعل reaction mixture لتفاعل واحد For 1 reaction	13-3
55	تحضير الخليط الرئيس Master Mix Preparation	14-3
56	الوقت والحرارة وعدد مرات التدوير للبرنامج	15-3
57	نتائج الزرع المختبري لعينات الدراسة	1-4
58	العلاقة بين اعداد البكتريا اللبنية وبكتريا السيلان	2-4
61	انتشار الإصابة ببكتريا <i>Neisseria gonorrhoeae</i> حسب الفئات العمرية	3-4

66	الصفات الزرعية لبكتريا <i>Neisseria gonorrhoeae</i> على أوساط زرعية أغنائية وانتقائية	4-4
71	الأختبارات البايوكيميائية لعزلات <i>N. gonorrhoeae</i> و <i>Lactobacillus acidophilus</i>	5-4
75	اختبار مقاومة المضادات الحيوية على العزلات السرييرية لبكتيريا النيسرية البنية	6-4
76	متوسط مستوى الأنترليوكينات في النساء المصابات ببكتريا <i>N. gonorrhoeae</i> مقارنة مع مجموعة السيطرة	7-4
81	قيم حد العتبة للجين opa	8-4
82	متوسط حد العتبة للجين opa Mean of cycle threshold (Ct, ΔCt, ΔΔCT) of opa gene	9-4
83	قيم حد العتبة للجين por	10-4
84	متوسط حد العتبة للجين Mean of cycle threshold (Ct, ΔCt, ΔΔCT) of porA gene	11-4
85	قيم حد العتبة للجين TFpC	12-4
86	متوسط حد العتبة للجين Mean of cycle threshold (Ct, ΔCt, ΔΔCT) of TFpC gene	13-4
90	الفروقات المعنوية بين جينات ضرواة بكتريا السيلان	14-4
92	العلاقة التضادية بين بكتريا <i>N. gonorrhoeae</i> وبكتريا <i>Lactobacillus spp</i> العصيات اللبنية	15-4
93	النسبة المئوية لبكتريا العصوية اللبنية <i>Lactobacillus spp</i>	16-4

قائمة الاشكال		
الصفحة	العنوان	التسلسل
11	الاستجابة المناعية ضد بكتريا <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1-2
13	عوامل ضراوة <i>N. gonorrhoeae</i>	2-2
26	المناعة ضد <i>N. gonorrhoeae</i>	3-2
59	بكتريا <i>N. gonorrhoeae</i> في الفحص المجهرى بعد صبغ العينة بصبغة كرام (تحت العدسة الزيتية 100X)، بشكل تشبه حبة القهوة Coffee-bean، ثنائية Diplococcus، داخل خلايا PMN (Intracellular) او خارج خلايا PMN (Extracellular)	1-4
65	مستعمرات <i>Neisseria gonorrhoeae</i> على وسط Chocolate agar بعد مرور 48 ساعة حضن بدرجة حرارة 37 درجة مئوية وتوفير 5-10% CO ₂ في candle jar	2-4
65	مستعمرات <i>Neisseria gonorrhoeae</i> على وسط ثاير-مارتن اكار المحور بعد حضانة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية	3-4
76	مستعمرات <i>L.acidophilus</i> بيضاء اللون على وسط MRS agar	4-4
76	مستعمرات <i>L.acidophilus</i> على وسط Nutrient agar التي تظهر فيها بيضاء - كريمة اللون ملساء	5-4
78	المنحنى القياسي (standard curve) لحساب تراكيز الجسم المضاد المعبر عنها بوحدة U/ml من OD لكل عينة	6-4
79	المنحنى القياسي (standard curve) لحساب تراكيز الجسم المضاد المعبر عنها بوحدة U/ml من OD لكل عينة	7-4
79	المنحنى القياسي (standard curve) لحساب تراكيز الجسم المضاد المعبر عنها بوحدة U/ml من OD لكل عينة	8-4
80	التعبير الجيني لجين 16srRNA	9-4
82	منحنى التعبير الجيني لجين Opa gene	10-4
84	منحنى التعبير الجيني لجين PorA gene	11-4
86	منحنى التعبير الجيني لجين Tfpc	12-4

الفصل الأول

المقدمة

INTRODUCTION

1. المقدمة Introduction

يعد مرض السيلان الجنسي Gonorrhoea ثاني أكثر الأمراض التي تنتقل عن طريق الاتصال الجنسي (Sexually Transmitted Disease) انتشارًا مع ارتفاع معدل الإصابة على مستوى العالم (Unemo et al., 2019; Yang and Yan, 2020). تقدر منظمة الصحة العالمية (World Health Organization (WHO) أن هناك 78-87 مليون حالة إصابة بمرض السيلان جديدة سنويًا (Unemo et al., 2019). توصي منظمة الصحة العالمية بإجراء تقييمات دورية لانتشار مرض السيلان في عموم السكان بما في ذلك (النساء الحوامل، والنساء اللائي يحضرن عيادات تنظيم الأسرة، والمجنندات العسكريات (military recruits)، وفي المجموعات السكانية التي ينتشر بها المرض بكثرة (Whelan et al., 2021). النيسرية البنية (*N. gonorrhoeae*) عبارة عن مكورات ثنائية diplococcus سالبة لصبغة جرام، من المسببات المرضية البشرية الإجبارية هوائياً obligate human pathogen ، وهي العامل المسبب لمرض السيلان gonorrhoea. على الرغم من أن إصابته *N. gonorrhoeae* نادراً ما تكون قاتلة، إلا أن المرض ينتشر بشكل كبير خاصة بين الرجال (Whittles et al., 2018). تسبب *N. gonorrhoeae* محدثة تلفاً في الجهاز التناسلي العلوي upper genital tract عند الإناث والتهاب البربخ Epididymitis الأقل شيوعاً عند الذكور (Kirkcaldy et al., 2019). ولقد تم تحديد المقاومة للمضادات الحيوية لبكتريا *N. gonorrhoeae* ضد مجموعة واسعة من الأدوية المضادة للميكروبات على مستوى العالم، ووجد ظهور سلالات تحمل صفة المقاومة لعدد من تلك المضادات (Yakobi and Poee, 2022).

بكتيريا حمض اللاكتيك (LAB) Lactic acid bacteria هي البكتيريا السائدة في مهبل النساء

السليمات healthy women وتلعب دوراً مثيراً مهماً في الحفاظ على التوازن البيئي

ecological balance في المنطقة التناسلية للانثى (Zheng *et al.*, 2020). تلعب *Lactobacillus* دورًا وقائيًا في البيئة الدقيقة المهبلية Vaginal microenvironment، ويؤدي انخفاض عددها إلى خلل في الأنواع الميكروبية وانخفاض في التنوع الميكروبي لمنطقة المهبل وهذا ما يسمى بالاختلال الميكروبي bacteriocin dysbiosis (Pramanick *et al.*, 2019). تولد بكتريا *Lactobacillus* البكتريوسين وحمض اللاكتيك lactic acid، مما يساعد على تثبيط نمو البكتيريا عن طريق الحفاظ على درجة الحموضة pH المهبلية منخفضة (درجة الحموضة 3.0 - 4.5) (Hartanto and Hidayati, 2021). تعد *Lactobacillus spp.* في المهبل بمثابة إحدى آليات الدفاع ضد غزو بكتريا *N. gonorrhoeae* للمنطقة التناسلية، إذ أنه أثناء التداخلات مع *N. gonorrhoeae* يمكن للمكونات السطحية للمواد الحيوية السطحية biosurfactants في بعض سلالات *Lactobacillus* تجعل منها ذات قدرات عالية للتجمع أو التلزن aggregation مع بعضها البعض، مما يعرقل غزو المكورات البنية (GC) gonococci ويقلل حيويتها (Foschi *et al.*, 2017). من جهة أخرى، تتميز إصابة النيسرية البنية بالتكاثر داخل خلايا الدم البيض العدلة neutrophils، والذي يؤثر على تفاعلات النيسرية البنية مع العدلات هي البروتينات المرتبطة بالعمامة phase-variable opacity-associated (Opa) ذات المرحلة المتغيرة (Alcott *et al.*, 2022). إن بروتينات Opa هي عائلة كبيرة من بروتينات الغشاء الخارجي المتكاملة integral outer membrane، كل منها يتكون من β -barrel مع ثمان متواليات غشائية محفوظة conserved transmembrane sequences للغاية. تعمل بروتينات Opa على تعزيز استدامة وبقاء النيسرية البنية في الجهاز التناسلي الأنثوي وتغير طور الجين opa gene phase الذي يسمح للمكورات البنية بغزو الخلايا الظهارية epithelial cells في الانسان (Quillin and Seifert, 2018; Shaughnessy *et al.*, 2019).

يلعب بورين الغشاء الخارجي الرئيس (PorB) outer membrane porin الذي تعبر عنه النيسيرية البنية أدوارًا متعددة أثناء الإصابة، فضلاً عن وظيفته كمسام أو أحداث ثقب في الغشاء الخارجي outer membrane pore للبكتيريا. *PorA* هو مسام ذو جهد كهربائي voltage-gated pore يتوسط التبادل الأيوني بين *N. gonorrhoeae* والبيئة. تحتوي سلالات *N. gonorrhoeae* على جين *porB* واحد في أحد الشكلين الأليلين (P. IA أو P. IB) ، وقد ارتبط الأليلين بأنماط ظاهرية بيولوجية مختلفة (Quillin and Seifert, 2018).

يؤدي استعمار الغشاء المخاطي من المكورات البنية وغزو الخلايا الظهارية في الجهاز التناسلي إلى إنتاج السيتوكينات Cytokines الناتجة عن حدوث الالتهابات وتنشيط الخلايا المناعية المقيمة resident لتحفيز الخلايا المناعية الأخرى المنتشرة في الجسم. يمكن للنيسيرية البنية أيضًا اختراق طبقة الخلايا الظهارية، وبالتالي الدخول إلى الطبقة تحت المخاطية Submucosa ، حيث تتفاعل مع الخلايا المناعية بما في ذلك خلايا البلعمة Macrophages والعدلات Neutrophils (الخلايا متعددة الأشكال polymorphonuclear cells; PMN) (Ritter and Genco, 2018).

أدى العلاج بالأجسام المضادة لـ IL-10 (anti-IL-10 antibodies) إلى إزالة أسرع للأصباة وزيادة الحماية المستحثة protection ضد العدوى الثانوية ببكتريا *N. gonorrhoeae*، مع إنتاج أضداد منتشرة في الجسم وكذلك في منطقة المهبل مضادة للمكورات البنية anti-gonococcal antibodies (Liu et al., 2014; Liu et al., 2017). تحفز النيسيرية البنية على إفراز السيتوكينات IL-6 و TNF- α والكيموكينات chemokines نوع CXCL8 و CCL20 بوساطة الخلايا الظهارية المصابة (Płaczekiewicz et al., 2022).

أهداف الدراسة The aims of the study

- 1- عزل وتشخيص بكتريا السيلان *Neisseria gonorrhoeae* عند النساء المصابات في محافظة ميسان بالطرق البايوكيميائية والجزئية.
- 2- تشخيص بكتيريا العصيات اللبنية *Lactobacilli spp* وعلاقتها ببكتيريا النيسرية البنية.
- 3- قياس مستويات الانتروكينات 6 و 8 و 10 للعينات الموجبة ببكتريا السيلان الجنسي.
- 4- التعرف على الجينات المسؤولة عن ضراوة النيسرية السيلانية بتقنية تفاعل البوليميريز المتسلسل العكسي الكمي المتسلسل RT- PCR technique.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

2. استعراض المراجع Literatures Review

1-2 الأمراض المنقولة جنسيا (STDs) Sexually Transmitted Diseases

من المعروف أن أكثر من 30 نوعًا من البكتيريا والفيروسات والطفيليات المختلفة تنتقل عن طريق الاتصال الجنسي Sexual contact، بما في ذلك الجنس المهبلي Vaginal sex والجنس الشرجي Anal sex والجنس الفموي Oral sex. يمكن أيضًا أن تنتقل بعض الأمراض المنقولة بالاتصال الجنسي من الأم إلى الطفل أثناء الحمل والولادة والرضاعة الطبيعية. ثمانية من مسببات الأمراض مرتبطة بأكبر معدل للإصابة بالأمراض المنقولة بالاتصال الجنسي، أربعة منها قابلة للشفاء حاليًا curable تشمل الزهري Syphilis والسيلان Gonorrhoea والكلاميديا Chlamydia وداء المشعرات Trichomoniasis. الأربعة الأخرى عبارة عن أصابة فايروسية غير قابلة للشفاء incurable تشمل التهاب الكبد الفايروسي نوع B Hepatitis B وفايروس الهربس (HSV) Herpes Simplex Virus وفايروس نقص المناعة البشرية Human Immunodeficiency Virus (HIV) وفايروس الورم الحليمي البشري Human Papillomavirus (HPV) (James et al., 2022). بالإضافة إلى ذلك، فاشيات Outbreaks فايروسية جديدة للأصابة التي يمكن أن تحدث عن طريق الاتصال الجنسي مثل الإيبولا Ebola وفايروس زيكا Zika ، وكذلك عودة ظهور الأمراض المنقولة بالاتصال الجنسي التي باتت منسية في سنوات سابقة ولم يعد لها وجود كبير مثل الورم الحبيبي اللمفاوي lymphogranuloma venereum، هذه تنذر بتحديات متزايدة في توفير الخدمات المناسبة للوقاية من الأمراض المنقولة بالاتصال الجنسي ومكافحتها (WHO, 2023).

للأمراض المنقولة بالاتصال الجنسي تأثير عميق على الصحة. إذا لم يتم علاجها، يمكن أن تؤدي إلى عواقب وخيمة بما في ذلك أمراض الجهاز العصبي والقلب والأوعية الدموية neurological and Cardiovascular disease ، والعقم Infertility ، والحمل خارج الرحم Ectopic pregnancy، وولادة جنين ميت Stillbirths ، وزيادة خطر الإصابة بفايروس نقص المناعة (HIV). كما أنها مرتبطة بالعنف

المنزلي domestic violence ونمط الحياة Life style وتعاطي المخدرات وغيرها من الامور التي تساعد على نقل الامراض الجنسية (Gerwen et al., 2022). كما أن غالبية الأمراض المنقولة بالاتصال الجنسي ليس لها أعراض مرضية. عند ظهور الأعراض الشائعة للأمراض المنقولة بالاتصال الجنسي، تكون بظهور الإفرازات المهبلية Vaginal discharge أو الإحليل Urethral discharge، وقرحة الأعضاء التناسلية Genital ulcer وآلام أسفل البطن (Ellsworth et al., 2021).

Neisseria gonorrhoeae 2-2

1-2-2 الصفات العامة لبكتريا السيلان البنية *Neisseria*

gonorrhoeae

النييسرية البنية *N. gonorrhoeae* والمعروفة أيضًا باسم المكورات البنية (GC) Gonococcus ، هي نوع من المكورات السالبة لصبغة كرام Gram-negative، تشبه حبوب البن Coffee bean، تجمعها يكون على شكل مكورات المزدوجة Diplococci، عزلها العالم ألبرت نيسر Albert Neisser في عام 1879 (Casino et al., 2023). أحد أكثر أنواع العدوى البكتيرية المنقولة جنسيًا Sexually transmitted infections (STIs) شيوعًا في جميع أنحاء العالم. تسبب عدوى السيلان البولي التناسلي Sexually Transmitted genitourinary infection المنقولة جنسيًا، فضلا عن مرض المكورات البنية المنتشرة disseminated gonococemia والتهاب المفاصل الإنتاني septic arthritis والرمد الولادي gonococcal ophthalmia neonatorum وقد يؤدي ذلك الى العمى (O'Donnell and Gelone, 2009; CDC, 2019) Blindness.

تعطي *N. gonorrhoeae* نتيجة إيجابية بالنسبة لأختبار الأوكسيديز Oxidase، هوائية Aerobic، غير متحركة Non-motile وغير مكونة للحافظة Non-capsule forming ، تقاوم عملية البلعمة

phagocytosis وتتمو داخل الخلايا العدلة Neutrophils. تتطلب زراعتها غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2 بتركيز 5-10% ، ووسط زرع غني مثل أكار الجوكوليت Chocolate agar ووسط ثاير مارتن Thayer-Martin agar. يُظهر تباينًا مستضديًا من خلال إعادة التركيب الجيني لشعيراته Genetic recombination of pili والبروتينات السطحية التي تتفاعل مع جهاز المناعة (Lovett and Duncan, 2019). من الصفات الرئيسة لهذه البكتريا أيضا هي عدم قدرتها على مقاومة الجفاف Dryness ودرجات الحرارة الواطئة، إذ تعد درجة حرارة 35-36 م° هي الدرجة المثلى لنموها (Casino *et al.*, 2023).

العلاج يتم باستخدام المضاد الحيوي Ceftriaxone إذا كانت الإصابة في العين أو بوضع قطرات من محلول 1% نترات الفضة Silver nitrate أو مرهم Tetracycline بتركيز 1% أو استعمال Erythromycin بتركيز 0.5% في العين. فيكون العلاج بإعطاء مضادات الجيل الثالث من cephalosporins مثل ceftriaxone و ciprofloxacin (Unemo *et al.*, 2019; Manoharan-). (Basil *et al.*, 2023).

Neisseria gonorrhoeae تصنيف 2-2-2

التصنيف العلمي للنايسريا البنية يكون حسب الترتيب التالي جدول 1-2 (Janda and Gaydos,

2007)

جدول 1-2: التصنيف العلمي للنايسريا البنية *N. gonorrhoeae*

Scientific classification	
Domain	Bacteria
Phylum	Pseudomonadota
Class	Betaproteobacteria
Order	Neisseriales
Family	Neisseriaceae
Genus	<i>Neisseria</i>
Species	<i>N. gonorrhoeae</i>

2-2-3 الأمراض Pathogenicity

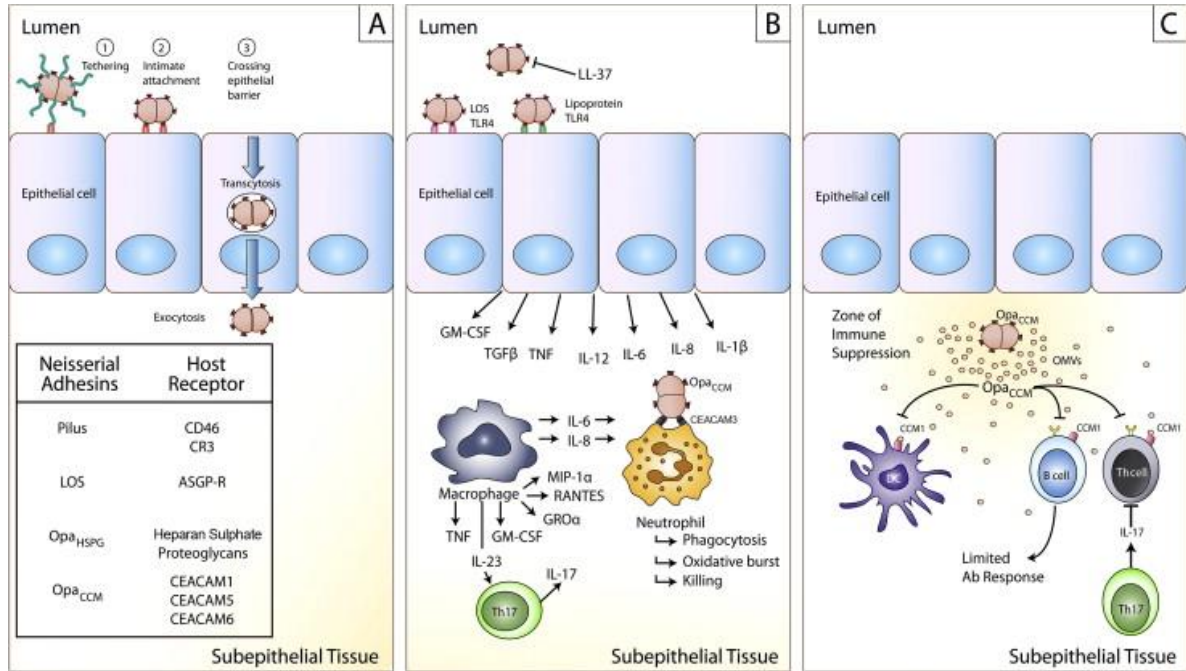
تقتصر إصابة السيلان بشكل عام على الأسطح المخاطية السطحية المبطنة بظهارة عمودية Columnar epithelium. تبدأ إصابة *N. gonorrhoeae* بالالتصاق المكورات البنية بالخلايا الظهارية، يليها غزو خلوي موضعي Local cellular invasion. تحتوي بكتيريا السيلان الجنسي على بروتينات سطحية متعددة تسهل الالتصاق. تستخدم *N. gonorrhoeae* الشعيرة لبدء الالتصاق بالخلايا الظهارية (Harvey *et al.*, 2000). الزوائد الشبيهة بالشعر Hair-like appendages المعروفة بإسم الشعيرات أو الاهداب Pili تغطي السطح البكتيري بالكامل مما يسهل الالتصاق بالخلايا الظهارية ويعزز الغزو الخلوي (Dye *et al.*, 2021). تشمل البروتينات السطحية الأخرى المشاركة في الارتباط الخلوي مثل البروتينات المرتبطة بالعتامة Opacity-associated proteins (Opa)، و Lipooligosaccharide (LOS). يرتبط LOS بخلايا الحيوانات المنوية ومن المحتمل أن يؤدي إلى الانتقال من الذكور المصابين إلى افراد آخرين غير مصابين عن طريق الاتصال الجنسي المباشر (WHO, 2016). تسهل بروتينات Pili و Opa التصاق المكورات البنية بالخلايا الظهارية في مجرى البول كالأحليل والمستقيم وعنق الرحم والبلعوم والملتحمة ، مما يجعل الاستعمار ممكناً (Unemo *et al.*, 2019). تتوسط بروتينات Pili و PorA و Opa المكورات البنية لتلتصق بالخلايا المخاطية، وتخرق الخلايا وتتكاثر بعدها، ثم تمر عبر الخلايا إلى الفراغ تحت الظهارة subepithelial space حيث يتم تكوين الأصابة. يحفز LOS إطلاق عامل تنخر الورم نوع ألف المسببة للالتهاب (Tumor Necrosis Factor, TNF- α) ، والذي يسبب معظم الأعراض المرتبطة بمرض المكورات البنية. يمكن للأجسام المضادة لـ LOS أن تنشط المتمم Complement، وتحرر المكون التكميلي C5a (Complement component C5a)، الذي له تأثير كيميائي على العدلات Neutrophils؛ ومع ذلك، فإن الأجسام المضادة IgG و IgA1 الإفرازية الموجهة ضد بروتين Rmp يمكن أن تمنع استجابة الجسم المضاد للبكتريا. يشمل غزو ظهارة عنق الرحم من قبل الخلايا البكتيرية التي ترتبط مع مستقبلات

المتمة من النوع 3 (CR3–Complement Receptors Type 3) (Lenz and Dillard, 2018). يبدأ الاتصال من خلال ربط pili بـ CR3. يتسبب هذا في إعادة ترتيب واسعة النطاق لأكتين الخلية المضيفة، مما يؤدي إلى ظهور نتوءات كبيرة تسمى النتوءات المزركشة Ruffles. تسمح هذه النتوءات بعد ذلك للمكورات البنية بدخول الخلايا المضيفة في فجوات كبيرة تسمى الأجسام المتشربة الكبيرة macropinosomes والتي هي عبارة عن عضيات داخلية عابرة transient endocytic organelles، ثم تتكاثر البكتريا لاحقاً داخل الخلايا المصابة (Yu *et al.*, 2017). تتطلب المكورات البنية الحديد والزنك والمنغنيز للنمو والبقاء في الجسم الحي. يكتسب العامل الممرض هذه المغذيات الضرورية عن طريق التعبير expression عن أنظمة نقل محددة تزيل الحديد وتستوعبه internalize من البروتينات المرتبطة بالحديد بما في ذلك الترانسفيرين transferrin واللاكتوفيرين lactoferrin والهيموجلوبين hemoglobin (Green *et al.*, 2022).

أما في النساء فتكون الاصابات اقل انتشارا وغالبا بدون أعراض مرضية، بينما من النادر عدم ظهور أعراض للمكورات البنية عند الرجال. قد تظل النايسريا البنية موضعيا في الأعضاء التناسلية، مما يتسبب في حدوث التهاب وإصابة موضعية localized، مما يسهل بلا شك انتقالها التناسلي المستمر (Luetkemeyer *et al.*, 2023). في بعض الأحيان، تصل *N. gonorrhoeae* إلى مجرى الدم لأحداث الإصابة بالمكورات البنية المنتشرة disseminated gonococcal infection. على الرغم من وجود اختلافات بين سلالات *N. gonorrhoeae* التي تظل موضعية، فإن ارتباطها بالإمراضية غير معروف (Su *et al.*, 2023). يؤدي تجرثم الدم بالمكورات البنية Gonococcal bacteremia إلى حدوث آفات جلدية في الكف والساعد والقدم والساق والتهاب غمد الوتر tenosynovitis والتهاب المفاصل القيحي suppurative arthritis عادة الركبة knee والكاحل ankle والمعصم wrists. أما التهاب شغاف القلب endocarditis بالمكورات البنية فانه غير شائع ولكنها تعد أصابة شديدة severe infection. تم ملاحظة أن نقص المتمة يكون بشكل متكرر في المرضى الذين يعانون من تجرثم الدم بالمكورات البنية. غالباً ما تكون المكورات البنية التي تنتج أصابة

موضعية حساسة في المصل أي تُقتل بواسطة الأجسام المضادة complement والمتمم

(Sarenje *et al.*, 2022) شكل 2-1.



شكل 2-1: الأستجابة المناعية ضد بكتريا *Neisseria gonorrhoeae* (Quillin *et al.*, 2018).

(*al.*, 2018).

2-2-4 عوامل ضراوة النيسيريا البنية

Virulence factors of *Neisseria gonorrhoeae*

1. أشعار (الأهداب) Pili

هي إحدى عوامل الفوعة الرئيسة لـ *Neisseria gonorrhoeae*. إذ يلعب دوراً رئيساً في الألتصاق adherence وتساعد البكتيريا في مقاومة عملية البلعمة phagocytosis. يساعد في ربط النيسيريا بالزغبيات الموجودة على الخلايا الظهارية العمودية غير الهدبية non-ciliated columnar epithelial cells. تتكون الأهداب من بروتينات البيلين pilin المتميزة من الناحية المستضدية، وتخضع لتغيرات وطفرات جينية تساعد في تميط typing وتشخيص النيسيريا (شكل 2-2) (Kim et al., 2022; Hughes-Games et al., 2022).

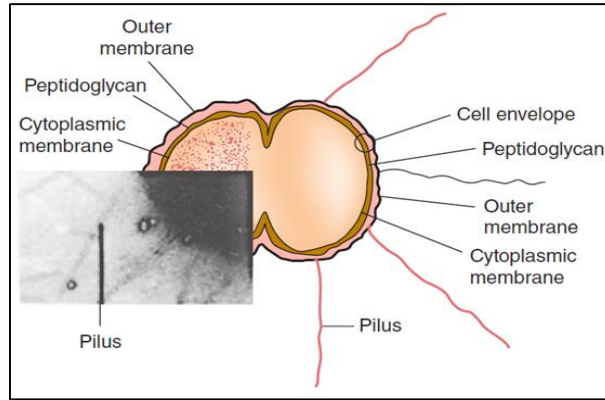
2. بورين الغشاء الخارجي الرئيس (Major outer membrane porin (PorA)

يلعب بورين الغشاء الخارجي الرئيسي (PorA) الذي تعبر عنه النيسيريا البنية أدواراً متعددة أثناء الإصابة، فضلاً عن وظيفته كمسام غشاء خارجي outer membrane pore. PorB هو مسام pore ذو جهد كهربائي يتوسط التبادل الأيوني بين *N. gonorrhoeae* والبيئة. كما يبدو أن PorB يؤدي وظائف متعددة تساهم في التسبب في أمراض النيسيريا (Zhu et al., 2023) أهمها:

- تحفيز أو تثبيط إشارات موت الخلايا المبرمج apoptotic signaling.
- المساهمة في مقاومة المصل serum resistance من خلال التفاعلات مع المنظمين لمسار المتممة الكلاسيكي classical complement والبديل alternative.
- التوسط في غزو الخلايا الظهارية في ظل ظروف منخفضة من الفوسفات low-phosphate conditions.

- يمكن أن يؤثر على توليد أنواع الأوكسجين التفاعلي (ROS) بواسطة

المناعة الطبيعية .innate.



شكل 2-2 : عوامل ضراوة *N. gonorrhoeae*

3. بروتينات العتمة (Opa) proteins Neisserial opacity

إنها عائلة من بروتينات الغشاء الخارجي المتميزة مستضديًا والتي تخضع لتعبير متغير الطور-phase variable expression . تعمل بروتينات أوبا على تعزيز بقاء *N. gonorrhoeae* في الجهاز التناسلي الأنثوي، وتغير طور الجين *opa gene phase* الذي يسمح للمكورات البنية بغزو الخلايا الظهارية. بروتينات Opa مسؤولة أيضاً عن الطبيعة غير الشفافة opaque لمستعمرات *N. gonorrhoeae* (Green et al., 2022; Alcott et al., 2022).

1. بروتين قابل للتعديل (Rmp) Reduction-modifiable protein

Rmp (Protein III) هو بروتين له وزن جزيئي من 30-31 كيلو دالتون، موجود في جميع أنواع الناييسريا الممرضة للإنسان. وهو بروتين قابل للاختزال (Rmp) Reduction-modifiable protein. يرتبط بـ Por لتكوين الفتحات Pores في سطح الخلية (Gulati et al., 2015; Jerse et al., 2014).

2. بروتينات الربط الترانسفيرين Transferrin binding proteins

تنتج *N. gonorrhoeae* اثنين من البروتينات المرتبطة بالترانسفيرين، وهما TbpA و TbpB، واللذان يرتبطان على وجه التحديد مع الحديد من البروتينات المشتقة من المضيف، بما في ذلك الترانسفيرين transferrin واللاكتوفيرين lactoferrin والهيموكلوبين haemoglobin (Fegan *et al.*, 2019; Greenawalt *et al.*, 2022).

3. بروتينات أخرى Other Proteins

العديد من بروتينات *N. gonorrhoeae* الثابتة مستضدياً لها دور ضعيف في حدوث المرض. Lip (H8) هو عبارة عن بروتين معرض للسطح surface-exposed protein قابل للتعديل أو التحوير بالحرارة مثل Opa. يتم التعبير عن Fbp (بروتين ربط الحديد ferric-binding protein)، المشابه لـ MW 1 Por ، عندما تكون كمية الحديد المتاحة محدودة، كما هو الحال في الإصابة البشرية. تنتج *N. gonorrhoeae* بروتين IgA1 (IgA1 protease) الذي يقسم ويثبط IgA1، وهو الكلوبولين المناعي المخاطي mucosal immunoglobulin الرئيس للإنسان الذي يتواجد في إفرازات المرأة المصابة بالنايسيريا. تقوم المكورات السحائية Meningococci والإنفلونزا *Hemophilus influenzae*، والمكورات الرئوية *Streptococcus pneumoniae* بإنتاج بروتياز IgA1 مماثل للنايسيريا البنية (Huang *et al.*, 2020; Karlinsky *et al.*, 2022;)

4. قليل السكريد الدهني Lipooligosaccharide (LOS)

ينشط عديد السكريد الدهني (LOS) لبكتريا *N. gonorrhoeae* المسار التكميلي البديل alternative complement pathway للمضيف. لقد تميز LOS بنشاط سمي داخلي endotoxic ؛ يحفز إنتاج عامل نخر الورم (TNF) tumor necrosis factor الذي يسبب تلف الخلايا. يتكون عديد السكريد الدهني من النيسيرية البنية من الدهون A (lipid A) و oligosaccharides الأساسية فقط ولكنها تفتقر إلى

سلاسل O-side المتكررة لذلك يشار إليها باسم lipooligosaccharide ؛ يحتوي LPS من البكتيريا المعوية أيضًا على سلاسل O-side (Ram *et al.*, 2017; Christodoulides, 2019).

5-2-2 تشخيص بكتريا السيلان الجنسي البنية *N. gonorrhoeae* Diagnosis of

1-5-2-2 العينات السريرية Clinical samples

يعتمد اختيار العينة وطريقة جمعها على تقنية الاختبار المستخدمة في المختبر والعمر والجنس والتوجه الجنسي للمريض sexual orientation (Whittington *et al.*, 1996). يجب جمع العينات باستخدام مسحات الداكرون أو الرايون Dacron or rayon swabs لأن ألبينات الكالسيوم calcium alginate قد تكون سامة للمكورات البنية. الأحماض الدهنية Fatty acids تمنع نمو المكورات البنية. لذلك، يجب عدم استخدام المسحات القطنية cotton swabs التي لا تذكر مواصفات الشركة المصنعة عليها (Janda and Knapp, 2003). لتقليل التأثيرات المثبطة للمواد غير المعروفة في العينة، يجب تلقيح المسحات مباشرة على وسط النمو أو وضعها في وسط نقل المسحة swab transport medium بعد أخذ العينات مباشرة. يمكن أيضًا استخدام أوساط ناقلة انتقائية مثل Transgrow أو Jembec إذا كانت متوفرة لكنها باهظة الثمن. أما وسط آميس الناقل Amies Transport Medium (بدون فحم charcoal) هو وسط ناقل مناسب لنقل *N. gonorrhoeae* عند استخدامها مع مسحات من الصوف القطني المطلي بالزلال البقري bovine albumin-coated cotton wool swabs، ويوجد أيضًا الوسط الناقل ستوربات Stuart transport medium وبذلك فيجب اختيار الوسط الناقل المناسب بدون أن يؤثر على صفات البكتريا ونموها ويمنع جفاف العينة (Corwin *et al.*, 2023) جدول 2-2.

جدول 2-2: نوع العينات السريرية وطرق جمعها للتشخيص المختبري لمرض السيلان

نوع العينة Specimen type	طرق جمع العينة Method of collection
Urethral الأحليل	جمع الإفرازات للحمية (فتحة مجرى البول) meatal (urethral opening) exudate في مرضى ما بعد البلوغ أو مسحة داخل الإحليل intraurethral swab للكشف عن <i>N. gonorrhoeae</i> . يتم عمل المسحات البكتيرية المناسبة وصبغها بصبغة كرام أو الزرع على أوساط زرعية مناسبة أو للنقل إلى مختبرات أخرى.
Urine الأدرار	الأدرار هو أحد أنواع العينات المناسبة لاختبارات الحمض النووي لتشخيص عدوى السيلان الجنسي عند الذكور والإناث.
Cervical and vaginal specimens عينات عنق الرحم والمهبل	عدوى <i>N. gonorrhoeae</i> عند الفتيات قبل سن البلوغ تشمل المهبل وليس عنق الرحم؛ لذلك يجب جمع العينات المهبلية من هذه الفئة العمرية. يمكن استخدام مسحات عنق الرحم والمسحات المهبلية لتحضير المسحات البكتيرية bacterial smears وصبغها، فضلا عن لتلقيح الأوساط الزرعية مباشرة، للاختبارات القائمة على الحمض النووي أو للنقل إلى مختبرات بعيدة.
Oropharyngeal and rectal specimens عينات الفم والبلعوم والمستقيم	مسحات الفم والبلعوم والمستقيم أو الإفرازات تتم زراعتها على الأوساط الانتقائية لتشخيص الناييسريا.
Sterile body fluids سوائل الجسم المعقمة	إجراء الشفط percutaneous aspiration عن طريق الجلد للسوائل الجنبية pleural أو التامور pericardial أو الصفاقي البريتوني peritoneal أو الزليلي synovial fluids.

(Meyer and Buder, 2020)

2-2-5-2 زرع العينات السريية بأستخدام الأوساط الزرعية الأنتقائية

المكورات البنية غير قادرة على النمو على أكار الدم Blood agar الشائع. لذا مباشرة بعد جمع العينات، تُزرع العينة على وسط انتقائي مناسب لعزل *N. gonorrhoeae* أهمها وسط أكار ثاير- مارتن المحور (MTM) Modified Thayer-Martin agar ووسط أكار مارتن - لويس (ML) Martin-Lewis Agar والذي يعد أيضاً وسطاً غنياً لأحتواءه على الهيموكلوبين Hemoglobin بنسبة غرام/ مل من الوسط والذي يسمى بعامل X (hemin) X factor ، فضلا عن إحتواءه على مكونات يرمز لها إختصاراً Enrichment Bio-X المتكونة من خلط (فيتامين ب12 Vitamin B12، وثيامين Thiamine Pyrophosphate، وكلوتامين L-Glutamine ، ونترات الحديدك Ferric Nitrate، وأدنين Adenine، وثيامين Thiamine ، والكوانين Guanine، والسستيين L-Cysteine ، والسستين L Cystine، ونيكوتين أميد أدنين ثنائي النيكليوتيد (NAD) Nicotinamide Adenine Dinucleotide الذي يسمى V factor ، والدكستروز (Dextrose) . أما الأوساط الأنتقائية الأخرى فهي وسط أكار GC (GC-Lect Agar) مكوناته مماثلة لوسط أكار الجوكليت Chocolate agar . يعد وسط GC مصدراً للمغذيات النيتروجينية في شكل ببتون اللحم Meat Peptone ، وبيبتون الكازين Casein Peptone، وفوسفات البوتاسيوم Potassium Phosphate للحفاظ على الأس الهيدروجيني، ونشا الذرة لمعادلة الأحماض الدهنية السامة fatty acids التي يمكن أن تتواجد داخل الأكار (Sarenje et al., 2022). ووسط MTM إلا إنه يحتوي على مكملات غذائية تسمى أختصاراً 1% IsoVitaleX ، والوسط الآخر هو وسط مدينة نيويورك New York City (NYC) medium الذي يماثل أيضاً في مكوناته لوسط أكار GC إلا أنه يحتوي أيضاً على بعض المكملات الغذائية الأخرى التي تشمل بلازما الحصان horse plasma وهيموكلوبين الحصان horse haemoglobin وخمائر متحللة ذاتيا yeast autolysate . تحتوي الخميرة على حمض oxaloacetic acid الذي يتم تأييضه بوساطة *N. gonorrhoeae* لإنتاج كمية كافية من ثاني أكسيد الكربون لتحفيز نمو المكورات البنية

المحبة لغاز ثاني أكسيد الكربون Capnophilic gonococci. كما أن وجود التحلل الذاتي للخميرة يقلل من وقت طور التكيف lag phase وبالتالي يعزز حجم وعدد المستعمرات (WHO, 2003; Liao *et al.*, 2018; Thakur and Dillon, 2010). يتم حضن الأوساط الزرعية في ظروف تحتوي على 5% من ثاني أكسيد الكربون CO₂ بأستعمال الشمعة (candle jar) أو حاضنة CO₂ incubator عند 37 درجة مئوية. لتجنب نمو بكتريا أخرى، يحتوي الوسط الانتقائي على مضادات للميكروبات، مثل فانكوميسين Vancomycin بتركيز 3 ميكروغرام/ مل (يثبط البكتريا الموجبة لصبغة كرام Gram-positive bacteria)؛ كوليسيتين Colistin بتركيز 7.5 ميكروغرام/ مل (يثبط البكتريا السالبة لصبغة كرام Gram-negative bacteria)؛ 1 ميكروغرام/ مل أمفوتريسين (يثبط الفطريات كونه مضاد للفطريات antifungal agents أهمها المبيضات *Candida albicans*)؛ و 3 ميكروغرام/ مل ترايميثوبريم Trimethoprim (يثبط ظاهرة التموج لبكتريا المتقلبات *Proteus spp.* (swarming of *Proteus spp.*) (Unemo and Ison, 2013; Visser *et al.*, 2019)). إذا كان زرع العينات المباشر غير ممكناً، يجب وضع العينة في جهاز نقل زرع يحتوي على ثاني أكسيد الكربون CO₂-containing transport-culture system. يجب حضن الأوساط المزروعة عند 35-37 درجة مئوية ورطوبة عالية (70-80%) بوضع قطنة مبللة بالماء المقطر داخل الجار anaerobic jar بجانب الأطباق، ودرجة حموضة 6.75-7.5. تظهر المستعمرات رمادية صغيرة لامعة shiny gray colonies (Paris *et al.*, 2022). بعد مرور ثمانية وأربعين ساعة على الزرع، يمكن التعرف على البكتريا الحية بسرعة من خلال صبغ مسحة بكتيريير مصبوغة بصبغة كرام؛ وبإيجابية إختبار الأوكسيديز وعن طريق إختبار التجلط coagglutination أو استخدام التآلق المناعي immunofluorescence staining أو الاختبارات المختبرية الأخرى. يمكن أيضاً تحديد أنواع البكتيريا المزروعة عن طريق أكسدة كربوهيدرات معينة. كما يمكن لوقت التأين/ الامتصاص بالليزر بمساعدة المصفوفة لمقياس الطيف الكتلي الطافي Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

توفير التشخيص السريع (في نفس اليوم) للعزلات المزروعة (Xiu *et al.*, 2019; Isara and Baldeh,) (2021).

2-2-5-3 فحوصات تضخيم الحمض النووي (NAATs) Nucleic Acid Amplification Tests

تتوفر العديد من فحوصات تضخيم الحمض النووي التي تمت الموافقة عليها من قبل إدارة الغذاء والدواء (FDA) Food and Drug Administration للكشف المباشر عن *N. gonorrhoeae* في العينات البولية التناسلية (جدول 2-2) (Meyer and Buder, 2020). بشكل عام، تتمتع هذه الأختبارات بحساسية sensitivity (>95%) وخصوصية specificity (<99%) ممتازة في المجموعات السكانية عالية الانتشار التي تظهر عليها الأعراض المرضية (Buder *et al.* 2019). لا يُنصح باستخدام NAATs كاختبارات للشفاء cure لأن الحمض النووي قد يستمر بقاءه في عينات المريض لمدة تصل إلى 3 أسابيع بعد العلاج الناجح. من الأفضل إعادة تقييم المرضى الذين يُعتقد أنهم فشلوا في العلاج باستخدام الزراعة حتى يمكن اختبار مقاومة البكتيريا (Goggins *et al.*, 2020).

تستخدم طريقة تسلسل 16 S ribosomal RNA (16S rRNA) كأداة لتحديد البكتيريا إذ أنه يتواجد في جميع البكتيريا. يتكون جين *16S rRNA* من سلاسل نيوكليوتيدات محفوظة جيداً، تتخللها مناطق متغيرة خاصة بالجنس أو النوع. يمكن التعرف على البكتيريا عن طريق تحليل تسلسل النيوكليوتيدات لـ PCR ثم بمقارنة هذا التسلسل مع التسلسلات المعروفة المخزنة في قاعدة بيانات. يتم تطبيق هذه الطريقة للكشف عن جينات بكتيريا الناييسريا لكونها تحمل جين 16S rRNA كبقية أنواع البكتيريا (Jenkins *et al.*, 2012). أما تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي Real Time PCR أيضاً تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي quantitative PCR (qPCR) (لا يستخدم الاختصار RT PCR لأنه يدل على تفاعل البلمرة العكسي Reverse Transcription PCR) (جدول 2-2)، ويعرّف بأنه طريقة للكشف عن العوامل الجرثومية المختلفة وتحديد كميتها وتصنيفها في التشخيص السريري والبيطري وسلامة الغذاء (Kang, 2019). تم تطوير اختبارات

Real Time PCR على نطاق واسع في مختبرات الأحياء الدقيقة السريرية للتشخيص الروتيني للأمراض المعدية، وخاصة الأمراض البكتيرية، كما تسمح هذه الطريقة أيضاً بإجراء تقييم سريع لوجود جينات مقاومة للمضادات الحيوية أو طفرات جينية. تشمل معدات Real Time PCR بشكل أساسي من جهاز تدوير حراري Thermal Cycler مزود بمصدر ضوئي، ونظام وبرنامج للكشف عن التآلق Fluorescence Detection System and Software، والذي يقوم بإجراء التحليل الكمي للفلورة المكتشفة خلال التحليل. هذه الأدوات قادرة على اكتشاف أطوال موجية مختلفة في وقت واحد (Eyre *et al.*, 2019). تعتمد هذه التقنية على نفس مبدأ PCR التقليدي لكن الفرق هو قياس كمية الحمض النووي المضاعف خلال التفاعل مباشرة، يشتمل Real Time PCR على كل من التضخيم وكشف تآلق الحمض النووي المضخم في نفس الخطوة، يكون التآلق في الحلقات البدئية منخفض جداً حيث لا يمكن تمييزه. ومع ذلك فإن النقطة التي تزداد عندها شدة التآلق فوق المستوى القابل للاكتشاف تتوافق مع العدد الأولي لجزيئات الحمض النووي في العينة. تسمى هذه النقطة دورة القياس الكمي Cq (دائرة كمية Quantification Cycle) ويسمح بتحديد الكمية المطلقة للحمض النووي المستهدف في العينة وفقاً للسلسلة العيارية التي تم إنشاؤها (Kralik and Ricchi, 2017). هناك طريقتان رئيستان للكشف عن النواتج المضخمة في Real time PCR، الأولى باستخدام صبغة التآلق Fluorescent dye، والثانية باستخدام مسبار نقل طاقة الرنين المتآلفة Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) والتي ترتبط بشكل خاص بالحمض النووي المتضخم. تعد طريقة Real time PCR أسرع من PCR التقليدي حيث أن الخطوة التي تلي PCR غير ضرورية، مما يقلل من الوقت المستغرق لعملية التحليل وخطر التلوث بالأحماض النووية التي تم تضخيمها مسبقاً، لأنه لا توجد حاجة لمعالجة المنتجات التي تم تضخيمها بعد التفاعل، كما تتمتع بحساسية وانتقائية عالية، فضلاً عن إمكانية القياس الكمي للعينة الهدف بشكل لحظي، لكن يمكن أن يتم تثبيط عملية التضخيم عند تحليل العينات البيئية

بسبب وجود الملوثات، كما أنها لا تميز بين الخلايا الحية والميتة بل تقيس كليهما (Kralik and Ricchi,)

جدول 2-3. (2017; Kang, 2019, Yim *et al.*, 2021).

جدول 2-3: تقنيات تضخيم الحمض النووي (NAATs) المعتمدة من إدارة الغذاء والدواء الأمريكية

(FDA) للكشف عن النيسرية البنية ونوع النماذج السريرية المعتمدة في كل فحص

Assay (Company)	Ng Targets	Cleared Specimen Types
Abbott RealTime CT/NG (Abbott)	Opa gene	Women: urine, swabs (vaginal, endocervical) Men: urine, urethral swab
cobas CT/NG (Roche)	Two different targets in the DR 9 region	Women: urine, swabs (vaginal, endocervical) Men: urine
APTIMA Combo 2 Assay (Hologic)	16S-rRNA	urine swabs (vaginal, endocervical, urethral, rectal, pharyngeal)
BD MAX GC BD MAX CT/GC BD MAX CT/GC/TV	OpcA gene	urine (20-60mL of first morning urine recommended), swabs (vaginal endocervical)
BD ProbeTec Neisseria gonorrhoeae (GC) Qx Amplified DNA Assay	Pilin-gene inverting protein homologue	Women: urine, swabs (vaginal, endocervical) Men: urine, urethral swab
BDProbeTec ET Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae Amplified DNA Assays	Pilin-gene inverting protein homologue	Women: urine, endocervical swab Men: urine, urethral swab
Xpert CT/NG (Cepheid)	Two distinct chromosomal targets	urine swabs (vaginal, endocervical, rectal, pharyngeal)
binx io CT/NG Assay (binx health)	Not specified	vaginal swabs

(Fifer *et al.*, 2019)

2-2-5-4 الفحوصات المصلية Serology

يحتوي المصل والسوائل التناسلية على أجسام مضادة IgG و IgA ضد المكورات البنية، وبروتينات الغشاء الخارجي، و LPS. بعض IgM من الأمصال البشرية قاتل لبكتريا bactericidal المكورات البنية في المختبر In vitro (Bettoni *et al.*, 2021). في الأفراد المصابين، يمكن الكشف عن الأجسام المضادة لأهداب المكورات البنية gonococcal pili وبروتينات الغشاء الخارجي عن طريق اختبارات immunoblotting والتجلط المناعي والفحص المناعي الإشعاعي radioimmunoassay وإختبارات الادمزاز المناعي المرتبطة بالإنزيم (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). ومع ذلك، فإن هذه الاختبارات ليست مفيدة كأدوات مساعدة تشخيصية لعدة أسباب، بما في ذلك عدم تجانس مستضد المكورات البنية antigenic heterogeneity، والتأخير في تكوين الأجسام المضادة في العدوى الحادة، والمستوى العالي من الأجسام المضادة في الأفراد النشيطين جنسياً sexually active population (PHLN, 2022).

2-2-5-5 N. gonorrhoeae المناعة ضد

عدوى المكورات البنية المتكررة شائعة. لا يبدو أن المناعة الوقائية Protective immunity للأصابة تتطور مرة أخرى كجزء من عملية المرض، بسبب التنوع المستضدي للمكورات البنية. على الرغم من إمكانية تكون الأجسام المضادة، بما في ذلك IgA و IgG على الأسطح المخاطية، إلا أنها إما شديدة الخصوصية highly strain-specific أو لديها قدرة وقائية قليلة. بالنظر إلى المجموعة الواسعة من الغشاء المخاطي للمضيف الذي يمكن أن تصيبه *N. gonorrhoeae*، فليس من المستغرب أن تمتلك البكتيريا مجموعة من الجزيئات السطحية للسماح بدخول وغزو هذه الأنواع المختلفة من الأنسجة (Quillin and Seifert, 2018). فضلا عن إمتلاك *N. gonorrhoeae* قدرة غير عادية على الخضوع لكل من الطور phase والتغاير

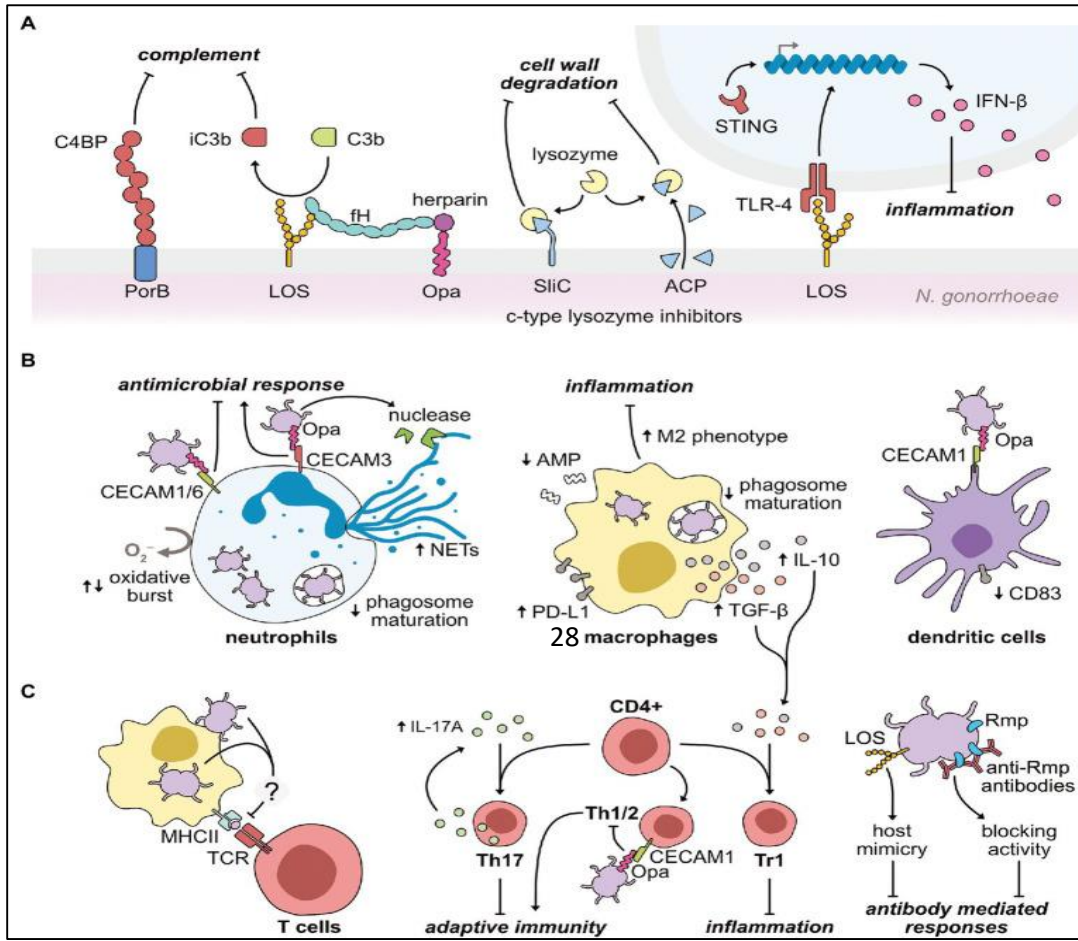
المستضدي antigenic variation لمولدات المضادات السطحية الأولية مع معدلات دوران عالية للغاية، أي تعرضه للطفرات الوراثية بشكل كبير. تفسر هذه الميزة للمكورات البنية جزئيًا سبب بقاء هذه البكتيريا كأحد مسببات الأمراض البشرية البارزة، إذ يصعب للغاية على جهاز المناعة البشري تطوير ذاكرة مناعية ضدها Immunological memory. تُعبر بكتريا السيلان الجنسي عن ثلاثة بروتينات غشائية خارجية أولية، وهي بروتين قناة أيون بورين (PorB)، والبروتينات المرتبطة بعنقود المستعمرة (Opa)، والبروتين القابل للتعديل الاختزالي (Rmp)؛ فضلًا عن نمطين جزيئيين رئيسيين مرتبطين بالعوامل المرضية - pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)، والسكريات الدهنية (LOS) والنوع الرابع للاهداب type IV pili (Cabeza-Cabrero *et al.*, 2021). على الرغم من الطبيعة المستقرة المستضدية PorB لسلالة معينة، فإن التباين الأليلي بين سلالات المكورات البنية شائع بين الأنماط النظرية (PorB isotypes) PorB ويحدث في الحلقات المكشوفة السطحية surface-exposed loops لجزيئات البورن porin. تحد آليات التهرب هذه من توليد استجابة مناعية واقية للمضيف، مما يترك المضيف أعزلاً ضد الإصابة مرة أخرى ويثبت صعوبة تطوير اللقاح (Zhu *et al.*, 2018). إن الفهم التفصيلي لآليات التهرب المناعي المعقدة هذه سوف يؤدي إلى تطوير تصميم اللقاح بشكل كبير، كما يتيح التعرف على أسباب العدوى غير المصحوبة بأعراض. آليات التحوير Modulation التي تمارسها *N. gonorrhoeae* على الاستجابة المناعية للمضيف أثناء الإصابة تتم كالتالي (Lenz and Dillard, 2018):

(A) تستخدم *N. gonorrhoeae* مستضدات الغشاء الخارجي الأولية للحد من فعالية أنزيم اللايسوزايم lysozyme والمتممة والتعرف على الأنماط Pattern recognition systems. يتفاعل PorB و LOS مع البروتينات المثبطة للمتممة القابلة للذوبان soluble complement inhibitory proteins، C4BP، والعامل factor H (fH)، على التوالي. يرتبط LOS أيضًا بالبروتين التكميلي القابل للذوبان، C3b، مما

يؤدي إلى تعطيله Inactivation C3b(iC3b). تتفاعل بروتينات Opa أيضاً مع هيبارين المضيف لتعزيز تعطيل C3b. تعبر البكتريا أيضاً عن اثنين من مثبطات اللايسوزايم المعرضين للسطح surface-exposed lysozyme inhibitors التي تسمى (ACP) adhesin complex protein و (SiIC) ، مما يمنع نشاط لايسوزايم المضيف عند الإصابة. في موازاة ذلك، يعمل تفاعل LOS مع مستقبل التعرف على الأنماط، TLR-4 ، على تنظيم التعبير عن السيتوكين المضاد للالتهابات، IFN- β (Garvin *et al.*, 2008).

(B) تقوم *N. gonorrhoeae* بتنشيط الوظائف المضادة للميكروبات للخلايا المستجيبة الطبيعية innate effector cells الرئيسية لتعزيز الإصابة. تتفاعل البكتريا مع مستقبلات CEACAM على الخلايا العدلة عبر بروتينات Opa لتنشيط (Opa-CEACAM1 و Opa-CEACAM6) أو تنشيط الاستجابات الالتهابية (Opa-CEACAM3) ، مثل الانفجار التأكسدي oxidative burst. يتم تنظيم مصائد الخلايا العدلة خارج الخلية Neutrophil extracellular traps (NETs) عن طريق الإصابة المكورات البنية، على الرغم من أن إفراز أنزيم Nuclease من المكورات قد يساعدها مقاومة عمل NET. في كل من خلايا العدلة والماكروفاج Macrophages، تكون البكتريا بارعة في تأخير نضج الجسم البلعمي phagosome maturation لإطالة البقاء داخل الخلايا. للحد من وظيفة الخلايا البلعمية على وجه التحديد، تعمل البكتريا على تقليل تنظيم تعبير الببتيد المضاد للميكروبات (AMP) Downregulates Antimicrobial Peptide ، مع تنظيم الجزيئات المثبطة للمناعة في نفس الوقت لتعزيز تكاثر الخلايا التنظيمية من النوع الأول T type 1 regulatory cell (Tr1). كجزء من إعادة البرمجة هذه، يتم إعادة برمجة reprogramming الخلايا البلعمية نحو النمط الظاهري M2 المضاد للالتهابات Inflammatory M2 phenotype. أخيراً، تتسبب تفاعلات Opa-CEACAM1 على الخلايا dendritic cells في تقليل تنظيم downregulation تكوين CD83.

(C) تعمل *N. gonorrhoeae* بشكل مباشر وغير مباشر على الجهاز المناعي التكيفي adaptive للمضيف لتقليل إنتاج الذاكرة المناعية. تفشل الخلايا البلعمية التي تواجه من قبل البكتريا في زيادة التعبير عن التوافق النسيجي الرئيسي من النوع الثاني (MHCII)، مما يحد من عرض المستضد الفعال لمستقبلات الخلايا التائية المعروفة T cell receptors (TCRs). بدلاً من ذلك، تقوم عدوى *N. gonorrhoeae* بتنظيم السيتوكين IL-17A ، موجهاً خلايا $CD4^+$ T نحو النمط الظاهري h17 ، وهو أقل قدرة على إحداث استجابة وقائية. تقلل تفاعلات Opa-CEACAM1 على خلايا Th1 / 2 من فعالية الاستجابة المناعية التكيفية. إلى جانب تثبيط المناعة التي تتوسطها الخلايا التائية، يتم أيضاً تقليل المناعة التي تتوسطها الخلايا البائية B cells أثناء الإصابة بالبكتريا. تعمل الأجسام المضادة التي يتم إنتاجها ضد بروتين Rmp على منع التأثيرات القاتلة للبكتريا من قبل الأجسام المضادة المنتشرة الأخرى. علاوة على ذلك، يحاكي جزيء LOS للمكورات البنية الهياكل المضيفة له، وبالتالي يقدم على أنه "ذاتي self" لجهاز المناعة كما في شكل 2-3.



الشكل 2-3: المناعة ضد *N. gonorrhoeae* (Walker et al., 2023)

يتم تنظيم دفاعات المضيف ضد البكتيريا المسببة للأمراض، بواسطة السيتوكينات التي تنتجها مجموعة متنوعة من الخلايا بما في ذلك الخلايا الليمفاوية، والخلايا البلعمية، والخلايا الظهارية. تختلف مستويات إنترلوكينات Interleukins مثل IL-1 و IL-6 و IL-8 و IL-10 وعامل النمو بيتا (TNF-β) في إفرازات المصل والجهاز التناسلي من النساء المصابات بالتهاب عنق الرحم بالمكورات *N. gonorrhoeae*. يحدث ارتفاع مستويات السيتوكينات في إفرازات الأعضاء التناسلية المصابة بالمكورات البنية بشكل ليس كبير مقارنة بالمرضى غير المصابين. تشير نتائج أبحاث علمية عديدة إلى أن *N. gonorrhoeae* تحفز استجابة مناعية محدودة للسيتوكينات والأجسام المضادة أثناء التهابات عنق الرحم غير المعقدة (Liu et al., 2023). تعد الخلايا الظهارية مصدرًا رئيسيًا لـ IL-6 و IL-8 التي

يتم إنتاجها خلال المراحل الحادة من إصابة الغشاء المخاطي. كما ثبت أن الخلايا الظهارية تنتج مجموعة متنوعة من السيتوكينات، بما في ذلك IL-1 و IL-6 و IL-8، استجابةً للبكتيريا الحية. ملف تعريف السيتوكين مشابه لذلك الذي تم اكتشافه أثناء عدوى الغشاء المخاطي ويختلف عن ذلك الذي تفرزه الضامة بسبب نقص تنشيط خلايا TNF- α و B وإنتاج الأجسام المضادة. يتشابه السيتوكين مع ما يتم اكتشافه أثناء الالتهابات المخاطية ويختلف عن ذلك الذي تفرزه الخلايا البلعمية بسبب نقص أو عدم تنشيط خلايا TNF- α (Tumor Necrosis Factor - α) وخلايا B cells وإنتاج الأجسام المضادة. فضلا عن ذلك، يشارك IL-1 و IL-6 و IL-8 في العديد من جوانب الالتهاب الموضعي Local والجهازي Systemic، بما في ذلك توسع الأوعية Vasodilation، وإنتاج البروستاغلاندين Prostaglandin، وتحفيز إنتاج بروتينات المرحلة الحادة acute-phase proteins، والأنجذاب الكيميائي chemotaxis لكريات البيض متعدد الأشكال Polymorphonuclear leukocytes (PMNs). لذلك، يمكن أن يكون إنتاج السيتوكين الموضعي بمثابة مؤشر على حالة الاستجابات المناعية والالتهابية أثناء التهابات الغشاء المخاطي (Ragland and Criss, 2019; Schlievert *et al.*, 2022).

6-2-2 العلاج Treatment

يتكون العلاج المنتشر في جميع أنحاء العالم من إصابة الجهاز البولي التناسلي عند الذكور والإناث من العلاج المزدوج بجرعة واحدة في العضلة أو في الوريد تبلغ 500 ملغم سيفترياكسون Ceftriaxone (Suay-García and Pérez-Gracia, 2018). على مدى العقود الأخيرة، ظهرت مقاومة لمعظم المضادات الحيوية التقليدية المستخدمة في علاج السيلان وازدادت في جميع أنحاء العالم. ومع ذلك، هناك اختلافات جغرافية geographical variations ملحوظة فيما يتعلق بمستويات المقاومة، ويجب تأكيد العلاج بالمضادات الحيوية بشكل مثالي من خلال المراقبة المحلية والوطنية والدولية للحساسية. تتمتع N.

gonorrhoeae بقدرة ملحوظة على تطوير المقاومة للمضادات الحيوية. تمتلك البكتريا مقاومة طبيعية لمضادات الميكروبات مثل الفانكوميسين والكوليسيتين وتريميثوبريم، مما يسمح بدمجها في الأوساط الانتقائية التي تستخدم لزراع العينات (Unemo *et al.*, 2019). تم تثبيت في العديد من البحوث العلمية عن مقاومة البكتريا للسلفانياميد Sulphanilamide في وقت مبكر من الأربعينيات، ومقاومة الكبتريا التتراسكلين في الثمانينيات، وأصبحت مقاومة الفلوروكينولون fluoroquinolone سائدة في مطلع الألفية. حاليًا، الجيل الثالث من السيفالوسبورينات هي المضادات الحيوية الموصى بها لعلاج التهابات المكورات البنية. تمتلك *N. gonorrhoeae* أيضًا مضخة تدفق Energy-Dependent Efflux Pump تعتمد على الطاقة مشفرة بوساطة موضع المقاومة المتعددة القابلة للتحويل (*mti*) multiple transferable resistance، يمكن لهذا النظام أن يضح بشكل فعال كلاً من الببتيدات المضادة للميكروبات antimicrobial peptides والمضادات الحيوية الكارهة للماء hydrophobic antibiotics من الجبلة المحيطة بالبكتريا periplasmic space (Hall *et al.*, 2019; Manoharan-Basil *et al.*, 2023). في عام 2023، تم الكشف في الولايات المتحدة عن أول عزلات من *N. gonorrhoeae* المقاوم للأدوية المتعددة (MDR) multidrug-resistant مع انخفاض الحساسية Cefixime، Azithromycin ومقاومة Ciprofloxacin والبنسلين Penicillin (Jennings and Krywko, 2023) Tetracycline

7-2-2 وبائية *N. gonorrhoeae* والوقاية والسيطرة

السيلان Gonorrhea منتشر في جميع أنحاء العالم. في الولايات المتحدة، ارتفع معدل حدوثه بشكل مطرد من عام 1955 حتى أواخر السبعينيات، عندما كان معدل الإصابة بين 400 و 500 حالة لكل 100.000 من السكان. بين عامي 1975 و 1997، كان هناك انخفاض بنسبة 74 % في معدل العدوى المبلغ عنها بالمكورات. بعد ذلك، استقرت المعدلات لمدة 10 سنوات وانخفضت من عام 2006 إلى عام 2009، ولكن منذ عام 2009، زادت المعدلات مرة أخرى بشكل طفيف كل عام. ينتقل السيلان حصرياً

عن طريق الاتصال الجنسي، غالبًا عن طريق النساء والرجال المصابين بعدوى بدون أعراض. تحدث إصابة البكتريا من التعرض الفردي لشريك جنسي مصاب هي 20-30% للرجال وحتى أكبر بالنسبة للنساء. يصعب تحديد الرقم العالمي الدقيق لـ *N. gonorrhoeae* بسبب نقص القدرة التشخيصية و أنظمة الإبلاغ في أجزاء كثيرة من العالم. لقد قدرت منظمة الصحة العالمية (WHO) معدل الإصابة بالعديد من الأمراض المنقولة جنسيًا (STIs) بين الأفراد الذين تتراوح أعمارهم بين (15 و 49) سنة استنادًا إلى بيانات من المناطق التي لديها أنظمة مراقبة جيدة قائمة على الحالات وكذلك بيانات من الدراسات المستندة إلى السكان. ففي عام 2020 ، كان تقدير *N. gonorrhoeae* هو 82.4 مليون حالة، وهو انخفاض طفيف عن عام 2016 ولكنه أعلى من الهدف المطلوب لتحقيق خفض بنسبة 90% في حدوث مرض السيلان بحلول عام 2030 (WHO, 2022). في عام 2021 ، كان مرض السيلان الجنسي في الولايات المتحدة الأمريكية لوحدها ثاني أكثر الأمراض المنقولة جنسيًا التي يتم الإبلاغ عنها، حيث تم تسجيل 710151 حالة (CDC, 2023). تراوح انتشار *N. gonorrhoeae* أثناء الحمل من 1.5% في غرب ووسط أفريقيا إلى 4.9% في شرق وجنوب أفريقيا. يمكن تقليل معدل العدوى عن طريق تجنب الشركاء الجنسيين المتعددين، والقضاء السريع على المكورات gonococci من الأفراد المصابين من خلال التشخيص والعلاج المبكر، وعن طريق إيجاد الحالات والمخالطين من خلال التنقيف وفحص السكان المعرضين لمخاطر عالية. توفر الوقاية الميكانيكية (الواقي الذكري) prophylaxis (condoms) حماية جزئية. بينما توفر المضادات الحيوية حماية محدودة بسبب ارتفاع مقاومة المضادات الحيوية للمكورات (Unemo et al., 2019; La Fauci et al., 2022).

2-3 بكتريا العصيات اللبنية *Lactobacillus spp*

2-3-1 الصفات العامة لبكتريا

تعد العصيات اللبنية *Lactobacilli* عصيات موجبة لصبغة كرام Gram positive bacilli وغير قادرة على تكوين السبورات non-spore forming. كما تعد بكتريا العصيات اللبنية مخمرة للعديد من السكريات، لاهوائية اختيارية facultative anaerobic، محبة للحامضية acidophilus، وتحتاج متطلبات غذائية معقدة مثل الكربوهيدرات Carbohydrates والأحماض الأمينية amino acids والبيبتيدات peptides وإسترات الأحماض الدهنية Esters of fatty acids والأملاح Salts ومشتقات الاحماض النووية derivatives of nucleic acids والفيتامينات Vitamins (Hemmes *et al.*, 2014; Estrada- *García et al.*, 2023).

تستقلب العصيات اللبنية الكربوهيدرات لإنتاج حمض اللاكتيك Lactic acid مما يجعلها أكبر جنس ضمن مجموعة بكتيريا حمض اللاكتيك. تم إعادة تصنيف أنواع العصيات اللبنية التي تقع ضمن عائلة الملبنات Lactobacillaceae إلى 25 جنسًا (بما في ذلك 23 جنسًا جديدًا) نظرًا لاحتوائها على تنوع جيني Genetic diversity وظاهري phenotypic وبيئي environmental مرتفع للغاية (Ibrahim, 2016; Gao *et al.*, 2022). تم تقسيم الأنواع العائدة الى جنس *Lactobacillus* والتي عددها 47 نوعا إلى ثلاث مجموعات على أساس التمثيل الغذائي. تعد *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) من مجموعة التخمير المتجانسة homofermentative التي تخمر الكربوهيدرات وتنتج حمض اللاكتيك كمنتج رئيس، حمض اللاكتيك بدوره يمنع نمو الكائنات المجهرية الأخرى في بعض مناطق جسم الانسان أهمها المهبل لأن الحامض يقلل من درجة حموضة pH الوسط (Zheng *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2021). أما مجموعة التخمير المتغايرة heterofermentative الاختيارية فإنه تحت ظل ظروف معينة أو مع مواد

مساعدة محددة تخمر الكربوهيدرات لإنتاج حمض اللاكتيك، الإيثانول/ حمض الخليك Acetic acid وثاني أكسيد الكربون CO₂ كمنتجات ثانوية *Lactobacillus fermentum* (Zheng *et al.*, 2020).

استعمرت العصيات اللبنية مناطق متعددة من جسم الإنسان، أبرزها الجهاز الهضمي بما في ذلك تجويف الفم والجهاز التناسلي للأنثى. العلاقة بين العصيات اللبنية والبشر هي علاقة تبادلية، إذ تقدم المساعدة للمضيف في هضم مواد غذائية معينة كالكاربوهيدرات، وكذلك الحماية من مسببات الأمراض مقابل الإقامة والحصول على المغذيات المهمة لبقاءها حية (Matos and Leulier, 2014; Heeney *et al.*, 2018).

ومن اللافت للنظر أنه من أجل تحديد لا لبس فيه لنوع من جنس *Lactobacillus* لا يكفي دائماً استخدام الطرق التقليدية (الاختبارات الفسيولوجية). من الواضح أن تحليلات الحمض النووي الريبوزي منقوص الأكسجين (Deoxyribonucleic acid (DNA) أو الحمض النووي الريبوزي (Ribonucleic acid (RNA) يكون بواسطة (التهجين Hybridization أو التسلسل Sequencing) هو أساس التصنيف المنهجي. يمكن تطبيق فحوصات الحمض النووي الريباسي المستهدفة لتحديد أنواع العصيات اللبنية (Huang *et al.*, 2021).

2-4 العلاقة بين الناييسريا البنية وبكتريا العصيات اللبنية الحمضية

The relationship between *Neisseria gonorrhoeae* and *Lactobacillus spp*

العصيات اللبنية وهي البكتيريا اللاهوائية الأكثر شيوعاً في المهبل وباطن عنق الرحم endocervix، والتي تلعب دوراً مهماً في الحفاظ على النظام البيئي الطبيعي للمهبل vaginal ecosystem من خلال إنتاج الأحماض العضوية والبكتريوسينات bacteriocins وبيروكسيد الهيدروجين (H₂O₂) hydrogen peroxide، وكلها قد تحميها من الممرضات Pathogens. من بين العدوى التي تثبط *Neisseria gonorrhoeae* في المختبر *in vitro* هي العصيات اللبنية، إذ تقوم *Lactobacillus spp* بتثبيط *N. gonorrhoeae* فيقل أو يمنع إلتصاقها بالخلايا الطلائية للمهبل (Tachedjian *et al.*, 2017; Edwards *et al.*, 2019; Tuddenham *et al.*, 2021).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3- المواد وطرائق العمل Materials and Method

3-1 المواد Materials

جميع الأجهزة والمواد المستخدمة والمواد والأوساط الزرعية واقراص المضادات مدرجة في جدول 3-1

3-1-1 الأجهزة والأدوات Equipment and Apparatus

جدول (3-1): الأجهزة والأدوات المختبرية المستعملة في الدراسة الحالية

ت	الجهاز	الشركة المصنعة	المنشأ
1	كابينة الـ PCR	Aura™ PCR cabinet	Italy
2	مؤصدة	Autoclave	UK
3	جهاز قراءة الـ الـ الـ الذاتي	Automatic ELISA Reader	Italy
4	ميزان	Balance	Germany
5	ماصات دقيقة متغيرة الاحجام	BioPette™ variable volume	USA
6	جهاز الطرد المركزي	Centrifuge	England
7	مسحات قطنية	Cotton Swabs	Jordan
8	كاميرا رقمية	Digital Camera	Japan
9	جهاز تقطير	Distillator	Germany
10	حاضنة	Thermostatic Incubator	Chania
11		SaCycler-96 Real-Time PCR SYSTEM	Italy
12	فرن الهواء الساخن	Hot Air Oven	England
13	جهاز الـ الـ الـ (ELISA)	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	USA
14	جهاز تصوير الهلام	Gel Documentation Unit	USA
15	مسخن حراري ممغنط	Hot Plate-Magnetic Stirrer and Bar	UK
16	حاضنة	Incubator	China
17	كابينة الزرع	Laminar Flow Clean Bench	Korea
18	مجهر ضوئي	Light Microscope	Germany
19	ناقل	Loop	India
20	أنابيب مكفر لاند	Mcrland Tubes no.5	France
21	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة	Micropipettes	Germany
22	جهاز الطرد المركزي الصغير عالي السرعة		Germany

		Microspin 12, High Speed Minicentrifuge	
Denmark	Nunc	Microtiter Plates 96 Well	الصفحة العيارية التي تحوي 96 حفرة
Spain	GEMA	Millipore Filter	مرشحات دقيقة الثقوب
Korea	AcTgene	Nanodrop Spectrophotometer	مقياس الضوء الطيفي
Jordan	APCO	Petri Dishes	اطباق بتري
USA	Martini	pH Meter	مقياس الرقم الهيدروجيني
Jordan	APCO	Plane Tubes	انابيب لا تحتوي مضادات تخثر الدم
Japan	Hitachi	Refrigerator	ثلاجة
Germany	Denver	Sensitive Electric Balance	ميزان كهربائي حساس
USA	Labnet	Thermal Cycler	جهاز التدوير الحراري
France	Vilber lourmat	UV Transmission	جهاز انتقال الأشعة فوق البنفسجية
France	Bio-Mexieux	Vitek 2 Apparatus System	جهاز الفايك 2
Brazil	FAWEM	Vortex	جهاز المازج
England	Gallenkamp	Water Bath	حمام مائي

2-1-3 المواد الكيميائية والصبغات Chemical Materials and Stains جدول (2-3): المواد

الكيميائية والصبغات المستعملة في الدراسة الحالية

ت	المواد	الشركة المصنعة	المنشأ
1.	كحول الأيثانول 70%، 95%	BDH	England
2.	بيروكسيد الهيدروجين	BDH	England
3.	حامض الكبريتيك	BDH	England
4.	دم بشري	Blood bank at Medical City Hospital	Bagdad- Iraq
5.	زيت السدر	BDH	England
6.	صبغة كرام (صبغة البلورات البنفسجية، ايودين، الكحول الايثيلي، صبغة السفرانين) Gram Stain (Crystal Violet, Iodine, Ethanol, Safranin)	RBIO	Switzerland
7.	كاشف الاوكسيديز Oxidase Indicator (N, N, N', N'-Tetramethyl-p- (Phenylenediamine Dihydrochloride)	BDH	England

England	Hayman	Absolute Ethanol	كحول الكحول الأيثانول المطلق	8.
England	BDH	BaCl ₂ .2H ₂ O	كلوريد الباريوم المائي	9.
German	Schuchard	NaCl	كلوريد الصوديوم	10
England	BDH	Glycerol	كليسيرول	11
India	CDH	Potassium Hydroxide (KOH)	هيدروكسيد البوتاسيوم	12
UK	Oxoid	Hemoglobin Soluble Powder مسحوق	الهيموكلوبين	13

3-1-3 الأوساط الزرعية Culture Media

جدول (3-3): الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة الحالية

ت	أسم الوسط الزرعى Culture medium	الشركة المصنعة	المنشأ
1	اكار الدم Blood Agar Base	Oxoid	England
2	اكار الماكونكي MacConkey Agar	Himedia	India
3	اكار مولر - هنتون Muller – Hinton Agar	Oxoid	England
4	الاکار المغذي Nutrient Agar	Himedia	India
5	اكار ال عصبیات اللبنية Lactobacilli MRS Agar (De Man, Rogosa and Sharpe)	Himedia	India
6	اكار اليوريا Urea Agar	Himedia	India
7	اكار ايوسين مثلين الازرق Eosin Methylen Blue Agar	Oxoid	England
8	اكار تربتون الصويا Tryptic Soy Agar	Oxoid	England
9	مرق نقيع القلب - الدماغ Broth Brain-Heart Infusion	Himedia	India
10	المرق المغذي Nutrient Broth	Oxoid	England
11	أكار الجوكليت Chocolate agar	Oxoid	England
12	أكار ثاير مارتن Thayer–Martin agar	Oxoid	England

3-1-4 أقراص المضادات الحيوية Antibiotic Discs

استخدمت أقراص المضادات الحيوية المصنعة من قبل الشركة التركبية Bioanalyse

جدول (3-4): أقراص المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة الحالية

قطر التثبيط بالمليمتر (mm)			تركيز المضاد في القرص (مايكروكرام/ قرص)	الرمز	أسم المضاد الحيوي	ت
Resistant مقاوم (R)	Intermediate متوسط الحساسية (I)	Sensitive حساس (S)				
≤ 14	15-16	≥ 17	10	AK	Amikacin	1
≤ 13	14-17	≥ 18	15	AZM	Azithromycin	2
≤ 14	15-17	≥ 18	30	CAZ	Ceftazidime	3
≤ 14	15-19	≥ 20	10	CRO	Ceftriaxone	4
≤ 15	16-20	≥ 21	10	CIP	Ciprofloxacin	5
≤ 12	13-14	≥ 15	10	CN	Gentamicin	6
≤ 15	16-18	≥ 19	5	LEV	Levofloxacin	7
≤ 14	15-18	≥ 19	10	TE	Tetracycline	8
≤ 15	16-18	≥ 19	10	TOB	Tobramycin	9
≤ 15	16-18	≥ 19	5	VA	Vancomycin	10

(CLSI, 2018)

3-1-5 المواد والمعدات المستخدمة في قياس الأنترلوكينات

استخدمت المواد والمعدات المدرج في الجداول (3-5 و 3-6 و 3-7) لقياس انترلوكين 6 و 8 و 10

جدول 3-5 المواد والمعدات المستخدمة لقياس انترلوكين 6

المكونات	Components
المحلول القياسى الأساس	Standard Solution (640ng/L)
الصفحة الدقيقة (96 حفرة)	Pre-coated ELISA Plate
محلول تخفيف المادة القياسية	Standard Diluent
أنزيم البيروكسيدز المرتبط مع أفيدين	Streptavidin-HRP
محلول الايقاف	Stop Solution
محلول المادة الأساس أو الركيزة A	Substrate Solution A
محلول المادة الأساس أو الركيزة B	Substrate Solution B
دارىء الغسيل المركز	Wash Buffer Concentrate (25x)
الجسم المضاد المرتبط مع البيوتين	Biotinylated human IL-6 Antibody

جدول 3-6 المواد والمعدات المستخدمة في الأختبار لقياس انترلوكين 8

المكونات	Components
المحلول القياسى الأساس	Standard Solution (1280ng/L)
الصفحة الدقيقة (96 حفرة)	Pre-coated ELISA Plate
محلول تخفيف المادة القياسية	Standard Diluent
أنزيم البيروكسيدز المرتبط مع أفيدين	Streptavidin-HRP
محلول الايقاف	Stop Solution
محلول المادة الأساس أو الركيزة A	Substrate Solution A
محلول المادة الأساس أو الركيزة B	Substrate Solution B
دارىء الغسيل المركز	Wash Buffer Concentrate (25x)
الجسم المضاد المرتبط مع البيوتين	Biotinylated human IL-8 Antibody

جدول 7-3 المواد والمعدات المستخدمة في الأختبار لقياس انترلوكين 10

المكونات	Components
المحلول القياسى الأساس	Standard Solution (1600pg/ml)
الصفحة الدقيقة (96 حفرة)	Pre-coated ELISA Plate
محلول تخفيف المادة القياسية	Standard Diluent
أنزيم البيروكسيدز المرتبط مع أفيدين	Streptavidin-HRP
محلول الايقاف	Stop Solution
محلول المادة الأساس أو الركيزة A	Substrate Solution A
محلول المادة الأساس أو الركيزة B	Substrate Solution B
دارىء الغسيل المركز	Wash Buffer Concentrate (25x)
الجسم المضاد المرتبط مع البيوتين	Biotinylated human IL-10 Antibody

6-1-3 تسلسلات البوادي للكشف عن الجينات المدروسة Primer sequences

استخدمت في هذه الدراسة البرايمرات المشار اليها في الجدول 8-3 .

جدول 8-3: تسلسلات بوادي الجينات المستعملة في الدراسة الحالية

Primer	Sequence	Primer sequence 5' - - 3'	Tm (°C)	GC %	MW PP
<i>Opa gene</i>	F	CGG TGC TTC ATC ACC TTA G CGG TGC TTC ATCACC TTA G	57.9	53	255
	R	GGATTC ATT TTC GGC TCC TT	57.9	45	
<i>PorA</i>	F	CCG GAA CTG GTT TCA TCT GAT T CCG GAAC T G GTT TCA TCT GAT T	60.1	45	742
	R	GTT TCAGCG GCA GCA TTC A	60.2	53	
16S rRNA	F	TAT CGG AAC GTA CCG GGT AGC	63.4	57	1500
	R	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA	66.1	62	
<i>TfpC</i> البرايمر صمم لهذه الدراسة	F	CTCCGCAGCGTGGTATTGATT	61.5	52	160
	R	AACGTCCAAACTACACGGTCG	61.9	52	

*Tm: Melting Temperature

2-3 طرائق العمل Methods

1-2-3 تحضير الكواشف والمحاليل والايوساط الزرعية

1-1-2-3 تحضير الكواشف والمحاليل

1- كاشف الكاتاليز Catalase Reagent

حضر كاشف بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3% في قنينة معقمة معتمدة. أُستعمل الكاشف للكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم الكاتاليز (Tadesse and Alem, 2006).

2- كاشف إنزيم الاوكسيديز Oxidase Reagent

حُضِر الكاشف بأذابة 0.1 غم من مادة "N, N, N', N'- Tetramethyl – p-Phenylenediamine Dihydrochloride" في 10 مل من الماء المقطر المعقم ووضِع في قنينة معقمة معتمدة، وحُفِظ في مكان مظلم في درجة حرارة الغرفة. أُستعمل الكاشف لمعرفة العزلات البكتيرية التي لها القدرة على إنتاج إنزيم الأوكسيديز (Tadesse and Alem, 2006).

3- محلول العكورة ماكفرلاند القياسي McFarland Standard

حُضِر في المختبر بالطريقة التالية (Vandepitte *et al.*, 2003):

المحلول (أ): أذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم المائي $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ في 100 مل من الماء المقطر المعقم.

المحلول (ب): أذيب 1 مل من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 لـ 99 مل الماء المقطر المعقم.

أضيف 0.5 مل من المحلول (أ) إلى 99.5 مل من المحلول (ب) للحصول على محلول عكر بتركيز (10×1.5) خلية/مل، ومُزَج المحلولين جيداً في عبوة زجاجية معتمدة ومحكمة الإغلاق لمنعها من التبخر، وحُزِنَت في مكان مظلم لحين الاستعمال.

4- المحلول الملحي الفسيولوجي (0.85%) Normal Saline Solution

من أجل تحضير المحلول الفسيولوجي، تم إذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم NaCl في حجم معين من الماء المقطر وأُكمل إلى 100 مل بالماء المقطر المعقم، ثم عُقم باستخدام المؤصدة Autoclave عند درجة حرارة 121 م° وبضغط 15 باوند/ انج² لمدة 15 دقيقة. حُزِنَ المحلول بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستخدام، حضر المحلول (Brown and Smith, 2005).

5- صبغة كرام Gram Stain

أُستخدِمت صبغة كرام حسب تعليمات الشركة المنتجة (Integrated DNA Technologies company; IDT, Canada) للكشف عن شكل وتجمع الخلايا البكتيرية وتقبلها للصبغة بأستعمال المجهر الضوئي المركب Compound light microscope تحت العدسة الزيتية 100X

تكشف المسحات البكتيرية المصبوغة بصبغة كرام Gram stain لإفرازات الأليل أو عنق الرحم urethral or endocervical exudates عن العديد من المكورات الثنائية داخل خلايا القيح (Unemo *et al.*, 2019). عند التكبير العالي للمجهر الضوئي الأعتيادي (1000 ×) بأستعمال العدسة الزيتية، يتم البحث عن المواقع الغنية بالكريات البيض. النمط النموذجي لبكتريا *N. gonorrhoeae* هو المكورات المزدوجة، متواجدة داخل الخلايا البيض PMNs أو خارجها، سالبة لصبغة كرام (Mensforth *et al.*, 2018)

2-1-2-3 تحضير الأوساط الزرعية (Preparation of Culture Media)

1-2-1-2-3 الأوساط آنية التحضير (Readymade Media)

حُضِرَت الأوساط الزرعية سابقة الذكر الموجودة في الجدول 3-3 تبعاً لتعليمات الشركة المجهزة للأوساط الزرعية. عَقمت هذه الأوساط بجهاز المؤصدة عند درجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/ انج² لمدة 15 دقيقة، وتركت حتى تبرد إلى درجة 45 م°، ثم سكبت في أطباق بتري معقمة، وحُضنت عند درجة 37 م° لمدة 24 ساعة من أجل التأكد من عقامتها. وخزنت بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال.

2-2-3 جمع العينات Collection of specimens

جمعت مائة وسبعون عينة (مسحة مهبل Vaginal swab) من مريضات مصابات بإفرازات مهبلية والتي قد تكون مائية في مظهرها وخضراء اللون أو صفراء اللون، ألم أو حرقان عند التبول، وبعضهن كُن يعانين من ألم في منطقة أسفل البطن ونزيف من الرحم إثناء فترة الطمث. جمعت العينات من النساء الوافدات إلى مستشفى العمارة العام في محافظة ميسان، تراوحت أعمارهن بين 20-50 سنة، ضمن الفترة من 10-28 2022 إلى 15-3-2023، وضعت جميع المسحات في الوسط الناقل ونقلت مباشرة إلى المختبر في صندوق مبرد لغرض تشخيص وعزل بكتريا *L. spp* و *N. gonorrhoeae*.

3-2-3 تشخيص العزلات البكتيرية

1-3-2-3 الفحص المظهري

استخدمت الأوساط الزرعية الانتقائية والغنية (اكار الدم واكار ماكونكي وأكار الجوكليت وأكار العصيات اللبنية Lactobacilli MRS وأكار ثاير - مارتن المحور) من أجل دراسة الأنماط المظهرية لبكتريا *N. gonorrhoeae* و *Lactobacillus spp* مثل شكل ولون وحجم ورائحة المستعمرات فضلاً عن قابليتها في تحلل الدم إن وجد (Baron et al., 2007; Rajamanikandan et al., 2022).

3-2-3 الفحص المجهرى

أجرى الفحص المجهرى كالتالى:

A. المسحة المباشرة direct smear: أجريت مسحة مباشرة من الإفرازات الموجودة في المسحات المهبلية، وجففت بالهواء وثبتت على النار، ثم صبغت بصبغة كرام لملاحظة وجود بكتريا *N. gonorrhoeae* داخل وخارج خلايا PMN وكذلك لمعرفة وجود وعدد بكتريا *L. acidophilus* (McLaughlin and Griffiss, 2019).

B. المسحة البكتيرية الجافة Dry bacterial smear: استخدمت صبغة كرام للكشف عن بكتريا *Lactobacillus. spp* و *N. gonorrhoeae* التي عزلت على الأوساط الزرعية. حيث تم وضع قطرة ماء مقطر عن طريق ناقل بكتيري مبرد ومعقم فوق شريحة زجاجية نظفة مسبقاً بوساطة 70% من الكحول، ثم مزجت مع مستعمرة بكتيرية معزولة Isolated Colony، وتركت إلى أن جفت بدرجة حرارة الغرفة، بعد ذلك تم تثبيت البكتريا التي وضعت على الشريحة الزجاجية Slide وتثبيتها وذلك بتمريرها 3 مرات على لهب مصباح بنزن. صبغت المسحة البكتيرية الجافة باستعمال صبغة كرام ثم فحصت باستخدام العدسة الزيتية 100X (Baron et al., 2007).

3-3-2-3 الاختبارات البايوكيميائية (Biochemical Tests)

أجريت الاختبارات البايوكيميائية التالية لتشخيص عزلات بكتريا *Lactobacillus. spp* و *N. gonorrhoeae*:

3-3-2-3-1 إختبار الكاتاليز (Catalase Test)

تم تحضير كاشف الكاتاليز (3% H₂O₂) تبعاً لما ذكر في الفقرة (3-2-3-1) من تحضير الكواشف. إذ أضيفت عدة قطرات من هذا الكاشف على شريحة زجاجية معقمة بوساطة 70% إيثانول وخلطت

معها مستعمرة مفردة من البكتريا النامية على وسط الاكار المغذي بوساطة ناقل بكتيري Loop معقم ومبرد أو باستعمال عيدان خشبية Wooden Stick. تم اعتبار الاختبار ايجابياً في حال تحرر فقاعات غاز الأوكسجين O_2 مما يدل على نشاط إنزيم الكاتاليز (Collee *et al.*, 1996).

3-2-3-2 إختبار الاوكسيديز (Oxidase Test)

أستخدمت كاشف إنزيم الأوكسيديز تبعاً لما ذكر في الفقرة (3-2-3-1) من تحضير الكواشف. إذ أضيفت عدة قطرات من الكاشف على ورق الترشيح filter paper وخط معه مستعمرة مفردة من البكتريا بوساطة عيدان خشبية أو ناقل بكتيري تم تعقيمه وتبريده مسبقاً، يعد الاختبار إيجابياً عند تكون اللون البنفسجي والذي يظهر بعد (10-30) ثانية وهذا مايشير إلى قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الاوكسيديز وفقاً للمرجع (Prescott and Harley, 2002).

3-3-3-2 إختبار الحركة (Motility Test)

حضرت الأنابيب التي تحوي وسط إختبار الحركة وفقاً لما ذكر في الفقرة (3-2-3-1) من تحضير الأوساط الزرعية. أخذت مستعمرة بكتيرية مفردة وطعن مركز الوسط باستعمال أبرة الناقل البكتيري والمعقم والمبرد، تم حضنت هذه الأنابيب لمدة 18-24 ساعة بدرجة حرارة 37 م°. في حال كان الاختبار إيجابياً أي البكتريا متحركة فسوف تتوزع حول خط الطعن (Collee *et al.*, 1996).

3-2-4 حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

3-2-4-1 تحضير العالق البكتيري

حضر العالق البكتيري وذلك بخلط المستعمرات البكتيرية لعزلات بكتريا بعزلات بكتريا *L. acidophilus* و *N. gonorrhoeae* (التي نميت على وسط الاكار المغذي لمدة 18-24 ساعة بدرجة حرارة 37 م° مع 5 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي المعقم بتركيز 0.85% ضمن أنبوب (Morello *et al.*, 2004)

3-2-4-2 طريقة تحضير العالق البكتيري ومقارنته مع محلول مكفرلاند القياسي

1- تحضير محلول مكفرلاند العياري (من كلوريد الباريوم المائي 1% ومحلول حامض الكبريتيك 1%) كما ذكر في الفقرة (3-2-4-1).

2- مزج كلوريد الباريوم وحامض الكبريتيك كما ورد في الجدول 3-9.

3- وضع الخليط الناتج ضمن أنابيب محكمة الإغلاق.

4- خزنت الأنابيب التي تحوي محلول مكفرلاند العياري بدرجة حرارة الغرفة (25م°) إلى وقت الاستخدام.

يجب تحريك أو رجّ الأنبوب قبل كل استخدام لمنع ترسب أو تكتل محلول مكفرلاند العياري مع الوقت.

5- قورنت العكورة بشكل بصري بوساطة مقارنة العالق البكتيري مع أنابيب محلول مكفرلاند العياري (حيث

استخدمت أنابيب مكفرلاند ذو الكثافة 0.5 لكي نحصل على 1.5×10^8 وحدة مكونة للمستعمرة/ مل (CFU/

mL) (Cockerill *et al.*, 2012).

جدول 3-9 : كثافة العد التقريبي للخلايا ومحلول مكفر لاند القياسي

McFarland Standard	1% BaCl ₂ (mL)	1% H ₂ SO ₄ (mL)	Approximate cell count Density (X10 ⁸ cells)
0.5	0.05	9.95	1.5 X 10 ⁸
1.0	0.1	9.9	3.0 X 10 ⁸
2.0	0.2	9.8	6.0 X 10 ⁸
3.0	0.3	9.7	9.0 X 10 ⁸
4.0	0.4	9.6	12.0 X 10 ⁸

3-4-2-3 إختبار حساسية ومقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية

إجريت طريقة كيربي - باير Kirby-Bauer المحورة (طريقة إنتشار القرص Disk Diffusion Method)

تبعاً للمرجع (Morello *et al.*, 2004) لإختبار مقاومة وحساسية بعزلات بكتريا *L. acidophilus* و *N.*

gonorrhoeae في الدراسة الحالية وكما يأتي:

1- لفتحت الأطباق الحاوية على وسط مولر - هنتون اكار بوساطة مسحات قطنية Swabs بعد غمرها في اللقاح البكتيري.

2- تُركت الأطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة لفترة لا تزيد عن دقيقة واحدة.

3- وضعت أقراص المضادات الحيوية وثبتت بوساطة ملقط معقم على سطح الوسط وضغطت بشكل خفيف.

4- حضنت أوساط الزرع لمدة 18-24 ساعة عند درجة 37م°، قيست أقطار التثبيط في حال وجودها حول

كل قرص مضاد حيوي بوساطة مسطرة بالمليمتر، تظهر النتائج على أن البكتريا إما مقاومة Resistant

(R) أو متوسطة الحساسية (I) Intermediate أو حساسة للمضادات الحيوية (S) Sensitive وتقرن

النتائج مع منطقة التثبيط العيارية Standard Inhibition Zone وذلك حسب الجدول (3-4) (CLSI,)

(2018).

3-2-4-4 تأكيد التشخيص باستعمال نظام التشخيص Compact system VITEK 2

اعتمد على طريقة (Harvey *et al.*, 2013) من حيث اختيار عدد عزلات بكتيرية لأجناس مختلفة، إذ استُعملت عدة التشخيص VITEK 2، وذلك لتعزيز التأكد من عملية تشخيص العزلات وصولاً إلى مستوى النوع، وفي هذا النظام يتطلب الأمر أن يكون العالق البكتيري قد حُضر من العينات المزروعة، ثم تم وضع هذا العالق في أنبوبة اللقاح Inoculum tube، بعدها نُقل هذا العالق آلياً إلى البطاقة المتضمنة حوالي (65) اختباراً كيموحيوياً، إذ حُضنت هذه البطاقة في ظروف مُسيطر عليها حرارياً، وإن الفعاليات الأيضية للبكتريا تسبب تغيرات للألوان في البطاقة، إذ قيست التغيرات بشكل متقطع كل (15) دقيقة بوساطة مقياس شدة الضوء Densitometer، حُللت بعد ذلك المعلومات و خزنت وطبعت بشكل آلي ولشرح الطريقة بصورة أكثر تفصيلاً حسب الشركة المصنعة للجهاز Biomerieux وعلى النحو الآتي:

1. تحضير العالق Suspension preparation

حُضر العالق في البداية ثم حُضرت الانابيب البلاستيكية المعقمة، وتم بعدها اضافة 3 مل من المحلول الملحي من كلوريد الصوديوم NaCl، وبعدها نُقلت مستعمرة نقية واحدة من الطبق الى الانبوب باستخدام ناقل معقم وتم مزجه جيداً إلى أن ظهرت العكورة Turbidity في المحلول، ثم استخدم جهاز DensiCheck مع جهاز الفايتك لقياس عكورة المحلول.

2. تلقيح البطاقة Inoculation of Card

نُقلت البطاقة والعالق الى الحامل في الجهاز ووضعت في المكان المخصص لها ثم تم رُبط العالق مع البطاقة بقناة توصيل دقيقة وبعدها أُدخِلَ الرقم التسلسلي للبطاقة عن طريق ماسح ضوئي Scanner في الجهاز، ثم وضع الحامل في غرفة مفرغة من الهواء Vacuum Chamber وبانعدام الهواء سيتم تسهيل نقل العالق الى الحفر المتعددة في البطاقة.

3. ختم البطاقة وحننها Card Sealing and Incubation

قُطعت قناة التوصيل بشكل آلي خلال 10-15 دقيقة وخُتمت البطاقة لكي يتم منع حصول التسرب من ثم تنتقل البطاقة الى الحاضنة وتحضن عند (35م).
من ثم تنتقل البطاقة الى الحاضنة وتحضن عند (35م).

4. النظام البصري Optical System

يعمل هذا النظام على توجيه عدد من الحزم الضوئية Optical beams باتجاه البطاقة وبهذا سيتم التعرف على الاطوال الموجية Wavelengths للتفاعلات الحاصلة وتمت ترجمتها بالاعتماد على التغييرات اللونية والعكورة ونواتج الايض.

5. نتائج الاختبار Test Results

تظهر النتائج على شاشة الجهاز بشكل (+) و (-) دلالة على ايجابية وسلبية الاختبار مع مقارنتها بالنتائج المخزونة في ذاكرة الجهاز ولعدد كبير من الانواع البكتيرية.

6. مستوى التشخيص Identification level

أعطيت البكتريا المشخصة نسبة احتمالية ومستوى ثقة من خلال خارطة اختبارات تشخيصية بالجهاز.

3-2-5 قياس الأنتريوكينات

3-2-5-1 قياس أنتريوكين 6 و 8 و 10

تم إستعمال العدة التشخيصية Human Interleukin 6,8 and 10 ELISA KIT المجهزة من شركة

Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China

1. التحضيرات قبل البدء بالاختبار Preparation prior to pipetting

1. داريء الغسيل Wash Buffer: تم تدفئة القنينة في درجة حرارة الغرفة (25 درجة مئوية) خلطت بعناية

حتى ذابت جميع البلورات crystals. لعمل 500 مل من الداريء، خفف 20 مل من محلول Wash Buffer

Concentrate (25 x) في ماء منزوع الأيونات أو ماء مقطر.

2. القياسي Standard: إجريت سلسلة من التخافيف serial dilutions كما هو موضح في الجدول

10-3 و 11-3 و 12-3.

جدول 3-10: سلسلة التخافيف التي أجريت على المحلول القياسي لانترلوكين 6

Conc. التركيز	رقم الأنبوب	Dilution of standard solutions
320ng/L	Standard No.5	120µl Original Standard + 120µl Standard Diluent
160ng/L	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
80ng/L	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
40ng/L	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
20ng/L	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent

جدول 3-11: سلسلة التخفيف التي أجريت على المحلول القياسي لانترولوكين 8

Conc. التركيز	رقم الأنبوب	Dilution of standard solutions
640ng/L	Standard No.5	120µl Original Standard + 120µl Standard Diluent
320ng/L	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
160ng/L	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
80ng/L	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
40ng/L	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent

جدول 3-12: سلسلة التخفيف التي أجريت على المحلول القياسي لانترولوكين 10

Conc. التركيز	رقم الأنبوب	Dilution of standard solutions
800pg/ml	Standard No.5	120µl Original Standard + 120µl Standard Diluent
400pg/ml	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard Diluent
200pg/ml	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard Diluent
100pg/ml	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard Diluent
50pg/ml	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard Diluent

3- طريقة العمل

1. أضيف 40 مايكرو لتر من المحلول القياسي standard في الحفر الخاصة به (standard well).
2. أضيف 40 مايكرو لتر من عينة مصل serum في الحفر الخاصة به (serum well). ثم أضيف 10 مايكرو لتر من الجسم المضاد ل IL-6,8 and 10 (antibody anti-IL-6,8 and 10)، ثم أضيف 50 مايكرو لتر من الستربتافيدين - HRP (streptavidin-HRP) إلى حفر العينات (sample wells) وحفر المحلول القياسي (standard wells). مزجت المكونات جيدا، ثم تم تغطية الصفيحة الدقيقة بمادة مانعة للتسرب (sealer) لكي يمنع تبخر المحاليل. بعدها حُضنت لمدة

60 دقيقة عند 37 درجة مئوية. تمت إزالة مانع التسرب وغُسلت الصفيحة 5 مرات باستخدام محلول الغسيل wash buffer.

3. نُقعت الحفر بما لا يقل بـ 0.35 مل من محلول داريء الغسيل wash buffer لمدة 30 ثانية إلى دقيقة واحدة لكل غسلة. نشفت الصفيحة على مناشف ورقية.

4. أُضيف 50 مايكرو لتر من محلول الركيزة أ (substrate solution A) لكل حفرة ثم أُضيف 50 مايكرو لتر من محلول الركيزة ب (substrate solution B) لكل حفرة. حُضنت الصفيحة بعد تغطيتها جيدا في الحاضنة عند 37 درجة مئوية لمدة 10 دقائق في الظلام.

5. أُضيف 50 مايكرو لتر من محلول الإيقاف stop solution لكل حفرة، تحول اللون الأزرق إلى اللون الأصفر على الفور. حُددت الكثافة الضوئية Optical density (قيمة OD) لكل حفرة على الفور باستخدام قارئ الصفيحة الدقيقة الميكروسكوبية microplate reader مضبوطة على 450 نانومتر في غضون 10 دقائق بعد إضافة محلول الإيقاف.

3-2-6 الدراسة الجينية لعزلات الناييريا Genetic Study of *Neisseria* Isolates

3-2-6-1 أستخلاص الحمض الريبسي RNA extraction

تم إستخلاص الحمض الريبسي RNA بأستعمال العدة FavorPrep Total RNA Mini Kit وحسب تعليمات الشركة المجهزة FAVORGEN / Korea وكالاتي:

1. تم نقل 1 مل من الخلايا البكتيرية النامية في وسط نقيع مستخلص القلب - الدماغ BHI إلى أنبوب الطرد المركزي screw centrifuge tube بحجم 2 مل.

2. وضعت الخلايا البكتيرية عند 4 درجات مئوية بجهاز الطرد المركزي عند سرعة 18000 دورة/الدقيقة لمدة 2 دقيقة. أزيلت بعدها كل المادة الطافية Supernatant.

3. أضيف 100 ميكروليتر من محلول اللايسوزايم lysozyme reaction solution، ثم حُضِن عند 37 درجة مئوية لمدة 10 دقائق.

4. أضيف 350 ميكروليتر من FARB Buffer و3.5 ميكروليتر من بيتا ميركابتوايثانول β -Mercaptoethanol.

5. أضيف 250 ملغم من الخرز الزجاجي المغسول بالحمض (500 ~ 700 ميكرومتر) ومُزج بجهاز المازج vortex بقوة ولمدة 5 دقائق لتكسير الخلايا البكتيرية. بعدها وضع المزيج في جهاز الطرد المركزي بسرعة 18000 دورة/ الدقيقة لمدة 2 دقيقة للتخلص من المواد غير قابلة للذوبان Insoluble Material. نُقِلت المادة الطافية إلى أنبوب طرد مركزي صغير microcentrifuge وقيس حجم المادة الطافية فيما بعد.

6. أضف حجمًا واحدًا من الإيثانول الخالي من أنزيم RNase (RNase-free ethanol) تركيزه 70% وخطب جيدًا بوساطة جهاز الرج Vortex.

7. وضع عمودًا صغيرًا من FARB (FARB Mini Column) في أنبوب تجميع Collection Tube ونُقِل خليط عينة الإيثانول المضاف (بما في ذلك الرواسب) إلى عمود FARB الصغير. تمت عملية الطرد المركزي بسرعة 18000 دورة/ الدقيقة لمدة دقيقة واحدة، ثم تم إعادة عمود FARB الصغير مرة أخرى إلى أنبوب التجميع.

8. أضيف 500 ميكروليتر من داريء الغسل 1 (Wash Buffer 1) إلى عمود FARB الصغير، ثم تم وضعه بجهاز الطرد المركزي بسرعة 18000 دورة/ الدقيقة لمدة دقيقة واحدة. تم إعادة عمود FARB الصغير مرة أخرى إلى أنبوب الجمع.

9. أضيف 750 ميكروليتر من داريء الغسل 2 (Wash Buffer 2) إلى عمود FARB الصغير، ثم تم وضعه بجهاز الطرد المركزي بسرعة 18000 دورة/ الدقيقة لمدة دقيقة واحدة. تم إعادة عمود FARB الصغير مرة أخرى إلى أنبوب الجمع. كُريت الخطوة مرتين.

10. وضع العمود الصغير FARB بجهاز الطرد المركزي بسرعة 18000 دورة/ الدقيقة لمدة 3 دقائق إضافية لتجفيف عمود FARB. هذه الخطوة مهمة لتجنب بقاء السائل الذي يسبب تثبيط التفاعل الأنزيمي اللاحق.

11. وضع عمود FARB الصغير في أنبوب شطف Elution Tube. ثم أضيف 100 ميكروليتر من الماء مزال الشوائب منه (ddH_2O) والخالي من RNase إلى مركز الغشاء لعمود FARB الصغير. تُرك العمود الصغير FARB لمدة دقيقة واحدة. هذه خطوة مهمة وذلك للحصول على شطف فعال. تم استخدام جهاز الطرد المركزي لعمود FARB المصغر بأقصى سرعة لمدة 1 دقيقة واحدة لإنزال الحمض النووي الريبي elute RNA. خُزِن الحمض النووي الريبي في -70 م° .

3-2-6-2 قياس تركيز ونقاوة الحمض النووي الريبي

Quantitation of RNA concentration and purity

تم قياس تركيز ونقاوة الحمض النووي الريبي (RNA) باستخدام جهاز Nanodrop Spectrophotometer بشكل إنتقائي لـ 30 عينة لبكتريا ناييريا التي كانت ذات مقاومة عالية للمضادات الحيوية لمعايرة Quantus™ Fluorometer. حضرت العينة القياسية standard sample في المعايرة القياسية النهائية final standard calibration بـ (نانوغرام/ أنبوب) المبين أدناه. حضرت عينة البلانك Blank والقياسية كالاتي:

1. تم تحضير داريء Tris-EDTA buffer (1X TE buffer) عن طريق تخفيف 20X TE Buffer

(pH 7.5) إلى 1X إذ تم أخذ 200 مايكروليتر من 20X TE Buffer وأكمل الحجم الى 4 مل

بالماء الخالي من أنزيم النيوكليز لتحضير 4 مل من 1X TE buffer.

2. مزج 10 مايكروليتر من محلول صبغة QuantiFluor® Dye مع 3,990 مل من داريء 1X TE .buffer

3. حضر الحمض النووي القياسي nucleic acid standard وذلك بأضافة 5 مايكروليتر من المحلول القياسي والعينة إلى 200 مايكروليتر من الكواشف العاملة working reagents. تم تحضير أنبوب Blank بإضافة 200 مايكروليتر من كاشف working reagent فقط.

4. تم خلط المزيج ثلاث مرات بوساطة الماصات ببطء، ثم خلطت مكونات الأنابيب بوساطة جهاز الهزاز vortex عند سرعة عالية لمدة 10 ثوانٍ وحضنت في درجة حرارة الغرفة بعيداً عن الضوء.
5. تم قياس تركيز ونقاوة الحمض النووي الريبوزي وتسجيل التركيز بالنانوغرام لكل مايكروليتر.

3-2-6-3 تحويل الحمض النووي الريبوزي الى الدنا المتمم

Conversion of RNA to cDNA

يعمل الحمض النووي الريبوزي (RNA) كقالب لتخليق الدنا المتمم (cDNA). تم تصميم مجموعة عدة تشخيصية LunaScript Reverse Transcriptase / Biolabs / England RT reagent Kit لأداء النسخ العكسي reverse transcription لـ RT-PCR (real-time RT-PCR) في الوقت الفعلي. يستخدم أنزيم RTase، الذي يتميز بإمكانية تمديد ممتازة ويجعل تركيب قالب cDNA سريعاً وفعالاً لـ Real-Time PCR.

1. مبدأ العمل

تم جعل التكوين الفعال efficient synthesis لقوالب cDNA (cDNA templates) سريعاً بوساطة تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل RT-PCR. هذه العدة التشخيصية هي الأنسب لأستعمالها في تقنية RT-

PCR وبخطوتين. تم استخدام برايمرات Gene Specific Primers خاصة بالجينات لإطالة lengthen إجمالي الحمض النووي الريبي total RNA وتحويله إلى cDNA.

2. طريقة العمل Protocol

1. وضع خليط التفاعل reaction mixture جدول 3-13 على الثلج. وضع الخليط في الأنابيب الدقيقة

micro tubes، بعدها أُضيفت عينة الحمض النووي الريبي RNA.

2. حضن خليط التفاعل عند درجة حرارة 25 م°، لمدة دقيقتين لخطوة (Primer Annealing)، 55 م° لمدة

15 دقيقة لخطوة (لتشجيع عمل أنزيم النسخ العكسي reverse transcriptase ، على تخليق cDNA

متبوعاً بـ 90 م° لمدة دقيقة واحدة لخطوة (التثبيط الحراري للانزيم Heat inactivation)

جدول 3-13: خليط التفاعل

Reagents	Volumes الأحجام (μl)
(5X) LunaScript RT SuperMix	2
Random primers	1
total RNA	5
Rnase Free dH ₂ O	up to 20
	Total 20

4-6-2-3 طريقة عمل الكشف الكمي عن النيسيريا بوساطة تفاعل البوليمراز المتسلسل بالزمن الحقيقي

Quantitative Detection *Neisseria gonorrhoeae* by Real Time- PCR

1-4-6-2-3 تحضير الخليط الرئيس Master Mix Preparation

تم إذابة وخط جميع مكونات التفاعل بدقة. إذ حُضِر Master Mix وفقاً للحجم المخصص لجميع مكونات التفاعل المشتركة لجميع التفاعلات أو مجموعة فرعية من التفاعلات المطلوب إجراؤها، وذلك بإتباع الحجم المطلوب لكل مكون بناءً على الجدول الآتي جدول 3-14 .

جدول 3-14: تحضير الخليط الرئيس

Components	20µL (Final volume)	Final concentration
المكونات	الحجم النهائي	التركيز النهائي
Luna Universal qPCR Master Mix(2x)	10µL	2x
Forward primer	0.5µL	0.2µM
Reverse primer	0.5µL	0.2µM
Nuclease-free water	Up to 20µL	
Template cDNA Sample Volume	5	1pg-100ng

RT-PCR Cycling Program 2-4-6-2-3

نقلت العينات إلى جهاز التدوير الحراري thermocycler instrument وتم برمجتها

وفقاً لدرجة حرارة مرحلة annealing لكل برايمر primer وكما هو مذكور في الجدول 3-14.

جدول 3-14: الوقت والحرارة وعدد مرات التدوير للبرنامج

Step	Temp. (°C)	Time	Cycle
Initial Denaturation	95	60 sec.	1
Denaturation	95	15 sec.	35 – 40
Extension	60	30 sec.	
Melt curve	60 – 95	02:00 min	1
Annealing	60	2.5 min	1

7-2-3 الاختبارات الإحصائية Statistical analyses

تم استعمال النسب والتكرارات في الإحصاء الوصفي لهذه الدراسة. وأيضاً تم إجراء إختبار T- test

من أجل دراسة العلاقة بين جينات الضراوة ومستوى الانترلوكينات ولايجاد الفروق المعنويه والتي اعتماد قيمة

$(p = 0.05)$. وتم إيجاد العلاقة بين اعداد البكتريا البنية وبكتريا السيلان باستخدام البرنامج الإحصائي spss

الأصدار 26 .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Dissection

4. النتائج والمناقشة Results and Discussions

4-1 العزل والتشخيص Isolation and Identification

تم الحصول على 30 (17.64%) من العدد الاجمالي للعزلات تعود الى بكتريا *N. gonorrhoeae* كنتائج إيجابية، في حين أظهرت 140 عينة أخرى (82%) من العينات نتائج سلبية في الزرع المختبري كما مبين في الجدول رقم 4-1.

الجدول 4-1: نتائج الزرع المختبري لعينات الدراسة

المجموع (%) Total	الزرع السلبي		الزرع الايجابي		نوع البكتريا <i>N.gonorrhoeae</i>
	%	عدد العينات السالبة	%	عدد العينات الموجبة	
(100)170	82.35	140	17.64	30	

لقد كانت جميع العينات الموجبة لبكتريا السيلان الجنسي والعينات السالبة أيضا حاوية على البكتريا العسوية *Lactobacillus spp* بنسبة 170(100%) الا ان اعدادها كانت مختلفة في العينات الموجبة عند فحص العينات بطريقة المسحة البكتيرية الجافة Dry bacterial smear المصبوغة بصبغة كرام، إذ تم ملاحظة ان العينات الموجبة الحاوية على عدد قليل من بكتريا *Lactobacillus spp.* (>100 بكتريا/ حقل مجهرى) فإنها تحتوي على عدد عالي نسبيا من بكتريا *N. gonorrhoeae* ما يقارب 50 - 100 زوج بكتري/ حقل مجهرى field، أما العينات التي اعداد بكتريا *Lactobacillus spp.* عالي (≤ 100 بكتريا/ حقل مجهرى) فأنها تحتوي على عدد قليل نسبيا من بكتريا *N. gonorrhoeae* ما يقارب 16 - 24 زوج بكتري/ حقل مجهرى field، ولقد كانت بعض بكتريا الناييريا داخل الخلايا العدلة متعددة الأنوية

Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) شكل 1-4 وجدول 2-4 .

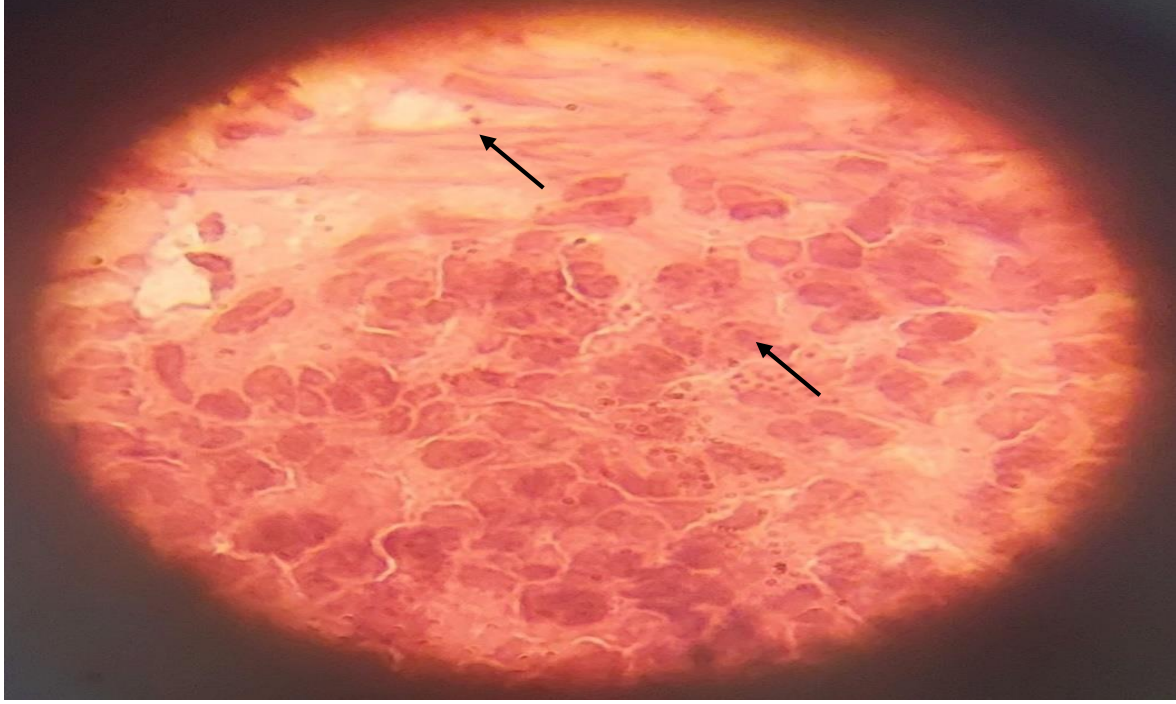
جدول 2-4: العلاقة بين اعداد العصيات اللبينية وبكتريا السلان

<i>Lactobacillus spp</i>			<i>Neisseria gonorrhoea</i>
p-value	≥ 100	< 100	
	Mean \pm S.E	Mean \pm S.E	
		-91.833 \pm 4.835	
	0.00	0.00	

كما ظهرت بكتريا *N. gonorrhoeae* في الفحص المجهرى بعد صبغ العينة بصبغة كرام، بشكل تشبه حبة القهوة Coffee-bean، ثنائية Diplococcus، داخل خلايا PMN (Intracellular) أو خارج خلايا PMN (Extracellular)، وهذا ما أكدته العديد من الدراسات المحلية والدولية، إذ بينت تلك الدراسات ان PMN هي الخلايا البيضاء الأكثر عدداً في الدم المحيطي للإنسان التي لها دوراً رئيساً في الجهاز المناعي (المناعة الطبيعية (Innate Immunity) التي تتجذب الى مكان تواجد البكتريا نتيجة تحرر انترليوكين 8 (IL-8) وانترليوكين 6 (IL-6) وعامل التنخر ألفا (TNF α) كنواتج للاستجابة المناعية، مما يؤدي إلى التهام البكتيري. إذ تشير الدلائل غير المباشرة إلى أن بكتريا *N. gonorrhoeae* تتجو من التعرض لخلايا PMN من خلال الدفاع ضد أنواع الأوكسجين التفاعلي المشتقة من البلعمة (ROS) (Potter *et al.*, 2022; Werner *et al.*, 2023).

في الدراسة الحالية أيضاً، ظهرت بكتريا *Lactobacillus spp* المتواجدة مع بكتريا السيلان الجنسي في نفس الشريحة المفحوصة مجهرياً والمصبوغة بصبغه كرام، بشكل خلايا مختلفة الاشكال، اذ كانت عصوية أو عصوية كروية cocco-bacilli، مفردة أو ثنائية التجمع، موجبة لصبغة كرام وهذا يطابق ما جاء في دراسات سابقة عديدة (Ansari *et al.*, 2023; Lyra *et al.*, 2023). فضلا عن ذلك، فلقد وجد عند فحص العينات بطريقة المسحة الرطبة المباشرة r وفحصها تحت العدسة ذات التكبير العالي 40X، أنها تحتوي على عدد

كبير من الخلايا القبيحية (full field pus cells) مع بكتريا عسوية وخلايا طلائية دلالة على وجود التهابات واصابات بكتيرية.



الشكل (1-4): بكتريا *N. gonorrhoeae* في الفحص المجهري بعد صبغ العينة بصبغة كرام (تحت العدسة الزيتية 100X)، بشكل تشبه حبة القهوة Coffee-bean، ثنائية *Diplococcus* ، داخل خلايا PMN (Intracellular) او خارج خلايا PMN (Extracellular)

لقد وجد Farooq وآخرون (2023) ان نسبة بكتريا *N. gonorrhoeae* وبكتريا *L. spp* كانت 6(13%) و1(2.2%) على التوالي في مسحات المهبل لنساء عراقيات يعانين من افرازات مهبلية قليلة جداً او لا يعانين من اي افرازات مع الالام ضئيلة في الحوض، كما وجد الباحثون ان تلك البكتريا (*gonorrhoeae*) كانت منتشرة لدى النساء على الرغم من انهن لا يعانين من اي اعراض مرضية وهن بأعمار تتراوح من 21 الى 47 سنة مما يساعد على انتقال البكتريا جنسياً (Farooq et al., 2023).

أما في إيران فلقد كانت نسبة الإصابة ببكتريا *N. gonorrhoeae* لا تتفق مع الدراسة الحالية، إذ أظهرت العديد من الدراسات أن نسبة الإصابة ببكتريا السيلان الجنسي لدى النساء بأعمار 15-56 سنة كانت تتراوح من (0-4%)، والاس الهيدروجيني كان 4-5.6 في الإفرازات المهبلية (Sameni et al., 2022; Kazemian et al., 2022). وبشكل عام فإن نسبة الإصابة ببكتريا السيلان الجنسي قد قلت بشكل ملحوظ خلال فترة جائحة كورونا بسبب الحظر الصحي في كل دول العالم. فلقد بينت نتائج العديد من الباحثين في هولندا، ان نسبة الإصابة كانت تراوحت ما بين 8(6%) الى 10(7.5%) بأعمار من 25-45 سنة، اما في تركيا فلقد كانت نسبة الإصابة 28(15%) (Zondag et al., 2023).

4-2 انتشار الإصابة ببكتريا *Neisseria gonorrhoeae* حسب الفئات العمرية وبعض العوامل المؤثرة:

يشكل انتشار الإصابة ببكتريا السيلان شاغلا رئيسا من شواغل الصحة العامة. وتشير تقديرات دراستنا الى أن الإصابة قد سجلت في صفوف النساء البالغات adults التي تتراوح أعمارهن ما بين (20-50) سنة بنسبة (10-60) % جدول 4-2. بينما كانت نسبة الإجهاض Miscarriage لديهن ما بين (10-50) % وبعدها مرات أجهاض (1-4) مرات، إلا أن تلك النسوة لم تكن يعانين من العقم، إذ كان عدد الأطفال لديهن يتراوح من 1 طفل الى 6 أطفال وبنسبة (3.33-26.67) %. كما كانت الإصابة بهذه البكتريا المريضان اللتان لديهن أمراضا مزمنة كالضغط وداء السكري بنسبة 6.67 %، و 26 مريضة (86.67) % لم تكن يعانين من أي مرض مزمن كما مبين في الجدول 4-3.

تعد الدراسات حول انتشار بكتريا *N. gonorrhoeae* في العراق قليلة جداً، على الرغم من تواجد البكتريا في النساء العراقيات بعمر الأنجاب والذي قد يشكل خطراً عليهن فيقلل من أنجاب الأطفال أو قد تؤدي الإصابة الى العقم، الا أن الدراسات منذ عام 2008 تشير أن إصابة الرجال أكثر مما في النساء العراقيات، لذا وجد الباحث Al-Douri وآخرون أن ستة وتسعين امرأة عراقية كانت مصابة بالعقم Infertile ويعانين من الأم في البطن حادة أو مزمنة، وبعد دراسة وجود بكتريا السيلان الجنسي في إفرازات عنق الرحم، ظهر أن

نسبة الإصابة كانت (3.13%) لدى النساء بإعمار (20-30) عاماً و (30-40) عاماً من سكنة محافظة بغداد (AL-Douri *et al.*, 2008). أما نتائج الباحثان Ali و Ghaima في عام 2022 فلقد أظهرت أن أعلى نسبة إصابة ببكتريا *N. gonorrhoeae* كانت في النساء بعمر (36-45) عاماً وبنسبة إصابة بلغت

جدول 3-4: انتشار الإصابة ببكتريا *Neisseria gonorrhoeae* حسب الفئات العمرية وبعض العوامل المؤثرة

Parameters	Categories	No.	%	Mean± Std.Deviation	p-value
Age العمر	20-30	18	60	3.17±1.555	0.00*
	31-40	9	30		
	41-50	3	10		
Miscarriage times عدد مرات الإجهاض	0	7	23.3	1.07±1.230	0.00*
	1	15	50		
	2	5	16.7		
	4	3	10		
Number of Children عدد الاطفال	0	2	6.67	28.83±6.773	0.00*
	1	1	3.33		
	2	6	20		
	3	8	26.67		
	4	8	26.67		
	5	3	10		
	6	2	6.66		
Chronic diseases الإصابة بأمراض مزمنة	None	26	86.67	0.30±.750	0.037*
	Diabetes	2	6.66		
	Diabetes and blood pressure	2	6.67		
Address	Rural area	6	20	15±12.72	0.00*
	City	24	80		

(P-value≤0.05)*

(%4) (Ali and Ghaima, 2022). وهذا لا يتوافق مع نتائج الدراسة الحالية. بينما وجد الباحث Silva وآخرون في عام 2023 أن نسبة انتشار بكتريا *N. gonorrhoeae* في النساء البرتغاليات في سن الأنجاب كن أكثر إصابة بتلك البكتريا. إذ تم اختيار مسحات من عنق الرحم المهبليّة cervical vaginal swabs لـ 680 امرأة في سن 15-عاماً وبلغ أعلى معدل انتشار لمرض السيلان (1.3%) في النساء بعمر 22 عاماً، وبذلك فإن البكتريا تكون قليلة الانتشار في النساء البرتغاليات بشكل عام ولدى النساء بعمر الأنجاب بشكل خاص (Silva et al., 2023). كما أجريت دراسة في إيران على عينات من باطن عنق الرحم ومسحات العين لـ 239 امرأة حامل وأطفالهن حديثي الولادة، إذ كانت معدلات انتشار بكتريا السيلان الجنسي قليلة أيضاً في إيران، ولقد فسرت النتائج على أن الكثير من النساء لديهن إفرازات مهبليّة وآم أسفل البطن والحوض مع ولادة أطفالهن مصابين بالتهاب العيون، واللاتي احتمال كبير يَكُن مصابات بالسيلان الجنسي، إلا أن غياب الكشف screening وعدم أخذ العلاج المناسب إثناء فترة الحمل، قد يسبب ذلك الى أنتشار البكتريا مع ولادة أطفال مصابين أيضاً (Pourabbas et al., 2018). ومن جهة أخرى، فإن نسبة تواجد بكتريا السيلان الجنسي في الولايات المتحدة الأمريكية عالية نوعاً وذلك بسبب الفحص الروتيني لبكتريا السيلان الجنسي *N. gonorrhoeae* في المستشفيات، إذ وجد Whelan وآخرون في عام 2021، أن (0.3%) هي أعلى نسبة تم تسجيلها لدى النساء بإعمار تراوحت بين 14-39 عاماً، و 10% بعمر 16-24 عاماً. ومقارنة مع دراسة قامت بها مراكز امريكية منها CDC (مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها)، فلقد وجد الباحثون الأمريكيون أن أعمار الأناث بعمر 16 الى 24 يشكلون خطراً في أنتشار بكتريا السيلان الجنسي بنسبة (2.2%) في معظم الولايات الامريكية (Whelan et al., 2021). إما في أوروبا، بشكل عام فإن نسبة الإصابة كانت في النساء بأعمار 20-24 عاماً وبنسبة (0.2%) مقارنة مع بقية الأعمار (CDC, 2023). من جهة أخرى، في الصين وعلى عكس نتائج الدراسة الحالية والدراسات العالمية الأخرى، وجد الباحثون ان أعلى نسبة تواجد

بكتريا *N. gonorrhoeae* في النساء المصابات كن بأعمار أكبر من 40 عاماً وبنسبة إصابة بلغت (4.09%) وقد يعود السبب الى ذلك هو النشاط الجنسي لديهم بسبب طعامهم البحري الصحي (Cai et al., 2020).

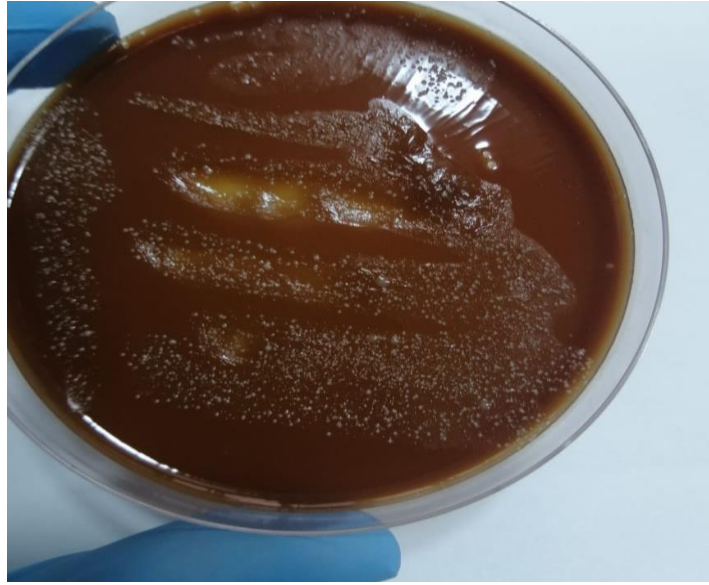
3-4 الصفات المزرعية لبكتريا الناييسريا البنية *N. gonorrhoeae* Cultural characteristics for

ظهرت مستعمرات *N. gonorrhoeae* على وسط أكار الدم بعد مرور حضانة 24 ساعة و 48 ساعة بدرجة 37 م° بشكل مستعمرات ملساء smooth، مستديرة round، رطبة ذات حافات منتظمة، لونها يميل الى الأبيض - الرصاصي. لقد لوحظ أن نمو البكتريا على وسط أكار الدم كان ضعيفاً خلال 24 ساعة الأولى من الحضن، لذا تركت الأوساط الزرعية لـ 24 ساعة أخرى، فظهر النمو بشكل أفضل مع تكون رائحة غير مقبولة. وقد أكد العديد من الباحثين هذا الأمر، وقد يعود الى أن بكتريا الناييسريا البنية هي أكثر أنواع الناييسريا حساسية وتتطلب إضافة مواد محفزة للنمو معقدة complex growth media لكونها شديدة التأثير بالمواد السامة مثل الأحماض الدهنية Fatty acids ، وغير قادرة على النمو في أكار الدم العادي (Sethi et al., 2020; Zhou et al., 2023).

ظهرت مستعمرات *N. gonorrhoeae* على وسط اكار الجوكليت بعد مرور 24 ساعة من الحضن بدرجة حرارة 37 م° وبوجود 5-10% غاز CO₂، صغيرة ذات لون رمادي يميل الى الأبيض، مخاطية، ملساء، ذات حافات محددة غير متعرجة defined margins شكل 3-4 وجدول 2-4. لقد كانت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع نتائج الباحثين الاخرين، إذ أكدت الدراسات أن أكار الجوكليت هو وسط غني يستعمل لدعم نمو بكتريا السيلان الجنسي التي تعد شديدة الحساسية للجفاف وتحتاج الى مدعومات نمو خاصة. قد تظهر بعض السلالات العائدة الى *N. gonorrhoeae* بعض الاختلافات عند نموها على وسط أكار الجوكليت إعتماًداً على وجود الأهداب pili وبروتينات العتامة opacity protein إلا انها بشكل عام تحتاج لنموها

لعاملتي X-factor (Hemin) و V-Factor (المتمثل بـ NAD) فيظهر النمو أكثر كثافة، والمستعمرات حجمها أكبر على وسط أكار الجوكليت مقارنة مع أكار الدم ذو الأس الهيدروجيني 7-7.2، إذ يمكن لبكتريا *N.gonorrhoeae* النمو بمديات أس هيدروجيني واسعة نسبياً (5.8-8)، إلا أنها نموها يكون غزيراً في مديات الحموضة المعتدلة (Boiko et al., 2020 ; paris et al., 2022).

فيما يخص مستعمرات *N.gonorrhoeae* على وسط تاير-مارتن المحور Modified Thayer-Martin agar فقد ظهرت صغيرة، بيضاء - رمادية اللون، تميل الى عديمة اللون greyish-white to colorless، مخاطية ذات حافات غير منتظمة وبقطر يتراوح من 0.5 الى 1 ملم شكل 4-4 وجدول 4-4. لقد جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع العديد من الدراسات العالمية، ويعد وسط أكار تاير-مارتن المحور من الاوساط الزرعية الانتقائية المهمة في عزل بكتريا السيلان الجنسي وذلك لاحتوائه على أربع أنواع من المضادات الحيوية (Polymyxin و Vancomycin و Trimethoprim و Nystatin)، مما يساعد على تثبيط نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام والسالبة لصبغة كرام عدا النيسريا، كذلك وجود مضاد النستاتين يساعد على قتل الفطريات في النموذج (مسحة المهبل) (Sarenja et al., 2022; Ratnappuli et al., 2022). أظهرت العزلات البكتيرية *N. gonorrhoeae* قيد الدراسة عدم قدرتها على الحركة في وسط نصف صلب Semi-Solid medium الخاص بفحص الحركة، دلالة على أن تلك البكتريا غير متحركة Non-motile وهذا ما أثبتته العديد من الدراسات العالمية (Hu et al., 2022; Bai et al., 2022).



شكل 4-2: مستعمرات *Neisseria gonorrhoeae* على وسط Chocolate agar بعد مرور 48 ساعة حضن بدرجة حرارة 37 درجة مئوية وتوفير 5-10% CO₂ في candle jar



الشكل 4-3: مستعمرات *Neisseria gonorrhoeae* على وسط ثاير-مارتن اكار المحور بعد حضانة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية

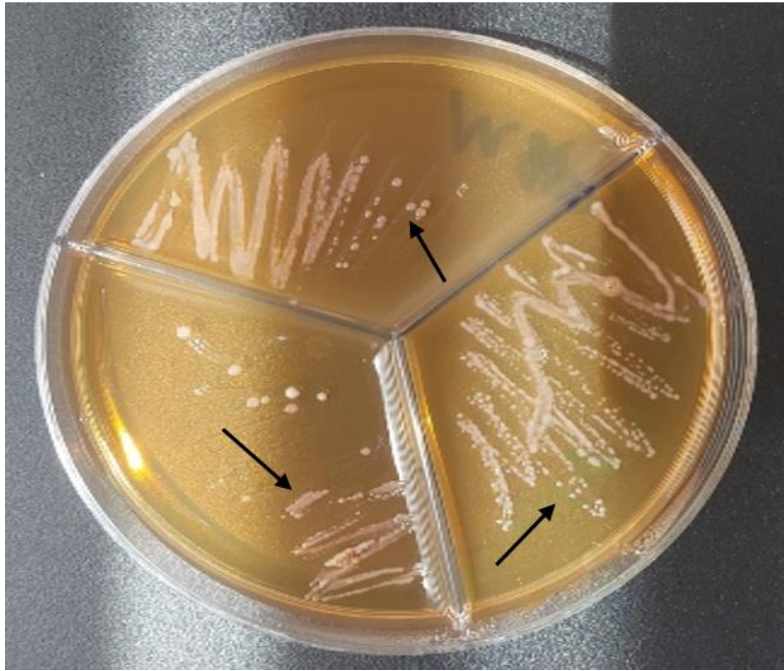
جدول 4-4: الصفات الزرعية لبكتريا *Neisseria gonorrhoeae* على أوساط زرعية أغنائية وانتقائية

Chocolate Agar Medium (CAM)	Thayer Martin Medium	Blood Agar Medium (BAM)	Culture Characters الصفات الزرعية للمستعمرات البكتيرية
مدورة Round	مدورة Round	مدورة Round	الشكل Shape
1 - 2 mm	1-3 mm	1-2 mm	الحجم Size
محدبة Convex	محدبة Convex	محدبة Convex	الارتفاع Elevation
أملس Smooth	أملس Smooth	أملس Smooth	السطح Surface
Colorless to Grey عديم اللون الى رصاصي	Colorless to Grey عديم اللون الى رصاصي	Grey رصاصي	Color اللون
Opaque معتمة	Transparent or Opaque شفافة الى معتمة	Opaque معتمة	Structure
γ - Hemolysis (No hemolysis)	γ - Hemolysis (No hemolysis)	γ - Hemolysis (No hemolysis)	Hemolysis نوع تحلل الدم

4-4 الصفات المظهرية والمزرعية لبكتريا العصيات اللبنية الحمضية

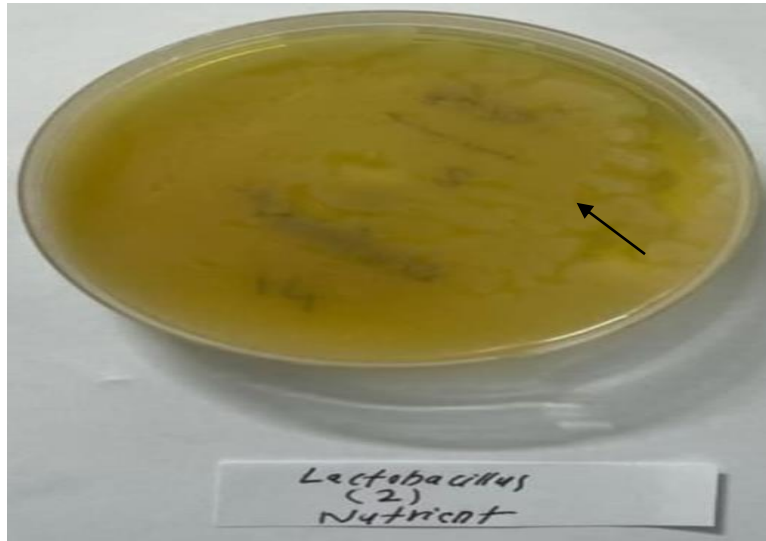
Cultural characteristics for *Lactobacillus spp*

امتازت مستعمرات *L. spp* على وسط أكار الدم بعد حضانة مدتها 24 ساعة بدرجة حرارة 37م بحجمها الصغير، رمادية اللون، مع إنتاج تحلل دم نوع ألفا α - hemolysis ، أما على وسط أكار الجوكليت chocolate agar فقد ظهر نمو المستعمرات ضعيفاً جداً في حين كان أفضل نمو لها وبنقاوة عالية على وسط MRS agar، إذ ظهرت المستعمرات دائرية الشكل، صغيرة الحجم محدبة ملساء، لماعة، البعض منها كانت بيضاء اللون، والبعض الآخر كان يميل الى اللون الكريمي شكل 4-4 .



شكل 4-4: مستعمرات *Lactobacillus spp* بيضاء اللون على وسط MRS agar

لقد وجد أن جميع العزلات النامية على وسط الأكار المغذي Nutrient agar قد ظهرت مستعمراتها بيضاء كريمة اللون white-creamy وناعمة وذات حافات ملساء (الشكل 4-5).



شكل 4-5 : مستعمرات *Lactobacillus spp* على وسط Nutrient agar التي تظهر فيها بيضاء - كريمة اللون ملساء

ظهرت مستعمرات بكتيرية مختلطة أخرى مع بكتريا *Lactobacillus spp* في العزل الأولي على وسط أكار الدم والأكار المغذي، وقد تبين أن معظم تلك الأنواع كانت عائدة الى بكتريا *Escherichia coli* والتي ظهرت لماعة متألقة على وسط EMB agar ومخمرة لسكر اللاكتوز على وسط ماكونكي MacConkey agar، فضلاً عن أنواع أخرى عائدة الى جنس *Lactobacillus* كنوع *L.plantarum* و *L.paracasei* و *L.fermentum* والتي تم تأكيد تشخيصها بأستعمال جهاز VITEK2 (ملحق رقم 2).

يوصي العديد من الباحثين بأستخدام وسط أكار MRS في عزل وتعداد بكتريا *Lactobacillus spp* المعزولة من مسحات المهبل، إذ يحتوي الوسط على البيبتون والدكستروز اللذان يحفزان نمو العصيات اللبنية بكفاءة عالية، فضلاً عن كونها توفر النايتروجين والكاربون للبكتريا. كما يحتوي الوسط على المغنسيوم والمنغنيز والخلات acetate والبولي سوربيت 80 polysorbate 80 (Tween 80) التي تمنع نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام وأنواع من بكتريا الموجبة لصبغة كرام عدا *Lactobacillus spp*، كما يساعد على دخول المغذيات الى داخل البكتريا (Taye et al., 2021; Mantegazza et al., 2023). في الدراسة الحالية، تمت ملاحظة بكتريا *Lactobacillus spp* تحت المجهر الضوئي بعد صبغها بصبغة كرام فظهرت بشكل عصيات موجبة لصبغة كرام Gram positive bacilli، مترتبة على هيئة سلاسل قصيرة أو مفردة. وهذا ما أكدته الدراسات المحلية والدولية (Yasmeen et al., 2017; Prakasita et al., 2019).

Biochemical 5-4 الفحوصات البايوكيميائية لبكتريا السيلان البنية والعصيات اللبنية الحمضية

tests for *N. gonorrhoeae* and *Lactobacillus spp*

بعد إجراء الفحوصات البايوكيميائية يدوياً Manual، فضلاً عن استعمال جهاز VIETK2 System، تبين أن جميع عزلات *N. gonorrhoeae* قد أعطت نتيجة سالبة لاختبار أنزيم اليوريز، أي أنها ليست لها القابلية على إنتاج انزيم urease (جدول 4-5) و (ملحق رقم 1). كما أظهرت العزلات نتيجة موجبة لاختبار الأوكسيداز oxidase test، وهذا يثبت امتلاك العزلات البكتيرية قيد الدراسة لأنزيم cytochrome oxidase، فضلاً عن ذلك، فلقد أعطت العزلات البكتيرية نتيجة إيجابية لاختبار الكاتليز catalase test، وهذا ما يؤكد أن بكتريا *N. gonorrhoeae* لها القابلية على أكسدة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 إلى ماء وأوكسجين O_2 ، مما يسهل على البكتريا التخلص من التأثير السام للأوكسجين عليها وهذه النتائج تتفق تماماً مع نتائج الدراسات السابقة (Petrine et al., 2019; Ayalew et al., 2022). أما فيما يخص إنتاج بكتريا *N. gonorrhoeae* للأحماض وأنزيمات أخرى، فلقد تم تأكيد تشخيصها بوساطة جهاز الفايتك (جدول 4-3). إذ أظهرت النتائج أن العزلات البكتيرية قيد الدراسة قد أعطت نتائج إيجابية لأختبارات ArgA و PheA و GGT و ProA و PHOS و TyrA و LeuA و APPA و ELLM و NAG، بينما أعطت نتائج سلبية لكل من GLYG و MTE و dMNE و ODC و LysA و PyrA و dMAL و AARA و SAC و dRIB2 و NAG و SAC و dMLT و dXYL. بكتريا *N. gonorrhoeae* لديها القدرة على إنتاج إنزيم Arginine arylamidase و Phenylamine arylamidase ومنتجة لأنزيم phosphatase وأنزيم Gamma-Glutamyl-Transferase وأنزيم Tyrosine Arylamidase وأنزيم Leucine Arylamidas. كما أعطت العزلات نتيجة موجبة لأختبار ELLM الذي يتم فيه استعمال كاشف ELLMan. للكشف عن وجود مجموعة sulfhydryl groups الحرة في المحلول وأن العزلات لها القدرة على استهلاك

سكر الكلوكوز وليست لها القدرة على سكر المالتوز والفركتوز والسكروز واللاكتوز. إن نتائج الدراسة الحالية تتفق تماماً مع نتائج دراسات لباحثين آخرين (Zolfaghri *et al.*, 2022; Vashishtha *et al.*, 2022). أما بالنسبة للاختبارات البايوكيميائية التي تم إجراؤها على بكتريا *Lactobacillus. spp* في الدراسة الحالية، فقد تم اعتماد المستعمرات المفصولة النامية على أكار MRS وذلك بسبب نقاوتها العالية على هذا الوسط. لقد وجد أن جميع العزلات البكتيرية قيد الدراسة كانت سالبة لأختباري الكاتليز والأوكسيديز فضلاً عن أختبار اليوريز ، إذ تعد بكتريا حامض اللبنيك من الأنواع البكتيرية غير المنتجة لأنزيم اليوريز وبذلك تكون تلك النتائج قد توافقت مع نتائج كل من الباحثين (Ma *et al.*, 2018; Chin *et al.*, 2021; Ansari *et al.*,) (2023).

جدول 4-5: الأختبارات البايوكيميائية لعزلات *N. gonorrhoeae* و *Lactobacillus spp*

<i>Lactobacillus spp</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	Tests
-	+	Oxidase test اختبار الأوكسيديز
-	+	Catalase test اختبار الكاتليز
-	-	Urease test اختبار اليوريز
-	+	(ArgA) Arginine Arylamidase
-	+	(PheA) Phenylalanine Arylamidase
-	+	(GGT) Gamma – Glutamidase
-	+	(Pro A) L –Proline Arylamidase
-	+	(PHOS) Phosphatase
-	+	(TyrA) Tyrosine Arylamidase
-	+	(LeuA) Leucine Arylamidase
-	+	(APPA) Ala – Phe–Pro–ARYLAMIDASE
-	+	(ELLM) ELLMan
+	+	(NAG) N–Acetyl–D–Glucosamine
+	-	(GLYG) Glycogen
+	-	(MTE) Matotriose
+	-	(dMNE) D–Mannose
+	-	(ODC) Ornithine Decarboxylase
-	-	(LysA)L– Lysine –Arylamidase
-	-	(PyrA)L–PyrrolidinyI–Arylamidase
+	-	(dMAL) D–Maltose
-	-	(AARA) Alpha–Arabinosidase
-	-	(dRIB) d–Ribose ²
-	-	(SAC) Saccharose/Sucrose
-	-	(dMLT) D–Malate
-	-	(dXYL) D–Xylose

مما تقدم يظهر ان التشخيص بالطرق التقليدية المتضمنة الاختبارات الكيميائية الحيوية هي طرق بطيئة ومتعبة اضافة الاختبارات الكيميائية الحيوية تأخذ حيزاً كبيراً لكثرة الاوساط والكواشف التفريقية، مما قد يرهق العامل بالمختبر خاصة اذا كان عدد العينات المطلوب تشخيصها كثيرة بالإضافة الى انها تؤدي الى خسارة العينة لأسباب عدة منها تعرض العينة للتلوث لعدم توافر ظروف معقمة وانتهاء صلاحية المواد ويحتاج التشخيص بالطرق التقليدية الى الدقة عالية وخبرة وقد يعتمد التشخيص على الرأي الشخصي (Turton *et al.*, 2008).

4-6 اختبار الحساسية لعزلات بكتريا *N. gonorrhoeae*

تم إجراء اختبار حساسية العزلات البكتيرية *N. gonorrhoeae* تجاه العديد من المضادات والتي اشتملت على (Amikacin، Azithromycin، Ciprofloxacin، Ceftriaxone، Gentamycin، Levofloxacin، Tobramycin، Tetracycline، Vancomycin). لقد جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع دراسات عراقية وعالمية أخرى، وسجلت حساسية متوسطة لمضادات أخرى (جدول 4-6). ففي الدراسة الحالية كانت معظم عزلات بكتريا *N. gonorrhoeae* مقاومة للمضادات الحيوية بنسبة 100% لكل من Ceftriaxone، Tetracycline، Ceftazidime في حين كانت أقل بنسبة مقاومة 73.33% تجاه Azithromycin و 10% تجاه Ciprofloxacin وتتفق نتائج هذه الدراسة تقريبا مع نتائج Magnus (and William, 2015). وليس من المستغرب أن تظهر سلالات مقاومة لهذه المضادات الحيوية البديلة بسرعة بسبب طفرات الكروموسومات أو اكتساب الجينات. في هذا الصدد، أدى ظهور سلالات تحتوي على جين (*tetM*) بروتين مقاومة Tetracycline الذي يتوسط مقاومة Tetracycline عالية المستوى المحمولة على البلازميد، والذي تم الإبلاغ عنه لأول مرة في عام 1985 إلى إزالة Tetracycline كخيار علاجي في منتصف وأواخر الثمانينات في معظم البلدان. ولحسن الحظ، كانت الفلوروكينولونات مثل Ciprofloxacin، فعالة للغاية ضد المكورات البنية، مما أتاح خيارات العلاج. بينما كانت النسبة مغايرة لبقية المضادات واغلبها

حساسة، إذ كانت 10% لمضاد Amikacin و13.3% لمضاد Levofloxacin و 100% Vancomycin و غير مقاومة لمضاد Tobramycin، وبذلك اتفقت النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية مع النتائج التي حصل عليها عددا من الباحثين المختصين (Sheeba *et al.*, 2023).

أما في كينيا، فقد وجد الباحثون Abdullahi وآخرون في عام 2022 لدراسة أجروها على النساء المصابات بالسيلان الجنسي، إنهن كُنَّ لم يكملن الدراسة ويعانين من الفقر وتعدد الأطفال. كانت بكتريا *N. gonorrhoeae* لديهم قد اظهرت مقاومة بنسبة 100% لكل من المضادات الحيوية Amikacin و Gentamycin و Tetracycline و Ciprofloxacin (Abdullahi *et al.*, 2022). بينما ركزت الدراسات في إيران على بعض المضادات الحيوية التي تستعمل في علاج مرض السيلان الجنسي في العديد من مدن إيران، منها مضادات الحياة إذ Azithromycin وجد الباحثون Lu وآخرون في عام 2022 أن من بين أكثر من 50 دولة أوروبية وأمريكية وكذلك إيران، قد أبلغت عن تدوين بيانات مقاومة لمضادات Azithromycin بنسبة 29.3%، لذا فإن التشخيص المبكر للأمراض الجنسية أمراً بالغ الأهمية للسيطرة على زيادة إنتشار ظهور المكوّرات البنية المقاومة للمضادات الحيوية (Lu *et al.*, 2022). كما أكد أعضاء من منظمة الصحة العالمية WHO، أن المقاومة الناشئة لمضاد Ciftrioxon و Azithromycin سبب 70%، قد أدت إلى تجديد الأهتمام بأستعمال Ciprofloxacin في علاج مرض السيلان الجنسي، إلا إن هذا يمكن أن يؤدي إلى ظهور وإنتشار سريع لمقاومة Ciprofloxacin بسبب استعماله العشوائي وبجرع عالية (Gonzalez *et al.*, 2022)، وهذا ما أثبتته نتائج دراستنا الحالية والتي ظهر من خلالها ظهور سلالات ناييريا بنية مقاومة بشكل عالي إلى Ciprofloxacin فضلا عن مضاد Azithromycin، وبالتالي يمكن إعتبار تلك العزلات مقاومة للعديد من المضادات الحيوية Multi-drug resistance. كما جاءت دراستنا الحالية متوافقة مع دراسة أجريت في استراليا في عام 2021 حول أستخدام Gentamycin في علاج *N. gonorrhoeae*، وقد أظهرت نتائج الباحثين أن المشكلات الرئيسية تمثلت بزيادة معدلات المقاومة لبكتريا

النايسيريا البنية في أستراليا، على الرغم من التقدم العلمي في أستراليا وتشخيص مرض السيلان الجنسي مبكراً لدى النساء لكونه قد أدخل اختبار تحري عن بكتريا السيلان ضمن الفحوصات الروتينية التي تجريها النساء في أستراليا، إذ وصلت نسبة المقاومة الى 85% والتي عكست مخاوف الجهات الصحية في إنتقال البكتريا للجنين وحديثي الولادة وأحتمال إرتفاع نسب المقاومة. إلا أن استعمال مضاد Gentamycin في أستراليا هو الخيار العلاجي المتاح لعدوى المكورات اللبنية (Armstrong *et al.*, 2021).

لم تعد مراكز السيطرة على الأمراض والوقاية (CDC) توصي باستعمال المضادات الحيوية المعروفة بأسم Fluoroquinolones (Ciprofloxacin , levofloxacin) كعلاج لمرض السيلان الجنسي في الولايات المتحدة الأمريكية بسبب ظهور السلالات المقاومة لتلك المضادات الحيوية (Klausner *et al.*, 2021)، إلا أنه لا زالت منظمة الصحة العالمية WHO و CDC توصي استعمالها في حالات السيلان الجنسي والمستقيم غير المصحوبة بمضاعفات، وأن يتم إستعمال مزيج من المضادات الحيوية Ceftriaxone و Azithromycin وهذا العلاج لا زال فعالاً في كندا، إلا إنه قد وجد إنخفاضاً ملحوظاً في المقاومة للسيفوسبورينات، ولكن مع الوقت نفسه زيادة في مقاومة Erythromycin (Liu *et al.*, 2016; Fong *et al.*, 2022).

جدول 4-6: اختبار مقاومة المضادات الحيوية على العزلات السريية لبكتيريا النيسرية البنية

Antibiotic	Amikacin Ak 10	Azithromycin AZM 15	Ciprofloxacin CIP 10	Ceftriaxone CRO 10	Cinoxacin CN 10	Levofloxacin LEV 5	Vancomycin VA 5	Tetracycline TE 10	Tobramycin TOB 10	Ceftazidime CAZ 30
Isolate										
%	10	73.3	10	100	20	13.3	100	100	0	100

تم ربط الالتهابات المهبلية بعواقب صحية خطيرة مثل العقم والولادة المبكرة ومرض التهاب الحوض pelvic inflammatory disease (PID) والإجهاض (Huang *et al.*, 2021; Dong *et al.*, 2022). ترتبط الالتهابات المهبلية في كثير من الأحيان بالفلورا المهبلية vaginal flora التي تحتوي على العصيات اللبنية، مما يؤدي إلى تلف الخلايا الظهارية والغشاء المخاطي في المهبل. أدى ظهور الأمراض المقاومة للمضادات الحيوية وانتشارها السريع، وخاصة البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة - multidrug-resistant، إلى تقييد استخدام المضادات الحيوية طوال القرن الماضي. ومن ثم، فقد تطور استخدام العصيات اللبنية البروبيوتيك ضد مسببات الأمراض كعلاج بديل أو تكميلي للعدوى المهبلية. إلا أن مخاوف تحول العصيات اللبنية إلى النوع الممرض والمقاوم للمضادات الحيوية، جعل الباحثين يلجؤون إلى أنواع بكتيرية أخرى تستعمل في البروباوتك والعلاجات الأخرى (Nawaz *et al.*, 2011; Larsson and Flach, 2022; (Jabbar and Salman, 2023).

7-4 متوسط الأنتريوكينات المختلفة بين المجموعات المدروسة

من نتائج الدراسة الحالية، ظهرت مستويات الأنتريوكينات IL-6 و IL-8 و IL-10 في مصل النساء المصابات ببكتريا *N. gonorrhoeae* عالياً جداً مقارنة مع مجموعة السيطرة Control وكالاتي جدول 4-7 والأشكال (4-6، 4-7، 4-8):

جدول 4-7: متوسط مستوى الأنتريوكينات في النساء المصابات ببكتريا *N. gonorrhoeae* مقارنة مع مجموعة السيطرة

Parameters	Mean±S.E		p. value
	Control NO=30	Patients NO=30	
IL-6(pg/ml)	7.09±1.12	47.11±1.69	0.0001
IL-8(pg/ml)	311.47±14.63	1615.53±197.16	0.0001
IL-10(pg/ml)	41.71±3.03	164.50±17.24	0.0001

يتم تنظيم دفاعيات المضيف ضد بكتريا *N. gonorrhoeae* جزئياً بواسطة السايوتوكينات cytokines التي تنتجها الخلايا للمفاوية وخلايا البلعمة phagocytes والخلايا الظهارية Epithelial cells. فالسايوتوكينات الالتهابية Inflammatory cytokines مثل IL-6 و IL-8 و IL-10 تنتج في الإفرازات الموضعية والمصل خلال إلتهابات الغشاء المخاطي المتواجدة فيها ببكتريا *N. gonorrhoeae* وهذا ما تم ملاحظته في نتائج الدراسة الحالية، إذ لوحظ ارتفاعاً عالياً في مستوى IL-6 و IL-8 و IL-10، وبالتالي فإن نتائج الدراسة الحالية تتوافق تماماً مع نتائج الدراسات العالمية (Belcher *et al.*, 2023). إذ تعد الخلايا الظهارية المصدر الرئيسي لأنتاج IL-6 و IL-8 خلال المراحل الحادة من المرض، والتي تعد كنواتج الاستجابة المناعية ضد

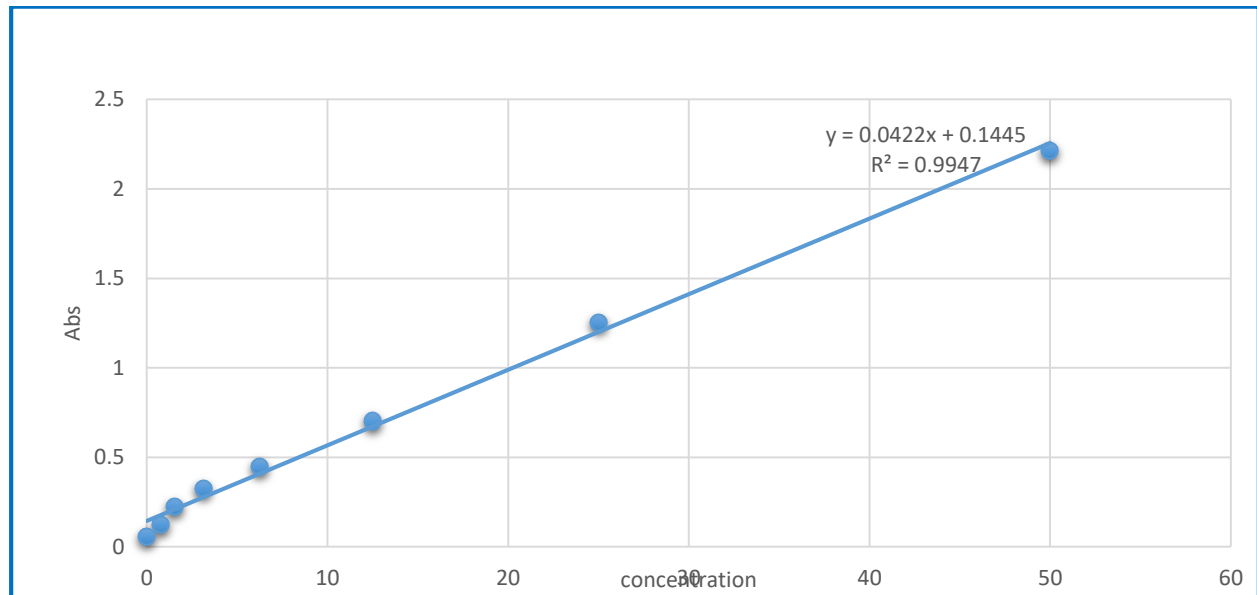
بكتريا *N.gonorrhoeae*، مما يؤدي الى توسع الأوعية الدموية Vasodilation وإنتاج البروستاغلاندين (Russel, 2021).

من جهة اخرى، لم تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الباحث Zhang وآخرون في عام 2021، إذ وجد أن مستويات IL-6 وعامل التنخر الورمي Tumor Necrosis Factor قد انخفضت في الإفرازات المهبلية في أنث الفئران المصابات ببكتريا *N. gonorrhoeae*، وفسر الباحث أن سبب إنخفاض مستويات IL-6 في الفئران يعود الى زيادة مستويات هرمون البروجسترون الذي يثبط إنتاج IL-6 (Zhang et al., 2021). في حين وجد الباحث Schlievent وآخرون في عام 2022، أن كلاً من *N.gonorrhoeae* و *Lactobacillus spp* لا يحفز على إنتاج IL-8 في حال عدم تحفيز CD40، وبالتالي لا يحدث تلف وموت الخلايا الطلائية المهبلية (Schlievent et al., 2022). إما الباحث Garrett وآخرون في عام 2021، توصلوا إلى أن مستويات IL-8 قد أزدادت بشكل ملحوظ في النساء المصابات ببكتريا السيلان البنية، أما مستوى IL-6 فكان أقل مقارنة مع مجموعة السيطرة (الأصحاء) للنساء اليافعات في جنوب افريقيا. أثناء العدوى ببكتريا *N.gonorrhoeae* تتلقى الخلايا العدلة Neutrophils إشارات signals من قبل الكيموكينات chemokines ويتم إنتاج سايتوكينات أخرى لتحفيز خلايا مناعية أخرى، لذا هناك العديد من الدراسات قد ركزت على هذا الجانب، ولاحظ الباحثون زيادة في IL-8 أو قلة في مستوياته في الإفرازات المهبلية والمصل، ويعتمد ذلك على مدى الاستجابة المناعية وكفاءة الجهاز المناعي وعمر النساء المصابات، والعرق Race والمنطقة الجغرافية، وأصابة النساء ببكتريا مختلطة Mixed infection أو تواجد بكتريا السيلان البنية مع فايروسات كما هو الحال مع مرضى الكورونا والمصابين بالايذ (Ragland and Criss, 2019). كما أظهرت نتائج الباحث Ortiz وآخرون في عام 2015، أن بكتريا *N.gonorrhoeae* قادرة على تثبيط الاستجابة المناعية وبمستويات مختلفة، إذ بإمكانها تثبيط فعالية الخلايا اللمفاوية البائية B-Lymphocyte والخلايا اللمفاوية التائية T-Lymphocyte والخلايا المقدمة للمستضد

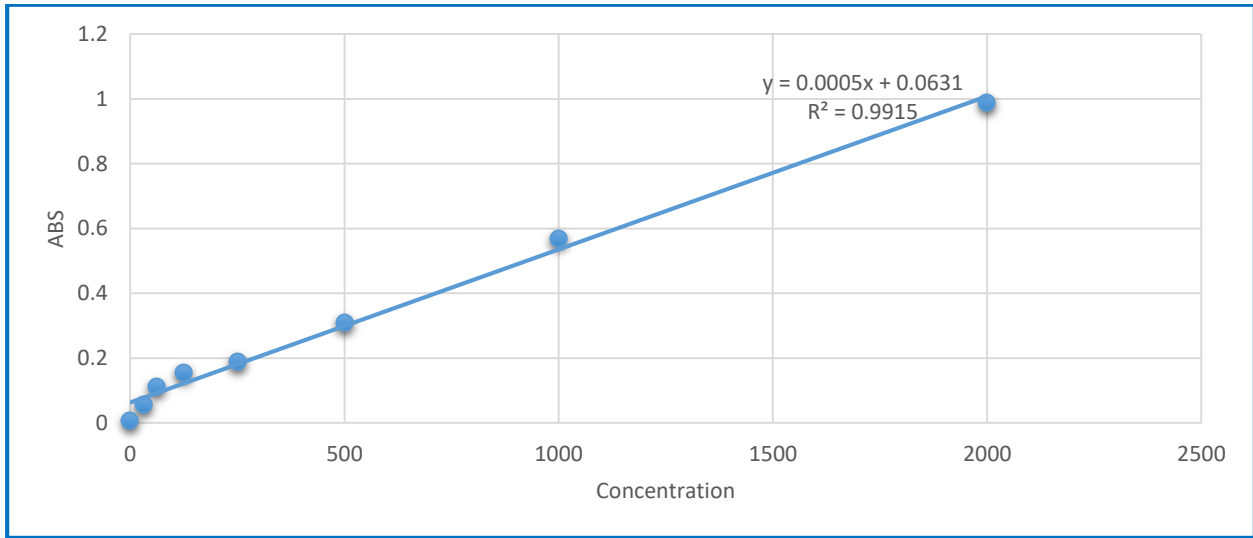
Antigen presenting cells، وبالتالي فإن مستويات IL-10 تقل (Liu *et al.*, 2013) ومن المثير للأهتمام، أن IL-10 يمكن تحفيزه بقوة بطريقة تعتمد على مقدار الجرعة عند الإصابة ببكتريا السيلان البنية، إذ تم أثبات تحفيز IL-10 بواسطة *N.gonorrhoeae* من خلال دراسة أجراها العديد من الباحثين (Liu *et al.*, 2013; Ortiz *et al.*, 2015; Penaloza *et al.*, 2018).

4-7-1 تفسير النتائج Interpretation of the results

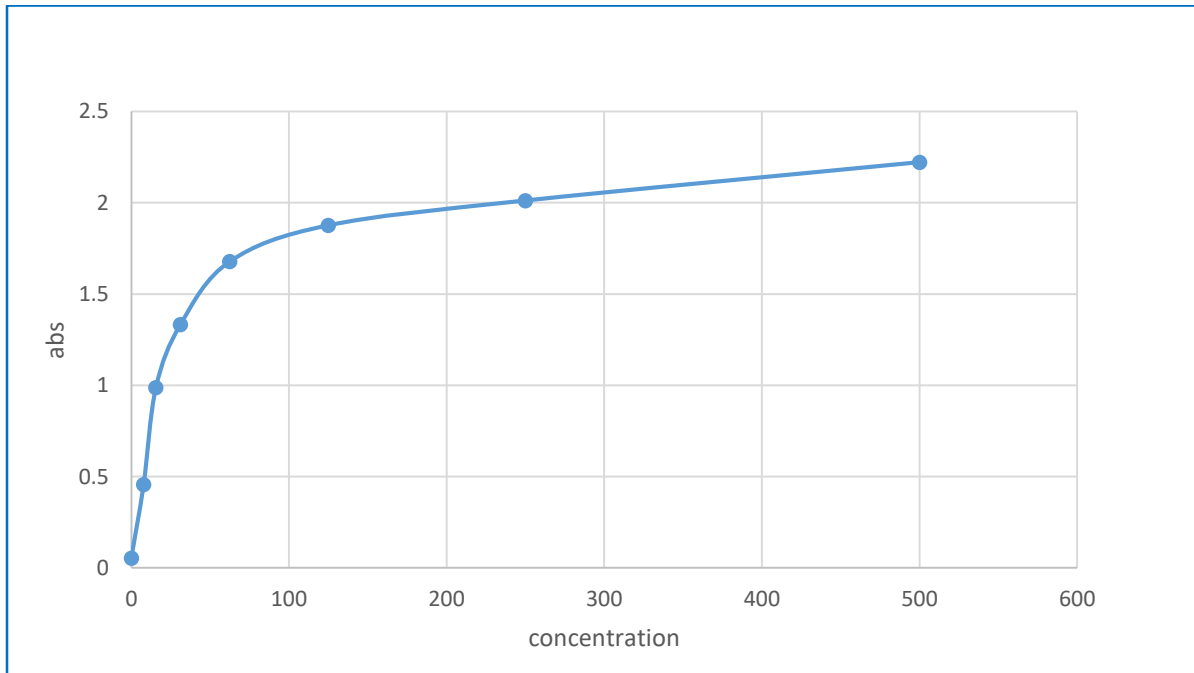
تم رسم الكثافة الضوئية (OD) لكل معاير calibrator (المحور Y) مقابل قيم التركيز المقابلة (corresponding concentration values) في Unit/ ml (المحور X) لإنشاء منحنى قياسي (standard curve) للتحليل الكمي (quantitative analysis). تم تركيب إحداثيات (log/lin) (coordinates)، فضلاً عن أربعة معلمات four-parameter. حسبت نتيجة تراكيز الجسم المضاد antibody concentrations المعبر عنها بوحدة U/ml من OD لكل عينة شكل 4-6 و 4-7 و 4-8.



شكل 4-6: المنحنى القياسي (standard curve) لحساب تراكيز الجسم المضاد المعبر عنها بوحدة U/ml من OD لكل عينة لانتراكين 6.



شكل 4-7: ال منحنى القياسي (standard curve) لتهاب تراكيز الجسم المضاد المعبر عنها بوحدة U/ml من OD لكل عينة لانتروكين 8.

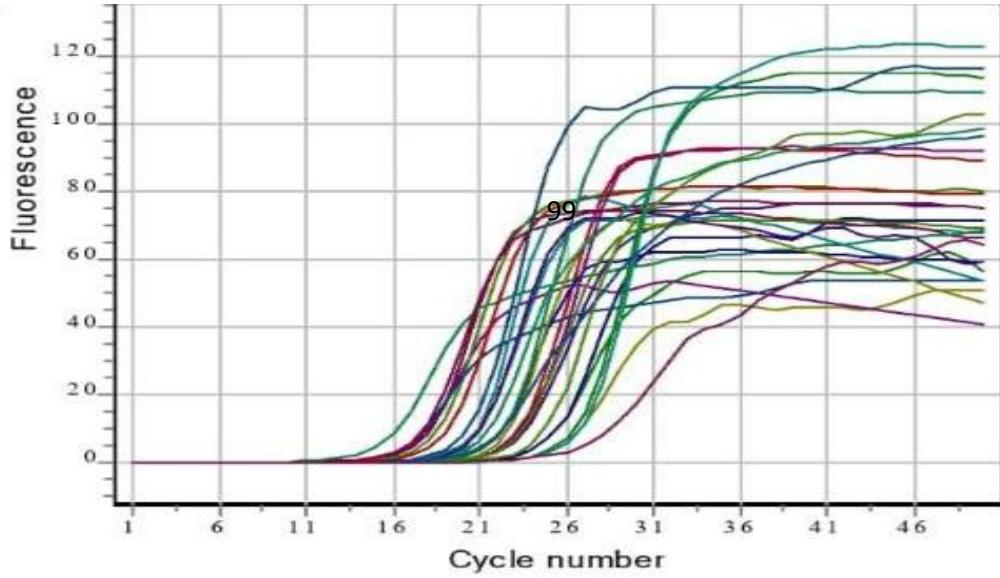


شكل (4-8) ال منحنى القياسي (standard curve) لحساب تراكيز الجسم المضاد المعبر عنها بوحدة U/ml من OD لكل عينة لانتروكين 10

8-4 تفاعل البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي RT-PCR

1-8-4 استخلاص الـ RNA لتفاعل البلمرة المتسلسل العكسي الكمي

تم استخلاص الحمض النووي الريبي من العزلات بدون معاملة، إستخراج إجمالي الحمض النووي الريبي باستخدام TM TRIZOL كان تركيزه من 62.5 إلى 240 نانوغرام / ميكروليتر وشكل 4-10 يوضح منحنى *16S rRNA*.



شكل (4-9): يوضح التعبير الجيني لجين *16srRNA*

2-8-4 التعبير الجيني لجينات *opa* و *TfpC* و *porA*

في هذه الدراسة، حللت النتائج باستخدام جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي RT-PCR كتعبيراً عن جينات *opa* و *TfpC* و *porA*، وأستخدم *16s RNA* كجينات للتعبير الثابت للمقارنة (Housekeeping gene)، إذ أشارت النتائج إلى ارتفاع في التعبير الجيني في الجينات الثلاثة مقارنة بالعينة السيطرة (Control). في حين لوحظت الفروقات بين الجينات، إذ أعطى جين *TfpC* أعلى تعبير جيني 441.47 مقارنة بالجينين *opa* و *porA* ال تي أعطت 100.723 و 71.02 على التوالي. كما

هو موضح في الجداول الآتية (جدول 8-4 و 9-4 و 10-4 و 11-4 و 12-4 و 13-4). والأشكال (4-4-

10 و 11-4 و 12-4

جدول 8-4: قيم حد العتبة لجين *opa gene*

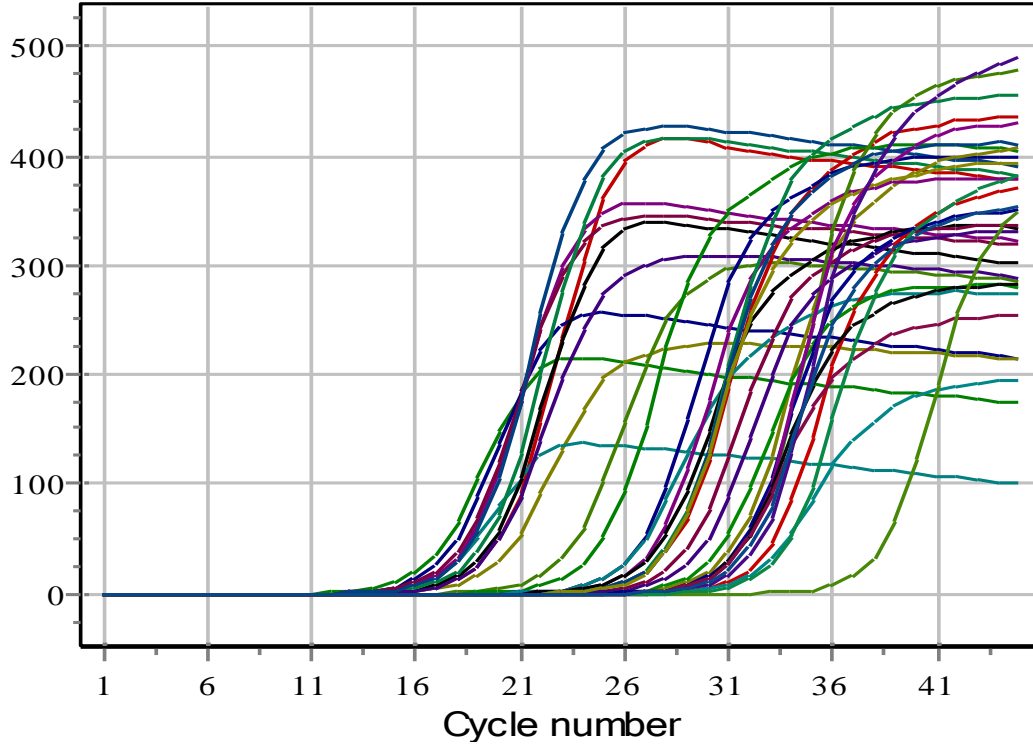
NO.	CT	DCT	DDCT	Fold change	FP/FC
1	22.7	8.1	-8.59	385.3431673	18.00669006
2	22	12	-4.69	25.8125363	1.206193285
3	20.9	9.8	-6.89	118.6032719	5.542208968
4	16.2	5.1	-11.59	3082.745339	144.0535205
5	23.8	12.1	-4.59	24.08394796	1.125418129
6	21.2	11.8	-4.89	29.65081798	1.385552242
7	19.1	8.3	-8.39	335.4607114	15.67573418
8	15.7	3.4	-13.29	10015.86915	468.0312689
9	16.6	9.9	-6.79	110.6607656	5.171063813
10	13.1	9.5	-7.19	146.0177556	6.823259609
11	20.5	10.4	-6.29	78.24897777	3.656494288
12	16.4	7.8	-8.89	474.4130877	22.16883587
13	15.2	4.5	-12.19	4672.56818	218.3443075
14	24.6	7.3	-9.39	670.9214228	31.35146835
15	21	8.3	-8.39	335.4607114	15.67573418
16	20.1	6.3	-10.39	1341.842846	62.70293671
17	16.4	2.6	-14.09	17438.64107	814.8897696
18	18.5	4.1	-12.59	6165.490677	288.107041
19	14.5	2.4	-14.29	20031.73831	936.0625378
20	19.8	6.3	-10.39	1341.842846	62.70293671
21	28.8	13.8	-2.89	7.412704495	1
22	32.9	23.5	6.81	0.008912217	1
23	29.2	22.9	6.21	0.013508394	1
24	30.4	17.6	0.91	0.532185091	1
25	30.3	19	2.31	0.20166044	1
26	32.1	18.7	2.01	0.248273124	1
27	23	12.5	-4.19	18.25221945	1
28	25.9	18.5	1.81	0.285190929	1
29	23.7	9.8	-6.89	118.6032719	1
30	23	10.6	-6.09	68.11969168	1

جدول 4-9: متوسط حد العتبة للجين

Mean of cycle threshold (Ct, Δ Ct, $\Delta\Delta$ CT) of *opa* gene

Groups	Δ CT (Mean \pm SE)	$\Delta\Delta$ CT (Mean \pm SE)	Fold Change ($2^{\Delta\Delta$ CT) (Mean \pm SE)	FP/FC
Control (<i>Neisseria weaveri</i>)	12.73 \pm 2.61	0.822 \pm 0.634	4.32 \pm 2.75	1
Patient (<i>N. gonorrhoeae</i>)	8.48 \pm 2.23	-4.14 \pm 1.32	618.687 \pm 17.83	100.723
P value	0.0546	0.01	0.0000	0.0000*

p-value \leq 0.01)*



شكل 4-10: منحنى التعبير الجيني لجين *opa* gene

10-4: قيم حد العتبه لعينات الجين porA

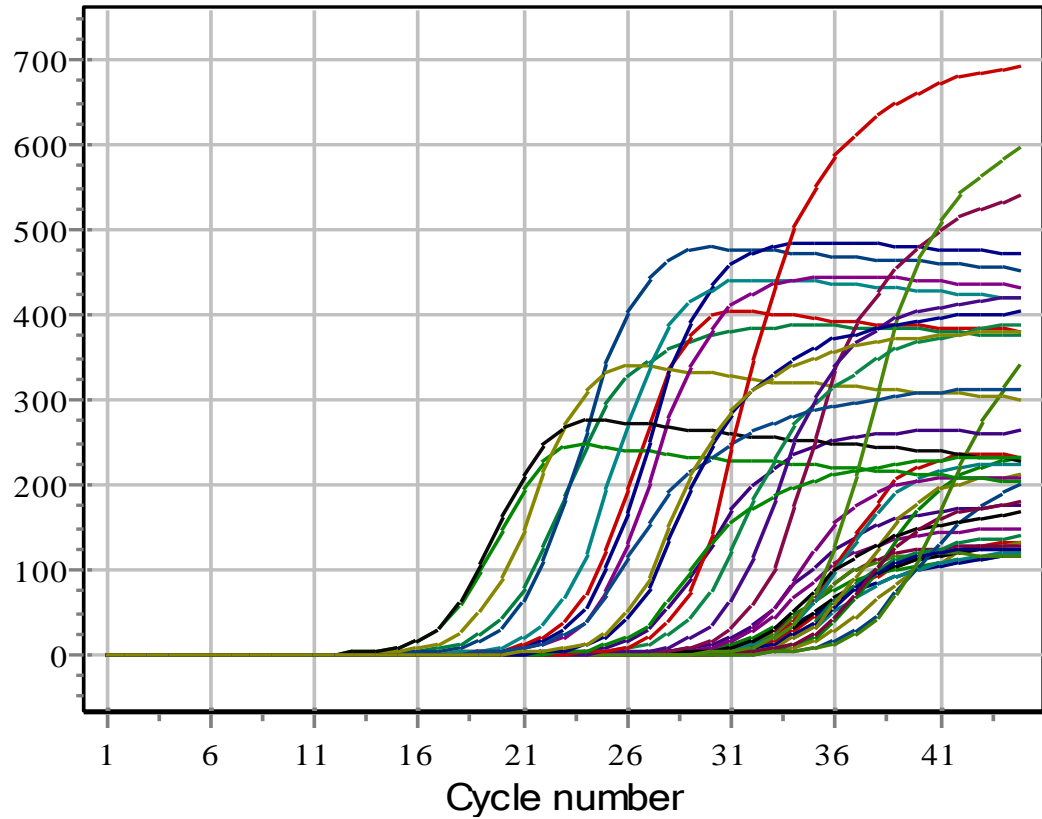
NO.	CT	DCT	DDCT	Fold change	FP/FC
1	17.3	2.7	-12.65	6427.31293	996.4826248
2	18.3	8.3	-7.05	132.5139103	20.54479229
3	17.6	6.5	-8.85	461.4402369	71.54112199
4	17.4	6.3	-9.05	530.055641	82.17916915
5	16.5	4.8	-10.55	1499.223753	232.4377911
6	19.9	10.5	-4.85	28.8400148	4.471320125
7	17.3	6.5	-8.85	461.4402369	71.54112199
8	16.5	4.2	-11.15	2272.398279	352.3098107
9	26.2	19.5	4.15	0.056328154	0.008733047
10	25.6	22	6.65	0.009957505	0.001543799
11	20.3	10.2	-5.15	35.50622311	5.504840792
12	21.7	13.1	-2.25	4.75682846	0.737492784
13	21.4	10.7	-4.65	25.10669113	3.892510253
14	22.3	5	-10.35	1305.150082	202.34885
15	21	8.3	-7.05	132.5139103	20.54479229
16	21.2	7.4	-7.95	247.2797002	38.33793802
17	23	9.2	-6.15	71.01244621	11.00968158
18	19	4.6	-10.75	1722.155858	267.0009083
19	25	12.9	-2.45	5.464161027	0.847156748
20	20.5	7	-8.35	326.2875206	50.5872125
21	31.1	16.1	0.75	0.594603558	1
22	24.2	14.8	-0.55	1.464085696	1
23	25	18.7	3.35	0.098073012	1
24	23	10.2	-5.15	35.50622311	1
25	24.3	13	-2.35	5.098242509	1
26	27.5	14.1	-1.25	2.37841423	1
27	24.4	13.9	-1.45	2.732080514	1
28	28.2	20.8	5.45	0.022876339	1
29	25.2	11.3	-4.05	16.56423878	1
30	33	20.6	5.25	0.026278013	1

جدول 4-11: متوسط حد العتبة للجين

Mean of cycle threshold (Ct, Δ Ct, $\Delta\Delta$ CT) of *porA* gene

Groups	Δ CT (Mean \pm SE)	$\Delta\Delta$ CT (Mean \pm SE)	Fold Change ($2^{\Delta\Delta$ CT) (Mean \pm SE)	FP/FC
Control (<i>Neisseria weaveri</i>)	9.83 \pm 2.78	0.872 \pm 0.43	2.38 \pm 1.22	1
Patient (<i>N. gonorrhoeae</i>)	4.85 \pm 1.88	-4.23 \pm 0.788	236.34 \pm 19.33	71.02
P value	0.063	0.0223	0.000	0.000

p-value \leq 0.01)*



شكل 4-11: منحنى التعبير الجيني لجين *porA* gene

12-4: حد العتبة لتعبير الجيني لجين *TFpC gen*

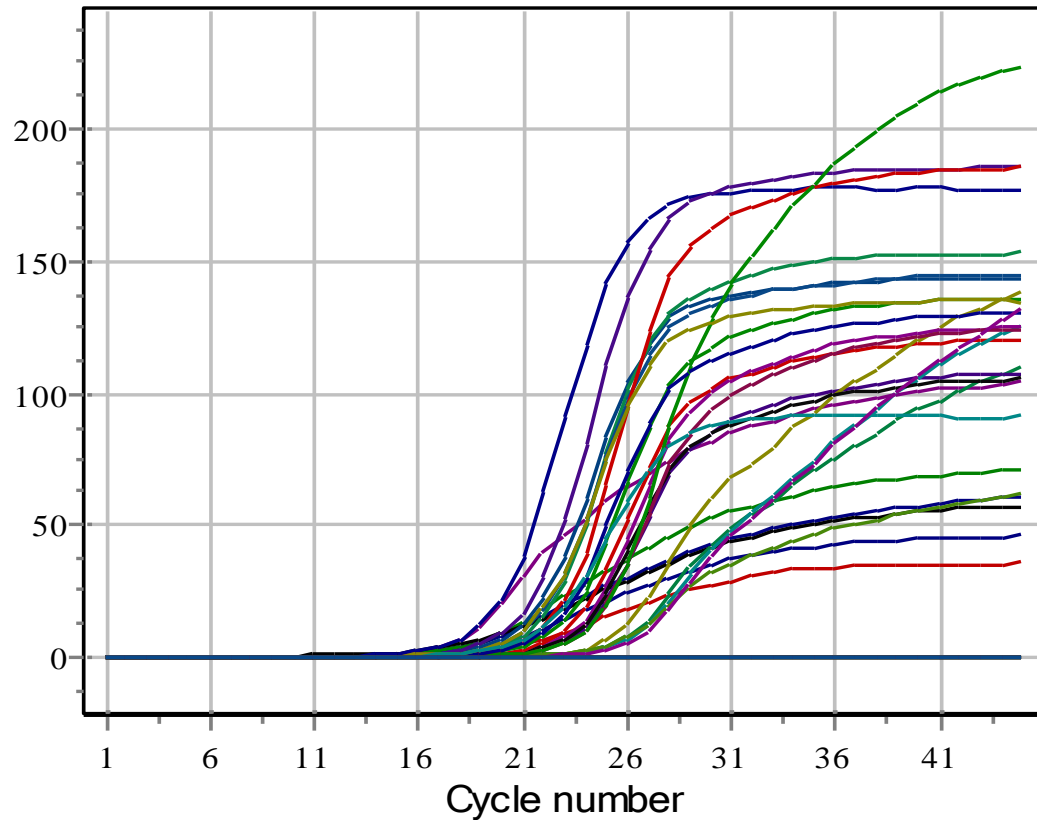
NO.	CT	DCT	DDCT	Fold change	FP/FC
1	20.4	5.8	-5.13	35.01739844	9.727055122
2	19.7	9.7	-1.23	2.345669898	0.651574972
3	18.6	7.5	-3.43	10.77786861	2.993852393
4	13.9	2.8	-8.13	280.1391875	77.81644098
5	21.5	9.8	-1.13	2.188587403	0.607940945
6	18.9	9.5	-1.43	2.694467154	0.748463098
7	16.8	6	-4.93	30.48441594	8.467893316
8	13.4	1.1	-9.83	910.1749055	252.8263626
9	14.3	7.6	-3.33	10.056107	2.793363054
10	10.8	7.2	-3.73	13.26911273	3.685864648
11	18.2	8.1	-2.83	7.110741449	1.975205958
12	14.1	5.5	-5.43	43.11147446	11.97540957
13	12.9	2.2	-8.73	424.6116075	117.9476687
14	22.3	5	-5.93	60.96883187	16.93578663
15	18.7	6	-4.93	30.48441594	8.467893316
16	17.8	4	-6.93	121.9376637	33.87157326
17	14.1	0.3	-10.63	1584.706553	440.1962648
18	16.2	1.8	-9.13	560.278375	155.632882
19	12.2	0.1	-10.83	1820.349811	505.6527253
20	17.5	4	-6.93	121.9376637	33.87157326
21	26.2	11.2	0.27	0.829319546	1
22	25.6	16.2	5.27	0.025916236	1
23	20.3	14	3.07	0.11907975	1
24	21.7	8.9	-2.03	4.084048503	1
25	21.4	10.1	-0.83	1.777685362	1
26	22.3	8.9	-2.03	4.084048503	1
27	21	10.5	-0.43	1.347233577	1
28	21.2	13.8	2.87	0.136786713	1
29	23	9.1	-1.83	3.555370725	1
30	19	6.6	-4.33	20.11221399	1

جدول 4-13: متوسط حد العتبة للجين *Tfpc*
 Mean of cycle threshold (Ct, Δ Ct, $\Delta\Delta$ CT) of *TFpC* gene

Pvalue \leq 0.01*

Groups	Δ CT (Mean \pm SE)	$\Delta\Delta$ CT (Mean \pm SE)	Fold Change ($2^{\Delta\Delta$ CT) (Mean \pm SE)	FP/FC
Control (<i>Neisseria weaveri</i>)	13.12 \pm 3.63	0.001 \pm 0.00	5.65 \pm 0.14	1
Patient (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	6.48 \pm 2.23	-6.81 \pm 1.74	2782 \pm 34.73**	441.47
P value	0.0433*	0.01*	0.0000*	0.0000*

p-value \leq (0.01)*



شكل 4-12: منحنى التعبير الجيني لجين *TFpC* gene

إشارة الى نتائج الجداول السابقة انخفاض في قيمة الـ CT (حد عتبة الدورة cycle threshold)، حيث تشير قيمة عتبة الدورة (CT) الى اول دورة يبدأ فيها الجين بالتعبير، ومن خلال الجداول السابقة كانت قيمة الـ CT منخفض، دلالة على تعبير جيني عالي، يتم من خلالها رصد البكتريا بعد عدة دورات ووجود كمية كبيرة من البكتريا مقارنة بالسيطرة القياسية (Control). تعد قيمة CT بمثابة علامة لتحديد وجود البكتريا ومدى العدوى في معظم الحالات، وقد تختلف قيمة CT اعتمادا على عوامل مثل طريقه جمع العينات والمصدر والفجوة الزمنية في الإصابة بالعدوى، ويتميز تفاعل البلمرة المتسلسل للنسخ العكسي (RT-qPCR) عن طرق أخرى للتعبير الجيني لدقتها وحساسيتها ونتائجه السريعة (Derveaux *et al.*, 2010). ضخمت الجينات بجهاز تفاعل البلمرة المتسلسل العكسي، لحساب قيمة CT. إن قيم CT العالية تعطي تعبير جيني منخفض وانخفاض CT تشير القيمة إلى تعبير جيني مرتفع. وان الجين للعينة القياسية المستخدم في الدراسات الجزيئية يكون تعبيرها ثابتاً في الخلايا أو الأنسجة في ظروف مختلفة (Schmittgen *et al.*, 2008).

جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع بعض الدراسات الدولية، إذ وجد Verma وآخرون في عام 2012 أنه نظراً للقيمة التنبؤية الأيجابية الضعيفة positive predictive value لأختبار تضخيم الحمض النووي (NAATS) Nucleic acid amplification tests لمرض السيلان الجنسي عند تطبيقه في بيئة قليلة الانتشار، لذا تستخدم تقنية PCR للكشف عن أحد جينات البكتريا ككشف سريع في العينات السريرية (Verma *et al.*, 2012). ويعد التحري عن *N.gonorrhoeae* باستخدام الأوساط الزرعية الانتقائية والأغنائية أمراً يستهلك الكثير من الوقت والجهد، لذا يلجأ العديد من الباحثين وذوي الاختصاص في معظم دول العالم المتقدمة بالكشف عن *N.gonorrhoeae* باستعمال تقنية الـ RT-PCR. وقد قام الباحث Oree وآخرون في عام 2022 بأجراء دراسة في مستشفى الملك أدورد الثامن في المملكة المتحدة United Kingdom والتي تضمنت فحص 307 من النساء ما قبل الولادة وأخذ عينات منهن (مسحات من عنق

الرحم)، زُرعت إحدى المسحات والأخرى استعملت للتحري عن جين *opa*. أظهر *16S rRNA* أعلى حساسية بنسب 62%، يليه جين *opa* بنسبة 38%، أما الزرع الإيجابي فأعطى نسبة عزل 7.8% (Oree et al., 2021). وفي دراسات حديثة متطورة، بدأت الشركات بأنتاج عدد تشخيصية لتشخيص *16S rRNA* وجين *porA* معا، وهذا يسمى التحري المزدوج Dual target detection وذلك لأهميته في التحري عن بكتريا السيلان الجنسي في العينات المختلفة، حتى لو كانت بأعداد قليلة جداً في النماذج السريرية مثل الأدرار ومسحات المهبل وعنق الرحم (Zheng et al., 2022). وبالتالي فإنه يمكن تشخيص بكتريا *N.gonorrhoeae* في حال وجود مزيج من البكتريا الممرضة الأخرى في العينة مثل *Lactobacillus* و *Chlamydia trachomats* (Lovett et al., 2022 ; Unemo et al., 2019). ومنذ ظهور طرق التشخيص الجزيئية، ظهرت معها النتائج السلبية الكاذبة False positive والنتائج الإيجابية الكاذبة False negative مقارنة مع نتائج الزرع على الأوساط الزرعية المختلفة للنايسريا. كما ترتبط بعض أنواع الناييسريا المتعايشة commensal *Neisseria* ارتباطاً وثيقاً بالنايسريا البنية، مما يؤدي الى حدوث تفاعل تصالبي (cross-reaction) عند استعمال تقنية PCR. لذا بدأ الباحثين باللجوء الى تقنية RT-PCR للتحري عن جينات *porA* و *Tfcp* (Hjelmevoll et al., 2006 ; Liu et al., 2017). أعضاء جنس *Neisseria* بما ذلك مسببات الأمراض البشرية النيسيرية والسحائية يعبرون express عن عضو واحد one membrane من البورينات porins، وقد لاحظ الباحثان Feavers و Maiden في عام 1998 (Feavers and Maiden, 1998) والباحثون (Liu et al., 2017) أنه قد ينتج فقدان في تعبير الجين *porA* في المكورات البنية، وهذا ناتج عن الطفرات الوراثية في منطقة البروموتور Promotor region والتي تمنع عملية الاستنساخ Transcription والطفرات الوراثية نوع Fram shift mutation في منطقة التشفير coding region للجين *porA*، ولم يتمكن الباحث من العثور على بروتينات Por في السلالات البكتيرية للنايسريا البنية التي تستعمر مناطق الجهاز التنفسي العلوي لكن لبعض السلالات التي تستعمر أو

تستوطن الجهاز البولي التناسلي خاصة عند الرجال مقارنة مع النساء، وجد أنها تمتلك جينات *porA*. بين الباحثون Alcott وآخرون في عام 2022، أن بكتريا السيلان أصبحت أكثر إمرضية في الكثير من الولايات المتحدة الأمريكية بسبب تزايد أعداد الأصابات وزيادة مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية التي تستعمل في العلاج ضد الناييسريا. وقد أظهرت نتائج الباحثين أن البكتريا المعزولة من المريضات في أمريكا تعد متغيرة الطور *phase variable* وذلك بسبب تعبير البكتريا لبروتين *OPa* المتكونة من المواد اللاصقة *adhesins* والغازيات *invasins* والتي لها دوراً رئيساً في تحطيم الخلايا العدلة. وقد تم الاستفادة من هذه الصفة في أنتاج اللقاحات ضد بكتريا الناييسريا (Kurzyk and Harrisin, 2023).

كما أظهرت الدراسات الحديثة وجود جينات تمتلكها بكتريا *N. gonorrhoeae* لها دور في حدوث الأصابة ومقاومة مناعة المضيف، إذ وجد أن الناييسريا البنية تعتمد على النوع الرابع من الشعيرات *Type IV pili (T4P)* لتعزيز استعمال المضيف البشري والتسبب في العدوى المنقولة جنسياً. ولقد وجد الباحثون أن عمليات البحث في مجال المعلومات الحيوية *Bioinformatic searches* الى أن ليست كل البكتريا المعبرة عن البيلين *pilin expression* من النوع الرابع تحتوي على جينات متعامدة *orthologous genes* ومع تلك الشعيرات، فقد تم اكتشاف بروتيناً جديداً يسمى *Tfpc* وهو بروتين ضروري للحفاظ على الشعيرات النوع الرابع على سطح الخلية البكتيرية تُعد الدراسات قليلة جداً حول جين *Tfpc* لكونه مكتشفاً حديثاً من قبل Hu وجماعته في عام 2020 (Hu *et al.*, 2020). في الجدول (4-14) يوضح الفروقات المعنوية بين جينات عوامل ضاروه بكتريا السيلان حيث لوحظ وجود داله احصائيه بين جينات الضراوه .

جدول 4-14 الفروقات المعنوية بين جينات عوامل ضرواة بكتريا السيلان

Virulence genes of <i>N.goneerhea</i>	Fold Change ($2^{\Delta\Delta CT}$) (Mean±SE)	p-value
OpaA	4.32±2.75	0.0000*
TfPc	2782±34.73**	0.0000*
PorA	236.34±19.33	0.0000*

4-9العلاقة بين بكتريا السيلان *Neisseria gonorrhoea* واجناس بكتريا العصيات اللبنية

Lactobacillus spp

يوضح جدول 4-15 الاجناس التابعة لبكتريا العصوية اللبنية *Lactobacillus spp*

والمرافقة لبكتريا السيلان *Neisseria gonorrhoea* وكذلك في جدول 4-16 يبين النسب المئوية لبكتريا

العصوية اللبنية *Lactobacillus spp* في عينات المسحات المرضية المهبلية والمعزولة من النساء اللذين

يعانون من مرض السيلان *gonorrhoea* والتي ظهرت عليهن الأعراض والعلامات السريرية للمرض حيث

سجلت بكتريا *Lactobacillus acidophilus* اعلى نسبة % (43.33) 13 *Lactobacillus acidophilus*

واقل نسبة لبكتريا *Lactobacillus fermentum* وبنسبة (13.33)% جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة

مع Amant حيث تم عزل بكتريا اللبنية العصوية الحمضية *Lactobacillus acidophilus* وبكتريا

Lactobacillus crispatus عند الاس الحامضي 5.8pH والتي تم عزلها على وسط *Blood agar* حيث

تم دراسة تأثير مادة H_2O_2

(Amant et al., 2002) والمفروزة من قبل اجناس البكتريا العصوية اللبنية وتأثيرها على بكتريا السيلان. اما

دراسة (Claudio et al., 2017) جاءت غير متفقه مع دراستنا الحالية حيث سجلت

اجناس البكتريا العسوية اللبنيّة *Lactobacillus gasseri* و *Lactobacillus crispatus* اعلى نسبة تواجدت مع بكتريا السيلان *Neisseria gonorrhoea*، و عملت على اختزال يكتريا الناييسريا و بنسبه 100% عند $pH > 4$ خلال 60 دقيقه وأخيراً يرجع سبب اختلاف في اجناس العصيات اللبنيّة المرافقة لبكتريا السيلان الى تفاوت افراز ماده H_2O_2 السامه لبكتريا السيلان وتحويل ماده الجلايكوجين glycogen الى lactic acid بمساعده الهرمونات الأنثوية وكذلك مستوى الاس الهيدروجيني pH وإنتاج ماده البكتريوسين Bacitracin وكذلك تأثير بعض العوامل المناعية (Sandra Borges.,2014)

جدول 4-15: العلاقة بين بكتريا *Neisseria gonorrhoea* وبكتريا العصوية اللبنية *Lactobacillus spp*

No	Present <i>N. gonorrhoea</i>	<i>Lactobacillus spp</i>
1	+	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2	+	<i>Lactobacillus plantarum</i>
3	+	<i>Lactobacillus Paracasei</i>
4	+	<i>Lactobacillus fermentum</i>
5	+	<i>Lactobacillus Paracasei</i>
6	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
7	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
8	+	<i>Lactobacillus plantarum</i>
9	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
10	+	<i>Lactobacillus fermentum</i>
11	+	<i>Lactobacillus plantarum</i>
12	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
13	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
14	+	<i>Lactobacillus Paracasei</i>
15	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
16	+	<i>Lactobacillus plantarum</i>
17	+	<i>Lactobacillus fermentum</i>
18	+	<i>Lactobacillus Paracasei</i>
19	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
20	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
21	+	<i>Lactobacillus plantarum</i>
22	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
23	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
24	+	<i>Lactobacillus Paracasei</i>
25	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
26	+	<i>Lactobacillus Paracasei</i>
27	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
28	+	<i>Lactobacillus fermentum</i>
29	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
30	+	<i>Lactobacillus plantarum</i>

جدول 4-16: النسبة المئوية لبكتريا العصويه اللبنيه *Lactobacillus spp*

No.	<i>Lactobacillus spp</i>	%	Mean ± SD	P-value
1	<i>Lactobacillus Paracasei</i>	7(23.33)	7.50±3.87	0.03*
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	13(43.33)		
3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	4(13.33)		
4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	6(20)		
	Total	30(100)%		

pvalue≤0.05)*

الاستنتاجات و التوصيات

Conclusions

&

Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

1. بينت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة عزل بكتريا *N. gonorrhoeae* المعزولة من افرازات مهبلية مائية في مظهرها وخضراء اللون أو صفراء، إذ تم عزل بكتريا *N. gonorrhoeae* كنتائج إيجابية.
2. كانت جميع العينات الموجبة لبكتريا السيلان الجنسي والعينات السالبة أيضا حاوية على البكتريا العصوية *Lactobacillus spp* وحيث سجلت مجموعه من الاجناس البكتريا العصويه اللبنيه التي كانت مرافقه لبكتريا السيلان .
3. كانت اعلى نسبة الأصابة ببكتريا *N. gonorrhoeae* قد سجلت في صفوف النساء البالغات .
4. أظهرت العزلات المستعملة في هذه الدراسة تبايناً واضحاً في مقاومتها للمضادات الحيوية، وكانت أعلى مقاومة للمضاد لعزلات بكتريا *N. gonorrhoeae* مقاومة للمضادات الحيوية لكل من Ceftazidime، Ceftriaxone، Tetracycline حين كانت أقل بنسبة مقاومة تجاه Azithromycin و Ciprofloxacin.
5. أظهرت الدراسة الحالية ، مستويات الأنترليوكينات IL-6 و IL-8 و IL-10 في مصل النساء المصابات ببكتريا *N. gonorrhoeae* عالياً جداً مقارنة مع مجموعة السيطرة Control .
6. أظهرت نتائج هذه الدراسة بأستعمال تقنية RT - PCR للتحري عن جينيات *opa* و *TfpC* و *porA* ، النتائج بأستخدام جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي RT-PCR كتعبيراً عن الجينات ، وأستخدم *16S RNA* كجينات للتعبير الثابت للمقارنة (Housekeeping gene) ، إذ أشارت النتائج إلى ارتفاع في التعبير الجيني في الجينات الثلاثة مقارنة بالعينة السيطرة (Control).

التوصيات Recommendations

1. دراسه العلاقه بين بكتريا *N. gonorrhoeae* وعلاقتها ب *L. Acidophilus* التي لها القدرة بالتحكم بPH الوسط استخدام أوساط , chromo agar وأوساط زرعية أخرى اكثر أنتقائية بالعزل .
2. التحري عن انترليوكينات أخرى ودراسة دورها المناعي .
3. التحري عن جينات أخرى لها دوراً في ضراوة بكتريا *N. gonorrhoeae* وعلاقتها بالانترلوكينات.
4. دراسة أنواع من المضادات الحيوية التي تُعد أكثر أماناً وفعالية ضد بكتريا *N. gonorrhoea*. ودراسه مقاومتها للمضادات الحيوية.
5. عزل وتشخيص بكتريا المرضية المترافقة مع بكتريا *N. gonorrhoea* والمسببه Bacterial vaginosis.
6. عدم استخدام المضادات الحيوية التي تظهر بكتريا السيلان مقاومة عالية لها مثل Tetracyclin و Ceftazidime.

المصادر

References

References

- **Abdullahi A, Nzou SM, Kikuvi G, Mwau M.(2022)** *Neisseria gonorrhoeae* infection in female sex workers in an STI clinic in Nairobi, Kenya. PLoS ONE 17(2): e0263531.
- **Alcott AM, Werner LM, Baiocco CM, Belcher Dufrisne M, Columbus L, Criss AK. (2022).** Variable Expression of Opa Proteins by *Neisseria gonorrhoeae* Influences Bacterial Association and Phagocytic Killing by Human Neutrophils. *J Bacteriol.* 19;204(4): e0003522. doi: 10.1128/jb.00035-22. PMID: 35343795; PMCID: PMC9017356.
- **Alcott AM, Werner LM, Baiocco CM, Belcher Dufrisne M, Columbus L, Criss AK.** Variable Expression of Opa Proteins by *Neisseria gonorrhoeae* Influences Bacterial Association and Phagocytic Killing by Human Neutrophils. *J Bacteriol.* 2022 Apr 19;204(4):e0003522. doi: 10.1128/jb.00035-22. Epub 2022 Mar 28. PMID: 35343795; PMCID: PMC9017356.
- **Alcott, A. M., Werner, L. M., Baiocco, C. M., Belcher Dufrisne, M., Columbus, L., & Criss, A. K. (2022).** Variable Expression of *Opa* Proteins by *Neisseria gonorrhoeae* Influences Bacterial Association and Phagocytic Killing by Human Neutrophils. *Journal of Bacteriology*, 204(4), e00035-22.
- **AL-Douri I.M. , Abood R., (2008).** Mukleaf A. A., Hoom K. I. WOMEN'S INFERTILITY WITH GONORRHEA INFECTION IN BAGHDAD, *Journal of Techniques*; 21, Issue 3: 33-38.
- **Ali, R. and Ghaima ,K.(2022).** Molecular Detection of Some Sexually Transmitted Bacteria and *Trichomonas vaginalis* in Iraqi Married Couples, *Iraqi Journal of Biotechnology*, 21, No. 2, 136-144
- **Allen GP, Deao KM, Hill SA, Schipelliti SM, Tran T.** In vitro evaluation of antimicrobial resistance selection in *Neisseria gonorrhoeae*. *Int J*

Antimicrob Agents. 2021 Oct;58(4):106417. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106417. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34391903.

- **Al-Ouqaili, M. T. & Al-Kubaisy, M. S. H. (2008).** Crystalline biofilm produced by *Proteus mirabilis*: an overview on their formation assays and antimicrobials interaction. *Al-Anbar Medical Journal*, 6.
- **ANEJA, K. (2007).** Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology, New Age International.
- **Ansari A, Son D, Hur YM, Park S, You YA, Kim SM, Lee G, Kang S, Chung Y, Lim S, Kim YJ. (2023).** Lactobacillus Probiotics Improve Vaginal Dysbiosis in Asymptomatic Women. *Nutrients*. Apr 13;15(8):1862. doi: 10.3390/nu15081862. PMID: 37111086; PMCID: PMC10143682.
- **Armstrong BH, Linnios A, Lewis DA, Hogan T, Kundu R, Ray S, Shoushtari M, El Nasser J, Driscoll T, Lahra MM. (2018).** Is gentamicin a viable therapeutic option for treating resistant *Neisseria gonorrhoeae* in New South Wales? *Commun Dis Intell*. 2021 Feb 26;45. doi: 10.33321/cdi.2021.45.12. PMID: 33632090.
- **Ayalew, E . ; Fentaw, S . ; Ebrahim, S . ; Seyoum, E . ; Woldesenbet, Z . ; Wolde, M. (2022).** Comparison of syndromic versus laboratory-confirmed diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and *Treponema palladium*, infections at the selected health centers in Addis Ababa, Ethiopia. *Reprod Health*. Apr 2;19(1):88. doi: 10.1186/s12978-022-01395-w. Erratum in: *Reprod Health*. 2022 , 5;19(1):110.
- **Barbara Van Der Pol, PhD, MPH,*P Stephanie N. Taylor, MD,p Oliver Liesenfeld, MD,§ James A. Williams, BS,p and Edward W. Hook III,** Vaginal Swabs Are the Optimal Specimen for Detection of Genital Chlamydia trachomatis or *Neisseria gonorrhoeae* Using the Cobas 4800 CT/NG Test MD. *Sexually Transmitted Diseases & Volume 40, Number 3, March 2013.* Copyright © 2013 by the American Sexually Transmitted Diseases Association. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

- **Bai, X . ; Borrow, R . ; Bukovski ,S . ; Caugant, D.A . ; Culic ,D.; Delic, S . ; Dinleyici, E.C . ; Eloshvili , M . ; Erdósi , T . ; Galajeva , J . ; Křížová, P . ; Lucidarme , J . ; Mironov, K . ; Nurmatov ,Z . ; Pana, M . ; Rahimov, E . ; Savrasova , L . ; Skoczyńska, A . ; Smith, V . ; Taha, M. K . ; Titov, L . ; Vázquez , J . ; Yeraliyeva L.** Prevention and control of meningococcal disease: Updates from the Global Meningococcal Initiative in Eastern Europe. *J Infect.* 2019 Dec;79(6):528-541. doi: 10.1016/j.jinf.2019.10.018. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31682877.
- **Baron E-J., Jorgensen J Landry M-L. and Pheller M. (2007).** Manuel of Clinical Microbiology (9th ed). Washington, DC: ASM Press
- **Bertuccini L, Russo R, Iosi F, Superti F. (2017).** Effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* on bacterial vaginal pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol.* Jun;30(2):163-167. doi: 10.1177/0394632017697987. Epub 2017 Mar 1. PMID: 28580872; PMCID: PMC5806794.
- **Bettoni S, Maziarz K, Stone MRL, Blaskovich MAT, Potempa J, Bazzo ML, Unemo M, Ram S, Blom AM. (2021).** Serum Complement Activation by C4BP-IgM Fusion Protein Can Restore Susceptibility to Antibiotics in *Neisseria gonorrhoeae*. *Front Immunol.* 1; 12:726801. doi: 10.3389/fimmu.2021.726801. PMID: 34539665; PMCID: PMC8440848.
- **Belcher, T.; Rollier ,C.S, . ; Dold, C . ; Ross , J.D.C . ; MacLennan , C.A. (2023).**Immune responses to *Neisseria gonorrhoeae* and implications for vaccine development. *Front Immunol.* 2023 Aug 17;14:1248613. doi: 10.3389/fimmu.2023.1248613. PMID: 37662926; PMCID: PMC10470030.
- **Boiko, I . ; Stepas, Y . ; Krynytska, I. (2020).** Comparison of deferred and bedside culture of *Neisseria gonorrhoeae*: a study to improve the isolation of gonococci for antimicrobial susceptibility testing. *Iran J Microbiol.* ;12(3):216-222.

- **BROWN, A. E. & SMITH, H. R. (2005).** Microbiological applications. McGRAW-Hill Companies, 35, 217-224.
- **Buder S, Schöfer H, Meyer T, Bremer V, Kohl PK, Skaletz-Rorowski A, Brockmeyer N. (2019).** Bacterial sexually transmitted infections. *J Dtsch Dermatol Ges.*;17(3):287-315. doi: 10.1111/ddg.13804. PMID: 30920748.
- **Cabeza-Cabrerizo M., Cardoso A., Minutti C. M., Pereira da Costa M., Reis E Sousa C. (2021).** Dendritic cells revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 39, 131–166. doi: 10.1146/annurev-immunol-061020-053707
- **Cai S, Pan J, Duan D, Yu C, Yang Z, Zou J. (2020).** Prevalence of *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, and *Neisseria gonorrhoeae* in gynecological outpatients, Taizhou, China. *J Clin Lab Anal.* ;34(2):e23072.
- **Casino Pablo, López Asunción, Sara Peiró, Inés Terrones, Gemma Agustí, Daniela Terlevich, Daniel Asensio, Ana María Marqués and Núria Piqué (2023).** Use of Blood Powder (Ground and Irradiated) for the Manufacture of Chocolate Agar, *Int. J. Mol. Sci.*, 24(9), 7965; <https://doi.org/10.3390/ijms24097965>.
- **CDC- Sexually Transmitted Disease Surveillance, (2019).** Department of Health and Human Services, Atlanta, GA 2021.
- **CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance (2023).** <https://www.cdc.gov/std/statistics/2021/default.htm> (Accessed on April 28, 2023).
- **Chen A, Seifert HS. (2013).** Structure-function studies of the *Neisseria gonorrhoeae* major outer membrane porin. *Infect Immun.*;81(12):4383–4391. doi:10.1128/IAI.00367-13
- **Chen T, Xia C, Hu H, Wang H, Tan B, Tian P, Zhao X, Wang L, Han Y, Deng KY, Wei H, Xin HB. (2021).** Dysbiosis of the rat vagina is efficiently rescued by vaginal microbiota transplantation or probiotic combination. *Int J*

Antimicrob Agents. Mar;57(3):106277. doi:
10.1016/j.ijantimicag.2021.106277. Epub 2021 , 9. PMID: 33434677.

- **Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L. & Beachey, E. H. (1982).** Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and immunity*, 37, 318-326.
- **Christodoulides M (2019).** Preparation of Lipooligosaccharide (LOS) from *Neisseria gonorrhoeae*, *Methods Mol Biol*; 96-1997:87; doi: 10.1007/978-1-4939-9496-0_6.
- **Claudio Foschi, Melissa Salvo¹ , Roberto Cevenini , Carola Parolin , Beatrice Vitali and Antonella Marangoni (2017).** Vaginal *Lactobacilli* Reduce *Neisseria gonorrhoeae* Viability through Multiple Strategies: An in Vitro Study *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, Volume 7.no .6.
- **CLSI (2018).** CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA.
- **Collee, J., Fraser, A., Marmino, B. & Simons, A. (1996).** Mackin and McCartney Practical Medical Microbiology. The Churchill Livingstone. Inc. USA.
- **Corwin LM Brendefur, P Campbell, K Jakobsen, F Müller, X Lai, M Unemo, TM Leegaard, J Vildershøj Bjørnholt & AO Olsen (2023).** Improvement in *Neisseria gonorrhoeae* culture rates by bedside inoculation and incubation at a clinic for sexually transmitted infections, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*; volume 22, Article number: 27.
- **De Angelis M, Gobbetti M. (2016).** *Lactobacillus spp.*: General Characteristics. In: Reference Module in Food Science. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- **Donà V., Smid J.H., Kasraian S., Egli-Gany D., Dost F., Imeri F., Unemo M., Low N., Endimiani A. (2018).** Mismatch Amplification Mutation Assay-Based Real-Time PCR for Rapid Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and

Antimicrobial Resistance Determinants in Clinical Specimens. *J. Clin. Microbiol.*;56: e00365–18. doi: 10.1128/JCM.00365-18.

- **ECDC - European Centre for Disease Prevention Control (2015).** Sexually Transmitted Infections in Europe, 2013. Stockholm: ECDC. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/sexual-transmitted-infections-europe-surveillance-report-2013>.
- **Edwards VL, Smith SB, McComb EJ, et al. (2019).** The Cervicovaginal Microbiota-Host Interaction Modulates *Chlamydia trachomatis* Infection. *mBio*; 10.
- **Edwards, V. L., Potter, A. D., D’Mello, A., Gray, M. C., Shetty, A. C., Zhao, X., ... & Tettelin, H. (2022).** Dual species transcriptomics reveals core metabolic and immunologic processes in the interaction between primary human neutrophils and *Neisseria gonorrhoeae* strains. *BioRxiv*, 2022-02.
- **Elizabeth, A. Stohl1; Yolande, A. Chan; Kathleen, T. Hackett; Petra, L. Kohler; Joseph, P. Dillard; and H. Steven, Seifert.** "The *Neisseria gonorrhoeae* virulence factor NG1686 is a bifunctional M23B family metallopeptidase that influences resistance to hydrogen peroxide and colony morphology". *J. Bio. Chem.* V.287 (14). p.11222-11233.2012.
- **Estrada-García J, Hernández-Aguilar E, Romero-Mota DI, Méndez-Contreras JM. (2023).** Influence of anaerobic biotransformation process of agro-industrial waste with *Lactobacillus acidophilus* on the rheological parameters: case of study of pig manure. *Arch Microbiol.* 28;205(3):99. doi: 10.1007/s00203-023-03437-8. PMID: 36853421.
- **Eyre D.W., Golparian D., Unemo M. (2019).** Prediction of Minimum Inhibitory Concentrations of Antimicrobials for *Neisseria gonorrhoeae* Using Whole-Genome Sequencing. *Methods Mol. Biol.* :59–76. doi: 10.1007/978-1-4939-9496-0_4.
- **Farooq, F, S ; Adnan, A ; Hameed ,W ; Alwasiti, E. (2023).**The Influence of Vaginal Dysbiosis on Intracytoplasmic Sperm Injection Outcome. *Arch*

Razi Inst. 2023 Feb 28;78(1):227-232. doi: 10.22092/ARI.2022.358610.2260. PMID: 37312685; PMCID: PMC10258255.

- **Feavers IM, Maiden MC. (1998).** A gonococcal porA pseudogene: implications for understanding the evolution and pathogenicity of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol.* Nov;30(3):647-56. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.01101.x. PMID: 9822829.
- **Fegan JE, Calmettes C, Islam EA, Ahn SK, Chaudhuri S, Yu RH, Gray-Owen SD, Moraes TF, Schryvers AB. (2019).** Utility of Hybrid Transferrin Binding Protein Antigens for Protection Against Pathogenic *Neisseria* Species. *Front Immunol.* 19; 10:247. doi: 10.3389/fimmu.2019.00247. PMID: 30837995; PMCID: PMC6389628.
- **Fifer H., Saunders J., Soni S., Sadiq T., FitzGerald M. (2019).** British Association for Sexual Health and HIV Web Site; [(accessed on 30 January 2020)]. National Guideline for the Management of Infection with *Neisseria gonorrhoeae*. <https://www.bashguidelines.org/media/1208/gc-2019.pdf>.
- **Fong P, Butel-Simoes G, Francis MJ, Korman TM, Graham M. (2022).** *Corynebacterium macginleyi* in the era of MALDI-TOF MS: epidemiology, susceptibility patterns and prevalence of co-infection. *Pathology.* Apr;54(3):336-343. doi: 10.1016/j.pathol.2021.07.007. Epub 2021 Oct 8. PMID: 34635321.
- **Forbes, B. A., Sahm, D. F. & Weissfeld, A. S. (2002).** *Bailey & Scotts. Diagnostic Microbiology.* 11th. ed. St. Louis, Missouri. Mosby.
- **Forbes, B. A., Sahm, D. F. & Weissfeld, A. S. (2007).** *Diagnostic microbiology,* Mosby St Louis.
- **Foschi, C., Salvo, M., Cevenini, R., Parolin, C., Vitali, B., & Marangoni, A. (2017).** Vaginal *lactobacilli* reduce *Neisseria gonorrhoeae* viability through multiple strategies: an in vitro study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,* 7, 502.

- **Foschi, C., Salvo, M., Cevenini, R., Parolin, C., Vitali, B., & Marangoni, A. (2017).** Vaginal *Lactobacilli* reduce *Neisseria gonorrhoeae* viability through multiple strategies: an in vitro study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 502.
- **Gao H, Li X, Chen X, Hai D, Wei C, Zhang L, Li P. (2022).** The Functional Roles of *Lactobacillus acidophilus* in Different Physiological and Pathological Processes. *J Microbiol Biotechnol.* 28;32(10):1226-1233. doi: 10.4014/jmb.2205.05041.
- **Garvin L. E., Bash M. C., Keys C., Warner D. M., Ram S., Shafer W. M., et al. (2008).** Phenotypic and genotypic analyses of *Neisseria gonorrhoeae* isolates that express frequently recovered PorB PIA variable region types suggest that certain P1a Porin sequences confer a selective advantage for urogenital tract infection. *Infect. Immun.* 76, 3700–3709. doi: 10.1128/IAI.00265-08
- **Goggins ER, Chamberlain AT, Kim TG, Young MR, Jamieson DJ, Haddad LB. (2020).** Patterns of Screening, Infection, and Treatment of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoea* in Pregnancy. *Obstet Gynecol.*;135(4):799-807
- **González N, Abdellati S, De Baetselier I, Laumen JGE, Van Dijck C, de Block T, Kenyon C, Manoharan-Basil SS. (2022).** Alternative Pathways to Ciprofloxacin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: An In Vitro Study of the WHO-P and WHO-F Reference Strains. *Antibiotics (Basel).* Apr 8;11(4):499. doi: 10.3390/antibiotics11040499. PMID: 35453249; PMCID: PMC9026730.
- **Green LR, Cole J, Parga EFD, Shaw JG. (2022).** *Neisseria gonorrhoeae* physiology and pathogenesis. *Adv Microb Physiol.*; 80:35-83. doi: 10.1016/bs.ampbs.2022.01.002. Epub Feb 18. PMID: 35489793.
- **Green Luke R., Cole Joby, Ernesto Feliz Diaz Parga, Jonathan G. Shaw (2022).** Chapter Two - *Neisseria gonorrhoeae* physiology and pathogenesis, *Advances in Microbial Physiology*; Volume 80: 35-83.

- **Green MR, Sambrook J. (2019).** Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harb Protoc. 3;2019(6). doi: 10.1101/pdb.top095109. PMID: 31160389.
- **Greenawalt AN, Stoudenmire J, Lundquist K, Noinaj N, Gumbart JC, Cornelissen CN. (2022).** Point Mutations in TbpA Abrogate Human Transferrin Binding in *Neisseria gonorrhoeae*. Infect Immun. Nov 17;90(11): e0041422. doi: 10.1128/iai.00414-22. PMID: 36321833; PMCID: PMC9670983.
- **Gulati Sunita, Xin Mu, Bo Zheng, George W. Reed, Sanjay Ram, and Peter A. Rice (2015).** Antibody to Reduction Modifiable Protein Increases the Bacterial Burden and the Duration of Gonococcal Infection in a Mouse Model, *J Infect Dis.* 15; 212(2): 311–315. doi: 10.1093/infdis/jiv024
- **Hall CL, Harrison MA, Pond MJ, Chow C, Harding-Esch EM, Sadiq ST. (2019).** Genotypic determinants of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex Health.*;16(5):479-487. doi: 10.1071/SH18225. PMID: 31366421.
- **Hammes WP, Hertel C. Lactobacillus. In: WB Whitman, F Rainey, P Kämpfer, M Trujillo, J Chun, P DeVos, et al., editors (2015).** Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. (Hoboken USA: John Wiley & Sons, Inc.) In Association with Bergey's Manual Trust. p. 1–76. doi:10.1002/9781118960608.gbm00604
- **Handing, J. W., Ragland, S. A., Bharathan, U. V., & Criss, A. K. (2018).** The *MtrCDE* efflux pump contributes to survival of *Neisseria gonorrhoeae* from human neutrophils and their antimicrobial components. *Frontiers in microbiology*, 9, 2688.
- **Harris, D. (1968).** Comparison of the patterns of pyuria in experimental pyelonephritis caused by *Streptococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *British Journal of Experimental Pathology*, 49, 128.
- **Harris, D. (1969).** Staining of urinary leucocytes as an aid to the diagnosis of inflammation in the urinary tract. *Journal of clinical pathology*, 22, 492-495.

- **Hartanto, F., & Hidayati, A. N. (2021).** The Role of Microbiome in Sexually Transmitted Infections. *The Role of Microbiome in Sexually Transmitted Infections*, 84(1), 10-10.
- **Hartanto, F., & Hidayati, A. N. (2021).** The Role of Microbiome in Sexually Transmitted Infections. *The Role of Microbiome in Sexually Transmitted Infections*, 84(1), 10-10.
- **Harvey HA, Porat N, Campbell CA, Jennings M, Gibson BW, Phillips NJ, Apicella MA, Blake MS. (2000).** Gonococcal lipooligosaccharide is a ligand for the asialoglycoprotein receptor on human sperm. *Mol Microbiol.*;36(5):1059-70
- **Heeney DD, Gareau MG, Marco ML. (2018).** Intestinal *Lactobacillus* in Health and Disease, a Driver or Just Along for the Ride? *Curr Opin Biotechnol* 49:140–7. doi: 10.1016/j.copbio.2017.08.004
- **Hjelmevoll SO, Olsen ME, Sollid JU, Haaheim H, Unemo M, Skogen V. (2006).** A fast real-time polymerase chain reaction method for sensitive and specific detection of the *Neisseria gonorrhoeae* porA pseudogene. *J Mol Diagn.* ;8(5):574-81.
- **Hu, L. I., Yin, S., Ozer, E. A., Sewell, L., Rehman, S., Garnett, J. A., & Seifert, H. S. (2020).** Discovery of a New *Neisseria gonorrhoeae* Type IV Pilus Assembly Factor, TfpC. *mBio*, 11(5), e02528-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02528-20>
- **Hu, L.I . ; Stohl, E.A . ; Seifert, H.S. (2022).** The *Neisseria gonorrhoeae* type IV pilus promotes resistance to hydrogen peroxide- and LL-37-mediated killing by modulating the availability of intracellular, labile iron. *PLoS Pathog*, 17;18(6):e1010561.
- **Huang J, Zhang Q, Chen J, Zhang T, Chen Z, Chen Z, Yang J, Wang Y, Min Z, Huang M, Min X. (2020).** *Neisseria gonorrhoeae* NGO2105 Is an Autotransporter Protein Involved in Adhesion to Human Cervical

Epithelial Cells and in vivo Colonization. *Front Microbiol.* 25; 11:1395. doi: 10.3389/fmicb.2020.01395. PMID: 32670242; PMCID: PMC7330057.

- **Huang Z, Zhou X, Stanton C, Ross RP, Zhao J, Zhang H, Yang B, Chen W. (2021).** Comparative genomics and specific functional characteristics analysis of *Lactobacillus acidophilus*. *Microorganisms.* 20; 9(9):1992.
- **Hughes-Games A, Davis SA, Hill DJ. (2022).** Direct visualization of sequence-specific DNA binding by gonococcal type IV pili. *Microbiology.*;168(8). doi: 10.1099/mic.0.001224. PMID: 35920810.
- **Hurtado-Camarena, A., Serafín-Higuera, N., Chávez-Cortez, E. G., & Pitones-Rubio, V. (2023).** Lactobacillus probiotics and their impact on periodontal diseases. *EAS J Dent Oral Med,* 5, 111-114.
- **Ibrahim SA. (2016).** Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* Spp.: Other Species. Reference Module in Food Science: Elsevier.
- **Isara A, Baldeh AK. (2021).** Prevalence of sexually transmitted infections among pregnant women attending antenatal clinics in West Coast Region of The Gambia. *Afr Health Sci.*;21(2):585-592. doi: 10.4314/ahs.v21i2.13. PMID: 34795711; PMCID: PMC8568222.
- **Iser, P., Read, T.R.H., Tabrizi, S., Bradshaw, C., Lee, D., Garland, S., Denham, I. and Fairley, C.K."** Symptoms of non-gonococcal urethritis in heterosexual men: a case control study". *Sex. Trans.Infect.*, V.81. p. 163-165. 2005.
- **James C, Harfouche M, Welton NJ, et al. (2020).** Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ.*;98(5):315-329.
- **Janda WJ, Knapp JS. (2003).** *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis* In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology,* 8th edn. Washington: American Society Microbiology:585-608.

- **Janda, W. M. and C. A. Gaydos. (2007).** "GramNegative Bacteria: Neisseria, Manual of Clinical Microbiology". In: P. A. Murray (ed.), ASM Press, Washington. p. 601-620.
- **Jenkins, C., Ling, C. L., Ciesielczuk, H. L., Lockwood, J., Hopkins, S., Mchugh, T. D., Gillespie, S. H. & Kibbler, C. C. (2012).** Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice. *Journal of medical microbiology*, 61, 483-488.
- **Jennifer L. Edwards, Michael A. Apicella. (2004).** The Molecular Mechanisms Used by *Neisseria gonorrhoeae* To Initiate Infection Differ between Men and Women. *Clinical Microbiology Reviews*. 17 (4) 965-81; doi: 10.1128/CMR.17.4.
- **Jennings LK, Krywko DM. (2023).** Pelvic Inflammatory Disease. In StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; PMID: 29763134.
- **Jerse AE, Bash MC, Russell MW. (2014).** Vaccines against gonorrhea: current status and future challenges. *Vaccine*; 32:1579–87.
- **Kang, T. S. (2019).** Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review. *Trends in Food Science & Technology*; 91: 574-585.
- **Karlinsky D, Prokopenko Y, Zinchenko A, Zhigis L, Kotelnikova O, Rumsh L, Smirnov I. (2022)/** Highly Similar Sequences of Mature IgA1 Proteases from *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae*. *Pathogens*. 28; 11(7): 734. doi: 10.3390/pathogens11070734. PMID: 35889980; PMCID: PMC9315783.
- **Kazemian H, Zarandi MK, Zargoush Z, Ghafourian S, Sadeghifard N, Jalilian A, Shafieian M, Pakzad I. (2022).** The prevalence of gonococcal and non-gonococcal infections in women referred to obstetrics and gynecology clinics. *Infez Med*. 1;30(2):247-253.

- **Kim ET, Kim YS, Park SJ. (2022).** Genomic sequence of the non-pathogen *Neisseria sp.* strain MA1-1 with antibiotic resistance and virulence factors isolated from a head and neck cancer patient. *Arch Microbiol.* Sep 2;204(9):591. doi: 10.1007/s00203-022-03212-1. PMID: 36053331.
- **Kirkcaldy, R. D., Weston, E., Segurado, A. C., & Hughes, G. (2019).** Epidemiology of gonorrhoea: a global perspective. *Sexual health*, 16(5), 401-411.
- **Klausner JD, Bristow CC, Soge OO, Shahkolahi A, Waymer T, Bolan RK, Philip SS, Asbel LE, Taylor SN, Mena LA, Goldstein DA, Powell JA, Wierzbicki MR, Morris SR. (2021).** Resistance-Guided Treatment of Gonorrhea: A Prospective Clinical Study. *Clin Infect Dis.* 2021 Jul 15;73(2):298-303. doi: 10.1093/cid/ciaa596. Erratum in: *Clin Infect Dis.* 1;72(5):911. PMID: 32766725; PMCID: PMC8282307.
- **Kralik, P. & Ricchi, M. (2017).** A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers in microbiology*; 8: 108.
- **Kurzyp K, Harrison OB.** Bacterium of one thousand and one variants: genetic diversity of *Neisseria gonorrhoeae* pathogenicity. *Microb Genom.* 2023 Jun;9(6):mgen001040. doi: 10.1099/mgen.0.001040. PMID: 37285200; PMCID: PMC10327513.
- **La Fauci V, Lo Giudice D, Squeri R, Genovese C. (2022).** Insight into Prevention of *Neisseria Gonorrhoeae*: A Short Review. *Vaccines (Basel).* 18;10(11):1949. doi: 10.3390/vaccines10111949. PMID: 36423044; PMCID: PMC9692366.
- **Lenz J. D., Dillard J. P. (2018).** Pathogenesis of *Neisseria gonorrhoeae* and the host defense in ascending infections of human fallopian tube. *Front. Immunol.* 9:2710. doi: 10.3389/fimmu.2018.02710
- **Liao Chun-Hsing, Chih-Cheng Lai, Meng-Shuian Hsu, Fang-Yeh Chu, Mei-Yu Wu, Yu-Tsung Huang, Po-Ren Hsueh (2010).** Antimicrobial

susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar, *Int J Antimicrob Agents*; 35(5):457-60. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.01.007. Epub 2010 Feb 25.

- **Liu H, Taylor TH Jr, Pettus K, Johnson S, Papp JR, Trees D. (2016).** Comparing the disk-diffusion and agar dilution tests for *Neisseria gonorrhoeae* antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob Resist Infect Control*. Nov 24;5:46. doi: 10.1186/s13756-016-0148-x. PMID: 27904747; PMCID: PMC5122013.
- **Liu Y, Hammer LA, Daamen J, Stork M, Egilmez NK, Russell MW. (2023).** Microencapsulated IL-12 Drives Genital Tract Immune Responses to Intranasal Gonococcal Outer Membrane Vesicle Vaccine and Induces Resistance to Vaginal Infection with Diverse Strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *mSphere*. 21;8(1):e0038822. doi: 10.1128/msphere.00388-22. Epub 2022 Dec 20. PMID: 36537786; PMCID: PMC9942569.
- **Liu, Y., Hammer, L. A., Liu, W., Hobbs, M. M., Zielke, R. A., Sikora, A. E., ... & Russell, M. W. (2017).** Experimental vaccine induces Th1-driven immune responses and resistance to *Neisseria gonorrhoeae* infection in a murine model. *Mucosal immunology*, 10(6), 1594-1608.
- **Liu, Y., Hammer, L. A., Liu, W., Hobbs, M. M., Zielke, R. A., Sikora, A. E., ... & Russell, M. W. (2017).** Experimental vaccine induces Th1-driven immune responses and resistance to *Neisseria gonorrhoeae* infection in a murine model. *Mucosal immunology*, 10(6), 1594-1608.
- **Liu, Y., Liu, W., & Russell, M. W. (2014).** Suppression of host adaptive immune responses by *Neisseria gonorrhoeae*: role of interleukin 10 and type 1 regulatory T cells. *Mucosal immunology*, 7(1), 165-176.
- **Lovett A., Duncan J. A. (2019).** Human immune responses and the natural history of *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Front. Immunol.* 9:3187. doi: 10.3389/fimmu.2018.03187

- **Lovett, A ; Seña, A.C, Macintyre AN, Sempowski GD, Duncan JA, Waltmann A. (2022).** Cervicovaginal Microbiota Predicts *Neisseria gonorrhoeae* Clinical Presentation. *Front Microbiol.* Feb 10;12:790531.
- **Lu Z, Tadi DA, Fu J, Azizian K, Kouhsari E. (2022).** Global status of Azithromycin and Erythromycin Resistance Rates in *Neisseria gonorrhoeae*: A Systematic Review and Meta-analysis. *Yale J Biol Med.* Dec 22;95(4):465-478. PMID: 36568835; PMCID: PMC9765340.
- **Luetkemeyer AF, Donnell D, Dombrowski JC, Cohen S, Grabow C, Brown CE, Malinski C, Perkins R, Nasser M, Lopez C, Vittinghoff E, Buchbinder SP, Scott H, Charlebois ED, Havlir DV, Soge OO, Celum C; DoxyPEP Study Team. (2023).** Postexposure Doxycycline to Prevent Bacterial Sexually Transmitted Infections. *N Engl J Med.* Apr 6;388(14):1296-1306. doi: 10.1056/NEJMoa2211934. PMID: 37018493; PMCID: PMC10140182.
- **Lyra A, Ala-Jaakkola R, Yeung N, Datta N, Evans K, Hibberd A, Lehtinen MJ, Forssten SD, Ibarra A, Pesonen T, Junnila J, Ouwehand AC, Baranowski K, Maukonen J, Crawford G, Lehtoranta L.(2023).** A Healthy Vaginal Microbiota Remains Stable during Oral Probiotic Supplementation: A Randomised Controlled Trial. *Microorganisms.* 2023 Feb 16;11(2):499. doi: 10.3390/microorganisms11020499. PMID: 36838464; PMCID: PMC9961720.
- **Ma L, Li F, Zhang X, Feng X. (2018).** Biochemical characterization of a recombinant *Lactobacillus acidophilus* strain expressing exogenous FomA protein. *Arch Oral Biol.* 2018 Aug;92:25-31. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.04.016. Epub , 30. PMID: 29747062.
- **Magnus Unemo , William M. Shafer. (2015).** Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: origin, evolution, and lessons learned for the future .Author manuscript; available in PMC 2015 Jul 22. Published in final edited

form as: Ann N Y Acad Sci. 2011 Aug; 1230: E19–E28.doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06215.

- **Maleki, D., Jahromy, S. H., Karizi, S. Z. & Eslami, P. (2016).** The prevalence of *acrA* and *acrB* genes among multiple-drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with UTI in Milad Hospital, Tehran. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 4, 39785-39785.
- **Manoharan-Basil Sheeba Santhini, Margaux Balduck, Saïd Abdellati, Zina Gestels, Tessa de Block and Chris Kenyon (2023).** Enolase Is Implicated in the Emergence of Gonococcal Tolerance to Ceftriaxone, *Antibiotics*; 12(3): 534; <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030534>
- **Manoharan-Basil SS, González N, Laumen JGE, Kenyon C. (2022).** Horizontal Gene Transfer of Fluoroquinolone Resistance-Confering Genes From Commensal *Neisseria* to *Neisseria gonorrhoeae*: A Global Phylogenetic Analysis of 20,047 Isolates. *Front Microbiol.* 17; 13:793612. doi: 10.3389/fmicb.2022.793612. PMID: 35369513; PMCID: PMC8973304.
- **Mantegazza G, Gargari G, Duncan R, Consalez F, Taverniti V, Riso P, Guglielmetti S.** Ready-To-Eat Rocket Salads as Potential Reservoir of Bacteria for the Human Microbiome. *Microbiol Spectr.* 2023 Feb 14;11(1):e0297022. doi: 10.1128/spectrum.02970-22. Epub 2022 Dec 20. PMID: 36537820; PMCID: PMC9927460.
- **Martín-Sánchez M., Ong J. J., Fairley C. K., Chen M. Y., Williamson D. A., Maddaford K., et al. (2020).** Clinical presentation of asymptomatic and symptomatic heterosexual men who tested positive for urethral gonorrhoea at a sexual health clinic in Melbourne, Australia. *BMC Infect. Dis.* 20:486. doi: 10.1186/s12879-020-05197-y
- **Matos RC, Leulier F. (2014).** Lactobacilli-Host Mutualism: "Learning on the Fly". *Microb Cell Fact* 13 Suppl 1(Suppl 1): S6–S.

- **McLaughlin SE, Griffiss JM. (2019).** How to Identify Exposed Women Who Are Infected with *Neisseria gonorrhoeae*. *Methods Mol Biol.*;29-36.
- **Meng L, Li S, Liu G, Fan X, Qiao Y, Zhang A, et al. (2021).** "The nutrient requirements of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and their application to fermented milk". *Journal of Dairy Science*. 104 (1): 138–150.
- **Mensforth S., Thorley N., Radcliffe K. (2018).** Auditing the use and assessing the clinical utility of microscopy as a point-of-care test for *Neisseria gonorrhoeae* in a Sexual Health clinic. *Int. J. STD AIDS.*;29:157–163. doi: 10.1177/0956462417721062.
- **Meyer T, Buder S. (2020).** The Laboratory Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: Current Testing and Future Demands. *Pathogens*. 31;9(2).
- **Montso K. (2019).** 5 API 20E system and TDA extraction Producing Antimicrobial Resistance factors of Extended Spectrum Beta-lactamases *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from cattle farms and Raw beef in North. West Province, South Africa, Biomed Res. Int Nov-6: 4318366
- **Nakayama, Y., Yamaguchi, H., Einaga, N. & Esumi, M. 2016.** Pitfalls of DNA quantification using DNA-binding fluorescent dyes and suggested solutions. *PloS one*, 11, e0150528.
- **Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Moore, J. E., Cherie Millar, B., & Xu, J. (2011).** Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current Microbiology*, 62(3), 1081-1089. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-010-9856-2>. PMID:21212956
- **O'Donnell, Judith A.; Gelone, Steven P. (2009).** Pelvic Inflammatory Disease. Infobase Publishing. ISBN 9781438101590.
- **Organization, W. H. & Group, I. S. O. H. W. 2003.** 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *Journal of hypertension*, 21, 1983-1992.

- **Organization, W. H. (2019).** WHO Drug Information 2019, vol. 33, 3 [full issue]. WHO Drug Information, 33, 394-604.
- **PandynM.,kh.A., Das S., et al. (2003)** Association of cytolethal distending toxin locus *cdtB* with Enteropathogenic Escherichia coli isolated from patients with acute diarrhea in Colcutta, India, J. clin. Microbiol.; 41(11): 5277-5281.
- **Paris KS, Font B, Mehta SR, Huerta I, Bristow CC. (2022).** 72-Hour transport recovery of antimicrobial resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates using the InTray® GC method. *PLoS One*. 21;17(1): e0259668. doi: 10.1371/journal.pone.0259668. PMID: 35061686; PMCID: PMC8782362.
- **Paris, K.S .;Font, B, . ; Mehta, S.R . ;Huerta, I . ; Bristow, C.C.** 72-Hour transport recovery of antimicrobial resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates using the InTray® GC method. *PLoS One*. 2022 , 21;17(1):e0259668. doi: 10.1371/journal.pone.0259668. PMID: 35061686; PMCID: PMC8782362.
- **Petrina, M.A.B ; Cosentino, L.A . ; Wiesenfeld , H.C . ; Darville, T . ; Hillier, S.L. (2019).** Susceptibility of endometrial isolates recovered from women with clinical pelvic inflammatory disease or histological endometritis to antimicrobial agents. *Anaerobe*. ;56:61-65.
- **PHLN, Public Health Laboratory Network (2022).** Gonococcal infection (*Neisseria gonorrhoeae*), Laboratory case definition: 1-11.
- **Plączkiewicz, J., Adamczyk-Popławska, M., Kozłowska, E., & Kwiatek, A. (2022).** Both *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria sicca* Induce Cytokine Secretion by Infected Human Cells, but Only *Neisseria gonorrhoeae* Upregulates the Expression of Long Non-Coding RNAs. *Pathogens*, 11(4), 394.
- **Potter, A.D. ; Baiocco, C.M ; Papin, J.A ; Criss, A.K.(2023).** Transcriptome-guided metabolic network analysis reveals rearrangements of carbon flux distribution in *Neisseria gonorrhoeae* during neutrophil co-culture. *mSystems*. 30:e0126522. doi: 10.1128/msystems.01265-22. Epub ahead of print. PMID: 37387581.

- **Pourabbas B, Rezaei Z, Mardaneh J, Shahian M, Alborzi A. (2018).** Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections among pregnant women and eye colonization of their neonates at birth time, Shiraz, Southern Iran. *BMC Infect Dis.* 24;18(1):477.
- **Prakasita VC, Asmara W, Widyarini S, Wahyuni AETH. (2019).** Combinations of herbs and probiotics as an alternative growth promoter: An in vitro study. *Vet World.* 2019;12(4):614-620. doi: 10.14202/vetworld. 614-620. Epub 2019 , 30. PMID: 31190720; PMCID: PMC6515817.
- **Pramanick, R., Mayadeo, N., Warke, H., Begum, S., Aich, P., & Aranha, C. (2019).** Vaginal microbiota of asymptomatic bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis: Are they different from normal microbiota?. *Microbial pathogenesis*, 134, 103599.
- **Quillin, S., & Seifert, H. (2018).** *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 226–240.
- **Ragland SA, Criss AK. (2019).** Protocols to Interrogate the Interactions Between *Neisseria gonorrhoeae* and Primary Human Neutrophils. *Methods Mol Biol.*; 1997:319-345. doi: 10.1007/978-1-4939-9496-0_19. PMID: 31119632; PMCID: PMC6731993.
- **Rajamanikandan S, Soundarya S, Paramasivam A, Prabhu D, Jeyakanthan J, Ramasamy V. (2022).** Computational identification of potential lead molecules targeting rho receptor of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Biomol Struct Dyn.*;40(14):6415-6425.
- **Ram S, Shaughnessy J, de Oliveira RB et al. (2017).** Gonococcal lipooligosaccharide sialylation: virulence factor and target for novel immunotherapeutics. *Pathog Dis.* 75(4).
- **Ratnappuli ,A .; Bissessor ,M .; Arumugam, S .; Williamson, D.A .; Chow, EPF .; Fairley ,CK.; Ong ,J.J .; De Petra, V .; Chen, M.Y. (2022).** Culture obtained from urethral swab of asymptomatic men who screen positive for

Neisseria gonorrhoeae by urine nucleic acid amplification testing. Sex Transm Infect. ;98(2):139-141.

- **Ritter, J. L., & Genco, C. A. (2018).** *Neisseria gonorrhoeae*–induced inflammatory pyroptosis in human macrophages is dependent on intracellular gonococci and lipooligosaccharide. *Journal of Cell Death*, 11, 1179066017750902.
- **Rodriguez, M., Rodriguez, A. & Maranon, R. 2011.** Gram Stain as a Predictor of Urinary Infections in Children under 2 years. *Indian Pediatr.*
- **Russell, M.W.(2021).** Immune Responses to *Neisseria gonorrhoeae*: Challenges and Opportunities with Respect to Pelvic Inflammatory Disease. *J Infect Dis.* 2021 Aug 16;224(12 Suppl 2): S96-S102.
- **Sabharwal, N., Dhall, S., Chhibber, S. & Harjai, K. 2014.** Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 5, 125.
- **Sambrook, J. 2001.** A laboratory manual. *Molecular cloning*, 1.
- **Sameni F, Zadehmodarres S, Dabiri H, Khaledi M, Nezamzadeh F.(2022)** Evaluation of *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* and *Neisseria gonorrhoeae* in infertile women compared to pregnant women. *J Obstet Gynaecol.* 2022 Aug;42(6):2151-2155.
- **Sandra Borges • Joana Silva • Paula Teixeira. (2014).** The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health *Arch Gynecol Obstet* 289:479–489.
- **Sarenje KL, Ngalamika O, Maimbolwa MC, Siame A, Munsaka SM, Kwenda G. (2022).** Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from patients attending sexually transmitted infection clinics in Urban Hospitals, Lusaka, Zambia. *BMC Infect Dis.* Aug 12;22(1):688. doi: 10.1186/s12879-022-07674-y. PMID: 35962370; PMCID: PMC9373640.
- **Sarenje, K.L.; Ngalamika, O .; Maimbolwa, M.C .; Siame, A .; Munsaka, S.M .; Kwenda ,G. (2022).** Antimicrobial resistance of *Neisseria*

gonorrhoeae isolated from patients attending sexually transmitted infection clinics in Urban Hospitals, Lusaka, Zambia. BMC Infect Dis, 12;22(1):688. doi: 10.1186/s12879-022-07674-y. PMID: 35962370; PMCID: PMC9373640.

- **Schlievert PM, Kilgore SH, Benavides A, Klingelutz AJ. (2022).** Pathogen Stimulation of Interleukin-8 from Human Vaginal Epithelial Cells through CD40. *Microbiol Spectr.* 27;10(2):e0010622. doi: 10.1128/spectrum.00106-22. Epub 2022 Mar 17. PMID: 35297656; PMCID: PMC9045207.
- **Schneider, A. C. R., Machado, A. B. M. P., de Assis, A. M., Hermes, D. M., Schaefer, P. G., Guizzo, R., ... & da Silveira, T. R. (2014).** Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on hepatic and serum lipid profiles in zebrafish exposed to ethanol. *Zebrafish*, 11(4), 371-378.
- **Seifert HS. (2019).** Location, Location, Location-Commensalism, Damage and Evolution of the Pathogenic *Neisseria*. *J Mol Biol.*;431(16):3010–4. Epub 20190412. pmid:30986425.
- **Sethi ,S . ; Singh, S . ; Banga , S.S . ;Jain, N . ; Gupta, S . ; Sharma, N . ; Chaudhry, H . ; Malhotra, S . ; Narang, T. (2020).** Revisiting blood agar for the isolation of *Neisseria gonorrhoeae*. *Indian J Sex Transm Dis AIDS.* ;41(2):221-222.
- **Shaughnessy, J., Ram, S., & Rice, P. A. (2019).** Biology of the gonococcus: disease and pathogenesis. *Neisseria gonorrhoeae: Methods and Protocols*, 1-27.
- **Sheeba ,Santhini Manoharan-Basil ,Margaux Balduck ,Saïd Abdellati , Zina Gestels ,Tessa de Block and Chris Kenyon . (2023)** .Enolase Is Implicated in the Emergence of Gonococcal Tolerance to Ceftriaxone Antibiotics 2023, 12, 534. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030534>
Received: 17 January 2023.

- **Sarenje, K. L., Ngalamika, O., Maimbolwa, M. C., Siame, A., Munsaka, S. M., & Kwenda, G. (2022).** Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from patients attending sexually transmitted infection clinics in Urban Hospitals, Lusaka, Zambia. *BMC Infectious Diseases*, 22(1), 688.
- **Silva J, Cerqueira F, Teixeira AL, Campinha R, Amorim J, Medeiros R.** Prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis* in Portuguese women of childbearing age. *J Obstet Gynaecol.* 2021 Feb;41(2):254-258.
- **St. Amant, D. C., Valentin-Bon, I. E., & Jerse, A. E. (2002).** Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by *Lactobacillus* species that are commonly isolated from the female genital tract. *Infection and immunity*, 70(12), 7169-7171.
- **Su X, Le W, Zhu X, Li S, Wang B, Madico G, Yang Z, Chaisson CE, McLaughlin RE, Gandra S, Yoon J, Zheng B, Lewis LA, Gulati S, Reed GW, Ram S, Rice PA. (2022).** *Neisseria gonorrhoeae* Infection in Women Increases with Rising Gonococcal Burdens in Partners: *Chlamydia* Coinfection in Women Increases Gonococcal Burden. *J Infect Dis.* Dec 13;226(12):2192-2203. doi: 10.1093/infdis/jiac408. PMID: 36201640; PMCID: PMC10205615.
- **Suay-García B, Pérez-Gracia MT. (2018).** Future Prospects for *Neisseria gonorrhoeae* Treatment. *Antibiotics (Basel)*. 15;7(2)
- **Tachedjian G, Aldunate M, Bradshaw CS, Cone RA. (2017).** The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Res Microbiol*; 168:782-92.
- **Tadesse, A. & Alem, M. 2006.** Medical Bacteriology. -.
- **Taye Y, Degu T, Fesseha H, Mathewos M. (2021).** Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cow Milk and Milk Products. *ScientificWorldJournal.* Aug 10;2021:4697445. doi: 10.1155/2021/4697445. PMID: 34421398; PMCID: PMC8371643.

- **Thakur SD, Dillon JR. (2018).** Suitability of a chocolate agar-based medium for the transportation and long-term storage of *Neisseria gonorrhoeae* isolates at room temperature. *J Microbiol Methods*;144: 86-87. doi: 10.1016/j.mimet.2017.11.011.
- **Todar, K.** "The Pathogenic Neisseriae". In: *Todar's online Textbook of Bacteriology*. Department of Bacteriology, The University of Wisconsin-Medison. Webpage, retrieved from [The pathogenic Neisseriae.htm](#). (accessed on: 20/04/2008). 2005.
- **Tuddenham S, Ravel J, Marrazzo JM. (2021).** protection and risk: male and female genital microbiota and sexually transmitted infections. *J Infect Dis*; 223: S222-S35.
- **Turton, J.F.; Hatice, B.; Siu, L.K.; Mary, E. K. and Tyrone, L. P. (2008).** "Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella* sp. and comparison of isolates within these serotypes". *Fems Microbiol. Lett.* V. 284. P. 247–252.
- **Unemo M, Golparian D, Eyre DW. (2019).** Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and Treatment of Gonorrhoea. *Methods Mol Biol*;1997:37-58. doi: 10.1007/978-1-4939-9496-0_3. PMID: 31119616.
- **Unemo M, Seifert HS, Hook EW 3rd, Hawkes S, Ndowa F, Dillon JR. (2019).** Gonorrhoea. *Nat Rev Dis Primers* Nov 21;5(1):79.
- **Unemo M., Ison C. (2013).** Gonorrhoea. In: Unemo M., Ballard R., Ison C., Lewis D., Ndowa F., Peeling R., editors. *Laboratory Diagnosis of Sexually Transmitted Infections, Including Human Immunodeficiency Virus*. WHO; Geneva, Switzerland.
- **Unemo M., Seifert H. S., Hook E. W., Hawkes S., Ndowa F., Dillon J.-A. R. (2019).** Gonorrhoea. *Nat. Rev. Dis. Primer* 5:79. doi: 10.1038/s41572-019-0128-6
- **Unemo, M., Lahra, M. M., Cole, M., Galarza, P., Ndowa, F., Martin, I., ... & Wi, T. (2019).** World Health Organization Global Gonococcal

Antimicrobial Surveillance Program (WHO GASP): review of new data and evidence to inform international collaborative actions and research efforts. *Sexual health*, 16(5), 412-425.

- **Unemo, M., Lahra, M. M., Cole, M., Galarza, P., Ndowa, F., Martin, I., ... & Wi, T. (2019).** World Health Organization Global Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program (WHO GASP): review of new data and evidence to inform international collaborative actions and research efforts. *Sexual health*, 16(5), 412-425.
- **Unemo, M.; Seifert, H.S.; Hook, E.W., Hawkes, S.; Ndowa, F.; Dillon J.-A.R. (2019),** Gonorrhoea; *Nat. Rev. Dis. Prim.:* 5, 79.
- **Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Piot, P., Heuck, C. C., Rohner, P. & Heuck, C. 2003.** Basic laboratory procedures in clinical bacteriology, World Health Organization.
- **Vashishtha, S . ; Singh, J . ; Kundu, B. (2022).** Antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae* can be targeted using inhibitors against evolutionary conserved asparaginase. *J Cell Biochem.* ;123(7):1171-1182.
- **Verma R, Sood S, Bala M, Mahajan N, Kapil A, Sharma VK, Pandey RM, Samantaray, J.C. (2012).** Evaluation of an opa gene-based nucleic acid amplification test for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urogenital samples in North India. *Epidemiol Infect.* Nov;140(11):2110-6. doi: 10.1017/S0950268811002883. Epub 2012 Jan 16. PMID: 22244259.
- **Vesic, S., Vukicevic, J., Dakovic, Z., Tomovic, M., Dobrosavlijevic, D., Medenica, L. and Pavlovic, M.D.** "Male urethritis with and without discharge: relation to microbiological findings and polymorphonuclear counts." *Acta Dermatovenereologica Alpina Pannonica et Adriatica.* V. 16 (2). P. 53-57. 2007.
- **Visser M., van Westreenen M., van Bergen J., van Benthem B.H.B. (2019).** Low gonorrhoea antimicrobial resistance and culture positivity rates

in general practice: A pilot study. *Sex Transm. Infect.* doi: 10.1136/sextrans-2019-054006.

- **Walker E., van Niekerk S., Hanning K., Kelton W., and Hicks J. (2023).** Mechanisms of host manipulation by *Neisseria gonorrhoeae*, *Front Microbiol.*; 14: 1119834. doi: 10.3389/fmicb.2023.1119834
- **Walker Emma, Stacy van Niekerk, Kyrin Hanning, William Kelton, and Joanna Hicks (2023).** Mechanisms of host manipulation by *Neisseria gonorrhoeae*, *Front Microbiol.* 14: 1119834. doi: 10.3389/fmicb.2023.1119834.
- **Werner, L.M ; Alcott, A ; Mohlin, F ; Ray, J.C ; Belcher Dufriane, M ; Smirnov, A ; Columbus, L ; Blom, A.M ; Criss, A.K.(2023).** *Neisseria gonorrhoeae* co-opts C4b-binding protein to enhance complement-independent survival from neutrophils. *PLoS Pathog.* 2023 2;19(3):e1011055.
- **Whelan J, Abbing-Karahagopian V, Serino L, Unemo M. (2021).** Gonorrhoea: a systematic review of prevalence reporting globally. *BMC Infect Dis.* 11;21(1):1152.
- **Whelan, J., Abbing-Karahagopian, V., Serino, L., & Unemo, M. (2021).** Gonorrhoea: a systematic review of prevalence reporting globally. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 1-23.
- **Whelan, J., Abbing-Karahagopian, V., Serino, L., & Unemo, M. (2021).** Gonorrhoea: a systematic review of prevalence reporting globally. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 1-23.
- **Whittington W, Ison, C, Thompson S. Gonorrhoea. (1996).** In: Morse SA, Moreland AA, Holmes KK, eds. *Atlas of Sexually Transmitted Diseases and AIDS*, 2nd edn. London: Mosby-Wolfe:99-117.
- **Whittles, L. K., White, P. J., Paul, J., & Didelot, X. (2018).** Epidemiological trends of antibiotic resistant gonorrhoea in the United Kingdom. *Antibiotics*, 7(3), 60.

- **WHO (2003).** Sexually Transmitted Bacterial Pathogen with Increasing Antimicrobial Resistance Concerns, *Neisseria gonorrhoeae*; Chapter VI; *Neisseria gonorrhoeae* confirmatory identification and antimicrobial susceptibility testing: 62-163.
- **WHO- World Health Organization (2023).** [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))
- **WHO -World Health Organization, (2016).** WHO Guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*.
- **WHO, World Health Organization. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, (2022).** www.who.int/publications/i/item/9789240027077 (Accessed on December 22, 2022).
- **Workowski, K.A. and Berman, S. "Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010". MMWR Recomm Rep. V. 59(12). p.1-110. 2010
- **Xiu L, Zhang C, Li Y, Wang F, Peng J. (2019).** Simultaneous detection of eleven sexually transmitted agents using multiplexed PCR coupled with MALDI-TOF analysis. Infect Drug Resist. 28; 12:2671-2682. doi: 10.2147/IDR.S219580. PMID: 31695443; PMCID: PMC6717854.
- **Yakobi, S. H., & Pooe, O. J. (2022).** Antimicrobial resistance of *neisseria gonorrhoeae* in sub-saharan populations. *Bacteria*, 1(2), 96-111.
- **Yang, F., & Yan, J. (2020).** Antibiotic resistance and treatment options for multidrug-resistant gonorrhea. *Infectious Microbes & Diseases*, 2(2), 67-76.
- **Yang, F., & Yan, J. (2020).** Antibiotic resistance and treatment options for multidrug-resistant gonorrhea. *Infectious Microbes & Diseases*, 2(2), 67-76.
- **Yasmeen, I.; Khalil, F. M. Kamel .; Karkaz ,M. ;Thalij .(2017).**Identify Microbial Species Produced Biogenic Amines in some Types of Sausages and Its Effects in some Hepatic Enzymes and Immunological globulins in

Laboratory Rabbits, Tikrit Journal for Agricultural Sciences, , Volume 17, Issue 4, Pages 255-263.

- **Yu Q., Wang L.-C., Benigno S. D., Gray-Owen S. D., Stein D. C., Song W. (2019).** *Neisseria gonorrhoeae* infects the heterogeneous epithelia of the human cervix using distinct mechanisms. *PLoS Pathog.* 15: e1008136. doi: 10.1371/journal.ppat.1008136
- **Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz C, Harris HMB, Mattarelli P, et al. (2020).** A Taxonomic Note on the Genus *Lactobacillus*: Description of 23 Novel Genera, Emended Description of the Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and Union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(4):2782–858.
- **Zheng Z, Cao Y, Chandrasekaran S, Schmidt JJ, Garner OB, Monbouquette HG.** An amplification-free, 16S rRNA test for *Neisseria gonorrhoeae* in urine. *Sens Diagn.* 2022 Nov 11;2(1):163-167. doi: 10.1039/d2sd00128d. Erratum in: *Sens Diagn.* 2023 Jan 30;2(2):468. PMID: 36741249; PMCID: PMC9850355.
- **Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ... & Lebeer, S. (2020).** A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858.
- **Zheng, Jinshui; Wittouck, Stijn; Salvetti, Elisa; Franz, Charles M.A.P.; Harris, Hugh M.B.; Mattarelli, Paola; O'Toole, Paul W.; Pot, Bruno; Vandamme, Peter; Walter, Jens; Watanabe, Koichi (2020).** "A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70 (4): 2782–2858.

- **Zhou Q, Xu W, Xia D, Zhu X, Han Y, Chen K, Yin Y.** Impact of Alternative Growth Supplements on Antimicrobial Susceptibility Testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Drug Resist.* 2022 ,18;15:5475-5481.
- **Zhu W, Cardenas-Alvarez MX, Tomberg J, Little MB, Duncan JA, Nicholas RA. (2023).** Commensal *Neisseria species* share immune suppressive mechanisms with *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS One.* 7;18(4): e0284062. doi: 10.1371/journal.pone.0284062. PMID: 37027389; PMCID: PMC10081783.
- **Zhu W., Tomberg J., Knilans K. J., Anderson J. E., McKinnon K. P., Sempowski G. D., et al. (2018).** Properly folded and functional PorB from *Neisseria gonorrhoeae* inhibits dendritic cell stimulation of CD4+ T cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 293, 11218–11229. doi: 10.1074/jbc.RA117.001209
- **Zolfaghari, P. ; Emamie, A.D . ; Rajabpour, M. ;Zarei, A . ; Whiley, D.M . ; Pourmand, M.R . ;Pourmand, G. (2022).** Antimicrobial susceptibility testing and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* in Tehran, Iran. *Int J STD AIDS.* ;33(7):660-665.
- **Zondag HCA, de Korne-Elenbaas J, Bruisten SM, de Vries HJC, van Dam AP. (2023).** Increased clonality among *Neisseria gonorrhoeae* isolates during the COVID-19 pandemic in Amsterdam, the Netherlands. *Microb Genom.* ;9(4):mgen000975.

الملاحق

Appendix

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed May 20, 2023 9:04:39 AM AST

Patient Name: R7.

Patient ID: WGTRSF

Location:

Physician:

Lab ID: 134

Isolate Number: 1

Organism Quantity:

Selected Organism : *Neisseria weaveri*

Source:

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time: 6.34 hours	Status: Final
Selected Organism	92% Probability Neisseria weaveri	
ID Analysis Messages	Bionumber: 3230000410	

Biochemical Details																	
1	ArgA	+	2	GGT	+	3	LysA	-	4	dGAL	-	5	LeuA	+	6	ELLM	+
7	PheA	-	8	ProA	+	10	PyrA	+	13	TyrA	-	15	APPA	+	18	dGLU	-
19	GLYG	-	20	dMNE	-	22	dMAL	-	28	SAC	-	33	NAG	-	36	URE	-
39	BGALi	-	40	ODC	-	41	AARA	-	45	PVATE	-	46	PHC	+	47	dMLT	-
51	MTE	-	52	IGLM	-	59	PHOS	+	61	dRIB2	-	62	OPS	-	64	dXYL	-

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed July 9, 2023 2:36:39 PM AST

Patient Name: Raghad3.

Patient ID: wqfqwfc

Location:

Physician:

Lab ID: 3

Isolate Number: 1

Organism Quantity:

Selected Organism : *Lactobacillus paracasei*

Source:

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time: 6.07 hours	Status: Final
Selected Organism	91% Probability Bionumber: 3737503270401	Lactobacillus paracasei
ID Analysis Messages		

Biochemical Details																	
4	dGAL	+	5	LeuA	+	6	ELLM	-	7	PheA	+	8	ProA	+	10	PyrA	+
11	dCEL	+	13	TyrA	+	15	APPA	-	18	dGLU	+	20	dMNE	+	22	dMAL	+
28	SAC	+	30	ARB	-	33	NAG	+	34	BGLUi	-	36	URE	-	37	BGURi	-
39	BGALi	+	41	AARA	+	42	AGALi	-	43	BMAN	-	44	ARG	+	45	PVATE	-
51	MTE	+	53	ESC	+	54	BdFUC	+	55	BNAGi	-	56	AMANi	-	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	lARA	-	61	dRIB2	+	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	-									

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed May 20, 2023 9:04:40 AM AST

Patient Name: R10.

Patient ID: ERPGJJH

Location:

Physician:

Lab ID: 138

Isolate Number: 1

Organism Quantity:

Selected Organism : *Neisseria Gonorrhoeae*

Source:

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time: 7.22 hours	Status: Final
Selected Organism	<i>Neisseria Gonorrhoeae</i>	
ID Analysis Messages	Bionumber: 1033000040	

Biochemical Details																	
1	ArgA	+	2	GGT	+	3	LysA	-	4	dGAL	-	5	LeuA	+	6	ELLM	+
7	PheA	+	8	ProA	+	10	PyrA	-	13	TyrA	+	15	APPA	+	18	dGLU	-
19	GLYG	-	20	dMNE	-	22	dMAL	-	28	SAC	-	33	NAG	+	36	URE	-
39	BGALi	-	40	ODC	-	41	AARA	-	45	PVATE	-	46	PHC	-	47	dMLT	-
51	MTE	-	52	IGLM	-	59	PHOS	+	61	dRIB2	-	62	OPS	-	64	dXYL	-

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed July 9, 2023 2:36:55 PM AST

Patient Name: Raghad 17.

Patient ID: bmnctre

Location:

Physician:

Lab ID: 17

Isolate Number: 1

Organism Quantity:

Selected Organism : *Lactobacillus paracasei*

Source:

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time: 6.37 hours	Status: Final
Selected Organism	91% Probability Bionumber: 3737503270401	Lactobacillus paracasei
ID Analysis Messages		

Biochemical Details																	
4	dGAL	+	5	LeuA	+	6	ELLM	-	7	PheA	+	8	ProA	+	10	PyrA	+
11	dCEL	+	13	TyrA	+	15	APPA	-	18	dGLU	+	20	dMNE	+	22	dMAL	+
28	SAC	+	30	ARB	-	33	NAG	+	34	BGLUi	-	36	URE	-	37	BGURi	-
39	BGALi	+	41	AARA	+	42	AGALi	-	43	BMAN	-	44	ARG	+	45	PVATE	-
51	MTE	+	53	ESC	+	54	BdFUC	+	55	BNAGi	-	56	AMANi	-	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	LARA	-	61	dRIB2	+	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	-									

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed July 9, 2023 2:36:42 PM AST

Patient Name: Raghad 5 .

Patient ID: rhywerh

Location:

Physician:

Lab ID: 5.

Isolate Number: 1

Organism Quantity:

Selected Organism : *Lactobacillus plantarum*

Source:

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time: 6.07 hours	Status: Final
Selected Organism	92% Probability Lactobacillus plantarum	
ID Analysis Messages	Bionumber: 0017710030641	

Biochemical Details																	
4	dGAL	-	5	LeuA	(-)	6	ELLM	-	7	PheA	-	8	ProA	-	10	PyrA	-
11	dCEL	+	13	TyrA	-	15	APPA	-	18	dGLU	+	20	dMNE	+	22	dMAL	+
28	SAC	+	30	ARB	+	33	NAG	+	34	BGLUi	+	36	URE	-	37	BGURi	-
39	BGALi	-	41	AARA	-	42	AGALi	-	43	BMAN	-	44	ARG	-	45	PVATE	-
51	MTE	+	53	ESC	+	54	BdFUC	-	55	BNAGi	-	56	AMANi	-	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	lARA	+	61	dRIB2	+	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	+
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	-									

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed July 9, 2023 2:36:45 PM AST

Patient Name: Raghad 7.

Patient ID: uykjokl

Location:

Physician:

Lab ID:7

Isolate Number: 1

Organism Quantity:

Selected Organism : *Lactobacillus plantarum*

Source:

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time: 6.77 hours	Status: Final
Selected Organism	99% Probability Lactobacillus plantarum	
ID Analysis Messages	Bionumber: 120017710030640	

Biochemical Details																	
4	dGAL	-	5	LeuA	-	6	ELLM	-	7	PheA	-	8	ProA	-	10	PyrA	-
11	dCEL	+	13	TyrA	-	15	APPA	-	18	dGLU	+	20	dMNE	+	22	dMAL	+
28	SAC	+	30	ARB	+	33	NAG	+	34	BGLUi	+	36	URE	-	37	BGURi	-
39	BGALi	-	41	AARA	-	42	AGALi	-	43	BMAN	-	44	ARG	-	45	PVATE	-
51	MTE	+	53	ESC	+	54	BdFUC	-	55	BNAGi	-	56	AMANi	+	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	IARA	+	61	dRIB2	+	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	+
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	-									

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed July 9, 2023 2:36:56 PM AST

Patient Name: Raghad 18 .

Patient ID: mklgf

Location:

Physician:

Lab ID: 18

Isolate Number: 1

Organism Quantity:

Selected Organism : *Lactobacillus fermentum*

Source:

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time: 6.34 hours	Status: Final
Selected Organism	97% Probability Lactobacillus fermentum	
ID Analysis Messages	Bionumber: 4320107610401	

Biochemical Details																	
4	dGAL	+	5	LeuA	+	6	ELLM	-	7	PheA	+	8	ProA	-	10	PyrA	-
11	dCEL	-	13	TyrA	-	15	APPA	-	18	dGLU	+	20	dMNE	+	22	dMAL	(-)
28	SAC	+	30	ARB	-	33	NAG	-	34	BGLUi	-	36	URE	-	37	BGURi	-
39	BGALi	+	41	AARA	+	42	AGALi	+	43	BMAN	-	44	ARG	+	45	PVATE	-
51	MTE	+	53	ESC	-	54	BdFUC	-	55	BNAGi	-	56	AMANi	-	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	LARA	+	61	dRIB2	+	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	-									

نموذج استبيان

الاسم: -

العمر

رقم العينه

امراض اخرى

السكر

الامراض:- الضغط

كلا

نعم

الاسقاطات:-

عدد الأسقاطات

نتيجة الفحص Biochemica:-

صبغة كرام :-

فحص الاوكسيديز :-

فحص الكاتليز:-

فحص اليوريز:-

كلا

نعم

نايسيريا :-

LI-10

LI-8

LI-6

نوع الفحص :

فحص Vitc.2:-

فحص PCR- RT:- نوع الجين

16sRNA

OPA

Por

TFpc

Summary

Summary

This study aims to diagnose and isolate *L. acidophilus* and *N. gonorrhoeae* patients who suffered from vaginal secretions that were watery in appearance and green or yellow in color with pain or burning when urinating, and some of them suffered from pain in the lower abdominal area and bleeding from the uterus during menstruation. Samples were collected from women arriving to Al-Amara General Hospital in Maysan Governorate. Their ages ranged between 20-42, during the period from 10-28-2022 to 5-13-2023. The bacterial isolates were diagnosed using traditional methods, and their diagnosis was then confirmed by molecular detection of the gene. Diagnostics using RT-PCR technology. Phenotypic, microscopic, biochemical and molecular examinations were conducted, and 30 17.64% of the total number of isolates belonging to *N. gonorrhoeae* bacteria were obtained as positive results, while another 140 samples 82% of the samples showed negative results in laboratory culture, all of which were The positive samples for *N.gonorrhea* bacteria and the negative samples also contained 170 (100%) *Lactobacillus acidophilus* bacteria, but their numbers were different in the positive samples when the samples were examined using the dry bacterial smear method stained with Gram stain. It was noted that the positive samples containing a small number of *L.acidophilus* bacteria (<100 bacteria/microscopic field) contain a relatively high number of *N. gonorrhoeae* bacteria, approximately (50-100 bacterial pairs/microscopic field). As for the samples that the numbers of *L.acidophilus*. bacteria are high (\geq 100 bacteria/microscopic field). It contains a relatively small number of *N. gonorrhoeae* bacteria, approximately (16-24 bacterial pairs/microscopic field). Estimates from our study indicate that the infection has been recorded among adult women aged between 20-50 years at a rate of 10-60 %. While their miscarriage rate was between 10-50 % and the number of miscarriages was 1-4 times, these women did not suffer from infertility, as the number of children they had ranged from 1 to 6 children, with a ratio of (3.33 - 26.67) %. The two patients who had chronic diseases such as high

blood pressure and diabetes were infected with this bacteria at a rate of 6.67%, and 26 patients 86.67% did not suffer from any chronic disease. It is evident from the results, and after performing manual biochemical tests, as well as using the VIETK2 System device. All isolates of *gonorrhoeae*. It gave a negative result for the urease enzyme test, meaning that it does not have the ability to produce the urease enzyme. The isolates also showed a positive result for the oxidase test, and this proves that the bacterial isolates under study possess the cytochrome oxidase enzyme. In addition, the bacterial isolates gave a positive result for the urease test. Catalase test. As for the production of acids and other enzymes by *N.gonorrhoeae*. bacteria, its diagnosis was confirmed using the Phytic device. The results showed that the bacterial isolates under study gave positive results. Among the results of the test conducted using the VITEK 2 device The gonorrhoeae.N bacteria have the ability to produce the enzyme Arginine arylamidase and Phenylamine arylamidase, and produce the enzyme phosphatase, the enzyme Gamma-Glutamyl-Transferase, the enzyme Tyrosine arylamidase, and the enzyme Leucine arylamidase. The isolates also gave a positive result for the ELLM test, in which the ELLMan reagent is used to detect the presence of a group The isolates have the ability to consume glucose, but they do not have the ability to consume maltose, fructose, sucrose, and lactose. All gonorrhoea bacteria studied were tested for sensitivity to twelve antibiotics. The results of the antibiotic susceptibility testing showed that the bacteria were multiple antibiotic resistant (MDR). (Multidrug Resistance). In the current study, most of the *N. gonorrhoeae* bacteria isolates were 100% resistant to antibiotics to Tetracycline and Ceftriaxone. However, they were less resistant at 73.33% to Azithromycin and 10% to Ciprofloxacin. From the results of the current study, the levels of interleukins IL-6, IL-8, and IL-10 in the serum of women infected with *N.gonorrhoeae* bacteria appeared very high compared to the control group. The results were analyzed using a quantitative RT-PCR device for expression of the opa, TfpC, and porA genes, and *16SrRNA* was used as a constant expression gene for comparison (Housekeeping gene), as the results indicated an increase in gene expression in the three genes

compared to the control sample. While differences were observed between genes, the TFpC gene gave the highest gene expression, 441.47, compared to the opa and porA genes, which gave 100.723 and 71.02, respectively. Finally it was concluded from this study that all positive and negative isolates of *Nisseria gonorrhoea* contain *lactobacillus spp* . Gonorrhoea bacteria also showed varying resistance to different types of antibiotics, the highest elevation of interleukin 8, and the highest expression of the TfpC gene.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Misan - College of
Science Department of Biology



**Antagonistic relationship between *Lactobacilli spp* and
Neisseria gonorrhoeae and their correlation with some
virulence factors and interleukins in women with
vaginal infections in Maysan governorate**

A thesis

*Submitted to the Council of the College of Science University of
Misan as Partial Fulfillment of the Requirements for the Master
Degree in Biology*

By

Raghad Abdewahed Qubian

B.Sc. Biology

Supervised by

Prof Dr. Zahrah Adnan Alshammarri

1445 A.H

2023 A.D