جمهوريه العراق

وزاره التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية/كلية العلوم قسم

علوم الحياة

((عزل وتشخيص بكتريا ***Pseudomonas arginosa*** من المرضى الراقدين في وحده الحروق في المستشفى التعليمي في الديوانية باستخدام عدد من الاختبارات))

بحث مقدم إلى مجلس كلية العلوم قسم علوم الحياة

كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس

في علوم الحياة

من إعداد ألطالبه

((أماني احمد عبد السادة))

بإشراف

الأستاذ. ديار خلف فليفل

١٤٣٧هـ ٢٠١٦م

قال تعالى:

(قالوا سبحانك لا علم لنا الا ما علمتنا انك انت العليم الحكيم)

صدق الله العلي العضيم

الاهداء والشكر:

اهدي هذا البحث الى البلسم الذي يداوي جراحي الى من احببت شمعة حياتي, والى سندي في رحلتي العلميه التي دامت سنوات الى امي وابي الى من ربياني

ومن لم يشكر الناس ....لم يشكر الله

اتقدم اولا واخيرا بالشكر الى الله عزوجل الذي وفقني في انجاز هذا البحث.

والى الاستاذ الفاضل :ديار خلف فليفل ,مشرف البحث

والى اساتذتي في قسم علوم الحياة .والى كل زملائي والى ابي الذي رباني وامي التي شقيت على تربيتي وتعليمي

واتقدم بالشكر الجزيل الى جامعتي الغراء جامعة القادسيه التي احتضنتنا طيله السنوات الماضيه....عرفا للجميل

فشكرا لكم جميعا

الخلاصه:

يتضمن البحث التالي عدة اختبارات تم اجرائها على بكتريا ال ***Pseudomonas arginosa*** حيث تم اجراء الاختبارات (oxides واختبار cataliase واختبار قابليه البكتريا على تحلل الدم واختبار التصبيغ بصبغه غرام وكذلك اختبار حساسيه البكتريا لبعض المضادات الحيويه)وبعد اجراء الاختبارات السابقه تم اضهار النتائج والتاكد من الصفات التشخيصيه للبكتريا والتاكد من ايجابيتها لكل من اختباري الكتاليز والاوكسديز وسلبيتها لصبغه غرام وقابليتها على تحليل الدم بشكل جزئي وكذلك تم التاكد من حساسيتها للمضاد الحيوي Chloramphenicol ومقاومتها لل Ampicillin

(الفصل الأول)

المقدمه:

Pseudomonas arginosa:

بكتريا سالبه لصبغه غرام -G ذات شكل قضيبي مع حركه أحاديه القطب وتفرز مجموعه من الاصباغ مثل صبغه pyocyanin,fluosescin,pyoscin [١]

وتكون البكتريا هوائيه وتكثر في ألتربه والماءوالنباتات والحيوانات

بمافيها البشر .الا انه يوجد الكثير ممن يعتقدون بانها قد تكون بكتريا هوائيه ولاهوائيه اختياريه بسبب تكيفها لتتكاثر بشكل جيد. وهذا النوع يحقق نمو لاهوائي بوجود النترات باعتباره محطه المستقبله للالكترونات وقدرتها على الهياج في المستوى الركيز من الفسفره وللتكيف في الهواء القليل او عدم وجوده حيث عند اصابتها للرئه تحدث طبقه سميكه من الجينات المحيطة بخلايا مخاطيه فتسبب التليف الكيسي الذي يحد من انتشار الاوكسجين حولها [٢،٣،٤،٥]...وهذا النوع من البكتريا من الانواع التي تتنوع بالفعاليات الايضيه التي يمكن ان تسبب مجموعه من العدوى الانتهازيه الشديده للمرضى وغالبا ماتضهر مقاومتها للمضادات الحياتيه لقدرتها على افراز انزيم البيتا لاكتميز مما يؤدي الى حصول العديد من الوفيات بين البشر حيث انها تملك عوامل فوعه تلغي معضم دفاعات المضيف وتسبب الضرر للانسجه وتقلل من القدره التنافسيه للبكتريا ايضا لذالك وجد حاجه ماسه لوجود علاج مناسب ولتحسين نتائج المرضى الذين يعانون من هذه البكتريا .ولقدرتها الجوهريه في مقاومة المضادات الحياتيه تمكنها من العيش والانتشار في المرافق الطبيه [٦].

وتعتبر ثاني اكثر الامراض شيوعا المعزوله من المرضى المصابين بالالتهابات الرئويه المرتبطه بالتنفس الاصطناعي بسبب قدرتها للتاقلم في كافه البيئات[٧] فتنتقل من الاجهزه الملوث هبها الى المرضى الراقدين في المشفى ونضرا لمقاومتها للمضادات الحياتيه يجعل التعامل معها محدود حيث يجب الوقايه الاستيراتيجيه وايجاد العلاج المناسب هو اولويه ملحه .ولفوعتها القويه لها القدره على احداث الامراض في اوساط المستشفيات ومسؤله عن الانتانات ذات القيح الازرق وهو مصدر تلوث الجروح والحروق وامراض الاتهاب السحايا والسعال [٨]

ولغرض اجراء التصنيف تزرع البكتريا على اوساط التربتوز سويا السائل trbtos suea broth لمدة 18ساعه وبدرجة حراره 37^0 واهم الطرق التصنيفيه هي

1-مقاومتهــــا لـــبعض المضــــادات الحياتيـــه مثـــل (chloromphenicol وneomycin وgentamicin)فمـثلا النـوع المصـلي 1,6,7مقـاوم للكايبنسـلين وبعض الانواع المصليه .

2-لاتحرر الاندول ولاتطلق غاز H_2S وتفكك البولـه غير ثابت ولا تخمر السكاكر خاصة الكلكوز والاكتوز .

3-تفاعل فوكس بروسكور سلبي وكذلك تفاعل حمرة المثيل وهي ترجع النترات الـى نتريت[٩] .

(الفصل الثاني)

المواد المطلوبه

1-مستعمره *Pseudomonas arginosa* ناميه ومحظره مسبقا

2-مادة (oxidrop)

3-ورقه ترشيح عاديه

4- loop

5- اطباق بتري

6-distilled water

7-مصباح بنزن

8-حوض للتصبيغ

9-iodine

10- crystal violet

11-alcohol aceton solution

12- Slid

13- sefranin

14-normal slain

15-وسط للنمو وسط blood agar تم تحضيره مسبقا ..
16-عيدان خشبيه نضيفه .

17-catalìase solution .

18-Swap

19- وسط ال molar hntun

طرق العمل :

بعد تحضير الاكار المغذي يتم صبه في طبق بتري في اجواء معقمه وتركه ليتصلب .بعد التاكد من تصلب الوسط يتم اخذ مسحه من العينه الماخوذه من المريض (حرق متقيح)وفرشه على الوسط بطريقه النشر ووظع الطبق في الحاظنه لمده ٤٨ ساعه على درجه ٣٧° .وبعد مرور هذه الفتره الزمنيه نلاحظ نمو المستعمره البكتيريه وبهذا تكون جاهزه للفحص والتشخيص .

:- blood hemolytic test-

صب وسط ال blood agar في طبق بتري في ضروف معقمه وتركه ليتصلب .

تعقيم الloopبشعله بنزن ,وتبريده ,بواسطته اخذ مسحه صغيره من المستعمره المحظره سابقا .وفرشها على وسط الblood agar بطريقه الفرش الاعتياديه (مثلا فرشها على الوسط بشكل حلزوني او بشكل عشوائي) .بعد ذلك يغلق الطبق ويوضع في الحاضنه بدرجه النمو الاعتياديه للبكتريا ٣٧° ولمده ٢٤ ساعه.

بعد مرور الفتره الازمه للنو نلاحظ نمو البكتريا على الوسط وتحللها للدم بشكل جزئي دليل على انها تحلل الدم من نوع B.

كما في الشكل (١)

-ختبار oxides :

1-نضع ورقه الترشيح في طبق بتري الفارغ النضيف

2-نضع على ورقه الترشيح قطره صغيره من مادة . oxides

3-ناخذ بواسطه loop المعقم من مركز المستعمره الناميه ومن ثم فرش العينه على قطره الoxides

4-ننتضر لمده اقل من خمس دقائق وبعد ذالك نلاحظ المسحه المفروشه بان لونها قد تغير الى اللون الارجواني كما في الشكل رقم (٢) دليل على ايجابيه الاختبار .

شكل (٢)

اختبار cataliase:

نضع قطره صغيره من -cataliase solution على السلايد .

بواسطه العود الخشبي ناخذ مسحه صغيره من المستعمره ووضعها على قطره cataliase solution الموظوعه على السلايد .

نحرك بواسطه العود الخشبي العينه ودمجها مع قطره المحلول نلاحظ بعد مظي اقل من نصف دقيقه تكون الفقاعات في العينه كما في الشكل(٣)

دليل على ايجابيه الاختبار ,,,,,

شكل(٣)

اختبارصبغه غرام:

١-ناخذ بواسطه loop بعد تعقيمه بلهب بنزن عينه صغيره من المستعمره وفرشها على الشريح الزجاجيه

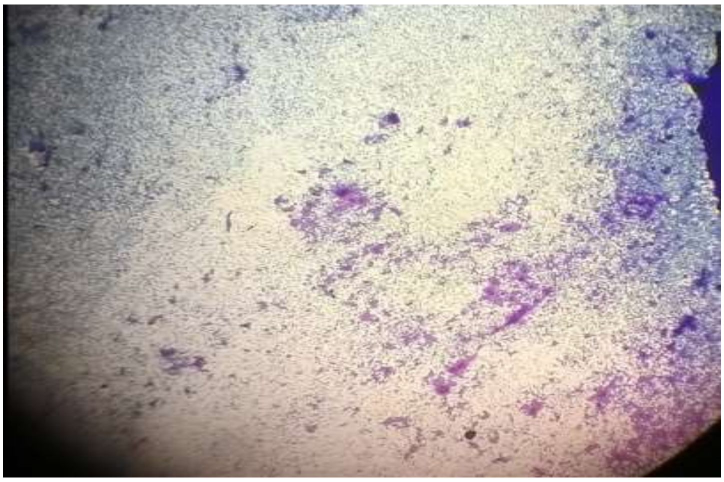
٢-نغمر الشريحه بصبغه crystal violet ذو اللون البنفسجي لمده دقيقه واحده فقط.بعد ذلك نغسل الشريحه بالماء المقطر لغرض التخلص من الصبغه الزائده .

٣-نغمر الشريحه بصبغه iodine الصفراء وتترك ايضا لمده دقيقه كامله .ثم نغسل الشريحه بالماء المقطر .

٤- نغمر الشريحه ب-alcohol aceton solution المحظر بنسبه ١:١ ذو اللون الشفاف المستخدم لاستخلاص الصبغه decolorzer ويترك لمده ٣٠ دقيقه ويغسل بعد ذلك بالماء المقطر.

٥-تغمر الشريحه بصبغه safranin ذو اللون الاحمر الغامق وتترك للتصبيغ ل٤٥دقيقه.ثم تغسل السريحه بالماء المقطر .

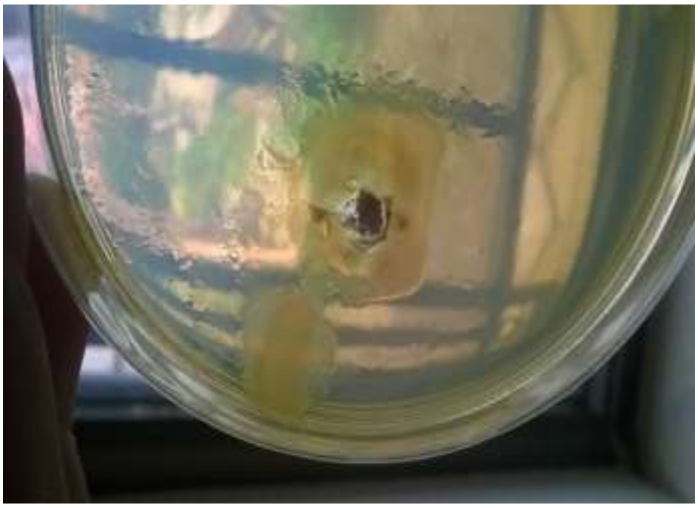
٦-وبعد ذلك تنشف الشريحه بورق الترشيح و تفحص الشريحه تحت المجهر على قوه X100 نلاحظ تصبغ العينه بالون الاحمر دليل على سالبيه البكترا لصبغه غرام كما في الشكل رقم (٤).



شكل (٤)

اختبار الحساسيه للمضادات الحيويه :

بعد صب ال molar hntun وتركه ليتصلب يتم نشر العينع على الوسط وعمل حفره في الوسط يتم وظع المضاد الحيوي فيها في ضروف معقمه .ويتم بعد ذالك وضع الطبق في الحاظنه بدرجه ٣٧ درجه مؤيه لمده ٢٤ ساعه .وبعد مظي يوم كامل نلاحظ النمو البكتيري حول المظادين حيث لوحظ حساسيه البكتريا للمضاد الحيوي Chloramphenicol حيث ضهر النمو بشكل حلقه نقيه حول المضاد كما في الشكل (٥) وضهرت مقاومه البكتريا للمضاد الحيوي Ampicillin حيث ظهرت البكترا حول المضاد بحلقه ضيقه كما في الشكل رقم (٦)



شكل رقم(٥)

اختبار حساسيه البكتريا للمضاد

Chloramphenicol

شكل رقم (٦)

اختبار حساسيه البكتريا للمضاد الحيوي

Ampicillin

(الفصل الثالث)

النتائج :

جدول رقم (١) يبين نتائج الاختبارات السابقه

Gram stein	Blood hemolytic test	Catalias test	Oxides test	Name of Bactria
-	B	+	+	*Pseudomonas :arginosa*

يبين الجدول السابق نتائج الختبارات السابقه حيث يبين ايجابيه البكترا اتجاه اختبار oxides من خلال اعطاء تغير لوني مباشر لا تتعدى المده الزمنيه اقل من ١٠ دقائق .

ويبين ايضا ايجابيه اختبار cataliase من خلال ضهور فقاعات هوائيه عند وضع محلول cataliase على المسحه وتحريكها لدقائق .

اما اختبار التصبيغ بصبغه غرام تكون البكتريا سالبه له ونستدل على ذلك من خلال تصبيغ المسحه وفحصها تحت المجهر تضهر باللون الاحمر .

وعند اجراء اختبار تحلل الدم نجد ان عند تنميه البكتريا على وسط يحوي عينه دم تعمل البكتريا على تحلل الدم جزئيا (B) .

جدول رقم (٢) يبين نتائج اختبار حساسيه البكتريا لمجموعه من المضادات الحياتيه

Name ofBactria	Chloramphenicol	Ampicillin
Pseudomonas :arginosa	حساسه	مقاومه

لوحظ من الجدول اعلاه قابليه البكتريا على مقاومه المظاد الحيوي Ampicillin وكذلك ظهرت مقاومتها الظئيله اتجاه المضاد Chloramphenicol.

المناقشه:

بعد اجراء الاختبارات السابقه على بكتريا (*Pseudomonas arginosa*) يتبين انها بكتريا سالبه لصبغه غرام بعد اجراء اختبار التصبيغ وضهور المسحه تحت المجهر باللون الوردي هذا فيما يتضمن اختبار التصبيغ بصبغه غرام .

اما ايجابيتها وسلبيتها لمحلول cataliase استدللنا على ايجابيه البكتريا لهذا المحلول من خلال ضهور الفقاعات الهوائيه في العينه .وكذلك ايجابيتها لاختبار oxides حيث تم التاكد من ذلك من خلال التغير اللوني الذي حصل للمسحه بعد اضافه محلولoxides .

واما فيما يخص قابليه البكترا على تحليل الدم فقد تم التاكد من انها بكتريا لها القابليه على تحليل الدم بشكل جزئي(B) وذلك من خلال اجراء اختبار تحلل الدم للبكتريا .

وكذلك تم الكشف عن حساسيه البكتريا لبعض المضادات الحيويه ك Chloramphenicol وAmpicillin

حيث اضهرت مقاومتها الظئيله للمضاد الحيوي Chloramphenicol واظهرت مقاومه قليله اتجاه Ampicillin

المصادر :

1-king Eo,word mk raney Ed(1954)

2-collins Fm,(1955) effect of argenos of entreat enzymes

3-Haset Dj (1996)bacteria (187) (24):7322-5 pmld.

4-wirlizscn dtarranr Ulrich m.cta (2002)

5-cooper m tavankar GR Williams HD (2003).

6- في مصدر الجدول lyczak وآخرون

7-vap Hydro(2008)

8- كتاب علم الاحياء المجهريه الطبي (والمضادات الحيويه والمعقمات)(2009)

9- كتاب علم الاحياء المجهريه (والمضادات الحيويه والمعقمات (2009)