جامعة القادسية
كلية التربية
قسم علوم الحياة

دراسة بكتريولوجية وو راثية لبعض البكتريا المرافقة لخمج السبيل التنفسي في مدينة الديوانية

رسالة مقدمة إلى
مجلس كلية التربية - جامعة القادسية
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير
في علوم الحياة / أحياء مجهريه

من قبل

ثائر عبد دعيشيش البديري

إشراف

أ.م. علي عبد رحيم الناشي **أ.م.د. أزهار نوري حسين الموسوي**

تشرين الثاني - 2010 م ذي الحجة - 1431 هـ

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ وَيَسْأَلُونَكَ عَنِ الرُّوحِ قُلِ الرُّوحُ مِنْ أَمْرِ رَبِّي وَمَا أُوتِيتُم مِّن الْعِلْمِ إِلاَّ قَلِيلاً ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة الإسراء

الآية : 58

﴿ إقرار المشرفين ﴾

نشهد بأن إعداد هذه الرسالة جرى تحت إشرافنا في كلية التربية / جامعة القادسية ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / أحياء مجهرية .

التوقيع :

الاسم : السيد علي عبد رحيم الناشي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : 17 / 8 / 2010

التوقيع :

الاسم : د. أزهار نوري حسين الموسوي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : 17 / 8 / 2010

﴿ إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا ﴾

بناءاً على التوصيات المقدمة من قبل المشرفين ، أُرشح هذه الرسالة للمناقشة .

التوقيع :

الاسم : د. هادي مدلول حمزة الميالي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : 17 / 8 / 2010

﴿ إقرار المقوم اللغوي ﴾

اشهد بأن أعداد الرسالة الموسومة "دراسة بكتريولوجية ووراثية لبعض البكتريا المرافقة لخمج السبيل التنفسي في مدينة الديوانية" تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية و تعبيرية وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الاسلوب وصحة التعبير .

التوقيع :

الاسم : السيد عبد المحسن جاسم

المرتبة العلمية : مدرس مساعد

التاريخ : ١ / ٩ / 2010

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة أننا قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ (**دراسة بكتريولوجية ووراثية لبعض البكتريا المرافقة لخمج السبيل التنفسي في مدينة الديوانية**) وناقشنا الطالب **ثائر عبد دعيشيش** في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ ٢٨/ ١١ /٢٠١٠ وأنها جديرة لنيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة/ أحياء مجهرية وبتقدير (امتياز).

رئيس اللجنة
التوقيع:
الاسم: د.قاسم نجم عبيد
المرتبة العلمية:استاذ
جامعة بابل/كلية العلوم
التاريخ: /١١/٢٠١٠

عضواً
التوقيع:
الاسم:عبد الباسط عبد الصمد عبد الله
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
جامعة واسط / كلية الطب
التاريخ: / ١١/ ٢٠١٠

عضواً
التوقيع:
الاسم:د. ماجد كاظم عبود
المرتبة العلمية:استاذ مساعد
جامعة القادسية /كلية التربية
التاريخ: / /٢٠١٠

عضواً ومشرفاً
التوقيع:
الاسم:السيد علي عبد رحيم
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
جامعة القادسية /كلية التربية
التاريخ: / /٢٠١٠

عضواً ومشرفاً
التوقيع:
الاسم:د. أزهار نوري حسين
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
جامعة القادسية /كلية التربية
التاريخ: / /٢٠١٠

مصادقة عمادة كلية التربية/جامعة القادسية

أ.د. سعيد عدنان المحنة
عميد كلية التربية
عميد كلية التربية
أ.د. سعيد عدنان المحنه

الإهداء

إلى من علمني حرفاً فملّكني عبداً .....مُعلمي
عرفاناً وإمتناناً

إلى قبس أنار لي الدرب ..... و رحل
ليبقى خالداً في نفسي إلى الأبد.....والدي
إلى الشفاه التي لم تكل بالدعاء لي .....والدتي
براً وإحساناً

إلى رمز المودة والوفاء والصدق والمحبة .....أخوتي وأصدقائي
إخلاصاً و وفاءاً

إلى امتدادي وفلذات كبدي ..... أولادي
نور الهدى ..... احمد
حباً وحناناً

إلى من شاركتني غربتي وحملت عني أتعابي ..... زوجتي
فخرا واعتزازاً

إلى كل يد امتدت لي بالخير .... إلى كل من يسره نجاحي
إليهم جميعاً أهدي ثمرة جهدي المتواضع هذا

ثائر

شكر و تقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين أبي القاسم محمد وعلى آله الطاهرين وصحبه المنتجبين ومن تبعهم إلى يوم الدين .

وأنا أُكمل رسالتي يطيب لي أن أتقدم بأسمى معاني الشكر والعرفان لأستاذي الفاضلين الأستاذ المساعد علي عبد رحيم الناشي والأستاذ المساعد الدكتورة أزهار نوري حسين الموسوي المشرفين على رسالتي الذين كان لهما الفضل بعد الله في اختيار موضوع البحث وجهدهم المتواصل في المتابعة والإرشاد ومساعدتهما في توفير الكثير من مستلزمات البحث فجزآهم الله عني الجزاء الأوفى .

كما يدعوني الواجب أن أتقدم بوافر الشكر والتقدير إلى عمادة كلية التربية / جامعة القادسية ممثلة بالأستاذ الدكتور سعيد عدنان المحنة والى رئاسة قسم علوم الحياة المتمثلة بالأستاذ المساعد الدكتور هادي مدلول حمزة لما قدماه لي من رعاية ومساعدة، كذلك أجد نفسي ملزم بالشكر والتقدير لأستاذي الفاضل الأستاذ المساعد الدكتور ماجد كاظم معاون العميد للشؤون العلمية عرفاناً لما قدمه من عون طيلة مدة الدراسة، شكري وامتناني إلى الأستاذ المساعد الدكتور قاسم سلمان رئيس قسم اللغة الإنكليزية لجهده المبذول في ترجمت غلاف وملخص الرسالة، كما أقدم جزيل شكري لأخي وأستاذي السيد حيدر عبد الواحد للجهد الكبير الذي بذله في توفير الكثير من مصادر هذه الرسالة.

وأتقدم بوافر شكري وامتناني لمنتسبي العيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية لما قدموه لي من مساعدات خلال مدة البحث عرفاناً بجميلهم وأخص بالذكر الدكتور حسن شريف مدير العيادة والسيد رحمن عيدان مسؤول المختبر، وأقدم خالص شكري وتقديري لمنتسبي مستشفى الديوانية العام وبالخصوص كادر قسم الأمراض الانتقالية (الحميات) ، كما لا يفوتني أن أتقدم بالشكر الجزيل لمنتسبي مستشفى النسائية والأطفال للمساعدات الكبيرة التي قدموها واخص بالذكر الدكتور جواد كاظم ، السيد حيدر جاسم ، رجوان فليح ، وجدان فليح . كما اهدي شكري وتقديري لأساتذتي في كلية التربية / قسم علوم الحياة واخص منهم كل من السيد حيدر حبيب ، احمد جاسم ، علي عبيد ، أزهر علي و السيد وسام عيدان ، اعتزازي واحترامي إلى زملائي من طلبة الدراسات العليا في كلية التربية / جامعة القادسية كل من الأخت هدى رحيم ، الأخ عباس جواد ، جميل كريم ، آمال عبد الرضا ومنال حمزة .

وفي الختام شكري وامتناني إلى عائلتي (والدتي وزوجتي) خاصة لتوفيرهم لي كل أشكال الدعم وتحملهم معي عناء الجهد طيلة فترة دراستي أثابهم الله خير الثواب كما أتقدم بوافر الشكر لكل من ساعدني في انجاز هذه الرسالة ولم تسنح الفرصة لذكره .

ثائر

الخلاصة

تم جمع 300 عينة من مناطق السبيل التنفسي توزعت على 100 شخص مصاب بأخماج المسالك التنفسية وبداء السكري ، 100 شخص مصاب بأخماج المسالك التنفسية غير مصاب بداء السكري و 100 شخص غير مصاب (مجموعة ضابطة) ، جمعت العينات من المرضى المراجعين لمستشفى الديوانية العام و العيادة الاستشارية للأمراض الصدرية و التنفسية في مدينة الديوانية للمدة من 2009/2/1 ولغاية 2009/11/10 .

وجد إن 71% ، 67% و 18% من العينات أظهرت نمواً بكتيرياً في مجموعة الأشخاص المصابين بداء السكري ، الأشخاص غير المصابين بداء السكري و الأشخاص الأصحاء (المجموعة الضابطة) وعلى التوالي ، كما أظهرت نتائج التشخيص البكتريولوجي عزل 208 عزلة بكتيرية من المجاميع الثلاث قيد الدراسة توزعت على 127 عزلة (61%) تعود للبكتريا الموجبة لصبغة غرام و 81 عزلة (39%) تعود للبكتريا السالبة لصبغة غرام .

بينت النتائج أن بكتريا *Staphylococcus aureus* كانت الأكثر ترددا بين الأنواع البكتيرية المعزولة ، إذ شكلت نسبة 29.6%(32 عزلة) ، 32.9%(27 عزلة) و 22.2% (4 عزلات) وعلى التوالي في المجاميع الثلاث سالفة الذكر ، أما الأنواع البكتيريا الأخرى المعزولة فتدرجت في ترددها من بكتريا *Moraxella catarrhalis* ، *Klebsiella pneumoniae* و *Pseudomonas aeruginosa* إذ بلغت نسبة 14.8%، 10.2% و 9.3% وعلى التوالي ، تليها بكتريا *Staphylococcus epidermidis* ، *Streptococcus pneumoniae* و *Haemophilus influenzae* بنسبة 8.3% وللأنواع الثلاثة ، ثم بكتريا *Streptococcus Pyogenes* (6.5%) ، مجموعةViridans Streptococci (2.8%) و *Escherichia coli* (1.9%) في الأشخاص المصابين بأخماج المسالك التنفسية وبداء السكري ، أما في الأشخاص غير المصابين بداء السكري فتدرج تردد الأنواع الأخرى من بكتريا *K. pneumoniae* (11%) ثم بكتريا *Staph. epidermidis* و *S. Pyogenes* بنسبة (9.8%) يليها بكتريا *S. pneumoniae* و *H. influenzae* بنسبة (8.5%) بعدها بكتريا *M. catarrhalis* و *P. aeruginosa* بنسبة (7.3%) وأخيراً مجموعة Viridans Streptococci (3.7%) و *E. coli* (1.2%) . في حين تدرجت الأنواع الأخرى في نسبة تواجدها في (المجموعة الضابطة) من بكتريا *Staph. epidermidis* (33.3%) ، *Staph. aureus* (22.2%) ، مجموعة Viridans Streptococci (16.7%) ، *H. influenzae* (11%) تليها كل من بكتريا *S. pneumoniae* ، *M. catarrhalis* و *K. pneumoniae* بنسبة (5.6%) وللأنواع الثلاث .

تم التحري عن بعض عوامل الضراوة المرتبطة بإمراضية الأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة غرام وبينت النتائج أن 84 عزلة بكتيرية من أصل 127 عزلة كانت تحتوي على المحفظة وبنسبة 66.2% ، كما أعطت 107 عزلة وبنسبة 84.3% القدرة على الالتصاق بالخلايا الطلائية للفم ، وأظهرت 104 عزلة وبنسبة 81.9% القدرة على إفراز الهيمولايسين ، في حين كانت 89 عزلة منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز وبنسبة 70.1%.

أظهرت نتائج فحص الحساسية الدوائية تجاه 15 مضاداً حيوياً من المضادات التي اغلبها شائع الاستعمال في علاج المسالك التنفسية وان معظم أنواع البكتريا أظهرت مقاومة متعددة لمعظم هذه المضادات تراوحت بين (مضاد واحد) قاومته العزلة Viridans Streptococci رقم (126) إلى (13 مضاد) قاومته العزلة *Staph. aureus* رقم (34) . كما تم تحديد قيم التركيز المثبط الأدنى MICs لبعض المضادات الحيوية المستخدمة في فحص الحساسية وتراوحت هذه القيم بين (≤ 4- 128) مايكروغرام/ملليتر لمضاد Ciprofloxacin إلى (8 - 1024<) مايكروغرام/ملليتر لمضاد Ampicillin .

تم التحري عن المحتوى البلازميدي لبعض العزلات البكتيرية (16 عزلة) وقد سجلت النتائج وجود على الأقل حزمة بلازميدية واحدة ورافق ذلك إنتاج معظم العزلات البكترية لأنزيمات ألبيتالاكتاميز ، كما تبين عدم وجود علاقة بين عدد الحزم البلازميدية المعزولة وعدد المضادات الحيوية التي قاومتها تلك العزلات .

اجري الاقتران البكتيري لـ 6 عزلات بكتيرية اتصفت بكونها حساسة لمضاد الريفامبسين ، وأظهرت النتائج فشل جميع العزلات في عملية الاقتران على الرغم من تكرار العملية لثلاث مرات إذ لم يتم الحصول على مستعمرات مقترنة .

أُخضِعتْ 4 عزلات بكتيرية لتجارب التحول الوراثي امتازت بحساسيتها لمضاد الريفامبسين ، وأُستخدمت السلالة *E. coli* MM294 كخلايا مستلمة ، وقد أمكن فعلا نقل صفة المقاومة المتعددة وإنتاج أنزيمات ألبيتالاكتاميز إلى الخلايا المتحولة ، تراوح تردد التحول مابين 2.3×10^{-3} للعزلة *Staph. epidermidis* رقم (67) إلى 7.5×10^{-5} للعزلة *S. Pyogenes* رقم (89) . كما اختبرت قابلية الخلايا المتحولة على إنتاج إنزيمات ألبيتالاكتاميز ومقاومة المضادات الحيوية ، كذلك تم التحري عن المحتوى البلازميدي للخلايا المتحولة والتي كانت تشابه الخلايا الأصلية في نمط المحتوى البلازميدي .

المحتويات

الموضوع	التسلسل
الخلاصة	ح
قائمة المحتويات	ي
الفصل الأول : المقدمة	2
الفصل الثاني : استعراض المراجع	
2.2- الجهاز التنفسي	6
2.2- آليات حماية الجهاز التنفسي	6
3.2- المسببات المرضية لأخماج الجهاز التنفسي .	9
2.3.2- بكتريا *Staphylococcus spp.*	9
2.3.2- بكتريا *Streptococcus spp.*	22
3.3.2- بكتريا *Haemophilus spp.*	21
1.3.2- بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	26
3.3.2- بكتريا *Moraxella catarrhalis*	21
6.3.2 - بكتريا *Klebsiella pneumoniae*	22
4.2- بعض العوامل المرتبطة بإمراضية البكتريا	22
1.4.2- المحفظة	22
2.1.2- الالتصاق وعوامل الاستعمار	22
3.4.2- إنتاج الهيمولايسين	23
4.4.2- إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز	23
3.2 - المضادات الحيوية	22
6.2- مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية	32
2.6.2- إنتاج الأنزيمات المثبطة للمضادات الحيوية	32
2.6.2- أنظمة الدفق	33
3.6.2- تغيير المسارات الأيضية	33
1.6.2- تغيير موقع الهدف	36
3.6.2- حاجز النفاذية	36

الموضوع	التسلسل
2.2- أسس مقاومة البكتريا لمضادات الحياتية	32
2.2.2- الاساس غير الوراثي للمقاومة	32
2.2.2- الأساس الوراثي لمقاومة	31
2.2.2.2- المقاومة الكروموسومية	31
2.2.2.2- المقاومة البلازميدية	39
3.2.2.2- المقاومة التي تتوسطها العوامل القافزة	12
1.2- آليات انتقال جينات المقاومة	13
2.1.2- الاقتران البكتيري	13
2.1.2- التحول الوراثي	11
الفصل الثالث : المواد و طرائق العمل	
1.3- الأجهزة والمواد	19
1.1.3- الأجهزة المستخدمة	19
2.1.3- المواد الكيميائية	32
3.1.3- الأوساط الزرعية	32
1.2.3 - المضادات الحيوية المستخدمة في فحص الحساسية و تراكيزها والشركة المجهزة المنشأ	32
3.2.3 - المضادات الحيوية المستخدمة في فحص التركيز المثبط الأدنى والشركة المجهزة والمنشأ	33
6.1.3- السلالة القياسية	31
7.1.3- الإنزيم	31
8.1.3- مواد متفرقة	31
2.3- طرائق العمل	33
1.2.3- طرائق التعقيم	33
2.2.3 – تحضير المحاليل والكواشف والصبغات	33
1.2.2.3 – المحاليل والدواريء	33
2.2.2.2.3- المحلول الملحي الفسلجي	33
2.2.2.2.3- محلول ثابت العكرة القياسي	33
3.1.2.2.3- دارئ الفوسفات الملحي	36
1.2.2.2.3- محاليل المضادات الحيوية	36
5.1.2.2.3 - محاليل الكشف عن أنزيمات البيتالاكتاميز	36

الموضوع	التسلسل
6.1.2.2.3- محاليل عزل الدنا البلازميدي	32
2.2.2.2.3- محاليل الترحيل الكهربائي	31
2.2.2.3- الكواشف	31
1.2.2.2.3- كاشف الأوكسديز	31
2.2.2.2.3- كاشف إنزيم الكاتليز	31
3.2.2.2.3- كاشف كوفاكس	39
4.2.2.2.3- كاشف فوكس بروسكاور	39
5.2.2.2.3- كاشف أحمر المثيل	39
6.2.2.2.3- كاشف تميع الجيلاتين	39
7.2.2.2.3- محلول بلازما دم الأرنب	39
3.2.2.3- الصبغات	39
2.3.2.2.3- صبغة غرام	39
2.3.2.2.3- صبغة العصيات المقاومة للقصر بالحامض	62
3.3.2.2.3- صبغة المحفظة	62
3.2.3- تحضير الأوساط الزرعية	62
1.3.2.3- وسط أكار الدم	62
2.3.2.3- وسط أكار الجوكليت	62
3.3.2.3- وسط لوريا السائل	62
4.3.2.3- وسط المثيل الأحمر – فوكس بروسكاور السائل	62
5.3.2.3- وسط اليوريا	62
6.3.2.3- وسط تخمر السكريات	62
2.3.2.3- وسط تحلل الإسكولين	62
8.3.2.3- وسط تميع الجيلاتين	62
9.3.2.3- وسط اختبار الحركة	62
10.3.2.3- وسط SOC السائل	62
4.2.3- جمع العينات	63
5.2.3- فحص نماذج القشع	63

الموضوع	التسلسل
6.2.3- زرع العينات	61
7.2.3- عزل وتشخيص البكتريا	61
1.7.2.3- الصفات الزرعية والفحص المجهري	61
2.7.2.3- الاختبارات الكيموحيوية	63
1.2.7.2.3- اختبار إنزيم الأوكسديز	63
2.2.7.2.3- اختبار إنتاج الكاتليز	63
3.2.7.2.3- اختبار إنتاج الأندول	63
4.2.7.2.3- إختبار فوكس – بروسكاور وأحمر المثيل	63
5.2.7.2.3- اختبار استهلاك السترات	66
6.2.7.2.3 - إختبار الحركة	66
7.2.7.2.3- اختبار إنتاج إنزيم اليوريز	66
8.2.7.2.3- اختبار كليكلر	66
9.2.7.2.3- اختبار تميع الجيلاتين	62
10.2.7.2.3- اختبار تخمر السكريات	62
11.2.7.2.3- اختبار إنزيم مخثر البلازما بطريقة الأنبوب	62
12.2.7.2.3- النموعلى أكار المانيتول الملحي	62
13.2.7.2.3.- اختبار الحساسية لنوفوبايوسين	62
21.2.2.2.3- اختبار التحلل في املاح الصفراء	61
15.2.7.2.3- اختبار تحلل الاسكولين	61
16.2.7.2.3- اختبار الحساسية للأبتوجين و الباستراسين	61
3.7.2.3- التشخيص الكيموحيوي باستخدام نظام الـ api	61
8.2.3- التحري عن بعض العوامل المرتبطة بضراوة البكتريا	22
1.8.2.3- تكوين المحفظة البكتيرية	22
2.8.2.3- عوامل الالتصاق	22
3.8.2.3- إنتاج الإنزيم الحال للدم	22
4.8.2.3- إنتاج إنزيم ألبيتا لاكتاميز	22
9.2.3- حفظ وادامة العزلات	22
22.2.3- المقاومة للمضادات الحيوية	22
1.10.2.3- حساسية البكتريا للمضادات الحيوية	22

الموضوع	التسلسل
2.10.2.3- تحديد التركيز المثبط الأدنى	23
11.2.3- عزل الدنا البلازميدي	23
12.2.3- الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي	21
13.2.3- الاقتران البكتيري	23
14.2.3- التحول الوراثي	26
23.2.3- التحليل الإحصائي	22
الفصل الرابع : النتائج و المناقشة	
2.1- العزل والتشخيص للعينات المرضية	29
1.1.4- العزل	29
2.1.4. تشخيص العزلات البكتيرية	12
3.2.1- حالات الخمج المفرد	12
1.2.1- حالات الخمج المختلط	11
2.4 - التحري عن بعض العوامل المرتبطة بضراوة البكتريا	92
1.2.4 - إنتاج المحفظة	92
2.2.4 - التحري عن عوامل الالتصاق في البكتريا	92
3.2.4 - إنتاج الأنزيم الحال للدم	92
4.2.4 - إنتاج إنزيمات ألبيتالاكتاميز	92
3.4 - حساسية البكتريا للمضادات الحيوية	93
4.4 - تحديد التركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية	222
5.4 - عزل الدنا البلازميدي	221
6.4 - الاقتران البكتيري	222
7.4 - التحول الوراثي	221
8.4 - الاستنتاجات	223
9.4 - التوصيات	221
المصادر	226
الملاحق	239
الملخص باللغة الانكليزية	B-C

قائمة بعناوين الجداول

الرقم	العنـــوان	الصفحة
2-2	التركيب الكيميائي لبعض المضادات الحيوية وآلية عملها واستخداماتها الطبية	29
2-1	نسب الإصابة بأخماج المسالك التنفسية عند الأشخاص المشمولين بالدراسة	29
2-1	أنواع البكتريا ونسبها المئوية المعزولة من أخماج المسالك التنفسية للأشخاص المشمولين بالدراسة	12
3-1	عدد العزلات الميكروبية والنسب المئوية لتواجدها عند الأشخاص المشمولين بالدراسة في حالة الخمج المفرد	12
1-1	عدد العزلات البكتيرية والنسب المئوية لتواجدها في اخماج المسالك التنفسية المختلطة عند الأشخاص المشمولين بالدراسة	19
3-1	النسب المئوية لبعض العوامل المرتبطة بإمراضية البكتريا قيد الدراسة	92
6-1	النسب المئوية لمقاومة الأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة غرام المعزولة من أخماج المسالك التنفسية اتجاه بعض المضادات الحيوية	91
2-1	المدى لقيم MICs للمضادات الثمان المستخدمة في الدراسة للعزلات البكتيرية	222
1-1	المحتوى البلازميدي لبعض العزلات البكتيرية المعزولة من اخماج المسالك التنفسية وإنتاجها لأنزيم البيتالاكتاميز	223
9-1	مقاومة المضادات الحيوية وإنتاج إنزيم البيتالاكتاميز لكل من الخلايا الواهبة والمتحولة	229
22-1	التراكيز المثبطة الدنيا MIC_S لبعض المضادات الحيوية لعزلات بكتريا *E.coli* MM 294 المتحولة	222

قائمة بعناوين الأشكال

الرقم	العنـــوان	الصفحة
2-2	الجهاز التنفسي العلوي والسفلي	2
2-2	أهداف وعمل المضادات الحيوية واستخدام أنواعها ضد الخلية الجرثومية	21
3-2	ميكانيكية عمل أنزيمات البيتالاكتام	33
1-2	ميكانيكية الاقتران البكتيري	16
3-2	ميكانيكية التحول البكتيري	12
2-1	النسب المئوية لمقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة	222
2-1	الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي لبعض العزلات البكتيرية في هلام الاكاروز2.2 وبفرق جهد 6 فولت/سم	226
3-1	الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي للخلايا المتحولة وراثيا في هلام الاكاروز بتركيز 2.2 وبفرق جهد 6 فولت/سم	222

قائمة بعناوين الملحق

الرقم	العنـــوان	الصفحة
2	استمارة مرضية تتضمن المعلومات المهمة للمريض	239
2	القائمة التوضيحية للفحوصات التي تشملها عدة api 20 E التشخيصية عن الشركة المصنعة BioMerieux	212
3	القائمة التوضيحية للفحوصات التي تشملها عدة api Staph التشخيصية عن الشركة المصنعة BioMerieux	212
1	نتائج الاختبارات البايوكيميائية للبكتريا المعزولة من خمج المسالك التنفسية	212
3	بعض العوامل المرتبطة بإمراضية البكتريا المعزولة من أخماج المسالك التنفسية للأشخاص المشمولين بالدراسة	213
6	المعدلات القياسية لأقطار التثبيط للمضادات الحياتي	219
2	فحص الحساسية للعزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام المعزولة من أخماج المسالك التنفسية	232
1	التراكيز المثبطة الدنيا لبعض المضادات الحيوية المستخدمة ضد العزلات البكتيرية	232

الفصل الأول

المقدمة

INTRODUCTION

المقدمة Introduction

يعد الجهاز التنفسي الرابط الرئيس بين الجسم والبيئة الخارجية، إذ يتنفس الإنسان الهواء الجوي ويتدفق مع ما يوجد فيه من أحياء مجهرية إلى داخل المسلك التنفسي (Wilkins *et al.*, 2007) ، والبكتريا واحدة من تلك الميكروبات التي تدخل إلى السبيل التنفسي بالرغم من أن بعضها يوجد طبيعياً ويعيش فيه كجزء من النبيت الطبيعي Normal Flora (السعيد،1997) ، لكن بعضها له دور مهم في حدوث أخماج الجهاز التنفسي كونها ذات طبيعة انتهازية Opportunistic في حالات ضعف مقاومة الجسم لأسباب عديدة (Wald, 1998 ; Levinson and Jawetz , 2000) ، وهنالك العديد من المسببات المرضية التي تساهم في إحداث هذه الأخماج بالإضافة إلى البكتريا كالرواشح Viruses التي تنتشر بشكل واسع وبدرجة اقل الفطريات والطفيليات (Baddley *et al.*, 2003) ، وتختلف طرق انتقال الإصابة، فمنها ما يحدث نتيجة العدوى من أشخاص مصابين عن طريق الرذاذ ، أو استخدام الأدوات الشخصية للمرضى كالمناشف ، أو عن طريق ما يعرف بخمج المستشفيات Nasocomial infection (Felton and Bryceson, 1996) ، ويعد الحاملون المزمنون Chronic carriers مصدرا من مصادر انتقال المرض (Falkow,1997) .

تستهدف الأخماج التنفسية التي تصيب الإنسان القناة التنفسية العليا والسفلى، وتعد الأخماج التنفسية السفلى هي الأكثر خطورة لأنها تصيب الرئتين والقصبات والشعب الهوائية محدثة مضاعفات قد لا يحمد عقباها عند تطور الحالة المرضية للشخص المصاب (Baddley *et al.*, 2003) ، إذ تشير تقارير منظمة الصحة العالمية إلى زيادة معدلات الوفيات التي تحصل سنويا" لاسيما لدى الأطفال حديثي الولادة بسبب الأمراض التنفسية الحادة خاصة مرض ذات الرئة Pneumonia disease الذي أدى إلى وفاة ثلاثة ملايين طفل دون الخامسة من العمر في الدول المتقدمة والذي تحدثه بكتريا *Streptococcus pneumoniae* و *Haemophilus influenzae* (Fatmi and White, 2002) ، وترتفع أعداد الوفيات بسبب الأمراض التنفسية الحادة إلى خمسة ملايين في الدول ذات الدخل المحدود (Enarson *et al.*, 1998).

على الرغم من امتلاك الجهاز التنفسي آليات متعددة لحمايته من الإصابات المختلفة كالشعيرات التي تبطن الأنف ، وجود الأهداب على سطح الطبقة الطلائية المحيطة بالقنوات التنفسية ، المادة المخاطية المحيطة بالتجاويف الأنفية و بالقنوات التنفسية ، وجود مواد غير متخصصة مضادة للجراثيم كالأنزيم الحال Lysozyme والانترفيرون Interferon الموجودة في الإفرازات التنفسية (Wilkins *et al.*, 2007) ، فضلاً عن الاستجابة

المناعية الخلطية المتمثلة بعمل الخلايا اللمفاوية وتكوينها الأجسام المضادة للجراثيم و فاعلية المناعة الخلوية المتمثلة بنشاط الخلايا البلعمية (Davidson and Macleod, 2001) ، إلا أن هناك عدة عوامل تزيد من شدة إصابة الجرثومة للمضيف، والتي تجعل الجراثيم قادرة على تجاوز الخطوط الدفاعية الأساسية للمضيف، وكذلك تسهم في تخريب النسيج الذي تستوطنه مثل العمر، الجنس، الضعف أو الوهن، السمنة، الأمراض الخبيثة، أمراض الأعصاب ، مرض السكري وتناول الأدوية المثبطة للمناعة (Baddley *et al.*, 2003) ، كما تمتلك هذه الجراثيم العديد من العوامل التي تزيد من شدة إمراضيتها بشكل مباشر أو غير مباشر وتعرف هذه العوامل بعوامل الضراوة Virulence factors مثل المحفظة capsule ، الشعيرات pili ، الأسواط flagella والتي لها دور في التصاق الجرثومة بسطوح خلايا المضيف (Goldman and Green, 2009) ، وكذلك إنتاجها العديد من الإنزيمات والسموم الخارج خلوية التي تقوم بتحطيم أنسجة المضيف كأنزيمات Coagulase , Hyaluronidase , Proteinase , Lipase, والذيفان القاتل لكريات الدم البيض Leucocidin والذيفانات الحالة للدم Haemolysins وغيرها التي لها أهمية كبيرة في إحداث الإمراضية للبكتريا(Jawetz *et al.*, 2004).

لقد كان للمضادات الحيوية منذ اكتشافها الأثر الكبير في خفض معدلات الإصابات المختلفة ، إلا أن الاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية في العلاج أدى إلى ظهور سلالات بكتيرية مقاومة لمضاد حيوي واحد أو أكثر، وتعتبر هذه من المشاكل الخطيرة من الناحية العلاجية (Glazer and Nikaido, 2007)، إذ إن فشل المضادات الحيوية في قتل الممرضات التنفسية بسبب مقاومة الأحياء المجهرية للمضادات يؤدي إلى تكرار حدوث الإصابة (Brook and Gober, 2005). وهنالك العديد من المشاكل الصحية الناجمة عن مقاومة البكتريا لمضادات الحياة كمقاومة المكورات المعوية لمضاد الفانكومايسين Vancomycin ومقاومة مكورات ذات الرئة *S. pneumoniae* لمضاد البنسلين Pencillin وكذلك مقاومة بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococci* لمضاد المثيسلين Methicillin (Pettit *et al.*, 2004).

أن آليات المقاومة للمضادات الحيوية تخضع لسيطرة العوامل الوراثية المحمولة على الكروموسوم Chromosome أو البلازميدات Plasmids أو العناصر القافزة Transposons (Hogg , 2005) ، ومنها الآليات التي تستخدمها البكتريا لمقاومة مضادات البيتالاكتام وأكثرها شيوعاً هي إنتاجها لإنزيمات البيتالاكتاميز، إذ تقوم هذه الإنزيمات بمهاجمة حلقة البيتالاكتام الموجودة في نواة البنسلينات Penicillins والسيفالوسبورينات Cephalosporins ليتحول المضاد إلى مركب غير فعال ، تُشفَّر هذه الأنزيمات بواسطة جينات محمولة على الكروموسوم

أو البلازميد (Qadri *et al.*, 1996) . كما تمتلك البكتريا العديد من الآليات لمقاومة المضادات الحيوية منها تغيير حاجز النفاذية وتغيير موقع الهدف إلى غير ذلك ، وجميع هذه الآليات تشفر من قبل عوامل وراثية تمتلكها البكتريا (Hogg, 2005). وجاءت هذه الدراسة بهدف :

1. التحري عن بعض المسببات المرضية من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام المسببة لخمج المسالك التنفسية لدى الأشخاص المصابين وغير المصابين بداء السكري .
2. دراسة بعض عوامل الضراوة المرتبطة بإمراضية البكتريا الموجبة لصبغة غرام .
3. دراسة نمط المقاومة البكتيرية لعدد من المضادات الحيوية وتحديد التراكيز المثبطة الدنيا لعدد منها .
4. دراسة المحتوى البلازميدي لبعض العزلات البكتيرية وعلاقة ذلك بمقاومتها للمضادات الحيوية .
5. دراسة دور البلازميد في إمراضية بعض العزلات البكتيرية من خلال تجارب الاقتران والتحول البكتيري .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

LITERATURE REVIEW

استعراض المراجع Literature Review

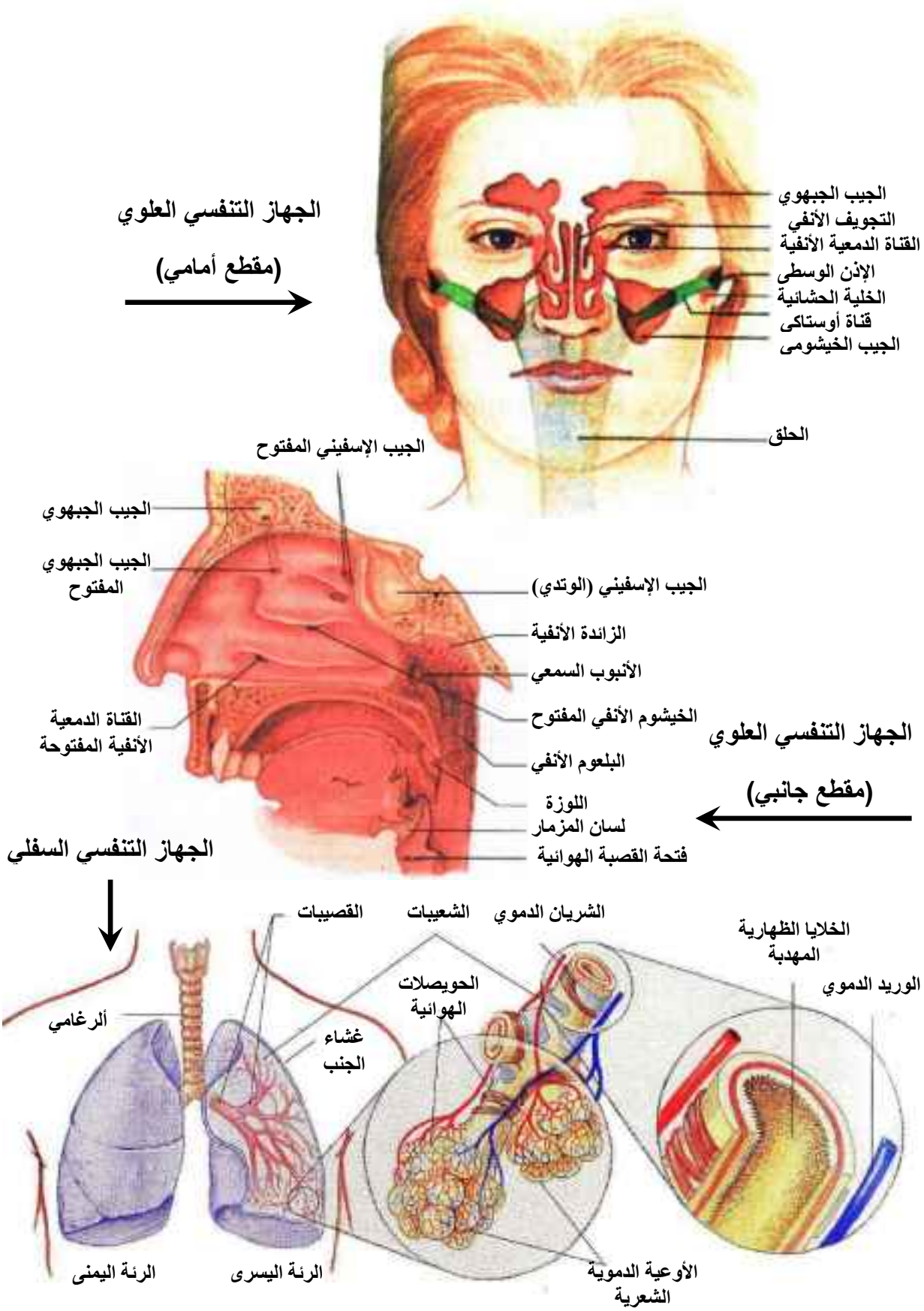
1.2- الجهاز التنفسي Respiratory System

يقسم الجهاز التنفسي تشريحياً إلى قسمين القناة التنفسية العليا Upper Respiratory Tract والقناة التنفسية السفلى Lower Respiratory Tract الشكل(1-1) (Nester *et al*., 1998) ، تتضمن القناة التنفسية العليا الأنف Nose، التجويف الأنفي – البلعومي Nasopharynx والبلعوم Larynx ، أما القناة التنفسية السفلى فتشمل القصبة الهوائية (الرغامي) Trachea ، والقصبات Bronchi والرئتين Lungs ، وتتفرع القصبة الهوائية إلى شعبتين هوائيتين . وتتفرع كل منهما إلى شعب هوائية ثانوية Secondary bronchi والتي تتفرع بدورها إلى تفرعات صغيرة تسمى الشعيبات الهوائية Bronchioles والتي تنتهي بقنوات دقيقة تسمى القنوات الحويصلية Alveolar ducts التي تؤدي في النهاية إلى الحويصلات الهوائية Air sacs (Alveoli) (Corren *et al*., 2003).

تمتاز الطبقة الطلائية المبطنة للجهاز التنفسي بكونها تحتوي على الأهداب وخلايا تفرز المادة المخاطية ، أما الحويصلات الهوائية فإنها محاطة بنوع من الخلايا المسطحة الملساء وهي الخلايا الطلائية تتخللها خلايا أكثر سمكاً ذات سايتوبلازم حبيبي هي الخلايا البلعمية الحويصلية Alveolar macrophages المتحركة داخل الحويصلات (Wilkins *et al*., 2007).

2.2- آليات حماية الجهاز التنفسي

تمتلك المسالك التنفسية مساحة سطحية كبيرة من الخلايا الطلائية تقدر بحوالي 90 متراً مربعاً وهذه المساحة الكبيرة تتصل مع المحيط الخارجي لذلك فهي تتعرض خلال التنفس الطبيعي وباستمرار للملوثات المختلفة وللعوامل المرضية التي قد تكون خارجية أو داخلية المنشأ (Nelson, 2001). وللجهاز التنفسي وسائل دفاعية متعددة لمنع حدوث الإصابات منها وسائل دفاعية ذاتية وأخرى موضعية تتعلق بالقناة التنفسية العليا والسفلى (Gaillit , 1996).



الشكل (2-1) : الجهاز التنفسي العلوي والسفلي Upper and Lower Respiratory System
(Nester *et al.*, 1998)

أما الآليات المهمة التي تحمي الجهاز التنفسي من الإصابات المختلفة فهي :

✷**الحواجز التشريحية** Anatomical barriers

تشمل الشعيرات الأنفية ، الممرات الأنفية ، المادة المخاطية المحيطة بالتجاويف الأنفية ، فضلاً عن وجود الأهداب على سطح الطبقة الطلائية مع المادة المخاطية التي تحيط بالقنوات التنفسية (Wilkins *et al.*, 2007).

✷**الحواجز الميكانيكية** Mechanical barriers

مثل المنعكسات Reflexes كالسعال ، العطاس والبلع التي تطرد الأجسام الغريبة أو الجراثيم وتمنعها من الدخول إلى القنوات التنفسية (Murray *et al.*, 1999).

✷**الاستجابة المناعية** Immune Response

يحمل الشخص عند ولادته مناعة ولادية Innate Immunity ، إذ أن انتقال الأجسام المضادة للجراثيم من الأم إلى جنينها عن طريق المشيمة قبل الولادة ، و انتقال مجموعة من الأجسام المضادة بعدها مهم جداً لحماية الطفل بعد الولادة من الأمراض المعدية لأن جهازه المناعي غير مكتمل التطور ، وتشمل الاستجابة المناعية : المناعة الخلوية Cell-Mediated Immunity المتمثلة بفعالية الخلايا البلعمية Phagocyte cells ، إذ تستطيع الخلايا البلعمية الحويصلية الموجودة في الرئة من القضاء على الجراثيم بفعالية عالية ويتآزر عملها مع الخلايا العدلة Neutrophiles ، فضلاً عن عمل الخلايا اللمفاوية Lymphocytes التي تفرز الأجسام المضادة التي تعطي استجابة مناعية خلطيه Humoral-immue Response ضد الأجسام الداخلة للجسم (Davidson and Macleod, 2001).

✷**موانع أخرى**

وجود مواد غير متخصصة مضادة للجراثيم كاللايزوزيم Lysozyme والانترفيرون Interferon الموجودة في اللعاب والإفرازات التنفسية (Wilkins *et al.*, 2007).

3.2- **المسببات المرضية لأخماج الجهاز التنفسي** .

تحصل الاخماج في الجهاز التنفسي بسبب العديد من المسببات المرضية منها البكتريا الرواشح والفطريات وغيرها ، وتعد المسببات البكتيرية هي الأكثر شيوعاً في إحداث الإصابة ، اذ تعد الأمراض الخمجية سبباً رئيساً للإصابة والوفاة (Song, 2003) ، وطبقاً لإحصائيات منظمة الصحة العالمية WHO في (1111) فأن الاخماج التنفسية تسبب 25 % من الوفيات في العالم ، وتشكل الوفيات في الدول المتقدمة نصف العدد منها ، والاهم من ذلك فان الاخماج التنفسية هي المسؤولة عن أكثر من 60% من الوفيات بين الأطفال الذين تكون أعمارهم دون الرابعة من العمر. وأهم المسببات المرضية البكتيرية هي :

1.3.2- بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.*

ينتمي جنس المكورات العنقودية إلى عائلة Micrococcaceae ، التي تضم مع جنس العنقوديات جنسين آخرين هما *Micrococcus* و *Stomatococcus* (Collee *et al.*,1996) ، ويمكن تمييز جنس الـ *Staphylococcus* عن بقية الاجناس التابعة لعائلة الـ Micrococcaceae بكونها سالبة لفحص الاوكسيديز Oxidase ومخمرة لسكر الكلوكوز لا هوائياً ، وغير مقاومة للتحلل بوساطة انزيم اللايسوستافين Lysostaphin (Goldman and Green, 2009) ، ومشابهه لها من حيث كونها موجبة لصبغة غرام وموجبة لفحص الكاتاليز Catalase (Novak , 2000).

هي مكورات موجبة لصبغة غرام ، غير متحركة ، غير مكونة للسبورات ، تنمو بظروف هوائية ولا هوائية اختيارية وذات قطر يتراوح ما بين (0.5-1.5) مايكروميتر (Goldman and Green, 2009) . تتجمع هذه البكتريا بشكل عناقيد وأن سبب هذا التجمع هو انقسامها بأكثر من مستوى وتبقى مرتبطة مع بعضها البعض ، ويمكن مشاهدتها على هيئة مكورات مفردة أو أزواج أو سلاسل قصيرة ولاسيما عند تنميتها في أوساط زرعيه سائلة (Holt *et al.*, 1994 ; Jawetz *et al.*, 2004) . تنمو على الأوساط الاعتيادية عند درجة حرارة 33مْ ، تظهر المستعمرات دائرية رقيقة ولماعة يصل قطر المستعمرة 2–3ملم ، تنمو في مدى حراري (11–33)مْ ، قادرة على تحمل تراكيز ملح NaCl تصل إلى 11% منتجة للصبغات الكاروتينية بتراكيز مختلفة يتراوح من الأصفر الذهبي إلى الأبيض اعتماداً على نوع السلالة وظروف النمو (Nesin *et al*, 1995 ; Foster, 1994).

يتضمن جنس العنقوديات ثلاثين نوعاً في الاقل ، منها ثلاثة انواع رئيسية ذات اهمية طبية وهي *Staph. aureus* ، *Staph. Epidermidis* و*Staph. saprophyticus* . ويتميزالنوع *Staph. aureus* بانتاجه للأنزيم المجلط للبلازما Coagulase لذا يمكن

تفريقه عن النوعين الآخرين عند إجراء الاختبار الخاص بهذا الأنزيم (Goldman and Green, 2009) ، ويعد هذا النوع من اشد المكورات العنقودية امراضية فهو يمتلك قدرة كبيرة على إحداث الاخماج الانتهازية بالرغم من إنه غالباً ما يكون متعايش بصورة طبيعية في أجسام الحاملين له Carriers كالأنف والبلعوم والقناة الهضمية والتناسلية دون أن تظهر عليهم الأعراض المرضية للإصابة (الناصري، 2002) . ويحدث الخمج بصورة انتهازية في الأجزاء العليا والسفلى للقناة التنفسية ويعتبر سبباً مهماً للإصابات الرئوية حيث سجلت حالات الإصابة بمرض ذات الرئة المكتسب Community Acquired Pneumonia (CAP) نتيجة وجود هذه البكتريا مصاحبة لحالات الإصابة بالأنفلونزا والتليف الكيسي Cystic fibrosis في الأطفال وحالات إعطاء الأدوية بالوريد (Gonzalez *et al.*, 2003).

تحدث هذه الإصابات عن طريق قابلية الجرثومة على غزو أنسجة المضيف والتضاعف والانتشار خلال هذه ألانسجه وإنتاج العديد من المواد الخارج خلوية Extracellular Substances مثل الأنزيمات والذيفانات وتشمل الأنزيمات Coagulase ، Hyaluronidase ، Proteinase ، Lipase ، Penicillinase ، phosphatase ، Deoxyribonucease ، أما الذيفانات فتشمل الذيفانات المعوية Enterotoxins ، الذيفان القاتل لكريات الدم البيض Leucocidin ، الذيفانات الحالة للدم Haemolysins والبروتين A الموجود في الجدار الخلوي والذي يمتلك خواص مستضدية (Kanchanapoom and Khardori, 2002 ; Jawetz *et al.*, 2004) كذلك لها القدرة على إنتاج ذيفان متلازمة الصدمة السمي1 Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST-1) والذيفان المسبب للتقشر الجلدي Exfoliative Toxin (Collee *et al.*, 1996).

أما فيما يخص النوع الثاني العائد لهذا الجنس فهو *Staph. epidermidis* ، تظهر البكتريا موجبة لصبغة غرام ، كروية ، موجبة لفحص الكاتليز ، سالبة لفحص Coagulase ، غير محللة للدم ، مخمرة لسكر الكلوكوز وغير مخمرة لسكر المانتول ، ذات مستعمرات دائرية بيضاء ملساء لا تكون صبغة في الوسط النامية عليه (Jawetz *et al.*, 2004).

إن موقعها الطبيعي هو الجلد إذ تستطيع أن تسبب الإصابة من حين لأخر، ومعظم سلالات *Staph. epidermidis* تنتج مادة مخاطية Slime تساعدها على الالتصاق ، وهذه المادة تظهر حماية للكائن من دفاعات العائل الطبيعية فضلاً عن المضادات الحيوية (Goldman and Green, 2009).

تسبب *Staph. epidermidis* التهاب شغاف القلب Endocarditis والإصابة على أو حول صمامات القلب Prosthetic heart vavles ، كذلك تسبب إصابة البروستات Prostate والقناة البولية خاصة في كبار السن (Myrvik and Weiser, 1998).

2.3.2- بكتريا المكورات السبحية *Streptococcus spp.*

يعود هذا الجنس الى عائلة Streptococcaceae وهي مكورات موجبة لصبغة غرام ، سالبة لاختباري الكاتاليز Catalase والاوكسيديز Oxidase ، تنمو بشكل ازواج او سلاسل في المزارع السائلة واغلب افرادها لا هوائية اختيارية Facultative Anaerobes على الرغم من وجود انواع لاهوائية اجبارية Obligate Anaerobes (Koneman *et al*., 1997 ; Macfaddin , 1985) . كما انها غير متحركة ، غير مكونة للابواغ وبعض انواعها تمتلك المحفظة Capsule ، وتقع بعض افراد هذه المجموعة ضمن الفلورا الطبيعية للانسان في حين البعض الاخر يرتبط ببعض الامراض المهمة التي تصيب الانسان (Brooks *et al*., 2001) ، تتطلب أوساط اغنائية لنموها وأحياناً تحتاج الى 5% من غاز ثاني أوكسيد الكاربون ، وتحصل على الطاقة بشكل رئيس من استهلاك السكريات ، كما ان نموها ضعيف على الاوساط الصلبة أو السائلة ما لم يتم اغناؤها بالدم أو السوائل النسيجية ، فيتحدد نموها غالباً بدرجات حرارة تتراوح بين (21–31)مْ ودرجة الحرارة المثلى لها هي 33مْ (Brooks *et al*., 2001 ; Holt *et al*., 1994).

وضعت عدة تصنيفات للمسبحيات أقدمها التصنيف الذي وضعه Brown في عام 1919 الذي يعتمد على نوع تحلل الدم Haemolysis على أوساط آكار الدم الذي صنفت المسبحيات بموجبه إلى ثلاث مجاميع شملت المسبحيات الحالة للدم تحللاً تاماً (بيتا) β- haemolytic Streptococci وتتميز بظهور هالة شفافة ومحددة حول مستعمراتها مثل بكتريا *Streptococcus pyogenes* ، والمسبحيات الحالة للدم تحللاً جزئياً (الفا) α- haemolytic Streptococci وتتميز بمستعمرات محاطة بهالة مخضرة مثل بكتريا *S. viridans* و *S. pneumoniae* والمسبحيات غير الحالة للدم (كاما) γ- haemolytic Streptococci مثل بكتريا *S. salivarius* (Cruickshank *et al*., 1975 ; Ananthanarayan and Paniker, 1997). وفي عام (1933) وضعت الباحثة Lancefield التصنيف المصلي الذي يعتمد على المستضدات الكربوهيدراتية الموجودة في الجدار الخلوي ، إذ لاحظت لانسفيلد أنّ المكورات المسبحية اذا ما وضعت في اس هايدروجيني (pH=2) وسخنت حد الغليان لمدة (11) دقيقة، فان من الممكن استخلاص مستضد كاربوهيدراتي ذائب من الجدار الخلوي واطلقت عليه التسمية C-Carbohydrate

(Jawetz *et al.*, 2004) ، اعتمدت لانسفيلد في تصنيفها على الاختلافات في البنية الكيميائية والنوعية المستضدية لكاربوهيدرات جدار الخلية وعلى اساسه قسمت المسبحيات الحالة للدم نوع بيتا الى (11) مجموعة مصلية سميت بمجاميع لانسفيلد Lancefield Groups ويرمز لها بالأحرف الإنكليزية من A إلى U باستثناء الحرفين I و J (Facklam , 2002) . تنتمي اغلب السلالات المرضية للانسان الى المجموعة (A) المسؤولة عن اكثر من (10%) من الاصابات المسبحية (Cruickshank *et al.*, 1975) . كما قسم Sherman في عام 1937 المسبحيات إلى أربع مجاميع رئيسة اعتمادا على نوع التحلل الدموي و نوع المستضد الكاربوهيدراتي لجدار البكتريا (مجاميع لانسفيلد) والنمو بوجود كلوريد الصوديوم بتركيز 6.5 % (تحمل الملوحة) وتخمر السكريات إلى :

1. **المسبحيات القيحية** Pyogenic streptococci وتضم المسبحيات المحللة للدم بيتا العائدة للمجاميع A و B و C و G و F.
2. **المسبحيات المخضرة** Viridans streptococci وتضم المسبحيات المحللة للدم الفا وكاما غير الخاضعة لتصنيف لانسفيلد.
3. **المسبحيات اللبنية** Lactic streptococci التي تضم المسبحيات المحللة للدم كاما والعائدة للمجموعة N .
4. **المسبحيات المعوية** Enteric streptococci وتضم المسبحيات المحللة للدم الفا وكاما العائدة للمجموعة D لتصنيف لانسفيلد (Facklam , 2002).

استخدمت الوراثة الجزيئية حديثاً واضيفت اختبارات كيموحيوية جديدة مما ادى الى تقسيم المسبحيات إلى ثلاثة أجناس هي جنس *Enterococcus* الذي يضم المسبحيات المعوية Enterococci وجنس *Lactococcus* الذي يضم المسبحيات اللبنية Lactic streptococci وجنس *Streptococcus* الذي يضم المسبحيات القيحية Pyogenic streptococci ، المسبحيات الفموية Oral streptococci والمسبحيات اللاهوائية Unaerobic streptococci ومسبحيات اخرى تضم 8 أنواع اخرى منها النوع *S. bovis* (Carey *et al.*, 2008).

يحتوي جنس المكورات المسبحية *Streptococcus* على اكثر من (30) نوعاً بعضها ممرض للانسان مثل *S. pyogenes* ، *S. agalactiae* و *S. pneumoniae* فيما يعد العديد منها نبيتاً طبيعياً Normal Flora في فم وأمعاء الإنسان (Facklam, 2002). وتعد بكتريا *S. pyogenes* من أهم أنواع المسبحيات الممرضة للإنسان وأكثرها شيوعا ، وهي بكتريا لا هوائية اختيارية Facultative anaerobic ، تتميز مستعمراتها على وسط آكار الدم بحجم

صغير جداً تشبه راس الدبوس، بيضاء، شفافة، محدبة ومحاطة بمناطق التحلل الكامل نوع بيتا (Goldman and Green, 2009)، وتعد هذه الميزة صفة تشخيصية مهمة، كما يتم تشخيصها بالطرق التقليدية مثل فحص الكاتاليز، فحص الحساسية للمضاد الحيوي الباستراسين Bacitracin واخيراً بالطرائق المصلية لاستعمال المصل المضاد الخاص بالمجموعة (Carey *et al.*, 2008). وتكون مسؤولة عن مدى واسع للاخماج فهي تسبب أمراضاً قيحية Suppurative diseases وتبعات غير قيحية Non-suppurative sequelae، إذ تمتلك البكتريا في الحالة الاولى خصائص تمكنها من مقاومة عملية البلعمة phagocytosis وتلعب دوراً حاسماً في قدرتها على الغزو ، وتعتمد هذه الخصائص على بروتين M (M-protein) عامل الضراوة الرئيس ، إذ تكون السلالات الغنية بهذا البروتين M-Positive Strains عالية المقاومة لعملية البلعمة وقادرة على البقاء حية في دم الانسان والتضاعف السريع فيه ، بينما تقتل السلالات الفاقدة له M-negative Strains ، أما عامل الضراوة الاخر والمهم فهو محفظة حامض الهيالورونيك Hyaluronic acid capsule (Moses ; McCarty, 1990 *et al.*, 1997).

تشمل الامراض القيحية التهاب البلعوم الحاد Acute Streptococcal Pharyngitis ، التهاب اللوزتين Tonsillitis ، الحمى القرمزية Scarlet fever وإنتان الدم Septicemia فضلاً عن اخماج قيحية أخرى أقل شيوعاً تتضمن التهاب الاذن الوسطى Otitis media ، التهاب الجيوب الأنفية Sinusitis ومرض ذات الرئة Pneumonia (Brooks *et al.*, 2001) . أما التبعات غير القيحية فتشمل التهاب كبيبات الكلية الحاد Acute Glomerulonephritis (يحدث بعد أخماج الجلد والبلعوم) والحمى الرثوية Rheumatic fever (تحدث بعد التهاب البلعوم) (Higerd and Fowler, 1997).

تنتج بكتريا *S. pyogenes* عوامل انتشار Spreading Factors تسبب ضرراً لنسيج العائل وتؤدي الى امتداد الاصابة الموضعية وانتشارها جهازياً ، وهي نواتج خارج خلوية وذيفانات Extracellular Products and Toxins تساعد البكتريا على الانتشار عن طريق تحليل التجلطات وتحطيم الانسجة الرابطة ومقاومة دفاعات الجسم وبالتالي زيادة فوعتها (Ashbaugh *et al.*,1998) . وهناك ما لا يقل عن 20 مادة خارج خلوية تم تمييز عدد محدود منها تتضمن انزيمات الهيالرونيديز Hyaluronidas ، بروتنيز Proteinase ، ستربتوكاينيز Streptokinase ، ستربتودورنيز Streptodornase ، فضلاً عن السستائين بروتيز Cysteine protease (Higerd and Fowler, 1997).

أما المكورات الرئوية *Streptococcus pneumoniae* فأنها توجد طبيعياً Normal flora في القناة التنفسية العليا ولها القابلية في الاختراق والتضاعف داخل الأنسجة

وتمتلك المحفظة Capsule التي تعد عامل ضراوة رئيس يحميها من البلعمة (Goldman and Green, 2009) . خلاياها بيضوية أو رمحيه الشكل توجد بشكل أزواج أو سلاسل قصيرة (Rijneveld *et al*., 2002) وهي هوائية ولا هوائية أختيارية Facultative anaerobic ولكن تفضل أغلب السلالات النمو بوجود 5-10% ثاني أوكسيد الكاربون ، تكوّن على وسط آكار الدم مستعمرات صغيرة ومسطحة ذات حواف مرتفعة مع طول فترة الحضن وتسبب تحللا دمويا من النوع (الفا) وتكون حساسة للأوبتوجين Optochin (Obregon *et al*., 2002 ; Baron *et al*., 1999).

تسبب هذه البكتريا اخماجاً متعددة مثل ذات الرئة Pneumoniae ، التهاب الجيوب الأنفيةSinusitis والتهابات الأذن الوسطى Otitis media ، وتسبب أيضاً التهاب السحايا Meningitis وإنتان الدم Septicemia (Dagan *et al*., 2002) ، كما أوضح Larrson وجماعته (1111) بان هذه البكتريا تتسبب في إحداث مرض ذات الرئة في البالغين ، وذكر Brooks وجماعته (2001) بان هذه البكتريا توجد مترافقة مع التهاب القصبات الحاد والتهاب القصبات المزمن وكذلك انتفاخ الرئة Emphysema ، وبيّن Jette وجماعته (2001) إن المكورات الرئوية هي من المسببات الأولية لمرض ذات الرئة الفصي والقصبي لمرضى الكبت المناعي ، كما أشار Carbino وجماعته (2002) أن هذه البكتريا تعتبر إحدى المسببات لمرض ذات الرئة المكتسب (CAP) الذي يعد سبباً من اسباب الوفاة في أمريكا الشمالية ويتسبب في إدخال أكثر من 600,000 شخص للمستشفيات في السنة وان معدل وفياته يشكل (13.7 %) بين كل حالات ذات الرئة المكتسب.

3.3.2- بكتريا *Haemophilus spp.*

يقع جنس *Haemophilus* ضمن عائلة Pasteurellaceae التي يتميز أفرادها بكونها سالبة لصبغة غرام لاهوائية اختيارية وعصوية وتضم فضلاً على الجنس المذكور أعلاه جنس Pasteurella (بيومى، 2001) . وتوجد جميعاً كفلورا طبيعية في الفم والقناة التنفسية العليا وفي الأغشية المخاطية الفمية للإنسان والحيوان ، كما وتمتلك أهمية إذ يعد البعض منها ممرضاً للإنسان والحيوان (Forbes *et al*., 1998).

تتميز أفراد هذا الجنس بكونها عصوية أو عصوية مكورة ، وتبدي ظاهرة تعدد الأشكال Pleomorphism ، صغيرة ، غير متحركة ، لاهوائية اختيارية ، غير مكونة للسبورات ، لها القابلية على تخمير السكريات وتنتج الحامض ، البعض من أنواعها له القابلية على انتاج الغاز ، تختزل النترات إلى نتريت ، والتفاعلات بالنسبة للكاتاليز والأوكسيديز متغايرة فبعضها موجب والآخر سالب (Jawetz *et al*., 2004 ; Collee *et al*., 1996) .

جنس *Haemophilus* من الأجناس الصعبة الإنماء على الأوساط الاعتيادية حيث يتطلب نموه وجود عوامل تساعده على ذلك مع وجود بعض الاستثناءات لبعض أنواعه التي قد لاتحتاج إلى واحد من هذه العوامل أو كلها ، والعوامل هي :

✷**العامل X** عبارة عن مجموعة مركبات tetrapyrrole الثابتة حرارياً والمجهزة من قبل الهيمين ، وهو ضروري في عملية تخليق الحديد الموجود في الانزيمات التنفسية مثل Cytochrome oxidase ، Catalase و Peroxidase .

✷**العامل V** وهو Nichotineamide Adenine Dinucleotide (NAD) ، أو Nichotineamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP) ، وهو مساعد انزيمي متغير حرارياً ومهم يتطلب وجوده في تفاعلات الأكسدة والاختزال Oxidation-Reduction reactions (Collins and Lyne, 1985) . ويمكن ان تنمى بكتريا *Haemophilus* على وسط آكار الدم ولكنها على وسط آكار دم الأغنام يكون نموها ضعيفاً او بالأحرى معدوماً لأن هذا الوسط يحتوي على العامل X الذي ينتشر من كريات الدم الحمراء إلى الوسط ، اما العامل V فيوجد بكميات قليلة تنتشر إلى الخارج ولكنها تتحلل مائياً بعملية Hydrolysis بفعل أنزيم NADase (Kilian *et al*., 1981)، وقد لوحظ ان أنواعاً من البكتريا مثل *Stahp. auerus* تستطيع ان تنتج كميات كبيرة من العامل V إلى الوسط وبما أن الوسط حاوي على العامل X مسبقاً بالتالي تستطيع *Haemophilus* النمو عليه ويظهر نموها على شكل مستعمرات صغيرة تحيط بمستعمرات بكتريا *Stahp. auerus* وهذه الظاهرة يطلق عليها بالتبعية Satellite ، ولقد استغلت هذه الظاهرة في الاختبارات التشخيصية لبكتريا *Haemophilus* وخاصة لتشخيص النوع *H. influenzae* (Carey *et al*., 2008) ، وعند تسخين وسط آكار الدم لدرجة 10مْ ولمدة 11 دقيقة تتحطم كريات الدم الحمراء ويتحرر منها العامل V وبنفس الوقت يتحطم أنزيم NADase ويصبح غير فعال مما يؤدي إلى انتشار هذا العامل في الوسط وكذلك العامل X مما يجعل وسط آكار الدم المطبوخ مثالياً لنمو هذه البكتريا ، كما وان الحاجة إلى العامل X تعد علامة تصنيفية أولية لهذا الجنس (Kilian *et al*., 1981).

يعد النوع *H. influenzae* من أهم أنواع هذا الجنس التي تسبب امراضاً للأنسان (Baron, 2001) ، والذي قسمت سلالاته على مجموعتين المنمطة Typable وغير المنمطة Nontypable ويتم التصنيف اعتمادا على صفات المحفظة وتتركب المحفظة من معقد من فوسفات السكر والكحول ، وقد صنفت السلالات ذات المحفظة الى ست مجاميع اعتمادا على الاختلافات في هذا المعقد وهذه المجاميع هي(a, b, c, d, e, and f) وتعتبر

H. influenzae type b (Hib) هي الأكثر شيوعاً كمسبب للاصابات الخطرة في الأنسان (St. Geme, 1993) ، ويشير Sharma وجماعته (2002) الى ان 96% من الاصابات المتسببة عن جنس *Haemophilus* في الهند تعود إلى (Hib). كما أنها تعد المسبب الرئيس للأمراض البكتيرية في الأطفال في الولايات المتحدة الأمريكية (Omikunle *et al*., 2002).

تكون السلالات غير المنمطة غير قادرة على تكوين المحفظة وهي تستوطن القناة التنفسية العليا بصورة طبيعية (St. Geme, 1993) وفي السنوات الأخيرة أصبحت هذه السلالات هي المسبب الرئيس والأكثر شيوعاً لذات الرئة في الأقطار النامية وبعض أقطار العالم وخصوصاً في الأطفال (Klein, 1992) . وبصورة عامة فأن الاصابات المتسببة عن *H. influenzae* type b غالباً ما تكون جهازية ومهددة للحياة حيث أنها مسؤولة عن 95% من الأمراض الجهازية في الأطفال وتتضمن الإصابات المتسببة عن هذه البكتريا التهاب لسان المزمار Epiglottitis ، ذات الرئة Pneumonia ، التهاب أغشية السحايا Meningitis و التهاب المفاصل الخمجي Septic arthritis وكذلك فهي تسبب تجرثم الدم في البالغين وبنسب مرتفعة ، في حين تكون الإصابات المتسببة عن السلالات غير المنمطة محصورة أو متمركزة وتتضمن التهاب الأذن الوسطى Otitis media ، التهاب الجيوب Sinusitis ، التهاب القصبات المزمن Chronic bronchitis (Goldman and Green, 2009).

تمتلك هذه الجراثيم آليات عدة للاستعمار منها الالتصاق على الخلايا الطلائية للإنسان الذي يحدث بفعل عوامل متعددة منها الشعيرات Pili التي تحيط بها من كل جانب ، بروتين الغشاء الخارجي Outer Membrane Protein ، متعدد السكريات الدهني Lipooligosaccharide ، وبروتينات الوزن الجزيئي العالي High Molecular Weight Proteins . (Krasan *et al*., 2001 ; Swords *et al*., 2000) ، بالإضافة إلى وجود المحفظة المتكونة من Poly ribosyl Ribitol Phosphate (PRP) التي تعد أحد أهم عوامل الضراوة لهذه البكتريا ، التي تقاوم عملية البلعمة وبالتالي فان السلالات المكبسلة تستطيع اختراق الخلايا الطلائية للبلعوم وتنتقل إلى الأوعية الدموية الشعرية بصورة مباشرة (Jawetz *et al*., 2004 ; Baron, 2001)

4.3.2- بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*

تقع هذه البكتريا ضمن عائلة Pseudomonadaceae (Holt *et al*., 1994) ، وهي عصيات سالبة لصبغة غرام ، هوائية مجبرة Obligatory aerobic تظهر الخلايا منفردة أو على هيئة أزواج أو سلاسل قصيرة ، غير مكونة للسبورات ولا للكبسولة ، متحركة بسوط قطبي واحد أو أكثر (Rehm, 2008) ، موجبة لانزيمي oxidase و catalase وتكون

سالبة لاختباري lysine decarboxylase و Orinithin decarboxylase (Forbes *et al.*, 1998) ، كما تعمل على تحليل الجيلاتين ، لاتنتج غاز H_2S وغير مخمرة لسكر اللاكتوز وبقية الكاربوهيدرات الاخرى اذ تستخدم الكلوكوز والكاربوهيدرات الاخرى بالاكسدة مثل Arabinose ، Melibiose ، Sucrose و mannitol (Holt *et al.*, 1994) ، كما انها تكون سالبة لاختبار المثيل الاحمر وفوكس بروسكاور ومتغيرة في اختبار السترات وتحلل الدم من نوع β-hemolytic على أطباق وسط آكار الدم (Rehm, 2008).

يمكن ان تنمو بكتريا الزوائف الزنجارية على الاوساط الزرعية الاساسية فتظهر المستعمرات على هذه الاوساط خشنة يقارب قطرها (3) مليمتر محاطة بحزام معدني Metallic Sheen ومن خواصها انها تبعث رائحة عفنة مميزة Mustyodor . فضلاً عن انتاجها الصبغة الزنجارية الخضراء المزرقة في الوسط الزرعي ، التي هي عبارة عن صبغتي Pyocyanin الزنجارية وصبغة Fluorescin . اما على وسط الماكونكي MacConcky Agar والوسط المغذي Nutrient Agar فتكون مستعمرات شاحبة وذات صبغة خضراء ، وافضل وسط زرعي لعزلها هو وسط الزوائف الانتخابي Pseudomonas Selective Agar (Govan *et al.*, 1993).

تعد بكتريا *P.aeruginosa* من الممرضات الانتهازية Opportunistic Pathogens التي لها القدرة على أحداث الإصابات المختلفة فتسبب إصابات الجهاز التنفسي Respiratory Infection ومنها التهاب الرئة Pneumoniae ولاسيما في الأشخاص المصابين بمرض التليف الكيسي Cystic fibrosis وعدد من الإصابات الخطيرة للعين Eye Infection والتهاب الأذن الوسطى Otitis media ، كما تسبب هذه الجرثومة التهاب أغشية الدماغ Meningitis والتهاب المجاري البولية Urinary Tract Infection (Hauser *et al.*, 1998) . فضلا عن عدد من الإصابات ولاسيما في المرضى الذين يعانون من الحروق والمرضى المثبطين مناعياً مثل مرضى السرطان ، ومرضى نقص المناعة المكتسبة (Rajan *et al.*, 2003).

ان الضراوة الانتهازية لجرثومة *P. aeruginosa* مرتبطة بقدرتها على استعمار مواقع تشريحية مختلفة (بسبب امتلاكها ميكانيكيات التصاق فعالة ومتطلبات تغذوية قليلة ومقاومة للمضادات الحيوية) ولها قدرة على غزو الانسجة الموضعية وتحطيمها وميل لغزو مجرى الدم واحداث الامراض الجهازية Systemic Disease (Dowling *et al.*, 1998).

إنّ استعمار *P. aeruginosa* لسطوح الاغشية المخاطية للانسجة الطلائية التنفسية يسهل بواسطة الشعيرات Pili ، كما يسهل بوجود ضرر سابق في النسيج مثلما يحدث في القناة التنفسية عند الاصابة بفايروس الانفلونزا ، ويسمى الالتصاق الانتهازي Opportunistic Adherence (Rajan *et al.*, 2003) ، كما ان العزلات المعزولة من الافرازات التنفسية

لمرضى التليف الكيسي تفرز متعدد سكريات خارجي مخاطي يسمى alginate (Cohn *et al*., 2001).

إن قدرة هذه البكتريا على غزو الأنسجة تعتمد على مقاومتها لعملية البلعمة Phagocytosis والدفاعات المناعية للمضيف Host Immune defenses وافرازها للانزيمات الخارجية والذيفانات التي تحطم الحواجز الفيزيائية وتشارك في الغزو البكتيري (Heale *et al*., 2001) ، مثل انزيمات Lipase ، Elastase ، Alkaline protease ، Gelatinase، Alkaline Phosphatase و DNase ، فضلاً عن حاملات الحديد Siderphores ، Hemolysin و الذيفان المعوي Enterotoxin (Ernst *et al*., 1999 ; Wilhelm *et al*., 1999) ، كما تنتج جرثومة *P. aeruginosa* عددا من المضادات الحيوية مثل Phenazine و Pyocompound والدهون السكرية Glycolipids التي تملك فعالية قاتلة للبكتريا Bactericidal Activity (Mouget *et al*., 1995).

5.3.2- بكتريا *Moraxella catarrhalis*

تنتمي هذه البكتريا إلى عائلة Neisseriaceae ، وتتصف بكونها سالبة لصبغة غرام وعلى هيئة مكورات منفردة أحياناً وغالباً ماتكون بهيئة ازواج ، ذات قطر 0.1–1 مايكروميتر ، لاتملك أسواطاً ولاتشكل سبورات وغير متحركة (Collee *et al*., 1996) . ومعظم سلالاتها تحمل على سطحها شعيرات أو زوائد (Marrs and Wein, 1990) ، أو تحمل بدلها تراكيب لاصقة تسمى أشباه الاشواك Tack / Spicule Like Structure تحيط بسطح الخلية الجرثومية (Fitzgerald *et al*., 1999 ; Kyd *et al*., 1998) . وهي هوائية غير مخمرة للسكريات وموجبة لانزيم الاوكسيديز و الكاتليز . وصفت لاول مرة سنة 1111 واطلق عليها اسم *Mikrokokkus catarrhalis* وقد عرفت أيضا ببعض مسميات سابقة هي *Micrococcus catarrhalis , Neisseria catarrhalis, Branhamella catarrhalis* (Constantinescu *et al*., 2004) . ويمكن تفريقها عن جراثيم جنس *Neisseria* بانها لا تخمر السكريات وتنتج انزيم DNase (Collee *et al*., 1996 ; Brooks *et al*., 2001) .

تنمو جرثومة *M. catarrhalis* على وسط آكار الدم ووسط آكار الدم المطبوخ هوائياً أو بشكل أفضل عند تزويدها بغاز ثاني اوكسيد الكاربون (CO_2) بنسبة 1% وبدرجة 33 مْ . ويكون شكل المستعمرات بعد 23 ساعة صغيرة ذات لون أبيض أو رمادي ، معتمة ملساء قطرها (1–1.1) ملم مرتفعة عن السطح ولا تحلل كريات الدم الحمراء على وسط آكار الدم ، في حين تكون المستعمرات بعد 31 ساعة مستعمرات كبيرة وأكثر عمقاً في مركز المستعمرة

(Goldman and Green, 2009) ، كما تتميز مستعمرات هذه الجرثومة بزحفها على سطح الآكار عند تحريكها بناقلة الجراثيم من دون ان تتجزأ تشبه بذلك قطعة الهوكيhockey puch (Koneman *et al*., 1997).

تعد جرثومة *M. catarrhalis* من النبيت الطبيعي Normal Flora في مناطق الجهاز التنفسي وأجزائه ومن الممكن أن تصبح ممرضة انتهازية Opportunistic Pathogen (Forbes *et al*.,1998 ; Collee *et al*., 1996) ، إذ أشار Hoang (1111) بان اغلب الإصابات تحصل لدى المرضى المصابين بالانسداد الرئوي المزمن Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) وخصوصاً كبار السن ، المرضى الذين يتناولون أدوية الكورتيزون ، مرضى داء السكري ومرضى الكبت المناعي .

تستوطن جرثومة *M. catarrhalis* تجويف البلعوم الفمي Oropharynx محدثة التهاب الاذن الوسطى والتهاب الجيوب الانفية (Baquero and Loza, 1994) وتتميز هذه الاصابة بانها موسمية وعادة تنتشر في فصلي الشتاء والربيع فضلاً عن وجود علاقة وثيقة بين حاملي هذه الجرثومة والاصابة بالمرض وفي كلا الجنسين وتزداد عند المدخنين وكبار السن (Kurtti *et al*., 1997) ، كما تستوطن سطوح الاغشية المخاطية للجهاز التنفسي العلوي ، ووجد في دراسات عديدة ان هذه الجرثومة يأتي تسلسلها بالدرجة الثالثة في التهاب الجيوب الانفية الحاد والجهاز التنفسي بعد جرثومتي *S. pneumoniae* و *H. influenzae* (Karalus and Campaqnari, 2000) . كما ان هذه الجرثومة توجد في الجهاز التنفسي السفلي مسببة امراض الرئة الخطيرة عند البالغين منها التهاب القصبات الحاد Acute Bronchitis ، ذات الرئة الحاد Acute Pneumoniae والتهاب الشعبي الرئوي Bronchopneumonia (Murphy, 1996) . إذ عزلت هذه الجرثومة وبشكل نقي من حالة التهاب الشعيبات الرئوية الحاد والمزمن (Stabberingh *et al*., 1986).

يظهر من كل ما تقدم بكتريا *M. catarrhalis* تمتلك الكثير من عوامل الضراوة المختلفة التي تساعدها على احداث الامراض سابقة الذكر منها بروتينات الجدار الخارجي Outer Membrane Protein (OMP) ، متعدد السكريد الدهني Lipopolysaccharide (LPS) ، الشعيرات Fimbriae ، التراكيب الشبيهة باشواك Tack / Spicule Like Structure ، الهستامين Histamin ، المحفظة Capsule ، أنزيم محلل الحامض النووي الرايبوزي الدنا DNase وعامل التلازن الدموي Hemagglutinin (McMichael, 2000 ; Ahmed *et al*., 1996).

6.3.2 – بكتريا *Klebsiella pneumoniae*

تنتمي هذه البكتريا إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae ، وهي عصيات مستقيمة سالبة لصبغة غرام يتراوح عرضها بين (0.3–1) مايكروميتر أما طولها يتراوح بين (0.1–1) مايكروميتر ، تترتب على هيئة أزواج أو تتخذ سلاسل قصيرة وخلاياها تحوي محفظة وهي بكتريا غير متحركة لا هوائية اختيارية ، درجة الحرارة المثلى لنموها هي33 ْم (Carey *et al.* 2008) ، وبصورة عامة فأن هذه البكتريا سالبة لفحص الاوكسديز oxidase وموجبة لفحص الكاتليز Catalase ، سالبة لفحص الاندول واحمر المثيل وموجبة لفحص فوكس . بروسكاور وقادرة على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون وتنتج إنزيم اليوريز Urease و انزيم Lysine decarboxylase لكنها غير منتجة لإنزيم Ornithine decarboxylase (Goldman and Green, 2009).

تنمو بكتريا *K. pneumoniae* على الأوساط الاعتيادية وتمتاز مستعمراتها بكونها كبيرة ومخاطية لزجة مندمجة مع بعضها مع زيادة فترة الحضن وسبب ذلك يعود لامتلاكها المحفظة ، أما نموها على وسط آكار الماكونكي فيظهرها وردية لمّاعة وذلك لتخميرها سكر اللاكتوز ، إلى جانب كونها مخمرة لمدى واسع من السكريات مع إنتاجها للغاز، كما إن أغلبها تختزل النترات إلى نتريت (Finegold and Martin, 1982).

تعد هذه البكتريا من الفلورا الطبيعية العابرة Transient الموجودة على جسم الإنسان ، فضلا عن معيشتها الرمية في البلعوم الانفي Nasopharynx والقناة المعوية فهي تمثل أحد أنواع الممرضات الانتهازية Opportunistic Pathogens والتي تعزل من مختلف النماذج المرضية ومن المسببات الشائعة لأخماج المستشفيات Nosocomial Infection ، إذ ترافق المرضى من كبار السن وأولئك الذين يعانون من كبح مناعي Immunocompromised ، مدمني الكحول ، مرضى السكري ومرضى العجز الرئوي المزمن ، ومن البكتريا التي تسبب مضاعفات متزايدة لدى مرضى الإيدز ، كما تسبب خراجات الكبد liver abscess في العديد من كبار السن ومرضى السكري(Fang *et al.*, 2005) . و يعد هذا النوع المسبب الرئيسي لذات الرئة إذ يسبب تنخر الفصوص العليا ولاسيما في الفئات العمرية المتوسطة وكبار السن فضلاً عن المرضى الموهنين مناعياً لتصل نسبة الوفيات إلى 10%(Bagley *et al.*, 1981) ، كما إنها تسبب التهاب الجروح ولاسيما جروح العمليات Surgical wounds وبنسبة (2–3)% ، أما نسبة عزلها من حالات خراج الكبد فكانت 11% ، وعزلت ايضاً من التهاب السحايا والتهاب المفاصل Arthtitis ، ومن التهاب الفقرات (Sahly *et al.*, 1994).

تمتلك بكتريا *K. pneumoniae* عدداً من عوامل الضراوة التي تشترك بامراضيتها منها مستضدات المحفظة وعوامل الالتصاق المتمثلة بالأهداب ، وانتاج الذيفانات الداخلية مثل متعدد السكريد الشحمي فضلا عن مقاومة التأثير القاتل للمصل ونظام الحصول على الحديد السايدروفورات Siderophores (Frirdich *et al.*, 2005) . كما تمتاز هذه البكتريا بمقاومتها للمضادات الحيوية وقد تعزى هذه المقاومة لإنتاجها أنزيمات البيتالاكتاميز المشفرة من قبل البلازميدات (Galani *et al.*, 2002).

4.2- **بعض عوامل الضراوة المرتبطة بإمراضية البكتريا** Some Virulence Factors Associated With Bacterial Pathogeniciety

تستخدم البكتريا العديد من الآليات لإحداث المرض في جسم المريض يُطلق على هذه الآليات بعوامل الضراوة virulence factors ، التي تمثل المقياس لقدرة البكتريا على إحداث المرض في المضيف وتُسهم هذه العوامل في جعل البكتريا المرضية قادرة على تجاوز الخطوط الدفاعية الأساسية في الجسم كما تعمل على تخريب النسيج الذي تستوطن فيه (Wilson *et al.*, 2002) ، ومن هذه العوامل :

1.4.2- **المحفظة** Capsule

تمتاز بعض أنواع البكتريا بقدرتها على إنتاج طبقة مخاطية مكونة غالبا من متعدد السكريد Polysccharide ، وتقع خارج الجدار الخلوي وقد تكون منتظمة بحيث تلتصق بالخلية بشكل لا يمكن إزالتها ، أو تكون غير منتظمة يسهل إزالتها لتسمى حينئذ الطبقة اللزجة Slim layer (Prescott, 2002). وتستخدم البكتريا أنواعاً مختلفة من السكريات لإنتاج المحفظة وقد يدخل في تركيبها البروتين فيطلق عليها Glycoproteins (Hjelm and Lundell-Etherden, 1989) ، إذ تتركب المحفظة في بكتريا *Enterobacter aerogenes* من وحدات متكررة من سكر الكلوكوز والفركتوز وحامض الكالوكيورونيك وترتبط بالجدار بروابط تساهمية (Robert, 1996) . أما بكتريا *P. aeruginosae* تتألف المحفظة فيها من الألجنيت alginate وهي عبارة عن مادة مخاطية معقدة من متعدد السكريات الخارجية Exopolysaccharide ، التي تتألف من guluronic acid و acetylated mannuronic acid (Govan and Deretic, 1996) . في حين تمتلك المسبحيات محفظة تتألف من طبقة سميكة من حامض الهيالورونيك Hyaluarонic acid بشكل بوليمر خطي مؤلف من وحدات مكررة من الـ Hyaluronate و N- acetylglucosamine (Goldman and Green, 2009) ،

مشابهه كيميائيا لمادة Hyaluranate الموجودة في المادة الأساس للأنسجة الرابطة للمضيف وبذلك فإنها تعمل على اخفاء مستضدات البكتريا وتمنع تعرف النظام المناعي للمضيف عليها (Todar, 2002) . بينما المكورات العنقودية المكونة للمحفظة تتألف من سكريات متعددة فقط (Harber *et al*., 1986) .

وعلى الرغم من اختلاف التركيب الكيميائي للمحفظة والتأثيرات المناعية إلاّ أنها تعمل على حماية البكتريا من الاستجابات الالتهابية Inflammatory response مثل مقاومة عملية البلعمة Antiphagocytosis بواسطة الخلايا العدلة (Jawetz *et al*., 2004). كما أن لها أدواراً مهمة في عملية الالتصاق بسطوح الخلايا الطلائية كذلك تساعد المحفظة على الالتصاق على سطوح الأدوات الطبية مثل أُنبوب القثطرة Catheter tube ، وبالتالي إحداث الإصابة في الأشخاص الذين يحتاجون لهذه الأدوات (Jawetz *et al*., 2004) . كما تعمل المحفظة على حماية البكتريا من المضادات الحيوية مما يؤدي إلى زيادة الاستجابة الالتهابية وبالتالي الزيادة في تحطم الأنسجة (Wilson *et al*., 2002) .

2.3.2- **الالتصاق وعوامل الاستعمار** Adhesion and Colonization Factors

يعرف الالتصاق بأنه عملية التفاعل والتداخل Interaction المعقدة التي تحدث بين خلايا المضيف والخلايا البكتيرية والتي تؤثر فيها عوامل كثيرة منها كراهة الماء Hydrophobicity والشحنة الموجودة على سطح الخلايا Net surface charge ، وتفاعلات المستقبلات الموجودة ضمن سطح خلايا المضيف فضلا عن عوامل الالتصاق التي تمتلكها الخلية البكتيرية (Jawetz *et al*., 2004) . إذ يمثل الالتصاق بسطوح خلايا المضيف الخطوة المهمة الأولى في إحداث الإصابة وبعدها تستوطن البكتريا السطح الذي التصقت عليه ومن ثم يحصل الغزو والالتهاب (Jett *et al*., 1994) . فعلى البكتريا أولا أن تلتصق (Adhere) بخلايا الهدف لكي لا تبعد خارج الجسم بوساطة العديد من الآليات التي يستخدمها جسم المضيف للتخلص من هذه الجراثيم منها الجريان الطبيعي للسوائل الجسمية كالإدرار والإفرازات المخاطية والدم (Wilson *et al*.,2002) ، إلاّ أن البكتريا المرضية تمتلك العديد من عوامل الالتصاق التي تمكنها من مقاومة هذه الآليات وإحداث المرض(Donnenberg, 2000) ، إذ تقسم عوامل الالتصاق التي تعرف بالملصقات Adhesins إلى قسمين :

1. **عوامل الالتصاق الهدبية Fimbrial adhesion**
2. **عوامل الالتصاق اللاهدبية Non fimbrial adhesion**

تعرف الأهداب بأنها زوائد شعرية صغيرة تبرز من سطح بعض أنواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام ، تتركب من معقد بروتين – كاربوهيدرات – فوسفات يسمى البروتين الموجود فيها بالبلين Pilin (Atlas, 1995) . تكون الأهداب أسطوانية مجوفة مسمارية الشكل ويساهم أحد أنواع هذه الأهداب في عملية الاقتران البكتيري وتسمى الأهداب الجنسية Sex pili وتوجد في السلالات البكتيرية التي تمتاز باحتوائها على بلازميد الخصوبة F-plasmid ، ويوجد نوع آخر من الأهداب يسمى أهداب الالتصاق Attachment pili يساهم في عملية التعرف على مستقبلات تقع على سطح الغشاء السايتوبلازمي للخلايا التي تلتصق بها البكتريا تمهيداً لعملية الاستيطان ومن ثم الإصابة (Prescott, 2002).

أما النوع الثاني من عوامل الالتصاق وهي عوامل الالتصاق اللاهدبية Non Fimbriae adhesion فتضم العديد من الملصقات منها مستضدات المحفظة K-antigen ، الألجنيت Alginate ، حامض التايكويك Teichoic acid ، متعدد السكريات الخارجي Exopolysaccharide ، الأسواط Flagella والفايبرونكتين Fibronectin (Abraham *et al.*,1983). اذ تمتلك بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بروتينات سطحية Surface proteins تمكنها من الالتصاق ببروتينات المضيف مثل اللامنين Laminin والبروتين المرتبط بالفايبرونكتين Fibronectin- binding protein والبروتين المرتبط بالكولاجين الليفي Collagen-binding protein وبروتين أي Protein A (Theresum *et al.*,1999)، إذ تشكل هذه البروتينات مادة خارج خلوية Extracellular matrix تمكن البكتريا من الألتصاق بالسطوح الطلائية الخارجية والداخلية لأنسجة المضيف بالاضافة الى ذلك فان معظم السلالات من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staph. aureus* تمتلك بروتينات لها القدرة على الارتباط مع الفايبرونوجين Fibrinogen والفايبرين Fibrin وعوامل التكتل Clumping factors والتي تمكن البكتريا من الالتصاق مع الدم المتخثر وأصابة الأنسجة المختلفة (Kenneth , 2005) .

3.4.2- **إنتاج الهيمولايسين** Haemolysin production

تمتلك العديد من الأنواع البكتيرية السالبة و الموجبة لصبغة غرام القابيلية على انتاج الانزيم الحال للدم ومنها *S. pyogenes* ، *Staph. aureus* و *P. aeruginosa* (Jawetz *et al.*, 2004) ، وللهيمولايسين اهمية كبيرة في زيادة امراضية البكتريا اذ يعد من عوامل الضراوة المهمة للبكتريا ، اذ تعمل البكتريا على الانغراز بسطح كرية الدم الحمراء وتكوين ثقوب فيها مسببة خروج الهيموغلوبين وبالتالي فقدان الحديد (Atlas, 1995) تتمثل

وظيفتــه بتــوفير عنصــر الحديــد مــن خلايــا المضــيف مــن اجــل نمــو وتكــاثر البكتريــا (Collee *et al.*, 1996) .

توجد أربعة أنواع من التحلل الدموي هي نوع بيتا β- haemolysis الذي يشمل تحلل الدم بشكلٍ كامل وتظهر حول المستعمرة هالة شفافة ويوصف أنزيم β-haemolysis بأنه مرتبط بالخلية وفعاليته لا يمكن فصلها عن الفعاليات الأيضية للخلية ، أما النوع الثاني فهو التحلل من نوع ألفا α-haemolysis إذ يحدث تحلل جزئي للدم وتظهر هالة خضراء حول المستعمرة ويكون أنزيم α-haemolysis غير مرتبط بالخلية ويفرز خارجها خلال الطور اللوغاريتمي للنمو . أما النوع الثالث من التحلل هو التحلل الدموي من نوع كاما γ-haemolysis اذ يقتصر ظهور التحلل فيه إلى ما تحت المستعمرة البكتيرية فقط ، أما النوع الرابع فهو نوع دلتا Δ-haemolysis الذي يكون غير محلل للدم (Brooks *et al.*, 2001).

تنتج المسبحيات التابعة للمجاميع A وC وG نوعين من الهيمولايسين، الأول يكون حساس للاوكسجين ويدعى بالستربتولايسين O (Streptolysin O) الذي يعود لعائلة الذيفانات الحالة للخلايا والمنشطة بالثايول التي تضم ايضا ذيفان العنقوديات الفا Alpha Haemolysin والنيمولايسينPneumolysin O وتمتاز بقدرتها على حل الخلايا حقيقية النواة من خلال ارتباطها بالكوليسترول الموجود في غشائها الخلوي ، اما النوع الثاني من الهيمولايسين فيكون مقاوما للاوكسجين ويدعى بالستربتولايسين S (Streptolysin S)، ويفرز من المسبحيات النامية بوجود المصل أو الألبومين أو التوين Tween ولا يمتلك قابلية استضدادية وهو المسؤول عن التحلل الدموي حول المستعمرات السطحية في أكار الدم لكونه لا يتأثر بالاوكسجين (Stevens and Kaplan,2000) ، وفي جنس العنقوديات فقد استخدم الهيمولايسين كدليل على إمراضية المكورات العنقودية المنتجة له مثل *Staph. aureus* إذ أشار Sneath وجماعته (1111) إلى قدرة المكورات العنقودية الذهبية على إنتاج جميع أنواع التحلل . أما بكتريا *Staph. saprophyticus* فتعد غير منتجة للهيمولايسين حيث لم يلاحظ وجود فعالية تحللية لكريات الدم الحمراء للإنسان إلاّ أن الدراسات الحديثة تشير إلى وجود فعالية تحللية تجاه دم الإنسان ودم خنازير غينيا (Hjelm and Lundell-Etherden,1989).

إن عملية إنتاج وإفراز الهيمولايسين تقع تحت سيطرة جينية معقدة يمكن أن تكون محمولة على الكروموسوم أو البلازميد قابل للانتقال (Prescott, 2002) ، اذ يقع انتاج الستربتولايسين في المسبحيات التابعة للنمط المصلي A تحت سيطرة الاوبرون Sag المكون من تسع جينات هي *sag A* ، *sag B* ، *sag C* ، *sag D* ، *sag E* ، *sag G* ، *sag F* ، *sag H* ، و *sag I* وتوجد تسلسلات انهاء غير معتمدة على *rho* بين الجينين *Sag A* و*Sag B* تنظم

عملية التعبير الجيني للاوبرون بكامله (Nizet *et al*., 2000). وبين Fuller وجماعته (2002) بان انتاج الستربتولايسين S في بكتريا *S. inae* يشفرله تسع جينات كروموسومية تناظر جينات الاوبرون Sag في المسبحيات التابعة للنمط المصلي A . وقد وجد أن أوبرون الهيمولايسين في أغلب أفراد العائلة المعوية يتكون من أربعة جينات هي *hiy*D ، *hiy*C ، *hiy*B و *hiy*A . إذ تعمل الجينات *hiy*D ، *hiy*C ، *hiy*B على تصنيع أنزيم الهيمولايسين في حين يعمل ناتج الجين *hiy*D على تحرير الهيمولايسين من الغشاء الخارجي إلى وسط النمو (Gray *et al*.,1986) . وليس بالضرورة أن تكون البكتريا المنتجة لأنزيم الهيمولايسين منتجة لنوع واحد ، إذ لوحظ قدرة بعض السلالات من بكتريا *E. coli* على إنتاج نوعين من الهيمولايسين هما ألفا وبيتا هيمولايسين في آن واحد وتحت ظروف النمو نفسها (المعاضيدي، 1999) .

4.4.2- **إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز** β-Lactamase poroduction

تعرف انزيمات البيتالاكتاميز بأنها انزيمات دفاعية تنتج من قبل البكتريا لها القدرة على تكسير آصرة الأمايد Amide Bond في حلقة البيتالاكتام الموجودة في نواة مضادات البيتالاكتام والتي تضم البنسلينات Penicillins ، السيفالوسبورينات Cephalosporins ، المونوباكتام Monobactam والكاربابينم Carbapenems جاعلة اياها جزيئات غير فعالة بايلوجياً (Glazer and Nikaido, 2007) ، اذ تعد هذه المضادات من مثبطات تكوين الجدار الخلوي للبكتريا لذا فهي من المضادات ذات الفعالية القاتلة Bactericidal agent (Hogg, 2005) ، وقد درست قدرة البكتريا على انتاج الانزيمات المثبطة لمضادات البيتالاكتام من قبل العديد من الباحثين ، اذ لاحظ الباحثان Abraham and Chain عام 1940 لاول مرة الفعالية الانزيمية لراشح خلايا مزارع الـ *E.coli* المثبطة للبنسلين ومنذ تلك الفترة ابتدأت الابحاث وادراج العديد من الانزيمات المشابهة (McCarthy,1980) . وقد طورت العديد من الاختبارات لغرض تحديد انزيمات البيتالاكتاميز ومنها طريقة اليود القياسية وطريقة المادة الاساس المولدة للصبغة Chromogenic substrate المعروفة بأختبار الـ Nitrocefin test والذي هو عبارة عن سيفالوسبورين مولد للصبغة Chromogenic cephalosporine والذي وجد بأنه فعال جداً في التحري عن كل انواع انزيمات البيتالاكتاميز المعروفة (Levinson and Jawetz , 2000) .

لانزيمات البيتالاكتاميز طبيعة مرنة ، اذ يؤدي اختلاف حامض اميني واحد الى تغير نوع الانزيم وهذا يعني ان عدد الانزيمات الناتجة من هذه التغيرات تكون غير محدودة مما يصاحبها تغير في الفعالية تجاه المادة الاساس العاملة عليها (Christopher *et al*., 1991) . لذا اعتمد

في تقسيمها عدّة أسس منها درجة فعاليتها ومدى الفتها للتفاعل مع مثبطات الإنزيم مثل مثبط Calvulanci acid ، Tazobactam و Sulbactam (Katsanis *et al.*,1994) . كما قسمت هذه الأنزيمات استناداً للعوامل الوراثية المسيطرة على إنتاجها سواء أكانت كروموسومية أم بلازميدية فضلاً عن الجينات القافزة (Hogg, 2005) ، إذ تكون الإنزيمات الكروموسومية مستحثة Inducible enzyme التي تنتج فقط عند توفر المادة الأساس العاملة عليها في وسط البكتريا . أما الأنزيمات المشفرة من قبل البلازميدات فتكون أنزيمات منتظمة التكوين Constitutive enzyme فيكون إنتاجها مستمراً (الجبوري،1997) .

تنتج انزيمات البيتالاكتاميز من اجناس بكتيرية متنوعة ، اذ ذكرت الجبوري (1113) في دراسة على عزلات *E. coli* ان حوالي 11% من هذه العزلات تقاوم مضادات الأمينوبنسلين بصورة عامة ، فيما بلغت نسبة العزلات المنتجة لانزيم البيتالاكتام 10% اغلبها كان يشفر من قبل بلازميدات اقترانية منتقلة ذاتياً . كما اشار Szabo وجماعته (2001) الى امتلاك بكتريا *K. pneumoniae* المقاومة العالية لمشتقات البنسلينات والسيفالوسبورينات القديمة والحديثة منها وغالباً ماتكون تحت سيطرة بلازميدات اقترانية فضلا عن تشخيصها ضمن الانواع الاكثر شهرة في انتاجها لانزيمات البيتالاكتام واسعة الطيف المحطمة لسيفالوسبورينات الجيل الثالث كمضاد الـ Cefotaxime و Ceftazidime . كما بين Carey وجماعته (2001) ان بكتريا *P. aeruginosa* تمتاز بمقاومتها المشتركة لأكثر من مضاد حيوي ، وتعد من المشاكل الصحية الرئيسية التي يعاني منها الكادر الطبي بأعتبارها العزلات المنتشرة في المستشفيات وخاصة بين مرضى الجروح والحروق والذين لديهم نقص في المناعة الجسمية.

و تأتي بكتريا *Staph. aureus* في طليعة البكتريا الموجبة لصبغة غرام المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز الخارج خلوية المشفرة من قبل البلازميدات والكروموسوم البكتيري وبنسبة تزيد عن 31% وغالباً ما يمكن زيادة ما مفرز من انزيم الى الخارج بتوفير وسط انتاجي مناسب او بتوفر عامل محفز متمثلاً بمضاد البنسلين (Bhat *et al.*, 1994) ، فضلاً عن بكتريا المكورات العنقودية فأن لبعض انواع جنس *Bacillus* القدرة على انتاج الانزيم مثل *B. cereus* ، *B. stearothermophilus* و *B. subtilis* وغالباً تكون الجينات المشفرة للأنزيم كروموسومية الموقع والبعض من هذه الانزيمات يعود الى مجموعة metalo β-Lactamase وهذه تحتاج الى ايون معدني كعامل مساعد Co- factor للأنتاج (Weidman *et al.*, 1989) ، ولاتنفرد البكتريا وحدها في انتاج انزيمات البتالاكتاميز فهناك العديد من الاحياء المجهرية في الطبيعة لها المقدرة على الانتاجية مثل الخمائر Yeast ، وبعض الطحالب الخضراء المزرقة blue green alage والمعروفة حالياً بـ Cyanobacteria . (Bush, 1989)

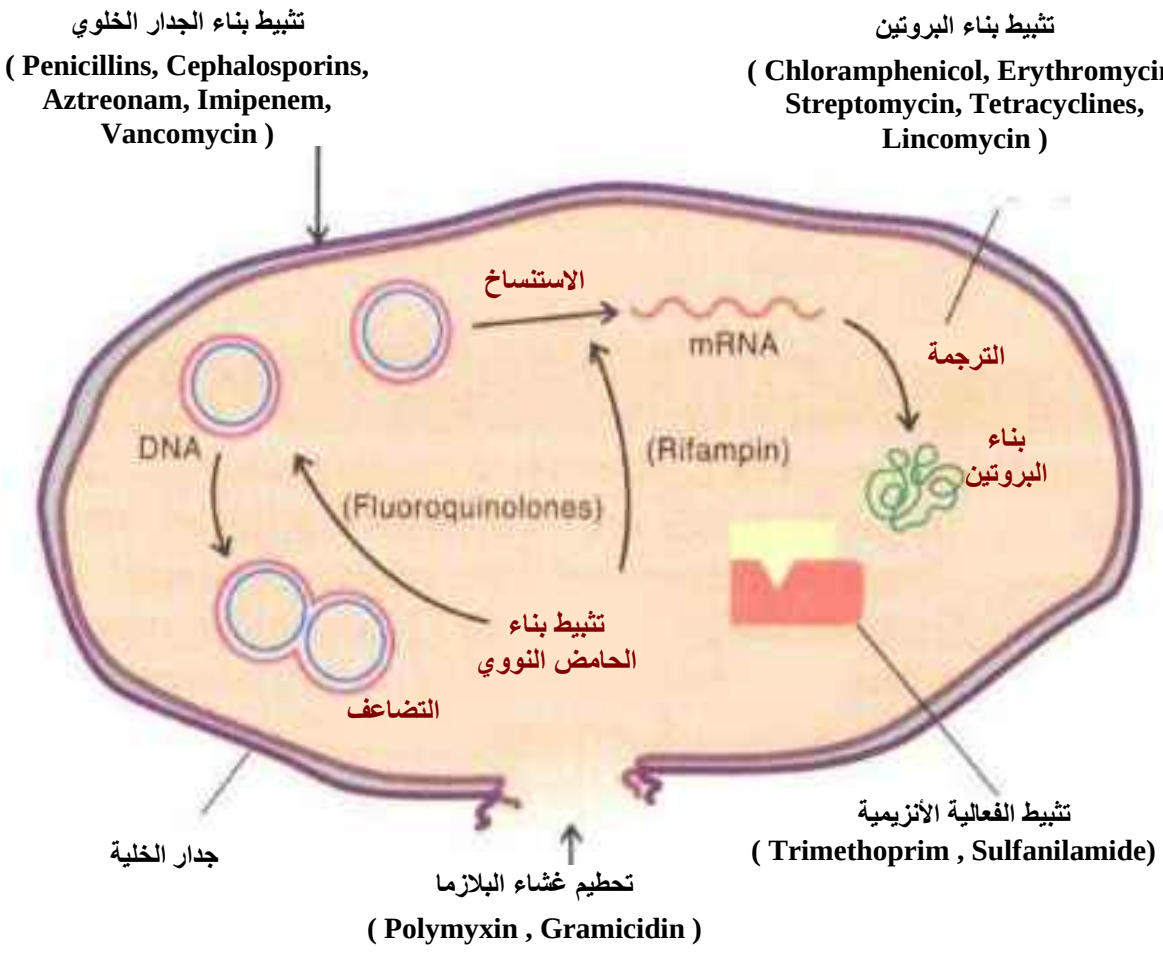
1.2 - **المضادات الحيوية** Antibiotics

يشير مصطلح المضادات الحيوية Antibiotics إلى المواد العضوية الطبيعية التي تنتج من الكائن المجهري والتي تعمل على تثبيط نمو كائنات مجهرية أُخرى (الجشاعة ، 2001) ، واليوم يعرف المضاد الحيوي بأنه المادة المنتجة من قبل الكائن المجهري كلياً أو جزئياً بعملية التخليق الكيميائي التي تثبط بتراكيز قليلة نمو الكائنات المجهرية الأخرى (Hodgson and Kizior, 2003).

تختلف هذه المضادات من حيث الفعالية ضد المايكروبية فهناك مضادات قاتلة Bacteriocidal لها القدرة على قتل البكتريا ومنع نموها مجدداً كالبنسلينات Penicillins والسيفالوسبورينات Cephalosporins ومضادات المجموعة الامينوكلايكوسيدية Aminoglycosides ، من جهة أخرى هناك المضادات المثبطة لنمو البكتريا Bacteriostatic التي تعمل على إيقاف تكاثر البكتريا مثل Tetracycline و Chloramaphenicol (Laurence *et al.*, 1997) . ومن حيث طيف فعاليتها فهناك المضادات واسعة الطيف Broad spectrum antibiotic ، التي تعمل على البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام مثل Amoxacillin و Tetracycline وغيرها ، ومنها ما تكون ذات طيف ضيق Narrow Spectrum Antibiotic التي تعمل على نوع محدد من الأحياء المجهرية كالبنسلينات المقاومة لمكورات العنقودية والبنسلينات ضد الزوائف Anti-Pseudomonal Antibiotic ، ويعتمد استمرار المفعول على الجرعة المناسبة وكذلك نفاذية المضاد الحيوي الى الأنسجة (Glazer and Nikaido, 2007).

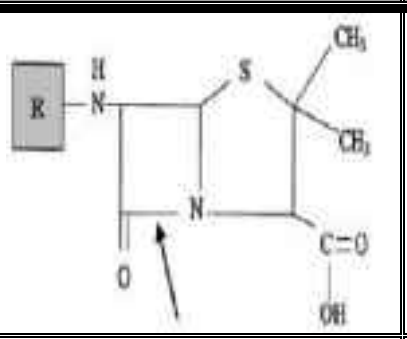
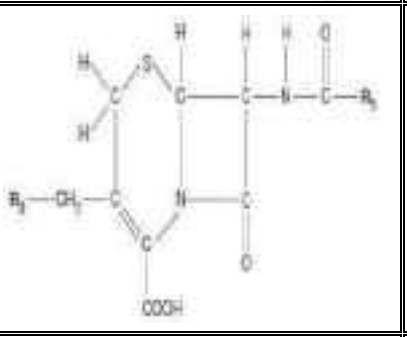
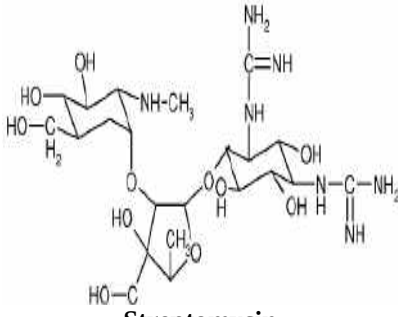
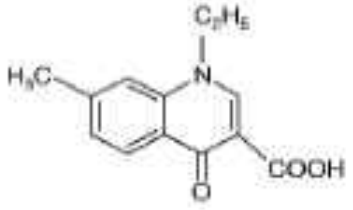
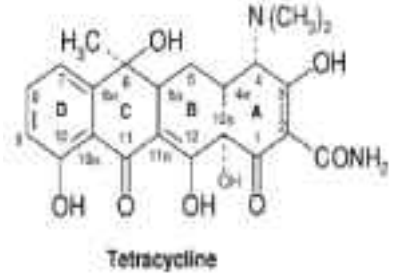
كما وتختلف المضادات الحيوية في ميكانيكية عملها وتأثيرها على تراكيب الخلية ، فهناك مضادات تعمل على ايقاف تكوين الجدار الخلوي للبكتريا Bacterial Cell Wall في مراحله التكوينية وتسبب موت البكتريا منها Pencillin ، Cephalosporin ، Vancomycin و Cyclosporine وهذه تكون ضمن المجموعة القاتلة كونها تعمل على إيقاف تصنيع الجدار الخلوي (Hogg , 2005) ، وتوجد مضادات تعمل على الغشاء السيتوبلازمي Cytoplasmic membrane مما تعرقل عملية نفاذية هذه الأغشية مثل Gramicidin و Polymyxin (Franklin and Snow, 2005) ، كما وتوجد مضادات تعمل على إيقاف صناعة البروتين Protein synthesis وهذه تختلف في آلية عملها والموقع الهدف الذي ترتبط به ومنها Erthromycin ، Tetracycline ، Streptomycin و Chloramaphenicol ، في حين أن هناك من المضادات ما يعمل على الأحماض النووية مثل Rifampin و Actinomycin

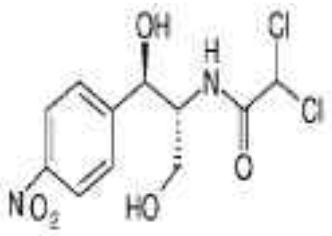
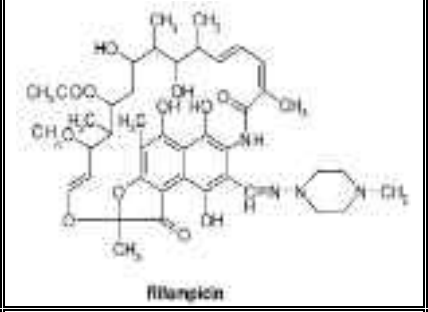
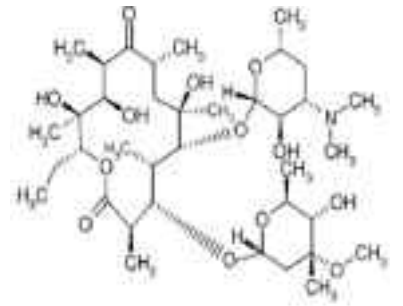
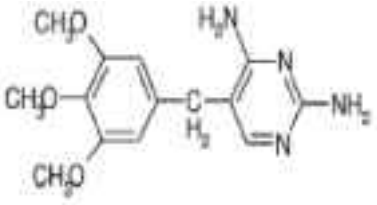
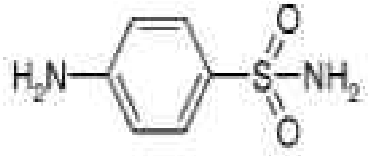
، وهذه المضادات توقف تكوين الدنا DNA في مراحل مختلفة من تصنيعه (بيومى ، 2001) .
والشكل(2-2) يوضح أهداف وعمل واستخدام انواع المضادات الحيوية ضد الخلية الجرثومية



الشكل (2-2) : أهداف وعمل المضادات الحيوية واستخدام أنواعها ضد الخلية الجرثومية
(Nester *et al.*, 1998)

جدول (2–1) : التركيب الكيميائي لبعض المضادات الحيوية وآلية عملها واستخداماتها الطبية

ت	المضاد الحيوي	التركيب الكيميائي	آلية العمل	الاستخدامات الطبية
1	**البنسلينات Penicillins** تتألف من حلقة البيتالاكتام β-Lactam ring مرتبطة مع حلقة ثايوزولدين Thiozolidine ring وتتصل بالنواة سلسلة جانبية R-side chain تمتلك مضادات كثيرة تختلف بأختلاف السلسلة الجانبية R منها Penicillin G ، Oxacillin، Ampicillin و Pipracillin		هدفها مجموعة الإنزيمات التي تعرف بالبروتينات المرتبطة بالبنسلين Penicillin-Binding Proteins (PBPs) ، إذ تقوم مضادات البيتالاكتام بمنع حدوث الارتباط المتقاطع وذلك بتكوينها آصرة تساهمية مع PBPs مؤدياً ذلك إلى تعطيل عملها والذي يؤدي إلى تخليق جدار خلوي غير متماسك ناقص التكوين وبالتالي موت الخلية نتيجة تأثره بالضغط الأزموزي	مضادات واسعة الطيف لها فاعلية ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام ، تستخدم في علاج التهابات المسالك التنفسية ، الأذن الوسطى ، المجاري البولية و الالتهابات الجلدية وغيرها .
2	**السيفالوسبورينات Cephalosporins** تتألف من حلقة بيتالاكتام مندمجة مع حلقة dihydrothiazine ، وتمتلك النواة موقعين هما R_1 و R_2 والتغيرات في هذين الموقعين معناه تغير الفعالية المضادة للبكتريا ومنها Ceftriaxone ، Cephalothin ، Cefotaxime و Cephalexin			
3	**الأمينوكلايكوسيدات Aminoglycosides** تحتوي هذه المضادات على اثنين او أكثر من السكريات الأمينية مرتبطة بآصرة كلايكوسيدية الى نواة حلقة المينواسيل ومنها Streptomycin ، Tobramycin ، Gentamicin و Amikacin	 **Streptomycin**	تعمل على تثبيط عملية تصنيع البروتين داخل الخلية البكتيرية لقدرتها على الارتباط مع الوحدة الرايبوسومية الصغيرة (30S) بطريقة تتسبب في دخول تسلسلات خاطئة من الأحماض الأمينية مؤدية إلى إنتاج بروتينات غير طبيعية متراكمة داخل الخلية البكتيرية وبالتالي توقف نمو البكتريا	لها دوراً مهماً في معالجة الأصابات الناتجة عن البكتريا السالبة لصبغة غرام ومنها افراد العائلة المعوية والزوائف ، إضافة لفاعليتها ضد عصيات السل *Mycobacterium tuberculosis*
4	**الكوينلونات Quinolones** هي نظائر مخلقة من المركب الأولي Nalidixic acid ومنها Levofloxacin ، Ciprofloxacin ، Rufloxacin ، Perfloxacin و Lomefloxacin	 **Nalidixic acid**	تعمل على تثبيط بناء دنا البكتريا DNA عن طريق تثبيط انزيم DNA gyrase ، إذ ان الأخير يعمل على منع استرخاء اللف الفائق للدنا وبذلك تمنع هذه المضادات التضاعف الطبيعي والاستنساخ والتصليح للدنا مما يجعلها من المضادات القاتلة Bacteriocidal	واسعة الطيف وفعالة ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام ولها القدرة على اختراق أنسجة الرئة لذلك فإنها توصف لمعالجة إصابات أمراض الرئة .
5	**مجموعة التتراسايكلين Tetracycline** فضلاً عن التتراسايكلين هناك مشتقات له منها Minocyclin، Oxytetracycline ، Doxycyclin و Chlortetracycline	 Tetracycline	وتعمل على تثبيط تخليق البروتينات داخل الخلية البكتيرية من خلال الارتباط العكسي مع تحت الوحدة (30s) في الرايبوسوم وبالتالي تمنع ارتباط tRNA مع mRNA وبذلك لا يمكن تكوين الآصرة الببتيدية بين الأحماض الأمينية	تمتلك هذه المجموعة فعالية مثبطة للبكتريا Bacterostatic ، تستخدم هذه المضادات في معالجة الإصابات الالتهابية في القصبات وفي حالات ذات الرئة .

ت	المضاد الحيوي	التركيب الكيميائي	آلية العمل	الاستخدامات الطبية
6	**كلورامفينكول Chloramphenicol** تحتوي جزيئة الكلورامفنيكول على نواة Nitrobenzene المسؤولة عن بعض الأضرار السمية المرتبطة بالمضاد ، وترتبط بهذه النواة مجموعة جانبية هي Nitrogroup .		يعمل على تثبيط تخليق البروتينات من خلال منع إيصال الحامض الأميني إلى سلسلة الأحماض الأمينية المتكونة حديثاً في تحت الوحدة (50s) للرايبوسوم عن طريق تداخله مع فعالية إنزيم Peptidyl transferase	يمتلك هذا المضاد فعالية عالية ضد البكتريا السالبة والموجبة مثل *H. influenzae* و *S. pneumonia* ، كذلك الركتيسيا Rickettsiae و المايكوبلازما Mycoplasma .
7	**مضادات الريفامبسين Rifamycins** تحتوي مضادات Rifamycins على نظام من الحلقات الأروماتية Aromatic ring المرتبط بجسور أليفاتية Aliphatic bridge وهم مضاد عائد لها هو Rifamycin .	 Rifampicin	يثبط هذا المضاد وبشكل انتخابي أنزيم DNA dependent RNA polymerase ليغلق بناء الحامض النووي الرسولي mRNA ، ويعتقد بأنه يتداخل مع معقد البدء initiation complex لتثبيط تخليق البروتينات	يمتاز المضاد بطيفه الواسع على البكتريا الموجبة لصبغة غرام والمايكوبلازما ، وهو واحد من اهم العلاجات في حالات السل الرئوي والسحايا وتجرثم الدم .
8	**الماكروليد Macrolides** تضم هذه المجموعة كلاً من Lincomycin ، Clindamycin و Erythromycin	 Erythromycin	تعمل على تثبيط بناء البروتينات من خلال ارتباطها مع rRNA(23S) في تحت الوحدة الرايبوسومية (50S). مما يؤدي إلى التداخل مع تكوين معقد الابتداء Initiation complex اللازم لبناء السلسلة الببتيدية أو قد يتداخل مع تفاعل ترجمة minoacyl وبالتالي منع عملية بناء السلسلة الببتيدية	يستعمل بشكل واسع في معالجة الإصابات التنفسية التي تسببها البكتريا الموجبة لصبغة غرام حيث يكون تأثيره قاتلاً .
9	**السلفوناميد و الترايميثوبريم Trimethoprim and Sulfonamide** استخدمت توليفة بينهما تتمثل بالمضاد Co-trimoxazole ليكون التأثير تآزرياً	 Trimethoprim  Sulfonamide	يتنافس مضاد Sulfonamide مع مركب P-amino benzoic acid على الموقع الفعال لأنزيم Dihydropteroate synthetase وبالتالي يثبط عملية تصنيع حامض الفوليك في الخلية. في حين يعمل المضاد Trimethoprime على تثبيط عمل إنزيم Dihydrofolate reductase الذي يختزل dihydrofolic acid إلى tetrahydrofolic acid وهي الخطوة المهمة التي تؤدي إلى بناء البيورينات في الحامض النووي DNA وبالتالي تثبيط بناء الأحماض النووية الذي يؤدي إلى موت الخلية البكتيرية	له تأثير قاتل للبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام ، لذلك يوصف بشكل واسع لمعالجة الأخماج المختلفة ومنها الأخماج التنفسية

1.2- مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية

على الرغم من تنوع ووفرة المضادات الحيوية غير أن مشكلة المقاومة البكتيرية لهذه المضادات أخذت بالانتشار في العالم (الموسوي ، 2001) ، إذ تشير معظم الدراسات إلى حصول تكرار في حدوث اخماج الجهاز التنفسي وهذا ناتج عن الاستخدام المتكرر للمضادات الحياتية بصورة عشوائية مما يؤدي إلى ظهور سلالات مقاومة لهذه المضادات وهذا بدوره يجعل معالجة الاخماج البكتيرية صعبة وطويلة الأمد (Brooks *et al.*, 2001) . ويمكن تعريف الكائن المجهري المقاوم Resistant micro organism بأنه الكائن الذي لا يثبط أو يقتل بتراكيز الدواء الموجودة في الجسم عند أخذ الجرعة الاعتيادية (Mims *et al.*, 2004).

توصف مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية بأنها ذات مستوى عالٍ عندما لا يوجد أي تأثير للمضاد الحيوي المستخدم على البكتريا أو أنها ذات مستوى جزئي عند بقاء نسبة عالية من الخلايا البكتيرية عالية الفعالية (Dinah and Christine , 2000) . وتمتلك بعض انواع البكتريا مقاومة حقيقية Intrinsic resistance وهي صفة ملازمة للكائن المجهري تحدد بتركيب الجدار الخلوي إذ تعتبر البكتريا الموجبة لصبغة غرام اكثر حساسية من البكتريا السالبة للصبغة وذلك بسبب طبيعة الجدار الخلوي الذي يكون اقل تعقيداً مما هو عليه في البكتريا السالبة للصبغة (Hamilton – Miller, 1990) . كما ويمكن للأنواع الحساسة فطرياً ان تتطور وتكسب المقاومة Acquired resistance وهي المقاومة الناشئة أما عن حدوث طفرات كروموسومية تلقائية أو نتيجة لانتقال مؤشرات وراثية قد تكون بلازميدية أو عناصر قافزة (Laurance *et al.*,1997) . وهناك آليات مختلفة تتبعها البكتريا لمقاومة المضادات الحيوية منها :

1.1.2- إنتاج الأنزيمات المثبطة للمضادات الحيوية

تقوم البكتريا بإنتاج العديد من الأنزيمات التي تستطيع تحوير تركيب جزئية المضاد ليصبح غير فعال من خلال تحليل المضاد أو عن طريق إضافة مجاميع كيمياوية له أو الارتباط به وبذلك لا يستطيع الوصول إلى منطقة الهدف (Prescott, 2002) ، ومن هذه الأنزيمات :

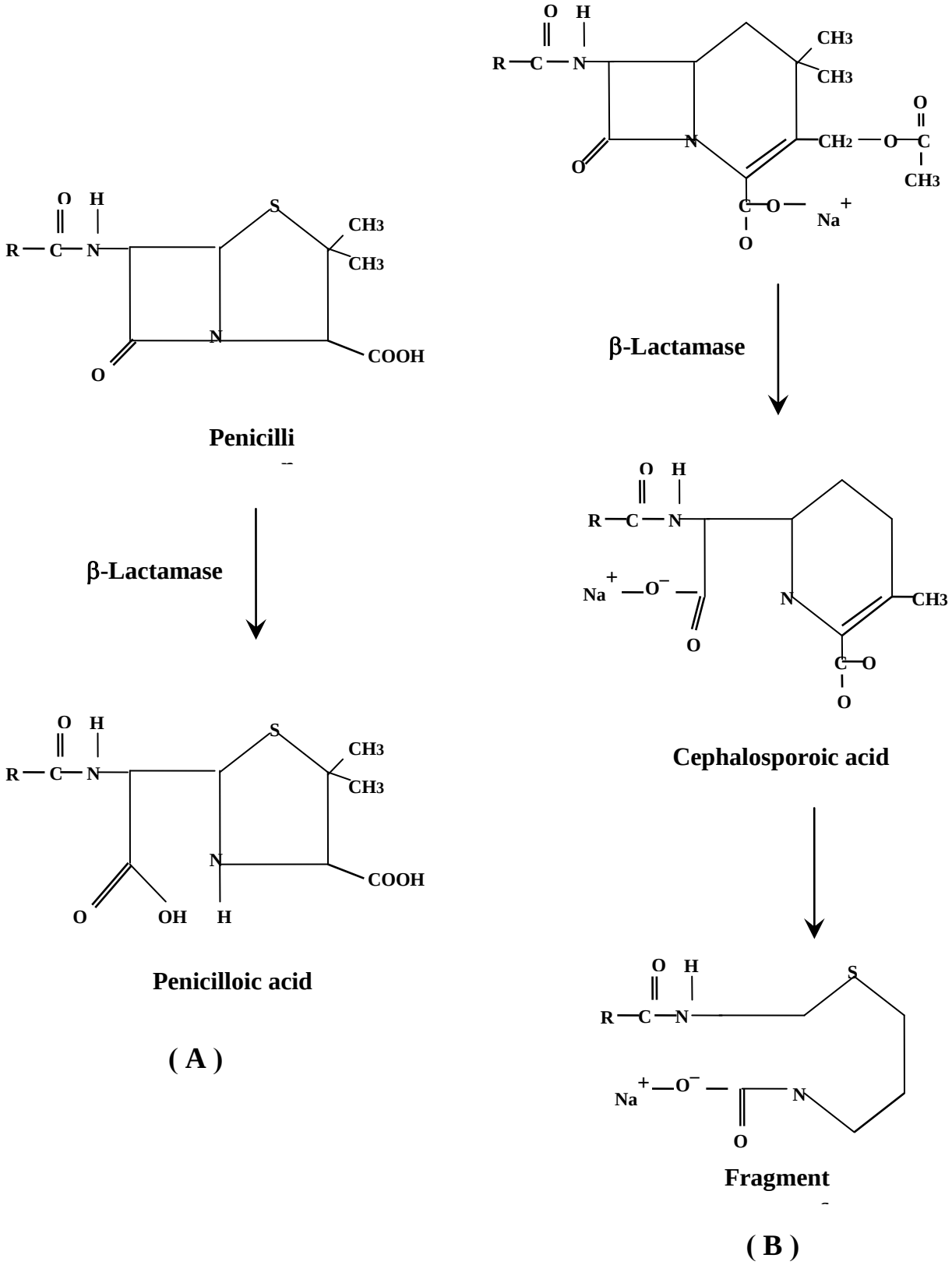
A. أنزيمات البيتالاكتاميز β-lactamases

يعد انتاج انزيمات البيتالاكتاميز الآلية الاساسية لمقاومة المضادات الحيوية التابعة لمجموعة β-lactam (Valverde *et al.*, 2004) ، تنتج هذه الأنزيمات من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام على حد سواء (Baron, 2001) ، ويختلف انتاجها في البكتريا الموجبة لصبغة غرام عن تلك الموجودة في البكتريا السالبة منها ، تكون إنزيمات المجموعة الأولى من

الإنزيمات الخلوية الخارجية Extracellular enzyme ، إذ يتم إفراز كميات كبيرة من الإنزيم إلى خارج الخلية لتحلل المضاد في الوسط المحيط بها كما هو الحال في بكتريا *Bacillus cereus* و *Staph. aureus* (Jacoby and Sutton, 1985) ، اما في البكتريا السالبة لصبغة غرام فأن الأنزيم يكون داخل خلوي Entracellular Enzyme او من نوع المرتبط بالخلية Cell-bound enzyme ويعود الأختلاف الى طبيعة تكوين الجدار الخلوي ، إذ تكون كمية الأنزيم المنتجة قليلة وتبقى محتجزة في الفسحة البريبلازمية Priplasmic Cpace ، مما تعمل على إعاقة مرور جزيئات المضاد الحيوي الى داخل الخلية البكتيرية (Ambler, 1980) ، وعليه فإن تراكيز قليلة من الإنزيم كفيلة لحماية البكتريا من تأثير المضاد كما هو الحال في بكتريا *P.aeruginosa* و *E. coli* (Jacoby and Sutton, 1985).

تحمي هذه الأنزيمات البكتريا من خلال مهاجمتها حلقة البيتالاكتام الموجودة في نواة البنسلين والسيفالوسبورين ، وكسر آصرة الأمايد ليتحول المضاد إلى مركب فاقد الفعالية (Joseph , 1993) . يطلق على المركب الناتج عن تكسير البنسلينات اسم حامض البنسلويك Penicilloic acid (شكل :2-3-A) ، ويكون مستقراً على العكس من المركب المتكون من تكسير السيفالوسبورينات، إذ ينتج أولاً مركباً وسطياً غير مستقر يدعى حامض السيفالوسبورك Cephalosporic acid الذي سرعان ما يتفكك الى جزئيين غير فعالين (شكل : 2-3-B) (Sykes and Mattew, 1976).

يسيطر على انتاج أنزيمات البيتالاكتام عوامل وراثية مختلفة قد تكون كروموسومية او بلازميدية او عناصر قافزة (Prescott , 2002) ، فلقد عزل الباحث Liu وجماعته (1112) سلالة من بكتريا *Klebsiella pneumoniae* تنتج كمية من أنزيمات بيتالاكتاميز كروموسومية صنف A منتظمة التكوين ، غير انها كافية لحمايتها من تأثير مضادات , Ampicillin Amoxacillin و Carbenicillin ، كما وجد الباحث Laraki وجماعته (1111) أن الجين المسؤول عن تشفير بعض انزيمات البيتالاكتام المعدنية Metallo-β-Lactamases هو جين قافز يعرف بـ Mobile gene ويرمز له bla Imp ، وأستطاع هذا الباحث من تحديد الجين في عزلات مرضية مثل *K. pneumoniae* و *P. aeruginosa* .



شكل (2-3): ميكانيكية عمل أنزيمات البيتالاكتام
(A) على البنسلينات (B) على السيفالوسبورينات (Sykes and Mattew, 1976)

B. الأنزيمات المثبطة للأمينوكلايكوسيدات

ان انتاج انزيمات تحوير الامينوكلايكوسيدات Aminoglycoside-modfying enzymes هو من اكثر آليات مقاومة البكتريا لهذه المضادات شيوعاً (Galimand *et al*., 2003) ، لقد تم تحديد ثلاثة انواع تنتجها البكتريا هي :

✺الأنزيمات الناقلة للأستيل Acetyltransferase (AAC)

تعمل هذه الأنزيمات على تحفيز عملية الأستلة Acetylation من خلال إضافة مجموعة الأستيل إلى مجموعة الأمين (Davis *et al*., 1990).

✺الأنزيمات الناقلة للأدنيل Adenyltransferase (AAD)

تكون هذه الأنزيمات مسؤولة عن عملية الأدنلة Adenylation ، إذ تقوم بإضافة مجموعة أدنيل في موقع الهيدروكسيل (Naber *et al*.,1990).

✺الأنزيمات الناقلة للفسفور Phosphotrnaferase (APH)

تكون هذه الأنزيمات مسؤولة عن عملية الفسفرة Phosphorylation ، من خلال نقل جزيئة الفسفور من الوسط الى جزيئة المضاد في موقع الهيدروكسيل ، مما يؤدي الى تغيير تركيب المضاد وبالتالي يفقد فاعليته (Davis *et al*., 1990).

إن جميع هذه الأنزيمات تحدث تغييراً في تركيب المضاد مما يجعله غير قادر على الأرتباط بالرايبوسومات البكتيرية (Mims *et al*., 2004) ، ويشفر لهذه الأنزيمات عوامل وراثية قد تكون بلازميدية واحياناً جينات قافزة (Mingeot- Leclereq *et al*.,1999) ، إذ أشار Vatopoulos وجماعته (1112) إلى وجود 13 بلازميد من نوع Resistance plasmid وبأحجام مختلفة تراوحت بين (40-120) ميكا دالتون تشفر لهذه الإنزيمات في بكتريا *Enterobacter* و *Klebsiella* . كما بين Fluit وجماعته (2001) ان سبب مقاومة بكتريا المكورات العنقودية للجنتامايسين يعود الى انتاجها لأنزيمات تحوير ثنائية الوظيفة ('6) AAC، ("2) APH والجين المشفر لها هو *aac (6')-Ietaph (2')* ويقع على العنصر القافز Tn4001 .

C. الأنزيمات المحورة للكلورامفينيكول

تنتج العديد من البكتريا إنزيم Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) الذي يعمل على أستلة Acetylation هذا المضاد (Dionisio *et al*., 2002) ، مما يؤدي الى تكوين جزيئه غير فعالة هي 1,3-Diacetyl Chloramphenecol ، فضلاً عن فقدان القدرة على الأرتباط بالرايبوسومات (Fluit *et al*., 2001) . يشفر لهذا الانزيم جينات

محمولة على بلازميد تدعى *cat* genes موجودة في كل من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام (Fluit *et al.*, 2001). وقد لاحظ هذا النوع من المقاومة لأول مرة في بكتريا *E. coli* الباحث Foster سنة 1113 ، كما لاحظ هذا الباحث احتواء أفراد العائلة المعوية على العديد من أنزيمات CATs وقد درست من خلال الخصائص البايوكيميائية والوراثية والمناعية . كما تقاوم بكتريا *Staph. aureus* هذا المضاد عن طريق إنتاج 1 انواع من انزيمات CATs المثبطة لفعل مضاد الكلورامفينيكول (Davis *et al.*,1990).

2.1.2- **أنظمة الدفق** Eflux Systems

تساهم انظمة الدفق المعتمدة على الطاقة او ماتعرف بآلية الضخ الخارجي Pump out في حدوث المقاومة الذاتية للعديد من المضادات من خلال قذف المضاد من داخل الخلية الى الخارج (Masuda *et al.*, 2000) ، وتتم هذه الآلية بمساعدة الغشاء الداخلي والفسحة البريبلازمية وبعض مكونات الغشاء الخارجي (Solnik , 2003). وتضم انظمة الدفق مجموعة من البروتينات المسيطر عليها من قبل الأوبيرون Operon الموجود على الكروموسوم البكتيري (Mallea *et al.*, 1998) ، ويؤدي حصول الطفرة فيه إلى زيادة التعبير لمضخات الدفق وبالتالي تزداد المقاومة لمضادات البيتالاكتام (Danel *et al.*,1999).

تكون هذه الأنظمة شائعة في أفراد العائلة المعوية وبكتريا *P. aeruginosa* (الجشاعة، 2001) ، اذ ما يعرف عن الاصابات الانتهازية المتسببة من قبل بكتريا *P.aeruginosa* انها صعبة العلاج بسبب قدرة هذه البكتريا على مقاومة العديد من المضادات الحيوية (Chuanchune *et al.*, 2001) ، وقد أُشير حديثاً ان سبب هذه المقاومة هو امتلاك بكتريا *P.aeruginosa* اثنا عشر نظام ضخ معقد المقاومة Resistance Nodulation Efflux System قد تم دراسة بعض هذه الأنظمة بشكل مفصل ولوحظ انها تحفز عند وجود المادة الاساس التي تعمل عليها (Rehm, 2008).

3.1.2- **تغيير المسارات الأيضية** Alteration of Metabolic Pathway

يحصل في هذه الآلية تغييراً في المسار الأيضي الخاص بتخليق بعض المركبات الضرورية للبكتريا ، كما يحدث في مقاومة بعض الأجناس البكتيرية لمضاد Sulfonamide الذي يعمل على تثبيط احد الأنزيمات الداخلة في المسار الحيوي لتخليق حامض Folic acid مما يؤدي الى تثبيط انتاج هذا الحامض المهم في الايض الخلوي للبكتريا وبالتالي تثبيط نمو البكتريا (Davis *et al.*, 1990)، ولذا فأن البكتريا تتجنب فعل هذا المضاد بزيادة مادة PABA وبذلك تُنافس المضاد في عمله في الدخول للمسار الأيضي الخاص بتصنيع مركب

Folic acid (Myrvik and Weiser, 1998) ، او عن طريق انتاج انزيمات اقل حساسية لهذا المضاد ، فضلاً عن تطوير قابليتها على امتصاص هذا الحامض من المحيط الخارجي (Jenkis, 1996).

3.1.2- **تغيير موقع الهدف** Alteration of Target Site

تمتلك البكتريا الحساسة لمضاد حيوي معين مستقبلاً لذلك المضاد في حين تفتقد البكتريا المقاومة لهذا المستقبل والمعروف بموقع الهدف Target Site (Marc , 1998) ، ويؤدي حدوث طفرة في موقع الهدف الى فقدان ألفة المضاد له ، وبالتالي تحول البكتريا من حساسة الى مقاومة (Jenkis , 1996) ، إذ أن حدوث طفرة وراثية في الجينات المشفرة لإنتاج البروتينات المرتبطة بالبنسلين PBPs قد تؤدي إلى تغير في تسلسل الأحماض الأمينية في هذا الموقع مع احتفاظها بوظيفتها البايلوجية وعليه يفقد البروتين الفته في الارتباط بالمضاد (Mims *et al.*, 2004) . كما ان التغير الحاصل لتحت الوحدة الرايبوسومية الصغيرة 30S في البكتريا الحساسة للمضادات الأمينوكلايكوسيدية يجعلها مقاومة لها (Franklin and Snow, 2005) ، ويكون أسلوب المقاومة لمضاد الريفامبسين عن طريق الطفرات الكروموسومية التي تؤدي إلى حدوث تغيرات في موقع الهدف للـ DNA dependent RNA polymerase مما يسبب في عدم قدرة مضاد الرفامبسين على الارتباط بهذا الإنزيم في بكتريا *E. coli* المقاومة له ، كما تقاوم المكورات العنقودية هذا المضاد بالأسلوب نفسه (Schmitz *et al.*, 2000) .

1.1.2- **حاجز النفاذية** Permeability Barrier

تعد هذه الآلية من الوسائل المهمة التي تستطيع البكتريا بواسطتها مقاومة المضادات الحيوية (Dever and Dermody, 1991) ، ويوجد هذا النوع من المقاومة في البكتريا السالبة لصبغة غرام فقط ، اذ يحتوي الغشاء الخارجي لها على قنوات بروتينية تسمى Porins تسمح بمرور المواد ذات الوزن الجزيئي الأقل من 100 دالتون (Mandell *et al.*, 1995) ، ويوجد نوعان اساسيان من البورينات هما Porins F و Porins C والتي تشفر لهما جينات محمولة على الكروموسوم (Nikaido *et al.*, 1983) ، وتعد هذه القنوات الممر الاساس لعبور البنسلينات والسيفالوسبورينات ، فضلاً عن عبور مجموعة المضادات الامينوكلايكوسيدية (Lee *et al.*, 1992) . تختلف الأنواع البكتيرية فيما

بينها بنسبة البروتينات الغشائية في الـ Porin وهذا يؤدي إلى الاختلاف في حساسية البكتريا المختلفة للمضاد الحيوي الواحد (Laurence *et al*., 1997).

يؤدي حدوث طفرة وراثية في الكروموسوم إلى تغيير في شكل البروتينات مما يؤدي إلى فقدان هذه القنوات أو اختزالها وتتغير البكتريا بذلك من حساسة إلى مقاومة للمضاد الحيوي (Mallea *et al*.,1998) . لقد اصبحت مقاومة مضادات الحياة الناجمة عن نقصان في نفاذية الغشاء الخارجي للبكتريا السالبة من المشاكل الخطيرة ، فبعض السلالات تمتلك القابلية على انتاج أنزيم β-Lactamase الى جانب امتلاكها حاجز النفاذية مما يجعلها عالية المقاومة (Glazer and Nikaido, 2007) ، فقد اشار Sanders (1112) الى فقدان كل من Outer Membrane Porin F(ompF) و (ompC) في السلالات المنتجة لأنزيم β-Lactamase قد سبب ارتفاعاً في قيم التراكيز المثبطة الدنيا MIC لمضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات نتيجة نقصان الأمتصاص من جهة وتحطيم الجزيئات بالأنزيم من جهة اخرى .

3.2- أسس مقاومة البكتريا لمضادات الحياتية

تشير الدراسات الى وجود نوعين من هذه الأسس احدهما يعود الى عوامل غير وراثية والأخر الى عوامل وراثية

1.7.2- الاساس غير الوراثي للمقاومة Non-Genetic Origin of Antibiotic Resistance

تؤثر معظم المضادات الحياتية في التكاثر النشط للبكتريا ، فالكائنات المجهرية التي لا تتضاعف تبدو مظهرياً مقاومة لتأثير المضاد الحياتي فمثلاً عصيات التدرن *Mycobacterium tuberculosis* تعيش لعدة سنين في الأنسجة بعد الإصابة وتقاوم الوسائل الدفاعية للجسم كما تقاوم العلاج ، وعندما تبدأ هذه البكتريا بالانقسام تحت ظروف ضعف المناعة تكون تحت التأثير الفعال والمؤثر للمضاد الحياتي المستعمل ضدها (Szabo *et al*., 2001) . وقد تفقد الأحياء المجهرية التركيب المستهدف من قبل المضادات ولأجيال متعددة وتكون نتيجة ذلك مقاومة لتلك المضادات ، فمثلاً البكتريا الحساسة للبنسلين قد تتحول الى اشكال فاقدة للجدار الخلوي (L-Shape) ، نتيجة استخدام البنسلين في العلاج ، وان فقدان الجدار الخلوي يجعل هذه الخلايا مقاومة للمضادات المثبطة للجدران الخلوية مثل البنسلينات والسيفالوسبورينات وقد تبقى كذلك لعدة أجيال (Jawetz *et al*., 2004). وأحياناً تكون الإصابة داخل خلية جسم المضيف فان تأثير المضاد الحياتي يكون غير فعال لأنه لا

يستطيع الدخول إلى الهدف ، ومثال ذلك المضاد الحياتي الجنتامايسين Gentamycin يكون غير فعال في معالجة الحمى التي تسببها بكتريا السالمونيلا *Salmonella* لأنه من مجموعة الامينوكلايكوسيدات التي ليس لها القدرة على الدخول إلى الخلايا (Baron *et al.*, 1999).

2.7.2- الأساس الوراثي لمقاومة Genetic Origin of Antibiotic Resistance

تعد العوامل الوراثية من اهم العوامل التي تسهم في ظهور مقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية ، اذ تمتلك البكتريا مورثات متعددة تنتقل بطرائق مختلفة تؤدي إلى حصول الطفرات الوراثية المقاومة للمضادات الحيوية وظهور سلالات مقاومة لمضاد حيوي واحد أو اكثر (Koneman *et al.*, 1997) ، وهذه الطفرات المقاومة ممكن ان تحصل في مركز تأثير المضادات الحيوية أو تغيير في الجدار أو الغشاء الخلوي ، وتقع الجينات المسؤولة عن المقاومة اما على الكروموسوم أو البلازميدات أو الجينات القافزة التي تنتقل من سلالة إلى اخرى أو من نوع إلى آخر (Bootsma, 1999). وعلى هذا الأساس تقسم هذه المقاومة الى عدة انواع أهمها :

1.2.3.2- المقاومة الكروموسومية Chromosomal Resistance

تكتسب البكتريا المقاومة ضد العديد من المضادات الحياتية عن طريق احداث طفرة تلقائية كرموسومية في الموقع الجيني الذي يتحكم بالشكل الوظيفي التركيبي للمستقبلات الخاصة التي يعمل عليها المضاد (Jawetz *et al.*, 2004) ، فحدوث طفرة وراثية في الجينات الكروموسومية قد تؤدي إلى تغيير في مركز تأثير المضاد الحيوي ، أو تغيير في جهاز نقل الجرثومة وربما تؤدي إلى زيادة إنتاج كمية المواد المقاومة أو المعطلة للمضاد الحيوي ، مثل إنزيمات *B*-lactamases والتي لها دور مهم في مقاومة مضادات البيتالاكتام (Hogg, 2005). فقد يؤدي حدوث طفرة وراثية في الجينات المشفرة للبروتينات المرتبطة بالبنسلين PBPs ، الى تقليل ميل ارتباط مضادات البيتا لاكتام بهذه البروتينات، او انتاج بروتينات بديلة مرتبطة بالبنسلين Alternative PBPs تدعى PBP_2a ذات الألفة القليلة للارتباط ، تشفر من قبل جين *mec A gene* المحمول على الكروموسوم ، وهي الالية المسؤولة عن المقاومة العالية المستوى لأغلب مضادات البيتا لاكتام في المكورات العنقودية (Berger-Bachi,1994) ، وقد يؤدي حدوث طفرة وراثية إلى فقدان بعض بروتينات القنوات Porins (تغيير في العدد أو التنسيق والترتيب) التي يتم عن طريقها انتقال المواد من وإلى الخلية البكتيرية (Nikaido, 1985) ، مما يؤدي الى حصول تغيير في الثقوب

الموجـــودة فـــي الغشـــاء الخـــارجي وبالتـــالى تصـــبح البكتريـــا مقاومـــة للمضـــادات (Mallea *et al.*, 1998).

لقد بينت العديد من الدراسات أن المقاومة الكروموسومية لمضادات البيتالاكتام تنتج عن قابلية معظم أنواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام على إنتاج نوعين من إنزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية (Sanders *et al.*, 1988) ، يعرف النوع الأول بالإنزيمات الكروموسومية منتظمة التكوين Constitutive Enzymes والذي ينتج بصورة مستمرة من قبل الخلية البكتيرية دون الحاجة إلى تحفيز المادة الأساس (متمثلة بمضادات البيتالاكتام) ، وتتراوح الكمية المنتجة من قليلة إلى عالية جداً (Franklin and Snow, 2005) ، بينما يعرف النوع الثاني بالإنزيمات الكروموسومية المحفزة Inducible ، وينتج هذا النوع عند وجود المادة المحفزة فقط ، وتصبح الكمية المنتجة قليلة جداً عند وجود كمية قليلة او ضئيلة من المضاد (Sanders, 1992) . تشفر الأنزيمات المحفزة من قبل جينات تركيبية Structural genes مسيطر عليها من جينات أخرى هي جينات السيطرة لذا فأن حدوث طفرة وراثية في الجينات السيطرة او تثبيط الكابح يؤدي إلى زيادة في استنساخ الجينات التركيبية وبالتالي ازدياد إنتاج الأنزيمات (Sanders *et al.*, 1993) . وتتراوح نسب حدوث الطفرات التلقائية بمعدل خلية واحدة لكل (10^6-10^7) خلية وتزداد خطورة هذه الخلايا الطافرة عندما يتحول إنتاجها الإنزيمي من النوع المحفز إلى النوع منتظم التكوين (Sanders , 1992) . وبذلك تؤدي هذه الطفرات إلى حدوث مقاومة كروموسومية والتي تعد من أنواع المقاومة الخطرة لأنها تنقل صفة المقاومة للمضادات الحيوية من الخلايا البكتيرية الأبوية إلى الأجيال اللاحقة (الميسري، 2002) .

2.2.3.2- **المقاومة البلازميدية** Plasmidial Resistance

البلازميدات عوامل وراثية خارج الكروموسوم متكونة من دنا (DNA) دائري ثنائي الخيط لها القابلية على التضاعف والتوارث بشكل مستقل عن دنا الكروموسوم وتكون نسبها 1–1 % من محتوى الكروموسوم وتتراوح أحجامها الجزيئية بين (1–200) كيلو قاعدة (Prescott, 2002) . وعلى الرغم من التشابه بين الكروموسوم والبلازميد في كونه حلزوناً مزدوجاً إلاّ أنه يوجد داخل الخلايا بشكل مختلف عن الكروموسوم حيث يمكن أن تكون ملتفة على نفسها مكونة جزيئة عالية الالتفاف Super coiled molecule أحياناً وتبقى جزيئة البلازميد على هذا الشكل ما دام كلا خيطي الحلزون سليمين دون كسر ويطلق على هذه الجزيئات العالية الالتفاف اسم الجزيئات الدائرية المغلقة التساهمية Covalently Closed Circular Molecules (CCCM) ، وفي حالة تعرض أي من خيطي الحلزون للقطع تفقد

الجزيئة خاصية الالتفاف العالي وتبدأ بالتراخي مكونة جزيئة دائرية مفتوحة (OCM) Open Circular Molecule . أما في حالة قطع كلا خيطي الحلزون في المكان نفسه فينتج جزيئة خطية (LM) Linear Molecule (Glazer and Nikaido, 2007). وعلى الرغم من كونها مواداً وراثية غير ضرورية لنمو وتكاثر الخلايا إلا أنها قادرة على تزويد الخلايا بصفات إضافية في ظروف معينة لاحتوائها على مورثات خاصة بها مثل مورثات الامراضية Pathogenicity ومورثات مقاومة المضادات الحيوي Antibiotic resistance (R-plasmid) (Prescott, 2002)، وتخليق السموم البكتيرية Toxin Synthesis ، وإنتاج الهيمولايسين Haemolycin Production والبكتريوسين Bacteriocin ، إنتاج المضادات الحيوية مثل Streptomycin ويمكن أن تحمل البلازميدات جينات تثبيت النيتروجين في التربة (Snyder and Champense, 1997).

قسمت البلازميدات إلى مجموعتين هما البلازميدات الاقترانية Conjugative plasmids والبلازميدات اللاقترانية Non-conjugative plasmids ، تمتاز البلازميدات الاقترانية بقابليتها على الانتقال إلى سلالات أو أنواع بكتيرية مختلفة لذا تدعى أيضاً بالبلازميدات المنتقلة ذاتياً Transferable plasmids حيث تحمل مثل هذه البلازميدات جينات خاصة مسؤولة عن عملية الانتقال تدعى جينات النقل *tra genes* (Grinsted and Bennett, 1986). أما البلازميدات غير الاقترانية فتمتاز بعدم قدرتها على الانتقال إلاّ بمساعدة البلازميدات الاقترانية وهي الأخرى تكون حاملة لجينات المقاومة للمضادات الحيوية (Prescott, 2002) . كما صنفت البلازميدات وفقاً للمعلومات الوراثية التي تشفر إليها الجينات المحمولة عليها إلى بلازميدات المقاومة ، بلازميدات الضراوة Virulence Plasmids و البلازميدات الأيضية Metabolic plasmids (Brooks *et al.*, 2001).

تعد بلازميدات المقاومة من أهم أنواع البلازميدات وتدعى أيضاً R-Factor ، والتي تحمل الجينات المسؤولة أما عن بناء إنزيمات محطمة للمضادات الحيوية أو التي تعمل على تغيير تركيب الغشاء الخلوي مما يؤدي إلى منع المضاد الحيوي من الدخول إلى داخل الخلية البكتيرية والوصول إلى الموقع الهدف أو أنها تحمل الجينات التي تعمل على تحوير الموقع الهدف مما يؤدي إلى المقاومة للمضادات الحيوية (Old and Primrose, 1994) ، إذ أشارت العديد من الدراسات إلى أن البلازميدات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضادات الحيوية الامينوكلايكوسيدية تحمل الجينات المشفرة لبناء إنزيمات إضافة مجاميع adenyl، phosphoryl , و acetyl مما يؤدي إلى تثبيط عمل بناء هذه المضادات (Dinah and Christine, 2000).

تقع إنتاجية اغلب أنزيمات البيتالاكتاميز تحت سيطرة البلازميدات التي معظمها تكون بلازميدات اقترانية(Prescott, 2002) ، اذ يحمل البلازميد الذي يحدد صفة المقاومة لمضادات البنسلين والسيفالوسبورين الجينات المسؤولة عن بناء أنزيمات البيتالاكتاميز و تعتبر البلازميدات الحاملة لجينات المقاومة للامبسلين من أهم البلازميدات المنتشرة بين أفراد العائلة المعوية وتعرف هذه البلازميدات ببلازميدات R-TEM-1 (Moellering, 1993) ، وتُحمل الجينات المشفرة لإنتاج البروتينات ذات الألفة القليلة للأرتباط بالبنسلين PBP_2a والمسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمثيسلين Methicillin في بكتريا *Staph. aureus* على البلازميدات ، تمتلك هذه الجينات عوامل إدخال هي IS257,IS431 والتي غالباً ما تكون مماثلة تقريباً إلى عوامل الإدخال الموجودة في *mec A gene* المحمولة على الكروموسوم البكتيري (Rouch and Skurray , 1989) . ويمكن ان تحمل البلازميدات الجينات المشفرة لعوامل الضراوة التي تحتاجها تلك البكتريا ، وتدعى مثل هذه البلازميدات ببلازميدات الضراوة Virulence Plasmids، فمثلاً تحمل بكتريا *E.coli* المسؤولة عن إحداث مرض الإسهال في الإنسان بلازميدات كبيرة الحجم تحمل الجينات المسؤولة عن نوعين من السموم ، وهذه البلازميدات قد تحمل الجينات المسؤولة عن التشفير لجزيئات الالتصاق Adhesion molecules وهي الجزيئات السطحية الضرورية لإحداث عملية الاستعمار للأغشية المخاطية (Perry and Staley, 1997 ; Walter *et al.*, 1979). كما تحمل بلازميدات الضراوة الجينات المشفرة إلى كلا من عوامل التحليل Haemolytic factor وهي البروتينات المحطمة للعديد من أغشية الخلايا بضمنها خلايا كريات الدم الحمراء (Perry and Staley, 1997).

هنالك مجموعة أخرى من بلازميدات الضراوة لها القابلية على البناء المباشر للبروتينات الحاملة لصفة السمية لأنواع أخرى من البكتريا وعادة ما تسمى هذه البلازميدات بأسماء البروتينات السمّية التي تشفر لإنتاجها ، فمثلاً تدعى البروتينات القاتلة لأنواع أخرى من البكتريا بالبكتيريوسين Bacteriocin أما البلازميد المشفر عنها فيدعى Bacteriocinogenic plasmid (Brooks *et al.*, 2001) . وتحمي البكتريا الحاملة للبلازميدات المسؤولة عن بناء البروتينات السمية نفسها من التأثيرات السمية لهذه البروتينات بالتعبير عن محددات مناعية يتم التشفير لها بواسطة جينات محمولة على نفس تلك البلازميدات (Gillespie and Hawkey, 2006).

هناك وظائف أيضية متخصصة يمكن التشفير عنها بوساطة بلازميدات تدعى بالبلازميدات الأيضية Metabolic Plasmids ، فمثلاً تمتلك بكتريا *P.aeruginosa* بلازميدات كبيرة الحجم تحمل الجينات المشفرة للمسارات الهدمية للمركبات الاليفاتية والاروماتية مثل التولوين والنيفثالين والاوكتان والديكان (Li and Poole, 1999) تعمل مثل هذه

البلازميدات على التشفير إلى بناء أنزيمات لها القابلية على تحليل النيفثالين وتحويله إلى بايروفين واستيل الديهايد ، لذا فان مثل هذه البلازميدات المحللة تسمح للبكتريا باستخدام المركبات العضوية غير المألوفة كمصدر وحيد للكاربون والطاقة (Perry and Staley, 1997) .ولكون العديد من الملوثات البيئية عبارة عن جزيئات عضوية معقدة التركيب لذلك فان البكتريا الحاملة للبلازميدات المحللة هي من أول المرشحات للاستخدام في عمليات المعالجة الحيوية Bioremediation (Gould, 1997).

ان استخدام المضادات الحيوية بشكل واسع يؤدي الى انتشار البلازميدات في العزلات السريرية وظهور المقاومة لهذه المضادات (Rice *et al.*, 2000) ، إذ تكون هذه المقاومة اخطر من المقاومة التي تظهر عن طريق الكروموسوم وذلك لإمكانية انتقالها من جنس إلى آخر عن طريق احد آليات انتقال البلازميدات كالاقتران Conjugation أو التحول الوراثي Transformation أو التوصيل الوراثي Transduction (Mims *et al.*, 2004) .

3.2.3.2- **المقاومة التي تتوسطها العوامل القافزة** Transposons Mediated Resistance

تعرف الجينات القافزة بأنها عبارة عن قطع من الـ DNA لها القابلية على الانتقال من مكانٍ إلى آخر ضمن الكروموسوم الواحد أو من البلازميد إلى الكروموسوم وبالعكس لاحتوائها على الجين الضروري لعملية نقلها أو المعروف بالجين المشفر لانزيم الحركة transposase gene ، وتعرف هذه العملية بالقفز Transposition وتسمى العناصر المتنقلة بالعناصر القافزة Transposable elements (Livermore,1995).

تتألف هذه العوامل من ثلاث جينات يرتبط بها على كل جانب تسلسلات DNA قصيرة والتي هي عبارة عن سلسلة من قواعد الإدخال تتوسط التفاعل بين العوامل القافزة وقطع الـ DNA الكبيرة (Hall and collis , 1995) . تشفر الجينات الثلاثية أنزيم Transposase والذي يحفز استئصال وإعادة تكوين العوامل القافزة ، والى الكوابح التي تنظم عملية بناء أنزيم Transposase ، كما أنها تشفر إلى جينات المقاومة للمضادات الحيوية (Brooks *et al.*, 2001).

اذ اشار Jacoby (1113) بأن العوامل القافزة تحتوي على جينات المقاومة للعديد من المضادات الحيوية مثل الأمبيسيلين ، التتراسايكلين و الكانامايسين وان اكثر هذه الجينات انشاراً هي تلك التي تعود الى العائلة Tn_3 المشفرة لأنزيمي TEM-1 و TEM-2 . كما بين Lyon وجماعته (1113) بأن الجينات المشفرة لمقاومة المضادات الامينوكلايكوسيدية محمولة على العوامل القافزة العائدة للعائلة Tn4001 وهي شائعة الانتشار بين عزلات بكتيريا

Staph. aureus ، وأوضح Hujer وجماعته (2001) بأن الإنزيمات المحللة للبنسلينات Pencillinases والمحللة للسيفالوسبورينات Cephalosporinases يكون الجين المسؤول عن إنتاجها محمول على جينات قافزة ، أما Venezia وجماعته (1111) فقد بين إن ظهور الجينات المشفرة لأنزيمات البيتالاكتاميز على البلازميدات وأحيانا على الكروموسوم البكتيري ربما يفسر أن هذه الجينات تكون محمولة على عوامل قافزة.

لا تستطيع الجينات القافزة Transposons من مضاعفة نفسها بمفردها ولابد من انغراسها في البلازميد او الكروموسوم لكي تتمكن من ذلك (Glazer and Nikaido, 2007) ، ويؤدي انغراسها في مواقعها الجديدة إلى ظهور صفات على حساب اختفاء أخرى إذ أن انغراز الجين القافز Tnc الحامل لصفة المقاومة للستربتومايسين والترايميثوبرايم في البلازميد RP_4 المشفر لمقاومة الامبسلين والتتراسايكلين والكانامايسين يؤدي إلى اختفاء المقاومة للمضادين التتراسايكلين والكانامايسين ،إضافة إلى تعطيل قابلية الانتقال الذاتي في البلازميد المذكور وبالمقابل ظهور صفة المقاومة للسترتبومايسين والترايمثيوبرايم عليه (Brath *et al.*,1978).

1.2- **آليات انتقال جينات المقاومة** The mechanism of Gene Resistance Transfer

1.8.2- **الأقتران البكتيري** Bacterial Conjugation

تعد طريقة الاقتران البكتيري الطريقة الأكثر شيوعاً لانتقال المعلومات الوراثية وبصورة سريعة في المجموعة البكتيرية (Dionisio *et al.*, 2002)، واكتشفت هذه الظاهرة من قبل Edward Tatum and Joshua Lederberg عام 1131 ، اللذين وصفا انتقال المورثات بين الخلايا الجرثومية المختلفة جنسياً (Prescott, 2002) ، وقد اكد Bernard Davis عام 1110 على ضرورة الاتصال المباشر بين الخليتين المقترنتين ، إذ اطلق العالم William Hayes عام 1112 على احدهما بالخلايا الانثوية F^- والاخرى الخلايا الذكرية F^+ وذلك اعتماداً على وجود بلازميد الخصوبة او عامل F (F-factor) الذي يشفر لانتاج Sex pili وهذا يعني ضرورة وجود البلازميد ليحدث الاقتران الجرثومي (Prescott, 2002) .

تتم السيطرة على عملية الاقتران عن طريق مجموعة من المورثات التي تدعى بالمورثات الناقلة Transfer (*tra*) genes والواقعة على البلازميدات الاقترانية فقط، تشفر هذه المورثات إلى تكوين الشعيرات الجنسية Sex pilli على جدار الخلية عند حصول الاقتران بين خلية F^+ واخرى F^- ويرتبطان بواسطة جسر الاقتران Conjugation bridge (Ferguson *et al.*, 2002 ; Hurlbert, 1999) ، أو أنبوب الإخصاب Pilus ، ينتقل عبره أحد أشرطة الحامض النووي DNA المزدوج البلازميدي إلى الخلية F^- بواسطة بروتين

Mobilization (Mob) ، وعند موقع متخصص(Origin of Transfer (OriT واقع بجانب جينات genes *tra* ، بعدها يتضاعف الشريطان في كل من الخليتين وبذلك تتحول الخلية F^- إلى خلية F^+ ذات بلازميد اقتراني (الشكل A–3–2) (Prescott, 2002) ، وعلى الرغم من القدرة التضاعفية الذاتية Autonomous للبلازميد الاقتراني إلا انه يلتحم مع الكروموسوم البكتيري من وقت إلى آخر وترجع قابليته هذه لاحتواءه على ترددات تدعى بالعناصر الانتقالية Transposable elements (Tn) أو عناصر الاندماج Insersion (Is) elements (الفيصل، 1111) ، وتدعى الخلايا التي حصل فيها هذا الالتحام بالخلايا الاتحادية عالية التردد High frequency recombinant cells (Hfr) ، وبهذا ينتقل جزء من الكروموسوم البكتيري اثناء عملية الأقتران الى الخلية المستلمة (الشكل B–3–2) (Prescott, 2002).

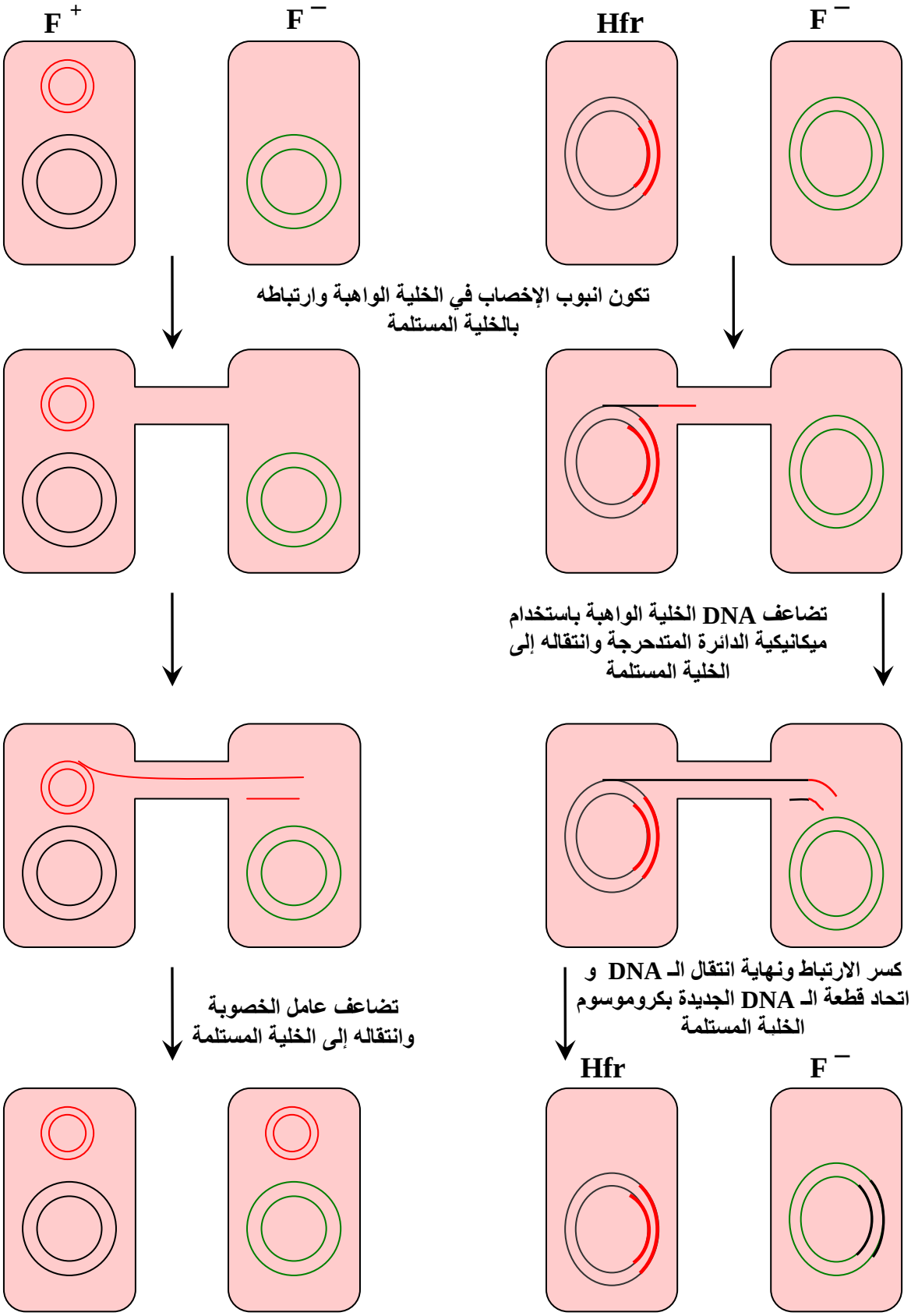
إن حقيقة كون البلازميدات قابلة للانتقال بين البكتريا بعملية الاقتران البكتيري وإنها تحمل جينات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية تفسر الانتشار السريع للسلالات البكتيرية المقاومة لمختلف المضادات وزيادة خطورة المشاكل الصحية الناجمة عن انتشارها (مفتن، 2000) . إذ لوحظَ وجود تشابه بين بلازميدات مقاومة الـ Tetracycline و Chloramphenicol المعزولة من سلالات *Staph. epidermidis* و *Staph. aureus* (Rosendorf and Kayser, 1974) .

2.8.2– التحول الوراثي Genetic Transformation

وصفت هذه الظاهرة لأول مرة عام 1121 من قبل العالم Griffith في سلالات بكتريا *Streptococcus pneumoniae* ، وفي وقتها لم تعرف ماهية المادة المسؤولة عن حدوث التحول (Prescott , 2002) ، وتوالت الدراسات في الاربعينيات من قبل Avery و MaCarty التي بينت ان DNA هو المادة الوراثية الفعالة بايولوجياً في عملية التحول واطلق عليها تسمية Transforming principle (Glazer and Nikaido, 2007) ، وتعرف هذه الظاهرة بأنها عملية نقل المعلومات الوراثية بوساطة إدخال قطعة DNA إلى داخل الخلية الحية واندماجها مع المادة الوراثية للخلية المستقبلة دون الحاجة إلى الاتصال المباشر بين الخليتين (Roberts, 2003) . ويحصل التحول على ثلاث مراحل هي الادمصاص Adsorption والاختراق Penetration ومن ثم انغراس Integration قطعة من جزيئة DNA داخل كروموسوم الخلية المستلمة بواسطة إعادة الاتحاد Recombination (Carpenter, 1977) ، تسمى الخلايا المستلمة عندئذ بالمتحولات Transformants أو بالخلايا المؤهلة Competent cells، يعتمد مدى نجاح هذه العملية على الحالة الفسيولوجية للخلايا فضلاً عن

توفر ظروف معينة للنمو والتكاثر (Talaro and Talaro, 1996) ، ومنها ظروف النمو وطور النمو إذ يصبح التحول أكبر في المراحل المتأخرة من الطور اللوغاريتمي كما يجب أن تكون البكتريا المتحولة مشتقة من النوع نفسه أو من نوع مقارب جداً للخلية التي ينتقل إليها وذلك لتشابه تسلسلات الـ DNA القريبة مع تسلسلات DNA كروموسوم الخلية المستقبلة . (Prescott, 2002)

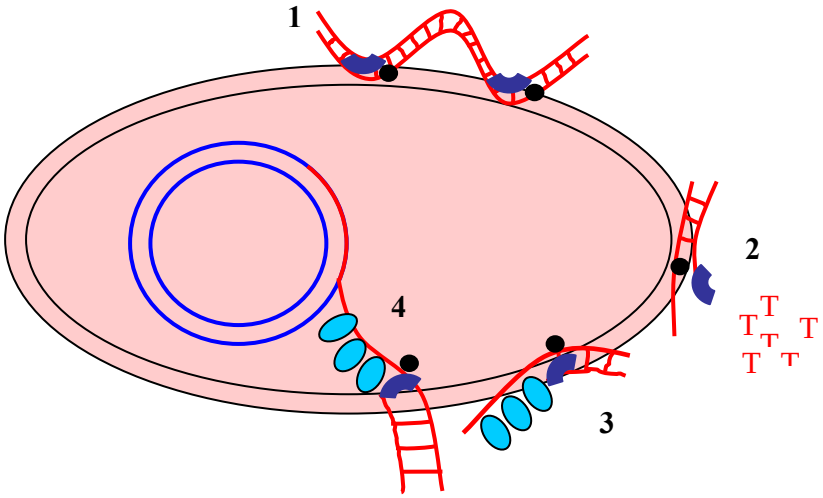
كما تعتمد هذه العملية على مدى امتلاك هذه الخلايا لبروتينات خاصة تعمل على جذب جزيئات DNA إلى سطح الخلية ومن ثم إدخالها إلى داخل هذه الخلايا من الوسط المحيط بها (Atlas, 1995) ، إذ تمتلك الخلايا المؤهلة بروتيناً معيناً يطلق عليه Competence factor والذي يسرع من دخول الـ DNA الى الخلية حيث وبمجرد دخول قطع الحامض النووي الى الخلية المؤهلة يقوم انزيم endonuclase بتقطيع الخيط المزدوج الى قطع يترواح اطوالها من (10.000–3000) نيوكليوتايد ثم يندمج خيط واحد فقط مع كروموسوم المضيف وذلك بعد انفصال قطعة مماثلة منه لتحل محلها القطعة الجديدة شكل(2–1) (Prescott, 2002) . قد تحصل هذه الظاهرة بصورة طبيعية في عدد محدود من الأنواع البكتيرية مثل *Pseudomonas* ، *Moraxella* ، *Staphylococcus* ، *Streptococcus* ، *Bacillus* ، *Neisseria* و *Haemophilus* (Black, 1993) ، بينما تحتاج أنواع بكتيرية أخرى مثل *E. coli* إلى عملية تأهيلها مختبرياً باستخدام المحلول الثلجي كلوريد الكالسيوم Ice-cold $CaCl_2$ ومن ثم تعريضها للصدمة الحرارية لجعلها قادرة على استقبال جزيئات DNA (Nicklin *et al*., 1999).



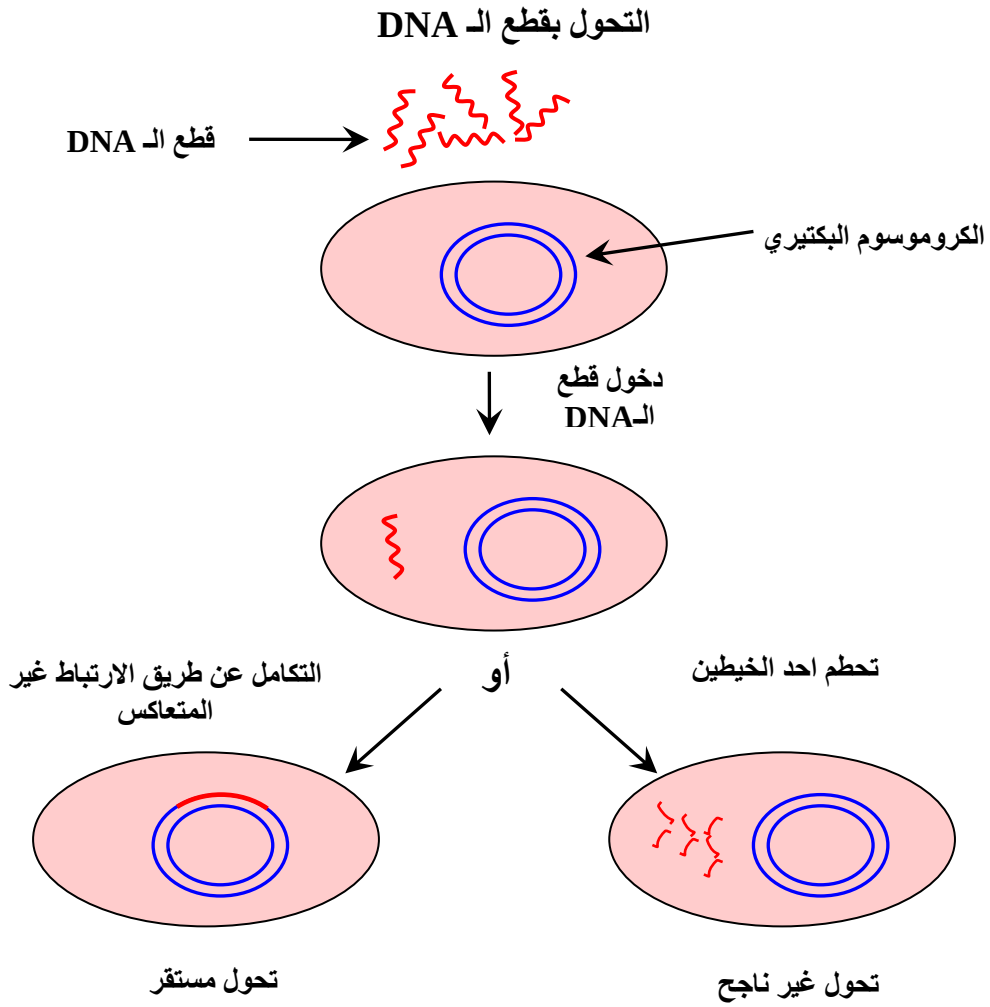
شكل (2-4) : ميكانيكية الإقتران البكتيري . (A) تزاوج بين $F^+ + F^-$ (B). تزاوج بين Hfr + F^- (Prescott, 2002)

F^+ = خلية واهبة Donor Cell ، F^- = خلية مستلمة

Hfr = خلية اتحادية عالية التردد High frequency recombinant cell



ميكانيكية التحول البكتيري (1) ارتباط شريط الـ DNA مزدوج الجديلة بالسطح الخارجي للبكتريا المؤهلة بمساعدة أنزيم DNA-binding protein (●) . (2) تحطم احد الشريطين بواسطة أنزيم nuclease (◡) . (3) ارتباط الشريط السليم مع بروتين متخصص competence-specific protein (⬭) . (4) دخول الشريط السليم إلى داخل الخلية البكتيرية وانغراسه بالمنطقة المماثلة له في الكروموسوم البكتيري للخلية المضيفة Host Cell .



شكل (2-5) : ميكانيكية التحول البكتيري (Prescott, 2002)

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

MATERIALS AND METHODS

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.3- الأجهزة والمواد

1.1.3- الأجهزة المستخدمة

ت	اسم الجهـــاز		الشركة المصنعة والمنشأ
1	مجهر ضوئي	Light microscope	Boeco (Germany)
2	مجهز القدرة الكهربائية	Power supply	Buchler (USA)
3	فرن كهربائي	Electric Oven	Elektro.mag (Turkiye)
4	حاضنة	Incubator	Elektro.mag (Turkiye)
5	صفيحة ساخنة	Hot Plate	Gallenkamp (England)
6	حاضنة هزاز	Shaking incubator	Gallenkamp (England)
7	منبذة صغيرة	Microcenrtifuge	Heraeus (Germany)
8	حمام مائي هزاز	ShakingWater bath	Julabo (Germany)
9	ميزان كهربائي حساس	Sensitive Electric balance	Kern (Germany)
10	جهاز الترحيل الكهربائي	Gel electrophoresis apparatus	LKB (Sweden)
11	مازج دوار	Vortex mixer	Lobcco (Germany)
12	مقياس الأُس الهيدروجيني	pH-meter	Martini (USA)
13	كاميرا رقمية	Digital Camera	Smartek (Italy)
14	موصدة	Autoclave	Triup (Italy)
15	جهاز طرد مركزي	Centrifuge	Triup (Italy)
16	جهاز التقطير	Distillator	Triup (Italy)
17	مصدر الأشعة فوق البنفسجية	U.V Transilluminator	UVP (USA)

2.1.3- المواد الكيميائية

ت	اسم المـادة		الشركة المصنعة
1	فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين	Disodium phosphate	Ajax (Australia)
2	فوسفات الصوديوم ثنائي الهيدروجين	Monosodium phosphate	Ajax (Australia)
3	كحول مثيلي	Methyl alcohol	Ajax (Australia)
4	زايلين	Xylene	Ajax (Australia)
5	أكار – أكار	Agar-Agar	BDH (England)
6	أوكزالات الأمونيوم أحادية الهيدروجين	Ammonium hydroxide monohydrate	BDH (England)
7	كلوريد الباريوم	Barium chloride	BDH (England)
8	حامض البورك	Boric acid	BDH (England)
9	صبغة بروموكرايسول البنفسجي	Bromo Cresol Purple	BDH (England)
10	صبغة بروموثايمول الأزرق	Bromothymol Blue	BDH (England)
11	كلوريد الكالسيوم	$CaCl_2$	BDH (England)
12	فوسفات البوتاسيوم أحادي الهيدروجين	Dipotassium phosphate	BDH (England)
13	Disodium ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA-Na_2)		BDH (England)
14	اسكولين	Esculin	BDH (England)
15	كحول أثيلي	Ethyl alcohol	BDH (England)
16	سترات الحديد	Ferric citrate	BDH (England)
17	كالكتوز	Galactose	BDH (England)
18	كلوكوز	Glucose	BDH (England)
19	كليسرول	Glycerol	BDH (England)
20	كلوريد الزئبق	$HgCl_2$	BDH (England)
21	حامض الهيدروكلوريك المركز	Hydrochloric acid	BDH (England)
22	بلورات الأيودين	Iodine crystals	BDH (England)
23	كحول أيزواميلي	Isoamyle alcohol	BDH (England)
24	كحول أيزوبروبيلي	Isopropyl alcohol	BDH (England)
25	لاكتوز	Lactose	BDH (England)
26	مالتوز	Maltose	BDH (England)
27	صبغة أحمر المثيل	Methyl red	BDH (England)
28	كلوريد المغنيسيوم	$MgCl_2$	BDH (England)
29	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	Monopotassium phosphate	BDH (England)
30	نكروسين	Nigrosine	BDH (England)
31	Para-dimethyl amino benzaldehyde		BDH (England)
32	أحمر الفينول	Phenol red	BDH (England)

ت	اسم المـادة		الشركة المصنعة
33	كلوريد البوتاسيوم	Potassium chloride	BDH (England)
34	خلات الصوديوم	Sodium acetate (CH_3COONa)	BDH (England)
35	كلوريد الصوديوم	Sodium chloride	BDH (England)
36	هيدروكسيد الصوديوم	Sodium hydroxide	BDH (England)
37	كلوريد البوتاسيوم	Potassium chloride	BDH (England)
38	كلوريد المغنيسيوم	$MgCl_2$	BDH (England)
39	كلوريد الكالسيوم	$CaCl_2$	BDH (England)
40	تراكوليت الصوديوم	Sodium taurcholate	BDH (England)
41	نشا	Starch	BDH (England)
42	سكروز	Sucrose	BDH (England)
43	Tetra methyl-P-phenylene diamine dihydro chloride		BDH (England)
44	ترس حامضي	Tris-HCl	BDH (England)
45	اليوريا	Urea	BDH (England)
46	زايلوز	Xylose	BDH (England)
47	ألفا – نفثول	α -naphthol	BDH (England)
48	أكاروز	Agarose	Fluka (Switzerland)
49	بلورات البنفسجي	Crystal violate	Fluka (Switzerland)
50	مستخلص الخميرة	Yeast extract	Fluka (Switzerland)
51	ترس قاعدي	Tris-base	Merck (Germany)
52	أقراص الباستراسين	Bacitracin	Oxoid (England)
53	داي مثيل سلفو أوكسيد	Dimethyl sulphoxide	Oxoid (England)
54	اقراص النوفوبايوسين	Novobiocin	Oxoid (England)
55	أقراص الابتوجين	Optochin	Oxoid (England)
56	بيبتون	Peptone	Oxoid (England)
57	يوديد البوتاسيوم	Potassium iodide (KI)	Oxoid (England)
58	تربتون	Tryptone	Oxoid (England)
59	صبغة بروميد الأثيديوم	Ethidium bromide	Sigma (USA)
60	بيروكسيد الهيدروجين	Hydrogen peroxide H_2O_2	Thomas Baker (India)
61	ترايتون أكس 100	Triton X-100	Thomas Baker (India)

3.1.3- الأوساط الزرعية

ت	اسم الوسط	الشركة المصنعة	الغرض من الاستخدام
1	وسط أكار الماكونكي MaConky agar medium	Difco (USA)	تنمية البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز
2	وسط ماء الببتون Peptone water broth	Himedia (India)	فحص الاندول
3	قاعدة الدم الأساس Blood agar base medium	Himedia (India)	تنمية البكتريا لغرض التشخيص
4	وسط اكار كليكلر الحديد Kligler Iron Agar Medium	Himedia (India)	فحص التحري عن غاز H_2S وتخمر السكريات
5	أكار مولر هنتون Muller Hinton agar	Himedia (India)	فحص الحساسية للمضادات الحيوية
6	وسط المرق المغذي Nutrient broth medium	Mast (England)	حفظ العزلات وإدامتها
7	وسط الأكار المغذي Nutrient agar medium	Mast (England)	تنمية البكتريا لغرض التشخيص
8	وسط سترات سايمون Simmon citrate medium	Mast (England)	فحص استهلاك السترات
9	وسط اكار المانيتول الملحي Mannitol Salt Agar	Mast (England)	تمييز المكورات العنقودية المخمرة وغير المخمرة للمانيتول
10	قاعدة اليوريا Urea agar base medium	Oxoid (England)	للتحري عن إنتاج أنزيم اليوريز
11	وسط أكار نقيع القلب والدماغ Brain heart infusion agar	Oxoid (England)	تنمية البكتريا لغرض دراسة بعض خواصها
12	مرق نقيع القلب والدماغ Brain Heart infusion broth	Oxoid (England)	تنمية البكتريا لغرض دراسة بعض خواصها

4.1.3 - المضادات الحيوية المستخدمة في فحص الحساسية و تراكيزها والشركة المجهزة والمنشأ

ت	اسم المضاد	الرمز	تركيز المضاد في القرص	الشركة المجهزة
1	Penicillin G	P	10 Units	Bioanalyse (Turkey)
2	Oxacillin	OX	1µg	Bioanalyse (Turkey)
3	Ampicillin	AM	10 µg	Bioanalyse (Turkey)
4	Cephalothin	KF	30 µg	Bioanalyse (Turkey)

ت	اسم المضاد	الرمز	تركيز المضاد في القرص	الشركة المجهزة
5	Cefotaxime	CTX	30 µg	Bioanalyse (Turkey)
6	Amikacin	AK	30 µg	Bioanalyse (Turkey)
7	Streptomycin	S	10 µg	Bioanalyse (Turkey)
8	Tobramycin	TOB	10 µg	Bioanalyse (Turkey)
9	Ciprofloxacin	CIP	5 µg	Bioanalyse (Turkey)
10	CO-Trimoxazole	CO	25 µg	Bioanalyse (Turkey)
11	Tetracycline	TE	30 µg	Bioanalyse (Turkey)
12	Chloramphenicol	C	30 µg	Bioanalyse (Turkey)
13	Rifampicin	R	5 µg	Oxoid (England)
14	Erythromycin	E	15 µg	Oxoid (England)
15	Clindamycin	CM	2 µg	Oxoid (England)

5.1.3 - المضادات الحيوية المستخدمة في فحص التركيز المثبط الأدنى والشركة المجهزة والمنشأ

ت	اسم المضاد	الشركة المجهزة
1	Ampicillin	Acai (Iraq)
2	Chloramphenicol	Acai (Iraq)
3	Ciprofloxacin	Acai (Iraq)
4	Erythromycin	Acai (Iraq)
5	Tetracycline	Acai (Iraq)
6	Amikacin	Eipico (Egypt)
7	Cefataxime	Panpharma (France)
8	Cephatothin	Panpharma (France)

6.1.3- **السلالة القياسية** Standard Strain

ت	اسم السلالة	التركيب الوراثي	المصدر
1	***E. coli*** MM294	end Al. Hsd R^-. Hsd H^+. Lac^+. thi $^-$. Rif^+	معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا– جامعة بغداد

الرموز

ت	الرموز	الدلالــة
1	Rif^+	وجود صفة المقاومة لمضاد الريفامبسين
2	end Al	خالية من إنزيمات الدناز الداخلية Endonucleases
3	Lac^+	القدرة على تخمير سكر اللاكتوز
4	thi^-	عدم الحاجة إلى الثايمين
5	Hsd R^-	خالية من أنظمة التقييد Restriction negative
6	Hsd M^+	وجود أنظمة التحوير

7.1.3- **الإنزيم** Enzyme

ت	الإنزيـم		الشركة المصنعة
1	اللايسوستافين	Lysostaphin enzyme	Boehringer Mannheim (Germany)

8.1.3- **مواد متفرقة**

ت	المـادة	المصدر المجهز
1	عدة api 20 E packs لتشخيص البكتريا المعوية وقسم من العصيات السالبة لصبغة غرام مع الكواشف الخاصة بها	Biomerieux (France)
2	عدة api Staph لتشخيص أنواع جنس المكورات العنقودية	Biomerieux (France)
3	بلازما دم الأرنب	BDH (England)
4	دم بشري	مصرف الدم في الديوانية

2.3- **طرائق العمل** Work methods

1.2.3- **طرائق التعقيم**

- التعقيم بالحرارة الجافة

عقمت جميع الزجاجيات والأدوات التي تحتاج إلى التعقيم الجاف بالفرن الكهربائي Oven في درجة حرارة 180ْم لمدة ساعتين .

- التعقيم بالحرارة الرطبة

عقمت الأوساط الزرعية المستخدمة في هذه الدراسة بجهاز الموصدة Autoclave عند درجة حرارة 121ْم وتحت ضغط 1 جو ولمدة 15 دقيقة .

- التعقيم بالترشيح

تم تعقيم المواد والمحاليل التي تتأثر بالحرارة باستعمال مرشحات دقيقة Millipore Filters بقطر 0.22 مايكرومتر (Benson, 2002).

2.2.3 – **تحضير المحاليل والكواشف والصبغات**

حضرت مجموعة من المحاليل والكواشف والصبغات المختلفة في هذه الدراسة وعلى النحو التالي :-

1.2.2.3 – **المحاليل والدواريء** Solutions and Buffers

1.1.2.2.3- **المحلول الملحي الفسلجي** Normal Saline

حضر هذا المحلول حسب ما أورده Benson (2002) ، وذلك بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 90 ملليلتر ماء مقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 ملليلتر . عقم بالموصدة ، وحفظ بدرجة حرارة 4°م لحين الاستعمال .

2.1.2.2.3- **محلول ثابت العكرة القياسي** Macfarland Standard

حضر هذا المحلول بالاعتماد على ما جاء به Benson (2002) وكما يلي :-

* **محلول A** : حضر بإذابة 1.175 غم من كلوريد الباريوم في 90 ملليلتر من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم إلى 100 ملليلتر .

* **محلول B** : أضيف 1 ملليلتر من حامض الكبريتيك المركز إلى 90 ملليلتر من الماء المقطر المعقم وأكمل الحجم إلى 100 ملليلتر .

أضيف 0.5 ملليلتر من محلول (A) إلى 99.5 ملليلتر محلول (B) ، للحصول على عدد تقريبي للخلايا البكتيرية بمقدار 15×10^{8} خلية/ملليلتر ، وحفظ المحلول في قنينة زجاجية معقمة ذات غطاء محكم لمنع التبخر في درجة حرارة الغرفة وفي الظلام .

3.1.2.2.3- **دارئ الفوسفات الملحي** Phosphate Buffer Saline (PBS)

حُضر هذا الدارئ على وفق ما أورده Sambrook وجماعته (1989)، وذلك بإذابة 0.144 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين KH_2PO_4 و 0.79 غم من فوسفات الصوديوم أُحادي الهيدروجين Na_2HPO_4 و 9 غم من كلوريد الصوديوم NaCl في 800 ملليلتر من الماء المقطر وعدل الأُس الهيدروجيني إلى 7.4 وأُكمل الحجم إلى اللتر وعقم بالموصدة.

4.1.2.2.3- **محاليل المضادات الحيوية** Antibiotic Solutions

حُضرت محاليل المضادات الحيوية على وفق ما جاء به Maniatis وجماعته (1982) وعلى النحو الآتي:

A- **محلول المضادين** Tetracycline **و** Chloramphincol

حضر المحلول الخزين بتركيز 10 ملغم / ملليلتر لكل من المضادين ، بإذابة 250 ملغم من مسحوق المضاد في 20 ملليلتر من الكحول الأثيلي تركيزه 99% ثم أكمل الحجم إلى 25 ملليلتر.

B – محلول مضاد Amikacin

حضر المحلول الخزين ، بمزج 2 ملليلتر من محلول المضاد تركيزه الأصلي (100 ملغم / 2 ملليلتر) في 8 ملليلتر ماء مقطر للحصول على التركيز النهائي 10 ملغم/ملليلتر .

C- حضرت محاليل خزينة Stock Solutions بتركيز نهائي مقداره 10ملغم/ملليلتر لكل من المضادات الآتية:-

PencillinG , Ampicillin , Cephalothin , Cefotaxime , Ciprofloxacin , Erythromycin ، بإذابة 250 ملغم من مسحوق المضاد في 20 ملليلتر من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 25 ملليلتر. وعُقمت هذه المحاليل بالترشيح بواسطة مرشحات دقيقة Millipore filter ذات ثقوب قطرها 0.22 مايكرومتر ، حفظت في درجة 4°م ، تكون هذا المحاليل صالحة للاستعمال لمدة أُسبوع من تأريخ تحضيرها.

5.1.2.2.3 - **محاليل الكشف عن أنزيمات البيتالاكتاميز**

حُضرت المحاليل التالية على وفق ما جاء في WHO (1978) وكما ياي :-

- محلول بنسلين G Penicillin **G** Solution

حضر أولاً دارئ الفوسفات المتكون من محلولين هما:

* **محلول A** : أُذيب 0.907 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين KH_2PO_4 في 90 ملليلتر ماء مقطر ، وأكمل الحجم إلى 100 ملليلتر.

* **محلـول B** : أُذيـب 0.946 غـم مـن فوسـفات الصـوديوم أُحـادي الهيـدروجين Na_2HPO_4 و 1.19 غم من فوسفات الصوديوم ثنائي الهيدروجين المائية $NaH_2PO_4.2H_2O$ في 90 ملليلتر ماء مقطر ، وأُكمل الحجم إلى 100 ملليلتر.

مُـزج 87.6 ملليلتـر مـن محلـول A و 12.3 ملليلتـر مـن محلـول B وضـبط الأس الهيدروجيني إلى 6 . أُضيفَ 0.693 غم من البنسلين G في دارئ الفوسفات المحضر أعلاه. عُقم بالترشيح وحفظ بدرجة حرارة 20− ْم.

– محلول النـشا Starch solution

حضر آنياً بأذابة 1 غم من مادة النشا في 90 ملليلتر من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 100 ملليلتر ، وضعت القنينة في حمام مائي بدرجة حرارة 100 ْم لمدة 10 دقائق لإتمام إذابة النشا . حفظ المحلول في درجة 4 ْم . يكون هذا المحلول صالحا للاستعمال لمدة أُسبوع من تأريخ تحضيره.

– محلول اليود Iodine solution

حضر بإذابة 2.03 غم من اليود و 5.32 غم من يوديد البوتاسيوم في 90 ملليلتر ماء مقطر ، ثم أُكمل الحجم إلى 100 ملليلتر . حفظ المحلول في درجة حرارة 4 ْم.

6.1.2.2.3- **محاليل عزل الدنا البلازميدي**

حُضرت المحاليل التالية حسب ما أورده Sambrook وجماعته (1989) وكما يلي :

A– دارئ STE (Sucrose-Tris base-EDTA**)**

حُضر من 8% كلوريد الصوديوم ، 50 ملي مولار من مادة EDTA ، 10 ملي مولار من مادة Tris-base . ضُبط الأُس الهيدروجيني إلى 8 . عُقم بالموصدة وحفظ بدرجة حرارة 4 ْم لحين الاستعمال.

B– دارئ STET (Sucrose-Tris base-EDTA-Triton x-100**)**

حُضر بإضافة 0.5% من مادة (Triton x-100) إلى دارئ STE المحضر أعلاه وعقم بالموصدة وحفظ بدرجة حرارة 4 ْم لحين الاستعمال.

C– محلول إنـزيم اللايسوستافين Lysostaphin

حُضر آنياً عند الاستعمال بتركيز نهائي 10 ملغم/ملليلتر بإذابة 10 ملغم من الإنزيم في 1 ملليلتر من داريء STE المحضر أعلاه .

D– محلول خلات الصوديوم 2.5 **مولاري**

حُضر بإذابة 22.31 غم من خلات الصوديوم في 50 ملليلتر من الماء المقطر وأُكمل الحجم إلى 100 ملليلتر وضبط الأُس الهيدروجيني إلى 4.8 .

E- دارئ TE (Tris base-EDTA**)**

حُضر من 10 ملي مولار من مادة Tris-HCl و 1 ملي مولار من EDTA . ضُبط الأُس الهيدروجيني إلى 8 . عُقم بالموصدة وحُفظ بدرجة حرارة 4ْ م لحين الاستعمال.

7.1.2.2.3- محاليل الترحيل الكهربائي

حُضرت المحاليل التالية على وفق ما جاء به Maniatis وجماعته (1982) وكما يلي :

A- دارئ TBE (Tris base-Boric acid-EDTA**)**

حُضر من 0.089 مولار Tris-base و 0.084 مولار حامض البوريك و 0.022 مولار EDTA. ضُبط الأُس الهيدروجيني إلى 8 عُقم بالموصدة وحفظ في درجة حرارة 4ْ م لحين الاستعمال.

B- صبغة بروميد الأثيديوم

حُضر محلول خزين بتركيز 5 ملغم/ ملليلتر. خُفف بالماء المقطر عند الاستعمال للحصول على تركيز نهائي مقداره 0.5 مايكروغرام/ ملليلتر. حُفظ محلول الصبغة في الظلام بدرجة حرارة 4ْ م لحين الاستعمال.

C- دارئ التحميل Loading buffer

حُضر من 0.25% من بروموفينول الأزرق Bromophenol blue ، 0.25% زايلين و 40% سكروز. حُفظ في درجة حرارة 4ْ م لحين الاستعمال.

2.2.2.3- الكواشف Reagents

حُضرت الكواشف التالية على وفق ما جاء به Benson (2002) واستخدمت لغرض تشخيص البكتريا وكما يلي :

1.2.2.2.3- كاشف الأوكسديز Oxidase Reagent

حُضر بإذابة 1 غم من مادة dimethyl-P-phenylene diamine dihydro chloride في 90 ملليلتر من الماء المقطر المعقم ثم أُكمل الحجم إلى 100 ملليلتر. يُحضر آنياً عند الاستعمال.

2.2.2.2.3- كاشف إنزيم الكاتليز Catalase Reagent

حُضر بتركيز 3% من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 واستعمل في الكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم الكاتليز.

3.2.2.2.3– **كاشف كوفاكس** Kovac`s Reagent

حُضر بإذابة 5 غم من Para-dimethylamine - benzaldehyde في 75 ملليلتر كحول إيزوبروبيلي باستخدام حمام مائي ثم أُكمل الحجم إلى 100 ملليلتر بحامض HCl المركز ببطيء ليصبح لون الكاشف أصفر شاحب. حُفظَ في قنينة معتمة في الثلاجة ، واستخدم في اختبار الأندول.

4.2.2.2.3– **كاشف فوكس بروسكاور** Voges-Proskauer reagent

حُضر على وفق ما أورده Collee وجماعته(1996) ، وتضمن تحضير محلولين هما:

* **محلول A** : أُذيبَ 5 غم من مادة ألفا– نفثول في 90 ملليلتر كحول أثيلي 99% ثم أُكمل الحجم بالكحول إلى 100 ملليلتر.

* **محلول B** : أُذيبَ 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 90 ملليلتر ماء مقطر ثم أُكملَ الحجم إلى 100 ملليلتر بإضافة الماء المقطر.

5.2.2.2.3– **كاشف أحمر المثيل** Methyl Red Reagent

حُضر بإذابة 0.1 غم من المثيل الأحمر في 250 ملليلتر من الكحول الأثيلي بتركيز 95% ثم أُكمل الحجم إلى 500 ملليلتر بإضافة الماء المقطر.

6.2.2.2.3– **كاشف تميع الجيلاتين** Gelatin liquefaction reagent

حُضر بالاعتماد على ما جاء به Collee وجماعته (1996) ، وذلك بإذابة 15 غم من مادة كلوريد الزئبق $HgCl_2$ في 20 ملليلتر من حامض الهيدروكلوريك المركز HCl ، ثم أُضيفَ الى المحلول 100 ملليلتر من الماء المقطر.

7.2.2.2.3– **محلول بلازما دم الأرنب**

حُضر حسب تعليمات الشركة المصنعة المثبتة على العبوة وذلك بإذابة محتوياتها في 1.5 ملليلتر من الماء المقطر المعقم وقد استخدم للكشف عن قدرة عزلات بكتريا المكورات العنقودية على إنتاج الأنزيم المختر للبلازما Coagulase .

3.2.2.3- **الصبغات**

حضرت الصبغات التالية على وفق ما جاء به Benson (2002) وكما يلي :

1.3.2.2.3– **صبغة غرام** Gram's Stain

تكونت من صبغة البلورات البنفسجية Crystal Violet ، صبغة السفرانين Safranine ، محاول اليود Gram's Iodine فضلاً عن الكحول الأثيلي المطلق ، استخدمت في الفحص المورفولوجي عن البكتريا الموجبة و السالبة للصبغة .

2.3.2.2.3– **صبغة العصيات المقاومة للقصر بالحامض** Acid Fast Stain (AFS)

استخدمت هذه الصبغة للكشف عن عصيات السل وتتكون من :

– **صبغة كاربول فوكسين** Carbolfuchsin

وتتضمن تحضير محلولين :

* **محلول A** : أُذيب 3 غم من Basic Fuchsin في 10 ملليلتر من الكحول الأثيلي بتركيز 95% .

* **محلول B** : أُذيب 5 غم من الفينول Phenol في 95 ملليلتر من الماء المقطر المعقم ، ثم مُزج محلولا **A** و **B** .

– **كحول محمض** Acid-Alcohol

حُضر بأضافة 3 ملليلتر من حامض الهيدروكلوريك hydrochloric acid الى 70 ملليلتر من من الكحول الأثيلي بتركيز 95 % ثم اكمل الحجم الى 100 ملليلتر بالكحول الأثيلي .

– **صبغة المثلين الأزرق** Methylene Blue

وتتضمن تحضير محلولين هما :

* **محلول A** : أُذيب 0.3 غم من صبغة المثلين الأزرق في 30 ملليلتر من الكحول الأثيلي بتركيز 95 % .

* **محلول B** : أُذيب 0.01 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100 ملليلتر من الماء المقطر المعقم ، ثم مُزج محلولا **A** و **B** .

3.3.2.2.3– **صبغة المحفظة** Capsule Stain

حضرت بأذابة 10 غم من صبغة النكروسين Nigrosine في 100 ملليلتر من الماء المقطر ثم غلي المزيج لمدة 30 دقيقة ورشح لمرتين ، وأُضيف له 0.5 ملليلتر فورمالديهايد Formaldehyde 40% ، حفظ عند درجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال .

3.2.3- تحضير الأوساط الزرعية

A. الأوساط الزرعية الجاهزة

حضرت الأوساط الزرعية المستخدمة في هذه الدراسة (فقرة:3.1.2) حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة وبعد أن ضبط الأُس الهيدروجيني عقمت بجهاز الموصدة Autoclave عند درجة حرارة 121ْم وتحت ضغط 1 جو ولمدة 15 دقيقة ، حُضنت الأوساط الزرعية بعد صبها في الأطباق أو الأنابيب حسب متطلبات التجربة في درجة حرارة 37ْ م لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها.

B. الأوساط الزرعية التركيبية

تم تحضير الأوساط التالية بالاعتماد على ما ورده Atlas (2004) وكما يلي :-

1.3.2.3- **وسط أكار الدم** Blood Agar Medium

حُضر أكار الدم الأساس حسب تعليمات الشركة المصنعة، عُقم بالموصدة بعدها تُرك ليبرد إلى درجة 45-50ْ م، أُضيف إليه الدم بنسبة (5%) ، مُزج جيداً وتركت الاطباق بعد تصلبها في الحاضنة إلى اليوم التالي للتأكد من خلوها من التلوث. استخدم الوسط لتنمية وعزل البكتريا وكذلك للكشف عن قدرة العزلات على إنتاج الإنزيم الحال للدم Haemolysin .

2.3.2.3- **وسط أكار الجوكليت** Chocolate Agar Medium

تم تعريض وسط أكار الدم المحضر في الفقرة أعلاه إلى حمام مائي بدرجة 70ْ مع المزج إلى أن يتحول اللون إلى البني دلالةً على تكسر كريات الدم الحمراء وانطلاق مكوناتها إلى الخارج . بُرّد الوسط وصُبَّ في أطباق معقمة . استخدم هذا الوسط لعزل بكتريا *H. influenzae* .

3.3.2.3- **وسط لوريا السائل** Luria-Bertani Medium

حضر بإذابة 15 غم من التربتون، 5 غم من مستخلص الخميرة و 10 غم من كلوريد الصوديوم في 950 ملليلتر من الماء المقطر. عُدل الأُس الهيدروجيني إلى 7 بإضافة قطرات من HCl أو إضافة قطرات من هيدروكسيد الصوديوم NaOH . أُكمل الحجم إلى واحد لتر ثم عُقم بالموصدة. استخدم هذا الوسط لتنمية البكتريا المراد استخلاص الدنا DNA منها.

4.3.2.3- **وسط المثيل الأحمر – فوكس بروسكاور السائل** MR-VP Broth Medium

حُضر الوسط بإذابة 5 غم ببتون ، 5 غم فوسفات البوتاسيوم أُحادي الهيدروجين K_2HPO_4 في الماء المقطر. عُدلَ الأُس الهيدروجيني إلى 7.6 ثم أُكمل الحجم إلى 950 ملليلتر ثم عُقم بالموصدة . وبعد تبريده أُضيفَ 50 ملليلتر من محلول 10% كلوكوز معقم بالترشيح. صُبَّ في أنابيب معقمة بواقع 5 ملليلتر لكل أنبوب . استخدم الوسط لغرض اختبار قابلية البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز و تكوين الأسيتون.

5.3.2.3- **وسط اليوريا** Urea agar medium

حُضر الوسط بإذابة 2.5 غم من أكار اليوريا الأساس في 95 ملليلتر من الماء المقطر، عقم بالموصدة بعدها ترك ليبرد إلى درجة 45-50ْ م ثم أُضيف إليه 5 ملليلتر من محلول اليوريا 40% ، مُزج جيداً ووزع في أنابيب بمقدار 5 ملليلتر، وبشكل مائل. استخدم الوسط للتحري عن إنتاج إنزيم اليوريز.

6.3.2.3– **وسط تخمر السكريات** Sugars fermentation medium

حُضر هذا الوسط بإذابة 2 غم ببتون ، 5 غم كلوريد الصوديوم ، 3 غم فوسفات البوتاسيوم أُحادي الهيدروجين ، 2.5 غم أكار و 0.03 غم من صبغة بروموثايمول الأزرق في 90 ملليلتر ماء مقطر ثم أُكمل الحجم إلى اللتر . سُخنت محتويات الوسط إلى أن تتجانس مكوناته ، بُرد إلى درجة 50–45 ْم . ضُبط الأُس الهيدروجيني إلى 7.1 ثم عُقم بالموصدة بدرجة 121 ْم لمدة 15 دقيقة بعد أن وزع إلى أنابيب الاختبار بمقدار 3 ملليلتر لكل أنبوب ، ثم تركت الأنابيب لتبرد إلى درجة 55 ْم . عندئذٍ أُضيفَ إليها 0.3 ملليلتر من المحلول السكري (الكلوكوز أو السكروز) المحضر بتركيز 10% والمعقم بالترشيح. استخدم هذا الوسط للتحري عن قدرة البكتريا على تخمر السكريات .

7.3.2.3– **وسط تحلل الإسكولين** Esculin Hydrolysis medium

حُضر بإذابة 1 غم من الإسكولين ، 0.5 غم من سترات الحديد و 40 غم من وسط أكار الدم في 1 لتر من الماء المقطر ، عقم بالموصدة وصب في انابيب بمقدار 5 ملليلتر ، وبشكل مائل . استخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتريا على تحليل الاسكولين .

8.3.2.3– **وسط تميع الجيلاتين**

حُضر هذا الوسط حسب ما أورده Collee وجماعته (1996) ، وذلك بأذابة 1.5 غم من K_2HPO_4 ، 0.5 غم من KH_2PO_4 ، 4 غم من الجيلاتين ، 0.05 غم من سكر الكلوكوز و 28 غم من وسط الأكار المغذي في واحد لتر من الماء المقطر ، ضبط الس الهيدروجيني الى 7 ، عقم بالمؤصدة لمدة 15 دقيقة ثم صُبَّ في اطباق معقمة ، استعمل هذا الوسط في الكشف عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم Gelatinase .

9.3.2.3– **وسط اختبار الحركة** Motility test medium

استخدم لهذا الغرض وسط Nutrient broth ذو القوام النصف صلب Semisolid ، إذ حُضر بإضافة مادة الأكار، وبنسبة 0.3-0.5% إلى وسط المرق المغذي Nutrient broth قبل التعقيم .

10.3.2.3– **وسط** SOC **السائل**

حُضر على وفق ما جاء في Sambrook وجماعته (1989)، وذلك بإذابة 2 غرام من التربتون، 0.5 غرام من مستخلص الخميرة و 0.05 غرام من كلوريد الصوديوم في 90 ملليلتر من الماء المقطر ثم أُضيف إليه 1 ملليلتر من محلول 0.25 مولار كلوريد البوتاسيوم KCl ، ثم عدل الأُس الهيدروجيني إلى 7 وأُكمل الحجم إلى 100 ملليلتر وعقم بالموصدة، وقبل الاستخدام أُضيف إليه 0.5 مل من محلول 2 مولار كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ و 1 ملليلتر من محلول

0.25 مولار كلوكوز المعقمين بالترشيح، وفي حالة استخدام الوسط بالحالة الصلبة أُضيف إليه الأكار بنسبة 2%. استخدم هذا الوسط في تجارب التحول الوراثي لتنمية البكتريا .

4.2.3- **جمع العينات** Collection of samples

جمعت العينات من المرضى المراجعين للعيادة الاستشارية للامراض الصدرية والتنفسية (مركز مكافحة التدرن) ، والمراجعين لمستشفى الديوانية العام في مدينة الديوانية ، الذين يعانون من اخماج المسالك التنفسية المصابين وغير المصابين بداء السكري للمدة من 2009/2/1 الى 2009/11/10 . اشتملت الدراسة على 300 عينة قُسمت إلى ثلاث مجاميع ، شملت المجموعة الأولى 100 عينة لمرضى مصابين بأخماج المسالك التنفسية وداء السكري ، شملت المجموعة الثانية 100 عينة لمرضى مصابين بأخماج المسالك التنفسية وغير مصابين بداء السكري وشملت المجموعة الثالثة (مجموعة السيطرة) 100 عينة لأشخاص أصحاء وذلك بهدف إجراء مقارنة لنسبة وأنواع البكتريا المتواجدة في المجاميع الثلاثة .

جمعت العينات تبعاً لنوع الإصابة ، إذ جمعت عينات القشع في قناني معقمة أما مسحات الأنف ، الأذن ، اللوزتين و البلعوم فقد جمعت بطريقة المسحة القطنية المعقمة المباشرة ، واختبرت خلال مدة زمنية اقل من ساعة .

كما تم إجراء مقابلة شخصية لكل مريض تم من خلالها ملىء استمارة استبيان Questionnaire تضمنت اسم المريض ، العمر ، الجنس ، السكن ، المهنة ، التدخين ، الإصابة بمرض السكري ، الأدوية التي يتناولها ، وكما مبين في الملحق (1).

5.2.3- **فحص نماذج القشع**:

A- لغرض قبول نماذج القشع فقد اعتمدت المواصفات الموضوعة من قبل Murray and Washington (1975) و Vanscoy (1977) وهي تشترط:

- يجب إن يزيد عدد خلايا الدم البيض مفصصة النوى على 25 خلية عند الفحص تحت القوى الصغرى.
- يجب إن يقل عدد الخلايا الطلائية عن 10 خلايا عند الفحص تحت القوى الصغرى.

ولغرض فحص نموذج القشع تم تحضير شريحة زجاجية صبغت بصبغة غرام واتبعت الخطوات الآتية في تحضير الشريحة:

1. نُقل حجم بمقدار الناقل من البقع القيحية أو الدموية للنموذج بوساطة الناقل ووُضع على شريحة زجاجية نظيفة.
2. وُضعت شريحة زجاجية ثانية فوق الشريحة الأولى وضُغط عليها جيداً وبرفق.
3. رُفعت الشريحة الثانية وعُرضت الشريحة الأولى للهب هادئ حتى جفت.
4. صُبغت الشريحة بعدها بصبغة غرام وفُحصت تحت قوة تكبير (100x) وحُسب عدد الخلايا الطلائية الحرشفية والخلايا البيض وكذلك حُدد نوع البكتريا سواء كانت موجبة أو سالبة لصبغة غرام.

وبعد عملية الفحص تم تحديد فيما إذا كان نموذج القشع موافقا للمواصفات الموضوعة ليتم زرعها لعزل المسبب المرضي البكتيري أما إذا لم يكن مطابقا للمواصفات هُمل النموذج.

B– أُخذت مسحات من عينات القشع لكل المجاميع للتحري عن عصيات السل.

6.2.3- **زرع العينات**

زُرعت العينات على الوسطين الإغنائيين أكار الدم واكار الجوكليت وكذلك على الوسط التفريقي أكار الماكونكي ، للتحري عن البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام ، حُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37ْ م لمدة 24 ساعة .

7.2.3- **عزل وتشخيص البكتريا** Isolation and Identification of Bacteria

شُخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على ما جاء في Benson (2002) و Alexander وجماعته (2004) وعلى النحو التالي :

1.7.2.3- **الصفات الزرعية والفحص المجهري** Cultural Characteristics and Microscopic Examination

أُجري التشخيص الأولي للعزلات بالاعتماد على الصفات المظهرية المتضمنة شكل ولون وقوام المستعمرات النامية على وسط أكار الماكونكي وأكار الدم وأكار الجوكليت . وأُخضعت العزلات إلى الفحص المجهري إذ تمَّ تحضير مسحات من هذه المستعمرات بعد إعادة تنقيتها على وسط أكار الماكونكي وأكار الدم وصبغت بصبغة غرام وفحصت تحت العدسة الزيتية للتمييز بين الخلايا الموجبة والسالبة للصبغة وشكل البكتريا وطرق تجمعها .

2.7.2.3- **الاختبارات الكيموحيوية** Biochemical tests

أُجريت عدد من الاختبارات الكيموحيوية التالية لتشخيص البكتريا اعتماداً على ما أورده كل من Benson (2002) و Alexander وجماعته (2004) .

1.2.7.2.3– **اختبار إنزيم الأوكسديز** Oxidase Test

نُقلت مستعمرات بكتيرية بعمر 18-24 ساعة بوساطة عود خشبي إلى ورقة ترشيح مرطبة بكاشف إنزيم الأوكسديز (فقرة :1.2.2.2.2) ، يعد تغير اللون إلى البنفسجي الغامق بعد مرور 30 ثانية دليل على إيجابية الفحص .

2.2.7.2.3– **اختبار إنتاج الكاتليز** Catalase Test

تمَّ مزج مزروع بكتريا بعمر 18-24 ساعة مع قطرة من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 (فقرة :2.2.2.2.3) على شريحة زجاجية نظيفة ، إذ أن ظهور الفقاعات الهوائية دلالة على إيجابية الفحص بإنتاج إنزيم الكاتليز الذي يعمل على تحلل مركب الـ H_2O_2 إلى الماء وغاز الأوكسجين.

3.2.7.2.3– **اختبار إنتاج الأندول** Indole Test

لُقح وسط ماء الببتون بمستعمرات للعزلات وحُضن بدرجة حرارة 37ْ م ولمدة 24 ساعة ثم أُضيف إليه 0.5 ملليلتر من كاشف كوفاكس Kovacs reagent (فقرة :3.2.2.2.3)، ومُزج جيداً . تم الاستدلال على النتيجة الموجبة للتفاعل من تكون حلقة حمراء في طبقة الكحول الأيزوميلي Isoamyl alcohol العليا نتيجة لتحلل الحامض الأميني التربتوفان وتحوله إلى الإندول .

4.2.7.2.3– **إختبار فوكس – بروسكاور وأحمر المثيل** Voges Proskauer and Methyl Red Test

لُقح وسط MR-VP (فقرة :4.3.2.2) بالبكتريا وبواقع مكررين لكل عزلة بكتيرية . حُضنت الانابيب بدرجة حرارة 37ْ م ولمدة 24–48 ساعة وبعد اكتمال مدة الحضن أُضيف لأحد المكررات 3 ملليلتر من محلول الفا – نفثول و 1 ملليلتر من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (فقرة :4.2.2.2.3) ومُزجت جيداً لمدة 3-5 دقائق . تعتبر النتيجة موجبة عند ظهور اللون الأحمر الوردي الذي يدل على تكوين المركب المتعادل Acetyl-Methyl Carbinol أو مركب Butylene Glycol واختزالهما إلى مركب Diacetyl . أما المكرر الثاني للعزلة البكتيرية فقد أُضيف إليه 0.5 ملليلتر من كاشف المثيل الأحمر (فقرة :5.2.2.2.3) . إنَّ ظهور اللون الأحمر الغامق دليل على قابلية البكتريا لإنتاج بعض الأحماض العضوية من سكر الكلوكوز التي تسهم في خفض الدالة الحامضية للوسط إلى 4.5 أو أقل ، أما ظهور اللون الأصفر فيدل على النتيجة السالبة للتفاعل.

5.2.7.2.2– **اختبار استهلاك السترات** Citrate Utilization Test

لغرض اختبار قدرة البكتريا المعزولة على استخدام السترات كمصدر وحيد للكاربون والطاقة تم تلقيح وسط السترات المائل بالبكتريا وحُضن بدرجة حرارة 37ْ م ولمدة (24-48) ساعة ، إذ يُعد تغير لون البروموثايمول من اللون الأخضر إلى اللون الأزرق نتيجة زيادة الأُس الهيدروجيني دليلاً على إيجابية التفاعل.

6.2.7.2.3 – **إختبار الحركة** Motility Test

تم تلقيح أنابيب الاختبار الحاوية على وسط الأكار المغذي نصف الصلب Semi solid agar (فقرة :9.3.2.3) بالبكتريا بطريقة الطعن ثم حُضنت الأنابيب لمدة 24-48 ساعة في درجة حرارة 37ْ م . تم ملاحظة النمو بانتشار البكتريا من منطقة التلقيح وهذا يعني أن البكتريا لها قابلية الحركة وهذا دليلٌ على إيجابية الاختبار أما عدم انتشار البكتريا حول منطقة الطعن فيدل على أن البكتريا غير متحركة.

7.2.7.2.3– **اختبار إنتاج إنزيم اليوريز** Urease Test

لُقح وسط اليوريا (فقرة :5.3.2.3) بطريقة الطعن والتخطيط ثم حضن الوسط الذي تم تلقيحه بدرجة 37ْ م ولمدة (24–48) ساعة. إن النتيجة الموجبة لهذا الفحص هو تغير لون الوسط إلى اللون الوردي دلالة على تحلل اليوريا بإنتاج إنزيم اليوريز من قبل البكتريا وإنتاج الأمونيا مما أدى إلى رفع الأُس الهيدروجيني للوسط وبالتالي تغير لون كاشف الفينول الأحمر.

8.2.7.2.3– **اختبار كليكلر** Kligler's Test

لُقحت أنابيب مائل كليكلر بمستعمرات البكتريا المراد تشخيصها بطريقة الطعن والتخطيط وحُضنت بدرجة حرارة 37ْ م ولمدة 24 ساعة ، قُرئت النتيجة اعتماداً على ما أورده Macfaddin (2000) وكما يلي:

1. Alk /Alk تعني عدم تخمر السكريات
2. $Acid^{+}$ /$Acid^{+}$ تعني تخمر السكريات وإنتاج غاز H_2S وغاز CO_2
3. $Acid^{+}$ /$Acid^{-}$ تعني تخمر السكريات وإنتاج غاز CO_2 وعدم إنتاج غاز H_2S
4. $Acid^{-}$ /$Acid^{-}$ تعني تخمر السكريات وعدم إنتاج غاز H_2S و CO_2
5. $Acid^{-}$ /Alk^{-} تعني تخمر الكلوكوز وعدم إنتاج غاز H_2S و CO_2

9.2.7.2.3– **اختبار تميع الجيلاتين** Gelatin Liquefaction Test

تمَّ تلقيح أطباق الوسط الزرعي الحاوي على الجيلاتين (فقرة 8.3.2.3) بالعزلات البكتيرية ثم حُضنت الأطباق لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37ْ م. بعدها غُمر النمو البكتيري بكاشف اختبار الجيلاتين (فقرة 6.2.2.2.3) . إن ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات البكتيرية دليل على إيجابية الفحص.

10.2.7.2.3– **اختبار تخمر السكريات** Sugars Fermentation Test

لُقح وسط تخمر السكريات (فقرة :6.3.2.3) بالبكتريا وتم حضنها تحت درجة حرارة 37ْ م ولمدة 24 ساعة ، إنَّ تغير لون الوسط من الأزرق إلى الأصفر دليل على ايجابية الأختبار.

11.2.7.2.3– **اختبار إنزيم مخثر البلازما بطريقة الأنبوب** Tube Coagulase Test

استعمل هذا الفحص في الكشف عن الإنزيم المخثر للبلازما Coagulase والذي يعد صفة تشخيصية لبكتريا العنقوديات الذهبية ، فقد زرعت المكورات العنقودية في أنابيب اختبار حاوية على 5 ملليلتر من مرق نقيع القلب والدماغ ، ثم حُضنت لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37ْ م ، بعدها نُقل 0.1 ملليلتر من المزروع البكتيري إلى أنابيب صغيرة ثم أُضيف إليها 0.5 ملليلتر من بلازما دم الأرنب (فقرة : 7.2.2.2.3) ، حُضنت الأنابيب في درجة حرارة 37ْ م ولمدة 4 ساعات ، مع مراقبة الفحص كل 30 دقيقة . إنَّ تكون الخثرة clot تعد دليلاً على إيجابية الفحص أما الأنابيب ذات النتيجة السالبة فتترك في درجة حرارة الغرفة ولمدة 24 ساعة إضافية للتأكد من نتيجة الفحص.

12.2.7.2.3– **النمو على أكار المانيتول الملحي** Growth on Mannitol Salt Agar

أُجري هذا الاختبار للتفريق بين أنواع المكورات العنقودية المخمرة وغير المخمرة لسكر المانيتول، زُرعت عزلات البكتريا على وسط أكار المانيتول وحُضنت بدرجة حرارة 37ْ م ولمدة 24 ساعة . يعد تغير لون الوسط إلى الأصفر دلالة على تخمر سكر المانيتول.

13.2.7.2.3.– **اختبار الحساسية لنوفوبايوسين** Novobiocin Susceptible Test

استخدم هذا الاختبار للتمييز بين الأنواع التابعة لجنس *Staphylococcus* spp. ، إذ تم تلقيح وسط مولر–هنتون الصلب بالبكتريا بطريقة التخطيط ، ثم وضع قرص النوفوبايوسين (30 mcg) على الوسط الملقح وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37ْ م ولمدة 24 ساعة ولوحظت منطقة تثبيط النمو حول القرص.

14.2.7.2.3– اختبار التحلل في املاح الصفراء Bile Solubility Test

استخدم الاختبار للتحري عن قدرة افراد جنس *Streptococcus* spp. على التحلل في املاح الصفراء، اذ اضيف جزء واحد من صوديوم تراكوليت 10 % Sodium taurocholate الى عشرة اجزاء من المزرعة السائلة بعمر 18 ساعة، حضن الزرع بدرجة حرارة 37°م ولمدة 15 دقيقة لملاحظة الذوبان وشفافية الوسط .

15.2.7.2.3– اختبار تحلل الاسكولين Esculin Hydolysis Test

لقح الوسط المحضر (فقرة : 7.3.2.3) بعزلات البكتريا التابعة لجنس *Streptococcus* spp. وحضنت الأنابيب في درجة 37°م ولمدة (28–48) ساعة واعتبر ظهور اللون الأسود في الوسط نتيجة موجبة ،

16.2.7.2.3– اختبار الحساسية للأبتوجين و الباستراسين Optochin and Bacitracin Susceptible Test

استخدم هذا الاختبار للتمييز بين الانواع التابعة لجنس *Streptococcus* spp. ، إذ تم تلقيح أطباق وسط أكار الدم (فقرة 1.3.2.3) بالبكتريا وذلك بالتخطيط باستعمال الناقل ، ثم وضع قرص الباستراسين (0.04) وحدة عالمية وقرص الأبتوجين (30 µg) على الوسط الملقح وحضنت الاطباق بدرجة 37°م ولمدة 24 ساعة . لوحظت مناطق تثبيط النمو حول الأقراص.

3.7.2.3- التشخيص الكيموحيوي باستخدام نظام الـ api

بعد الحصول على نتائج الفحوص الأولية التي تنطبق على الأجناس البكتيرية قيد الدراسة. استخدمت عدّة التشخيص api 20E kit حسب تعليمات الشركة المصنعة لتشخيص أنواع الأجناس البكتيرية التابعة للعائلة المعوية وبكتريا *Pseudomonas*. إذ لُقح 5 ملليلتر من المحلول الفسلجي بالبكتريا للحصول على عالق متجانس وذلك بالمقارنة مع محلول ثابت العكرة القياسي (فقرة :2.1.2.2.3) ، نُقل مقدار 0.12 ملليلتر من عالق البكتريا لكل أنبوب اختبار فيما بلغت كمية اللقاح البكتيري 0.28 ملليلتر لأنابيب الاختبارات CIT ، VP ، GEL . أُضيف الزيت Oil لأنابيب الاختبارات H_2S ، URE ، ADH ، LDC ، ODC لغرض توفير ظروف لا هوائية ثم حُضنت الأشرطة بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة. بعد فترة الحضن تمَّ قراءة الشرائط إذ أن نواتج الفعاليات الأيضية للبكتريا تسبب تغيرا لونيا في الاختبارات ملحق (2) وبعض من هذه الاختبارات تحتاج إلى كواشف لملاحظة التغير اللوني مثل:

- اختبار IND بإضافة قطرة من كاشف كوفاكس وتكوين الحلقة الحمراء يدل على النتيجة الموجبة.
- اختبار VP بإضافة قطرات من كاشف VP1 ثم قطرة من كاشف VP2 وظهور اللون الأحمر يدل على النتيجة الموجبة.
- اختبار TDA بإضافة قطرة من كاشف الـ TDA وظهور اللون البني يدل على النتيجة الموجبة.

تمَّ التشخيص بعد قراءة النتائج وتحويلها إلى أرقام إذ أن الشريط يحتوي على 7 مجموعات وكل مجموعة تحتوي على ثلاثة أرقام 1 , 2 , 4 وكل فحص موجب يعطي الرقم الموجود على الحفرة والفحص السالب لا يعطى له رقم ثم تم جمع الأرقام لكل مجموعة وسُجلت وكونت في النهاية سبعة أرقام قورنت مع الفهرس الخاص بالنظام ليعطي اسم الجنس والنوع للبكتريا قيد الاختبار. فيما استخدم نظام api staph الخاص بالمكورات العنقودية والمستعمل في تشخيص جميع الأنواع التابعة لهذا الجنس. إذ تم عمل معلق بكتيري متجانس من العزلة البكتيرية المراد تشخيصها باستعمال وسط بكتريا المكورات العنقودية تحت ظروف معقمة بعكورة مساوية إلى عكورة أنبوب ماكفرلاند . بعدها مُلئت الأنابيب الصغيرة في الشريط بوساطة ماصة باستور المعقمة مع تجنب تكون فقاعات هوائية داخل الأنبوب. وضعت (1-2) قطرة من الزيت في الأنبوبتين URE و ADH الخاصتين بفحصي إنتاج إنزيم اليوريز وتحلل الأرجنين وعلى التوالي وذلك لتوفير ظروف لاهوائية. حُضنت بعدها الأشرطة في حاوية الحضن بدرجة حرارة 37ْ م ولمدة 18–24 ساعة. قُرئت النتائج بعد إضافة الكواشف وهي :

- كاشف اختبار الفوكس بروسكاور Voges-Proskaure : أُضيفت قطرة من كل من VP1 و VP2 واعتبر التفاعل موجباً عند ظهور اللون البنفسجي أو الوردي بعد مرور 10 دقائق.
- كاشف اختبار اختزال النترات Nitrate reduction test : أُضيفت قطرة واحدة من كل NIT1 و NIT2 وتعتبر النتيجة موجبة عند ظهور اللون الأحمر بعد مرور 10 دقائق.
- كاشف اختبار إنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase test : إن اللون البنفسجي المتكون بعد أن أُضيفت قطرة واحدة من كل من ZYM_A و ZYM_B دليل على إيجابية التفاعل وذلك بعد مرور 10 دقائق.

تمت قراءة شريط الفحص كاملاً بعد الرجوع إلى ملحق (3) لتوضيح النتائج وبنفس الأسلوب الذي استخدم في قراءة أشرطة api 20E المستخدمة في تشخيص الأجناس التابعة للعائلة المعوية، وبعد الرجوع إلى الفهرس الخاص بالنظام أمكن معرفة نوع العزلة البكتيرية.

8.2.3- التحري عن بعض العوامل المرتبطة بضراوة البكتريا

1.8.2.3- تكوين المحفظة البكتيرية Bacterial capsule

استخدمت طريقة التصبيغ الواردة في Alexander وجماعته (2004) وكالآتي:

1. تمَّ مزج كمية صغيرة من النمو البكتيري المأخوذ من مستعمرة عمرها 24 ساعة مع قطرة صغيرة من محلول الملح الفسلجي على شريحة زجاجية نظيفة.
2. أُضيف للشريحة قطرة من صبغة النكروسين ومُزجت باستخدام عروة الناقل .
3. نُشر المزيج على سطح الشريحة بواسطة شريحة زجاجية ثانية وبزاوية ˚45 وتركت لتجف .
4. أُضيف صبغة البلورات البنفسجية ولمدة دقيقة واحدة ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ، جففت الشريحة وفحصت مباشرةً تحت العدسة الزيتية .

2.8.2.3- عوامل الالتصاق Adhesion Factors

استخدمت طريقة الالتصاق بالخلايا الطلائية لهذا الغرض ، وعزلت الخلايا الظهارية الفموية بالاعتماد على ما أورده Iwahi وجماعته (1983) وكما يلي:

1. جُمعت الخلايا الظهارية من الغشاء المخاطي الفموي Buccal Mucosa بوساطة ماسحة قطنية معقمة ووضعت في 5 ملليلتر من دارئ الفوسفات الملحي PBS . غُسلت الخلايا الظهارية ثلاث مرات بوساطة جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000 دورة/دقيقة ولمدة 5 دقائق ثم عُلقت الخلايا الراسبة بمحلول PBS واستعملت انياً في إجراء اختبار الالتصاق .
2. أُضيف 0.5 ملليلتر من مزروع بكتيري بعمر 24 ساعة إلى الكمية نفسها من عالق الخلايا الطلائية ومزج الخليط عن طريق قلب الأنبوبة ثم حضن بدرجة حرارة 37˚ م لمدة ساعة واحدة في حاضنة هزازة بسرعة 40 دورة/دقيقة .
3. طُردت الخلايا مركزياً وتم غسلها أربع مرات بداريء الفوسفات الملحي وذلك للتخلص من البكتريا غير الملتصقة بالخلايا الطلائية.
4. وضعت قطرة صغيرة من العالق النهائي للخلايا الطلائية على شريحة زجاجية نظيفة وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة ثم ثبتت بالحرارة وصُبغت بصبغة غرام وفُحصت تحت العدسة الزيتية لملاحظة البكتريا الملتصقة بالخلايا الطلائية.

3.8.2.3– إنتاج الإنزيم الحال للدم Detection of Hemolysin Production

اتبعت الطريقة الواردة في Senior and Hughes (1987) ، للتحري عن قابلية البكتريا المعزولة على إنتاج إنزيم الهيمولايسين وتحديد قابلية هذا الإنزيم على تحليل الدم البشري وكما يلي:

1. نُبذ مقدار 5 ملليلتر من عينة الدم باستخدام أنابيب نبذ بلاستيكية معقمة ومزودة بمانع التخثر للتخلص من البلازما والحصول على راسب خلايا الدم الحمر.
2. غُسلت الخلايا مرتين متتاليتين بالمحلول الملحي الفسلجي المعقم، وتم ترسيب الخلايا بالنبذ المركزي بعد كل غسل.
3. أُضيف نسبة 5% من الراسب إلى وسط أكار الدم الأساس المعقم بعد تبريده إلى درجة حرارة 45-50ْ م ، ثم وزع في أطباق زجاجية معقمة وحُضن بدرجة حرارة 37ْ م لمدة 24 ساعة للتأكد من خلوه من التلوث.
4. زُرعت العزلات البكتيرية بطريقة التخطيط على الوسط الزرعي المحضر وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37ْ م ولمدة 24 ساعة . يعد ظهور منطقة تحلل واضحة حول المستعمرة النامية دلالة على التحلل من نوع بيتا β- hemolytic وفي حالة ظهور لون اخضر حول المستعمرة فأن التحلل من نوع الفا α- hemolytic وفي حالة عدم حصول التحلل فأنه من النوع كاما γ- hemolytic .

4.8.2.3 – إنتاج إنزيم ألبيتا لاكتاميز Detection of β-Lactamase production

استخدمت طريقة اليود القياسية السريعة الواردة في WHO (1978) للتحري عن إنتاج إنزيم ألبيتا لاكتاميز وقد استخدمت المحاليل في (الفقرة : 5.1.2.2.3) ، وتضمنت طريقة العمل الخطوات الآتية:

1– حُضرت مزارع بكتيرية بعمر 24 ساعة منماة على وسط أكار الدم .

2– نقل عدد من المستعمرات بواسطة العروة إلى حفرة من حفر الـ Microtiter plate الحاوية على 100 مايكروليتر من Penicillin G وخُلطت جيداً مع المحلول . حُضنت لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة 37ْ م.

3– أُضيفَ 50 مايكروليتر من محلول النشا، ومُزج جيداً مع محتويات الحفرة .

4– أُضيف 20 مايكرليتر من محلول اليود، إذ يتكون لون أزرق غامق من تفاعل اليود مع النشا.

5- أُحتسبت النتيجة موجبة عند حصول تغير لوني وسريع من الأزرق الغامق إلى الأبيض بعد مرور أقل من دقيقة على إضافة الكواشف . أُعيد الفحص عند ظهور نتيجة موجبة متأخرة أكثر من 5 دقائق.

6- أُجريت تجربة السيطرة السالبة باتباع الخطوات السابقة ولكن بدون استخدام المستعمرات البكترية .

9.2.3- **حفظ وادامة العزلات** Storage and maintenance of isolates

1.9.2.3- **الحفظ قصير الأمد**

لُقح وسط الأكار المغذي بالعزلات المشخصة وحضنت عند درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم أحيطت الأطباق بشريط شمعي لاصق (Parafilm) . جمعت الأطباق داخل أكياس معلمة وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة 4 م° لمدة شهر واحد (Harley and Prescott,1996) .

2.**9.2.**3- **الحفظ طويل الأمد**

لُقحت أنابيب حاوية على 10 ملليلتر من المرق المغذي بمقدار 0.1 ملليلتر من مزروع بكتيري عمره 4 ساعات . حفظت الأنابيب عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة بعدها أخذ 1 ملليلتر من المزروع البكتيري النامي ونقل الى أنابيب معقمة حاوية على 1 ملليلتر من الكليسيرول المعقم ثم حفظت عند درجة حرارة -20 م° ولمدة 6 أشهر (Karch *et al*., 1995).

10.2.3- **المقاومة للمضادات الحيوية** Resistance to Antibiotic Agents

1.10.2.3- **حساسية البكتريا للمضادات الحيوية** Antibiotics Sensitivity Test

أُجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية على وسط أكار مولر هنتون باعتماد طريقة Kirby و Bauer ، وكما جاء في Hindler (1998) باستخدام أقراص المضادات الحيوية المبينة في (الفقرة : 4.1.3) لإجراء فحص الحساسية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة.

1. حُضرت المزارع البكتيرية بنقل مستعمرة واحدة إلى 5 ملليلتر من وسط المرق المغذي وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة (18-24) ساعة.

2. قورنت عكرة النمو مع عكرة محلول ثابت العكرة القياسي (الفقرة : 2.1.2.2.3) والذي يعطي عدداً تقريبياً للخلايا 15×10^8 خلية/ ملليلتر.

3. نُشر 0.1 ملليلتر من المزروع أعلاه في وسط أكار مولر هنتون بواسطة الناشر المعقم spreader ، تركن الأطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10-15 دقيقة .

4. نُقلت بعدها أقراص المضادات بملقط معقم إلى الأطباق بواقع 5–6 قرص للطبق الواحد، وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 ْم لمدة 24 ساعة.
5. قرأت النتائج بملاحظ مناطق التثبيط حول أقراص المضادات الحيوية المتكونة، وفسرت النتائج مع ما ورد في NCCLS (2005) .

2.10.2.3– **تحديد التركيز المثبط الأدنى** Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

استخدمت طريقة التخافيف المضاعفة بالوسط الزرعي الصلب لحساب (MIC) لعدد من المضادات الحيوية اعتماداً على ما جاء به Stocks and Ridgway (1987) وكما يلي :
1. حُضرت تراكيز متسلسلة متضاعفة تراوحت بين (4–1024) مايكروغم/ ملليلتر لكل من المضادات المستخدمة بإضافة نسب مختلفة من المحاليل الخزينة لهذه المضادات فقرة (4.1.2.2.3) إلى وسط أكار مولر هنتون المعقم والمبرد إلى 50 ْم.
2. رُجت الأوساط جيداً بعد إضافة المضاد وصُبت في أطباق معقمة . حُفظت بدرجة حرارة الثلاجة 4 ْم واستعملت خلال (24–48) ساعة.
3. حُضرت التخافيف العشرية 10^{-2} لمزارع البكتريا بعمر 24 ساعة باستعمال محلول الملح الفسلجي المعقم.
4. سُحب 5 مايكروليتر من التخفيف أعلاه بواسطة ماصة دقيقة ولُقحت به أوساط المضادات الحيوية كقطرة واحدة.
5. كُررت العملية لكافة المزارع (مكررين للتركيز الواحد) وتركت الأطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لكي تجف القطرات قبل قلب الأطباق ثم حُضنت بدرجة حرارة 37 ْم لمدة 24 ساعة.
6. احتسب التركيز المثبط الأدنى MIC على أنه أقل تركيز من المضاد ، الذي يمنع ظهور نمواً واضحاً للبكتريا.

11.2.3- **عزل الدنا البلازميدي** Plasmid DNA Isolation

استخدمت طريقة الغليان على وفق ما ورد في Sambrook وجماعته (1989)، كما موضح في الخطوات الآتية:
1. رسب 5 ملليلتر من عالق البكتريا بعمر 24 ساعة بجهاز المنبذة بسرعة 5000 دورة/دقيقة ولمدة 5 دقائق.

2. أُهمل الراشح وأُضيف للراسب 400 مايكروليتر من دارىء STE (فقرة :A.5.1.2.2.3) ، رُسبت الخلايا البكتيرية بجهاز المنبذة الصغيرة Biofuge بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق .

3. أُهمل الراشح وعلقت الحبيبة Pellet المتكونة بمقدار 350 مايكروليتر من داريء STET (فقرة :B.5.1.2.2.3) و 25 مايكروليتر من محلول إنزيم اللايسوستافين المحضر آنياً بتركيز 10 ملغم/ملليلتر (فقرة :C.5.1.2.2.3) ، رُجَّ المزيج بالمازج الدوار vortex بشكل جيد لمدة 3 ثوان وترك لمدة 10 دقائق في ثلج مجروش.

4. نُقلت الأنابيب إلى حمام مائي بدرجة حرارة 100ْ م ولمدة 40 ثانية. نُبذَ المحلول بجهاز المنبذة الصغيرة بسرعة 13000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق.

5. سُحبت الحبيبة اللزجة المتكونة بعيدان خشبية.

6. أُضيف إلى الرائق مقدار 40 مايكروليتر من 2.5 مولار خلات الصوديوم (فقرة :D.5.1.2.2.3) و 420 مايكروليتر من كحول أيزوبروبيل. خُلطت المقادير برجها بهدوء ثم حُفظت النماذج في درجة حرارة 4ْ م لمدة 24 ساعة أو بدرجة -20ْ م لمدة ساعتين.

7. نُبذَ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة بسرعة 13000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة، ثم أُهمل الراشح وتُرك الكحول ليتبخر بدرجة حرارة الغرفة.

8. أُضيف 25 مايكروليتر من داريء TE (فقرة :E.5.1.2.2.3) لإذابة الدنا البلازميدي المترسب على جدران الأنبوبة ثم رُجت النماذج بهدوء، وقد أصبحت جاهزة للترحيل الكهربائي.

12.2.3- **الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي** Gel Electrophoresis

أُجري الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي في هلام الأكاروز على وفق ما ورد في Maniatis وجماعته (1982) وكما يلي:

1. حُضر هلام الأكاروز بإذابة 0.7 غم من الأكاروز في 100 ملليلتر من داريء TBE (فقرة :A.6.1.2.2.3) سُخن الأكاروز إلى درجة الغليان وبعدها تم تبريده إلى درجة 45-50ْ م ثم أُضيف مقدار 10 مايكروليتر من صبغة بروميد الأثيديوم بتركيز نهائي 0.5 مايكروغم/ملليلتر (فقرة :B.6.1.2.2.3) .

2. حُضرت صفيحة إسناد Tray الاكاروز بإحاطة حافتها بشريط لاصق وبشكل جيد لمنع تسرب الهلام الذائب بعد صبّه ثم ثبت مشط تكوين الحفر Comb في أحد طرفي الصفيحة ، صبَّ هلام الاكاروز في الصفيحة وتُرك ليتصلب لمدة 30 دقيقة ، رفع مشط تكوين الحفر من الأكاروز المتصلب ورفع الشريط اللاصق ثم ثبتت الصفيحة على مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي Cell unit، بعدها غطي هلام الأكاروز بارتفاع 1 ملمتر بدارئ TBE .

3. حضر الدنا المراد تحميله على الهلام بأخذ 10 مايكروليتر منه وأُضيف إليه 3 مايكروليتر من داريء التحميل Loading buffer (فقرة :C.6.1.2.2.3)، ثم حمل كل نموذج في حفرة من حفر الهلام، بعدها رحلت النماذج كهربائياً تحت فرق جهد مقداره 6 فولت/سم وتيار مقداره 20 ملي أمبير لمدة 1–2 ساعة (حتى تصل الصبغة الزرقاء إلى نهاية حافة الهلام).
4. فُحص الهلام بوساطة مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV Transilluminator عند طول موجي 336 نانوميتر. صور بعدها الهلام باستخدام كاميرا رقمية .

13.2.3- **الاقتران البكتيري** Bacterial Conjugation

أُجريت عملية الاقتران البكتيري حسب ما ورد في O`connell (1984) ، وكما مبين في الخطوات الآتية:

1. لُقح 5 ملليلتر من وسط LB (فقرة :3.3.2.3) بمستعمرات مفردة لكل من الخلايا المستلمة recipient cells المتمثلة بالسلالة القياسية ***E. coli*** MM 294 المقاومة للريفامبسين والخلايا الواهبة donor cells في دوارق زجاجية سعة 50 ملليلتر. حُضنت الدوارق بعد ذلك بدرجة حرارة 37 ْم لمدة 24 ساعة في حاضنة هزازة.
2. باستخدام أنابيب زجاجية معقمة تم مزج 1 ملليلتر من كل من الخلايا الواهبة والمستلمة حُضنت بدرجة حرارة 37 ْم لمدة (1–2) ساعة من غير تحريك.
3. رُجَّ المزيج بواسطة المازج الدوار Vortex ، وبشكل جيد لمدة 1-2 دقيقة لفصل الخلايا الواهبة عن المستلمة.
4. حُضرت سلسلة من التخافيف العشرية للمعلق البكتيري لغاية 10^{-6} . نُشر 100 مايكروليتر من التخافيف المذكورة على أوساط انتقائية حاوية على مَعْلمين Tow Markers أحدهما مضاد Rifampicin بتركيز نهائي 100 مايكروغم/ ملليلتر والآخر مضاد Ampicillin بتركيز 100 مايكروغم/ملليلتر التي اظهرت العزلة الواهبة مقاومة له ، كما حُضرت أوساط تحتوي على مضاد الريفامبسين بالتركيز سالف الذكر فقط، ونُشر عليها 100 مايكروليتر من مزيج الاقتران وبتخفيف 10^{-7} و 10^{-8} على انفراد لحساب عدد الخلايا المستلمة.
5. نُشر 100 مايكروليتر من المزارع الأصلية لكل من الخلايا الواهبة والمستلمة على الأوساط الانتقائية للتأكد من عدم وجود طفرة وراثية. حُضنت الطباق بعد ذلك في درجة حرارة 37 ْم لمدة 24 ساعة.

استخرج تردد الاقتران من المعادلة الآتية:

تردد الاقتران = عدد الخلايا الاقترانية / عدد الخلايا المستلمة

6. نُقلت الخلايا المقترنة إلى أوساط انتقائية جديدة للتأكد من انتقال المحددات المسؤولة عن صفة المقاومة للمضادات الحياتية وإنتاج إنزيم ألبيتا لاكتاميزعن طريق الاقتران. كما تم التحري عن المحتوى البلازميدي للخلايا الاقترانية لمعرفة الحزم البلازميدية المنتقلة من الخلايا الواهبة إلى الخلايا المستلمة

14.2.3- **التحول الوراثي** Transformation

اجريت تجارب التحول الوراثي على وفق ما جاء في Sambrook وجماعته (1989) وكما يلي :

A. تحضير الخلايا المؤهلة Preparation of Competent cells

1. نُميت السلالة المستلمة ***E. coli*** MM 294 الخالية من البلازميدات في 5 ملليلتر من وسط LB السائل (فقرة :3.3.2.3) وحُضنت بدرجة حرارة 37 ْم في الحاضنة الهزازة بسرعة 60 هزة/دقيقة ولمدة 18 ساعة لغرض تنشيطها.

2. لُقح 50 ملليلتر من وسط LB السائل بـ 1 ملليلتر من المستنبت المنشط وحُضن بالظروف آنفة الذكر نفسها لمدة أقصاها 3 ساعات حتى تصل الامتصاصية الضوئية إلى 0.2 وعلى الطول الموجي 590 نانوميتر.

3. وزع مستنبت البكتريا في أنابيب اختبار معقمة بعد انتهاء مدة الحضن ثم بُردت في حمام ثلجي لمدة 10 دقائق.

4. نُبذت خلايا البكتريا مركزياً بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 4 ْم ، ثم أُخذ راسب الخلايا وعلق في 20 ملليلتر من 0.1 مولار من محلول كلوريد الكالسيوم المعقم والمبرد ثم حضن في الحمام الثلجي لمدة 30 دقيقة .

5. نُبذت خلايا البكتريا مركزياً بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق وبدرجة 4 ْم ثم أُخذ راسب الخلايا وأُعيد تعليقها في 1 ملليلتر من 0.1 مولار من محلول كلوريد الكالسيوم البارد ثم وزعت الخلايا المؤهلة في أنابيب ابندروف معقمة ومبردة بواقع 200 مايكروليتر من عالق الخلايا لكل أنبوب ، وبذلك أصبحت الخلايا مؤهلة لاستلام الدنا .

B. التقاط الدنا البلازميدي Plasmid DNA uptake

1. أُخذ انبوبا أبندروف محتويان على الخلايا المؤهلة ووضعا في حمام ثلجي لمدة 15 دقيقة.
2. أُضيف للأنبوب الأول 10 مايكروليتر من الدنا البلازميدي المراد تحويله ذو التركز 0.05 مايكروغرام/ملليلتر وأُضيف للانبوب الثاني 10 مايكروليتر من داريء TE كسيطرة سالبة ومزج الخليط بهدوء وتُرك في الحمام الثلجي لمدة 45 دقيقة.
3. عُرضت البكتريا المؤهلة لصدمة حرارية بدرجة حرارة 42ْ م لمدة 90 ثانية ثم أُعيدت إلى الحمام الثلجي لمدة 3 دقائق ثم أُضيف إلى كل أنبوب 0.8 ملليلتر من وسط SOC السائل (فقرة :10.3.2.3). حُضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37ْ م ولمدة 45 دقيقة.
4. تم تخفيف النماذج عشرياً (10^{-1} - 10^{-5}) ونُشرت على الأوساط الانتقائية المحتوية على المضادات الحيوية بواقع 0.1 ملليلتر لكل طبق وحُضنت بدرجة حرارة 37ْ م لمدة 24 ساعة لحساب عدد الخلايا المتحولة وراثياً.
5. نُشر 100 مايكروليتر من تخفيف 10^{-5} على وسط SOC الصلب (فقرة :10.3.2.3) المضاف إليه الريفامبسين بتركيز 100 مايكروغرام/ملليلتر لحساب العدد الكلي للخلايا الحية.
6. **حُسب تردد التحول من المعادلة الآتية :**

تردد التحول = عدد الخلايا المتحولة / تركيز الدنا بالمايكروغرام / عدد الخلايا الحية الكلي

علما ان تركيز الدنا البلازميدي تم تقديره باستخدام جهاز الامتصاص الضوئي على طول موجي 260 نانومتربتطبيق المعادلة الاتية:

تركيز الدنا بالمايكروغرام/ملليلتر =الكثافة الضوئية عند الطول الموجيnm 260 × معامل التخفيف × 50 المايكروغرام/ملليلتر (Sambrook *et al*., 1989).

وبعد الكشف عن البلازميدات المنتقلة للخلايا المتحولة . تم التأكد من ثباتها واستمرار توارثها عن طريق إعادة التقاط مستعمرات الخلايا المتحولة وتنميتها على الأوساط الزرعية الانتقائية نفسها ، وفيما بعد نُميت المستعمرات المتحولة على كل المؤشرات الأخرى المدروسة (المقاومة للمضادات الحيوية) لمعرفة الانتقال المتزامن للمؤشرات المدروسة.

15.2.3- **التحليل الإحصائي**

استخدم اختبار تحليل التباين ثنائي الأتجاه Two-Way Analysis of Variance ANOVA بمستوى أهمية 0.01 و 0.05 لمقارنة التغيرات الحاصلة بين المجاميع الثلاث المشمولة بالدراسة استناداً لما ورد في الراوي (2000) .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

RESULTS and DISCUSSION

النتائج و المناقشة Results and Discussion

4.1- العزل والتشخيص للعينات المرضية

4.4.1- العزل

بينت النتائج كما في الجدول (1-4) إن العينات المأخوذة من مواقع مختلفة للجهاز التنفسي للأشخاص المشمولين بالدراسة والتي أظهرت نمواً بكتيرياً كانت 14% للأشخاص المصابين بأخماج المسالك التنفسية وبمرض السكري ، 71% للأشخاص المصابين بأخماج المسالك التنفسية غير المصابين بمرض السكري و 41% للأشخاص الطبيعيين (مجموعة ضابطة) .

جدول (4-1): نسب الإصابة بأخماج المسالك التنفسية عند الأشخاص المشمولين بالدراسة

ت	الحالات المشمولة بالدراسة	عدد العينات	العينات ذات النمو البكتيري العدد (%)	العينات غير الحاوية على نمو بكتيري العدد (%)
1	أشخاص مصابين بأخماج المسالك التنفسية وبمرض السكري (المجموعة الأولى)	100	71 (14)	29 (92)
2	أشخاص مصابين بأخماج المسالك التنفسية و غير مصابين بمرض السكري (المجموعة الثانية)	100	67 (71)	33 (33)
3	أشخاص أصحاء (مجموعة ضابطة)	100	18 (41)	82 (19)
	المجموع	300	156 (29)	144 (11)

LSD بين المجاميع = 1.6
LSD بين عينات المجموعة الواحدة = 1.33
LSD بين عينات المجاميع (التداخل) = 2.3

إن ارتفاع نسبة الإصابة في المجموعة الأولى قد يعود سببه إلى داء السكري ، إذ أشار Wheat (4211) إلى أن الأخماج عموما هي أكثر شيوعا عند مرضى السكر وخصوصا التدرن ، أنواع معينة من ذات الرئة ، التهابات المجاري البولية والتناسلية وغيرها. إن زيادة نسبة الأخماج لا يعكس خلل الجهاز المناعي فحسب وإنما هناك العديد من العوامل التي قد تلعب دورا مهما مثل خلل الأوعية الدموية ، خلل الأعصاب والمحيط الداخلي غير الطبيعي كيميائيا ، وعلى العموم فان العديد من نقاط الاضطراب في فعاليات الجهاز المناعي قد تمت ملاحظتها ، فمثلا في خلايا الدم البيض مفصصة النوى لوحظ قلة الانجذاب للعوامل الالتهابية ، كما لوحظ خلل البلعمة وقتل الجراثيم داخل الخلايا . وربما يعود السبب في جميع هذه النقاط إلى قلة كمية الطاقة المتوافرة للخلايا نظرا لقلة الانسولين (Gorsuch and Cudworth, 1983) . كما أن المتمم قد يتأثر في مرضى السكر، ولعل السبب يعود إلى أن ارتفاع كمية الكلوكوز في مصل الدم قد يؤدي إلى إضافة جزيئة كلوكوز بطريقة لاانزيمية إلى جزيئة المتمم الثالثة أو الرابعة C3 and C4 (Scaillon *et al.*, 1999).

كما نلاحظ في الجدول (1−4) ظهور النمو البكتيري بين أفراد المجموعة الضابطة إذ بلغت 41% ، وهذا ما أكده Wilkins وجماعته (9111) باحتواء القناة التنفسية العليا على العديد من الأنواع البكتيرية التي تعد من النبيت الطبيعي Normal Flora والتي اغلبها من المكورات السبحية نوع ألفا و كاما ، المكورات العنقودية و *M. catarrhalis* ، فضلاً عن تواجد البكتريا المرضية *H. influenzae* و *S. pneumoniae* الشائعة في المنطقة خصوصاً أثناء الفصول الباردة من السنة ، كما أشار السعيد (4221) بأن انتشار البكتريا في القناة التنفسية العليا له تأثير واضح في أخماج القناة التنفسية السفلى بحالات الضعف المناعي .

أوضحت نتائج التحليل الإحصائي باستخدام اختبار تحليل التباين ثنائي الاتجاه ANOVA بوجود فروقات معنوية بين المجاميع الثلاث من حيث وجود النمو البكتيري و عدم وجوده عند مستوى الأهمية 1.14 .

9.4.1 - **تشخيص العزلات البكتيرية**

تم تشخيص البكتريا اعتماداً على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية التي اوردها كل من Benson (9119) و Alexander وجماعته (9111) ملحق (1) ، وأُكد التشخيص باستخدام ألعده التشخيصية api 20E لأفراد العائلة المعوية والبكتريا السالبة لصيغة غرام و api Staph لتشخيص الأنواع التابعة للمكورات العنقودية . إذ تم تشخيص 911 عزلة بكتيرية توزعت على 491 عزلة (74%) تعود للبكتريا الموجبة لصبغة غرام و 14 عزلة (32%) تعود للبكتريا السالبة لصبغة غرام . إذ شُخص 411 عزلة (24.1%) من العينات الخاصة بالأشخاص المصابين بأخماج المسالك التنفسية و بداء السكري (المجموعة الأولى) توزعت على 71 عزلة (22.7%) تعود للبكتريا الموجبة لصبغة غرام اغلبها تعود لأفراد الجنس *Staphylococcus spp.* و 11 عزلة (11.1%) تعود للبكتريا السالبة لصبغة غرام . في حين شُخصت 19 عزلة (32.1 %) من العينات الخاصة بالأشخاص المصابين بأخماج المسالك التنفسية غير المصابين بداء السكري (المجموعة الثانية) توزعت على 23 عزلة (71.7%) بكتريا موجبة لصبغة غرام و 92 عزلة (32.1%) بكتريا سالبة لصبغة غرام . فيما شُخص 41 عزلة (1.1 %) من العينات الخاصة بالأشخاص الأصحاء (المجموعة الضابطة) توزعت على 41 عزلة (11.1%) بكتريا موجبة لصبغة غرام و 1 عزلات (99.9%) بكتريا سالبة لصبغة غرام .

تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه العامري (9112) بأن نسبة الأخماج التنفسية التي تسببها البكتريا الموجبة لصبغة غرام اعلى من تلك التي تسببها البكتريا السالبة لصبغة غرام إذ بلغت (27.1%) و (13.9%) وعلى التوالي ، كما تتفق مع ما وجده Carbino وجماعته (9119) و Watanabe وجماعته (4222) بان نسبة أخماج الجهاز التنفسي التي تسببها البكتريا الموجبة لصبغة غرام أعلى من تلك الأخماج التي تسببها البكتريا السالبة لصبغة غرام ، بينما لا تتوافق مع ما ذكره مرقبي (4222) من إن نسبة الأخماج التنفسية التي تسببها البكتريا السالبة لصبغة غرام أعلى من تلك التي تسببها البكتريا الموجبة لصبغة غرام . وقد يعود السبب في ذلك إلى التواجد الطبيعي لأغلب البكتريا الموجبة لصبغة غرام في القناة التنفسية العليا الذي له تأثير واضح في اخماج القناة التنفسية السفلى المقترنة بحالات الضعف المناعي (السعيد ، 4221) ، كما قد يرجع السبب لأمتلاكها العديد من آليات المقاومة ولسهولة انتشار محددات هذه المقاومة عن طريق البلازميدات من خلال عمليات الإقتران أو التحول فيما بينها لتواجدها في بيئة واحدة (Arakawa *et al.*, 1995) . كما ان لهذه البكتريا القدرة على افراز العديد من السموم و الأنزيمات التي تلعب دوراً مهما في مقاومة عملية البلعمة ومساعدتها في اختراق أنسجة الجسم كما في بكتريا المكورات العنقودية (Goldman and Green, 2009).

جدول (4–2) : أنواع البكتريا ونسبها المئوية المعزولة من أخماج المسالك التنفسية للأشخاص المشمولين بالدراسة

ت	الحالات المشمولة بالدراسة	العدد الكلي للعزلات (%)	*Staphylococcus aureus* (%)	*Staphylococcus epidermidis* (%)	*Streptococcus pyogenes* (%)	*Streptococcus pneumoniae* (%)	Viridans Streptococci group (%)	*Moraxella catarrhalis* (%)	*Haemophilus influenzaes* (%)	*Pseudomonas aeruginosa* (%)	*Klebsiella pneumoniae* (%)	*Escherichia coli* (%)
1	أشخاص مصابين بأخماج المسالك التنفسية وبمرض السكري (المجموعة الأولى)	108 (24.2)	32 (92.7)	9 (1.3)	7 (7.2)	9 (1.3)	3 (9.1)	16 (41.1)	9 (1.3)	10 (2.3)	11 (41.9)	2 (4.2)
2	أشخاص مصابين بأخماج المسالك التنفسية و غير مصابين بمرض السكري (المجموعة الثانية)	82 (32.1)	27 (39.2)	8 (2.1)	8 (2.1)	7 (1.2)	3 (3.1)	6 (1.3)	7 (1.2)	6 (1.3)	9 (44)	1 (4.9)
3	أشخاص أصحاء (مجموعة ضابطة)	18 (1.1)	4 (99.9)	6 (33.3)	– (1)	1 (2.7)	3 (47.1)	1 (2.7)	2 (44)	– (1)	1 (2.7)	– (1)
	المجموع	208	63 (31.3)	23 (44.4)	15 (1.9)	17 (1.9)	9 (1.3)	23 (44.4)	18 (1.1)	16 (1.1)	21 (41)	3 (4.1)

LSD بين المجاميع = 0.46 LSD بين عينات المجموعة الواحدة = 0.84 LSD بين عينات المجاميع (التداخل) = 1.41

يوضح الجدول (1–9) أنواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام ونسبها المئوية المعزولة من الأشخاص المشمولين بالدراسة ، إذ يتضح بان بكتريا *Staph. aureus* هي أكثر تردداً بين أنواع البكتريا المعزولة إذ بلغت 73 عزلة (31.3%) توزعت على 39 عزلة (92.7%) ، 91 عزلة (39.2%) و 1 عزلات (99.9%) للمجاميع الثلاث المشمولة بالدراسة (اشخاص مصابين بداء السكري ، اشخاص غير مصابين بداء السكري واشخاص اصحاء [مجموعة ضابطة]) وعلى التوالي وهذا مشابه للعديد من الدراسات ، إذ أشار نادر (9112) إلى إن بكتريا *Staph. aureus* شكلت اعلى نسبة اصابة 11.2% من بين المسببات البكتيرية لأخماج الجهاز التنفسي العلوي ، كما أشار العامري (9112) بأن هذه البكتريا تعد الأكثر انتشاراً من مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة غرام والتي تسبب اصابات تنفسية مختلفة منها ذات الرئة والتهاب القصبات ، وفي دراسة أجريت في تايوان ذكر Yhn-Chering وجماعته (9111) بان نسبة

الإصابة بهذه البكتريا بلغت (53-83%) ، وعلى النقيض من ذلك فقد ذكر Barker وجماعته (1989) بان نسبة الإصابة بالأخماج التنفسية التي تسببها بكتريا *Staph. Aureus* قد شكلت نسبة قليلة لا تتجاوز 9%. وقد يعود سبب كثرة تواجد هذه البكتريا في اخماج المسالك التنفسية إلى امتلاكها لعديد من عوامل الضراوة بعضها يقع في جدار الخلية المتكون من متعدد الببتيد السكري مثل بروتين A ، حامض التايكويك ، المحفظة ، بعض الذيفانات والأنزيمات المحللة للمواد المعقدة كالبروتينات والدهون ، إذ تمكنها هذه العوامل من الالتصاق بالخلايا المبطنة لقناة التنفسية ، اختراق أنسجة الجسم وكذلك مقاومة عملية البلعمة ، فضلاً عن تعايش هذه البكتريا بصورة طبيعية على الممرات التنفسية والأغشية المخاطية والجلد (Carey *et al.*, 2008).

فيما جاءت كل من بكتريا *Staph. epidermidis* ، *M. catarrhalis* و *K. pneumoniae* بالمرتبة الثانية إذ بلغت نسبة الإصابة بها 44.4% (93عزلة) ، 44.4% (93عزلة) و 41% (94 عزلة) وعلى التوالي من بين المسببات البكتيرية لأخماج المسالك التنفسية عند الأشخاص المشمولين بالدراسة توزعت بنسبة 1.3% (2 عزلات) ، 41.1% (47 عزلة) و 41.9% (44 عزلة) وعلى التوالي لمجموعة الأشخاص المصابين بداء السكري كما بلغت نسبة هذه الأجناس الثلاثة 2.1% (1 عزلات) ، 1.3% (7 عزلات) و 44% (2 عزلات) وعلى التوالي لمجموعة الأشخاص غير المصابين بداء السكري ، فيما بلغت النسبة 33.3% (7 عزلات) ، 2.7% (عزلة واحدة) و 2.7% (عزلة واحدة) وعلى التوالي في الأشخاص الأصحاء (المجموعة الضابطة) .

وقد جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه العامري (9112) إذ شكلت نسبة الإصابة ببكتريا *Staph. epidermidis* 43.7% من بين المسببات البكتيرية لأخماج الجهاز التنفسي ، وتشير الدراسات إلى عدم اهميتها في اصابات أخماج الجهاز التنفسي لكونها تعتبر من النبيت الطبيعي ، إلا انها في بعض الأحيان قد تؤدي إلى الإصابة بالخمج خصوصاً في الأشخاص الذين يشكون ضعفاً في الآلية الدفاعية للجسم ولاسيما في مرحلة النضج أو الكهولة (Brooks *et al.*, 2001). في حين لم تتوافق النتائج مع ما توصل اليه Ewing and Torres (1999) من إن نسبة حدوث الأخماج التنفسية الناتجة عن بكتريا *K. pneumoniae* تقدر بـ(19%) ، وقد أشار Fang وجماعته (9112) إلى ان هذه البكتريا تعد من الفلورا الطبيعية العابره الموجودة على جسم الإنسان وفضلا عن معيشتها الرمية في البلعوم الانفي والقناة المعوية فهي تمثل أحد أنواع الممرضات الأنتهازيه إذ ترافق المرضى من كبار السن وأولئك الذين يعانون من ضعف مناعي ومدمني الكحول ومرضى السكري ومرضى العجز الرئوي المزمن ، ومن البكتريا التي تسبب مضاعفات متزايدة لدى مرضى الإيدز ، كما

أشار Frirdich وجماعته (9112) إلى أن هذه البكتريا تملك عدد من عوامل الضراوة التي تشترك بامراضيتها وتتضمن مستضدات المحفظة وعوامل الالتصاق المتمثلة بالأهداب ، وانتاج الذيفانات الداخلية مثل متعدد السكريد الشحمي فضلا عن مقاومة التأثير القاتل للمصل ونظام الحصول على الحديد .

كما جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه Miyashita وجماعته (9111) الذين استطاعوا عزل بكتريا *M. catarrhalis* بنسبة 41.2% ، فيما اختلفت النتائج مع ما وجده العامري (9112) بان نسبة الإصابة بهذه البكتريا شكلت 94.2% من بين المسببات البكتيرية لأخماج الجهاز التنفسي ، لكنها تتفق معه بان نسبة عزل هذه البكتريا كانت عالية إذا ما قورنت مع باقي الأنواع البكتيرية المعزولة مع ملاحظة إن هذه البكتريا لم تعزل بشكل منفرد وإنما عزلت مع بكتريا أخرى ، إذ أشار Karalus and Campaqnari (9111) إلى أن هذه البكتريا تعد من النبيت الطبيعي في مناطق الجهاز التنفسي وأجزائه ومن الممكن أن تصبح ممرضة انتهازية ، إذ نالت اهتمام الكثير من الباحثين في السنوات الأخيرة بسبب انتشارها وتسببها في إحداث أمراض الجهاز التنفسي العلوي والسفلي واستيطانها الأغشية المخاطية للإنسان ، كما أشار Hoang (4221) بان اغلب الإصابات تحصل لدى المرضى المصابين بالانسداد الرئوي المزمن وخصوصا" كبار السن ، المرضى الذين يتناولون الأدوية المثبطة للمناعة ، مرضى داء السكري ومرضى الكبت المناعي . وهذا ما أكدته هذه الدراسة من زيادة نسبة الإصابة بهذه البكتريا وبحالات مختلطة لدى مجموعة الأشخاص المصابين بداء السكري .

احتل النوعان *H. influenzae* و *S. pneumoniae* المرتبة الثالثة في إحداث الإصابة إذ شكلا نسبة 1.1% (41 عزلة) و 1.9% (41عزلة) وعلى التوالي للعينات المشمولة بالدراسة توزعت على 1.3% (2 عزلات) لكلا النوعين في الأشخاص المصابين بداء السكري ، كما بلغت نسبة هذين النوعين 1.2 (1 عزلات) و 2.1% (1 عزلات) وعلى التوالي في الأشخاص غير المصابين بداء السكري ، فيما كانت النسبة 44% (عزلتان) و 2.7% (عزلة واحدة) وعلى التوالي في المجموعة الضابطة ، وقد جاءت هذه النتائج أعلى مما توصل إليه نادر (9112) إذ وجد أن نسبة إصابة الجهاز التنفسي ببكتريا *H. influenzae* كانت 1.7% ، وقد أشار Murray وجماعته (4222) بأن هذه البكتريا تشترك في إحداث الأخماج التنفسية وخاصة خمج ذات الرئة البكتيري حيث تأتي بالترتيب الثاني في إحداث الأخماج التنفسية بعد بكتريا *S. pneumoniae* وخاصة في كبار السن والمرضى الراقدين في المستشفيات والمرضى الذين يتناولون الأدوية المثبطة للمناعة ، وأكد Krasan وجماعته (9114) على امتلاك هذه البكتريا آليات عدة للاستعمار منها الالتصاق على الخلايا الطلائية للإنسان الذي يحدث بطرائق عدة منها الشعيرات Pili التي تحيط بها من كل جانب ، بروتين الغشاء الخارجي متعدد

السكريات الدهني ، وبروتينات الوزن الجزيئي العالي فضلاً عن امتلاك بعض سلالاتها على المحفظة . كما جاءت النتائج مقاربة لما ذكره العامري (9112) بأن نسبة الإصابة ببكتريا *S. pneumoniae* قد شكلت 2.1% من بين المسببات البكتيرية لأخماج الجهاز التنفسي ، بينما أكد Scott وجماعته (9111) دور هذه البكتريا في إحداث الأخماج التنفسية وبنسبة أعلى هي 17% ، وقد أشار Dagan و جماعته (9119) إلى أن هذه البكتريا تستوطن الممرات التنفسية بصورة طبيعية ولكنها من الممكن أن تدخل إلى الرئتين بالاستنشاق ، إذ أنها تعد المسبب الأكثر شيوعا لذات الرئة ، وأوضح Goldman and Green (9112) بان لهذه البكتريا القابلية في الاختراق والتضاعف داخل الأنسجة وتمتلك المحفظة التي تعد عامل ضراوة رئيس يحميها من البلعمة.

فيما احتل النوعان *P. aeruginosa* و *S. pyogenes* المرتبة الرابعة إذ شكلا نسبة 1.1% (47 عزلة) و 1.9% (42 عزلة) في الأشخاص المشمولين بالدراسة توزعت على 2.3% (41 عزلات) و 7.3 (1 عزلات) وعلى التوالي في الأشخاص المصابين بداء السكري ، في حين بلغت نسبة هذين النوعين 1.3% (7 عزلات) و 2.1% (1عزلات) وعلى التوالي في الأشخاص غير المصابين بداء السكر . وبذلك جاءت نتائجنا مقاربة لما توصل أليه العامري (9112) الذي وجد أن هذين النوعين قد شكلا نسبة إصابة بلغت 7.1% و 7.1% وعلى التوالي ، في حين جاءت النتائج اقل مما توصل إليه السعيد (4221) إذ وجد أن بكتريا *S. pyogenes* شكلت نسبة 39% من المرضى المصابين بأخماج القناة التنفسية العليا ، كما جاءت النتائج غير متوافقة مع Lunch (9114) الذي عزل بكتريا *P. aeruginosa* بنسبة (17%) من المرضى المصابين بأخماج الجهاز التنفسي ، وأوضحت العديد من الدراسات بأن بكتريا *P. aeruginosa* نادراً ما تصيب الجهاز التنفسي في الأشخاص الطبيعيين ولكن تزداد الإصابة بها في المرضى الذين يعانون أمراضا مزمنة والمرضى الذين يتناولون الأدوية المثبطة للمناعة (Brooks *et al.*, 2001) ، كما أشار Suzuki وجماعته (9112) بأن هذه البكتريا من أكثر الممرضات الانتهازية خطورة بسبب امتلاكها العديد من عوامل الضراوة كالأنزيمات والذيفانات ، القدرة العالية على الألتصاق بالأغشية المخاطية للأنسجة الطلائية التنفسية ، متطلبات تغذوية قليلة فضلاعن امتلاكها العديد من آليات مقاومة المضادات الحيوية ، في حين اشارت العديد من الدراسات امتلاك بكتريا *S. pyogenes* العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها على الانتشار عن طريق تحطيم الأنسجة الرابطة ومقاومة دفاعات الجسم وبالتالي زيادة فوعتها مثل المحفظة ، بروتين M و الذيفانات ، إذ بين Brooks وجماعته (9114) أن هذه البكتريا تسبب التهاب البلعوم الحاد ، الجيوب الأنفية ، اللوزتين ومرض ذات الرئة .

أمـا مجموعـة المسـبحيات المخضـرة Viridans Streptococci group وبكتريـا القولـون *E. coli* فقد جاءتـا بالمرتبـة الأخيرة إذ شكلتا نسـبة 1.3% (2 عـزلات) و 4.1% (3 عـزلات) وعلـى التـوالي فـي الأشـخاص المشـمولين فـي الدراسـة توزعـت علـى 9.1% (3 عزلات) و 4.2% (عزلتان) على التوالي في الأشخاص المصابين بداء السكري ، كما شكلتا نسبة 3.1% (3 عزلات) و 4.9% (عزلتان) وعلى التوالي في الأشخاص غير المصابين بداء السكري ، فـي حين بلغت نسبة مجموعـة Viridans Streptococci group 47.1% (3 عزلات) في المجموعة الضابطة . جاءت هذه النتائج اقل مما توصل اليه العامري (9112) الذي بين بأن نسبة إصابة الجهاز التنفسي ببكتريا مجموعة Viridans Streptococci كانت 41.1% ، وعلى الرغم من تواجد هذه البكتريا بشكل طبيعي في القناة التنفسية العليا إلا انه لا يمكن الغاء دورها في إحداث الأخماج الاخرى مثل التعفن الدموي و التهاب بطانة القلب (Brooks *et al.*, 2001) ، كما أشار Myrvik and Weiser (4221) إلى أن استخدام الأدوية المثبطة للمناعة والمضادات الحياتية لإمراض مختلفة قد يؤدي إلى زيادة الإصابات الانتهازية التي تسببها العائلة المعوية ومنها *K. pneumoniae* و *E. coli* .

نلاحظ من النتائج أعلاه إن هنالك اختلاف في نسب الإصابة بالمسببات البكتيرية وأعدادها بين الأشخاص المشمولين بالدراسة وهذا ما أكدته نتائج التحليل الإحصائي التي أوضحت بان هنالك فروقاً معنوية بين الأنواع البكتيرية المعزولة للمجاميع الثلاث المشمولة بالدراسة عند مستوى الأهمية 1.14 .

كما لوحظ ارتفاع في نسب البكتريا المسببه لأخماج المسالك التنفسية الانتهازية عند الأشخاص المصابين بداء السكري ، مقارنةً بالأشخاص غير المصابين بداء السكري ، ولعل السبب في ذلك يعود إلى زيادة استعداد المضيف للإصابة بالأخماج نتيجة لقلة نشاط الخلايا اللمفاوية (reduced lymphocytes activity) واضطراب عمل الخلايا العدلة (neutrophil dysfunction) مع فشل جذب الخلايا الالتهابية (chemotaxis) (Ojetti *et al.*, 2002) ، وقد جاءت هذه النتائج مقاربة لما وجده Daad (9111) الذي اشار الى وجود بعض الاختلافات في نسب المسببات المرضية المعزولة من المصابين وغير المصابين بداء السكري إذ تضاعفت نسبة بكتريا *P. aeruginosa* إلى 99.2% المعزولة من المصابين بداء السكري فيما بلغت 41.2% عند غير المصابين بداء السكري ، وهذا ما تم تسجيله في دراستنا مع اختلاف نوع البكتريا إذ بلغت نسبة الإصابة ببكتريا *M. catarrhalis* الأشخاص المصابين بداء السكري 41.1% (47 عزلة) فيما كانت في الأشخاص غير المصابين بداء السكري 1.3% (7 عزلات) .

3.1.1- **حالات الخمج المفرد**

يوضح الجدول (1–3) إن الزرع البكتيري الموجب في حالة الخمج المفرد بلغ 14 عزلة (31%) للأشخاص المصابين بداء السكري ، فيما بلغت 21 عزلة (72.2%) للأشخاص غير المصابين بداء السكري . إما في الأشخاص الأصحاء (المجموعة الضابطة) فبلغت 41 عزلة (411%) .

جدول (4–3):عدد العزلات البكتيرية والنسب المئوية لتواجدها عند الأشخاص المشمولين بالدراسة في حالة الخمج المفرد

ت	أشخاص مصابين بأخماج المسالك التنفسية و بمرض السكري (المجموعة الأولى)			أشخاص مصابين بأخماج المسالك التنفسية و غير مصابين بمرض السكري (المجموعة الثانية)			أشخاص أصحاء (مجموعة ضابطة)		
	العزلات البكتيرية	عدد العزلات	النسبة المئوية	العزلات البكتيرية	عدد العزلات	النسبة المئوية	العزلات البكتيرية	عدد العزلات	النسبة المئوية
1	*Staph. aureus*	18	43.9	*Staph. aureus*	20	37.1	*Staph. aureus*	4	22.2
2	*Staph. epidermidis*	1	2.4	*Staph. epidermidis*	6	11.1	*Staph. epidermidis*	6	33.3
3	*S. pyogenes*	2	4.9	*S. pyogenes*	6	11.1	–	–	0
4	*S. pneumoniae*	5	12.2	*S. pneumoniae*	6	11.1	*S. pneumoniae*	1	5.6
5	Viridans Streptococci group	–	0	Viridans Streptococci group	2	3.7	Viridans Streptococci group	3	16.7
6	*M. catarrhalis*	–	0	*M. catarrhalis*	–		*M. catarrhalis*	1	5.6
7	*H. influenzae*	4	9.8	*H. influenzae*	2	3.7	*H. influenzae*	2	11
8	*P. aeruginosa*	5	12.2	*P. aeruginosa*	4	7.4	–	–	0
9	*K. pneumoniae*	6	14.6	*K. pneumoniae*	8	14.8	*K. pneumoniae*	1	5.6
المجموع		41	100		54	100		18	100

Staphylococcus aureus = Staph. aureus
Staphylococcus epidermidis = Staph. epidermidis
Streptococcus pyogenes = S. pyogenes
Streptococcus pneumoniae = S. pneumoniae
Moraxella catarrhalis = M. catarrhalis
Haemophilus influenzaes = H. influenzae
Pseudomonas aeruginosa = P. aeruginosa
Klebsiella pneumoniae = K. pneumoniae

إذ تبين إن بكتريا *Staph. aureus* ، *K. pneumoniae* ، *S. pneumoniae* و *P. aeruginosa* كانت أكثر المسببات المرضية المعزولة في حالة الخمج المفرد في الأشخاص المصابين بداء السكري إذ بلغت نسبها 13.2% (41 عزلة) ، 41.7% (7 عزلات) ، 49.9% (2 عزلات) و 49.9% (2 عزلات) وعلى التوالي . فيما كانت كل من بكتريا *Staph. aureus* و *K. pneumoniae* تمثل التواجد الأكثر كخمج مفرد وبنسبة 31.4% (91 عزلة) و 41.1% (1 عزلات) وعلى التوالي في غير المصابين بداء السكري. فيما شكلت كل من بكتريا *Staph. epidermidis* و *Staph. aureus* نسبة 33.3% (7 عزلات) و99.9% (1 عزلات) وعلى التوالي في الأشخاص الاصحاء (المجموعة الضابطة) .

1.1.4- **حالات الخمج المختلط**

يوضح الجدول (1–1) اعداد ونسب البكتيريا المعزولة في حالة الخمج المختلط إذ كان يمثل 31 حالة (71 عزلة) 79% في الأشخاص المصابين بداء السكري فيما كانت 43 حالة (91 عزلة) 31.4% تمثل الإصابة المختلطة في الأشخاص غير المصابين بداء السكري . إما العينة الضابطة فلم يتم عزل أي حالة خمج مختلط منها . ففي حالة الخمج المختلط المحتوي على كل من بكتريا *Staph. aureus + M. catarrhalis* فقد احتلت أعلى نسبة تواجد في خمج المسالك التنفسية للأشخاص المصابين بداء السكري وهي 43.1% (1 حالات) تشترك معها كل من بكتريا *Staph. aureus + H. influenzae* ، *Staph. aureus + K. pneumoniae* ، *Staph. aureus + S . pneumoniae* ، *Staph. epidermidis + P. aeruginosa* ، *Staph. epidermidis + M. catarrhalis + S. pyogenes* ، *Staph. aureus + H. influenzae + M. catarrhalis* و *Staph. aureus +* Viridans Streptococci group *+ M. catarrhalis* بنسبة 7.1% (حالتان) ولجميع الحالات. فيما كان الخمج المختلط المحتوي على *Staph. aureus + H. influenzae* و *Staph. aureus + M. catarrhalis* قد احتل أعلى نسبة وجود 93% (3 حالات) و 42.1% (حالتان) وعلى التوالي لغير المصابين بداء السكري . وقد جاءت النتائج متوافقة مع ما توصلت اليه الموسوي (2006) من حيث كثرة حالات الخمج المختلط لدى النساء المصابات بداء السكري إذ بلغت 34.3% في حين بلغت نسبة الإصابة بالخمج المختلط للنساء غير المصابات بداء السكري 91% . وقد يعود السبب في ذلك إلى ضعف الآليات الدفاعية (ADA, 2009) ، فكما هو ثابت ان فعالية الجهاز المناعي في مرضى السكري تكون متدنية ، مما يشجع الممرضات الانتهازية التي تسبقها اصابات اولية بأحد الممرضات الرئيسية ومنها بكتريا *Staph. aureus* (Johanson, 2000)

جدول (4-4): عدد العزلات البكتيرية والنسب المئوية لتواجدها في اخماج المسالك التنفسية المختلطة عند الأشخاص المشمولين بالدراسة

ت	أشخاص مصابين بأخماج المسالك التنفسية و بمرض السكري (المجموعة الأولى)			أشخاص مصابين بأخماج المسالك التنفسية و غير مصابين بمرض السكري (المجموعة الثانية)		
	العزلات البكتيرية	عدد العزلات	النسبة المئوية	العزلات البكتيرية	عدد العزلات	النسبة المئوية
1	*Staph. aureus* + *M. catarrhalis*	4	13.5	*Staph. aureus* + *M. catarrhalis*	2	15.4
2	*Staph. aureus* + *H. influenzae*	2	6.7	*Staph. aureus* + *H. influenzae*	3	23
3	*Staph. aureus* + *K. pneumoniae*	2	6.7	–	–	0
4	*Staph. aureus* + *S . pneumoniae*	2	6.7	–	–	0
5	*Staph. epidermidis* + *P. aeruginosa*	2	6.7	*Staph. epidermidis* + *P. aeruginosa*	1	7.7
6	*S. pyogenes* + *M. catarrhalis*	1	3.3	*S. pyogenes* + *M. catarrhalis*	1	7.7
7	*K. pneumoniae* + *M. catarrhalis*	1	3.3	*K. pneumoniae* + *M. catarrhali*	1	7.7
8	*E. coli* + *P. aeruginosa*	1	3.3	*E. coli* + *P. aeruginosa*	1	7.7
9	–	–	0	*S . pneumoniae* + *H. influenzae*	1	7.7
10	–	–	0	*Staph. aureus* + Viridans Streptococci group	1	7.7
11	*Staph. aureus* + *P. aeruginosa*	1	3.3	–	–	0
12	*S . pneumoniae* + *Staph. epidermidis*	1	3.3	–	–	0
13	*E. coli* + *K. pneumoniae*	1	3.3	–	–	0
14	*Staph. epidermidis* + *M. catarrhalis*	1	3.3	–	–	0
15	*S. pyogenes* + *Staph. epidermidis*	1	3.3	–	–	0
16	*K. pneumoniae* + *H. influenzae*	1	3.3	–	–	0
17	*S . pneumoniae* + *M. catarrhalis*	1	3.3	–	–	0
18	*P. aeruginosa* + *M. catarrhalis*	1	3.3	–	–	0
19	*S. pyogenes* + *M. catarrhalis* + *Staph. epidermidis*	2	6.7	*S. pyogenes* + *M. catarrhalis* + *Staph. epidermidis*	1	7.7
20	*Staph. aureus* + *H. influenzae* + *M. catarrhalis*	2	6.7	*Staph. aureus* + *H. influenzae* + *M. catarrhalis*	1	7.7
21	*Staph. aureus* + Viridans Streptococci group + *M. catarrhalis*	2	6.7	–	–	0
22	*S. pyogenes* + Viridans Streptococci group + *M. catarrhalis*	1	3.3	–	–	0
	المجموع	30	100	المجموع	13	100

Staphylococcus aureus = Staph. aureus
Staphylococcus epidermidis = Staph. epidermidis
Streptococcus pyogenes = S. pyogenes
Streptococcus pneumoniae = S. pneumoniae
Escherichia coli = E. coli
Moraxella catarrhalis = M. catarrhalis
Haemophilus influenzaes = H. influenzae
Pseudomonas aeruginosa = P. aeruginosa
Klebsiella pneumoniae = K. pneumoniae

9.1- التحري عن بعض العوامل المرتبطة بضراوة البكتريا

1.2.4 - إنتاج المحفظة

اظهرت النتائج المبينة في الجدول (1–2) والملحق (2) احتواء 11 عزلة (77.9%) على المحفظة من مجموع 491 عزلة ، إذ كانت 32 عزلة (74.2%) موجبة للفحص عائدة لبكتريا *Staph. aureus* ، فيما كانت 1 عزلات (31.3 %) من بكتريا *Staph. epidermidis* موجبة لفحص ، اما بكتريا *S. pyogenes* ، *S. pneumoniae* فقد اظهرت جميع العزلات ايجابيتها للفحص ، في حين كانت 2 عزلات (22.7%) من بكتريا مجموعة Viridans Streptococci موجبة للفحص .

جدول (4–5) : النسب المئوية لبعض العوامل المرتبطة بإمراضية البكتريا قيد الدراسة

ت	العزلات البكتيرية	العدد العزلات	إنتاج المحفظة العدد (%)	الالتصاق بالخلايا الطلائية العدد (%)	إنتاج الأنزيم الحال للدم العدد (%)	إنتاج الأنزيم β-Lactamase
1	***Staph. aureus***	63	39 (61.9)	54 (85.7)	63 (100)	47 (74.6)
2	***Staph. epidermidis***	23	8 (34.3)	15 (65.2)	- (0)	15 (65.2)
3	***S. pyogenes***	15	15 (100)	15 (100)	15 (100)	11 (73.3)
4	***S. pneumoniae***	17	17 (100)	17 (100)	17 (100)	11 (64.7)
5	**Viridans Streptococci group**	9	5 (55.6)	6 (66.7)	9 (100)	5 (55.6)
	المجموع	127	84 (66.2)	107 (84.3)	104 (81.9)	89 (70.1)

Staphylococcus aureus = Staph. aureus

Staphylococcus epidermidis = Staph. epidermidis

Streptococcus pyogenes = S. pyogenes

Streptococcus pneumoniae = S. pneumoniae

جاءت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه البغدادي (9117) الذي وجد ان جميع العزلات العائدة لبكتريا *S. pyogenes* والأنواع الأخرى للمسبحيات تحتوي على المحفظة . كما تتفق النتائج مع ما ذكره Macfaddin (9111) الذي اكد على احتواء السلالات الضارية للمسبحيات على المحفظة . إذ أشار Carey وجماعته (2008) إلى امتلاك *S. pyogenes* على محفظة حامض الهايلورونيك Hyaloronic Acid Capsule واحتواء *S. pneumoniae* على محفظة من متعدد السكريد Capsule Polysacharid والتي تلعب دوراً كبيراً في مقاومة البكتريا لعملية البلعمة ، في حين جاءت النتائج غير متوافقة مع الموسوي (9117) التي وجدت ان 37% من عزلاتها التابعة لـ *Staph. aureus* كانت حاوية على المحفظة . في حين أشار Carey وجماعته (2008) إلى احتواء اغلب السلالات التابعة لـ *Staph. aureus* يتكون جدارها الخارجي من طبقة مخاطية تدعى المحفظة أو متعدد السكريد والتي تمكن هذه البكتريا من مقاومة عملية البلعمة . كما اكد Goldman and Green (9112) بأن معظم سلالات *Staph. epidermidis* تنتج مادة مخاطية (هلام) Slime متكونة من متعدد السكريد تساعدها على تجنب دفاعات العائل .

2.2.4 - **التحري عن عوامل الالتصاق في البكتريا**

جرى التحري عن قابلية العزلات البكترية قيد الدراسة على الالتصاق بالخلايا الطلائية المبطنة للفم . أظهرت النتائج الاختلاف في النسب المئوية للالتصاق بالخلايا الطلائية بين الأنواع البكتيرية الجدول (1−2) و الملحق (2) إذ تبين إن كل من بكتريا بكتريا *S. pyogenes* ، *S. pneumoniae* أظهرت نسبة 411% في قابليتها على الالتصاق بالخلايا الطلائية. فيما أظهرت 12.1% من عزلات بكتريا *Staph. aureus* قابليتها على الالتصاق بسطوح الخلايا . إما بكتريا *Staph. epidermidis* ومجموعة Viridans Streptococci فقد أظهرت قابلية على الالتصاق وبنسبة 72.9% و 77.1% وعلى التوالي . جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصلت إليه الموسوي (9117) التي وجدت ان كل من بكتريا *Staph. aureus* و *Staph. epidermidis* قد اظهرت قابلية على الالتصاق بالخلايا الطلائية 12% و 71% وعلى التوالي ، إذ أشار (Donnenberg, 2000) إلى ان البكتريا الموجبة لصبغة غرام تمتاز بان عوامل الالتصاق فيها متمثلة بملصقات متعددة السكريات Polysaccaride adhesions ، التي يتركب منها جدار الخلية والمحفظة ، كما يعمل حامض التيكويك Teichoic acid ، والذي يعتبر احد مكونات الجدار في البكتريا الموجبة لصبغة غرام كعامل لاصق ، كما اكد (Carey *et al.*, 2008) على امتلاك بكتريا *S. pyogenes* العديد

من عوامل الضراوة التي تسهم في امراضيتها كالمحفظة وبروتين M التي تساعد في مقاومة البكتريا لعملية البلعمة وتعمل على تسهيل الألتصاق واستعمار البكتريا للجهاز التنفسي العلوي ، في حين أشار Gillespie and Hawkey (9117) إلى امتلاك بكتريا *Staph. aureus* ، *S. pyogenes* و *S. pneumoniae* بروتينات مرتبطة بالفايبرونكتين fibronectin-binding proteins يعتقد انها مستقبلات للفايبرونكتين الذي هو عبارة عن مركبات كلايكوبروتينية معقدة ذات وزن جزيئي عالي وجدت في مختلف السوائل الجسمية ، البلازما وسطوح الخلايا المبطنة للفم .

3.2.4 - **إنتاج الأنزيم الحال للدم**

أظهرت النتائج في جدول (1–2) أن 411 عزلة أعطت نتيجة موجبة وبنسبة 14.2% توزعت على 73 عزلة (411%) من بكتريا *Staph. aureus* و42 عزلة (411%) من بكتريا *S. pyogenes* وقد حلّلَ هذان النوعان الدم بشكل كامل β- Haemolysis ، كما اعطت 41 عزلة (411%) من بكتريا *S. pneumoniae* و 2 عزلات (411%) من بكتريا مجموعة Viridans Streptococci نتيجة موجبة للفحص وكان تحليلهما للدم جزئي α- Haemolysis في حين لم نلاحظ أي عزلة من عزلات بكتريا *Staph. epidermidis* قادرة على انتاج الهيمولايسين .

جاءت هذه الدراسة مطابقة لما توصل إليه العامري (9112) الذي وجد ان كل من بكتريا *S. pyogenes* ، *S. pneumoniae* ومجموعة Viridans Streptococci قد حللت الدم بنسبة 411% وللأنواع الثلاثة ، في حين لم تعطِ أي عزلة تابعة لبكتريا *Staph. epidermidis* أي نتيجة موجبة لفحص انتاج الهيمولايسين ، في حين تختلف النتائج معه فيما يخص عزلاته التابعة لبكتريا *Staph. aureus* اذ كانت نسبة انتاجها لأنزيم الهيمولايسين هي 42% ، كما جائت النتائج مخالفة لما توصلت اليه الموسوي (9117) بأن عزلتين من بكتريا *Staph. epidermidis* قد اظهرت قابلية على انتاج الانزيم الحال للدم Haemolysin .

4.2.4 - **إنتاج إنزيمات ألبيتا لاكتاميز**

من ملاحظة الجدول (1–2) نجد ان 12 عزلة (11.4%) اظهرت نتيجة موجبة للفحص من بين 491 عزلة بكتيرية موجبة لصبغة غرام ، توزعت على 11 عزلة (11.7%) من بكتريا *Staph. aureus* وكانت 42 عزلة (72.2%) من بكتريا *Staph. epidermidis* موجبة لفحص ، كما اظهرت 44 عزلة (13.3%) من بكتريا *S. pyogenes* القابلية على

انتاج انزيمات البيتالاكتاميز ، اما بكتريا *S. pneumoniae* فقد كانت 44 عزلة (71.1%) منها موجبة للفحص ، في حين انتجت 2 عزلات (22.7%) من بكتريا مجموعة Viridans Streptococci انزيمات البيتالاكتاميز.

جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه الموسوي (9117) التي وجدت بأن عزلاتها التابعة لبكتريا *Staph. epidermidis* كانت لها القدرة على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز بنسبة 71% ، في حين نتفق معها فيما يخص عزلاتها التابعة لبكتريا *Staph. aureus* التي كانت منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز بنسبة 71% ، كما كانت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما جاء به العامري (9112) إذ كانت كل من بكتريا *Staph. aureus* و *S. pneumoniae* منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز بنسبة 14.1% و 77.1% وعلى التوالي ، إلا اننا نختلف معه فيما يخص عزلاته التابعة لبكتريا *S. pyogenes* إذ كانت نسبة إنتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز 77.1% .

كما نلاحظ إن بعض العزلات البكتيرية غير منتجة لإنزيمات ألبيتالاكتاميز إلا أنها كانت مقاومة للعديد من مضادات البيتالاكتام ، ويمكن إن يعزى ذلك إلى امتلاكها آليات أخرى للمقاومة كحدوث تغير في موقع الهدف الذي يعمل عليه المضاد أو أنظمة الدفق الفعالة في هذه العزلات ، لذلك لا يعد إنتاج إنزيم ألبيتا لاكتاميز الميكانيكية الوحيدة التي تستطيع من خلالها البكتريا مقاومة مضادات البيتالاكتام (الجشاعة، 9114) .

3.4- **حساسية البكتريا للمضادات الحيوية**

يبين الجدول (1–7) ، الشكل (1–4) و الملحق (1) النسب المئوية لمقاومة العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة غرام المعزولة من أخماج المسالك التنفسية في الأشخاص المشمولين بالدراسة ، إذ أظهرت النتائج أن نسبة المقاومة لمضادات مجموعة ألبيتا لاكتام ، والتي تشمل البنسلينات كانت لمضاد Penicillin G ، Oxacillin و Apmicillin هي 29.1% ، 12% و 11.1% وعلى التوالي . في حين كانت المقاومة التي أظهرتها العزلات البكتيرية بالنسبة لمجموعة مضادات السيفالوسبورينات المتمثلة بالمضادين Cephalothin و Cefotaxime هي 11.1% و 21.2% وعلى التوالي . إن ارتفاع نسبة المقاومة لمضادات ألبيتا لاكتام أكدته العديد من الدراسات ، إذ وجدت الموسوي (2006) إن عزلاتها قاومت مضادي Penicillin G و Apmicillin بنسبة 27% و 12% وعلى التوالي ، كما بينت العبسي (9112) ان نسبة مقاومة عزلاتها لمضاد Apmicillin كانت 12.9% .

جدول (4-6) النسب المئوية لمقاومة الأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة غرام المعزولة من أخماج المسالك التنفسية تجاه بعض المضادات الحيوية

ت	العزلات البكتيرية	العدد الكلي للعزلات	Penicillin G (%)	Oxacillin (%)	Ampicillin (%)	Cephalothin (%)	Cefotaxime (%)	Amikacin (%)	Streptomycin (%)	Tobramycin (%)	Ciprofloxacin (%)	Co-Trimoxazole (%)	Tetracycline (%)	Chloramphenicol (%)	Rifampicin (%)	Erythromycin (%)	Clindamycin (%)
1	*Staphylococcus aureus*	66	61 (8669)	75 (8. 67)	77 (9566)	66 (8964)	48 (5569)	6 (6165)	68 (6168)	41 (6761)	7 (568)	66 (7664)	47 (5164)	8 (1466)	66 (7664)	69 (4464)	47 (5164)
6	*Staphylococcus epidermidis*	66	61 (8166)	18 (9666)	15 (5668)	17 (6766)	9 (6468)	6 (965)	16 (7666)	5 (6 64)	. (.)	9 (6469)	11 (4569)	6 (16)	1. (4667)	9 (6469)	1. (4667)
6	*Streptococcus pyogenes*	17	14 (8666)	11 (5666)	17 (1. .)	8 (6)	6 (4.)	1 (665)	9 (7666)	6 (4.)	1 (665)	6 (4.)	1. (6665)	1 (665)	8 (6)	8 (6)	5 (4665)
4	*Streptococcus pneumoniae*	15	17 (9966)	16 (5667)	15 (1. .)	8 (7668)	7 (6864)	6 (1566)	6 (6766)	7 (6864)	. (.)	4 (6667)	16 (5667)	1 (768)	8 (7668)	11 (6465)	5 (4166)
7	Viridans Sterptococci group	8	6 (6665)	9 (9968)	5 (5569)	7 (7766)	7 (7766)	. (.)	7 (7766)	6 (6666)	. (.)	6 (6666)	6 (6666)	. (.)	6 (6666)	6 (6666)	1 (1161)
	المجموع	165	115 (8661)	1. 9 (97)	111 (9564)	1. . (5965)	56 (7567)	66 (6 67)	5. (7761)	66 (4969)	6 (465)	76 (4165)	91 (6669)	14 (11)	64 (7. 64)	78 (4667)	5. (7761)

كما نلاحظ من الجدول (4–6) ان بكتريا *S. pyogenes* و *S. pneumoniae* اظهرت مقاومة تامة لمضاد Apmicillin ، وجاءت هذه النتائج مطابقة لما وجدته علي (2006) إذ قاومت عزلاتها العائدة لـ *S. pyogenes* هذا المضاد مقاومة تامة ، كما بين العامري (2005) ان نسبة مقاومة بكتريا *S. pyogenes* لهذا المضاد كانت 100% في حين كانت نسبة مقاومة عزلاته التابعة لـ *S. pneumoniae* لهذا المضاد 85.7% .

في حين لوحظ توافق في نتائج المقاومة لمضاد Penicillin G مع ما توصل اليه المسلماوي (1999) من ان نسبة مقاومة بكتريا *Staph. aureus* لهذا المضاد كانت 96.5% . أما مجموعة السيفالوسورينات فجاءت نتائجنا مقاربة لما توصلت اليه الموسوي (2006) من أن عزلاتها قاومت مضاد Cephalothin بنسبة 73% ، في حين لم تتفق هذه الدراسة مع ما توصلت إليه علي (2006) إذ أن نسبة مقاومة عزلاتها لمضاد Cefotaxime كانت 13.8%.

إن وجود المقاومة العالية للعزلات قيد الدراسة لمجموعة مضادات ألبيتا لاكتام قد يعزى إلى إنتاج إنزيمات ألبيتا لاكتامير المشفرة من قبل محددات وراثية محمولة على البلازميد أو الكروموسوم أو على ترانسبوزونات ، التي تعود إلى كثرة الاستعمال العشوائي لهذه المضادات فضلا عن التطور في المقاومة التي تحدثها البكتريا لصالحها إذ أشارت المصادر إن سبب زيادة نسب السلالات البكترية المقاومة لمضادات ألبيتا لاكتام هو استعمال جرع تحت علاجية مما يؤدي إلى نشوء طفرات تلقائية (David *et al.*, 2001 ; Gupta *et al.*, 1999)، فقد يؤدي حدوث طفرة وراثية في الجينات المشفرة للبروتينات المرتبطة بالبنسلين PBPs ، إلى تقليل ميل ارتباط مضادات البيتا لاكتام بهذه البروتينات، أو انتاج بروتينات بديلة مرتبطة بالبنسلين Alternative PBPs تدعى PBP_2a ذات الألفة القليلة للارتباط ، تشفر من قبل جين *mec A gene* المحمول على الكروموسوم ، وهي الآلية المسؤولة عن المقاومة العالية المستوى لأغلب مضادات البيتا لاكتام في المكورات العنقودية (Berger-Bachi, 1994) ،

إما مضادات مجموعة Aminoglycosides التي شملت كل من مضاد Amikacin ، Tobramycin و Streptomycin فكانت نسب المقاومة لها هي 20.5% ، 55.1% و 48.8% وعلى التوالي ، إذ نلاحظ وجود اختلاف في مضادات هذه المجموعة من حيث تأثيرها على العزلات قيد الدراسة جدول (4–6) وهذا مقارب مع ما أشارت إليه الموسوي (2006) التي وجدت أن نسبة المقاومة لمضاد Tobramycin هي 46% ، في حين لم تتفق دراستنا مع ما توصلتا إليه كل من محفوظ (2002) و الموسوي (2006) إذ وجدتا ان عزلاتهما قاومت مضاد Streptomycin بنسبة 65.5% و66% وعلى التوالي .

كما بينت النتائج ان عزلاتنا ابدت مقاومة ضعيفة تجاه مضاد Amikacin إذ بلغت 31.7% ، 8.7% ، 6.7% و 17.6% لكل من بكتريا *Staph. aureus* ، *Staph. epidermidis* ، *S. pyogenes* و *S. pneumoniae* وعلى التوالي ، بينما ابدت مجموعة Viridans Streptococci group حساسية تامة لهذا المضاد . وهذا مقارب لما توصلت إليه العبسي (2009) إذ ان عزلاتها العائدة لـ *S. pyogenes* و *S. pneumoniae* قد قاومت هذا المضاد بنسبة 10% و 20% وعلى التوالي ، في حين لم تتفق نتائجنا معها فيما يخص عزلاتها التابعة لـ *Staph. aureus* التي قاومت هذا المضاد بنسبة 11.8% ، بينما أبدت عزلاتها التابعة لـ *Staph. epidermidis* حساسية تامة لهذا المضاد .

تعمل هذه المضادات على تثبيط تصنيع البروتين داخل الخلية وذلك لقدرتها على الارتباط بتحت الوحدة الصغيرة للرايبوسوم small subunit (30 S) مؤدية إلى قراءة خاطئة لشفرات الحامض النووي الرسولي mRNA الامر الذي ينتج بروتينات غير ضرورية أو ذات تأثير قاتل للخلية البكتيرية (Franklin and Snow, 2005) .

إن المقاومة لمضادات Aminoglcosides أخذت بالتزايد وبشكل ملحوظ في الفترات الأخيرة وهذه المقاومة ناتجة عن انتاج إنزيمات من قبل البكتريا المقاومة تقوم بتحوير المضاد وبالتالي يفقد فعاليته أو تأتي كنتيجة لفقدان بعض بروتينات الغشاء الخارجي مما يقلل من نفاذية المضاد إلى داخل الخلية(Mims *et al* ., 2004) ، كما يمكن ان تقاوم البكتريا هذه المجموعة من المضادات من خلال حدوث تغيير في تحت الوحدة الرايبوسومية 30S التي يرتبط بها المضاد ويؤدي هذا التغيير إلى تقليل أُلفة المضاد لها وبالتالي إلى مقاومة الخلية البكتيرية (Mingeot-Leclereq *et al*.,1999) ،

بالرجوع إلى الجدول (4–6) يتبين إن عزلات هذه الدراسة اظهرت مقاومة ضعيفة جداً تجاه مضادات مجموعة Quinolones المتمثلة بمضاد Ciprofloxacin إذ بلغت 4.7% ، كانت نسبة مقاومة بكتريا *Staph. aureus* و *S. pyogenes* هي 7.9% و 6.7% وعلى التوالي ، في حين اظهرت كل من بكتريا *Staph. epidermidis* ، *S. pneumoniae* ومجموعة Viridans Streptococci حساسية تامة تجاه هذا المضاد . ان هذه النتيجة جاءت متوافقة مع ما توصل اليه العامري (2005) الذي بين ان بكتريا *Staph. aureus* و *S. pyogenes* أظهرتا مقاومة ضعيفة تجاه هذا المضاد بلغت 9.9% و 20% وعلى التوالي ، بينما ابدت عزلاته التابعة لكل من بكتريا *Staph. epidermidis* ، *S. pneumoniae* ومجموعة Viridans Streptococci حساسية تامة تجاه هذا المضاد . في حين لم تتفق نتائج دراستنا مع ما توصلت اليه الموسوي (2006) التي قاومت عزلاتها العائدة لـ *Staph. aureus*

هذا المضاد بنسبة 46%. ان سبب حساسية البكتريا لهذا المضاد قد يعزى إلى ان العزلات المحلية لم تطور مقاومة عالية لهذا المضاد بسبب محدودية استعماله في القطر و لأنه من المضادات واسعة الطيف . كما ان هذا المضاد يعمل على تثبيط عمل انزيم DNA gyrase المسؤول عن فك الألتفاف الحلزوني للـ DNA ويضمن تباعدهما اثناء عملية استنساخ الـ DNA (Brooks *et al.*, 2001).

تقاوم البكتريا الموجبة لصبغة غرام مضادات مجموعة الكوينولونات من خلال تغيير انزيمات هدف المضاد DNA gyrase أو Topoisomerase IV اعتمادا على تركيب الكوينولون ، وهي الآلية الأكثر شيوعا ، إذ أثبتت عدد من الدراسات أن حصول الطفرات في جين *gyrA* يؤدي إلى تغييرات في تكوين موقع ارتباط المضاد أو شحنته أو الأثنين معاً مما يؤثر على ارتباط الكوينولون بإنزيم DNA gyrase (Hooper, 1998) . كما ان حدوث طفرات في الجينات المشفرة لأنزيم Topoisomerase IV يؤدي إلى مقاومة الكوينولونات كما في بكتريا *Staph. aureus* (Franklin and Snow, 2005) .

يتضح لنا من الجدول (4–6) أن مضاد CO-Trimoxazolie (وهو توليفة تتمثل بمضاد التراي ميثوبريم مع سلفاميثاكسازول) قد قاومته العزلات قيد الدراسة بنسبة 41.7% توزعت على 52.4% ، 34.8% ، 40% ، 23.5% و 22.2% لكل من بكتريا *Staph. aureus* ، *Staph. epidermidis* ، *S. pyogenes* ، *S. pneumoniae* ومجموعة Viridanis Streptococci وعلى التوالي ، وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه العبسي (2009) إذ قاومت عزلاتها التابعة لـ *S. pyogenes* هذا المضاد بنسبة 20% . كما كانت النتائج مقاربة لما وجده العامري (2005) إذ بلغت نسبة مقاومة عزلاته 54.5% و 33.3% لكل من بكتريا *Staph. aureus* و *Staph. epidermidis* وعلى التوالي . في حين لم تتفق النتائج معه فيما يخص كل من بكتريا *S. pyogenes* و *S. pneumoniae* ومجموعة Viridanis Streptococci التي بلغت نسبة مقاومتها لهذا المضاد 50% ، 33.3% و 37.5% وعلى التوالي .

تكون مقاومة البكتريا لهذا المضاد عن طريق إنتاجها نوعاً آخر من إنزيم Dihydrofolate reductase يكون أكثر مقاومة لفعل العامل المضاد من الإنزيم الطبيعي (Kohler *et al.*,1996) ، الذي يشفر عن طريق جينات محمولة على البلازميد الذي يحل محل الإنزيم الكروموسومي لذلك فإن الخلية البكتيرية سوف تستمر في المسلك البايوكيميائي بوجود هذا الدواء ، الذي يقود إلى إنتاج حامض الفولك (Dever and Dermody,1991) .

كما أظهرت هذه الدراسة ان العزلات قيد الدراسة قد قاومت مضاد Tetracycline بنسبة 63.8% وكانت نسبة مقاومة كل من بكتريا *Staph. aureus* ، *Staph. epidermidis* ، *S. pyogenes* و *S. pneumoniae* ومجموعة Viridanis Streptococci هي 71.4% ، 47.8% ، 66.7% ، 76.5% و 22.2% وعلى التوالي . وبذلك جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه علي (2006) التي أظهرت عزلاتها التابعة لـ *Staph. aureus* و*S. pyogenes* نسبة مقاومة لهذا المضاد بلغت 75% و 60% وعلى التوالي ، كما جاءت النتائج متوافقة ايضاً مع ما وجده إبراهيم (2002) بأن نسبة مقاومة بكتريا *Staph. epidermidis* لهذا المضاد كانت 46.6% ، في حين لم تتوافق النتائج مع ما توصل إليه العامري (2005) من ان نسبة مقاومة كل من بكتريا *S. pyogenes* و *S. pneumoniae* لهذا المضاد بلغت 50% و 16.7% وعلى التوالي ، إلا أنها كانت متقاربة مع ما توصل إليه نفس الباحث من إن نسبة مقاومة بكتريا مجموعة Viridans Streptococci لهذا المضاد كانت 25% .

نلاحظ وجود مقاومة عالية لمضاد التتراسايكلين على الرغم من عدم استعمال هذا المضاد في علاج أخماج الجهاز التنفسي ، وقد سجلت مقاومة البكتريا للتتراسايكلين منذ الخمسينات وتزايدت في اغلب بلدان العالم (Chopra and Roberts, 2001) ، واشارت البحوث إلى حدوث زيادة مماثلة في مقاومة بكتريا *S. pyogenes* للتراسايكلين في البلدان المجاورة إذ وجد Jassir وجماعته (2000) بان مقاومة بكتريا *S. pyogenes* المعزولة من اماكن مختلفة في ايران تزايدت من 23% في الفترة من 1989 إلى 1991 لتصل إلى اكثر من 42% عام 1997 ولوحظت هذه الظاهرة ايضاً في البرازيل وعزيت إلى الضغط الانتخابي للتتراسايكلين المستعمل في علاج الامراض المختلفة في ظهور وانتشار السلالات المقاومة التابعة لهذه البكتريا (De Melo *et al*., 2003) .

اما بالنسبة لمضاد Chloramphenicol فقد أظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة ضعيفة تجاهه إذ بلغت 11% توزعت على 14.3% ، 13% ، 6.7% و 5.9% لكل من بكتريا *Staph. aureus* ، *Staph. epidermidis* ، *S. pyogenes* و *S. pneumoniae* وعلى التوالي ، فيما أبدت بكتريا مجموعة Viridans Streptococci حساسية تامة تجاه هذا المضاد ، وقد جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه العامري (2006) من حيث المقاومة الضعيفة التي ابدتها عزلاته إذ بلغت نسبة مقاومتها لهذا المضاد 25% ، فيما ابدت عزلاته التابعة لـ *Staph. Epidermidis* حساسية تامة تجاه هذا المضاد . في حين كانت النتائج مخالفة لما توصلت اليه علي (2006) التي وجدت بأن كل من بكتريا *Staph. aureus* ،

Staph. epidermidis و *S. pyogenes* أظهرت مقاومة عالية لهذا المضاد بلغت 100% ، 76.2% و 93.3% وعلى التوالي .

ويلاحظ من نتائج هذه الدراسة حصول انخفاض كبير في مقاومة العزلات قيد الدراسة لمضاد Chloramphenicol وقد يعود سبب ذلك لندرة استخدام هذا المضاد في علاج أخماج المسالك التنفسية و الأخماج الأخرى بالنظر لمضاعفاته الجانبية إذ انخفضت نسبة المقاومة من 33.8% لدى عيسى (2000) إلى 13.33% لدى البغدادي (2006) حتى وصلت 11% في الدراسة الحالية .

أظهرت نتائج هذه الدراسة ان العزلات قيد الدراسة قد قاومت مضاد Rifampicin بنسبة 50.4% إذ تبين ان نسبة مقاومة كل من بكتريا *S. aureus* ، *Staph. epidermidis* ، *S. pyogenes* ، *S. pneumoniae* و Viridans Streptococci بلغت 52.4% ، 43.5% ، 60% ، 52.9% و 33.3% وعلى التوالي . جاءت نتائج هذه الدراسة غير متوافقة مع ما وجدت محفوظ (2002) و الموسوي (2006) إذ بلغت نسبة مقاومة عزلاتهما لهذا المضاد 80% و71% وعلى التوالي .

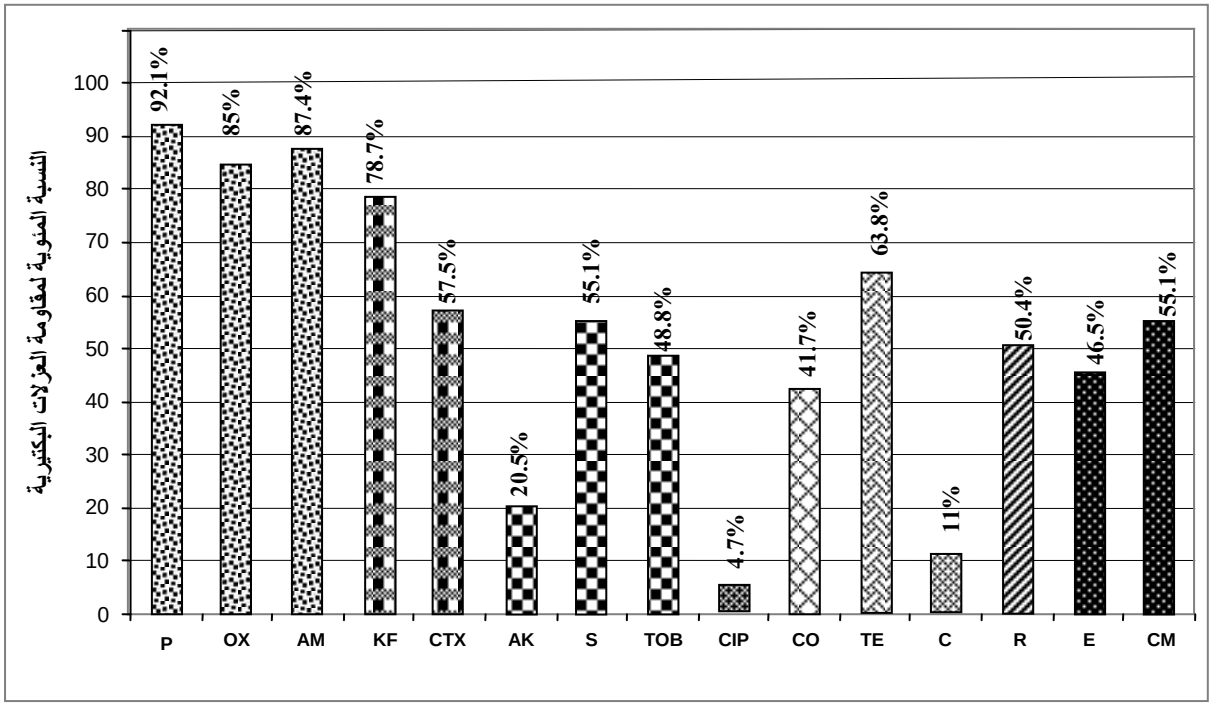
يكون أسلوب المقاومة لمضاد الريفامبسين عن طريق الطفرات الكروموسومية التي تؤدي إلى حدوث تغيرات في موقع الهدف لـ DNA dependent RNA polymerase مما يسبب في عدم قدرة مضاد الرفامبسين على الارتباط بهذا الإنزيم كما في بكتريا المكورات العنقودية (Schmitz *et al*.,2000) .

اظهرت النتائج ان نسبة المقاومة لمضادات مجموعة Macrolides المتمثلة بمضادي Erythromycin و Clindamycin هي 46.5% و 55.1% وعلى التوالي ، إذ كانت نسبة مقاومة كل من بكتريا *S. aureus* ، *Staph. epidermidis* ، *S. pyogenes* ، *S. pneumoniae* و Viridans Streptococci للمضادين هي (44.4% و 71.4%) ، (34.8% و 43.5%) ، (60% و 46.7%) ، 64.7% و 41.2%) و (33.3% و 11.1%) وعلى التوالي . جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه علي (2006) إذ بلغت نسبة مقاومة عزلاتها العائدة لـ *Staph. aureus* و *S. pyogenes* لمضاد Clindamycin هي 75% و 40% وعلى التوالي ، في حين كانت النتائج غير متوافقة لما وجدته الموسوي (2006) من ان نسبة مقاومة عزلاتها التابعة لـ *Staph. aureus* و*Staph. epidermidis* كانت 86% و 33% وعلى التوالي لمضاد Clindamycin و 82% و 33% وعلى التوالي لمضاد Erythromycin .

تتم المقاومة لهذه المجموعة من المضادات عن طريق تغيير موقع الهدف لارتباط المضاد بالرايبوسوم مما يؤدي إلى تقليل ارتباط المضاد (Hugo and Russell, 1987) ، كما يمكن ان تكون المقاومة بوساطة إنتاج إنزيمات تعمل على أسترة المضاد الحياتي مثل إنزيم Erythromycin estrase (Westh *et al*., 1991) .

طبقاً للنتائج الواردة في الملحق (7) نجد أن غالبية العزلات قيد الدراسة كان لها صفة مقاومة أكثر من مضاد حيوي إذ تتراوح بين مقاومة (13) مضاد كما في العزلة (34) العائدة لبكتريا *Staph. aureus* إلى مضاد واحد كما في العزلة (126) العائدة لبكتريا مجموعة Viridans Streptococci . إن زيادة مقاومة البكتريا للعديد من المضادات الحيوية قد يعود سببه إلى الاستعمال الواسع والعشوائي لهذه المضادات في معالجة الأخماج المختلفة ، ولكن معظم هذه الأنواع من البكتريا تشكل جزءا من النبيت الطبيعي في الجهاز التنفسي ، يؤدي تعرضها المستمر للمضادات الحيوية إلى انتخاب السلالات المقاومة لهذه المضادات بالإضافة إلى ازدياد فرص اكتسابها البلازميدات ذات المقاومة المتعددة من بكتريا أخرى موجودة معها في الجهاز التنفسي عن طريق الاقتران ، التحويل أو التوصيل (Wilkins *et al*., 2007) .

شكل :(4–1) النسب المئوية لمقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة



P=PenicillinG ; OX=Oxacillin ; AM=Ampicillin ; KF=Cephalothin ; CTX=Cefotaxime ;A=Amikacin ; S=Streptomycin ; TOB=Tobramycin ; CIP = Ciprofloxacin ; CO = Co-rimoxazole ; TE = Tetracycline ; C=Chloramphenicol ; R=Rifampicin ; E= Erythromycin ; CM = Clindamycin

4.4 - تحديد التركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية

تشير النتائج في جدول (4-7) و ملحق (8) إلى إبداء العزلات قيد الدراسة مقاومة عالية لمضادات مجموعة البنسلينات المتمثلة بمضاد الـ Ampicillin من خلال نمو البكتريا في تراكيز أعلى من نقطة التوقف واختلفت القيم باختلاف نوع البكتريا فتراوحت قيم MIC لبكتريا *Staph. aureus* ، *Staph. epidermidis* و *S. pyogenes* بين (8 – 1024<) ، (8 – 1024) و (512 – 1024) مايكروغرام/ ملليلتر وعلى التوالي ، في حين استطاعت جميع عزلات بكتريا *S. pneumoniae* من النمو في تركيز (1024) مايكروغرام / مل وبذلك تتفق نتائجنا في ارتفاع قيم MIC لمضاد Ampicillin مع نتائج الموسوي (2006) و الجميلي (2005) إذ أشارتا إلى ظهور مقاومة شديدة لهذا المضاد من خلال استمرار نمو عزلاتهم بتراكيز وصلت إضعاف نقطة التوقف ، إذ تراوحت قيم MIC لديهما بين (8 – 1024) و (2 – 1024<) مايكروغرام/ ملليلتر وعلى التوالي .

أما مضادات مجموعة السيفالوسبورينات المتمثلة بمضادي Cephalothin و Cefotaxime فتراوحت قيم الـ MIC لبكتريا *Staph. aureus* (512 –1024<) و (4 – 1024) مايكروغرام/ ملليلتر وعلى التوالي ، كما كانت قيم MIC لبكتريا *Staph. epidermidis* بين (8 – 1024) و (8 – 512) مايكروغرام/مل وعلى التوالي ، في حين كانت قيم MIC لبكتريا *S. pyogenes* و *S. pneumoniae* تتراوح بين (≥4 – 512) و (8 – 1024) مايكروغرام/ ملليلتر وعلى التوالي .جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع نتيجة الجميلي (2005) إذ بينت أن عزلاتها قاومت مضادي Cephalothin وCefotaxime ضمن مدى تراوح بين (2 – 1024<) مايكروغرام/ ملليلتر ، كما جاءت النتائج متوافقة مع ما توصلت إليه الموسوي (2006) التي وجدت أن قيم MIC لمضاد Cephalothin تراوحت بين (4 –1024) مايكروغرام/ ملليلتر .

ويلاحظ من الملحق (8) المقاومة الواضحة لأغلب العزلات البكتيرية وبالأخص بكتريا *Staph. aureus* التي استمر نمو عزلاتها بتراكيز وصلت أضعاف نقطة التوقف لمضاد Cephalothin إذ قاومت جميع عزلاتها هذا المضاد . إلا أن نتائجنا جاءت مخالفة لما أشار Palucha وجماعته (1999) عندما وجدوا أن عزلاتهم أظهرت مدى لمضاد Cefotaxime تتراوح بين (32 – 512) مايكروغرام/ ملليلتر . فيما أكد Paterson وجماعته (2001) أن على الرغم من إنتاج بعض العزلات للأنزيمات المحللة للسيفالوسبورينات إلا أن هنالك بعضها ما زال غير مقاوم لكل السيفالوسبورينات وهذا يتفق مع الدراسة الحالية بظهور عدد من العزلات الحساسة .

جدول (4–7) : المدى لقيم MICs للمضادات الثمان المستخدمة في الدراسة للعزلات البكتيرية

ت	المضاد الحيوي / التركيز (µg/ml) / العزلات البكتيرية	التركيز المثبط الأدنى للمضاد الحيوي µg/ml							
		Ampicillin	Cephalothin	Cefotaxime	Amikacin	Ciprofloxacin	Tetracycline	Chloramphenicol	Erythromycin
		>32	>16	>32	>32	>4	>16	>16	>8
1	*Staph. aureus*	>1024 - 8	>1024 - 512	1024 - 4 ≥	512 - 8	128 -4 ≥	512 - 8	512 - 8	1024 - 4 ≥
2	*Staph. epidermidis*	1024 - 8	1024 - 8	512 - 8	256 - 4 ≥	4 ≥	512 - 8	512 - 8	512 - 4 ≥
3	*S. pyogenes*	1024 - 512	512 - 4 ≥	1024 - 8	128 - 4 ≥	64 - 4 ≥	1024 - 8	128 - 8	512 - 4 ≥
4	*S. pneumoniae*	> 1024	512 - 4 ≥	1024 - 8	256 - 4 ≥	4 ≥	1024 - 8	16 - 4 ≥	512 - 32
	المدى الكلي	>1024 - 8	>1024 - 4 ≥	1024 - 4 ≥	512 - 4 ≥	128 -4 ≥	1024 - 8	512 - 4 ≥	1024 - 4 ≥

Staphylococcus aureus = Staph. aureus *Staphylococcus epidermidis = Staph. epidermidis*

Streptococcus pyogenes = S. pyogenes *Streptococcus pneumoniae = S. pneumoniae*

أما مضادات مجموعة Aminoglycosides المتمثلة بمضاد Amikacin فتراوحت قيم MIC له بين (8 – 512) ، (≥4 – 128) مايكروغرام/ ملليلتر لكل من بكتريا *Staph. aureus* و *S. pyogenes* وعلى التوالي ، بينما كانت قيم MIC لهذا المضاد بين (≥4 – 256) مايكروغرام/مل لكل من بكتريا *Staph. epidermidis* و *S. pneumoniae* . جاءت هذه النتائج مخالفة لما توصلت إليه الجميلي (2005) التي بينت أن قيم MIC لهذا المضاد تراوحت مابين (2 – 128) مايكروغرام/ ملليلتر.

فيما يخص مضاد Ciprofloxacin الذي يعود إلى مجموعة Quinolones فقد أظهرت العزلات البكتيرية قيد الدراسة قيم للـ MIC تراوحت بين (≥4 – 128) مايكروغرام/ ملليلتر، وبذلك كانت للعزلات البكتيرية حساسية أعلى لهذا المضاد مقارنة بالمضادات الأخرى التي اتسمت بارتفاع قيم MIC لها ، إذ جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصلت إليه الموسوي (2006) عندما وجدت بان عزلاتها البكتيرية أظهرت حساسية عالية لهذا المضاد إذ بلغت قيم MIC لها بين (4 – 128) مايكروغرام/ ملليلتر ، كما أشار Drago وجماعته (2001) إلى أن عزلاتهم أظهرت حساسية عالية لهذا المضاد إذ تراوحت قيم MIC لها بين (4 – 8) مايكروغرام/ ملليلتر وهي أقل بكثير من المثبتة في هذه الدراسة . كما ذُكر سابقاً قد يعود سبب المقاومة المنخفضة لمضاد Ciprofloxacin قد يعود إلى الاستعمال المحدود لهذا المضاد في القطر ولأنه من المضادات واسعة الطيف لذلك لم تتمكن العزلات قيد الدراسة من مقاومته إلا بأعداد قليلة جدا .

اما مضادا Tetracycline و Erythromycin فقد تراوحت قيم الـ MIC لهما بين (8 – 1024) و (≥4 – 1024) مايكروغرام/ ملليلتر وعلى التوالي، وبذلك جاءت النتائج متوافقة مع ما توصلت إليه الموسوي (2006) إذ أشارت إلى أن عزلاتها قاومت مضاد Erythromycin ضمن مدى تراوح بين (4 – 1024) مايكروغرام/ ملليلتر، إلا أننا نختلف معها في قيم MIC لمضاد Tetracycline التي تراوحت بين (4 – 512) مايكروغرام / ملليلتر.

أظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة ضعيفة تجاه مضاد Chloramphenicol إذ كانت قيم MIC تتراوح بين (8 – 512) ، (8 – 512) و (8 – 128) مايكروغرام/ ملليلتر لكل من بكتريا *Staph. aureus* ، *Staph. epidermidis* و *S. pyogenes* وعلى التوالي ، في حين اظهرت العزلات التابعة لبكتريا *S. pneumoniae* حساسية تامة تجاه هذا المضاد إذ تراوحت قيم الـ MIC (≥4 – 16) مايكروغرام/ ملليلتر ، جاءت هذه النتائج غير متوافقة مع ما توصلت أليه الجميلي (2005) التي أظهرت جميع عزلاتها مقاومة عالية لهذا المضاد باستثناء عزلة واحدة فقد أعطت قيمة للـ MIC اقل من نقطة التوقف وكانت (2) مايكروغرام/ ملليلتر

أما باقي العزلات فقد تراوحت قيم MIC لها بين (128 – 1024<) مايكروغرام/ ملليلتر ، وكما ذُكر سابقاً أن سبب حساسية البكتريا لمضاد Chloramphenicol قد يعود إلى ندرة استخدام هذا المضاد في السنوات الخيرة لعلاج أخماج المسالك التنفسية و الأخماج الأخرى بالنظر لمضاعفاته الجانبية .

لقد أكدت العديد من الدراسات المحلية ازدياد مقاومة البكتريا للعديد من المضادات الحيوية، وجاءت هذه الزيادة في المقاومة بوصفها نتيجة للممارسة الطبية الخاطئة في وصف المضادات الحيوية ، إذ لا توجد ضوابط أو سياقات عمل عملية تحد من هذه الظاهرة لذا يمكن للمريض أن يحصل على أي مضاد حيوي من الصيدلية من دون وصفة طبية. ويقلد تصرف الطبيب في المستشفى والعيادات الخاصة المضمدون الذين تنتشر دكاكينهم في الأحياء الشعبية. إذ نادراً ما نرى أي شخص صغيراً كان أم كبيراً يراجع المستشفى ولم يزر هذه الأماكن وقد أُعطي المضادات الحيوية قبل وصوله إلى المستشفى .

تشير النتائج في الجدول(4–7) والملحق (8) إلى وجود اختلاف كبير في قيم الـMIC للعزلات المختلفة ، وهذا يؤكد على ضرورة أجراء اختبار الـ MIC قبل إعطاء العلاج لان كل عزلة تختلف عن الأخرى في تركيز المضاد الذي تحتاج إليه وعلى هذا الأساس فكل مريض بحاجة إلى جرعة تختلف عن المريض الآخر .

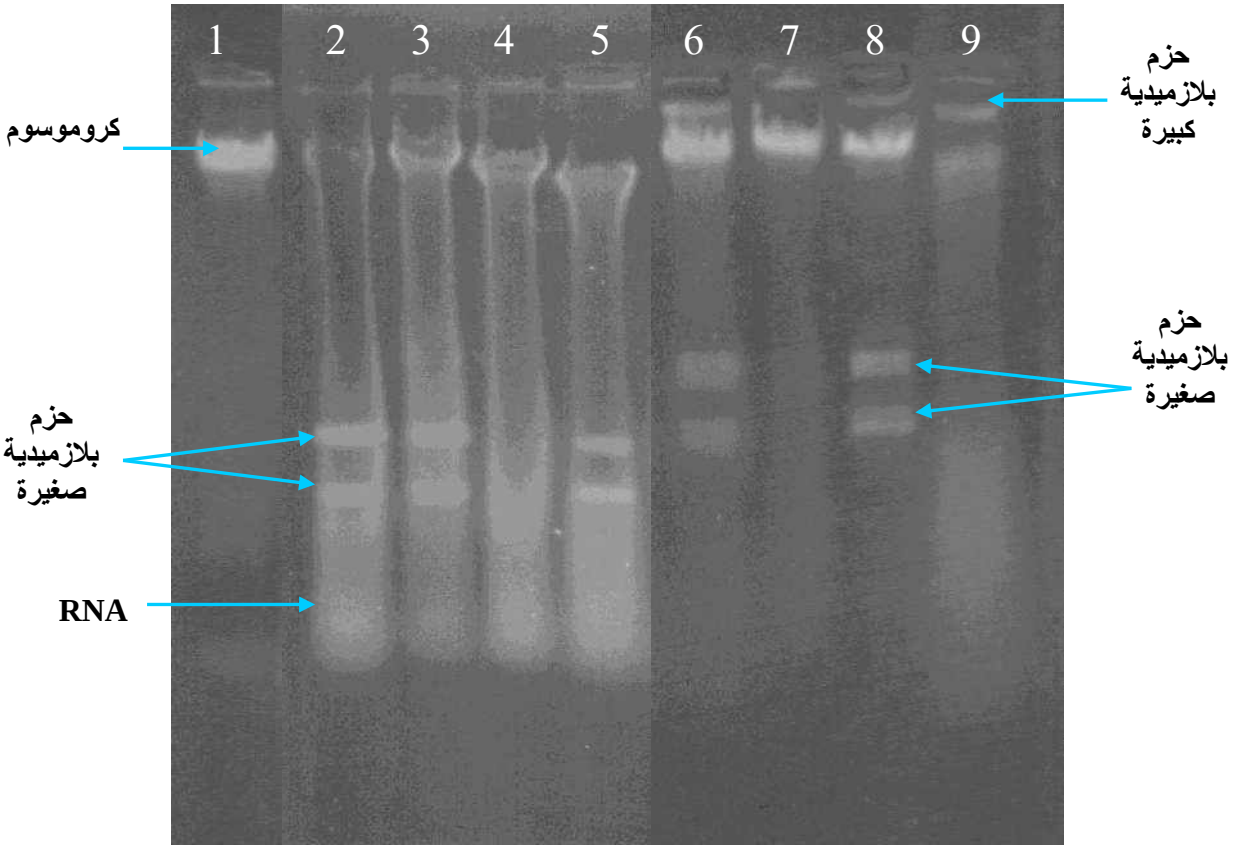
5.4- عزل الدنا البلازميدي

يبين الجدول (4–8) والشكل (4–2) المحتوى البلازميدي لبعض العزلات الموجبة لصبغة غرام المعزولة من أخماج المسالك التنفسية ، إذ أظهرت نتائج عزل الدنا DNA احتواء 10 عزلات من مجموع 16 عزلة وبنسبة 62.5% على حزم بلازميدية تراوحت بين حزمة واحدة إلى ثلاث حزم . كما أظهرت 6 عزلات خلوها من الحزم البلازميدية توزعت على عزلة واحدة لكل من بكتريا *Staph. aureus* (34) و *S. pyogenes* (95) وعزلتين لكل من بكتريا *Staph. epidermidis* (68 ، 76) و *S. pneumoniae* (102 ، 116) ، على الرغم من أنها أظهرت مقاومة متعددة للمضادات الحيوية تراوحت بين (9–13) مضاد حيوي مع إنتاج 5 عزلات منها لإنزيمات ألبيتا لاكتاميز. يمكن إن يعزى السبب في ذلك إلى كون صفة المقاومة في هذه العزلات مشفرة من قبل جينات محمولة على الكروموسوم ، إذ أشار Masuda وجماعته (2000) إلى إن جينات مقاومة مضادات ألبيتا لاكتام ومضادات أخرى ممكن إن تشفر لها محددات جينية محمولة على الكروموسوم .

جدول (4-8) المحتوى البلازميدي لبعض العزلات البكتيرية المعزولة من اخماج المسالك التنفسية وإنتاجها لأنزيم البيتالاكتاميز.

رقم العزلة	العزلات البكتيرية	عدد الحزم البلازميدية		مجموع الحزم	عدد المضادات المقاومة لها	إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز
		كبيرة	صغيرة			
17	*Staph. aureus*	-	2	2	11	+
21	*Staph. aureus*	-	2	2	12	+
34	*Staph. aureus*	خالية من البلازميدات			13	+
51	*Staph. aureus*	-	2	2	10	+
67	*Staph. epidermidis*	-	2	2	8	+
68	*Staph. epidermidis*	خالية من البلازميدات			10	+
76	*Staph. epidermidis*	خالية من البلازميدات			10	+
79	*Staph. epidermidis*	-	2	2	9	+
87	*S. pyogenes*	1	2	3	12	+
89	*S. pyogenes*	1	-	1	6	-
93	*S. pyogenes*	1	2	3	11	+
95	*S. pyogenes*	خالية من البلازميدات			10	+
102	*S. pneumoniae*	خالية من البلازميدات			10	+
109	*S. pneumoniae*	1	-	1	12	+
115	*S. pneumoniae*	1	2	3	7	+
116	*S. pneumoniae*	خالية من البلازميدات			9	-

كما لوحظ إن العزلة رقم (21) العائدة لبكتريا *Staph. aureus* قد احتوت على حزمتين بلازميديتين وأظهرت مقاومة لـ 12 مضاد حيوية وكانت منتجة لإنزيم ألبيتا لاكتاميز، في حين احتوت العزلة رقم (109) العائدة لبكتريا *S. pneumoniae* على حزمة بلازميدية واحدة وقاومت 12 مضاد حيوي وكانت منتجة لإنزيم ألبيتا لاكتاميز. إما العزلة رقم (89) العائدة لبكتريا *S. pyogenes* فقد احتوت على حزمة بلازميدية واحدة إلا أنها قاومت 6 مضادات حيوية وكانت غير منتجة لإنزيم ألبيتا لاكتاميز، وهكذا الحال بالنسبة لبقية العزلات قيد الدراسة، إذ يتضح منها عدم وجود علاقة بين عدد الحزم البلازميدية التي تحتويها وعدد المضادات التي قاومتها، وبذلك جاءت هذه النتيجة متفقة مع ما توصلت إليه كل من الموسوي (2000) ، النعيمي (2002) و الموسوي (2006) بعدم وجود علاقة بين عدد الحزم البلاميدية ومقاومة المضادات الحيوية .



شكل (4-2) الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي لبعض العزلات البكتيرية في هلام الاكاروز 0.7 وبفرق جهد 6 فولت/سم

المسار الأول : يمثل دنا السلالة البكتيرية *E.coli* MM294 الخالية من الدنا البلازميدي

المسار الثاني : المحتوى البلازميدي للعزلة *Staph. aureus* (21)

المسار الثالث : المحتوى البلازميدي للعزلة *Staph. aureus* (51)

المسار الرابع : العزلة *Staph. epidermidis* (68) خالية من البلازميدات

المسار الخامس : المحتوى البلازميدي للعزلة *Staph. epidermidis* (79)

المسار السادس : المحتوى البلازميدي للعزلة *S. pyogenes* (87)

المسار السابع : العزلة *S. pyogenes* (95) خالية من البلازميدات

المسار الثامن : المحتوى البلازميدي للعزلة *S. pneumoniae* (115)

المسار التاسع : المحتوى البلازميدي للعزلة *S. pneumoniae* (109)

كما أظهرت النتائج إن معظم العزلات البكتيرية التي امتازت باحتوائها على الحزم البلازميدية قادرة على إنتاج إنزيم ألبيتا لاكتاميز (9 عزلات منتجة لإنزيم ألبيتا لاكتاميز وحاوية على حزم بلازميدية من اصل 10 عزلات كانت حاوية على حزم بلازميدية) وبنسبة 90% مما يشير إلى إمكانية إن تكون الجينات المشفرة لهذه الإنزيمات في هذه العزلات محمولة على البلازميد ، وهذا ما سبق وذكره Marchandin وجماعته (2000) من إن إنزيمات ألبيتا لاكتاميز يمكن أن تُشفْر من محددات جينية محمولة على البلازميد .

من النتائج المهمة التي ظهرت احتواء جميع العزلات التابعة لبكتريا *S. pyogenes* و *S. pneumoniae* (البالغ عددها 5 عزلات من اصل 10 عزلات حاوية على حزم بلازميدية) وبنسبة 50% على حزم بلازميدية كبيرة الحجم جدول (4-8) وغالباً ما تكون مثل هذه البلازميدات من النوع الاقتراني وتكون مسؤولة عن صفة المقاومة المتعددة لمضادات الحيوية فضلاً عن مقدرتها على نقل هذه المقاومة بين العزلات المختلفة . إذ أشار الباحث Weller وجماعته (1997) إلى مسؤولية بلازميدات اقترانية كبيرة يصل حجمها إلى 58 كيلو زوج قاعدي على المقاومة المشتركة للمضادات ألبيتا لاكتام ومجموعة الامينوكلايكوسايد ومضاد Tetracycline في عزلات *K. pneumoniae* من النتائج الأخرى التي سجلت احتواء جميع العزلات التابعة لبكتريا *Staph. aureus* ، *Staph. epidermidis* ، عزلتان لبكتريا *S. pyogenes* و عزلة واحدة تابعة لبكتريا *S. pneumoniae* (8 عزلات من اصل 10 عزلات حاوية على حزم بلازميدية) بنسبة 80% كانت حاوية على حزمتين بلازميديتين يعتقد بانها متقاربة في إحجامها بشكل كبير لهجرتها المتشابهة في هلام الاكاروز ، ويشير وجود مثل هذه البلازميدات المتماثلة إلى مدى التقارب بين هذه العزلات مما يعطي مؤشراً وبائياً جزئياً حول انتشار البكتريا في مجتمعنا الصحي . جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما توصل إليه جاسم (2006) من وجود تشابهاً في المحتوى البلازميدي التابعة لكل من بكتريا *Staph. aureus* و *Staph. epidermidis* اذ احتوت كل عزلة على حزمتين بلازميديتين كانت هجرتهما متشابهة في هلام الأكاروز .

6.4 - **الاقتران البكتيري** Bacterial Conjugation

أجريت عملية الاقتران البكتيري لـ (6) عزلات ثبت احتوائها على حزم بلازميدية بعد أجراء عزل ألدنا وترحيلها كهربائياً كما امتازت هذه العزلات بحساسيتها لمضاد الريفامبسين وعدت هذه العزلات كخلايا واهبة Donor cells. استخدمت السلالة القياسية *E.coli* MM294 كسلالة مستلمة recipient cell ، والتي تتصف بكونها خالية من

البلازميد وعوامل التقييد ومقاومة للريفامبسين بتركيز 100 مايكروغرام / ملليلتر وحساسة لبقية المضادات. انتخبت المقترنات على الأوساط الانتقائية الحاوية على المضادين الحيويين الريفامبسين والامبسلين بتركيز نهائي 100 مايكروغرام / ملليلتر لكلا المضادين، حيث استخدم مضاد الريفامبسين لمنع ظهور العزلات الواهبة والسماح للعزلات المقترنة فقط بالنمو إذا تمكنت من التعبير عن عامل المقاومة الذي جرى انتخابه متمثلاً بمضاد الامبسلين .

أظهرت النتائج فشل جميع العزلات في عملية الاقتران بالرغم من احتوائها على حزم بلازميدية . كررت هذه العملية لثلاث مرات وعلى الرغم من ذلك لم يتم الحصول على مستعمرات مقترنة ، وربما يعزى سبب ذلك إلى عدم امتلاك هذه العزلات إلى البلازميدات الاقترانية التي يمكن من خلالها انتقال المحددات الوراثية المسؤولة عن صفة المقاومة للمضادات الحيوية كما سبق وأشار لمثل هذه الملاحظة في دراستهم كل من Danel وجماعته (1999) ، الموسوي (2006) و البغدادي (2006). أو قد تكون البلازميدات ذات طبيعة اقترانية لكنها فشلت بالاقتران بسبب حاجز النوع ووجود اختلافات كبيرة بين الجنسين الواهب والمستلم ، أو قد تكون البلازميدات لها القدرة على الانتقال بالاقتران بين الأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة غرام فقط ، فقد أشار كل من Clewell (1981) و Schaberg and Zervos (1986) إن الاقتران في المكورات الموجبة لصبغة غرام وبعكس البكتريا السالبة لا يعتمد على تكوين جسور الاقتران أو الأهلاب (Pili) وإنما يعتمد على حصول التماس المباشر بين الخليتين الواهبة والمستلمة. ومن الممكن أن تكون هذه البلازميدات قابلة للنقل بطرق أخرى غير الاقتران مثل التحول الوراثي Transformation أو النقل بالعاثي Transduction .

7.4 - **التحول الوراثي** Transformation

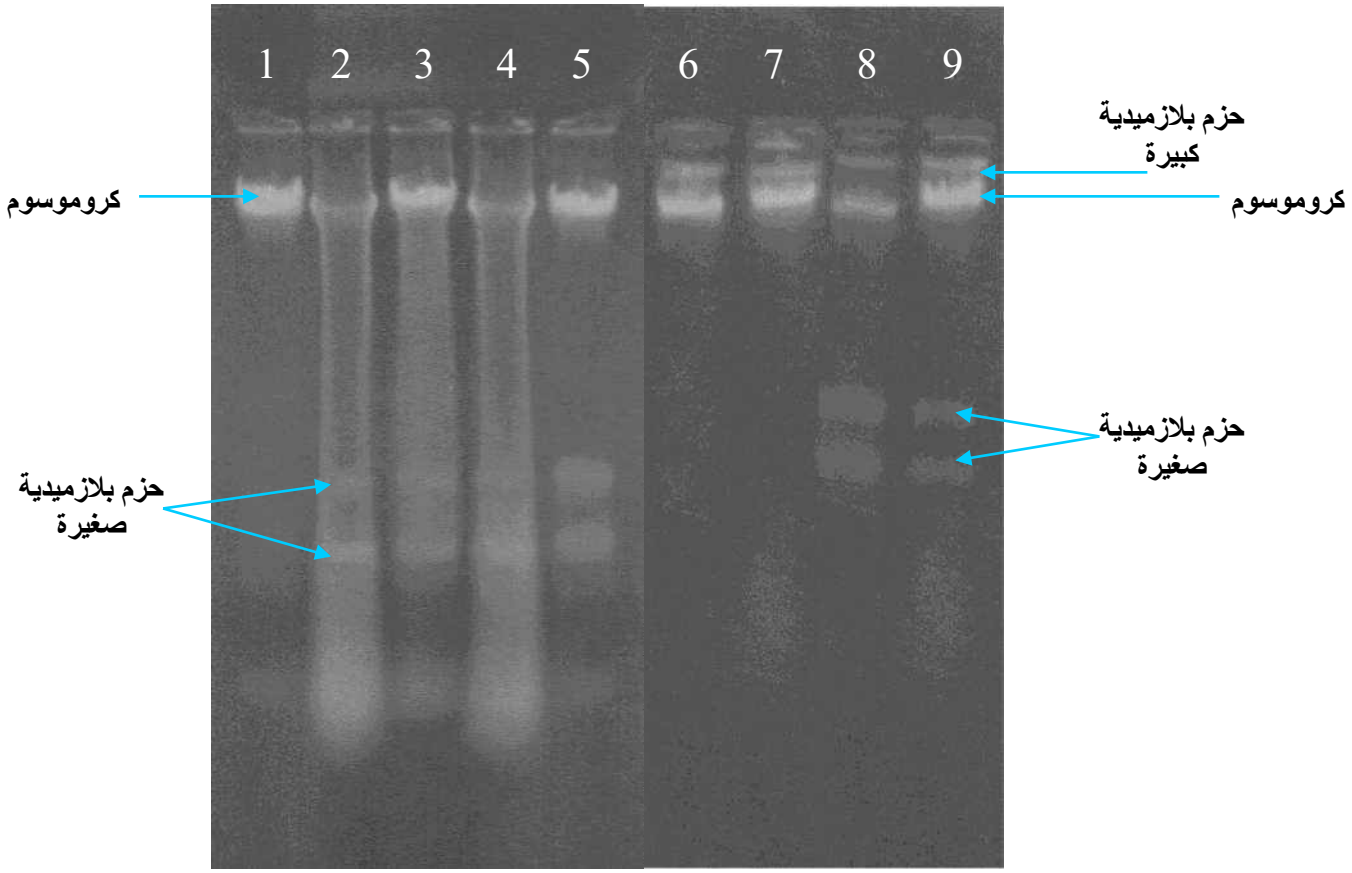
لوحظ من خلال نتائج الإقتران البكتيري السابق فشل جميع البلازميدات العائدة للعزلات البكتيرية قيد الدراسة في الانتقال إلى الخلية المستلمة ، فكان لابد من إجراء خطوة التحول الوراثي باستعمال الدنا المستخلص من 4 عزلات تابعة لكل من بكتريا *Staph. aureus* (17) ، *Staph. epidermidis* (67) ، *S. pyogenes* (89) و *S. pneumoniae* (115) كسلالات واهبة Doners والخلايا المؤهلة للعزلة القياسية *E. coli* MM294 الخالية من البلازميدات كسلالة مستلمة Reciepent ، فأمكن الحصول على مستعمرات متحولة على الأوساط الانتقائية الحاوية على بعض المضادات الحيوية التي قاومتها العزلة الواهبة .

جدول (4–9) مقاومة المضادات الحيوية وإنتاج إنزيم البيتالاكتاميز لكل من الخلايا الواهبة والمتحولة

رقم العزلة ونوعها	صفة مقاومة المضادات الحيوية وإنتاج إنزيم البيتالاكتاميز لكل من		تردد التحول
	الخلايا الواهبة	الخلايا المتحولة	
(17) *Staph. aureus*	P – OX – AM – KF – CTX – S – TOB – CIP – CO – E – CM - β-Lac$^+$	P –AM –E – CM - β-Lac$^+$	**10^{-4} × 4.5**
(67) *Staph. epidermidis*	P – OX – AM – KF – CTX – S – TE - CM - β-Lac$^+$	P – OX – AM –TE - β-Lac$^+$	**10^{-3} × 2.3**
(89) *S. pyogenes*	P – OX – AM – CTX –TE - E	OX – AM –E	**10^{-5} × 7.5**
(115) *S. pneumoniae*	P – OX – AM – KF – CTX –TE – E - β-Lac$^+$	P – OX – AM –TE – E - β-Lac$^+$	**10^{-4} ×5.6**

P : Pencillin G ; OX : Oxacillin ; AM : Ampicillin ; KF : Cephalothin ; CTX : Cefotaxime ; S : Streptomycin ; TOB : Tobramycin ; CIF : Ciprofloxacin; CO : Co-Trimoxazole ; TE : Tetracyclin ; E : Erythromycin ; CM : Clindamycin ; β-Lac$^+$: β-Lactamase positive

يوضح الجدول (4–9) والشكل (4–3) إن البلازميدين الموجودين في العزلة *Staph. aureus* (17) قد تم تحويلهما بتردد 4.5 × 10^{-4} وعبرت الخلية المتحولة مظهريا عن المقاومة لمضاد Penicillin G ، Ampicillin ، Erythromycin ، Clindamycin فضلا عن انتاجها لانزيم البيتا لاكتاميز ، في حين لم تظهر صفة المقاومة لمضادات Oxacillin ، Cephalothin ، Cefotaxime ، Streptomycin ، Tobramycin ، Ciprofloxacin و Co-Trimoxazole التي كانت قد قاومتها العزلة الواهبة .



شكل (4-3) الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي للخلايا المتحولة وراثيا في هلام الاكاروز بتركيز 0.7 وبفرق جهد 6 فولت/سم

المسار الأول : يمثل دنا السلالة البكتيرية *E.coli* MM294 الخالية من الدنا البلازميدي

المسار الثاني : المحتوى البلازميدي للعزلة *Staph. aureus* (17)

المسار الثالث : يمثل المحتوى البلازميدي للخلية *E.coli* MM294 المتحولة بالبلازميدين العائدين للعزلة *Staph. aureus* (17)

المسار الرابع : المحتوى البلازميدي للعزلة *Staph. epidermidis* (67)

المسار الخامس : : يمثل المحتوى البلازميدي للخلية *E.coli* MM294 المتحولة بالبلازميدين العائدين للعزلة *Staph. epidermidis* (67)

المسار السادس : المحتوى البلازميدي للعزلة *S. pyogenes* (89)

المسار السابع : يمثل المحتوى البلازميدي للخلية *E.coli* MM294 المتحولة بالبلازميد العائد للعزلة *S. pyogenes* (89)

المسار الثامن : المحتوى البلازميدي للعزلة *S. pneumoniae* (115)

المسار التاسع : يمثل المحتوى البلازميدي للخلية *E.coli* MM294 المتحولة بالبلازميدات العائدة للعزلة *S. pneumoniae* (115)

إما الخلية المتحولة بالبلازميدين الموجودين في العزلة *Staph. epidermidis* (67) فقد عبرت مظهريا عن المقاومة للمضادات Penicillin G ، Oxacillin ، Ampicillin و Tetracycline فضلا عن إنتاجها لإنزيم ألبيتا لاكتاميز ، في حين لم تظهر الخلايا المتحولة بهذين البلازميدين لصفة المقاومة لمضادات Cephalothin ، Cefotaxime ، Streptomycin و Clindamycin التي كانت قد قاومتها العزلة الاصلية على الرغم من انتقال جميع بلازميدات السلالة الواهبة اليها ، وهذا يشير إلى أن مقاومة العزلات الواهبة لهذه المضادات غير محمولة على البلازميدات . جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه جاسم (2006) ان صفة المقاومة لمضادات Penicillin G ، Ampicillin ، Erythromycin و Tetracycline في بكتريا المكورات العنقودية محمولة على البلازميدات .

كما يبين الجدول (4–9) والشكل (4–3) إن البلازميد الموجود في العزلة *S. pyogenes* (89) قد تم تحويله بتردد 7.5×10^{-5} وعبرت الخلية المتحولة مظهرياً عن المقاومة لمضاد Oxacillin ، Ampicillin و Erythromycin ، في حين لم تُظهر الخلايا المتحولة صفة المقاومة لمضادات Penicillin G ، Cefotaxime و Tetracycline التي قاومتها العزلات الواهبة . إما الخلية المتحولة بالبلازميدات الثلاثة الموجودة في *S. pneumoniae* (115) فقد عبرت مظهريا عن المقاومة للمضادات Penicillin G ، Oxacillin ، Ampicillin ، Tetracycline و Erythromycin فضلا عن إنتاجها لإنزيم ألبيتا لاكتاميز ، إلا انها لم تُظهر صفة المقاومة لمضادات Cephalothin و Cefotaxime التي كانت قد قاومتها العزلة الأصلية على الرغم من انتقال جميع بلازميدات السلالة الواهبة اليها ، مما يشير إلى أن مقاومة العزلات الواهبة لهذه المضادات غير محمولة على البلازميدات . تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه البغدادي (2006) من ان صفة المقاومة للـ Ampicillin ، Tetracycline و Erythromycin للمسبحيات محمولة على البلازميدات . كما اشار Clewell (1981) الى انتشار البلازميدات المشفرة لمقاومة مضاد Erythromycin في مدى واسع من المسبحيات .

تم تحديد التراكيز المثبطة الدنيا MICs للمضادات الحيوية التي أبدت الخلايا المتحولة مقاومة تجاهها لملاحظة ثبات صفة المقاومة التي انتقلت بوساطة البلازميد إليها . أظهرت النتائج جدول (4–10) انخفاض قيم MIC في الخلايا المتحولة مقارنة بما هو عليه في الخلايا الأصلية الواهبة للبلازميد ، وقد يعود السبب لامتلاك العزلات الأصلية لبعض العوامل التي تساعدها في مقاومة المضادات الحيوية كالمحفظة ، حامض التايكويك ، بروتين A وبروتين M فضلاً عن اختلاف طبيعة الغلاف الخلوي للعزلات الموجبة لصبغة غرام عما موجود في السلالة

القياسية السالبة لصبغة غرام *E.coli* MM 294 وهذا ما سبق واشار اليه Goldman and Green (2009) .

جدول (4-10) التراكيز المثبطة الدنيا MIC_S لبعض المضادات الحيوية لعزلات بكتريا *E.coli* MM 294 المتحولة

Clindamycin	Erythromycin	Tetracyclin	Ampicillin	Oxacillin	Pencillin G	المضاد الحيوي (µg/ml) / رقم العزلة
64	1024	–	>1024	–	1024	**(17) *Staph. aureus***
16	**128**	**–**	**226**	**–**	**512**	***E.coli* MM 294 Sa (17)**
–	–	256	256	128	1024	**(67) *Staph. epidermidis***
–	–	**64**	**64**	**32**	**256**	***E.coli* MM 294 Se (67)**
–	128	–	1024	512	–	**(89) *S. pyogenes***
–	**64**	–	**512**	**128**	–	***E.coli* MM 294 Sp (89)**
–	128	128	1024	1024	512	**(115) *S. pneumoniae***
–	**32**	**64**	**256**	**512**	**256**	***E.coli* MM 294 Sn (115)**

E.coli* MM 294 Sa (17)** = العزلة المتحولة ببلازميدات العزلة **(17) *Staph. aureus
E.coli* MM 294 Se (67)** = العزلة المتحولة ببلازميدات العزلة **(67) *Staph. epidermidis
E.coli* MM 294 Sp (89)** = العزلة المتحولة ببلازميدات العزلة **(89) *S. pyogenes
E.coli* MM 294 Sn (115)** = العزلة المتحولة ببلازميدات العزلة **(115) *S. pneumoniae

8.4 - الاستنتاجات

1. إن البكتريا الموجبة لصبغة غرام أكثر انتشارا لأخماج المسالك التنفسية من البكتريا السالبة لصبغة غرام، وان بكتريا *Staph. aureus* أكثرها ورودا في هذه الإصابة.
2. للإصابة بداء السكري دور كبير في زيادة الفرصة للإصابة بأخماج المسالك التنفسية.
3. تزايد وجود البكتريا الانتهازية *M. catarrhalis* في مجموعتي الأشخاص المصابين وغير المصابين بداء السكري.
4. امتلاك العزلات البكتيرية للعديد من عوامل الضراوة، والتي تعزز قدرتها على إحداث الإصابة، ومنها أنتاج الهيمولايسين، أنزيم ألبيتا لاكتاميز، امتلاك المحفظة والقدرة على الالتصاق بالخلايا الظهارية المبطنة للمسالك التنفسية.
5. أظهرت العزلات البكتيرية مقاومة متعددة لعدد من المضادات الحيوية المدروسة إذ أظهرت مقاومة عالية لمضادات البيتالاكتام ومقاومة متوسطة لكل من Streptomycin ، Tobramycin ، Co-Trimoxazole ، Tetracycline، Rifampicin ، Erythromycin و Clindamycin ، في حين اظهرت حساسية عالية لكل من Ciprofloxacin ، Chloramphenicol و Amikacin.
6. احتواء العزلات البكتيرية على حزم بلازميدية تراوحت بين 1-3 حزم بلازميدية تحمل صفة المقاومة لبعض المضادات الحيوية ، ولا توجد علاقة محددة بين عدد الحزم البلازميدية للأنواع البكتيرية ومقاومتها للمضادات الحيوية.
7. أكدت تجارب الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز تشابه المحتوى البلازميدي لبعض العزلات قيد الدراسة.
8. أظهرت نتائج التحول الوراثي بان صفة المقاومة لمضادات PenicillinG ، Oxacillin ، Ampicillin ، Erythromycin وTetracycline فضلا عن إنتاج إنزيم ألبيتا لاكتاميز محمولة على البلازميدات في العزلات قيد الدراسة.

9.4 - التوصيات

1. إجراء الزرع البكتريولوجي وفحص الحساسية للمصابين بأخماج المسالك التنفسية تجنباً لإعطاء المضادات بشكل عشوائي ومنعاً لحدوث المقاومة مستقبلاً ، مع التأكيد على ضرورة تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC للمضادات الحيوية قبل إعطاء العلاج لان كل عزلة تختلف عن الأخرى في تركيز المضاد الذي يعالجها وعلى هذا الأساس فكل مريض بحاجة إلى جرعة تختلف عن المريض الأخر .
2. إجراء دراسة موسعة على إمراضية الأنواع البكتيرية على الحيوانات المختبرية في مناطق الجهاز التنفسي العلوي و السفلي ودراسة التأثيرات النسيجية عليها .
3. تثبيت الخارطة الوراثية للأجناس البكتيرية المسببة لأخماج الجهاز التنفسي على مستوى محافظة الديوانية من اجل وضع قاعدة بيانات تختزل الجهد والوقت للوصول الى أفضل الحلول لهذه المشكلة.
4. دراسة قابلية انتقال البلازميدات بين سلالات النوع الواحد أو بين سلالات الأنواع المختلفة التابعة لكل من بكتريا *Staphylococcus* spp. و *Streptococcus* spp. من خلال عملية الاقتران البكتيري .

المصادر

REFERENCES

المصادر العربية

إبراهيم، حسنين خليل. (2002). دراسة مقارنة الاحياء المجهرية المعزولة من مرضى التدرن الرئوي ومرضى مصابين بامراض تنفسية اخرى. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بابل.

البغدادي، إسراء عدنان ابراهيم. (2006). دراسة بكتريولوجية ووراثية للمسبحيات المعزولة من الجهاز التنفسي العلوي. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بابل.

الجبوري، سوسن ساجد. (1997) . دراسة وراثية وجزيئية لأنزيم البينالاكتاميز المنتج من البكتريا السالبة لصبغة غرام المعزولة محلياً. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

الجشاعة، فضل أحمد سعيد. (2001) . دراسة علاقة مقاومة عزلات بكتريا ***Pesudomonas aeruginosa*** للمضادات الحيوية مع إنتاجها للبايوسين. رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

الجميلي، هيفاء محمود فهد. (2005) . دراسة بكتيريولوجية لمرضى زرع الكلى في بعض مستشفيات بغداد . رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

الراوي، خاشع محمود و خلف الله، عبد العزيز محمد. (2000). تصميم وتحليل التجارب الزراعية، دار الكتب للنشر. جامعة الموصل.

السعيد، محمد صبري. (1997). النسق الوراثي لبكتريا الجهاز التنفسي الهوائية. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة بغداد.

العامري، عباس عطية حمودي. (2005). دراسة الإصابات البكتيرية في الجهاز التنفسي لمرضى زرع الكلية. رسالة ماجستير. كلية التربية ابن الهيثم. جامعة بغداد.

العبسي، سميرة عجير جريمخ. (2009). دراسة بعض البكتريا المكونة للأغشية الحيوية على سطوح مينا الأسنان. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة القادسية.

الفيصل، عبد الحسين. (1999). الهندسة الوراثية، دار الشروق للنشر والتوزيع، رام الله – المنارة.

المسلماوي، ذكرى عدنان. (1999). دراسة مصلية للمكورات العنقودية الذهبية المحفظة المعزولة من مرضى مستشفيات الحلة. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بابل.

المعاضيدي، فرح عبد القادر سلمان. (1999). مقارنة التنميط المصلي و الهيمولايسين ومقاومة المضادات الحيوية لعزلات ايشيريشيا القولون من الخروج مع تلك المعزولة من بعض الحالات المرضية. رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

الموسوي، بتول كاظم سلمان. (2000). عزل وتشخيص بعض البكتريا السالبة لصبغة غرام من خمجات جروح العمليات الجراحية ودراسة التأثير الخلطي للمضادات الحيوية (دراسة وراثية). رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

الموسوي، أزهار نوري حسين. (2006). العزل والتثبيت الوراثي للخمج البكتيري والفطري في المسالك البولية وعلاقته بمرض السكري بين النساء الحوامل في محافظة القادسية. اطروحة دكتوراه. كلية التربية. جامعة القادسية.

الميسري، محمد فضل سالم. (2002). دراسة بكتيريولوجية، وراثية وبائية عن بعض عصيات القولون المسببة للأسهال في الاطفال في بعض مستشفيات عدن. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

الناصري، اسامة ناظم نجرس. (2002). دراسة بكتيرية وكيموحيوية وجزيئية للمكورات العنقودية الذهبية ***Staphylococcus aureus***. اطروحة دكتوراه، الجامعة المستنصرية، كلية العلوم.

النعيمي، ابتهال محمد زاهد. (2002). الأخماج البولية عند النساء الحوامل. رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

بيومى، رضا احمد. (2008). أسس علم الأحياء الدقيقة. الطبعة الأولى، مكتبة الأنجلو، القاهرة، مصر .

جاسم، نهاد كاظم. (2006) . دراسة بكتريولوجية ووراثية للعنقوديات السالبة للأنزيم المختثر لبلازما الدم . رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بابل.

علي، علياء موسى. (2006). عزل وتشخيص بعض البكتريا والخمائر المرافقة لبعض امراض الفم في مدينة الناصرية واختبار حساسيتها الدوائية. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة ذي قار.

عيسى، مي طالب فليح. (2000). دراسة على أنزيم الـ Cystein protease المنتج من بكتريا ***Streptococcus pyogenes***. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم. جامعة بغداد.

محفوظ، ندى نزار خضر. (2002). دراسة بكتريولوجية، جزيئية وسايتولوجية لبعض جراثيم ***Enterobacter*** المعزولة من التهاب المجاري البولية. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

مرقبي، شذى. (1999). دراسة مختبريه للأخماج الجرثومية التنفسية لمرضى وحدة العناية المشددة. مجلة بحوث جامعة حلب، سلسلة العلوم الطبية، العدد 38: ص 337 – 339 .

مفتن، فاطمة حسن. (2000). انتشار ضراوة بكتريا الكلبسلا المعزولة من التهابات المجاري البولية في الإنسان ودراسة محتواها البلازميدي. رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

نادر، أوس إبراهيم سليمان. (2005). دراسة جرثومية للنوعين ***Haemophilus parainfluenzae*** و ***Haemophilus aphrophilus*** المعزولين من المرضى المصابين بإصابات الجهاز التنفسي العلوي في مدينة الموصل. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة تكريت.

المصادر الأجنبية

Abraham, S. N.; Beachey, E. H. and Simpson, A. W. (1983). Adherence of ***Streptococcus pyogenes*** , ***Escherichia coli*** and ***Pseudomonas aeruginosa*** to fibronection- coated and uncoated epithelial cells. J. Infect., 41: 1261-1268.

Ahmed, K.; Matsumoto, K.; Rikitomi, N. and Nagatake, T. (1996). Attachment of ***Meraxella catarrhalis*** to pharyngeal epithelial cells is mediated by aglycosphingolipid receptor FEMS. Microbiol. Lett., 135: 305-309.

Alexander, S. K.; Strete, D. and Niles, M. J. (2004). Laboratory Exercises in Organismal and Molecular Microbiology. The McGraw−Hill Companies. USA.

Ambler, R. P. (1980). The structure of β-lactamase. Philos Trans. R. Soc. London. Biol. Sci., 289: 321-331.

American Diabetes Association (ADA). (2009). Clinical Practice Recommendations . Vol :1 . Supplement :1 . Diabetes Care . USA .

Ananthanarayan, R. And Paniker, C. K. (1997). Textbook of Microbiology. 5th ed., Orient Longman., pp: 187-197.

Arakawa, Y.; Murakami, M.; Suzuki, k.; Ito, H.; Wacharotayankun, R.; Ohsuka, S.; Kato, N. and Ohta, M. (1995). A novel integron-like element carrying β-lactamase gene bla imp. J. Antimicrob. Agents Chemother., 39: 1612-1615.

Ashbaugh, C. D.; Warren, H. B.; Carey, V. J. and Wessels, M. R. (1998). Molecular analysis of the role of the Group A Streptococcal Cysteine Protease, Hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft-tissue infection. J. Clin. Invest. 102(3): 550-560.

Atlas, R. M. (1995). Principle of microbiology. 1st ed . Mosby-Year book company. USA.

Atlas, R. M. (2004). Handbook of Microbiological Media. 3ed ed. CRC Press LLC. USA.

Baddley, J. W.; Pappas, P. G.; Smith, A. C. and Maser, S. A. (2003). Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. J. Clin. Microbiol., 41(12): 5525-5529

Bagley, S. T.; Seidler, R. J.; and Brenner, D. J. (1981). ***Klebsiella planticola***. Nov: a new species of enterobacteriaceae found primarily in non - clinical environments. J. Curr. Microbiol. 6: 105-109.

Baquero, F. and Loza, E. (1994). Antibiotic resistance of microorganisms involved in ear, nose and throat infections. Pediatr. J. Infect. Dis., 13(1): S9-14.

Barker, J.; Gratten, M.; Riley, I.; Lehman, D.; Montangomery, I.; Kajoi, M.; Smith, D.; Marshall, T. and Alpers, M. (1989). Pneumonia in children in the Eastern Highlands of Popua New Guinea; A bacteriological study of patients selected by standard clinical criteria. J. Infect. Dis., 154(2): 348-352 .

Baron, E. J.; Peterson, L. R.; and Finegold, S. M. (1999). Diagnostic Microbiology. 9th ed. Baily and Scott's. The Mosby company, New York.

Baron, S. (2001). Medical Microbiology.4th ed . The University of Texas Medical Branch.

Bath, K.; Hegde, B. K. and Shivananda, P. G. (1994). Effect of trace metals on production of exoprotein and β-Lactamase by ***Staphylococcus aureus***. Indian. J. Experimental Biology. 32(7): 492-494.

Benson, H. J. (2002). Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiolology. 8th ed. The McGraw−Hill Companies. USA .

Berger-Bachi, B. (1994). Expression of resistance to methicillin. Trends Microbiol. 2 : 389-393 .

Black, J. G. (1993). Microbiology–Principles and Applications. 2nd ed. Prentice Hall, New Jersey., USA.

Bootsma, H. J. (1999). General introduction: Emergence of β-lactam-resistance in ***Moraxella catarrhalis*** a bla-bla tale about brol and bro 2. Chapter.,1: 9-27.

Brath, P. T.; Grinter, N. J.; and Bradley, D. E. (1978). Conjugal transfer system of plasmid RP4 analysis by transposon 7 insertion. Mol. Gen. Genet., 133(1): 43- 52.

Brook, I. and Gober, A. E. (2005). Antimicrobiol resistance in the nasopharyngeal flora of children with acute otitis media and otitis media recurring after amoxicillin therapy. J. Med. Microbiol., 54: 83-85.

Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. (2001). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 22nd ed. Middle east Beirut Company. London.

Bush, K. (1989). Characterization of β-Lactamases. Mini-reviews. J. Antimicrob. Agents Chemother. 33(3): 259-263.

Carbino, J.; Sommer, R.; Gber, A.; Regamey, C.; Vernazaa, P.; Genne, D.; Dur, p.; Rothen, M.; Unger, J-P. and Lew, D. (2002). prospective epidemiology survey of patient with communty- acquired requiring hospitalization in Stwitzerland. lnter. J. infect. Dis., 7(2): 80-85.

Carey, R. B.; Schuster, M. G. and McGowan, K. L. (2008). Medical Microbiology for The New Curriculum. John Wiley and Sons Company. England.

Carpenter, P. L. (1977). Microbiology. 4th ed. W. B. Saunders Company Philadelphia. London. Toronto., pp: 209.

Chopra, I. and Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. MMWR., 65: 232-260.

Christopher, R. W.; Edward, l. and Bonchier, I. (1991). Antibiotic chemotherapy: in Davidson's principles practice of medicin. l6th ed. Churchill Living stone. Edinburgh. London., pp: 193-199.

Chuanchune, R.; Beinlick, K.; Hoang, A. T; Becher, A. and Schweizer, R. K. (2001). Cross-resistance between Triclosan and antibiotics in ***Pseudomonas aeruginosa*** is mediated by multidrug efflux pumps: Exposure of a suscepitble mutant strain to Triclosan select nfx mutants over expressing MexCD-Opr. J. Antimicrob. Agents Chemother., 45(2): 428-432 .

Clewell, D. B. (1981). Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus ***Streptococcus***. Microbiol. Rev., 45: 409-436.

Cohn, L. A.; Weber, A.; Phillips, T. and Lory, S. (2001). ***Pseudomonas aeruginosa*** infection of respiratory epithelium in a cystic fibrosis Xenograft model. J. Infect. Dis., 15: 1-13.

Collee, G. J.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology. 14th ed. Churchill Livingstone., pp: 449-455.

Collins, C. H. and Lyne, P. M. (1985). Microbiological Methods. Butterworth and Co. Publishers Ltd. London., pp: 306-307.

Constantinescu, M. D.; Bocchini, J. A. and Maria D. M. (2004). ***Moraxella catarrhalis*** infections. www.emedicine.com/ ed/topic1500.htm.

Corren, J.; Togias, A. And Bousguet, J. (2003). Upper and Lower Respiratory Disease. Marcel Dekker, Inc. New York. USA.

Cruickshank, R.; Duguid, J. P.; Mormion, B. P. and Swain, R. H. A. (1975). Medical Microbiology. Vol. 2, 12th ed. Edinburgh. Churchil Livingstone. London.

Daad, H. A. (2000). Urinary tract infection, Diabetics and diabetic patients Saudi. Med. J. Vol., 22(4): 326-329.

Dagan, R.; Givon-Lavi, N.; Zamir, O., Sikuler-Cohen, M.; Guy, L.; Janco, J.; Yagupsky, P. and Fraser, D. (2002). Reduction of Nasopharyngeal Carriage of ***Streptococcus pneumoniae*** after Administration of a 9- valent Pneumococcal Conjugate Vaccine to Toddlers Attending Day Care Centers.

Danel, f.; Hall, H.; Duke, B., Gur, D. and Livermore, D. (1999). OXA-17, A further extended spectrum variant of OXA-10 β-lactamase isolates from ***Pseudomonas aeruginosa*** . J. Antimicrob. Agents Chemother., 43: 1362-1366.

David, L.; Paterson, C. W.; Gottberg, A. V.; Casellas, J. M.; Mulazimoglu, L.; Klugman, K. P.; Bonomo, R. A. and Rice, L. B. (2001). Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended spectrum β-lactamase. J. Clin. Microbiol., 39: 2206-2212.

Davidson, S. and Macleod, J. (2001). The principles and practice of medicihe. Churchill Livingstone. London., pp: 1196.

Davis, B. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N. and Ginsberg, H. H. (1990). Microbiology. 4th ed. Lippincott company. London.

De Melo, M. C.; Figueiredo, A. M. and Carvalho, B. T. (2003). Antimicrobial susceptibility patterns and genomic diversity in strains of ***Streptococcus pyogenes*** isolated in 1978-1997 in different Brazilian cities. J. Med. Microbiol., 52: 251-258.

Dever, L. A. and Dermody, T. S. (1991). New Mechanism of bacterial Resistance to antibiotics. Arch. Intern. Med. Vol., 151: 886-893.

Dinah, G. and Christine, B. (2000). Applied microbiology for nurses. Macmillan Press LTD. London.

Dionisio, F.; Matic, I.; Radman, M.; Rodriques, O. R. and Taddi, F. (2002). Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities. J. Gen. Microbiol., 162: 1525-1532.

Donnenberg, M. S.(2000). Pathogenic strategies of enteric bacteria. Nature., 406: 768-774.

Dowling, R. B.; Newton, R.; Robichaud, A.; Cole, P. J.; Barnes, P. J. and Wislon, R. (1998). Effect of inhibition of nitric oxide on ***Pseudomonas aeruginosa*** infection of respiratory mucosa in vitro. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 19: 950-958.

Drago, L.; Vecchi, E.; Mombelli, B.; Valli, M. and Nicola, L. (2001). Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens. J. Antimicrob. Agents Chemother., 48: 37-45.

Enarson , P. M.; Rasmussen, Z. and Yaohua, D. (1998). principles and priorities in acute respiratory infection in children. Int. J. Tubercul. Lung. Dis., 2(9): 577-586.

Ernst, R. K.; Yi, E. C.; Guo, L.; Lim, K. B.; Burns, J. L.; Hackett, M. and Miller, S. I. (1999). Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway ***Pseudomonas aeruginosa***. Science., 286: 1561-1565.

Ewing, S. and Torres, A. (1999). Sever community acquired pneumonia. Clin. Chest. Med., 20(3) : 575-587 .

Facklam, R. M (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin. Microbiol. Rev., 15: 613-630.

Falkow, S. C. (1997). Epidemiology and clinical microbiology. In Microbiology dynamics and diversity. Saunders college publishing. Harcount and Brace college publishers., pp: 824-825

Fang, F. C.; Sandler, N. and Libby, S. J. (2005). Liver Abscess caused by *mag* A^+ ***Klebsiella pneumoniae*** in North America , J. Clin. Microbiol., 43(2): 991-992.

Fatmi, Z. and White, F. (2002). Acomparision of " cold and cough" and pneumonia, risk factors for pneumonia in children under 5 year revisited. Inter . J. infect. Dis., 6(4): 245-336.

Felton, J. M. and Bryceson, A. D. (1996). Fever in the returning traveler .Br. J. Hosp. Med. *British Journal of Hospital Medicine*

Ferguson, G. C.; Heinemann, J. A. and Kennedy, M. A. (2002).Gene transfer between ***Salmonella enterica*** serovar ***typhimurium*** inside epithelial cells. J. Bacteriol., 184: 2235-2242.

Finegold, S. M.; and Martin, W. J. (1982). Diagnostic Microbiology. 6th ed. Mosby company.

Fitzgerald, M.; Murphy, S.; Muleahy, R.; Keane, C.; Coakley, D. and Scott, T. (1999). Tissue culture adherence and haemagglutination characteristics of ***Moraxella (Branhammella) catarrhalis***. FEMS. Immunol. Med. Microbiol., 24: 105-114.

Fluit, C.; Visser, M. R. and Schmitz, F. (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev., 14(4): 836-846.

Forbes, B. A.; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. (1998). "Biley and Scott's Diagnostic Microbiology". 10th ed. Mosby. A Times Mirror Company Inc. New York., pp: 449-469.

Foster, M. K. (1994). Coagulase-negative staphylococci.clinical manifestation. J. Antimicrob. Agents Chemother., 1: 309-320.

Franklin, T. J. and Snow, G. A. (2005). Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action. 6th ed. Springer Science + Business Media, Inc. USA .

Frirdich, E.; Bouwman, C.; Vinogradov, E. and Whitfield, C. (2005). The role of Galacturonic acid in outer membrane stability in ***Klebsiella pneumoniae***. J. Biol. Chem., 280(30): 4-12.

Fuller, J. D.; Camus, A. C.; Duncan, C. L.; Nizet, V.; Bast, D. J.; Thune, R. L.; Low, D. E. and de Azavedo, J. C. (2002). Identification of a streptolysin S–associated gene cluster and its role in pathogenesis of ***Streptococcus iniae***. Infect. Immun., 70: 5730-5739.

Gaillit, J. (1996). clinical manifestation of ***Chlamydia pneumoniae*** infections. Respir. Med., 17(12): 987-991.

Galani, I.; Xirouchaki, E. and Kanellakopoulou. (2002). Transferable plasmid mediating resistance to multiple antimicrobial agents in ***Klebsiella***., Vol. 8(9) : 88-579 .

Galimand, M.; Courvalin, P. and Lambert, T. (2003). Plasmid - mediated high - level resistance to aminoglucosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. J. Antimicrob. Agents Chemother., 4**7**: 2565-2571 .

Gillespie, S. H. and Hawkey, P. M. (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2nd ed. John Wiley and Sons Company. England.

Glazer, A. N. and Nikaido, H. (2007). Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology . 2nd ed . Cambridge University Press. New York.

Goldman, E. and Green, L. H. (2009). Practical Handbook of Microbiology. 2nd ed . CRC Press is an imprint of the Taylor and Francis Group. New York.

Gonzalez, C.; Rubino, M.; Romero-Vivas, J.; Gonzalez, M. and Picazo, J. (2003). ***Staphylococcus aureus*** bacteremic pneumonia differences between community and nosocomial acquisition. Inter. J. infect. Dis., 7(2):103-107.

Gorsuch, A. N. and Cudworth, A. G. (1983). Immunological aspects of endocrine diseases in childhood. Chapter 22. In.Pediatric Immunology. Edited by Soothhill JF; Hayward AR. Wood CBS. Blackwell scientific publications.

Govan, G. R. and Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis : mucoid pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia . Microbiol. Rev., 6(60): 530-574.

Govan, G. R.; Brown, P. H. and Maddison, J. (1993). Evidence for transmission of pseudomonas cepacia by social contact in cytic fibrosis Lancet., 342: 15-19.

Gould, D. (1997). Giving infection control a big hand. Community Nursing Notes., 15: 3-6.

Gray, l.; Mackman, N.; Nicaud, J. and Holland, L. (1986). The carboxylerminal region of hemolysin 2001 is required for secretion of the toxin from ***Escherichia coli*** . Mol. Gen. Genet., 205: 127-133.

Grinsted, J. and Bennett, P. M. (1986). Introduction in methods in microbiology, In; Grinsted,J. and Bennett, P. M. (eds.), Plasmid technology. 2nd ed. Academic Press. London., Vol. 21: 1-10.

Gupta, K.; Scholes, D. and Stamm, W. E. (1999). Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in woman. JAMA., 281: 736-738.

Hall, R. M. and Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and Integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol. Microbiol., 15: 593-600.

Hamilton-Miller, J. M. (1990). The emergence of antibiotic resistance: myths and facts in clinical practice. Intensive Care Med., 16(3): S206- S211.

Harber, M. L.; Toley, N.; Jenner. D. E.; Mackenzie. R. K.; Steadman, R. and *et al*. (1986). Virulence facters of urinary pathogens in relation to kidney scarring. In: Microbial diseases in nephrology. John Willey and Sons company. New York.

Harley, J. P. and Prescott, L. M. (1996). Laboratory exercises in microbiology. 3th ed. McGraw-Hill company. USA.

Hauser, A. R.; Kang, P. J. and Engel, J. N. (1998). Pep A , a secreted protein of ***Pseudomonas aeruginosa*** is necessary for cytotoxicity and virulence , Mol. Microbiol., 27 : 807-818.

Heale, J. P.; Pollard, A. J.; Crookall, K.; Stokes, R. W.; Simpson, D.; Speert, D. P.; Tsang, A. and Bonnie, M. (2001). Two distinct receptors mediate nonopsonic phagocytosis of different strains of ***Pseudomonas aeruginosa***. J. Infect. Dis., 183(8): 1-15.

Higerd, T. B.; and Fowler, S. (1997). Gram Positive Cocci: Staphylococci and Streptococci. *In*: Virella, G. (edt.). Microbiology and Infectious Diseases. 3rd ed. Williams and Wilkins. Baltimor, Maryland, USA.

Hindler, J. (1998). Antimicrobial susceptibility testing. In: Essential procedures for clinical microbiology press. Washington. USA.

Hjelm, E. and Lundell-Etherden, I. (1989). Effects of extracelluar products from ***Staphylococcus saprophyticus*** on human lymphocytes APMIS., 97: 935-940.

Hoang, A. T. (1998). Lower respiratory tract infections. Pathophysiol. therap. series. J. Infect. Dis., 20(10): 105-110.

Hodgson, B. P. and Kizior, R. J. (2003). Staunders nursing drug handbook. Elsevier Science. USA.

Hogg, S. (2005). Essential Microbiology**.** John Wiley and Sons Company. England., pp: 353-372.

Holt, J. G.; Kreig, N. R.; Sheath, P. H.; Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins. USA., pp: 532-553.

Hooper, D. C. (1998). Bacterial topoisomerases, anti- topoisomerases and anti-topoisomerases resistance. Clin. Infect. Dis., 27: 54-63 .

Hugo, W. B. and Russell, A. D. (1987). Pharmaceutical microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone. London.

Hujer, A. M; Hujer, M. K. and Banoma, R. A. (2001). Mutagenesis of aminoacid residue in the SHV-1 β-lactamase the premier role of Gly 238 ser in penicillin and cephalosporin resistance. Biochem. Biophys. Acta., 1597: 37-50.

Hurlbert, R. E. (1999). Microbial exchange of genetic material. In: Microbiology. Chapter, IX, Science Hall, Room 440CA.

Iwahi, T.; Abe, R.; Nako, M. and Imado, A. (1983). Role of type-1 fimberiae in the pathogenesis of ascending UTI by *E. coli* in mice. Infect. Immune., 39: 1307-1315.

Jacoby, G. A. and Sutton, l. (1985). β- Lactamases and β-lactam resistance in ***Escherichia coli***. J. Antimicrob. Agents Chemother., 28(5): 703-705.

Jacoby, G. A. (1994). Genetics of extended spectrum β-lactamases. Eur. J. Clin. Microbiol., 1: 2-11.

Jassir, A.; Tannas, A.; Noorani, A.; Mirsalehian, A.; Efstratiou, A. and Schalen, C. (2000). High rate of tetracycline resistance of ***S. pyogenes*** in Iran an epidemiological study. J. Clin. Microbiol., 38: 2103-2107.

Jawetz, E. J.; Melnick, J. L.; Adelberg, E. A.; Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. (2004). Medical Microbiology. 23rd ed. Appelton and Longe. USA.

Jenkis, S. G. (1996). Mechanisms of bacterial antibiotic resistance. New Horiz., 4(3): 321-332.

Jett, B. D.; Huycki, M. M. and Gilmore, M. S. (1994). Virulence of Enterococci. J. Clin. Microbiol., 7(4): 462-478.

Jette, L. P.; Delage, R. L.; Allard, P. and Wals, P. (2001). Surveillance of invasion ***Streptococcus pneumoniae*** infection in the province of Quebecof Canda from 1996-1998: Serotype distribution antimicrobial susceptibility and clinical characteristics .J. Clin. Microbiol., 39: 733-737.

Johanson, M. S. (2000). ***Shigella*** and ***E. coli*** at the crossroads. J. Med. Microbiol. Vol., 49: 583-585.

Joseph, K. M. (1993). New microbiological method for the detection of Staphylococcal Beta- Lactamase Indian. J. Exper. Biol. 31: 653-654.

Kanchanapoom, T. and Khardori, N. (2002). Management of infections in patients with sever Burns : Impact of Multi resistant pathogens. J. Burns and surg. Wound Care., 1(1): 17.

Karalus, R. and Campaqnari, A. (2000). ***Moraxella catarrhalis*** : a review of an important human mucosal pathogen. Clin. Microbiol. Infect., 2: 547-559.

Karch, H.; Russmann, H.; Schmidt, H.; Schwar, Z. K. and Heesemann, J. (1995). Long-term shedding and clonal turnover of EHEC 0157 in diarrhea disease. J. Clin. Microbiol., 33: 1602 .

Katsanis, G. P.; Spargo, J.; Ferraro, M. J.; Sutton, L. and Jacoby, G. A. (1994). Detection of ***Klebsiella pneumoniae*** and ***Escherichia coli*** strains producing extended-spectrum β- Lactamases. J. Clin. Microbiol., 32: 691-696.

Kenneth, T. (2005). ***Staphylococcus aureus*** . Text book of bacteriology, Univercity of Wisconsin, Department of bacteriology.

Kilian, M.; Frederiksen, W. and Biberstein, E. L. (1981). Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus. Academic Press Inc. London., pp: 13-22.

Klein, J. O. (1992). Bacterial pneumonia. In; Text book of pediatric infectious disease. 3rd ed. Feigin RD, and Cherry JD. Saunders., Vol. 1: 299-309

Kohler, T.; Kok, M.; Michea, M.; Plesiat, P.; Goto, N.; Nishino, T.; Curty, L. and Pechere, J. (1996). Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole in ***Pseudomonas aeruginosa***. J. Antomicrob. Agents Chemother., 40: 2288-2290.

Koneman, E. W.; Allen, S. D. ; Dowell, V. R. Janda, W. M.; Sommer, H . M . and Winn, W. C.(1997). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4thed . Lippincott Company. Philadelphia.

Krasan, G. P.; McCrea, K. W.; Clemans, D. L. and Gilsdrof, J. R. (2001). ***Haemophilus influenzae*** - Human Specific Bacteria. Frontiers in BioScience., 6: e41-60.

Kurtti. P.; Isoah, R.; Von-Hertzen, I.; Keistinen, T.; Kivela, S. I. and Leinonen, M. (1997). Influence of age, gender and smoking on ***Streptococcus pneumonia, Haemophilus influenzae*** and ***Moraxella catarrhalis*** antibody titers in population. Scand. J. Infect. Dis., 29: 485-9.

Kyd, J. M.; Cripps, A. W. and Murphy, T. F. (1998). Outer membrane antigen expression by ***Moraxella catarrhalis*** influences pulmonary clearance. J. Med. Microbiol., 47: 159-168.

Laraki, N.; Franceschin, N.; Rosslini, G. M.; Santucci, P.; Meunier, C.; Pauw, E.; Amicosante, G.; Frere, J. M. and Galleni, M. (1999). Biochemical Characterization of Pseudomonas aeruginosa 101/1477 metallo-β-lactamase IMP-1 Produced by ***Escherichia coli***. J. Antomicrob. Agents Chemother., 43(4): 902-906.

Larrson, C.; Kanugo, R.; kahlmeter, G.; Rao, R. S.; Krantz, I.; Norrby , S. R. and Miorner, H. (1999). High frequence of multiresistance respiratory tract pathogens at community level in south India. Clin. Microbiol. Infect., 5: 740-747.

Laurence, D. R.; Bennett, P. N. and Brown, N. J. (1997). Principles of antimicrobial chemotherapy. 8th ed. Churchill Livingston. London., pp: 187-217.

Lee, E. H.; Collatz, E.; Trias, J.; and Gutmann, L. (1992). Diffusion of β- Lactamase antibiotics into proteoliposomes reconstituted with outer membranes of isogenic imipenem susceptible and resistant strains of ***Enterobacter cloacae***. J. Gen. Microbiol., 138(11): 2347-2351.

Levinson, W. and Jawetz, E. (2000). Medical microbiology and immunology. 6th ed. McGraw-Hill. New York.

Li, X. Z. and Poole, K. (1999). Organic solvent- tolerant mutants of ***Pseudomonas aeruginosa*** display multiple antibiotic resistance. Can. J. Microbiol., 45: 18- 22.

Liu, P. Y.; Lyon, D. J.; Chang, A. F. B. and French, G. L. (1992). Survery of the Prevalence of β-lactamases of Ampicillin-Resistance ***Escherichia coli*** in Hong Kong . J. Antomicrob. Agents Chemother., 34: 65-71.

Livermore, D. M. (1995). β-lactamase in Laboratory and clinical resistance. Clin. Microbial. Rev., 8(4): 557-584.

Lunch, J. P. (2001). Hospital acquired pneumonia risk factor. Microbiol. Trect. Chest., 119(2): 3735-3815.

Lyon, B. R.; Gillespie, M. T.; Byrne, M. E.; May, J. W. and kurray, R. A. (1987). Plasmid-mediated resistance to gentamicin in ***Staphylococcus aureus***: the involvement of a transposon. J. Med. Microbiol., 23: 101-110.

Macfaddin, J. F. (1985). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd ed. Waverly Press Inc. Baltimore.

Macfaddin, J. F. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. 3rh ed. The Williams and Wilkins. Baltimore. USA.

Mallea, M.; Chevalier, J.; Bornet, C.; Eyrand, A.; Davin, A.; Bollet, C. and Pages. (1998). Porin alteration and active efflux: Tow in vivo drug resistance strategies used by ***Enterobacter aerugenes*.** Microbiology., 144(11): 3003-3009.

Mandell, G. L.; Bennet, J. E. and Dolim, R. (1995). Principles and practice of infection diseases. 4th ed. Churchill Livingstone. London.

Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. Alaboratory. Manual. Cold spring Labratorry. Coldspring. New York.

Marc, S. N.(1998) Tracking the epidemiology of antimicrobial drug resistance in hospital. J. Med. Microbiol. Vol., 47: 1035-1036

Marchandin, H.; Jean, H.; Dechamps, C.; Sirot, D.; Darbas, H.; Perigault, P. and Carrieve, C. (2000). Production of a TEM-24 plasmid mediated extended spectrum β-lactamase by a clinical isolate of ***Pseudomonas aeruginosa*** . J. Antomicrob. Agents Chemother., 44: 213-216.

Marrs, C. F. and Wein, S. (1990). Piliefimbriae of *Branhamella* species. Am. J. Med. Microbiol., 88: 36-40.

Masuda, N.; Sakagawa, A.; Ohya, S.; Gotoh, N.; Tsujimot, L. and Nishion, T. (2000). Contribution of the Mex X-Mex Y Opr M efflux system to intrinsic resistance in ***Pseudomonas aeruginosa***. J. Antomicrob. Agents Chemother., 44: 2242-2246.

McCarthy, L. R. (1980). β-lactamases . J. Clin. Microbiol., 2: 1-3.

McCarty, M. (1990). Streptococci. In: Davis, B. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N. and Ginsberg, H. S. (eds.). Microbiology. 4th ed., J. B. Lippincott Company. Philadelphia.

McMichael, J. C. (2000). Progress toward the development of vaccine to prevent ***Moraxella (Branhamella) catarrhalis*** infections. Microbes and Infection., 2: 561-568.

Mims, C. A.; Dockrell , H. M.; Goering , R. V.; Roitt , I.; Wakelin , D. and Zuckerman , M. (2004). Medical Microbiology .3rd ed. Mosby Company .USA.

Mingeot-Leclereq, M. P.; Gluperzynski, Y. and Tulken, P. M. (1999). Aminoglycosides: Activity and resistance. J. Antomicrob. Agents Chemother., 43(4): 727-737.

Miyashita, N.; Fukano, H.; Niki, Y.; Matsushima, T. and Okimoto, N. (2000). Etiology of community acquired pneumoniae requiring hospitalization in Japan. Chest., 119(4): 1295-1296.

Moellering, R. C. (1993). Meeting the challenges of β-Lactamases. J. Antomicrob. Agents Chemother., 31: 1-4.

Moses, A. E.; Wessels, M. R.; Zalcman, K.; Alberti, S.; Natansonyaron, S.; Menes, T. and Hanski, E. (1997). Relative contributions of hyaluronic acid capsule and M protein to virulence in a mucoid strain of the Group A Streptococcus. Infect. Immun., 65(1): 64-71.

Mouget, J. L.; Dakhama, A.; Lavoie, M. and de la Noue, J. (1995). Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved. FEMS Microbiol. Ecol., 18: 35-44.

Murphy, T. F. (1996). ***Branhamella catarrhalis***: epide miology surface antigenic structure, and immune response. Microbiol. Rev., 60: 267-279.

Murray, P. R., and Washington, I. J. A. (1975). Microscopy and bacteriologic analysis of expectorated sputum. Mayo. Clin. Proc., **(**50**)**: 339-44.

Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller. M. A.; Tenover. F. F. C. and Yolken. R. H. (1999). Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. ASM press, Washington.

Myrvik, Q. N. and Weiser, R. S. (1998). Fundamentals of medical Bacteriology and Mycology. Lea and Febiger, London: pp: 445-452.

Naber, K. G.; Grimm, H.; Rosenthal, E. J. K.; Shah, P. M. and Wiedemann, B. (1990). Resistance to aminoglycoside: The situation in the federal republic of Germeny. J. Int. med., 18(4): 6-26.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (NCCLS). (2005). Performance standard for anti microbiology susceptibility testing . 15th ed . Informational supplement NCCLS , Wayne P.A.

Nikaido, H.; Rosenberg, E. and Fould, J. (1983). Porin channels in ***Escherichia coli*** : Studies with β-lactams in intact cells. J. Bacteriol., 153(1): 232-240.

Nikaido, H. (1985). Molecular basis of bactaria outer membrane permeability. Microbiol. Rev., 49: 1-32.

Nelson, S. (2001). Novel nonantibiotic therapies for pneumonia. Cytochin. Host Defence. Chest., 119: 4195- 4255.

Nesin, M.; Projan, S. J.; Bolt, Y. and Novick, R. P. (1995). Molecular epidemiology of ***Staphylococcus epidermidis*** blood isolates from neonantal intensive care unit patients. J. Hosp. Infect., 31: 111-121.

Nester, E. W.; Roberts, C. E.; Pearsall, N. N.; Anderson, D. G. and Nester, M. T. (1998). Microbiology. A human perspective. 2nd ed. McGraw-Hill. New York.

Nicklin, J.; Graeme-Cook, K.; Paget, T. and Killington, R. A. (1999). Microbiology. University of Leeds, Leeds. UK.

Nizet, V.; Beall, B.; Bast, D. J.; Datta, V.; Kilburng, L.; Low, D. L. and De Azavedo, J. C. (2000). Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococci . Infect. Immun., 68: 4245-4254**.**

Novak, R. P. (2000). Pathogenicity factors and their regulation, In V. A. Fischetti, R.P.Noviak,J.J.Ferretti,D.A. Portnoy, and J. I. Rood, Gram positive pathogens. American Society for Microbiology. Washington., pp: 392-407.

Obregon, V.; Garcia, P.; Garcia, E.; Fenoll, A.; Lopez, R. and Garcia, J. L. (2002). Molecular Peculiarities of the lyt A Gene Isolated from Clinical Pneumococcal Strains that are Bile Insoluble. J. Clin. Microbiol., (40): 2545- 2554.

O'Connell. M. (1984). Genetic transfer in prokaryotes: Transformation, Transduction and Coonjugation. In: Advanced molecular genetics. Auhler, A. and Timmis, K. Sipringer. Verlage. Berlin.

Ojetti, V.; Pitocco, D.; Bartolozzi, F.; Danese, S.; Alessio Migneco, A.; Lupascu, A.; Pola, P.; Ghirlanda, G.; Gasbarrini, G. and Gasbarrini, A. (2002). High Rate of ***Helicobacter pylori*** Re-Infection in Patients Affected by Type 1 Diabetes. Diabetes Care., 25: 1485.

Old, R. W. and Primrose, S. B. (1994). Principles of gene manipulation. Cambridge, MA. Blackwell Science.

Omikunle, A.; Takahashi, S.; Ogilvie, C. L.; Wang, Y.; Rodriguez, C. A.; St. Geme, J. W. and Elisabeth, E. A. (2002). Limited Genetic Diversity of Recent Invasive Isolates of Non- Serotype b Encapsulated *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol., (40): 1264-1270.

Palucha, A.; Mikiewicz, B.; and Gnidkowski, M. (1999). Diversification of *Escherichia coli* expressing an SHV - type extended - spectrum β-Lactamase (ESBL) - during a hospital outbreak Eme Fr genes of an ESBL - Hyper producing strain resistant to expanded - spectrum cephalosporins. J. Antomicrob. Agents Chemother., 43: 393-396.

Paterson, L. D.; pharm, D. and Mombelli, J. (2001). Out come of cephalosporin treatment for serious infection due to apparently susceptible organisms producing Extended-spectrum β-Lactamase. J. Clin. Microbiol., Vol. 39(6): 2206-2212.

Perry, J. J. and Staley, J .T. (1997). Dynamic and Diversity. Saunders College Publishing. Forth Worth. New York.

Pettit, R. K.; Fakoury, B. R.; knight, J. C.; Weber, C. A.; Cage, G. D. and Pon, S. (2004). Antibacterial activity of the marine sponge constituent 6. J. Med. Microbiol., 53: 61-65.

Prescott, L. M. (2002). Microbiology. 5th ed . The McGraw-Hill Companies. USA.

Qadri, S. M., Ueno, Y.; Postle, A. G. and Cunha, B. A. (1996). Antibacterial activity 1296 clinical isolates from atertiary care center. Ann. Saudi Med., 16: 377-380.

Rajan, S.; Cacalano, G.; Bryan, R.; Ratner, A. J.; Sonitch, C. U.; Heerakeren, A. V.; Davis, P.; and Prince, A. (2003). ***Pseudomonas aeruginosa*** Inductin of Apoptosis in Respiratory Epithelial Cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 23(3): 304-312.

Rehm, B. H. (2008). Pseudomoas. Model Organism, Pathogen, Cell Factory. WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim.

Rice, L.; Willey, S. H.; Paponicolaon , G. A.; Mederivos , A. A. and Jacoby. G. A. (2000). High level expression of chromosomally encoded SHV-1 β-Lactamase and outer membrance protein change confer resistance to ciftazidime and piperacillin Tazobactam in a clinical isolates of ***Klebsiella pneumoniae*** . J. Antomicrob. Agents Chemother., 2: 353-357.

Rijneveld, A. W., Lauw, F. N., Schultz, M. J., Florqwin, S., TeVelde, A. A., Speelman, P., Van Deventer, S. J. H., and Vander Poll, T. (2002). The Role of Interferon- γ in Murine Pneumococcal pneumonia. J. Infect. Dis., (185): 91- 97.

Robert, I. S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Annu. Rev. Microbiol., 50: 285-315.

Roberts, G. (2003). Transformation . (Ed., T., Paustian) , University of Wisconins-Madison.

Rosendorf, L. L. and Kayser, F. H. (1974). Transduction and Plasmid. Deoxyribonucleic acid analysis in Amultiple antibiotic resistance strain of ***Staphylococcus epidermidis***. J. Bacteriol., 120: 676-686.

Rouch, D. A. and Skurray, R. A. (1989). *IS257* from ***Staphylococcus aureus***: member of an insertion sequence superfamily prevalent among gram-positive and gram-negative bacteria. Gene., 76: 195-205.

Sahly, H.; Kekow, J.; Podschun, R.; Schaff, M.; Gross, W. L. and Ulmann, U. (1994). Comparison of the antibody resposes to the 77 Klebsiella capsular types in ankylosing spondylitis and various rheumatic disease. Infect. lmmun., 62(11): 4838-4848.

Sambrook, J.; Maniat, T. and Fritsch, E. F. (1989). Moleculrr cloning. A laboratory manual. Cold spring laboratory. Coldspring. New York.

Sanders, C. C.; Gates, M. L. and Sanders, W. E. (1988). Heterogenicity of class 1 β-Lactamase expression in clinical isolates of ***Pseudomonas aeruginosa***. Clin. Infect. Dis., 31(12): 1893-1895.

Sanders, C. C. (1992). β-Lactamase of gram-negative bacteria: new Challenges for new drug. Clin. Infect. Dis., 14: 1089-1099.

Sanders, C. C.; Thomson, K. S. and Bradford, D. A. (1993). Problems with the detection of β-Lactam resistance among non fastidious gram-negative bacilli. J. Infect. Dis., 7(2): 411-424.

Scaillon, M.; Dorchy, H. and Cadranel, S. (1999). Pattern of ***Helicobacter pylori*** infection in insulin-dependant diabetic children and young adults. Gut., 45: A103.

Schaberg, D. R. and Zervos, M. (1986). Intergenic and iterspecies gene exchange in gram- positive cocci. J. Antomicrob. Agents Chemother., 30: 817-822.

Schmitz. F. J.; Fluit, A. C.; Hafener, D.; Beeck, A.; Perdikouli, M.; Boos, M.; Schearing, S.; Verhoef, J.; Kohrer, K. and Von-Eiff, C. (2000). Development of resistance to ciprofloxacin, Rifampicin and Mupirocin in Methicillin-susceptible and resistance ***Staphylococcus aureus*** isolates. J. Antomicrob. Agents Chemother., 44: 3229-3231.

Scott, J. A.; Hall, A. J.; Muyodi, C.; Lowe, B.; Ross, M.; Mandaliya, K.; Getambu, E.; Gleeson, F. and Drobniewski, F. (2000). Aetiology, out come and risk factors for mortality among adult with acute pneumoniae in Kena. Lancet., 335(8): 1225-1230.

Senior, B. W. and Hughes, C. (1987). Production and properties of hemolysin from clinical isolates of the protease. J. Med. Microbiol., 24:17-25.

Sharma, A., Kaur, R., Ganguly, N. K., Singh, P. D., and Chakraborti, A. (2002). Subtype distribution of ***Haemophilus influenzae*** isolates from North India. J. Med. Microbiol., (51): 399-404.

Sneath, P. H. A.; Mair, N. S.; Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (1986). Bergey's manual of systemic bacteriology. 2nd ed. The Williams and Wilkins company. Baltimore.

Snyder, L. and Champense, W. (1997) . Molecular genetics of bacteria .2nd ed. American Sonciety of Microbiology pres. Washington.

Solnik, J. V. (2003). Antibiotic mechanisms of resistance. Div. Infect. Dis., 530: 752-1333.

Song, J. H. (2003). The goals of antimicrobial therapy. Int. J. Infect. Dis., 7: S_1- S_4 .

Stabberingh, E. E.; VanEck, H. J.; Houben, A. W. and Doven, V. (1986). Analysis of the relationship between penicillin resistance and β-lactamase production in ***Bronhamella catarrhalis***. Drugs., 31(3): 23-27.

Stevens, D. L. and Kaplan E. L. (2000). Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis. Oxford University Press. New York.

St.Geme, J. W. (1993). Nontypeable ***Haemophilus influenzae*** disease: epidemiology, pathogenesis, and prospects for prevention. Infect Agents Dis; (2): 1.

Stocks, E. J. and Ridgway, G. L. (1987). Handling clinical specimens for microbiological studies. 5th ed. Churchill Livingstone. USA.

Suzuki, T.; Moraes, T. J.; Vachon, E.; Ginsberg, H.; Huang, T.; Matthay, M. D.; Marshall, J.; McCulloch, C. A.; Abreu, T. S.; Chow, C.; and Downey, G. P. (2005). Protienase-Activated Reseptor-1 Mediates Elastase- Induced Apoptosis of Human Lung Epithelial Cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 33: 231-247.

Swords, W. E.; Buscher, B. A.; Versteeg, K. I. I.; Preston, A.; Nichols, W. A.; Weiser, J. N.; Gibson, B. W. and Apicella, M. A. (2000). Nontypeable ***Haemophilus influenzae*** adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interactive of lipopolysaccharide with PAF receptor. Mol. Microbiol., 37: 13-37.

Sykes, R. B. and Mattew, M. (1976). The B-Lactamase of Gram-negative bacteria and their role resistance to β-Lactam antibiotic. J. Antomicrob. Agents Chemother., 2: 115-152.

Szabo, D.; Mathe, A.; Filetoth, Z.; Erlik, P. and Rozgony, F. (2001). Invitro and invivo activities of Amikacin, cfepime, Amikacin plus cefepime, and imipene against an SHV-5 extended spectrum β-Lactamase producing ***Klebsiella pneumoniae*** strain. J. Antomicrob. Agents Chemother., 45(4): 1287-1291.

Talaro, K. and Talaro, A. (1996). The cocci of medical importance. In: Foundation in microbiology. W.M.C. publishers, Bogata., pp: 120-128.

Theresum , M .; John , E. and Solomon , L. (1999). Adhesins as targets for Vaccines developments , Emerging infection Disease., 5: 395-403 .

Todar, K. (2002). Streptococcus pyogenes: In Todar 's on line Textbook of Bacteriology.

Valverde, A.; Coque, T. M.; Sanchez-Moreno, M. P.; Rollan, A.; Baquero, F. and Canton, R. (2004). Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended– spectrum β-lactamase – producing Enterobacteriaceae during non outbreak situations in Spain. J. Clin. Microbiol., 42(10): 4769-4775.

Vanscoy, R. E. (1977). Bacterial sputum cultures: a clinician's view point. Mayo Clin Proc., **(**52**)**: 39-41.

Vatopoulos , A. C.; tsakris, A.; Tzourelekis, L. S.; legakis, N. J.; Pitt, T. L. and Komninou, Z. (1992). Diversity of aminoglycoside resistance in ***Enterobacter cloacae*** in Greece. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11(2): 131-138.

Venezia, R. A.; Scarano, F. J.; Preston, K. E.; Steel, L. M.; Root, T. P.; Limberger, R.; Archinal, W. and Kacica, M. A. (1995). Molecular epidemiology of an SHV-5extended spectrum β-Lactamase in Enterobacteriaceae isolated from infants in a neonatal intensive care unit. Clin. Infect. Dis., 21: 915-923.

Weidman, B.; Kliebe, C. and Kresken, M. (1989). The epidemiology of β-actamase. J. Antomicrob. Agents Chemother., 24: 1-22**.**

Wald, E. R. (1998). Microbiology of acute and chronic sinusitis in children and adults. Am. J. Med. Sci., 316(1): 13-20.

Walter, S. D.; Michael, G. and Stanley, F. (1979). Cistrons encoding ***Escherichia coli*** heat-labile toxin. J. Bacteriol., 139: 850-858.

Watanabe, A.; Oizum, K.; Mastuno, K.; Nishino, K.; Motomiya, M. and Nukiwa, T. (1995). Antibiotic susceptibility of sputum pathogens and throat swab pathogens isolated from patients undergoing treatment in twenty one private clinics in Japan. Tokokn. J. E. Med., 174(4): 235-247.

Weller, T. M. A.; Mackenzie, F. M. and Forbes, K. J. (1997). Molecular epidemiology of a large out break of multiresistant ***Klebsiella pneumoniae***. J. Med. Microbiol., 46: 922-926.

Westh, H.; Knudesen, A. M.; goth, A. and Rosdah, V. T. (1991). Evaluation of ***Staphylococcus aureus*** resistance to Erythromycin in Denmark 1959 and 1988 comparison with Erythromycin susceptible strains. J. Hosp. Infect., 18: 23-34.

Wilhelm, S.; Tommassen, J. and Jaeger, K. E. (1999). A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of ***Pseudomonas aeruginosa*.** J. Bacteriol., 181(22): 6977-6986.

Wilkins, R. L.; Dexter, J. R. and Gold, P. M. (2007). Respiratory Disease a Case Study Approach to Patient Care. 3rd ed. F. A. Davis Company. California.

Wilson, J. W.; Schurr, M. J.; Leblane, C. L.; Ramamurthy, R.; Buchanan, K. L. and Nickerson, C. A. (2002). Mechanisms of bacterial pathogenicity. Postgraduate Medical J., 78: 216-224.

Wheat, L. J. (1980). Infection and diabetes mellitus. Diabetes Care., 3: 187.

Word Health Organization. (WHO). (1978). Technique for the detection of β- lactamase Production strain of ***Neisseria gonorrhoeae***., 616: 137-143.

Word Health Organization. (WHO). (1999). World Health Organization Monographys on selected medical plants. W.H.O. Geneva.

Yhn–Chering, H.; Lin-Hui, S.; Tsu-Lan, W.; Chun-Engm L.; Tzun-Guang, Y.; Po-yen, C.; Po-Ren, H. and Tzou-Yien, L.(2004). Molecular epidemiology of clinical isolates of methicillin resistant ***Staphylococcus aureus*** in Taiwan. J. Clin. Microbiol., 42(1): 307-310.

Summary

Three hundred samples from Respiratory Tract Collecting, Included 100 persons suffering from Respiratory Tract Infection (RTI) and diabetic, 100 persons suffering from (RTI) but diabetic-free. The samples also involved 100 persons with no cases (control group). Samples were Collected from patients at Al-Diwaniya Hospital and the Respiratory Infections Clinic at Al-Diwaniya, governorate from 1/2/2009 to 10/11/2009.

It was found that 71%,67% and 18% from the samples indicated a bacterial growth with persons suffering from diabetes, persons free from diabetes and healthy persons (control group) respectively. The results of the bacteriological diagnosis showed the isolation of 208 bacterial isolates of the three groups, including 127 isolates (61%) of gram positive bacteria and 81 isolates (39%) of gram negative bacteria.

Results showed that *Staphylococcus aureus* bacteria were more frequent than the isolated bacterial types because they had 29.6%, 32.9% and 22.2% respectively of the afore mentioned groups. As for the other bacterial types that were isolated, they showed gradual frequency from *Moraxella catarrhalis* (14.8%), *Klebsiella pneumoniae* (10.2%) and *Pseudomonas aeruginosa* (9.3%), followed by *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in rate (8.3%) then *Streptococcus pyogenes* (6.5%), Viridans Streptococci group (2.8%) and *Escherichia coli* (1.9%) with diabetic persons group, While in the non-diabetic persons group the other bacterial types showed gradual frequency from *K. pneumoniae* (11%), then *Staph. epidermidis* and *S. Pyogenes* in rate (6.5%) then *M. catarrhalis* and *P. aeruginosa* in rate (9.3%) and finally Viridans Streptococci group (3.7%) and *E. coli* (1.2%). The other bacterial types showed gradual frequency in rate of coexisting from *Staph. epidermidis* (33.3%), Viridans Streptococci group (16.7%) and *H. influenzae* (11%) followed by *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* and *K. pneumoniae* in rate (5.6%).

Some of the virulence factors connected with the species of gram positive bacteria were investigated, The results showed that 84 isolates out of 127 isolates contained capsule with (66.2%), 107 isolates (84.3%) showed adhesiveness to oral epithelial cells. 104 isolates (81.9%) showed ability to produce haemolysin, While 89 isolates were β-Lactamase secreting with (70.1%).

Sensitivity tests showed bacterial susceptibility towards 15 antibiotics. The most common of which are used in treating (RTI). Most bacteria species showed multiple resistance for most antibiotics ranged one antibiotics for the isolate Viridians Streptococci (126) to 13 antibiotics resisted by the isolate *Staph. aureus* (34). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for some antibiotics that were used in sensitivity test for bacteria were determined. The results showed that the values were ranged between (≤4-128) µg/ml for Ciprofloxacin, to (8-1024<) µg/ml for Ampicillin.

Plasmid profile for some of the bacterial isolates (16 isolates), The results showed that there was at least one plasmid band in some isolates and production of β-Lactamase and no relationship between the number of plasmid bands and resistance toward antibiotics.

The bacterial conjugation was done for 6 bacterial isolates (Rifampicin sensitive isolates). Results showed that all isolates failed in conjugation. Though the process was repeated for three times, no conjugative colonies were detected.

Four bacterial isolate were subjected to experiments of genetic transformation and they showed sensitivity to Rifampicin antibiotic. The *E. coli* MM294 was used as receptive cells to investigate whether the resistance to antibiotic as a trait is carried on non-conjugative plasmids. It was possible to convey or transport the multi- resistance property to the antibiotics and produce β-Lactamase enzyme to the transformed cells. The frequency of transformation ranged between 2.3×10^{-3} for isolate *Staph. epidermidis* (67) and 7.5×10^{-5} for isolate *S. Pyogenes* (89). transformed cells have been tested for their ability produce β-Lactamase enzyme. Plasmid profile for this cells, the results showed that cells contained plasmid bands similarity the Donor cells.

Al-Qadisiya University

College of Education

Department of Biology

Bacteriological and Genetic Study of Some Bacteria Accompanying Respiratory Tract Infection in AL-Diwaniya City

A Thesis Submitted to

the Council of the College of Education – Al-Qadisiya University

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master in Biology / Microbiology

By

Tha'ir Abid D'asheesh Alibdeari

Supervised by

Assistant Professor
Ali Abed Raheem

Assistant Professor
D. Azhar N. Hussein

November - 2010