جامعة القادسية
كلية العلوم
قسم علوم البيئة

دراسة الحساسية الدوائية لبعض البكتريا المرافقة لحالات الإسهال في مدينة الديوانية

بحث مقدم إلى قسم علوم البيئة – كلية العلوم - جامعة القادسية
وهو جزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس
في علوم البيئة

من قبل

ملاك عبد موسى و موج جعفر دوهان

إشراف

م. م. ثائر عبد دعيشيش

نيسان . ٢٠١٦

الخلاصة

جمعت العينات من المرضى المراجعين لمستشفى النسائية والأطفال في مدينة الديوانية، الذين يعانون من حالات إسهال للمدة من ٢٠١٥/١٢/٥ إلى ٢٠١٦/٢/٢٠. اشتملت الدراسة على ٣٠ عينة عينة لأطفال مصابين بالإسهال.

بينت النتائج أن عينات البراز المأخوذة من الأطفال المشمولين بالدراسة أظهرت نمواً بكتيرياً كانت ٩٠% (٢٦ عينة), يقابلها ١٠% (٤ عينات) أعطت نتيجة سالبة للزرع البكتريولوجي (عينات غير حاوية على نمو).

تم تشخيص ٤٢ عزلة بكتيرية، احتلت بكتريا *Escherichia coli* النسبة الأعلى ٤٥,٢٤ % (١٩ عزلة)، جائت بعدها *Salmonella* spp. بنسبة ١٦,٦٧ % (٧ عزلات)، فيما اظهرت بكتريا *Proteus* spp. نسبة ١١,٩١ % (٥ عزلات) ، في حين اظهرت كل من *Klebsiella pneumonia* و *Shigella spp.* النسبة نفسها ٩,٥٢ % (٤ عزلات)، في حين كانت اقل نسبة عزل لبكتريا *Enterobacter spp.* ٧,١٤ % (٣ عزلات).

أظهرت نتائج فحص الحساسية الدوائية تجاه ١٠ مضادات حيوية من المضادات التي اغلبها شائع الاستعمال وان معظم العزلات البكتيرية قيد الدراسة أظهرت مقاومة متعددة لمعظم هذه المضادات تراوحت بين (مضاد واحد) قاومته العزلة رقم (٢) العائدة لبكتريا *E. coli* إلى (٩ مضادات) قاومته العزلتين رقم (١٩ و ٢٠) العائدتين الى البكتريا *Enterobacter* spp. .

إذ أظهرت النتائج أن نسبة المقاومة لمضادات مجموعة ألبيتا لاكتام ، والتي تشمل البنسلينات كانت لمضاد Penicillin G و Apmicillin هي ١٠٠% و ٩٠% وعلى التوالي. في حين كانت المقاومة لمجموعة مضادات السيفالوسبورينات المتمثلة بالمضادين Cephalothin و Cefotaxime هي ٧٥% و ٦٠% وعلى التوالي، كما أبدت مقاومة ضعيفة تجاه مضادات مجموعة Aminoglycosides التي شملت كل من مضاد Amikacin ، وStreptomycin فكانت نسب المقاومة لها هي ٢٥% و ٤٥% وعلى التوالي.

كما أظهرت العزلات حساسية تامة تجاه مضادات مجموعة Quinolones المتمثلة بمضاد Ciprofloxacin ، وكانت نسبة المقاومة لمضاد Tetracycline هي ٥٥ %، اما بالنسبة لمضاد Chloramphenicol فقد أظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة ضعيفة تجاهه إذ بلغت ١٥%، وأخيراً نسبة المقاومة لمضادات مجموعة Macrolides المتمثلة بمضاد Erythromycin كانت ٥٠%.

١ - المقدمة : Introduction

يعد الإسهال Diarrhea من الأمراض الخطيرة والواسعة الانتشار في العالم، إذ يتعرض الأطفال الذين تقل أعمارهم عن خمس سنوات للإصابة بهذا المرض وتتركز الإصابة لدى الأطفال الرضع الذين تتراوح أعمارهم من ستة أشهر إلى سنتين (AL-Kaby, 2000). وتكون الحالات الشديدة للإسهال إحدى الأسباب الرئيسية في وفات الأطفال في العالم وتحدث في البلدان النامية بين ٧٠٠ – ١٠٠٠ مليون حالة إسهال سنوياً مسببة وفاة ٥ ملايين طفل في كل سنة (Behrman *et al.*, 2000).

إن السبب الرئيسي للوفاة في الحالات الشديدة من الإسهال يعود إلى الجفاف Dehydration الناتج من فقدان الجسم للسوائل الضرورية إذ يعد الإسهال سبباً مهماً لسوء التغذية Malnutrition لذلك فأن الإسهال وسوء التغذية يعدان من الأسباب الرئيسية لحدوث الوفيات في بلدان عديدة (Ribeiro , 2000).

ان مسببات المرض عديدة منها البكتيري Bacterial agen كما في بكتريا *E. coli* ، *Salmonella* spp. ، *Shigella* spp. و *Compyiobacter* ومنها الفيروسي viral agents كما في *Rota virus* و *Corona virus* الى جانب المسببات الطفيلية ومنها *Entamoeba histolytica* و *Giardia lamblia* والخمائر مثل *Candida albicans* (Jawetz *et al.*, 2004).

تأتي الإصابة بالإسهال نتيجة لدخول المسببات المرضية إلى الجوف المعوي للأطفال عن طريق الأغذية والمشروبات أو الأيدي الملوثة بتلك المسببات المرضية أو نتيجة تحول بعض أعضاء النبيت الطبيعي Normal Flora إلى مسببات مرضية عند ازدياد نسبتها عن الحد الطبيعي بسبب حدوث تغيير في بيئة الأمعاء نتيجة لتناول عقار معين أو إصابة الطفل بأحد المسببات المرضية مما يسهل على هذه الأحياء المجهرية إحداث المرض (Pabst *et al.*, 2000).

لقد كان للمضادات الحيوية منذ اكتشافها الأثر الكبير في خفض معدلات الإصابات المختلفة (Amyes and Gammel, 1997)، 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 Pencillin وكذلك مقاومة بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococci* لمضاد Methicillin (Pettit *et al.*, 2004).

أهداف البحث : Aims of the Search

١. عزل وتشخيص بعض البكتريا المرافقة لحالات الإسهال لدى الاطفال.

٢. دراسة حساسيتها الدوائية تجاه بعض المضادات المستخدمة محلياً.

٢- استعراض المراجع Literature Review

١,٢- الإسهال Diarrhea

يعد الإسهال والالتهابات المعوية من المشاكل الصحية الشائعة في مختلف بلدان العالم لاسيما البلدان النامية حيث تأتي بالمرتبة الرابعة بين أسباب الوفيات لاسيما في الأطفال (WHO,2008a) .

يمكن تعريف الإسهال على انه إفراغ متكرر لمحتويات الأمعاء مع تغير في قوام البراز إذ يتحول من الشكل الطبيعي إلى اللين أو الرخو مع زيادة المحتوى المائي (Surawicz and Ochoa ,2006) . وهو عبارة عن عارض سريري شائع لالتهاب المعدة والأمعاء ما يؤدي إلى حدوث خلل في امتصاص الماء والأملاح مسببا حركة الفضلات الموجودة في الأمعاء وزيادة عدد نوبات الخروج لثلاث مرات أو أكثر (الراوي, 1996 ; WHO,2009).

يقسم الإسهال اعتمادا على مدة المرض على نوعين: الحاد Acute diarrhea، والمزمن Chronic diarrhea، يستمر الأول لمدة قصيرة لا تتجاوز الأسبوعين، بينما يستمر النوع المزمن لأكثر من أربعة أسابيع (Ahlquist and Camilleri, 2001)، قد يؤدي النوع الحاد إلى الجفاف ومن ثم الموت، وينتج هذا النوع من الإصابة بالفيروسات، البكتريا والطفيليات، بينما ينتج النوع المزمن من اضطرابات وظيفية للأمعاء أو استعمال بعض العقاقير أو التسمم بالمواد الكيميائية (NDDIC, 2007).

هناك تقسيم آخر اعتمادا على طبيعة البراز ويشمل: الإسهال المائيWatery diarrhea والدموي Bloody diarrhea، وينتج النوع الأول من غزو الأحياء المجهرية غير المخترقة لنسيج الأمعاء الدقيقة مثل (*Escherichia coli* ،*Vibrio cholera* ، *Clostridium perfringes*)، التي تعمل على إفراز السموم المعوية مؤدية إلى تحفيز الخلايا المخاطية على إفراز السوائل، فيما يحدث الإسهال الدموي نتيجة الإصابة بالأحياء المجهرية المخترقة للطبقة المخاطية للأمعاء مثل (*Campylobacter* spp. ، *Salmonella* spp. ، *Shigella* spp.)، ويتميز هذا النوع من البراز باحتوائه على الدم والمخاط (Brooks *et al*.,2007) .

وقد تكون مسببات الإسهال بكتيرية أو فيروسية أو طفيلية أو فطرية وتشكل المسببات البكتيرية النسبة الأكبر من بين تلك المسببات في الأطفال وبالأخص أفراد العائلة المعوية Enterobacteriaceae إذ تكون أما ممرضات Pathogens أو ممرضات انتهازية Opportunistic

وكلاهما ينتجان عوامل الضراوة Virulence factors المهمة في احداث المرض مثل الذيفانات الداخلية Endotoxins (Jawetz *et al.*, 2004).

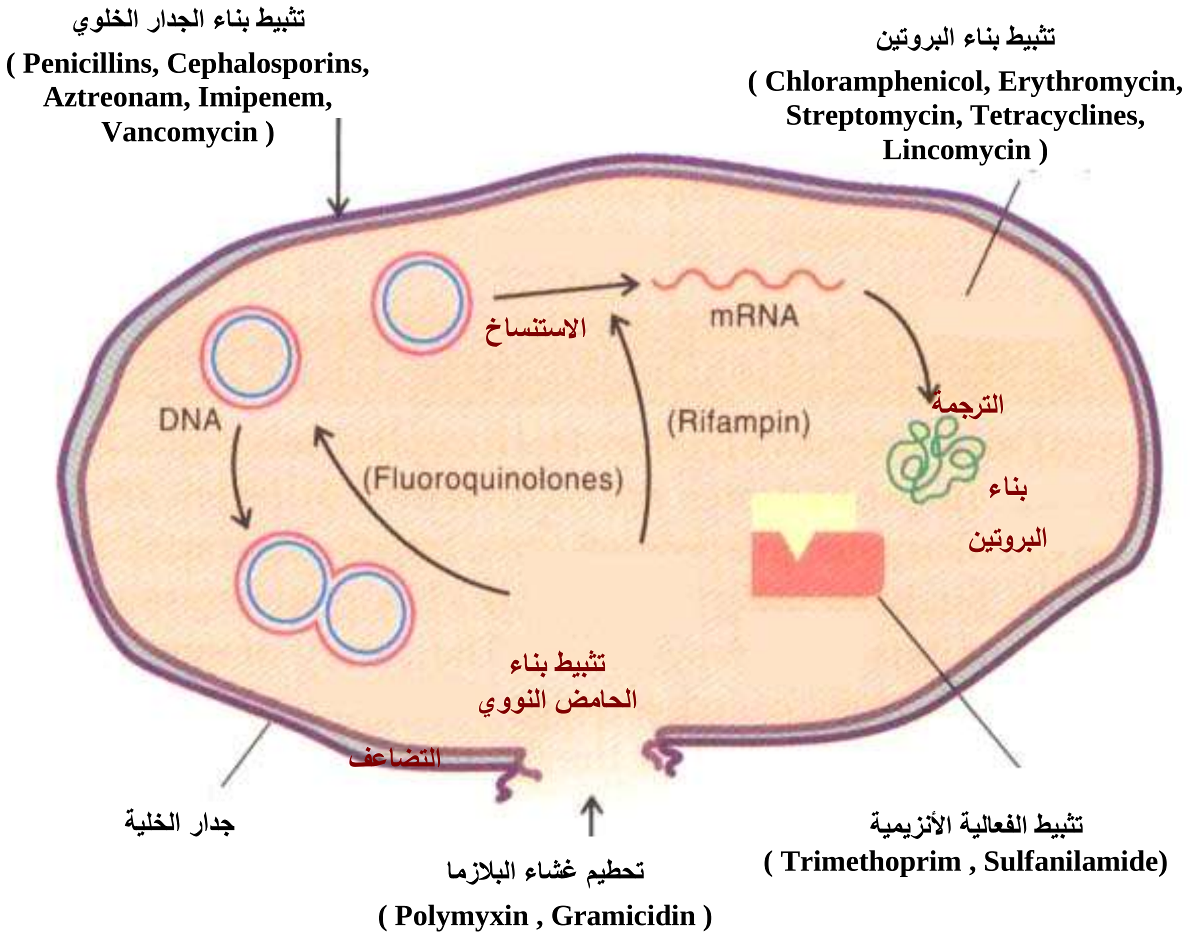
٢,٢ - **المضادات الحيوية** Antibiotic

يشير مصطلح المضادات الحيوية Antibiotics إلى المواد العضوية الطبيعية التي تنتج من الكائن المجهري والتي تعمل على تثبيط نمو كائنات مجهرية أُخرى (الجشاعة ، ٢٠٠١)، 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 (Glazer and Nikaido, 2007) ، ويعتمد استمرار المفعول على الجرعة المناسبة وكذلك نفاذية المضاد الحيوي الى الأنسجة (Greenwood , 1998).

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 ، ٢٠٠٨) . والشكل(٢-١) يوضح أهداف وعمل واستخدام انواع المضادات الحيوية ضد الخلية الجرثومية



الشكل (٢-١) : أهداف وعمل المضادات الحيوية واستخدام أنواعها ضد الخلية البكتيرية
(Nester *et al*., 1998)

٣,٢ - مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية

على الرغم من تنوع ووفرة المضادات الحيوية غير أن مشكلة المقاومة البكتيرية لهذه المضادات أخذت بالانتشار في العالم (الموسوي ، ٢٠٠٦) ، 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) .

3 – **المواد وطرائق العمل** Materials and Methods

1.3- **الأجهزة والمواد**

1.1.3- **الأجهزة المستخدمة**

ت	اسم الجهـــاز		الشركة المصنعة والمنشأ
١	مجهر ضوئي	Light microscope	Boeco (Germany)
٢	مرشحات غشائية	Millipore filter	Difco (England)
٣	فرن كهربائي	Electric Oven	Elektro.mag (Turkiye)
٤	حاضنة	Incubator	Elektro.mag (Turkiye)
٥	صفيحة ساخنة	Hot Plate	Gallenkamp (England)
٦	ميزان كهربائي حساس	Sensitive Electric balance	Kern (Germany)
٧	مقياس الأُس الهيدروجيني	pH-meter	Martini (USA)
٨	ماصات دقيقة	Micropipettes	Slamed (Germany)
٩	موصدة	Autoclave	Triup (Italy)
١٠	جهاز طرد مركزي	Centrifuge	Triup (Italy)
١١	جهاز التقطير	Distillator	Triup (Italy)

2.1.3- **المواد الكيميائية**

ت	اسم المـــادة		الشركة المصنعة
١	أكار – أكار	Agar-Agar	BDH (England)
٢	ألفا – نفثول	α -naphthol	BDH (England)
٣	ببتون	Peptone	Oxoid (England)
٤	بيروكسيد الهيدروجين	Hydrogen peroxide H_2O_2	Thomas Baker (India)
٥	حامض الهيدروكلوريك المركز	Hydrochloric acid	BDH (England)

BDH (England)	Methyl red	صبغة أحمر المثيل	٦
Ajax (Australia)	Disodium phosphate	فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين	٧
BDH (England)	Ethyl alcohol	كحول أثيلي	٨
BDH (England)	Isopropyl alcohol	كحول أيزوبروبيلي	٩
BDH (England)	Sodium chloride	كلوريد الصوديوم	١٠
BDH (England)	Glucose	كلوكوز	١١
BDH (England)	Potassium hydroxide	هيدروكسيد البوتاسيوم	١٢
BDH (England)	Para-dimethyl amino benzaldehyde		١٣
BDH (England)	Tetra methyl-P-phenylene diamine dihydro chloride		١٤

3.1.3- الأوساط الزرعية

الغرض من الاستخدام	الشركة المصنعة	اسم الوسط	ت
تنمية البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز	Difco (USA)	وسط أكار الماكونكي MaConky agar medium	١
عزل بكتريا *Salmonella* spp. و *Shigella* spp.	Himedia (India)	وسط سالمونيلا شيكلا اكار S. S. agar	٢
فحص الحساسية للمضادات الحيوية	Himedia (India)	أكار مولر هنتون Muller Hinton agar	٣
حفظ العزلات وإدامتها	Mast (England)	وسط المرق المغذي Nutrient broth medium	٤
تنمية البكتريا لغرض التشخيص	Mast (England)	وسط الأكار المغذي Nutrient agar medium	٥
فحص استهلاك السترات	Mast (England)	وسط سترات سايمون Simmon citrate medium	٦
فحص الاندول	Himedia (India)	وسط ماء الببتون Peptone water broth	٧

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

الشركة المجهزة	تركيز المضاد في القرص	الرمز	اسم المضاد	ت
Bioanalyse (Turkey)	10 Units	P	Penicillin G	1
Bioanalyse (Turkey)	10 µg	AM	Ampicillin	٢
Bioanalyse (Turkey)	30 µg	KF	Cephalothin	٣
Bioanalyse (Turkey)	30 µg	CTX	Cefotaxime	٤
Bioanalyse (Turkey)	30 µg	AK	Amikacin	٥

Bioanalyse (Turkey)	10 µg	S	Streptomycin	٦
Bioanalyse (Turkey)	5 µg	CIP	Ciprofloxacin	٧
Bioanalyse (Turkey)	30 µg	TE	Tetracycline	٨
Bioanalyse (Turkey)	30 µg	C	Chloramphenicol	٩
Oxoid (England)	15 µg	E	Erythromycin	١٠

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 180ºم لمدة ساعتين .

– التعقيم بالحرارة الرطبة

عقمت الأوساط الزرعية المستخدمة في هذه الدراسة بجهاز الموصدة Autoclave عند درجة حرارة 121ºم وتحت ضغط 1 جو ولمدة ١٥ 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** Solutions

1.1.2.2.3- **المحلول الملحي الفسلجي** Normal Saline

حضر هذا المحلول حسب ما أورده Benson (٢٠٠٢) ، وذلك بإذابة ٠,٨٥ غم من كلوريد الصوديوم في ٩٠ ملليلتر ماء مقطر ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ ملليلتر . عقم بالموصدة ، وحفظ بدرجة حرارة ٤°م لحين الاستعمال .

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

حضر هذا المحلول بالاعتماد على ما جاء به Benson (٢٠٠٢) وكما يلي :-

* **محلول A** : حضر بإذابة ١,١٧٥ غم من كلوريد الباريوم في ٩٠ مllيلتر من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مllيلتر .

* **محلول B** : أضيف ١ مllيلتر من حامض الكبريتيك المركز إلى ٩٠ مllيلتر من الماء المقطر المعقم وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مllيلتر .

أضيف ٠,٥ مllيلتر من محلول (A) إلى ٩٩,٥ مllيلتر محلول (B) ، للحصول على عدد تقريبي للخلايا البكتيرية بمقدار ١٥ x ١٠ ^{٨} خلية/مllيلتر ، وحفظ المحلول في قنينة زجاجية معقمة ذات غطاء محكم لمنع التبخر في درجة حرارة الغرفة وفي الظلام .

2.2.2.3- **الكواشف** Reagents

حُضرت الكواشف التالية على وفق ما جاء به Benson (٢٠٠٢) 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 مllيلتر من الماء المقطر المعقم ثم أُكمل الحجم إلى 100 مllيلتر. 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 مllيلتر كحول إيزوبروبيلي باستخدام حمام مائي ثم أُكمل الحجم إلى ١٠٠ مllيلتر 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 مllيلتر كحول أثيلي 99% ثم أُكمل الحجم بالكحول إلى 100 مllيلتر.

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

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

حُضر بإذابة 0.1 غم من المثيل الأحمر في ٢٥٠ ملليلتر من الكحول الأثيلي بتركيز 95% ثم أُكمل الحجم إلى 500 ملليلتر بإضافة الماء المقطر.

3.2.3- **الصبغات**

حضرت صبغة غرام Gram's Stain على وفق ما جاء به Benson (2002)، إذ 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 .

4.2.3- **تحضير الأوساط الزرعية**

A. **الأوساط الزرعية الجاهزة**

حضرت الأوساط الزرعية المستخدمة في هذه الدراسة (فقرة:٣,١,٢) حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة وبعد أن ضبط الأُس الهيدروجيني عقمت بجهاز الموصدة Autoclave عند درجة حرارة 121 م وتحت ضغط 1 جو ولمدة ١٥ دقيقة ، حُضنت الأوساط الزرعية بعد صبها في الأطباق أو الأنابيب حسب متطلبات التجربة في درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة للتأكد من عدم تلوثها.

B. **الأوساط الزرعية التركيبية**

1.4.2.3– **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 الرقم 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.

2.4.2.3– **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 .

5.2.3- **جمع العينات** Collection of samples

جمعت العينات من المرضى المراجعين لمستشفى النسائية والأطفال في مدينة الديوانية، الذين يعانون من حالات إسهال للمدة من ٢٠١٥/١٢/٥ إلى ٢٠١٦/٢/٢٠. اشتملت الدراسة على ٣٠ عينة.

وقد جمعت عينات البراز في أنابيب معقمة حاوية على ماء الببتون القاعدي بوصفه منشطاً لنمو البكتريا ونقلت مباشرة إلى المختبر لحضنها.

6.2.3- **زرع العينات**

زُرعت العينات على الوسط التفريقي MaConky agar والاختياري S. S. agar ، للتحري عن البكتريا السالبة وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧ْم لمدة ٢٤ ساعة .

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

شُخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على ما جاء في Benson (٢٠٠٢) و Alexander وجماعته (٢٠٠٤) 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 الوسط الزرعي وأُخضعت العزلات إلى الفحص المجهري إذ تمَّ تحضير مسحات من هذه المستعمرات بعد إعادة تنقيتها على وسط أكار الماكونكي وصبغت بصبغة غرام وفحصت تحت العدسة الزيتية للتمييز الخلايا السالبة 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 (٢٠٠٢) و Alexander وجماعته (٢٠٠٤) .

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 :1.2.2.2.3) ، يعد تغير اللون إلى البنفسجي الغامق بعد مرور ٣٠ 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 37ْم ولمدة 24 ساعة ثم أُضيف إليه ٠,٥ 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 1.4.2.3:) بالبكتريا وبواقع مكررين لكل عزلة بكتيرية . حُضنت الانابيب بدرجة حرارة 37ْم ولمدة ٢٤–٤٨ ساعة وبعد اكتمال مدة الحضن أُضيف لأحد المكررات ٣ 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 ٤,٥ أو أقل ، أما ظهور اللون الأصفر فيدل على النتيجة السالبة للتفاعل.

5.2.7.2.3– 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 37ْم 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 شبه الصلب Semi solid agar (فقرة 2.4.2.3:) بالبكتريا بطريقة الطعن ثم حُضنت الأنابيب لمدة 24-48 ساعة في درجة حرارة 37 مْ . تم ملاحظة النمو بانتشار البكتريا حول خط الطعن دليل على أن البكتريا لها قابلية الحركة وهذا دليلٌ على إيجابية الاختبار أما عدم انتشار البكتريا حول خط الطعن فيدل على أن البكتريا غير متحركة.

8.2.3- حفظ وادامة العزلات Storage and maintenance of isolates

1.8.2.3– الحفظ قصير الأمد

لُقح وسط الأكار المغذي بالعزلات المشخصة وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة 24 ساعة ثم أحيطت الأطباق بشريط شمعي لاصق (Parafilm) . جمعت الأطباق داخل أكياس معلمة وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ م° لمدة شهر واحد (Harley and Prescott,1996) .

2.8.2.3– الحفظ متوسط الأمد

لُقح وسط الأكار المغذي المائل بالعزلات المراد حفظها ثم حضن عند درجةحرارة ٣٧ م° لمدة 24 ساعة بعد ذلك أحيطت سدادات الأنابيب بشريط شمعي لاصق وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ م° ولمدة تتراوح بين ١–٤ أشهر (Harley and Prescott,1996).

9.2.3- 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 (١٩٩٨) باستخدام أقراص المضادات الحيوية المبينة في (الفقرة : ٤,١,٣) لإجراء فحص الحساسية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة.

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

٢. 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.

٣. 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 .

٤. نُقلت بعدها أقراص المضادات بملقط معقم إلى الأطباق بواقع ٥–٦ قرص للطبق الواحد، وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧° م لمدة ٢٤ ساعة.

٥. قرأت النتائج بملاحظ مناطق التثبيط حول أقراص المضادات الحيوية المتكونة، وفسرت النتائج مع ما ورد في NCCLS (٢٠٠٥) .

النتائج و المناقشة Results and Discussion

١,٤- العزل والتشخيص للعينات

١,١,٤ - العزل

بينت النتائج كما في الجدول (٤-١) إن العينات البراز المأخوذة من الأطفال المشمولين بالدراسة أظهرت نمواً بكتيرياً كانت ٩٠% للأطفال المصابين بالإسهال, في حين أعطت ١٠% نتيجة سالبة للزرع البكتريولوجي (عينات غير حاوية على نمو).

جدول (٤- ١) : نسب الإصابة بالاسهال عند الاطفال المشمولين بالدراسة

ت	عدد العينات المفحوصة	العينات ذات النمو البكتيري العدد (٪)	العينات غير الحاوية على نمو بكتيري العدد (٪)
١	٣٠	٢٦ (٨٦,٦٦)	٤ (١٣,٣٤)

إن ارتفاع نسبة الإصابة قد يعزى إلى عدم المعالجة المبكرة للإصابة الأمر الذي أدى إلى تطور الإصابة. أما عدم وجود نمو بكتيري في اربع عينات للأطفال المصابين بالإسهال قد يعزى سبب ذلك إلى أمور عديدة منها أن هؤلاء المرضى يتناولون مضادات الحياة إلى الحد الذي لا يمكن عزلها، أو أن المسببات ليست بكتيرية فقد تكون فطرية او فيروسية او طفيلية (Bartlett, 1992) .

٢,١,٤- تشخيص العزلات البكتيرية

تم تشخيص البكتريا اعتماداً على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية التي اوردها كل من Benson (٢٠٠٢) و Alexander وجماعته (٢٠٠٤).

بينت نتائج الدراسة الحصول على ٤٢ عزلة بكتيرية مختلفة من الحالات المشمولة بالدراسة ، واظهرت نتائج التشخيص ان نلك العزلات توزعت على سبعة اجناس بكتيرية وبنسب مختلفة وكما يظهر الجدول (٤-٢).

جدول (٤-٢) : الأجناس البكتيرية المعزولة من حالات الإسهال

ت	جنس ونوع البكتريا المعزولة	عدد العزلات	النسبة المئوية
١	*Escherichia coli*	19	٤٥,٢٤ %

٢	*Salmonella* spp.	7	١٦,٦٧ %
٣	*Proteus* spp.	5	١١,٩١ %
٤	*Klebsiella pneumonia*	4	٩,٥٢ %
٥	*Shigella* spp.	4	٩,٥٢ %
٦	*Enterobacter* spp.	٣	٧,١٤ %
٨	**المجموع الكلي للعزلات**	42	١٠٠%

احتلت بكتريا *Escherichia coli* النسبة الأعلى ٤٥,٢٤ % (١٩ عزلة)، جائت بعدها *Salmonella* spp. بنسبة ١٦,٦٧ % (٧ عزلات)، فيما اظهرت بكتريا *Proteus* spp. نسبة ١١,٩١ % (٥ عزلات) ، في حين اظهرت كل من *Klebsiella pneumonia* و *Shigella spp.* النسبة نفسها ٩,٥٢ % (٤ عزلات)، في حين كانت اقل نسبة عزل لبكتريا *Enterobacter spp.* ٧,١٤ % (٣ عزلات).

من الجدول (٤-٢) نلاحظ ان بكتريا *E. coli* جاءت في المرتبة الاولى من ناحية العزل وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي اجريت في اماكن واوقات مختلفة، اذ احتلت المرتبة الاولى لدى الحميداوي (٢٠٠٤) في دراستها على الاطفال في مدينة الديوانية، في حين لم تتفق النتائج مع ما توصلت إليه الجبوري (١٩٩٩) إذ كانت نسبة الإصابة بهذه البكتريا (19.28%).

وعلى الرغم من أن بكتريا *E. coli* 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 (Brooks et al., 2001)، كما أشار Myrvik and Weiser (١٩٩٨) إلى أن استخدام الأدوية المثبطة للمناعة والمضادات الحياتية لإمراض مختلفة قد يؤدي إلى زيادة الإصابات الانتهازية التي تسببها العائلة المعوية ومنها *E. coli* .

اما بكتريا *Salmonella spp.* فكانت النسبة المستحصلة في هذه الدراسة هي (١٦,٦٧%) وهي اعلى مما حصلت عليه الجبوري (١٩٩٩) في دراستها على اطفال محافظة بابل وكذلك اعلى مما توصل اليه الحميداوي (٢٠٠٤) اذ كانت النسبة لديهما ١٢% و ٤,٥% على التوالي. اما بقية العزلات فكانت نسبها متفاوتة نوعاً ما وحسب الجدول (٤-٢).

وقد اظهرت العزلات المستحصل عليها استجابات مختلفة للاختبارات الكيمو حيوية المختلفة التي تم اجراؤها وحسب الجدول (٤-٣).

جدول (٤-٣) : نتائج الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا المعزولة من حالات الإسهال

ت	جنس ونوع البكتريا المعزولة	صبغة غرام	Catalase	Oxidase	Motility	Indol	Methyl Red	Voges-Proskauer	Citrate
١	*Escherichia coli*	−	+	−	+	+	+	−	−
٢	*Salmonella* spp.	−	+	−	+	−	+	−	+
٣	*Proteus* spp.	−	+	−	+	±	+	−	±
٤	*Klebsiella pneumonia*	−	+	−	−	−	+	+	+
٥	*Shigella* spp.	−	±	−	−	±	+	−	−
٦	*Enterobacter* spp.	−	+	−	+	−	−	+	+

٢,٤- حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

تم في هذه الدراسة اختبار حساسية العزلات الموجبة لصبغة غرام ، والبالغ عددها ٢٠ عزلة لـ ١٠ مضادات حيوية بالاعتماد على أقطار التثبيط القياسية الواردة في (NCCLS, 2005).

جدول (٤-٤): المعدلات القياسية لأقطار التثبيط للمضادات الحيوية (NCCIS, 2005)

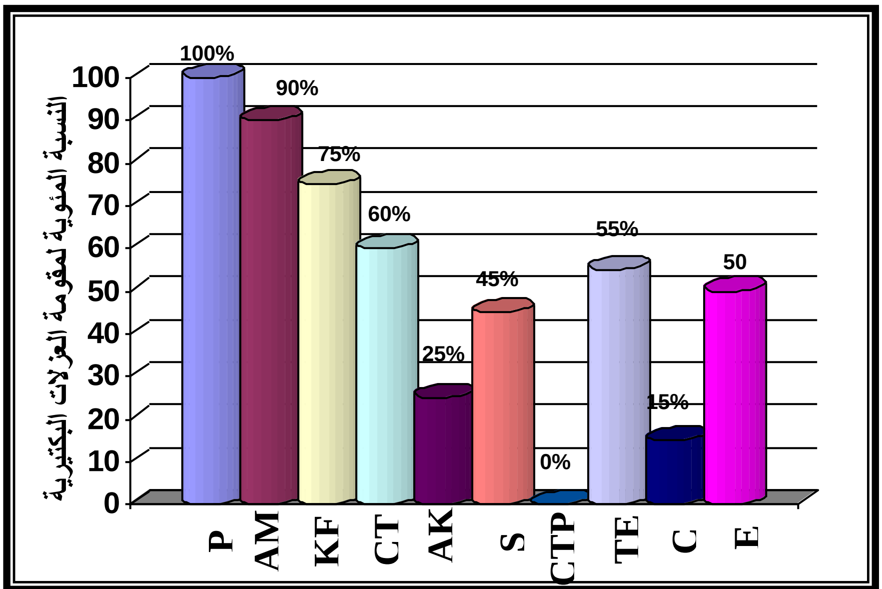
ت	اسم المضاد	الرمز	محتوى القرص	البكتريا المستخدمة في الاختبار	حساسة اقل أو يساوي	مقاومة أكثر أو يساوي
١	**Penicillin G**	P	10 Units	Streptococci other Organisms	28 19	29 28
٢	**Ampicillin**	AM	10 µg	Streptococci other Organisms	28 18	29 26
٣	**Cephalothin**	KF	30 µg	All Organisms	14	18
٤	**Cefotaxime**	CTX	30 µg	Streptococci other Organisms	25 14	28 23
٥	**Amikacin**	AK	30 µg	All Organisms	14	17
٦	**Streptomycin**	S	30 µg	All Organisms	11	15
٧	**Ciprofloxacin**	CIP	5 µg	All Organisms	15	21
٨	**Tetracycline**	TE	30 µg	Streptococci other Organisms	18 14	23 19
٩	**Chloramphenicol**	C	30 µg	Streptococci other Organisms	20 12	21 18
١٠	**Erythromycin**	E	15 µg	Streptococci other Organisms	15 13	21 23

جدول (٤-٥): فحص الحساسية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة

ت	المضاد الحيوي / العزلات البكتيرية	Penicillin G	Ampicillin	Cephalothin	Cefotaxime	Amikacin	Streptomycin	Ciprofloxacin	Tetracycline	Chloramphenicol	Erythromycin
١	*E. coli*	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R
٢	*E. coli*	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

٣	*E. coli*	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S
٤	*E. coli*	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
٥	*Salmonella* spp.	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S
٦	*Salmonella* spp.	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
٧	*Salmonella* spp.	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S
٨	*Salmonella* spp.	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S
٩	*Proteus* spp.	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
١٠	*Proteus* spp.	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R
١١	*Proteus* spp.	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R
١٢	*K. pneumonia*	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S
١٣	*K. pneumonia*	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R
١٤	*K. pneumonia*	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R
١٥	*Shigella* spp.	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S
١٦	*Shigella* spp.	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R
١٧	*Shigella* spp.	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R
١٨	*Enterobacter* spp.	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
١٩	*Enterobacter* spp.	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
٢٠	*Enterobacter* spp.	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
المجموع		٢٠ ١٠٠ %	١٨ %٩٠	١٥ %٧٥	١٢ %٦٠	٥ %٢٥	٩ %٤٥	٠ % ٠	١١ %٥٥	٣ %١٥	١٠ %٥٠

شكل (٤-١): النسب المئوية لمقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة



P=PenicillinG ; AM=Ampicillin ; KF=Cephalothin ; CTX=Cefotaxime ;AK=Amikacin ; S=Streptomycin ; CIP = Ciprofloxacin ; TE = Tetracycline ; C=Chloramphenicol ;
E= Erythromycin

يبين الجدول (٤-٥) والشكل (٤-١) النسب المئوية لمقاومة العزلات البكتيرية المعزولة من حالات الإسهال في الأشخاص المشمولين بالدراسة، إذ أظهرت النتائج أن نسبة المقاومة لمضادات مجموعة ألبيتا لاكتام ، والتي تشمل البنسلينات كانت لمضاد Penicillin G و Apmicillin هي ١٠٠% و ٩٠% وعلى التوالي . في حين كانت المقاومة التي أظهرتها العزلات البكتيرية بالنسبة لمجموعة مضادات السيفالوسبورينات المتمثلة بالمضادين Cephalothin و Cefotaxime هي ٧٥% و ٦٠% 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 ٩٦% و ٨٥% وعلى التوالي، كما بينت العبسي (٢٠٠٩) ان نسبة مقاومة عزلاتها لمضاد Apmicillin كانت ٨٩,٢%.

إن وجود المقاومة العالية للعزلات قيد الدراسة لمجموعة مضادات ألبيتا لاكتام قد يعزى إلى إنتاج إنزيمات ألبيتا لاكتامير، 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).

كما بينت النتائج ان عزلاتنا ابدت مقاومة ضعيفة تجاه مضادات مجموعة Aminoglycosides التي شملت كل من مضاد Amikacin ، و Streptomycin فكانت نسب المقاومة لها هي ٢٥% و ٤٥% وعلى التوالي. وهذا مقارب لما توصلت إليه العبسي (٢٠٠٩) إذ ان عزلاتها قد قاومت هذا المضاد بنسبة ١٠% و ٢٠% وعلى التوالي

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 (٤–٥) والشكل (٤–١) يتبين إن عزلات هذه الدراسة اظهرت حاسية تامة تجاه مضادات مجموعة Quinolones المتمثلة بمضاد Ciprofloxacin. 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*., 1998).

نلاحظ وجود مقاومة متوسطة لمضاد Tetracycline وصلت الى ٥٥% على الرغم من عدم استعمال هذا المضاد في علاج أخماج الجهاز الهضمي، وقد سجلت مقاومة البكتريا للتتراسايكلين منذ الخمسينات وتزايدت في اغلب بلدان العالم (Chopra and Roberts, 2001) ، وأشارت البحوث إلى حدوث زيادة مماثلة في مقاومة البكتريا للتراسايكلين في البلدان المجاورة إذ وجد Jassir وجماعته (٢٠٠٠) بان مقاومة البكتريا 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 ١٥%، 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 الجهاز الهضمي و الأخماج الأخرى بالنظر لمضاعفاته الجانبية.

اظهرت النتائج ان نسبة المقاومة لمضادات مجموعة Macrolides المتمثلة بمضادي Erythromycin هي ٥٠%، تتم المقاومة لهذه المجموعة من المضادات عن طريق تغيير موقع الهدف لارتباط المضاد بالرايبوسوم مما يؤدي إلى تقليل ارتباط المضاد (Hugo and Russell, 1983) ، 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 جدول (٤–٥) نجد أن غالبية العزلات قيد الدراسة كان لها صفة مقاومة أكثر من مضاد حيوي إذ تتراوح بين مقاومة (٩) مضادات كما في العزلتين رقم (١٩ و ٢٠) إلى مضاد واحد كما في العزلة رقم (٢). إن زيادة مقاومة البكتريا للعديد من المضادات الحيوية قد يعود سببه إلى الاستعمال الواسع والعشوائي لهذه المضادات في معالجة الأخماج المختلفة، ولأن بكتريا *E. coli* تشكل جزءا من النبيت الطبيعي في الجهاز الهضمي، 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 الهضمي عن طريق الاقتران، التحويل أو التوصيل (Wilkins *et al.*, 2007) .

الاستنتاجات

١. تبين إن بكتريا E. coli احتلت النسبة الأعلى من بين البكتريا المعزولة من حالات السهال ٤٥,٢٤ % جائت بعدها .*Salmonella* spp بنسبة ١٦,٦٧ % ، فيما اظهرت بكتريا .*Proteus* spp نسبة ١١,٩١ % ، في حين اظهرت كل من *Klebsiella pneumonia* و .*Shigella* spp النسبة نفسها ٩,٥٢ % ، في حين كانت اقل نسبة عزل لبكتريا .*Enterobacter* spp ٤,٧٦ % .

٢. أظهرت العزلات البكتيرية مقاومة متعددة لعدد من المضادات الحيوية المدروسة إذ أظهرت مقاومة عالية لمضادات البيتالاكتام ومقاومة متوسطة لكل من Streptomycin ،Tetracycline Erythromycin و مقاومة ضعيفة لـ Chloramphenicol و Amikacin ، في حين اظهرت حساسية تامة لمضاد الـ Ciprofloxacin.

التوصيات

١. إجراء الزرع البكتريولوجي وفحص الحساسية للمصابين بحالات الاسهال تجنباً لإعطاء المضادات بشكل عشوائي ومنعاً لحدوث المقاومة مستقبلاً.
٢. إجراء دراسة موسعة على إمراضية البكترية المعوية على الحيوانات المختبرية في مناطق الجهاز الهضمي ودراسة التأثيرات النسيجية عليها .
٣. أجراء دراسة مسحية لمعرفة مدى انتشار البلازميدات المشفرة للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ودراسة النسق الوراثي السائد لهذه البلازميدات باعتبارها مؤشرات وبائية منتشرة .

المصادر العربية

بيومى، رضا احمد. (٢٠٠٨). أسس علم الأحياء الدقيقة. الطبعة الأولى، مكتبة الأنجلو، القاهرة، مصر .

الجبوري، حنان سلمان. (١٩٩٩). دراسة وبائية لمسببات الاسهال في الاطفال في محافظة بابل. رسالة ملجستير – كلية العلوم – جامعة بابل.

الجشاعة، فضل أحمد سعيد. (٢٠٠١) . دراسة علاقة مقاومة عزلات بكتريا ***Pesudomonas aeruginosa*** للمضادات الحيوية مع إنتاجها للبايوسين. رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

الحميداوي، ابتسام ثامر جعاز. (٢٠٠٤). تأثير خليط المضادات الحياتية في البكتريا المعوية المعزولة والمشخصة من حالات اسهال للاطفال من مدينة الديوانية. رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة القادسية.

العبسي، سميرة عجير جريمخ. (٢٠٠٩). دراسة بعض البكتريا المكونة للأغشية الحيوية على سطوح مينا السنان. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة القادسية.

الموسوي، أزهار نوري حسين. (٢٠٠٦). العزل والتثبيت الوراثي للخمج البكتيري والفطري في المسالك البولية وعلاقته بمرض السكري بين النساء الحوامل في محافظة القادسية. اطروحة دكتوراه. كلية التربية. جامعة القادسية.

المصادر الأجنبية

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

AL-Kaby, F. J. (2000). Astudy on diarrhea in relation to malnutrion in children under 2 years in Baghdad . ,M.se.Thesis stbmitted of the college of medicine university of AL Mustansiriya.

Bartlett, J. G. (1992) . Antibiotic – associated diarrhea. Clin. Infect- Dis. 15: 573 .

Behrman, R. E.; Kliegman , R. M. and Jenson, H. B. (2000). Nelson textbook of pediatrics.16th ed W.BSaunders company ,Philadelphia,London , Toronto ,Montreal ,Sydney and Tokyo

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

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.; Ornston, L. N.; Jawetz, E.; Melnick, J. L. and Adelberg, E. A. (1998). Jawetz; Melnick and Adelberg's Medical microbiology. 21st ed. Middle east Beirut Company. London.

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.

Brooks,G.F.;Bulel,J.S.;and Morse,S.A.(2007) Medical microbiology (24th edition). Lange Medical Books / MC Graw-Hill.

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

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

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. Microb., 39: 2206-2212.

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.

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

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

Glazer, A. N. and Nikaido, H. (2007). Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology . 2nd ed . Cambridge University Press. New York., pp: 324-339

Greenwood, (1998). Antibiotics and chemotherapeutic agents used in the therapy of Bacterial infections. 9th ed. Microbiology and Microbial infections., Vol. 2: 197-223 .

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.

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

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

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

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.

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. Microb., 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.

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

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. Antimicrob. Agents Chemother., 43(4): 727-737.

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

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

National Digestive Diseases Information Clearinghouse (NDDIC). (2007) .Diarrhea. National Institute of Diabetas and Digestive and Kidney Diseases,National Institutes of Health . NIH publication No. 7-2749.

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.

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.

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. Hospt. Infect., 18: 23-34.

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.

World Health Organization (WHO) (2008a) The top 10 causes of death. W.H.O. media center .fact sheet N. 310.