جامعة القادسية
كلية العلوم
قسم علوم البيئة

دراسة الحساسية الدوائية لبكتريا *Staphylococcus aureus* المتواجدة في بيئة الفم

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

من قبل

اسماعيل عبد الله خليف و نورة محمد ضياء نور

إشراف

م. م. ثائر عبد دعيشيش

نيسان . 2017

بسم الله الرحمن الرحيم

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

صدق الله العلي العظيم

سورة الإسراء

الآية : ٨٥

الإهداء

إلى من علمنا حرفاً فملّكنا عبداً .... مُعلمنا
عرفاناً وإمتناناً

إلى من أنار دربنا ، إلى الشفاه التي لم تكل بالدعاء لنا .... والدينا
براً وإحساناً

إلى رمز المودة والوفاء والصدق والمحبة .... أخوتنا وأصدقائنا
إخلاصاً و وفاءاً

إلى كل يد امتدت لنا بالخير .... إلى كل من يسره نجاحنا
إليهم جميعاً نُهدي ثمرة جهدنا المتواضع هذا

إسماعيل و نور

شكر و تقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين أبي القاسم محمد وعلى آله الطاهرين وصحبه المنتجبين.

ونحن نكمل بحثنا يطيب لنا أن نتقدم بأسمى معاني الشكر والعرفان لأستاذنا الفاضل المدرس المساعد ثائر عبد دعيشيش المشرف على بحثنا الذين كان له الفضل بعد الله في اختيار موضوع البحث وجهده المتواصل في المتابعة والإرشاد ومساعدتنا في توفير الكثير من مستلزمات البحث فجزآه الله عنا الجزاء الأوفى .

كما يدعونا الواجب أن نتقدم بوافر الشكر والتقدير إلى عمادة كلية العلوم / جامعة القادسية ورئاسة وأساتذة قسم البيئة، عرفاناً منا لما قدموه لنا من عون طيلة مدة الدراسة.

كما لا يفوتنا أن نتقدم بالشكر الجزيل لمنتسبي مستشفى النعمانية العام في مدينة الكوت للمساعدات الكبيرة التي قدموها واخص بالذكر مساعد مختبر حامد حمزة و سلمان كريم.

وفي الختام شكرنا وامتناننا إلى عائلتنا لتوفيرهم لنا كل أشكال الدعم وتحملهم معنا عناء الجهد طيلة فترة الدراسة أثابهم الله خير الثواب كما نتقدم بوافر الشكر لكل من ساعدنا في انجاز هذا البحث ولم تسنح الفرصة لذكره .

إسماعيل و نور

الخلاصة

جمعت العينات (مسحات) من افواه المرضى المراجعين لمستشفى النعمانية العام في مدينة الكوت، الذين يعانون من امراض الفم للمدة من 2016/11/1 إلى 2017/2/1. اشتملت الدراسة على 40 عينة قُسمت إلى مجموعتين، شملت المجموعة الأولى 20 عينة لاشخاص مصابين بأمراض الفم، في حين شملت المجموعة الثانية (مجموعة السيطرة) 20 عينة لأشخاص اصحاء وذلك بهدف إجراء مقارنة لنسبة تواجد بكتريا *Staphylococcus aureus* في المجموعتين.

بينت النتائج أن المسحات المأخوذة من الاشخاص المشمولين بالدراسة أظهرت نمواً بكتيرياً كانت 90% للأشخاص المصابين بأمراض الفم، 55% للأشخاص الأصحاء (مجموعة السيطرة) . يقابلها 10% و 45% وعلى التوالي للمجموعتين أعطت نتيجة سالبة للزرع البكتريولوجي (عينات غير حاوية على نمو).

تم تشخيص 6 عزلات (20.68%) بكتيرية تعود لبكتريا *S. aureus* من 29 عينة كانت تحتوي على نمو بكتيري، توزعت على 4 عزلات (22.22 %) من العينات الخاصة بالأشخاص المصابين بأمراض الفم (المجموعة الأولى)، وعزلتين (18.18 %) من العينات الخاصة بالأشخاص الأصحاء (المجموعة الضابطة).

أظهرت نتائج فحص الحساسية الدوائية تجاه 10 مضادات حيوية من المضادات التي اغلبها شائع الاستعمال وان معظم العزلات البكتيرية قيد الدراسة أظهرت مقاومة متعددة لمعظم هذه المضادات تراوحت بين (مضادين) قاومتهما العزلة رقم (5) إلى (9 مضادات) قاومتها العزلة رقم (3).

إذ أظهرت النتائج أن نسبة المقاومة لمضادات مجموعة ألبيتا لاكتام ، والتي تشمل البنسلينات كانت لمضاد Penicillin G و Apmicillin هي 100% و 83.3% وعلى التوالي. في حين كانت المقاومة لمجموعة مضادات السيفالوسبورينات المتمثلة بالمضادين Cephalothin و Cefotaxime هي 66.7% و 50% وعلى التوالي، كما أبدت مقاومة ضعيفة تجاه مضادات مجموعة Aminoglycosides التي شملت كل من مضاد Amikacin ، وStreptomycin فكانت نسب المقاومة لها هي 16.7% و 33.3% وعلى التوالي.

كما أظهرت حاسية تامة تجاه مضادات مجموعة Quinolones المتمثلة بمضاد Ciprofloxacin ، وكانت نسبة المقاومة لمضاد Tetracycline هي 50 %، اما بالنسبة لمضاد Chloramphenicol فقد أظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة ضعيفة تجاهه إذ بلغت 33.3%، وأخيراً نسبة المقاومة لمضادات مجموعة Macrolides المتمثلة بمضاد Erythromycin كانت 66.7%.

المحتويات

الموضوع	التسلسل
الفصل الأول : المقدمة	2
الفصل الثاني : استعراض المراجع	
1.2 – بيئة الفم mouth environment	5
1.1.2 – الانسجة الصلبة (الاسنان) Hard tissues (teeth)	5
2.1.2 – الانسجة الرخوة (الاغشية المخاطية) Soft Tissues (Mucosa)	5
2.2 – بكتريا المكورات العنقودية Staphylococcus spp.	6
3.2 – المضادات الحيوية Antibiotic	7
4.2 – مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية	9
الفصل الثالث : المواد و طرائق العمل	
1.3 – الأجهزة والمواد	12
1.1.3 – الأجهزة المستخدمة	12
2.1.3 – المواد الكيميائية	12
3.1.3 – الأوساط الزرعية	13
4.1.3 – المضادات الحيوية المستخدمة في فحص الحساسية و تراكيزها والشركة المجهزة والمنشأ	13
2.3 – طرائق العمل Work methods	14
1.2.3 – طرائق التعقيم	14
2.2.3 – تحضير المحاليل والكواشف والصبغات	14
1.2.2.3 – المحاليل Solutions	14
1.1.2.2.3 – المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline	14
2.1.2.2.3 – محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland Standard	14
2.2.2.3 – الكواشف Reagents	15
1.2.2.2.3 – كاشف الأوكسديز Oxidase Reagent	15
2.2.2.2.3 – كاشف إنزيم الكاتليز Catalase Reagent	15
3.2.2.2.3 – كاشف تميع الجيلاتين Gelatin liquefaction reagent	15
4.2.2.2.3 – محلول بلازما دم الأرنب	15

الموضوع	التسلسل
3.2.3– الصبغات	15
4.2.3– تحضير الأوساط الزرعية	16
1.4.2.3– وسط أكار الدم Blood Agar Medium	16
2.4.2.3– وسط اختبار الحركة Motility test medium	16
3.4.2.3– وسط تميع الجيلاتين Gelatin liquefaction medium	16
5.2.3– جمع العينات Collection of samples	17
6.2.3– زرع العينات	17
7.2.3– عزل وتشخيص البكتريا Isolation and Identification of Bacteria	17
1.7.2.3– الصفات الزرعية والفحص المجهري	17
2.7.2.3– الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests	17
1.2.7.2.3– اختبار إنزيم الأوكسديز Oxidase Test	18
2.2.7.2.3– اختبار إنتاج الكاتليز Catalase Test	18
3.2.7.2.3 – إختبار الحركة Motility Test	18
4.2.7.2.3– النمو على أكار المانيتول الملحي Growth on Mannitol Salt Agar	18
5.2.7.2.3– اختبار تميع الجيلاتين Gelatin Liquefaction Test	18
6.2.7.2.3– اختبار إنزيم مخثر البلازما بطريقة الأنبوب Tube Coagulase Test	19
7.7.2.3– إنتاج الإنزيم الحال للدم Detection of Hemolysin Production	19
8.2.3– حفظ وادامة العزلات Storage and maintenance of isolates	20
9.2.3– حساسية البكتريا للمضادات الحيوية Antibiotics Sensitivity Test	20
10.2.3– التحليل الإحصائي	21
الفصل الرابع : النتائج و المناقشة	
1.4– العزل والتشخيص للعينات	23
1.1.4 – العزل	23
2.1.4– تشخيص العزلات البكتيرية	24
2.4– حساسية البكتريا للمضادات الحيوية	26
3.4– الاستنتاجات Conclusions	31
4.4– التوصيات Recommendations	32
المصادر	34

قائمة بعناوين الجداول

الرقم	العنـــوان	الصفحة
1-4	نسب الإصابة بالاسهال عند الاطفال المشمولين بالدراسة	23
2-4	نتائج الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا **E. coli** المعزولة من حالات الإسهال	24
3-4	نسب تواجد بكتريا ***E. coli*** في براز الأطفال المشمولين بالدراسة	25
4-4	المعدلات القياسية لأقطار التثبيط للمضادات الحيوية (NCCIS, 2005)	26
5-4	فحص الحساسية لعزلات ***E. coli*** قيد الدراسة	27

قائمة بعناوين الأشكال

الرقم	العنـــوان	الصفحة
1-2	أهداف وعمل المضادات الحيوية واستخدام أنواعها ضد الخلية الجرثومية	9
1-4	النسب المئوية لمقاومة عزلات ***S. aureus*** للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة	27

الفصل الأول

المقدمة

INTRODUCTION

1 - المقدمــة : Introduction

يكوّن التجويف الفمي بيئة مفتوحة تدخل اليها العديد من الاحياء المجهرية وقد يبتلع قسم منها في حين يستقر القسم الاخر ويكوّن فلورا مقيمة في الفم لتوفر السطح النسيجي الملائم والغذاء وعدم تأثرها بالعوامل الميكانيكية والمناعية في الفم (Nolte, 1982).

وتعد الفلورا الفموية Oral Flora من اول الانواع التي شاهدها العلماء ولكنها اهملت لان امراض الفم كانت تعالج ببساطة فالام الاسنان مثلا كانت تعالج بقلع السن المصاب (Gibbons, 1984) تقدر الفلورا البكتيرية في الفم بحوالي اكثر من 300 جنس بكتيري مضافا اليها الابتدائيات Protozoa والخمائر yeasts، إذ عزل حاليا اكثر من 200 نوع مختلف من اللويحة السنية Dental plaque فقط (Nisengard & Newman, 1994)، كما ان كل 10 ملم^3 من اللعاب يحوي ملايين الاحياء المجهرية فضلاً عن مناطق اخرى في الفم مثل اللسان Tongue واللثة Gum والخدود Cheeks والتي لم يقدر لحد الان اعداد الفلورا الجرثومية المستعمرة لها (Tortora *et al*, 2001).

تعد *Staphylococcus aureus* النوع الأهم من جنس المكورات العنقودية ذات الاهمية السريرية للإنسان، وقد حظيت هذه البكتريا باهتمام العلماء في جميع انحاء العالم لاهميتها المرضية ولانتشارها الواسع في الطبيعة (Brooks *et al* , 2001)، إذ تنتشر هذه الجراثيم بشكل كبير في الطبيعة وهي احد اهم مسببات التسمم الغذائي Food Posining كما انها توجد على الجلد والاسطح المخاطية للانسان وتعد من الجراثيم الممرضة Pathogenic Bacteria حيث تسبب امراضاً جلدية مثل الدمامل Carbuncles والخراجات الجلدية Skin Abscesses او امراضاً داخلية مثل ذات الرئة Pneumonia والتهاب الشغاف القلبي حيث تمتلك هذه الجراثيم عدداً من عوامل الضراوة مثل الذيفانات والانزيمات المقاومة للمضادات الحيوية والبروتينات المقاومة للحرارة (Harly & Prescott, 1996).

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 البنسلين Pencillin وكذلك مقاومة بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococci* لمضاد المشلين Methicillin (Glazer and Nikaido, 2007).

أهداف البحث : Aims of the Search

1. عزل وتشخيص بكتريا *Staphylococcus aureus* المتواجدة في بيئة الفم.
2. دراسة حساسيتها الدوائية تجاه بعض المضادات المستخدمة محلياً.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

LITERATURE REVIEW

2. استعراض المراجع Literature Review

1.2- بيئة الفم mouth environment

يعد تجويف الفم بيئة صالحة لنمو الجراثيم لكونها بيئة رطبة ومظلمة تحافظ على درجة حرارة ثابتة نسبيا 34 – 36 م^{o} ورقم هيدروجيني قريب من التعادل (Marsh & Martin , 1992) . فضلاً عن التنوع التشريحي الذي يوفر عدداً من المواقع البيئية Ecological Niches التي يمكن استيطانها من قبل الفلورا الجرثومية ويمكن تقسيم هذه المواقع الى مجموعتين (Theilade, 1990) هما:

1.1.2- الانسجة الصلبة (الاسنان) Hard tissues (teeth) :

يعد السن سطحاً صلباً يوفر عدة مواقع يمكن استعمارها من قبل الجراثيم وهي فوق اللثة Supra Gingival ، تحت اللثة Sub Gingival ، حافة اللثة Gingival Margin .

2.1.2- الانسجة الرخوة (الاغشية المخاطية) Soft Tissues (Mucosa) :

يتكون الغشاء المخاطي الفموي Oral Mucosa من سطح متقشر من الخلايا الحرشفية Epithelial Cells يوفر العديد من المناطق القابلة للالتصاق من قبل الجراثيم وهي الغشاء المخاطي المبطن للخدود Cheeks Mucosa ، اللسان Tongue ، اللثة Gingiva ، سقف الفم Oral Palate ارضية الفم Oral Floor ثم موقع شق اللثة Gingival cervice الواقع بين الانسجة الحرشفية الرابطة للثة وبين الاسنان ويعد موقعاً مهماً لأنه يحوي الانسجة بنوعيها الصلبة والرخوة ويوفر موقعاً مثالياً لاستعمار الجراثيم .

كما يمتلك الفم نوعين من السوائل (Marcotte & Lavoie, 1998) هما:

- **اللعاب Saliva** : ويفرز من قبل الغدد اللعابية الرئيسية والثانوية ويجهز منطقة تحت اللثة بالسوائل .
- **سائل شق اللثة Gingival Cervicular Fluid** : ينضح هذا السائل من البلازما التي تمر عبر اللثة حتى تصل الى شق اللثة ويجري على طول الاسنان ويجهز منطقة فوق اللثة بالسوائل المرطبة.

2.2 – 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، ومشابهه لها من حيث كونها موجبة لصبغة غرام وموجبة لفحص الكاتاليز Catalase (Goldman and Green, 2009).

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 (Jawetz *et al*., 2004) . تنمو على الأوساط الاعتيادية عند درجة حرارة 37مْ ، تظهر المستعمرات دائرية رقيقة ولماعة يصل قطر المستعمرة 2–3ملم ، تنمو في مدى حراري (15–43) مْ ، قادرة على تحمل تراكيز ملح NaCl تصل إلى 15% منتجة للصبغات الكاروتينية بتراكيز مختلفة يتراوح من الأصفر الذهبي إلى الأبيض اعتماداً على نوع السلالة وظروف النمو (Brooks , 2001) .

يتضمن جنس العنقوديات ثلاثين نوعاً في الاقل ، منها ثلاثة انواع رئيسية ذات اهمية طبية وهي *S. aureus* ، *S. Epidermidis* و *S. saprophyticus* ، ويتميز النوع *S. 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). يمكن ان تُحدث هذه البكتريا اصابات في الاسنان مثل اصابة قناة الجذر Root canal، إذ قد تسببها هذه البكتريا لوحدها أو بالاشتراك مع بكتريا اخرى لا سيما انها تتوطن الفم في الايام الاولى بعد الولادة (Brooks , 2001). كما انها تُحدث 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).

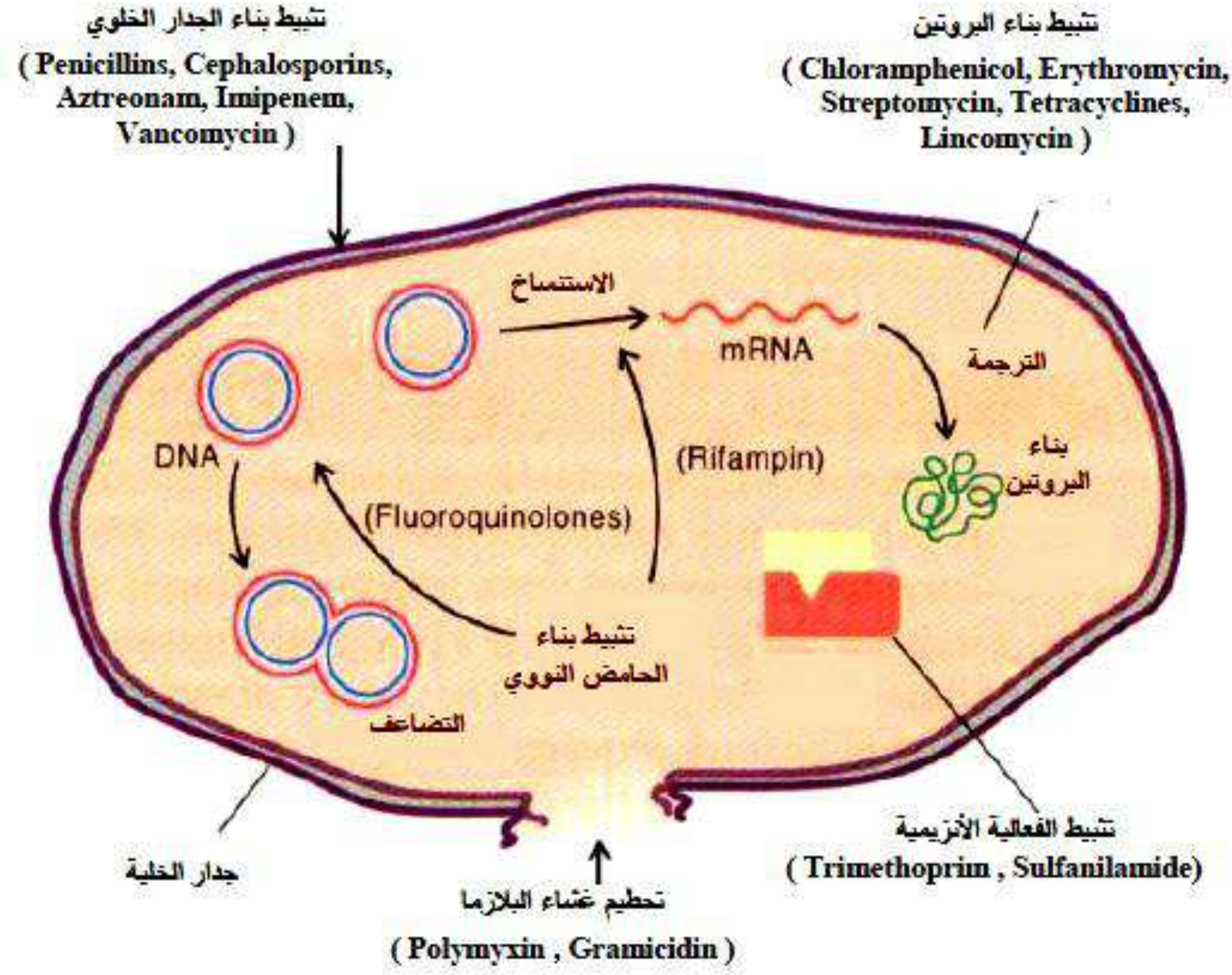
تحدث هذه الإصابات عن طريق قابلية الجرثومة على غزو أنسجة المضيف والتضاعف والانتشار خلال هذه الانسجه وإنتاج العديد من المواد الخارج خلوية Extracellular Substances مثل الأنزيمات والذيفانات وتشمل الأنزيمات Coagulase ، Hyaluronidase ، Proteinase ، Lipase ، Penicillinase ، phosphatase ، Deoxyribonucease، أما 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 (Jawetz *et al.*, 2004) كذلك لها القدرة على إنتاج ذيفان متلازمة الصدمة السمي1 (Toxic Shock Syndrome (TSST-1 Toxin والذيفان المسبب للتقشر الجلدي Exfoliative Toxin (Collee *et al.*, 1996).

3.2 – 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 (الموسوي، 2006)، 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 (Hogg , 2005) . 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 (Franklin and Snow, 2005).

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 ، 2008) . والشكل(2-1) يوضح أهداف وعمل واستخدام انواع المضادات الحيوية ضد الخلية الجرثومية



الشكل (2-1): أهداف وعمل المضادات الحيوية واستخدام أنواعها ضد الخلية الجرثومية (Nester *et al.*, 1998).

4.2- مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية

على الرغم من تنوع ووفرة المضادات الحيوية غير أن مشكلة المقاومة البكتيرية لهذه المضادات أخذت بالانتشار في العالم (الموسوي ، 2006) ، 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 (Brooks *et al*., 2001) . 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 (Franklin and Snow, 2005). 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 (Mims *et al*., 2004).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

MATERIALS AND METHODS

3 – المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.3- الأجهزة والمواد

1.1.3- الأجهزة المستخدمة

ت	اسم الجهــاز		الشركة المصنعة والمنشأ
1	مجهر ضوئي	Light microscope	Boeco (Germany)
2	مرشحات غشائية	Millipore filter	Difco (England)
3	فرن كهربائي	Electric Oven	Elektro.mag (Turkiye)
4	حاضنة	Incubator	Elektro.mag (Turkiye)
5	صفيحة ساخنة	Hot Plate	Gallenkamp (England)
6	ميزان كهربائي حساس	Sensitive Electric balance	Kern (Germany)
7	مقياس الأُس الهيدروجيني	pH-meter	Martini (USA)
8	ماصات دقيقة	Micropipettes	Slamed (Germany)
9	موصدة	Autoclave	Triup (Italy)
10	جهاز طرد مركزي	Centrifuge	Triup (Italy)
11	جهاز التقطير	Distillator	Triup (Italy)

2.1.3- المواد الكيميائية

ت	اسم المــادة	الشركة المصنعة
1	كلوريد الصوديوم	BDH (England)
2	كلوريد الباريوم	BDH (England)
3	حامض الكبريتيك	BDH (England)
4	بيروكسيد الهيدروجين	Thomas Baker (India)
5	كلوريد الزئبق	BDH (England)
6	حامض الهيدروكلوريك المركز	BDH (England)
7	أكار – أكار	BDH (England)
8	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	BDH (England)
9	فوسفات البوتاسيوم أحادي الهيدروجين	BDH (England)
10	كلوكوز	BDH (England)
11	جيلاتين	BDH (England)
12	كحول أثيلي	BDH (England)
13	Para-dimethyl amino benzaldehyde	BDH (England)
14	dimethyl-P-phenylene diamine dihydro chloride	BDH (England)

3.1.3- الأوساط الزرعية

ت	اسم الوسط	الشركة المصنعة	الغرض من الاستخدام
1	قاعدة الدم الأساس Blood agar base medium	Himedia (India)	تمييز المكورات العنقودية المحللة وغير المحللة للدم
2	وسط اكار المانيتول الملحي Mannitol Salt Agar	Mast (England)	تمييز المكورات العنقودية المخمرة وغير المخمرة للمانيتول
3	أكار مولر هنتون Muller Hinton agar	Himedia (India)	فحص الحساسية للمضادات الحيوية
4	وسط المرق المغذي Nutrient broth medium	Mast (England)	حفظ العزلات وإدامتها
5	وسط الأكار المغذي Nutrient agar medium	Mast (England)	تنمية البكتريا لغرض التشخيص
6	مرق نقيع القلب والدماغ Brain Heart infusion broth	Oxoid (England)	استخدم لتنشيط البكتريا وعمل اختبار إنزيم مختر البلازما بطريقة الأنبوب

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	Ampicillin	AM	10 µg	Bioanalyse (Turkey)
3	Cephalothin	KF	30 µg	Bioanalyse (Turkey)
4	Cefotaxime	CTX	30 µg	Bioanalyse (Turkey)
5	Amikacin	AK	30 µg	Bioanalyse (Turkey)
6	Streptomycin	S	10 µg	Bioanalyse (Turkey)
7	Ciprofloxacin	CIP	5 µg	Bioanalyse (Turkey)
8	Tetracycline	TE	30 µg	Bioanalyse (Turkey)
9	Chloramphenicol	C	30 µg	Bioanalyse (Turkey)
10	Erythromycin	E	15 µg	Oxoid (England)

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 Solutions

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 مллيلتر ماء مقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مллيلتر . 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 مллيلتر من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم إلى 100 مллيلتر .

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

أضيف 0.5 مليلتر من محلول (A) إلى 99.5 مليلتر محلول (B) ، للحصول على عدد تقريبي للخلايا البكتيرية بمقدار 15×10^{8} خلية/مليلتر ، 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 (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 مليلتر من الماء المقطر المعقم ثم أُكمل الحجم إلى 100 مليلتر. 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 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 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك المركز HCl ، ثم أُضيفَ الى المحلول 100 مليلتر من الماء المقطر.

4.2.2.2.3– **محلول بلازما دم الأرنب**

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

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: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 :-

1.4.2.3– 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 .

2.4.2.3– 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 .

3.4.2.3– وسط تميع الجيلاتين Gelatin liquefaction medium

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 .

5.2.3- **جمع العينات** Collection of samples

جمعت العينات من المرضى المراجعين لمستشفى النعمانية العام في مدينة الكوت، الذين يعانون من امراض الفم للمدة من 2016/11/1 إلى 2017/2/1. اشتملت الدراسة على 40 عينة قُسمت إلى مجموعتين، شملت المجموعة الأولى 20 عينة لمرضى مصابين بأمراض الفم، في حين شملت المجموعة الثانية (مجموعة السيطرة) 20 عينة لأشخاص أصحاء وذلك بهدف إجراء مقارنة لنسبة تواجد بكتريا *S. aureus* في المجموعتين.

وقد جمعت عينات الفم بإستخدام مسحات قطنية معقمة Transport swabs 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 وسط قاعدة الدم الأساس Blood agar وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37°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 Blood agar وأُخضعت العزلات إلى الفحص المجهري إذ تمَّ تحضير مسحات من هذه المستعمرات بعد إعادة تنقيتها على وسط Blood agar وصبغت بصبغة غرام وفحصت تحت العدسة الزيتية للتمييز الخلايا الموجبة للصبغة وشكهاا الكروي وتجمعها العنقودي.

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 :1.2.2.2.3) ، 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 – 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.

4.2.7.2.3– 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 37مْ ولمدة 24 ساعة . يعد تغير لون الوسط إلى الأصفر دلالة على تخمر سكر المانيتول.

5.2.7.2.3– اختبار تميع الجيلاتين Gelatin Liquefaction Test

تمَّ تلقيح أطباق الوسط الزرعي الحاوي على الجيلاتين (فقرة 8.3.2.2) بالعزلات البكتيرية ثم حُضنت الأطباق لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37ْ م. بعدها غُمر النمو البكتيري بكاشف اختبار الجيلاتين (فقرة : 3.2.2.2.3) . إن ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات البكتيرية دليل على إيجابية الفحص.

6.2.7.2.3– 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 مليلتر من مرق نقيع القلب والدماغ ، ثم حُضنت لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37ْ م ، بعدها نُقل 0.1 مليلتر من المزروع البكتيري إلى أنابيب صغيرة ثم أُضيف إليها 0.5 مليلتر من بلازما دم الأرنب (فقرة : 4.2.2.2.3) ، 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.

7.7.2.3– 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 مليلتر 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 .

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 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.

2.8.2.3– الحفظ متوسط الأمد

لُقح وسط الأكار المغذي المائل بالعزلات المراد حفظها ثم حضن عند درجةحرارة 37 م° لمدة 24 ساعة بعد ذلك أحيطت سدادات الأنابيب بشريط شمعي لاصق وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة 4 م° ولمدة تتراوح بين 1–4 أشهر.

3.8.2.3– 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).

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 (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) .

10.2.3- التحليل الإحصائي

استخدم اختبار T test بمستوى أهمية P = 0.05 لمقارنة التغيرات الحاصلة بين المجموعتين المشمولتين بالدراسة باستخدام برنامج SPSS الاحصائي.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

RESULTS and DISCUSSION

النتائج و المناقشة Results and Discussion

1.4- العزل والتشخيص للعينات

1.1.4 - العزل

بينت النتائج كما في الجدول (3-1) إن العينات البراز المأخوذة من الأطفال المشمولين بالدراسة أظهرت نمواً بكتيرياً كانت 90% للأشخاص المصابين بأمراض الفم، 55% للأشخاص الأصحاء (مجموعة ضابطة) . يقابلها 10% و 45% وعلى التوالي للمجموعتين أعطت نتيجة سالبة للزرع البكتريولوجي (عينات غير حاوية على نمو).

جدول (4- 1) : نسب الإصابة بالاسهال عند الاطفال المشمولين بالدراسة

ت	الحالات المشمولة بالدراسة	عدد العينات	العينات ذات النمو البكتيري العدد (٪)	العينات غير الحاوية على نمو بكتيري العدد (٪)
1	الأشخاص المصابين بأمراض الفم (المجموعة الأولى)	20	18 (90)	2 (10)
2	أشخاص أصحاء (مجموعة ضابطة)	20	11 (55)	9 (45)
	المجموع	40	29 (75.5)	11 (24.5)

إن ارتفاع نسبة الإصابة في المجموعتين الأولى مقارنة مع المجموعة الضابطة قد يعزى إلى عدم المعالجة المبكرة للإصابة الأمر الذي أدى إلى تطور الإصابة. أما عدم وجود نمو بكتيري في عينة الاشخاص المصابين بأمراض الفم 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 (Hindler, 1998) .

كما نلاحظ في الجدول (4-1) ظهور النمو البكتيري بين أفراد المجموعة الضابطة إذ بلغت 55% ، وهذا ما أكده Tortora وجماعته (2001) باحتواء الفم على أنواع بكتيرية تعد من النبيت الطبيعي Normal Flora والتي اغلبها البكتريا الموجبة لصبغة كرام Gram Positive Bacteria ومنها بكتريا *S. aureus*.

أوضحت نتائج التحليل الإحصائي بوجود فروقات معنوية بين المجموعتين من حيث وجود النمو البكتيري و عدم وجوده عند مستوى الأهمية 0.05.

2.1.4- تشخيص العزلات البكتيرية

تم تشخيص بكتريا *S. aureus* اعتماداً على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية التي اوردها كل من Benson (2002) و Alexander وجماعته (2004) ، الجدول (4-2).

بينت نتائج الدراسة أن بكتريا *S. aureus* هي بكتريا كروية موجبة لصبغة غرام، تتجمع بشكل يشبه عناقيد العنب، سالبة لإختبار الأوكسيديز والحركة، موجبة لأختبار الكاتاليز والكواكيوليز، قادرة على تحليل الدم من نوع بيتا، ومميعة للجيلاتين، وعند تنميتها على وسط آكار المانيتول الملحي بدت مستعمراتها كبيرة صفراء ذهبية دلالة على قدرتها على تخمير سكر المانيتول.

جدول (4-2) : نتائج الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا E. coli المعزولة من حالات الإسهال

ت	نوع الاختبار	النتيجة
1	صبغة غرام	+
2	اختبار الكاتاليز	+
3	اختبار الأوكسيديز	–
4	تمييع الجيلاتين	+
5	اختبار الحركة	–
6	تحلل الدم	β
7	Coagulase	+
8	النمو على اكار المانتول الملحي	+

تم تشخيص 4 عزلات (13.79%) تابعة لبكتريا *S. aureus* من 29 عينة فم كانت تحتوي على نمو بكتيري، توزعت على 3 عزلات (16.66 %) من العينات الخاصة بالاشخاص المصابين بامراض الفم (المجموعة الأولى)، و عزلة واحدة (9.09 %) من العينات الخاصة بالاشخاص الأصحاء (المجموعة الضابطة).جدول (4-3).

جدول (4-3) : نسب تواجد بكتريا *S. aureus* في العينات الاشخاص المشمولين بالدراسة

ت	الحالات المشمولة بالدراسة	عدد العينات ذات النمو البكتيري	عدد عزلات بكتريا *S. aureus*	النسبة المئوية (٪)
1	الأشخاص المصابين بأمراض الفم (المجموعة الأولى)	18	4	% 22.22
2	أشخاص أصحاء (مجموعة ضابطة)	11	2	% 18.18
المجموع		29	6	% 20.68

جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه الجبوري (2004) الذي بين بأن نسبة تواجد بكتريا *S. aureus* في الفم كانت (21.7 %)، في حين لم تتفق النتائج مع ما توصلت إليه الموسوي (2006) إذ كانت نسبة تواجدهذه البكتريا (9.6 %).

وقد يعود اختلاف نسب العزل الى اختلاف طرق اخذ العينات والتشخيص والاختلافات البيئية بين الأشخاص فضلاً عن الاختلافات الكثيرة في العادات الاجتماعية والصحية فمثلاً عادات الاكل تمتلك دور محدد حيث ان نوع الطعام يساهم في تحديد الانواع الجرثومية داخل الفم (Alaluusua & Malmivirta, 1994).

2.4- حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

تم في هذه الدراسة اختبار حساسية العزلات الاربعة لبكتريا *S. aureus* ، والبالغ عددها 20 عـزلة لــ 10 مضــادات حيويــة بالاعتمــاد علــى أقطــار التثبــيط القياســية الــواردة فــي (NCCLS, 2005).

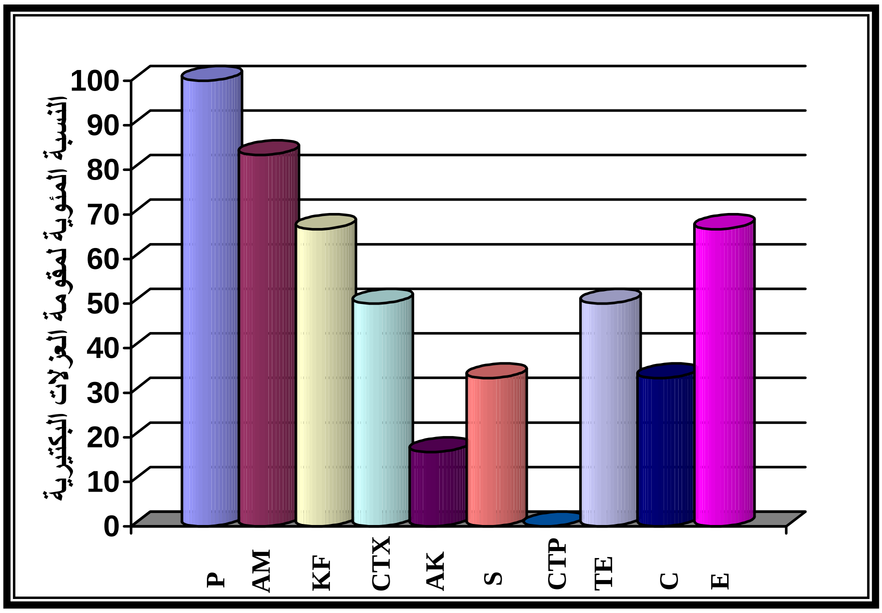
جدول (4-4): المعدلات القياسية لأقطار التثبيط للمضادات الحيوية (NCCIS, 2005)

ت	اسم المضاد	الرمز	محتوى القرص	البكتريا المستخدمة في الاختبار	حساسة اقل أو يساوي	مقاومة أكثر أو يساوي
1	**Penicillin G**	P	10 Units	Streptococci other Organisms	28 19	29 28
2	**Ampicillin**	AM	10 µg	Streptococci other Organisms	28 18	29 26
3	**Cephalothin**	KF	30 µg	All Organisms	14	18
4	**Cefotaxime**	CTX	30 µg	Streptococci other Organisms	25 14	28 23
5	**Amikacin**	AK	30 µg	All Organisms	14	17
6	**Streptomycin**	S	30 µg	All Organisms	11	15
7	**Ciprofloxacin**	CIP	5 µg	All Organisms	15	21
8	**Tetracycline**	TE	30 µg	Streptococci other Organisms	18 14	23 19
9	**Chloramphenicol**	C	30 µg	Streptococci other Organisms	20 12	21 18
10	**Erythromycin**	E	15 µg	Streptococci other Organisms	15 13	21 23

جدول (4-5): فحص الحساسية لعزلات *S. aureus* قيد الدراسة

ت	المضاد الحيوي / العزلات البكتيرية	Penicillin G	Ampicillin	Cephalothin	Cefotaxime	Amikacin	Streptomycin	Ciprofloxacin	Tetracycline	Chloramphenicol	Erythromycin
1	*S. aureus*	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R
2	*S. aureus*	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R
3	*S. aureus*	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
4	*S. aureus*	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
5	*S. aureus*	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
6	*S. aureus*	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
	المجموع	6 %100	5 %83.3	4 %66.7	3 %50	1 %16.7	2 %33.3	0 % 0	3 %50	2 %33.3	4 %66.7

شكل (4-1): النسب المئوية لمقاومة عزلات *S. aureus* 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 (4–5) والشكل (4–1) النسب المئوية لمقاومة العزلات العائدة لبكتريا *S. aureus* المعزولة من أفواه الأشخاص المشمولين بالدراسة، إذ أظهرت النتائج أن نسبة المقاومة لمضادات مجموعة ألبيتا لاكتام ، والتي تشمل البنسلينات كانت لمضاد Penicillin G و Apmicillin هي 100% و 83.3% وعلى التوالي. في حين كانت المقاومة التي أظهرتها العزلات البكتيرية بالنسبة لمجموعة مضادات السيفالوسبورينات المتمثلة بالمضادين Cephalothin و Cefotaxime هي 66.7% و 50% 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 96% و 85% وعلى التوالي، كما بينت العبسي (2009) ان نسبة مقاومة عزلاتها لمضاد Apmicillin كانت 89.2%.

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).

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 16.7% و 33.3% وعلى التوالي. وهذا مقارب لما توصلت إليه العبسي (2009) إذ ان عزلاتها قد قاومت هذا المضاد بنسبة 10% و 20% 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 (Franklin and Snow, 2005).

بالرجوع إلى الجدول (4–5) والشكل (4–1) 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 لل DNA ويضمن تباعدهما اثناء عملية استنساخ الـ DNA (Brooks *et al*., 2001).

نلاحظ وجود مقاومة متوسطة لمضاد Tetracycline وصلت الى 50% على الرغم من عدم استعمال هذا المضاد بكثرة، 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 (2000) 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 33.3%، 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 بمضاد Erythromycin هي 66.7%، تتم المقاومة لهذه المجموعة من المضادات عن طريق تغيير موقع الهدف لارتباط المضاد بالرايبوسوم مما يؤدي إلى تقليل ارتباط المضاد (Franklin and Snow, 2005) ، كما يمكن ان تكون المقاومة بوساطة إنتاج إنزيمات تعمل على أسترة المضاد الحياتي مثل إنزيم Erythromycin estrase (David *et al*., 2001) .

طبقاً للنتائج الواردة في جدول (4–5) نجد أن غالبية العزلات قيد الدراسة كان لها صفة مقاومة أكثر من مضاد حيوي إذ تتراوح بين مقاومة (9) مضادات كما في العزلة رقم (3) إلى مضادين كما في العزلة رقم (5). إن زيادة مقاومة البكتريا للعديد من المضادات الحيوية قد يعود سببه إلى الاستعمال الواسع والعشوائي لهذه المضادات في معالجة الأخماج المختلفة، ولأن بكتريا *S. aureus* بكتريا انتهازية غالباً ما تكون متواجدة عندما يكون الفم مصاباً بالتهاب معين كالتهاب اللثة، اللسان، اللوزتين او تسوس الأسنان 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 تجويف الفم عن طريق الاقتران أو التحويل (Wilkins *et al.*, 2007) .

3.4 - الاستنتاجات

1. تبين إن بكتريا *Staphylococcus aureus* ترافق حالات التهاب الفم بنسبة 22.22% ، ووتواجد بنسبة 18.18% لدى الأشخاص الاصحاء.
2. أظهرت العزلات البكتيرية مقاومة متعددة لعدد من المضادات الحيوية المدروسة إذ أظهرت مقاومة عالية لمضادات البيتالاكتام ومقاومة متوسطة لكل من Tetracycline، Erythromycin و مقاومة ضعيفة للـ Chloramphenicol، Streptomycin و Amikacin ، في حين اظهرت حساسية تامة لمضاد الـ Ciprofloxacin.

4.4 - التوصيات

1. إجراء الزرع البكتريولوجي وفحص الحساسية للمصابين بالتهابات الفم تجنباً لإعطاء المضادات بشكل عشوائي ومنعاً لحدوث المقاومة مستقبلاً.
2. إجراء دراسة موسعة على إمراضية بكتريا *Staphylococcus aureus* على الحيوانات المختبرية في مناطق الفم ودراسة التأثيرات النسيجية عليها .
3. أجراء دراسة مسحية لمعرفة مدى انتشار البلازميدات المشفرة للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ودراسة النسق الوراثي السائد لهذه البلازميدات باعتبارها مؤشرات وبائية منتشرة .

المصــادر

REFERENCES

المصادر العربية

الجبوري، صبحي حسين خلف. (2004). عزل وتشخيص الفلورا الجرثومية من تجويف فم الأطفال حديثي الولادة والرضّع في مدينة الموصل، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.

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

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

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

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

المصادر الأجنبية

Alaluusua,S. & Malmivirta, R. (1994). Early plaque accumulation - a sign of caries risk in young children. Community Dent. Oral Epidemiol. 22-273-276.

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

Amyes, S. And Gammel, C. G. (1997). “Review Article: Antibiotic Resistance”. *J.* Med. Microbiol., 46: 436-470.

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

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. and Morse, S. A. (2001). Jawetz, Melnick and Adelberg’s Medical Microbiology. 22nd ed. Middle east Beirut Company. London.

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.

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

Gibbons, R.J. (1984). Microbial Ecology: Adherence Interaction, which may affect Microbial Ecology in the mouth. J. Dent. Res. 63(3): 378-385.

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

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.

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.

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 .

Marcotte, H. & Lavoie, M. C. (1998). Oral microbial ecology & the role of salivary immunoglobulin A, Microbiology & Molecular biology reviews, p. 71-109.

Marsh, P. & Martin, M. (1992). Oral microbiology. 3rd ed. Chapman & Hall, Ltd., London, United Kingdom.

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

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

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.

Nisengard, R.J. & Newman, M.G. (1994). Oral microbiology and immunology. 2nd ed.; W. B. Saunders Company.

Nolte, W.A. (1982). Oral microbiology with basic microbiology and immunology. 4th. ed., Mosby Company; USA.

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

Theilade, E. (1990). Factors controlling the microflora of healthy mouth, p. 2-56. In Hill ,M. J. & Marsh ,P. D. (ed.), Human microbial ecology. CRC press, Inc., Boca Raton, Fla.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. (2001). Microbiology, Cummings publishing Co., California,USA,pp.395-442 ; 658-662.

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.

University of Al-Qadisiyah
College of Sciences
Department of Ecology

Study drug sensitivity of the bacteria *Staphylococcus aureus* present in the mouth environment

A Search Submitted to
the Department of Ecology – College of Sciences
In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Baccalaureus in Ecology

By
Ismail Abdullah khalif & Nora Mohammed diaa

Supervised by
Assistant master
Tha'ir Abid D'asheesh

April - 2017