وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسيـــة
كلية التربيـــة
قسم علوم الحياة

التحري عن جينات المقاومة لمضادي الارثرومايسين والبيتالاكتام وعلاقتها بمستويات الحركيات الخلوية لبكتيريا *Staphylococcus lentus* المصاحبة لمرضى الفشل الكلوي

اطروحة
مقدمة الى مجلس كلية التربية / جامعة القادسية
وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة
في علوم الحياة / إحياء مجهرية

من قبل
منى حامد عطشان السلامي
بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للبنات / جامعة الكوفة /2000 م
ماجستير علوم حياة/احياء مجهرية/كلية التربية للبنات/ جامعة الكوفة/ 2011 م
اشراف
أ.م.د ميادة فرحان درويش
أ.د أزهار نوري الموسوي

1438هـ
2017 م

بسم الله الرحمن الرحيم

{ وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ}

صدق الله العلي العظيم

الشعراء ألآية(٨٠)

الإهداء

إلى نور الهدى وبيرق الحق

مصدر النعمة ونبي الرحمة ...محمد وآله الكرام

(صلى الله عليه وآله وسلم)

الى الذين لبّوا نداء الوطن والمرجعية بفتوى الجهاد المقّدس وقدموا ارواحهم الطاهرة ودماءهم الزكية دفاعاً عن الأرض والعرض والمقدسات في مواجهة العصابات الاجرامية (داعش) واحيوا بمهجهم اللحمة الوطنية بين ابناء شعبنا العزيز ... غيارى الحشد الشعبي والقوات الامنية .

إلى من جعل راحتنا وسعادتنا جلّ ما يشقى لأجله ... مصدر فخري واعتزازي والدي الحبيب (رحمه الله)

إلى من ننعم ببركة وجودها ودُعائها... بحر الحنان الذي لا ينضب ...والدتي الحبيبة احاطها الله برعايته ورحمته

الى شهدائنا الابرار ... وشهيد العلم والعقيدة أخي صبيح (رحمه الله) الذي لم يمكّنه الطغاة من اكمال دراسته في علوم الهندسة المدنية إجلالاً واكباراً

إلى من كانوا في البأساء سند ... وفي الليل الحالك مشاعل ... اخوتي وأخواتي الاعزاء

إلى مصدر قوتي وعزيمتي ... ومن كانت سبباً لإكمال دراستي ... فلذة كبدي

آملين

أهدي ثمرة جهدي ... واسأل الله التوفيق

منى

شكر وتقدير

((ولكل درجات مما عملوا وما ربك بغافل عما يعملون))

أُحرك لساني حمداً وتسبيحاً وأثني هامتي ركوعاً وتواضعاً وأُكرم جبهتي بأديم الأرض سجوداً وتذلُلاً لله الذي منحني صبراً وألهمني علماً وأعانني في ضعفي، ونصرني في مسعاي فأتممتُ عملي بفضلٍ منه ... بعد حمد الله والثناء على خير خلقه سيدنا محمد صلى الله عليه وعلى آله الطيبين الطاهرين، لابُد لي من أن أتقدم بوافر الشكر والعرفان للدكتورة أزهار نوري الموسوي، والدكتورة ميادة فرحان درويش؛ لإشرافهما على الأطروحة فجزاهن الله خير الجزاء.

وأتقدم بشكري وامتناني إلى عمادة ومنتسبي كلية التربية جامعة القادسية، وتُلزمني دوافع الوفاء أن أُثمن بالشكر أ.م.د رائد كاظم رئيس قسم علوم الحياة و أ.م.د. احمد جاسم ود. حيدر الغانمي وأساتذتي في قسم علوم الحياة؛ لجهودهم المتواصلة في توفير ما يلزم توفيره من متطلبات الدراسة.

واتقدم بخالص الشكر الى عائلة الدكتورة ميادة فرحان لما تكبدته من مشقة طوال مدة البحث.

وأجد نفسي تفيض شكراً وامتناناً لرفيقتي د. لمى فؤاد منحر لما قدمته لي من مساعدة طوال مسيرة الدراسة.

وفيضاً من الشكر والعرفان لأختي التي لم تلدها امي د.سناء عبادي الشمري قسم التحليلات المرضية/كلية العلوم/ جامعة الكوفة ولعائلتها الكريمة؛ لما قدموه لي من مساعدة .

ويقتضي الواجب أن أُسجل شكري لـ أ.د عدنان حمد الحمداني رئيس فرع الأحياء المجهرية / كلية طب /جامعة القادسية، وأ.م.د احمد عبد الجبار قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الكوفة، وأ.م.د محمد عماد قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الكوفة، د. مريم الموسوي اخصائي المجاري البولية في مدينة الصدر الطبية .

وأتقدم بالشكر إلى منتسبي وحدة الغسيل الكلوي في مدينة الصدر الطبية ، ومنتسبو مختبر الصحة العامة واخص بالذكر الاخ فاهم جميل؛ لتذليله لي الكثير من صعوبات البحث . واتقدم بالشكر الى زملائي طلبة الدراسات العليا في قسم علوم الحياة /كلية العلوم / جامعة الكوفة؛ لتقديمهم كل مساعدة احتجت إليها .

ويطيب لي أن أُقدم شكري وامتناني لطلبة الدراسات العليا/ قسم علوم الحياة / جامعة القادسية واخص بالذكر د.جميل كريم والي العمري، ولكل من مد لي يد العون داعيةً الله لهم بالسداد والتوفيق.

وأخيراً، أجدني حائرةً، وكلماتي عاجزة أمام موقف ليس بمقدور الكلمات أن تعبر عنه، ألا وهو شكر الأهل، فشكراً ووفاءً وعرفاناً وإجلالاً؛ لما تحملوه معي من أعباء البحث... فادعوا الله أن يجزيهم بما قدموه في الدنيا والآخرة... ومهما بذل الإنسان من جهد فلا بد من هفوة تبدر منهُ هنا أو زلة تُمَسك عليه هناك، فالكمال لله وحده، وحسبنا صفاء النية وإخلاص العمل ومن الله التوفيق والسداد .

منى

إقرار لجنة المناقشة

نشهد أعضاء لجنة المناقشة أننا أطلعنا على هذه الأطروحة الموسومة بـ (**التحري عن جينات المقاومة لمضادي الارثرومايسين والبيتالاكتام وعلاقتها بمستويات الحركيات الخلوية لبكتيريا *Staphylococcus lentus* المصاحبة لمرضى الفشل الكلوي**)"وقد ناقشنا الطالبة (**منى حامد عطشان السلامي**) في محتوياتها وفيما لهُ علاقة بها ووجدنا انها جديرة بالقبول لنيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة / علم الأحياء المجهرية بدرجة (امتياز).

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. محمد عبد الأخوة الفحام

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ : / /٢٠١٧

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. ماجد كاظم عبود

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ : / /٢٠١٧

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. احلام كاظم نعيم

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ : / /٢٠١٧

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. سيوف خومان علوان

المرتبة العلمية :استاذ مساعد

التاريخ : / /٢٠١٧

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. امل طالب عطية

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ : / /٢٠١٧

عضو اللجنة / مشرفا

التوقيع :

الاسم : د. أزهار نوري الموسوي

المرتبة العلمية :استاذ

التاريخ : / /٢٠١٧

عضو اللجنة /مشرفا

التوقيع :

الاسم : د . ميادة فرحان درويش

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / /٢٠١٧

مصادقة عمادة كلية التربية

التوقيع :

الاسم : د. خالد جواد العادلي

المرتبة العلمية : استاذ

المنصب : عميد كلية التربية

التاريخ : ٦/ ٨ / ٢٠١٧

الخلاصة

جمعت 600 عينة من المرضى المصابين بالفشل الكلوي المراجعين الى مركز الغسيل الكلوي لمدينة الصدر الطبية في النجف الأشرف/العراق، للفترة من حزيران/2014 ولغاية كانون الاول/2015 ، وقد قُسمت العينات بحسب مصادر جمعها إلى400 عينة سريرية من 100مريض شملت 100 عينة لكل من الإدرار والدم والناسور الشرياني ومنطقة الجلد المحيطة بدخول الناسور الشرياني و200 عينة جمعت من بيئة المستشفى بمعدل 100 عينة لكل من أجهزة الديلزة والأسرة . تراوحت اعمار المرضى بين (20–80) سنة ومن كلا الجنسين أوضحت الدراسة ان الإناث أكثر عرضة للإصابة بالمرض من الذكور حيث سجلت نسبة (62 %) للاناث مقارنة بـ (38%) للذكور. وقد أظهرت الفئة العمرية (60-69) أكثر نسبة إصابة بالبكتريا المسببة لخمج السبيل البولي وكذلك تجرثم الدم.،اثبتت نتائج الفحص البكتيري ان208 (41.3 %) عينة لم تظهر نمو جرثومي ،اما العينات التي اظهرت نمو جرثومي فشكلت 392 (58.6%) من العينات شخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على الصفات المظهرية فأظهرت النتائج 258(65.8 %)عزلة موجبة لملون غرام و 134 (34.2%) عزلة سالبة لملون غرام والتي تم تشخيصها اعتماداً على الفحوصات الكيموحيوية وجهاز الفايتك ، وتم انتخاب بكتريا *Staphylococcus lentus* كونها من البكتريا المنتقلة حديثا من المواشي للإنسان وبسبب قلة الدراسات والبحوث عليها .أُجري فحص الحساسية الدوائية لـ50عزلة تجاه 12 نوعاً من المضادات ، وجد ان اغلب عزلات بكتريا *S.lentus* قد اظهرت مقاومة عالية تصل الى 100% لمضادات Penicillin و Ceftazidime و96% لـ Erythromycin و Clindamycin و94% لـ Methicillin و82% Cefotaxime و 78% لـ Ceftriaxone ولـ Amoxillin/Clavulanicacid 76% و لـ Tetracycline 28% ولـ Trimthoprim/ Sulfamethoxazole 20% و Levofloxacin بنسبة 10%، لكنها لم تبدي أي مقاومة اتجاه مضاد Vacomycin. تم التحري عن جينات المقاومة للمضادات الحيوية وفحصت48 عزلة مقاومة للمضاد الحيوي اريثروميسين ومضادات البيتالاكتام باستخدام تقنية الـ PCR بهدف الكشف عن الجينات المسؤولة عن المقاومة والمتمثلة بالجينات *ermA, ermB, ermC,blaz* كانت نسبة تواجد جين *ermA* % 27.8 في13عزلة وان18عزلة تمتلك جين *ermB* بواقع 37.5%،وجين *ermC* 62.5% من 30عزلة اما جين *blaz* فكانت 20.8% من 10.يعزى سبب وجود المقاومة الى وجود المجموعة الجينية المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز والمثيليز في *S. Lentus* . وتم قياس تركيز الحركيات الخلوية في مصل مرضى الفشل الكلوي بوساطة تقنية ألامتصاص ألمناعي ألمرتبط بالأنزيم

الـ ELISA .اظهرت النتائج ارتفاع معنوي في تركيز الحركي الخلوي 33 حيث بلغ لدى مرضى الفشل الكلوي المصابين ببكتريا *S. lentus* 386.6±38.5 pg/ml عند المقارنة مع مرضى الفشل الكلوي الغير مصابين بالبكتريا والذي بلغ 195±34 pg/ml والأشخاص الاصحاء 51±11.4 pg/ml حيث نلاحظ ان مستوى هذا الحركي الخلوي كان اكثر ارتفاعا لدى مرضى الفشل الكلوي المصابين بالبكتريا، كما نلاحظ هنالك ارتفاع لدى مرضى الفشل الكلوي الغير مصابين بالبكتريا قياسا بمجموعة السيطرة ، ولوحظ انخفاض معنوي واضح في تركيز IL-27 في المجاميع المدروسة مقارنة بمجموعة السيطرة حيث تبين كذلك ان هنالك ارتفاع ملحوظ في تركيز هذا العامل بين مجاميع مرضى الفشل الكلوي والمصابين ببكتريا *S.lentus* 86.6±6.5 pg /ml قياسا بمرضى الفشل الكلوي غير المصابين بالبكتريا 50.7± 9.8 pg /ml على الرغم من ان معدل هذا الحركي الخلوي سجل انخفاض معنوي ملحوظ لدى تلك المجموعتين عند مقارنتهم مع الاصحاء 187.7±34.6 pg /ml.

وتبين وجود ارتفاع معنوي في تركيز الحركي الخلوي 17 حيث بلغ لدى مرضى الفشل الكلوي الغير مصابين ببكتريا *S. lentus* 336.1±39.7 pg/ml عند المقارنة مع مرضى الفشل الكلوي المصابين بالبكتريا والذي بلغ 177.1±17.3 pg/ml و الأشخاص الاصحاءpg/ml 90±12 حيث نلاحظ ان مستوى هذا الحركي الخلوي كان اكثر ارتفاعا لدى الفشل الكلوي الغير مصابين بالبكتريا، كما نلاحظ هنالك ارتفاع لدى مرضى الفشل الكلوي والمصابين بالبكتريا قياسا بمجموعة السيطرة . تم ألتحليل ألإحصائي بواسطة استعمال ألبرنامج ألكمبيوتري SPSS واعتمدت ($p < 0.05$) كأصغر فرق معنوي.

نستنتج من الدراسة الحالية ازدياد انتقال البكتريا من الحيوانات والبيئة الى بيئة المستشفيات كما يسبب تردي حالة المرضى رغم كثرة عمليات التعقيم والتطهير مما يتوجب الاهتمام باستخدام تراكيز وانواع مطهرات ومعقمات اكثر فعالية والانتباه الى عدم اصابة مرضى الفشل الكلوي بالبكتريا .

قائمة المحتويات

الموضوع	الصفحة
الخلاصة	أ
قائمة المحتويات	ج
قائمة الأشكال	ذ
قائمة الجداول	ر
قائمة الصور	ز
قائمة المختصرات	س
قائمة الملاحق	ش
الفصل الأول	
المقدمة	1
الفصل الثاني	
2 : استعراض المراجع	3
2-1 : الجهاز البولي Urinary System	3
2-2 : الفشل الكلوي : Renal failure	3
2-3 : اسباب الفشل الكلوي :	4
2-4 : اعراض الفشل الكلوي :	4
2-5 : تصنيف الفشل الكلوي Classification of Renal Failure	5
2-5-1 : الفشل الكلوي الحاد (ARF) Acute Renal Failure	6
2-5-2 : الفشل الكلوي المزمن : (CRF) Chronic Renal Failure	6
2.5.2.1: مراحل الفشل الكلوي المزمن: Stages of Chronic Renal Failure	6
2-5-2-2: الأعراض السريرية Clinical Symptoms	7
2-6 : علاج الفشل الكلوي :	8
2-7 : علاقة الفشل الكلوي مع الاخماج البكتيرية	9

2-8 : جنس المكورات العنقودية : *Staphylococcus*	10
2-9 : العنقوديات السالبة للانزيم المختثر لبلازما الدم :	12
2-10 : بكتريا *Stapylococcus lentus*	13
2-10-1: تصنيف بكتريا : Taxonomy *Stapylococcus lentus* :	13
2-10-2: الصفات المظهرية والخصائص المزرعية	13
2-10-3 :الاختبارات الكيموحياتية : Biochemical Characters	14
2-10-4 : الامراضية Pathogenicity	14
2-11 : المضادات الحيوية Antibiotics	15
2-12: مقاومة البكتريا للمضادات الحيويةBacterial resistant for antibiotics	15
2-13 : مضادات البيتالاكتام β -Lactam antibiotics	16
2- 13-1 : البنسلينات	16
2- 13-2 : السيفالوسبورينات	18
2- 13-3 :مقاومة العنقوديات لمضادات البيتالاكتام	19
2-14: مجموعة الماكروليدات : Macrolides	20
2-14-1 :إريثرومايسين : Erythromycin	20
2-14-2 مقاومة العنقوديات لمضادات الارثرومايسين :	21
2-15: التتراسايكلينات	22
2-16: الكوينولينات	23
2-17: الكلايكوببتايدات	23
2-18: مضادات السلفونامايدات والترايمثوبريم	24
2-19: الاخماج الجهازية والفشل الكلوي	24
2-20:الحركيات الخلوية : Cytokines	25
2-20-1: الحركيات الخلوية قبل الالتهاب Pro-inflammatory cytokine	26

2-20-2: الحركيات الخلوية ضد الالتهاب Anti-inflammatory cytokine	26
2-20-2-1: الحركيات الخلوية نوع 17- Interleukin (IL-17)	27
2-20-2-2: الحركيات الخلوية نوع 27- Interleukin (IL-27)	28
2-20-2-3: الحركيات الخلوية نوع 33- Interleukin (IL-33)	29
الفصل الثالث	
3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods	31
3-1 : المواد	31
3-1-1 الأجهزة والمعدات Equipments and Instruments	31
3-1-2 : المواد الكيمياوية Chemical Materials	32
3-1-3 : الاوساط الزرعية الجاهزة Ready prepared media	33
3-1-4: المضادات الحيوية: Antibiotics	34
3-1-5 : العُدد Kits	35
3-1-5-1 : عدة التشخيص الجزيئي	35
3-2-5-2 : عدة التشخيص المناعي	35
3-1-6 : البادئات : Primers	36
3-2 : طرائق العمل	37
3-2-1: المحاليل والدوارئ Buffers and Solutions	37
3-2-1-1: المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline Solution	37
3-2-1-2: أنبوبة ماكفرلاند القياسية McFarland Tube Standard No.(0.5)	37
3-2-1-3 : الكواشف Reagents	37
3-2-1-4 : كاشف الكتاليز Catalase reagent	37
3-2-1-5 : كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent	37
3-2-1-6 : كاشف كوفاكس Kova'cs reagent	38
3-2-1-7 : كاشف احمر المثيل Methyl red reagent	38
3-2-1-8 : كاشف فوكس – بروسكاور Voges - proskauer reagent	38

2-2-3 : جمع العينات Samples collection	38
1-2-2-3 : المرضى patients	38
2-2-2-3 : السيطرة Controls	39
3-2-3 : جمع عينات الدم	39
1-3-2-3 : جمع وزرع عينات الدم من المرضى	39
2-3-2-3 :جمع عينات الدم من الأصحاء	39
2-3-2-3 : زرع عينات الإدرار Urine samples	39
3-2-3 : تشخيص البكتيريا المعزولة Identification of Isolated	40
1-3-2-3 : الخصائص المزرعية Cultural characteristics	40
1-1-3-2-3: اختبار تحلل الدم Blood hemolysis test	40
2-1-3-2-3 : النمو على وسط المانيتول الملحي الصلب.	40
3-1-3-2-3: النمو على الوسط EMB	40
2-3-2-3 : الخصائص المظهرية للخلايا Morphological characteristics	40
3-3-2-3 : الاختبارات الكيمو حيوية Biochemical test	40
1-3-3-2-3 : اختبار الكتاليز Catalase test	41
2-3-3-2-3: اختبار الاوكسيديز Oxidase test	41
3-3-3-2-3 : اختبار إنتاج الاندول Indol production test	41
4-3-3-2-3: اختبار احمر المثيل Methyl red test	41
5-3-3-2-3 : اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test	41
6-3-3-2-3 : اختبار الفوكس– بروسكاور Voges - Proskauer test	41
4-3-2-3 : التشخيص بنظام الفايتك	42
3-3 : حفظ وإدامة العزلات البكتيرية	42
1-3-3 : الحفظ قصير الأمد	42
3–3–2 : الحفظ طويل الأمد	42
4-3:إختبار فحص الحساسية للمضادت الحيوية Antibiotic Susceptibility Testing	43

5-3:فحص تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)	43
1-5-3: استخلاص الحامض النووي البكتيري Bacterial genomic DNA	43
2-5-3 : تركيز نقاوة الحامض النووي المستخلص DNA examination	45
3-5-3 : تحضير مزيج تفاعل انزيم البلمرة المتسلسلPCR master mix	45
4-5-3 : برنامج الدورات الحرارية لفحص الـ Thermocycler PCR	46
5-5-3 : الترحيل الكهربائي الهلام Gel electrophoresis	46
6-3 : الفحوصات المناعية Immunological Tests	47
1-6-3 : عدة الاختبار المناعي المرتبطة بالأنزيم ELISA kit	47
2-6-3 التحديد الكمي لمستوى الحركيات الخلوية **IL-33** و**IL-27** و**IL-17** في المصل	48
7-3 : التحليل الاحصائي	51
الفصل الرابع	
4 – النتائج والمناقشة : Results and Discussion	52
1-4 : تصنيف مرضى الفشل الكلوي المزمن	52
2-4 : العزل والتشخيص البكتيري .	55
1-2-4: عزل البكتريا من منطقة الناسور الشرياني Fistula	50
2-2-4 : عزل البكتريا من الدم	61
3-2-4 : عزل البكتريا من الادرار :	62
4-2-4: عزل البكتريا من الجلد :	63
4 -3: تصنيف مرض الفشل الكلوي اعتماداً على الإصابات البيئية والسريرية لبكتيريا *S. lentus*	64
4-4: إختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic Susceptibility Test:	67
1-4-4 : مضادات البيتالاكتم β -Lactam	67
2-4-4 : مضادات الماكرولايدات : Macrolides	70
3-4-4: مضادات التتراسايكلينات : Tetracyclines	71

4-4-4: مضادات الكلاكوببتيدات Glycopeptides	72
4-4-5: مضادات السلفونامايدات والترايميثوبريم Sulfonamides &Trimethoprim	72
4-4-6 : مضادات الكوينولينات : Quinolones	73
4-5 : تقنية سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR)	73
4-6 : المعايير المناعية : Immunological parameters	80
4-6-1 : تقدير مستوى تركيز الحركي الخلوي IL-17 في مصل مجموعة الدراسة	80
4-6-1 : تقدير مستوى تركيز الحركي الخلوي IL-33 في مصل مجموعة الدراسة	83
4-6-1 : تقدير مستوى تركيز الحركي الخلوي IL-27 في مصل مجموعة الدراسة	85
الاستنتاجات والتوصيات	87
الاستنتاجات	87
التوصيات	88
المصادر العربية والأجنبية	
المصادر العربية	89
المصادر الأجنبية	90
الملاحق	

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1-2	التركيب الكيميائي لمضاد الارثرومايسين	21
1-3	سلسلة تخافيف الحركي الخلوي نوع 33	50
2-3	سلسلة تخافيف الحركي الخلوي نوع 27	51
4- 1	النسبة المئوية لمرضى الفشل الكلوي حسب الجنس	53
2-4	النسبة المئوية للاصابة بالفشل الكلوي حسب الفئات العمرية	54
3-4	الاصابة بالفشل الكلوي حسب الفئات العمرية وفترات الغسيل الكلوي	55
4-4	بكتريا *S.lentus* على وسط الدم الصلب	58
5-4	بكتريا *S.lentus* على وسط المانتول الملحي الصلب	58
6-4	النسبة المئوية للاصابات البكتيرية المصاحبة لمنطقة الناسور الشرياني لمرضى الفشل الكلوي	61
7-4	النسبة المئوية للاصابات البكتيرية المرافقة لدم مرضى الفشل الكلوي .	62
8-4	النسبة المئوية للاصابات البكتيرية المرافقة لادرار مرضى الفشل الكلوي .	63
9-4	الإصابات البكتيرية المرافقة لجلد مرضى الفشل الكلوي .	64
10-4	النسبة المئوية للإصابة ببكتريا *S. Lentus* لمرضى الفشل الكلوي .	67
11-4	الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) لنواتج تضخيم جين *ermA* 220 pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولتية وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة M : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات (1-10) موجبة لفحص 220 pb لجين *ermA* .	74

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
12-4	الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز(1.5%) لنواتج تضخيم جين *ermA* 220 pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولت وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة M : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات الكاملة لجين *ermA* .	75
13-4	الترحيل الكهربائي على هلام الاكارو (1.5%) لنواتج تضخيم جين *ermB* 314 pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولت وتيار80 امبير ولساعة واحدة والاعمدة : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات (1-10) موجبة لفحص 314 bp لجين *ermB* .	75
14-4	الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) لنواتج تضخيم جين *ermB* 314 pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولت وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات الكاملة لجين *ermB* .	76
15-4	الترحيل الكهربائي على هلام الاكارو (1.5%) لنواتج تضخيم جين *ermC* 410 pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولت وتيار80 امبير ولساعة واحدة والاعمدة : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات (1-10) موجبة لفحص 410 bp لجين *ermC* .	76
16-4	الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) لنواتج تضخيم جين *ermC* 410 pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولت وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات الكاملة لجين *ermC* .	77
17-4	الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) لنواتج تضخيم جين *blaz* 640pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولت وتيار80 امبير ولساعة واحدة و الاعمدة :الدليل الحجمي للـDNA والعزلات (1-10) موجبة لفحص 640 bp لجين *blaz* .	78
18-4	الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) لنواتج تضخيم جين *blaz* 641pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولت وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات الكاملة لجين *blaz* .	78
19-4	النسب المئوية لجينات المقاومة لمضادات البيتالاكتام والارثرومايسين .	82
20-4	النسب المئوية لجينات المقاومة لبكتريا *S.lentus* المرضية المعزولة من العينات السريرية (منطقة الناسور الشرياني والدم والادرار).	82

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1-3	بادئات جينات المقاومة	36
2-3	تحضير مزيج تفاعل انزيم سلسلة البلمرة .	45
3-3	ظروف التضخيم	46
1-4	الانواع البكتيرية المرافقة لمرض الفشل الكلوي	56
2-4	الاختبارات المجهرية والكيموحيوية للعزلات البكتيرية	69
3-4	النسب المئوية لمقاومة عزلات *S.lentus* تجاه المضادات الحيوية	36
4-4	تقدير مستوى الحركيات الخلوية في مجاميع المرضى قيد الدراسة والاصحاء.	82
5-4	يوضح العلاقة بين مستوى 1L-17 في مرضى الفشل الكلوي والمصابين بالبكتريا والنسب المئوية لجينات المقاومة لبكتريا *S.lentus* المرضية.	83
6-4	يوضح العلاقة بين مستوى 1L-33 في مرضى الفشل الكلوي والمصابين بالبكتريا والنسب المئوية لجينات المقاومة لبكتريا *S.lentus* المرضية.	85
7- 4	يوضح العلاقة بين مستوى 1L-27 في مرضى الفشل الكلوي والمصابين بالبكتريا والنسب المئوية لجينات المقاومة لبكتريا *S.lentus* المرضية.	

قائمة المختصرات

المختصر	تعريفه
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
blaz	β-Lactamase z Gene
Bp	Base pairs
CLSI	Clinical And Laboratory Standards Institute
CNS	Coagulase-Negative Staphylococci
CoNS	Coagulase negative Staphylococci
DDST	Double Disc Synergy Test
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ESBLs	Extended-Spectrum β-Lactamases
IS	Insersion Sequence
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDR	Multidrug Resistant
MIC	Minimum Inhipition Concentration
MLC	Minimum Lethal Concentration
MRSA	Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
MR-VP broth	Methyl-Red Voges-Proskauer
MSSA	Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*
MTDET	Modified Three Dimensional Extract Test
NA	Nutreint Agar
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NF-$_k$B	Nuclear factor-$_k$B
PABLs	Plasmid-Mediated AmpC β-Lactamases
PBPs	Pinicillin Binding Proteins
PCR	Polymerase Chain Reaction
S.aureus	*Staphylococcus aureus*
S.lentus	*Staphylococcus lentus*
Spp	Species
UTIs	Urinary Tract Infections

قائمة الملاحق

رقم الملحق	عنوان الملحق
1	استمارة استبيان لجمع المعلومات عن المرضى المصابين بمرض الفشل الكلوي
2	نتائج اختبار الفايتك لبكتريا *Staphylococcus lentus*
3	نتائج اختبار الفايتك لبكتريا *Pseudomonas areuginosa*
4	نتائج اختبار الفايتك لبكتريا *Enterobacter cloacae*
5	مقاومة عزلات *S. lentus* للمضادات الحيوية

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

1- المقدمة Introduction

يعرف الفشل الكلوي (Renal failure) بأنه القصور في الوظيفة الإفرازية للكلية نتيجة احتباس وتراكم الفضلات النتروجينية والمواد الضارة الناتجة عن التفاعلات الايضية المختلفة (Davidson's; Junior *et al.*, 2015 ,2010) ، وفشلها في تحقيق التوازن بنسبة سوائل الجسم والاملاح والمحافظة على استقرار نسبة الحموضة بالدم والسوائل البينية وبالتالي تؤدي الى تراكم المواد السامة (USRDA,2013). إذ يعد مرض الفشل الكلوي من الأمراض الشائعة في العصر الحديث ولا سيما في حالات الإصابة المتزامنة مع امراض أخرى مثل مرض السكري وضغط الدم و الاصابات الميكروبية المتعددة ، يعاني الأشخاص المصابون بالفشل الكلوي من نقص حاد في المناعة الجهازية و تعد مسؤولة عن حوالي20-30% من وفيات مرضى الفشل الكلوي و المستمرين على عملية الغسيل الدموي (Hemodialysis)(USRDA,2013; Bagdasarian *et al.*,2012) ، ففي عام 2000 سجلت في الولايات المتحدة الامريكية حوالي19.5% من الوفيات بسبب الاصابات الميكروبية المتداخلة مع امراض اخرى (USRDS,2009) تزداد هذه النسبة بعد مرور فترة زمنية من الاستمرار بعملية الغسيل الدموي اذ يصبح الموت هو السائد و خاصة عند الاشخاص اصحاب الاعمار الكبيرة . (Kasper *et al.*,2005).

هناك الكثير من الظروف المتداخلة مثل سوء التغذية و عملية الوخز الوريدي المتكرر وارتفاع نسبة التسمم الدموي باليوريا(Uremic toxicity) وفقر الدم الناتج من الفشل الكلوي المزمن ، تزيد من نسبة الاصابة وتساعد المسببات المرضية على اختراق الجلد إلى جانب عوامل مهمة اخرى تلعب دوراً كبيراً في عملية حدوث الاصابة المايكروبية والمرتبطة مع نقص المناعة (Immunodeficiency) مثل نقص العدد الكلي لكريات الدم البيضاء (leukocyte) والخلل في العدلات (Neutrophisl) واضطراب في وظيفة البلعمة (Phagocytic function) وكذلك الضعف في آليات الدفاع للمضيف ومقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية بسبب امتلاكها لاليات مختلفة للمقاومة (Cohen and Hörl, 2012;Nasri ,2003)

معظم هذه العوامل قد تضعف المناعة لمرضى الفشل الكلوي المزمن و من ذلك وجدنا من الضروري البحث والتحري عن الاصابات الميكروبية ودراسة مقاومتها للمضادات الحيوية والبحث في أسباب المقاومة وتقدير مستوى بعض المعايير المناعية للأشخاص المصابين بالفشل الكلوي المزمن المصابين وغير المصابين بالتهابات مايكروبية في محافظة النجف الأشرف في الوقت الحاضر. لذا هدفت الدراسة الحالية تحديد نوع المقاومة للمضادات الحيوية للبكتيريا المصاحبة لمرضى الفشل الكلوي وتأثيراتها على بعض المؤشرات المناعية الخلوية مثل السايتوكاينات من اجل الوصول إلى إستراتيجية دوائية فعالة .ولتحقيق هذا الهدف تم اتباع الخطوات الآتية :

خطوات الدراسة:

1- عزل وتشخيص البكتيريا المصاحبة لمرضى الفشل الكلوي المزمن من العينات السريرية والبيئية ودراسة بكتريا *Staphylococcus lentus* لقلة الدراسات المحلية عليها.

2- دراسة حساسية بكتريا *S. lentus* لبعض المضادات الحيوية .

3 - التحري عن بعض الجينات المسؤولة عن مقاومة المضادات الحياتية *ermA, ermB, ermC,blaz* لـ *S. lentus* بطريقة احتبار انزيم البلمرة المتسلسل الـ (PCR) Polymerase chain reaction من خلال تضخيم بعض جينات المقاومة مع الـ DNA المستخلص template .

4- تقدير مستوى الحركي الخلوي نوع Interleukin -33 و Interleukin -27 و Interleukin - 17 بتقنية الاليزا

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures review

الفصل الثاني : استعراض المراجع

2-1 : الجهاز البولي (Urinary System) :

يعد الجهاز البولي في جسم الإنسان من ركائز التوازن في أجهزته الجسمية المختلفة ، وتمثل الكليتان اهم هذه الركائز ويكون شكلهما كلوي نموذجي يشبه إلى حد كبير حبة الفاصوليا ، تقع الكليتان على جانبي العمود الفقري وتبلغ ابعادها في الشخص البالغ الطبيعي (11 ، 5 ، 3) سم ، تتكون من ثلاث مناطق متميزة المحفظة Capsule والقشرة Cortex واللب Medulla ويعتبر اللب اسمك طبقات الكلية (Wingerd, 2013; Preston and Wilson, 2012) .

يعد النفرون (Nephron) الوحدة الفعالة في الكلية إذ يوجد حوالي مليون وحدة منه في كل كلية، يتكون من شبكة من الشعيرات الدموية تعرف بالكبيبة (Glomerulus) ،التي تحاط بخلايا متخصصة مكونة تركيبا يدعى محفظة بومان (Bowman Capsule) يمتد منها النبيب الداني ويليه جزء منحني هو عروة هنلي(Henley lope) ثم النبيب القاصي فالقناة الجامعة(Ganong's,2010) تعمل الكلية على ترشيح الدم وطرح الفضلات و السموم والحفاظ على مستوى الالكتروليتات في الجسم والسيطرة على ضغط الدم وتصنيع مكونات الدم بواسطة هرمون الارثروبايوتين (Erythropoietin) المنتج من الكلية والذي يحفز نخاع العظم على إنتاج كريات الدم الحمر وباقي مكونات الدم (Estridge and Reynolds, 2012; Feher, 2012).تقوم الكلية بوظائفها عن طريق ثلاث فعاليات مهمة يؤديها النفرون هي الترشيح(Flirtation) وإعادة الامتصاص (Reabsorption) والإفراز(Guyton and Hall 2011) (Secretion) ، ولأسباب متعددة قد يحدث قصور في عمل الكليتين يعرف بالفشل الكلوي إذ يصيب الأطفال والبالغين (Vianna *et al.*,2011). ان حدوث خلل في الكليتين يؤثر على وظيفتهما ويؤدي إلى خلل في بيئة الجسم الداخلية فتختل وظائف بقية أعضاء الجسم(Morlidge and Richards, 2001) تقدر فعالية الكلية من خلال قياس كفاءة الترشيح الكبيبي ممثلا بكمية الكرياتنين المترشح إلى جوف النبيبات الكلوية لفترة زمنية محددة، وتتراوح القيمة الطبيعية (80- 120) مل/ دقيقة ، أي اختلاف يدل على وجود خلل في الكلية (Taskapan *et al.*, 2008) .

2-2 : الفشل الكلوي (Renal failure) :

يشير مصطلح الفشل الكلوي الى القصور في الوظيفة الإفرازية للكلية نتيجة احتباس وتراكم الفضلات النتروجينية والمواد الضارة الناتجة عن التفاعلات الايضية (Davidson's ,2010) ، وفشلها في تحقيق

توازن بنسبة سوائل الجسم والاملاح والمحافظة على استقرار نسبة الحموضة بالدم والسوائل البينية وبالتالي تؤدي الى تراكم المواد السامة (USRDA,2013).

2-3 : اسباب الفشل الكلوي :

أسباب حدوث الفشل الكلوي عديدة منها خمج كبيبات الكلى (Glomenulonephritis) وحويض الكلية المزمن وانسداد السبيل البولي(Obstruction Urinary Tract) وارتفاع ضغط الدم (Hypertension) ومرض السكري والاستخدام المفرط لبعض الأدوية (National kidney foundation 2011; Porth ,2007,) وهناك عوامل تلعب دوراً في الفشل الكلوي لدى البالغين أهمها داء السكري بنسبة 36% وارتفاع ضغط الدم 31% والتهاب الكبيبات 7% وتكيس الكلية (Polycystic kidney) 3% وانسداد القناة البولية 2% والإصابات الفيروسية 7%، وأسباب اخرى غير معروفة 14%(Vianna *et al.*,2011).

2-4 : اعراض الفشل الكلوي :

أهم الأعراض المصاحبة لمرضى الفشل الكلوي هي الشعور بالتعب والإرهاق الجسدي والذهني وفقدان الشهية للطعام مما يؤدي الى سوء التغذية ونقصان الوزن وصعوبة التنفس والاعياء والضعف العام والغثيان والتقيؤ وصداع وآلام في الظهر والضعف الجنسي وحكة وكثرة التبول ليلاً وفقر الدم وارتفاع ضغط الدم بسبب تجمع السوائل والاملاح والوذمة في الاطراف والوجه واليدين والقدمين والرئتين وألم في الخاصرة في حالات الفشل الناتج من وجود حصى في الكلية وتلون الجلد باللون الداكن مع حكة جلدية والعصبية وفقدان التركيز وتشنج العضلات اوشلل الاطراف والتهاب في الأعصاب الطرفية ونقص فيتامين D (Yazar and Kayhan, 2010; DiGiulio *et al.*, 2007). تعزى أعراض المرض إلى تراكم كميات غير طبيعية لليوريا في الدم ونواتج أخرى لعمليات الايض والخلل في تراكيز أيون الهيدروجين وتوازن الماء والشوارد مما يؤدي الى التسمم الداخلي وزيادة حموضة الدم الناتجين عن تراكم المواد الضارة التي يتخلص منها الدم في حالة زيادة نسبها عن المستوى الطبيعي عن طريق الكلى مثل اليوريا والكرياتنين وحامض اليوريك ، ينعكس ذلك على شكل اعراض مرضية في جميع اجهزة الجسم وخاصة الجهاز القلبي الوعائي وجهاز الدوران والجهاز الهضمي والجهاز العصبي والجهاز المناعي ونظام مكونات الدم ومنظومة الغدد الصماء وعلى المدى الطويل يحصل تغير الأوعية الدموية الدقيقة في الكلى مؤدية الى التصلب والحمولة الزائدة للنيفرون ثم تفقد الكلية وظيفتها وفي المراحل النهائية يحصل انخفاض في معدل الترشيح الكبيبي وتفشل الكلية في الحفاظ على المستويات الطبيعية

من نواتج ايض البروتينات واليوريا والكرياتينين(National Kidney Foundation ,2011) .

يحصل الخلل في الجهاز المناعي لمرضى الفشل الكلوي وضعف في الدفاعات وزيادة حدوث الاخماج التي تعد السبب الثاني بعد الامراض القلبية الوعائية في احداث الوفاة عند المرضى (Amore and Coppo) 2002, . يعتبر الوسط اليوريمي (Uremic milieu) من اهم مضاعفات الفشل الكلوي بنوعيه بسبب فشل الكلية في إفراز اليوريا والكرياتينين ونتيجة لذلك سترتفع مستويات الدم من اليوريا والكرياتينين وحدوث التبول الدموي حيث يحصل الخلل في كلا من المناعة الخلوية والخلطية وهذا يعتمد على فترة حدوث حالة اليوريمي(Bagdasarian *et al.,*2012; Costa, 2008) . يتضمن الخلل في المناعة الخلوية قلة اعداد الخلايا اللمفاوية إضافة الى حدوث خلل في كميات وأنشطة مجموعة الخلايا اللمفاوية التائية وبالتالي تنخفض استجابة الخلايا اللمفاوية للمستضدات المحفزة وضعف عملية البلعمة . اما الخلل الذي يحصل في المناعة الخلطية يعود معظمه إلى ضعف في وظيفة الخلايا التائية المساعدة وبالتالي تؤثر على عملية إنتاج الأجسام المضادة وزيادة في انتاج الحركيات الخلوية المناعية (Kirsztajn *et al.,*2014 ; Kralova *et al.,* 2009) .

من المعروف أن كريات الدم البيضاء تلعب دورا رئيسيا في استجابة دفاعات المضيف ضد الإصابات التي تهدد الحياة (Cohen and Hörl, 2012) ، ويقل نشاط كريات الدم البيض في مرضى الفشل الكلوي حيث ان خلايا الدم البيضاء متعددة الانوية تفشل في الهجرة بشكل صحيح ويحدث خلل في عملية البلعمة يكون سببا في زيادة القابلية للالتهابات في مرضى الفشل الكلوي المزمن وتزداد نسبة حدوث الالتهابات الفطرية والبكتيرية في المرضى الذين يعانون من الفشل الكلوي بصورة أعلى من الاصحاء ولا تزال هذه الإصابات احد الاسباب الرئيسية للوفاة بين مرضى الفشل الكلوي ، وان العوامل الخطرة الأكثر شيوعا المرتبطة مع ارتفاع حالات الإصابات الفطرية في المرضى الذين يعانون من الفشل الكلوي هو الطرق العلاجية المتخذة والاستخدام الواسع للمضادات الحيوية البكتيرية والفطرية (Gandhi *et al.,* 2005).

2-5 : تصنيف الفشل الكلوي (Classification of Renal Failure)

يصنف الفشل الكلوي الى نوعين هما الفشل الكلوي الحاد Acute Renal Failure والفشل الكلوي المزمن Chronic Renal Failure (Kasper *et al.*,2005).

2-5-1 : الفشل الكلوي الحاد (ARF) (Acute Renal Failure)

يعرف بأنه التوقف المفاجئ للكلية عن أداء وظائفها مما تدعو الحاجة إلى إجراء الديلزة إلى أن تعود الكلية لأداء وظائفها ، قد تستغرق عملية الديلزة عدة أسابيع أو أشهر ، يحدث بسبب فقدان كمية كبيرة من سوائل الجسم مثل الإسهال المؤدي للجفاف مع تقيؤ مستمر والحوادث التي تسبب فقدان كميات كبيرة من الدم (Davidson's,2010).و يمثل نقصاً عكسياً مفاجئاً في وظائف الكليتين يكفي لإحداث اضطراب في البيئة الداخلية للجسم ومسبباً تراكم وتجمع المركبات النتروجينية الضارة داخل الجسم .عادة تسترجع الكلية وظائفها بشكل كامل (Ress and Shaw ,2007).

يعزى ارتفاع معدل الوفيات عند مرضى الفشل الكلوي الحاد الى زيادة خطر المضاعفات غير الكلوية الشديدة مثل الخمج والنزف ومعظم هذه المضاعفات تتطور بعد ابتداء الفشل الكلوي وثم تؤدي إلى الوفاة .ان الكثير من الامراض الأساسية الأخرى تؤدي إلى تطور حالة الفشل الكلوي الحاد مثل السكري وارتفاع ضغط الدم والقصور القلبي الحاد وامراض الكبد ويشترك الفشل الكلوي الحاد مع تلك الأمراض الأساسية في إحداث الوفاة (Vianna *et al.*,2011).

2-5-2: الفشل الكلوي المزمن (CRF) (Chronic Renal Failure)

يشير مصطلح الفشل الكلوي المزمن الى حدوث نقص دائم ومستمر في وظائف الكلى الى الحد الذي يجعلها غير قادرة على حفظ البيئة الداخلية لوظائف الجسم ضمن الحدود الطبيعية ، أي أنه زيادة مستمرة ومطَّردة في فقد وظائف نفرونات الكلية التي تؤدى إلى فقد الكلية لوظيفتها في ترشيح وحفظ التوازن بالدم وتفقد فعاليتها الابرازية والايضية والهرمونية وهذا الفشل لا يحدث إلا بعد تدمير حوالي 75% من النفرونات العاملة بالكلية (Porth,2007 ;Kasacka *et al*,2004) ، يحدث الفشل الكلوي المزمن بالتدريج نتيجة تلف أنسجة الكلية ، ومن الحالات المصاحبة للفشل الكلوي المزمن حدوث تحطم في الوحدات الترشيحية للكلية وبأعداد كبيرة على إن الباقي لايكفي لقيام الكلية بعملها ويعقب ذلك عجز الكلية في إفراز أملاح الفوسفات الذي يؤدي إلى زيادة نسبتها في الدم (Levey and Coresh, 2012;National Kidney Foundation ,2011).

2-5-2-1: مراحل الفشل الكلوي المزمن: (Stages of Chronic Renal Failure)

ان مراحل الفشل الكلوي المزمن تتدرج إلى خمسة مراحل متداخلة وهي كالتالي :

المرحلة الاولى: نقص في احتياطي الكلية (Dimination of Renal Reserve)

تنخفض فعالية الكلية في هذه المرحلة الى 90% وعلى الرغم من انخفاض سرعة الترشيح الكبيبي لاتظهر على المريض اعراض الازويتميا (Azotemia) التي تعرف بتجمع المركبات النتروجينية في الجسم . في حين تبقى الفعالية الابرازية والتنظيمية للكلية محافظا عليها اذ تكيف الكلية نفسها بزيادة فعالية الوحدات الكلوية السليمة (Andreoli *et al*,2004).

المرحلة الثانية: القصور الكلوي (Renal insufficiency)

يزداد انخفاض فعالية الكلية بين 60-89% ويقل تركيز الإدرار وتبدا مجموعة اعراض مرضية بالظهور كفقر الدم وتجمع المركبات النيتروجينية مما يؤدي الى ظهور الأعراض والعلامات السريرية للفشل الكلوي المزمن (Andreoli *et al*,2004) .

المرحلة الثالثة: الفشل الكلوي الواضح (Overt renal Failure)

تنخفض فعالية الكلية الى 40% وتتميز باستفحال فقر الدم والازويتميا مع بداية ظهور اعراض تحمض الدم (Acidemia) ونقص كالسيوم الدم (Hypocalcemia) وفرط فوسفات الدم (Hyperphosphatemia) وفرط بوتاسيوم الدم (Hyperkaliemia) وتتطور اعراض هشاشة العظام (Rosner and Bolton,2006) .

المرحلة الرابعة: اليوريميا (Uremia)

تنخفض فعالية الكلية بين 15-29 % ، إذ تتفاقم الأعراض فيها ويمتد تأثيرها إلى اغلب أجهزة الجسم ، وتعتبر من اشد مراحل الفشل الكلوي المزمن وتنتقل هذه المرحلة بسرعة إلى المرحلة الاخيرة (Brown,2014 ; USRDA,2013 ; Checherita *et al.,* 2010) .

المرحلة الخامسة : الفشل الكلوي (Renal Failure)

تمثل المرحلة النهائية للفشل الكلوي المزمن (ESRD) (End stage renal disease) حيث تنخفض فعالية الكلية فيها الى اقل من 15% ولا ينفع العلاج التحفظي فيلجأ المريض اما إلى العلاج التعويضي بالديلزة بنوعيها الدموية (Hemodialysis) اوالبريتونية (Peritoneal dialysis) أو إلى عملية زرع الكلية (Renal transplantation) (Brown,2014;USRDA,2013).

2-5-2-2: الأعراض السريرية (Clinical Symptoms)

تشمل الأعراض كل أجهزة الجسم لأن الاضطراب عام وشامل وتتباين الصورة السريرية إلى حد ان بعض الاطباء يدخلون فحص اليوريا في الدم ضمن الفحوص الروتينية للمرضى ، و من الأعراض المألوفة

ضعف في القوى وتدهور عام في الصحة وقد تقل كمية البول(Oliguria) أو تزيد (Polyuria) ولكنها غالباً ما تكون اعتيادية إلا في ادوار المرض المتقدمة إذ تقل، ووجود البوال الليلي نتيجة ضعف قدرة الكلية على تركيز البول ولايشتكى من عسر التبول (Dysuria) الا عند وجود خمج في السبيل البولي ، يعاني بعض المرضى من انكاز (Ehydratio) ، بينما يظهر خزب (Oedema) عند اخرين في الوجه والاطراف السفلى تبعاً لقلة أو زيادة الماء والملح في الجسم وتغلب الحالة الثانية في الأدوار الأخيرة من المرض . قد يتضخم القلب ثم يعجز عن أداء وظيفته مبتدئاً بعجز في البطين الايسر ثم الايمن ويظهر خمج التامور (Checherita *et al.,*2010;Perez *et al.,*2008) .يرتفع ضغط الدم في85% من المرضى المصابين بالفشل الكلوي اما نتيجة لزيادة الماء والملح في الجسم أو لزيادة افراز هرمون الرنين المسبب لارتفاع ضغط الدم من الكلية المريضة او لكلا السببين، ويسبب ارتفاع ضغط الدم ضرراً اضافياً للكليتين فتبدأ حلقة مفرغة إذ ان مرض الكلية يرفع الضغط وارتفاع الضغط يزيد من مرض الكلية (Kirsztajn *et al.,*2014;Ansari, 2003). يصاب مرضى الفشل بفقر الدم نتيجة ضعف الشهية والحمية المفروضة من الطبيب وسهولة النزف الدموي من أماكن متعددة من الجسم وسوء امتصاص الأغذية الضرورية التي تساعد على تشكيل كريات الدم الحمر كالحديد وحامض الفوليك (Checherita *et al.,*2010) وينتج نقص كريات الدم الحمر بسبب نقص انتاج هرمون (Erythropoetin) (Jairam *et al.,*2010)، إذ ان من المعروف ان فشل الكلية يسبب فقر الدم ويرتبط بالمخاطر الكبيرة لعجز القلب والوفاة ،لايتغير عدد كريات الدم البيض ،الصفيحات الدموية قد يقل العدد ويبطأ عملها إذا اشتدت الحالة مؤديا إلى نزف دموي يساعد فيه انخفاض عوامل التخثر الاخرى في الدم (Kirsztajn *et al.,*2014; Astor *et al.*, 2002) .

2-6 : علاج الفشل الكلوي (Treatment of Renal Failure)

يعالج الفشل الكلوي بإتباع الحمية الغذائية والأدوية او إجراء غسيل كلوي ، وتعد عملية زرع الكلية الحل الأخير للمريض، تتم عملية الغسيل الكلوي عن طريق الديلزة (Dialysis) وهي طريقة اصطناعية تتم بوساطة جهاز خاص للتخلص من المواد السامة والضارة من مجرى الدم عندما تعجز الكليتان عن أداء وظائفهما كما في حال الفشل الكلوي تتم هذه العملية بطرائق شتى من أبرزها الديلزة الدموية أوما يعرف بالغسيل الدموي (Hemodialysis) والديلزة الصفاقية (Peritonial dialysis).

(Sanchez and Ward , 2012 ; Pendse *et al.,* 2008).

1- الديلزة الصفاقية (Peritonial dialysis)

تتم عن طريق الغشاء البريتوني الذي يملك خاصية الأختيار(نصف نفوذ) ولذلك يمكن إدخال قسطرة خاصة فى التجويف الصفاقي(البريتوني) (Peritonial Cavity) وعن طريق تلك القسطرة يتم إدخال سائل معقم فى التجويف البريتوني ، يحدث تبادل للسوائل والكيماويات فيما بين المحلول البريتوني ودم المريض اذ تنفذ سموم الجسم عبر الغشاء البريتوني الى المحلول البريتوني الذى يتم اخراجه من الجسم عبر القسطرة حاملا معه مخلفات الدم وتستخدم فيها قسطرة خاصة مرنة لها لبادة من الداكرون تساعد على منع التسرب والتلوث (Perl *et al.*, 2011) .

2- الديلزة الدموية (Hemodialysis)

هي عملية تنقية الدم من المواد الضارة وغير المرغوبة بالاعتماد على عملية انتشار المواد بين الدم ومحاليل معروفة التركيب تدعى سوائل الديلزة (المديلزة) (Dialysate) عبر غشاء نصف ناضح (Semipermeable Membrane) (Cecil *et al.*, 2007) . ان عملية الغسيل الدموي تعتبر افضل علاج لمرضى الفشل الكلوي المزمن في المرحلة الأخيرة (ESRD) .تعتمد عملية الغسيل على استعمال فلتر خاص يدعى(Dialyzer) يعمل هذا المرشح عمل كلية صناعية لتنظيف الدم من الفضلات والسموم إذ يربط (Catheter)خاص في الوريد العضدي أو الوريد الرقبي عن طريق مدخل وعائى جراحيا (وصلة وريدية – شريانية) ليمر الدم من جسم المريض الى جهاز الكلى الصناعية عبر جدار المرشح وثم يعود لجسم المريض بعد تصفيته من السموم التى لم تتمكن كليتاه من التخلص منها ، هنالك أنواع مختلفة من المرشحات وأكثرها شيوعاً هي (Curpophan) و (Methacrylate) و(Cellulose Acetate) و(Polyethylene) . وتوجد ثلاث وسائل لتحقيق ذلك هي: الناسور الشرياني الوريدي (Fistula) والتحويلة الشريانية الوريدية (Shunt) وأستخدام قثاطر الديلزة (Levin *etal.,*2008; Kallenbach , 2005; pastan *et al.*,2002).

2-7 : علاقة الفشل الكلوي مع الاخماج البكتيرية.

تعتبر الإصابات البكتيرية من أهم المشاكل التي يعاني منها مرضى الفشل الكلوي المزمن المستمرين على عملية الغسيل الدموي إذ يكون استعدادهم عالي للإصابات البكتيرية لأرتباط الاخماج مع الإصابات البكتيرية وإصابات الجهاز الوعائي القلبي مما يؤدي الى ارتفاع نسبة الوفيات بينهم (Amore and Wang *et al.*,2003 ; Coppo,2002) .

تعد عملية الوخز الوريدي المتكرر وعمليات نقل الدم والإصابات الناتجة عن عدوى المستشفيات من أسباب الإصابات البكتيرية لحاجة مرضى الفشل على الأقل لاثنتين من عمليات الغسيل الدموي أسبوعيا (Rewa *et al.*, 2012;Weinreich *et al.*, 2006) ، بالإضافة إلى أسباب أخرى متمثلة بانخفاض الاستجابة المناعية للمرضى أو نتيجة لفقدان كريات الدم المتعددة الانوية لوظيفتها وتتمثل فقدان الوظيفة باختزال في عملية الانجذاب الكيميائي وانخفاض في فعالية البلعمة واختزال في فعالية القتل الخلوي(Kralova *et al .,*2009). إن الإصابات البكتيرية تتمثل بنوعين من الإصابات هما إصابة السبيل البولي (Urinary Tract Infection) ، حيث يكون مصدر الإصابة بتلوث السبيل البولي إما داخلية المنشأ (Endogenous) نتيجة تلوث منطقة (perineum) أو منطقة الاحليل (Urethral) بالفلورا الطبيعية ، أومن مصادر خارجية المنشأ (Exogenous) عن طريق الانتقال من مريض لآخر أو عن طريق تلوث الأجهزة مثل جهاز القسطرة البولية Catheter (Zaki,2001) . إما النوع الثاني من الإصابات البكتيرية هي إصابات المجرى الدموي أو ما يطلق عليها بتجرثم الدم (Bacteremia) الناتجة من عمليات الوخز الوريدي المتكرر أو المكتسبة عن طريق أيادي العاملين أو الأدوات الجراحية ومن إصابات السبيل البولي الشائعة الإصابة ببكتريا *E coli* و *Staphylococcus aureus* و *Proteus spp .* و*Klebsiella spp.* وفي الفترة الأخيرة ظهرت بكتريا *Staphylococcus lentus* بكثرة في المستشفيات وفي ردهات وحدة الغسيل الدموي والتي تعتبر نوع من انواع جنس العنقوديات (Checherita *et al.,*2010;Duah, 2010).

2-8 : جنس المكورات العنقودية *Staphylococcus*

يعتبر جنس المكورات العنقودية *Staphylococcus* من الأحياء المجهرية المهمة لتأثيره المباشر والخطير على حياة الكائنات الحية الأخرى ، ويعد العالم Alexander Ogaston أول من أطلق هذه التسمية عام1880 للدلالة على بكتريا كروية عادة ما تكون مصاحبة للقيح في التهابات الجروح (Ryan and Ray,2004). تتواجد أفراد هذا الجنس في مختلف البيئات كالغبار والماء والهواء والغائط وعلى الجلد والأغشية المخاطية للفقريات من ذوات الدم الحار وعلى الملابس وغيرها من الأماكن الأخرى . يعيش معظم أنواع هذا الجنس بشكل فلورا طبيعية على جلد الإنسان والأغشية المخاطية ولكن بعضها مرضية انتهازية (Murray *et al.*, 2013; Vasconcelos and Cunha, 2010).

يمتاز جنس العنقوديات بأمتلاكه العديد من عوامل الضراوة التي تزيد من فعالية وامراضية أنواعه على احداث الخمج لامتلاكه لحامض التيكويك وعامل الالتصاق وعوامل الاخرى تمكنه من التخلص من دفاعات المضيف كانزيم (Staphylokinase) ، او تمكنه من الغزو والانتشار كانزيم (Hyaluronidase) .ومن عوامل الضراوة الأخرى لها امتلاكها لبروتينات الجدار الخلوي ، وتكوينها للمحفظة والسكريدات المتعددة الخارجية وانتاجها أنواعاً متعددة من الانزيمات الخارج خلوية والسموم المتنوعة كالسموم المعوية الثابتة في الحرارة ، وافرازها مثبطات الجهاز المناعي واحتوائها على جينات مقاومة المضادات الحيوية وابدائها المقاومة الكلية للتحلل باللليسوزايم (Suleiman *et al*., 2013; Marraffini *et al*.,2006). تظهر المكورات العنقودية مقاومة للعديد من العوامل المضادة للمايكروبات وبذلك تنتج مشاكل في العلاج . يضم جنس المكورات العنقودية 36 نوعاً و80 تحت النوع حيث تم توضيح أكثر من 20 نوعاً من المكورات العنقودية في كتاب Bergeys manual (2001) (Moura *et al*. 2012;Gotz and Schleifer, 2006)).

تكون مستعمرات العنقوديات دائرية ورقيقة ولماعة وبيضاء وأحياناً صفراء أو برتقالية يصل قطر المستعمرة (2–3) ملم، تنمو بشكل طبيعي على العديد من الأوساط الزرعية، تصنف العنقوديات اعتماداً على إنتاج الأنزيم المختثر لبلازما الدم (Coagulase) الى مجموعتين رئيستين المجموعة الاولى العنقوديات الموجبة لأنزيم (Coagulase) أي قادرة على انتاج الانزيم المختثر لبلازما الدم والمجموعة الثانية العنقوديات السالبة للانزيم (Coagulase) والتي تكون غير قادرة على انتاج الانزيم المختثر لبلازما الدم ,*et al*. (Moura *et al*. 2012; Quinn 2011) .

ان التطورات الحاصلة في علم الأحياء الجزيئي والتقنيات الاحيائية الحديثة مكنت العلماء والباحثون من استخلاص وفصل البروتين (Coagulase) وتصنيفه من الانزيمات المتخصصة والمحفزة بالمادة الأساس النوعية وهي بروتين البروثرومبين (Prothrombin) محولاً اياه الى ثرومبين (Thrombin) يتضمن هذا التفاعل تكوين معقد (Staphylothrombin complex) ويعمل الثرومبين منشطاً لتفاعل تحول فايبرينوجين بلازما دم اللبائن بصورة عامة الى فايبرين وتتكون شبكة دقيقة من الألياف المسؤولة عن تكون الخثرة. تكمن اهمية انزيم (Coagulase) بتغليفه خلايا المكورات العنقودية بالفايبرين مانعا الخلايا البلعمية من التهامها وهناك نوعان منه المقيد (Bound) والطليق (Free) (Brooks *et al*., 2007).

2-9: العنقوديات السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم

(Coagulase-Negative Staphylococci)

تعد العنقوديات السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم (CONS) Coagulase-Negative Staphylococci من الفلورا الطبيعية للجلد والأغشية المخاطية للإنسان وبعض اللبائن والطيور (Asangi *et al.*, 2011; Longauerova, 2006) . وتعتبر من البكتريا الانتهازية التي تظهر قدرتها الامراضية عند المرضى الذين يعانون من الضعف المناعي (Immunocompromised patients) وحالات الإمراض المزمنة والمرضى الراقدين لمدد طويلة في المستشفى (Jean-Baptiste *et al.*, 2011) ، اذ تدخل مجرى الدم وتسبب إصابات في جهاز الدوران سيما في الحالات المصاحبة لاستخدام بعض العدد الطبية كأنابيب القثطرة ومن مزروع الدم للمرضى الراقدين في المستشفيات (Al-Mazroea,2009;Finch,2006;Christof *et al.*, 2001) . وتعد من اهم الأنواع البكتيرية المسببة للأخماج المكتسبة من المستشفيات(Nosocomial Infections)، اذ تمتاز بقدرتها على النمو في مديات حرارية من15- 43 ْم وتحملها الملحي 15% NaCl ومقاومة للتراكيز المثبطة الدنيا لبعض المطهرات الشائعة فضلا عن مقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية . تنتج بعض أنواعها سموم معوية خارجية مسببة التسمم الغذائي.ان اغلب آليات المقاومة في المكورات العنقودية تشفر لها بلازميدات مما يوفر فرصة لانتقال هذه المقاومة الى الأنواع والاجناس الاخرى.

(Ternes *et al.*, 2013; Türkyilmaz and Kaya,2006; Hirmatsu,1997).

ان قدرة هذه الأنواع على التعايش داخل المستشفيات مكنتها من اكتساب المقاومة للعديد من المضادات الحيوية وصلت الى 100% لمركبات β-lactam و80% للمثيسلين وهي نسب تفوق احياناً مقاومة النوع *S. aureus* (Jacques *et al.*, 2000).هناك تقارير عديدة تشير الى قدرة النوع *S.epidermidis* على اصابة عضلة القلب (Endocarditis) ، واحداث الخمج في العديد من الحالات المصاحبة لاستخدام العدد الطبية العلاجية وخاصة انابيب القثطرة وقدرة هذا النوع على احداث التهابات الحروق والاذن والسبيل البولي (Duah, 2010 ;Christof, 2001) . تكمن خطورة العنقوديات في قدرتها على التعايش مع الأنواع البكتيرية الاخرى ونقل عوامل المقاومة البلازميدية اليها مما يعزز دورها الوبائي داخل المستشفيات (Aires *et al* , 2000).

2-10 : بكتريا *Stapylococcus lentus*

تعتبر بكتريا *S.lentus* نوع من انواع العنقوديات CONS الشائعة والواسعة الانتشار في الطبيعة حيث يمكن عزلها من مختلف البيئات مثل التربة والرمل والماء وكذلك المستشفيات وهي من البكتريا ذات الأصل الحيواني والتي تنتقل للإنسان (Quinn *et al.*,2011;Dakie *et al.*,2005)، عزلت من الجلد لانواع عديدة من الحيوانات المجترة وآكلة اللحوم والقوارض والطيور ومن منتجات الأغذية الحيوانية كالحليب والأشخاص العاملين في الحقول مع الحيوانات البرية والداجنة حيث وجدوا حاملين لهذه البكتريا Stepanovic (Hauschild and Shwarz,2003; *et al.*,2001)،كما عزلت من ضرع الأغنام والماعز والحليب الخام وعينات إدرار الإنسان وأمعاء يرقات الذبابة المنزلية *(Musca domestica)* .تعتبر من الممرضات النادرة حيث بينت الدراسات السابقة امتلاكها جينات مقاومة للمضادات الحيوية محدودة معظمها معزولة من البلازميدات وتعد من مسببات خمج الضرع في الحيوانات وفي حالات نادرة تسبب إصابات للإنسان ;2009 ., (Koksal *et al* Taponen *et al.*,2006; Dakie *et al .,* 2005;Stepanovic *et al.,* 2003) ،على الرغم من انها لم تعزل كثيراً من الإنسان الا انها ترتبط بعدة إصابات مثل خمج شغاف القلب والبريتون والسبيل البولي والحوض وخراجات الطحال وإصابات الجروح (Karachalios *et al.*,2006; Dakic *et al.,* 2005; Stepanovic *et al.,* 2005) .

2-10-1: تصنيف بكتريا *Stapylococcus lentus* Taxonomy

تعود بكتريا *S.lentus* الى مجموعة *Staphylococcus sciuri* التي تضم الأنواع التالية بكتريا *S.lentus*و *S.sciuri* و*S.vitulinus*(Schleifer *et al.*,1983) وتم تصنيف *S.lentus* كما يأتي :

Phylum : Fimicutes

Class : Bacilli

Order : Bacillales

Familly : Staphylococcaceae

Genus : *Staphylococcus*

Species : *lentus*

2-10-2 : الصفات المظهرية والخصائص المزرعية

Morphology and Cultural Characteristics

شخصت بكتريا *S. lentus* مظهرياً باستخدام المجهر الضوئي بعد تصبيغها بملون غرام فوجد انها

موجبة لملون غرام وغير متحركة وغير مكونة للسبورات وقطرها يتراوح بين 1.2-0.7 نانومتر توجد بصورة مفردة أوعلى هيئة ازواج او بشكل رباعي (**Karachalios *et al.*,2006**) وتمتاز مستعمرات *S. lentus* بكونها غير شفافة تتراوح الوانها بين البيضاء والبيضاء الرمادية أو الكريمية . بعض السلالات تكون مستعمراتها مخاطية قطر المستعمرة يتراوح بين 0.5 – 5 ملم على اكار الدم ، و2– 7 ملم على وسط agar Treptic soya . تنمو بشكل مثالي في مدى حراري يتراوح بين25– 35 مْ ، ولا تنمو تحت 15 مْ أو أعلى من 45 مْ . لاهوائية أختيارية يكون نموها ضعيف في الظروف اللاهوائية ، تنمو ببطئ في تركيز 10%من كلوريد الصوديوم ويكون نموها ضعيف في تركيز 15% منه (Dakie *et al.* ,2005).

2-10-3 :الصفات الكيموحياتية Biochemical Characters

تعد بكتريا *S. lentus* موجبة لاختبار اختزال النتريت (Nitrate reduction) والاوكسيديز والديوكسي رايبو نيوكليز (Deoxyribonuclease) واختبار الـ (Benzidine) واختبار الـ (Caseinase) واختبار الـ (Catalase) واختبار الـ (Esculin hydrolysis) واختبار الـ (Gelatinase) واختبار الـ (Beta – glucosidase) واختبار الـ (Nuclease) وانتاج حامض من سكر ومانتول وسكروز ورايبوز ومانوز وكلوكوز وكليسرين والفركتوز .

وسالبة لاختبار اليوريز وانزيم الفوسفتيز القاعدي وانتاج الاسيتون واختبار الانزيم المخثر لبلازما دم الارنب واختبار عامل التكتل (Clumping factor) والتحلل المائي للارجنين. وتكون نتائجها متغايرة لكل من انتاج انزيم الاستافيلوكاينيز وانتاج حامض من اللاكتوز والارابينوز والفوكوز والسالسين والسوربيتول والكالكتوز(Stepanovic *et al.,* 2005;Holt *et al.,*1994).

2-10-4 : الامراضية (Pathogenicity)

صنف 14 نوع من بكتريا العنقوديات CONS ذات علاقة بالإنسان فهي قادرة على إصابة أجهزة الجسم المختلفة ابتداءاً من الجلد حتى القلب والنخاع الشوكي ،وذلك لأمتلاكها للعديد من عوامل الضراوة ومقاومتها العالية والمتعددة للمضادات الحيوية والمطهرات فضلا عن القدرة على التحمل الملحي (Türkyilmaz and Kaya,2006; Jacques *et al.*, 2000)،ان الأعراض التي تسببها CONS عادة تكون مخفية وغير نوعية والمراحل السريرية للإصابة تكون في الطور تحت الحاد او المزمنة بدون أعراض واضحة *et* (Bannerman , 2003 ;Von-Eiff *al .*,1999) تنشط CONS في حالات الضعف المناعي والأمراض المزمنة خاصة عند المرضى الراقدين في المستشفى ويرتفع مستوى امراضيتها عندما تتوافر لها وسيلة لدخول الجسم

اذ تعد من الجراثيم الممرضة الانتهازية (Bannerman,2003) . ان لها القدرة على خمج الجهاز التنفسي والبولي والتناسلي الانثوي وخمج عضلة القلب والعظم والعيون والثدي والأذن الوسطى والجروح والحروق والمشاركة في التهابات اخرى (Al-Ghrairy , 2007; Tawfik , 2007;Al-Heety , 2005).

اشارت التقارير الى ارتفاع نسب CONS في اخماج الدم (Maria *et al.*, 2002) ، وبينت الدراسات الى امتلاك بعض انواعها لعامل التصاق والمكون من متعدد السكريات يمكنها من الالتصاق على العدد الطبية البلاستيكية وخاصة انابيب القثطرة وتشكيل غشاء حيوي مخاطي يعرف (Biofilm) يعمل على حماية البكتريا من دفاعات المضيف ويمنع وصول المضاد الحيوي للبكتريا (Holger *et al.*, 2004). تعتبر بكتريا *S. lentus* من الممرضات الانتهازية لمرضى نقص المناعة (Immunocompromised) (Karachalios *et al.,*2006) لذلك ترتبط امراضيتها بإصابات خطيرة للانسان وتسبب اخماج مختلفة مثل خمج شغاف القلب والبريتون والسبيل البولي والحوض والعظم وخراجات الطحال وإصابات الجروح. (Karachalios *et al.,*2006;Dakic *et al.,*2005; Stepanovic *et al.,* 2005).

2-11 : المضادات الحيوية (Antibiotics)

مركبات عضوية تنتجها انواع معينة من الاحياء المجهرية وتستطيع بتراكيز قليلة ان تثبط نمو او تقتل كائن مجهري آخر، عزلت من مصادر بايولوجية مختلفة مثل الفطريات والبكتريا يكون بعضها مصنع او شبه مصنع (Ibezim, 2005; Forbes *et al.*,2002; Bradford,2001) . تعمل بآليات مختلفة للتاثير اوالقضاء على البكتيريا عادة ما يكون تاثيرها في بناء جدار الخلية اوغشائها او التأثير في تصنيع البروتينات او المادة النووية RNA او DNA تختلف من حيث ميكانيكية عملها فاستمرار مفعول المضاد يعتمد على الجرعة المناسبة ونفاذية المضاد الى الأنسجة (Strasheim *et al.*, 2013; Greenwood *et al.*,2007)

2-12: مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية (Bacterial resistant for antibiotics)

منذ اكتشاف مضاد البنسلين اظهرت العنقوديات مقاومة عالية له ولأغلب المضادات الحيوية مثل التتراسايكلين والارثرومايسين ومركبات السلفا وغيرها وقد وصل مستوى المقاومة لمضادات β-lactam الى100% ، لذا دعت الحاجة الى إيجاد أنواع أخرى من مركبات البنسلين مثل Nafcillin و Methicillin (Cooper *et al.*, 2004; Wesley *et al.*, 1998). تطورت الإصابة بالعنقوديات الى ان اصبحت مشكلة رئيسية في المستشفيات خصوصا مع نشوء سلالات مقاومة للمثسلين (Fagade *et al.*, 2010;Baron *et al.*, 1998).

ان القدرة العالية للعنقوديات على اكتساب المقاومة للمضادات الحيوية تزيد من امراضيتها وخطورتها وخاصة في المستشفيات، وان الاستخدام الكبير والعشوائي للمضادات الحيوية ساعد في نشوء السلالات البكتيرية المقاومة.(WHO, 2003) . وبما ان العنقوديات من الفلورا الطبيعية لجلد الإنسان وهذا يجعلها في تعرض مستمر لجميع المضادات التي يتناولها المريض مما يحفزها على اظهار آليات مقاومة مختلفة Arakawa *et al* 2000) .ان الآليات الرئيسة لمقاومة البكتريا للمضادات الحيوية هي:

1-افراز انزيمات قادرة على تحطيم المضاد .

2- تغيير بعض المسارات الايضية التي يؤثر فيها المضاد الحيوي.

3- تغيير في نفاذية الغشاء الخلوي لمنع دخول المضاد.

4- قدرة البكتريا على التخلص من المضاد بقذفه خارج الخلية بآلية تسمى نظام الدفق Efflux pump system (Yildirim *et al*., 2005) .

2-13 : مضادات البيتالاكتام (β -Lactam antibiotics)

مضادات البيتالاكتام من المضادات الأكثر أهميةً وأستخداماً منذ أكتشافها وتمتاز بفعاليتها العالية وطيفها الواسع وقلة تأثيراتها الجانبية لذا يمكن عدها من المضادات الأمينة بأستثناء المرضى الذين يعانون من الحساسية لها وتضم المجاميع الاتية (Asbel and Levison ,2000) :

1- البنسلينات Penicillins 2- السيفالوسبورينات Celphalosporins

3- الكاربابينيم Carbapenem 4- المونوباكتام Mono bactam

2-13-1 : البنسلينات (Penicillins)

أكتشفت البنسلينات من قبل العالم Alexander Fleming عام 1929 عند ملاحظته للتثبيط الحاصل في نمو مزارع بكتريا *S. aureus* بعد تلوثها بفطر *Penicililum notatum* (Ibezim,2005) .البنسلينات مجموعة واسعة من المضادات الطبيعية والمضادات شبه المصنعة . يتكون مضاد البنسلين من نواة البنسلين (6-amino penicillic acid) الضرورية للفعالية البايولوجية وهي عبارة عن حلقة ثايوزوليدين (Thiozolidine ring) مرتبطة مع حلقة البيتالاكتام (β- Lactam ring) وتتصل مع النواة سلسلة جانبية (R-side chain) يضاف لها جذور مختلفة للحصول على مشتقات البنسلينات. تعمل المكورات العنقودية لمقاومة مضادات البيتالاكتام بواحدة من اثنين من آليات المقاومة الرئيسية تتمثل الاولى بانتاج انزيمات

البيتالاكتاميز او البنسيلينيز حيث تعمل على كسر حلقة البيتالاكتام بالتحلل المائي الذي يجعل جزيئة البنسلين غير فعالة . ويشفر لانزيمات البيتالاكتاميز في العنقوديات عن طريق جين blaZ المحمول على البلازميد (Malachowa and DeLeo, 2010;Hou *et al.*, 2007) ، اما الالية الثانية تتمثل بمقاومة العنقوديات لمضاد الميثسيلين (Methicillin) تحدث عند اكتسابها لجين mecA الذي يشفر للبروتينات المرتبطة بالبنسلين PBP2a ذات الألفة المنخفضة لمضادات البيتالاكتام (Han *et al.*, 2013). تصنف البنسلينات بالأعتماد على السلسة الجانبية والفعالية الى مايأتي (Tidwell , 2008) :

اولا: البنسلينات ضيقة الطيف (Narrow Spectrum Penicillins)

تكون على نوعين هما البنسلينات الطبيعية Natural penicillins والبنسلينات ضد المكورات العنقودية Anti staphylococcal Penicillinتشمل المجموعة الاولى كل من Penicillin G و Mycek PenicillinV (*et al.*, 2000). تمتاز بأنها فعالة ضد أغلب أنواع البكتريا الموجبة لملون غرام غير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز فضلا لفعاليتها ضد البكتريا اللاهوائية والمكورات السالبة لملون غرام مثل بكتريا *Neisseria sp.*يمتاز بنسلينV بمقاومته للعصارة المعدية وبثبوتيته اما بنسلينG حساس للعصارة المعدية لذا يعطى عن طريق العضل (Katzung , 2001).تضم المجموعة الثانية (Flucloxacillin) و(Cloxacillin) ويعد مضاد (Methicillin) أول مشتقاتها وأستعمل كعلاج ضد خمج العنقوديات عام 1960 له فعالية عالية ضد العنقوديات المنتجة لأنزيم البيتالاكتاميز لأمتلاكه سلسلة أسيل جانبية تحمي أصرة البيتالاكتام وتمنع وصول الأنزيم المحطم لها (Ehmann *et al.*, 2012; Katzung,2001) .

ثانيا: البنسلينات واسعة الطيف (Broad Spectrum Penicillins)

يطلق على هذه المجموعة من المضادات (Aminopenicillin) هي من المضادات شبه المصنعة وتضم كلاً من الأمبسلين (Ampicillin) والأموكسسلين (Amoxacillin) فضلا" عن المشتقات الجديدة مثل سايكلوسيلين (Cyclocillin) وهيتاسيلين(Hetacillin) .تمتاز هذه المجموعة بفعالية أكبر من سابقتها إذ أن فعاليتها تشمل البكتريا العصوية الموجبة لملون غرام اضافة لبعض الأنواع السالبة لملون غرام بجانب فعاليتها ضد المكورات السالبة لملون غرام المقاومة لبنسلين G .

(Paterson *et al.*,2003 ; Laurence *et al.*,1997) . تعد مضادات الامبسلين والأموكسسلين من مضادات واسعة الطيف ذات الفعالية العالية ضد بكتريا *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* لقدرتها على أختراق طبقة الغشاء الخارجي Outer membrane للغلاف الخلوي كما انها حساسة لأنزيمات

البيتالاكاميز (Al-camo, 2001) واستخدمت لمدة طويلة كعلاج فعال ضد خمج السبيل البولي والأذن الوسطى، وتعطى عن طريق الفم بسبب أمتصاصها الكامل في الأمعاء (Forbes *et al.*, 2002; Murray *et al.*,1999).

2-13-2 : السيفالوسبورينات (Cephalosporins)

السيفالوسبورينات مجموعة اخرى من مضادات البيتالاكتام تتشابه تركيبيا ووظيفيا مع البنسلين، تعتمد فعاليتها ضد البكتريا الموجبة لملون غرام على الفة المضاد للانزيمات الحساسة للبنسلين PBPs اما في البكتريا السالبة لملون غرام فتعتمد على اختراقها للغلاف الخارجي ومقاومتها لانزيمات البيتالاكتاميز الموجودة في الفسحة المحيطة بالبلازما وارتباطها بانزيمات PBPs وتكون هذه المضادات واسعة الطيف امنة الاستعمال (Al-acamo, 2001). عُزلت لأول مرة من مزارع *Cephalosporum acrimonum* سنة1948 وقد أدّت التعديلات التي أُجريت على هذه المركبات إلى تطوير مضادات حيوية مفيدة وجيدة مثل (Cephalothin) (Bradford, 2001) ، إنّ مضادات السيفالوسبورين هي مركبات قاتلة للبكتريا تحتوي على نواة (Amino-cephalosporanic-acid) والتي تشتمل على نواة البيتالاكتام مندمجة مع حلقة (Dihydrothiazine) (Yao and Moellering, 2003; Bush *et al.,* 1995). تُصنف السيفالوسبورينات إلى خمسة أجيال، إستناداً إلى فعاليتها المضادة للنمو البكتيري وهي:

1- الجيل الأول : يشمل السيفالوسبورينات ذات الطيف الضيق ضد المكورات الموجبة لملون غرام وبعض العصيات السالبة مثل Cephalexin و Cephalothin (Moya *et al.*,2010).

2- الجيل الثاني: مركبات مستقرة بوجود إنزيمات البيتالاكتاميز التي تزيد من نشاطها ضد البكتريا السالبة لملون غرام مثل (Cefuroxime) و(Cofoxitin) (Samaha-Kfoury and Araj,2003).

3- الجيل الثالث : تضم هذه المجموعة مضادات حيوية ذات نشاط أكثر بكثير من المضادات ذات الطيف الضيق، وهي أكثر استقراراً بوجود إنزيمات البيتالاكتاميز، وقادرة على عبور الجدار الخارجي للبكتريا السالبة لملون غرام، ومن الأمثلة على هذه المضادات (Cefotaxime) و(Ceftiaxone) و(Ceftazidime) (Moya *et al.*, 2010; Greer, 2006).

4- الجيل الرابع : مضاد (Cepheme) الذي طُوّر في سنة 1994، ويُظهر زيادة في الإستقرارية للإنزيمات التي تشفر لها الكروموسومات وحتى لبعض هذه الإنزيمات التي تكون جيناتها محمولة على البلازميدات (Kalai *et al.*, 2005; Yoa and Moellering, 2003).

5 – الجيل الخامس : مثل مضاد (Ceftobriprole) ذو فعالية ضد بكتريا *S.aureus* والمقاومة للمشيلين ويعطى بالحقن لعلاج إصابات الجلد والانسجة الرخوة (المرجاني ،2011) .

2-13-3 : مقاومة العنقوديات لمضادات البيتالاكتام .

تقاوم العنقوديات مضادات البيتالاكتام عند اكتسابها عوامل المقاومة المشفرة لعدد من الميكانيكيات المختلفة وأول ميكانيكية عرفت هي انتاج انزيمات البيتالاكتاميز كاستجابة لوجود مضادات البيتالاكتام في محيطها وتعمل على شطر آصرة الأمايد لحلقة البيتالاكتام ويشفر له العديد من الجينات مثل *Shiv,Tem,Oxa* وجين *blaZ* وان جين *blaZ* يقع غالباً على البلازميد وأحياناً على الكروموسوم وامكانية انتقاله بين البكتريا عن طريق البلازميدات (Guilfoile *et al.*,2007;Hou *et al.*, 2007;Zhang *et al.*, 2001) . يعتقد ان جينات *blaZ* الموجودة في العنقوديات مشتقة من التسلسلات المدغمة Insertion Sequences المحمولة على الجينات القافزة Transposons وهي قطع محددة من الـ DNA لها قابلية الانتقال من موقع الى آخر دون الحاجة الى ناتج الجين وشخصت الجينات القافزة من علاقتها بالمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية للمكورات العنقودية (Guilfoile *et al.*,2007) وتحتوي العنقوديات على العديد من الجينات القافزة لها القدرة على الانفصال والانغراس في شريط الـ DNA الكروموسومي او البلازميدي وتشفر لبعض المضادات الحيوية كالبنسلين والمعادن الثقيلة. تحوي العنقوديات بلازميدات اقترانية صغيرة مسؤولة عن مقاومة بعض المضادات الحيوية مثل التتراسايكلين والارثرومايسين و والامبسلين وغيرها (Franklin,2003). يعتبر تحليل حلقة البيتالاكتام بوساطة انزيمات البيتلاكتاميز والمتضمنة البنسلينات والسيفالوسبورينات من آليات المقاومة الاكثر اهمية (Guilfoile *et al.*,2007). اذ تقوم بغلق الارتباط التصالبي Cross-linking في طبقة Peptidoglycan خلال عملية بناء الجدار اذ ترتبط حلقة البيتالاكتام بانزيمات PBP التي تشترك في بناء البروتينات عبر عمليات الارتباط التصالبي في جدار الخلية ، ان عملية ارتباط البيتالاكتام مع PBP تؤدي الى وقف عمليات بناء الجدار وبذلك تموت الخلية نتيجة عدم ثباتها عند الضغط الازموزي الواطئ،تعمل مضادات البيتالاكتام ضد طيف واسع من البكتريا الموجبة والسالبة لملون غرام لذلك تكون قاتلة للبكتريا Bacteriocidal (Forbes *et al.*, 2002; Alcamo, 2001).

2-14: مجموعة الماكروليدات (Macrolides)

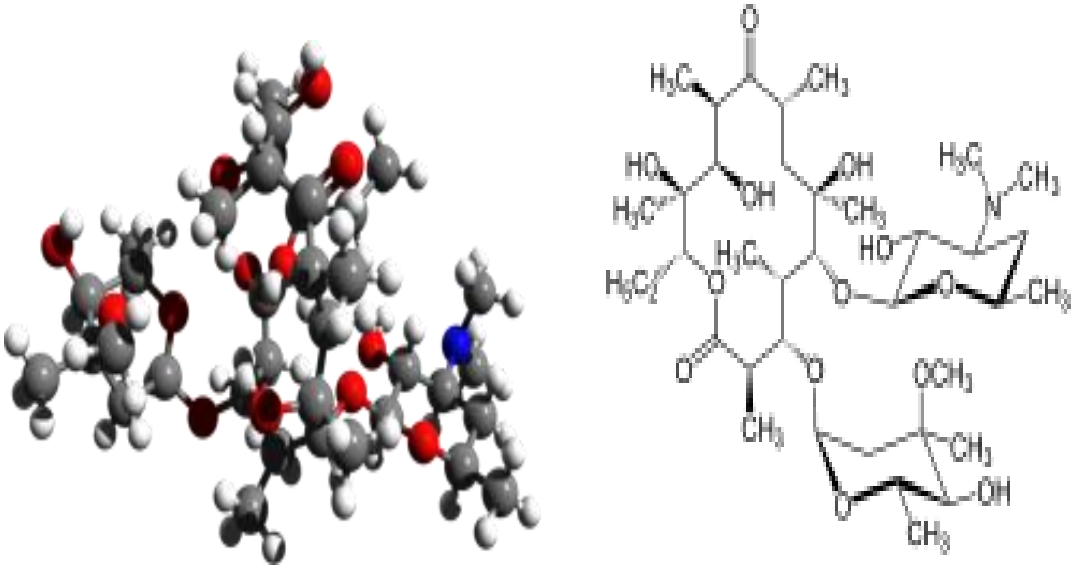
اقترح مصطلح الـ (Macrolide) اول مرة من قبل الباحث Wood ward سنة 1957 وهي نواتج ثانوية تنتج من الاكتينومايسيتات التي تستوطن التربة ويعد البيكرومايسين اول مضاد حيوي تابع لهذه المجموعة(Katz and Ashley,2005). مضادّات حيويّة تنشأ فاعليتها من وجود حلقة ماكروليد (Macrolide ring) عبارة عن حلقة ضخمة دائرية كبيرة مغلقة تسمى (Lactone) وتخلق من تجمع الخلات والبروبيونات يرتبط بها جزيء أوعدة جزيئات من السكر منزوع الهيدروكسيل وغالبا ما يرتبط كل من الكلادينوز والديسوسامين تتألف حلقة اللاكتون من15,14أو16 ضلع وتنتمي هذه المجموعة إلى فئة متعدد الكيتيد (Polyketide) من المنتجات الطبيعية (Gary ,2009) تمتلك تركيبا كيمياويا مكون من 12 – 16 ذرة كاربون ويعد الـ (Erythromycin) احد افراد هذه المجموعة .

تؤثر الماكروليدات على تصنيع البروتينات بواسطة تداخلها مع الرايبوسومات ويكون تاثيرها رجعي وهي لذلك مثبطة ، كما تنتمي إلى فئة مثبطات تخليق البروتين الحيوي في البكتريا . يعتقد أن ذلك يتم بحجب ببتيديل ترانسفيرز من إضافة الببتيديل المرتبط بـ tRNA إلى الحامض الأميني التالي (Guilfoile *et al.*,2007 ; Mims *et al* . , 2004).

1-14-2 : إرثرومايسين (Erythromycin)

مضاد حيوي مايكروليدي صيغته الكيميائيةC37H67NO13 يتميز بمجال طيفي يشبه أو يزيد قليلا عن البنسيلين، ولذلك يستعمل لمن يعاني أو لديه حساسية للبنسيلين، تم عزله عام 1952م من مزارع الفطور العقدية ذات الصبغة الحمراء *Streptomyces erythreus* ، إن السلالة المنتخبة لإنتاجه تكون غير ملونة . بالنسبة لعدوى الجهاز التنفسي فإن لديه تغطية أفضل للميكروبات الغير شائعة مثل *mycoplasma* و*Legionellosis* (Maheshwa، 2007) يتركب كيميائياً من14ضلع في حلقة اللاكتون مع عشرة مراكز غير متماثلة ونوعين من السكر L- cladinose و D- desoamine مما يجعله عصياً على التخليق وعليه فانه يثبط تخليق البروتين بتأثيره على الرايبوسومات الوظيفية ومن خلال التعديلات الايضية التي تمكن الخلايا البكتيرية من التعامل مع العمل المثبط له من خلال تغير تركيب موقع الارتباط الرايبوسومي والنفاذية القليلة لغلاف الخلية وانتاج الانزيمات المثبطة للمضادات الحيوية وتغيرها *et* (Katzung *al.*,2009; Abramowicz and Zuccotti,2005) . اوضحت الدراسات الى امكانية عمل الارثرومايسين اذ عزت التقارير الى

معالجة الحامض النووي الرايبوزي RNA والرايبوسوم 23S من قبل N- مثيل الادنين للـ Methylase والمحدد من قبل فئة من الجينات تقارب الى 30 جين من مصادر متنوعة بدأ من مسببات الامراض السريرية الى الشعاعية التي تنتج المضادات الحيوية (Von-Eiff *et al.*,1999). يستخدم بتركيز 0.1-2µg/ml بشكل فعال ضد البكتريا الموجبة لملون غرام ويعطى للمرضى الذين لديهم حساسية للبنسلين ومن تاثيراته الجانبية فانه يسبب اضطرابات بسيطة في المعدة وحمى . هناك مضادات اخرى مشابهة لهذا المضاد تركيبيا مثل azithromycin و Clarithromycin (Maheshwai ,2007;Craig and Stitzel, 2004).



شكل (2-1) التركيب الكيميائي لمضاد الارثرومايسين

Eiks,J. and Ganellin,R.(1991).

2-14-2 : مقاومة العنقوديات لمضاد الارثرومايسين .

يرتبط مضاد الارثرومايسين مع مستلم 23rRNA في وحدة 50S لرايبوسوم البكتريا وبذلك يثبط عملية تصنيع البروتين من خلال تداخله في تفاعلات الترجمة وتكوين معقد البادىء (Initiation complex) وان البكتريا تكّون مقاومة ضده من خلال تغير في عملية الميثلة Methylation لمستلم rRNA وتكون هذه المقاومة بلازميدية السيطرة (Gary,2009 Katzung,2009).يحدث تحوير الهدف على مستوى الرايبوسوم عن طريق 23S وميثلة انزيم rRNA هذا الانزيم يشفر بوساطة جينات ميثلة مقاومة الارثرومايسين erm .

توجد اصناف متعددة من جينات erm مميزة بواسطة معايير التهجين تتضمن (ermA ,ermB ,ermC,ermF ,ermY)، تعمل انزيمات الميثلة على اضافة واحد اواثنين من بقايا المثيل الى بقايا الادينين

في حقل VDomine(مركزانزيم ناقل الببتديل) من 23S rRNA هذا التحوير الرايبوسومي يصنع سلالات بكتيرية مقاومة لأغلب المايكروليدات واللنكوساميدات والستربتومايسينات المتضمنة للأنماط المظهرية، تعرف انماط المقاومة هذه بـ MLSB (Abramowicz *et al*.,2005; Matsuoka *et al* .,2002;Weisblum,1995).والتعبير عن مقاومة MLSB تكون اما مكتسبة او تكون غير مكتسبة ، تكون السلالات المقاومة لـ MLSB في العنقوديات قابلة للتولد وتمتلك مقاومة عند حلقة ماكروليد 14 او15 وحساسة عند حلقة ماكروليد 16، العنقوديات ذات مقاومة للأنماط المظهرية القابلة للتولد تتضح مقاومتها للارثرومايسين خارج الجسم وحساسة للكلندمايسين لذلك مضاد الارثرومايسين يمثل مولد جينات قوي لانتاج انزيم المثيليز (Fasih *et al.,*2010).

2-15 : التتراسايكلينات : (Tetracyclines)

تعد من المضادات واسعة الطيف ذات التأثير المثبط (Bactriostatic) وفعالة ضد مدى واسع من الأحياء المجهرية مثل البكتريا السالبة والموجبة لملون غرام والريكتسيا والكلاميديا وغيرها (Fluit *et al*., 2001) . تضم نوعين من المركبات الطبيعية وشبه المصنعة ومن أمثلتها التتراسايكلين (Tetracycline) والأوكسي تتراسيكلين (Oxytetracycline) والكلورتتراسيكلين (Chlorotetracycline) والدوكسي سيكلين (Doxycycline) (Baron *et al*., 1999). تعمل على تثبيط تصنيع البروتين وذلك من خلال أرتباط المضاد بالوحدة الرايبوسومية 30S بعد دخوله الى الخلية البكتيرية (Fluit *et al*., 2001) فينتج عن هذا التثبيط منع أرتباط Aminoacyl-tRNA الى الموقع الخاص بالأرتباط على معقد الرايبوسوم mRNA وبذلك تعيق عملية الترجمة بشكل كامل مما يؤدي الى تثبيط بناء البروتين (Gales *et al*., 2005).

أن أستعمال مضادات التتراسيكلينات بشكل واسع أدى إلى ظهور وزيادة نسبة المقاومة في أغلب أنواع الاجناس البكتيرية مما قلل من أستخدامها. تكون المقاومة لهذه المضادات بثلاث طرق أما أن تكون عن طريق الدفق بوساطة بروتينات مرتبطة بالغشاء أو بحماية الرايبوسومات بتغير موقع الارتباط الرايبوسومي بوساطة بروتين ذائب أو عن طريق التثبيط الأنزيمي في حالات نادرة (Nester *et al*., 2001; Murray *et al*.,1999).

2-16 : الكوينولينات (Quinolones)

تضم عدة مضادات حيوية ذات فعالية واسعة ضد البكتريا الموجبة والسالبة لملون غرام اذ تكون ذات تأثير قاتل للبكتريا وهي عبارة عن مشتقات لـ Nalidixic acid ; Ivanov and Budanov , 2006). (Katzung 2001 . يعد مضاد الـ (Nalidixic acid) من أنجح المضادات استعمالا في معالجة اخماج السبيل البولي(Tillotson, 1996) ، وتصل الكوينولينات إلى مستوى عال في الأنسجة وتفرز بتركيز عال في الإدرار وهذا يجعل منها مهمة في علاج اخماج السبيل البولي(Brookes *et al*,. 2007) . تعمل الفلوروكوينولينات التي تعمل على إيقاف تصنيع DNA البكتريا بتثبيط عمل أنزيم (DNA Gyrase) Topoisomerase II وبالتالي جعل الكروموسوم البكتيري فائق اللف مما يؤدي إلى موت الخلية في البكتريا السالبة لملون غرام (Fluit *et al.,* 2001) إضافة إلى تثبيط أنزيم Topoisomerase IV في البكتريا الموجبة لملون غرام حيث يتسبب ذلك في إعاقة انفصال الـ DNA المتضاعف أثناء عملية الإنقسام الخلوي. من العقاقير المهمة لهذه المجموعة (Nalidixic acid) و (Ofloxacin) و (Norfloxacin) و (Gatifloxacin) و (Levofloxacin) (Katzung, 2001).

2-17 : الكلايكوببتايدات (Glycopeptides)

مجموعة مضادات الكلايكوببتايد (Glycopeptide) احد الاصناف الرئيسة والمهمة من المضادات الحيوية المثبطة لبناء الجدار الخلوي (Inhibits synthesis of cell wall) ويعتبر مضاد الـ (Vancomycin) احد افرادها وينتج من البكتريا الخيطية *Streptomyces orientalis* (Forbes *et al.*,2002) وهو مضاد معقد التركيب حيث يتكون من ببتيدات سكرية تحوي سكر اميني يدعى (Vanosamic) ويحتوي ايضا على احماض امينية مثل (Phenylglycine) وحامض الاسبارتك (Kee and Hayes ,2000). يعمل هذا المضاد ضد البكتريا الموجبة لملون غرام وله فعل متخصص ضد بكتريا الـ *S.aureus* حيث يعد العلاج الامثل للإصابات التي تسببها (Mayer ,2002). يعطى هذا المضاد لعلاج امراض صمامات القلب مثل الحمى الروماتزمية او امراض الحساسية المرافقة للصمامات الاصطناعية ولحالات خمج شغاف القلب وحالات انتان الدم و كذلك في حالات التهاب نخاع العظم وغيرها من حالات

الالتهابات العميقة (**Wotton *et al.*,**2004;Chang *et al.*,2003) يعطى هذا المضاد عن طريق الحقن بالوريد حيث انه لا يمتص جيدا بالامعاء (Anaizi,2002) .يؤثر مضاد الـ (Vancomycin) في عملية بناء

الجدار الخلوي لبكتريا العنقوديات و بالتحديد على بناء طبقة الـ(Peptidoglycan) التي تعد من التراكيب الاساسية للبكتريا الموجبة لملون غرام (Kee and Hayes,2000).

2-18: مضادات السلفونامايدات والترايميثوبريم. (Sulfonamides and Trimethoprim)

تشارك هذه العقارات المصنعة في عملية التخليق الحياتي لحامض الفوليك الذي يدخل في عملية تصنيع الأحماض الأمينية والنيوكليتيدات والسلفونامايد شبيه بحامضP-amino benzoic acid) حيث يتنافس معه ليثبط انزيم Dihydropteroate synthatase (DHPs) الذي يكون بدوره عامل مساعد لتخليق Tetrahydrofolic acid.أما مركب Trimethoprim فهو شبيه بحامض Dihydrofolic acid الذي يتنافس معه ليثبط انزيم Dihydrofolate reductase (DHFR) ليعمل كعامل مساعد في اختزال Dihydrofolic acid الى Tetrahydrofolic acid في المرحلة النهائية لتخليق Tetrahydrofolic acid ويستعمل Co-Trimoxazole ويسمى أيضاً Methoprime المتكون من Sulfamethaxazole و Trimethoprime في الحالات الخمجية التي تسببها *S. aureus* والتي تكون في الغالب حساسة له (Allou *et al*, 2009).

2-19 : الاخماج الجهازية والفشل الكلوي Systemic Inflammation and Renal failur

إن الالتهابات الجهازية تكون هي السائدة في مرضى الفشل الكلوي والمستمرين على عملية الغسيل الدموي ، ترتبط الالتهابات مع الإصابات الميكروبية وكذلك إصابات الجهاز الوعائي القلبي وبالتالي ارتفاع نسبة الوفيات بين مرضى الفشل الكلوي (Wang *et al.*,2003 ,2002;Stenvinkle and Alvestr).

إن عملية الغسيل الدموي المثالية يمكن إن تقلل وبنسبة كبيرة الاخماج في مرضى الفشل الكلوي المزمن (Schindler *et al.*,2000) . في العديد من حالات الفشل الكلوي لايمكن تشخيص الحالة المرضية في المراحل الثلاث الأولى ويكون التشخيص في المرحلة الرابعة والخامسة حيث يكون الخلل واضحاً في معدل ترشيح الكبيبات مما يساهم في تجمع كميات كبيرة من اليوريا والسموم المختلفة الأخرى وان الالتهابات تتكون

في المراحل الأولى لحدوث المرض لذلك تكون واسعة الانتشار ولا يمكن السيطرة عليها (Kaysan and Kumar ,2003).

2-20 : الحركيات الخلوية Cytokines

الحركيات الخلوية هي عبارة عن بروتينات سكرية صغيرة Glycoproteins مكونة من سلاسل ببتيدية ذات وزن جزيئي واطىء ، تشبه الهرمونات والنواقل العصبية حيث تقوم بعملية نقل الاشارات وتوصيل الايعازات بين الخلايا وبالتالي تقوم بتنظيم الاستجابة المناعية الذاتية والمكتسبة وتشكيل واصلاح الانسجة . تفرز بواسطة الخلايا نتيجة لتحفيز خارجي ومعظم الحركيات الخلوية متعددة المصدر والهدف الوظيفة (Cabay and kushner , 1999). تلعب دورا مهما في تنظيم الاستجابة المناعية وإن اغلب الحركيات الخلوية تنتج بواسطة الخلايا اللمفية التائية المساعدة T Helper cell حيث تنقسم هذه الخلايا إلى قسمين Th2وTh1 تتضمن Th1 الاستجابة المناعية الخلوية Cell-mediate immunity بينما Th2 فتتضمن الاستجابة المناعية الخلطية Humoral immune response. الحركيات الخلوية التي تنتج من قبل Th1 هي IL-2 ، IFN-γ أما التي تفرز من قبلTh2 هي IL-4, IL-5, IL-1B حيث يكون هنالك تنظيم متبادل بين السايتوكينات المفرزة من قبل Th1, Th2 (Jones *et al*,2012) تتضمن أنواع عديدة تقسم الى نوعين رئيسين هما الحركيات الخلوية قبل الخمج Pro-inflammatory والحركيات الخلوية ضد الخمج anti- inflammatory التي تعتبر وسائط مهمة في الاستجابة المناعية تحفز المضيف على التفاعل بشكل ملائم ضد الممرضات ،وتعمل بشكل سلسلة متداخلة اي ان تحفيز احد الأنواع له القابلية على تحفيز الأنواع الاخرى،تنتج الحركيات الخلوية من مختلف خلايا الجسم والخلايا المناعية ويكون تأثير عملها ذاتياً Autocrineعلى الخلية نفسها،او جنبياً Paracrine على الخلايا المجاورة لها ، او يكون تاثيرها Endocrine على الانسجة ، تعمل الحركيات الخلوية على تنظيم الاستجابة المناعية من خلال التحفيز أو التثبيط (Yoshimoto and Yoshimoto , 2013) . تركيب اغلب الحركيات الخلوية متعدد الاشكال Pleiotropic لذا تتميز بقدرتها على التفاعل مع مجموعة متنوعة من الأهداف الخلوية عن طريق مستقبلات محددة تعبر على سطح الخلية، تفرز الخلايا المناعيةالمختلفة وخلايا Fibroblasts أنواع مختلفة من

الحركيات الخلوية تؤثر بها على خلايا مناعية أخرى ، حيث تبين أن وظيفة الجهاز المناعي تعتمد بصورة رئيسة على الحركيات الخلوية ، وان الانترلوكين يؤدي دورا مهما في تطور الخمج المزمن أو الحاد Cruse) and Lewis, 2004; Kindt *et al.*, 2007) ، هنالك الكثير من الدراسات تشير إلى ارتفاع الحركيات الخلوية قبل الخمج في مرضى الفشل الكلوي (Boenisch *et al* .,2002; Donica.,2001) وهناك

سببين رئيسيين لزيادة إنتاج الحركيات الخلوية في مرضى الفشل الكلوي هما زيادة في إعداد خلايا الدم البيضاء الوحيدة Monocyte في المجرى الدموي blood stream وزيادة في إنتاج الحركيات الخلوية لكل خليه واحدة من Monocyte (Sester *et al.*, 2001). يمكن تصنيف الحركيات الخلوية اعتماداً على تأثيرها في الاستجابة الخلوية الى :-

2-20-1: الحركيات الخلوية قبل الخمج Pro-inflammatory cytokine

تتوسط الحركيات الخلوية فعالية الخلايا البيض المتعددة الانوية وتعمل كجاذبات كيمياوية،اغلب هذه الحركيات ترتبط بالاستجابة المناعية للخلايا التائية المساعدةTh1 و تكون مسؤولة عن القضاء على الاخماج مثل γ-INF،TNF،IL-1،IL-2،IL-3، IL-6، IL-7، IL-8، وIL-12 (Yoshimoto andYoshimoto,2013) . إن التغيرات في الفعالية البايلوجية مثل إنتاج الحركيات الخلوية قبل الخمج Cytokines pro inflammatory وفعالية خلايا الدم البيض يمكن إن تقيم في الدم لتحديد وجود الاخماج الجهازية لان ارتفاع تركيز الحركيات الخلوية قبل الخمج وانترفيرون- كاما يعد دليلاً على وجود الاخماج الجهازية في مرضى الفشل الكلوي (Himmelfarb *et al.*¸2002)

2-20-2: الحركيات الخلوية ضد الخمج Anti-inflammatory cytokine

تشمل هذه الحركيات الأنواع IL-4،IL-13،وIL-10 المرتبطة بالاستجابة المناعية للخلايا التائية المساعدةTh2،لها تأثير في تثبيط انتاج الحركيات الخلوية قبل الخمج أو مواجهة تأثيرها بتقليل التعبير الجيني للعامل المنخر للأورام -TNF و IL-1، الاستجابة الخمج في الجسم تحتاج الى الحركيات المفرزة من قبل الخلاياTh1،Th2 لمقاومة الخمج (Hofmann *et al.*, 2002). تعمل على تحفيز الحركيات الخلوية قبل الخمج مثل α- TNF، IL - 6،IL- 8، IL -33،و IL-12 حيث يعمل الاخير على تعزيز منطقة الاصابة بخلايا الدم العدلة والبلاعم والخلايا التائية (Biffl *et al* ., 1996 ; Liu *et al* ., 2003) ، كما تقوم خلايا البلاعم بتقديم المستضد Ag-presentation الى الخلايا التائية التي بدورها تبدأ بالتضاعف بسرعة

تحت تأثير الحركيات الخلوية من نوع IL-1 فتنتج الـ IL-2 و IL-4 و IL-5 التي تعمل على تحفيز وتضاعف الخلايا اللمفية من

نوع B لإنتاج الأجسام المضادة كما تطلق خلايا البلاعم العامل المنخر للأورام α -TNFالذي يساهم في رفع الاستجابة الالتهابية وتعبير معقد التوافق النسيجيMHC الذي يساعد على تقديم المستضد للخلايا الالتهابية (Garcia *et al.*, 2005) اضافة الى كون النوع IL-1 يعد عامل جذب كيمياوي Chemotaxis

مباشر لخلايا الدم البيضاء فانه يقوم بالتعاون مع α -TNF بحث تعبير جزيئات الالتصاق بين الخلايا Intercellular adhesion molecule (ICAM) على سطوح الخلايا الظهارية والاورمات الليفية التي تسبب التصاق خلايا الدم البيض بالخلايا الظهارية (Dinarello , 1997).

2-20-2-1: الحركيات الخلوية نوع 17- Interleukin (IL-17)

يعد انترلوكينIL-17 احد الحركيات الخلوية قبل الخمج ويمثل احد افراد عائلة متنوعة من الحركيات الخلوية تشمل كل IL-17E , IL-17D , IL-17C , IL-17B , IL-17 A وتعتبر نسيلة فريدة من خلايا CD4 Tcells هي Th-17 ، يتكون من ستة أعضاء وخمسة مستقبلات تنتج بشكل خاص من تنشيط خلايا T cell (Jones *et al*,2012 ; Sonobe *et al*,2005) كذلك له مصادر اخرى هي الخلايا العدلة والحامضة والخلايا القاتلة الطبيعية D8 T cells . يكون متعدد الاشكال للاخماج الأولية التي تعزز الخلايا التائية وتنشط الخلايا البطانية والظهارية والخلايا الليفية لإنتاج العديد من الوسائط الألتهابات ألأولية ، المتضمنة على IL-6 و IL-1 و TNF-α، ويعمل كجاذب كيميائي حيث يجذب الخلايا وحيدة النواة والخلايا العدلة الى منطقة الخمج او الإصابة البكتيرية كأستجابة الى دخول البكتيريا (Kolls and Linden.,2004).وبين Cooper (2009) ان IL-17 يلعب دور وقائي ضد الإصابات البكتيرية وبنفس الوقت له تأثير في تلف الأنسجة نتيجة الاخماج او الإصابة ببعض الامراض المناعية او الفسلجية المختلفة كما بين ان فهم آلية عمل هذا الحركي الخلوي تتطلب معرفة اين وكيف يعمل اولاً حيث بين العديد من الدراسات ان التداخل بين IL-17 والبكتريا يبدأ في السطوح المخاطية التي تخترقها البكتيريا حيث تحفز على انتاج IL-23 والذي بدوره يحث على انتاج IL-17 والاخير يقوم بجذب الخلايا العدلة الى منطقة الاصابة وانتاج IL-8

و IL-1 ، علاوه على ذلك فأنIL-17 يمارس تأثيره عن طريق تعزيز خلايا العدلات neutrophils والوحيدات monocytes خلال زيادة الإنتاج الموقعي للتنشيط الكيميائي لـ IL-8، وبروتين-1الجاذب

الكيميائي لخلايا الوحيدات ، وبروتين a المرتبط بنمو الجين الورمي growth-related oncogene protein a(Laan *et al* 2001 ; Agarwal *et al*,2008).

لوحظ الدور الامراضي لـ17-L في مرض الفشل الكلوي حيث يعمل على تسهل تنشيط الخلايا التائية T cell وارتشاح الأنسجة بواسطة زيادة تنظيم upregulating التعبيرعن التصاق الجزيء بين الخلايا (ICAM-1) (Albanesi *et al.*,1999).

ويستطيع العمل تآزريا مع عامل تحفيز خلايا B للتأثير على انتشار الخلايا وإفراز الأجسام المضادة . (Doreau *et al.*,2009) ان وجود خلايا T المضاعفة السالبة يفسر قابلية تراكمها في ألأنسجة الملتهبة وتقترح بقوة بأنها تلعب دور امراضي في ألأستجابة للأخماج الموضعية (Crispin *et al.*, 2008).

2-20-2-2: الحركيات الخلوية نوع 27- Interleukin (IL-27)

يعود IL-27 الى مجموعة الحركيات الخلوية نوع 12، حيث وصف لأول مرة من قبل Pflanz وجماعته في (2002) ،والذي عرفه بأنه عبارة حركي خلوي متعدد المظاهر ويؤثر على فعالية الخلايا اللمفية التائية. يلعبIL-27 دورا مزدوجا في تنظيم الاستجابة المناعية وتكون له خصائص الحركيات الخلوية قبل وضد الالتهاب ، وينتج بصورة رئيسية من الخلايا الشجرية Dendritic cells (DCs) ومن خلايا البلاعم والخلايا الاندوبلازمية (Pflanz *et al.,*2002) وتوجد مستقبلات هذا الانترلوكين IL-27R و gp130 على أنواع مختلفة من الخلايا مثل الخلايا الوحيدة و خلايا البلعم الكبير و الخلايا الشجيرية والبدنية و الخلايا القاتلة الطبيعية والخلايا اللمفية التائية والبائية Yoshida; Pflanz *et al.,*2002 ;Pflanz *et al.,*2004) (2001 *et al.,* . تشير الدراسات المتوفرة أن IL-27، تكون لديه وظيفة مزدوجة عكس باقي الحركيات الخلوية فهو يعمل كبادئ Initiator وكمضعف Attenuator للاستجابة الالتهابية والمناعية (Xu *et al.,* 2010; Yoshida *et al.,*2009). حيث بين الباحثان (Gideon and Flyn., 2016) ان IL-27 له القدرة على حفظ التوازن بين الحركيات قبل وبعد الخمج من خلال عمله كمحفز وكابت للاخماج وقد اثبتا ذلك من تجارب اجريت على الحيوانات التي اصيبت ببكتريا mycobacterium tuberculosis لاحداث مرض السل وقاما بتقدير مستوى الانترفيرون كاما وIL-17 , IL-10 داخل الـ granuloma ووجدو دوره في تنظيم انتاج هذه السايتوكينات كما لاحظوا العلاقة بين نسبة البكتريا والتعبير عنه داخل granuloma . ان IL-27 يحفز التمايز المبكر للخلايا التائية المساعدة الأولى TH1 (Takeda *et al.,* 2003) ويحفز أنتاج أنواع من الحركيات الخلوية ضد الخمج مثل الـ IL-10 بواسطة تنشيط الخلايا اللمفية التائية كما ان له دور في

حفظ التوازن بين proinflammatory cytokines المنتجة بفعل تحفيز خلايا Th−1 cells والحركي الخلوي المسؤول عن Antiiflammatory بفعل الخلايا التائية المنتجة IL−10 (Awasthi *et al.,* 2007) ويقوم بعملية كبح او تثبيط تمايز الخلايا التائية المساعدة الثانية Th2 و Th17 (Yoshimoto *et al.,*2007; Stumhofer *et al.*, 2006) وانتاج الحركيات الخلوية قبل الخمج (Hamano *et al.,* 2003; Villarino *et al.,* 2003) وبالتالي فان هذه الوظيفة المزدوجة تمكنه من السيطرة على أمراض المناعة

الذاتية والأخماج النسيجية الأخرى(Murugaiyan *et al.,*2009). كما تنتج كميات من الحركي الخلوي 27 من الخلايا المقدمة للمستضد (خلايا البلاعم والخلايا الشجرية) بعد ان تصادف الميكروبات البكتيرية والفطرية (Hause *et al.,*2007; Gafa *et al.,*2006) . تضم مجموعة الـ IL−12 عدد من الحركيات الخلوية منها IL−27 و IL−12 و IL−23 و IL−35 (Yoshimoto and Yoshimoto,2013) .يتميز IL−27 بزيادة تنظيم السيتوكينات قبل الخمج مثل IFN−γ و IL−17 و انخفاض تنظيمه للحركيات الخلوية المضادة للاخماج مثل IL−4 و IL−10 (Santos *et al.,*2013; Shibata *et al.*,2015) .

2−20−2−3: الحركيات الخلوية نوع Interleukin −33 (IL−33)

عضو من عائلة IL−1 ويعتبر أحدث افرادها وهو بروتين Alarmin ويفرز بشكل نشط من الخلايا التالفة Necrotic cell وهو واحد من انواع الخلايا المستجيبة لأضطرابات الحساسية ويعد وسيط مهم من خلايا المناعة الذاتية Innate immunity إذ يؤدي دوراً هاماً في الاستجابات التكيفية (Lohning *et al.,*2010). اعضاء اسرة IL−1 تؤدي دورا حاسما في الاستجابات اللألتهابية تشمل افضل الأعضاء هم (IL−1β, IL−1 α, IL− 18, IL−33) (Roussel *et al.,*2007; Carriere *et al.,*2007) ، وله تأثير على الحركيات الخلوية قبل الخمج ويعتبر كجاذب كيمائي للخلايا التائية المساعدة الثانية TH2 ويحفر انتاج حركياتها الخلوية مثل IL−5 و IL−13 (Miller, 2011). ويتم التعبير عنه من قبل العديد من الخلايا والأنسجة بما في ذلك المعدة والدماغ والطحال والكلية والقلب والخلايا الظهارية والشعب الهوائية ، والخلايا الليفية والخلايا العضلية الملساء والخلايا الكيراتينية والملتهمة والخلايا الشجيرية Schmitz *et al.,*2005) . يتم انتاجه في الغالب من قبل خلايا النسيجية Stromal cells مثل الخلايا الظهارية والبطانية حيت ان حدوث ضرر في هذه الخلايا سوف يحفز عملية النخر للخلايا واطلاق IL−33 الذي يمكن ان ينشط جزيئات المستقبل الموجودة على الخلايا المناعية المختلفة مثل الخلايا البدنية وخلايا Th2 يعود الى

مجموعة الحركيات الخلوية من نوع 1 ولكنه لا يشبه بقية الأنواع حيث انه يرتبط بتحفيز الخلايا Th2 وليس Th1 لوجود المستقبلات الخاصة به على سطحها ويرتبط معها ويكون معقد له دور في تنشيط خلايا Th2ويزيد من انتاجها مثل IL-5 و IL-13 .او قد ترتبط مع المستقبلات الخاصة به (Miller,2011; Liew *et al.,*2010). ان انتاجه يرتبط مع الحالات الالتهابية المزمنة حيث ان وجوده يعتبر اشارة الى التلف الخلوي ونشوء الالتهابات حيث انه يطلق من الخلايا الملتهبة والمنخرة اذ ينبه الجهاز المناعي لموقع التهديد مثل الصدمات أو الإصابات المختلفة (Saenz *et al.,*2008).

وان زيادته تسهم في تنظيم الحركيات الخلوية في المرضى الذين يعانون من الاخماج وله دور في التئام او معالجة الطبقات الطلائية و المخاطية ويساهم في الامراض والاخماج التي يتعرض لها الجلد والتئام الجروح (Palmer *et al.,*2009).زيادة تركيز IL-33 مؤشر مهم لمرض الفشل الكلوي المزمن وقد يؤدي الى تليف الكلية المقترن مع مرض الذئبة الاحمراري بالإضافة الى ذلك ان ارتفاع تركيز IL-33 مؤشر على مرض الفشل الكلوي الحاد (Yang *et al.,*2016; Bao *et al.,*2012).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1 : المواد Materials

3-1-1 الأجهزة والمعدات Equipment and Instruments

اسم الجهاز	الشركة المصنعة (المنشأ)
أنابيب مضادة للتخثر Anticoagulant tubes (K3-EDTA)	AFNA-Dispo (Jordan)
دورق مخروطي Conical flasks	BBL (USA)
جهاز الفايتك Vitek 2	Biomeriux (France)
جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis	Bioneer (Korea)
جهاز الدورات الحرارية Thermocycler apparatus(PCR)	BioRad (USA)
ثلاجة Refrigerator	Concord (Lebanon)
مازج Vortex mixer	CYAN (China)
فرن كهربائي Electric oven	Eriotti (Italy)
جهاز تقطير Distillater	Fisons(Japan)
موصدة Autoclave	Gallen Kaamp(England)
ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance	
حاضنة Incubator	
جهاز الطرد المركزي High speed cold centrifuge	Hettich/ Germany
جهاز قراءة الاليزا ELISA- reader	Human (Germany)
جهاز غسيل الاليزا ELISA-washer	
طابعة اليزا Printer – micro ELIA	
الناقل الزرعي القياسي Standard wire loop	John Bolten/ England

Lab – line (USA)	Shaker Incubator حاضنة هزازة
MUV(Tiwan)	UV-transilluminater مصدرالاشعة فوق البنفسجية
Memmert (Germany)	Water bath حمام مائي
Olympus (Japan)	Compound light microscope مجهر ضوئي مركب
Superestar(India)	Slides and cover slides شرائح زجاجية وغطاء الشريحة
THERMO (U.K)	Nanodrop جهاز فحص تركيز الحامض النووي

2-1-3 : المواد الكيمياوية Chemical Materials

اسم المادة	الشركة وبلد المنشأ
الفا نافثول α-Naphthol($C_{10}H_8O$)	BDH (England)
حامض البوريك Boric Acid	
حامض الهيدروكلوريك Hydrochloric acid (HCl)	
كاشف كوفاكس Kovacs reagent	
المثيل الأحمر Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)	
هيدروكسيد البوتاسيوم Potassium hydroxide (KOH)	
البلور البنفسجي Crystal violet	
سفرانين Safranine	
ايودين Iodine Gram's	
صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide dye	Bio Basicing (USA)
محلول الترحيل الدارئ TBE buffer	
انزيم تحليل الخلايا Lysozyme	
عدة تشخيص مع الكواشف النشخيصية GP-kit,GN-kit	Biomeriux (USA)
الحامض النووي القياسي DNA ladder (100bp)	Bioneer (Korea)
ماءال PCR PCR water	
صبغة التحميل Loading dye	

Difco (USA)	Peptone	ببتون
Fluka (England)	Glycerol($C_3H_8O_3$)	كليسيرول
Himedia (India)	Ethanol (96%)	كحول الايثانول
Promega (USA)	Agarose gel	هلام الاكروز
SDI (Iraq)	Hydrogen peroxide (H_2O_2) (3%)	بيروكسيد الهيدروجين

3-1-3 :الاوساط الزرعية الجاهزة: Ready prepared media

اسم الوسط الزرعي	الغاية من استخدامه	الشركة المصنعة
وسط أكار الدم الصلب Blood agar	انمائي لتشجيع نمو جميع انواع البكتيريا ولتحديد نوع تحلل الدم للبكتيريا.	Hemidia (India)
وسط أكار الماكونكي الصلب MacConkey agar	تفريقي لعزل البكتيريا السالبة لملون كرام وللتميز بين البكتريا المخمرة وغير المخمرةلسكر اللاكتوز.	Hemidia (India)
وسط المانيتول الملحي الصلب Mannitol salt agar	انتقائي لبكتريا العنقوديات	
وسط الاكار المغذي الصلب Nutrient agar	وسط عام لتنمية العزلات البكتيرية وحفظها	
وسط الاكار المغذي السائل Nutrient broth	وسط ناقل للعزلات البكتيرية .	
وسط ايوسين مثيلين الأزرق EMB Eosin methylene Blue agar	وسط انتقائي لبكتريا *E.coli*	
وسط مولر هنتون Muler-Hinton agar	للفحص الحساسية الدوائية للمضادات الحيوية	
وسط استهلاك السترات Simmon's citrat	للتحري عن قابلية البكتريا على استغلال السترات كمصدر وحيد للكاربون.	
وسط ماء الببتون Pepton water	الكشف عن قدرة البكتيريا على انتاج الاندول .	

وسط نقيع القلب – الدماغ السائل Brain heart infusion broth	وسط ناقل ولتنشيط العزلات البكتيرية	
وسط احمر المثيل Methyl red	انتاج الحامض من تخمر الكلوكوز– وإنتاج الاستيل مثيل كاربينول	Oxoid(England)

4-1-3: المضادات الحيوية Antibiotics

مجموعة المضاد	اسم المضاد الحيوي	الرمز	التركيز مايكروغرام /disc	الشركة المجهزة وبلد المنشأ
مجموعة البيتالاكتام β -Lactam antibiotics	١– بنسلين Penicillin	PEN	10	Bioanalyse (Turkey)
	٢– اموكسيسيلين–كلافولينك اسد Amoxicillin-clavulanic acid	AMC	30	
	٣– سيفاتازديم Ceftazidime	CAZ	30	
	٤– سيفوتاكسيم Cefotaxime	CTX	30	
	٥– سيفترياكسون Ceftriaxone	CRO	30	
	٦– مثسيلين Methicillin	ME	30	
مجموعة الكوينولينات Quinolones	٧– ليفوفلاكسين Levofloxaci	LEF	5	
مجموعة الماكروليدات Macrolides	٨– كليندمايسين Clindamycin	CD	2	
	٩– اريثرومايسين Erythromycin	E	15	
مجموعة الكلايكوببتيات Glycopeptides	١٠– فانكومايسين Vancomycin	VA	30	

مجموعة التتراسايكلينات Tetracyclines	١١- تتراسيكلين Tetracycline	TE	30	
مجموعة السلفوناميدات والترايميثوبريم Sulfonamides and Trimethoprim	١٢- سلفاميثوكسازول ترايمثبريم Sulfamethoxazole/Trimthoprim	SXT	5	

3-1-5 : العُدد Kits

3-1-5-1 : عدة التشخيص الجزيئي : (Molecular Kits)

اسم العدة	مكوناته	الشركة وبلد المنشأ
عدة استخلاص الحامض النووي البكتيري Presto™ Mini DNA Bacteria Kit	GT Buffer 30 ml	Geneaid (USA)
	GB Buffer 40 ml	
	W1 Buffer 45 ml	
	Wash Buffer 100	
	Elution Buffer 30 ml	
	GD Colum 100pcs	
	2ml collection tubes 100 pcs	
	Proteinase K	
عدة مزيج تفاعل الـ PCR AccuPower® PCR PreMix	Top DNA polymerase 1U	Bioneer (Korea)
	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) each: 250µM	
	Tris-HCl (pH 9.0) 10Mm	
	KCl 30Mm	
	MgCl2 1.5Mm	
	Stabilizer and tracking dye	

3-1-5-2 : عدة التشخيص المناعي : (Immunological Kits)

العُدد المستخدمة في الدراسة المجهزة من قبل شركة Elabscience(Ltd)

ت	العدد Kits

1	ELISA IL-17 kit عدة قياس مستوى
2	ELISA IL-27 kit عدة قياس مستوى
3	ELISA IL-27 kit عدة قياس مستوى

6-1-3 : البادئات : (Primers)

تم استخدام بادئات خاصة بتحديد جينات المضادات الحيوية في بكتريا *Staphylococcus lentus* والتي صممت في هذا الدراسة باستخدام موقع NCBI-Genbank وبرنامج تصميم البادئات Primer3 plus وتم تجهيز هذا البادئات عن طريق شركة Bioneer الكورية.

اسم البادئ	تسلسل القواعد النايتروجينية		حجم ناتج التضخيم	المصدر
ermA	F	ACCCAAAGCTCGTTGCAGAT	220bp	(Sutcliffe *et al.*,1996)
	R	AGCGGTAAACCCCTCTGAGA		
ermB	F	TTTTGAAAGCCGTGCGTCTG	314bp	(Sutcliffe *et al.*,1996)
	R	TGGCGTGTTTCATTGCTTGA		
ermC	F	TTGGCTCAGGAAAAGGGCAT	410bp	(Leclercq *et al.*,1989)
	R	AAGCGAGCTATTCACTTTAGGT		

Blaz	**F**	**ACACCTGCTGCTTTCGGTAA**	**641bp**	**(Martine *et al*.,2000)**
	R	**TCAGCTCTGTTGTCACTTTGC**		

الجدول (3-1) : بادئات جينات المقاومة .

ermA: GenBank: AF466413.1
ermB: GenBank: JF909978.1
ermC: GenBank: JF968537.1
blaz: GenBank: U58139.
F: Forward primer (البادئ الامامي)
R: Reverse primer (البادئ العكسي)

3-2 : طرائق العمل : (Methods)

3-2-1 : تحضير المحاليل والدوارئ: (Preparation of Buffers and Solutions)

3-2-1-1 : المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline Solution

حضر المحلول بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في كمية قليلة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل وعقم بالموصدة وحفظ في الثلاجة **(McFadden , 2000)** .

3-2-1-2: أنبوبة ماكفرلاند القياسية (0.5)No. McFarland Tube Standard

حُضّرت من المحاليل الآتية وحسب ما جاء في **NCCLS (2003):**

آ- محلول كلوريد الباريوم $BaCl_2.2H_2O$

حُضّر المحلول بإذابة 1.175غم من كلوريد الباريوم في 50 مل من الماء المقطر المعقم وأُكمل الحجم إلى 100 مل .

ب- حامض الكبريتيك H_2SO_4

حُضّر المحلول بإضافة 18 مل من حامض الكبريتيك المركز ببطء إلى 50 مل من الماء المقطرالمعقم، وأكمل الحجم إلى 100 مل للحصول على تركيز 0.18 مل من H_2SO_4.

أضيف0.5 مل من محلول (آ) إلى 99.5 مل من محلول (ب) في انبوبة نظيفة وجافة وذات غطاء محكم لمنع التبخر وقد استخدم هذا المحلول للمقارنة في إعطاء عدد تقريبي للخلايا البكتيرية مقداره 1.5 × 10^8خلية/مل وحفظ بالظلام .

3-1-2-3 : الكواشف Reagents

حضرت محاليل الكواشف التالية وفق ما جاء في **McFadden (2000)** .

4-1-2-3 : كاشف الكتاليز Catalase reagent

استعملت مادة بيرو كسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3% للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الكتاليز وحفظ في قنينة معقمة .

5-1-2-3 : كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent

حضر الكاشف آنيا بإذابة 0.1 غم من رباعي المثيل– بارا فيلين ثنائي أمين ثنائي كلوريد الهيدروجين في 10 مل من الماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة استخدم الكاشف في اختبار الاوكسيديز للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الاوكسيديز.

6-1-2-3 : كاشف كوفاكس (Kova'cs reagent)

حضر هذا الكاشف بإذابة 5 غم P-dimethyl amino benzyl aldehyde في75مل من الكحول الاميلي Amyl-alcohl ثم أضيف 25 مل من حامض كلوريد الهيدروجين المركز ومزجت المحتويات جيدا وحفظ في قنينة معتمة ووضع في الثلاجة ، استخدم للكشف عن قابلية البكتريا على إنتاج الاندول في وسط ماء الببتون الملقح بالبكتريا .

7-1-2-3 : كاشف احمر المثيل (Methyl red reagent)

حضر الكاشف بإذابة 0.1 غم من صبغة المثيل في 300 مل من 95% الكحول الاثيلي وأكمل الحجم إلى500 مل من الماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة في الثلاجة استعمل الكاشف للكشف عن التحلل الكامل للسكريات(الكلوكوز).

8-1-2-3: كاشف فوكس – بروسكاور (Voges - proskauer reagent)

كاشف (A) : حضر بإذابة 5 غم من α – naphthol في كمية قليلة من الكحول الاثيلي المطلق ثم أكمل الحجم إلى 100 مل من الكحول في دورق .

كاشف (B) : حضر بإذابة 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة ووضع في الثلاجة ، استخدم هذا الكاشف للكشف عن إنتاج مركب الاستيل مثيل كاربينول من تحلل السكريات الجزيئي .

2-2-3 : جمع العينات : (Specimens collection)

1-2-2-3 : المرضى (patients)

جمعت 600 عينة بيئية ومرضية من المرضى المصابين بالفشل الكلوي المراجعين الى مركز الغسيل الكلوي لمدينة الصدر الطبية في النجف الأشرف للفترة من حزيران/2014 ولغاية كانون الاول/ 2015 ، وقد قُسمت العينات بحسب مصادر جمعها إلى 400 عينة سريرية من 100مريض بواقع 100 عينة لكل من الإدرار والدم والناسور الشرياني fistula ومنطقة الجلد المحيطة بدخول الناسور الشرياني ، و200 عينة من بيئة المستشفى 100 عينة لكل من أجهزة الديلزة والأسرة . تراوحت اعمار المرضى بين (20–80) سنة ومن كلا الجنسين .

2-2-2-3 : السيطرة : Controls

شملت مجموعة السيطرة 54 فرد من الأصحاء كقرينة ضبط من الرجال والنساء حيث قسم تسعة إفراد لكل فئة عمرية وبحسب الأعمار.

3-2-3 : جمع عينات الدم :

1-3-2-3 : جمع وزرع عينات الدم من المرضى

سحب 5 مل دم من الوريد العضدي للمرضى بواسطة محاقن طبية نبيذه ، ثم وزع الى ثلاث اقسام، وضع 1مل في أنابيب اختبار حاوية على مادة EDTA تستخدم لمرة واحدة وحفظت في الثلاجة لاجراء العد الكلي والتفريقي لكريات الدم البيضاء ، وضع القسم الثاني في أنابيب بلاستيكية معقمة نقلت العينات إلى المختبر وتركت الأنابيب ليتخثر الدم ووضعت في جهاز الطرد المركزي ونبذت لمدة 10 دقائق بسرعة 3000 دورة/دقيقة وسحب المصل بواسطة ماصة باستور معقمة ووضعت في أنابيب حفظ العينات وحفظت في المجمدة ،اما القسم الثالث فقد تم زرع 2 مل من الدم مباشرة في قناني تحوي على 18 مل من الوسط المغذي السائل وحضنت عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة،بعدها لقحت الأوساط الزرعية Blood agar و

MacConkey agar وMannitol salt agar من قناني زرع الدم بواسطة الناقل وبطريقة التخطيط وحضنت الإطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، ففي حالة وجود نمو بكتيري في الإطباق الزرعية يتم إجراء كافة الاختبارات التشخيصية اللازمة **(McFadden , 2000)**.

2-3-2-3 : جمع عينات الدم من الأصحاء.

سحب الدم من الأصحاء من الوريد العضدي بواسطة محاقن طبية نبيذه واحدة ,ووضعت في أنابيب بلاستيكية معقمة نقلت العينات إلى المختبر وتركت الأنابيب ليتخثر الدم ووضعت في جهاز الطرد المركزي ونبذت لمدة 10 دقائق بسرعة 3000 دورة/دقيقة وسحب المصل بواسطة ماصة باستور معقمة ووضعت في أنابيب حفظ العينات وحفظت في المجمدة .

3-3-2-3: زرع عينات الإدرار (Urine samples culture)

جمعت عينات الادرار في قناني زجاجية معقمة وتم اعتماد عينة الإدرار الوسطي mid -stream urine اختيرت هذه العينات من نفس المرضى الراقدين في وحدة الغسيل الكلوي والذين سحبت منهم عينات الدم زرعت هذه العينات على أوساطMacConkey agar وMannitol salt agar وBlood agar وحضنت الإطباق بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة .

3-2-3 : تشخيص البكتريا المعزولة Identification of Isolated Bacteria

1-3-2-3 : الخصائص المزرعية Cultural characteristics

تم دراسة إشكال المستعمرات النامية وخصائصها المزرعية من حيث شكل وحجم المستعمرات ولونها وقوامها والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفريقية وفقا لما جاء به **McFadden (2000)** وتشمل ما يأتي :

1-1-3-2-3: اختبار تحلل الدم Blood hemolysis test

خطط المزروع البكتيري على وسط اغارالدم وحضنت الإطباق لمدة 24 ساعة.ان ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات تدل على تحلل الدم نوع إلفا او بيتا.

2-1-3-2-3 : النمو على وسط المانيتول الملحي الصلب.

لقح وسط Mannitol salt agar بالمزروع البكتيري وحضنت الإطباق بدرجة حرارة 37م° لمدة 48- 24 ساعة.ظهور المستعمرات ذات اللون الذهبي والمحاطة بهالة صفراء يدل على قدرة بكتريا على تخمر سكر المانيتول والنمو بتركيز ملحي عال .

3-1-3-2-3 : النمو على الوسط EMB

لقح الوسط بالمزروع البكتيري ، وحضنت الإطباق على درجة حرارة37 م° لمدة 24 – 48 ساعة إن ظهور المستعمرات ذات اللون الأخضر واللمعة المعدنية metallic sheen يدل على قدرة بكتريا ***Ecoli*** على النمو في وسط EMB.

2-3-2-3 : الخصائص المظهرية للخلايا Morphological characteristics

تم دراسة الخصائص المظهرية للخلايا من خلال تصبيغ الخلايا بملون غرام للعزلات البكتيرية اعتمادا على الصفات الشكلية تحت المجهر **(Prescott .,2005)**

3-3-2-3 : الاختبارات الكيمو حيوية Biochemical test وهي تشمل ما يأتي:

اجريت الاختبارات الكيموحيوية وفقاً لما جاء في **Macfaddin (2000)** .

1-3-3-2-3 : اختبار الكتاليز Catalase test

تم نقل جزء من مستعمرة فتية بعمر24 ساعة بواسطة ناقل خشبي إلى شريحة زجاجية نظيفة وتم إضافة قطرة من محلول بيرو كسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز3 % كانت النتيجة موجبة بظهور فقاعات من غاز الأوكسجين .

2-3-3-2-3: اختبار الاوكسيديز (Oxidase test)

نقل جزء من مستعمرة فتية بعمر24 ساعة بواسطة ناقل خشبي معقم إلى ورقة ترشيح مشبعة بكاشف الاوكسيديز. تكون اللون البنفسجي خلال 10 ثوان دليلاً على ايجابية الاختبار.

3-3-3-2-3 : اختبار إنتاج الاندول (Indol production test)

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط ماء الببتون باستعمال الناقل وحضن المزروع بدرجة حرارة37 م°لمدة 18-24 ساعة. ثم أضيفت بضع قطرات من كاشفKovacs reagent إلى كل أنبوبة ثم رجت الأنابيب جيدا ظهور حلقة حمراء أعلى الوسط دلالة على النتيجة الموجبة .

4-3-3-2-3: اختبار احمر المثيل (Methyl red test)

لقح وسط MR-VP بالبكتريا وحضنت بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة بعد ذلك تم قراءة النتيجة من خلال إضافة 5 قطرات من دليل احمر المثيل مع الرج والقراءة تكون مباشرة ، اكتساب اللون الأحمر يدل على التحلل الكامل للسكر وإنتاج الحامض إما إذا تغير إلى اللون الأصفر دلالة على إن pH الوسط أكثر من 6 وهذا يعني إن نتيجة الفحص سالبة .

5-3-3-2-3: اختبار استهلاك السترات (Citrate utilization test)

خطط وسط السترات المائل بالبكتريا المراد اختبارها ,ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة, فالنتيجة الموجبة تغير لون الوسط الزرعي من اللون الأخضر إلى اللون الأزرق وهو دليل على استهلاك السترات .

6-3-3-2-3: اختبار الفوكس– بروسكاور (Voges - Proskauer test)

لقح وسط (MR-VP) باستعمال حلقة الناقل بالبكتريا المراد اختبارها وحضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 - 48 ساعة . ثم إضافة 0.6 مل من كاشف الفانفثول و 0.2 مل من كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم، ان تغير لون الوسط إلى الأحمر بعد مرو 15 دقيقة دلالة على التحلل الجزئي للسكر وإنتاج مركب الاستيل مثيل كاربينول .

4-3-2-3 : التشخيص بنظام الفايتك (Vitek compact2 system diagnosis)

استخدمت عدة التشخيص Vitek 2 والمنتج من شركة Biomeriux في تشخيص العزلات البكتيرية المختلفة .ويحتوي الشريط الواحد على 64 حفرة صغيرة تمثل كل منها فحصاً كيمياوياً تشخيصياً وفقاً لما جاء به Fritsche وجماعته (2011)، وتضمنت الخطوات التالية.

1- زُرعت العزلات البكتيرية على وسطي أگار الدم والماكونكي وحُضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.

2- حضر العالق البكتيري بتلقيح 3 مل من المحلول الفسلجي الملحي بتركيز 0.85% بمستعمرة مفردة لعزلة نقية بعمر18-24 ساعة في انبوبة اختبار ، ورج جيداً بواسطة المازج الدوار للحصول على عالق بكتيري متجانس .

3- تمت قراءة الكثافة البكتيرية بواسطة جهاز VitekdensiChek حيث ان العالق البكتيري له قراءة محددة تتراوح بين (0.5 - 0,65) .

4- وُضِع الـ Card cassette الخاص بتشخيص الأنواع البكتيرية في كل أنبوبة من أنابيب الإختبار الحاوية على العالق البكتيري المُخفف ثم فتح الجهاز وادخلت المعلومات الخاصة بالنموذج المستخدم ومن ثَمَ

وُضِعت الأنابيب في جهاز الفايتك الذي يقوم بقراءة النتائج تلقائياً بين 5-9 ساعة وتحديد نوع البكتريا الموجودة في العالق ثم سحبت النتائج .

3-3 : حفظ وإدامة العزلات البكتيرية

Preservation and Maintenance of Bacterial Isolates

1-3-3 : الحفظ قصير الأمد

تم تلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتريا المراد حفظها وحُضنت في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، ثم حفظت بدرجة 4مْ، وكررت عملية الحفظ لتجديد حيوية العزلات، وتجنب حدوث التلوث كل شهرين **(Collee *et al*., 1996)**.

2-3-3 : الحفظ طويل الأمد

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي السائل بالبكتريا قيد الدراسة ثم اضيف الكليسيرول بتركيز (15%) ، وحُفظت بدرجة – 20 مْ .**(Collee *et al*., 1996)**

4-3: إختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية(Antibiotic Susceptibility Testing)

استعملت طريقة الانتشار بالاقراص Diskdiffusion methodes لأختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية (Kirby *et al*.,1966) حيث زرعت أنابيب أختبار حاوية على وسط مرق المغذي وحضنت عند درجة 37 م لمدة 8-2 ساعات او لحين ظهور العكورة . من ثم اجراء مقارنة بين الانابيب الحاوية على المزروع البكتيري وانبوبة ماكفرلاند القياسية0.5 حيث استخدم محلول ملحي لتعديل كثافة انابيب المزروع البكتيري حتى تساوي كثافة انبوبة ماكفرلاند . نشرت خلايا العالق البكتيري على وسط مولر هنتون باستعمال ماسحة قطنية بشكل متجانس وتركت الاطباق لبضعة دقائق لتجف بعدها تم تثبيت اقراص المضادات على سطح الطبق باستخدام ملقط معقم بواقع خمسة اقراص للطبق الواحد . ثم حضنت الاطباق عند درجة 37 م لمدة 18 ساعة .قرئت النتائج بقياس اقطار مناطق التثبيط بالمليمتر ومقارنتها مع الاقطار القياسية للمضادات المحددة (CLSI,2014) .

3-5: تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)

أجري فحص تفاعل البلمرة المتسلسل للتحري عن بعض جينات المقاومة الحيوية *ermA* و*ermC* و *ermB* و*blaZ* في بكتريا *Staphylococcus lentus* حسب طريقة **(Simeoni *et al*., 2008)** اذ تكون الفحص من الخطوات التالية .

3-5-1:استخلاص الحامض النووي البكتيري Bacterial genomic DNA extractionتم استخلاص الحامض النووي من عزلات بكتريا الـ *S. lentus* والتي عددها 48 عزلة وذلك باستخدام عدة الـ Genomic DNA extraction kit المجهزة من شركة Geneaid الأمريكية، وتم أجراء الاستخلاص حسب تعليمات الشركة كآلاتي:

1- نقل1مل من العالق البكتيري لكل عزلة من بكتريا *S. lentus* النامية على وسط مرق نقيع القلب والدماغ ووضعت في انابيب ابندروف معقمة قياس(1.5) مل معقمة ونقلت الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 دورة/دقيقة لجمع الخلايا البكتيرية ثم التخلص من السائل الطافي.

2- اضيف 200 مايكروليتر من محلول انزيم الايسوزايم Lysozyme buffer (20mg/ml) وبعدها مزجت الخليط بواسطة المازج vortex لمدة 5 ثواني.

3- حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقيقة وخلال فترة الحضن قلبت الانابيب لضمان تحليل كامل للخلايا في المزيج.

4- اضيف 200 مايكروليترمن محلول GB Buffer المجهز من العدة الى مزيج الخلايا المتحللة ومزج جيدا بواسطة المازج vortex لمدة 5 ثواني.

5- حضن المزيج بدرجة حرارة 60 م° لمدة 10 دقيقة باستخدام الحمام المائي.

6- اضيف 200 مايكروليتر من الكحول الاثيلي المطلق الى المزيج المتحلل ومزج الخليط جيدا بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثواني.

8- نقل الخليط من انبوبة الابندروف الى انابيب جمع collection tubes قياس 2 مل الحاوية على اعمدة تحوي مصفى لتنقية الحامض النووي GD filter colum والمجهزة مع العدة.

9- وضعت انابيب الجمع مع الاعمدة الحاوية على الخليط في جهاز الطرد المركزي ودورت بسرعة 15000 xg لمدة دقيقة للتخلص من نواتج الخلايا المتحللة.

10- نقل الـ GD Colum الحاوي على الحامض النووي الى انبوبة جمع Collection tube جديدة ازالة راسب الخلايا المتحللة.

11- اضيف 400 ميكروليتر من محلول الـ W1 Buffer المجهز مع العدة الى العمود الحاوي على الحامض النووي لغسل الحامض النووي ووضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 xg لمدة 30 ثانية.

12- اضيف 600 مايكروليتر من محلول الغسل الحاوي على الكحول الاثيلي المطلق Wash buffer المجهز مع العدة الى العمود الحاوي على الحامض النووي لتخلص من الدهون داخل العمود بعد ازالة الراسب ووضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 xg لمدة 30 ثانية.

13- ازالة الراسب وأعادة الانابيب الى جهاز الطرد المركزي مرة ثانية لتجفيف الأعمدة بسرعة 15000 xg لمدة 3 دقائق.

14- نقل الاعمدة الحاوية على الحامض النووي الى انابيب ابندروف معقمة واضيف 50 مايكروليتر من محلول الاذابة Elution Buffer المجهز مع العدة الى وسط العمود وترك لمدة 5 دقائق ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 xg لمدة 30 ثانية لإذابة الحامض النووي وحفظه بدرجة حراره – 20م لحين اجراء فحص الـ PCR.

2-5-3 : فحص تركيز نقاوة الحامض النووي المستخلص DNA examination

تم حساب تركيز نقاوة الحامض النووي DNA المستخلص وذلك باستخدام جهاز Nanodrop (spectrophotometer) الخاص بالكشف وقياس تركيز الاحماض النووية حيث تم الكشف عنه من خلال تحديد تركيزه DNA (ng\µl) وقياس نقاوته من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين 260/280nm وتم استخدام الجهاز على النحو التالي :

1- تشغيل جهاز(Nanodrop) واختيار برنامج قياس الحامض النووي نوع DNA .

2- تصفير ركيزة المقياس مرتين بوضع 2 مايكروليتر منddH_2O باستخدام ماصة معقمة على سطح ركيزة المقياس واجراء التصفير وتنظف الركيزة باستخدام ورق نشاف خاص .

3- نقل1 مايكروليتر من كل عينة من الـ DNA المستخلص الى ركيزة مقياس الجهاز وضغط زر ok لبدء عملية قياس تركيز الـ DNA وننظف الجهاز لقياس عينة أخرى.

4- تحديد نقاوة عينات الـ DNA المستخلص بقراءة امتصاصية جهاز (Nanodrop Spectrophotometer) على طولين موجيين 260/280 nm حيث ان DNA المستخلص يعتبر نقي عند امتصاصية 1.8.

3-5-3 : تحضير مزيج تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR master mix

حضر مزيج تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل باستخدام عدة الـ (AccuPower® PCR PreMix) المجهزه من قبل شركة الـ (Bioneer) الكورية وحسب تعليمات الشركة كألاتي:

1- حضر مزيج تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل في انابيب الـ PCR المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات التفاعل وتم اضافة المكونات الاخرى لمزيج التفاعل (جدول3-8) .

جدول (3-2) تحضير مزيج تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل .

PCR master mix		Volume
DNA template		5µL
Primers (10pmol)	F. primer	1.5µL
	R. primer	1.5µL
PCR water		12µL
Total		**20µL**

2 –غلقت الانابيب الحاوية على مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل ومزجت بعناية بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثواني.

3- نقلت الانابيب الى جهاز ادورات الحراري لأجراء عملية تضخيم الـ DNA وفق الظروف المثلى الدورات الحرارية PCR thermocycler conditions والمتمثلة بعمليات فصل شريط الـDNA وارتباط البادئات مع الشريط المنفصل وتطويل سلسلة الـ DNA .

4-5-3:برنامج الدورات الحرارية لفحص الـ DNA

اجري تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل باستخدام جهاز الـ PCR thermocycler وفق نموذج Perkin Elmer model.(Collee *et al*., 1996;Rychlik, 1990). (جدول 3-9) .

جدول (3-3) ظروف التضخيم .

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95C	5min
Denaturation	30	95C	30sec.
Annealing		58	30sec
Extension		72C	1min
Final extension	1	72C	5min
Hold	**-**	**4C**	**Forever**

5-5-3 : الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis

أُجريَ الترحيل الكهربائي لهلام الأگاروز المُحضَّر بنسبة 1.5% تحت فرق جهد 100فولت وتيار 80 أمبير وزمن ساعة واحدة لغرض الكشف عن حزم Bands ألـ DNA المُستخلص والـ DNA المُضخم والذي يُمثل نواتج التضخيم Amplified size أو نواتج ألـ PCR وحسب طريقة Sambrouk وRussell (2001)، كالآتي:

1- اذيب 1.5غم من هلام الاكاروز في100 مل من محلول الـ TBE bufferبتركيز1X باستخدام الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة 15دقيقة .

2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50 مْ ثم إضافة 3 مايكروليتر من صبغة الحامض النووي المشعة Ethidium bromide ومزجت جيدا مع الهلام.

3- صب هلام الاكاروز في قالب الترحيل الحاوي على المشط لتحديد اماكن عينات الـ PCR وترك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة بعدها ازيل المشط من الهلام.

4- تحميل العينات باستخدام صبغة التحميل Loading dye على ورق البارافلم باضافة 1 حجم من صبغة التحميل لكل اربعة حجوم من ناتج PCR product ووضعت في حفر الهلام.

5- إستُخدمَ سُلم القياس DNA ladder بحجم (100 – 1000) زوج قاعدي في الحُفرة الأولى لقياس ناتج أو حجم ألـ DNA المُضخَّم؛ وذلك بمقارنة حجم الجين المُضخم مع الحجوم أو الأوزان الجزيئيَّة لسُلَّم القياس (Marker).

6- وُضِعَ 8 مايكروليتر من نواتج التضخيم بعد إكتمال عملية التحميل في حفر الهلام غمر هلام الاكاروز باستخدام محلولTBE Buffer الدارئ بتركيز1X وغلق غطاء الترحيل ثم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام فرق جهد 100 فولت وتيار80 امبير لمدة ساعة.

7- فحص الهلام الحاوي على ناتج الـ PCR باستخدام مصدر الاشعة فوق البنفسجية U.V لتحديد الحزم وقياس أوزانها الجزيئيَّة عند مقارنتها بالقيم القياسية لـ DNA القياسي .

6-3 : الفحوصات المناعية Immunological Tests

1-6-3:عدة الاختبار المناعي المرتبط بالأنزيم ELISA kit

تحتوي عدة الاختبار المناعي المجهزة من شركة Elabscience(Ltd) على المواد الآتية:

1- طبق المعايرة الدقيقة Micro ELISA Plate: مُقسم إلى 12 شريط كل شريط يحتوي على 8 حفر مطلية بالأجسام المضادة .

2- المحلول القياسي Reference Standard : عبوتين تحتوي على 1000 بيكوغرام / مل .

3- محلول تخفيف المحلول القياس والعينات Reference Standard and Sample Diluent : عبوة واحدة تحتوي على 20 مل.

4- محلول الاضداد المعلمة بالبايوتين المركزConcentrated Biotinylated Detection : عبوة واحدة تحتوي 120 مايكروليتر .

5- محلول تخفيف محلول الاضداد المعلمة بالبايوتين Biotinylated Detection Ab Diluent : عبوة واحدة تحتوي 10 مل

6- محلول المُقتَرن المركز Concentrated HRP Conjugate:عبوة واحدة تحتوي 120 مايكروليتر.

7- محلول تخفيف المحلول المقترنHRP Conjugate Diluent: عبوة واحدة تحتوي 10مل.

8- محلول الغسل المركز (25×) Concentrated Wash Buffer: عبوة واحدة تحتوي 30 مل تخفف بنسبة 1:25 قبل الاستعمال.

9- محلول المادة الأساس Substrate Reagent: عبوة واحدة تحتوي 10 مل .

10– محلول وقف التفاعل Stop Solution : عبوة واحدة تحتوي 10 مل .

11- شريط لاصق Adhesive sheet : خمسة أشرطة لاصقة.

استعملت العدة للتحديد الكمي للأنترلوكينات(IL-17 وIL-27 وIL-33) في المصل و والبلازما والسوائل الحيوية الأخرى .

2-6-3 : التحديد الكمي لمستوى الحركيات الخلوية IL-33 وIL-27 وIL-17 في المصل
Quantitative Determination of IL-33, IL-27 and IL-17 in Serum

A – مبدأ الفحص Principle of Assay

اعتمد الاختبار على طريقة Sandwich-ELISA لإجراء الفحص حيث ثبت على سطح طبق المعايرة الدقيقة أجسام مضادة متخصصة بـ IL-33 وIL-27 وIL-17 والتي ترتبط بصورة خاصة مع المحاليل القياسية أو مع المصل أو البلازما الحاوي علىIL-33 وIL-27 وIL-17 عند إضافتها الى حفر الصفيحة الدقيقة . ثم يضاف بعدها الـ biotinylated Ab المتخصصة بـ وIL-27 وIL-17وIL-33 لكل حفرة من حفرات الصفيحة الدقيقة ثم أضيف الانزيم Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) وحضنت بعدها غسلت الصفيحة الدقيقة لإزالة اي إجزاء أو مكونات غير مرتبطة وإضافة محلول المادة الأساس لكل حفرة وبعد فترة الحضانة لوحظ ان الحفر الحاوية على الأجزاء المرتبطة والمتمثلة بـ IL-33 -IL 27 وIL-17 وbiotinylated و(HRP) تظهر باللون الازرق وتتناسب شدة اللون مع تركيز الانترلوكين المرتبط . وبعد ايقاف التفاعل الانزيمي بإضافة محلول حامض الكبريتيك يتحول اللون الى الأصفر. عندها ستقرئ الامتصاصية بجهاز الإيلايزا الخاص عند الطول الموجي 450 نانومتر لتحديد تركيز كل من و-IL 27 و IL-33 و IL-17 الموجود بالعينة بمقارنة قيمة الامتصاصية مع المنحني القياسي.

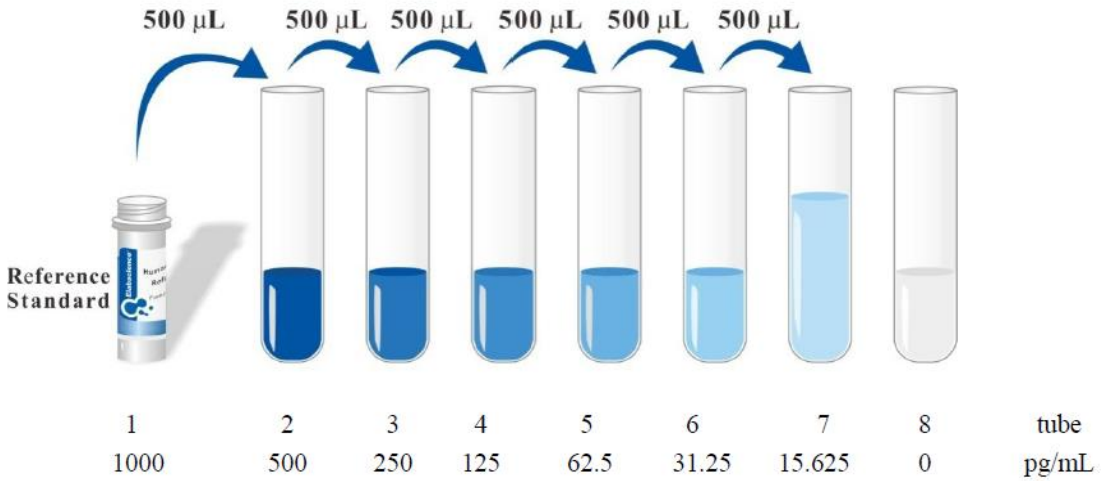
ب– تحضير الكواشف

1- وضع طبق المعايرة الدقيقة والكواشف لتأخذ درجة حرارة الغرفة 18-25م° قبل الاستعمال

2- خفف محلول الغسل بإضافة 750مل من الماء المقطر الى30 مل من محلول الغسل المركز.

3- حضرت سلسلة تخافيف لمحاليل IL-33 وIL-27 القياسي. تم اجراء الطرد المركزي للعبوة الحاوية على المحلول القياسي Reference Standard واضيف له 100مل من محلول تخفيف المحلول القياسي Reference Standard and Sample Diluent وترك لمدة 10 دقائق وبعدها قلبت رأسا على عقب عدة مرات ومزجت المحتويات جيدا بالماصة الى أن تذوب تماما . مثل هذا المحلول القياسي stock solution بتركيز1000 بيكوغرام / مل لكل من IL-33 وIL-27 والذي عملت منه التراكيز المطلوبة التالية :

(1000,500,250,125,62.5,31.25,15.625,0) بيكوغرام / مل. وذلك بنقل 500 مايكروليتر من المحلول القياسي stock الى أنبوبة ابندروف الحاوية على0.5 مل من محلول تخفيف المحلول القياسي وبذلك نحصل على التركيز 500 بيكوغرام / مل وهكذا بالنسبة لبقية التخافيف. المحلول القياسي الـ stock يمثل التركيز الاعلى ونترك انبوبة تحتوي على0.5 مل من محلول Reference Standard and Sample Diluent والذي يمثل التركيز الادنى 0 بيكوغرام / مل (الشكل3–1). كما حضرت سلسلة تخافيف لمحلول17-IL القياسي وتم اجراء الطرد المركزي للعبوة الحاوية على المحلول القياسي Reference Standard واضيف له 100 مل من محلول تخفيف المحلول القياسي Reference Standard and Sample Diluent وترك لمدة 10 دقائق بعدها قلبت الانبوبة رأسا على عقب عدة مرات ومزجت المحتويات جيدا بالماصة حتى تذوب تماما. تمثل المحلول القياسي stock solution بتركيز 2000 بيكوغرام / مل . عملت منه سلسلة التخافيف المطلوبة على النحو التالي : (2000,1000,500,250,125,62.5,31.25,0) بيكوغرام / مل تنقل 500 مايكروليتر من المحلول القياسي stock الى أنبوبة ابندروف الحاوية على 0.5 مل من محلول تخفيف المحلول القياسي وبذلك نحصل على التركيز1000 بيكوغرام / مل وهكذا بالنسبة لبقية التخافيف .حيث ان المحلول القياسي بتركيز 2000 بيكوغرام / مل يمثل التركيز الاعلى ونترك انبوبة تحتوي على0.5 مل من محلول والذي يمثل التركيز الادنى 0 بيكوغرام / مل . كما مبين في (الشكل3–2).



الشكل(3-1) سلسلة تخافيف الحركي الخلوي نوع 33

4- Biotinylated Detection Ab : حضر بنسبة 1:100 من محلول التخفيف ومحلول الاضداد المعلمة بالبايوتين Biotinylated Detection Ab Diluent .

5- Concentrated HRP Conjugate : حضر بنسبة 1:100 من محلول التخفيف محلول تخفيف المحلول المقترن HRP Conjugate Diluent

6- كاشف المادة الاساس Substrate Reagent : يستخدم مباشرة.

جـ - طريقة العمل:

1- تم اضافة 100 مايكروليتر من المحلول القياسي المحضر سابقا وعينات السيطرة وعينات المرضى الى كل حفرة في طبق المعايرة الدقيقة ويجب تجنب ملامسة قعر الحفرة بواسطة الماصة ثم غطت بورق اللاصق وتحضن لمدة 90 دقيقة في 37 مº.

2- ازيل السائل من طبق المعايرة الدقيقة واضيف 100 مايكروليتر من كاشف الـ Biotinylated Detection Ab الى كل حفرة باستخدام الماصة المتعددة وتغطى بالورق اللاصق وتحضن لمدة ساعة في 37 مº.

3- فرغت محتويات الحفر وغسلت ثلاث مرات مع محلول الغسل المحضر سابقا بإضافة 350 مايكروليتر باستخدام جهاز الغسل الآلي وأزيلت السوائل من الحفر بعد كل غسلة.

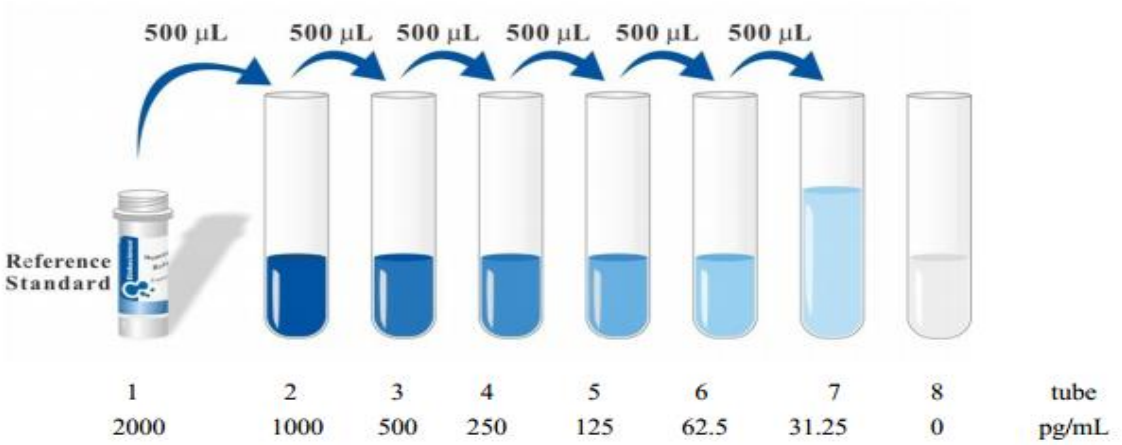
4- اضيف 100 مايكروليتر من محلول HRP Conjugate الى كل حفرة وغطت مع الورق اللاصق وتحضن في 37 مº لمدة 30 دقيقة.

5- غسلت الحفر كما موضح في الخطوة 3 خمس مرات.

6- إضافة 90 مايكروليتر من محلول المادة الاساس Substrate Solution لكل حفرة في الطبق وتغطى مع الورق اللاصق وحضنت لمدة 15 دقيقة في درجة 37 مº .

7- اضافة 50 مايكروليتر من محلول وقف التفاعل Stop Solution الى كل حفرة ولوحظ تغير اللون الى الاصفر مباشرة.

8- قدرت الكثافة الضوئية OD Measurement لكل حفرة مباشرة بعد الخطوة السابقة عند الطول الموجي 450 نانوميتر بواسطة جهاز micro-plate reader وطبعت النتائج.



الشكل(3–2) سلسلة تخافيف الحركي الخلوي نوع 27

3- 7: التحليل الإحصائي Statistical Analysis

تم إجراء التحليل الإحصائي للبيانات وذلك باستخدام برنامج الإكسيل في الكمبيوتر حيث تم استخراج قيمة المعدل والانحراف المعياري وعمل جدول تحليل التباين ANOVA –single factor للنتائج وايجاد قيمة اقل فرق معنوي LSD ومقارنتها مع الفرق بين متوسطين عند مستوى احتمالية 0.05.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4 – النتائج والمناقشة Results and Discussion

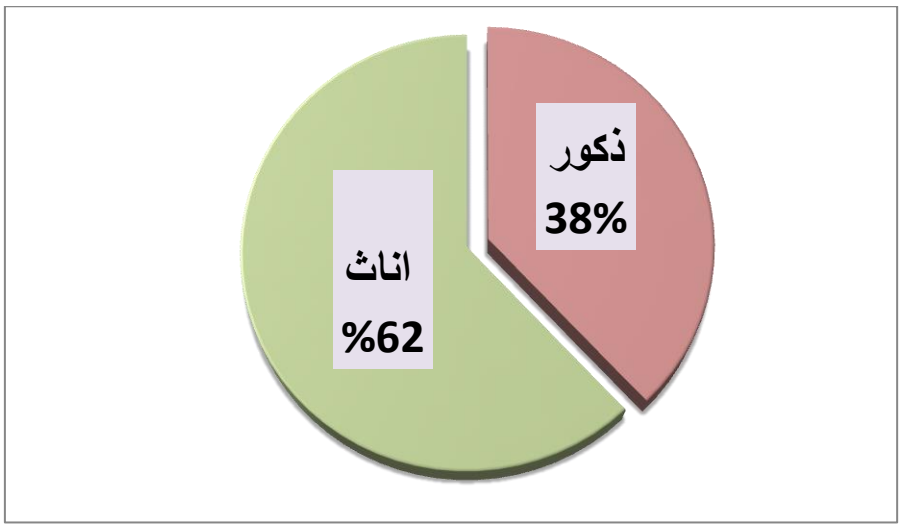
4-1 : تصنيف مرضى الفشل الكلوي المزمن .

تم خلال الدراسة جمع 600 عينة سريرية وبيئية من 100 مريض من المرضى المراجعين لمدينة الصدر الطبية في النجف الأشرف وممن راجعوا مركز الغسيل الكلوي للمستشفى وبأعمار تراوحت من (20–80) سنة ومن كلا الجنسين ، اظهرت النتائج ان الإناث اكثر عرضة للإصابة بالمرض من الذكور حيث

سجلت نسبة (62%) للاناث مقارنة بـ (38%) للذكور (شكل4-1) ، وتوافقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة اجرتها Kadim(2008) حيث وجدت ان نسبة الذكور (47%) والإناث (52 %) يعانون من فشل الكلية والذين يراجعون مستشفى مرجان التخصصي للطب الباطني في بابل .كما توافقت النتائج مع دراسة. Abroug وجماعته (2010) الذين اكدوا ان نسبة اصابة الإناث اعلى من الذكور في عموم اوربا، في حين بينت دراسة اجراها Zaki (2001) ان نسبة الاصابة متساوية بين الجنسين ولاتوجد فروق معنوية في نسب الإصابة ولا في مايؤول اليه المرض من مضاعفات من ناحية اخرى . في حين كانت نتائج هذه الدراسة مخالفة لدراسة محلية اجريت في محافظة بابل من قبل Kareem (2013) والذي بين ان نسبة إصابة الذكور (1.3%) والإناث كانت (1%) وقد فسر نتائجه الى ان الذكور اكثر تدخينا وشربا للكحول من الإناث إضافة الى تأثير هرمون الاستروجين حيث اشارت العديد من الدراسات الى تأثيره على وظائف الكلى في الإنسان (Silbiger and Neugarten ,2008). وفسر سليمان واخرون (2014) ان النساء اكثر عرضه للإصابة بالفشل الكلوي لانخفاض نسبة النشاط البدني مقارنة بالذكور او لاختلاف المجهود العضلي والعادات الغذائية بين الجنسين .كما اكد Horal (2010) ان تأثير الفشل الكلوي يختلف حسب الجنس والعمر والرعاية الطبية للمريض.

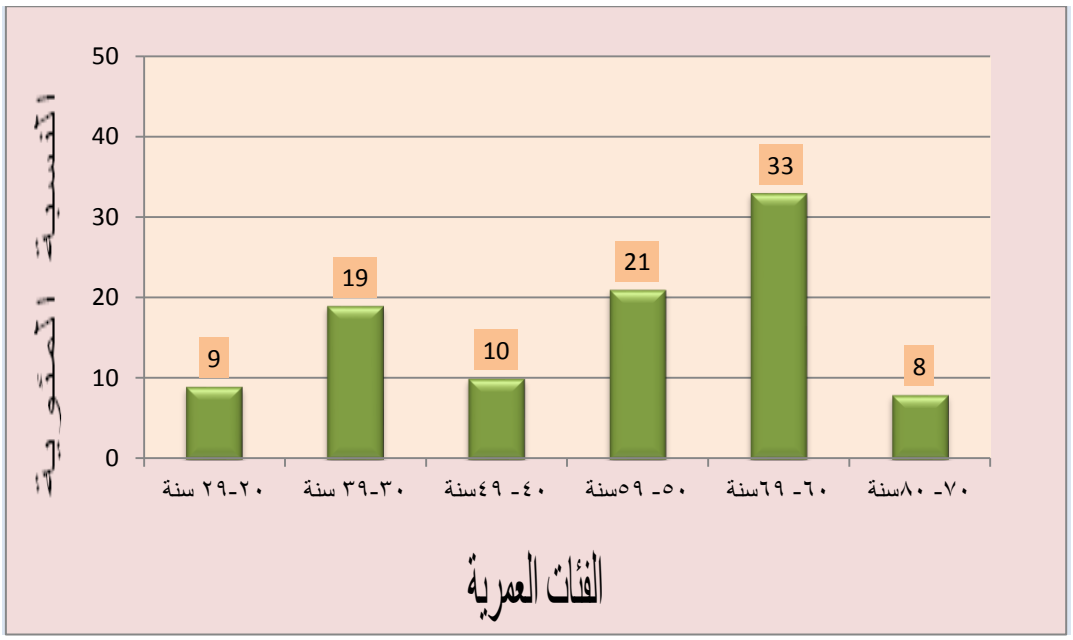
قُسم مرضى الفشل الكلوي في هذه الدراسة حسب الفئات العمرية الى ست مجاميع (الشكل4-2) ، واظهرت النتائج ان الفئة العمرية 60-69 أكثر الفئات العمرية المسجلة ضمن هذه الدراسة في إصابات الفشل الكلوي المزمن التي تظهر استعدادا للإصابة بالمرض ، إذ شكلت ارتفاعًا معنوياً بنسبة إصابة 33%. كانت النتائج متوافقة مع دراسة Kareem (2013) ، والذي لاحظ ان نسب الاصابة بمرض الفشل الكلوي تزداد ما بعد عمر الخمسين . ووجدت Kadm(2008) ان مرض فشل الكلية كان سائدا بدرجة كبيرة بين المرضى للاعمار بين (40-70) في حين بينت Saxena وجماعتها (2001) ازدياد نسب الاصابة بالمرض خلال فترة الاربعينيات من عمر المرضى ، وقد يعزى السبب الى انعدام مستوى النشاط

البدني وعدم ممارسة الرياضة والمشي بالنسبة للجنسين او نمط الحياة (Life Style) المتسم بقلة الحركة (سليمان وجماعته ، 2014). ان عدم ممارسة النشاط البدني المعتدل يومياً لمدة 30 دقيقة يسبب تقدم علامات الشيخوخة وذلك لتعطيل بعض اعضاء الجسم عن وظائفها (CDC, 1998).



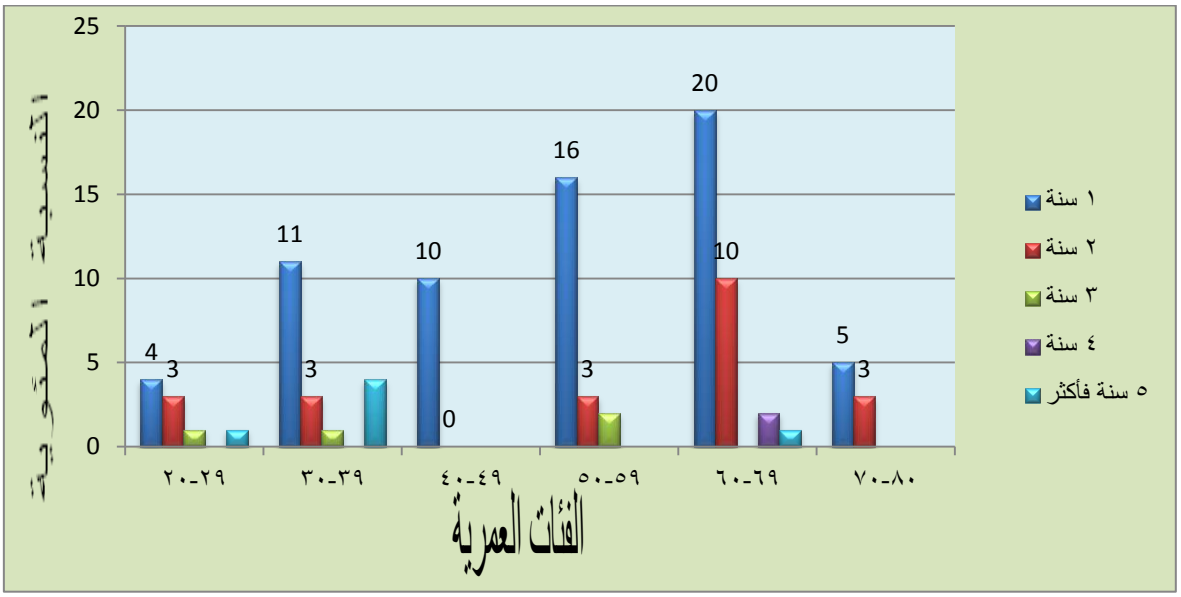
شكل (4– 1) النسبة المئوية لمرضى الفشل الكلوي حسب الجنس .

كانت الفئة العمرية (70-80) اقل نسبة اصابة 8% وقد يعزى السبب الى ارتباطها بأمراض اخرى مثل فشل الكبد والرئتين الناتج عن متلازمة الانحلال الكبيبي داخل الكلية الناجم عن القصور الكلوي المزمن الذي يسبب حدوث حالات الوفاة (Kiziltaz *et al.*,2008)، اشارت العديد من الدراسات ان علامات الإصابة بالمرض لاتكون ظاهرة في بادئ الأمر الا بارتفاع معدل الكرياتنين واليوريا بالوقت الذي تكون وظائف الكلى تبدأ تدريجيا بالانحدار وما يرافقها من تداعيات كارتفاع ضغط الدم وتراكم اليوريا مما يؤدي الى اليوريا الدموية وزيادة حجم السوائل مسببة الـ Edema وفقر الدم نتيجة قلة هرمون الارثروبايوتين وتضاعف الإصابة بالأمراض القلبية الوعائية وداء السكري والسمنة وتخلخل العظام (Porth ,2007; Sarnak *et al.*,2005) او يعزى السبب لارتفاع مستويات هرمون جنيب الدرقية (PTH) الذي يسبب زيادة مستويات الكالسيوم في الدم وهبوط مستويات الفوسفات لـ (70–80)% لمرضى القصور الكلوي من كبار السن (Bilezikian *etal.*,2009). ، كما بينت دراسة محلية قام بها الفحام (2014) ان مجموعة المرضى الذين تجاوزت اعمارهم 50 سنة يزداد لديهم نسب الموت الخلوي المبرمج بين الخلايا كما يزداد تأثر نخاع العظم بالسموم والمواد المثبطة مما تسبب بتدهور النسيج العظمي وبالتالي انخفاض تصنيع كريات الدم الحمراء وفقر دم شديد .



شكل (4-2) النسبة المئوية للإصابة بالفشل الكلوي حسب الفئات العمرية

صنفت الفئات العمرية الستة لمرضى الفشل الكلوي اعتماداً على فترات الغسيل الدموي للمرضى الى خمس مجموعات هي (1 سنة ، 2 سنة ، 3 سنة ، 4 سنة ، 5 سنة فأكثر) فكان مجموع المرضى للسنة الأولى 66 والسنة الثانية 22 والسنة الثالثة 4 والسنة الرابعة 2 والسنة الخامسة 6 (الشكل4-3) .اظهرت النتائج ان فترة السنة الأولى من الغسيل الكلوي اعلي في أعداد المرضى وتبدأ أعداد المرضى بالتناقص كلما تقدمت فترات الغسيل وقد جاءت نتائجنا متفقة مع Johnson وجماعته (2009) الذي توصل الى ان نسبة الوفيات تقل خلال فتره الغسل الكلوي اقل من 6 اشهر وتزداد تدريجيا في الفتره الواقعة بين 2-6 سنة وتزداد بشكل ملحوظ بعد 6 سنوات ، وقد فسر ذلك لكثره الإصابات البكتيرية والفطرية إضافة الى ما يرافق المرض من تدهور في صحة المرضى كإصابتهم بأمراض الأوعية الدموية والقلبية والرئوية وغيرها. كما أشارت دراسة محلية في الموصل اجرتها الليله (2004) ان لعمر المرضى وفترات الغسيل الكلوي تأثير على معدل هرمون جنيب الدرقية مما يشكل خطرا على حياه هؤلاء المرضى، كما بينت ان عمليه الديلزة الدموية لم تظهر كفاءة في السيطرة على مستوى البوتاسيوم والكلورايد والفسفور العضوي وان طول فتره العلاج بالديلزة الدموية أظهرت تأثير واضح على مستوى فعالية الفوسفاتيز القاعدي .كما استنتجت دراسة الفحام (2014) ان للديلزة الدموية دورا مهما في زيادة الحالة الالتهابية ومستوى الحساسية عند مرضى الفشل الكلوي وتزداد هذه الحالات كلما تقدمت فترة العلاج .



شكل (4-3) نسبة الإصابة بالفشل الكلوي حسب الفئات العمرية وفترات الغسيل الكلوي

2-4 : العزل والتشخيص البكتيري .

جمعت 400 عينة سريرية والتي تضمنت 100 عينة دم و100 عينة ادرار و100 مسحة من منطقة الناسور الشرياني و100 مسحة جلدية لمنطقه دخول الجهاز من 100 مريض مصاب بالفشل الكلوي ولكلا الجنسين وباعمار مختلفة بالإضافة الى 200 عينة بيئية تضمنت 100 مسحة لكل من أسرة غسيل المرضى و جهاز الديلزة . اثبتت نتائج الفحص البكتيري ان 208 (41.3 %) من العينات لم تظهر نمو بكتيري (أعطت نتيجة سالبة للنمو) ، اما العينات التي اظهرت نمو بكتيري فشكلت 392 (58.6) %من العينات . كان عدد العزلات البكتيرية النامية على وسط الماكونكي والذي يمثل البكتريا السالبة لملون غرام 134 (34.2%) ، اما البكتريا النامية على وسط Blood agar ووسط المانيتول والذي يمثل وسط البكتريا الموجبة لملون غرام فشكلت 258 (65.8%) (جدول 4-1) تم تشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة اعتماداً على الفحوصات المظهرية والمجهرية والكيموحيوية (الجدول4-2) . زرعت جميع العينات على أوساط MacConkey agar و Mannitole salt agar و Blood agar وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة . تم اعتماد بعض الصفات المظهرية العامة للمستعمرات كتشخيص مبدئي إذ اعتمدت على شكل وهيئة وقوام المستعمرات الموجود في الأوساط الزرعية . ظهرت بعض المستعمرات وردية اللون

جدول (4–1) الانواع البكتيرية المرافقة لمرضى الفشل الكلوي.

المجموع	Blood	Urine	System	Bed	Fistula	Skin	البكتريا
85	4	10	20	18	16	17	***S.aureus***
78	1	4	20	18	15	20	***S.albus***
74	4	5	18	15	17	15	***S.lentus***
12	2	-	1	2	2	5	***S.heamolyticus***
7	-	-	5	-	-	2	***St. pneumonia***
20	-	4	5	3	4	4	***Klebsiella***
27	-	15	3	5	2	2	***E.coli***
21	-	-	4	8	5	4	***Pantoea***
24	-	3	4	5	7	5	***Enterobacter***
3	-	-	3	-	-	-	***P.aurgenosa***
25	-	-	7	8	3	7	***P .stutzeri***
11	-	-	4	2	-	5	***P.flursence***
2	-	-	2	-	-	-	***Proteus***
2	-	-	-	1	1	-	***Kosaria rosea***
1	-	-	-	1	-	-	***Vibrio fluvial***
392	11	41	96	86	72	86	***المجموع***

عدد

العزلات الموجبة لصبغة غرام : 258

عدد العزلات السالبة لصبغة غرام : 134

المجموع الكلي للعزلات : 392

لتخميرها سكر اللاكتوز في وسط الماكونكي الصلب فضلاً عن كونها جافة متوسطة الحجم ومحدبة ، وهذه الصفات غالباً ما يتصف بها جنس بكتريا القولون *Escherichia* (Brooks *et al*., 2007) ، وعند تنميتها على وسط EMB ظهرت المستعمرات ذات بريق معدني مخضر (Green metallic shine) ، وظهر القسم الآخر من المستعمرات بهيئة مخاطية لامتلاكها كبسولة كبيرة الحجم غير منتظمة وذات لون وردي أفتح من سابقتها كونها مخمرة لسكر اللاكتوز وهذه الصفات ربما تعود لجنس*Klebsiella spp.* (Prescott *et al*., 2005) . إن صفة تخمير اللاكتوز من قبل أفراد العائلة المعوية صفة مميزة لكل من *E.coli* و *Klebsiella* ، و *Enterobacter* (MacFaddin , 2000) ، وظهرت على وسط الماكونكي الصلب مستعمرات دائرية متوسطة الحجم ملساء مخاطية ولزجة وردية اللون بطيئة التخمر لسكر اللاكتوز وفي وسط الدم الصلب كانت ملساء محدبة دائرية مخاطية غير محللة للدم عديمة اللون او قد تكون صفراء شاحبة شخصت على انها بكتريا الـ *Pantoea* (MacFaddin , 2000) ، اما المستعمرات النامية على وسط الماكونكي الصلب التي كانت شاحبة كونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز وخضراء اللون لإنتاجها صبغة (Pyocyanin) ، وعند تنميتها على وسط الدم اعطى بعضها تحلل كامل للدم مما يدل على قدرتها على انتاج هرمون الهيمولايسين وتحليل كريات الدم الحمراء والبعض الآخر لم تحلل الدم قد تكون من جنس بكتريا الزوائف .*Pseudomonas* spp(MacFaddin , 2000).

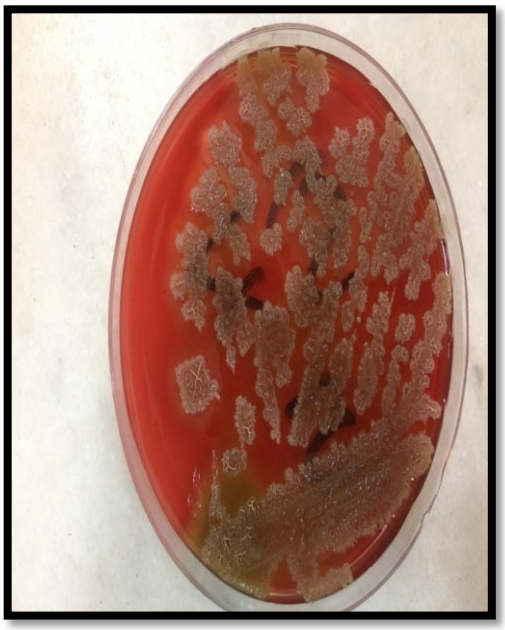
ان جميع العزلات البكتيريا السابقة شخصت على انها سالبة لملون غرام لنموها على وسط الماكونكي الصلب الحاوي على أملاح الصفراء وصبغة (Crystal violet) المثبطة لنمو البكتريا الموجبة لملون غرام وعدم نموها على وسط المانتول الملحي (Atlas,1995). استخدمت الفحوص الكيموحيوية كفحوص تكميلية للتشخيص الأولي ولتأكيد أجناس البكتريا قيد الدراسة ، فقد أعطت جميع عزلات البكتريا السالبة لملون غرام فحصاً موجباً الـ (Catalase) وسالباً للأوكسديز ماعدا بكتريا *P. auroginosa* التي اعطت نتيجة موجبة لفحص الاوكسيديز .

العزلات التي ظهر نموها في وسطي الدم الصلب والمانتول الملحي فقط شخصت على إنها تعود للبكتريا الموجبة لملون غرام ،لأنها ثبطت على وسط الماكونكي الصلب (MacFaddin,2000) ، أما الصفات المورفولوجية العامة للمستعمرات فقد ظهرت دائرية كريمية اللون إلى صفراء ومتوسطة الحجم ملساء فضلاً عن قابلية بعضها على تحليل الدم ، شخصت هذه العزلات مبدئياً على أنها تعود لجنس *Staphylococcus* ، واعطت نتيجة موجبة لفحص الـ (Catalase) شخصت العزلات المرضية البالغة

85 عزلة لـ *S.aureus* كما أظهر فحص الشريحة بأنها مكورات مفردة أو بشكل عناقيد ذات لون بنفسجي بأجراء الاختبارات الكيموحيوية ، وكانت سالبة لاختبار(Oxidase) (MacFaddin,2000).

اما البكتريا التي ظهرت مستعمراتها على وسط الدم الصلب غير شفافة تتراوح الوانها بين البيضاء ، البيضاء الرمادية أو الكريمية والتي تكون مستعمراتها مخاطية شخصت على انها *S.lentus* (شكل 4-4) ، واعطت تلك البكتريا تحلل كامل للدم مما يدل على قدرتها على انتاج انزيم الهيمولايسين وتحليل كريات الدم الحمراء ، والتي أعطت فحصاً موجباً لتخمير سكر المانتول بظهور المستعمرات والوسط المحيط بها بلون أصفر دلالة على تكوين حامض نتيجة تخمر سكر المانتول (شكل 4-5) وانها موجبة لفحص (Oxidase) (MacFaddin,2000).

تعد هذه الفحوص غير كافية للتوصل لمعرفة النوع لكنها تعطي انطباعاً أولياً للتعرف على جنس البكتريا المعزولة ويمكن الجزم النهائي بتشخيصها باعتماد عدد من الفحوص الكيموحيوية ، فضلاً عن استخدام جهاز الفايتك للتأكد من صحة ذلك (الملحق 4,3,2) (Atlas,1995؛ Harley and Prescott,2002). ظهرت بعض الاجناس البكتيرية الاخرى الموجبة والسالبة لملون غرام بنسب قليلة منها *Proteus*، *Vibrio fluvial*،و *Kosaria rosea*.



شكل (4-4) بكتريا *S.lentus* على وسط الدم الصلب

شكل (4-5) بكتريا *S.lentus* على وسط المانتول الملحي الصلب

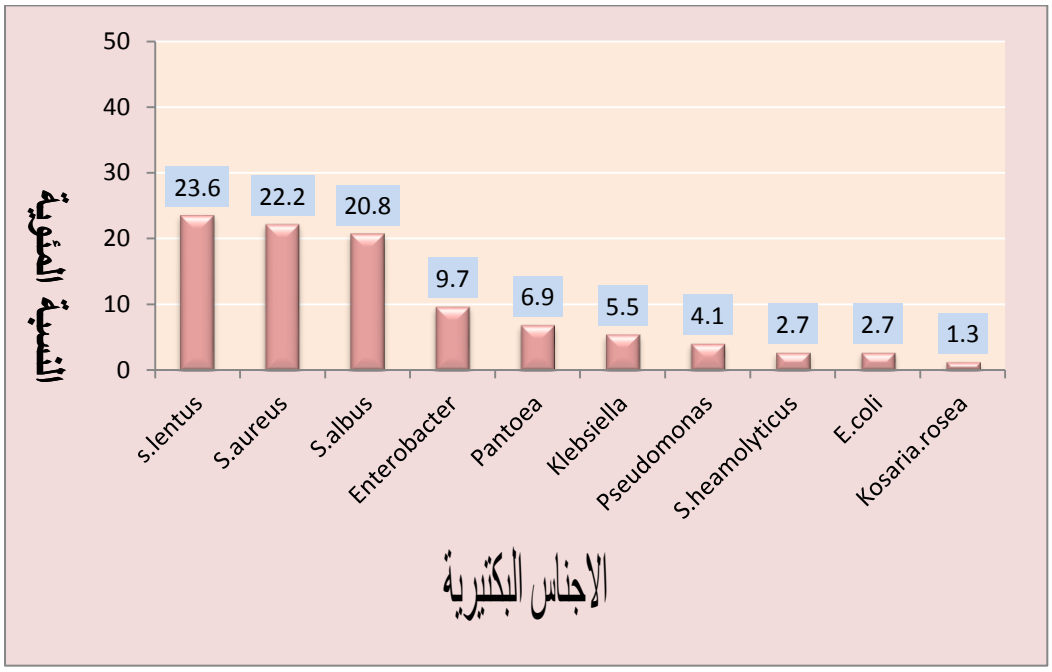
جدول (4 -2) الاختبارات المجهرية والكيموحيوية للعزلات البكتيرية .

نوع المسبب البكتيري / الاختبار	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus albus*	*Staphylococcus lentus*	*Pseudomonas auroginosa*	*Pseudomonas Stutzeri*	*Pseudomonas Flursenes*	*Klebsiellia pneumonia*	*E. coli*	*Pantoea ssp.*	*Proteus spp.*	*Enterobacter spp*
Gram stain	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Catalase	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Methyl red	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-proskauer	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Simmon citrate	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Hemolysis	B	ℓ	B	B	ℓ	ℓ	ℓ	ℓ	ℓ	ℓ	ℓ
Mannitol salt agar	G	G	G	-	-	-	-	-	-	-	-
EMB	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-
MacConky agar	-	-	-	G	G	G	G	G	G	G	G

الرموز: (+) النتيجة موجبة / (−) النتيجة سالبة / (β) تحلل كامل للدم /
(ℓ) غير محللة للدم /(G) وجود نمو في الزرع .

4-2 -1: عزل البكتريا من منطقة الناسور الشرياني (Fistula) :

يبين الشكل (4-6) عدد العزلات البكتيرية المصاحبة لمنطقة الناسور الشرياني Fistula لمرضى الفشل الكلوي المزمن حيث تم جمع (100) عينة من هذه المنطقة . بينت نتائج العزل نمو 72 عزلة بكتيرية ، إذ اظهرت جميع الفئات العمرية إصابات بكتيرية ، مثلت بكتريا *S.lentus* أعلى نسبة عزل 17 (23.6%) وبالمرتبة الثانية *S.aureus* 16 (22.2%) وبكتريا *S.albus* 15 (20.8%) ، واظهرت *Enterobacter spp.* 7 (9.7%) ، والـ *Pantoea* 5 (6.9%) ، والـ*Klebsiella spp* 4 (5.5 %)، والـ *Pseudomonas spp* 3(4.13)% وكانت نسبة كل من *S.heamolyticus* و *E.coli* 2 (2.7%) و *Kosaria rosea* 1(1.3%). في دراسة قام بها كل من Elseviers and Waeleghem (2003) وجد ان الخثرة الدموية والخمج البكتيري هي من اهم مضاعفات استخدام الناسور الشرياني (Fistula) والدبلومة (Double Lumen). كما اوضح Mayhall (2004) ان مرضى الديلزة المستخدمين للناسور الشرياني معرضين لخطر الإصابة بالخمج البكتيري نتيجة تغيير موضع (Cannulation) والذي يؤدي الى دخول البكتريا مباشرة الى مجرى الدم مسببا البكتريميا او قد تنتقل من الفلورا الطبيعية الموجودة في الجلد او بواسطة ايدي العاملين ، وقد سجلت بكتريا *Staphylococcus* اعلى نسب الإصابة للسبب اعلاه . وجاءت نتائج الدراسة مناقضة لدراسة Rosenbaum وجماعته (2006) والتي اوضحت زيادة حالات انتان الدم لمرضى الديلزة المستخدمين للـ (Catheter) والذي يعتبر احد مضاعفات العلاج بالديلزة الدموية بواسطة الـ (Catheter) ، وقد بين ANZDATA (2011) ان موت المرضى المستخدمين للـ (Catheter) اعلى النسب تلتها المستخدمين لـ (Double Lumen) مقارنة بالناسور الشرياني الذي اعتبر أكثرهم امنا للمرضى .واكد Cherifi وجماعته (2014) ان العنقوديات السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم شكلت النسبة الأعلى بين انواع البكتريا الداخلة الى مجرى الدم عن طريق الـ (Catheter) وعدوى المستشفيات . كما جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع دراسة Al-Mamouri (2016) فقد سجلت نسبة عزل لبكتريا الـ *Pantoea* حوالي 8.6% من الناسور الشرياني.

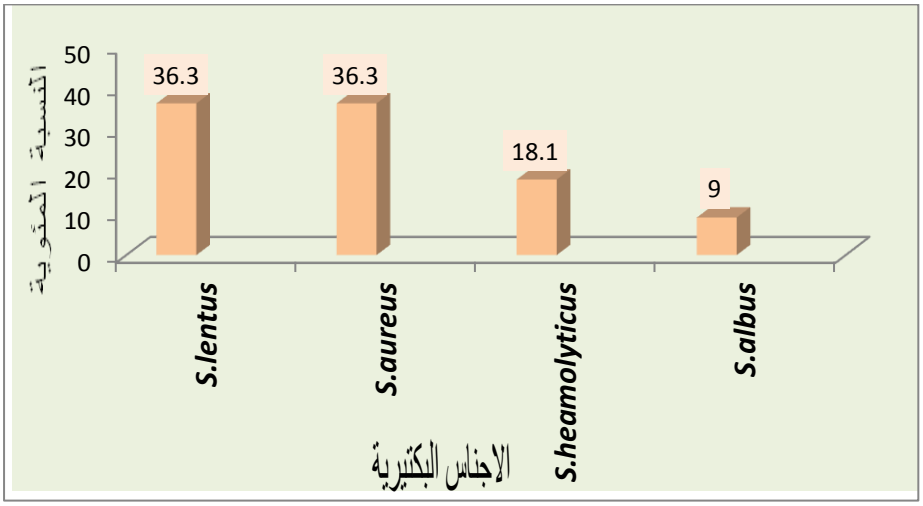


شكل(4-6) النسب المئوية للإصابات البكتيرية لمنطقة الـ Fistula لمرضى الفشل الكلوي

4-2-2 : عزل البكتريا من الدم

اظهرت كل من بكتريا *S.lentus* و *S.aureus* نسبة عزل 4 (36.3%) في دم مرضى الفشل الكلوي وبالمرتبة الثانية *S.heamolyticus* 2(18.1%) وبكتريا *S.albus* 1(9%) (الشكل4-7) . اوضح Lok and Mokrzycki (2011) ان اهم أسباب انتان الدم لمرضى الفشل الكلوي هو انتقال البكتريا من ايدي المختصين بعملية الغسيل او من تلوث البيئة المحيطة بالمريض كتلوث اجهزة الديلزة او نظام الغسيل الدموي او من خلال دخول الـ Catheter او Fistula الأوعية الدموية للمرضى ، وقد ينتقل بين المرضى خلال أجراءهم لعملية الغسيل الدوري . اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة اجراها Al-Hasnawi (2013) حيث وجد ان من بين 25 عينة دم اعطت 11 عزلة نتيجة موجبة لبكتريا CONS بضمنها بكتريا *S.lentus* ، وقد جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع دراسة محلية في محافظة بابل قام بها فلفل (2010) الذي اكد ان البكتريا الموجبة لصبغة كرام هي المسبب الرئيسي لتجرثم الدم في مرضى الفشل الكلوي وحققت بكتريا *S. aureus* اعلى نسب عزل في حين لم يتم عزل اي نوع من البكتريا السالبة لصبغة غرام ، وايضا جاءت نتائج الدراسة منسجمة مع دراسة Faix and Champan(2003) ، والذين وجدا ان بكتريا *Staphylococcus spp.* حققت اعلى نسب إصابة بالمجرى الدموي ، ويعود لامتلاك هذه البكتريا للعديد من عوامل الضراوة ومنها عامل الالتصاق وقدرتها على مقاومة العديد من المضادات الحيوية . كما

قام Esmanhoto وجماعته (2013) بعزل البكتريا من مناطق مختلفة لمرضى الفشل الكلوي المعالجين بالديلزة الدموية من الجلد ومجرى الدم وقمة القسطار واثبتوا ان *S.aureus* هي الاكثر شيوعا في مجرى الدم حيث شكلت نسبه (76%) من نسب عزل البكتريا . وأشار Fitzgibbon وجماعته (2011) ان البكتريا الموجبة لملون غرام هي اكثر البكتريا المسببة لألتهاب مجرى الدم شيوعا لمرضى الديلزة الدموية وكانت كلا من *S.aureus* و *S.* coagulase –negative المسبب الرئيسي للأخماج البكتيرية تلتها بكتريا *Entrococci* ، وقد توافقت هذه النتيجة مع دراسة اجراها Mermal وجماعته (2009) .

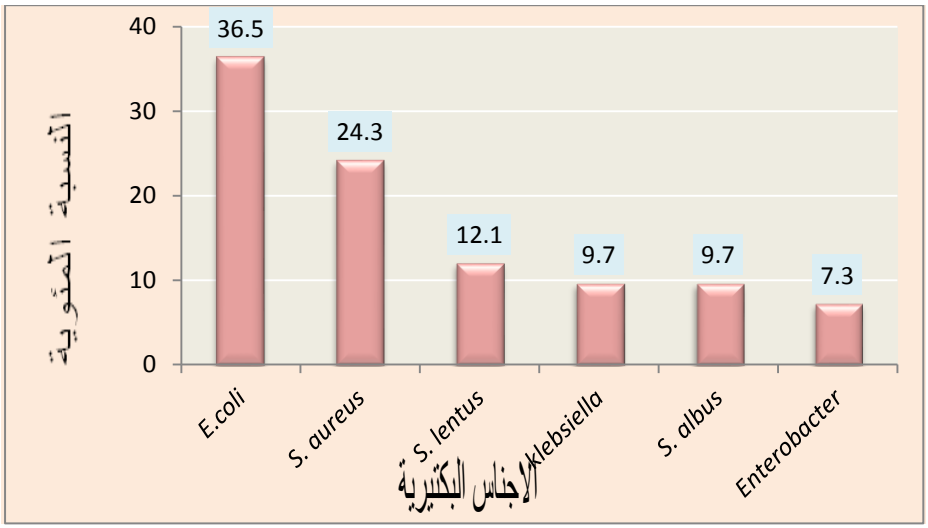


شكل(4-7) النسب المئوية للإصابات البكتيرية المرافقة لدم مرضى الفشل الكلوي .

4-2-3 : عزل البكتريا من الادرار :

اظهرت بكتريا *E.coli* أعلى نسبة إصابة في الإدرار بلغت 15(36.5%) وبالمرتبة الثانية بكتريا *S.aureus* 10 (24.3%)، وبكتريا و *S.lentus* 5(12.1%) وكل من بكتريا *Klebsiella spp.* و *S.albus* بنسبة 4 (9.7 %) ، اما *Enterobacter spp.* فكانت 3 (7.3%) (الشكل4-8) . يعد خمج السبيل البولي سائد في حوالي (30%) من مرضى الفشل الكلوي وسجلت بكتريا *E.coli* أعلى نسبة للبكتريا السالبة لصبغة غرام والتي اختصت الدراسة بعزلها من مرضى الفشل الكلوي وهذا يتفق مع دراسة قام بها الحميداوي (2005) الذي وجد نسبة عزل هذا النوع (42.1%) من مجموع العزلات المشخصة مختبريا ، ووجدت نسب مقاربة لما توصلت إليه الدراسة الحالية فقد شكلت33% من حالات الفشل الكلوي الحاد والمزمن (Reinhard *et al*,.2006) . اما بكتيريا *Klebsiella spp.* فكانت نسبة عزلها (9.7%) وهي تتفق مع نتائج دراسة Tsenge وجماعته (2002) ، والتي عزلت بنسبة (10%) من المرضى المصابين

بالفشل الكلوي. كما بينت دراسة محلية قام بها Manhal وجماعته (2012) في بغداد ان خمج السبيل البولي يعد من اكثر الاخماج المايكروبية المرافقة لمرضى الفشل الكلوي المعالجين بالديلزة الدموية وشكلت بكتريا *E.coli* المسبب الرئيسي تلتها بكتريا *K.pnemonia* واخيرا CONS. واشار Golding وجماعته (2012) ان بكتريا *E.coli* شكلت (85 %) من اخماج السبيل البولي المكتسبة من المجتمع ونسبة (50 %) مكتسبة من المستشفيات تلتها العنقوديات .

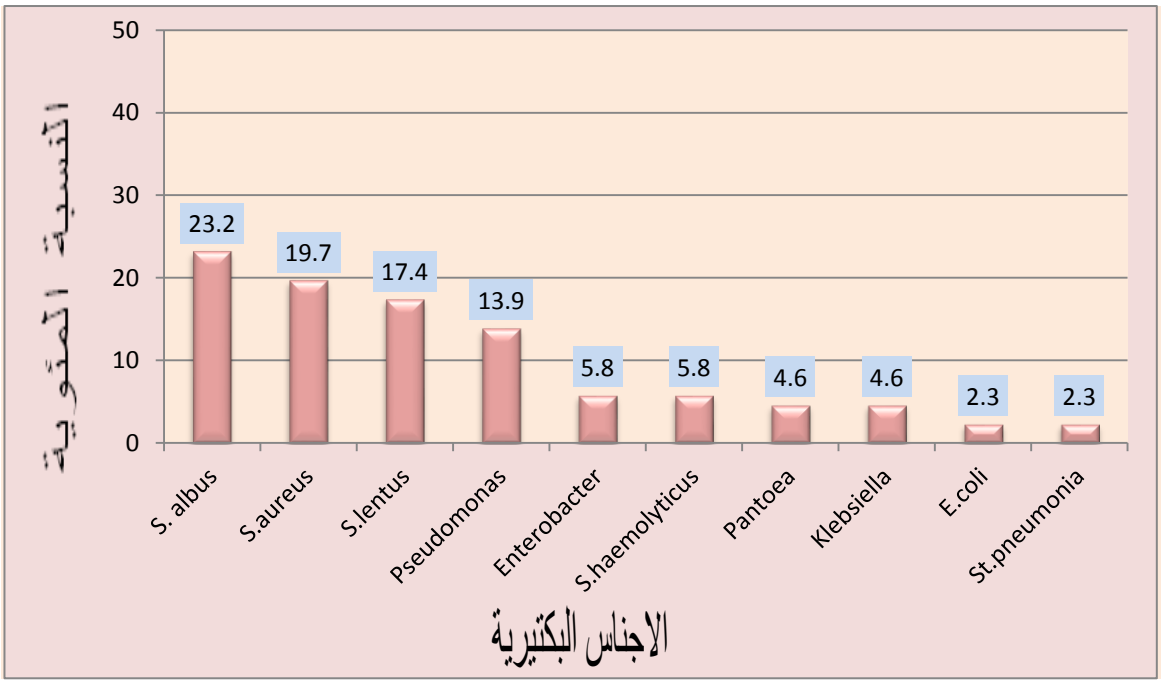


الشكل(4-8) النسب المئوية للإصابات البكتيرية المرافقة لإدرار مرضى الفشل الكلوي .

4-2-4 : عزل البكتريا من الجلد :

يبين الشكل (4-9) عدد العزلات البكتيرية المصاحبة لمنطقة الجلد لمرضى الفشل الكلوي المزمن حيث جمعن (100) عينة جلدية، بينت نتائج العزل نمو (86) عزلة بكتيرية، إذ اظهرت جميع الفئات العمرية إصابات بكتيرية تمثلت ببكتريا *S.albus* أعلى نسبة إصابة 20(23.2%) وبالمرتبة الثانية *S.aureus* 17(19.7%) وبكتريا *S.lentus* 15(17.4%)، واظهرت *Pseudomonas spp.* نسبة12(13.9%) وان نسبة كل من *Enterobacter spp.* و *S.heamolyticus* 5(5.8%) ، بينما كانت نسبة الـ *Pantoea*، و *Klebsiela spp* 4(4.6%)، والـ *E.coli* والـ *S.pnemoniae* 2(2.3%) ، ففي دراسة اجراها Esmanhotoوجماعته (2013) وجدوا بان البكتريا الموجبة لملون غرام هي البكتريا الأكثر شيوعا والتي عزلت من المسحات الجلدية لمرضى الفشل الكلوي المعالجين بالديلزه الدموية حيث شكلت نسبه (82 %) من البكتريا المعزولة من مناطق مختلفة من الجلد نالت بكتريا *S.aureus* نسبه (51 %) تلتها (CONS) بنسبه (31%). اوضحت دراسة Saxena and Panthotra (2005) ان الجلد يعد من المصادر الرئيسية

لاستيطان واحداث الاخماج البكتيرية حيث ان البكتريا الطبيعية في الجلد تنتقل من خلال سطح الجلد الى منطقة دخول القسطار او الناسور الشرياني محدثة الاخماج البكتيرية او تدخل الى السطوح الداخلية للأوعية ويساعدها ماتملكه من عوامل ضراوة كبروتينات الالتصاق وماتكونه من الأغشية الحيوية التي تساعدها على الالتصاق بالأوعية وبالتالي إحداث البكتريميا .



الشكل (4-9) الاصابات البكتيرية المرافقة لجلد مرضى الفشل الكلوي .

4-3: تصنيف مرضى الفشل الكلوي اعتماداً على الإصابات البيئية والسريرية لبكتيريا *S. lentus*

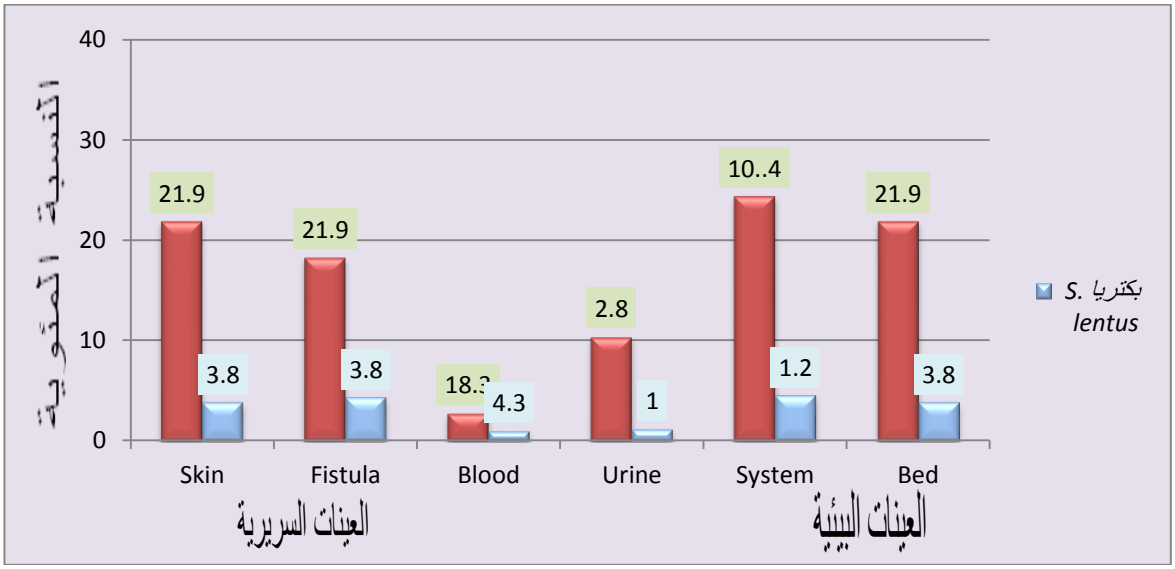
صنف مرضى الفشل الكلوي اعتماداً على نسبة الاصابة ببكتريا الـ *S.lentus* المأخوذة من العينات السريرية والعينات البيئة (الشكل 4-10). يلحظ في العينات السريرية ان نسبة بكتيريا *S.lentus* المعزولة من الجلد 15(3.8%) ومنطقة الناسور الشرياني 17 (4.3%) والدم 4 (1%) والادرار 5(1.2%) من المجموع الكلي للبكتريا المعزولة حيث بلغت نسبتها في العينات السريرية (10.3%). اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة اجراها Al-Hasnawi (2013) حيث وجد ان نسبة بكتريا *S.lentus* المعزولة من العينات السريرية بلغت 12.5% من المجموع الكلي لبكتريا CoNS . اظهرت الدراسة الحالية امكانية عزل المكورات العنقودية السالبة للانزيم المخثر للبلازما مثل بكتيريا الـ *S.lentus* من منطقة الناسور الشرياني (منطقة القسطرة الوريدية) . جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع الدراسات السابقة حيث بينت ان استخدام انابيب القسطرة البلاستيكية ساهم في رفع نسب الاصابة بالعنقوديات السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم حيث تساعدها على

الألتصاق والأستيطان (Von-eiff *et al*., 1999) وهذا يتوافق مع دراسة اجريت في مستشفى جامعة اسطنبول الطبية في تركيا بين عامي (1999-2006) حيث تم عزل200 عزلة للعنقوديات السالبة للانزيم المخثر للبلازما وجد 5 عزلات تعود لبكتريا *S.lentus* أي بنسبة 12.8% من المجموع الكلي للعزلات يعزى السبب نتيجة للاستخدام الطويل لأنابيب القسطرة الوريدية والتي سببت تجرثم الدم (Bacterimia) للمرضى (Koksal *etal*.,2009) ، وقد يرجع ذلك من خلال ما تفرزه البكتيريا من مواد مخاطية متعددة السكريات Mucopolysacharide من هيكلها الخارجي اضافة لامتلاكها البروتينات السطحية مثل الكولاجين فبرونيكتين مما يسهل التصاقها على أسطح الأنسجة والاجهزة (Normanno *et al*., 2005) وبهذه الطريقة يمكنها الانتشار بسهولة في بيئة المستشفى.

بينت نتائج الدراسة الحالية نسبة عزل *S.lentus* من الجلد كانت اعلى نسبة بين العزلات البكتيرية (شكل 4-8) ، وكانت هذه النتائج متوافقة لما ذكره العالم Rivera وجماعته (2014) ، حيث اوضح انها ذات اصل حيواني يمكنها الانتقال الى الإنسان خاصة عندما يكون بتماس مع الحيوانات (Zoonosis) وتنتقل عن طريق الجلد مما يسبب الكثير من الامراض ، ووجد Bendahou وجماعته (2008) ان *S.lentus* اكثر انواع العنقوديات مقاومة للمضادات الحيوية المعزولة من منتجات الحليب . قد تكون النسبة عالية نتيجة لخرق الميكانيكية الدفاعية في الجلد أو الغشاء المخاطي أو عن طريق افراز السموم،حيث اوضحت دراسات اخرى ان البكتريا تكون اكثر انتشارا في الجلد كون نسبة الرطوبة فيه قليلة اضافة الى انخفاض معدل الدالة الحامضية الـ pH وهذا يتناسب مع معدل pH الـ *S.lentus* الذي يكون مقارب (pH = 5) . كما بين Rivera وجماعته (2014) بان بكتيريا *S.lentus* تسبب خمج غشاء البريتون لعدد من مرضى الديلزة البريتونية وكان سبب الانتقال ان معظم المرضى على تلامس مع الحيوانات .

بينت الدراسة امكانية عزل بكتيريا *S.lentus* من الادرار(1.2%) وهذه النسبة تتوافق مع دراسة اجريت في منطقة بريبرام في جمهورية التشيك للفترة من (2000-2002) إذ تم جمع عينات الادرار من تفريغ المرضى من تلقاء انفسهم او من القسطرة وجد ان نسبة بكتيريا *S.lentus* (0.9%) وهذه النسبة تتفق مع العديد من الدراسات والتقارير التي اكدت على امكانية عزلها من الادرار حيث تلعب دور سريرا هاما في خمج السبيل البولي (Guirguitzova *et al*.,2002).وقد تشير انخفاض نسبة بكتريا *S.lentus* في الادرار الى زيادة تركيز الاملاح وهذا الوسط يعتبر غير ملائم لنمو البكتيريا حيث يكون نموها ضعيف في التركيز الملحي المقارب (15%) . جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع دراسة Stepanovic وجماعته

(2003) الذين وجدوا ان بكتريا *S.lentus* تشكل نسبة (0.79%) من مجموع مرضى خمج السبيل البولي ، في حين لاتتفق نتائج الدراسة مع دراسة Barros وجماعته (2011) الذين سجلوا نسبه (0.07%) لبكتريا *S.lentus* من مجموع مرضى خمج السبيل البولي لكنها تتفق مع دراستنا كون ان بكتريا *E.coli , S aureus*. هي البكتريا الاكثر شيوعا لمرضى خمج السبيل البولي ، كما بين Alcaraz وجماعته (2003) ان بكتريا *S.lentus* تلعب دور سريريا مهما في مرض خمج السبيل البولي حيث عزلت من عدد من مرضى الدراسة. كما أشار كل من Archer و Ruppy(1994) ان ارتفاع نسب العنقوديات السالبة للانزيم المختثر لبلازما الدم في العزل السريري والمسحي للمستشفيات بصورة عامة ناتج عن عدة عوامل منها : مقاومة العنقوديات للعديد من المضادات الحيوية والمطهرات الشائعة الاستعمال وكون العنقوديات تمثل النبيت الطبيعي للجلد والاغشية المخاطية للإنسان فضلا عن استخدام بعض العدد الطبية كأنابيب القسطرة والتصريف البلاستيكية لمدد زمنية قد تزيد عن ثلاثة أيام أو أكثر.اما بالنسبة للعينات البيئية فكانت نسبة بكتريا *S.lentus* المعزولة من جهاز الكلية الصناعية والسرير(4.5 %) ، و(3.8%)على التوالي من المجموع الكلي للبكتريا (الشكل4-10) . فقد وصلت نسبة العنقوديات السالبة لأنزيم مختثر البلازما في بعض الدراسات الى (95%) وهذا يقدم دليلاً على هيمنة هذه الانواع على اجواء المستشفيات وما تسببه من مشاكل صحية للمرضى الراقدين، وقد بينت دراسة Szymanska و Sitkowska (2013) ان بكتريا *S.lentus* هي احد انواع البكتريا الموجبه لصبغه كرام التي عزلت من وحدة علاج الاسنان وبالتحديد من مياه غسل الاسنان في حين أشار Heilmann و Peters (2000) الى سيادة بكتريا *S.epidermidis* كمسبب مرضي في الاخماج المكتسبة من المستشفيات.



الشكل(4-10) النسبة المئوية للإصابة ببكتريا *S.lentus* لمرضى الفشل الكلوي .

4-4: إختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic Susceptibility Test

تم اختبار حساسية (50) عزلة *S.lentus* تجاه (12) صنف من المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال بطريقة الانتشار بالاقراص ، وبالاعتماد على نتائج الفحص (قياس قطر منطقة التثبيط حول قرص المضاد) والتي قُورنت مع جداول قياسية ، وحسب ما جاء في CLSI (2014) (ملحق3) ، وذلك لمعرفة مدى مقاومة *S.lentus* للمضادات الحيوية المستعملة في مستشفى مدينة الصدر الطبية ، وخطورة انتشار تلك المقاومة التي قد تمتد لتشمل عدداً واسعاً من المضادات الحيوية المختلفة ، وبالنتيجة فسوف تتقلص الخيارات العلاجية الناجحة للإصابات التي تسببها هذه البكتريا. يظهر الجدول(4-3) نتائج اختبار المقاومة للمضادات الحيوية المشمولة بالدراسة لعزلات بكتريا *S.lentus* إذ اظهرت مقاومة عالية ضد اغلب المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة .

4-4-1: مضادات البيتالاكتم (β –Lactam)

يتبين من الجدول(4-3) و(الملحق5) أنّ هناك مقاومة تامة أبدتها عزلات بكتريا *S.lentus* لمضاد الـ (Penicillin) إذ جاءت نسبة المقاومة له 50(100%) حيث تعمل البنسيلينات على تثبيط بناء جدار الخلية البكتيرية من خلال ارتباطها مع البروتينات الرابطة للبنسيلينPBP القريبة إلى الغشاء السايتوبلازمي، ليحصل إغلاق للموقع الذي يتم عنده الإرتباط العرضي للببتيدات المرتبطة أصلاً بمتعدد السكريد الدهني المعطي لجدار الخلية التركيب الصلب (Kiffer *et al*., 2005 ; Ryan and Ray ,2004

واشار Oscar وجماعته (2004) الى ارتفاع نسب المقاومة للعديد من المضادات في دراسة مسحية في اسبانيا امتدت ستة عشر عاماً فكانت النسب تتزايد كل عام حتى بلغت (75.3%) .وجاءت الدراسة متوافقة مع Yasudaوجماعته (2000) الذي وجد ان جميع عزلات *S.lentus* كانت ذات مقاومة عالية (100 %)لمضادات البتالاكتام .كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج كل من Al-Hasani (2011) و Bouchami جماعته (2011) و Fathi (2007) حيث كانت مقاومة الـ CONS لمضاد البنسلين (100%) و(84%) و(95 %) على التوالي. واعزوا سبب المقاومة الى قابليتها على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز القادرة على تحطيم حلقة البيتالاكتام وجعل مضاد البنسلين غير فعال ويشفر لهذه الانزيمات بواساطة البلازميدات التي تنتقل بسهولة بين السلالات البكتيرية (Brooks *et al*.,2007) . اظهرت النتائج جدول(4-3) ان نسبة المقاومة لمضادات السيفالوسبورينات Cephalosporins المتمثلة بـ Ceftazidime و Cefotaxime و Ceftriaxone لبكتريا *S.lentus* كانت (100، 82 ، 76)% على التوالي . وتعد هذه المضادات من افراد الجيل الثالث من مركبات السيفالوسبورينات وقد اثبتت فعاليتها ضد العديد من انواع البكتريا المشاركة في عدوى المستشفيات (Lambert *et al*.,2001) . وقد اشار Tsubakishita وجماعته(2010) ان *S.lentus* قد فقدت *mecA* gene لها في مرحلة معينة من تاريخها التطوري ، وقد تم القيام بالعديد من الدراسات على وظيفة *mecA* gene منذ اول اكتشاف لهذه البكتريا عام 1961م. اشارت الدراسات امتلاك بكتريا *S. lentus* جينات المقاومة لمضادات السيفالوسبورينات كونها تنتج انزيمات β-lactamase التي تكون اما كروموسومية او بلازميدية المنشأ (Chambers,2001) ، اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة Al-Tameemi (2010) حيث وجد ان المقاومة لمضاد Ceftriaxone بلغت 90.4% وقد عزى أسباب المقاومة الى قلة ألفة ارتباط المضادات بالبروتينات المرتبطة بالبنسلينات او ربما لإنتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز .كما اتفقت النتائج مع دراسة Vyletelov وجماعته (2011) ودراسة Souza Antunes وجماعته (2007)، وخالفت الدراسة نتائج Islam وجماعته (2008) وVaez وجماعته (2011) اذ سجلوا نسبة مقاومة لمضاد Ceftriaxone (20%) و(25%) على التوالي .

بينت الدراسة أنّ نسبة مقاومة عزلات *S. lentus* كانت لمضاد Amoxillin / Clavulanicacid 39(78%) ، وهو من مضادات البيتالاكتام التعاضدية (الأموكسيسيلين+ حامض الكلافيولانك)، الذي يتميز بتأثيره الفعال على البكتريا المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز، وإنّ استعمال أموكسيسيلين وحده أدى إلى مقاومة

عالية من قبل العزلات، لذلك تم زيادة كفاءته بإضافة حامض كلافيولانك، ولا تختلف آلية مقاومته عن سابقاته من مضادات البيتالاكتام، إذ تتم مقاومته من خلال تغير الموقع الهدف، وقد تحدث نتيجة خفض نفاذية المضاد الحيوي عبر غشاء الخلية البكتيرية (Ryan and Ray, 2004). وقد أبدت 39(78%) من العزلات مقاومة لهذا المضاد وأسباب ذلك ممكن أن تعود إلى امتلاك العزلات قيد الدراسة تعبيراً وراثياً عالياً لإنزيمات AmpC التي لا تتأثر بالفعل المثبط للكلافولانيت ، أو بسبب آليات أخرى غير متخصصة، مثل اختزال نفاذية الغشاء الخارجي أو جميع هذه الأسباب مجتمعة (Livermore and Brown. 2005). وقد يعود السبب الى ان بكتريا *S. lentus* تفتقر الى Mec Agene مما يجعلها اكثر عرضه للمضادات الحيوية ومن ضمنها Amoxillin / Clavulanicacid ، وتؤكد الدراسات الحديثة على اهمية دراسة *S. lentus* لأهميتها السريرية إضافة الى كونها ملوثات (Rivera , 2014).

جدول (4–3) النسب المئوية لمقاومة عزلات *S.lentus* تجاه المضادات الحيوية .

انواع المضادات الحيوية	العدد الكلي لعزلات المقاومة
Penicillin	(%100) 50
Methicillin	(% 94) 47
Levofloxacin	(% 5) 10
Tetracycline	(%28)14
Clindamycin	(%96) 48
Trimthoprim/Sulfamethoxazole	(% 20) 10
Erythromycin	(%96) 48
Vacomycin	(% 0) 0
Ceftriaxone	(%76) 38
Cefotaxime	(% 82) 41
Ceftazidime	(%100) 50
Amoxillin / Clavulanicacid	(%78) 39

بلغت نسبة المقاومة لمضاد (Methicillin)47 (94 %) والذي يتصف كونه مقاوماً للعديد من انزيمات البنسلينيز. ان ارتفاع نسب المقاومة لمضادات البيتالاكتام هذه اتفقت مع دراسة Ryffel وجماعته (1992) حيث بين ان مقاومة العنقوديات لمضاد (Methicillin) بلغت (100%) مع التزايد المستمر في نسب السلالات المقاومة للمثيسلين . واشار Koksal وجماعته (2009) نسبة مقاومة المكورات العنقودية *S.lentus* بلغت (67.5%) وقد عزيت الى وجود مواد كلاليكوببتيدات التي تكون ذات نسبة ايجابية مع مكونات الـSlime ، في حين تباينت نتائج الدراسة مع نتائج Simeoni وجماعته (2008) التي كانت نسبة مقاومة المضاد (36.4%) وعزى اسباب المقاومة الى العلاقة بين mec Agene والبلازميد الحامل له ، لذا كانت دراسة المضادات الحيوية للبكتريا العنقودية خاصة بالمضاد المشسلين من الأمور المهمة سريريا في تحديد أمراضية العينات السريرية التي تم عزلها في المستشفى التابع لكلية الطب في معهد علم الأحياء الدقيقة في صربيا من(1998-2003).

2-4-4 : مضادات الماكروليدات (Macrolides)

اظهرت النتائج ان نسبة المقاومة لمضادات الماكروليدات المتمثلة بمضاد (Erythromycin) و(Clindamycin) بلغت 48 (96%) لكل منهما. وجاءت الدراسة متوافقة مع دراسة Yasuda وجماعته (2000) حيث بين ان معظم سلالات *S.lentus* كانت مقاومة لمضاد الارثرومايسين ، وجاءت نتائج الدراسة الحالية متفقة مع دراسة Schwendener و Perreten (2012) الذي وجد ان عزلات *S.lentus* المعزولة سريريا من الإنسان والدواجن كانت ذات مقاومة عالية لمضادي الـ الارثرومايسين والكلندمايسين . ان الجينات المسؤولة عن مقاومة هذه المضادات محمولة على بلازميدات اقترانية صغيرة الحجم تساهم في انتشار المقاومة لهذه المضادات الى الأنواع البكتيرية الاخرى (Oscar *et al*., 2004; Gerard *et al*., 1999) . اشار Frankin (2003) ان العديد من العنقوديات الموجبة والسالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم وخاصة السلالات المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية تحمل بلازميد كبير الحجم مسؤول عن مقاومة مضادات البيتالاكتام ، الارثرومايسين والجنتامايسين ، ان ظهور مثل هذه العزلات ربما يعود الى حدوث طفرة وراثية في جين الأرثرومايسين المحمول على البلازميد المسؤول عن مقاومته او انغراس جين اخر داخل جين الارثرومايسين ادى الى تعطيله . وقد اتفقت النتائج مع مابينته NCCLS (2002) بأن *S.lentus* المعزولة من التهابات الجهاز التنفسي تكون مقاومة لكل من الارثرومايسين والكلورومفينكول والتتراسايكلين لنفس السبب اعلاه ، كما اتفقت النتائج مع Bendahou وجماعته (2008) الذين وجدوا ان عزلات

S.lentus كانت مقاومة لمضاد الارثرومايسين.وقد اوضح Koksal وجماعته (2009) ان الـ *S.lentus* كانت مقاومة للارثرومايسين بنسبة (80%) والكلندمايسين (72%) ولم تبدي أي مقاومة لمضاد الفانكومايسين. ومن الشائع مقاومة العنقوديات لمركبات الماكروليدات ومن ضمنها (Erythromycin) حيث تنشأ المقاومة من خلال إنتاج إنزيم (RNA methylase) المشفر بوساطة مورثة *erm* (Jorgensen *et al*., 2004) ، وقد أدرج (Erythromycin) ضمن قائمة المضادات الحيوية التي تجابه بمقاومة عالية من العنقوديات، ووصلت نسبة المقاومة في بعض السلالات إلى (100%) (Leclercq, 1989) وهي أعلى من نسبة المقاومة في الدراسة الحالية ، وفي دراسة Schmitz وجماعته (2000) التي سلطت الضوء على المقاومة العالية للأرثرومايسين ، إذ تم عزل العنقوديات من 24 مستشفى تعليمي في مختلف البلدان الأوربية وقد وجد أنَ نسبة المقاومة لـ (Erythromycin) بلغت (93%)، وقد خالفت دراسة Al-Hassnawi (2013) النتائج إذ بلغت نسبة المقاومة (25%) وهي أدنى من نسبة المقاومة في الدراسة الحالية .

3-4-4 : التتراسايكلينات (Tetracyclines)

اظهرت النتائج ان نسبة المقاومة لمضاد التتراسايكلين هي 14(28%). وقد اشارت تقارير ودراسات عديدة لـ WHO (2003) الى تراجع كبير في استخدام هذا المضاد بسبب مقاومة العنقوديات له .ان الجينات المسؤولة عن مقاومة هذا المضاد محمولة على بلازميدات اقترانية صغيرة الحجم تساهم في انتشار المقاومة منه الى الأنواع البكتيرية الأخرى (Oscar *et al*., 2004; Gerard *et al*., 1999) . اشار Hauschild وجماعته (2005) ان نسبة مقاومة للتتراسايكلين30 % يعود الى تكوين الجينات الصغيرة المحمولة على البلازميدات .كما اتفقت النتائج مع نتائج كل من Al-Hasani (2011) و Bouchami (2011) و Efuntoym (2012) إذ كانت مقاومة الـ CONS لمضاد التتراسايكلين (33%) و(39%) و(36.4%) على التوالي . وخالفت الدراسة نتائج كل من Mahesh وجماعته (2012) حيث وجد ان نسبة المقاومة بلغت (58.62%)، ووجد Koksal وجماعته (2009) ان نسبة المقاومة للتتراسايكلين هي (60 %). في حين وجد Simeoni (2008) ان نسبة المقاومة لمضاد (Tetracyclin) كانت(72.7 %) .

4-4-4 : مضادات الكلايكوببتيدات (Glycopeptides)

اظهرت النتائج ان نسبة المقاومة لمضاد الفانكومايسين هي صفر لجميع العزلات قيد الدراسة، وقد اشارت دراسات عديدة بأن للعنقوديات حساسية عالية لمضادات كلايكوببتايد وتضم نوعين رئيسيين هما الفانكومايسين وتايكوبلانين وقد استخدم الفانكومايسين في الحد من خطورة العنقوديات وخاصة في الاخماج المكتسبة من المستشفيات لسنوات طويلة في الولايات المتحدة وبريطانيا وفي العديد من الدول الاخرى ، (Garrett *et al*.,1999). جاءت نتائج الدراسة متوافقة مع دراسة Barros وجماعته (2011) الذين وجدوا ان نسبة حساسية عزلات *S.lentus* هي100% لمضاد الفانكومايسين، وعزو سبب حساسية البكتريا للمضاد الى تأثيره في بناء الجدار الخلوي اذ يرتبط بشدة مع (D-alanine) ويمنع تخليق متعدد الببتيد،ان قلة استخدام هذا المضاد او عدم استخدامه على الأغلب لما له من تأثيرات جانبية على الكلى والكبد والأذن والأعصاب حالت دون ظهور العزلات المقاومة له ويبقى استخدام هذا المضاد في الحالات الخطيرة والمتسببة من العنقوديات والمسبحيات الموجبة لملون غرام،ورغم ذلك ظهرت بعض العزلات المقاومة لهذا المضاد، وان الأساس الوراثي للمقاومة هو كرموسومي ،اذ يحدث تحوير في جزيئة متعدد الببتيد يمنع ارتباطها بالمضاد الحيوي (Franklin, 2003; Maria *et al*., 2002)

5-4-4 : مضادات السلفونامايدات والترايميثوبريم Sulfonamides &Trimethoprim

يعد (Trimthoprim/Sulfamethoxazole) من المضادات الشائعة الاستخدام مع مركبات السلفانومايد اذ يشترك بنفس المسار الايضي ونفس آلية التأثير على البكتريا العنقودية من خلال تأثيره على تخليق حامض الفولك (Franklin, 2003) . اتفقت نتائج الدراسة الحالية لمضاد (Trimthoprim/Sulfamethoxazole) الذي بلغت نسبته 20 % مع نتائج Oscar وجماعته (2004) ، اذ بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد20% ايضا والذي عزى سبب ظهور العديد من سلالات العنقوديات المقاومة لهذا المضاد وان اساس المقاومة يتمثل بتحوير في جزئية الهدف وهو انزيم (Dihydrofolatereductase) . واتفقت مع دراسة Bendaho (2008) الذي وجد ان نسبة مقاومة الـ *S.lentus* للمضاد بلغت (18%) ،واظهرت دراسات اخرى نسبة مقاومة المضاد بلغت (68%) . ان التباين في نسب المقاومة لهذا المضاد ربما يكون ناتج عن التشفير الجيني للبروتينات المحمولة على البلازميد لمجموعة العنقوديات ومنها الـ *S.lentus* والتي تكون فعالة وظيفيا لهذا المضاد (Koksal, 2009) ، او يرجع الاختلاف في النسب الى الاختلاف في مصادر العزلات واختلاف الموقع الجغرافي للدراسات المنجزة

حول هذا المضاد وبصورة عامة يعد مركبTrimethoprim- sulfamethaxozol قليل الاستخدام مقارنة بالمضادات الحيوية الاخرى لما له من تأثيرات جانبية على الكلى والكبد وظهور حالات فرط الحساسية لهذا المركب (Wesley, 1998).

6-4-4 : مضادات الكوينولينات (Quinolones)

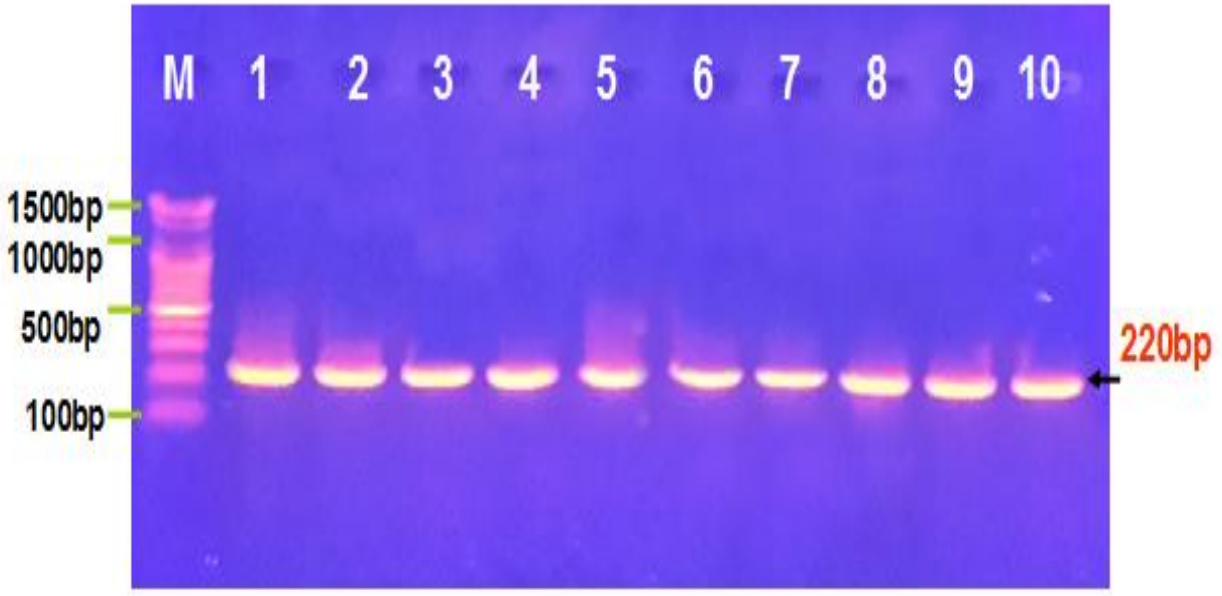
اوضحت النتائج ان مقاومة بكتريا *S.lentus* لمضاد (Levofloxacin) مقاومة ضعيفة بلغت (5%) ، وعن طريق تحليل الـ DNA للبكتريا الذي يعد من الأساليب التفضيلية لتحديد حساسية وخصوصية الكائنات الحية الدقيقة من خلال تحديد كفاءة السلالات البكتيرية ومن ضمنها الـ *S.lentus* الذي يربط التقنيات الوراثية بالمسببات المرضية ، وجد إنّ مضادات الكوينولون لها قابلية قاتلة للأحياء المجهرية (Bectericidal) من خلال تثبيط بناء DNA وتثبيط فعالية إنزيم (DNA-gyrase) الذي يعمل على فك إرتباط الإلتفاف الحلزوني للـ DNA ويضمن تباعدها عن بعضهما أثناء عميلة الاستنساخ DNA(Turnridge, 1995). اتفقت النتائج معBendaho وجماعته (2008) الذي وجد ان نسب مقاومة *S.lentus* لمضادت الكوينولينات تبلغ (15%).

5-4 : تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

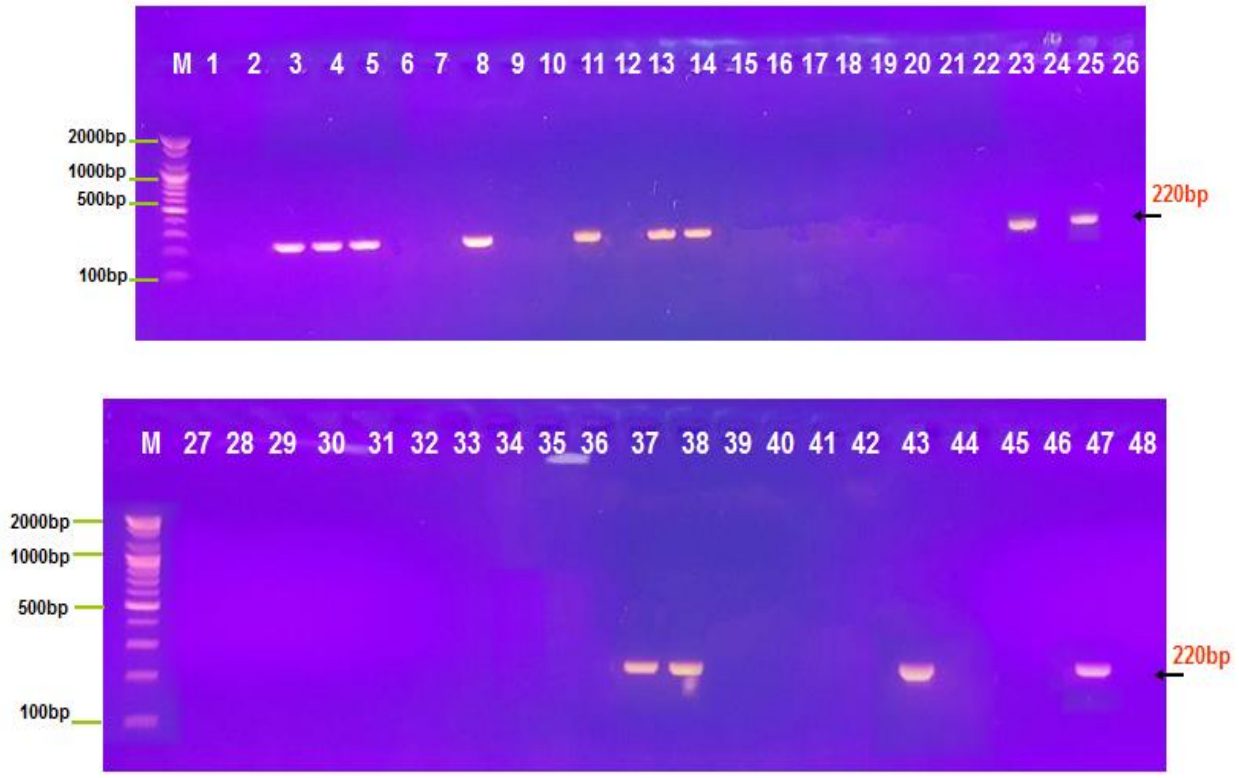
اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان تلوث اغلب اجهزة الديلزة يكون عن طريق بكتريا CONS ، وتعتبر مشكلة مقاومتها للمضادات الحيوية من اهم المشاكل المسجلة لدى مرضى الفشل الكلوي ، وتعتبر المسبب الرئيس للإصابات المرتبطة بالمستشفيات في الوقت الحاضر،ان ازدياد نسبة حدوث الإصابات لهذه البكتيريا يعود لمقاومتها العالية لأغلب مضادات الحياة سببا في انتشارها ، وان الاستعمال الواسع وغير مقنن للعلاج السريري بالمضادات الحيوية الأثر الكبير في زيادة تلك المقاومة التي تبديها وان المقاومة تزداد طرديا مع الزمن اثر الاستعمال الكبير للمضادات (Branski *et al*.,2009). بينت نتائج الدراسة مقاومة بكتريا *S. Lentus* لاغلب المضادات الحيوية الشائعة كمضادات البيتالاكتام والارثرومايسين ، ولتأكيد قابلية تلك العزلات على مقاومة المضادات الحيوية ، درست قابليتها للمقاومة من خلال دراسة انتاج الجينات المسوؤلة عن المقاومة مثل*ermA* و *ermC* و*ermB* و*blaz* بوساطة استخدام تقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل الـ Polymerase Chain Reaction DNA . اظهرت نتائج تضخيم البادئات في الدراسة الحالية للعزلات البكتيرية والبالغ عددها 48 عزلة احتواء 48/13 اي بنسبة (27.8%) على جين *ermA* ذو الوزن الجزيئي 220bp زوجا قاعديا (شكل 4-11) و(شكل 4-12) والتي تمثل نواتج تضخيم الجين *ermA* بعد ترحيله

كهربائيا ثم تم حساب حجم الـ DNA المضخم من خلال مقارنته مع الحجم الجزيئي . وان 48/18 عزلة تمتلك جين *ermB* بواقع (37.5%) ذو الوزن الجزيئي 314bp زوجا قاعديا (شكل 4-13) و(شكل 4-14)، وجين *ermC* بنسبة (62.5%) من 48/30 عزلة بوزن جزيئي 410bp زوجا قاعديا (شكل 4-15) و(شكل 4-16) واما جين *blaz* فكانت نسبته (20.8%) من 48/10 عزلات ذو وزن جزيئي 641bp زوجاً قاعدياً (شكل 4-17) و(شكل 4-18). و(الشكل4-19) يوضح النسب المئوية لجينات المقاومة للمضادات الحيوية .

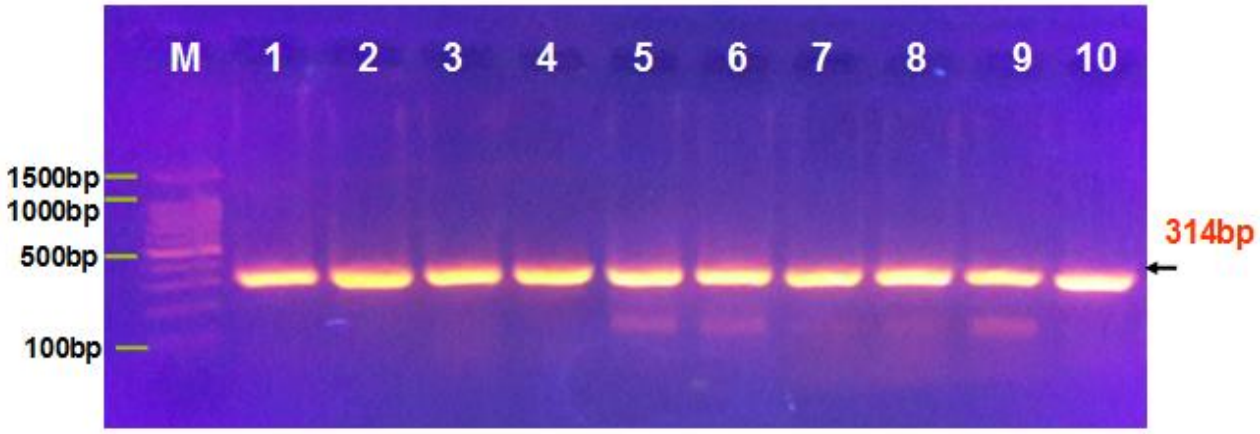
هنالك آليات متعددة لمقاومة مضاد الارثرومايسين منها تحوير المضاد وآلية الضخ الخارجي وتغير موقع الهدف للمضاد وهي الآلية الاكثر شيوعا لمقاومة مضاد الارثرومايسن ويشفر لها بواسطة المورثة *erm* اذ تعمل هذه المورثة على انتاج الانزيم المسؤول عن مقاومة مضاد الارثرومايسين Erythromycin resistance methylase (Abramowicz *et al*.,2005).



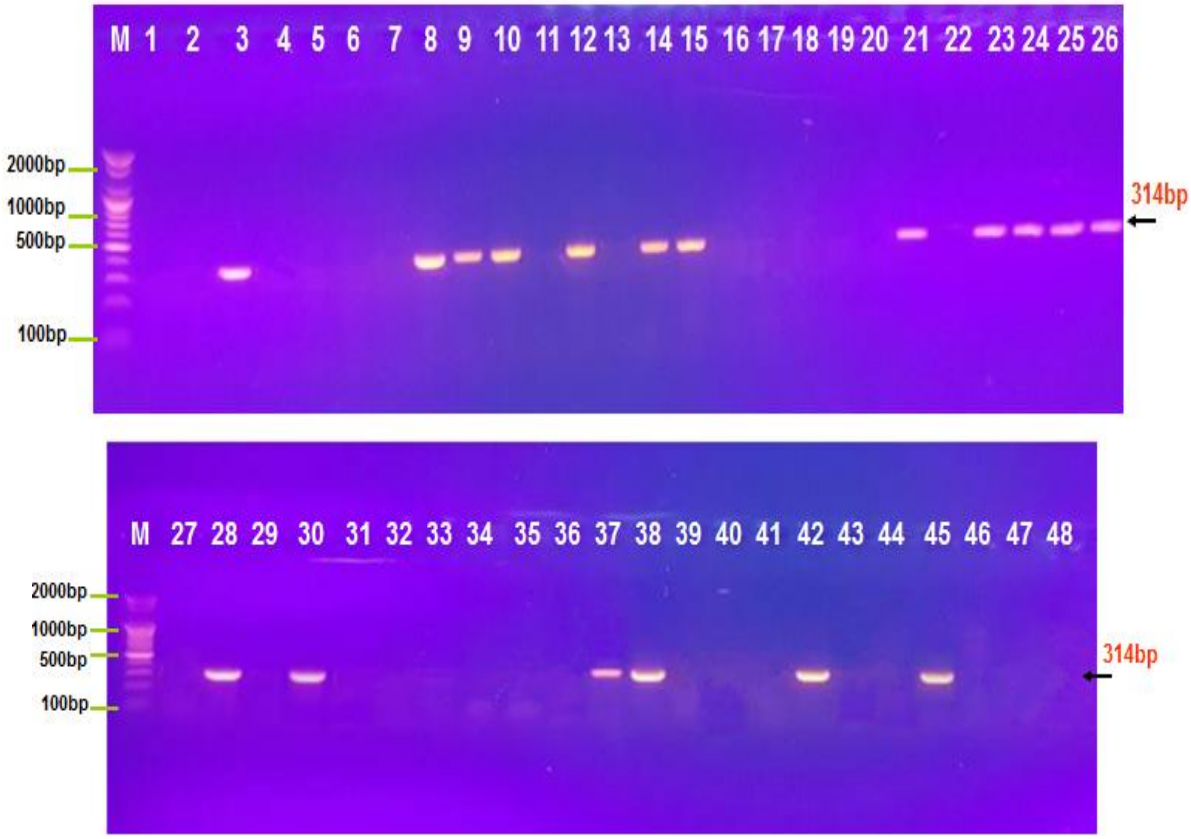
شكل (4-11) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) لنواتج تضخيم جين *ermA* 220 pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولتية وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة M : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات (1-10) موجبة لفحص 220 pb لجين *ermA* .



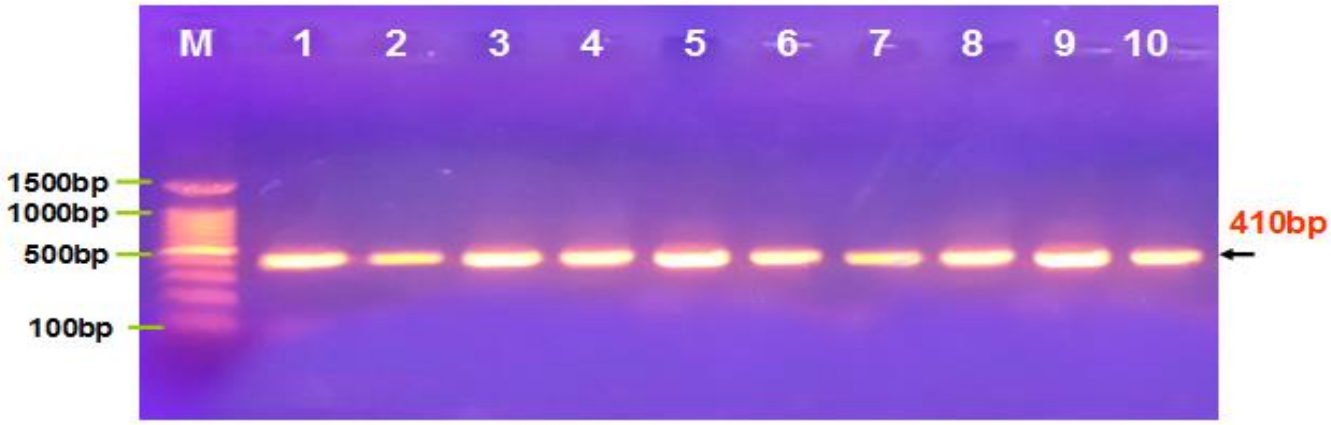
شكل (4-12) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز(1.5%) لنواتج تضخيم جين *ermA* 220 pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولتية وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة M : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات الكاملة لجين *ermA* .



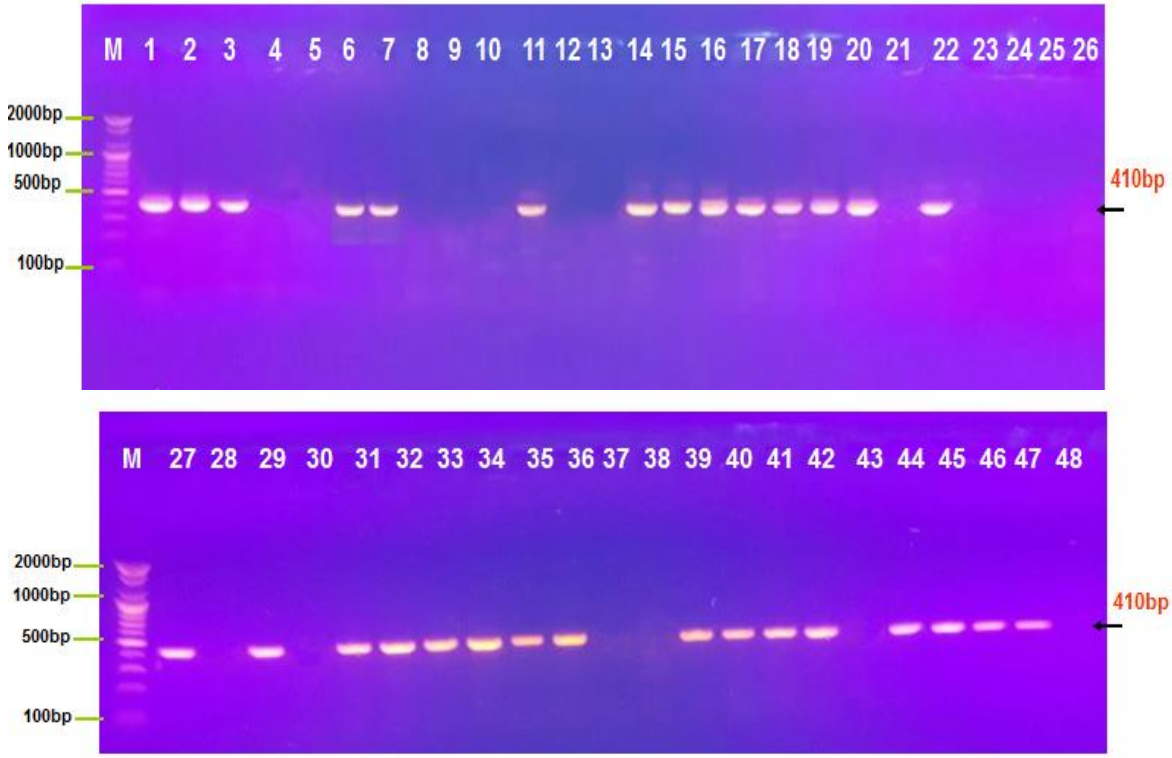
شكل (4-13) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) لنواتج تضخيم جين *ermB* 314 pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولتية وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات (1-10) موجبة لفحص 314 bp لجين *ermB* .



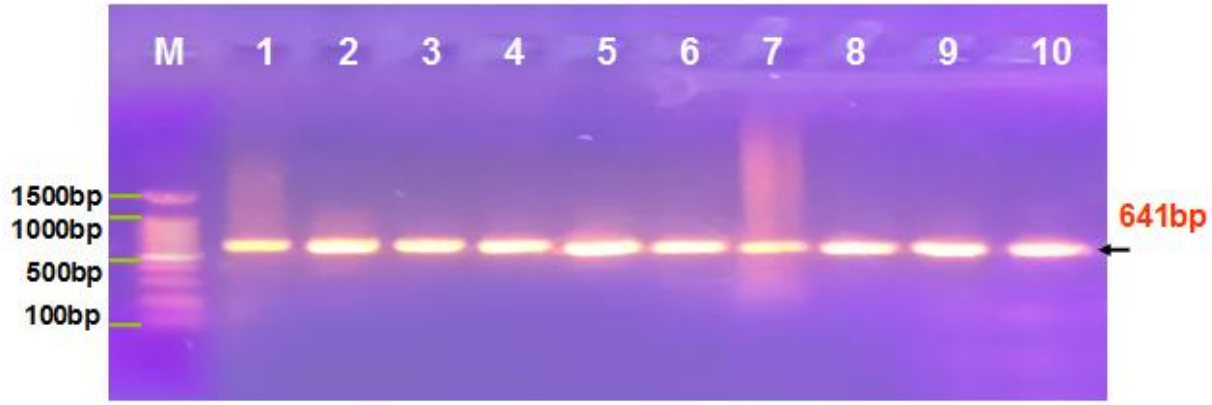
شكل (4-14) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) لنواتج تضخيم جين *ermB* 314 pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولتية وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات الكاملة لجين *ermB* .



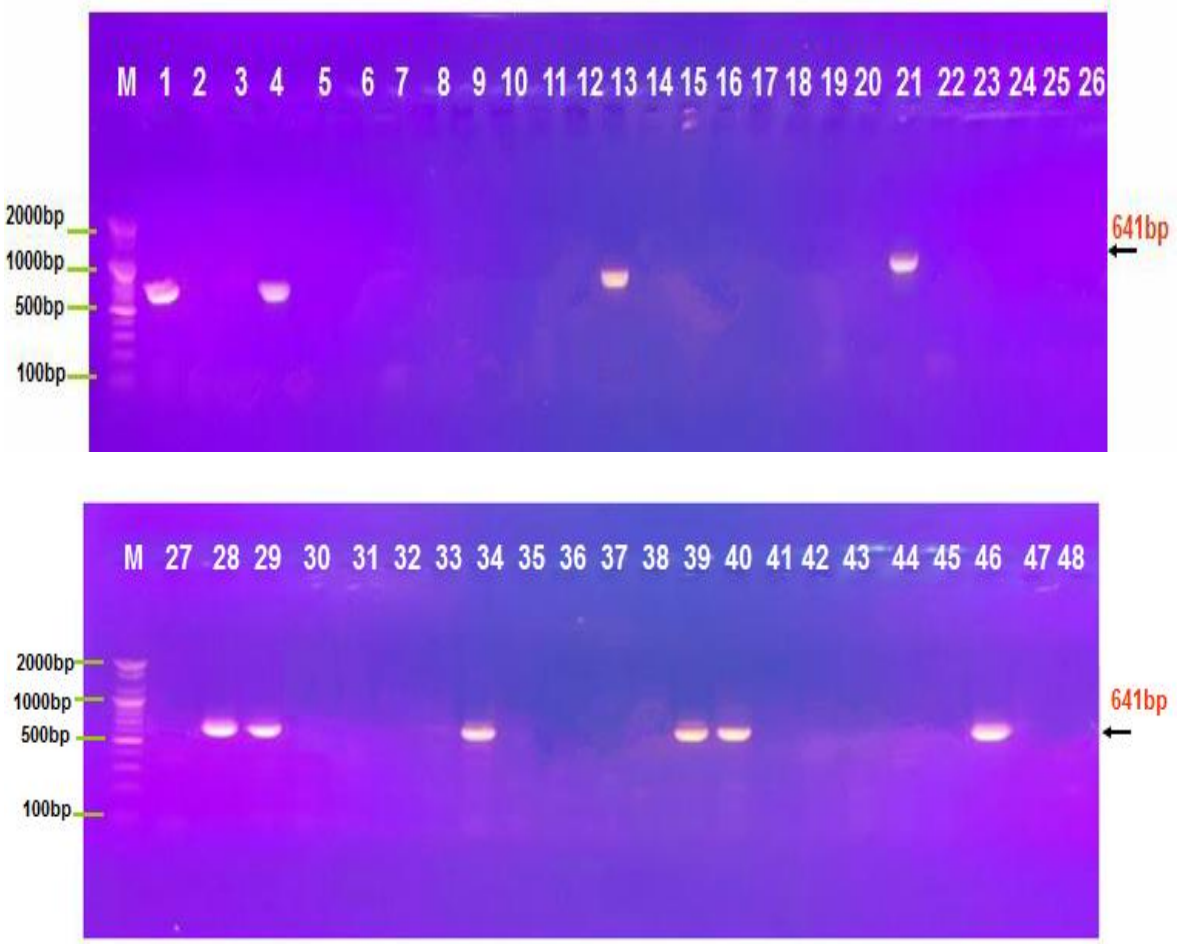
شكل (4-15) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) لنواتج تضخيم جين *ermC* 410 pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولتية وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات (1-10) موجبة لفحص 410 bp لجين *ermC* .



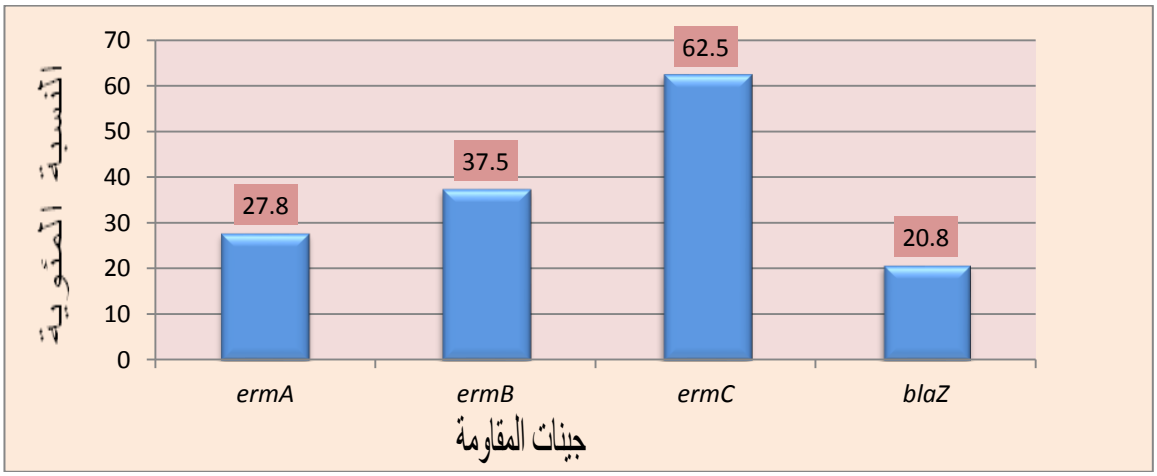
شكل (4-16) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) لنواتج تضخيم جين *ermC* 410 pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولتية وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة : الدليل الحجمي للـDNA والعزلات الكاملة لجين *ermC* .



شكل (4-17) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) لنواتج تضخيم جين *blaz* 640pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولتية وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة : الدليل الحجمي للـ DNAوالعزلات (1-10) موجبة لفحص 640 bp لجين *blaz* .



شكل (4-18) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1.5%) لنواتج تضخيم جين *blaz* 641pb لعزلات *S. lentus* بفرق جهد 100 فولتية وتيار80 امبير ولمدة ساعة واحدة والاعمدة : الدليل الحجمي للـ DNAوالعزلات الكاملة لجين *blaz* .



(الشكل4-19) النسب المئوية لجينات المقاومة لمضادات البيتالاكتام والارثرومايسين .

اشارت Naela (2014) في دراسة اجرتها على العنقوديات ان نسب الكشف عن جينات *erm* ذات العلاقة بمقاومة المضادات الحيوية بأستخدام تقنية الـ PCR في 36 عزلة حيث اتفقت الدراسة وجود الجين *ermA* بنسبة 25% وخالفت كل من *ermC* حيث وجد بنسبة 30.6% و *ermB* ظهر بنسبة منخفضة ، وكانت نتائج الدراسة مقاربة للنتائج التي حصل عليها كل من Simeoni وجماعته (2008) حيث وجد في 66 عزلة من العنقويات الموجبة والسالبة للانزيم المخثر انها تحتوي على *ermC* بنسبة 75.8% و اما *ermB* فكانت نسبته 56.1% و مع انخفاض نسبة *ermA* حيث كانت نسبته 10.6 % .وفي دراسة اجراها Khan وجماعته (2002) وجد ان عدد كبير من العزلات البكتيرية العنقودية المقاومة لمضاد الارثرومايسين تحتوي على *ermC* بنسبة مرتفعة وهذا الجين في كثير الاحيان يقع على البلازميدات الصغيرة small multicopy plasmids و *ermB* يكون محمول على الجينات الاقترانية القافزة وهذا ما يفسر ارتفاع نسبة *ermB* وانخفاض نسبة *ermA* في العنقوديات السالبة للانزيم المخثر للبلازما .وفي دراسة أجراها Martineau وجماعته (2000) في كندا وجد ان*ermA* هي 20.9% و*ermC* هي 66%. كما وجدوا Farid وجماعته (2015) وجد ان نسبة *ermA* هي 23%، وفي دراسة قام بها Westh وجماعته(1995) في الدنمارك حيث وجد ارتفاع نسبة جين *ermC* في عزلات CONS على جين *ermA* وانخفاض جين *ermB* . وبين Rays وجماعته (2007) ان جينات *ermC* هي السائدة في 23 عزلة من المكورات السالبة للانزيم المخثر للبلازما وبنسبة (85.2%) و*ermA* بنسبة (14.8%) و *ermB* بنسبة (3.7%) .وفي دراسة لـ Lina وجماعتها (1999) وجدت *ermA* بنسبة (63.2%) و*ermC* (44%) و *ermB*بنسبة (1%).

يعزى سبب مقاومة بكتريا *S. lentus* للمضادات البيتالاكتام قيد الدراسة الى وجود المجموعة الجينية المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز في العزلات البكتيرية المدروسة وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة Asfour و Darwish (2011) ، حيث بينت نسبة الكشف عن جينات *blaZ* المقاومة لمضادات البيتالاكتام بأستخدام تقنية الـ PCR في 118 عزلة من العنقوديات الموجبة و CONS لوحظ وجود الجين *blaZ* بنسبة (22.9%) من 27 عزلة بكتيرية CONS، واتفقت نتائج الدراسة مع Farid وجماعته (2015) حيث تم الكشف عن جين *blaZ* المسوؤل عن مقاومة البكتريا لمضادات البيتالاكتام في 3 عزلات بكتيرية وكانت نسبته (23%) . وخالفت نتائج دراستنا نتائج كل من Simeoni وجماعته (2008) حيث كانت نسبة *blaZ* في العنقوديات (63.6%) و Sawant وجماعته (2009) كانت النسبة (62%) في بكتريا (CONS).

إنَّ إنتاج إنزيمات البيتالاكتام يُشفَّر له بوساطة مورثة خاصة تُعرف بمورثة *blaZ*14 والتي غالباً ما تكون محمولة على البلازميد وإنَّ وجود المضاد الحيوي يعمل على تحفيز إنتاج إنزيمات البيتالاكتام وهذا يؤكد على أهمية دور تعاطي مضادات البيتالاكتام في تحفيز المقاومة البكتيريَّة لتلك المضادات (Zhang *et al*., 2001).

6-4 : المعايير المناعية : Immunological parameters

1-6-4 : تقدير مستوى الحركي الخلوي IL-17 **في مصل مجموعة الدراسة**

Estimate the level of IL- 17 concentration in the serum of the study group

اوضحت نتائج الدراسة الحالية (الجدول4-4) وجود ارتفاع معنوي في تركيز الحركي الخلوي17 حيث بلغ لدى مرضى الفشل الكلوي الغير مصابين ببكتريا *S. lentus* 336.1±39.7 pg/ml عند المقارنة مع مرضى الفشل الكلوي المصابين بالبكتريا والذي بلغ 177.1±17.3 pg/ml والأشخاص الاصحاء pg/ml 90±12 حيث نلاحظ ان مستوى هذا الحركي الخلوي كان اكثر ارتفاعا لدى مرضى الفشل الكلوي الغير مصابين بالبكتريا، كما نلاحظ هنالك ارتفاع لدى المرضى الفشل الكلوي والمصابين بالبكتريا قياسا بمجموعة السيطرة . و(الشكل 4-20) يوضح النسب المئوية لجينات المقاومة لبكتريا *S.lentus* حيث وجد ان نسبة جين erm C في العزلات المرضية بلغت 32/21 (65.62 %) و جين erm B بلغت 32/12 (37.5 %) و جين erm A بلغت 32/9 (28.12 %) و blaZ بلغت 32/6 (18.75 %) والتي سببت ارتفاع في مستوى الحركي الخلوي17 يقدر بـ 177.1±17.3 pg/ml عند مقارنته بمجوعة السيطرة pg/ml 90±12 ،و(الجدول4-5) يوضح ارتفاع الحركي الخلوي17 لدى مرضى الفشل الكلوي والمصابين بالبكتريا قياسا بمجموعة السيطرة ، ان ارتفاع الحركي الخلوي17 يعود الى ان البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية المرافقة للإصابات المرضية تكون اكثر ضراوة وامراضية وشده من البكتريا الحساسة لصعوبة معالجتها بسبب وجود جينات المقاومة للمضادات الحيوية وان المرضى الراقدين في المستشفى والمستمرين بالمراجعة الى المستشفيات يعتبرون اكثر اكتساب او الإصابة بالبكتريا الحاملة لجينات المقاومة لمضادات البيتالاكتام وجينات المقاومة للماكروليدات كما ان الجهاز المناعي يكون اكثر تحفيز ويكون مستوى الحركيات الخلوية قبل الخمج Pro-inflammatory cytokin اعلى مستوى من الإصابات الناجمة من البكتريا الحساسة للمضادات لكون الأخيرة تستجيب اسرع وبالتالي لا يضطر الجهاز المناعي المساهمة بالدفاع عن المضيف بشكل مفرط (Agarwal *et al*,2008).

جاءت النتائج متوافقة مع دراسة محلية اجرتها Al-Shibli (2015) والتي وجدت ان مرضى الفشل

الكلوي المصابين بداء الذئبة الاحمراري لديهم زيادة في مستوى IL-17 بفارق معنوي عن مجموعة السيطرة . وتتطابقت النتائج مع دراسة محلية في كربلاء اجرتها الخطيب (2015) والتي اوضحت ارتفاع مستوى الحركي الخلويIL-17 لدى مرضى الحروق المصابين بالاخماج المايكروبية مقارنة مع مرضى الحروق غير المخمجين ومع مجموعة السيطرة .كما توافقت النتائج مع Elewa وجماعته (2014) وهي تثبت وجود ارتفاع معنوي في مرضى الفشل الكلوي ويمكن ان يستعمل كمؤشر حيوي biomarker لفعالية الكلية . وتماشت النتائج مع دراسات اخرى والتي بينت وجود زيادة غير طبيعية في انتاج IL-17 في المرضى المصابين بالمرض مقارنة مع مجموعة السيطرة (Chen *et al*.,2010; Zhao *et al*.,2010) .

اوضحت دراسة Wang وجماعته (2011) ان الإنتاج الموقعي لـ IL-17 يعد جزء من الاستجابة المناعية الوقائية يقوم بها الجهاز المناعي لمرضى الديلزة البريتونية وان انتاجه بكميات كبيرة لدى المرضى عند حدوث خمج بريتوني يلعب دور مهم في انحسار الخمج والشفاء. واوضح Nakae (2002) ان انتاج IL-17 من قبل خلايا Th-17 يؤثر معنوياً على نضج الخلايا العدلة والخلايا وحيدة النواة وعلى زيادة اعدادها وانجذابها الى موقع الاصابة البكتيرية . وبنفس السياق بين الباحثون Cho وجماعته (2016) ان الفئران المصابة تجريبيا ببكتريا *S.aureas* والغير قادرة على انتاج IL-17 تعاني من تكرار الاصابة بالبكتريا وزيادة اعدادها وانتشارها وضعف قدرة الجسم على الشفاء مقارنة بالفئران المصابة بالبكتريا العنقودية والقادرة على انتاج IL-17.

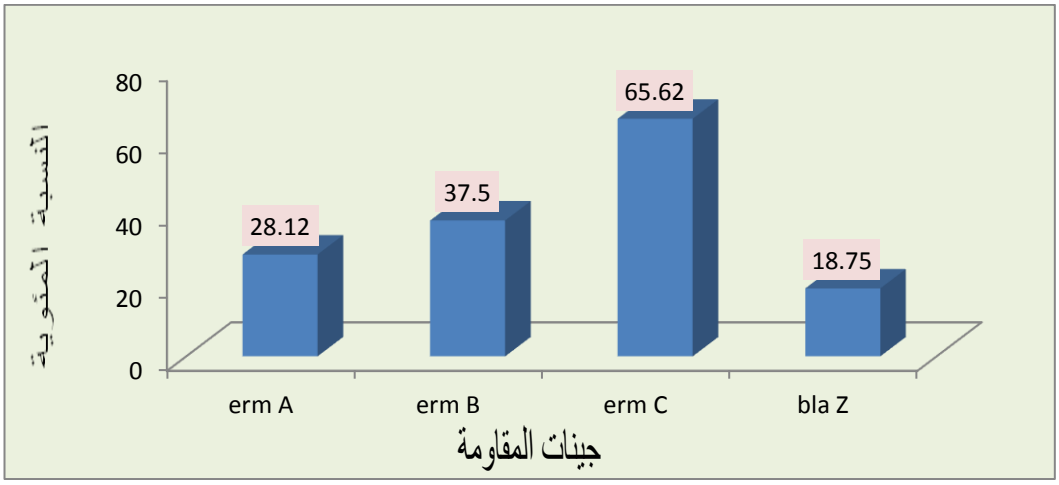
سجل Doreau وجماعته (2009) وجود زيادة في مستوى تركيزIL-17 امصال مرضى الفشل الكلوي مقارنة مع مجموعة السيطرة ويرتبط الارتفاع مع شدة المرض.اوضحت الكثير من الدراسات الى دورIL-17 في النشوء المرضي لمرض الفشل الكلوي واشارت الى ان المصابين يرتفع لديهم تركيز بروتينIL-17 ويؤدي انتاجه زيادة فعالية T cell، او قد يشير المسلك المتحصل من تمايز خلايا T cell الى خلايا منتجة لـ-IL 17، كذلك قد يكون نتيجة انحراف تمايز خلايا T cell، هذا بجانب ألاستجابة المناعية الكبيرة المحفزة من انتاج IL-6 وبروستوكلاندين E2 والعامل المحفز لمستعمرة الملتهمات – الحبيبية (Crispin *et al*., 2008) .

جدول (4-4) تقدير مستوى الحركيات الخلوية في مجاميع المرضى قيد الدراسة والاصحاء.

المجاميع المدروسة / الحركيات الخلوية	مرضى الفشل الكلوي غير المصابين بالبكتريا	مرضى الفشل الكلوي المصابين بالبكتريا	السيطرة	L.S.D
IL-17	336.1±39.7*	177.1±17.3	90±12	36.1
IL-27	50.7± 9.8*	86.6±6.5	187.7±34.6	19.8
IL-33	195±34	386.6±38.5**	51±11.4	22.6

*: ارتفاع معنوي عند غير المصابين بالبكتريا. ** : ارتفاع معنوي عند المصابين بالبكتريا.

* : انخفاض معنوي عند غير المصابين بالبكتريا.



الشكل (4-20) النسب المئوية لجينات المقاومة لبكتريا *S.lentus* المرضية المعزولة من العينات السريرية (منطقة الناسور الشرياني والدم والادرار) .

جدول (4-5) يوضح العلاقة بين مستوى 1L-17 في مرضى الفشل الكلوي والمصابين بالبكتريا والنسب المئوية لجينات المقاومة لبكتريا *S.lentus* المرضية.

مرضى الفشل الكلوي المصابين بالبكتريا	السيطرة (الاشخاص الاصحاء)	ermA	ermB	ermC	Blaz
177.1±17.3	90±12	28.12	37.5	65.62	18.75

4-6-2 : تقدير مستوى تركيز الحركي الخلوي IL-33 في مصل مجموعة الدراسة

Estimate the level of Interleukin 33 concentration in the serum of the study group

اظهرت النتائج المبينة في الجدول (4-4) ارتفاع معنوي في تركيز الحركي الخلوي 33 حيث بلغ لدى مرضى الفشل الكلوي المصابين ببكتريا *S. lentus* 386.6±38.5 pg/ml عند المقارنة مع مرضى الفشل الكلوي الغير مصابين بالبكتريا والذي بلغ 195±34 pg/ml و الأشخاص الاصحاء pg/ml 51±11.4 حيث نلاحظ ان مستوى هذا الحركي الخلوي كان اكثر ارتفاعا لدى الفشل الكلوي المصابين بالبكتريا والشكل (4-20)، كما نلاحظ هنالك ارتفاع لدى مرضى القصور الكلوي الغير مصابين بالبكتريا قياسا بمجموعة السيطرة. وفي (الجدول4-6) يوضح ارتفاع تركيز الحركي الخلوي33 لدى مرضى الفشل الكلوي والمصابين بالبكتريا قياسا بمجموعة السيطرة ، ويعود سبب التغاير في هذا الحركي الخلوي الى كونه من مجموعة IL-1 حيث ان تلك المجموعة تزداد معدلات انتاجها اثناء حالات الاعتلال المناعي والالتهابات والاخماج المختلفة. حيث ان الالتهابات الميكروبية تحفز خلايا البلاعم على اطلاق الوسائط الالتهابية مثل IL-1β و IL-12 و TNF-α وانواع اخرى من الحركيات قبل الالتهاب (Pro-inflammatory cytokine) من ضمنها IL-33 وتعتبر هذه الوسائط الالتهابية محفزات اساسية للجسم للاستجابة للإصابات والالتهابات الموضعية المختلفة وبالتالي سيزداد جريان الدم موضعيا وتزداد اعداد خلايا الدم البيضاء وتنجذب الخلايا العدلة الى المنطقة المتضررة لقتل الجراثيم(Munford and Pugin, 2001 ;Yang *et al.*,2016). اثبتت دراسة Li وجماعته (2014) ان طبقة البيتيدوكلايكان في الجدار الخلوي للبكتريا الموجبة لملون غرام لها القدرة على استحثاث العديد من السايتوكاينات قبل اللالتهاب مثل و IL-6

و IL-1β و α IL-1وTNF كما انها تسبب حدوث زيادة في تركيز انزيمات Cyclooxygenase و Inducible Nitric Oxide Synthetase (INOs) اللذان يعدان احد مسالك عملية البلعمة.

جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع دراسة جواد (2016) والتي اوضحت ارتفاع معدل IL-33 لدى مرضى الفشل الكلوي المصابين بالاخماج البكتيرية اذ بلغ 374.25 pg/ml عند مقارنتهم مع مجاميع السيطرة الموجبة والسالبة . كما جاءت النتائج مطابقة لدراسة Yin وجماعته(2013) الذي بين كفاءه IL-33 في حث الاستجابة المناعية المرتبطة بتنشيط الخلايا التائية نوع الثاني Th-2 والتي تنشط المناعة الخلطية ، كما بين الباحثين قدرة IL-33 في العمل كمضاد مايكروبي والمساعدة في شفاء الجروح حيث استخدموا فئران مصابة تجريبيا ببكتريا المكورات العنقودية وقاموا باعطائها IL-33 وجدوا ان الانترلوكين ثبط من نمو البكتريا وكذلك ساهم في جذب الخلايا العدلة الى موضع الاصابة للقيام بعملية القتل المايكروبي ولقد وجد Ross وجماعته (2002) عندما قام بحقن الفئران في المختبر بمستخلص متعدد السكريد الدهني LPS المعزول من البكتريا السالبة لملون غرام ان الجهاز المناعي يتحفز وينتج كميات من الساتوكينات قبل الالتهاب مثل IL-33 في مجرى الدم بسرعة كبيرة وذلك لتهيئة الجسم للاستجابة الالتهابية.

اثبتت دراسة Ghaffar وجماعته (2007) قدره اوكسسيد النتريك في القضاء والتخلص من بكتريا المكورات العنقودية ، في حين اظهرت دراسات كل (MacMicking *et al.*,1997; Vouldoukis *et al.*,1995) ان للعديد من الحركيات الخلوية مثل IL-1 , INF-y القدرة على تنشيط اوكسيد النتريك والذي بدوره ينهي العديد من الاصابات المايكروبية وفي نفس الاتجاه جاءت دراسة Gong وجماعته (2012) و Choi وجماعته (2012) واثبت ان IL-33 والذي يعد احدث افراد عائلة IL-1 له نفس الكفاءة في استحثاث الخلايا البلعمية وتنشيط عملية قتل البكتريا من خلال تنشيط دور اوكسيد النتريك .

جاءت نتائج دراسة Li وجماعته (2014) لتثبت كفاءة IL-33 الذي ينتج من خلايا البلعمية في استحثاث الدفاعات المناعية ضد الاصابات الجلدية ببكتريا المكورات العنقوديه الذهبية لامتلاك الأخيرة طبقة (Lipotechoic acid وpeptidoglycane) في الجدار الخلوي للبكتريا والتي تحث على انتاجه كما اكدت الدراسة على قدرة الخلايا الاندوثيلية على تنشيط اوكسيد النتريك والقيام بعملية قتل البكتريا العنقودية .

جدول (4-6) يوضح العلاقة بين مستوى 1L-33 في مرضى الفشل الكلوي والمصابين بالبكتريا والنسب المئوية لجينات المقاومة لبكتريا *S.lentus* المرضية.

مرضى الفشل الكلوي المصابين بالبكتريا	السيطرة (الاشخاص الاصحاء)	ermA	ermB	ermC	blaz
386.6±38.5	51±11.4	28.12	37.5	65.62	18.75

3-6-4 : تقدير مستوى الحركي الخلوي IL-27 في مصل مجموعة الدراسة

Estimate the level of Interleukin 27 concentration in the serum of the study group

اظهرت النتائج الموضحة (الجدول 4-4) ان هنالك انخفاض معنوي واضح في تركيز IL-27 في المجاميع المدروسة مقارنة بمجموعة السيطرة حيث تبين كذلك ان هنالك ارتفاع ملحوظ في تركيز هذا العامل بين مجاميع مرضى الفشل الكلوي والمصابين ببكتريا *S.lentus* 86.6±6.5 pg /ml قياسا بمرضى الفشل الكلوي غير المصابين بالبكتريا 50.7± 9.8 pg /ml على الرغم من ان معدل هذا الحركي الخلوي سجل انخفاض معنوي ملحوظ لدى المجموعتين عند مقارنتهم مع الاصحاء 187.7±34.6 pg /ml(الشكل4-20) و(الجدول4-7). لوحظ ان مرضى الفشل الكلوي المصابين بالبكتريا لديهم ارتفاع في حالة وجود الاخماج في هؤلاء المرضى حيث ان الجهاز المناعي يكون اكثر ضررا وان الاصابات لديهم مهددة للحياة حيث بين Abdallaوجماعته (2015) ان IL-27 يلعب دور رئيسي في الاستجابة المناعية الذاتية والمكتسبة حيث بين الباحثون ان لهذا الحركي الخلوي القدرة على تحفيز انتاج العديد من الوسائط الالتهابيه ومنها INF- Y من الخلايا التائية وخلايا المناعة الذاتية كالبلعمية (Macrophage) والعدلة (Neutrophils) المحفزة به. يعود هذا الانترلوكين الى مجموعة IL-12 ويتميز بخصائص مزدوجة قبل وضد الالتهاب في تنظيم الاستجابة المناعية (Wang *et al.*,2008) . يقوم IL-27 بالتآزر مع IL-12 لتعزيز انتشار خلايا CD4 T + الاصلية وليس المذاكرة وإنتاج IFN-γ من الخلايا القاتلة الطبيعية والخلايا CD4+T مما يشير إلى أن لهذا الحركي IL-27 وظيفة كحركي خلوي قبل الالتهاب (Hall *et al.*,2012; Pflanz *et al.*,2002) .

جاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع جواد (2016) والتي اوضحت ارتفاع معدل IL-27 لدى مرضى الفشل الكلوي المصابين بالاخماج البكتيرية اذ بلغ 78.41 pg/ml عند مقارنتهم مع مجاميع السيطرة الموجبة والسالبة . Pirhonen وجماعته (2007) أذ اوضحوا ان التعرض للاصابات البكتيرية كالاصابة ببكتريا *E.coli , Sallmonella entiriticae* تحفزعلى انتاج IL-27 لما تمتلكه في جدارها من مكونات LPS وكذلك التعرض للبكتريا الموجبة لملون غرام *Listeria monocytogenes* ايضا ترفع من مستوى IL-27(Hirahara *et al*.,2012). كما وجد الباحث Robinson وجماعته (2010) ان الفئران الفاقدة IL-27 تجريبيا يرافقها اختزال في انتاج الاضداد والاضداد الذاتية وبالتالي يقلل من شدة التهاب حويض الكلية .

جدول (4-6) يوضح العلاقة بين مستوى 1L-27 في مرضى الفشل الكلوي والمصابين بالبكتريا والنسب المئوية لجينات المقاومة لبكتريا *S.lentus* المرضية.

مرضى الفشل الكلوي المصابين بالبكتريا	السيطرة (الاشخاص الاصحاء)	ermA	ermB	ermC	blaz
86.6±6.5	187.7±34.6	28.12	37.5	65.62	18.75

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات .....Conclusion

1- إن نسبة الإصابة لمرض الفشل الكلوي في الاناث كانت أعلى منها في الذكور والفئة العمرية (60-69) سنة كانت الأكثر عرضة للإصابة بالمرض مما يشير الى ان المرض يزداد في كبار السن بسبب امراض الشيخوخة وضعف المناعة .

2- تعد كل من بكتريا *E. coli* المسببة لخمج السبيل البولي وبكتريا *S. aureus* و *S. lentus* المسببة لتجرثم الدم هي الاكثر شيوعاً.

3- ارتفاع نسبة المكورات العنقودية السالبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم في العزل السريري والعزل البيئي .

4- مقاومة بكتريا *S. lentus* للعديد من المضادات الحيوية الشائعة الأستعمال طبيا وان البكتيريا بدأت تزداد نسب عزلها من الحالات السريرية مما يدل على قدرتها على تشكيل عامل مسبب جديد للإصابات البشرية .

5- ارتفاع نسبة جين*ermC* في بكتريا *S. lentus* عن باقي جينات المقاومة للمضادات الحيوية (*ermB* وجين *ermAC* وجين *blaz*) .

6- ارتفاع تركيز IL-33 و IL-17 مقابل انخفاض تركيز IL-27 لدى المرضى المصابين ببكتريا *lentus S.* مقارنة مع المرضى غير المصابين بالبكتريا وهذا يوجز خطورة الإصابات البكتيرية في تداعي حالة المريض صحيا .

التوصيات .....Recommendations

1- اجراء دراسات مسحية دورية في المستشفيات لمتابعة مستوى التلوث المايكروبي وتحديد مصادره والتغيرات الوراثية الحاصلة على البكتريا وخاصة مقاومتها للمضادات الحيوية .

2- دراسة أنواع البكتيريا المرافقة لمرضى الفشل الكلوي بعينات اكبر .

3- دراسة بعض المعايير المناعية لمرضى الفشل الكلوي قبل وبعد عملية الغسيل الدموي وتحديد تراكيز الأجزاء في مصل دم المرضى بطريقة الترحيل الكهربائي .

4- الاهتمام بدراسة *S. lentus* لاظهار دورها الامراضي في الأخماج المكتسبة من المستشفيات .

5- استخدام بعض التقنيات الوراثية الحديثة في تعزيز عملية تشخيص وتصنيف البكتريا المرضية .

المصادر

References

المصادر العربية :

١- **الحميداوي ، طالب فالح حسن (2005)**.النشاط الهيمولايسيني لبكتريا ايشيريكيا القولون المسببة لالتهاب المجاري البولية ومقاومتها لمضادات الحياة.اطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية– العراق.

٢- **الخطيب ، ضواء محمد صلاح (2015)** .دراسة تشخيصية لبكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من مضى الحروق باستخدام الطرق البايولوجية والوراثية مع تقييم الحالة المناعية للمصابين . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة كربلاء – العراق.

٣- **الفحام ، علي عبد الزهرة (2014)**. دراسة بعض التغيرات الفسلجية والكيموحيوية المرافقة لمرضى الفشل الكلوي تحت الديلزة الدموية في محافضة النجف الاشرف .اطروحة دكتوراه . كلية العلوم ،جامعة الكوفة –العراق .

٤- **الليلة ، آلاء محمد طيب .(2004)** .مستوى هرمون جنيب الدرقية وبعض المتغيرات في مصل دم مرضى العجز الكلوي المزمن المعالجين بالديلزة الدموية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل – العراق.

٥- **المرجاني ، محمد فرج (2011)** . المضادت الحيوية . المقاومة ال البكتيرية للمضادات الحيوية . الطبعة الاولى . دار دجلة .عمان 255.

٦- **جواد ، هدى محمد كاظم .(2016)** .تقييم بعض الجوانب المناعية في المرضى المعتلين مناعيا والمصابين بالاخماج الجلدية في كربلاء. رسالة ماجستير.الاحياء المجهرية .كلية العلوم ، جامعة كربلاء–العراق .

٧- **سليمان ، سمية جعفر حميدي ، اسماعيل، علي اسماعيل ، صلاح جابر فريني ، د. احمد ادم احمد (2014)** . ممارسة النشاط البدني والصحة للكبار وامراض العصر ؛ جامعة السودان للعلوم والتكنلوجيا. email.sumia.58@hotmail.com

٨- **فلفل ، عادل عبادي (2010)**. بعض المؤشرات الجرثومية والمناعية لدى مرضى الفشل الكلوي المزمن.رسالة ماجستير . الاحياء المجهرية .كلية العلوم ، جامعة بابل–العراق .

References:

Abdalla1, E. , Li, Q., Xie,L.and J Xie,J.(2015). Biology of IL-27 and its Role in the Host Immunity against Mycobacterium Tuberculosis Abualgasim Elgaili. Int. J. Biol. Sci . 11(2): 168-175.

Abramowicz, M. and Zuccotti, G.(2005). Antibacterial Drugs:A Breief Summary For Quick Reference. Handbook of Antimicrobia Therapy.17th ed. New Rochelle.USA: 7-9.

Abroug F. Brenner M. .; Zhon, Y.; Gadina, M.; Lipsky , P.and Sigel, R. (2010). An 0fficial ATS/ERS/ESICM/SCCM/SRLF Statement : Prevntion and Management of Acute Renal Failure in the ICU Patient.American Thorcic Society Documents.USA.

Agarwal R.C. ; Misara R.K. and Agarwal A.(2008). Interlukin 17 leveis are increased in juvenile idiopathic arthritis synovial fluid and induce synovial fibroblast to produse proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases .JRheumatol .,35:515-9.

Aires, D.S ; Santos, M.L. and Lancaster, H.D. (2000). Epidemiological study of Staphylococcal colonization and cross-infection in two west African hospital .Microb .Drug .Resist .*6*:133-141 .

Albanesi ,C. ; Cavani, A. and Girolomoni, G. (1999). IL-17 is produced by nickelspecific T lymphocytes and regulates ICAM-1 experssion and chemokine production in human keratinocytes , synergistic or antagonists effects with IFN –Gamma, and TNF-alpha.JImmunol ., .*162(1)*:494-502 .

Al-camo, I.E. (2001). Fundamental of Microbiology . 6thed . Jones and Bartelett. London. UK : 25-34.

Alcaraz,I.E;Satorres ,S.E. ;Lucero,R.M;Puig,S.K. and liu ,T.K. (2003). Species identification slime production and oxacillin susceptibility in coagulase-negative staphylococci isolated from nosocomial specimens .Bras .J. Microbiol.19,:875–879.

Al-Ghrairy , Z.A. (2007). Comparative study on some pathological aspects between *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus saprophyticus.* M.Sc. Thesis. University of Baghdad , College of Science: 5-14

Al-Hasani ,H.M.(2011).Comparative study between methicillin resistant coagulase positive and negative staphylococci.M.SC.Thesis of science. University of Baghdad.

Al-Hasnawi,H.(2013) . Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from different clinical cases M.Sc. Thesis. University of Qadisiya , College of Medicne: 5-14.

Al-Heety, A.S.F. (2005). Role of peptidoglycan in pathogenicity *Staphylococcus saprophyticus* . M.Sc. Thesis . University of Baghdad , College of Science:5-17**.**

Allou, N. ;Cambau,E. ;Massias,L. ;Chau,F. and Fantin ,B.(2009). Impact Low – Level Resistance to Fluoroquinolones Due to *qnrAl* and *qnrSl* Genes or *agyrA* mutation on ciprofloxacin Bactericidal Activity in a Murine MODEL of *E.coli* Urinary Tract Infection . Antimicrob. Chemother. 53 (10): 4292-4297.

Al-Mamouri, L. (2016). Immunological and Mlecular aspects of locally isolated *Pantoea* spp. Ph.D. Thesis . University of Kufa , College of Science.

Al-Mazroea, A.H . (2009). Incidence and Clinical Significance of Coagulase Negative Staphylococci in Blood. Journal of Taibah University Medical Sciences, 4:137-147.

Al-Shibli,N. (2015). Evaluation of some immunological markers in patients with lupus nephitis . M.Sc. Thesis. University of Kufa , College of Science.

Al-Tameemi,A.(2010). Genetic Study of the vancomycin-Resistant *Staphylococcus* spp. M.Sc. Thesis. University of Diyala ,College of Education for Pure Science:3-27.

Amore , A . and Coppo , R . (2002). Immunological basis of Inflammation in dialysis. Nephrol . Dia . Transplant. 17 (8): 16 – 24.

Anaizi, N. (2002). Vancomycin.The drug monitor.,16 (5) : 513- 518.

Andreoli , T.E. ; Carpenter , C.C. ; Griggs, R.C. and Loscalzo, J. (2004) Cecil essentials of medicine . 6th ed ,W.B. Saunders Company .

Ansari, A.G. (2003). Hypertensive kidney disease. JAMA, 13 (2): 110.

ANZDATA.(2010). The Thirty Third Report, S. McDonald, L. Excell and B. Livingston, Editors., Australia and New Zealand Dialysis and Transplant Registry: Adelaide, South Australia.

Arakawa, Y.; Murakami, M.; Suzuki, K.; Wacharotayankun, R.; Ohsuka, S.; Kato, N. and Ohta, M. (2000). A novel integron-like element carrying β-lactamase gene bla_{IMP}. Antimicrob. Agents Chemother. *39*:1612-1615

Asangi ,S.Y.; Mariraj, J. ; Sathyanarayan, M.S. ; Nagabhushan, and Rashmi ,A. (2011). Speciation of clinically significant Coagulase Negative Staphylococci and their antibiotic resistant patterns in a tertiary care hospital. Int. J. Biol. Med. Res., 2(3):735-739.

Asbel, LE. ; and Levison, ME. (2000) . Cephalospoorins , Carbapenems and monobactams . Infect Dis Clin North Am 14: 435 .

Asfour,A and Darwish, S.(2011).Phenotypic and Genotypic Detection of both mecA-and blaZ- Genes Mediated β-lactam resistanc in *Staphylococcus* strains isolated from Bovine Mastitis .Global Veterinaria 6(1):39-50.

Astor, B.C.; Muntner, P.; Levin, A.; Eustace, J.A. and Coresh ,J. (2002) . Association of kidney function with anemia. JAMA, 2 (5): 39.

Atlas, R.M. (1995). Pathogenesis of Infectious Diseases In : Principles of Microbiology. P. 505-509. 1st ed. Mosby-yearbook, Inc. St. Louis. Baltimore.

Awasthi , A.; Carrier, Y. and Peron, J. (2007) . "A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells,"Nature Immunology. 8(12):1380–1389.

Bagdasarian, N.; Heung, M. and Malani, P.N.(2012). classification of chronic kidney disease: a position statement excercises in microbiology 3rd ed. WCBMC Graw .

Barros, EM. ;Ribeiro, H. ; Carolina,A. ; daCosta , M. and Santos ,D. (2011). Microorganisms prevalent in urinary tract infection and anti Microbial sensitivity profile :analysis of patient attended at the military police Hospital of the state of Goias.Health sci INST :29(4):243-7.

Bannerman, T.L. (2003). *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase positive cocci that grow aerobically. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Pfaller, M.A.; and Yolken, R.H.(eds.). Manual of Medical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, : 384-404.

Bao, Y.; Na, S.; Zhang, P.; Chan, L .;Yuan ,Y .; Hong, M. and Juan, X. . J (2012). Characterization of Interleukin-33 and Soluble ST2 in Serum and Their Association with Disease Severity in Patients with Chronic Kidney Disease. Clin Immunol 32: 587. doi:10.1007/s10875-011-9622-7

Baron, E. J.; Murray, P. R. and Pefaller, M. A.; Tenver, F. C. and Yolke, R. H. (1999). Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. American Society for Microbiology. U.S.A.

Baron, E.J.; Peterson, L.R. and Fingold, S.M. (1998). Diagnostic microbiology. "15th ed".The C.V.Mosby Co. Toronto. Canada.

Bendahou, A. ; Lebbadi, M. Ennanei.L. ; Essadqui ,F.and Abid,M.(2008). Characterization of *Staphylococcus* species isolated from raw milk and milk products (lben and jben) in North Morocco.

Biffl,W. ;Moore,E. ; Moore,F. ;Frederich,A. and Peterson,V.(1996) . Interlukine-6 in the injured patient,marler of injury or mediater of inflammation Annals of surgery ,224(5):647-664.

Bilezikian, J.P.;Khan, A.A and Potts, J.T.(2009) . Guidlines for the mangment asympomatic primary hyperparathyroidism: summary stetment from the third international workshop.G Clin Eindocrinol Metab. feb.94(2):335-9.

Boenisch, O. ;Ehmke , E. D.; Heedergott, A.; Naoum, C.; Frei, U.; and Schindler,R.(2002).C-reactive protein and Cytokine plasma level in hemodialysis patients.J.Nephrol .15(5):547-51.

Bouchami,O. ;AchourmW. And Ben-Hassen,A.(2011). Species distribution and antibiotics sensitivity pattern of coagulase-negative staphylococci other than *Staphylococcus albus* isolated from various clinical specimens .Afr.J. Microbiol.5(11):1298-1305.

Bradford, P.A. (2001). Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev. 14: 933-951.

Branski ,L. ;Almousawi,A. ; Lansac, N. ; Ménard, C. and diar , F. (2009). Emerging infection in burns . Burns infect ,10:389-97.

Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2004). Jawetz, Melnick And Adelberg's Medical Microbiology. 23th ed .McGraw-Hill. New York. U.S.A.

Brooks, G.F.; Carroll, K.C.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2007). Jawetz, Melnik and Aldelberg's medical microbiology. 24rd ed. Lange Medical Books. McGraw- Hill.

Brown,W.(2014). The Stages of chronic kidney disease . PKD National Convention , http://kidney.niddk.nih.gov/kudiseases/pubs /polycystic/

Bush, K.; Jacoby, G.A.; and Mederios, A.A. (1995). A functional classification scheme for β-lactamase and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Chemother. 39 (6): 1211-1233.

Cabay ,C.;and Kushner,I .(1999). Acute -phase protein and other systemic responses to inflammation .N.Engl.J.med.340(6):448-454.

Carriere ,V.; Roussel ,L.; Ortega ,N.; Lacorre, D.; Americh ,L.; and Justice ,L. (2007). IL-33the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 282–287.

CDC WEB SERCH AT http://www.cdd.gov/serch.htm (1998**).**

Cecil, A. ; Ausiello, D. and Goldman, L . (2007) . Textbook of Medicine. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier cells in chronic renal failure. Anna. Med. Acade.; 49 (suppl. 1)

Chambers , H.F .(2001). The changing epidemiology of Characterization of clinical isolation of members of the *Staphylococcus sciuri* groups J Clin Microbial. 2005;43(2):956-958.

Chang, S.; Sievert, D. M. ; Hageman, J. C.; Boulton, M. L.Tenover, F. C; Downes, F. P.; Shah, S.;Rudrik, J. T. ; Pupp, G. R. Brown , W. J. ; Cardo, D. and Fridkin, S. K.(2003) Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. N. Engl. J. Med. 348:1342–1347.

Checheriţă, I . A .; Flavia Turcu , R . F.; and Dragomirescu , A . C . (2010) Chronic complications in hemodialysis: correlations with primary renal disease . Romanian . J . Morphol Embryo l.51:21-26 .

Cherifi, S.; Byl B.; Deplano, A.; Nagant, C.; Nonhoff, C. and Denis, O, (2014) . Genetic characteristics and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related blood stream infections and from colonized healthcare workers in a Belgian hospital. Ann Clin Microbiol Antimicrob.; 13:20.

Chen,x. .;Yu,Y. .;Deng ,H. and Wu,Y. (2010) . PlasmaIL-17A is increased in new –onset SLE patients and Associated with disease activity .J Clin Immunol. .,30:221-225.

Choi, Y.S. Choi ,H.J. Min, J.K. Pyun, B,J. and Maeng, Y.S,. (20012) .Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. Blood 114: 3117–3126

Cho,S.;Pietras,M.;Garcia,C .; Ramos,M.; Farzam,M.; Monroe,R.; Magorien,D.;Blauvelt,J.; Kolls,K.; Cheung,L.;Cheng,H. and Miller,E.(2016). IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. The Journal of Clinical Investigation http://www.jci.org.

Christof, V.E.; Richard, A.; Proctor, M.D. and George, P. M. (2001). Coagulase-negative *staphylococci pathogens* have major role in nosocomial in reactions.*110*(4):63-76.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 22nd informational supplement M100-S22. Vol. 31. Wayne, PA: CLSI.

Cohen, G.; Hörl, W.H. (2012). Immune dysfunction in uremia—an update. Toxins. Journal.4.(11):962-90.

Collee , J.G .; Fraser , A.G .; Marmian , B.P . and Simmon ,A. (1996) . Mackie and McCartney medical microbiology . 14th ed , The Churchill living stone . Inc . USA .

Cooper, B.S.; Medley, G.F.; Stone, S.P.; Kibb1er, C.C.; Cookson, B.D.; Roberts , J.A.; Duckworth, G.; Lai, R.; and Ebrahim, S.(2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and the community: Stealth dynamics and control catastrophes. Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) of the USA .101(27): 10,223-8.

Cooper, M.(2009). IL-17 and anti-bacterial immunity: protection versus tissue damage . 39(3): 649–652.

Costa, E. (2008). Resistance to recombinant human erythropoietin therapy in haemodialysis patients. Doctor of philosophy, Faculdade de Farmacia, universidade do porto. P.1-194.

Craig , C., and Stizel , R. (2004). Modern Pharmacology with clinical Applications .sixth Edition: 140-152.

Crsipin ,J.C. ;Oukka,M. **;Bayliss,G. ;Cohen ,R.A. ;Van Beek, C.A. and Stillman ,I.E. (2008)** . Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infilterate the kidney . J ,Immunol .,181(12):8761-6 .

Cruse, J. M. and Lewis, R. E. (2004). Atlas of Immunology. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. International Standard. Second Edition. Book Number 0:8493-1567.

Dakic I, Eady, E.; Ross, J.; Tipper, J. and Noble, W.(2005). Survey of genes encoding staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin 1, and exfoliative toxins in members of the *Staphylococcus sciuri* group. J. Clin. Microbiol.43:4875– 4876.

Dakie, I., D. .; Morrison, D. .;Vukovic, B. .;Savic, A. .; Shittu, P. .;Jezek T. .; Hauschild,A. and S. Stepanovic.(2005). Isolation and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital environment. J. Clin. Microbiol. 43:2782–2785 .٤Derbise, A., S. Aubert, and N. El Solh.1.

Davidson`s , (2010). Principles & practice of medicine. 21st edition.New York. Churchil Livingston: 482-492 dialysis.;Pediatr. Nephrol. ; 22(10):1689–1702.

DiGiulio, M. .;Jackson , D. and Keogh ,J. (2007). Medical- Surgical Nursing : Demystified .McGraw –Hill Companies ,Ins.,USA.

Dinarello, C.A. (1997). Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogensis of septic shock. Chest, 112(6): 3215-3295.

Donica, H. (2001). Evalution of lipid peroxidation product vs proinflammatory cytokines in hemodialysis patients . Ren . Fail. 23(2): 231 - 8.

Doreau, A. .;Belot, A. .;Bastid. J, Riche, .;B. Trescol-Biemont, .;MC. Ranchin, B. .; Fabien, N. .;Cochat, P. .;Pouteil -Noble, C. and Trolliet ,P.(2009). Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. Nat Immunol.;10:778–785. [PubMed: 19483719]

Duah, M. (2010). Daptomycin for methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* native-valve endocarditis: a case report. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 9:9

Efuntoye ,M. ;Omotosho,O.and Ashidi,J.(2012).Prevalence methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci among male students in A private Tertiary institution and their Enterotoxin .Asian.J.pharm.Hea.Sci.1(2):231-234.

Ehmann, D.E. ; Jahić, H. ; Ross, P.L. ; Gu, R.F ; Hu, J. ; Kern, G. ; Walkup, G.K ; and Fisher, F.L. (2012) . Avibactam is a covalent reversible , non-β-lactam β-lactamase inhibitor. Proc Natl Acad Sci USA. 109(29): 11663-11668 .

Eiks,J. and Ganellin,R.(1991). Dictionary of drugs.London :Chapman and Hall.

Elew,E . ; Zakaria,O. ; Mohamed,E. and Boghdadi,G. (2014).The role of infections 4,17 and interferon gamma as biomarkers in patients with system lupus Erythematosus and their correlation with diserse activity .The Egyption .39:21-27.

Elseviers M and Van Waeleghem J. (2003). Identifying vascular access complications among ESRD patients in Europe. A prospective, multicenter study. Nephrology news and issues.; 17: 61.

Esmanhoto,G. ; Taminato,M. ; Fram,D. ; Belasco,A.and Barbosa ,D. (2013). Microorganisms isolated from patients on hemodialysis by central venous catheter and related clinical evolution . Original Article ; 26(5):413-20.

Estridge, B. and Reynolds, A. (2012). Basic Clinical Laboratory Techniques . 6Th ed. Delmar , Cengage Learning. USA , P. 356.

Fagade, O.E.; Ezeamagu, C.O.; Oyelade, A.A. and Ogunjobi, A.A. (2010). Comparative study of antibiotic resistance of *Staphylococcus* species isolated from clinical and environmental samples. J. Techn. Rep., 13(3): 165-169.

Faix¸ R. G.; and Champan¸ R. L. (2003). Persistent bacteremia and outcome in late onset infection among ESRD patients. J. Infect. Disease .22(1): 17-21.

Farid,A. ; Naz, F. ; Ashraf,A. ; Ali, B. v Rehman, A. ; Sarwar,Y and Abdul Haqu,A. (2015) .Molecular Detection of Antimicrobial Resistance in local isolates of *Staphylococcus epidermidis* from urinary tract infection in Faisal abad region of Pakstan . Excli Jour.;14:697-705 – ISSN 1611-2156 .

Fasih,N. ; Irfan,S. ; Zafar,A. ; Khan,E. and Hassan,R. (2010). Inducible clindamycin resistance due to expression of erm genes in *Staphylococcus aureus* report from afetrary care hospital Karachi abad Pakstan Jour.pak Med;60(9) :750-3.

Fathi, N. (2007). A study on some Virulence Factors of Coagulase Negative Staphylococci isolated from skin infection in Sullaimaniya hospitals. Master Thesis. College of Science, University of Baghdad.

Feher J. (2012). Quantitative Human physiology :An introduction.Academic press. p. 137.

Finch, R.G. (2006). Coagulase negative Staphylococci . In : Principles and practice of Clinical Bacteriology .(Gillepie, S.H. and Hawkey, P.M, eds) 2nd ed. John Wiley and Sons. Nottingham, UK .7(10):1002-9780.

Fitzgibbons, L.N.; Pulsmm, D.L .and Mackay, K. (2011). Management of Gram-Positive Coccal Bacteremia and Hemodialysis. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation.; 57: 624-640

Fluit,A.C.;Visser,M.R.;and Schmitz ,F-J .(2001). Molecular detection of antimicrobial resistantce. Clin.Microbiol. Rev., 14(4) : 836-871.

Forbes, B. A.; Sahm, D.F. and Wessifld, A. S. (2002). Bailey and Scotts' diagnostic microbiology. 9th ed. Mosby. U.S.A. Vol. 1: 509.

Franklin, D.L. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus* . J. Clin.Invest.*111*:1265-73.

Fritsche,T.; Swoboda,S.; Olson,B.; Moor,F.;Meece,J. and Novick, T. (2011). Evalution of the SensititrARIS2X and Veitek 2 Automated System FOR Identification of Bacterial Pathogens Recovered from Veterinary Specimens . Marshfield Iabs .LACOSSE.University of Wisconsim.

Gafa, V.; Lande, R.; Gagliardi, M. C.; Severa, M.; Giacomini, E.;Remoli , M. E.; Nisini, R.; Ramoni, C.; Di Francesco, P.; Aldebert , D.;Grillot, R.and Coccia, E. M. (2006). Human dendritic cells followingAspergillus fumiga-tus infection express the CCR7 receptor and a differential pattern of interleukin-12 (IL- 12), IL-23, and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response.Infect. Immun.74:1480 - 1489. : 430-438.

Guirguitzova, B., D. ; Chankova, and B. Zozikov.(2002). Staphylococci asuropathogens—frequency of isolation in hospitalized patients and sensitivityto antimicrobial agents. Ann. Urol. (Paris) 36:341–347.

Gales, **A., ;Jones, R. ; Andrade,S. ; Pereira, A. and Sader HS (2005).** In vitro Activity of Tigecycline, a New Glycylcycline, Tested Against 1,326 Clinical Bacterial Strains Isolated from Latin America. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 9(5):348-356.

Gandhi, B.V.; Bahadur, M.M.; Dodeja, H.; Aggrwal, V.;Thamba, A. and Mali, M.(2005). Systemic fungal infections in renal diseases. J. Postgrad. Med . Vol 51 Suppl 1:30-36.

Ganong's , W.F. (2010). Review of Medical physiology.23rd ed., McGraw-Hill Companies, Inc. Singapore. P 643-728 .

Garcia,I.A; Segura,A.M; Rodriquez,A.C; Perez,J.A and Gonzalez,M.D. (2005). Participation of epidermal Langerhans cells in human pathplogy and their potential as targets for drug development . proc. West. Pharmacol .48:13-20.

Garrett, D.O.; Jochimsen, E.; Murfitt, K. and Jarvis, W.R.(1999) . The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in Staphylococcus. spp. Infect. Cont. and Hosp. Epidemiol .20:167-170 .

Gary ,K. (2009) .Protein synthesis inhibitors: macrolides mechanism of action animation. Classification of agents Pharmamotion. The Community College of Baltimore County.

Gerard, L. ; Quaglia ,A. ; Reverdy, ME. ; Lequerq, R. ; Vandenesch, F. and Etienne, J. (1999) . Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother; 43 (5) 1062 – 1066.

Ghaffari, A. .;Jalili, R. .;Ghaffari, M. .;Miller, C. .;Ghahary, A. (2007). Efficacy of gaseous nitric oxide in the treatment of skin and soft tissue infections. Wound Repair Regen 15: 368–377

Gideon,H. and Flynn, A.(2016). Characterization of munomodulatory cytokine IL-27 in tuberculosis infection. The Journal of Immunology.1:169.

Golding, G.; Persaud ,N.; Levett, P.; McDonald, R.; Irvine, J. and Nsungu, M. (2012) . Characterization of Escherichia coli urinary tract infection isolates in remote northern Saskatchewan communities: The Northern Antibiotic Resistance Partnership. Diagn Micr Infec Dis.;74:242-7.

Gong, K.;Zhou, F.; Huang, H.; Gong, Y. and Zhang, L. (2012). Suppression of GSK3beta by ERK mediates lipopolysaccharide induced cell migration in macrophage through beta-catenin signaling. Protein Cell 3: 762–768.

Gotz, F.; T. and Schleifer, K. H. (2006). The Genera *Staphylococcus* and *Macrococcus.* In "The Prokaryotes. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (Eds.), " Springer New York,**4**: 5–75.

Greenwood, D.; Finch, R.; Davey, P. and Wilcox, M. (2007). Antimicrobial chemotherapy. Oxford University Press, New York.

Greer, N. D. (2006). Tigecycline (tygacil): the firstin the glycylcyclineclass of antibiotics.proc, Bayl univ med cent. 19 (2): p: 155-61.

Guilfoile, P.G.; Alcamo, E. and Heymann, D. (2007). Antibiotic Resistant Antbacteria. Infobase Publishing . New York.USA: 40-46.

Guyton ,A . C. and Hall .J .E .(2011). Text book of medical physiology. Philadelphia . USA , p 419.

Hall, AO.; Beiting, DP.; Tato, C.; John, B.; Oldenhove, G.; Lombana, CG .;Pritchard, GH.; Silver ,JS.; Bouladoux, N. and Stumhofer, JS. (2012). The Cytokines Interleukin 27 and Interferon-gamma Promote Distinct Treg Cell Populations Required to Limit Infection-Induced Pathology. Immunity.;37:511–523. [PubMed: 22981537].

Hamano, S.; Himeno, K. ; and Miyazaki, Y.(2003). "WSX-1 is required for resistance to Trypanosoma cruzi infection by regulation of proinflammatory cytokine production,"Immunity, 19 (5) : 657–667.

Han , E. ; Hwang, S. ; Kim, J. ; Shine, S. ; Jun, J. ; Chai, J. ; Park , Y. and Park, S. (2013). CPRMethicillin resistant coagulase-negative Staphylococci isolated from South Korean ducks exhibiting tremor.Acta Veterinaria Scandinavica, 55:88.

Harley, J.P. and Rescott, Z.M. (2002). Laboratory excercises in microbiology 3rd ed. WCBMC Graw Hill, New York

Hauschild, T. and Schwarz,S. (2003). Differentiation of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from free-living rodents and insectivores. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health 50:241– 246

Hauschild, T.; Lüthje, P, and Schwarz S.(2005). Staphylococcal tetracycline MLSBresistance plasmid pSTE2 is the product of an RSA-mediatedin vivo recombination. J. Antimicrob . Chemother.56:399– 402.

Hause, L.; Al-Salleeh, F. M.and Petro, T. M. (2007). Expression of27 p28 by Theiler's virus-infected macrophages depends on TLR3 and TLR7 activation of JNK-MAP-kinases.Antiviral. Res.76,159 – 167.

Heilmann, C. and Peters, G.(2000). Biology and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* . In: Fischetti, V.A.; Novick, R.P.; Ferrtti, J.J. (eds). Gram- positive pathogens. Washington . DC. :442-449 .

Himmelfarb,J.; Stenvinker,P.; Ikizier, T.A.; and Hakim,R.M. (2002) . The Elephant in uremia oxidant stress as aunifiying concept of cardiovascular disease in uremia. kidney .Int.62(5):1524-38.

Hirahara, K.; Ghoreschi ,K.; Yang, X.P.; Takahashi, H.; Laurence ,A. and Vahedi G, (2012). Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1. Immunity.; 36: 1017-30. doi:10.1016/j.immuni.

Hirmatsu, K. C . (1997). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduce vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother., 40:135-136.

Hofmann, S.R.; Ettinger, F.; Zhon, Y.; Gadina, M.; Lipsky , P.; Sigel, R.; Candott, F. and O'sheu , J. (2002). Cytokin and their role in lymphoid development differentiation and homeostasis. Curr. Opin. Allergy.Clin.Immunol.2(6):495-506.

Holger, R.; Mathios, K. and Dietrich, M. (2004). Detection of virulence-associated genes not useful for discrimination between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit . J. Clin. Micro. *42*:5614-5619.

Holt, J. G. ; Krieg. N. R. ; Sneath, P. H. A. ; Staley, J. T. and Williams, S. T.(1994). Bergeyٔ s Manual of Determinative Bacteriology.9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore , U.S.A.

Horal,W.H. (2010). Hypertension in End-Stage Renel Disease :Different Measues and theier Progostic Signification .Nephrol Dial Transplant , Editorial Review :1-6.

Hou, Z. ; Meng, J.R. ; Zhao ,R. ; Hu , B.Q. ; Liu, J. and Yan, X. (2007). Inhibition of beta-lactamase-mediated oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* by a deoxyribozyme. Acta Pharmacol Sin,28(11): 1775-1782

Ibezim E. C. (2005). Microbial resistance to antibiotcs. African Journal of Biotechnology. **4** (13): 1606-1611.

Islam, M. A. ; Alam, M. M. ; Choudhury, M. E. ; Kobayashi, , N. and Ahmed, M. U. (2008). Determination Of minimum inhibitory concentration (MIC) of cloxacillin for selected isolates of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) with their antibiogram. Bangl. J. Vet. Med. 6 (1): 121–126.

Ivanov, DV. ; and Budanov, SV. (2006) . Ciprofloxacin and antibacterial therapy of respiratory tract infections . Antibiot. Khimioter (in Russian) 51(5): 29-37 .

Jacques,O.; Anne M. and Nevin, E. (2000). Phenotypic and molecular typing of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain susceptible to gentamicin isolated in France from 1995 to 1997. ASFM.*38*:185-190.

Jairam, A. ;Das R, ;Aggarwal PK, ;Kohli HS, ;Gupta KL, and Sakhuja V, (2010). Iron status, inflammation and hepcidin in ESRD patients: The confounding role of intravenous iron therapy. Indian J Nephrol;20:125-31. DOI: http://dx.doi. org/10.4103/0971-4065.70840.

Jean-Baptiste, ; N. Daniel, K. ; Benjamin, D.K. ; Cohen-Wolkowiez , M. ;Fowler. VG. ;Laughon, M. ;Clark, RH. and Smith, P.B. (2011). Coagulase negative Staphylococcal Infections in the Neonatal Intensive Care Unit. Infect Control Hosp Epidemiol, 32(7):679-686.

Johnson,W. ;Hawley, M. ; McDonald, Rosman,B. ; Brown, G. and Bannister, M. (2009). Associations of Dialysis Modality and Infectious Mortality in Incident Dialysis Patients in Australia and New Zealand Am J Kidney Dis53:290-297.

Jones, L.;Chaturvedi, V.; Uyttenhove, C.; Van Snick, J.and Vignali, D. (2012). Distinct subunit pairing criteria within the heterodimeric IL-12 cytokine family. Mol Immunol.; 51: 234-44. doi:10.1016/j.molimm.

Jorgensen ,J.; CrfordmS.; McElmeel,M. and Fiebelkorn,K.(2004).D-zone test clindamycin resistance of Staphylococci in conjuction with performance of automically detection .j. Clin. Microbiol. infect.Dis. 42: 1800-1802.

Junior,O;Sabino,A. ;Romano ,D. and Riso,A.(2015). Inflammation and poor respose to treatment with erythropoietin in chronic kidney disease .chanadour,Divinopolis ,MG.CEP:35501-296.

Kadim,H.S.(2008). Study of Some Purine Metabolic Enzymes In Sera Of Patients with Renal Failure. University of Babylon College of Medicine.

Kalai, S.; Achour, W.;Abdeladhim, A.; Bejaoui, M. and Benttassen, A. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* isolated in immunocompromised patients: antimicrobial resistance, serotyping and molecular typing. Med. Mal. Infect. 35 (11): 530 – 535.

Kallenbach, J.Z. (2005) . Review of hemodialysis for nurses and dialysis personnel 7th ed .

Karachalios GN, .; Zhon, Y.; Gadina, M.; Lipsky , P. and Sigel, R. (2006). Splenic abscess due to *Staphylococcus lentus* a rare entity. Scand. J. Infect. Dis.38:708–710 .

Kareem,M,F. (2012). Physiological study of post dialysis chronic renal failure accordance to peripheral neuropathy ,some biochemical and aematological changes, University of Babylon College of Medicine.

Kasacka, I. ; Sawicki, B. and Ostrowska H.(2004). Pulmonary neroendocrine Infectious complications of dialysis access devices. Infectious disease clinics of North America .26(1):127-41.

Kasper, D. L. ; Fauci ,A. S. ; L-Longo, D. ; Braunwald, E. ; Hauser ,S.L. and Jameson, J.L. (2005). Harrisons' Principles of Internal Medicine.16th ed. Mc Graw-Hill ,Medical Publishing Division. USA.; p 1639-1724.

Katz , J. and Ashley,G. (2005). Chemical Review :Translation and protein synthesis .American Chemical society,California. 105(2) : 499-527.

Katzung , B. G. (2001) . Basic and clinical Pharmacology . (8th) ed. lange medical books . Mc Graw – Hill. New York . Kidney. Int. ;67:2089-2100.

Katzung, B.G.; Trevor, A.J. and Masters, S.B. (2009). Aminoglycosides. Pharmacology: Examination and Board Review.11th ed. McGraw-Hill Medical: 773-8804.

Kaysan,G.A.; and kumar , V.(2003). Inflammation in ESRD:Causes and potential onsequence .J.Ren.Nutr.13(2):158-60.

Kee, J.L.; and Hayes,E.R. (2000). Pharmacology : a nursing process approach . (3rd ed.).W .B . Sannders Campamy , U.S.A.

Khan, A.A. ; Nawaz, M.S. ; Khan, S.A.and Steel, R. (2002). Detection and characterization of erythromycin-resistant methylase genes in Grampositive bacteria isolated from poultry litter. Appl. Microbiol.Biotechnol. 59, 377–381.

Kiffer, C.; Hsiung, A.; Oplustil, C.; Sampaio, J.; Sakagami, E.; Turner, p. and Mendes, C. (2005). Antimicrobial susceptibility of Gram – negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC program Brazil 2003. Braz. J. Infect. Dis. 9 (3): 216 – 224.

Kindt, T. J.; Goldspy, R. A. and Osborne, B.A. (2007). Kuby Immunology. 6th Ed. WH Freeman and Company; New York; 401

Kirsztajn, G.M. ; Filho, N.S. ; Draibe, S.A; Netto, M.V. ; Thomé, F.S. and Souza, E. (2014). guidelines for evaluation and management of chronic kidney disease in clinical practice. J Bras Nefrol. 2014;36:63-73. DOI: http://dx.doi.org/10.5935/0101-2800.2014001

Kiziltaz H ., Ekin S . and Erkoc R .(2008). Trace elements status of chronic renal patients undergoing hemodialysis . Biol trace element Res . ; 163 : 498 – 502.

Koksal, F. ;Yasar, H. and Samasti, M.(2009). Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative *Staphylococcus* strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. Microbiol. Res.164:404– 410 .

Kolls,J.K and Linden ,A. (2004) ."Interleukin-17 family members and inflammation " Immunity .,21(4): 467-476.

Kralova ,S. ; Leva, .L. and Tomanm, M. (2009). Polymorphonucler Function in Naturally Occurring Renel Failar in Dogs . *Verterinari Medicinia ,54(5):236-243.*

Laan,M. ; Lotvall ,J. ; Chung ,K.F. and Linden ,A.(2001). IL-17 induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro role of mitogen activated protein (MAP) Kinases .Br J PHARMACOL .,133:200-6.

Lambert ,O.; Michea, M. ; Koler ,T. and Pechere, J.(2001). Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and seprofloxacin in gram-positive cocci .Antimicrob .agent. chemotherp. 44:571-576 .

Laurence , D. R .; Bennett , P. N .; Brown . and M . J . (1997) . Clinical Phrmacology . (8^{th}) ed . Churchill Livingstone London .

Leclercq,R, .;Baudurect ,J.and Soussy,A.(1989). Selection of constitive mutants of gram positive cocci inducible resistant to macrolides lincosamides and strptogramycin (MLS): Comparision of the selective effects of the MLS .pathol Bio .37:568-572.

Levey, A.S. and Coresh, J. (2012). Chronic kidney disease;379:165 – 80.

Levin, A. ; Hemmelgarn ,B. ; Culleton B.and Suh, B.(2008). Guidelines for the management of chronic kidney disease. CMAJ 179:1154-62.

Li,C.;Li,H.; Jiang,Z.; Zhang,T.; Li,Z.;Wu.Y.;Xiao,X.; Ryffel,B.; Radek,A.; Xia,X and Lai.Y(2014). Interleukin-33 Increases Antibacterial Defense byActivation of Inducible Nitric Oxide Synthase in Skin. PLoS Pathog 10(2): e1003918. doi:10.1371/journal.ppat.1003918

Liew ,Y. ;Pitman ,N.and McInnes ,B. (2010). Disease-associated functions of IL-33:the new kid in the IL-1 family. Nat Rev Immunol 10: 103–110.

Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 43: 1062-1066.

Liu, L.; Roberts, A. and Ganz, T. (2003) . By IL-1 signaling , monocyte- derived cells dramatically enhance the epidermal response to lipopolysaceharide . J. of Immunol., 170: 575-580.

Livermore, D. M. and Brown. D. F. J. (2005). "Detection of β-lactamase-mediated resistance." Retrieved 31.

Lohning, M.; Stroehmann, A.and Coyle, A.J.(2010). T1/STpreferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 6930- 6935.

Lok, C. E. and Mokrzycki, M. H. (2011). Prevention and management of catheter-related infection in hemodialysis patients, Kidney International, 79, 587–598.

Longauerova,A.(2006). coagulase negative staphylococci and their Participation in pathogenesis of human infection .Braatisal .lek. Listy.107.(11):448-452.

MacMicking, J. ; Xie, Q.W. and Nathan, C .(1997). Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 15: 323–350

Mahesh,B. ;Dedent, A.C. and Schneewind, O. (2012). A potential source of methicillin and multi Drug resistance Coagulase negative Staphylococcal health care workers .inf .J. Med .Hea.Sci.4(1):9-14.

Maheshwa , N .(2007). "Are young infants treated with erythromycin at risk for developing hypertrophic pyloric stenosis?". Arch. Dis. Child.92 (3): 271.

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

Malachowa ,N and DeLeo, R. (2010). Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell. Mol. Life Sci. 67: 3057–3071.

Manhal, F.S. ; Mohammed, A.A. ; and Ali K.H. (2012) . Urinary tract infection in Hemodialysis patients with renal failure . Fac Med Baghdad 54(1)

Maria, M.; Couto, I. and Sandrof. F. (2002) . Molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* clones .ASFM .clin.microbiol. 40 : 430-438 .

Marraffini, L.A.; Dedent, A.C. and Schneewind, O. (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70:192–221.

Martineau, F. ; Picard, F. ; Lansac, N. ; Ménard, C. ; Roy, PH. ; Ouellette, M. and Bergeron ,MG.(2000). Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* an *Staphylococcus epidermidis.* Antimicrob Agents and Chemother; 44:231-238.

Mayer,G.(2002). Antibiotics protein synthesis, nucleic acid synthesis and metabolism . Med.Microbiol. (3rd ed.)., 165 - 168.

Mayhall ,G.(2004). Hospital epidemiology and infection control, McGraw-Hill, New York. U.S.A: 224-232

Mermel LA, ;Allon M, Bouza E, ;Hujer, AM. and Yeiser, B. (2009). Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;49(1):1–45.

Miller, A.M. (2011). Role of IL-33 in inflammation and disease, Journal of Inflammation , 8(22):6-12

Mims,C.; Dockrell, H.M.; Goering, R.V.and Zuckerman ,M .(2004). Medical Microbiology 3rd ed .Mosby of Elsevier Limited .molecular characterization of *Staphylococcus sciuri* in the hospital Molecular characterization of methicillin resistant.

Morlidge C. and Richards T. (2001). "Managing chronic renal disease". Pharmacol. J., 266: 655-660.

Moura , T.M. ; Campos, F.S. ; d'Azevedo, P.A. ; Van Der Sand, S.T. ; Franco, A.C. ; Frazzon, J. and Guedes Frazzon, A.P. (2012). Prevalence of enterotoxin-encoding genes and antimicrobial resistance in coagulase negative and coagulase-positive *Staphylococcus* isolates from black pudding. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 45(5):579-585.

Moya, B.; Zamorano,L.; **Juan,C.**; **José, L.P.** ; **Yigong, Ge.and Oliver,A.(2010).** Activity of a new cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against β-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa mutants* selected *in vitro* and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients. Antimicrob. Agents Chemother., 54(3):1213–1217 .

Munford, R.S. and Pugin, J. (2001) . Normel responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppresive . Am. J. Respir. Crit. Care Med., 163(2): 316-321.

Murray, P.R. ; Rosenthal, K.S. ; and Pfaller, M.A. (2013). Medical Microbiology, with STUDENT CONSULT Online Access,7 ed : Medical Microbiology, pp.874

Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C. and Yolken, R.H. (1999). Manual of clinical Microbiology. 7th ed., ASM Press, Washington, D.C., 2.

Murugaiyan, G.; Mittal, A.; Lopez-Diego, R.; Maier, L.M.; Anderson, D.E. and Weiner, H.L. (2009).IL-27 is a key regulator of IL-10and IL-17 production by human CD4 T cells. J .Immunol., 183(4):2435–43.

Mycek ,M. ; Harvey,R. and Champe,P. (2000). Pharmacology 2nded. Lippincott Williams and Wilkins . New Jersey:610-617.

Naela,G.(2014). Resistance of Staphylococcal and Streptococcal clinical isolates to macrolides and functionally related antimicrobial in Nabuls . An – najah national University. 5:16

Nakae, S.; Komiyama, Y.; Nambu, A.; Sudo, K.; Iwase, M. Homma, I .(2002). Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice,causing suppression of allergic cellular and humoral responses.Immunity;17:375e87.

Nasri ,H.(2003). Intensification of anemia by secondary hyper parathyrodism Hemodialysis.Iranian .J.Med.28:195-197.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCFCLS) . (2002) . Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard. NCCLS document M31-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA

National Kidney Foundation. (2011). Stages and complication of chronic renal failure . Available on line at WWW.Kidney.Org. New York .;p 301-310 .

Nester, E.; Anderson, D.; Roberts, J.R.; Paersall, N. and Nester, M. (2001). Microbiology: Ahuman Prepction. McGraw Hill Co. New York:64-65

Normanno, G. ;Firinu ,A. ;Virgilio, S. ; Mula,G. ; Dambrosio, A. ; Poggiu, A. ; Decastelli, L. ; Mioni, R. ; Scuota, S. ; Bolzoni, G. ;Di Giannatale, E. ; Salinetti, AP. ; La Salandra, G. ; Bartoli, M . ;Zuccon, F. ; Pirino, T. ; Sias, S. Parisi, A. ; Quaglia, NC. and Celano, GV. (2005) . Coagulase-positive Staphylococci and Staphylococcus aureus in food products marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology 98: 73 –

Oscar, C.; Emilia, C. and Jesus, G.(2004). Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. In Spain : Five nationwide prevalence studies, 1986- 2002. American Society for Micribiology. 48:4240-4245.

Palmer, G.; Talabot-Ayer, D.; Lamacchia, C.; Toy, D.; Seemayer, CA.; Viatte, S.; Finckh ,A.; Smith, DE.and Gabay, C.(2009). Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. Arthritis Rheum;60:738–49.PubMedCrossRef

Pastan¸ S.; Souice¸ M.; and Mcclellan¸ W. M. (2002). Vascular risk and increase risk of death among hemodialysis patients. Kidney. Int. 62: 620-625.

Paterson, DL. ; Hujer, KM. ; Hujer, AM. ; Yeiser, B. ; Bonomo, MD. ; Rice, LB ; and Bonomo, RA. (2003) . 'Extended-Spectrum beta-lactamases in Klebsiella pneumoniae bloodstream isolates from seven countries : dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX -Mtype beta-lactamases . Antimicrob . Agents Chemother . 47(11): 3554-3560

Pendse, S. ; Singh, A. ; and Zawada, E. (2008) . Initiation of Dialysis. In : Handbook of Dialysis. 4th ed. New York, NY; 14-21.

Perez, F.; Bernasconi, A.; Ballain, K.M.;and Bover, J. (2008).Cardiovascular Disease in Patients with Chronic Renal Failur The Cardio- Renal Axis.*Rev Argent Cardiol*, 76: 215-215.

Perl, J. ; Nessim, S. J. ; and Bargman, J. M. (2011). The biocompatibility of neutral pH, low-GDP peritoneal dialysis solutions: Benefit at bench, bedside, or both. Kidney International 79 (8): 814 -824.

Pflanz, S.; Timans, J. C.; Cheung, J.; Rosales, R.; Kanzler, H.;Gilbert, J.;Hibbert, L. ; Churakova, T.; Travis,M.;Vaisberg, E.; Blumenschein, W. M.; Mattson, J. D.; Wagner, J. L.; To, W.; Zurawski, S.; McClanahan, T. K.; Gorman, D. M.; Bazan, J. F.; de-Waal-Malefyt, R.; Rennick, D. and Kastelein, R. A. (2002) .IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. Immunity, 16(6): 779–790.

Pflanz,S.; Hibbert,L.; Mattson,J. and Rouse, M.S (2004). "WSX-1 and Glycopro-tein 130 Constitute a Signal-Transducing Receptor for IL-27," .Journal of Immunology, 172 (4) : 2225- 2231.

Pirhonen J.; Siren J.; Julkunen I. and Matikainen ,S. (2007a). IFN-alpha regulates Toll-like receptor-mediated IL-27 gene expression in human macrophages. Journal of leukocyte biology.; 82:1185–1192. [PubMed: 17684041]

Porth, C.M. (2007). Essentials of Pathology 2nd ed ,Lippincott Williams and Wilkins,Philadelphia;p:559-574.

Prescott,L.M.; Harley,J.P. and Klein,D.A.(2005). Microbiology. 6 th ed. McGraw-Hill .U.S.A.

preston R. and Wilson T.(2012). Physiology. Lippincott Williams and Wilkins. P 313-327.

Quinn , P.J. ; Markey, B.K. ; Leonard , F.C. ; FitzPatrick, E.S. ; Fanning, S. and Hartigan PJ (2011). Veterinary microbiology and microbial disease.Second Edition, p.912

Rayan, K.J. and Ray, G.(2004) , Medical microbiology , The Mc Graw –Hilll company , USA , 168: 177

Rayes, J. ; Hidalgo, M. ; Díaz ,L. ; Rincón, S. ;Moreno, J. ; and Vanegas, N. ; Casta- ñeda E (2007). Characterization of macrolide resistance in Grampositive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. Int J Infect Dis 11: 329-336.

Reinhard, F.; Undine ,O.; and Kurt, G. (2006). International Journal of Antimicrobial Agents Volume 28, Supplement 1 : P.72-77.

Ress, L. and Shaw ,V.(2007). Nutrition in children with CRF and on *S.epidermidis* clones. ASFM. Clin . Microbial . 40

Rewa, O. ; Muscedere, J. ; and Heyland, D.K. (2012). Coagulase-negative *Staphylococcus*, catheter-related, bloodstream infections and their association with acute phase markers of inflammation in the intensive care unit: An observational study. Can J Infect Dis Med Microbiol,23(4):204-208.

Rivera ,M. ;Dominguez,M. ;Mendiola ,N. and Roso,g.(2014). *Staphylococcus lentus* peritonitiis Acase report. Peritoneal

Robinson, CM. ; O'Dee, D. ; Hamilton, T. and Nau ,GJ. (2010). Cytokines involved in interferon-gamma production by human macrophages. Journal of innate immunity.; 2: 56-65.

Rosenbaum, D. ; MacRae, J. M. ; Djurdjev, O. ; Levin, A. ; Werb, R. and Kiall, M. (2006). Surveillance cultures of tunneled cuffed catheter exit sites in chronic hemodialysis patients are of no benefit,International Society for Hemodialysis, 10, 36–370.

Rosner,M.H and Bolton ,W.K.(2006). Renel Function Testing . Am j Kidney Dis , 47(1) :174-183.

Ross,G. ;Hubsctile, T. ;Pelhim,A**. ;Braun, K. andRoth,J.(2002).**Fever induction by localized subcutaneous inflammation in guinea pigs :the role of cytokines and prostaglandins.J.Appl.physiol.,94:1395-1402.

Roussel, L.;Erard, M.; Cayrol, C.and Girard, JP. (2008). Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. EMBO Rep 9: 1006–1012.

Ruppy, M.E. and Archer, G.L. (1994). Coagulase-negative staphylococci: Pthogens associated with medical progress. Clin. Infect. Dis., *19*:231-245.

Ryan, K.J. and Ray, C.G. (2004). Sherris Medical Microbiology an Introduction to Infectious Diseases. 4th ed., pp. 327-341. United States: McGraw Hill.

Ryffel, C.; Kayser, F.H. and Perger, B. (1992). Correlation between regulation of mecA transcription and expression of Methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob. Agent Chemother.,*36*:25-31.

Saenz, S.; Taylor, B.; Artis.; D. and Le ,G. (2008). Welcome to the neighborhood: Epithelial cellderived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites.Immunol Rev 226:172–190.

Samaha-Kfoury, J.N.,and Araj, G.F.,(2003). Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases. Brit. Med. J., 327(7425):1209–1213.

Sanchez , A.P. ; and Ward , D.M. (2012) . Therapeutic Apheresis for Renal Dialysis . Seminars in Dialysis, 25(2): 119-131.

Santos, A.S. ; Melo, M.E. ; Crisóstomo, L.G. ; Fukui , R.T.; Matioli , S . R. and Silva, M.E.(2013). Lack of association between IL27 gene variantsand type 1 diabetes susceptibility . Elsevier.Ltd.,61(2):349-52 .

Sarnak M.J., Greene T., Wang X., Beck G., Kusek J.W., Collins A.J., and Levey A.S.(2005). The effect of a lower target blood pressure on the progression of kidney disease: long-term follow-up of the modification of diet in renal disease study. Ann. Inter. Med.;142(5):342-351.

Sawant A.A., Gillespie B.E. and Oliver S.P. (2009). Antimicrobial susceptibilityof coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. Vet. Microbiol. 134:73-81.

Saxena S.K., Dwivedi R.N., Alam S.M., Chandra R, Singh N., Kumar A.,and Abbas A(2001). Prognostic predictors in non-diabetic CRF with special reference to proteinuria. J. India. Academ. Clin. Med.;2(4);276-280.

Saxena, AK. and Panhotra, BR. (2005) . Septicemia in hemodialysis : A focus on bacterial flora and antibiotic access salvage . Saudi Kidney Dis . Transplant 13: 29-34 .

Schindler,R.; Boenisch,O.;Fischer,C.;and Free,U.(2000). Effect of hemodialysis on the inflammatory reaction in vivo. Cli.Nephrol.53(6):452-9.

Schleifer ,K. ; Geyer,U. ; Bell, J. and Devriese A. (1983). Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp**.** *Staphylococcus lentus* Microbiol 4:382-387

Schmitz, F. J.; Petridou, J.; and Fluit, A. C. (2000). Distribution of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* blood-culture isolates from fifteen German university hospitals. Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19: 385-387.

Schmitz ,J. ; Owyang, A. ; Oldham, E. ; Song ,Y. ; Murphy, E. ; McClanahan, TK. ; Zurawski, G. ; Moshrefi ,M. ; Qin, J. ; Li, X. ; Gorman, DM. ; Bazan, JF. and Kastelein RA.(2005) IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. Immunity.;23:479–90.PubMedCrossRef.

Schwendener,S. and Perreten,V.(2012). New MLSB Resistance Geneerm(43) in *Staphylococcus lentus* . Antimicrobial Agents and Chemotherapy p. 4746 – 4752

Sester , U .;Sester, M ; Hein ,G .; Kaul ,H .; Grindt,M .; and Kohler, H . (2001) . Strong depletion treatment. Nephrol . Dia Transplant. 16 (7): 140 – 8.

Shibata, S.; Tada, Y.; Kanda N.; Nashiro, K.; Kamata,M. and Banks R..(2015) Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis. J. Invest. Dermatol 130: 1034–1039.

Silbiger S., and Neugarten J. (2008) . Gender and human, chronic renal disease. Gender medicine .; 5(supp 1): s3-s10 .

Simeoni, D. ; Rizzotti,L. ; Cocconcelli,P. ;,S. ; Gazzola,S. ; Dellaglio,F.and Torriani,S.(2008). Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities. Strada le Grazie 15, 37134 Verona, Italy.

Sonobe ,Y.; Yawata, I.; Kawanokuchi ,J.; Takeuchi, H.; Mizuno, T. and Suzumura, A .(2005). Production of IL-27 and other IL-12 family cytokines by microglia and their subpopulations. Brain Res. 2005; 1040: 202-7. doi:10.1016/j.brainres

Souza Antunes, A.L. ; Secchi, C. ; Reiter, K.C. ; Rodrigues Perez, L.R. ; Peixoto de Freitas, A.L.and Alves d'Azevedo, P. (2007). Evaluation of oxacillin and cefoxitin disks for detection of resistance in coagulase negative staphylococci. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102, 719e723.

Stenvinkle ,p. and Alvestr,A.(2002). Inflammation in End - Stage Renal Disease source Consequence and Therapy .*Semin .Dial.15:329-37.*

Stepanovic, S., V. ; Dimitrijevic, D. ;Vukovic, I. ;Dakic, B. ; Savic, A. and M. SvabicVlahovic. (2001).*Staphylococcus sciuri* as a part of skin, nasal and oral flora in healthy dogs. Vet. Microbiol.82:177–185.

Stepanovic, S.; Dakic,I. ; Morrision,D. ; Hauschild,T. and Devriese , L.(2005). A comparative evaluation of phenotypic and molecular methods in the identification of members of the *Staphylococcus sciuri* group. Syst. Appl. Microbiol.28:353–357.

Stepanovic, S.; Jezek, P.; Vukovic, D., ;Dakic, I. And Petras.(2003) Isolation of members of the Staphylococcus scuiri group from urine and their relationship to Urinary tract infection. J. Clin. Microbiol., 41 (11) : 5262-5264.

Strasheim, W. ; Kock MM. ; Dreyer, m.; A.W, and Ehlers, MM (2013). Molecular markers of resistance in coagulase-negative staphylococci implicated in catheter-related bloodstream infections. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education (A. Méndez-Vilas, Ed.).pp.1822-1832.

Stumhofer, J. S.; Laurence,A.; Wilson, E. H. and Banks R.(2006). " Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system,"Nature Immunology, vol. 7, no. 9, pp. 937–945 .

Suleiman, A. ;Zaria, L.T. ; Grema, H.A. and Ahmadu P (2013). Antimicrobial resistant coagulase positive Staphylococcus aureus from chickens in Maiduguri, Nigeria. Sokoto Journal of Veterinary Sciences, 11(1):51-55.

Szymanska,J. and Sitkowska ,J.(2013). Opportunisitic Bacteria in Dental Unit Waterlines .Assessment and characteristics .microbiol .8(5):681-689.

Takeda, A.; Hamano, S.; Yamanaka, A. and Banks R.(2003). Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment,"Journal of Immunology, 170 (10): 4886–4890 .

Taskapan, H. ; Tam, P. ; Au, V. ; Chow, S. ; Fung ,J. ; Nagai, G. ; Roscoe, J. ; Ng, P. ; Sikaneta, T. ; Ting, R. and Oreopoulos DG. (2008). Improvement in GFR in patients with chronic kidney disease attending a nephrology clinic. Int Urol Nephrol 40(3):841-848 .

Tawfik, H.K. (2007). Comparative pathogenicity of peptidoglycan extracted from Staphylococcus xylorus and standard lipopolysaccharide extract from E.coli .M.Sc. Thesis . University of Baghdad / Baghdad Iraq / College of Science : 46-51.

Ternes, Y.M. ; Lamaro-Cardoso, J. ; Andre . M.C. Pessoa, V.P. ; da Silva Vieira, M.A. ; Minamisava, R. ; Andrade, A.L. and Kipnis, A . (2013). Molecular epidemiology of coagulase-negative Staphylococcus carriage in neonates admitted to an intensive care unit in Brazil. BMC Infectious Disease, 13:572

Tidwell Thomas, T. (2008) . Hugo (Ugo) Schiff , Schiff Bases, and a Century of β-lactam synthesis . Angewandte Chemie International Edition 47(6): 1016 -1020.

Tsenge, C .C.; Wu, J.J.; Liu, H.L.; Sung, J.M.; Huang, J.J. (2002). roles of host and bacterial virulence factors in the Development of Upper Urinary Tract Infection Caused by Escherichia coli. Am.J.Kidny .Dis. 39(4): 744-52.

Tillotson, G.S.(1996). Quinolones Structure - Activity Relatioships And Future Predications. J.Med.Microbiology. 44 : 320-4

Tsubakishita,S.;Kuwahara, .;K.; Takashi,S.; and Hiramatus,K.(2010). Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in Staphylococci . Antimicrobial.agents and chemotherapy ,p.4352-4359**.**

Türkyilmaz, S. and Kaya, O. (2006). Determination of some Virulence Factors in Staphylococcus spp. Isolated from Various Clinical Samples. Turk J Vet Anim Sci, 30:127-132.

Turnridge, J. (1995). Epidemiology of quinolone resistance. Eastern hemisphere. Drugs. 49: 43 – 47.

United States Renal Data System. (2009). annual data report volume two: atlas of end stage renal disease in the United States. [Acesso 22 nov. Disponivel em: http://www.usrds.org.

United States Renal Data System. USRDS (2013) . Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases .. http://www.usrds.org/render/xrender_home.asp.

Vaez, H.; Tabaraei, A.; Moradi, A. and Ghaemi, E.A.(2011). Evaluation of methicillin resistance Staphylococcus aureus isolated from patients in Golestan province-north of Iran. Afr. J. Microbiol. Res. 5(4): 432-436.

Vasconcelos, N.G. and de Souza, D. Cunha MLRS (2010). Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. Journal of Public Health and Epidemiology, 2(3):29-42.

Vianna, H.R. ; Soares, C.M. ; Tavares, M.S. ; Teixeira, M.M. and Silva A.C. (2011). Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. J Bras Nefrol;33:351-64. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/

Villarino, A.; Hibbert, L.; Lieberman ,L. *et al.*,(2003). "The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection,"Immunity,vol.19,no.5,pp.645–655.

Von-Eiff, C.; Heilmann, C. and Peters, G. (1999). New aspects in the molecular basis of polymer-associated infection due to Staphylococci . Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18(12): 843-846.

Vyletelov.M. ; Vlkove, H. and Manga, I. (2011). Occurrence and characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant coagulase negative staphylococci in raw milk manufacturing. Czech J. Food Sci. 29,S11eS16.

Wang, H.H.; Lee, T.Y. and Lin, C.Y.(2008). Integrins mediate adherence and migration of T lymphocytes on human peritoneal mesothelial cells.Kidney Int2008;74:808e16.

Wang,A.Y.; Woo , A. and lam, C.W.(2003).Is a single time point c-reactive protein predictive of out come in peritoneal dialysis patient.J.Nephrol .14:1871-9.

Wang ,A.; Tzong-Yann, L. and Ching-Yuang, L.(2011). Kinetics and involvement of interleukin-17 in the outcome of peritonitis in nondiabetic patients undergoing peritoneal dialysis. Journal of the Chinese Medical Association ,74 : 11-15.

Weinreich, T . ; De los Ríos, T. ; Gauly, A. ;and Passlick-Deetjen, J. (2006). Effects of an increase in time vs. frequency on cardiovascular parameters in chronic hemodialysis patients. Clin. Nephrol. 6 (6): 433-439.

Weisblum, B. (1995). Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrob Agents Chemother 39: 577-585**.**

Vouldoukis, I. Riveros-Moreno, V. Dugas, B. Ouaaz, F. Becherel, P. (1995). The killing of Leishmania major by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fc epsilon RII/CD23 surface antigen. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 7804–7808.

Wesley, A.V. (1998). Basic microbiology 7th edition. School of medicin Uni. Of Virginia .

Westh H, Hougaard DM, Vuust J, Rosdahl T.(1995). Prevalence of ermgene classes in erythromycin-resistance *Staphylococcus aureus* strains isolated between 1959 and 1988. Antimicrob Agents Chemother; 39:369-373.

WHO. (2003). Basic laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. 2 nd ed. Geneva .

Wingerd,M. B. (2013). The human body: concepts of anatomy and physiology . 3 rd ed. Lippincott Williams and Wilkins .P.167.

Wotton, M.; Avison, P. M.; and Walsh, T. R. (2004). Genetic analysis of 17 genes in *Staphylococcus aureus* with reduced susceptitiltiy to vancomycin (VISA) and hetero VISA. J. Antimicrob. Agents and Chemother., 53: 406–407.

Yang, F. ;Zhu, P. ; Duan, L. ; Yang ,L. and Wang ,J.(2016).IL-33 and kidney disease . Mol Med Rep. 2016 Jan;13(1):3-8.

Yao, J. D. and Moellering, R. C. (2003). Antibacterial agentsand susceptibility test methods, In: Manual of clinical microbiology, Murray, P. R. **;** E. J. Baron, J. H. **;** Jorgensen M. A. **;** Pfaller, and R. H. (eds), 8th ed. ASM Press, Washington, DC. p. 1039-1073

Yasuda ,R. ; Kawano,H. and Anzai ,A.(2000). Methicilin –resistan coagulase – negative staphylo cocci isolated from healthy horses in Japan Am J.Res:61(11):1451-5.

Yazar,H. and Kayhan, B.C.(2010). Adult Hemodialysis Patients with End-Stage Renel Disease and Erythropoietin Treament of the Relation between Hypertention . *JChem Pharm Res, 2(4) :588-593.*

Yildirim, S.; Narsal, T. Z.; Tarim, A.; Torer, N.; Noyan, T.; Demiroglu, Y. Z.; Moray, G. and Heberal, M. (2005). Bacteriological profile and antibiotic resistance: comparison of findings in a burn intensive care unit, other intensive care unit, and the hospital services unit of a single center, J. Burn. Car. Rehabil. 26 (6): 488 – 492.

Yin, H.; Li X.;Hu, S.; Liu, TandYuan, B. (2013). IL-33 promotes *Staphylococcus aureus*-infected wound healing in mice. Int Immunopharmacol 17: 432–438.

Yoshida ,H.; Nakaya, M. and Miyazaki , Y. (2001). "Interleukin 27: adouble-edgedswordforoffense and defense," Journal of Leukocyte Biology,.86(6):1295–1303.

Yoshimoto ,T.; Yoshimoto, T.; Yasuda, K.; Mizuguchi, J. and Nakanishi, K.(2007)."IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation," Journal of Immunology, 179 (7) :4415–4423.

Yoshimoto,T and Yoshimoto,T.(2013). Cytokine Frontiers: Regulation of Immune Responses in Health and Disease ," Journal of Immunology. , 190 (9) :5435–5430.

Zaki, M.A. (2001). Renal dialysis and transplantation in Iraq. Al-Kufa J., 5(2): 10-12.

Zhang, H.Z.; Hackbarth ,C.J.; and Chambers ,H.F.(2001) Aproteolytic transmembrane singnaling pathway and resistance to beta- lactams in Staphylococci .Science., 291 : 1962 - 1965.

Zhao ,X.; Pan ,H.; Yuna ,H.; Zhung, W.; Li, X. and Wang,G. (2010). Increased serum interleukin 17 in patients with Systemic Lupus Erythemmatosus .Mol Biol Rep ., 37 : 81 -85.

الملاحق

Appendices

ملحق رقم ١

استمارة استبيان

١- رقم الاستمارة :

٢- التاريخ :

٣- اسم المريض :

٤- العمر :

٥- الجنس :

٦- السكن :

٧- درجة العجز الكلوي :

٨- التشخيص الحالي :

٩- فصيلة الدم :

١٠- عدد مرات الغسل :

١١- الفترة بين غسلة وأخرى :

١٢- تاريخ الإصابة (مدة المرض) :

١٣- مدة العلاج بالديلزة :

١٤- عدد مرات العلاج في الأسبوع :

١٥- الأمراض المصاحبة الأخرى :

١٦- الملاحظات :

ملحق رقم 2

bioMerieux Customer: Laboratory Report printed Nov 16,2014 08:01
CDT System#:
printed by:labtech
printed Name: muna printed ID: 544
Isolate Group: 544-1
~~Bionumber: 342210220733631~~
Selected Organism **: Staphylococcus lentus**

Comments	

Identification Informatio	**Card:** GP	**Lot Number:** 242284210	**Expires:** Sep 16,2014 13:00 CDT
	Completed: Nov 11,2014 16:40 CDT	**Status:** Final	**Analysis Time :** 7. 75 hours
Selected Organism	98% Probability **Staphylococcus lentus**		Very good **Confidence:** Identification
	Bionumber: 342210220733631		

SRF Organism	

Analysis Organisms and Tests to separate:

Analysis Messages:
Critical Pathogen, check Camp test and b-hemolysis

Contraindicating Typical Biopattern (s)

Staphylococcus lentus SAC(1),

Biochemical Details																
2	AMY	+	4	PlPLC	+	5	Dxyl	-	8	ADH1	-	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	+	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	+	19	PHOS	-
20	LeuA	+	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	+	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLY B	+	37	dGAL	-
38	drib	-	39	ILATk	-	42	LAC	-	44	NAG	+	45	Dmal	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	draf	-	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Installed VITEK 2 Systems Version: 05.04 Therapeutic Interpretation Guideline:
MES Interpretation Guideline: AES Parameter Last Modified:
Parameter Set Name:

bioMerieux Customer: Laboratory Report printed nov10,2014
08:01 CDT System#:
printed by:labtech
printed Name: muna printed ID: 38
Isolate Group: 1-4
~~Bionumber: 142210324733631~~
Selected Organism: Pseudomonas areuginosa

Comments	

Identification Informatio	**Card:** GN	**Lot Number:** 24227740	**Expires:** nov 10,2014 13:00 CDT
	Sep 5,2014 17:20 **Completed:** CDT	**Status:** Final	**Analysis Time :** 8. 00 hours
Selected Organism	99% Probability **Pseudomonas areuginosa**		**Confidence:** Low discrimination
	Bionumber: 0003051103500200		
SRF Organism			

Analysis Organisms and Tests to separate:
Low Discrimination Organism
Pseudomonas areuginosa dXYLOSE(1),B-HEM(1),CAMP(S.au)(1),
Pseudomonas areuginosa s dXYLOSE (1),B-HEM(99),CAMP(S.au)(99),
Pseudomonas areuginosa dXYLOSE (99),B-HEM(1),CAMP(S.au)(1),

Analysis Messages:
Critical Pathogen, check Camp test and b-hemolysis

Contraindicating Typical Biopattern (s)

Pseudomonas areuginosa s SAC(1),AIaA(1),
Pseudomonas areuginosa s SAC(1),AIaA(1),
Pseudomonas areuginosa s SAC(1), dXYL (99),

Biochemical Details

2	AMY	+	4	PlPLC	-	5	Dxyl	-	8	ADH1	-	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	+	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	+	19	PHOS	-
20	LeuA	+	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	+	29	TyrA	+	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLY B	+	37	dGAL	-
38	Drib	-	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	Dmal	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	Draf	-	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Installed VITEK 2 Systems Version: 05.04 Therapeutic Interpretation Guideline:
MES Interpretation Guideline: AES Parameter Last Modified:
Parameter Set Name:

bioMerieux Customer: Laboratory Report printed Nov 11,2014 08:01 CDT
System#:
printed by:labtech
printed Name: muna printed ID: 504
Isolate Group: 504-1
~~Bionumber: 342210220733631~~
Selected Organism **Entrtobacter cloacae**

Comments	

Identification Informatio	**Card:** GP	**Lot Number:** 242284210	**Expires:** Sep 11,2014 13:00 CDT
	Nov 10,2014 16:40 **Completed:** CDT	**Status:** Final	**Analysis Time :** 7. 75 hours
Selected Organism	95% Probability **Entrtobacter cloacae**		Very good **Confidence:** Identification
	Bionumber: 342210220733631		
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to separate:			
Analysis Messages: Critical Pathogen, check Camp test and b-hemolysis			
Contraindicating Typical Biopattern (s) **Entrtobacter cloacae** SAC(1),			

Biochemical Details																	
2	AMY	+	4	PlPLC	+	5	Dxyl	-	8	ADH1	-	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	+	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	+	19	PHOS	-
20	LeuA	+	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	+	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLY B	+	37	dGAL	-
38	drib	-	39	ILATk	-	42	LAC	-	44	NAG	+	45	Dmal	+	46	BACI	+
47	NOVO	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	draf	-	58	O129R	+	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Installed VITEK 2 Systems Version: 05.04 Therapeutic Interpretation Guideline:
MES Interpretation Guideline: AES Parameter Last Modified:
Parameter Set Name:

ملحق رقم (5) مقاومة عزلات *S .lentus* للمضادات الحياتية

المقاومة للمضادات الحياتية المستعملة												العزلات	
AMC	CAZ	CRO	CTX	SXT	CD	E	TE	VA	LEF	ME	PEN	المصدر	العدد

R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	**Fistula**	**1**
R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**2**
R	R	S	S	I	R	R	-	S	S	R	R	**Fistula**	**3**
R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**4**
I	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**5**
R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**6**
R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	**Fistula**	**7**
R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	**Fistula**	**8**
R	R	R	R	S	I	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**9**
R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R	R	**Fistula**	**10**
R	R	I	S	S	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**11**
R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	R	R	**Fistula**	**12**
I	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**13**
R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**14**
I	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**15**
R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**16**
R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**17**
R	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	**Fistula**	**18**
R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**19**
I	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**20**
R	R	R	R	I	R	R	R	-	R	R	R	**Fistula**	**21**
I	R	R	R	I	R	R	R	-	R	I	R	**Fistula**	**22**
R	R	S	R	S	R	R	S	-	S	S	R	**Fistula**	**23**
R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	**Fistula**	**24**
R	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	**Skin**	**25**
R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	**Skin**	**26**
R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	**Skin**	**27**
I	R	R	R	S	R	R	S	-	S	R	R	**Skin**	**28**
R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Skin**	**29**
R	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	**Skin**	**30**
I	R	R	R	S	R	R	I	S	S	R	R	**Skin**	**31**
R	R	R	R	I	R	R	S	S	S	R	R	**Bed**	**32**
R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Bed**	**33**
I	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Bed**	**34**
R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	R	R	**Bed**	**35**
R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Bed**	**36**
R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**System**	**37**
R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	**System**	**38**
S	R	R	R	S	R	R	S	-	S	R	R	**Blood**	**39**
R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Blood**	**40**
R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Blood**	**41**
R	R	R	R	S	R	R	S	-	S	I	R	**Blood**	**42**
R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Blood**	**43**
R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	**Blood**	**44**
R	R	S	S	S	R	R	S	-	S	R	R	**Blood**	**45**
I	R	R	R	S	R	R	S	-	S	R	R	**Blood**	**46**
R	R	R	R	R	R	R	R	-	S	R	R	**Urine**	**47**
R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	R	R	**Urine**	**48**
R	R	I	R	S	R	R	S	-	S	R	R	**Urine**	**49**
R	R	I	R	S	R	R	S	S	S	R	R	**Urine**	**50**

Summary

In this study was collected 600 samples from patients with renal failure (100 patients) auditors Sadr City Medical in Najaf and continuing on dialysis process who attended laundry Center for Kidney Hospital and the ages ranged from (20 - 80 years) and both sexes for the period from June / 2014 and up to December / 2015 and divided the samples, according to sources gathered to 6 totals 100 samples for each of lactation, blood, arterial fistula, skin, bed and dialysis device. The study showed that females are more vulnerable to the disease than males, where the proportion of 62% recorded for females, compared with 38% for males. Age group has shown (69-60), the highest infection with the bacterium that causes inflammation of the urinary tract, as well as bacteremia. Proven bacterial examination that the results of 34.6% samples did not show bacterial growth, while the samples showed bacterial growth and formed the 65.3% samples diagnosed isolates based on phenotypic traits . Results showed 66.3% isolates gram positive and 33.6% isolated gram negative diagnosed depending on the biochemical tests and a vitk, was elected bacteria Staphylococcus lentus being of bacteria transmitted newly from livestock to humans, and because of the lack of studies and research them. Make examine the pharmacological sensitivity to 50 isolates towards 12 types of antibiotics, he found that most of the isolates of bacteria S.lentus has shown high resistance of up to 100% of the antibiotics Penicillin and Ceftazidime and 96% for Erythromycin and Clindamycin and 94% for Methicillin and 82% Cefotaxime and 78% for Ceftriaxone well Clavulanicacid / Amoxillin% 76 and 28% for Tetracycline well Sulfamethoxazole / Trimthoprim 20% and Levofloxacin 10%, but did not show any resistance Anti direction Vacomycin. The investigation of the genes of antibiotic resistance and examined 48 isolates resistance to the antibiotic erythromycin and anti-B-lactam antibiotics using the PCR technique of in order to detect genes responsible for the resistance and of gene ermA, ermB, ermC, blaz rate was the presence of gene ermA% 27.8 13 isolated and 18 isolation owns gene ermB by 37.5% and gene ermC 62.5% from 30 isolated either gene blaz

was 20.8% of 10.aazy why there is resistance to the existence of producing genetic group of enzymes B- Lactamases and erythromycin resistance methylases (erm) in S. Lentus. It was measured the concentration of cytokines in the serum of patients with renal failure mediated by technology absorption linked immunosorbent assay results of the ELISA .showed significant increase in the concentration of cytokines 33 reaching the kidney failure patients infected with bacteria lentus S. pg / ml 386.6 ± 38.5 when compared with patients with failure renal non-infected with bacteria, which amounted pg / ml 195 ± 34 and healthy people pg / ml 51 ± 11.4 where we note that this kinetic level of the cell was higher for failure patients with renal infected with bacteria, also note there is a rise in patients with renal failure of others infected with bacteria compared to group control, was observed clearly significant decrease in the concentration of IL-27 in the study groups as compared to control as well as showing that there is a significant increase in this factor concentration between the groups patients with renal and wounded failure bacteria S.lentus 86.6 ± 6.5 pg / ml compared with patients of kidney failure are not infected bacteria 50.7 ± 9.8 pg / ml, although the rate of this cytokines marked a significant decrease among those two groups record when compared with healthy controls pg / ml 187.7 ± 34.6. And show a significant increase in cytokine concentration cell 17 where he stood in patients with renal failure of others infected with bacteria lentus S. pg / ml 336.1 ± 39.7 when compared with kidney failure patients infected with bacteria, which amounted pg / ml 177.1 ± 17.3 and healthy people pg / ml 90 ± 12 where we note that this level of cytokine was higher for non-renal failure patients with bacteria, also note there is a rise in patients with renal failure and infected with bacteria compared to the control group. The statistical analysis through the use of computerized SPSS program adopted ($p < 0.05$) as the smallest significant difference .

Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Al- Qadisiya
College of Education

Investigation of resistant genes for antibiotics B-Lactam and Erythromycin and their relation to cytokines levels from bacteria *Staphylococcus lentus* of renal failure in patients

A Thesis Submitted to the Council of the

College of Education / University of Al- Qadisiya

In Partial Fulfillment of the Requirments for the Dgree of Doctor of philosophy in Biology - Micobiology

By

Muna Hamed Atshan Al-Salami
M.Sc. Biology /Miocrobiology

Supervised by

Assist.prof.Dr.Mayada F. Darweesh **prof.Dr. Azhar N. H. Almousawi** **2017 A.D** **1438A.H**