وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم- قسم علوم الحياة

التحري عن التلوث المايكروبي في العيادات التخصصية لكلية طب الأسنان

بحث مقدم

إلى كلية العلوم / قسم علوم الحياة– جامعة القادسية

كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة

من قِبل الطالبة

رسل غانم حسين

بإشراف

م.م.عباس ميار حزام

1440 هـ   2019 م

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

وَمَا أُوتِيتُم مِّنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا

صدق الله العظيم

الخاتمة

الخلاصة Summary

جُمعت عينات الدراسة بواقع 50 عينة من العيادات التخصصية لكلية طب الأسنان للمدة من تشرين الأول 2018 ولغاية شباط 2019 ، وقسمت العينات بحسب مصادر جمعها إلى 5 مجموعات (10 عينات من الأرضية ، 10 عينات من الستائر ، 10 عينات من كرسي الأسنان ، 10 عينات من أدوات طبيب الأسنان، 10 عينات من الحشوات) وذلك لغرض التحري عن الأنواع البكترية المختلفة الملوثة لتلك العيادات ، إذ أظهرت نتائج الفحوصات الزرعية والكيموحيوية إن 10 عينات أعطت نتائج موجبة لتلك الاختبارات وشملت 4 عزلات لبكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* و3 عزلات لبكتريا *E.coli* وعزلتان لبكتريا *Proteus* وعزلة واحدة لبكتريا *staphylococcus.aureus*

من جهة أخرى بينت نتائج البحث ان اعلي نسبة عزل لبكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* كانت من الأرضية بنسبة 30 % واقل نسبة عزل كانت من كرسي الأسنان بنسبة 10 % . بينما كانت اعلي نسبة عزل لبكتريا *E.coli* من ادوات طبيب الأسنان بنسبة 20 % واقل نسبة عزل من الحشوات بنسبة 10 %. كما بينت النتائج إن نسبة تواجد بكتريا *staphylococcus.aureus* في الأرضية ونسبة تواجد بكتريا *Proteus* في الستائر هي 10% و20% على التوالي .

بينت نتائج الدراسة الحالية سيادة بكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* في العيادات التخصصية لطب الأسنان تليها بكتريا القولون *E.coli* وبكتريا المتقلبات *Proteus* .

1.المقدمة

تتعرض المستشفيات والعيادات الخاصة ومنها عيادات طب الأسنان للتلوث بالبكتريا الممرضة, ومن أهم أنواع البكتيرية المسببة لتلوث العيادات التخصصية لطب الأسنان بكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas. aeruginosa* المسببة لتفشي العدوى المكتسبة من المستشفيات والعيادات الخاصة (Gawish *et al*., 2013) , إذ لوحظ في كثير من الأحيان صعوبة علاج الإصابات الناتجة عن هذه البكتيريا لكونها تمتلك صفة المقاومة الطبيعية بالإضافة إلى قدرتها على اكتساب المقاومة تجاه العديد من المضادات الحيوية (Chick *et al*., 2013). تليها بكتريا *E.coli* التي تمتلك تركيبا مستضديا معقدا يتكون من ثلاثة أنواع من المستضدات Antigens بعض مستضداتها مقاومه للحرارة ويدعى المستضد الجسمي Somatis Antigan وهو النوع الأول إما البعض الأخر فيكون حساس للحرارة وهو المستضد المحفظي Capsular وهو النوع الثاني ، إما النوع الثالث فهو المستضد السوطي Flagellar كما إن اغلب الاخماج بسب جرثومة *E.coli* تكون ناتجة عن التعرض إلى المستضدين الجسمي والمحفظي . و بكتريا *Proteus sp* والتي تسبب العديد من الإمراض في مقدمتها التهاب المسالك البولية لاسيما في القسم العلوي منها وتؤدي الإصابة أحيانا إلى حدوث التهاب حويض الكلية (Swierzko *et al*.,2000)، تعد المسبب المرضي الثاني بعد بكتريا *Escherichia coli* في إحداث التهاب القناة البولية وتكثر الإصابة بها في المرضى الراقدين في المستشفيات والمستعملين للقناطر البولية لمدة زمنية طويلة وكذلك الأشخاص الذين يعانون من تشوهات تركيبيه في القناة البولية (Sosa *et al*., 2006).

تعد بكتريا المكورات العنقودية مسؤولة عن مدى واسع من الأمراض مثل الدمامل ، والخراجات, وخراجات الجروح الناتجة عن العمليات الجراحية ، والتهاب الجلد والأنسجة الرخوة ، والتهاب العظام ، والمفاصل ، والتهاب الرئة القصبي ، والتهاب الأجزاء الداخلية للقلب ، والإصابات الناتجة عن الذيفانات (Omoe *et al*., 2002) ، تعود أمراضية بكتريا *s.aureus*إلى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة مثل إنتاجها الذيفانات Toxins والإنزيمات Enzymes التي تساعد البكتريا على إحداث الإصابة (Brooks *et al*., 1998) ، إذ تمتلك البكتريا القابلية على إنتاج الأنزيمات خارج خلوية مثل الأنزيم المختثر لبلازما الدم الذي يمتلك القدرة على تثبيط عملية البلعمة وأنزيم البروتييز ، واللايبيز التي تسهم في غزو البكتريا للأنسجة وانتشار الخمج فضلا عن امتلاكها المحفظة التي تساعد في مقاومة البكتريا لعملية البلعمة (Ryan and Ray, 2004) .

الهدف من الدراسة:

نظرا لحدوث التهابات لدى بعض الأشخاص المراجعين للعيادات التخصصية لطب الأسنان فقد هدفت الدراسة التحري عن التلوث الميكروبي في تلك العيادات , وتحقق الهدف من خلال عزل وتشخيص الأنواع البكتيرية (*Pseudomonas. aeruginosa*، *E.coli*، *proteus sp*، *S. aureus*) مجهريا ومظهريا وبالاختبارات الكيموحيويه Biochemical test.

2.استعراض المراجع

1.2: بكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas. aeruginos*

عصوية الشكل وسالبة لصبغة گرام ومستقيمة او منحنية . تظهر بشكل مفردة أو ثنائية أو على شكل سلاسل قصيرة و تتحرك بواسطة سوط قطـــــبي (Ryan and Ray, 2004) . تظهر مستعمرات بكتريا *P. aeruginosa* شاحبة اللون على وسط أگار الماكونكي لعدم قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز (Baron and Finegold , 1990) ، كما تمتاز معظم أنواع جنس الزوائف الزنجارية بإفرازها صبغة البايوفردين الخضراء المصفرة والتي تذوب بالماء والكلورفورم (Lau *et al* ., 2004). كما تتصف بكتريا *P.aeruginosa* بايجابيتها لاختبار الأوكسديز والكتاليز، وتميع الجيلاتين, إما بالنسبة لمجموعة اختبارات IMViC والتي شملت اختبارات : (الأندول , احمر المثيل , فوكس بروسكاور, واستهلاك السترات) , فكانت موجبة في اختبار استهلاك السترات فقط , وسالبة لاختبارات الأندول ، والمثيل الأحمر ، و فوكس بروسكاور، إذ تستطيع هذه البكتيريا استغلال مركبات متنوعة كمصدر للطاقة كالمصادر النايتروجينية والكاربونية (Itah and Essien , 2005) .

تعدّ بكتريا *P. aeruginosa* من المسببات المرضية الانتهازية وخاصة في المناطق التي تخلو من الدفاعات الطبيعية (Jawetz *et al* ., 2008) لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة منها عوامل خلوية كالاسواط والأهلاب والشعيرات التي تساعد على الحركة والالتصاق بخلايا المضيف وعوامل إفرازية كصبغة البايوسيانين و وصبغة البايوفردين وذيفانات Exotoxine A التي تكون قاتلة عند حقنها بشكل نقي في الحيوانات المختبرية وذيفانات Exotoxine S التي وظيفتها الالتصاق ومنع عملية البلعمة في الأنسجة المصابة (Jawetz *et al* ., 2010). ومن عوامل الضراوة الاخرى في بكتيريا *P. aeruginosa* الغشاء الحيوي والمادة اللزجة المخاطية (Todar , 2008) , التي تفرز من قبل بعض سلالات بكتيريا *P. aeruginosa* وتظهر مستعمراتها بمظهر مخاطي Salyres and Whitt , (2002) , إذ يكثر إنتاجها في حالات الخمج المزمن للرئة وخاصة في حالة التليف الكيسي ولها دور في تقليل نفاية التركيز القاتلة لعدد من المضادات الحيوية والمعقمات ومنعها من الوصول إلى الموقع الهدف في الخلية البكتيرية ودورها في زيادة مقاومة البكتريا لعملية البلعمة (Jawetz *et al* ., 2010)

تعد بكتيريا *P. aeruginosa* سبباً مهماً في أخماج الجهاز التنفسي المزمن المرتبطة بالتليف الكيسي والذي يسبب أخماج الصدر في البالغين والأطفال ، ويصاحب المرض إفراز مخاط لزج لايمكن إزالته من الرئة مما يؤدي إلى عسر في وظيفة الجهاز التنفسي (Hoiby *et al* ., 2001) ، كما تسبب بكتيريا *P. aeruginosa* العديد من الأخماج االاخرى منها أخماج الإذن وأخماج العين وأخماج القناة

البولية واخماج الجلد(Willenbrock *et al* ., 2006) , وتزداد نسبة الإصابة بهذه البكتيريا في حالات الأورام السرطانية و نقص المناعة وبعد عمليات نقل الأعضاء (Willenbrock and Ussery , 2007) .

:2.2 بكتريا القولون *E.coli*

تظهر جرثومه *E.coli* على هيئه عصيات صغيره سالبه لصبغه كرام , توجد بشكل منفرد أو بهيئة أزواج , تنمو في ظروف لاهوائيه اختياريه (Madigan *et al* ,2006) تتحرك بواسطة الاسواط المحيطه غير مكونه لسبورات, وقد تمتلك بعض سلالاتها المحفظة (Holt *et al*,1994) تستطيع النمو في مديات حرارية واسعة تتراوح مابين (15_45) م الا إن درجه الحراره المثلى لنموها هي 37م (Fotador *et al* ,2005) تظهر مستعمرات جرثومه *E.coli* المرضية على وسط ايوسين المثلين الأزرق الصلب ذات بريق اخضر معدني Green metalic cheen (Brooks *et al*,2004) كما إن لها القدره على تخمير سكر اللاكتوز ,فتظهر مستعمراتها بلون وردي على وسط الماكونكي الصلب (Mecter *et al* ,1998) تعطي جرثومه *E.coli* نتيجة موجبه للعديد من الاختبارات الكيمو حيويه مثل اختبار الكاتليز واختبار الاندول واختبار احمر المثيل في حين أنها تكون سالبه لاختبار الاوكسديز واختبار السترات واختبار الفوكس برسكار وتمتلك الجرثومه القابلية على اختزال النترات إلى نتريت وتحليل الجلاتين بينما لاتمتلك القابلية على إنتاج إنزيم اليوريز وإنتاج H2S (Macfaddin,2000).

تمللك البكتريا العديد من عوامل الظراوة أهما :الخمل Fimbriae والاسواط التي تساعد على الحركة والالتصاق بخلايا المضيف حيث تتحرك إلى المواد المغذية والأوكسجين والضوء أو تتدرج إلى الأسفل بعيد عن المواد السامة (Blair,1995:Caplan and kara _Lvanov,1993) . ومن عوامل الضراوة الأخرى المحفظة و الغشاء الحيوي وإنتاج الذيفانات Toxin وإنتاج الإنزيمات تلعب الإنزيمات دورا هاما في جميع مراحل عمليات الايض والتفاعلات الكيمياويه المختلفة ,تمتلك الإحياء ألمجهريه القابلية على إنتاج إنزيمات معينه ذات أهميه خاصة تدخل في مجالات مختلفة ومنها مجال الصناعات الغذائية ,كما تعد من عوامل الفوعه التي تزيد من أمراضيه الجراثيم المنتجة لها (Chirumamilla, *et al*,2001). بعض سلالات *E.coli* لها القابليه على إحداث العديد من اخماج الإنسان والحيوان (Belanger *et al*,2011) فهي مسؤوله عن اخماج الجهاز الهضمي واخماج المسالك البوليه واخماج أخرى ومنها تعفن الدم والسحايا (Russo and Johnson 2003).

3.2: بكتريا المتقلبات *Proteus sp*

توصف هذه البكتريا بأنّها عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام متحركة غير مكونة للسبورات (2007 (Abbott,. كما ان هذه البكتريا مكونة للكبسولة وتحتوي على مخامل Fimberiae تحتوي على الاسواط Flagellae ، سالبة لفحص الأوكسيديز، منتجة لانزيم اليوريز، منتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين H_2S وموجبة لفحص احمر المثيل Methyl red وسالبة لفحص Vogus Proskaur وكذلك بأمكانها تكوين Phenyl Pyruvic acid عند تنميتها على وسط حاوي على Phenylalanine (Greenwood *et al.*, 2002). وتكون موجبة لفحص الكاتليز وأنواع بكتريا المتقلبات تعطي فحصا سالبا للاندول ماعدا النوع *P.vulgaris* ، وتظهر مستعمرات بكتريا المتقلبات بلون اصفر باهت على وسط أكار الماكونكي لعدم تخمرها سكر اللاكتوز غير إنها تخمر كلا من سكر الكلوكوز والسكروز والكالاكتوز وتمتاز بكونها هوائية (Abbott,2007).

تمتلك بكتريا *proteus sp* العديد من عوامل الضراوة التي تساهم في أمراضيتها وتثبيتها في أنسجة المضيف (Corker *et al.*,2000). ومن عوامل الضراوة لهذه البكتريا الانزيم الحال للدم Hemolysin ، أنزيم اليوريز ، الأهداب و الاسواط كما تتميز هذه البكتريا بظاهرة الانثيال Swarming أضافة الى قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي (Himpsl *et al.*,2008).

على الرغم من كون هذه البكتريا جزء من النبيت الطبيعي (Normal flora) في القناة المعوية مع باقي انواع البكتريا المعوية للاشخاص الاصحاء لكن من الممكن ان تؤدي الى اصابة الأفراد ضعيفي المناعة في الغالب عندما تنتقل اليهم (Kearns, 2010).ولكونها بكتريا أنتهازية لذا فهي تسبب كثيراً من الاصابات عند وجودها في غير موطنها الطبيعي كخمج المسالك البولية (Pellegrino *et al.*,2013) .

4.2: بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*

هي مكورات موجبة لصبغة كرام ، مرتبة بشكل عناقيد غير منتظمة ، تنمو في العديد من الأوساط الزرعية منتجة مستعمرات بصبغات مختلفة تتدرج بين اللون الأبيض ، والأصفر الداكن والذهبي (Ryan and Ray, 2004) ، وتعد المكورات العنقودية موجبة للكتاليز كصفة تفريقية عن جنس *Streptococcus* (MacFaddin, 2000) وتتميز بكتريا *S. aureus*- عن بقية أنواع المكورات العنقودية بكونها موجبة لإنزيم مخثر بلازما الدم Coagulase (Collee *et al.*, 1996) .

وتعرف بكتريا *S.aureus* على إنها خلايا كروية الشكل قطرها 1مايكروميتر تقريباً ، موجبة لصبغة كرام ، غير متحركة ، غير مكونة للسبورات وعادة مكونة للمحفظة (Kenneth,2002) وذات مستعمرات كبيرة صفراء على الاوساط الغنية حيث تظهر مستعمراتها دائرية رقيقة ذات سطوح لماعة يصل قطر المستعمرة الواحدة (2-3) مليمتر وتصطبغ بلون ذهبي مصفر،ولها القابلية على تحلل الدم في وسط أكار الدم Blood agar ومعيشة هذه البكتريا هوائية او لاهوائية اختياريه .

تكمن الاهمية السريرية لبكتريا *S. aureus* في كونها تمتلك العديد من عوامل الضراوة التي تعطيها القدرة على النمو والتكاثر وغزو انسجة المضيف وبذلك فهي تساهم بصورة كبيرة في امراضيتها (Zadik *et al.*, 2001) وفيما يلي اهم تلك العوامل المحفظة و الببتيدوكلايكان وحامض التيكويك و بروتين protein A و الانزيم المخثر للبلازما وانزيم الكتاليز وغيرها من عوامل الضراوة (Murray *et al.*, 2009)

تعد جرثومة *S. aureus* من اشد انواع المكورات العنقودية في امراضيتها على الرغم من كونها جزءاً من النبيت الطبيعي للجلد والانف والبلعوم والقناة الهضمية والتناسلية للانسان (Todar,2002) . وتمتلك ايضاً القدرة على احداث اخماج انتهازية تتفاوت بين اخماج الجلد البسيطة نسبيا الى الامراض الجهازية المهددة للحياة (Levinson and Jawetz, 2000) . وبسبب امتلاكها العديد من المستضدات السطحية والذيفانات تستطيع هذه البكتريا اختراق انسجة الجسم (Zadik *et al.*, 2001).
ومن الأمراض التي تسببها هي الأخماج الأولية مثل الدمامل الموضعية (Furuncles) وهي عبارة عن خمج جلدي سطحي يحدث في حويصلات الشعر ، أو في الغدد الشحمية ، أو الغدد العرقية ، وهذا الخمج يؤدي إلى إغلاق قناة الغدة مصحوباً بحكة ، وتنتهي الإصابة عادة بتصريف القيح ، ومن الممكن أن تمتد الحويصلة بين الأنسجة الجلدية المتجاورة وتكون سلسلة من الإصابات التي قد تصل إلى مجرى الدم (Diep *et al.*, 2004) ، كما تنتج *S. aureus* الدمامل المزمنة نتيجة لتكرار الإصابة وهذه الإصابات عادة تكون مصحوبة بعدة عوامل كأن يكون الشخص مصاباً بداء السكري ، أو مصاباً بأحد أمراض الدم الأخرى ، وغالباً ما تظهر الإصابة ببكتريا *S. aureus* كإصابة ثانوية مصاحبة للإصابة الأولية بالمكورات المسبحية (Ryan and Ray, 2004). ومن الامراض الجلدية الاخرى التي تسببها بكتريا *S. aureus* هي الخراجات Abscesses والتهاب حويصلة الشعر Folliculitis (Johnson *et al.*, 2002 and Collee *et al.*, 1996) .

3. المواد وطرائق العمل Materials and method

1.3: الأجهــزة والأدوات المختبرية والصبغات والمواد الكيميائية

جدول(3-1) الأجهزة والمعدات المختبرية والصبغات والمواد الكيميائية

أســـــــم الجـــهـاز		ت
Autoclave	مؤصده	1
Sensitive balance	ميزان حساس	2
light microscope	مجهر ضوئي	3
Hot plate	مسخن حراري	4
Water bath	حمام مائي	5
Distiller	جهاز تقطير	6
High speed centrifuge	منبذة عالية السرعة	7
Incubator	حاضنة	8
Vortex mixer	مازج	9
Laminar flow cabinet	كابينة الزرع المجهري	10
Refrigerator	ثلاجة	11
Standard wire loop (1μ)	الناقل الزرعي القياسي	12
Conical flasks	دورق مخروطي	13
Disposable Petri dishes	اطباق بتري بلاستكية	14
Slides and cover slides	شرائح زجاجيه وغطاء شريحة	15
Test tube	أنابيب إختبار	16
Glycerol	كليسيرول	17
Methylred ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)	المثيل الأحمر	18
Agar- Agar	الاكار	19
Kovac' s reagent	كاشف كوفاكس	20
Gram stain	صبغة گرام	21

2.3: تحضير الأوساط الزرعية Preparation of culture media

حُضِّرت الأوساط الزرعية الجاهزة حسب تعليمات الشركة المُصنَّعة ما عدا الأوساط التركيبية التي شمِلت وسطي أكَار الدم والحركة .

جدول (3-2):الأوساط الزرعية

ت	اسم الوسط	الاستخدام
1.	Simmons citrate agar	استعمل للكشف عن البكتريا المخمرة للسترات بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون
2.	Pepton water	استعمل للكشف عن حلقة الاندول
3.	Eosin methylene blue	يفرق بكتريا القولون عن بقية أنواع العائلة المعوية
4.	MacConkey agar	استعمل بوصفه وسطا انتخابيا للبكتريا السالبة لصبغة غرام وللتفريق بين المستعمرات المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز
5.	Kligler's iron agar	استخدم هذا الوسط للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S وكذلك قابليتها على تخمير سكريات الكلوكوز واللاكتوز
6.	Blood agar	التحري عن قابلية العزلات على انتاج ظاهرة الانثيال Swarming ومعرفة نوع التحلل الدموي
7.	Nutrient agar	وسط تنمية عام
8.	Nutrient broth	استعمل لتنشيط وادامة العزلات
9.	Mannitol salt agar	التفريق بين المكورات العنقودية الذهبية عن بقية الانواع
10.	Motility media	استخدم لاختبار حركة البكتريا
11.	M.R.V.P Medium	استخدم الوسط للكشف عن التحليل الكامل أو الجزئي للسكريات وانتاج الحامض أو الاستيل مثيل كاربون

3.3: طرائق التعقيم Sterilization methodes

عقمت جميع الأوساط الزرعية الجاهزة، والتركيبية، وأغلب المحاليل المستخدمة التي لاتتأثر بالحرارة بجهاز الموصدة عند درجة حرارة 121 م° وتحت ضغط 15 باوند / انج^2 لمدة 15 دقيقة، أما الزجاجيات فقد تم تعقيمها بالفرن الكهربائي عند درجة حرارة 168 مْ لمدة ساعتين (MacFaddin, 2000).

4.3: جمع العينات Samples collection

جُمعت 50 عينة من العيادات التخصصية لكلية طب الاسنان للمدة من تشرين الأول 2018 ولغاية شباط 2019. إستُخدمت المسحات القطنية الحاوية على وسط ناقل Transport media swabs في عملية جمع العينات لضمان حيوية العزلات . وبعدها نقلت العينات الى المختبر و زرعت على وسط الاكار المغذي ووسط الماكونكي ووسط الايوسين- ازرق المثلين الصلب وكذلك على وسط اكار الدم الصلب وحضنت الاطباق بدرجة حرارة37 م ولمدة 18- 24ساعة لغرض تشخيص البكتريا النامية على الأوساط (MacFaddin, 2004) .

5.3: تشخيص البكتريا المعزولة

1.5.3:التشخيص المظهري والمجهري

تم عمل مسحات مباشرة من الأوساط الزرعية ثم صبغت بصبغة كرام لدراسة الخصائص المجهرية للأنواع البكتيرية المعزولة التي شملت شكل الخلية البكتيرية، وانتظام الخلايا البكتيرية مع بعضها , وطبيعة تفاعلها مع صبغة كرام. كذلك درست الصفات المظهرية لكل من المستعمرات والخلايا البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية المختلفة، شملت دراسة المستعمرات البكتيرية من حيث اللون والشكل و القوام والحواف والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفريقية Differential media والانتقائية Selective media.

2.5.3:الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

لغرض إجراء هذه الفحوصات تم استخدام المزروع البكتيري النامي على وسط الاكار المغذي بعمر 24 ساعة وهذه الفحوصات تشمل:-

الكشف عن إنزيم الكاتيليز Catalase test

تم نقل كمية قليلة من النمو البكتيري النامـــي على الوسط الزرعي بعمر 24 ساعة بواسطة العيدان الخشبية إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ثم أضيف لها قطرة من (H_2O_2) المحضر في الفقرة، إن ظهور الفقاعات الغازية يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

الكشف عن انزيم الاوكسيدز Oxidase test

تم بنقل كمية من النمو البكتيري الى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف المحضر آنياً، تلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجي يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

إختبار انتاج الهيمولايسين Hemolysin production test:

استُخدم في هذا الإختبار وسط أگار الدم؛ إذ تم تلقيح الوسط بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها , وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة37°م لمدة 18–24 ساعة. لوحظت النتيجة الموجبة عند حدوث تحلل دموي حول المستعمرة , اذ كان التحلل من نوع التحلل الكامل β- hemolysis ، (Levinson and Jawetz, 2000).

اختبار إنتاج مخثر البلازما Coagulase test

تم التحري عن إنزيم مخثر البلازما بالاعتماد على طريقة أنبوبة الاختبار (Tube Test) ، إذ تم إضافة 0.5 ملي لتر من بلازما دم الإنسان غير المخفف إلى أنابيب اختبار حاوية على 0.5 ملي لتر من وسط تربتون الصويا السائل الملقحة بالعزلات البكتيرية المراد التحري عنها وحضنت أنابيب الاختبار في حمام مائي في درجة حرارة 37 °م مدة أربع ساعات ، تم خلالها مراقبة تكون الخثرة لكونها دليلاً على ايجابية الفحص ، أما الأنابيب التي لم تظهر استجابة للاختبار تركت في الحاضنة مدة 24 ساعة وفي درجة حرارة 35 °م للتأكد من النتائج (MacFaddin, 2000) .

الكشف عن انتاج ألا ندول Indol test

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي بالمزروع البكتيري حضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 18 – 24 ساعة، عندها أضيفت بضع قطرات من كاشف كوفاكس إلى كل أنبوبة مع الرج الجيد، ظهور حلقة حمراء في أعلى الوسط يدل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 1979).

اختبار احمر المثيل Methyl red test

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي M.R.V.P Medium بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 – 48 ساعة عندها تم اضافة 5 قطرات من كاشف احمر المثيل مع رج الانبوبة ان ظهور اللون الاحمر في الأنبوبة يدل على التحلل الكامل للسكريات وانتاج الحامض (Collee *et al*., 1996).

اختبار الفوكس بروسكور Voges pros-kauer test

اجري الفحص بتلقيح الوسط الزرعي MR-VP Medium بالمزروع البكتيري، وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 – 48 ساعة بعد ذلك تم إضافة 1 ملي ليتر من الكاشف إلى كل أنبوبة مع الرج، ان ظهور اللون الوردي خلال 2 –5 دقيقة والذي يصبح كرزي غامق خلال 30 دقيقة مع الرج المتواصل يعبر عن النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

اختبار استهلاك السترات Citrate utllization test

اجري الفحص بتلقيح وسط السترات المائل بالمزروع البكتيري المراد فحصه وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 – 48 ساعة. ان تحول لون الوسط الاخضر الى الازرق وظهور النمو على خطوط الزرع يدل على النتيجة الموجبة (MacFaddin, 2000).

اختبار قابلية الحركة Motility test

اجري الفحص بتلقيح الانابيب الحاوية على الوسط بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 – 48 ساعة، انتشار النمو خارج حدود الطعنة يدل على النتيجة الموجبة .

اختبار كلكلر – ايرون Kligler-iron test

لقحت الانابيب الحاوية على وسط الكلكلر الصلب المائل بمستعمرة نقية بطريقة الطعن والتخطيط ثم حضنت بدردجة 37م لمدة 24 ساعة .ثم تقرأ المتغيرات اللونية في قعر وقمة الوسط الزرعي كما موضح ادناه.

اللون	القعر/السطح المائل
اصفر/احمر	حامضي/قاعدي
اصفر/اصفر	حامضي/حامضي
احمر/احمر	قاعدي /قاعدي
راسب اسود	انتاج H_2S

6.3: حفظ العزلات البكتيرية

1.6.3:الحفظ قصير الأمد

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتريا المراد حفظها وحضنت في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، ثم حفظت في درجة 4 م°، وكررت عملية الحفظ لتجديد حيوية العزلات كل شهر (Forbes *et al*., 2007).

2.6.3: وسط الحفظ طويل الأمد

حضر الوسط بإضافة 15% من الكليسيرول إلى المرق المغذي المحضر بإذابة 1.5غرام من الوسط في 50 ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر، وعقم بالمؤصدة، وترك ليبرد في درجة حرارة 56 مْ باستعمال الحمام المائي، ووزع على أنابيب اختبار معقمة وذات سدادات محكمة وحفظ في 4 مْ لحين الاستعمال. استعمل هذا الوسط لحفظ البكتريا المعزولة والمشخصة لعدة أشهر في درجة حرارة - 20 مْ (Forbes *et al*., 2007) .

4. النتائج والمناقشة

1.4:العزل والتشخيص

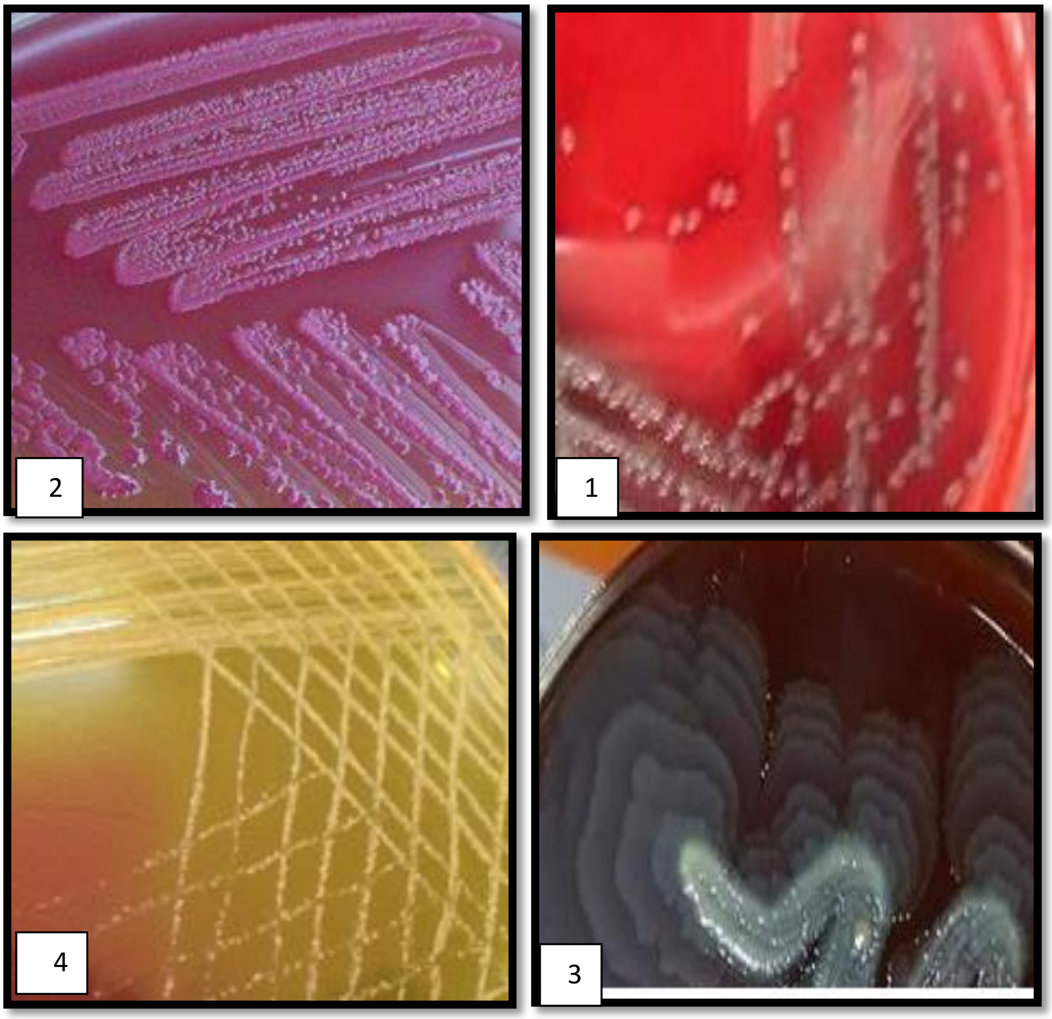
تم الحصول على 10 عزلات من اصل 50 عينة من العيادات التخصصية لكلية طب الاسنان وشملت 4 عزلات لبكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* و3 عزلات لبكتريا *E.coli* و2 عزلتان لبكتريا *Proteus* وعزلة واحدة لبكتريا *staphylococcus.aureus* وشخصت جميع العزلات مظهريا ومجهريا ثم اكدت النتائج بالاختبارات الكيموحيوية وكما يلي:

1.1.4: الخصائص الزرعية

ظهرت *Pseudomonas aeruginosa* على وسط أكار الماكونكي شاحبة عديمة اللون لعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز الموجود في الوسط الزرعي كما في الشكل (1) ولها رائحة شبيهة برائحة العنب المتخمر و ظهرت مستعمراتها محاطة بهالة شفافة على وسط أكار الدم مما يدل على قدرتها على تحلل الدم. بينما تكون بكتريا *E.coli* ذات مستعمرات وردية على اكار الماكونكي MacConkey agar نتيجة لتخمرها سكر اللاكتوز كما في الشكل (2) ، كما اظهرت النتائج ونكوم مستعمراتها ذات بريق معدني اخضر على وسط Eosin methylene blue . في حين ان بكتريا *Proteus* ظهرت بمستعمرات شفافة شاحبة على وسط MacConkey agar بوصفها غير مخمرة للسكر اللاكتوز و تمتاز بظاهرة العج swarming على اكار الدم Blood agar كما في الشكل (3). اما بكتريا *staphylococcus-aureus* تكون ذات مستعمرات صفراء ذهبية على وسط المانتول الملحي Mannitol salt agar نتيجة لتخمرها سكر المانتول كما في الشكل (4).

2.1.4: الخصائص المجهرية

أظهرت نتائج الفحص المجهري ان خلايا بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ، *E.coli* و *proteus* تكون بشكل عصيات صغيرة سالبة لصبغة كرام ذات لون وردي غير مكون للسبورات بينما ظهرت بكتريا *staphylococcus aureus* بشكل مكورات عنقودية مكون للمحفظة.



الشكل (1) : مستعمرات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* على وسط MacConkey agar

الشكل (2) مستعمرات بكتريا *E.coli* على وسطMacConkey agar

الشكل(3) مستعمرات *Proteus* بكتريا على وسط Blood agar

الشكل (4) مستعمرات بكتريا *staphylococcus-aureus* على وسط Mannitol salt agar

3.1.4: الفحوحات الكيموحيوية

الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* أعطت نتائج موجبة لإختبار الأوكسيديز واختبار الكتاليز لجميع العزلات وذلك لقدرة البكتيريا على انتاج انزيمي الأوكسيديز والكتاليز . اما بالنسبة لمجموعة إختبارات IMViC (الأندول , احمر المثيل , فوكس بروسكاور, واستهلاك السترات) , كانت النتيجة موجبة في اختبار استهلاك السترات فقط , اتصفت جميع العزلات بعدم قدرتها على انتاج غاز H_2S و أنها غير مخمرة للسكروز واللاكتوز. محاطة بهالة شفافة على وسط أگار الدم مما يدل على قدرتها على تحلل الدم كما في الجدول (1) .

الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا *E.coli* أعطت نتائج موجبة لاختبار الكتاليز, واختبار الحركة ,و اختباراحمر المثيل, وتخمر الكلوكوز واللاكتوز والمانتول , ونتائج سالبة لفحص لاوكسديز وفوكس بروسكور, وكذلك سالبة لاستهلاك السترات لعدم قابليتها على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون من خلال عدم تغير لون الوسط من الاخضر الى الازرق. وموجبة لاختبار الاندول من خلال تكوين حلقة الاندول الحمراء نتيجة تحلل الترتيوفان وتكون الاندول. وكذلك تنمو على وسط الحديد الثلاثي Triple sugar iron ويكون نموها A/A مع انتاج غاز CO_2 كما في الجدول (1) .
نتائج الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا *proteus* تكون موجبة لاختبار الكتاليز من خلال تكوين فقاعات هوائيه عند اضافة H_2O_2 لمستعمرة البكتريا الموضوعة على الشريحة الزجاجية وكذلك موجبة لاختبار احمر المثيل من خلال تكوين اللون الاحمر بعد اضافة الكاشف للمزرعة البكتيرية وهذا دليل على التحلل الكامل للسكريات وانتاج حامض , وايضا موجبة لاختبار الحركة من خلال انتشار النمو خارج حدود الطعنة , وكذلك موجبة لاستهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون حيث يتغير اللون الوسط من الاخضر الى الازرق. بينما اعطي جميع العزلات البكتريا فحصا سالبا للاوكسديز والفوكس بروسكور واختبار الاندول تكون النتيجة موجبة من خلال تكوين حلقة حمراء نتيجة تحلل الحامض الاميني الترتيوفان وتكون الاندول, كذلك انتجت غاز H_2s كما في الجدول (1)

جميع عزلات *staphylococcus aureus* أعطت نتائج موجبة للكتاليز, وسالبة للاوكسديز, من خلال عدم تكون اللون البنفسجي عند اضافة المستعمرة الى ورقة الترشيح المشبعة بالكاشف الاوكسديز.وكذلك موجبة لاختبار Coagulase . وايضا موجبة الاختبار فوكس بروسكور من خلال تكون اللون الاحمر بعد اضافة الكاشف وهذا دليل على التحلل الجزئي للسكريات ولها القابلية على تحلل الدم في وسط Blood agar كما في الجدول (1)

جدول (1) الاختبارات الكيموحيوية لجميع العزلات البكتيرية

الاختبارات	*Pseudomonas aeruginosa*	*E-coli*	*Proteus*	*staphylococcus aureus*
الكتاليز	+	—	+	+
الاوكسديز	+	—	—	-
Vogesproskauer	-	—	—	+
الاندول	-	+	—	
احمر المثيل	-	+	+	
استهلاك سترات	+	—	+	
الحركة		+	+	
الكلكوز		+	+	
اللاكتوز	-	+	—	
مانتول		+	—	+
Coagulase				+
انتاج H_2s	-		+	
Hemolysin test	+	+	+	+

2.4: الإعداد والنسب المئوية للعزلات البكتيرية

شخصت 10عزلات (20%) من مجموع 50 عينة التي جمعت من العيادات التخصصية لكلية طب الأسنان 2019 ، شملت 10 عينات من الأرضية ،10 عينات من الستائر ، 10 عينات من كرسي الأسنان و10 عينات من أدوات طبيب الأسنان و 10 عينات من الحشوات.

بينت النتائج البحث إن اعلي نسبة عزل لبكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* كانت من الأرضية وبنسبة (30) % واقل نسبة عزل كانت من كرسي الأسنان وبنسبة(10 %) بينما كانت اعلي نسبة عزل لبكتريا *E.coli* من ادوات طبيب الأسنان وبنسبة 20 % واقل نسبة عزل من الحشوات هي10 %. كما بينت النتائج إن نسبة تواجد بكتريا *staphylococcus.aureus* في الأرضية 10% . في حين بينت النتائج إن نسبة تواجد بكتريا *Proteus* في الستائر هي 20% كما موضح في الجدول (2).

جدول (2) يوضح الاعداد والنسب المئوية لعزل الانواع البكترية من العيادات التخصصية لكلية طب الاسنان

مصدر العينات	عدد العينات الكلي	عدد العزلات الموجبة	الأنواع البكتيرية	النسبة المئوية %
الارضية	10	3	*Pseudomonas aeruginosa*	%30
		1	*staphylococcus.aureus*	%10
الستائر	10	2	*proteus sp*	%20
كرسي الاسنان	10	1	*Pseudomonas aeruginosa*	%10
ادوات طبيب الاسنان	10	2	*E.coli*	%20
الحشوات	10	1	*E.coli*	%10
المجموع	50	10	-	%20

وعُزِزت نتائج الدراسة الحالية بنتائج الدراسات السابقة التي أجراها Abdul-Wahid (2014) و منحر (2011) و سالم (2014) , والتي اكدت بان اسباب انتقال التلوث البكتيري في العيادات والمستشفيات إما أن يكون ذاتياً بكونها تمثل جزءاً صغيراً من الفلورا الطبيعية أو مكتسباً من المرضى أو عن طريق الأشخاص المشرفين على المريض وبصورة عامة فأن الهواء والمياه والأيدي والأطعمة جميعها تساعد على انتقال البكتيريا من شخص لآخر وبالتالي اتساع دائرة العدوى البكتيرية (Thomas , 2007).

قد يرجع سيادة بكتريا الزائفة الزنجارية وبكتريا القولون وبكتريا المتقلبات في عيادات طب الاسنان الى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة أهمها عوامل المسح والارتباط Attachment and

effacing factors واهلاب الالتصاق وكذلك امتلاكها الاسواط والمحفظة والبروتينات السطحية التي تمكنها من الحركة والانتقال والعيش في ظروف قاسية .

تعـــد *S. aureus* أحد أهم الأسباب الرئيسية في إنتاج وتكوين الاخماج بسبب قدرتها الكامنة على الغزو والهجوم تحصل عملية إحداث المرض ومن ثم التسبب في إحداث أخماج في مناطق واسعة من الجسم (Murphy *et al.*, 2001) ، وتحدث الأخماج العنقودية عندما تخترق الحواجز المناعية مثل الجلد والحواجز المخاطية أو عند دخول أجسام غريبة ، و قد يكون الشـــخص المخمج يعاني أصلا من ضعفٍ في أنظمة الجسم المناعية. قد يكون سبب الاختلاف في نسب العزل لهذة البكتريا هو عدد العينات المشمولة في الدراسة ومدة جمع العينات.

الاستنتاجات والتوصيات

1 -الاستنتاجات Conclusions

سيادة بكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* في العيادات التخصصية لطب الأسنان تليها بكتريا القولون *E.coli* وبكتريا المتقلبات *Proteus* .

2 - التوصيات Recommendations

- الاهتمام بالنظافة الصحية للعيادات التخصصية لكلية طب الاسنان
- ضـرورة اجـراء المسـح الـدوري لعيـادات طـب الاسـنان لتحديـد مصـدر التلـوث البكتيـري ومعرفة مستويات المقاومة للمضادات الحيوية.

المصادر العربية

سالم , رنا مشعل. (2014). انتشار انزيمات البيتالاكتاميز نوع OXA بين بكتيريا الزوائف الزنجارية والمعزولة من مشستشفيات محافظة الديوانية . رسالة ماجستير , كلية العلوم - جامعة القادسية.

منحر , لمى فؤاد. (2011). دراسة بعض الجوانب الفسلجية والوراثية لبكتيريا *Pseudomonas aeroginosa* المعزولة من حالات سريرية في مدينة الديوانية . رسالة ماجستير, كلية التربية - جامعة القادسية .

المصادر الأجنبية

Abbott, S. L. (2007). *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas,* and Other *Enterobacteriaceae*. In:Manual of Clinical Microbiology, Murray, P. R.; *Baron, E. J.; Jorgensen, J.* H.; Landry M. L. and Pfaller, M. A.(eds.) 9th ed. ASM Press. Washington. USA, pp. 698-711.

Abdul-Wahid, A.A.**(2014).** Dissemination of Aminoglycosides Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Al-Nasseryia Hospitals. M.Sc. Thesis. College of Medicine. University of Kufa.

Baron, E.J. and Finegold, S.M. (1990).Bailey and Scott's. Diagnostic Microbiology .(8thed) Mosby . USA.

Belanger , L. ; Garenaux, A. ; Harel J.; Boulianne , M.; Nadeau , E. Blair , D.F. (1995).How bacteria sense and swim. Annual Reviews .

Brook ,G ,F.; Butel, J, S.; and Morse,S ,A.(2001).Medical microbiology lange medical brook Mcgraw-hill.tewenty-second edition pp 197-202.

Brooks, G.F., Butel, J.S. & Morse. S.A. (1998). Jawetz, Melinck and Adelberg's Medical Microbiology .21sted. Appleton and lange, Asimon and Schuster Co., California.

Chirumamilla, R.R.; Muralidhar, R.; Marchant, R.and Nigam,P.(2001). Improving the quality of industrially important enzymes by directed evolution. *Mol. Cell. Biochem*. 224: 159–168.

Cicek, A.C.; Saral, A.; Duzgun, A.O.; Cizmeci, Z.; Kayman, Balci, P.O.; Dal, T.; Firat, M.; Yazici, Y.; Sancaktar, M.; , Osman Birol Ozgumus, O.B. and Sandalli, C. (2013). Screening of class 1 and class 2 integrons in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* collected from seven Hospitals in Turkey: A Multicenter Study. J. Med. Microb., 3:227-233.

Collee, J. G. ; Fraser, A. G. ; Marmion, B. P. and Simmons, A.(1996). Mackine and McCarteny "Practical medical microbiology" 14th ed, Churchill livingston Inc., New York.

Corker, **C. ; Poore, C. A. ; Li , X. and Mobley , H. L. (2000) .** Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes Infect* ; **2**(12) : 1497-1505.

Diep, B. A.; Sensabaugh, G. F.; Somboona, N. S.; Carleton, H. A.; and Perdreau-Remington, F. (2004). Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin. J. Clin. Microbiol. **42**: 2080-2084.

Forbes , B. A. ; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. (2007). Diagnostic Microbiology 12th ed. Bailey and Scotts'. Mosby Elsevier. China., pp: 93-247.

Gawish, **A.; Mohammed, N.; El-Shennawy, G. and Mohammed, H.** (2013). An investigation of type 3 secretion toxins encoding-genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a university hospital in Egypt. J. of Microbio. and Infec. Dise, 3 (3): 116-122.

Greenwood, D. ; R. C. B. Slack and J. F. Peuthere (eds) (2002). Medical Microbiology. A guide to microbial infections , pathogenesis , immunity , laboratory diagnosis and control. 16th ed. Edinburl, London , New York , Philadephia , Sydney , Toronto.

Himpsl , S .D. ; Lockatell , C.V.; Hebel , J.R . ; Johnson , D . E . and Mobley , H . L. (2008). Identification of virulence determinants in uropathogenic Proteus mirabilis using signature-tagged mutagenesis. *J. Med .Microbiolo,* **57**: 1068-1078.

Hoiby, N.; Johansen, H.K.; Moser, C.; Song, Z.; Ciofu, O. and Kharazmi, A. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. Microb. Infection., 3: 23-35.

Holt, J. G. ; Kreig , N. R. ; Sneath, P. H.A. ; Stanley, J. T. and Williams , S. T. (eds) (1994) Bergy's manual of determinative bacteriology. 9th. ed Williams and Wilkins , *USA*. P. 532 – 553.

Itah, A.Y. and Essien , J.P. (2005). Growth profile and Hydrocarbono clastic potential of Microorganisms Isolated from Tarballs in the Bight of Bonny , Nigeria , World J. of Microbiol Biotechnol., V. 21: 6-7.

Jawetz, E. J.; Melnick, J. L.; Adelberg, E. A.; Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. (2010). Medical Microbiology. 23rd ed. Appelton and Longe New York Connctical.PP. 45-60 .

Jawetz, E., Melnik, J.L. ; Adelberg , E.A.; Brook, G.F.; Butel, J.S. and Morse , S.A. (2008). Medical Microbiology 26th. ed. Appleten and Lang New York. Connctical. PP.45-60.

Johnsson, D., Molling, P., Stralin, K. and Soderquist, B. (2004). Detection of Panto-Valentine leukocidin gene in *Staphylococcus aureus* by LightCycler

PCR: clinical and epidemiological aspects. Clin. Microbiol. Infect. **10**:884-889.

Kearns, D.B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol*; **8**(9): 634-644.

Kenneth, T . (2002) . The bacterial flora of Human , University of Wisconsin – Madison . Department of bacteriology .

Levinson, W. and Jawetz, E. (2000). Medical Microbiology and Immunology. Examination and Board Review. 6th ed., McGraw-Hill, International Editions. Health Professions Series.

Macfaddin, J.F. (2000).Biochemical test for bacteria, 3[nd]ed.the Williams andWilkins. London. identification of medical Microbiology .8[th]ed .The McGraw-Hill Companies.USA.

Murphy, G. J.; Pararajasingam, R.; and Nasim, A. (2001). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in vascular surgery patients. Ann. R. Coll. Surg. Engl. **83**: 158-163.

Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; and Pfaller, M. A. (2009) . John, F. K. Kennedy. Medical microbiology. 6[th] edition. Mosby Elsevier. U.K.

Omoe, K.; Ishikawa, M.; Shimoda, Y.; Hu, D. L.; Ueda, S.; and Shinagawa, K. (2002). Detection of *seg, seh,* or *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg, seh,* or *sei* genes. J. Clin. Microbiol. **40**: 857-862.

Pellegrino. R.; Scavone, P.; Umpiérrez, A.; Maskell, D.J.and Zunino, P.(2013). *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. *J. Phatho. Dis.,* **2**(67):104-107.

Russo, T.A. and Johnson, J.R.(2003). Medical and economic impactof extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*. 5: 449-456.

Ryan, K. J.; and Ray, C. G. (2004). Sherris Medical Microbiology 4th ed. McGraw-Hill-NewYork.

Salyers, A.A., and Whitt, D.D. (2002). Bacterial Pathogensis amolecular approach, P. 251- 259 . American Society for Microbiolog Press, Washington, D.C.

Sosa,V. ; Schlapp,G and Zunino,P.(2006). *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice. *Microbiol*. **152:**2149.

Swierzko, A.S.; Kirikae, T.; Kirikae, F.; Hirata, M.; Cedzynsk, M.; Ziolkowski, A.; Hirai, Y.; Kusumoto, S.; Yokochi, T.;and Nakano, M.(2000). Biological Activities of Lipopolysaccharides Of *Proteus* Species & Their Interactions With Polymyxin-B and An 18-Kda Cationic Antimicrobial Protein (cap 18) Derived Peptide. *J.Med.Microbiology*. **49**(2): 127-138.

Thomas, L.C. (2007). Genetic methods for rapid detection of medically important nosocomial bacteria. Faculty of Medicine, Department of Medicine, The University of Sydney, Australia.

Todar, K. (2008) .Text Book of Bacteriology Written and Edited by Kneth Todar university Todar online text book of Bacteriology.

Todar,K. (2002). Staphylococcus. J. Med. Microbiol, 1-9.

Willenbrock, H. and Ussery, D.W. (2007). Prediction of highly expressed genes in microbes based on chromatian accessibility . BMC, Mol., Biol., 8: 11.

Willenbrock, H.; Friis, C.; Friis, A.S. and Ussery, D.W. (2006). An environmental Signature for 323 microbial genomes based on codon adaption indices genome. Biol., 7 : R114.

Zadik, P.M.; Davies, S.; Wttittaker, S. and Muson, C. (2001). Evaluation of new selective medium for methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbial. **50**:476-479.