جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية / كلية العلوم

قسم علوم الحياة

بحث بعنوان

التأثير الشبطي لجسيمات الفضة النانوية على بكتريا staphylococcus aureus

مقدم الى

كلية العلوم – قسم علوم الحياة وهو جزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس في علوم الحياة

من قبل الطالبة

رواء عبدالكاظم موسى

بإشراف

أ.د. سيوف خومان الرماحي

٢٠١٩م ١٤٤٠هـ

بسم الله الرحمن الرحيم

ويسألونك عن الروح قل الروح من امر ربي
وما أوتيتم من العلم إلا قليلا

صدق الله العلي العظيم

سورة الاسراء   اية ٨٥

الاهداء

الى امي حبيبتي لقد كبرت الطفلة التي ترعرعت في مدرسه قلبك ونامت على وساده حضنك وكبرت معها طفولتها فها هي ..

اليوم تحقق الحلم الاكبر من احلامها ..

ابي الغالي قد اشتد ساعدي وقست عظمتي وأن الاوان ان احمل و اتقاسم اعباء الحياة معك

اهدي بحث تخرجي لكما واسأل الله ان أرد لكما القليل من كثيركم

وايضا

الى اخوتي واخواتي

زملائي وزميلاتي

و اساتذتي و بالأخص استاذتي ومشرفه بحثي أ.د سيوف خومان

والى ارواح شهداء وطني العراق الحبيب

والى كل فتاه حلمت ان تصل لهذا اليوم ومنعتها الظروف

اسال الله ان يمن علينا بالنجاح والتوفيق الدائم

في كل معتركات الحياة والحمد لله على ما كان وما نحن به وما سيكون ..

المقدمة :

تضم المكورات العنقوديه (Staphylococci)انواعا عديدة من البكتريا الممرضه للأنسان والحيوان على حد سواء وتعد S.aureus من اهم الانواعا الممرضه للأنسان واكثرها شيوعآ وهي مسؤولة عن مدى واسع من الامراض (Omoc et al2002) .

تعد s.aureus النوع الوحيد من جنس المكورات العنقوديه ذات الاهميه السريريه للأنسان والتي تكون موجبه لأنزيم مختثر البلازما Coagulase ومع ذلك هناك سلالات منها قد تكون سالبه لهدا الانزيم كما ان بعض الانواع قد تسبب امراض الحيوانات الاخرى . تعد جرثومه s.aureus من اكثر الجراثيم غير مكونه للسبورات مقاومه للعوامل الفيزوكيميائيه اذا أن لهذه الجراثيم القدره على البقاء حيه لمده ١٤ اسبوع في القيح الجاف وتقتل بواسطه ٧٠% كحول اثيلي فقط بعد فتره تماس لاتقل عن ١٠ دقائق (Edmon et al….1996) وتستطيع ان تتحمل درجه حرارة ٦٠ م لمده ٣٠ دقيقة ولكنها تقتل بعد مرور ٦٠ دقيقه في نفس درجه الحرارة هذه (Collee et al….1996) وهي بكتريا موجبه لصبغه كرام وفي المزارع القديمه تميل هذه البكتريا لزوال قابليتها للاحتفاظ بصبغه البنفسج البلوري crystal violet لذا قد تظهر سالبه الصبغه ،وهي غير متحركة مستعمراتها دائرية بقطر ٢-٣ ملم ملساء،غير شفافة ، محدبه قليلا وذات لون ذهبي و احيانآ اصفر او برتقالي او بلون القشطه cream-like تنمو هذه البكتريا جيدا على الاوساط الزرعيه مثل الاكار المغذي nutrient agar و لكنها تصبح مستعمراتها اكبر عند زرعها على وسط اكار الدم blood agar اذ تنقسم لتكون ما يشبه عنقود العنب في الاوساط الصلبه(Levison and Jawetz..2000)وتكون محاطة بمنطقه من تحلل الدم التام من نوع بيتا Beta –hemolysis. اما في الاوساط الزرعيه السائله فقد تظهر اما مفرده او بشكل ازواج او سلاسل قصيرة ومعظم سلالاتها تتحمل نسبه عاليه من ملح الطعام Nacl ما بين (١٠%-٧،٥). كما انها موجبه لأنزيم الكتاليزcatalase والمثيل الاحمر methyl red وفوكس بروسكورvoges-proskouer وسالبه لفحص الاوكسديز مخمره لسكريات المانيتول ،الكلوكوز، المالتوز (Johnsonetal 2002…). ان جرثومة staph-aureus هي كائن ممرض مقيح قادر على غزو الانسجة وتثبيط عمليه البلعمه بوساطة الخلايا العدله ،حيث يشترك غزو الانسجة وقتل الخلايا البلعميه في الاستجابة الالتهابية التي تؤدي الى الصدمة السميه وأن فعاليه البلعمه تزداد في حالات الحمى ،الاورام الخبيثة ، معظم الاصابات الجرثومية وبعض الاصابات الفايروسيه (Jawetzetal…2007) وعلى العكس من ذلك تقل فعاليتها في حالات الاعتلال الوراثي و امراض المناعة الذاتيه والمرضى والمصابين بقله خلايا الدم البيض العدله Neutropenia ومرضى داء السكري تمتلك جرثومة S.aureusالعديد من اليات المقاومة للمضادات الحيوية والتي تخضع السيطرة

العوامل الوراثية المحمولة على الكروموسوم chromosome اوالبلازميد plasmids او العناصر القافزهTransposons(hogg..2005) ومن الاليات التي تستخدمها لمقاومه مضادات البيتالاكتام واكثرها شيوعا هي انتاجها لأنزيمات البيتالاكتام اذا تقوم هذة الانزيمات بمهاجمه حلقه البيتالاكتام الموجودة في نواة البنسلينات penicillins والسيفالوسبورينات Cephalosporins ليتحول المضاد الى مركب غير فعال حيث تشفر هذه الانزيمات بوساطة جينات محمولة على الكروموسوم اوالبلازميد(Duran et al.. 2012) كما تمتلك هذه الجرثومة العديد من الاليات المقاومة المضادات الحيوية فمنها تغير حاجز النفاذية وموقع الهدف الى غير ذلك وجميع هذه الاليات تشفر من قبل عوامل وراثية تمتلكها الجرثومة (Heidari et al.. 2011). يعد البنسلين من اكثر مضادات الحياة تأثيرا في المكورات الذهبية و عليه فقد تم استعماله منذ بداية الاربعينات وهو يكافح بنجاح جميع حالات الاصابة بالمكورات الذهبية وغيرها من الجراثيم . غير ان بعض السلالات بدأت تقاوم هذا المضاد بفضل قدرتها على انتاج البيتالاكتاميز الذي يعطل عمل البنسلين لذا فشل البنسلين ومشتقاته في علاج اخماجها وظهور سلالات بكترية مقاومه لعده مضادات جانبيه اخرى (Murray .1984:Mini et al 1997..). ودفع ظهور انتشار المقاومه لمضادات الحياة بين الجراثيم الموجبه لصبغه كرام دفع المختصين بالكيمياء و الاحياء المجهريه الى البحث المتواصل من اجل ايجاد مواد بديله مضادة للجراثيم ،منها النباتات الطبية وما تحويه من مكونات فعاله ،اضافه الى تصنيع مواد كيميائيه جديدة بحيث تستطيع ان تتغلب على المقاومه التي تظهرها الجراثيم ضد مضادات الحياة المتداولة (Lamb et..1999 Esswit Srour....2000. ان في ولايه كاليفورنيا .يحمل شخص واحد من كل ١٠٠ شخص المكورات العنقوديه الذهبية للبنسلين من غير ان تعرضهم للأصابه بالمرض (Munoz et al ...1999). و يعد داء السكري من اكثر الامراض شيوعا المخللة بتوازن سكر الكلوكوز في الدم (Guay et al...2011).ويتصف بإضطراب الأستقلاب وارتفاع شاذ في تركيز سكر الدم نتيجة لحدوث خلل(نقص)في افراز هرمون الانسولين المنظم لعمليه امتصاص سكر الكلكوز من الدم نحو العضلات و الانسجة الدهنيه او انخفاض حساسية الانسجة للأنسولين او كلا الامرين (Lanner et al ...2008)يحدث هذا المرض نتيجة لحدوث مضاعفات عدة داخل جسم الانسان ناجمة عن تحرير الجذور الحرة في الدم (Golbidi & Lahar) ..2010 التي تتلف مكونات خلوية متعددة كالدهون والبروتينات والDNA. علاوة على ذلك .هناك عوامل عده ترتبط بداء السكري تتضمن : زيادة او ارتفاع موت الخليه Apoptosis ،تناقص او انخفاض اعاده انقباض الاوعية الدمويه .عدم استجابة الإخماج للعلاج و تأخير التكوين الخلوي في جروح السكري المساهمه في اضعاف التئام الجروح (Nguyen et al ..2010)كما ان ضعف شفاء (التئام)الجروح يمثل مشكله حادة او قاسيه لمرضى داء السكري ،حيث تمكن من تخفيف او اضعاف الفعالية البدنيه المسفره عن جروح مدمنه تؤدي الى بتر الاعضاء (Lioupis..2005)

و ان عمليه شفاء الجروح يمكن تحديدها بمراحل متعددة تتضمن جوانب بارزه منها الخمج ،تشكل النسيج المتحبب انتاج انسجه القديمه (Diegelmann & Evans..2004)فضلا عن ذلك ،يوجد هنالك الكثير من العوامل التي باستطاعتها ان تؤثر على شفاء الجروح والتي تتداخل مع واحده او اكثر من مراحل هذه العمليات وبالتالي تسبب في افشال او اتلاف اصلاح النسيج (Barrientos et al ..2008) هناك توافق جماعي بين الاطباء السريرين بأن مرضى داء السكري تتزايد لديهم مخاطر الاخماج تطورا نتيجة لضعف قابليه اجسامهم على تنظيم مستويات كلوكوز الدم المؤديه الى ارتفاع سكر الدم (فرط السكر) Hyperglycemia(Braces..2007)و بالخصوص قابليه الجروح على امتلاك اليه منسوبه الى اضعاف وظيفة خلايا الدم البيض المرتبطة بالإمراض الوعائية ،ان سيطرة نقص الكلكوز الى طاقه مما يؤدي الى توفر كميات زائدة منه في الدم بينما تبقى الخلايا متعطشة للطاقة الامر الذي يؤدي الى ظهور حاله من فرط السكر بالدم (Bhatia et al..2003)

اهداف الدراسة

نظرا لتعرض الجروح الناجمة عن الاصابات الجلدية للتلوث الجرثومي بفعل الجراثيم الانتهازية المرضيه فقد اجريت هذه الدراسة للتوصل الى:

١. التحري عن بعض الجراثيم الموجبه والسالبة لصبغه كرام المصاحبه لخمج الجروح لدى الاشخاص المصابين وغير المصابين بداء السكري.
٢. مقارنه نسبه الخمج الجرثومي لإصابات الجروح بين الاشخاص المصابين وغير المصابين بداء السكري.
٣. دراسة نمط المقارنه البكترية لعزلات Staph. aureus اتجاه عدد من المضادات الحيوية وتحديد التركيز المثبط الادنى لعدد منها بإستخدام نظام الفايتك Vitek compact 2 system
٤. التحري عن بعض الجينات المقاومه للمضادات الحيوية لبعض عزلات بكتريا Staph. aureus بإستخدام تقنيه ال PCR.

طرق العمل

جمع العينات Collection of Sample

جمعت العينات من مستشفى الديوانيه التعليمي ومن ردهات الجراحه العامه والعمليات الصغرى بواقع ٢٠٠ عينه شملت ١٠٠ عينه من الاشخاص المصابين بداء السكري و ١٠٠ عينه اخرى من الاشخاص غير المصابين بداء السكري . اخذت المسحات من اصابات جلديه لاماكن مختلفة من الجروح وبأعمار مختلفة لكلا الجنسين . استخدمت المسحات القطنية الحاويه على وسط ناقل Transport media swabs في عمليه جمع العينات لضمان حيوية العزله .

زرع العينات Culture of sample

بعد اخذ المسحات من الإصابات الجلدية باستخدام المسحات الحاويه على وسط ناقل . نقلت الى المختبر مباشره خلال (٣٠-٢٠) دقيقة ،حيث زرعت العينات بطريقه التخطيط على اطباق كلاِ من :

- وسط اكار الدم Blood agar
- وسط اكار الماكونكي MacConkey agar

حضنت الاطباق بدرجه 37مْ و لمده 24 ساعة .كما تم حضن الاطباق التي لم يظهر فيها نمو خلال 24ساعة لمدة 24 ساعة اخرى قبل اعتبارها نتيجة سالبه .

تشخيص البكتريا المعزولة Identification of Bacteria

١- التشخيص المجهري Microscopic diagnosis: صبغت جميع العزلات بصبغه كرام ، وثبتت الصفات المجهريه لها من حيث شكلها واصطباغها بصبغه كرام وتجمع الخلايا .

٢- التشخيص الزرعي Cultural diagnosis:حددت الصفات الزرعيه للمستعمرات النامية على الاوساط الزرعية التاليه

- وسط اكار الدم :حددت بوساطته الصفات الشكليه للمستعمرات النامية و الوانها ،كما يمكن تم التحري بوساطته عن انتاج البكتريا لإنزيم الهيمولايسين.

- وسط الماكونكي :يعتبر هذا الوسط وسطا تفريقاً تنمو عليه مستعمرات البكتريا السالبه لصبغه كرام حيث استعمل لدراسة الصفات الشكليه للمستعمرات المخمره لسكر اللاكتوز بألوان حمراء او ورديه على سطح الوسط ،اما اذا كانت مخمره له فتظهر مستعمراتها شفافة مثل بكتريا Ps.aeruginosa (Winn et al 2006).
- وسط اكار الكروم Chrom agar: يعتر هذا الوسط تشخيصا لنمو البكتريا بالاعتماد على لون المستعمره النامية عليه ،اذ يكون لكل بكتريا لون معين تظهر بهِ عليه .

التشخيص بنظام الفاتيك VITCK يعد نظام المن الانظمة التشخيصية الحديثة والسريعة في التشخيص البكتيري،اذ يعطي نتائج دقيقه تصل دقتها الى 99% و لغرض التأكد من العزلات البكتيرية استخدم النظام اعلاه وحسب تعليمات الشركه المجهزه وفقاً لما جاء في (Fritsche et al..2011).

١- زرعت العزلات البكتيرية على وسطي اكار الدم والماكونكي وحضنت بدرجه حرارة 37مْ و لمدة 24ساعة .

٢- حضر من المزروع البكتيري عالق بكتيري،وذلك بنقل مستعمره واحده من كل طبق الى انابيب اختبار حاوية على3 مل من المحلول الملحي الفسلجي بتركيز0.85%ثم خففت عكورة النمو للحصول على عالق كثافته تتراوح بين (0.50- 0.63)ملغم .مل و الذي يكافئ 1.5*10 خليه .مل باستخدام جهاز المطياف الضوئي بطول موجي 230 نانومتر.

٣- وضع ال Card cassette الخاص بتشخيص الانواع البكتيرية في كل انبوبه من انابيب الاختبار الحاويه على العالق البكتيري المخفف و من ثم وضعت الانابيب في جهاز الفاتيك الذي يقوم بقراءة النتائج تلقائيا وتحديد نوع البكتريا الموجودة في العالق.

الاختبارات الكيموحيويةBiochemical tests

اجريت مجموعه من الاختبارات الكيموحيوية اللازمة لتشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة وكالتالي :

١- اختبار الكتاليز Catalase test:نقل جزء من مستعمره فتيه بعمر ٢٤ ساعة بوساطة ناقل زرعي الى شريحة زجاجية نظيفة ثم اضيفت قطره من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 30%وتكون النتيجة موجبه بظهور فقاعات من غاز الاوكسجين (Macfaddin 2000)

٢- اختبار الاوكسيديز Oxidase tast:نقل جزء من مستعمره فتيه بعمر ٢٤ ساعة بوساطة عود خشبي معقم الى ورق ترشيح مشبعه بكاشف الاوكسيديز ،و ان تكون الون الازرق خلال ١٠ ثوانِ دليل على ايجابية الاختبار (Macfaddin,2000)

٣- اختبار انتاج انزيم مختر البلازما Coagulase tast:تم التحري عن انتاج انزيم مختر البلازما اعتمادا على طريقه انبوبه الاختبار (Test tube)،حيث اضافه 0.5مل من بلازما دم الانسان عبر المخفف الى انابيب اختبار حاويه على 0.5مل من وسط تربتون الصويا السائل والملقحة بالمستعمرات البكتيرية المراد اختبارها ،حضنت انابيب اختبار في حمام مائي بدرجه حرارة 37 مْ لمده اربع ساعات تم خلالها مراقبة الخثرة ،لكونها دليلا على ايجابيه الفحص ،اما الانابيب التي لم تظهر استجابة للاختبار تركت في الحاضنه مده 24 ساعة وبدرجه حرارة 37مْ للتأكد من النتائج (Macfaddn…2000)

٤- اختبار تخمر سكر اللاكتوز وسكر الكلكوز وتكوين غاز H_2S:استخدم هذا الاختبار وسط للكشف عن قدره البكتيريا عاى تخمير سكر اللاكتوز او الكلوكوز من خلال تغير لون الوسط بفعل كاشف الفينول الاحمر الى اللون الاصفر او بقائه بلون الاحمر دون تغير او تغير القعر فقط دون تغير لون المائل وهذا دليل على تخمر سكر الكلوكوز فقط ،ومن خلال هذا الوسط تم الكشف عن قابليه البكتيريا على انتاج غاز (كبريتيد الهيدروجين)الذي يتفاعل مع املاح الحديد في الوسط ليكون راسبا اسود اللون من كبريتيد الحديدوز(Criuickshank et al …1975)

٥- اختبار فعالية انزيم اليوريز Urease test:استخدم هذا الاختبار في وسط اكار اليوريا Urea agarالمعقم الذي لقح بجزء من المستعمره البكتيرية النقية المراد اختبارها ثم حضن بدرجه حرارة مْ37 لمده(24-48)ساعة ويستدل على النتيجة الموجبه بتغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي (Harley et al 1996)

٦- اختبار تحليل الدم Hemolysis test:استخدم في هذا الاختبار وسط اكار الدم اذ تم تلقيح الوسط بجزء من المستعمره البكتيرية النقية المراد اختبارها وحضنت الاطباق بدرجه حرارة 37مْ لمدة (18-24)ساعة لوحظت النتيجة الموجبه عند حدوث تحلل دموي حول المستعمره Levinson (& 2000) Jawetz

٧- مجموعه اختبارات IMVCالمكونه من :

- اختبار انتاج الاندول Indol production test:استخدام في هذا الاختبار وسط ماء الببتون (Pepton water)الذي لقح بجزء من المستعمره البكتيرية النقية المراد اختبارها ،ثم حضن الوسط بدرجه حرارة 37مْ لمده 24 ساعة بعد ذلك اضيفت عده قطرات من كاشف كوفاكس kovac s reagent الى الوسط . وان ظهور حلقه حمراء اللون دليل على ايجابية الفحص وقدرة البكتريا على تحليل الحامض الأميني التربتوفان Tryptophan و انتاج الاندول (Baron & Finegold 1995).
- اختبار المثيل الاحمر Methyl red test:استخدم في هذا الاختبار وسط ماء الببتون ،الكلوكوز و الفوسفات (G.P.P.W.)،حيث يوضح قابليه البكتيريا على تخمير سكر الكلوكوز و انتاج الحامض العضوي الذي يؤدي الى خفض الأس الهيدروجيني للوسط اقل من 4.5 لقحت الانابيب الحاويه على الوسط بجزء من المستعمره البكتيرية النقية المراد اختبارها وحضنت بدرجه حرارة 37 مْ لمده 48 ساعة .بعد انتهاء فتره الحضن اضيفت 5قطرات من كاشف المثيل الاحمر وسجلت النتيجة الموجبه بظهور اللون الاحمر دلاله على انتاج الحامض ،في حين ان بقاء اللون الاصفر يمثل النتيجة السالبه (Collee et al …1996)

- اختبار فوكس _بروسكاور Voges_Proskauer test:لقح وسط (G.P.P.W.) بجزء من المستعمره البكتيرية النقية المراد اختبارها ثم حضن بدرجه حرارة37 مْ ولمده (24_ 48)ساعة ،بعد ذلك اضيف كاشف باريت Barrit reagent المتضمن ١ مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH بتركيز 40% و3 مل من محلول α _Naphthol بتركيز 5% الى الوسط مع التحريك الهادئ ثم ترك ساكناً لمده (١٥-١٠)دقيقه ،واستدل على النتيجة الموجبه بظهور اللون الاحمر دلالة على تكون المركب المتعادل Acetyl methyl carbinol)) والذي يختزل بدوره مركب Diacetyl carbinol (Turnidge & Grayson …1993).

- اختبار السترات Citrate utilization:لقح في هذا الاختبار وسط سيمون ستريت بجزء من المستعمره البكتيرية النقية المراد اختبارها وحضن بدرجه حرارة 37 مْ و لمدة (24_48) ساعة ، واستدل على ايجابية الفحص بتغير لون الوسط من الاخضر الى الازرق دلاله على استهلاك البكتيريا للسترات على انه مصدر للكاربون ،فضلا عن انتاج عدد من المركبات القاعدية في الوسط المؤديه الى رفع الأس الهيدروجيني نحو القاعدية (Winn et al ...2006)

التحري عن مقاومه البكتيريا Staph.aureus للمضادات الحيوية (طريقه اقراص فخص الحساسية)

اجري اختبار الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بطريقة الاقراص بالاعتماد على طريقة NCCLS(2003)،وتضمن اختبار الخطوات التاليه :

١) غمست المسحه القطنية في مرق تربتون الصويا المزروع و ازيل الفائض منها بضغطها على الجوانب الداخليه للأنبوبة.

٢) نشرت البكتيريا على وسط مولر _هنتون الصلب بطريقه التخطيط لأكثر من مرتين و باتجاهات مختلفة لغرض التأكد من نشر البكتيريا المراد اختبار حساسيتها بالتساوي ،وتركت هذه الاطباق لمده 15 دقيقه في درجه حرارة الغرفه لضمان امتصاص الرطوبة

٣) وضعت اقراص المضادات الحيوية بواقع خمس اقراص في طبق قياسه 100ملم و 12 قرصا في طبق قياسه 150 ملم،والمسافة بين كل قرص و اخر24 ملم (من مركز القرص الاول الى مركز القرص الاخر).

٤) حضنت الاطباق بدرجه حرارة 35مْ لمده (16_18)ساعة لجميع انواع المضادات الحيوية ثم قيست اقطار التثبيط وقورنت مع القيم القياسيه المذكورة في (CLSI..2011).

التحري عن قدرة بكتيريا Staph.aureus على انتاج انزيمات البيتالاكتام

استخدمت طريقه اليود السريعة الواردة في WHO(1978) للتحري عن قابليه البكتيريا على انتاج انزيمات البيتالاكتام ،وبأتباع الخطوات التاليه :

١. نقل عدد من المستعمرات النامية على وسط نقيع الدماغ _القلب حديث النمو بعمر (24-18_) ساعة بوساطة العيدان الخشبية المعقمة الى صفيحة التخافيف الدقيقه الحاوية على 100مايكرولتر من محلول بنسيلين G في كل حفرة من حفر الصفيحة ،ومزجت مزجاً جيدا وحضنت بدرجه حرارة 37مْ لمدة 30 دقيقة .

٢. اضيف 50 مايكرولتر من محلول النشا الى كل حفره من حفر الصفيحة ومزج بوساطة العيدان الخشبية .

٣. اضيف 50 مايكرولتر من محلول اليود الى كل حفره من حفر الصفيحة ومزج جيدا بالعيدان لضمان تجانس المحتويات .وان تكون اللون الازرق يحصل نتيجة لتفاعل اليود مع النشا ،اذ يعد التغير اللوني السريع من الازرق الى عديم اللون خلال 5 دقائق نتيجة موجبة .

جدول لاقراص المضادات الحيوية المجهزه من قبل شركة **Bioanalyse** التركية :

اسم المضاد الحيوي	رمزه	تركيزه
Amikacin	AK	10
Amoxicillin	AX	23
Augmastin	AUG	10\20
Cefipime	CEF	30
Cefotaxime	CTX	30
Ceftazidime	CAZ	10
Ceftriaxone	CTR	10
Ciprofloxacin	CIP	30
Erythromycim	ER	20
Gentamycin	GEN	10
Meropenem	MRP	5
Tetracyclcine	TE	30
Vancomycin	VA	20

النتائج والمناقشة :

Table (1) Zone of inhibition of antibiotics used against bacterial species

اظهرت النتائج في الجدول اعلاه ان تراكيز كل من المضادات هو Ak هو 1 وتركيز المضاد Ax هو 7 وتركيز المضاد AmP هو 6 وتركيز المضاد CEF هو 9 وتركيز المضاد CTX هو 5 وتركيز المضاد CAZ هو 7 وتركيز المضاد CTR هو 4 وتركيز المضاد CIP هو 2وتركيز المضاد ER هو 5 وتركيز المضاد GEN هو 8 وتركيز المضاد MRP هو 6 وتركيز المضاد TE هو 9 وتركيز المضاد VA هو 0.

Bacteral-Lsolates	Concentrion (ug\ml)zone of inhibition(mm)													
	AK	AX	AMP	AUG	CEF	CTX	CAZ	CTR	CIP	ER	GEN	MRP	TE	VA
S.aureus	1	7	6	3	9	5	7	4	2	5	8	6	9	0

Table (2) zone of inhibition of antibiotics used against fungal **species.**

Fungal isolate	Concentration (ug\ml) zone of inhibition (mm)	
	Amphotericin B	Ketaconazole
Asp.flavus	22	23
Asp.parasiticus	21	35
Asp.parasiticus	22	24
Candida albicans	25	22

اظهرت النتائج في الجدول علاه ان فطر As.flavus يكون تركيز المضاد في منطقة التثبيط AmphotercinB هو 22 والمضاد qetaconazole هو 23 وفطر Asp.Parasityicus تركيز المضاد Amphotericin 21 وتركيز المضاد ketoconazole هو 35 وفطر Asp.Terrus تركيز المضاد AmPhotericinB في منقطة التثبيط هو 22 وتركيز المضاد Ketaconzole في منقطة التثبيط هو 24 وفطر candide albicans تريكز المضاد AmphotericinB في منقطة التثبيط 25 وتركيز المضاد ketoconazole هو 22

Table (3) zone of inhibition of Ag nanoparticles against bacterial species at different Concentrations.

Bacteral- Lsolates	Concentration (ug\ml) zone of inhibition (mm)			
S.aureus	34	32	35	45

يظهر الجدول علاه مناطق التثبيط للجزيئات النانووية لــ sio2 ضد بكتريا S.auReus وتظهر التراكيز 34,32,35,45

Table (4) zone of inhibition of SiO2 nanoparticles against fungal species at different Concentrations.

Fungal isolate	Concentration (ug\ml) zone of inhibition (mm)			
Asp.flavus	21	32	25	22
Asp.parasiticus	37	35	23	20
Asp.terrus	22	23	24	25
Candida albicans	25	20	30	45

يظهر الجدول أعلاه مناطق التثبيط لجزيئيات النانويه Ag ضد A.Flavas الذي يظهر بتركيز (40,41,46,50 A.Parasiticus و A.Terrus بتركيز (49-47-42-39) و Candida.albicans بتراكيز 44 -63 (40_44)

دراسة ميكانيكية

اعادة المعلق الحيوي لجزئيات الفضة النانووية AgNp3 قد تم خلطتها مع MS2 عاثية قالونية للحصول على ١٠مل من نظام التفاعل ما لم ينص خلاف ذلك التركيز البدائي لـ MS2 للعاثية القالونية تم حفظها في هذه الدراسة في $10^6 \mathrm{PFU/ml}$.

كل التفاعلات اجريت تحت ظروف تحرك مستمرة في درجة حرارة الغرفة وغطيت بواسطة رقائق الالمنيوم لحفظ تأثير الضوء المحيط بها.

وقت الاتصال كان محفوظ في ١٠دقائق غير محددة.

من اجل تحقيق قاعدة ايونات الفضة 157.4mg من AgNo3 تم تذويبها في ١٠٠مل من ماء مقطر للحصول على 1000mg.Ag/l من المحلول الخزين Bio-AgPN3 تم خلطهما معا MS2 عاثية قالونية في تركيز معلوم (10.25and 50mg/l) وزمن اتصال قدره من ٥ الى ١٠ دقائق.

مقارنة تعطيل العاثية البكتيري MS2.

كانت ايضا قد اجريت في 10mg/l لـ Bio-AgPN3 Ag^+ 0.5mg/l على التوالي تم اخذ العينات 5 , 10 , 30 , 60 دقيقة لدراسة قاعدة الـ ROS 15ml من البنسلين داخل الزجاجات 10mg/l من Bio-AgPN والعاثية القالونية MS2 تم حضنها تحت مستويات مختلفة من الاوكسجين ، ظروف لا هوائية ..

زجاجات البنسلين تم ازالتها مع N2 ل 5 دقائق بينما 2.5L من الاوكسجين النقي قد ارتفعت الى منطقه الراس في الزجاجات لتحقيق حاله فرط الاوكسجين .

تم اخذ العينات في ظل هذه الظروف الثلاثة وفي وقت اتصال قدره 60.30.10.5 دقيقة على التوالي . قاعدة الاتصال المباشر تم دراستها مع خطوات واضحة .

تم استخدام للسيطرة حيث تم خلط AGPNs الحيوي مع MS2 جيدا في الحاوية عندما كان نفس انبوب الغسيل موجود بعد التعريض لمدة ساعة واحدة .

تم اخذ العينات واجريت اوساط الالواح على الفور بعد التخفيف .

التخليق الحيوي لجزيئات الفضة النانوية

التخليق الحيوي ل AgNps اخذ وفقا ل (Sintubin et al ...2009) تم شراء L.fermentum ATCC 1976. من النوع الامريكي مجموعه الوسط ATCC).US) تم حضنها في وسط Rogosa_sharrpe broth قد حضن في جهاز الاتوكليف في درجة حراره 30مْ لمده 48 ساعة بعد هذه الفتره كان الوزن الجزيئي للخميره L.fermentumقد اخذت وتم غسلها ثلاث مرات بواسطه السنترفيوج . بعد اذابه 4.6 g لكل لتر اصبح الوزن الجزئي قاعديا بواسطه اضافه 2.56% من 1 M من محلول NaOH. 16.5g mg\ml من (Ag) من محلول Ag(NH3)2NO3 قد تم اضافتها فيما بعد الى الوزن الجزيئي الذي حصل عليه لكي نحصل على نسبه 1:4.6 من Ag:CDW الخليط تم تغطيته بحذر بورق من شرائح الالمنيوم وتم خلطها في درجه حراره الغرفه ولمده 24 ساعة .

بعدها تم تنقية جزيئات الفضه النانويه الحيويه باستخدام السنترفيوج في هذه الحاله bio-AgPNs تم خلطها و الوزن الجزيئي والزوائد الاخرى تم اخراجها من الوزن الجزيئي لكي لا تستخدم

توصيف جزيئات الفضه النانويه

TEM(JEM302H.)EDLLtd.Japan) تم استخدامه في هذه الدراسه لوصف شكل وحجم جزيئات الفضه النانويه في 300Kv العينات تم تحظيرها بواسطه وضع قطره جديده من المعلق السائل لجزيئات الفضه النانويه على شبكه من الكاربون مطليه بالنحاس من الجهتين ومجففه بالهواء في درجه حراره الغرفه .اختبار TEM تم الزياده مع طاقه منتشره من الاشعه السينيه للطيف المتحلل من اجل التاكد من صحه وجود AgPNs خلال حدوث القمه المتخصصه من Ag .

المصادر

- Barrientos, S.; Stojadinovic, O.; Golinko, M.S.; Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2008) Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen., 16(5) 585-601.
- Bhatia, J. Y.; Pandey, K.; Rodriguez, C.; Mehta, A/ and Joshi, V. R. (2003). Postoperative wound infection in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: A prospective study with evalugoing of risk factors. India J. Med. Microbiol.; 21 (4) : 246-251.
- Braces, A. (2007) infection of the diabetic foot. Available at http://www.bracesandsupports.com.
- CLSI (Clinical and Laboratory Stadards Institute) (2011). Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 21th informational supplement. 31(1). Wayne, Pannsylvannia, USA.
- Collee , J; Gerald , ; fraser, F.; Amdrew, G.; Marmion, M.; Barrie, P.; simmon, s. and Anthong, N. (1996)
- Duran , N.; Ozer, B.; Duran, G.G.; Onlen, Y. and Demir, C.(2012) Antibiotic.
- Friseche, T.R.; Swoboda, S. E; Olson, B.J.; Moore, F.M.; Meece, J.K. and Novicki, T.J. (2011)
- Cuay, C.; Roggli, E.; Nesca, V.; Jacovetti, C.; Ragazzi, R. (2011)
- Heidari, M.; Momtaz, H. and Mahdani, M. (2011)
- Hogg, S. (2005) . Essential Microbiology. John Wiley and Sons Comp. England., pp: 353-372
- Jawetz, E. J.; Melnick, J. L.; Adelberg, E.A.; Brooks, G. F.; Butel, J.S. and Morse, S. A. (2004).
- Lanner, J. T.; Bruton, J. D. and Katz, A. (2008)
- Levinson, W. and Jawetz, E. (2000)

- Lioupis, C. (2005) Effects of diabetes mellitus on wound healing : an update. J. wound Care, 14 : 84-86
- Macfaddin, J. F. (2000) Biochemical test for identification of Medical Bacterria 3rd ed Williams and Wilkins . Baltimore . USA
- Winn, J. W.; Allen , S.; Janda, W.; Koneman, E.; procop, G.; schreeckenberger, p. and woods, G. (2006) .