جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

مقارنة وراثية و بكتريولوجية بين *Staphylococcus* spp. و *Streptococcus* spp. المقاومة لمضادات الـ Macrolide و المعزولة من إصابات سريرية مختلفة .

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الأحياء المجهرية

من قبل

سيف علي محمد الحيالي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2012

بإشراف

أ. م . د. هادي رحمن رشيد الطائي

1435هـ **2014 م**

بِسْمِ اللهِ الرَّحْمنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَإِن يَمْسَسْكَ اللَّهُ بِضُرٍّ فَلَا كَاشِفَ لَهُ إِلَّا هُوَ وَإِن يُرِدْكَ بِخَيْرٍ فَلَا رَادَّ لِفَضْلِهِ يُصِيبُ بِهِ مَن يَشَاءُ مِنْ عِبَادِهِ وَهُوَ الْغَفُورُ الرَّحِيمُ ﴾

صَدَقَ اللهُ العظيم

(سورة يونس: الآية 107)

إلى الشفاه التي أكثرت الدعاء لي كلما نطقت .....والدتي الغالية

إلى من تفرعت أغصاني بعرق جبينه ولا أطمح إلا برضاه .....والدي العزيز

إلى سندي وعوني ورفقاء دربي ..... ليث و أماني و أيلاف و الحسين

إلى كل من علمني حرفا ومهد لي العلم طريقا ..... أساتذتي الأفاضل

أهدي ثمرة جهدي المتواضع

سيف

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

مقارنة وراثية و بكتريولوجية بين *Staphylococcus* spp. و *Streptococcus* spp. المقاومة لمضادات الـ Macrolide و المعزولة من إصابات سريرية مختلفة .

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الأحياء المجهرية

من قبل

سيف علي محمد الحيالي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2012

بإشراف

أ. م . د. هادي رحمن رشيد الطائي

1435هـ **2014 م**

أقرار المشرف

أشهد أن أعداد هذه الرسالة الموسومة بـــ (مقارنة وراثية و بكتريولوجية بين *Staphylococcus* spp. و *Streptococcus* spp. المقاومة لمضادات الـ Macrolide و المعزولة من أصابات سريرية مختلفة) .التي قدمها طالب الماجستير (سيف علي محمد) قد جرى تحت أشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الاحياء المجهرية .

التوقيع :

المشرف : أ . م . د . هادي رحمن رشيد الطائي

كلية العلـوم – قسم علوم الحيـاة – جامعة ديـالـى

توصية رئيس قسم علـوم الحياة

بناء على هذه التوصيات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : أ . م . د . نجـم عبـد الله الزبيـدي

رئيس قسم علوم الحياة

التأريخ 25 / 09 / 2014

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة , نشهد أننا قد اطلعنا على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية بتقدير (أمتياز) .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الأسم : د. عباس عبود فرحان

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : 25 / 11 / 2014

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم : د.عدنان نعمة عبدالرضا العزاوي

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : 25 / 11 / 2014

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم : د. منعم رضوان علي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : 25 / 11 / 2014

عضو اللجنة المشرف

التوقيع :

الأسم : د.هادي رحمن رشيد الطائي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : 25 / 11 / 2014

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع :

الأسم : د. عباس عبود فرحان

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : 25 / 11 / 2014

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (مقارنة وراثية و بكتريولوجية بين *Staphylococcus* spp. و *Streptococcus* spp. المقاومة لمضادات الـ Macrolide و المعزولة من أصابات سريرية مختلفة) التي قدمتها طالبة الماجستير(سيف علي محمد) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الأسم: أ . م . د . رنا سعدي عبود

التأريخ: 29 \ 9 \ 2014

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار الخبير اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (مقارنة وراثية و بكتريولوجية بين *Staphylococcus* spp. و *Streptococcus* spp. المقاومة لمضادات الـ Macrolide و المعزولة من أصابات سريرية مختلفة) التي قدمتها طالبة الماجستير(**سيف علي محمد**) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصحح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الامر بسلامة الأسلوب وصحة ألتعبير.

التوقيع:

الدكتور: باسم محمد إبراهيم

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

التأريخ : 29 \ 9 \ 2014

المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	الخلاصة العربية	I
	المحتويات	III
	قائمة الجداول	VII
	قائمة الاشكال	VIII
	قائمة المختصرات	VIIII
	المقدمة	
1	الفصل الاول : المقدمة	1
	الفصل الثاني : استعراض المراجع	
2	استعراض المراجع	3
1.2	المكورات العنقودية *Staphylococcus*	3
1.1.2	الصفات العامة للمكورات العنقودية	3
2.2	المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*	4
1.2.2	الوبائية Epidemiology	5
2.2.2	ألامراضية Pathogenicity	5
3.2	جنس المكورات العنقودية الجلدية *Staphylococcus epidermidis*	6
1.3.2	الوبائية Epidemiology	6
2.3.2	ألامراضية Pathogenicity	7
4.2	جنس المكورات العنقودية التعايشية *Staphylococcus saprophyticus*	7
1.4.2	الوبائية Epidemiology	8
2.4.2	ألامراضية Pathogenicity	8

5.2	جنس المكورات السبحية *Streptococcus*	8
1.2	جنس *Streptococcus pyogens*	10
1.1.5.2	ألامراضية Pathogenicity	10
2.1.5.2	الوبائية Epidemiology	11
2.2	*Streptococcus agalactiae*	11
1.2.2	الوبائية Epidemiology	11
2.2.2	ألامراضية Pathogenicity	12
6.2	بعض عوامل الضراوة للأجناس والأنواع البكتيرية قيد الدراسة	12
1.6.2	عوامل الضراوة الانزيمية	12
2.6.2	الذيفانات	14
3.6.2	المحفظة Capsule	16
4.6.2	أنتاج الطبقة اللزجة و تكوين الغشاء الحيوي Slime layer and biofilm production	16
7.2	مضادات الحياة Antibiotics	17
1.7.2	Macrolide Antibiotic	17
1.1.7.2	الارثرومايسين Erythromycin	18
2.1.7.2	الأزيثرومايسين Azithromycin	19
2.7.2	الكلندامايسين Clindamycin	20
2.8	آلية المقاومة لمجموعة Macrolide	21
9.2	مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic resistant	22
10.2	طبيعة المقاومة	23
11. 2	مقاومة الـــ Macrolide Resistance of Macrolide	25
12.2	التحري عن جينات مقاومة Macrolide بتقنية PCR	29
3	الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل	30
1-2-3	تحضير المحاليل والكواشف	35

1.1.2.3	المحاليل الخزينة الخاصة بالإختبارات الوراثية	35
2.1.2.3	المحاليل المستعملة في أستخلاص الدنا الكلي DNA- Extraction Solution	36
3.1.2.3	الإنزيمات المستعملة	36
4.1.2.3	المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Electrophoresis solutions	36
5.1.2.3	المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR	37
6.1.2.3	محاليل المضادات الحياتية Antibiotic solutions	38
7.1.2.3	محلول كلوريد الكالسيوم Cacl2	39
8.1.2.3	محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland Standard	38
9.1.2.3	محلول صبغة غرام Gram Stain	38
10.1.2.3	المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline	38
3.3	الكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا	38
1.3.3	كاشف أنزيم الكاتاليز Catalase Reagent	38
4.3	الاوساط الزرعية التركيبية Culture Media	38
1.4.3	وسط الدم الصلب Blood Agar Base	39
2.4.3	وسط غراء الجوكليت Chocolate agar medium	39
3.4.3	وسط الكونكوريد اكار Congo-red agar	39
4.4.3	وسط انتاج البروتيز Protease production	39
5.4.3	وسط أجار صفار البيض Egg-yolk agar	40
6.4.3	وسط أنتاج الستافيلوكاينيز Staphylokinase production	40
7.4.3	الحفظ على مائل الاكار Slant agar	40
8.4.3	الحفظ في الكليسيرول 20%	40
5.3	جمع العينات Samples collection	40
6.3	زرع العينات Samples culture	41
7.3	تشخيص البكتريا Dignosis of Bacteria	43
1.7.3	الخصائص المظهرية Morphological characteristics	43
2.7.3	الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests	43

3.7.3	التشخيص بأستخدام نظام API 20	43
8.3	التحري عن بعض عوامل الضراوة	44
1-8-3	أختبار انتاج الهيمولايسين Hemolysin Production Test	44
2.8.3	التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الستربتوكاينيز	44
3-8-3	الكشف عن أنتاج الستافيلوكاينيز Staphylokinase Production	44
4-8-3	الكشف عن قدرة *Streptococcus* على أنتاج البروتييز	44
5-8-3	الكشف عن قدرة *Staphylococcus* على أنتاج البروتييز	45
6-8-3	الكشف عن أنتاج اللايبيز Detection of lipase production	45
7-8-3	إختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm	45
9.3	اختبار حساسية العزلات لمضادات الحياة	45
10.3	أختبار مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية بطريقة النمو في الوسط الصلب	46
11.3	قياس التركيز المثبط الادنى Minimal - Inhibitory Concentration	46
12.3	أستخلاص الدنا البكتيري Bacterial DNA extraction	47
13.3	الترحيل الكهربائي في الهلام Gel Electrophoresis	48
14.3	التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR)	48
	الفصل الرابع : النتائج والمناقشة	
1.4	عزل بعض أنواع البكتريا الكروية الموجبة لصبغة غرام و تشخيصها	51
1.1.4	العزل Isolation	51
2.1.4	توزيع العزلات بحسب مصدر العزل	56
2.4	التحري عن بعض عوامل الضراوة الانزيمية للاجناس قيد الدراسة	58
1.2.4	أنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production	59
2.2.4	أنتاج البروتييز Protease Production	60
3.2.4	أنتاج الستافيلوكاينيز Staphylokinase Production	61
4.2.4	أنتاج الستربتوكاينيز Streptokinase Production	62

5.2.4	أنتاج اللايبيز Lipase Production	63
6.2.4	أنتاج الدنييز DNase production	64
7.2.4	أنتاج الغشاء الحيوي Biofilm production	65
3.4	فحص الحساسية الدوائية Antibiotic Sensitive test	67
4.4	الكشف عن العزلات المقاومة للارثرومايسين	70
5.4	طريقة التركيز المثبط الأدنى للأرثرومايسين	72
6.4	الكشف عن الجينات *erm* A و *mef* A بأستخدام تقنية P.C.R	73
الاستنتاجات والتوصيات		
الاستنتاجات		82
التوصيات		83
المصادر		
المصادر العربية		84
المصادر الاجنبية		88
الملاحق		
ملحق 1	نتائج فحص الحساسية	105
ملحق 2	نتائج عوامل الضراوة	107
ملحق 3	إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى	109
ملحق 3	خصائص البوادئ المستعملة	110

الاشكال

التسلسل	العنوان	الصفحة
1-2	التصنيف العلمي لـ Staphylococcus	4
2-2	التصنيف العلمي لـ Staphylococcus	9
3-2	موقع أرتباط الارثرومايسين	19
1.4	النسب المئوية للنمو الايجابي و السلبي للبكتريا	54
3.4	النسب المئوية لجنس المكورات العنقودية المعزولة .	56
4.4	يوضح النسب المئوية للعزلات البكتيرية	57
5.4	النسبة المئوية لأنواع البكتيريا المعزولة من مصادر مختلفة .	58
6.4	النسب المئوية لمقاومة مركبات الـ Macrolide	69
7.4	الـترحيل الكـهربائي عن الجينين *erm* A و *mef* A	75
8.4	الـترحيل الكـهربائي عن الجينين *erm* A و *mef* A	76
9-4	يوضح النسب المئوية لتواجد الجينات قيد الدراسة في *Staphylococcus* spp.	78
10-4	النسب المئوية لتواجد الجينات قيد الدراسة في *Streptococcus* spp.	79

الجداول

التسلسل	العنوان	الصفحة
1-2	جينات المثيلة rRNA methylase genes والتي تدخل في مقاومة مضادات MLS	24
1-3	الاجهزة المختبرية المستخدمة	30
2-3	المـــواد الكيـميـاويـة Chemical Materials	31
1-3-3	أقراص المضادات المايكروبيه Antimicrobial disks	32
2- 3-3	مساحيق المضادات المايكروبية	32
4-3	الصبغات المستخدمة	33
5-3	العدة المختبرية	33
6-3	مــــواد متفرقـة	34
7-3	الأوساط الزرعية الجاهزة	34
8-3	مكونات عدة استخلاص الدنا البكتيري	36
9-3	تتابعات وتراكيز البوادىء وحجم الناتج المتوقع لكل بادئ	37
10-3	اقطار منطقة التثبيط القياسية لأقراص مضادات الحياة المستعملة	46
11-3	المكونات اللازمة للتفاعل التضاعفي لكل من الجينين *erm* A و *mef* A.	49
12-3	برجمة جهاز P.C.R .	50
1-4	النسبة المئوية للعزلات الموجبة لصبغة كرام والمعزولة من مصادر سريرية	51
2-4	الاخـــــتبـــارات الكيمــــوحـــــيـــوية لـ Staphylococci	53

3-4	الاختبارات الكيموحيوية لـ Streptococci	54
4-4	يوضح النسب المئوية لتوزيع العزلات قيد الدراسة .	55
5-4	أعداد ونسب Staphylococci المنتجة للهيمولايسين	60
6-4	أعداد ونسب Streptococci المنتجة للهيمولايسين	60
7-4	أعداد ونسب Staphylococci المنتجة لأنزيم البورتيز	61
8-4	أعداد ونسب Streptococci المنتجة لأنزيم البورتيز	61
9-4	أعداد ونسب Staphylococci المنتجة لأنزيم الستافيلوكاينيز .	62
10-4	أعداد ونسب العزلات المنتجة لأنزيم الستربتوكاينيز	63
11-4	أعداد ونسب Staphylococci المنتجة لأنزيم اللاييز	64
12-4	أعداد ونسب Staphylococci المنتجة لأنزيم الدنييز	65
13-4	أعداد ونسب Streptococci المنتجة لأنزيم الدنييز	65
14-4	أعداد ونسب Staphylococci المنتجة للغشاء الحيوي	66
15-4	أعداد ونسب Streptococci المنتجة للغشاء الحيوي	66
16-4	النسب المئوية لحساسية العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية المختلفة .	70
17-4	الأعداد والنسب المئوية للعزلات المقاومة للارثرومايسين باستعمال طريقة الكشف عن العزلات المقاومة للارثرومايسين .	71
18-4	قيم التراكيز المثبطة الدنيا لمضاد الارثرومايسين .	72
19-4	تركيز الدنا المستخلص	74
20-4	النسب المئوية للعزلات قيد الدراسة المحتوية على الجينات *erm* A و *mef* A	77

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
β-Lactamase enzyme	Beta-lactamase enzyme
b.p.	Break point
BHIA	Brain Heart Infusion Agar
CNS	Coagulase negative staphylococci
CA-MRSA	Community acquired-MRSA
DNA	Deoxynuclic acid
CRA	Congo_Red Agar
erm gene	Erythromycin resistance methylase gene
Mef gene	Macrolide efflux pump gene
api 20	Analytical Profile Index
EDTA	Ethylene di-amine tetra acetic acid
IgG	Immunoglobulin G
IS	Insertion site
MLS resistance	Macrolid lincosamid streptogramin B resistance
MRSA	Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*
MSSA	Methicillin sensitive *Staphylococcus*

	aureus
MIC	Minimal inhibitory concentration
MDR	Multidrug resistance
NCCLS	National committee for clinical laboratory standards
PCR	Polymerase chain reaction
SEs	Staphylococcal enterotoxins
SSSS	Staphylococcal scalded skin syndrome
TSST-1	Toxic shock syndrome toxin-1
Tris-OH	Tris-(hydroxymethyl) methylamine
CCCP	Carbonyl Cyanide Chlorophenylhydrazone
WHO	World health organization
ddH2O	Deionized Distilled water

الخلاصة Summary

جمعت 200 عينة من مصادرمتنوعة شملت (الادرار، والدم ، ومسحات الأذن الوسطى ، والقشع ، والجروح ، و البلعوم ، و مسحات مهبلية) من مستشفيات (بعقوبة العام ، البتول للولادة ، و بلدروز العام) بالأضافة الى بعض المراكز الصحية و ذلك للفتره من 1/ 9 / 2013 لغاية 1/ 1/ 2014 ، حيث أظهرت 75 عينة وبنسبة (37.5%) نموا سالبا للزرع البكتيري و 125 عينة (62.5%) نمواً موجباً للزرع البكتيري .

تم الحصول على 40 عزلة تعود للجنسين *Staphylococcus* spp. و *Streptococcus* spp . إذ شخصت العزلات بإستخدام الاختبارات الزرعية , والمجهرية , والكيموحياتية فضلا عن الفحص التأكيدي للعزلات بأستخدام نظام *api* 20 staph and strep . وصلت نسبة *Staphylococcus* المعزولة من الدم الى 33.3% ومن الادرار 12.6% و من البلعوم 36% ، ومن الاذن الوسطى 13.8% ، و من الجروح 18.7% ، أما نسبة *Streptococcus* المعزولة من البلعوم فكانت نسبتها 30.7% ، و من القشع 11.7% ، ومن الجروح 6.2% .

تم أختبار حساسية جميع العزلات لبعض مضادات الـــ Macrolide الشائعة الاستخدام بالاضافة الى مضاد الكلندامايسين العائد لعائلة الـ Lincosamides ، أظهرت النتائج أن مقاومة *S. aureus* للارثرومايسين وصلت الى نسبة 50% ، و للازيثرومايسين بنسبة 45% ، و للكلندمايسين بنسبة 25% . أما *S. epidermidis* فقد كانت النسب كالتالي 66.6% للارثرومايسين و 44.4% للازيثرومايسين ، و 11.11% للكلندامايسين . أما بالنسبة للجنس *S.pyogenes* فكانت نسب المقاومة كالتالي 25.5% للارثرومايسين ، و 25.5% للازيثرومايسين ، و 14.5% للكلندامايسين .

تم تحديد التركيز المثبط الادنى لمضاد الارثرومايسين للعزلات قيد الدراسة والتي أظهرت مقاومة تجاه هذا المضاد في فحص الحساسية بطريقة الاقراص (المقاومة) حيث تراوحت قيم MIC للعزلات بين (32-64>) مايكروغرام / مل .

تم التحري عن قابلية عزلات *Staphylococcus* spp . و *Streptococcus* spp . على إنتاج بعض عوامل الضراوة وقد أظهرت النتائج أن تلك العزلات كانت منتجة لعدة أنواع من الأنزيمات والذيفانات التي تسهم عادة في أمراضيتها ومن هذه الأنزيمات أنزيم البروتييز، و اللايبيز ، و اليوريز، و الأنزيم المحلل للدنا ، و الستافيلوكاينيز ، و الستربتوكاينيز و كذلك

أظهرت هذه العزلات قدرتها على إنتاج أربعة أنواع من الهيمولايسين (ألفا ، بيتا ، كاما ، و دلتا). كما و تم التحري عن قابلية العزلات على إنتاج الطبقة اللزجة Slime layer باستخدام طريقة أكار احمر الكونغو وقد بينت النتائج أن كلا الجنسين لها القدرة على إنتاج الطبقة اللزجة فقد أظهرت النتائج أن (65%) من عزلات بكتريا *S. aureus* منتجة للطبقة اللزجة بينما كانت جميع عزلات *S.epidermidis* و بنسبة 100% منتجة للطبقة اللزجة ، بينما أظهرت 75% من عزلات *S.pyogens* قدرتها على إنتاج الطبقة اللزجة .

أجريت عملية أستخلاص للدنا الكلي البكتيري لـ (12) عزلة ثم أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لعزلات *Staphylococcus* spp. و *Streptococcus*s spp. المقاومة للـ Mcrolide وذات MIC أكثر من 64 مايكروغرام/ مل والموجبة النمو على الوسط المعلم بالارثرومايسين من خلال أستعمال البوادىء المتخصصة التي تستهدف التسلسل النوعي للجين *erm* A و *mef* A ، رُحِلت نواتج التضاعف على هلام الأكاروز بتركيز 1% و لوحظ ظهور حزمة واحدة في جميع المسارات في الهلام بالمستوى نفسه بالنسبة للجينين . أظهرت النتائج أن نسبة وجود الجين *erm* A في عزلات *S. aureus* وصل الى 80% و في عزلات *S.epidermidis* 30% ، وفي عزلات *S.pyogens* وصلت النسبة الى 50% ، أما بالنسبة للجين *mef* A فكانت نسبة توافره في عزلات *S. aureus* 20% ، و في عزلات *S.epidermidis* 40% ، و في عزلات *S.pyogens* 50% .

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف المرسلين سيدنا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين . بعد حمد الله وشكره على توفيقه .... يسعدني أن أتقدم بجزيل الشكر والامتنان إلى أستاذي العزيز الأستاذ الدكتور هادي رحمن رشيد الطائي لاقتراحه فكرة البحث وسعة صدره وتقديمه النصائح والإرشادات كافة لإكمال هذا البحث . كما أتقدم بوافر شكري وتقديري الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة المتمثلة بالاستاذ الدكتور عباس عبود فرحان ورئاسة قسم علوم الحياة ومنتسبيه ، وأخص بالذكر الدكتور عدنان نعمة العزاوي , و الدكتور نجم عبد الله الزبيدي ، و الدكتورة نغم ياسين كاظم ، و السيدة أسماء حسيب ، و السيدة شيرين محمد محمود لما قدموه لي من العون والمساعدة طيل فترة الدراسة . و أتقدم بشكري وتقديري الى مدير مختبر الصحة المركزي في بعقوبة السيد هادي علي حمودي و منتسبي مختبر الصحة المركزي كافة وأخص بالذكر الدكتور داوود سلمان , والكيمياوية فاتن مهدي غائب و أتقدم بجزيل الشكر لمنتسبي شعبة البكتريولوجي /مستشفى بعقوبة العام وأخص بالذكر السيدة ثريا كاظم، ومنتسبي شعبة الأنف و الاذن والحنجرة في العيادة الاستشارية لما قدموه لي من العون والمساعدة وتعاونهم معي . كما اقدم خالص شكري وامتناني الى منتسبي مختبرات مستشفى بلدروز العام وأخص بالذكر السيد نور الدين عبد الباري و السيد سعد رشيد جاسم لما قدموه لي من العون والمساعدة وتعاونهم معي في جمع العينات . كما أتوجه بوافر الشكر والأمتنان الى منتسبي شركة جسر المسيب لما قدموه لي من المساعدة فيما يخص الجانب الوراثي من البحث . كما أقدم شكري العميق الى عائلتي التي ساعدتني ووقفت الى جانبي داعياً من الباري (عزوجل) أن يمنَ عليهم بالصحة والعافية .

سيف

1. المقدمة Introduction

تضم المكورات الموجبة لصبغة كرام عدة أجناس ذات صفات مشتركة منها كروية الشكل ، لاهوائية أختيارية ، إذ تعد جزءاً من النبيت الطبيعي و تكون متعايشة مع الانسان ، إضافة إلى ذلك ذلك تعد من الممرضات المهمة للانسان و الحيوان إذ تتميز بقدرتها على إحداث أنواع مختلفة من الإصابات في مواقع متعددة من الجسم (Brooks و أخرون ، 2010) .

إن إمراضية الجنسين *Staphylococcus* و *Streptococcus* مرتبطة بقدرتها على أنتاج العديد من عوامل الضراوة التي تشمل أنتاج الذيفانات المحللة للدم نوع ألفا وبيتا وكاما ودلتا ، إلى جانب إنتاجها ذيفانات معوية مسببة تسمماً غذائياً ، كما إنها تمتلك قدرة على إنتاج ذيفانات خارجية تنتج في حالات متلازمة الصدمة الذيفانية و متلازمة الجلد الحرشفي العنقودي والانزيمات الخارج خلوية مثل أنزيم الستافيلوكاينيز ، والبروتينيز ، واللايبيز ، و الستربتوكاينيز التي تسهم في غزو البكتريا للأنسجة ، وانتشار الخمج بالإضافة إلى امتلاكها جدار الخلية الذي يعد تركيباً مستضدياً لاحتوائه على التراكيب المستضدية (الببتايدوكلايكان ، وحامض التكويك ، وبروتين A) ، ويعمل جدار الخلية على مقاومة الجهاز المناعي للعائل ، ويشكل حماية أوزموزية للخلية البكتيرية وغيرها من العوامل الاخرى مما يعطي هذه الاجناس القدرة على التضاعف والانتشار داخل أنسجة العائل (Gillespie و أخرون ، 2006) .

إن لهذه الاجناس القدرة على التسبب بمدى واسع من الأمراض مثل الدمامل ، والخراجات المختلفة وخراجات الجروح الناتجة عن العمليات الجراحية ، والتهاب الجلد والأنسجة الرخوة ، والتهاب العظام ، والتهاب الرئة القصبي ، والتهاب الأجزاء الداخلية للقلب ، التهاب البلعوم واللوزتين ،الحمى الروماتزمية من التهاب المفاصل و غيرها (Willems و أخرون ، 2013) .

تعد مضادات الـ Macrolide من أهم عوائل المضادات الحياتية ؛ و ذلك لأستخدامها في علاج العديد من الأخماج الناتجة عن البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة غرام ، تنتج من الفطر *Streptomyces* أو بكتريا *Arthrobacter* ، التركيب الكيميائي لها مكون من حلقة كبيرة من اللاكتون Macro lacton ring cyclic مؤلفة من 10 – 60 ذرة مرتبط بها سكر سداسي (desosamine ، cladinose) وهناك مواقع جانبية في حلقة اللاكتون هي :R4,R3,R2,R1 يضاف لها جذور كيمائية مثل (CH_3) وغيرها لإنتاج مشتقات هذه المجموعة ، الية عمل الـ Macrolide هي تثبيط التخليق الحيوي Biosynthesis للبروتين عن طريق الارتباط بالوحدة الريبوسومية الكبيرة 50s للبكتريا وبالتالي منع خطوة تبديل الموضع (Translocation) مما يؤدي الى أيقاف عملية الترجمة Translation (Mankin ، 2008) . أن سوء إستخدام المضادات الحياتية وكذلك كثرة الاستخدام من الاسباب التي أدت الى نشوء المقاومة المتعددة

لمضادات الحياة وبالتالي تدفق كبير للجينات في عالم المايكروبات إذ إنتشرت المقاومة بشكل واسع بوساطة البلازميدات وغيرها من وسائل الانتقال الافقي للجينات مما ساعد الممرضات على مواجهة الضغط الانتخابي الذي تفرضه المضادات إذ أصبحت مقاومة الاحياء متعددة أي أن السلالة الواحدة تقاوم عدد من المضادات كما هو الحال في MRSA ، كما وأصبحت الاصابات المستعصية العلاج مصدرها المستشفيات ، حيث تؤدي في بعض الدول المتقدمة الى 5000 حالة وفاة سنوياً ، و تحدث الاصابة لأكثر من ربع مليون شخص ممن يترددون المستشفيات الكبيرة سنوياً (الخفاجي , 2008أ ; Larson ، 2007) .

تعد مقاومة الــ Erythromycin و عناصرالــ Macrolide الأخرى واسعة الانتشار في البكتريا الكروية الموجبة لصبغة غرام حيث لوحظت زيادة المقاومة للارثروميسين في أنحاء العالم كافة . اليات المقاومة ضد مجموعة الــ Macrolide هي إما نتيجة التحوير في الموقع الهدف (Target site modification) أو تحويرالدواء بوساطة الأنزيمات من خلال التعبير الجيني للبلازميد أو الينقول Transposons الحاوي على جينات *erm* gene المشفرة لهذه الالية ، أو من خلال انظمة الدفق الخارجي Efflux system والتي تشفر من قبل الجين *mef* A (Shain و أخرون ، 2002 ; Reyes و أخرون ، 2007) . أشارت الدراسات الى إمكانية ظهور توليفة تضم المورثات *erm* و *mef* مجتمعتين معاً في بكتريا *S. pneumonia* و *S. pyogenes* و *S. agalactiae* و *S .aureus* تشفر لمقاومة Macrolide (Kataja و أخرون ، 2000) .

نظراً لقلة وجود دراسات في العراق (ديالى) بشأن الكشف الجزيئي عن طرق مقاومة *Staphylococcus* spp و *Streptococcus* spp لمضادات Macrolides بين المرضى الراقدين وغير الراقدين في مستشفيات محافظة ديالى جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على ما يأتي :

- تحديد الأجناس البكتيرية الكروية الموجبة لملون غرام الأكثر شيوعا و المسببة للاخماج المختلفة بين المرضى الراقدين وغيرالراقدين في مستشفيات ديالى المختلفة .
- إجراء دراسة مقارنة بين عوامل الضراوة للأجناس المختلفة و دراسة حساسية العزلات لمضادات الــ Macrolide .
- الكشف عن الجين *erm* A و *mef* A المشفر للانزيمات المحطمة و أنظمة الدفق Efflux pump للمضاد الحيوي الارثرومايسين بأستخدام تقنية PCR .

المقدمة

Introduction

استعراض المراجع

Literature Review

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

النتائج و المناقشة

Results and Discussion

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions

and

Recommendations

المصادر

References

الملاحق

Appendix

1.2 المكورات العنقودية *Staphylococcus*

1.1.2 الصفات العامة للمكورات العنقودية :

General Characteristic of Staphylococci

سميت المكورات العنقودية بهذا الاسم من قبل العالم أوغستن 1882 إذ شاهدها أول مرة في القيح Pus المتكون في الخراجات Abscesses ويعد العالم Rosenbach أول من قام بعزلها و تنميتها في مزارع نقية وذلك في العام 1884 ، إن أنواع هذا الجنس البكتيري موجبة لصبغة غرام ، قطر الخلية (0.5 - 1.5) مايكروميتر إذ تتوافر بشكل خلايا مفردة أو مزدوجة أو رباعيات أو على شكل سلاسل قصيرة ، ولكنها بشكل عام تكون على هيأة عناقيد غير منتظمة تشبه عناقيد العنب Grape-like shape ومن مميزاتها أيضا إنها غير متحركة وغير مكونة للابواغ عادةً موجبة لأنزيم الكاتليز، و تصنف بالاعتماد على قدرتها على أنتاج أنزيم الكوجيوليز Couagulase (Götz و أخرون ، 2006) . أن معظم أنواع المكورات العنقودية تتواجد بشكل تعايشي في جلد الانسان , وفي الأغشية المخاطية , ولكن بعض السلالات الأخرى تسبب خراجات سطحية , وأحيانا قد تسبب تجرثم الدم Bacterimia الذي قد يؤدي إلى الوفاة كما وتؤدي الى حدوث أخماج داخلية (التومي و أخرون ,2013) . تعد المكورات العنقودية Staphylococci من العوامل الملوثة الواسعة الانتشار في المستشفيات ، إذ تمتاز بعض أنواعها على اختراق دفاعات الجسم وغزو أنسجة الجسم وامتلاكها العوامل التي تزيد من ضراوته (Virulence) ومقاومتها العالية للمضادات الحيوية مما يجعلها سبباً للعديد من الاخماج في الإنسان ، يضم جنس المكورات العنقودية ما لا يقل عن (40) نوعا تعود لعائلة Staphylococcaceae كما موضح في الجدول (1-1) ، كما و أن هناك ثلاثة أنواع مهمة سريرياً لإرتباطها بالاخماج التي تسببها للإنسان وهي كالآتـي :

أ - المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*

ب- المكورات العنقودية الجلدية *Staphylococcus epidermidis*

ج- المكورات العنقودية الرمية *Staphylococcus saprophyticus*

(Brooksو أخرون ، 2010)

جدول (1-1) التصنيف العلمي Scientific classification

Domain	Bacteria
Kingdom	Eubacteria
Phylum	Firmicutes
Class	Bacilli
Order	Bacillales
Family	Staphylococcaceae
Genus	*Staphylococcus*

2.2 المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*

تعد بكتريا *S. aureus* موجبة لصبغة غرام بحسب مصنف بيركي ، إذ تتميز عن بقية أنواع المكورات العنقودية بوصفها موجبة لإنزيم مختر بلازما الـــدم Coagulase وتعـد من أوسع أنواع المكورات العنقودية أمراضية للإنسان (George و أخرون ، 2004) . تعــرف *S. aureus* على إنها خلايا كروية الشكل قطرها 1 مايكروميتر تقريباً ، غير متحركة ، غير مسوطة ، وغير مكونة للأبواغ و تستطيع النمو بصورة جيدة في معظم الاوساط الزرعية و بدرجات حرارة مثلى (30-37) مْ و بظروف لاهوائية أختيارية لكنـها تنمو بشـــــكل أفضــل في الظــروف الـــهوائية (التومي و أخرون , 2013) . أن الصفات الزرعيـة لهذه البكتريا هي على شكل مستعمرات دائرية محدبة قليلاً ذات سطوح ملساء كما لوحظ تغير لون وسط أكار المانيتول الملحي في المناطق المحيطة بالمستعمرات النامية من اللون الوردي الى اللون الاصفر الذهبي ؛ وذلك لوجود كاشف الفينول الاحمر مما يدل على قابلية هذه البكتريا على تخمر سكر المانيتول (السعدي و أخرون ، 2014) .

1.2.2 الوبائية Epidemiology

تعد المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* جزءاً من النبيت الطبيعي للانسان ، إذ تظهر على الجلد والأغشية المخاطية والقناة التنفسية العليا وفي الهواء والتربة ، إذ يقدر الحاملون Carriers للنوع *S.aureus* في مقدمة مناخرهم بـ 30% الإ إنها تعد من الجراثيم التي يمكن أن تسبب أخماج خطيرة عند حدوث خلل أو اضطرابات في

دفاعات جسم العائل المناعية ، وتزداد هذه النسبة لدى لأشخاص العاملين في المستشفيات (Tong و أخرون ، 2012) . تكتسب أخماج المجتمع تلقائياً بوساطة السلالات المحمولة في فتحتي الأنف أو على سطح الجلد أو كليهما ، أما أخماج المستشفى من الممكن إن تحدث من خلال اكتساب خلية مفردة من سلالات *S. aureus* الشائعة الوجود لدى المرضى الذين خضعوا لعمليات جراحية أو المرضى المخمجين بتلك البكتريا (Bratu و أخرون ،2003) . أن من أهم مصادر أنتشار الاخماج هم المرضى المصابين بالاخماج و التي قد تنتقل مباشرة إلى المرضى الآخرين عن طريق أيادي الأشخاص العاملين في المستشفى إذ تعد بيئة المستشفيات مصدراً رئيساً للأخماج الشديدة التي تتحول بعد حصول عملية الشفاء إلى حالات كامنة وغالباً ما تتحول البكتريا من الحالة الفعالة إلى بكتريا محمولة صامتة (Silent) مما يساعدها على الانتقال إلى البيئة المحيطة والتوسع في الانتشار (Warshawsky و أخرون ، 2000) . تعد *S. aureus* إحدى المسببات الرئيسية لعدوى المستشفيات Nosocomial infections و خصوصاً سلالات MRSA منها إذ سجلت العديد من الدراسات أن 40% من عزلات *S. aureus* مقاومة للمثيسيلين و تزداد هذة النسبة سنة بعد أخرى كما وأن العديد من الدراسات وثقت أزدياد معدل الهلاكات Mortality الناتج عن سلالات MRSA في مختلف دول العالم سبب هذه الهلاكات أمتلاكها للعديد من عوامل الضراوة بالاضافة الى مقاومتها للعديد من المضادات الحياتية على العكس من سلالات MSSA والتي تعد حساسة للمثيسيلين (AL-Sheikh و yousif ، 2014) .

2.2.2 الامراضية Pathogenicity :

تعد *S.aureus* من أكثر جراثيم المكورات العنقودية أهمية من الناحية السريرية ، إن حدوث المرض يتم من خلال بكتريا *S. aureus* نفسها أو من خلال إنتاج الذيفانات Toxins والمواد خارج خلوية إذ يتكون جدارها من الببتيدوكلايكان Peptidoglycan و الحامض الدهني Lipoteichoic acid والعديد من النواتج السامة والمفرزة والتي من المحتمل أن تشترك في ضراوة هذه البكتريا (Tong و أخرون ، 2012 ; السعدي و أخرون , 2014) . تحدث الاخماج المرضية لهذه البكتريا عند دخولها إلى الانسجة وذلك عن طريق الخدوش Abrasions أو الجروح Wounds أو عند تلامسها مع سطح الانسجة الجلدية للعائل Host إذ تحدث أضطراباً أو خللاً في هذه الأنسجة وذلك عن طريق أفرازها لعدد من الإنزيمات منها Lipase الانزيم المحلل للدهون وأنزيم Hyaloronidase الذي يساعد في انتشار البكتريا و الذي يعمل على تحطيم المادة الاساس للنسيج الرابط (Janštová و أخرون ، 2012) . تسبب هذه البكتريا أخماج جلدية Skin infections إذ تسبب الدمامل Boils ، والبثور Pimples ، والخراجات Abscesses ، و القوباء Impetigo ، وكذلك خمج الجروح Wound infections (jasim ، 2012) . كما و تسبب هذه البكتريا التهابات في البلعوم الذي إن تكرر فانه يؤدي إلى

مضاعفات مثل التهاب المفاصل الرثوية Rheumatoid Arthritis ، وتقيحات الرئة وخراجاتها ، والتهاب الجهاز التنفسي العلوي Upper respiratory infection ، والتهاب الجيوب الانفية Nasal fruncles ، وذات الرئة Pneumonia ، والتهاب شغاف القلب Endocarditis ، والتهاب الإذن Otitis (التومي و أخرون , 2013) . تستطيع بكتريا *S.aureus* أن تدخل الى مجرى الدم وتحدث أخماج في جهاز الدوران , كما و أنها من أهم الانواع البكتيرية المشاركة في عدوى المستشفيات Nosocomial infections , إذ شارت تقارير National nosocomial infection surveillance الى إرتفاع ملحوظ في نسبة الخمج بهذه العنقوديات والذي قد يصل الى 70 % (جاسم و أخرون , 2012) .

3.2 المكورات العنقودية الجلدية *Staphylococcus epidermidis*

تعد بكتريا *S. epidermidis* موجبة لصبغة غرام ، قطرها حوال 1 مايكرون , غير متحركة و غير منتجة للهيمولايسين ، ذات مستعمرات بيضاء اللون سالبة لإنزيم مخثر بلازما الـــــدم Coagulase ، إذ تعد النوع الأهم في المكورات العنقودية السالبة لانزيم الخثرة Couagulase و أكثرها تعايشاً و تواجداً على جلد الانسان و تتواجد أيضاً في الغشاء المخاطي للانف ومنطقة الابطين و الرأس و الإذنين ، عرفت هذه البكتريا منذ فترة طويلة على إنها غير مرضية Non pathogen ولكن أثبت حديثاً بأنها المسبب الأول للأخماج المرتبطة بعدوى المستشفيات (Otto ، 2012)

1.3.2 الوبائية Epidemiology

تعد بكتريا *S.epidermidis* جزاً من النبيت الطبيعي الظاهر على جلد الانسان إذ يسهم توافرها وبشكل كبير في المحافظة على سلامة الجلد وذلك عن طريق تنافسه مع البكتريا الضارة وخاصة بكتريا *S.aureus* (Otto, 2009) , الا أن دراسات حديثة أثبتت إنتهازيتها (Opportunistic) نتيجة لتمزيقها للحاجز الطلائي للجلد Epithelial Barrier و الإسهام في تكوين الغشاء الحيوي Biofilm إذ تنتج سلسلة من الجزيئات التي توفر لها الحماية من دفاعات الجسم خاصة عند تكوينها للغشاء الحيوي والذي يعد بوصفه عامل ضراوة مهم خصوصاً خلال العدوى المرتبطة بالقسطرة (Fey وأخرون ، 2010) ، إذ أشارت التقديرات بأن 65% من الاغشية الحيوية لبكتريا *S. epidermidis* مرتبطة بعدوى المستشفيات و السبب هو قدرة تلك البكتريا على انتاج المادة اللزجة Slime layer والتي تساعد تلك الجراثيم على الالتصاق بالسطوح المختلفة الحية و غير الحية (صبحي و أخرون , 2006 ; Cheung و أخرون ، 2010) .

2.3.2 الامراضية Pathogenicity

برزت الاهمية الطبية لبكتريا *S. epidermidis* من خلال إرتفاع نسب الخمج بها للمرضى الراقدين في المستشفيات إذ تكرر ظهورها خلال العقدين الماضين في زروع الدم Blood cultures لمرضى العناية المركزة و المتصلين بأجهزة طبية (Schommer ،2011) . ظهرَ في الاونة الاخيرة إهتمام متزايد في الاليات التي تستطيع من خلالها بكتريا *S.epidermidis* أحداث الاخماج بوصفها تنتج جزءاً ضئيلاً من عوامل الضراوة المتمثلة بالانزيمات المفرزة خارجياً Exoenzymes و الذيفانات Toxins (Cheung و أخرون ، 2010) ، ضمن أهم هذه العوامل هو الطبقة اللزجة Slime layers التي توفر لهذه البكتريا القدرة على الالتصاق بخلايا العائل Host cells و تجنب عملية البلعمة Phagocytosis و تأثير مضادات الحياة (Ismail و أخرون ، 2011) . أشار الباحث Gordon وآخرون 2012 أن *S. epidermidis* واحدة من أهم المسببات الرئيسة لأخماج مجرى الدم Blood stream و الاخماج المتعلقة بالقسطرة القلبية و الاجهزة التعويضية إذ تسبب عدوى تجرثم الدم الأولي Primary bacterimia لا سيما للاطفال حديثي الولادة Neonates و الاشخاص الذين يعانون من ضعف المناعة نتيجة لإتصالهم المباشر بالاجهزة الطبية الملوثة بتلك البكتريا كما و تشترك بكتريا *S. epidermidis* في أخماج مرضى الحروق والجروح العميقة والتهابات العين و الإذن و خمج السبيل البولي بالاضافة الى تسببها في التهابات صمامات القلب التهابات العظام و المفاصل الاصطناعية (Schommer و أخرون ، 2011) .

4.2 المكورات العنقودية الرمية *S. saprophyticus*

هي خلايا كروية عنقودية الترتيب ، غير منتجة لانزيم التجلط , موجبة لاختبار الكتاليز و سالبة لاختبار الأوكسيديز , منتجة لانزيم اليوريز , غير متحركة , وغير قادرة على أنتاج Dnase , تشكل جزءاً من النبيت الطبيعي لمنطقة الجلد في الانسان , تمتاز بمقاومتها للمضاد النوفوبايوسين Novobiocin والذي من خلاله نستطيع تفريقها عن بقية أنواع المكورات والتي تكون حساسة له (Ismail و جماعته 2011) .

1.4.2 الوبائية Epidemiology

تعد بكتريا *S.saprophyticus* جزءاً من النبيت الطبيعي في جسم الانسان و خارجه كما وهي معروفة بإمراضية الجهاز البولي من غير وجود القساطر (Kuroda و أخرون ، 2005) . تتوافر هذه البكتريا في مهبل النساء بكثرة كما و أن تناول الهرمونات و العلاج الكيمياوي وتخرش القناة البولية يؤدي الى حصول الخمج بهذه البكتريا (الجنابي و أخرون ، 2008) إن هذه البكتريا لها ميل عالٍ للالتصاق على الخلايا الظهارية للقناة البولية

أكثر مما في حالة خلايا الدم و الجلد ؛ وذلك لامتلاكها حامض Lipotechoic acid الذي يعد عاملاً مهما في أحداث عملية الغزو لهذه البكتريا Invasive factor و إختراق الانسجة الطلائية للقناة البولية وقد يكون هذا أحد أسباب وجود عزلات هذه البكتريا في القناة البولية (Kleine و أخرون ، 2010) كما ويمكن عزلها أيضاً من الجهاز الهضمي للانسان والحيوانات (الأبقار , والخنازير , والدجاج ، والقوارض) ، و كذلك من اللحوم والجبن ، وكذلك الخضروات (Irlinger و أخرون ، 2012) .

2.4.2 الامراضية Pathogenicity

تمتلك هذه البكتيريا العديد من عوامل الضراوة كالالتصاق على الخلايا الظهارية للقناة البولية و إنتاجها لأنزيم اليوريز وإمتلاكها لعدة أنظمة لنقل المواد و التي تسهل عملية تكيفها في بيئة القناة البولية التناسلية (Urogenital environment) للانسان وبذلك تجعلها المسبب الثاني بعد الاشيريشيا القولونية *E.coli* لالتهاب المجاري البولية للاناث اليافعات (Martineau وأخرون ، 2000) ، كما و تسبب التهاب المثانة و التهاب الإحليل الذي قد ينتقل جنسياً والتهاب الحويضة والكلية Pyelonephritis للنساء في سن البلوغ والاكزيما و التهابات الجروح ، و التهابات الجهاز التنفسي (Flaih و أخرون ، 2009) علاوة على ذلك تسبب هذه البكتريا التهاب شغاف القلب ، و التهاب البروستات و قد تنتشر هذه البكتريا في الدورة الدموية و تسبب تجرثم الدم Bacteremia (الجنابي و أخرون ، 2008) .

5.2 الصفات العامة للمكورات المسبحية

General Characteristic of Streptococci

ينتمي جنس المكورات المسبحية الى عائلة Streptococcaceae التي تمتاز بوصفها كروية الشكل تترتب بشكل أزواج أو سلاسل طويلة أو قصيرة إعتماداً على العوامل البيئية ، إذ يتكون جدارها الخلوي من طبقة الببتيدوكلايكان التي تنطمر فيها أنواع مختلفة من الكربوهيدرات وطبقة حامض التايكويك والبروتينات الدهنية والمستضدات البروتينية السطحية (Kayser و أخرون ، 2005) . تعد المكورات السبحية *Streptococcus* جزءا من النبيت الطبيعي Normal flora للقناة الهضمية ، والتنفسية للانسان ، والحيوان (اللبائن والطيور) ، ولكن بعضها مسبب للامراض المهمة للانسان تتراوح شدتها ما بين الاخماج المزمنة والحادة والاخماج تحت الحادة وهي من الكائنات الانتهازية Opportunistic pathogens إذ يعد ظهورها طبيعيا في القناة الهضمية ولكنها تسبب أمراضا خطيرة تنتقل الى القناة التناسلية البولية أو قد تنتقل الى مجرى الدم لتسبب التهاب السحايا أو التهاب شغاف القلب وغيرها من الامراض (Bessen ، 2009) . يضم جنس *Streptococcus* على أكثر من 30 نوع

بعضـــها ممرضاً للإنسان مثل *S. pyogenes* و *S. agalactiae* و *S. pneumoniae* فيما يعد العديد منها نبيتاً طبيعياً Normal flora للفم والأمعاء عند الإنسان و نظراً لعدم تجانس هذه الكائنات فقد وصفت اعتماداً على مجموعة من الصفات تشمل نوع التحلل على أطباق أكار الدم و خواص النمو والتركيب المستضدي للجدار الخلوي والتفاعلات البايوكيمياوية ونوع التحليل الوراثي (Faclam و Carey ، 1985) . وضعت العديد من التصنيفات لبكتريا Streptococci و لكن اقدمها التصنيف الذي و ضعه الباحث Brown عام (1919) معتمداً على نوع تحلل الدم كما أشار (Tortora و أخرون ، 1986) والتي هي :

1- الأنواع المحللة للدم نوع بيتا β-haemolytic species : تنتج المسبحيات الحالة للدم بيتا محيطاً واسعاً من التحلل الدموي الكامل وأن الفحص المجهري لهذه المنطقة يظهر عدم ظهور أي اثر لكريات الدم الحمر .

2- الأنواع المحللة للدم نوع الفا α-haemolytic species : تنتج مادة محللة للدم تسمى α-haemolysin والتي تكون لها القابلية على اختزال خضاب الدم Haemoglobin الأحمر الى الميثوغلوبين Methoglobin الأخضر اللون . إن هذا الأختزال يولد منطقة مخضره تحيط بالمستعمرة .

3- الأنواع المحللة للدم نوع كاما γ- haemolytic species : لا تولد البكتريا النامية أي منطقة تحلل دموي لذلك يفضل تسميتها بالأنواع غير الحالة للدم Non haemolytic species .

المكورات السبحية Streptococci لاهوائية إختيارية درجة الحرارة المثلى لنموها 37°م وغالبا ما تكون أنواعها محاطة بمحفظة و مستعمراتها مخاطية ويكون نموها ضعيفاً في الأوساط الاعتيادية الصلبة أو السائلة ولذا يتم إغناء الوسط المستخدم لعزلها بالدم أو السوائل النسيجية مستعمراتها تبدو شفافة أو بيضاء الى رمادية مع درجات مختلفة من التحلل على وسط اكار الدم (Ryan و أخرون ، 2004) . هي سالبة لفحص الكاتاليز ، غير متحركة ، لا تكون سبورات ، كما أن قسما منها وخاصة المرضية يمتلك محفظة Capsule ولا يمكن ملاحظتها في المزارع الفتية غالباً وهي تؤدي دورا في أعاقة عملية الابتلاع (Pierce و Leboffe ، 2010) . يشير جدول (1-2) الى التصنيف الكامل لجنس *Streptococcus* .

جدول (1-2) التصنيف العلمي Scientific classification

Kingdom:	Bacteria
Phylum:	Firmicutes
Class:	Bacilli
Order:	Lactobacillales
Family:	Streptococcaceae
Genus	*Streptococcus*

1.5.2 بكتريا *StreptococcuS. pyogenes*

هي بكتريا كروية , موجبة لصبغة غرام , قطرها حوالي (0.1- 0.6) ملي مايكرون , غير متحركة وغير مكونة للابواغ , لا هوائية إختيارية لا تنمو في الاوساط الزرعية الاعتيادية وإنما تحتاج لأوساط إغنائية ، تنمو بشكل سلاسل مكونة من (4- 10) خلايا تقريباً محاطة بتحلل دموي كامل قطره حوالي (2-3) ملم سببه إما Streptolysin S أو Streptolysin O ، تسبب بكتريا *S. pyogenes* العديد من الامراض التي تتراوح شدتها بين الخفيفة مثل التهاب اللوزتين و الحادة مثل الانتان . تحتوي عادة على محفظة مؤلفة من حامض الهيالرونيك Hyaluronic acid . (Savic و Mcshan ، 2012) . تعرف *S. pyogenes* أيضاً بأسم المسبحيات المحللة للدم تحللا كاملاً (Group A *Streptococcus* GAS) إذ قسمت Lancefield عام 1933هذه المسبحيات على أساس الاختلافات المستضدية لمتعدد السكريد في الجدار البكتيري (Ryan و أخرون ، 2004) .

1.1.5.2 الوبائية Epidemiology

تعد بكتريا *S. pyogenes* مسبب رئيسي للامراض وهي قادرة على أستعمار مواقع مختلفة من الجسم كالجلد و و الاغشية المخاطية وهذا بدوره ينعكس على كثرة الاخماج الناتجة عن تلك البكتريا ، تمتاز *S. pyogenes* كونها حرة المعيشة مع ذلك المواقع البيئية له ضيقة جداً إذ يعد الانسان العائل البيولوجي لها شأنها شأن بقية المسبحيات فيكون أنتقالها من أنسان الى أنسان أخر عن طريق الرذاذ أو ملامسة الجلد (Carapetis و أخرون ، 2005). يعد البلعوم Pharynx الموطن الطبيعي لهذه البكتريا وعليه تكون مسؤولة عن التهاب الحلق Throat

infections متمثلة بألتهابات البلعوم Pharyngitis أو اللوزتين لدى الأطفال في سن (5 – 15) سنة يحدث ذلك عند إنتقال الرذاذ المتطاير في أثناء السعال أو العطس أو حتى من خلال التخاطب بينهما و خاصة في فصلي الخريف و الشتاء (Ryan و أخرون ، 2004) .

2.1.5.2 الامراضية Pathogenicity

تسبب بكتريا *S. pyogenes* العديد من الامراض البشرية المهمة فهي مسؤولة عن ستة ملايين حالة بأخماج الحلق Throat infections في أنحاء العالم ، كما وتصيب حوالي 11 مليون شخص بألتهابات جلدية مختلفة ويعد داء القوباء Impetigo في المقام الاول و بالأخص في البلدان الاقل تطوراً (Busowski و أخرون ، 2013) . معظم الهلاكات التي تسببها بكتريا *S.pyogens* تحدث بفعل الاخماج الغازية Invasive أو نتيجة لأمراض المناعة الذاتية Autoimmune disease بالرغم من ندرة حدوث ذلك لكن تقتصر أخماجها على التهابات الحلق و القوباء كأخماج خفيفة (Bessen ، 2009) إلا إنها مسؤولة أيضاً عن العديد من الامراض الجهازية المختلفة التي تهدد الحياة مثل التهابات الحنجرة , الحمى الروماتزمية من التهاب المفاصل أو التهاب القلب بالاضافة الى التهاب الكلية الحاد (Mora و أخرون ، 2005) .

2.5.2 بكتريا *Streptococcus agalactiae*

بكتريا *S.agalactiae* كروية موجبة لصبغة غرام تترتب بشكل أزواج أو سلاسل مختلفة الأطوال غير متحركة ، وغير مكونة للسبورات ، قسم منها يمتلك محفظة وهي لاهوائية إختيارية تنمو بدرجة حرارة 37 مْ ، وقد تحتاج الى توافر غاز CO_2 بنسبة 5 % لتعزيز نموها ، وتنمو على الاوساط الزرعية الغنية كوسط أكار الدم و أوساط انتقائية خاصة لنموها ، تكون مستعمراتها ملساء ناعمة دقيقة ذات قطر يتراوح (1-2) ملم وحافة دائرية ذات لون رمادي whitish gray محاطة بمنطقة ضيقة من التحلل الكامل وقد لا تسبب حدوث التحلل (Al-khalidi و Al-taee ، 2013) .

1.2.5.2 الوبائية Epidemiology

تعد بكتريا *S.agalactiae* المسبب الرئيس لالتهاب السحايا Meningitis وتجرثم الدم Bacteremia للأطفال حديثي الولادة والأطفال الرضع كما و تسبب العديد من الاخماج للبالغين في مناطق شتى من العالم (Verani و أخرون ، 2010) ، تستوطن هذه البكتريا القناة الهضمية و التناسلية عند النساء فقد تصل نسبة تواجدها في القناة التناسلية بين 5-35 % وأحيانا تصل الى 69% عند النساء الحوامل (Koneman و أخرون ، 1997) . وقد سجل مركز السيطرة على الامراض الانتقالية Centers Disease Control في الولايات المتحدة تقريبا من 1-3 أطفال

مصابين لكل 1000 طفل مولود حديثا في الولايات المتحدة (Regan و أخرون ، 1996) . أشار الباحث Chaiwarith و أخرون ، 2011 نقلاً عن Phares و أخرون ، 2008 حصول أزدياد في معدلات الخمج بهذه البكتريا من 3.4 طفل لكل 100,000 طفل مولود حديثاً في عام 1999 الى 5,0 طفل لكل 100,000 طفل في عام 2005 . في حالة وجود هذه البكتريا في الادرار وبكثافة فإنها ستؤدي الى مضاعفات ولاسيما في أثناء الحمل وفي فترات الولادة إذ يمكن أن تحصل ولادة مبكرة أو يحدث تمزق مبكر للغشاء الجنيني PROM (Sheen و أخرون ، 2011)

2.2.5.2 إمراضيـة *S. agalactiae*

تشكل *S. agalactia* جزءاً من النبيت الطبيعي للقناتين التناسلية و البولية للانسان , ولكن دراسات حديثة أثبتت أزدياد نسبة الاخماج الغازية Invasive infections الناتجة عن بكتريا *S. agalactiae* لنساء بالغات غير حوامل و مصابات بأمراض عدة منها السكري ، الامراض الخبيثة Malignancy ، ضعف الأعصاب ، القصور الكلوي Renal dysfunction ، المستخدمات للستيرويدات Steroids uses ، التليف الكبدي cirrhosis و بالايدز AIDS وهذا ما يؤكد الطبيعة الانتهازية لهذه البكتريا (Matsubara و جماعته ، 2009) . وقد بينت الدراسات البيئية والوبائية أن الاطفال الخدج أكثر حساسية للاخماج التي تسببها هذه البكتريا من الأطفال الذين يجتازون مدة الحمل كاملة (Baker ، 1997) ، كما وتعد هذه البكتريا إحدى مسببات ذات الرئة ، والتهاب السحايا ، وحالات تسمم الدم ، والصدمة السمية للاطفال حديثي الولادة والتي تعد عالية الضراوة ولها القابلية على إحداث التلف لخلايا الرئة والدماغ والكبد وهي قادرة على إختراق الحواجز الخلوية في هذه الاعضاء (Richards و أخرون ، 2011) بالاضافة الى أمتلاكها للذيفانات المكونة للثقوب و المحفظة عديدة السكرايد الغنية بحامض السياليك Sialic acid (Maisey و أخرون ، 2008) . أشارت الشعّار ، 2002 بأن *S. agalactiae* تعد عاملاً مسبباً لالتهابات الجروح والانسجة الرخوة والعظام والمفاصل وقد تبين حديثا إنها تسبب التهاب المفاصل النتن Septic arthritis والذي ينتج عن الخمج بالنمط المصلي Serotype VII .كما إنها قد تسبب التهاب نقي العظم وقرحة القدم لمرضى داء السكري .

6.2 عوامل الضراوة Virulence factors للبكتريا قيد الدراسة

1-6-2 عوامل الضراوة الانزيمية Enzymatic virulence factors

1 . الستربتوكاينيز Streptokinase

هو بروتين تفرزه مجموعات مختلفة من بكتريا *Streptococcus* المحللة للدم من نوع β و زنه الجزيئي 46 دالتون و يشفر له الجين *sk* ذو الحجم 1.3 كيلو زوج قاعدي ، يتألف البروتين من سلسلة ببتيدية مكونة من 441 حامضاً أمينياً تؤلف ثلاث مقاطعات Domains و هي α ، β ، γ وتتألف من 147 حامضاً أمينياً مشابهاً لانزيم

الستافيلوكاينيز المفرز من العنقوديات Staphylococci الا أن قدرته على الارتباط بالبلازمين تكون عشرة أضعاف قدرة الستافيلوكاينيز و تعمل هذه المقاطعة بوصفها منظماً Regulator لفعالية بقية الجزيئات ، اما المقاطعتين الثانية والثالثة فتكون ضرورية لتنشيط البلازمين و تحويله الى بلازمين فعال (هادي و جارالله ، 2013) . يعد الستربتوكاينيز من عوامل إذابة الجلطة Thrembolytic agents غير التخصصية للفايبرين إذ يرتبط هذا البروتين مع مولد البلازمين إذ يكون مقعد (الستربتوكاينيز – مولد البلازمين) إذ يعمل هذا المعقد على تحويل مولد البلازمين Plasmingen الى البلازمين Plasmin الذي يقوم بتحليل الفايبرين (Reddy ، 1980) . يعد الستربتوكاينيز عامل أنتشار Spreading factors يسهم في أنتشار البكتريا من خلال تنشيطه لانزيم Metalloproteases أو Collagenases في المادة البينية للخلايا الطلائية مما يسهل الانتشار و غزو الانسجة (Cunningham ، 2000) ، كما و يترك دور في أحداث الاخماج الجلدية ويعتقد وجود تعاون بينه و بين Plasminogen- binding group A Streptococcal Protein (Ringdahl و أخرون ، 1998) .

2. أنزيم اللايبيز Lipase enzyme

يعد اللايبيز أنزيم خارج خلوي Extracellular enzyme ينتج من قبل عدة أجناس بكتيرية وكذلك من بعض الفطريات يشفر له من قبل الجين *geh* ، يعمل اللايبيز على تحليل الدهون الثلاثية Triglycerol مائياً الى أحماض شحمية متطايرة Free fatty acids و كليسيرول Glycerol ، المادة الاساس لهذا الانزيم معقدة ، بالاضافة الى تكسير الدهون Metabolize lipids فأن الدور الاساس لإنزيم اللايبيز المنتج من قبل Staphylococci هو عامل أمراضي Pathogenic إذ يعمل هذا الانزيم على التداخل مع الخلايا البلعمية ومنع عملية الابتلاع Phagocytosis مانعاً بذلك الاستجابة المناعية التي تظهرها هذه الخلايا ضد Staphylococci وغيرها من الاجناس المنتجة لهذا الانزيم (Winny و أخرون ، 2012) .

3 . الأنزيم المحلل للدنا Deoxyribonuclease

هو إنزيم يعود الى مجموعة أنزيمات التحلل المائي Hydrolases إذ يعمل هذا الانزيم على التحلل المائي للاصرة الفوسفاتية ثنائية الاستر (Phosphodiester bond) التي تربط وحدات البناء الرئيسة للحامض النووي الـــ DNA وتحويله الى سائل ، تتوافر أربعة أنواع مختلفة مستضدياً هي A و B و C و D (Brooks و أخرون ، 2010) .

4 . الستافيلوكاينيز Staphylokinase

هو أنزيم بكتيري ينتج من قبل أنواع معينة لجنس *Staphylococcus* وزنه الجزيئي 15.5 كيلو دالتون ، يشفر من قبل الجين *sak* ، يتكون من سلسلة بروتينية مفردة مكونة من 136 حامض أميني ، يحول مولد البلازمين Plasminogen الى بلازمين Plasmin وهو بذلك يزيل خثرة الليفين fibrin clots ، إذ يمكن إستخدام هذا البروتين كعلاج لأحتشاء عضلة القلب Myocardial infarction ، يسمح هذا الانزيم بأنتشار البكتريا خلال أنسجة العائل من الجروح والحروق مما يؤدي الى حدوث التهابات جلدية (Wieckowska- Szakiel و أخرون ، 2007) .

5 . الأنزيم الحال للبروتينات Protease

يعد أنزيم Protease من الأنزيمات الخارج خلوية Extracellular enzymes التي تؤدي دوراً مهما في أمراضية بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* ، إذ يعمل على تحلل العناصر البروتينية الداخلة في تركيب الخلايا ، فضلاً على دوره في فلق و منع نشوء الجسم المضاد من نوع IgG من خلال تحطيم السلاسل الثقيلة له ، كما و أن بعض إنزيمات Protease تكون قادرة على هدم الببتيدات الضد ميكروبية Antimicrobial peptides المنتجة من قبل خلايا المضيف (سعود و أخرون , 2009) .

2.6.2 الذيفانات Toxins

هي عبارة عن بروتينات تفرز من قبل عدة أجناس بكتيرية مرضية تُسهم في أحداث الامراضية بشكل ناجح من خلال دورها الكبير في تحطيم أنسجة المضيف ، وهذا يسمح للبكتريا الغازية Invasive بأستغلال مصادر المضيف و تسهيل أنتشارها داخل و خارج المضيف وتمكينها من تجاوز الاستجابة المناعية Immune response للمضيف (Madigan و أخرون ، 2012) .

1. أنتاج الهيمولايسين Haemolysin production :

الهيمولايسين احد انواع البروتينات المحللة لكريات الدم الحمر Erythrocytes و الصفيحات الدموية Platelets تنتجه بعض أنواع البكتريا وهو ذو تركيب جزيئي يختلف من بكتريا الى أخرى وغالبا ما يرتبط انتاجه بالبكتريا المعزولة في الحالات المرضية لذا يعد من العوامل التي تسهم في الامراضية (Kebaier و أخرون ،2012) . أشار أبو ريشة و جماعتها , 2007 نقلاً عن Butt و أخرون ،1998 إنّ لهذا البروتين أهمية في زيادة إمراضية لبعض أنواع المكورات و المسبحيات و يكون على أربعة أنواع جميعها ذيفانات خارجية Exotoxin وهـــي : الفا (Alpha) وبيتا (βeta) وكاما (Gamma) ودلتا Delta .

2. الستربتولايسين Streptolysin O. و Streptolysin S :

تعود قابلية العديد من المسبحيات على تحليل خلايا الدم الحمراء Erythrocytes لإفرازها أنزيم الستربتولايسين بنوعيه . Streptolysin S الذي يحطم الغشاء الخلوي للخلية الحمراء و الخلايا الاخرى إذ يكون هالة التحلل الكامل للدم β-hemolytic الذي يحيط بمستعمرات GAS النامية على أطباق أكار الدم Blood agar plates ، أما Streptolysin O فأنه يمتلك صفة مستضدية (Antigen) إذ يمكن التحري عن وجود Streptococci وذلك من خلال قياس الاجسام المضادة لهذا الذيفان Antistreptolysin titer (Kayser و أخرون ، 2005) .

3 . الذيفان المقشر Exfoliatin

هو ذيفان ثابت بالحرارة إذ يطلق علية بـ Exotoxin *Staphylococcus aureus* .إن الذيفان المقشر عبارة عن الكلوتامين Glutamate المتخصص الحال للحامض الاميني السيرين Serine تنتجه بعض سلالات Staphylococci يستهدف جزيئات الـ Desmoglein والتي تعد أحد مكونات خلايا الجلد للثدييات وبالتالي يعمل على تحطيم الروابط الداخلية و تسلخ الجلد لتكوين البثور Blister المرتبطة بمتلازمة الجلد السمطي للمكورات العنقودية (SSSS) Scalede schok syndrome *Staphylococcus* . يقع الذيفان المقشر تحت سيطرة المورثات *eta* و *etb* ، إذ يحمل الجين *eta* على الكروموسوم البكتيري بينما يحمل *etb* على بلازميد ، يعد هذا الذيفان مستضد فائق Superantigen من خلال تحفيزه للخلايا التائية T- Cells الغير متخصصة على الانقسام (Nishifuji و أخرون ، 2008) .

4 . الذيفانات المعوية Enterotoxins

وهو ذيفان ثابت بالحرارة يسبب إسهالاً وقيئاً ناتجاً عن التسمم الغذائي (Brooks و أخرون ،2007) . يعد هذا الذيفان مستضد فائق Super antigen من خلال تحفيزه للخلايا التائية T- Cells على التضاعف و الارتباط مع MHC-II المتوافر على سطح الخلية المقدمة للمستضد كالخلية البلعمية إذ يؤدي هذا المعقد (ذيفان / MHC-II) إلى استجابة الخلايا التائية بشكل كبير (Dinges و أخرون ، 2000) .

5 . ذيفان متلازمة الصدمة السمية Toxic Shok Syndrome (TSST-1)

يشفر هذا الذيفان من قبل الجين H *tst* و الواقعة على كروموسوم السلالات المرضية للمكورات العنقودية (Dinges و أخرون ، 2000) ، يؤدي إلى متلازمة الصدمة السمية ، تم عزله من 20% من المكورات العنقودية

الذهبية و يسمى هذا الذيفان بالمستضد الفائق Super antigen ، يرتبط مع MHC-II المتواجد على سطح الخلية المقدمة للمستضد (كالخلية البلعمية) إذ يؤدي هذا المعقد (ذيفان / MHC-II) إلى استجابة الخلايا التائية بشكل كبير وتدفق الحركيات الخلوية (Cytokinse) وبالتالي حدوث متلازمة الصدمة السمية (Brooks و أخرون ،2007) .

3.6.2 المحفظة Capsule

تتكون المحفظة في أغلب الانواع البكتيرية من عديد السكريد Polysaccharide كما هو الحال في بعض سلالات بكتريا *S .aureus* إذ تحيط بالخلية البكتيرية ، لها دور مهم إذ تقوم بحماية البكتريا من عملية البلعمة Phagocytosis ، أما بالنسبة لبكتريا *Streptococcus pyogens* فأن المحفظة تتكون من حامض الهياليورنيك Hyaluronic acid إذ أن لها علاقة بالالتصاق والاختراق Adherence and invasion (Kayser و أخرون ، 2005) . تسهم المحفظة في عملية التصاق البكتريا على سطوح خلايا العائل و الأدوات الطبية المزروعة داخل أجسام المرضى مثل خطوط السوائل الوريدية و المفاصل الاصطناعية مما يساعدها على استعمار الأجهزة الطبية (Koneman و أخرون ، 1997) .

4.6.2 أنتاج الطبقة اللزجة و تكوين الغشاء الحيوي Slime layer and biofilm production

يعرف Glycocalyx بأنه المادة المخاطية المتكونة من معقد متعدد السكريات الخارجية ذات المنشأ البكتيري ، يدخل فيها أيضاً مواد خارجية تظهر في بيئة الكائن المجهري مثل الأحماض النووية ، و البروتينات ، و المعادن ، و المغذيات ومواد الجدار الخلوي و غيرها ، أستخدم مصطلح المادة المخاطية Slime layer عام 1940 لوصف طبقات الغشاء الحيوي البكتيري Biolfilm (Shumugaperumal ، 2010) . أما من الناحية الطبية فأن الأغشية الحيوية تعد تجمعات بكتيرية مرتبطة بالأسطح تتوافر داخل قالب من بوليمرات خارج خلوية تبدي أنماطاً مظهرية متغايرة للنمو و التعبير الجيني و أنتاج البروتين و يمكن أن تؤدي الى عواقب طبية و أقتصادية (Mariana و أخرون ، 2009 ; خضر , 2013) . إن أهم ما يميز البكتريا داخل الاغشية الحيوية هو امتلاكها لدرجة عالية من المقاومة ضد العوامل المضادة للجراثيم كما أنها تكون متوارية عن الجهاز المناعي للعائل (Dadawala و أخرون ، 2010) . فالبكتريا داخل الاغشية الحيوية تسبب أخماج مستعصية بنسبة (20 – 100) مرة بقدر الخلايا النامية بشكل عالق (الخفاجي , أ 2008) . إن البكتريا الموجبة و السالبة لصبغة غرام لها القدرة على تكوين الاغشية الحيوية إذ تتواصل مع بعضها داخل الغشاء الحيوي عن طريق إشارات كيميائية تدعى محفزات ذاتية Auto indicator وتدعى عملية التواصل الكيميائية هذه بظاهرة التحسس النصاب Qourum sensing وهي تسمح للبكتريا بالتحكم

بالبيئة وتغير التصرف أستجابة لتغيرات مجتمع الغشاء الحيوي (Venturi، 2006) . يساعد الغشاء الحيوي البكتريا في البقاء حية في الظروف القاسية داخل العائل و تعد مسؤولة عن الاخماج المزمنة و المستعصية ومن هذه الأمراض التهاب شغاف القلب ، التليف الكيسي ، التهاب الإذن الوسطى ، الاخماج المتعلقة بالأدوات الطبية ، أخماج القثاطر ، التهاب اللثة ، تسوس الأسنان وغيرها (المسعودي و أخرون ، 2013) .

7-2 مضادات الحياة Antibiotics

تعرف المضادات الحيوية على أنها مواد كيميائية تنتج من قبل كائنات مجهرية عدة ، بما في ذلك البكتريا والفطريات إذ تشكل جزءاً من النواتج الايضية الثانوية الخاصة أو المحورة والتي تمتلك فعالية ضد مجاميع مختلفة من الاحياء المجهرية ، كذلك تعرف بأنها مواد كيمياوية عضوية تنتج من قبل الاحياء المجهرية المختلفة (Prescott و أخرون ، 2005) . يعد البنسلين أول مضاد حيوي مكتشف تم ذلك بالصدفة من قبل فليمنك في عام 1928 إذ لاحظ تثبيط نمو بكتريا *Staphylococcus aureus* ، عن طريق الفطر *Penicillium notatum* (Torok و أخرون ، 2010).

1-7-2 Macrolide Antibiotic

تعد مضادات الـ Macrolide واحدة من أهم عوائل المضادات الحياتية ؛ لأهميتها في علاج الأخماج الناتجة عن البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة غرام و تنتج من الفطر *Streptomyces* أو بكتريا *Arthrobacter* ، يستخدم عناصر Macrolide كعلاج بديل للأشخاص الذين يعانون من حساسية ضد مركبات البيتالاكتام β-lactam ، تركيبها الكيميائي مكون من حلقة كبيرة من Macro cyclic lacton ring مؤلفة من 10 – 60 ذرة مرتبط بها سكرين سداسي Cladinose و Desosamine وهناك مواقع جانبية في حلقة اللاكتون هي R4,R3,R2,R1: يضاف لها جذور كيمائية مثل (CH_3) وغيرها لإنتاج مشتقات هذه المجموعة ، يطلق على مجموعة الـ Macrolide و اللنكوسمايد و الستربتوغرامين B أسم MLS_B وعليه فأن تعبير MLS_B يشير الى مقاومة واحد أو أكثر من أصناف هذه المجموعة ، تستهدف مركبات Macrolide الرايبوسوم البكتيري بتثبيطها لعملية التخليق الحيوي Biosynthesis للبروتين من خلال الارتباط بالوحدة الريبوسومية الكبيرة 50S للبكتريا وبالتالي منع خطوة تبديل الموضع Translocation من خلال منعها لببتديل ترانسفيريز Peptidyl transferase من إضافة الببتيديل المرتبط بالحامض النووي الرايبي المراسل tRNA الى الحامض الاميني ، تضم مجموعة Macrolide عدد من المضادات منها : الارثروميسين، الازيثروميسين ، الكلاريثروميسين ،

السبراميسين ، أولياندوميسن ، روكسيثروميسين ، جوزاثروميسين (Kwiatkowska و Maslinska ، 2012 ; Mankin ، 2008) .

1.1.7.2 الارثرومايسين Erythromycin

هو أول مضاد اكتشف من مجموعة Macrolide ينتج من عتر تدعى *Streptomyces erythraeus* له فعالية موقفة لنمو الجراثيم وقاتلة لها اذا كان ذا تركيز عالٍ , أستعمل في بدايات 1950 م لمعالجة أخماج الجهاز التنفسي بالإضافة الى الاخماج الجلدية و الانسجة الرخوة Soft tissue infections إذ يمتاز الارثرومايسين بطيف مشابه أو أوسع قليلاً من البنسلين ذي الطيف الواسع (Extended) ولذا يستخدم للمرضى الذين يعانون من حساسية تجاه مضاد البنسلين , يمتاز الاريثرومايسين بقدرته على القضاء على العديد من الممرضات ومن ضمنها الممرضات داخل خلوية مثل *Legionella* و *Mycoplasma* و *Chlamydia* (Zuckerman ، 2004 ; Katzung ، 2009) .

- **التركيب الكيميائي Chemical Srtucture**

يتكون الأريثرومايسين من أربعة عشر طرفاً و حلقة لاكتون مع عشرة مراكز غير متـــــناظرة ونوعين من السكر هما L - cladinose و D - desoamine . الصيغة الجزيئية **C**37**H**67**NO**13 (Katzung ، 2009)

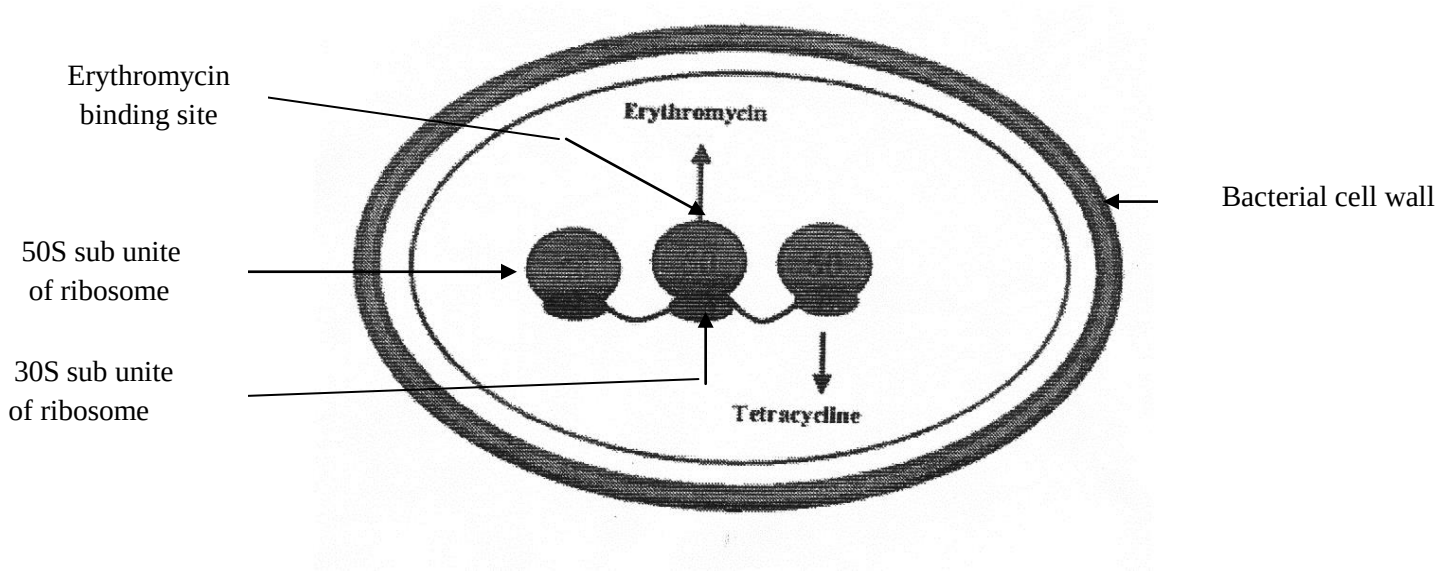
- **آلية عمل الاريثرومايسين Mechanism of action**

يعمل الاريثومايسين على منع التخليق الحيوي للبروتين وبالتالي فإن باقي العمليات الوظيفية والتركيبية للحياة والتكاثر سوف تثبط , وذلك من خلال الاتحاد بطريقة غير عكوسة مع 50S subunit للرايبوسومات البكتيرية وبالتالي يمنع خطوة تبديل الموضع (Translocation) والتي هي احدى خطوات تخليق البروتين (Richard و أخرون 2009) ، كما موضح في الشكل (1-1) . يرتبط الارثرومايسين مع 23S للحامض النووي الرايبوسومي (rRNA) في 50S subunit للرايبوسوم البكتيري وبالتالي يعطل خطوة تبدل المواضع من خلال منع تحرير الحامض النووي الناقل tRNA من الموقع A الى الموقع P أثناء عملية الترجمة Translation (Lovmarو أخرون ،2004 ; Katzung ، 2009) .

- **إستخدام الاريثرومايسين Erythromycin uses**

هو أحد انواع المضادات الحياتية الاكثر انتشاراً وأماناً للاستعمال ، وهو ذو فعالية ضد مجال واسع من الجراثيم مثل المكورات الموجبة لصبغة غرام و الريكيتسيا *Rickettisia* والبكتريا المنحنية *Campylobacter jejuni* ،

يعطى الاريثروميسين بأحيان متقاربة في أنتانات الجهاز التنفسي، التي تشمل أنواعاً نادرة عدة من التهاب الرئتين ، مثل الالتهاب الرئوي الناتج عن *Mycoplasma pneumomia* و Legionellosis ، كما و يعطى أحيانا لتقليل خطر العدوى من الخمج بالسعال الديكي (Pertussis) و علاج هذا المرض وأيضا كجزء من علاج الخناق Diphtheria . (Maslinska و Kwiatkowska ، 2012) .



شكل (1-3) يوضح موقع ارتباط الارثرومايسين بالوحدة الرايبوسومية الكبيرة (Jasir و أخرون ، 2000)

2-1-7-2 الأزيثرومايسين Azithromycin

وهو مضاد من صنف الأزاليد Azalid مشتق من Macrolide ، ويقصد بصنف الأزاليد هو صنف Macrolide الحاوي على جزيئة نيتروجين في حلقة Macrolide وهو ما يؤثر على الحركية الدوائية ويزيد من استقرار وثباتية جزيئة المضاد (Amacher و أخرون ، 1991) . يعد الأزيثرومايسين من أحد أفضل المضادات المُسوقة عالمياً ، إذ يمتاز بزيادة نشاطه ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام و بعض البكتريا الموجبة لصبغة غرام نتيجه لأزدياد عمر النصف Half-life لديه في مصل الدم وإختراقه للأنسجة مما جعله يتفوق على الارثرومايسين في ذلك ، يستخدم الأزيثرومايسين في علاج أو منع بعض الاخماج البكتيرية والتي معظمها تسبب التهاب الأذن الوسطى Otitis media ، والتهاب اللوزتين Tonsillitis ، والتهاب الحنجرة Laryngitis ، والتهاب القصبات Bronchitis ، وذات الرئة Pneumonia ، والتهاب الجيوب الأنفية Sinusitis وفي السنوات الأخيرة أُستخدم

لمنع الأخماج البكتيرية في الأطفال حديثي الولادة والذين لديهم جهاز مناعي ضعيف , هذا فضلاً عن قدرة الأزيثرومايسين على القضاء على بعض أخماج القناة البولية والأمراض السارية (Klausner و أخرون 1998 ; Zuckerma ، 2004) .

- **التركيب الكيميائي Chemical Srtucture**

يشتق الأزيثرومايسين من الاريثرومايسين إذ تُستبدل مجموعة المثيل بذرة نيتروجين والتي تندمج بحلقة اللاكتون وبالتالي تكون تلك الحلقة بخمسة عشر طرفاً.الصيغة الجزيئية **C**38**H**27**N**2**O**12 (Katzung ، 2009) .

- **آلية عمل الأزيثرومايسين Mechanism of action**

يمنع نمو الجراثيم وتكاثرها من خلال منع عملية تخليق البروتين من خلال الارتباط مع 50s subunit للرايبوسوم البكتيري , وبالتالي يمنع عملية الترجمة Translation للحامض النووي الرايبوسومي المرسال mRNA مع عدم تأثر عملية تصنيع الحامض النووي (Mims و أخرون ، 2004) .

- **أستخدام الأزيثرومايسين Azithromycin uses**

الازيثرومايسين واسع الطيف ولكن يكون ذا تأثير أكبر تجاه معظم الجراثيم الموجبة لصبغة غرام خاصة بكتريا *Haemophilus influenzae* فضلاً عن كفاءتها في القضاء على العديد من الجراثيم ومنها : *Streptococcus agalactiae* ، *Streptococcus pnumonia* ، *Streptococcus pyogenus* ، *Neisseria gonorrhoeae* ، *Chlamydia pneumonia* و *Salmonella typhi* (Noedl و أخرون ، 2006) . يستخدم الازيثرومايسين لعلاج التهاب المجاري التنفسية والتهاب الرئة , و التهاب القصبات المزمن وفي التهاب الجيوب الأنفية وفي التهاب البلعوم والتهاب اللوزتين ، كما ويستخدم في التهاب الأذن الوسطى الحاد والتهاب الجلد والجروح والتهاب الملتحمة البكتيري والتهاب الحالب بالمتدثرة و التهاب السحايا النيسيري و التهاب النسيج الخلوي (Robredo و جماعته ، 2013) .

2.7.2 الكلندامايسين Clindamycin

هو مضاد حيوي من عائلة اللينكوزاميدات Lincosamides ، أعلن عن تركيبه لاول مرة عام 1966 من قبل العالمان Magerlein و Birkenmeyer ، يستخدم هذا المضاد لمعالجة العديد من الاخماج الناتجة عن البكتريا الموجبة لصبغة غرام الهوائية و اللاهوائية ، كما ويستخدم ايضاً لمعالجة الاخماج الطفيلية كالملاريا ، ومعالجة

الاخماج الموضعية Local infections ويكون فعال أيضاً لمعالجة المكورات العنقودية المقاومة للمثيسيلين MRSA . طرح في الاسواق لأول مرة عام 1968 (Daum ، 2007) .

- **التركيب الكيميائي Chemical Srtucture**

الكليندامايسين هو مضاد شبه مصنع Semi-synthetic يشتق من المضاد الحيوي اللنكوسامين lincocymin المنتج من بكتريا *Streptomyces lincolnensis* بعد أستبدال مجموعة الهيدروكسيل بذرة كلور(chloro-7-deoxylincomycin-7) كما و يحتوي على حلقة البايروليدين Pyrollidene المرتبطة بمجموعة سكر عن طريق رابط أميد Amide bond (Stephen ، 1990 ; Torok و أخرون ، 2010)

- **الية عمل الكليندامايسين Mechanism of action**

يمتلك هذا المضاد تأثيراً مثبطاً Bacteriostatic على الجراثيم إذ يثبط عملية التخليق الحيوي للبروتين من خلال إرتباطه مع الوحدة الريبوسومية البكتيرية الكبيرة 50s مانعاً بذلك خطوة تبديل الموضع Translocation وبالتالي منع عملية الترجمة Translation لأنتاج البروتين البكتيري المهم لانجاز الفعاليات الحيوية (Woods ، 2009 ; Torok و أخرون ، 2010) .

- **أستخدام الكليندامايسين Clindamycin uses**

يمتلك هذا المضاد حاله حال بقية Macrolide طيف واسع ضد البكتريا الموجبه و السالبة لصبغة غرام ، إذ يستخدم لعلاج الاخماج البكتيرية الحادة مثل أخماج الجهاز التناسلي للاناث و أخماج الجهاز التنفسي التي تسببها البكتريا اللاهوائية و المكورات العنقودية و المسبحيات *Staphylococcus* و *Streptococcus* كما ويستعمل لعلاج حباب الشباب Acne و التهاب المهبل البكتيري Bacterial vaginosis (Charles و Woods ، 2009) .

8-2 آلية المقاومة لمجموعة Macrolide :

1 . عدم قدرة دخول المضاد الى داخل الخلية البكتيرية وكذلك عملية النضح الى الخارج وكلاهما يحدُ من تركيز الدواء داخل الخلية البكتيرية .

2. تقليل الالفة للـ 50s subunit للرايبوسوم تجاه المضاد والناتج من عملية أزالة المثيل للأدنين في الجزء الـ 23S للـ rRNA في البكتريا .

3 . وجود الأنزيمات مثل الاريثرومايسين أستريز Erythromycin estrase الذي ينتج عن بلازميد المقاومة (Guilfoile و Heymann ، 2007) .

9-2 مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic resistant

تعد مقاومة المضادات الحياتية من قبل بعض الاحياء المجهرية مؤشراً خطيراً على صحة الانسان لاسيما تـأثيرها المباشر في زيادة نسبة الاخماج وإنتشار المرض وبالتالي زيادة معدل الوفيات إضافة الى زيادة تكاليف صناعة المضادات الحياتية (نجيب , 2011) . يشكل ظهور سلالات بكتيرية مقاومة للمضادات الحياتية المستخدمة حالياً و زيادتها المتسارعة مصدر قلق في العالم أجمع ، و مما يزيد هذه المشكلة سوءاً أن هذه المقاومة لا تقتصر على مضاد حياتي معين بل تتعداه لتشمل كل المركبات التي تعود للصنف نفسه (Marzoog ، 2013) . أكد خبراء منظمة الصحة العالمية WHO إن مقاومة مضادات الحياة أصبحت مشكلة عالمية إذ أصبح من السهل أنتقالها بين البلدان وحتى بين القارات لذلك تم تسمية مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية بكابوس البكتريا "Nightmare Bacteria" . يكتسب في الولايات المتحدة حوالي مليونا شخص لأخماج تقاوم واحد أو أكثر من المضادات الحياتية المصممة لعلاجها كما ويموت حوالي 23 الف شخص سنوياً بفعل مقاومة البكتريا لمضادات الحياة (Frieden ، 2013) بالنسبة للبكتريا الموجبة لصبغة غرام تبقى سلالات MRSA من أصعب العزلات معالجة نتيجة لمقاومتها لجميع أنواع مضادات البيتالاكتام بالإضافة إلى مقاومتها للعديد من أنواع المضادات الحياتية الأخرى بالاضافة الى مجموعة "ESKAPE" *Enterococcus faecium , S. aureus, Klebsiella Pneumonia , Acinetobacter baumannii , Pseudomonas aeruginosa, , Enterobacter species* فعلى الرغم من تقديم أنواع جديدة عدة من المضادات الحياتية خلال العقود الماضية الا أن الكثير من العوامل السلبية حالت دون إنخفاض نسبة الخمج بالاخماج الناتجة عن تلك الجراثيم بسبب الكلفة العالية لتلك المضادات وظهور طرق مقاومة جديدة إذ يجري تطوير عدة مضادات حديثة لمكافحة العدوى الناتجة عن سلالات MRSA في حين أن معظم هذه المضادات ستوجه لمكافحة الاخماج الجلدية الحادة ABSSSIs (Rodvold و Mcconeghy ، 2014) . يلجأ الكائن المجهري الى مقاومة المضادات الحياتية بوسائل عديدة منها إنتاج الإنزيمات المحطمة القادرة على تحليل جزيئة المضاد أو إجراء تحويرات فيها الى جزيئات خاملة أو منع المضاد من الوصول الى الهدف الذي يؤثر فيه أو خفض تركيز المضاد من خلال قذفه الى خارج الجسم من خلال الية يطلق عليها مضخة القذف Efflux pump (القيسي وجماعته , 2007) .

10-2 طبيعة المقاومة Characters of resistance

1. مقاومة لا وراثية : قد تكون ناتجة عن غياب الموقع الهدف مثلاً البنسلينات تؤثر على الببتيدوكلايكان المتوافر في البكتريا فقط لذلك لا يتوقع أن تؤثر في الفطريات ، و يمكن لبعض الاحياء ان تفقد الهدف الذي يتأثر بالدواء بعد عدة أجيال من نموها بوجود الدواء و بذلك تصبح مقاومة مثلاً تفقد البكتريا بعض مكونات جدارها الخلوي و تتحول الى L-Form الخيطية في أثناء أعطاء البنسلين وتصبح مقاومة له . أما المقاومة الاخرى فهي عدم وصول المضادات الى أهدافها نتيجة للحواجز النضوحية (Brooks و أخرون ، 2010) .

2. المقاومة ذات الاصل الوراثي : و تقسم الى : -

- **مقاومة وراثية كرومرسومية :**

يمكن أن تحدث نتيجة الطفرات الوراثية التلقائية في الموقع الذي يتأثر بالدواء , لذا فهو يعمل بوجود الدواء و يعمل الاخير بوصفه كعاملاً انتخابياً فيشجع الخلايا المقاومة و يقتل الحساسة . تزداد مقاومة البكتريا على وجه الخصوص نتيجة لوجود المضادات في محيط الخلايا يجعلها تحت اجهادات كبيرة لذلك تظهر عليها القابلية العالية للتطفير (الخفاجي , أ 2008) .

- **المقاومة الوراثية اللاكروموسومية :**

تتمثل بظهور العناصر الوراثية المتحركة مثل البلازميدات Plasmids و الجينات القافزة Transposons و التي تشفر عادة لأنزيمات تفكك المضادات الحياتية ، غالباً ما تحتوي البكتريا على عناصر وراثية مستقلة و تكون بشكل عناصر وراثية تنقسم بصورة بشكل حلقات دائرية مغلقة وتدعى البلازميدات Plasmids لها مواقع بدء التضاعف Origin خاصة بها وهي تتضاعف بشكل مستقل عن تضاعف كروموسوم الخلية ، بلازميد المقاومة R-plasmid ينتقل بأكثر من طريقة ، البكتريا السالبة لصبغة غرام تتبادل هذه العوامل بالاقتران ، أما البكتريا الموجبة لصبغة غرام فتتبادل هذه العوامل بالتنبيغ او التحول ، كما وأن الجينات يمكن ان تتحرك من بلازميد الى أخر بشكل يعتمد على بروتين *Rec* A أو بعملية القفز بالنسبة للجينات القافزة (الخفاجي , أ 2008) . أما العناصر القافزة Transposonal element هي قطع دنا تستطيع الانتقال من أحد مواقع جزيئة DNA الى موقع أخر داخل جزيئة دنا نفسها أو حتى الى جزيئة دنا اخرى ، لا تظهر العناصر القافزة بصورة منفصلة عن جزيئة الدنا ولكنها تنغرز داخل جزيئة الدنا إذ تستطيع أن تتخذ جينوم الفيروسات و البلازميدات و الكروموسومات مضائف لها ، هنالك ثلاث أنواع من العناصر القافزة في البكتريا و هي عناصر الاقحام Insertion sequence و الينقول Transposon و بعض الفيروسات الخاصة ، عناصر الاقحام هي أبسط أنواع العناصر القافزة لاتحمل معلومات

وراثية لحركتها داخل الكروموسوم ، أما الجينات القافزة Transposable genes فتنتشر في جينومات الاحياء و يمكن أن تنحشر في مواقع معينة أو بشكل عشوائي البعض منها بسيط والأخر معقد وأغلبها تحمل صفة مقاومة المضادات الحياتية (Madigan و أخرون ، 2012) . أشارت بان ، (2010) إن هذه البلازميدات و العناصر القافزة Transposons يمكن نقلها من الجيل السابق الى الجيل اللاحق كما في الطفرات التلقائية للحامض النووي الرايبوزي DNA وهوناتج عن عملية التغيير في الكروموسومات والذي يحدث نتيجة حذف أوالغاء أو تبديل لواحد أو اكثر من النيوكليوتيدات في الجين ، هذه الطفرة في ترتيب المورثات إما أن تستمر أو تعدل من قبل البكتريا نفسها أو تكون قاتلة للجرثومة ، وفي حال قاومت هذا التغيير في المورثات فأنها تعمد الى نقله الى الجيل الاخر، وقسم من هذه الطفرات ليس له أي تأثير على حساسية الجراثيم تجاه المضادات . أن العناصر الوراثية المتحركة الحاملة لصفة مقاومة المضادات الحياتية تنتقل من خلال ميكانيكيات وهي :

1 . الاقتران Conjugation : وهو إنتقال المادة الوراثية (البلازميد) عن طريق الاقتران بين خليتين بتكوين جسر بينهما وتدعى الخلية التي تنتقل منها المادة الوراثية بالخلية المانحة +F أما الخلية التي تستقبل المادة الوراثية بالخلية المستقبلة -F (Dimitriu ، 2014) .

2 . التحويل Transformation : تحدث هذه العملية خارج جسم الكان الحي *In vitro* إذ تتحلل الخلية الواهبة لتحرر قطع من جينومها يمكن ان تستلم من قبل الخلايا المستلمة من البيئة الخارجية ، والخلايا التي تقوم بهذه المهمة هي الخلايا المؤهلة Competent cells يمكن أن تكون العملية ناجحة عند نقل حوالي 500 نيوكليوتيد على الاقل وتصبح القطع جزءاً صغيراً من جينوم الخلايا الواهبة ، أكتشفت عملية التحول في بكتريا *Streptococcus pneumonia* وعدت اول دليل على تبادل المعلومات الافقي و الجانبي ثم وجدت في عدد من البكتريا مثل *Staphylococcus* و *Niesseria* و *Baccilus* (الخفاجي , ب 2008 ; فاطمة و باسمة ، 2012)

3 . التنبيغ Transduction : وهي انتقال المادة المادة الوراثية من بكتريا الى اخرى عن طريق العاثيات (Bacteriophage) وهي فايروسات متطفلة على البكتريا إذ تعمل على نقل جزء من المادة الوراثية من خلية الى اخرى ، و التنبيغ على نوعين :

- **التنبيغ العام** : وفيه تقوم العاثيات التي تستطيع القيام بعملية التنبيغ Transducing phage بنقل جينات غير محددة .
- **التنبيغ المتخصص** : تنتقل جينات محددة ويتم ذلك بوساطة عاثيات خاصة أكثرها من العاثيات المعتدلة .

4 . المناقلة Transposition : وهو ناتج من انفصال قطعة من الـ DNA البكتيري لها القدرة على أن تتحرك ضمن المادة الوراثية للخلية نفسها مؤدية بذلك الى حدوث طفرات وتغيير في المادة الوراثية (Madigan و أخرون ، 2012) .

11-2 مقاومة الـ Macrolie Resistance of Macrolide

ظهر خلال العقدين الماضيين زيادة ملحوظة في مستويات مقاومة Erythromycin و عناصر الـ Macrolide الأخرى بين العزلات البكتيرية المرضية و المتعايشة ، إذ أرتبط ظهور هذا الازدياد مع الاستخدام الواسع لهذه المضادات (Villedieu و أخرون ، 2004) . المقاومة المكتسبة ضد الـ Macrolide إما تكون نتيجة التحوير في الموقع الهدف Target site modification أو نتيجة نضوح الدواء أو تحويرالدواء بوساطة الأنزيمات من خلال التعبير الجيني Gene expression للـبلازميد أو الينقول Transposons الحاوي على المورثات *erm* gene ، أو من خلال انظمة الدفق Efflux system والتي تشفر من قبل الجين *mef* A أو غيرها من الجينات (Shain و أخرون ، 2002) . يرجع أزدياد مقاومة الارثرومايسين الى توافر الجينات *erm* A و *erm* B و غيرها و تسمى هذه بجينات المثيلة Erythromycin Resistant Methylase إذ تمتلك هذه الجينات القدرة على الانتقال و الانتشار بين المرضى و كذلك من الحيوانات الى الانسان وبالعكس و بذلك تمثل مشكلة صحية متنامية الخطورة (Hatkar و أخرون ، 2014) أن التعبير الجيني للـ *erm* يؤدي الى تغيير الموقع الهدف للمضاد الحيوي Target site modification عن طريق تحوير للجزء المستهدف بإضافة مجموعة المثيل للحامض النووي الرايبي rRNA بفعل أنزيمات المثيلة Methelases هذا التعبير إما أن يكون فطرياً أو مستحثاً بعملية التوهين المترجم Translation attenuation وهذا التوهين ونوعه يعتمد بالدرجة الاساس على وجود الجينات *erm* أضف الى ذلك توفير مقاومة مشتركة للماكرولد واللنكوسامايد والستربتوغرامين MLSB (Weisblum ، 1995) ، فقد أشار الباحث Jorgensen وأخرون ، 2004 الى أرتباط *erm* A و *erm* C بالمقاومة المحفزة للكلندامايسين [Macrolid lincosamid streptogramin B resistance (MLS)] . أشار الباحث Chancey و أخرون ، 2012 الى وجود 34 صنف للجين *erm* وكما موضح في الجدول (2-1) إذ تنتشر الجينات *erm* A و *erm* B و *erm* C في البكتريا الموجبة لصبغة غرام وأن الفرق بين أصناف هذا المورثات تعتمد بالدرجة الاساس على المضيف البكتيري فالمورثات *erm* A ترتبط بالبكتريا *Staphylococcus* ولكن تم الكشف عنها في أجناس بكتيرية أخرى موجبة لصبغة غرام مثل *Enterococcus* و *Streptococcus* أما المورثات *erm* B فترتبط بـ *Streptococcus* المقاومة للماكرولايد واللنكوسامايد والستربتوغرامين MLSB مع ذلك تم الكشف عنها في 11 جنس بكتيري موجب لصبغة غرام . يحمل الجين *erm* A على العنصر القافز Tn554 إذ يمتلك موقعاً محدداً ينغرز

من خلاله في كروموسوم *S .aureus* كما و يقع الجين *erm* B على Tn551 أما الجين *erm* C فتحمل على بلازميد (Wu و أخرون ، 1999 ; Zamantar و أخرون ، 2011) . الالية الثانية لمقاومة الـ Macrolide هي أنظمة الدفق Efflux system والتي هي عبارة عن بروتينات تقع على الحدود الخارجية للخلايا تعمل على طرد جزيئات المضاد الحيوي و المواد الضارة خارج الخلية وبإستخدام القوة الدافعة للبروتون Proton motive force كمصدراً للطاقة عن طريق المقايضة Drug \ H+ antiport بحيث تقلل من تركيز المضاد الداخل للخلية البكتيرية للحد الذي يصبح فيه غير مؤثرا (الخفاجي , أ 2008) . تتواجد الية الدفق Efflux pump في البكتريا الموجبة و السالبة لصبغة غرام ، بالنسبة للبكتريا الموجبة لصبغة غرام تشفر هذه الالية عن طرق التعبير الجيني للمورثة *mef* A إذ تقع أنظمة الدفق المتخصصة بصنف معين من المضادات على البلازميد أو الكروموسوم في حين أنظمة الدفق المتخصصة بمقاومة عديد الادوية تكون محمولة على الكروموسوم (Costa و أخرون ، 2013) . تم الكشف لأول مرة عن الجين *mef* A في بكتريا *Staphylococcus epidermidis* و لاحقاً في بكتريا *S. pyogenes* (Lampson و أخرون ، 1986) . تؤثر هذه الالية على مضادات الـ Macrolide المكونة من 14 و15 ذرة في حلقة اللاكتون ، كما و تكون حساسة للمضادات ذات 16 ذرة ، بالاضافة الى الكليندامايسين و الستربتوغرامين B حتى بعد تحفيزها بمضاد الارثرومايسين لذلك يطلق العزلات الحاوية على الجين *mef* A بالطراز المظهري M (M phenotype) . يمكن للمورثة *mef* A الانتقال من بكتريا *S.pneumonia* الى *S.pyogens* عن طريق الاقتران Congugation ، كما و تظهر توليفة تضم المورثات *mef* A و *erm* A مجتمعتين معاً في بكتريا *S.pneumonia* و *S. pyogenes.* و *S. agalactiae* و *S .aureus* (Kataja و أخرون ، 2000 ; Luna و أخرون ، 2002) . كما يوجد نظام اخر لـ Active Drug Efflex في بكتريا *S. pyogenes* فضلاً عن نظام *mef* A لا يثبط بالمثبط Carbonyl Cyanide Chloropheneylhydrazone (CCCP) ولايشفر بالجين *mef* A وأقترح بأن تكون الجينات المشفرة له مشابهة لجينات *msr* A و *mre* A في المكورات الموجبة لصبغة غرام والتي تمنحها صفة المقاومة لكل من الارثرومايسين والستربتوغرامين B مضادات مجموعة MS (Giovanetti و أخرون ، 2002) . هنالك اليات أخرى لأبطال مفعول مجموعة الـ Macrolide متمثلة بالتثبيط الانزيمي Enzyme inactivation والتي تحدث عن طريق عدد من الانزيمات كل منها يظهر تأثير معين مثل محفز الانتقال Transferase والانزيم الحال Hydrolase والاستريز Esterase يشفر لهذه الالية عدد من المورثات منها *ere* A و *ere* B التي تشفر للأستريز أما الجين *mph* C فتشفر لانزيمات الفوسفوترانسفراز Phosphotransferase و جميع هذه المورثات تحمل على R-Plasmid (Meier و أخرون ، 1999) .

جدول 2-1 : جينات المثيلة rRNA methylase genes والتي تدخل في مقاومة مضادات MLS_B حسب ما أشارت اليه (Zahid ، 2007) .

Protein	Gene name	Gene (s) included	% Homology		Plasmid transposon
			DNA	Amino acid	
Erm (A)	*erm* (A)	*erm* (A)	83	81	Tn554
		erm (TR)			pAM77
Erm (B)	*erm* (B)	*erm* (AM)	98-100	98-100	Tn*1545*
		erm (AM)			pAM-1
		erm (AM)			pAM77
		erm (B)			Tn917
		erm (B)			pAD2
		erm (B)			pIP501
		erm (AMR)			
		erm (BC)			pIP1527
		erm (P)			
		erm (BP)			pIP402
		erm (IP)			pIP501
		erm (Z)			
		erm (BZ1),			Tn5398
		erm (BZ2)			
		erm			pLEM3
		erm (2)			pBT233, pMD101
Erm (C)	*erm* (C)	*erm* (C)	99-100	98-100	pE194
		erm (C)			pT48
		erm (C)			pE5
		erm (C)			pJR5
		erm (C)			pA22
		erm (C)			pSES6
		erm (C)			pSES5
		erm (C)			pSES4a
		erm (C)			pSES21
		erm (C)			J3356:pOX7
		erm (IM)			pIM13

		***erm* (M)**			**pNE131**
		***erm* (M)**			**pPV141**
		***erm* (M)**			**pPV142**
Erm (D)	***erm* (D)**	***erm* (D)**	**97-99**	**97-99**	**pBD90**
		***erm* (J)**			**pBA423**
		***erm* (K)**			
Erm (E)	***erm (E)***	***erm* (E)**	**99**	**96**	**pUC31, pIJ43**
		***erm* (E2)**			
Erm (F)	***erm* (F)**	***erm* (F)**	**98-100**	**97-100**	**pBF4**
		***erm* (F)**			**Tn4351**
		***erm* (FS)**			**pBI106, Tn4551**
		***erm* (FU)**			**Chromosomal**
Erm (G)	***erm* (G)**	***erm* (G)**	**99**	**9**	**pBD370**
		***erm* (G)**			**Tn7853**
Erm (H)	***erm* (H)**	***car (B)***			**pOJ159**
Erm (I)	***erm* (I)**	***mdm* (A)**			
Erm (N)	***erm* (N)**	***tLr* (D)**			
Erm (O)	***erm* (O)**	***Lrm***	**84**	**84**	**pLST391**
		***srm* (A)**			
Erm (Q)	***erm* (Q)**	***erm* (Q)**			**Chromosomal**
Erm (R)	***erm* (R)**	***erm* (R)**			
Erm (S)	***erm* (S)**	***erm* (SF)**	**100**	**100**	**pET23**
		***tlr* (A)**			
Erm (T)	***erm* (T)**	***erm* (GT)**			**pGT633**
Erm (U)	***erm* (U)**	***lmr* (B)**			**pPZ303**
Erm (V)	***erm* (V)**	***erm* (SV)**			
Erm (W)	***erm* (W)**	***myr* (B)**			
Erm (X)	***erm* (X)**	***erm* (CD), *erm* (A)**	**99-100**	**99-100**	**pNG2**

12-2 التحري عن جينات مقاومة الـ Macrolide بتقنية PCR

تعد تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction (PCR) أحد أهم التطورات العملية في الهندسة الوراثية ، وقد حصل مخترعه كيري ميلس على جائزة نوبل ، تستخدم هذه التقنية في تضخيم أي تسلسل قصير من ال DNA ، مثلاً جين أو قطعة جين ، ذلك لمرات عديدة بأستخدام أنزيم DNA polymerase وتعد هذه التقنية قيمة جداً في مجال تعريف الجينات و التلاعب بها ، إذ يتطلب البروتوكول القياسي لهذه الطريقة شريط قالب DNA الذي يحتوي على التتابع المطلوب تضخيمه والمتكوّن من عشرات أو عشرات الآلاف من النيوكليوتيدات ، و زوج من البوادئ primers اللتان ترتبطان بأحد أطراف تسلسل جزيئة الدنا المراد تضخيمها و بوجود أنزيم *Taq* DNA Polymerase الثابت حرارياً فضلاً عن محلول دارئ يُمثل وسطاً لإجراء أو حدوث التفاعل الذي يحتوي على القواعد النيتروجينية الأربعة dNTPs (Nicholl ، 2008) . تتم هذه العملية بثلاث خطوات: الأولى تتضمن مسخ Denaturation لشريط القالب أي فك شريطيه للسماح للبوادئ بالارتباط مع التتابع المكمل لها على شريط القالب ، أما الخطوة الثانية فتضم ارتباط البوادئ مع شريطي القالب Annealing ، والثالثة التي يطلق عليها بخطوة الاستطالة Extension والتي يبدأ من خلالها إنزيم البلمرة بإضافة القواعد النيتروجينية لشريط البادئ من النهاية 3`- OH الحرة (Sambrook و Russell ، 2001) . ثم يصار الى الكشف عن نواتج التفاعل بإستعمال أكثر من طريقة ومن أهمها و الواسعة الاستعمال هو الترحيل الهلامي Gel electrophoresis للكشف عن القطع المستهدفة و معرفة حجومها بالمقارنة مع قطع DNA معروفة الحجم و الوزن DNA ladder ، و تكون عملية الكشف و الاظهار بإستعمال صبغات أو مواد مثل بروميد الاثيديوم Ethidioum bromide والذي يعطي تألقاً عند تعريضه للضوء فوق البنفسجي Ultra violet light (الخفاجي وحسن محمود ،2013) . تمكنت تقنية PCR من إعطاء نتائج ذات دقة عالية وحساسية نوعية إذ تعد من أحد أهم التقنيات التشخيصية التي يتم من خلالها اختصار العديد من الاختبارات التقليدية منها الكشف عن جينات المقاومة لمضادات الحياة (Hallin و أخرون ، 2007) .

3. المواد و طرائق العمل Materials & Methods

3-1 المواد

جدول : 3-1-1 الاجهزة و الادوات

	أســـــــم الجـــهـاز		الشركة المصنعة (المنشـــأ)
1	موصدة	Autoclave	Arnold & Sons (USA)
2	ماصات دقيقة	Automatic micropipettes	Certyfied (Germany)
3	مجهر ضوئي مركب	Compound light microscope	Olympus (Japan)
4	منبذة	Biofuge	Hettich (Germany)
5	كاميرا رقمية	Digital camera	Sony (Japan)
6	جهاز تقطير	Distiller	GFL (Germany)
7	فرن كهربائي	Electric oven	Eriotti (Italy)
8	وحدة ترحيل كهربائي	Electrophoresis unit	Lab-net (Tiwan)
9	منبذة عالية السرعة	High speed centrifuge	Hettich (Germany)
10	حاضنة	Incubator	Memmert (Germany)
11	محرك مغناطيسي	Magnetic stirrer	Gallenkamp (England)
12	مرشحات دقيقة مختلفة الاحجام	Millipore filters	Difco (USA)
13	جهاز قياس الحموضة	pH-meter	Ino-lab. (Germany)
14	ثلاجة	Refrigerator	Concord (Lebanon)
15	حمام مائي	Water bath	Kottermann (Germany)
16	ميزان الكتروني حساس	Sensitive electronic	A& D co. (Japan)

	balance	
Himedia (India)	Standard wire loop (1µ) الناقل الزرعي القياسي	17
A & B co. (Singapore)	Thermocycler جهاز الدورات الحرارية	18
MUV (Taiwan)	UV-transilluminater مصدر الأشعة فوق البنفسجية	19
Melrosee park (USA)	Vortex mixer مازج	20
	Nano drop system	21

جدول : 3-1-2 المواد الكيميائية Chemical Materials

الشركة المصنعة (المنشأ)	المادة	ت
Biomérieux (France)	Macfarland solution محلول ثابت العكرة القياسي	1
BDH(England)	NaCl كلوريدالصوديوم	2
	NaOH هيدروكسيدالصوديوم	3
	Bromophenol Blue صبغة أزرق البروموفينول	4
	Glycerol كليسيرول	5
	Sucrose سكروز	6
	Phenol فينول	7
BDH(England)	حامض الهيدروكلوريك 37% HCl	8
	Chloroform كلوروفورم	9
	Boric acid حامض البوريك	10

11	سترات الصوديوم	Na – citrate	
12	أثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك	EDTA	
13	أسيتون	Acetone	
14	أكار– أكار	Agar-Agar	
15	مسحوق البلورات البنفسجية	Crystal violate	
16	ترس الحامضي	Tris – HCl	Fluka(Switzerland)
17	بيروكسيدالهيدروجين	H_2O_2	
18	أكاروز	Agarose	Sigma (U.S.A)
19	كحول أثيلي	Ethanol	BDH

3-1-3 المضادات المايكروبية Antimicrobial Agents

جدول (3-1-3- 1) أقراص المضادات المايكروبية Antimicrobial disks

ت	اسم المضاد	رمز المضاد	تركيزه في القرص Mg \ Disc	الشركة المصنعة والمنشأ
.1	Erythromycin	E	15	Bioanalyse (Turkey)
.2	Azithromycin	AZM	15	Bioanalyse (Turkey)
.3	Clindamycin	CL	15	Bioanalyse (Turkey)

جدول (3-1-3–2) مساحيق المضادات المايكروبية

المضاد	الشركة المصنعة والمنشأ
Erythromycin	Rospira(USA)

4-1-3 الصبغات المستخدمة

ت	أسم الصبغة	المنشأ
1	البلور البنفسجي Crystal violet	Himedia (India)
2	أيودين Iodine Gram's	
3	سفرانين Safranin	
4	صبغة برومايد الإثيديوم Ethidium Bromide	Sigma (USA)
5	صبغة الكونكوريد Congo red stain	

جدول (3-1-5) العدة المختبرية

ت	العدة المختبرية	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	عُدة Master Mix PCR وتحتوي المحاليل الكافية لإجراء 100 تفاعل كل تفاعل بحجم (25) مايكروليتر.	Bioneer (Korea)
2	DNA Ladder 100bp 135 ng \ µl	

جدول (3-1-6) مـــواد متفرقــة

	المادة	المصدر
1	عدة الفحص api 20 strep & staph	France\Biomérieux
2	أكياس الدم البشري Human Blood صنف + AB و + O	مصرف الدم – مستشفى بعقوبة العام + مستشفى بلدروز العام
3	بلازما الدم البشري Human Blood Plasma	مصرف الدم – مستشفى بعقوبة العام +

		بلدروز العام
4	بلازما دم الارنب Rbbit plasma	مستشفى بعقوبة العام

جدول (3-1-7) الأوساط الزرعية الجاهزة Ready prepared media

ت	الوسط الزرعي	الشركة المصنعة	المنشأ
1	Macconckey agar	LAB M	UK
2	Brain-Heart Infusion agar	LAB M	UK
3	Brain-Heart Infusion broth	LAB M	UK
4	Nutrient agar	LAB M	UK
5	Nutrient Broth	LAB M	UK
6	Muller Hinton agar	LAB M	UK
7	Blood agar base	Oxoid	UK
8	Mannitol Salt agar	LAB M	UK
9	Urea agar	LAB M	UK
10	Simmon ctrate agar	LAB M	UK
11	Trypticase soya agar	LAB M	UK
12	Dnase agar	Oxoid	UK

3-1-8 الإنزيمات

أستعمل في هذه الدراسة أنزيم (Proteinase K) المجهزين من شركة (Bioneer \ Korea) .

3-2 طرائق العمل

3-2-1 تحضير المحاليل :

حضرت المحاليل والكواشف والصبغات بالاعتماد على المصادر المتبعة في الدراسة ، عقمت تلك التي تحتاج الى تعقيم باستخدام جهاز الموصدة Autoclave عند درجة حرارة 121 م ولمدة 15 دقيقة وتحت ضغط 15 باوند/ انج2 بينما عقمت بقية المواد الأخرى التي تتعرض للتلف عند درجات الحرارة المرتفعة مثل اليوريا و مساحيق المضادات الحيوية بالترشيح بمرشحات دقيقة Millipore filtre بقطر 0.22 مايكروميتر ، أما المواد الزجاجية فقد عقمت بالفرن عند درجة حرارة 180مْ ولمدة ساعتين (Ryan و Ray ، 2004) .

3-2-1-1 المحاليل الخزينة الخاصة بالإختبارات الوراثية

حُضرت المحاليل الخزينة كافة حسب ما جاء في (Sambrook و Russel ، 2001 ; Stephenson ، 2003) و كالآتي :-

1. **دارئ ترس – حامض الهيدروكلوريك Tris – HCL**

حُضر هذا المحلول بتركيز 2 مولار بإذابة 31.52 غم من الترس الحامضي في 80 مـل من الماء المقطر، ثم عُدل الرقم الهيدروجين إلى 7.5 بإستعمال حامض HCL المركز و أكمل الحجـم إلى 100 مل وعُقـم بالموصدة .

2. **محلول EDTA**

حُضر هذا المحلول بتركيز 0.5 مولاري بإذابة 93.06 غم من مادة EDTA في 400 مل من الماء المقطر، ثـم ضُبط الرقم الهيدروجيني إلى 8 بإستعمال 10 NaOH عياري و أكمل الحجم الى 500 مل من الماء المقطر وعُقم بالموصدة .

3. **محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH 10N**

حُضر بإذابة 40 غم من NaOH في 80 مل من الماء المقطر ثم أكمل إلى 100 مل بالماء المقطر .

4. **محلول دارئ TE**

يتكون من 0.05 مولاري Tris-HCl و 0.005 مولار من EDTA ، إذ حُضر 100 مل منه بأخذ 2.5 مل من محلول Tris- HCl المحضر وفق الفقرة (3-2-1-1) و 1 مل من محلول EDTA المحضر وفق الفقرة (3-2-1-1) و أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر وعُقم بالموصدة وحُفظ بعدها في الثلاجة فـــي 4 مْ .

2-1-2-3 المحاليل المستعملة في عزل الدنا الكلي DNA- Extraction Solutions

أستعملت عدة أستخلاص DNA المجهزة من شركة Geneaid لأستخلاص الـ DNA البكتيري، جدول (3-8) يوضح محتويات عدة الاستخلاص .

جدول (3-8) مكونات عدة إستخلاص الدنا البكتيري

Kit Components	
1	Pellet cells solutions : - ➢ Gram + Buffer (30) ml .
2	Lyse cells solutions : - ➢ Lysozyme (110) m.g ➢ Proteinase K (1.1) m.g + 1.1 ml (ddH2O) . ➢ GT Buffer (30) ml .
3	DNA Binding : - ➢ Absolute Ethanol (25) ml . ➢ GD Columns (100) .
4	Wash ➢ W 1 Buffer (45) ml . ➢ Wash Buffer (25) ml .
5	Elution ➢ Elution Buffer (30) ml .
6	Lysozyme

3-1-2-3 الإنزيمات المستعملة

- **إنزيم Proteinase K** حضر بإذابة 11 ملغم في 1.1 مل ماء مقطر منزوع الاستقطاب ddH2O .

4-1-2-3 المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Electrophoresis solutions

1. محلول Tris- Boric acid – EDTA (TBE) 10x

يتكون المحلول من 0.089 مولار من Tris-OH ، و 0.089 مولار من حامض البوريك و 0.002 مولار من Na_2-EDTA في 800 ملي لتر من الماء المقطر ، وعدل الأس الهيدروجيني إلى 8 وأكمل الحجم إلى 1000 ملي لتر ، وعقم بالموصدة ، وحفظ في 4 مº لحين الاستعمال (Sambrook و Russel ، 2001) .

2. دارئ التحميل 6 x Loading buffer

حضر من 30% كليسيرول ، 50% TBE، 20% ماء مقطر ، 0.25% صبغة بروموفينول الازرق (Sambrook و Russel ، 2001) .

3. محلول خزين بروميد الإثيديوم Ethidium Bromide Stock Solution

حُضر بإذابة 0.05 غم من صبغة بروميد الإثيديوم في 9 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 10 مل بالماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 5 ملغم \ مل (Sambrook و Russel ، 2001) .

5-1-2-3 المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR

1. محلول PCR master mix , 1x

أستعمل PCR master mix , 1x المحضر مسبقاً والمجهز من قبل شركة (Bioneer (Korea .

1. محاليل البوادئ Primers Solutions

أختيرت البوادئ النوعية المُستهدفة لجينات *erm* A و *mef* A لبكتريا *Staphylococcus* و *Streptococcus* وفقاً لما ذكر في (Sutccliffee و أخرون ، 1996 a ; Sutcliffe و أخرون ، 1996 b ; Lim و أخرون ، 2002) و كما موضح في الجدول (3- 9) ، تم تحضير المحاليل الخزينة حسب تعليمات شركة Bioneer المُجهزة لها بإستعمال ddH2O للحصول على تركيز 100 بيكومول \ مايكروليتر .

جدول (3-9) تتابعات وتراكيز البوادىء وحجم الناتج المتوقع لكل بادئ

ت	البادئ	تتابع البادئ 5`——3`	عدد القواعد bp	حجم الناتج bp
1	*erm* A-F	5- GTT CAA GAA CAA TCA ATA CAG AG – 3	23	421
	erm A-R	5’ - GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC – 3	23	
2	*mef* A-F	5 - AGT ATC ATT AAT CAC TAG TGC – 3	21	348
	mef A-R	5 - TTC TTC TGG TAC TAA AAG TGG – 3	21	

تم تحضير محلـول كل بـادئ وبشكل منفصل بتركيز 10 بيكومول \ مايكروليتر، وذلك بأخـذ 2 مايكروليتر من المحلول الخزين لكل بادئ وإضافته إلى 18 مايكروليتر من ddH2O ومُزجه جيداً وحُفظه في الثلج لحين الإستعمال في حين حُفظت المحاليل الخزينة للبوادئ في درجة 20- مع مُراعاة مزج المحلول بعد إخراجه من الثلج بإستعمال المازج لمُجانسته قبل الإستعمال .

3-2-1-6 محاليل المضادات الحياتية Antibiotic Solutions

حضرت محاليل خزينة Stock solutions بحسب ما ورد في (Stephenson ، 2003) لمسحوق الارثرومايسين حضرت بإذابة 250 ملغم من المضاد الحيوي في 5 مل من الايثانول وأكمل الحجم الى 25 مل للحصول على تركيز 10 ملغم / مل ، حفظ بعدها بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال .

3-2-1-7 محلول كلوريد الكالسيوم CaCl2

حضر بإذابة 0.25 من كلوريد الكالسيوم في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم الى 100 مل وعقم بالترشيح باستعمال مرشحات دقيقة بقطر 0.45 مايكرومتر (Collee و أخرون ، 1996) .

3-2-1-8 محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland Standard

أُستعمل المحلول الجاهز المجهز من شركة France \ Biomérieux ، لمُعايرة عدد الخلايا البكتيرية ، و هو يعطي عدداً تقريبياً للخلايا 1.5×10^8 خلية \ مل .

3-2-1-9 محلول صبغة غرام Gram Stain

أستعملت الصبغات الجاهزة و المجهزة من شركة (Himedia \ India) وذلك لتصبيغ البكتريا وتصنيفها الى سالبة وموجبة.

3-2-1-10 المحلول الملحي الفسلجي Physiological Saline Solution

حُضر بإذابة 8.5 غم من كلوريد الصوديوم في 900 مل من الماء المقطر و أكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر، ثم عُقم بالموصدة وحُفظ في درجة حرارة4 مْ لحين الإستعمال (Collee و أخرون ، 1996) .

3-3 الكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا :

3-3-1 كاشف أنزيم الكاتاليز Catalase Reagent

حضر من خلط 1 مل من بيروكسيد الهيدروجين المركز 30 % مع 9 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 3 % بيروكسيد الهيدروجين ، وحفظ في الثلاجة في عبوة داكنة ، أستعمل للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على أنتاج أنزيم الكاتاليز (Collee و أخرون ، 1996) .

3-4 الاوساط الزرعية التركيبية Culture Media

تم تحضير الأوساط الزرعية الصلبة والسائلة كل بحسب تعليمات الشركة المصنعة وبعد ضبط الأس الهيدروجيني عقمت بوساطة الموصدة Autoclave بدرجة حرارة 121مْ ولمدة 15 دقيقة وهذه الأوساط تشمل ما يأتي :

1-4-3 وسط الدم الصلب Blood Agar Base

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة وعقم بالمؤصدة ، ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة 45ْم واضيف اليه 5% من دم الانسان . استعمل هذا الوسط لتنشيط البكتريا و لمعرفة قابلية العزلات على تحليل الدم وتحديد نوع التحلل (Baron و أخرون ، 1994).

2-4-3 وسط غراء الجوكليت Chocolate agar Medium

تم تحضيره بإضافة 5% من دم انسان طازج الى الوسط الأساس Blood agar المعقم بجهاز الموصدة والمبرد الى 80 مْ لتكسير كريات الدم الحمر وتحول الوسط الى اللون البني . أستعمل الوسط لتنشيط نمو *Streptococcus* spp (Finegold[a] و Baron ، 1990) .

3-4-3 وسط الكونكوريد أكار Congo-Red agar

يتكون وسط C . R . A من 37 غم وسط نقيع القلب والدماغ المغذي Brain heart infusion broth و 50 غم من السكروز Sucroce و 10 غم من أكار- أكار Agar-Agar و 0.8 غم من صبغة الكونكوريد Congo-red stain ، حيث تلك أذيبت المواد في 900 مل من الماء المقطر ما عدا صبغة الكونكوريد وعقم الوسط بالموصدة ، أما صبغة الكونكوريد فقد أذيبت في 100 مل من الماء المقطر وعقمت بالموصدة وبعدها أضيفت الى الوسط بعد تبريده الى 55 مْ وصبت في أطباق معقمة , هذا الوسط يستخدم للكشف عن قابلية البكتريا في أنتاج الطبقة المخاطية Slime layer و تكوين الغشاء الحيوي Biofilm (Freeman و أخرون ، 1989).

4-4-3 وسط انتاج البروتيز Protease Production

حضرت الاوساط Trypticase Soya Agar و Nutrient Agar حسب تعليمات الشركة المصنعة . حيث أضيف 1.5% من حليب خال من الدسم Skim – Milk الى وسط Trypticase Soya Agar وعقم بالموصدة بدرجة 121مْ لمدة 5 دقائق وحفظ في الثلاجة بعدها صب في أطباق معقمة حيث أستخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة بكتريا . *Streptococcus* spp على أنتاج انزيم البروتيز , أما بالنسبة لجنس *Staphylococcus* spp أضيف 12.5 مل من الحليب المقشوط الخالي الدسم الى وسط Nutrient agar وأكمل الحجم الى 100 مل ثم صب في أطباق معقمة ، أستخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة *Staphylococcus* spp على أنتاج أنزيم البروتيز (Straus و أخرون ، 1980 ; Collee و أخرون ،1996).

5-4-3 وسط أجار صفار البيض Egg-yolk agar

حضر هذا الوسط أستناداً الى (Collee و أخرون ،1996) من خلال إضافة 15 مل من صفار البيض الى 85 مل من الأكار المغذي المعقم بالموصدة و المبرد الى 50 °م بحيث يكمل الحجم الى 100 مل يمزجان معاً و يصب في أطباق . يستخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة العزلات المعنية بالدراسة على أنتاج أنزيم اللايبيز Lipase .

6-4-3 وسط أنتاج الستافيلوكاينيز Staphylokinase Production

حضر وسط أستهلاك الكازائين Casein hydrolytic assay بإضافة 2 مل من مصل الدم البشري Serum الى 98 مل وسط الحليب المقشوط Skim – Milk Agar المحضر في الفقرة (4.3.2.3) ليكمل الحجم الى 100 مل بعدها يصب في أطباق معقمة ، يستخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة *Staphylococcus* spp. على أنتاج أنزيم الستافيلوكاينيز (Rajamohan و أخرون ، 2000) .

7-4-3 الحفظ على مائل الأكار Slant agar

بعد التشخيص لقحت العزلات البكتيرية على وسط الأكار المغذي Nutrient agar المحضر بشكل مائل وبطريقة التخطيط ، وحضنت بدرجة 37 م ° لمدة 24 ساعة ، ثم حفظت بدرجة 4 م° للاستعمال اليومي ، ويتم تجديد العزلات بشكل دوري شهرياً، وذلك بتنشيطها على وسط أكار الدم أو وسط نقيع القلب و الدماغ ثم إعادة زرعها على وسط مائل جديد لضمان بقاء العزلات بشكل نشط طيلة مدة الدراسة (Burnett و Crocker ، 2005) .

8-4-3 الحفظ في الكليسيرول 20%

حضرت أنابيب صغيرة تحوي 0.5 مللتر من 40% كليسيرول معقم، وأضيف له حجم مماثل من المزروع البكتيري المنمى على وسط المرق المغذي للحصول على تركيز نهائي للكليسيرول 20% ، وحضنت الأنابيب بدرجة 37 م ° لمدة 24 ساعة بعدها حفظت الأنابيب بدرجة -20 م ° لحين الاستعمال (Burnett و Crocker ، 2005) .

5.3 جمع العينات Collection of Samples

جمعت 200 عينة من المرضى الراقدين في مستشفيات (بعقوبة العام ، البتول التعليمي ، بلدروز العام) بالاضافة الى بعض المراكز الصحية خلال الفترة من 1 \ 9 \ 2013 لغاية 1 \ 1 \ 2014) . جمعت العينات تحت أشراف طبيب مختص وتم سؤال المريض في حالة تناوله لمضادات الحياة بعدها أخذت العينات تبعاً لنوع الاصابة فقد أستخدمت المسحات المباشرة في جمع عينات الجروح والحروق والالتهابات الجلدية ،

في حين جمعت عينات القشع ، الادرار ، الدم من أصابات كل من جهاز التنفس والجهاز البولي وجهاز الدوران على التوالي ، في قناني و أنابيب اختبار معقمة.

6-3 زرع العينات Samples culture

زرعت عينات (الجروح و القشع و الادرار و مسحات البلعوم و الاذن الوسطى و المسحات المهبلية بشكل فوري على وسط أكار الدم و وسط أكار الماكونكي ، وتم تنقية العزلات على وسط أكار الدم و المانيتول الملحي بطريقة التخطيط وحضنت كافة الاطباق هوائياً بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ، أجري بعدها عدد من الفحوصات التشخيصية المظهرية والكيموحيوية للبكتريا المعنية بالدراسة . أما عينات الدم فجمعت بسحب 5 مل من دم المريض وزرعت مباشرة في قناني تحوي 50 مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل وحضنت عند درجة حرارة 37ْم لمدة 24 ساعة ، أعيد زرعها بأخذ 0.1 مل من المزرعة ونشرها على وسط الدم الصلب وحضنت عند درجة حرارة 37ْم لمدة 24 ساعة (Macfaddin ، 2000) .

7-3 تشخيص البكتريا Dignosis of Bacteria

شخصت العزلات المستحصل عليها إعتماداً على على وفق الاسس الاتية :-

1-7-3 الخصائص المظهرية Morphological Characteristics

درست الصفات المظهرية للعزلات على وسطي الأكار المغذي وأكار الدم من حيث شكل المستعمرة ، و الحجم ، واللون ، والحواف ، والعتمة ، والقوام وغيرها. كما درست الصفات المظهرية للخلايا بعمل مسحات جافة للفحص المجهري المباشر لملاحظة شكل الخلايا وانتظامها وتفاعلها مع صبغة كرام .

2-7-3 الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests

قبل إجراء الاختبارات نشطت البكتريا على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب و وسط أكار الدم . أعتمدت الاختبارات التشخيصية الواردة في (Forbes و أخرون ، 2007) لتشخيص العزلات الى مستوى النوع و هي التي شملت ما يأتي :

- **اختبار الكاتاليز Catalase Test**

نقل جزء من المستعمرة بعمر 18-24 ساعة من وسط الأكارالمغذي المحضر على وفق الفقرة (3-4) الى شريحة زجاجية نظيفة وجافة واضيف اليها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3 % المحضر وفق الفقرة (3-3-1) أن ظهور فقاعات هوائية يعد دليلا ايجابياً على قابلية العزلات على أنتاج أنزيم الكاتاليز .

- **أختبار أنتاج أنزيم مخثر بلازما الدم Coagulase Test**

أجري هذا الفحص بطريقتين :

1. أختبار انزيم مخثر بلازما الدم المرتبط (الشريحة) Slide Coagulase Test

أتبعت طريقة (Baron و أخرون ، 1994) للتحري عن أنزيم تخثرالبلازما Coagulase بإضافة قطرة من المحلول الفسيولوجي المحضر على وفق الفقرة (3-2-1- 10) الى شريحة زجاجية نظيفة ومزج معه قليل من المستعمرات البكتيرية بعروة ناقل loop full بعمر 18 ساعة المنماة على وسط المانيتول الملحي المحضر وفق الفقرة (3-4) ، وبعد حصول مستحلب للمزروع أضيف اليه بلازما دم الارنب Rbbit plasma وحركت الشريحة بلطف وقرأت النتيجة بعد 10 ثوان . إن تكون تكتلات واضحة للعين المجردة دليلاً على النتيجة الموجبة المتمثلة بإنتاج أنزيم مخثر بلازما الدم المرتبط .

2. أختبار انزيم مخثر بلازما الدم الحر(الانبوب) Tube Coagulase Test

تم الاختبار بتلقيح مستعمرة بكتيرية بأنابيب حاوية 1مليلتر من بلازما دم الانسان المخفف بالمحلول الفسيولوجي المحضر على وفق الفقرة (3-2-1-10) بنسبة 6:1 حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 مº ولمدة 24 ساعة ثم فحصت مرة ثانية ، أن التكتل دليل على ايجابية الاختبار .

- **أختبار القابلية على انتاج الانزيم المحلل للدنا DNase Test**

تم تلقيح المستعمرة البكتيرية على وسط DNase Agar المحضر على وفق الفقرة (3-4) على شكل حلقة صغيرة للحصول على نمو غزير بحيث يكون قطرها (5-10) مليمتر . حضنت الاطباق بدرجة 37 م º لمدة 24 ساعة ثم اضيف اليها 1 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك بتركيز 3.6% . قرأت النتيجة بعد دقائق قليلة بوضع الطبق على ورقة معتمة. أن ظهور هالة شفافة حول المستعمرة دليل على النتيجة الموجبة .

- **أختبار أنتاج أنزيم اليوريز Urease Test**

زرعت البكتريا تحت الاختبار بطريقة التخطيط على وسط أكار اليوريا المحضر في الفقرة (3-4) ، حضنت عند درجة 37 مْ لمدة 24-48 ساعة ، ظهور اللون الوردي دل على النتيجة الموجبة .

- **إختبار استهلاك السترات Citrate Utilization test**

زرعت العزلات على مائل وسط سايمون- ستريت المحضر في الفقرة (3-4) حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، تعد النتيجة موجبة عند تحول لون الوسط من الاخضر الى الازرق لأستهلاك السترات .

- **أختبار النمو في وسط أكار المانيتول الملحي Mannitol salt agar**

تم تلقيح المستعمرة البكتيرية على وسط أكار المانيتول الملحي المحضر في الفقرة (3-4) ، حضنت الاطباق بدرجة 37 م° لمدة 24- 48 ساعة ، النتيجة موجبة عند ظهور هالة صفراء حول النمو البكتيري وهذا يدل على قابلية البكتريا على تخمير سكر المانيتول في حين عدت النتيجة سالبة عند ظهور نمو جرثومي دون تغير لون الوسط ويعد وسط Mannitol Salt agar وسطاً تشخيصياً وأنتخابياً Selective media وهو خاص لعزل *Staph . aureus* .

- **Bacitracin and Optochin Sensitivity Test**

أستخدم هذا الاختبار لتفريق *S.pyogens* و *S.pnumonia* عن المجاميع الأخرى ، أخذت من1-5 مستعمرات من البكتريا و خططت على طبق غراء الدم المحضر في الفقرة (3-4) ، حضنت من 18-24 ساعة وبعدها تم أخذ مستعمرة نقية و زرعت على طبق مولر هينتون المضاف إليه 5% من دم الانسان الطازج نوع AB و وضع قرص Bacitracin و Optochin في الطبق وبعد الحضن لمدة 18-24 ساعة في درجة حرارة 37 م° قرِئت النتائج التي تعتمد على منطقة التثبيط حول القرص (Macfaddin ، 2000) .

- **أختبار مقاومة مضاد النوفوبايوسين Novobiocin Resistance Test**

تم أجراء هذا الفحص بزرع العالق البكتيري بعد مقارنته مع محلول ماكفرلاند 0.5 على وسط مولر-هنتون الصلب ، وأستخدمت اقراص النوفوبايوسين 30 مايكروغرام/ قرص ، أذ تعد بكتريا *S. saprophyticus* مقاومة لهذا المضاد لذلك يمكن تمييز هذا النوع عن بقية أنواع *Staphylococci* التي تعد حساسة لهذا المضاد (Macfaddin ، 2000) .

3-7-3 التشخيص بأستخدام نظام API 20

فحص API 20 Strep & Staph

يتألف هذا النظام من شريط حاوٍ على ركائز فحص مجففة Dehydrate substrates test في أنابيب دقيقه مفردة Individual Microtubes إذ يعاد تعليقه Reconstitution من خلال إضافة كمية مناسبة من وسط نظام التشخيص .medium API 20 Strep & Staph الذي سبق وأن لقح بالبكتريا المراد دراستها بعد حضن الشريط لمدة 4 ساعات وبدرجة حرارة 37 م ° تضاف الكواشف الاتية :

- VPI reagent
- VP2 reagent
- NIN reagent
- ZYMA reagent
- ZYMB reagent

وبعد 10 دقائق تقرأ النتائج ثم تحضن لمدة 24 ساعة في درجة الحرارة نفسها وتقرأ النتائج مرة أخرى بالاعتماد على Analytical profile Index ليتسنى لنا معرفة هوية العزلة البكتيرية .

3-8التحري عن بعض عوامل الضراوة

Detection of virulence factors

3-8-1 أختبار انتاج الهيمولايسين Hemolysin Production Test

خطط المزروع البكتيري المراد فحص قابليته على أنتاج الهيمولايسين على وسط أكار الدم المحضر على وفق الفقرة (3-4-1) وحضن بدرجة حرارة 37 م º لمدة 24 ساعة . أن النتيجة الموجبة تكون بوجود تحلل حول المستعمرات النامية .

3-8-2 التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الستربتوكاينيز

أخذ ملى الناقل من مزروع بعمر 18 ساعة نامي في وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم واستعمل لتلقيح 10 مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة بعدها أخذ 0.1 مل من الأخير واستعمل لتلقيح 10 مل من الوسط نفسه وحضن بالظروف نفسها ثم نقل 0.5 مل من المزروع المنشط وأضيف إلى أنبوبة اختبار معقمة حاوية على 0.2 مل من البلازما البشري و 0.8 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي و0.25 مل من محلول كلوريد الكالسيوم وحضن عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة وقورن مع أنبوبة السيطرة الحاوية على 0.5 مل من الوسط المعقم والمعاملة تحت نفس الظروف.النتيجة الموجبة تكون بعدم تكون خثرة في أنبوبة الاختبار مقارنة مع أنبوبة السيطرة (Cruickshank و أخرون ،1975) .

3-8-3 الكشف عن أنتاج الستافيلوكاينيز Staphylokinase Production

لقحت عزلات *Staphylococcus* على الوسط المذكور في الفقرة (3-4-6) و حضنت الاوساط بدرجة حرارة 37 م° و لمدة 24 ساعة وسجلت النتيجة الموجبة بتوافر تحلل حول المستعمرات البكتيرية النامية (Rajamohan و أخرون ،2000) .

3-8-4 الكشف عن قدرة *Streptococcus* على أنتاج البروتييز

لقحت السلالات قيد الدراسة على وسط Trypticase Soya Agar و المذكور حسب الفقرة (3-4-4) ، وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة ساعة 24 وسجلت النتيجة الموجبة بوجود التحلل حول المستعمرات ولم تعد النتيجة سالبة الا بعد أسبوعين من التلقيح (Straus و أخرون ،1980) .

5-8-3 الكشف عن قدرة *Staphylococcus* على أنتاج البروتييز

أخذ ملى ناقل من مزروع *Staphylococcus* المنشط حديثاً و بعمر 24 ساعة وأستعمل لتلقيح وسط Skime – Milk – Agar المحضر وفق الفقرة (3-4-4) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م ° لمدة 24 ساعة بعدها تقرأ النتائج حيث تكون موجبة في حالة وجود تحلل يحيط بالمستعمرات البكتيرية النامية ، وسالبة في حالة عدم وجو تحلل (Collee و أخرون ،1996) .

6-8-3 الكشف عن أنتاج اللايبيز Detection of lipase production

لقحت السلالات قيد الدراسة على وسط Egg-yolk agar والمذكور في الفقرة (3-4-5) وحضنت بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24ساعة ، ظهور تحلل حول المستعمرات دل على النتيجة الموجبة (Collee و أخرون ، 1996) .

7-8-3 إختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm

طريقة أحمر الكونغو Congo red agar

نقلت مستعمرة مفردة نقية على وسط أكار الدم و و وسط نقيع القلب و الدماغ الى أنبوبة اختبار حاوية على 5 مل من محلول الملح الفسلجي المحظر في الفقرة (3-2-1-10) وبعد المزج الجيد بوساطة المازج قورنت عكورته بعكورة ماكفرلاند . 0.5 لقح وسط الكونكوريد المحظر في الفقرة (3-4-3) وحضنت الاطباق في درجة حرارة 37 م ° ولمدة 24 -48 ساعة ، النتيجة موجبة عندما تظهر المستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة أما النتيجة السالبة فتبقى المستعمرات وردية اللون (Mathur و أخرون ، 2006) .

9.3 اختبار حساسية العزلات لمضادات الحياة Antibiotics Sensitivity Test

استخدمت طريقة Bauer and Kerby القياسية لاختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية (Vandepitte[a] و أخرون ،1991) و كالأتي :

1. لقح 5 مل من وسط المرق المغذي بـ 2-3 مستعمرات من مزارع بكتيرية نقية بعمر 24 ساعة.
2. رجت الانابيب جيدا و حضنت بالحاضنة 37 م لمدة 24 ساعة .
3. قورنت عكورة النمو بعكورة المحلول ثابت العكرة القياسي Macfarland solution .
4. نقل 0.1 مل من العالق البكتيري, ونشر على وسط أكار مولر هنتون المضاف إليه 5%من الدم لكي يكون مناسباً للنمو في حالة *S.pyogenes* و أكار مولر هنتون الاساس للنمو في حالة *Staphylococcus* و ترك الطبق لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لحين جفاف المزروع .
5. نقلت أقراص المضادات الحيوية الى سطح الوسط الزرعي بوساطة ملقط معقم بمعدل 6-7 أقراص لكل طبق . حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 18-24 ساعة ، وبعدها قيست أقطار مناطق التثبيط حول كل

قرص عدت البكتريا حساسة S أو مقاومة R أو متوسطة I حسب المواصفات القياسية الواردة في CLSI ، 2012 و كما موضح في الجدول (3-10) .

الجدول (3-10) : أقطار منطقة التثبيط القياسية لأقراص مضادات الحياة المستعملة .

أقراص مضادات الحياة	الرمز	التركيز مايكروغرام/قرص	أقطار منطقة التثبيط بالمليمتر		
			حساسة	متوسطة	مقاومة
Clindamycin	DA	2	>21	15-20	<14
Novabiocin	NV	30	>21	15-20	<14
Erythromycin	E	10	>23	14-22	13
Azithromycin	AZI	10	>23	14-22	13

10.3 أختبار مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية بطريقة النمو في الوسط الصلب

حضر وسط أنتخابي مكون من مولر – هنتون الصلب و مضاد الارثرومايسين . عقم الوسط بالموصدة وبرد لدرجة حرارة 50 مْ وأضيف محلول مضاد الارثرومايسين وبتركيز 1 ملغم \ 100 مول ، ثم صب في أطباق معقمة وترك ليتصلب , بعدها زرعت البكتريا بطريقة Picking and patching وحضنت عند درجة حرارة 37 مº لمدة 24 ساعة تعد النتيجة موجبة في حالة ظهور نمو في الوسط المعلم بالارثرمايسين (CLSI ، 2012) .

11-3 قياس التركيز المثبط الادنى Minimal - Inhibitory Concentration

أستخدمت طريقة التخافيف المضاعفة المتسلسلة Two Fold Dilution Method لحساب التركيز المثبط الادنى لعدد من المضادات الحياتية إعتماداً على ما ورد في Stock و Ridgway ، (1987) وكما يلي :

1. حضرت تراكيز متسلسلة متضاعفة تراوحت بين 1024-512-256-128-64-32-16-4-2-1-0.5 مايكروغرام/ مل لمضاد الارثرومايسين بإضافة نسب مختلفة من هذه المضادات من محاليلها الخزينة المحضرة في (3-2-8) الى وسط أكار مولر- هنتون المعقم والمبرد الى 45 مº .

2. حضرت التخافيف العشرية وأختير التخفيف 10^{-2} لمزارع البكتريا بعمر 24 ساعة بإستعمال المحلول المحلي الفسلجي المعقم .
3. سحب 5 مايكروليتر من التخفيف أعلاه بوساطة ماصة دقيقة كلا على حدة ، ولقحت كقطرة واحدة على أوساط المضادات .
4. كررت العملية للمزارع كافة بالتسلسل مكررين للتركيز الواحد، وتركت الاطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لحين جفاف القطرات قبل قلب الاطباق ، حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .
5. أحتسب التركيز المثبط الادنى بأنه اقل تركيز يمنع ظهور النمو البكتيري بعد حضانة 18-24 ساعة بدرجة حرارة 37 م °.

تم مقارنة النتائج مع نقطة التوقف Break point ويمثل أقل تركيز يمكن أن يصله المضاد في المصل ليعطي أعلى فعالية وبعده يصبح مقاوماً .

12-3 أستخلاص الدنا البكتيري Bacterial DNA extraction

تم عزل الدنا البكتيري حسب تعليمات شركة Geneaid وكالآتي :-

1. نقل 1 مل من مزروع العزلات البكتيرية المنماه بعمر 24 ساعة الى انابيب أبيندروف 1.5 مل
2. طردت الانابيب مركزياً لمدة دقيقة بسرعة 14000 دوره / دقيقة ، بعدها أهمل الطافي .
3. أضيف 200 مايكروليتر من دارىء GB وخلطت المحتويات جيداً لمدة 5 ثوان .
4. أعيد تعليق راسب الخلايا بإضافة 200 مايكروليتر من اللايسوزايم Lysozyme المحضر في الفقرة (3.1.2.3) ورجت الانابيب جيداً .
5. وضعت الانبوبة مع الانزيم داخل حمام مائي Water bath لمدة نصف ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ و قلب الانابيب ثلاث مرات في أثناء فترة الحضن .
6. أضيف 20 مايكروليتر من أنزيم Proteinase K ثم مزجا بوساطة المازج Vortex .
7. أضيف 200 مايكروليتر أيثانول مطلق Absolute ethanol ثم خلط المزيج بقوة .
8. تم وضع عامود GD في انبوبة الجمع Collection tube سعة 2 مل ونقل له جميع الخليط .
9. طردت الانابيب مركزياً لمدة دقيقتين بسرعة 16000 دورة / دقيقة بعدها نقل المحتويات الى أنبوبة جمع جديدة .
10. أضيفت 400 مايكروليتر من دارىءW1 الى عمود GD
11. طردت الانابيب مركزياً بسرعة 16000 دورة / 30 ثانية ثم وضع عمود GD في أنبوبة الجمع.
12. أضيف 600 مايكروليتر من دارىء Wash buffer الى عمود GD.

13. أجري الطرد المركزي 16000 دورة / 30 ثانية .
14. أعيد الطرد المركزي لمدة ثلاث دقائق بسرعة 16000 دوره / دقيقة لتجفيف العمود
15. نقل العمود GD الى أنبوبة ابيندروف نظيفة 1.5مل .
16. أضيف 100مايكوليتر من دارىء Elution المسخن مسبقاً ثم طردت الانابيب مركزياً لمدة 30 ثانية بسرعة 16000 دورة / دقيقة .

13-3 الترحيل الكهربائي في الهلام Gel Electrophoresis

أُجري الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص حسب ماجاء في (Sambrook و Russell ، 2001) بإستعمال المحاليل المحضرة وفق الفقرة (3-2-1-10) وكالاتي :

حُضر هلام الأكاروز بتركيز 1 % باذابة 1 غم من الأكاروز في 100 مل من محلول 10 x TBE بعد تخفيفه 10 مرات للحصول على 1x TBE، سُخن الأكاروز إلى درجة الغليان وتُرك ليبرد إلى درجة حرارة 45 مْ ، ثم أُضيفت إليه صبغة بروميد الإثيديوم بتركيز نهائي 0.5 مايكروغرام \ مل بإستعمال المحلول الخزين المحضر لهذه الصبغة بعدها مُزج الأكاروز جيدا . تم إعداد صفيحة لإسناد الأكاروز Tray بإحاطة حافاتها بشريط لاصق وبشكل جيد ، ثم ثُبت المشط Comb لتكوين الحفر Wells المُعدة لتحميل العينات ثم صُبّ الأكاروز بشكل هادىء ومستمر لتجنب حدوث فقاعات هوائية ، بعدها تُرك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، رُفِع المشط بهدوء ونُزِع الشريط اللاصق . بعدها نُقِل الهلام مع القالب إلى حوض الترحيل الحاوي على حجم مناسب يغطي الهلام من 1x TBE ثم حُملت العينات المُعدة للترحيل بعد خلطها مع 3 مايكروليتر من دارىء التحميل 6x بإستعمال ماصة دقيقة Micropipette . بعدها تم إجراء عملية الترحيل الكهربائي بفرق جهد مقداره 80 فولت \سم لمدة 45 دقيقة حتى وصول العينات إلى ما قبل نهاية الهلام ، بعد الإنتهاء من عملية الترحيل نُقِل القالب لفحص الهلام بتعريضه إلى مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator عند طول موجي 320 نانوميتر .

14-3 تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

تم فحص العزلات المقاومة لمجموعة الـ Macrolide بطريقة فحص الحساسية التقليدي Antibiotics sensitivity ومن خلال النمو في الوسط الزرعي الصلب المضاف اليه المضاد الحيوي الارثرومايسين بالاضافة الى الكشف عن قيمة MIC ، بعدها تم أختيار العزلات المقاومة لمضادات صنف الـ Macrolide للتحري عن وجود جينات تشفر لمقاومة مركبات هذه العائلة . تم الكشف عن الجينات *erm* A و *mef* A بأستخدام تقنية PCR وبأتباع الخطوات الاتية :

1. تحضير العينات Sample preparation

حضر 20 مايكرولتر من قطع الدنا المستخلص في الفقرة (3-12) والذي سوف يضاعف بأستخدام تقنية PCR . جدول (3- 11) يوضح المكونات اللازمة لتضعيف الجينين بتقنية PCR .

2. تحضير مزيج سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة

PCR Master mixture preparation

حضر مزيج الـ PCR حسب ما جاء في تعليمات الشركة المصنعة Bioneer \ Korea وبالخطوات الآتية :

آ- ذوب المزيج الرئيس الأخضر بتعريضه لدرجة حرارة الغرفة ، ثم وضعه في المنبذة لكي تتجمع المكونات في قعر الأنبوب.

ب- أعد مزيج التفاعل بالحجم المطلوب الذي يتلائم مع نوع التفاعل .

جدول : 3-11 المكونات اللازمة للتفاعل التضاعفي لكل من الجينين *erm* A و *mef* A .

ت	المكونات	التركيزالنهائي	حجم خليط التفاعل لأنبوبة واحدة(مايكروليتر)
1	محلول PCR Master Mix,2x	1x	12.5
2	البادئ الأمامي 10*	1*	2.5
3	البادئ الخلفي 10*	1*	2.5
4	قالب الدنا	10 ng \ ml	2.5
5	ماء مقطر معقم		5
الحجم النهائي			25

ج- تم نبذ مكونات المزيج في المنبذة مدة قدرها 5 ثواني .

- **برمجة جهاز PCR The cycling reactions program**

تم إجراء خطوات التضاعف للتحري عن الجينات *erm*A و *mef*A حسب ماجاء في (Sutccliffee و أخرون ، 1996 ; Sutcliffe a و أخرون ، 1996 ; Lim و أخرون ، 2002) مع إجراء بعض التحويرات ثم تمت برمجة جهاز PCR كما موضح في الجدول (3 - 12) :

1. المسخ Denaturation

تحدث عملية أنصهار شريط DNA عند درجة حرارة 93 مْ للجين *mef*A و 95 مº بالنسبة للجين *erm*A . حيث ينفصل شريطا DNA ضمن ذلك المدى الحراري و تتوقف كل التفاعلات الانزيمية عند تلك الدرجات .

2. الارتباط Annealing

ترتبط اشرطة DNA المزدوجة مع البوادئ primers بوساطة الاواصر الهيدروجينية بين القواعد . خفظت درجة الحرارة الى 52 مْ بالنسبة للجين *mef* A و 54 مْ للجين *erm* A .

3. الامتداد Elongation

يحدث الامتداد عند درجة حرارة 72 مº ، تعد هذه الدرجة بمثابة المثلى لانزيم*Taq* polymerase وذلك بأرتباطه الى البوادئ مع القالب Tamplet و أضافة النيوكليوتيدات الى البادئ بأملاء من الشريط القالب بعد أن يكونا قد ارتبط بشكل قوي و أطالة الشريط متجهاً بعيداً عن البادئ .

الجدول (3-12) برمجة جهاز P.C.R

Type of genes	PCR Conditions Temperature / Minute								
	Denaturation				Annealing		DNA-extension		Expected size of products (bp)
	One cycle		35 cycles						
	°C	Min	°C	Min	°C	Min	°C	Min	
Mef (A)	93	3	93	3s	52	1	72	5	348
erm (A)	95	5	95	30s	54	1	72	5	421

* نُقل بعد ذلك (10) مايكروليتر من ناتج التضاعف للترحيل الكهربائي .
* حُفظ المتبقي من نواتج التضاعف في درجة (- 20) مْ .

الاستنتاجات

1. كانت نسبة عزلات *S.aureus* هي السائدة بين *Staphylococcus* spp. و عزلات *S.pyogens* هي السائدة بين *Streptococcus* spp. .
2. وجود أرتباط بين مقاومة المضادات قيد الدراسة و عوامل الضراوة المنتجة من قبل *Staphylococcus* spp. و *Streptococcus* spp. .
3. حساسية غالبية العزلات قيد الدراسة للكلندامايسين بينما أظهرت مقاومة عالية لمضادي الارثرومايسين والازيثرومايسين .
4. أمتلاك غالبية العزلات للجين *erm* A المشفر لألية تغيير موقع الهدف للمضاد الحيوي
5. أمتلاك غالبية العزلات للجين *mef* A المشفرة لألية مضخة الدفق Efflux pump .
6. لوحظ هناك تقارب بين نتائج الفحص المظهري لحساسية العزلات لمضادات الـ Macrolide و طريقة لفحص الجزيئي بأستخدام تقنية PCR للجينين المشفرين لمقاومة الـ Macrolide .

التوصيات

1. أجراء دراسات جزيئية عن مقاومة الـ Macrolide للأنواع الاخرى التابعة لـ *Staphylococcus* spp. و *Streptococcus* spp وخصوصاً سلالات MRSA مع تحديد تتابعات DNA للجينات القافزه المسؤولة عن مقاومة عناصر الـ Macrolide .
2. أجراء دراسات جزيئية بأستعمال تقنية الـ PCR للتحري عن الجينات المشفرة لمقاومة مركبات MLSB .
3. أجراء دراسات مسحية دورية في المستشفيات لمتابعة مستوى التلوث المايكروبي وتحديد مصادره والتغيرات الوراثية الحاصلة على البكتريا وخاصة مقاومتها للمضادات الحيوية .

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1 عزل *Staphylococcus spp.* و *Streptococcus spp* و تشخيصها

Isolation and identification of Staphylococcus spp. and *Streptococcus spp*

4-1-1 العزل Isolation

بلغ العدد الاجمالي للعينات 200 عينة ، أظهرت 75 عينة وبنسبة (37.5%) نموا سالبا للزرع البكتيري و 125عينة (62.5%) نمواً موجباً للزرع البكتيري عزلت منها 40 عزلة تعود للجنسين *Staphylococcus spp.* و *Streptococcus spp* جمعت من مصادر سريرية مختلفة شملت (الادرار، والدم ، ومسحات الأذن الوسطى ، والقشع ، والجروح ، و مسحات مهبلية) ، شكل 4-1 . وتوزعت العزلات على وفق ما ذكر في الجدول (4 -1) . جمعت العينات والمسحات من مستشفيات بعقوبة العام والبتول التعليمي و بلدروز العام بالاضافة الى بعض المراكز الصحية للمدة من 1 \ 9 \ 2013 لغاية 1 \ 1 \ 2014 .

جدول 4-1 : النسبة المئوية للعزلات الموجبة لصبغة غرام المعزولة من مصادر سريرية مختلفة .

مصدر العزل	عدد العزلات الكلية	العزلات الموجبة لصبغة غرام	النسبة المئوية %
الادرار	71	9	12.6
الجروح	16	6	37.5
الدم	15	5	33.3
مسحات الاذن	36	4	11.1
البلعوم	25	12	48
مسحات مهبلية	3	1	33.3
القشع	34	3	8.8
المجموع الكلي	200	40	100

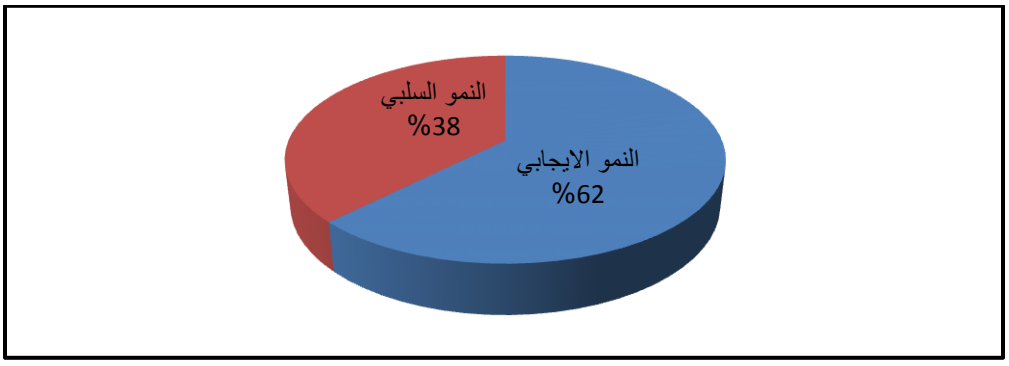
جمعت العينات والمسحات من مصادر مختلفة لغرض معرفة بؤر التــلوث ب *Staphylococcus spp.* و *Streptococcus spp* و معرفة المدى الأمراضي لهذه البكتريا ودورها في الاخماج المكتسبة من المستشفيات ، والتحري عن مقاومتها لمضادات الـ Macrolide وما يترتب على ذلك من إجراءات تشخيصية ووقائية وعلاجية . تم تشخيص العزلات البكتيرية إعتماداً على الصفات المجهرية للمستعمرات و الصفات المزرعية للخلايا البكتيرية و تم بعد ذلك تشخيصها حتى الجنس و النوع بأتباع الفحوصات الكيموحيوية الخاصة بها و المبينة في الجدول (4-2) فيما بتعلق بالجنس *Staphylococcus spp.* زرعت المسحات في وسط الدم الصلب Blood agar base للحصول على مستعمرات نموذجية ، وكانت المستعمرات ناعمة ، مرتفعة قليلاً ، لامعة ، وتتراوح أقطارها بين 1-3 مليمتر ، ثم زرعت المستعمرات النامية على وسط المانيتول الملحي الصلب ، إذ ظهرت بشكل دائري أملس الحواف مرتفعة قليلاً على سطــح الوســط ، يعد هذا الوسط من الاوساط الاختيارية والتفريقية بين بكتريا *S.aureus* القادرة على تخمير سكر المانيتول والنمو بتركيز ملحي عالٍ يقارب 7.5% عن بقية *Staphylococci* الغير قادرة على تخمير المانيتول . أظهرت نتائج الفحص المجهري أن خلايا البكتريا المعزولة كروية الشكل ، عنقودية الترتيب ، موجبة لصبغة غرام ، غير مكونة للسبورات . كما و أظهرت الفحوصات الكيموحيوية فحصاً سالباً للاوكسيديز وموجباً للكاتاليز ، وسالبة لأنتاج السترات ، أجري إختبار أنتــاج أنزيم مخثر البلازما Coagulase بنوعيه ، وأنزيم محلل الحامــض النووي Dnase و أختبار أنتاج انزيم حال الدم Hemolysin من خلال ملاحظة مناطق التحلل المحيطة بالمستعمرات البكتيرية وبـنوعية الفا وبيتا ، أستخدمت تلك الفحوصات لتمييز بكتريا *S.aureus* عن بقية أنواع *Staphylococci* ، و أستخدم أيضاً وسط النوفوبايوسين Novobiocin disc لتميز بكتريا *Staph. Saprophyticus* والتي تعد مقاومة له بينما تعد بقية أنواع المكورات حساسة لهذا الوسط ، جدول (4 - 2) يوضح الفحوصات الكيموحيوية المتبعة لتشخيص *Staphylococci* . أما بكتريا *Streptococcus spp.* فقد شخصت تشخيصا أوليا بالاعتماد على صفاتها الزرعية والمجهرية ، إذ كانت مستعمراتها صغيرة الحجم بقطر 0.5 ملم بيضاء- رمادية اللون دائرية الشكل وذات تحدب قليل ، وأظهر الفحص المجهري للعزلات بان الخلايا كروية الشكل موجبة لصبغة غرام ومرتبة بشكل سلاسل Chains ، كما أظهرت نتائج الاختبارات الاولية التشخيصية أن العزلات جميعها أعطت نتيجة سالبة لفحص الكاتاليز و الاوكسيديز كما و أستخدمت اقراص الباستراسين Bacitracin والاوبتوكين Optochin للتميز بين أنواع Streptococci ، جدول (4 - 3) يوضح الفحوص الكيموحيوية لتمييز Streptococci .

جدول 4 - 2 : الاختبارات الكيموحيوية لـ Staphylococci

نوع الاختبار	عدد البكتريا الموجبة للفحص	عدد البكتريا السالبة للفحص
صبغة غرام Gram stain	40	0
اختبار الكتاليز Catalase test	31	0
اختبار الأوكسيديز Oxidase test	0	0
اختبار مخثر البلازما الحر Couagulase	20	11
اختبار مخثر البلازما المرتبط (عامل التكتل)	20	11
اختبار محلل الدنا Dnase test	20	11
اختبار اليوريز Urease test	1	30
أختبار تخمر المانيتول	20	11
أختبار أستهلاك السترات	0	0
Novobiocin test	30	1
api 20 Staph	20	6706113

جدول 4 -3 : الاختبارات الكيموحيوية لـ Streptococci

نوع الاختبار	عدد البكتريا الموجبة
صبغة غرام Gram stain	9
أختبار الكتاليز Catalase test	9
أختبار الأوكسيديز Oxidase test	9
أختبار اليوريز Urease test	9
أختبار أستهلاك السترات	9
Novobiocin test	9
Bcitracin test	8
Optochin test	9
api 20 strep	0161414



شكل 4-1 : يوضح النسب المئوية للنمو الايجابي و السلبي للبكتريا

وللتأكد من تشخيص عزلات *Staphylococcus* و *Streptococcus* فقد أستعمل نظام api 20 Staph and Strep إذ أظهر تطابقاً كاملاً مع الفحوصات التي يشتمل عليها هذا النظام و التي حولت إلى أرقام مطابقة لنتيجة التفاعلات ، و فسرت تلك الأرقام من خلال الرجوع إلى Analytical profile index المجهز مع النظام المذكور كما موضح في شكل (4-2) .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية عائدية 31 عزلة وبنسبة 77.5% لجنس *Staphylococcus* قسمت على ضوء أيجابيتها لفحص مختثر البلازما Couagulase بطريقتيه الحرة و المرتبطة إذ وجد أن ما نسبته 64.5% كانت موجبة لهذا الفحص و 35.4% سالبة لهذا الفحص شكل (4-3) . توزعت العزلات بواقع 20 عزلة بنسبة 64.5 % إلى جنس المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* و 9 عزلات 29% *S. epidermidis* و 1عزلة 3.2% *S. saprophyticus* و1 عزلة 3.2% *S.albus* . أما بالنسبة لجنس *Streptococcus* إذ كان أجمالي عدد العزلات 9 عزلات و بنسبة 22.5% توزعت بواقع 8 عزلات 88.8 % لجنس *S.pyogenes* ، و 1 عزلة بنسبة 11.11% *S.agalactiae* يشير جدول (4-4) و شكل (4-4) الى النسب المؤية للعزلات قيد الدراسة .

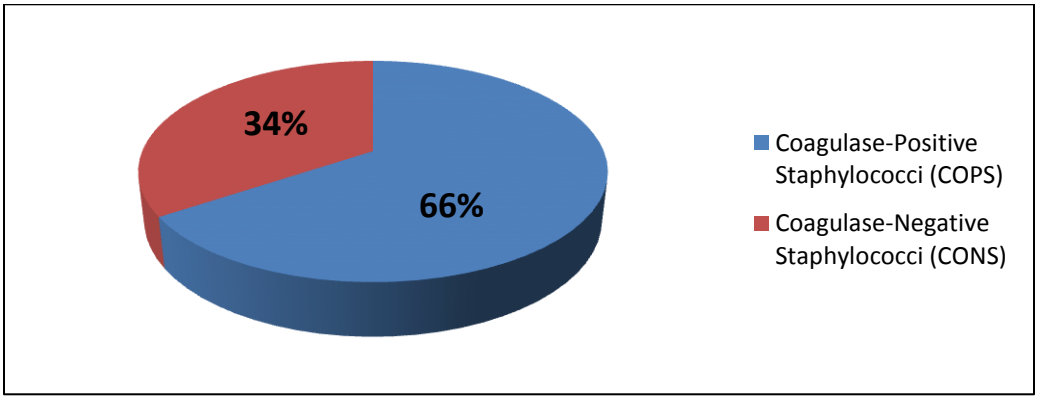
جدول 4-4 : النسب المئوية لتوزيع العزلات مقارنة بالعدد الكلي للعزلات .

ت	العزلات	العدد الكلي	النسب المئوية %
1	*S. aureus*	20	64.5
2	*S.epidermidis*	9	29
3	*S. saprophyticus*	1	3.2
4	*S. albus*	1	3.2
5	*Strep. Pyogenes*	8	88.8
6	*Strep . agalactiae*	1	11.11

2-1-4 توزيع العزلات بحسب مصدر العزل

Distribution of isolates according to source of isolates

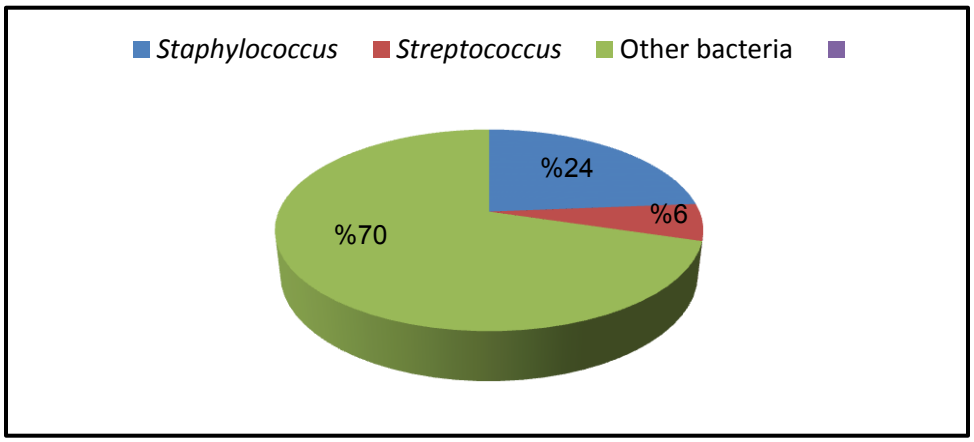
تتضمن العزلات الموجبة التابعة لجنس *Staphylococcus* المعزولة من الادرار 9 عزلات 12.6% توزعت بواقع 5 عزلات 55.5% تعود للجنس *S.aureus* ، و 3 عزلات 33.3% تعود للجنس *S.epidermidis* وعزلة واحدة 11.11% تعود للجنس *S.saprophyticus* شكل (4-5) ، تتقارب هذه النتيجة مع ماتوصلت له المالكي ، (2009) اذ بلغت نسبة عزل Staphylococci من الادرار 11% ، ومع ما توصلت له الحلفي ، (2009) إذ بلغت نسبة عزلها لجنس المكورات العنقودية 11.5% . أما بالنسبة للدم فتتضمن 5 عزلات 33.3% تعود للجنس *Staphylococcus* توزعت بواقع عزلاتان 40% تعود للجنس *S.aureus* و عزلتان أيضاً 40% *S.epidermidis* و عزلة واحدة 20% تعود للجنس *S.albus* . جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه الحسو ، (2007) أذ كانت نسبة المكورات العنقودية المعزولة من الدم 33.3% وبواقع 3 عزلات .



شكل 4-3 : النسب المئوية لجنس المكورات العنقودية المعزولة .

أظهرت البيانات في الدراسة الحالية أن نسبة عزل *S.aureus* من الجروح Wounds وصلت الى 3 عزلات 18.7% وعزلتان (12.5%) تعود للجنس *S.epidermidis* و عزلة واحدة 6.2% تعود للجنس *Strep. pyogenes* . تقاربت تلك النتيجة مع ما توصل اليه التميمي ، (2007) إذ كانت نسبة المكورات العنقودية المعزولة من الجروح 20.95% ، كما و تقاربت تلك النتائج جزئياً مع ما توصل الية سمير ، (2011) إذ أشار الى أن نسبة *Staphylococcus* في الجروح هي 31.3% وبواقع 27 عزلة . تعد *S.aureus* أحد أهم الأسباب الرئيسة في إنتاج وتكوين أخماج الجروح ، وبسبب قدرتها الكامنة على الغزو والهجوم ، تحصل

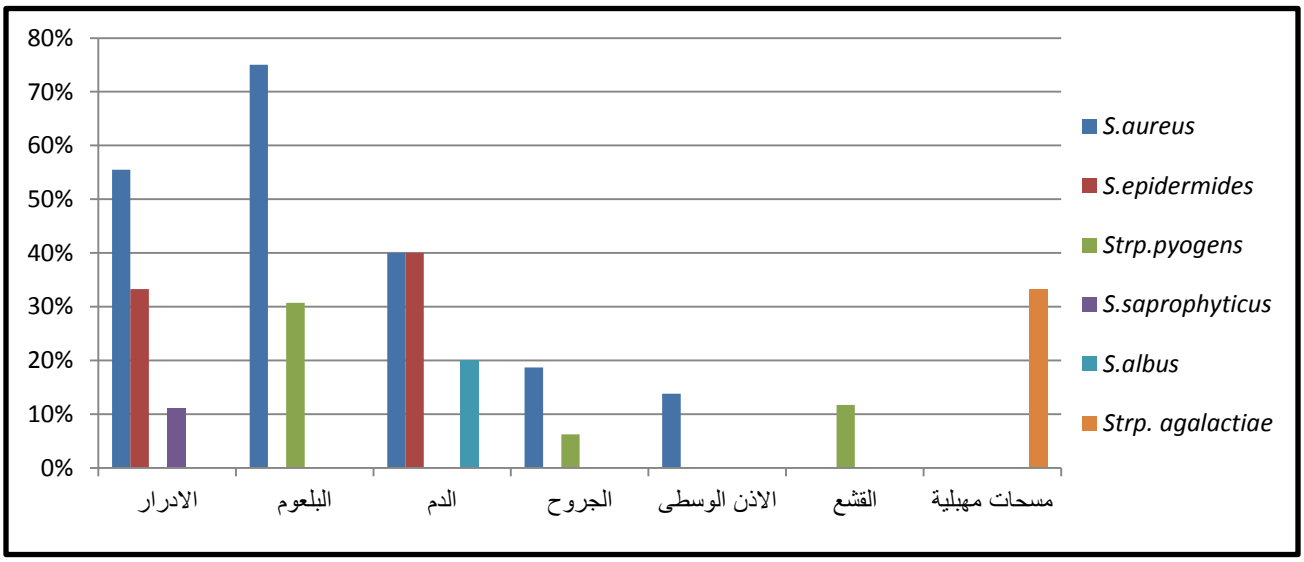
عملية إحداث المرض ومن ثم التسبب في إحداث أخماج في مناطق واسعة من الجسم تحدث الأخماج العنقودية عندما تخترق الحواجز المناعية مثل الجلد والحواجز المخاطية أو عند دخول أجسام غريبة و قد يكون الشخص المخمج يعاني أصلا من ضعفٍ في أنظمة الجسم المناعية (AL-Sheikh و yousif ، 2014) . تم الحصول على 4 عزلات 11.11% تعود للجنس *S.aureus* عزلت من مسحات الاذن الوسطى Middle ear swap ، إذ تتقارب تلك النتيجة مع ما توصل له التميمي ، (2007) إذ أشار الى أن نسبة *S.aureus* المعزولة هي 9.5% قد يعزى ذلك الاختلاف الى ظروف العزل . أما بالنسبة لعينات البلعوم Throat swap فقد تم الحصول على 8 عزلات بنسبة 32% تعود لجنس *Staphylococcus* تضمنت 6 عزلات 75% تعود للجنس *S.aureus* و عزلتين 25% تعود للجنس *S.epidermidis* إذ تقاربت تلك النتيجة مع ما توصلت له البارودي ، (2010) إذ وجدت أن نسبة *Staphylococcus* المعزولة من البلعوم هي 39% ، ولكن تختلف نتائج هذه الدراسة مع نتائج البارودي ، (2010) من حيث أنواع *Staphylococcus* المعزولة ، إذ توصل الى أن نسبة *S.aureus* 39% و *S.epidermidis* 61% ، كما ولم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل له الحسناوي ، (2006) إذ وصلت نسبة *S.epidermidis* الى 14.5% ، قد يعود سبب الأختلاف في نسبة العزل الى طبيعة العينات ، ونوع الدراسة ، وحجم العينة ، والموقع الجغرافي الذي أخذت منه العينات وموسم جمع العينات .



شكل 4-4 : يوضح النسب المئوية للعزلات البكتيرية

تم الحصول على 4 عزلات 30.7% تعود للجنس *Streptococcus pyogenes* لمرضى مصابين بأخماج الجهاز التنفسي العلوي (التهاب الحنجرة واللوزتين) . لم تتفق تلك النتائج مع ما توصلت له العاني ، (2001) إذ تمكنت من الحصول على 24 عزلة 12% من المسبحيات الحالة للدم بيتا ، كما و أختلفت تلك النتائج مع ما توصلت له البغدادي ، (2006) إذ بلغت نسبة *Strep. pyogenes* المعزولة من البلعوم

19.4% وبذلك تكون نسبة عزل *Strep. pyogenes* في هذه الدراسة متقاربة من نسب العزل لدى كل من القوادري ، (2000) التي عزلت 54 عزلة 37.76 % من المسبحيات الحالة للدم بيتا من 143 مسحة من أطفال مصابين بالتهاب اللوزتين و العبودي ، (2002) من الحصول على 45 عزلة 28.12 %من 160 مريض مصاب بالتهاب اللوزتين ، في حين جاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لما توصلت له التميمي ، (2013) إذ حصلت على 15 عزلة 33.3% تعود للجنس *Strep. pyogenes* . أختلفت نسبة عزل المسبحيات المحللة للدم باختلاف المصادر و ذلك يعود إلى إختلاف المواقع الجغرافية للعزل . أما بالنسبة للمكورات السبحية *Streptococci* المعزولة من القشع فكانت نسبتها 11.7% بواقع 3 عزلات ، لم تتفق مع ما توصلت له الكريمي ، (2010) إذ شكلت *Streptococci* مانسبته 2% من مجموع عينات القشع . أما بالنسبة للمسحات المهبلية فقد تم الحصول على عزلة واحدة (33.3% تعود للجنس *Strep . agalactiae* شكل (4-5) النسبة المئوية لأنواع البكتيريا المعزولة من مصادر مختلفة .



شكل 4-5 : النسبة المئوية لأنواع البكتيريا المعزولة من مصادر مختلفة .

4-2 التحري عن بعض عوامل الضراوة الانزيمية للاجناس قيد الدراسة

Detection of some enzymatic virulence factors

تم التحري عن بعض عوامل الضراوة التي قد تمتلكها *Staphylococcus* و *Streptococcus* والتي تزيد من إمراضيتهما منها :

1-2-4 أنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production

أختبرت قابلية عزلات *Staphylococcus* و *Streptococcus* على إنتاج الهيمولايسين من خلال تنميتها في وسط أكار الدم الحاوي على 5% دم الانسان نوع AB ، وقد أظهرت النتائج الموضحة في جدول (4-5) أن ما نسبته 94% من عزلات *Staphylococcus* منتجة للهيمولايسين إذ تتقارب تلك النتيجة مع ما توصلت له Al-Hasani ، (2011) إذ وجدت ان جميع عزلات جنس المكورات العنقودية بنوعية (Couagulase positive & negative Staphylococci) منتجة للهيمولايسين وبنسبة 100% . يمتلك جنس *Staphylococcus* أربعة أنماط من الهيمولايسين وهي : ألفا ، و بيتا ، وكاما ، و دلتا ، يمكن لهذا الذيفان أن تحطم كريات الدم والعدلات والصفيحات الدموية وهو سام لبعض خلايا الأنسجة ، كما يحلل النمط ألفا الخلايا الملتهمة الكبيرة Macrophage (Demuth و Lamont ،2006) . أما بالنسبة لجنس *Streptococcus* فقد تم التحري عن قابلية العزلات على أنتاج الهيمولايسين بأستخدام وسط نقيع القلب والدماغ BHIA المضاف اليه دم الانسان و بنسبة 5% وأظهرت النتائج ان جميع عزلات *S.pyogenes* لها القدرة على انتاج الهيمولايسين جدول (4-6) . أتفقت هذه النتيجة مع ما توصلت اليه البغدادي ، (2006) إذ وجدت إن 100% من عزلاتها لها القدرة على أنتاج الهيمولايسين , كما وتطابقت مع ما توصلت اليه التميمي ، (2013) أذ وجدت ان 100% من عزلاتها منتجة للهيمولايسين ، والنتيجة التي توصلت لها الدراسة الحالية أعلى مقارنة مع ما توصل له الجبوري ، (2007) الذي وجد بان 90% من العزلات التابعة لبكتريا *S.pyogenes* لها القدرة على انتاج الهيمولايسين البكتيري . يؤدي الستربتولايسين O دورا مهما في ضراوة بكتريا *S. pyogenes* ، إذ وجد بأن الفعالية الحالة للخلايا للستربتولايسين O تسهل من غزو بكتريا *S. pyogenes* للبلعوم وتمنع القتل داخل الخلوي لها بفعل القتل باللايسوسوم (Haknssonو أخرون ، 2005) .

جدول 4-5 : أعداد Staphylococci المنتجة للهيمولايسين ونسبها .

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات المنتجة للهيمولايسين	النسبة المئوية للعزلات المنتجة للهيمولايسين %
S.aureus	**20**	**20**	**%100**
S.epidermidis	**9**	**7**	**%77**

S.albus	`1	1	%100
S.saprophyticus	1	1	%100

جدول 4-6 : أعداد Streptococci المنتجة للهيمولايسين ونسبها .

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات المنتجة للهيمولايسين	النسبة المئوية للعزلات المنتجة للهيمولايسين %
Strp.pyogenes	8	8	100%
Strp.agalactiae	1	1	100%

4-2-2 أنتاج البروتييز Protease Production

أستخدم وسط الحليب المقشوط Skim – Milk agar للكشف عن قدرة البكتريا قيد الدراسة على أنتاج البروتييز Protease شكل (4-6) . أظهرت النتائج أن 15 عزلة بنسبة 75% تعود لجنس *S.aureus* أنتجت هذا الانزيم جدول (4-7) ، إذ تقاربت تلك النتيجة ما توصلت له Al-Hasani ، (2011) بأن 80% من عزلات *S.aureus* منتجة لهذا الانزيم ، وأقل مع ما توصل له Al-Junadi، (2005) الذي بين بأن 97.3% من عزلات *S.aureus* منتجة للبروتيز ، لم تتوافق نتائج الدراسة الحاليةمع ما توصلت له أسماء و أخرون ، (2009) بأن من بين 35 عزلة تعود للجنس *S.aureus* أنتجت 10عزلات 28.5% أنزيم البروتييز . أما بالنسبة لجنس *S.epidermidis* فأن 4 عزلات 44.4% أنتجت أنزيم البروتييز إذ تقاربت تلك النتيجة جزئياً مع ما توصل اليه Fathi ، (2007) الذي بين نتائج كشفه لأنزيم البروتييز أن 50% من عزلات أنتجت هذا الانزيم ، أما بالنسبة لجنس *Streptococcus* فقد أظهرت النتائج أن 6 عزلات وبنسبة 75% تعود للجنس *S.pyogenes* أنتجت لهذا البروتييز جدول (4 - 8) . يعد أنزيم البروتييز من أهم عوامل الضراوة لما له من دور في إحداث الأصابة من خلال تحطيمه لمجموعة من بروتينات المضيف مثل السلاسل الثقيلة للكلوبينات المناعية Immunoglobulin heavy chain (أسماء وأخرون ،2009) . أشارت الشعّار (2002) الى إن الدراسات الوبائية أظهرت العلاقة الوثيقة بين إنتاج أنزيم Protease وبين

الاخماج التي تسببها السلالات المنتجة له في الانسان ، كما لوحظ أن تركيب هذا الانزيم يشابه تركيب أنزيم Elastase الذي تنتجه بكتريا *Pseudomones aeroginosa* والذي يعد عاملَ ضراوة مهما في الاصابات الحادة التي تسببها هذه البكتريا وخاصة في مرض تليف الرئة Cystic fibrosis .

جدول 4 – 7 : أعداد Staphylococci المنتجة لأنزيم البورتيز ونسبها .

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات المنتجة لانزيم البروتييز	النسبة المئوية للعزلات المنتجة لأنزيم البروتييز %
S.aureus	20	15	75
S.epidermidis	9	4	37.5
S.albus	`1	0	0
S.saprophyticus	1	0	0

جدول 4 - 8 : أعداد Streptococci المنتجة لأنزيم البورتيز ونسبها .

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات المنتجة لانزيم البروتييز	النسبة المئوية للعزلات المنتجة لأنزيم البروتييز %
Strp.pyogenes	**8**	6	85
Strp.agalactiae	**1**	0	0

3-2-4 أنتاج الستافيلوكاينيز Staphylokinase Production

تم التحري عن أنتاج الستافيلوكاينيز بإستخدام وسط الكازائين Casein hydrolytic . يشير الجدول (4-9) الى أن 20 عزلة 62% تعود لجنس *Staphylococci* أنتجت هذا الانزيم . قسمت بواقع 14 عزلة 70% تعود لجنس *S.aureus* و 6 عزلات 66.6% تعود لجنس *S.epidermidis* أنتجت أنزيم الستافيلوكاينيز Staphylokinase . تقاربت تلك النتائج مع نتائج الدراسة التي أجراها الباحث Devi

وأخرون ، (2012) حول الكشف عن قدرة *Staphylococci* على إنتاج هذا الانزيم ، إذ بين أن 7 عزلات من أصل 12 عزلة 58% تعود للجنس *Staphylococcus* أنتجت هذا الأنزيم .

جدول 4-9 : أعداد Staphylococci المنتجة لأنزيم الستافيلوكاينيز ونسبها .

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات المنتجة لانزيم الستافيلوكاينيز	النسبة المئوية للعزلات المنتجةلأنزيم الستافيلوكاينيز %
S.aureus	**20**	14	70
S.epidermidis	**9**	6	66.6
S.albus	**`1**	1	100
S.saprophyticus	**1**	1	100

4-2-4 أنتاج الستربتوكاينيز Streptokinase Production

تم التحري عن قدرة .*Streptococcus* spp على أنتاج أنزيم الستريبتوكاينز وأظهرت النتائج أن 3 عزلات 37.5% قادرة على أنتاج هذا الأنزيم جدول (4 - 10) . أن النسبة التي توصلت لها الدراسة الحالية كانت أقل مما توصلت اليه التميمي ، (2013) إذ وجدت أن 60% من عزلاتها أنتجت هذا الأنزيم و أقل مما توصل اليه (Razak و Al-jebori ، 2012) إذ وجد أن 66.6% من عزلاته قادرة على إنتاج هذا الانزيم ، والنتيجة التي توصلت اليها لا تتوافق مع ما حصلت عليها عيسى ، (2000) إذ توصلت الى أن 85.18% من العزلات المعزولة من البلعوم منتجة للانزيم وهي أعلى من النسبة التي توصلنا اليها . يعتبرالستربتوكاينيز من عوامل أذابة الجلطة Thrembolytic agents غير التخصصية للفايبرين إذ يرتبط هذا البروتين مع مولد البلازمين إذ يكون معقد (الستربتوكاينيز – مولد البلازمين) إذ يعمل هذا المعقد على تحويل مولد البلازمين Plasmogen الى البلازمين Plasmin والذي يقوم بتحليل الفايبرين (Bhardwaj و أخرون ،2013) .

جدول 4 – 10 : أعداد العزلات المنتجة لأنزيم الستربتوكاينيز و نسبها .

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات المنتجة لأنزيم الستربتوكاينيز	النسبة المئوية للعزلات المنتجة لأنزيم الستربتوكاينيز %
Strp.pyogenes	**8**	3	62.5
Strp.agalactiae	**1**	0	0

5-2-4 أنتاج اللايبيز Lipase Production

أستخدم وسط Egg – Yolk agr للتحري عن قدرة *Staphylococcus* spp و *Streptococcus* spp. على أنتاج أنزيم اللايبيز . أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن 18 عزلة 56.2% تعود للجنس *Staphylococcus* قسمت بواقع 14 عزلة 70% تعود للجنس *S.aureus* و 3 عزلات 33.3% تعود للجنس *S.epidermidis* أنتجت اللايبيز Lipase في حين ان جميع عزلات *Streptococcus spp.* لم تنتج أنزيم اللايبيز ، جدول (4- 11) . تقاربت نتائج دراستنا مع ما توصلت له Al-Hasani ، (2011) إذ بلغت نسبة إنتاج *S.aureus* لهذا الانزيم 80% لكنها لم تتفق فيما يخص *S.epidermidis* إذ توصلت Al-Hasani ، (2011) الى أن جميع عزلات ذلك النوع لم تكن منتجة لهذ الانزيم . لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل له Junadi (2005) -Al الذي وجد أن 94.5% من عزلات *S.aureus* منتجة لهذ الانزيم ، كما وتتوافق نتائج الدراسة الحالية فيما يتعلق بـ *S.epidermidis* مع ما توصل له Cunha و أخرون ، (2006) إذ وجد أن 17.5% من عزلات *S.epidermidis* منتجة لهذ الانزيم . يعد أنزيم أنزيم اللايبيز من عوامل الضراوة المهمة لما له من دور في العيد من الاخماج الموضعية كالخراجات Abscesses ، أن الأثر الفعلي للايبيز Lipase بوصفه عامل ضراوة أنزيمي ليست واضحة لكنه يلعب دور مهم في منع أستيطان Colonize الجلد من قبل كائنات أخرى ، ومن المحتمل أن يسهم هذا الانزيم في عملية التغذية Nutration ، أو في تحرير الاحماض الدهنية الحرة free fatty acids والتي تلعب دوراً مهماً في عملية الالتصاق Adherence . يوفر اللايبيز أمكانية بقاء *S.epidermidis* في بيئة غنية بالشحوم

Lipids و يوفر لها أمكانية إختراق الجلد وغزو الأنسجة الأدمية Epidermal tissues (Winny ، 2012) .

جدول 4- 11 : أعداد Staphylococci المنتجة لأنزيم اللايبيز ونسبها .

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات الموجبة المنتجة لأنزيم اللايبيز	النسبة المئوية للعزلات المنتجة لأنزيم اللايبيز %
S.aureus	20	14	70
S.epidermidis	9	3	33.3
S.albus	`1	0	0
S.saprophyticus	1	0	0

6-2-4 أنتاج الدنييز DNase production

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة أنتاج بكتريا *S.aureus* لأنزيم الدنييز قد وصلت الى (100%) كما في الجدول (4 - 12) .. تطابقت تلك النتيجة مع ما توصلت له Al-Hasani ، (2011) أذ بلغت نسبة أنتاج *S.aureus* لهذا الانزيم 100% و هي أيضا تطابق ما توصل اليه Al-Junadi ، (2005) الذي وجد بأن نسبة أنتاج الدنييز في بكتريا *S.aureus* قد وصلت الى 100%. أما بالنسبة لجنس *Streptococcus* فقد بلغت نسبة أنتاج *S.pyogenes* 62% كما هو مبين في الجدول (4 - 13) إذ لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصلت له التميمي ، (2013) إذ بلغت نسبة أنتاج *S.pyogenes* 93.3% ، إذ يعود سبب تلك الاختلاف ربما الى التفاوت في أعداد العزلات . يعمل انزيم الدنييز Dnase على تكسير الحامض النووي الرايبي منقوص الأوكسجين الـ Deoxyribonucleic acid DNA و يستعمل أختبار الكشف عن هذا الأنزيم DNase Test للتفريق بين مجاميع الأحياء المجهرية فضلاً على تحديد العنقوديات ذات الامراضية الكامنة Potential pathogenic *Staphylococci* (Leboffe و Pierce ، 2012) .

جدول 4 - 12 : أعداد Staphylococci المنتجة لأنزيم الدنييز ونسبها .

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات الموجبة المنتجة لأنزيم الدنييز	النسبة المئوية للعزلات المنتجة لأنزيم الدنييز %
S.aureus	**20**	20	100
S.epidermidis	**9**	0	0
S.albus	**`1**	0	0
S.saprophyticus	**1**	0	0

جدول 4- 13 : أعداد ونسب Streptococci المنتجة لأنزيم الدنييز .

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات الموجبة المنتجة لأنزيم الدنييز	النسبة المئوية للعزلات المنتجة لأنزيم الدنييز %
Strp.pyogenes	**8**	6	75
Strp.agalactiae	**1**	0	0

4-2-7 أنتاج الغشاء الحيوي Biofilm production

أتبعت طريقة Freeman و أخرون ، (1989) للكشف عن قدرة *Staphylococcus* و *Streptococcus* على أنتاج الغشاء الحيوي . أظهرت النتائج أن 25 عزلة 78.1% تعود للجنس *Staphylococcus* أنتجت الغشاء الحيوي Biofilm كما مبين في الجدول (4- 14) ، إذ أظهرت المستعمرات المنتجة للغشاء الحيوي سوداء اللون الى رمادية مع كثافة بلورية جافة . توزعت العزلات بواقع 13 عزلة 65% تعود للجنس *S.aureus* ، فضلاً عن أن جميع عزلات المكورات العنقودية السالبة لانزم الخثرة CONS أنتجت الغشاء الحيوي إذ بلغت نسبة أنتاج *S.epidermidis* للغشاء الحيوي 100%. أما بالنسبة لجنس *Streptococcus* فأن 6 عزلات 75% تعود لـ *S.pyogenes* أنتجت الغشاء الحيوي الجدول (4- 15) ، تتقارب تلك الدراسة مع ما توصلت اليه Al-Hasani ، (2011) إذ كانت نسبة أنتاج *S.aureus* 60% ، وكانت نسبة أنتاج المكورات

العنقودية السالبة لانزم الخثرة CONS 100% ، وتتقارب النتائج التي توصلنا اليها جزئياً مع ما توصل له Turkyilmazو Kaya ،(2006) الذي وجد أن 77.8% من عزلات *S.aureus* منتجة للغشاء الحيوي ، كما و تقاربت نتائج الدراسة الحاليةمع ما توصلت له التميمي ، (2013) إذ كانت نسبة أنتاج *S.pyogenes* للغشاء الحيوي 86.6% ، لم تتفق نتائج الدراسة الحاليةمع Fathi (2007) فيما يخص *S.epidermidis* إذ أشار الى أن 31.8% من عزلات CONS منتجة للغشاء الحيوي و 40.9% أظهرت نمواً ضعيفاً بينما 27.2% لم تظهر أي نمو على وسط الـ Congo red . كما ولم تتفق نتائج الدراسة الحاليةأيضاً مع نتائج الدراسة التي قامت بها خضر (2013) على 14 عزلة تعود للجنس *S.aureus* إذ وجدت إن 42.8% أنتجت الغشاء الحيوي .

جدول 4- 14 : أعداد Staphylococci المنتجة للغشاء الحيوي ونسبها .

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات الموجبة المنتجة للغشاء الحيوي	النسبة المئوية للعزلات المنتجة للغشاء الحيوي
S.aureus	**20**	13	65
S.epidermidis	**9**	9	100
S.albus	**`1**	1	100
S.saprophyticus	**1**	1	100

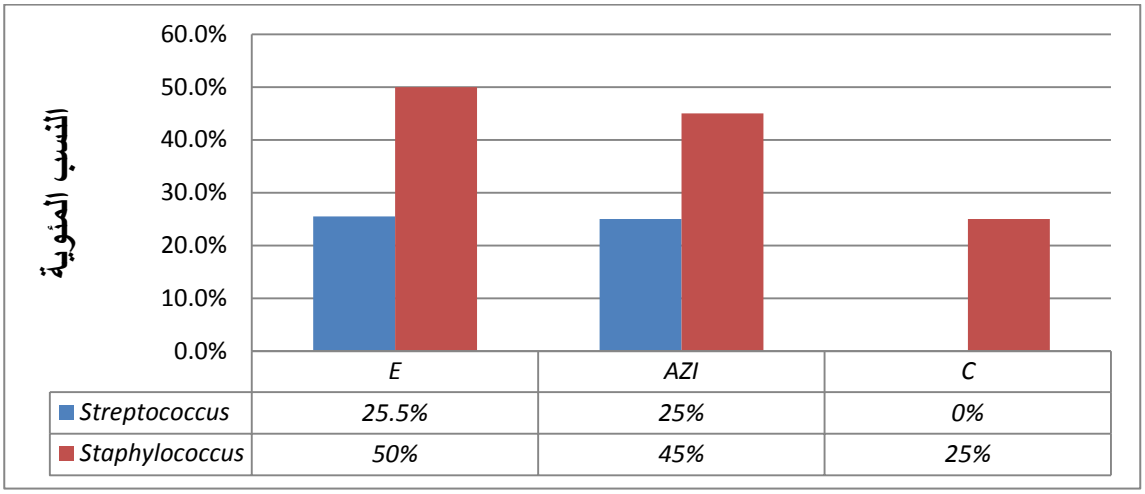
جدول 4- 15 : أعداد Streptococci المنتجة للغشاء الحيوي ونسبها .

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات الموجبة المنتجة للغشاء الحيوي	النسبة المئوية للعزلات المنتجة للغشاء الحيوي
Strp.pyogenes	**8**	6	75
Strp.agalactiae	**1**	0	0

3-4 فحص الحساسية الدوائية Antibiotic Sensitive test

تم أختبار الحساسية الدوائية لجميع عزلات *Staphylococcus* و *Streptococcus* المعنية بالدراسة بإستعمال أثنين من المضادات الحيوية القياسية العائدة لمجموعة الـ Macrolide وهما الارثرومايسين و الازثرومايسين بالاضافة الى مضاد الكلندامايسين العائد لعائلة اللينكوزاميدات Lincosamides ، وقد أختيرت هذه المجموعة من المضادات الحيوية لشيوع إستعمالها في معالجة بعض الأخماج الناتجة عن الاصابة ببكتريا *Staphylococcus* و *Streptococcus* ، و لمعرفة مدى المقاومة التي تبديها تلك الاجناس لهذه المضادات و خطورة إنتشار تلك المقاومة التي قد تمـــتد لتشـــمل عدد واسع من المضـــادات الحيوية المختلفة . أختبرت حساسية 40 عزله تجاه المضادات الثلاث بأستعمال طريقة الأقراص وتم تحديد حساسية ومقاومة العزلات للمضادات المايكروبية بالأعتماد على قياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر (ملم) حول أقراص المضادات المستعملة وقورنت النتائج مع ماورد في CLSI ، (2012) . أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة مقاومة *S.aureus* لمضادات الارثرومايسين erythromycin والازثرومايسين azithromycin و الكلندامايسين clindomycin 50% , 45% 25% على التوالي الشكل (4 - 6) و الجدول (4 -16) يوضح نسب المقاومة للعزلات قيد الدراسة . توافقت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل له الحسو ، (2007) فيما يخص Erythromycin إذ أن نسبة المقاومة وصلت الى 58.3% . كما وتقاربت نتائج مقاومة *S.aureus* لمضاد الارثرومايسين مع ما توصل له الزهيري ، (2005) ، إذ وصلت نسبة المقاومة الى 56.1% ، و زيدان و أخرون ، (2009) إذ وصلت نسبة المقاومة الى 52.5% . بينت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة مقاومة *S.aureus* لمضاد الازيثرومايسين 52.3% أي أن نسبة المقاومة في دراستنا أقل مع ما توصل له التميمي ، (2012) إذ وصلت نسبة مقاومة الازثرومايسين 78% ، وأن نسبة المقاومة في دراستنا أقل من من النسبة التي حصلت عليها الخضيري ، (2008) إذ كانت نسبة المقاومة لمضاد الازيثرومايسين و الارثرومايسين 81.5% . أدرج الأرثرومايسين من ضمن قائمة المضادات الحيـــوية التي تجابه بمقاومـــة عالية من قبل بكتريا *S. aureus* وقد وصلت نسبة المقاومة في بعض السلالات إلى 100% (Leclercq ، 2002) وهي أعلى من نسبة المقاومة لمركبات الماكروليد في الدراسة الحالية ، وهناك بعض الدراسات سلطت الضوء على المقاومة العالية للأزثرومايسين وهي دراسة Aktas وأخرون ، (2007) في مستشفى كلية الطب جامعة أسطنبول – تركيا و التي توصل فيها الى إن نسبة مقاومة عزلات *S. aureus* للأزثرومايسين وصلت الى 96% و للارثرومايسين 96.1% و للكلندامايسين 55.1% وهي أعلى أيضا من نسبة المقاومة لمركبات الـ Macrolide في الدراسة الحالية . أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة مقاومة عزلات *S. aureus*

لمضاد الكلندامايسين 28.5% إذ توافقت تلك النتيجة مع ما توصلت له Al-Hasani ، (2011) إذ وصلت نسبة مقاومة *S. aureus* للكلندامايسين 31.2% ، و أن نسبة مقاومة *S. aureus* لمضاد الكلندامايسين التي توصلنا اليها في الدراسة الحالية هي اقل مما توصلت له الزهيري ، (2005) إذ بلغت نسبة مقاومة الكلندامايسين 47% والحسو ، (2007) اذ وصلت نسبة المقاومة الى 50% ومع ماتوصلت له الخضيري ، (2008) إذ وصلت الى 55.2% . يمتلك الكلندامايسين أهمية علاجية كبيرة في علاج الأخماج الناتجـــة عن *S. aureus* إلا أن المقاومة المحفزة للكلندامايسين التي تنشأ أحيانا بوساطة الأرثرومايسين أدت إلى إفشال العلاج بمركبات اللنكوساميد (Patel و أخرون ، 2006) ، أما بالنسبة للمكورات العنقودية السالبة لانزيم الخثرة (CONS) والتي تشكل *S.epidermidis* الجزء الاكبر منها في الدراسة الحالية ، وصلت نسبة المقاومة لمضاد الارثرومايسن 66.6% و للازثرومايسين 44% و للكلندامايسين 11.11% ، إذ تتقارب تلك النتائج مع ما توصل له جاسم ، (2006) إذ وصلت نسبة مقاومة *S.epidermidis* للارثرومايسين 65% ، في حين أن نسبة المقاومة التي حصلنا عليها لمضاد الازثرومايسين هي أقل من ما توصل له Hafeth ، (2010) إذ وصلت نسبة المقاومة الى 87.2% . اما بالنسبة لمضاد الكلندامايسين لم تتفق نتائج الدراسة الحاليةمع ماتوصلت له Al-Hasani ، (2011) إذ أن جميع عزلاتها حساسة لهذا المضاد وبنسبة 100% . أما بالنسبة لبكتريا *S.pyogenes* والتي تشكل الجزء الاكبر من جنس *Streptococcus* المعزولة في الدراسة الحالية فقد وصلت نسبة مقاومة هذا النوع لمضاد الارثرومايسين 25.5% و للازثرومايسين 25% أما بالنسبة للكلندامايسين فكانت عزلات *Streptococci* جميعها حساسة لهذا المضاد كما موضح في الجدول (4 - 16) ، إذ إن النتائج التي توصلنا اليها مقاربة لما توصلت له البغدادي ، (2006) إذ كانت نسبة مقاومة الارثرومايسين 26% وتقاربت نتائج الدراسة الحالية جزئياً مع ما توصل له (Younge و أخرون ، 2004) إذ وصلت نسبة مقاومة الارثرومايسين 19% . أما بالنسبة لمضاد الكلندامايسين فأن النسبة التي توصلت لها الدراسة الحالية تتطابق مع ما توصل له (Moriangthem و Gurung ، 2013) إذ كانت العزلات لبكتريا *S.pyogenes* جميعاً حساسة لهذا المضاد وبنسبة 100% ولا تتوافر أي عزلات مقاومة ، على العموم أن نسب مقاومة الكلندامايسين التي توصلنا اليها بالنسبة للجنس *S.pyogenes* هي اقل من نسب المقاومة في أغلب بلدان العالم . إذ وجد Ciftci وأخرون (2003) بانها لاتزيد عن 3% في تركيا ، و وجد Ralf و أخرون ، (2004) بانها لاتزيد عن 1.1% في بكتريا *S. pyogenes* المعزولة من الاطفال في المانيا ، وذكر Grivea وأخرون ، (2012) بإن المقاومة للكلندامايسين في أسبانيا 0% .



شكل 4 - 6 : النسب المئوية لمقاومة مركبات الـ Macrolide

AD : Clindamycin ، Azi : Azithromycin ، E: Erythromycin

أتضح من خلال النتائج المتعلقة بمقاومة المضادات أن العزلات البكتيرية جميعاً تمتلك المقاومة لأغلب المضادات المستخدمة في هذه الدراسة وبنسب متباينة , أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان نسبة مقاومة *Staphylococcus* لمضادات الارثرومايسين ، والازيثرومايسين ، والكلندامايسين كالاتي 51.6% , 45.1% , 22.5% على التوالي ، . أما بالنسبة لـــ *Streptococcus spp.* فقد كانت نسبة المقاومة للارثرومايسين و الازثرومايسين والكلندامايسين كالاتي 25.5% ، 25.5% ، 0% . يعود سبب مقاومة *Staphylococcus spp.* و *Streptococcus spp.* لعناصر Macrolide ومن ضمنها الارثرومايسين و الأزثرومايســـين الى وجود بلازميدات و عناصر قافزة تحمل جينات مسؤولة عن هذه المقاومة ، فهنالك طريقتان رئيسيتان لمقاومة عناصر Macrolide أما خلال تحوير الموقع الرايبوسومي Ribosomal target site عن طريق أنتاج (23 rRNA methylase) المشفر بوساطة أحد جينات *erm* ومنها *erm* A و B و *erm* C والتي ينتج عنها مقاومة مركبات Macrolide و Lincosamide و Streptogramin B (MLSB Phenotype) أو من خلال اكتسابها *mef* (A) gene إذ يقوم هذا الجين بالتشفير لبناء بروتينات مضخات الدفق Efflux pump protein synthesis التي تقوم بطرد مضادات الـ Macrolide المكونة من 14-15 حلقة ماكرولد خارج جسم الكائن الحي وبذلك تقاوم هذه المضادات (Zmantar و أخرون، 2011) . أن العديد من أنواع مورثات *erm* مصحوبة بالعوامل القافزة الاقترانية وغير الاقترانية التي تميل إلى التواجد على الكروموسومات ، ومع ذلك فان البعض منها يحمل على

البلازميدات وغالباً ما تكون مصاحبة للمورثات المقاومة للمضادات الحيوية الأخرى ولاسيما مورثات المقاومة للتتراســـايكلين فمثلاً مورثات *erm*(F) مرتبطة مع مورثة *tet*(Q) ، بينما *erm*(B) مرتبطة مع مورثة *tet*(M) وهذه العوامل القافزة الاقترانية تمتلك مدى واسع من المضايف مما يعطي توضيحاً لاختلاف وتنوع المورثات في العزلات السريرية (Salyers و أخرون ، 1995) .

جدول 4-16 : النسب المئوية لحساسية العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية .

Clindamycin			Azithromycin			Erythromycin			المضادات الحياتية
R	I	S	R	I	S	R	I	S	
25% (5)	5% (1)	70% (14)	45% (9)	10% (2)	45% (9)	50% (10)	5% (1)	45% (9)	*S.aureus*
11.11% (1)	22.22% (2)	66.6% (6)	44.4% (4)	0%	55.5% (5)	66.6% (6)	0%	33.3% (3)	*S.epidermidis*
0%	28.5% (2)	62.5 % (6)	25% (2)	0%	85.5% (6)	25% (2)	12.5% (1)	75% (5)	*Str.pyogenes*
0%	0%	100% (1)	0%	0%	100% (1)	0%	0%	100% (1)	*Str.agalactiae*
0%	0%	100% (1)	0%	0%	100% (1)	0%	0%	100% (1)	*S.albus*
0%	0%	100% (1)	0%	0%	100% (1)	0%	0%	100% (1)	*S.saprophyticus*

S :Sensitive - I : Immediate - R : Resist

4-4 الكشف عن العزلات المقاومة للارثرومايسين

زرعت جميع العزلات المعنية بالدراسة والمؤلفة من 40 عزلة سريرية على وسط أكار الدم بالنسبة لـ *Staphylococcus* و و وسط نقيع القلب والدماغ المضاف له 5% من دم الانسان بالنسبة للجنس *Streptococcus* ولمدة حضن 18 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ بعدها نقلت المستعمرات النقية الى وسط مولر - هنتون الصلب المدعم بالأرثرومايسين بتركيز 1 ملي غرام باللتر (CCLSI، 2012) . يبين الجدول (4-17) وجود نسبة عالية من العزلات قيد الدراسة مقاومة لمضاد الارثرومايسين، إذ أن 14 عزلة تعود للجنس *Staphylococcus* قاومت النمو على الوسط المعلم باللارثرومايسين و بنسبة

45.16% ، بينما كانت نسبة عزلات المكورات العنقودية الحساسة للارثرومايسين 17 عزلة وبنسبة 54.8% ، تبين نتائج الدراسة الحالية وجود عزلة واحدة 11.11% من أصل 9 عزلات تعود للجنس *Streptococcus pyogenes* قاومت الارثرومايسين بهذه الطريقة . على الرغم من إنخفاض النسبة إلا أن عزلات *Staphylococcus* والتي يتوقع أن تشكل سلالات تشكل MRSA جزءاً كبيراً قد تكون سبباً للعديد من الاخماج التي يتطلب معالجتها أصناف محددة من المضادات الحياتية ، إذ تعد هذه السلالات مقاومة لعدة أصناف من مضادات الحياة (Duran و أخرون ،2012) تسبب هذه السلالات خطورة عالية في الحالات المرضية ذات التعقيدات العلاجية ، إذ تمتاز عزلات MRSA المتوطنة في المستشفيات بمقدار تحكمها بالعلاج المقدم إذ تشكل ضغطاً لأنتقاء علاجات نوعية ومحددة لان العلاقة بين المقاومة للمثيسيلين والمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية الأخرى ومن ضمنها الـ Macrolide علاقة مترابطة وطردية إذ تؤثر على سلسلة المضادات الحيوية المقدمة للشخص الذي يعاني مسبقاً من حالات إصابة التي قد تكون خطرة (Griffiths و أخرون ، 2004) .

جدول 4 -17 : الأعداد والنسب المئوية للعزلات قيد الدراسة المقاومة للارثرومايسين بأستعمال طريقة الكشف عن العزلات المقاومة للارثرومايسين .

البكتريا	الحساسية للارثرومايسين	عدد العزلات	النسبة المئوية (%)
Staphylococcus	المقاومة	14	43.7
	الحساسة	17	54.8
Streptococcus	المقاومة	1	12.5
	الحساسة	8	87.5

5-4 طريقة التركيز المثبط الأدنى Minimal inhibitory concentration

على ضوء نتائج التجارب السابقة (فحص الحساسية و الكشف عن المقاومة بالوسط المعلم بالارثرومايسين) تم إنتخاب 15 عزلة تعود للجنسين *Staphylococcus* و *Streptococcus* عزلت من مصادر سريرية مختلفة و مقاومة لجميع مضادات الحياة قيد الدراسة بعد أن تم الكشف عن تلك المقاومة بالطرق الموضحة أعلاه ، وذلك لتحديد مدى قدرة هذه العزلات على مقاومة مضادات الـ Macrolide من خلال عمل سلسلة من التراكيز المختلفة لتحديد التركيز المثبط الأدنى له بالاعتماد على CLSI ، (2012) على أفتراض إن نقطة التوقف [(Break point (b.p] تمثل التركيز الأمثل للمضاد الحيوي الذي يصل فيه إلى المصل Serum ويعطي أعلى مستوى من التأثيرات العلاجية ، أما إذا كان مستوى MIC أقل من (b.p) فتعد العزلة متحسسة لذلك المضاد . تشير النتائج في الجدول (4 -18) الى أن قيم التراكيز المثبطة الدنيا لمضاد الارثرومايسين تراوحت ما بين (64-1024>) مايكروغرام / مل لعزلات *Staphylococcus* تقاربت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل له (Richter و أخرون ، 2011) إذ توصل الى أن الـ MIC للارثرومايسين هو 64> مايكروغرام / مول ، كما و تقاربت تلك النتائج جزئياً مع ما توصل له (Aktas و أخرون ، 2007) الذي أشار الى أن قيم MIC للارثرومايسين 128> مايكروغرام / مل ، تمتاز طريقة MIC بقدرتها العالية على التحســس لمقدار المقاومة الواطــئة إذ يؤكد Brown وأخرون ، (2005) على دقة نتائج هذه الطريقة وتحسسها العالي لمستويات المقاومة الواطئة وبالمقارنة مع نتائج الطرائق السابقة يلاحظ ان الطريقة في هذه الدراسة اتفقت في نتائجها مع طريقة أقراص فحص الحساسية وبذلك يمكن الاعتماد على هاتين الطريقتين في تشخيص العزلات المقاومة لعناصر الـ Macrolide .

جدول 4-18 : قيم التراكيز المثبطة الدنيا لمضاد الارثرومايسين .

ت	رقم العزلة	Isolates	Erythromycin
		Break point	≥64
1	3	*S.aureus*	≥64
2	6	*S.aureus*	≥64
3	7	*S.aureus*	≥64
4	8	*S.aureus*	≥64
5	9	*S.aureus*	≥64

≥64	*S.aureus*	10	6
≥32	*S.aureus*	11	7
≥64	*S.epidermidis*	12	8
≥3.2	*S.aureus*	13	9
≥64	*S.aureus*	14	10
≥64	*S.epidermidis*	16	11
≥64	*S.aureus*	21	12
≥16	*S.pyogenes*	22	13
≥64	*S.aureus*	25	14
≥64	*S.aureus*	26	15
≥64	*S.epidermidis*	27	16
≥32	*S.epidermidis*	31	17
≥64	*S.pyogenes*	40	18

6-4 . الكشف عن الجينين A *erm* و A *mef* بأستخدام تقنية P.C.R

أختبرت 12 عزلة تعود للأجناس *Staphylococcus* و *Streptococcus* والتي تحمل التسلسلات (6 ، 7 ، 9 ، 12 ، 14 ، 21 ،22 ، 25 ، 26 ، 34 ، 36 ، 40) إذ أستخدمت العزلة رقم 34 كسيطرة سالبة وهي حساسة للارثرومايسين بينما أختيرت بقية العزلات على وفق قيمة الـ MIC العالي إذ بلغت قيمة الـ MIC للعزلات المفحوصة الى (64>) كما وخضعت تلك العزلات لأختبار النمو على الوسط الزرعي الصلب المدعم بالارثرومايسين و كذلك مقاومتها المتعددة لمضادات الـ Macrolide عند أستخدام طريقة الاقراص Disc diffusion method فضلاً عن أنتاجها للعديد من عوامل الضراوة وذلك للكشف عن وجود جينات تشفر لمقاومة عناصر الـ Macrolide بأستعمال تقنية (PCR) من خلال أستعمال بوادئ Primers المتخصصة بالجينين A *erm* و A *mef* المجهزة من قبل شركة (Bioneer \ Korea) على وفق التسلسل المصمم من قبل (Sutccliffee و أخرون 1996 a ; Lim , 1996, Sutccliffee و أخرون ،2002) مع إجراء بعض التحويرات على برنامج التفاعل فيما يتعلق بدرجة حرارة الارتباط Anneling إذ أصبحت 52 مْ بدلاً من 53مْ . ثم تمت برمجة جهاز PCR كما موضح في الجدول (3-15) . و قد تم إستعمال الدنا القالب DNA template المحضر بأستخدام Mini gDNA Bacteria kit المجهز من قبل شركة Genaied وتم الكشف عن نواتج أستخلاص الدنا البكتيري بأستخدام تقنية التحليل الكهربائي لبعض العزلات و أستخدمت تقنية النانو Nano drop system لتحديد تركيز الدنا للقسم الاخر

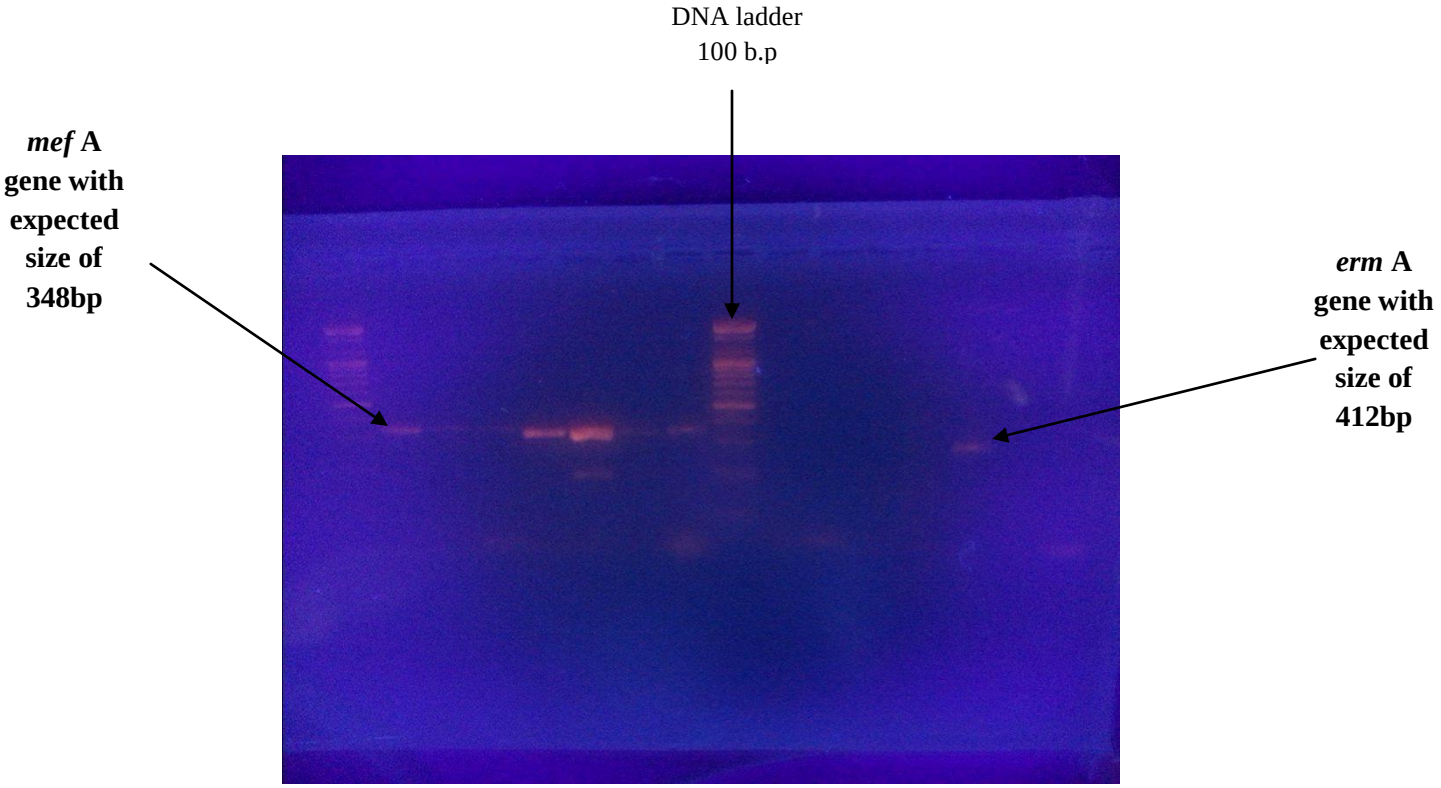
من العزلات و كما موضح في الجدول (4-19) .

جدول 4-19 : تراكيز الدنا البكتيري المستخلص بتقنية Nano drop System

Sample Type	Con(ng/ul)	260/280	Abs280	Abs260	Sample ID
dsDNA	406.8	1.93	4.21	8.135	40
dsDNA	93.5	1.91	0.981	1.87	26
dsDNA	5.9	1.55	0.076	0.118	14
dsDNA	69.8	1.1	1.269	1.396	25
dsDNA	10.6	1.49	0.143	0.213	21
dsDNA	10.7	2.12	0.101	0.214	12
dsDNA	28.8	1.21	0.477	0.576	6

رحلت نواتج التضاعف على هلام الأكاروز بتركيز 1% إذ لوحظ ظهور حزمة واحدة في جميع الحفر بالمستوى نفسه و ذلك بعد تعريض الهلام للأشعة فوق البنفسجية ، مما يدل على إرتباط البادىء مع التسلسل المكمل له على شريط القالب ، كما ولوحظ عدم ظهور أي حزمة بالنسبة للمسار الثاني لتوافر عينة سيطرة سالبة Control عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder المجهز من قبل شركة (Bioneer \ Korea) ذي الحزم المعروفة الأحجام الجزيئية . جاءت أحجام الحزم مماثلة للحجم المتوقع وهو (412 bp) بالنسبة للجين *erm* A و (348 bp) بالنسبة للجين *mef* A وذلك عند مقارنتها مع النتائج التي توصل اليها (Sutccliffee و أخرون 1996 a ; Lim ، 1996) . أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود نسبة عالية من العزلات تمتلك كلا أو احد الجينات قيد الدراسة ، إذ أظهرت 5 عزلات إمتلاكها للجين *erm* A أي بنسبة 50% تعود تلك العزلات للجنس *Staphylococcus* أما بالنسبة للجين *mef* A فقد أظهرت 8 عزلات 66.6% أمتلاكها لهذا الجين وتعود لكلا الجنسين *Staphylococcus* و *Streptococcus* ، كما و أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود نسبة عالية من عزلات *Staphylococcus* spp. تمتلك الجين *erm* A بواقع 5 عزلات من أصل 10 عزلات أي بنسبة 50% ، توزعت بواقع 4 عزلات 80% تعود للجنس *S.aureus* و عزلة واحدة 20% تعود للجنس *S.epidermidis* . كما و بينت الدراسة الحالية أن 7 عزلات 70% تعود للجنس *Staphylococcus* تمتلك الجين *mef* A كما

موضح في الجدول (4-20) و الشكل (4 -7) . أما بالنسبة للجنس *Streptococcus* فقد تم الكشف عن جينات المقاومة لعزلتين فقط من أصل 8 عزلات يعود السبب الى أن بقية العزلات حساسة لمضادات الـ Macrolide عند الكشف عن حساسيتها بالطرق التي ذكرت سابقاً الشكل (4 -10) ، اظهرت النتائج إن العزلتين تمتلك الجينين قيد الدراسة إذ أظهرت العزلة رقم 40 أمتلاكها للجين *erm* A في حين أظهرت العزلة رقم 20 إمتلاكها للجين *mef* A . و كما موضح في الجدول (4 -22) .



شكل 4 -7: الترحيل الكهربائي للكشف عن الجينين *erm* A و *mef* A المتضاعفة باستخدام تقنية (PCR) (الترحيل في هلام الأكاروز بتركيز (1%) وفرق جهد 80 فولت مدة قدرها خمس وأربعون دقيقة)

- **الجين *erm* A على اليمين من الصورة**

المسار رقم (1) : عزلة 25 *S. epidermidis* لا تحتوي الجين *erm* A

المسار رقم (2): عزلة 14 *S. epidermidis* لا تحتوي على الجين *erm* A

المسار رقم (3): عزلة 26 *S.aureus* محتوية على الجين *erm* A

المسار رقم (4): عزلة 40 *S. pyogenes* لا تحتوي على الجين *erm* A

المسار رقم (5): عزلة 6 *S.aureus* لا تحتوي على الجين *erm* A

المسار رقم (6): عزلة 36 *S.aureus* لا تحتوي على الجين *erm* A

المسار رقم (7): عزلة 21 *S. epidermidis* لا تحتوي على الجين *erm* A

- **أما الجين *mef* A على اليسار من الصورة**

المسار رقم (1): عزلة 25 *S. epidermidis* تحتوي على الجين *mef* A

المسار رقم (2): عزلة 14 *S. epidermidis* تحتوي على الجين *mef* A

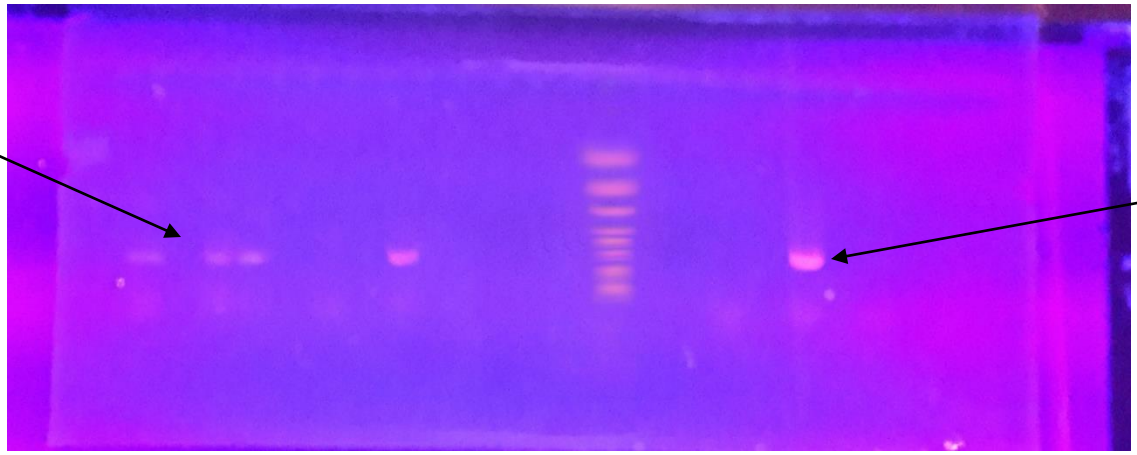
المسار رقم (3): عزلة 26 *S.aureus* تحتوي على الجين *mef* A

المسار رقم (4): عزلة 40 *S.pyogenes* تحتوي على الجين *mef* A

المسار رقم (5): عزلة 6 *S.aureus* تحتوي على الجين *mef* A

المسار رقم (6): عزلة 36 *S.aureus* تحتوي على الجين *mef* A

المسار رقم (7): عزلة 21 *S. epidermidis* تحتوي على الجين *mef* A



شكل 4 -12 : الترحيل الكهربائي للكشف عن الجينين *erm* A و *mef* A المتضاعفة باستخدام تقنية (PCR) (الترحيل في هلام الأكاروز بتركيز (1%) وفرق جهد 80 فولت مدة قدرها خمس وأربعون دقيقة)

- **الجين *mef* A على الجهة اليمنى من الصورة**

المسار رقم (1) : عزلة 7 *S.aureus* لا تحتوي على الجين *mef* A

المسار رقم (2) : ســـــــيطرة سـالبـة .

المسار رقم (3) : عزلة 9 *S.aureus* تحتوي على الجين *mef* A

المسار رقم (4) : عزلة 12 *S. epidermidis* لا تحتوي على الجين *mef* A

المسار رقم (5) : عزلة 22 *S.pyogens* لا تحتوي على الجين *mef* A

- **الجين *erm* A على الجهة اليسرى من الصورة**

المسار رقم (1) : عزلة 7 *S.aureus* محتوية على الجين *erm* A

المسار رقم (2) : ســـــــيطرة سـالبـة .

المسار رقم (3) : عزلة 9 *S.aureus* محتوية على الجين *erm* A

المسار رقم (4) : عزلة 12 *S. epidermidis* محتوية على الجين *erm* A

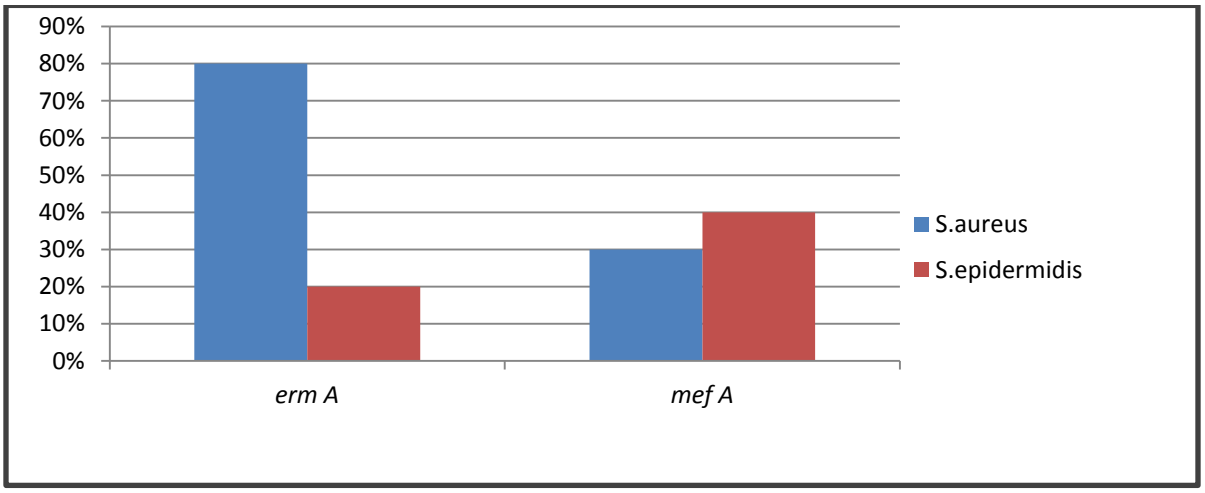
المسار رقم (5) : عزلة 22 *S.pyogens* محتوية على الجين *erm* A

جدول 4 -20 : الأعداد والنسب المئوية للعزلات قيد الدراسة المحتوية على الجينات *erm* A و *mef* A باستعمال تقنية الـ (PCR) .

الجينات	أعداد العزلات المحتوية على الجينات		النسبة المئوية %
	***Staphylococcus* spp.**	***Streptococcus* spp.**	
***erm* A**	**(50%) 5**	**(50%) 1**	**(50%)**
***mef* A**	**(70%) 7**	**(50%) 1**	**(66.6%)**

لوحظ أن جميع العزلات في الدراسة الحالية التي لم تظهر أي حزمة خلال الترحيل الكهربائي مع العلم أنها مقاومة للارثرومايسين عدا المسار رقم 2 في الشكل (4 – 8) إذ عدت كسيطرة سالبة قد يعود ذلك الى

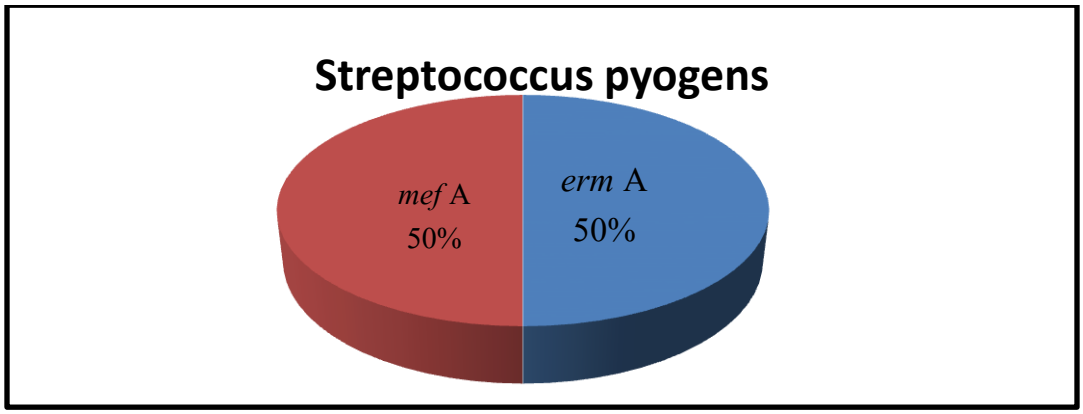
أمتلاك تلك العزلات لجينات المقاومة الى أن تلك الجينات محمولة على بلازميد صغير وقد يفقد هذا البلازميد أحياناً (Zmantar و أخرون ، 2011) . تقاربت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل له الباحث Aktas و أخرون ، (2011) في تركيا إذ وجد أن نسبة 50% عزلات *S.aureus* تحتوي على الجين *erm* A وهي بذلك تتقارب مع نتائج الدراسة الحالية ولكن النتائج التي توصل لها نفس الباحث في ما يخص *S.epidermidis* أقل بكثير مما توصلت له نتائج الدراسة الحالية إذ وصلت نسبة أمتلاك تلك البكتريا للجين *erm* A 8.9% ، أشار الباحث Aktas ، (2011) الى أن هناك تفاوت في توزيع جينات المقاومة في مختلف بلدان العالم أو قد يكون التفاوت من مستشفى الى أخرى وقد يكون من شخص لأخر إذ يرتبط هذا التفاوت بالاستخدام الواسع و العشوائي للارثرومايسين في كل بلد بالضافة الى عمر الشخص و مصدر العينة



شكل 4-8 : النسب المئوية لتواجد الجينات قيد الدراسة في *Staphylococcus* spp.

لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل له الباحث Duran و أخرون ، (2012) في دراسة قام بها في جامعة مصطفى كمال في تركيا إذ أشار الى أن 33% من مجموع عزلات *S.aureus* تمتلك الجين *erm* A , أما بالنسبة للجنس *S.epidermidis* تقاربت نتائج الباحث نفسه جزئياً مع ما نتائج الدراسة الحالية إذ رأى أن 11.4% من عزلاته تمتلك الجين *erm* A ، كما وتتقارب نتائج الدراسة الحالية مع دراسة قام بها Chaieb و أخرون ، (2007) في تونس إذ توصل الى أن 12.5% من عزلات *S.epidermidis* تمتلك الجين *erm* A ولكنها تختلف معه فيما يخص الجين *mef* A إذ توصل الى عزلاته جميعها لا تمتلك هذا الجين وبنسبة 0% . و في دراسة أخرى قام بها الباحث Saderi و أخرون ، (2011) في إيران إذ توصل الى إن 60.3% من عزلات *S.aureus* تمتلك الجين *erm* A وهي بذلك تتقارب جزئياً مع نتائج الدراسة

الحالية . كما وأشار Saderi و أخرون ، (2011) الى أن نسبة توافر الجين *erm* A في عزلات *S.aureus* في مملكة الدنمارك قد وصل 16% و في تركيا وصلت الى 48% وهي أقل من ما توصلنا له في الدراسة الحالية . وفي دراسة أخرى قام بها الباحث Reyes و أخرون ، (2007) شملت سبع مستشفيات كبرى في كولومبيا إذ توصل الى أن نسبة وجود الجين *erm* A في عزلات *S.aureus* المقاومة للمثيسيلين (MRSA) وصل الى 73.5%. شخصت العديد من مورثات *erm* في سلالات MRSA مثل *erm*A و *erm*B و *erm*C المسؤولة عن المقاومة للـ Macrolide (Spiliopoulou و أخرون ،2004) ، وقد أشـــــار الباحث Jorgensen وأخرون (2004) أنَ نسبة 5% من سلالات MRSA أظهرت تنوعاً في *erm* عند تحليلها باستعمال تقنية PCR ، بينما أكدت دراسة Leclercq ، (2002) على ظهور ارتباط أكيد للجينات *erm* A و *erm* C مع عزلات MRSA ، إذ وجد ان 21 عزلة تمتلك أحدى أنواع الجينات سابقة الذكر من مجموع 128 عزلة تعود للسلالة MRSA وبنسبة 16.4% .



شكل 4 - 9 : النسب المئوية لتواجد الجينات قيد الدراسة في *Streptococcus* pyogenes .

أشارت الخضيري ، (2008) الى تشخيص الجينات المسؤولة عن تشفير المقاومة للأرثرومايسين في عزلات MRSA وهي *erm*A ، و *erm*B ، و *erm*C ، و *ere*A ، إذ يمتاز الجين *erm* A بغالبية تواجده في عزلات MRSA وبنسب عالية أما الجين *erm* B يتواجد في عزلات MRSA ذات الارتباط المباشر مع المقاومة المحفزة للكلندامايسين وضمن نفس الدراسة فقد تم إيجاد علاقة بين النسب المرتفعة للجين *erm*A مع عزلات MRSA المقاومة للأرثرومايسين بنسبة 88% ، التي تؤلف نسبة مرتفعة ومقاربة للنسبة المسجلة في الدراسة الحالية . أكد الباحث Hatkar و أخرون ، (2014) الى أن 90% من سلالات MRSA تقاوم مضادات الـ Macrolide و خصوصاً الارثرومايسين وبنسبة 91.3% يعود السبب لامتلاكها لجينات

تشفر لمقاومة عديد المضادات الحياتية . أما بالنسبة للجنس *Streptococcus pyogenes* فقد أظهرت نواتج الكشف وجود جين واحد في كل عزلة من العزلتين المفحوصتين وبذلك فأن نسبة أمتلاك الجين هي 50% شكل (4-9) ، إذ تقاربت تلك النتيجة جزئياً مع ما توصل له López و أخرون ، (2012) الذين اجروا دراسات (1994- 2006) في أسبانيا إذ توصل الى 35% من عزلات *S. pyogenes* تمتلك الجين *erm*A في حين لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل له López و أخرون ، (2012) بالنسبة للجين *mef* A الذي وجد بأن 89% من عزلاته تمتلك هذا الجين . توصلت Richter و أخرون ، 2005 الى أن (46%) من عزلات *Str.pyogenes* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في الولايات المتحدة الاميركية تمتلك الجين *erm*A و 43% تمتلك الجين *mef* A وهي بذلك تتقارب تماماً مع نتائج الدراسة الحالية ولكن يعزو سبب الاختلاف بين نتائجنا و نتائج الباحثين الاخرين الى الفرق في عدد العزلات التي خضعت للاختبار . في ألمانيا توصل الباحث Reinert و أخرون ، (2004) الى أن 55.5% من عزلات *Str.pyogenes* تمتلك الجين *mef* A المشفر لمضخة الدفق Efflux pump ، كما وتوصل الى ان 31.5% من العزلات نفسها تمتلك الجين *erm*A إذ تتقارب نتائج Reinert و أخرون ، (2004) مع ما توصلنا له في الدراسة الحالية . تمكنت تقنية (PCR) من إعطاء نتائج ذات دقة عالية وحساسية نوعية إذ تعد من أحد أهم التقنيات التشخيصية التي يتم من خلالها اختصار العديد من الاختبارات التقليدية مع هذا فأن الطرائق التشخيصية الأخرى في هذه الدراسة مثل (طريقة الأقراص ، طريقة التخطيط على الوسط الزرعي الصلب ، طريقة التركيز المثبط الأدنى) أعطت نتائج مقاربة لنتائج تقنية (PCR) .

المراجع العربية

أبو ريشة , رسمية عبد ; سلوم , دنيا فريد و لميس خليل . (2007) . دراسة تأثيرالفا هيمولايسين المنتج من *Staphylococcus aureus* على عملية البلعمة خارج الجسم الحي . المجلة العراقية للعلوم . المجلد , 48 . العدد , 1 . ص 14 – 17 .

أسماء ، محمد سعود ، غازي منعم عزيز و الخفاجي ، زهرة محمود (2009) . تحديد الضروف المثلى لأنتاج أنزيم البروتييز من بكتريا *Staphylococcus aureus* AG10 المعزولة محلياً . المجلة العراقية للتقانات الاحيائية . المجلد 8 ، العدد (1) ، ص:10-26 .

البارودي ، أيناس سامي محمود (2010) . تأثير مكونات بعض المحاليل الوريدية على بكتريا *Staph. aureus* و *Staph. epidermidis* المعزولة من اللوزتين ، رسالة ماجستير ، كلية التربية \ جامعة الموصل .

البغدادي ، إسراء عدنان إبراهيم (2006) . دراسة بكتريولوجية ووراثية للمسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي ، رسالة ماجستير \ جامعة بابل .

التميمي ، أحمد عيسى جعفر (2012) . دراسة وراثية لبكتريا *Staphylococcus* spp. المقاومة لمضاد الفانكومايسين . رسالة ماجستير ، كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى .

التميمي ، زينب عامر حاتم (2013) . دراسة بكتريولوجية و وراثية لبكتريا *Streptococcus pyogenes* المعزولة من مرضى مصابين بالتهاب اللوزتين في مدينة المقدادية ، رسالة ماجستير ، كلية التربية للعلوم الصرفة \ جامعة ديالى .

التومي ، عبد الرزاق سليمان , الامام ، محمد محمد, أبو زويدة ، عبد الباسط رمضان . (2013). أساسيات التشخيص البكتريولوجي المعملي السريري . مركز بحوث التقنيات الاحيائية.

الجنابي ، حمدي نايف ; عبد الرضا ، حسن علي ; مطر, حسن علي و العسافي , أدهام علي . (2008) . أنتشار بكتريا *stapylococcus saprophyticus* في الجهاز البولي لمرضى مدينة الفلوجة . مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة , العدد الثاني ,المجلد الثاني .

الجليلي، محمود. (1983). المعجم الطبي الموحد .الطبعة الثالثة. اتحاد الاطباء العرب . مطبعة المجمع الطبي العراقي.

جاسم ، نهاد كاظم (2006) . دراسة بكتيريولوجية ووراثية للعنقوديات السالبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم . رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة بابل .

الحسناوي ، ضياء شنان عبد الكاظم .(2006) . دراسة بكتريولوجية ومناعية على بعض البكتريا الهوائية المسببة لألتهاب اللوزتين الحاد والمزمن في محافظة النجف ، رسالة ماجستير . كلية العلوم – جامعة الكوفة .

الحسو،محمود زكي , النعيمي ، أنفال عبد السلام (2007) . دراسة حساسية جرثومة *Staphylococcus aureus* للمضادات الحياتية . مجلة التربية و العلم ، المجلد (19) ، العدد (1) , ص 144-154 .

الحلفي ، عبد القادر كريم (2008) . دراسة التاثيرات المرضية لطافي خلايا *Staphylococcus xylosus* المقتولة بالمضادات الحياتية ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم / جامعة بغداد .

الخضيري ، ميعاد كاظم علي (2008) . دراسة بكتريولوجية ووراثية للمكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيسيلين المعزولة من مستشفيات مدينة النجف . رسالة ماجستير ، كلية التربية للبنات – جامعة الكوفة .

الخفاجي ، زهرة محمود , أبو المعالي ، حسن محمود . 2013 . تفاعلات الكوثرة و تصميم البوادئ . معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الحيوية للدراسات العليا . جامعة بغداد .

الخفاجي ، زهرة محمود . (2008 أ) . الاحياء العلاجية . معهد الهندسة الوراثية و التقانة الاحيائية للدراسات العليا . جامعة بغداد .

الخفاجي ، زهرة محمود . (2008 ب) . التقنية الحيوية الميكروبية (تقنيات جزيئية) . معهد الهندسة الوراثية و التقانة الاحيائية للدراسات العليا . جامعة بغداد .

خلف ، صبحي حسين , الكناني ، أنتصار رحيم , علي ، ذكرى سالم . (2006) . دراسة مرضية لجراثيم المكورات العنقودية السالبة لانزيم التجلط المعزولة من حالات التهاب المجاري البولية للنساء . مجلة علوم الرافدين ، المجلد 17، العدد9 ، ص 263- 277 .

الدهان ، بان عباس (2010) . دراسة أهمية مزج مركبات Macrolide شبه المصنعة في تثبيط مقاومة المكورات العنقودية الذهبية في الزجاج وداخل الجسم الحي . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري - جامعة بغداد .

الزهيري ، عهود عقيل راضي . (2005) . أخماج المستشفيات الناتجة عن المكورات العنقودية الذهبية في محافظة ديالى . رسالة ماجستير ، كلية التربية (ابن الهيثم) – جامعة بغداد .

السعدي ، عادل عبيد حسوني ، عباس فاضل ، رياض كزار و جمهورية سعدي . (2014) . أ ستخلاص و تنقية البروتين المرتبط بالفايبرونكتين من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية . مجلة جامعة بابل، العلوم الصرفة و التطبيقية . العدد (3) . المجلد (22) . ص 1303- 1309 .

سعود, أسماء محمد ; عزيز , عزيز محمود و الحفاجي , زهرة محمود . (2009) . تحديد الضروف المثلى لانتاج البروتيز من بكتريا *Staphylococcus aureus* AG10 المعزولة محلياً . المجلة العراقية للتقانات الاحيائية . المجلد (8) . العدد (1) . ص 10 – 26 .

سمير مرعي ، (2011) المعزولات الجرثومية وحساسيتها للصادات الحيوية في مستشفى الاطفال بجامعة دمشق . مجلة دمشق للعلوم الصحية . المجلد 27 ، العدد الاول .

الشعّار ، زبيدة طارق فتحي . (2002) ، دراسة تشخيصية و إمراضية لجرثومة *Streptococcus agalactiae* GBS المعزولة من النساء في مدينة الموصل . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل .

العبودي ، مها عبد الجبار (2002). عزل وتنقية Streptolysin O جزئيا من بكتريا *Streptococcus pyogenes* المعزولة من الأطفال ودراسة فعاليته. رسالة ماجستير، كلية العلوم-الجامعة المستنصرية .

علي ، فاطمة عبودي و عبد الله ، باسمة أحمد . (2012) . تحديد العوامل الوراثية المسؤولة عن صفة المقاومة للمضادات الحيوية في جرثومة *Staphylococcus sciuri* . المجلة العراقية للتقانات الاحيائية العدد (11) . المجلد (2) . ص 182-195 .

عيسى، مي طالب فليح (2000) . دراسة على انزيم الـ Cystein protease المنتج من بكتريا *Streptococcus pyogenes*. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم- جامعة بغداد .

القوادري، فايزة أحمد (2000) . تأثير متعدد السكريد المستخلص من بكتريا *Streptococcus pyogenes* المعزولة من الأطفال على الخلايا المناعية. رسالة ماجستير، كلية العلوم-الجامعة المستنصرية.

القيسي , إبراهيم نواف سعود ,خلف جاسم محمد الدليمي و نواف ' أزل إبراهيم . (2007) . دور البلازميدات في مقاومة بكتريا *Salmonella* لبعض المضادات الحياتية . مجلة الانبار للعلوم الزراعية . المجلد (5) . العدد (1) . ص 198 – 202 .

الكريمي ، خالدة كريم و الخفاجي ، زهرة محمود (2010) . تأثير ثنائي الاستيل في البكتريا المعزولة من أصابات القناة التنفسية . مجلة تقني . معهد الهندسة الوراثية والتقانات الاحيائية . جامعة بغداد .

المالكي ، افراح عبد الرضا (2009) . دراسة حول عزل بعض أنواع المكورات العنقودية المقاومة للمثسلين MRSA وMRSE من المرضى في بعض مستشفيات بغداد ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم / الجامعة المستنصرية .

المسعودي ، حامد جهاد ، الدوري ، سند شامل و السعدي ، كوكب عبد الله . (2013) . الكشف عن قدرة البكتريا المعزولة من التهاب اللثة على تكوين Biofilm . مجلة جامعة كربلاء العلمية .المجلد (11) . العدد (3) . ص 276-282 .

نجيب , ليث مصلح . (2011) . دراسة دور بلازميدات بعض العزلات البكتيرية تجاه بعض المضادات الحيوية . مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة . المجلد الخامس ، العدد الثالث .

References

Aktas , A. Aridogan,A. ; Kayacan , C.B.and Aydin , B. (2011) . Resistance to Macrolide, Lincosamide and Streptogramin Antibiotics in Staphylococci isolated in istanbul, Turkey. J . Microbiology, 45 (4) : 286-290 .

Al-Junadi , A.A.S. (2005). Immunological Study on TSST-1 Extracted from *Staphylococcus aureus* Isolated from Skin Infections. Ph.D. Thesis. College of Science. AL-Mustansiriya University.

Al-khalidi , A.S. and Al-taee , S.S . (2013) . Detection of Sortase Enzymes and Cyl operon A and B of *Streptococcus agalactiae* by PCR . Med . J. Babylon , 10(4) .

AL-Sheikh, E.B.N. and Yosif, H.S. (2014) . Study the effect of Lysostaphin , Methicillin resistant *Staphylococcu aureus*(MRSA) biofilm formation . J. Scien. 55 (1) :93-100 .

Baker, C.J. (1997). Group B streptococcal infections. Clin. Perinatol. 24: 59-70.

Baron , E.J. and Finegold , S.M .(1990) . Bailey and scotts diagnostic Microbiology . 8thed Mosby . Co . USA

Baron, E.J.; Pelerson, L. R.; and Finegold , S.M. (1994*).* *Enterobacteriaceae* . In : Baiely and Scott's Dagnostic Microbiology,(9th ed.) , Mosby –year book Inc ,USA .

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(2004) . Toxanomic Outlines of the Prokaryotes Bergey's Manual of Determinativen Bacteriology .2nd Ed. Edited by George ,M.G.; Julia , A.B. and Timothy, G.L. Springer ,New York ,Berlin and Heidelberg .p:184-188 .

Bessen , D.E. (2009) . Population Biology of the Human Restricted Pathogen , *Streptococcus pyogenes* .j. Infect Genet Evol. 9(4): 581–593.

Bhardwaj , J.S ; Angayarkanni, J ; Bhattacharya, S ; Das, A. and Palaniswamy , M. (2013) . Isolation, screening and charctrization of beta-hemolytic Streptococci with potential of streptokinase production. *Int. Res. J. Biologic. sci* . 2(4):63-66.

Brook , G.F. ; Caroll, K.C. ; Butel, J.S. and Mores, S.A. Maietzner , T.A. (2010) . Jawets, Melnik and Adelberg's Medical Microbiology. 25th.ed. The McGraw- Hill companies .

Brown , D. F. J ; Edwards, D. I ; Hawkey, P. M.; Morrison, D.; Ridgway, G. L.; Towner, K. J. M.; and Wren, W. D. (2005). Behalf of the joint working party of the britis guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Anti. Chemo . 56 (6): 1000-1018.

Burnett, D. and Crocker, J. (2005). The Science of Laboratory Diagnosis. 2nd edition. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium. England. UK:444-448.

Busowski , M.T. Lee , M . Busowski , J.D. Akhter , K. and Wallace , M.R. (2013) . Case Report Puerperal Group A Streptococcal Infections: A Case Series and Discussion . Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Medicine Volume 2013, Article ID 751329, 4 pages .

Butt, H. L.; Dunsyon, R.; McGregor, N.; Roberts, J.; Zerbes, M. and Klincherg, I. (1998). An association of membrane damaging toxin from coagulase negative Staphylococcus .

Caosta , S.S ; Miguel , V; Leonard , V. and Isabel , C . (2013) . Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update . The J. Op. Microbio. 7 (Suppl 1-M5) : 59-71 .

Carapetis , J. R ; Steer AC. ; Mulholland E.K. ; Weber M. (2005) . The global burden of group A streptococcal diseases. The Lancet Infectious Diseases; 5:685–694.

Chaieb , K. Zmantar,T . ; Chehab, O. ; Bouchami , O. ; Ben Hasen , A . ; Mahdouani , K. and Bakhrouf , A. (2007) . Antibiotic Resistance Genes Detected by Multiplex PCR Assays in *Staphylococcus epidermidis* Strains Isolated from Dialysis Fluid an Needles in a Dialysis Service . Jpn. J. Infect. Dis. 60: 183-187.

Cheung , G.Y.C. and Otto , M . (2010) . Understanding the significance of *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in babies and children . Curr. Opin. Infect. Dis. 23(3) : 208–216.

CLSI (2012) . Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. 32(8). CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.

Collee, J.S.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). Mackie & MeCartney practical medical microbiology. 20th ed. Vol.1. Churchill living stone . London .

Cruickshank , R . ; Duguiol , J.P. ; Marmion , B.P. and Swain , R.H.A. (1975). Medical Microbiology 14thed . Churchill living stone Edniburg London and new York.

Cunha, M.L.R.S.; Rugolo, L.M.S.S. and Lopes, C.A.M.(2006) . Study of virulence factors in coagulase-negative staphylococci isolated from newborns. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 101 (6) :661-668.

Dadawala, A.I. ; Chauhanm, H. C. ; Chandelm, B. S. ; Ranaware, P. ; Patel , S. S. ; Khushboo, S. ; Ratod, P. H.; Shah, N. M. and Kher, H. N. (2010). Assessment of *Escherichia coli* isolates for *in virto* biofilm production. Vet. World . 3(8) : 364-366.

Demuth , D. R., and Lamont , R. (2006). Bacterial cell-to-cell communication Rol in virulence and Pathogenesis . AMCM. 10(13):97-105.

Dimitriu , T. Lotton , C. Capelle,J.B. Misevic, D. Brown,S.P. Lindner,A.B. Taddei , F . (2014) . Genetic information transfer promotes cooperation in bacteria . PNAS | 30: 11103–11108

Dinges , MM. Orwin , P.M. Schlievert,P.M. (2000) . Enterotoxin of *Staphylococcus aureus* . Clin. microbio. rev . 13(1) : 16-34 .

Duran, N. Ozer, B. Duran , G.G . Onlen , Y . & Demir, C. (2012) . Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci . Ind. J. Med. Res . 135: 389-396 .

Facklam , R.R. and Teixeria, L.M. (1997). Enterococcus. In : Collier, A., Balow, S. and Sussman, M., (Eds.,), Microbiology and microbial infections. Topicey and Wilson. 9th ed., Edward Arnold, London, pp.669-682.

Falagas , M. E ; Rosmarakis, E.S. ; Avramopoulos, I. and Vakalis, N. Streptococcus agalactiae infections in non-pregnant adults .2006. single center experience of a growing clinical problem. Med. Sci. Monit. 12: PP. 51- 447.

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

Fey , M . D. , Olson , M . E . (2010) . Futu. Microb. 5(6): 917–933.

Flaih, M.T. Al-Mathkhury, H.J.F. and Fleih , A.S. (2009) . Journal of Al-Nahrain University ; 12 (4) : pp.132-136 .

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

Forbes, B.A. , Sahm, D.F. and Wessifeld, A.S.(2007).Diagnostic Microbiology.12thed.Elsevier.Pheladelphia.USA:276-216.

Freeman, D.J, Falkiner, F.R. and Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococc.

Frieden , T. (2013) . Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 . Director, U .S . Centers for Disease Control and Prevention . United States House of Representatives .

Gillespie , S., Hawkey,P.,(2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology . Second Edition. John Wiley & Sons Ltd., England

Giovanetti, E.; Brenciani, A.; Burioni, R.; Varaldo, P. E. (2002). A noval efflux system in inducibly erythromycin resistant strain of *S. pyogenes*. Antim. Ag. Chemo. 46: 3750–3755.

Gordon , R . G.; Miragaia , M. ; Weinberg , A.D. ; Lee , C.G. ; Rolo , G. ; Giacalone, G.C. ; Slaughter , M.S. ; Pappas, P. ; Naka , Y. ; Tector , A.G. ; Lencastre , H.D. and Lowy , F.D .(2012) . *Staphylococcus epidermidis* Colonization Is Highly Clonal Across US Cardiac Centers . J. Infect. Dis . 205: 1391–1398 .

Butt, H. L.; Dunsyon, R.; McGregor, N.; Roberts, J.; Zerbes, M. and Klincherg, I. (1998). An association of membrane damaging toxin from coagulase negative Staphylococcus.

Götz , F., Bannerman,T., Schleifer,K. (2006) . The Genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. Prokary. 4:5–75 .

Guilfoile , P.G. Heymann , D. (2007) . Antibiotic-Resistant Bacteria . Chelsea House .

Hafeth ,A.A.(2010). In vitro antibiotic susceptibility and biofilm formation to *Staphylococcus epidermidis* isolates from health care workers in Al-Hussein teaching hospital in Al-Nasserya city . the j.of the coll. of Educa. for pur. scie . 2 (1) : 5-9 .

Hakansson , A.; Bentley, C. C.; Shakhnovic, E. A. and Wessels, M. R. (2005). Cytolysin dependent evasion of lysosomal killing . Proc. Natl. Sci. USA. 102: 5192–5197.

Hala , M .H .H .2011. Comparative Study between Methicillin-Resistant Coagulase Positive and Negative Staphylococci . M.Sc.Thesis. College of Science. University of Baghdad .

Hallin , M.; Deplano, A.; Denis, O.; DeMendonca, R.; DeRyck, R.; and Struelens, M. J. (2007b). Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 45: 127-133.

Hatkar , S.S. Bansal, V.P. Mariya, S. Ghogare, H.S. (2014) . Antimicrobial Profile of Inducible Clindamycin Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated From Clinical Samples. International Journal of Health Sciences & Research ,(4) Issue: 6 .

Irlinger ,F. ; Loux,V. ; Bento,P. ; Gibrat,J.F. ; Straub,C. ; Bonnarme,P. Landaud,S. and Monnet,C. (2012) . Genome Sequence of

Staphylococcus equorum subsp. equorum Mu2 , Isolated from a French Smear-Ripened Cheese . J. Bacter. 194 (18) : 5141–5142 .

Ismail , M. CH. , Ali , F.I. and Mohammed , S.W. (2011) . Production of Slime Layer by *Staphylococcus epidermidis* Isolated From Corneal Infection . Baghdad Sci . J . 8(3) : 740- 744 .

Janštová , B ; Necidová , L and Janštová , B . (2012) . Comparing the growth of *S. aureus* and production of *Staphylococcal* enterotoxin c in sheep's and goat's milk . J. Microbiology, Biotechnology and Food Sciences . 1 (February Special issue) : 758-768 .

Jasim , H .s . (2012) . Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from nasal cavity of Health care personnel . j. of med. Baghd. 45 : 344-348 .

Jasir, A . ; Stahl , S. and Schalen, C. (2000). Molecular characterization of classical and novel MLS antibiotic resistance in Swedish clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* .Department of infectious disease and medical microbiology and department of microbiology, University of Lund , Sweden.

Jorgensen , J. H. ; Crwford, S. A.; McElmeel, M. L. and Fiebelkorn, K. R. (2004). D-zone test clindamycin resistance of staphylocci in conjunction with performance of automatically detection. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 42: 1800-1802.

Kataja , J , Huovinen, P. and Seppala , H. (2000). Erythromycin resistance genes in group A *streptococci* of different geographical origins. J AntiChemo . 46: 789–792.

Katzung , B.G.(2009).Basic and Clinical Pharmacology, 9th edition . section VIII .Chemotheraputic Drugs. Mc Graw Hill Medical. chapter 44 : 745 – 755.

Kayser , F.H . ; Bienz , K . A . and Eckert , J . (2005) . Medical Microbiology . Thieme . Stuttgart . New York .

Kebaier , C. ; Chamberland , R.R. ; Allen , I.C. ; Gao, X.I. ; Broglie, P.M. ; Hall, J.D. ; Jania,C. ; Doerschuk , C.M. ; Tilley , S.L. and Duncan, J.A. (2012) . Staphylococcus aureus a-Hemolysin Mediates Virulence in a Murine Model of Severe Pneumonia Through Activation of the NLRP3 Inflammasome . (2012) . J. Infect Dis . 205:807–17 .

Klausner, JD.; Passaro, D; Rosenberg, J.; Thacker, W.L.; Talkington, D.F. ;Werner, S.B.and Vugia, D.J. (1998). Enhanced control of outbreak of *Mycoplasma pneumoniae pneumonia* with Azithromycin prophylaxis. J. of Infect. Dis . 177: 161–166.

Kleine , K . ; Gatermann , S . and Sakinc*, C . (2010) . Genotypic and phenotypic variation among *Staphylococcus saprophyticus* from human and animal isolates . BMC Rese. Not. 3:163 .

Koneman , E.W. ; Allen, S.. ; Dowell, V.R. and Winn, W. C. (1986). "Color Atlas and textbook of diagnostic Microbiology". 7th, J. B. Lippincott, Philadelphia.

Koneman , E.W. ; Allen, S.D. ; Janda, W.M. ; Sehreckenberger, P.C.; and Winn, W.C. (1997) . "Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology". 5th . J.B. Lippincott-Raben Publishers , Philadelphia.

Koneman , E.W; Allen , S.D . ; Janda, W.M . ; Schreckenberger , P.C. and Winn, W.C.J.(1992). Color Atlas and Textbook Of Diagnostic Microbiology. (4th) ed. J.B.Lippincott Company. Philadelphia.

Kuroda , M. ; Yamashita , A. ; Hirakawa , H. ; Kumano , M. ; Morikawa. K. ; Higashide, M. ; Maruyama , A. ; Inose, Y. ; Matoba, K. ; Toh, H. ; Kuhara , S. ; Hattori, M. and Ohta , T. (2005) . Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection ; PNAS . 102 (37) : 13272–13277 .

Kwiatkowska , B. Ma´sli´nska , M. (2012) . Macrolide Therapy in Chronic Inflammatory Diseases . Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation . Volume 2012, Article ID 636157, 7 pages

Lampson , B. C. ; Von david W. and Parisi , J. T. (1986) . Novel mechanism for plasmid-mediated erythromycin resistance by pNE24 from *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Ag. Chemoth. 30:653–658.

Larson , E. (2007). Community factors in the development of antibiotic resistance.. Annu. Rev. Pub. Heal. 28: 435–447.

Leboffe , M.j. and Pierce , B.E. (2011). APhotographic Atlas for the Microbiology Labortary 4 th . Morton Publishing Company .

Leboffe , M.J. and Pierce , B.E. (2012) . A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory . 4th Edition . Morton .

Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 34: 482-492.

Lim , J. A. ; KWON , A . R. ; Kim , S. K. ; Chong , Y. ; Lee , K. and Choi , E. C. (2002) . Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital . J. Anti. Chemo . 49: 489–495

López ,V.R. ; Valdezate,S. ; Álvarez,D. ; Villalón,P. ; Medina, M.J. ; Salcedo,C. and Sáez-Nieto,J.A. (2012) . Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of Streptococcus pyogenes isolates resistant to erythromycin and tetracycline in Spain (1994–2006) . BMC Microbio . 12 (215) :1-11.

Lovmar , M. , Tenson , .T. and Ehrenberg,M. (2004) . Kinetics of Macrolide Action . Amer. Soc. for Bioch. and Molec. Biol. Inc. 279(51) : 53506–53515.

Luna ,V.A . Heiken , M . Judage,K .Ulep,C. Kirk , N.V. Luis , H . Bernardo, M . Leitao . J . and Roberts M.C. (2002). Distribution of *mef*(A) in Gram-Positive Bacteria from Healthy Portuguese Children . Antim . Ag. Chemoth. 46(8) : 2513–2517 .

MacFaddin , J. F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd . Lippincott Williams and Wilkins, USA.

Richter, S.S. ; Heilmann , K.R.; Beekmann, S. E. ; Miller, N.G. ; Miller ,A.L. ; Rice, C.L. ; Doern, C.D. ; Reid, C.D. and. Doern , G.V.(2005) . Macrolide Resistant *Streptococcus pyogenes* in the United States, 2002–2003 . Clini. Infect. Dis . 41: 599 – 608 .

Madigan ,M.T. ; Martinko , J.M . ; Stahl , D.A. and Clark , D.P . (2012) . Brock Biology of Microorganisms. 13ed . Benjamin Cummings , 1301 Sansome Street , San Francisco .

Maisey, H.C. ; Doran, K.S. and Nizet , V . (2008) . Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. Expert. Rev. Mol .Med . 10: e27 .

Mankin , A.S. (2008) . Macrolide myths . Curr Opin Microbiol. 11 , (5) : 1 – 14 .

Martineau , F. ; Picard , F.J. ; Me ´Nard , CH. ; ROY , P.H. ; Ouellette , M. and Bergeron , M. (2000) . J. Clin Micro. 38(9) : 3280–3284.

Mathur , T.; Singhal, S. ; Khan , S. ; Upadhyay, D.J. ; Fatma, T. and Rattan, A. (2006). Detection of Biofilm Formation among The Clinical Isolates of Staphylococci: An Evaluation of Three Different Screening Methods. Indian J. Med. Microbiol. 24(1) :.25-29.

Matsubara , K and Yamamoto, G. (2009) . Invasive group B streptococcal infections in a tertiary care hospital between 1998 and 2007 in Japan . Int. J. Infect. Dis . 13:679-84.

Meier , A. ; Kirschner , P. ; Burkhardt S. ; Steingrube , V.A. ; Brown , B.A. ; Wallace, R.J.and Böttger E.C.(1999) . Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin resistant Mycobacterium intracellular , Antim . Ag. Chem . 38 : 381-384.

Moirangthem , A . and Gurung , K .(2013) . Bacteriological analysis and its Antibiogram profile of pharyagitis cases from the patients attending hospital . Sikkim . India . BMJ.J , 2(1):10-13.

Mora , M. B. G . Group of streptococcus produce pilus –like structure containing protective antigens & lane field T antigens. (2005) . Poc. Natl. Acad. Sci . USA , 102(43): 16541-6.

Nicholl , D.S.T . (2008) . An introduction to genetic engineering . Third edition . Cambridge University press .

Nishifuji , K . ; Sugai , M . and Amagai , M. (2008) . Staphylococcal Efoliative Toxins : “ Molecular scissors “ of bacteria that attack the cutaneous defence barriers in mammals . j . Dermato. Sci . 49(1) :21-31 .

Noedl ,H. ; Krudsood, S. and Chalermratana, K.(2006). Azithromycin combination therapy with artesunate or quinine for the treatment of

uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in adults: arandomised, phase 2 clin. Tri. in Thail. .43 : 1264-1271.

Otto , M . (2009) . *Staphylococcus epidermidis* – the "accidental" pathogen . Nat. Rev. Microbiol . 7(8): 555–567.

Otto , M . (2012) . Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections . Semin. Immunopathol. ; 34(2) : 201–214.

Patel, M. ; Waites, K. B.; Moser, S. A.; Cloud, G. A. and Hoesley, C. J. (2006). Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.44: 2481-2484.

Prescott,L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. (2005). Microbiology. 6th ed. McGraw. Hill companies Inc. New York.

Ragiamohan , G . and Kanak, L . Dikshit . (2000) . Role of the N-terminal region of Staphylokinase (SAK) : Evidence for the particiation of the n-terminal region of (SAK) in the enzyme substrate comlex formation . FEBS Letters . 474 151158 .

Razak , M.S . and Al-Jebori , R.F.(2012) . Molecular study of storase enrzyme and characterization of some virulence factors in *streptococcus pyogenes* . Med. J. Baby. 9(1):74-83.

Reddy , K.K.N. (1980), 'Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase', In: Kline D.L. and Reddy K.K.N. (Eds.), Fibrinolysis, CRC Press, Boca Raton, FL, : 71-94.

Regan , J.A. ; Gibb, R.S. ; Rettig, P.J. ; Nugent, R.P. ; Martin, D.H ; and Edelman, R., (1996). Colonization with group B streptococci in

pregnancy and adverse outcome. Am. J. Obstet. Gynecol., 174(4): 1354-1360.

Reinert , R.R. ; Lutticken , R. ; Sutcliffe , J.A. ; Kamradt , A.T. ; Cil , M.Y. ; Schorn, H.M. ; Bryskier , A. and Al-Lahham , A. (2004) . Clonal Relatedness of Erythromycin-Resistant *Streptococcus pyogenes* Isolates in Germany . Antimic. Ag. and chem.. 48(4) : 1369–1373.

Reyes , J . ; Hidalgo , M. ; Dı i´a z , L . ; Rinco´n , S. ; Moreno , J. ; Vanegas , N. ; Castaneda , E. and Arias , C.A. (2007) . International J. of Infect. Dis . 11: 329—336 .

Richards , V.P. ; Lang , P. ; Bitar, P.D.P. ; Lefébure , T. ; Schukken, Y.H. ; Zadoks, R.N . and Stanhope , M.J. (2011) . Comparative genomics and the role of lateral gene transfer in the evolution of bovine adapted *Streptococcus agalactiae* . Infect Genet Evol . 11(6): 1263–1275.

Richter, S.S . ; Heilmann, P.K . ; Dohrn, C.L. ; Riahi, F. ; Costello,A.J. ; Kroeger,J.S . Bie. ; Critchley, I . ; Diekema, D.J. and. Doern , J.V. (2011) .Activity of Ceftaroline and Epidemiologic Trends in *Staphylococcus aureus* Isolates Collected from 43 Medical Centers in the United States in 2009 . Antimicro. Ag. Chemo. 55(9) : 4154–4160 .

Ringdahl , U. ; Svensson , M. ; Wistedt , A. C. ; Renne ,T. ; Kellner, R. Muller – Esterl , W. and Sjobring, U. (1998) . 'Molecular co –operation between PAM protein and Streptokinase for plasmin acquisition by *Streptococcus pyogenes'* J. Biol. Chem . 273: 6424–6430.

Robert S. Daum . (2007) . Skin and Soft-Tissue Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* . The new eng. J. of Med . 357(4) :380-390 .

Rodvold , K.A. McConeghy, K.W. (2014) . Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Therapy: Past , Present , and Future . Clinic. Infect. Dis .58(S1):S20–7 .

Ryan , K.J. ; Ray,C.G. ; Champoux , J . J. ; Drew , W.I. ; Neidhardt , F.C. and Plorde , J.J. (2004) . Sherris medical microbiology an Introduction to infectious diseases. 4th edition . Mcgraw-Hill compony .

Saderi , H . ; Emadi , B . and Owlia , P. (2011) . Phenotypic and genotypic study of macrolide , lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran . Med. Sci. Monit . 17(2): 48-53 .

Sadowska , B. and Rozalska , B. Wieckowska- Szakiel, M . 2007 . Staphylokinase production by clinical *Staphylococcus aureus* strains . polish. j. of micro . 56 (2) : 97-102.

Salyers , A. A.; Shoemaker, N. B.; Stevens, A. M.; and Li, L. Y. (1995). Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. Microbiol. Rev. 59: 579-590.

Sambrook , J.& Russell, D.W. (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor, NewYork, USA. 5.2-5.14, 8.2.

Savic , D. J. and . McShan , D.M. (2012) . Long-term survival of *Streptococcus pyogenes* in rich media is pH-dependent . Microbio. 158, 1428–1436 .

Schommer , N.N. ; Christner , M. ; Hentschke , M. ; Ruckdeschel , K. ; Aepfelbacher, M. , and Rohde , H. (2011) . *Staphylococcus epidermidis* Uses Distinct Mechanisms of Biofilm Formation To

Interfere with Phagocytosis and Activation of Mouse Macrophage-Like Cells 774A.1 . Infect. and Immun. 79(6) : 2267–2276 .

Sheen , T.R. ; Jimenez , A. ; Wang, N.Y. ; Banerjee , A. ; van Sorge , N.M. and Doran , K.S. (2011) . Serine-Rich Repeat Proteins and Pili Promote *Streptococcus agalactiae* Colonization of the Vaginal Tract . J. Bacter . 193(24) : 6834–6842 .

Shumugaperumal, T. (2010). "Biofilm Eradication and Prevention, A Pharmaceutical Approach to Medical Device Infections ". A John Wiley and Sons, Inc., Publication , Hoboken, New Jersey. pp. 4-5.

Spiliopoulou , E.; Petinaki, P. and Papandreou, G. (2004). Dimitracopoulos *erm*(C) is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. J. Antimicrob. Ag. Chemother. 53 (5): 814-817.

Stephen Douthwaite . (1990) . Interaction of the antibiotics clindamycin and lincomycin with *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA . Nucl. Acids Resea . 20(18) : 4717-4720 .

Stephenson , F.H. (2003). Calculations for Molecular Biology and Biotechnology : A Guide to Mathematics in the Laboratory. 1st edition . Elsevervier.USA. CH-2:18-34.

Straus , D.C. ; Mattingly, S.J. ; Milligan, T.W. ; Doran, T.I. and Nealon, T.J. (1980). Protease production by clinical isolates of type III group B streptococci. J. Clin . Microb. 12: 421-425.

Sutcliffe , J. ; Kamradt , A.T. and Wondrack , L. (1996b) . *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to

macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. Antimicro. Ag. and chemoth.. 40(8) : 1824-1817.

Sutcliffe , J. ; Grebe , T . ; Kamradt , A.T. and wondrack , L.T. (1996a) . Detection of Erythromycin-Resistant Determinants by PCR . Antimicro. Ag. and chemoth . 40(11) : 2562–2566 .

Tong , S . ; ; Chen , L . and Fowler Jr , V . (2012) . Colonization, Pathogenicity, Host Susceptibility and Therapeutics for *Staphylococcus aureus*: What is the Clinical Relevance . Semin . Immunopathol . 34(2) : 185–200.

Torok , E. ; Moran , E. and Cooke , F. (2010) . Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology . Oxford University Press .

Turkyilmaz , S . and Kaya , O .(2006). Determinationof some virulence factors in *Staphylococcus spp* . isolated from various cinical samples .Turk. J. Vet. Anim. sci . 30:127-132.

Vandepitte[a], J; Engback, K ; Piot, P. and Heuck, G. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO Switzerland .

Vandepitte[b], J. ; Engback, K. ; Piot , P. and Heuk, C.(2003).Basic laboratory procedure in clinical Bacteriology. 2nd ed .World health organization . Geneva .

Verani , J. R.; McGee, L. and Schrag , S. J. (2010). Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC. MMWR Recommend. 59. :1–36.

Villedieu , A.; Diaz-Torres, M. L. ; Roberts, A. P. ; Hunt, N. ; McNab, R. Spratt, D. A. ; Wilson, M. and Mullany, P. (2004) . Antimicro.Ag. and Chemoth . 48(6) : 2298–2301.

Warshawsky , B. ; Hussain, Z. and Gregson, D. B. (2000). Hospital and community-based surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: previous hospitalization is the major risk factor. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 21 (11): 724-727.

Weisblum , B. (1995) . Erythromycin resistance by ribosome modification . Antirnicro . Ag. Chemoth. 39 :577-585.

Willems , R. J. L. ; Hanage , W.P. ; Bessen , D. E. and Feil , E. J. (2011) . Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance . FEMS Microbiol Rev. 35 (5) : 872–900.

Winny , X . Khosasih , V. Suwanto , A. and Kim, H.K. (2012) . Characterization Lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Human Facial Sebaceous Skin. J. Microbio. Biotech . 22(1) : 84–91 .

Woods , C.W. (2009) . Concise reviews of Ped. Infect. Dis . 28 : 1115–1118.

Wu S. De , ; Lencastre H, and Tomasz A. (1999) .The *Staphylococcus aureus* transposon Tn551: Complete nucleotide sequence and transcriptional analysis of the expression of the erythromycin resistanc gene. Microb . Drug . Resist . 5:17.

Young , U.H ,Jang , I.H , Hwany , G.Y ,Lee,M.K ,Yoon,K.J . and Kim,H.Y. (2004). Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes of β-hemolytic streptococci in korea . Antimicro. agents and chemother . 48(7): 16 – 27 .

Zahid , I.M . (2007) . Epidemiological Study on β-Hemolytic Streptococci (BHS) Isolated among children of Baghdad. The Detection of Antibiotic Resistance Genes . M.S.C. Thesis. College of Science for Women . Baghdad University .

Zmantar , T. ; Kouidhi , B. ; Miladi , H . and Bakhrouf , A . (2011) . Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci . BMC Resea. 4(453) : 2– 9 .

Zuckerman , J.M. (2004). Macrolides and ketolides: azithromycin, clarithromycin , telithromycin . Infect. Dis. Clin. Nor. Amer. 18 : 621–649 .

ملحق رقم (1) نتائج فحص حساسية مضادات الحياة .

Clindomycin	Azithromycin	Ereythromycin	الجنس	ت
S	s	S	*Staph.aureus*	1
S	s	S	*Staph. aureus*	2
R	R	R	*Staph. aureus*	3
S	s	S	*Staph. aureus*	4
S	S	I	*Staph. aureus*	5
S	R	R	*Staph. aureus*	6
R	R	R	*Staph. aureus*	7
R	R	R	*Staph. aureus*	8
S	R	R	*Staph. aureus*	9
S	R	R	*Staph. aureus*	10
R	S	R	*Staph. aureus*	11
S	R	R	*Staph.epidermisis*	12
R	R	R	*Staph. aureus*	13
S	R	R	*Staph.epidermidis*	14
S	S	S	*Staph. aureus*	15
S	S	S	*Staph. aureus*	16
S	R	S	*Staph.epidermidis*	17
S	S	S	*Staph. aureus*	18
S	S	S	*Staph.epidermidis*	19
S	S	S	*Strp. Pyogens*	20

Clindomycin	Azithromycin	Erythromycin	الجنس	ت
S	R	R	*Staph.epidermidis*	21
S	R	R	*Strp. Pyogens*	22
S	S	S	*Staph.epidermidis*	23
S	S	S	*Strp. Pyogens*	24
S	R	R	*Staph.epidermidis*	25
S	R	R	*Staph. aureus*	26
R	R	R	*Staph.epidermidis*	27
S	S	S	*Strp. agalactiae*	28
S	S	S	*Staph. albus*	29
S	S	S	*Staph. aureus*	30
S	S	R	*Staph.epidermidis*	31
S	S	R	*Staph.epidermidis*	32
S	S	S	*Staph. aureus*	33
S	S	S	*Staph. aureus*	34
S	S	S	*Staph. saprophyticus*	35
S	R	R	*Staph. aureus*	36
S	S	S	*Strp. Pyogens*	37
S	S	S	*Strp. Pyogens*	38
S	S	S	*Strp. Pyogens*	39

ملحق رقم (2) نتائج فحوصات عوامل الضراوة

LIPASE	PRORES.	DNASE	HEMOLYSI.	Biofilm	STREPTOKIN.	STAPHYLOKIN.	الجنس	ت
+ ve	- ve	+ ve	β.H	+ ve		+ ve	*S.aureus*	1
+ ve	+ ve	+ ve	β.H	+ ve		- ve	*S.aureus*	2
+ ve	- ve	+ ve	NON	+ ve		-ve	*S.aureus*	3
+ ve	+ ve	+ ve	β.H	+ ve		-ve	*S.aureus*	4
+ ve	+ ve	+ ve	β.H	+ ve		-ve	*S.aureus*	5
+ ve	- ve	+ ve	β.H	+ ve		+ve	*S.aureus*	6
- ve	+ ve	+ ve	β.H			+ve	*S.aureus*	7
- ve	+ ve	+ ve	β.H	+ ve		+ve	*S.aureus*	8
- ve	+ ve	+ ve	β.H			-ve	*S.aureus*	9
- ve	+ ve	+ ve	NON	+ ve		+ve	*S.aureus*	10
- ve	+ ve	+ ve	NON	+ ve		+ve	*S.aureus*	11
+ ve	- ve	-ve	β.H	+ ve		+ve	*S.epidermidis*	12
+ ve	- ve	+ ve	NON	+ ve		+ve	*S.aureus*	13
+ ve	- ve	- ve	β.H	+ ve		+ve	*S.epidermidis*	14
+ ve	+ ve	+ ve	β.H	+ ve		+ve	*S.aureus*	15
- ve	+ ve	+ ve	β.H			-ve	*S.aureus*	16
- ve	+ ve	-ve	NON	+ ve		-ve	*S.epidermidis*	17
+ ve	+ ve	+ ve	β.H			-ve	*S.aureus*	18
- ve	- ve	-ve	α.H				*S.pyogens*	19
- ve	- ve	+ ve	α.H				*S.pyogens*	20
- ve	- ve	-ve	NON	+ ve		+ve	*S.epidermidis*	21
- ve	+ ve	-ve	β.H		+ ve		*S.pyogens*	22
- ve	- ve	-ve	β.H	+ ve		+ve	*S.epidermidis*	23
- ve	+ ve	+ ve	β.H		+ ve		*S.pyogens*	24
- ve	+ ve	-ve	β.H	+ ve		-ve	*S.epidermidis*	25
+ ve	+ ve	+ ve	β.H	+ ve		-ve	*S.aureus*	26
+ ve	- ve	-ve	NON	+ ve		+ve	*S.epidermidis*	27
- ve	- ve	-ve	NON		- ve		*S.agalactiae*	28
+ ve	- ve	-ve	NON			+ve	*S.albus*	29
- ve	- ve	+ ve	NON			+ve	*S.aureus*	30
- ve	+ ve	-ve	NON	+ ve		+ve	*S.epidermidis*	31

- ve	**+ ve**	**-ve**	**NON**	**+ ve**		**-ve**	***S.epidermidis***	**32**
+ ve	**+ ve**	**+ ve**	**α.H**			**+ve**	***S.aureus***	**33**
- ve	**+ ve**	**+ ve**	**β.H**			**+ve**	***S.aureus***	**34**
+ ve	**- ve**	**-ve**	**β.H**			**+ve**	***S. saprophyticus***	**35**
+ ve	**- ve**	**+ ve**	**α.H**			**+ve**	***S.aureus***	**36**
- ve	**+ ve**	**+ ve**	**β.H**		**- ve**		***S.pyogens***	**37**
- ve	**+ ve**	**+ ve**	**β.H**		**- ve**		***S.pyogens***	**38**
- ve	**+ ve**	**+ ve**	**β.H**		**- ve**		***S.pyogens***	**39**
- ve	**+ ve**	**+ ve**	**β.H**		**+ ve**		***S.pyogens***	**40**

ملحق (3) إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى

رقم العينة .

اسم المريض .

العمر .

السكن .

نوع العينة .

تاريخ جمع العينة .

مكان العزل .

ملحق (4) خصائص البوادءى المستعملة

G≡C Content	Length Mer	Scale Umoles	Total nmole	*Pmoles	ODs	Primers	ت
34.8	23	0.025	12.3	123.2	3.0	*erm*A–F	1
39.1	23	0.025	12.6	125.7	3.0	*erm*A–R	2
33.3	21	0.025	14.2	142.5	3.0	*Mef*A-F	3
38.1	21	0.025	14.9	148.6	3.0	*Mef* A – R	4

Picomoles *: Volume for 100 pmoles \ ul .

Melting Temperature **

M . W : Molecular weight

Summary

Collected 200 samples from different clinical sources included (Urine , blood , middle ear , sputum, throat , wounds , and vaginal swabs) from hospitals (Baquba teaching hospital , AL-Batool hospital and Balad Ruz teaching hospital) in addition to some health centers for the period from 1 / 9 / 2013 until 01 / 01 / 2014.

As demonstrated 75 samples 37.5% were negative growth for bacterial culture and 125 62.5% positive growth of bacterial culture . 40 isolates belonging were obtained to both genus *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. These isolated were diagnosed by using cultural tests , microscopic, and biochemical characteristics as well as a confirmatory test for the isolates using the api 20 staph & strep system .

The percentage of *Staphylococcus* isolated from the blood is 33.3% the urine 12.6% the throat 36% , middle ear 13.8% , and the wounds 18.7%, while the percentage of *Streptococcus* isolated from the throat was represented 30.7% , the sputum 11.7% , and the wonds 6.2%.

Antibiotic susceptibility testing was performed on all isolates against some of the commonly used Macrolide members in addition to the clindamycin return to the lincosamides family using the disk diffusion method , the results showed that the resistance of *S. aureus* to erythromycin reached to 50% , for azithromycin 45% , and for clindamycin is 25% . The *S. epidermidis* ratios were as follows 66.6% for erythromycin 44.4% for azithromycin , and 11.11% of the clindamycin ، while the resistant of *S.pyogens* were as follows 12.5% of erythromycin , 12.5% of the azithromycin , and 14.5% of the clindamycin .

The minimum inhibitory concentration MIC for erythomycin of isolates under study which showed resistance to the antibiotic sensitivity test in a

Disk diffusion method where ranged between <33-64 µg / mL . investigated the ability of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp on the production of some of the virulence factors .

The results showed that these isolates were productive for several types of enzymes and toxins that contribute usually in pathogenicity. One of these enzymes , protease enzyme , lipase enzyme , urease enzyme , Dnase enzyme , Staphylokinase enzyme , and Streptokinase enzyme and also showed these isolates ability to produce Four types of Heamolysin (alpha , beta , gamma , and Delta) . It also has been investigating the susceptibility of isolates to produce a Slime layer using the Congo red agar (CRA) ، The results showed that both genus have the ability to produce slime layer and Biofilm formation , the results showed that 65% of the *S. aureus* producing Slime layer while all *S.epidermidis* isolates produced the slime layer , while showed 75% of the isolates *S.pyogens* ability to produce Slime layer.

Conducted the process of total DNA extraction to 12 isolates under study that resist Macrolide members . polymerase chain reaction (PCR) was done for isolates of the bacterium *Staphylococcus* and *S.pyogens* resistance of Mcrolide and with MIC more than 64 micrograms / ml by using specialized primers targeting sequence specific gene *erm* A and *mef* A , deported outputs doubling the agarose gel concentration 1% and observed the emergence of a single package in all the tracks in the gel at the same level for the genes .

The results showed that the percent of the presence of *erm* A gene in isolates of *S. aureus* arrived 80% and in isolates *S.epidermidis* 30% , and in isolates *S.pyogens* got to 50% , while for *mef* A gene the presence in isolates of *S. aureus* was 20% , in isolates *S.epidermidis* 40% , and in isolates *S.pyogens* 50% .

Repuplic of Iraq

Ministry of Higher Education

and Scientific Research

Diyala University

College of Education for Pure Sciences

Biology Department

Genetic and Bacteriological Comparative between *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. resistance to Macrolide , isolated from different clinical infections .

A Thesis

Submitted to the Council of College of Education for Pure Science

Diyala University In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science In Biology / Microbiology

By

Saif ali mohammed AL-Haeali

Supervised by

Dr. Hadi Rahman Rasheed Al Taai

Assistant Professor

2014 **1435**