جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامـــــعة ديالـــــى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة بكتريولوجية و وراثية لبكتريا *Streptococcus pyogenes* المعزولة من مرضى مصابين بالتهاب اللوزتين في مدينة المقدادية

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الاحياء المجهرية

من قبل

زينب عامر حاتم التميمي

بكالوريوس علوم الحياة / جامعة ديالى

بإشراف

الاستاذ الدكتور

عباس عبود فرحان الدليمي

الاستاذ المساعد

هادي رحمن رشيد الطائي

1434 هـ

2013 مـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا
الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ﴾

سورة المجادلة: جزء من الآية (11)

الاهـــــــداء

الى من كلت انامله ليقدم لنا لحظة سعادة ..الى من حصد الاشواك عن دربي ليمهد الي طريق العلم ..

والدي العزيز

الى من ارضعتني الحب والحنان ..الى رمز الحب وبلسم الشفاء ..

والدتي العزيزة

الى من هم اقرب الي من روحي ..الى من شاركني حضن الام وبهم استمد عزتي وإصراري ..

اخواني وأخواتي الاعزاء

بكل الحب الى رفيق دربي .. الى من سار معي نحو الحلم خطوة بخطوة بذرناه معا وحصدناه معا وسنبقى معا بأذن الله ..

زوجي العزيز

الى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة الى رياحين حياتي ..

زهراء , علي , حسين

الى صاحبة القلب الطيب والنوايا الصادقة وسارت معي خطوة بخطوة .. وما تزال ترافقني حتى الان ..

خالتي العزيزة

زينب عامر

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف المرسلين سيدنا محمد وعلى آله الطيبين الطاهرين وصحبه أجمعين . وبعد ..

يسعدني ويشرفني وأنا أنهي كتابة رسالتي أن أتقدم بخالص شكري وتقديري وعرفاني بالجميل الى أستاذيّ الفاضلين الدكتور هادي رحمن رشيد الطائي ، والدكتور عباس عبود فرحان الدليمي لإقتراحهما موضوع البحث ومتابعتهما المتواصلة وتوجيهاتهما السديدة لي طوال مدة البحث داعيةً الله أن يوفقهما لما يحبه ويرضاه .

كما أتقدم بوافر شكري وتقديري الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة المتمثلة بالأستاذ الدكتور عباس عبود فرحان ورئاسة قسم علوم الحياة لأتاحتهم الفرصة لإكمال دراستي العليا، وما قدموه لي من العون والمساعدة .

كما أتوجه بوافر الشكر والأمتنان الى عمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة ومنتسبيه / جامعة ديالى واخص بالذكر الست زينب عبد والست هالة محمد لما قدموه من دعم وإسناد طيلة مدة البحث.

كما يدعوني الوفاء أن أشكر الدكتور مازن اللهيبي مدير مختبرات مستشفى بعقوبة التعليمي ومنتسبي شعبة البكتريولوجي السيدة ثريا كاظم , علياء لطيف ، دينا داود وأطباء ومنتسبي شعبة الـ ENT في الأستشارية في مستشفى المقدادية واخص بالذكر دكتور قاسم ودكتور رشيد والدكتورة سارة, و البكتريولوجية ضحى علي, لما قدموه لي من العون والمساعدة وتعاونهم معي في جمع العينات .

كما اقدم شكري العميق الى عائلتي التي ساعدتني ووقفت الى جانبي داعيةً من الباري (عزوجل) أن يمنَ عليهم بالصحة والعافية

كما اقدم خالص شكري وامتناني الى خالتي العزيزة لما قدمته لي من يد العون والمساعدة طيلة فترة البحث وأدعو من الله ان يمن عليها بالصحة والعافية ويحفظها من كل مكروه . وأخيراً اتقدم بخالص شكري وإمتناني الى كل من مدّ يد العون والمساعدة لي .

زينب

تم عزل 15 عزلة من بكتريا *Streptococcus pyogenes* وتشخيصها من اصل 200 عينة من المرضى المصابين بألتهاب اللوزتين في مستشفى المقدادية العام والمراكز الصحية المتوافرة في القضاء للمدة من 2012/9/15 الى 2013/1/15 .

شخصت العزلات بأستخدام الاختبارات الزرعية , والمجهرية , والكيموحياتية فضلا عن التأكد من عائدية العزلات الى بكتريا *S.pyogenes* بأستخدام نظام Api 20 Strep .

اظهرت هذه الدراسة ان نسبة عالية من الاصابة بالمرض كانت في الفئة العمرية من 1-10 سنة وفي الذكور اكثر مما في الاناث ، اذ كانت في الذكور 45 اصابة وفي الاناث 30 اصابة.

وجد ان نتائج اختبار Antistreptolycin O titer ASOT بأن عيارية هذه الاضداد قد ارتفع عند مرضى التهاب اللوزتين المخمجين ببكتريا *S.pyogenes* كافة.

بينت نتائج التحري عن عوامل الضراوة لبكتريا *S.pyogenes* ان جميع العزلات منتجة للهيمولايسين وبنسبة 100% وجميعها محاطة بالمحفظة وبنسبة 100%, والعزلات جميعها غير قادرة على انتاج البكتريوسين. بينما اظهرت 14 عزلة وبنسبة 93.3% القدرة على انتاج انزيم الدنييز و13 عزلة وبنسبة 86.6% قادرة على انتاج الغشاء الحيوي و 11 عزلة وبنسبة 73.3% منتجة انزيم الستائيين بروتييز و 9 وبنسبة 60% قادرة على انتاج انزيم الستريبتوكاينييز.

لوحظ ان 10 عزلات وبنسبة66.6 % لها القدرة على انتاج انزيم البيتالاكتاميز. واشارت النتائج ان 8 عزلات وبنسبة 53.3% من بكتريا *S.pyogenes* كانت منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وبأستخدام اقراص Impinem-EDTA. اظهرت النتائج ان 5 عزلة وبنسبة 33.3% منتجة لأنزيمات الميتالوبيتالاكتاميز .

اوضحت الدراسة الحالية ان العزلات المحلية لبكتريا *S.pyogenes* جميعها تتصف بمقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية Multiple antibiotic resistance وقسمت العزلات الى مجموعتين اعتمادا على مقاومتها للمضادات الحيوية اذ ضمت المجموعة الاولى 13 عزلة مقاومة من 4-7 مضادات بينما المجموعة الثانية ضمت 2 عزلة مقاومة 8-11 مضاد .

اختبرت حساسية العزلات تجاه 15 مضادا واظهرت جميعها وبنسبة 100% مقاومة اتجاه المضادات Amikacin, Ampicilin, Trimethobrim, وان العزلات جميعها كانت حساسة لمضادات Penicillin, Imipenem, Chloramphenicol, Vancomycin وتباينت في حساسيتها ومقاومتها تجاه المضادات الاخرى .

درس المحتوى البلازميدي لعزلة واحدة وهي العزلة 15 وتبين توافر بلازميد واحد مفرد . اجريت عملية تحييد الدنا البلازميدي بأستخدام ثلاث مواد هي Acridine orange, Ethidium bromide, Sodium dodecyl sulfate وتبين ان مادة Acridine orange هي المادة المحيدة الاقوى من بين هذه المواد اذ نجحت في تحييد الحزم البلازميدية عند تركيز 256 مكغم/مل , وتأتي بعدها مادة Ethidium bromide اذ نجحت في تحييد الحزم البلازميدية عند التركيز 512 مكغم/مل بينما كانت مادة Sodium dodecyl sulfate هي الاضعف تحييداً اذ حيدت الحزم البلازميدية عند التركيز 2000 مكغم/مل .

تم التحري عن قابلية العزلات المحيدة على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز ومقاومة المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة واظهرت النتائج فقدان قابلية العزلات قيد الدراسة على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز وايضا فقدان مقاومتها لمضادات الامبيسيلين, والتتراسايكلين , والترايميثوبريم , والارثرومايسين.

Abbreviation	Key
A.O	Acridine orange
APC	Antigen processing cells
API	Analytical profile Index
A.S.O.T	Anti streptolysin O Titer
BAP	Biofilm associated protein
β-Lactam	Beta lactam
CCCP	Carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone
CLB	Cell lysis buffer
DHFR	Dihydro folate reductase
DNA	Deoxy ribonucleic acid
E.B	Ethidium bromide
EDTA	Eyhylene Diamine Tetra Acitic Acid
ERW	Endtoxin Removal Wash
ESBLs	Extended spectrum beta lactam
GABHS	Group A beta Hemolysis
IAV	Influenza A Virus
IgG	Immunoglobulin G
LPS	Lipopolysaccharide
MBLs	Metallo beta Lactam
MALT	Mucosal associated lymphoid tissue
mef	Macrolide drug efflex
mm	Milimeter
NDM-1	Newdelhimetallo-b-Lactamase
NCCLS	National committee of clinical Laboratory standard
NS	Neutralization solution

-

PBP	Penicillin binding protein
PCR	Polymerase chain reaction
PMNs	Polymorphnuclear leukocyte
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SLO	Streptolysin O
SPE	Streptococcal pyrogenic exotoxin
STSS	Streptococcal toxic shock syndrome
TSA	Trypticase soy agar
µg	Microgram
µl	Microleter

التسلسل	الموضوع	الصفحة
الفصل الاول – المقدمة		
	المقدمة.	1
الفصل الثاني – استعراض المراجع		
1-2	نبذة تأريخية عن بكتريا *S.pyogenes*.	3
2-2	الصفات العامة لبكتريا *S.pyogenes* .	3
3-2	امراضية المكورات المسبحية القيحية.	5
4-2	الامراض التي تسببها *S.pyogenes* .	7
1-4-2	التهاب البلعوم واللوزتين.	7
2-4-2	الحمى القرمزية.	8
3-4-2	الحمى النفاسية.	8
4-4-2	الاخماج الجلدية.	9
5-4-2	المضاعفات المتأخرة لأخماج بكتريا *S.pyogenes* .	10
1-5-4-2	الحمى الرثوية.	10
2-5-4-2	التهاب كبيبات الكلية الحاد.	10
5-2	العوامل المرتبطة بالامراضية.	11
1-5-2	الستربتوكاينييز.	11
2-5-2	السستائين بروتييز.	12
3-5-2	الهيمولايسين البكتيري.	13
4-5-2	الانزيم المحلل للدنا.	13
5-5-2	البكتريوسين.	14
6-5-2	المحفظة.	14
7-5-2	الغشاء الحيوي.	15
8-5-2	بروتين M.	16
9-5-2	الستربتولايسين O.	16

6-2	وبائية البكتريا .	17
7-2	تركيب اللوزتين.	17
8-2	اهمية اللوزتين.	18
9-2	المضادات الحيوية.	18
1-9-2	تأثير المضادات الحيوية على الخلية البكتيرية.	19
1-1-9-2	تثبيط بناء الجدار الخلوي.	19
2-1-9-2	تحطيم الغشاء الخلوي.	21
3-1-9-2	التداخل مع بناء البروتينات.	21
4-1-9-2	التداخل مع بناء الحامض النووي.	21
5-1-9-2	تثبيط العمليات الايضية الاخرى.	21
10-2	انزيمات البيتالاكتاميز.	22
1-10-2	تصنيف انزيمات البيتالاكتاميز.	22
2-10-2	الية عمل انزيمات البيتالاكتاميز.	22
3-10-2	العوامل الوراثية المسيطرة على انتاج البيتالاكتاميز.	22
1-3-10-2	انزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية.	22
2-3-10-2	انزيمات البيتالاكتاميز البلازميدية.	23
11-2	المقاومة للمضادات الحيوية.	23
12-2	النسق البلازميدي.	26
13-2	تحييد البلازميدات.	26

الفصل الثالث – المواد وطرائق العمل		
1-3	المواد.	28
1-1-3	الاجهزة والادوات.	28
2-1-3	المواد الكيميائية والصبغات.	29
3-1-3	الاوساط الزرعية المستخدمة.	30
4-1-3	مضادات الحياة.	31
1-4-1-3	اقراص مضادات الحياة.	31
5-1-3	مواد متفرقة.	32
1-5-1-3	عدة التشخيص.	32
2-5-1-3	عدة عزل الدنا البلازميدي.	32
3-5-1-3	مصدر الدم.	32
2-3	تحضير المحاليل والكواشف والصبغات.	32
1-2-3	المحاليل.	32
1-1-2-3	المحلول الملحي الفسلجي.	32
2-1-2-3	محلول ثابت العكورة القياسي.	32
3-1-2-3	محلول صبغة المحفظة.	33
4-1-2-3	محاليل الكشف عن انزيم البيتالاكتاميز.	33
1-4-1-2-3	محلول النشأ.	33
2-4-1-2-3	محلول اليود.	33
3-4-1-2-3	محلول البنسلين جي.	33
5-1-2-3	محاليل عزل الدنا البلازميدي.	34
6-1-2-3	محاليل الترحيل الكهربائي.	34
2-2-3	كاشف الكاتاليز.	35
3-2-3	صبغة كرام.	35
3-3	تحضير الاوساط الزرعية.	35
1-3-3	وسط غراء الدم.	36

2-3-3	وسط غراء الجوكليت.	36
3-3-3	وسط غراء ازايد الدم.	36
4-3-3	وسط غراء مولرهنتون.	36
5-3-3	الوسط السائل لنقيع القلب والدماغ والدم.	36
6-3-3	وسط الكونكوريد اكار.	37
7-3-3	وسط تربتيكيز صويا اكار.	37
8-3-3	وسط تخمر السكريات.	37
9-3-3	وسط التحري عن انتاج انزيم الستائيين بروتييز.	37
10-3-3	وسط ادامة العزلات البكتيرية.	38
11-3-3	وسط حفظ العزلات.	38
4-3	طرائق العمل.	38
1-4-3	جمع العينات.	38
2-4-3	زرع العينات.	39
3-4-3	تشخيص البكتريا المعزولة.	39
1-3-4-3	التشخيص الزرعي.	39
2-3-4-3	التشخيص المجهري.	39
3-3-4-3	التشخيص الكيموحياتي.	40
1-3-3-4-3	اختبار الكاتاليز.	40
2-3-3-4-3	اختبار الحساسية للباستراسين.	40
3-3-3-4-3	اختبار قابلية البكتريا على النمو بدرجة(10,45)م.	40
4-3-3-4-3	اختبار تخمر السكريات.	40
5-3-3-4-3	اختبار قابلية البكتريا على النمو اللاهوائي.	41
6-3-3-4-3	اختبار قابلية البكتريا على النمو بوجود 5% من Co_2.	41
5-3	التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا *S.pyogenes*.	41
1-5-3	طريقة احمر الكونكو للتحري عن قابلية البكتريا في انتاج الطبقة المخاطية.	41
2-5-3	التحري عن قابلية البكتريا على انتاج البكتريوسين.	41

3-5-3	التحري عن وجود المحفظة .	42
4-5-3	التحري عن انتاج الهيمولايسين.	42
5-5-3	التحري عن انتاج السستائين بروتييز.	42
6-5-3	التحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم DNase.	43
7-5-3	التحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم Streptokinase.	43
6-3	فحص Api 20 strep.	43
7-3	فحص الحساسية للمضادات الحيوية.	44
8-3	التحري عن انتاج انزيم البيتالاكتاميز.	45
1-8-3	تحضير العالق البكتيري.	45
2-8-3	استخدام طريقة اليود القياسية السريعة للتحري عن قابلية العزلات على انتاج انزيم البيتالاكتاميز.	45
9-3	التحري عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف.	45
10-3	التحري عن قابلية البكتريا لأنتاج انزيم البيتالاكتاميز المعدني بأستخدام طريقة اتحاد المضاد الحيوي.	46
11-3	استخلاص الدنا البلازميدي.	47
12-3	الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي في هلام الاكاروز.	48
13-3	تحييد الدنا البلازميدي.	48
1-13-3	التحييد بأستخدام مادة الاكردين البرتقالي وبروميد الاثيديوم و كبريتات دودسل الصوديوم.	48
14-3	التحليل الاحصائي	49
الفصل الرابع – النتائج والمناقشة		
1-4	العزل والتشخيص.	50
1-1-4	العزل.	50
2-1-4	نسبة العزل.	51
3-1-4	توزيع الاصابات بألتهاب اللوزتين بحسب الجنس والاصابات الحادة والمزمنة.	54
4-1-4	توزيع مجاميع المسبحيات المعزولة بحسب توزيعها بالذكور والاناث.	56
5-1-4	التشخيص.	57
1-5-1-4	التشخيص الزرعي.	59

2-5-1-4	التشخيص المجهري.	59
3-5-1-4	التشخيص الكيميائي الحياتي.	59
1-3-5-1-4	فحص الكاتاليز.	59
2-3-5-1-4	فحص الحساسية للبستراسين.	60
3-3-5-1-4	تخمر السكريات.	60
4-3-5-1-4	النمو بدرجات حرارة 10-45م.	60
2-4	التحري عن بعض عوامل الضراوة المهمة لبكتريا *S.pyogenes*.	61
1-2-4	الغشاء الحيوي.	61
2-2-4	انتاج البكتريوسين.	62
3-2-4	المحفظة.	63
4-2-4	انتاج الهيمولايسين البكتيري.	63
5-2-4	انتاج السستائيين بروتييز.	65
6-2-4	انتاج الدنييز.	66
7-2-4	انتاج الستربتوكاينييز.	67
3-4	حساسية بكتريا *S.pyogenes* للمضادات الحيوية.	69
4-4	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.	73
5-4	النسق السائد للمقاومة المتعددة لبكتريا *S.pyogenes* للمضادات الحيوية .	75
6-4	التحري عن انتاج انزيم البيتالاكتاميز .	75
7-4	التحري عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف.	76
8-4	التحري عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية.	78
9-4	التحري عن عيارية اضداد الحالة O.	80
10-4	النسق البلازميدي لبكتريا *S.pyogenes*.	82
11-4	تحييد البلازميدات.	84
1-11-4	التحييد باستخدام Acridine orange.	84
2-11-4	التحييد باستخدام Ethidium bromide.	84

3-11-4	التحييد باستخدام Sodium dodecyl sulfate.	85
12-4	التحري عن حساسية العزلات قبل التحييد وبعده .	86
الاستنتاجات والتوصيات		
	الاستنتاجات.	88
	التوصيات.	88
المصادر		
	المصادر العربية.	89
	المصادر الاجنبية.	92
	الملحق-1-	119
	الملحق-2-	120
	الخلاصة	A

قائمة الجداول

الرقم	الجداول	الصفحة
1-4	الخصائص الطبية لأجناس المسبحيات .	53
2-4	توزيع الاصابات بالتهاب اللوزتين بحسب جنس المريض والإصابات الحادة والمزمنة	55
3-4	توزيع مجاميع المسبحيات المعزولة بحسب الذكور والاناث .	56
4-4	الفحوصات التشخيصية لبكتريا *S.pyogenes* .	58
5-4	عوامل الضراوة المتوافرة في العزلات قيد الدراسة .	64
6-4	عوامل الضراوة المتمثلة بالانزيمات المتوافرة في العزلات قيد الدراسة.	68
7-4	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي اظهرتها عزلات *S.pyogenes*.	74
8-4	تقسيم العزلات المحلية لبكتريا *S.pyogenes* الى مجموعتين على اساس عدد المضادات التي قاومتها.	75
9-4	النسق السائد للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية .	75
10-4	قابلية عزلات *S.pyogenes* على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية.	79
11-4	عيارية اضداد ASOT في مصل مرضى التهاب اللوزتين للمصابين ببكتريا *S.pyogenes*.	81

12-4	نتائج التحييد لعزلات *S.pyogenes*.	86
13-4	نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية قبل التحييد وبعده.	87

قائمة الصور والاشكال

الرقم	الشكل	الصفحة
1-4	النسب المئوية للعينات التي اظهرت نموا سالبا وايجابيا للزرع البكتريولوجي.	50
2-4	النسبة المئوية لعزل المسبحيات.	54
3-4	توزيع الاصابات بألتهاب اللوزتين بحسب الفئات العمرية.	56
4-4	نتيجة تشخيص بكتريا *S.pyogenes* بنظام API 20 Strep.	60
5-4	اختبار التحري عن انتاج الغشاء الحيوي للعزلة *S.pyogenes*.	62
6-4	اختبار التحري عن انتاج انزيم السستائين بروتييز للعزلة *S.pyogenes*.	66
7-4	اختبار التحري عن انتاج انزيم الدنييز للعزلة *S.pyogenes* .	67
8-4	النسب المئوية لمقاومة بكتريا *S.pyogenes* للمضادات الحيوية.	73
9-4	النسب المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز.	76
10-4	النسب المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف.	77
11-4	انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف للعزلة المحلية *S.pyogenes*.	78
12-4	النتيجة الموجبة لأنتاج انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية للعزلة المحلية *S.pyogenes*.	80
13-4	فقدان الحزم البلازميدية لبكتريا *S.pyogenes* المحيدة .	83

1- المقدمـــــــة

يعد الحلق المتقرح sore throat والتهاب البلعوم واللوزتين Tonsillopharyngitis من اكثر الاسباب التي تدعو لزيارة الطبيب من اجل التشخيص السريري والمعالجة.ان بكتريا المسبحيات القيحية *Streptococcus pyogenes* في مقدمة هذه الممرضات ومن الاصابات البكتيرية الشائعة التي تؤدي الى التهاب البلعوم واللوزتين (Jawetz[b] *et al.*,2004).

بكتريا *Streptococcus pyogenes* موجبة لصبغة كرام , غير متحركة, غير مكونة للابواغ ,مخمرة للسكريات , سالبة لفحص الكاتاليز Catalase negative , لاهوائية اختيارية Facultative anaerobes وتنتج منطقة كبيرة من التحلل الكامل نوع بيتا beta hemolysis بسبب تحلل كريات الدم الحمراء على وسط اكار الدم لذلك تسمى Group A Streptococci. تستوطن بكتريا *Streptococcus pyogenes* البلعوم والجلد بصورة رئيسية مسببة بذلك امراض التهاب البلعوم واللوزتين Tonsillopharyngitis ومرض القوباء (Carapetis *et al.*,2005). لا يتوفر اي لقاح صناعي لمنع الاصابات بهذا النوع من البكتريا (Henningham *et al.*,2012).

تمتلك المسبحيات وبالأخص بكتريا *Streptococcus pyogenes* والمسبحيات التابعة للمجاميع المصلية B,C,G العديد من العوامل التي تسهم في امراضيتها وضراوتها كالمحفظة Capsule و بروتين M-protein M التي تساعد في مقاومة البكتريا لعملية البلعمة Phagosytosis وتعمل على تسهيل التصاق واستعمار البكتريا للجهاز التنفسي العلوي.فضلا عن ذلك فأن لهذه البكتريا القدرة على انتاج المواد والانزيمات الخارج خلوية Extra cellular enzymes, اذ تنتج ما يزيد عن 20نوع من الافرازات الخارجية ومنها انزيم الستربتوكاينيز والهيالودورينيز التي تسهم في انتشار الخمج وغزو البكتريا للانسجة من خلال حلها للخثرة والانسجة الرابطة للعائل لذا تعد من عوامل الانتشار Spreading factors (Cunninghamm ,2000).

تمتاز هذه البكتريا بمقاومتها المتزايدة لمضادات البيتالاكتام عن طريق انتاجها انزيمات البيتالاكتاميز التي تعمل على تحطيم حلقة البيتالاكتام وجعلها جزيئات غير فعالة حيويا , مما يزيد من خطورة هذه الانزيمات حصول الطفرات في الجينات المسؤولة عن تشفيرها لتحولها الى انزيمات واسعة الطيف مقاومة لمضادات البيتالاكتام ومنها الاجيال المتطورة للسيفالوسبورينات (Nass *et al*, 2003).

يشفر لمقاومة المضادات الحيوية عناصر وراثية خارج كروموسومية Extra chromosomal genetic elements وتمتاز بكون هذه العناصر دائرية الشكل وتسمى البلازميدات Plasmids التي تشفر لمقاومة المضادات الحيوية وبعض الصفات المظهرية كأنتاج الهيمولايسين البكتيري والبكتريوسين (Stevens and Kaplan , 2000).

وللاسباب المذكورة اعلاه ولقلة توافر دراسات حول هذا الموضوع في محافظة ديالى بصورة موسعة ولخطورة هذه البكتريا بأحداث مرض التهاب اللوزتين بين الفئات العمرية, ولا سيما صغار السن لذا جاءت هذه الدراسة تهدف الى :

1- عزل بكتريا *Streptococcus pyogenes* وتشخيصها ومعرفة نسب الاصابة بحسب الفئات العمرية وجنس المرضى .
2- دراسة حساسية العزلات البكترية للمضادات الحيوية حديثة الاستخدام في العراق .
3- دراسة بعض عوامل الضراوة المهمة .
4- قياس تركيز سم الستربتولايسن O .
5- دراسة النسق البلازميدي Plasmid profile.
6- دراسة عملية تحييد البلازميدات Curing of plasmids وباستخدام ثلاث مواد هي Acridine orange , Ethidium bromide, Sodium dodecyl sulfate .

2- استعراض المراجع

2-1 نبذة تاريخية عن بكتريا *Streptococcus pyogenes*

ان أول من وصف بكتريا *S.pyogenes* هو العالم Billroth عام 1874 في مرضى أخماج الجروح وتمكن العالم Fehleisen عام 1883 من عزلها بشكل سلاسل في مزروع نقي pure culture من المرضى المخمجين بآفات احمرار الجلد Erysipelas lesion , في عام 1884 اطلق مصطلح المكورات المسبحية القيحية على البكتريا الكروية والتي تنمو بشكل سلاسل من قبل العالم Rosenbach الذي عزلها من الافات القيحية Suppurative lesions (Mandell *et al.*,1995)

2-2 الصفات العامة لبكتريا *S.pyogenes*

هي بكتريا كروية , موجبة لصبغة كرام , تحتوي عادة على محفظة مؤلفة من حامض الهيالرونيك Hyaluronic acid.

أشار الباحث (Okamoto*et al.* 2004) الى أهمية الدور الذي تلعبه المحفظة في غزو خلايا المضيف من خلال تمكنها من الارتباط ببعض انواع الرواشح مثلIAV virus A Influenza الذي يسبب الخمج في الجهاز التنفسي.

وضعت تصنيفات عدة للمسبحيات *Streptococci*أقدمها التصنيف الذي وضعه Brown عام 1919 والذي يعتمد على نوع تحلل الدم Hemolysis على أوساط اكار الدم الذي صنفت المسبحيات بموجبه الى ثلاث مجاميع رئيسة هي :

المجموعة الاولى: تمثل المسبحيات المحللة للدم تحللا كاملا β-hemolytic streptococci وتكون مستعمراتها محاطة بمنطقة تحلل كلي.

المجموعة الثانية: تمثل المسبحيات المحللة للدم الفا المحللة للدم تحللا جزئيا α-hemolytic streptococci وتكون مستعمراتها محاطة بمنطقة تحلل جزئي منطقة خضراء اللون.

المجموعة الثالثة: تضم المسبحيات المحللة للدم كاما γ-Hemolytic Streptococci وتكون غير محللة للدم . قسمت Lancefield في عام 1933 المسبحيات المحللة للدم تحللا كليا على أساس

الاختلافات المستضدية لمتعدد السكريد في جدار البكتريا إلى 18 مجموعة سميت بمجاميع لانسفيلد Lancefield Groups ويرمز لها بالأحرف الإنكليزية من A إلى U باستثناء الحرفين I و j (Facklam, 2002 , وقسم Sherman في عام 1937 المسبحيات إلى أربع مجاميع رئيسة اعتمادا على نوع التحلل الدموي و نوع المستضد الكاربوهيدراتي لجدار البكتريا مجاميع لانسفيلد وتخمر السكريات إلى:

1. المسبحيات القيحية Pyogenic streptococci وتضم المسبحيات المحللة للدم بيتا العائدة للمجاميع A و B و C و G و F.
2. المسبحيات المخضرة Viridans streptococci وتضم المسبحيات المحللة للدم الفا وكاما غير الخاضعة لتصنيف لانسفيلد.
3. المسبحيات اللبنية Lactic streptococci التي تضم المسبحيات المحللة للدم كاما والعائدة للمجموعة N.
4. المسبحيات المعوية Enteric streptococci وتضم المسبحيات المحللة للدم الفا وكاما العائدة للمجموعة D لتصنيف لانسفيلد (Facklam, 2002).

يمثل النوع *S. pyogenes* الذي وصف لأول مرة من قبل العالم Rosenbach في عام 1884 المجموعة A للمسبحيات المحللة للدم تحللا كليا بحسب تصنيف لانسفيلد . وهي بكتريا لا هوائية اختيارية لا تنمو في الاوساط الزرعية الاعتيادية وإنما تحتاج لاوساط أغنائية ولها القدرة على تخمير اللاكتوز والسالسين والتريهالوز وإنتاج حامض بدون تحرير غاز، محللة للارجنين وغير محللة لهيبارات الصوديوم Sodium Hipurit أو للاسكولين Esculin وليس لها القدرة على النمو في الاوساط الحاوية على أملاح الصفراء بتركيز 40% أو الملح NaCl بتركيز 6.5% ، مقاومة للاوبتوكين وحساسة للباستراسين و لا تنمو عند درجة حرارة 10 أو 45 مْ (Macfaddin, 2000).

3-2 أمراضية المكورات المسبحية القيحية

تعد بكتريا *S. pyogenes* كائن ممرض رئيسي للإنسان (Carapetis *et al.*,2005) إذ تؤدي الى عدد من الأخماج القيحية مثل اصابات اللوزتين و اصابات الجلد, بالإضافة الى عدد من الأمراض الجهازية الحادة وأحيانا تؤدي الى وفاته, وذلك لإنتاجها عوامل متعددة تسهم في ضراوتها ومن اهمها انزيمات التحلل Streptolysin O,S التي تعمل على تحلل الدم (Forbes[a] *et al.*,1998).

وتقسم الأخماج التي تسببها البكتريا الى قسمين:

1. الأخماج القيحية Suppurative infections وتتمثل في العديد من الامراض مثل ألتهابات النسيج الجلدي Cutaneus cellulitis , والحمرة Erysipelas , والتهاب الاذن الوسطى Otitis media, والتهاب اللوزتين Tonsillitis, والتهاب الجيوب الانفية Sinusitis , وذات الرئة Pneumonia , والحمى النفاسية Puerperal fever , والحمى القرمزية Scarlet fever , والتهاب السحايا Meningitis , والتهاب البلعوم Pharyngitis , والتهاب اللفافة الناخر Necrotizing fasciitis , و جرثمة الدم Bacteremia ;Cunningham[a],2000)
2. الأخماج غير القيحية Non-Suppurative infections تشمل ألتهاب كبيبات الكلية الحادAcute glomerulonephritis الذي يحدث بعد اخماج الجلد والبلعوم , الحمى الرثويةRheumatic fever , التهاب شغاف القلب Endocarditis متلازمة الصدمة السمية المسبحية Streptococcal toxic shock syndrome .

وكذلك يمكن تقسيم الامراض التي تسببها هذه البكتريا الى:

1. الأمراض الغازية Invasive diseases

تعد مجموعة المسبحيات المحللة للدم نوع بيتا β-hemolysis Group A ممرض رئيسي للانسان وتسبب له امراض كثيرة مثل التهاب البلعوم الفموي Oropharynx والجلدskin, حيث تمتلك القدرة على اختراق السطوح الظهارية Epithelial surfaces مسببة عدداً من الامراض وتتضمن تجرثم الدم Baciteremia ومرض اللفافة الناخرNecrotizing faciitis ومتلازمة الصدمة السمية المسبحيةStreptococcal toxic shock syndrome (STSS), وهناك امراض اقل شيوعا مثل الحمى النفاسية Puerperal fever والسحايا Meningitis والخراج Abscess التهاب شغاف

القلب Endocarditis والتهاب الصفاق Peritonitis .ان لهذه الامراض عواقب صحية خطيرة مع ارتفاع نسبة الاعتلال Morbidity والوفيات Mortality وعموما حوالي 20% من المرضى المصابين بهذه الامراض يموتون في غضون سبعة ايام .ان تطور الاصابة بمرض متلازمة الصدمة السمية المسبحية STSS يؤدي الى زيادة معدل الوفيات و تقريبا 50% من المصابين بهذا المرض يموتون خلال سبعة ايام بعد الاصابة. وان التأثيرات الجانبية لهذه الامراض الغازية تتضمن الوصول الى الجلد واختراق جروح الجلد Skin injuries في الرضع Infants وكبار السن Alderly. (Lamagni *et al.*,2008)

2. الامراض غير الغازيةNon-Invasive diseases

يمكن تسميتها ايضا الامراض السطحية Superficial Diseases ومن هذه الامراض التهاب البلعوم Pharyngitis والحمرة Erysipelas والقوباء Impetigo والتهاب المهبل Vaginitis والتهابات ما بعد الولادة Post-Partum infections اذ ان GAβHS هي العامل المسبب Causative الاكثر شيوعا لألتهاب البلعوم الجرثومي bacterial Pharyngitis الذي يصيب الاطفال في سن المدرسةSchool age children بصورة اساسية, وعلى الرغم من ان كل الاعمار قابلة للاصابة فيه ولكن النسبة الاعلى في سن المدرسة. يمكن ان ينتشر التهاب البلعوم بوساطة ملامسة الافراد لبعضهم البعض و بوساطة الافرازات الانفية Nasal secretions او قطرات اللعابdroplets of saliva .(Bisno and stevens[c], 2010; Wessels[b], 2011)

ان العلامات السريرية لألتهاب البلعوم تتضمن تقرح الحلق Sore throat وحمى fever وصداع Headache وغثيان Nausea وتقيؤ Vomiting وايضا الشعور بالتعب Malaise والتداخلات الفيزيائية لهذا المرض Physical manifestations تتضمن الاحمرارRedness وذمة Edema , وتضخم اللوزتين enlarged hyperemic tonsils , والافرازات اللوزية tonsillar exudates (Choby, 2009; Wessels[b], 2011) وفي غياب التبعات القيحية Suppurative complications او تطور العقابيل غير القيحية Non-Suppurative sequelae تكون الاصابة بألتهاب البلعوم التي تسببها GAβHS محدودة وفي دراسة اجريت في الولايات المتحدة على العزلات التي تسبب التهاب البلعوم في سنة 1999 وجد ان 92% من السلالات تعود الى النمط المصلي M_1 وبالمقارنة هناك دراسة اجريت في المناطق الريفية في الهند واحتوت هذه الدراسة على تغاير كبير في

العزلات المسببة لألتهاب البلعوم ومن بين 71 عزلة من GAβHS وجد بأن 29.6% تعود للنمط المصلي M_{77} 25.4% تعود للنمط المصلي M_{81} و 14.1% تعود للنمط المصلي M_{11} (Kumar *et al.*,2009). هذا التغاير في النمط المصلي M له اثار عميقة في تصميم اللقاحات المستقبلية لل GAβHS. وان صيغة اللقاح المستخدم قادرة على تنشيط المناعة ضد كل GAβHS (Cole *et al.*,2008).

2-4 الأمراض التي تسببها *S.pyogenes*

2-4-1 ألتهاب البلعوم و اللوزتين Tonsillitis and Pharyngitis

يعد التهاب البلعوم واللوزتين الحاد من أكثر اصابات الجهاز التنفسي العلوي ويسبب نسبة عالية من الاعتلال Morbidity والوفيات Mortality والعامل المسبب على الأغلب يكون فيروسياً و أكثر شيوعا في الأطفال تحت سن الثلاث سنوات, والعامل المسبب الأخر هو بكتيري ويشمل مجموعة المسبحيات المحللة للدم نوع بيتا GAβHS وهو شائع في الاطفال في سن ست سنوات وبنسبة تتراوح من 15-30% (Ozkaya *et al* .,2013). وتكون أعراض المرض هي تقرح في الحلق Sore throat , أفرازات تحدث في اللوزتين tonsillar exudates , تضخم اللوزتين enlarged hyperemic tonsils , تضخم العقد اللمفاوية Enlarged lymph nodes , وحمى شديدة قد تصل الى 38.5 درجة .

تظهر الأعراض بعد 2-5 ايام وفي حالة المرضى الذين يعانون من تقرح في الحلق لمدة أكثر من أسبوع وبدون ظهور الأعراض يمكن عد المسبب فيروسي (Wessels[b], 2011). ويظهر مرض ألتهاب البلعوم واللوزتين بشكلين هما الشكل الحاد Acute الذي يحدث عند الاصابة الاولية بالجراثيم الممرضة والشكل الثاني المزمن Chronic او راجع Recurrent الذي يحدث عند فشل المعالجة بالمضادات وتكرار الاصابات الحادة لأكثر من 6 مرات في السنة وفي حال عدم تماثل المريض للشفاء وعلى الرغم من استخدام المعالجة المكثفة بالمضادات الحيوية عندئذٍ بفضل الاطباء استئصال اللوزتين(Bond *et al.*, 2006).

2-4-2 الحمى القرمزية Scarlet fever

هو مرض يصيب الاطفال بعمر 4-8 سنوات تسببها بكتريا *S.pyogenes*. العلامات السريرية للمرض تشبه العلامات السريرية لألتهاب البلعوم واللوزتين وتتضمن تقرح الحلق Sore throat , حمى fever , احمرار في الجلد الذي يظهر بعد 12-48 ساعة من بداية المرض وهذا الاحمرار عبارة عن بقع حمراء صغيرة تظهر عادة على الرقبة والصدر وينتشر بسرعة الى البطن, الذراعان, السيقان (Jaggi *et al.*,2007).

معظم العلامات السريرية يكون سببها الذيفانات المولدة للحمرة Erythrogenic toxins الذي هو عبارة عن مادة تفرز من قبل بكتريا *S.pyogenes* ويمكن ان تؤدي للموت وكذلك الى مضاعفات متأخرة مثل التهاب كبيبات الكلية الحاد Acute glomerulonephritis و التهاب شغاف القلب Endocarditis مؤديا الى امراض في الصمامات القلبية التي يمكن ان تؤدي الى الموت. (Bisno[c],2010)

يجب تمييز سلالات بكتريا *S.pyogenes* المنتجة للذيفانات المولدة للحمرة Erythrogenic toxins,لأنها اكثر خطورة على المريض من غير المنتجة لهذه الذيفانات. ان مرض الحمى القرمزية هو مرض شائع في الاطفال ولكلى الجنسين وبنسب متساوية (Czarkowoski[a] *et al.*,2010). عندما يكون الاطفال في سن العاشرة او اكبر تتحفز لديهم اجسام مضادة تجاه الحمى القرمزية لذلك تكون اصابات الحمى القرمزية في هذا العمر او اكبر نادرة الحدوث (Czarkowoski[b] *et al.*,2011).

2-4-3 الحمى النفاسية puerperal fever

اصابة الرحم ببكتريا *S.pyogenes* الذي يؤدي لتسمم الدم وحدوث اعتلالات morbidity ووفيات mortality في فترة الولادة وقبل استخدام المضادات Antibiotic وهذه الاصابات يجب اخذها بنظر الاعتبار عند تشخيص انتان الدم بعد الولادة postpartum sepsis (Lynskey *et al.*,2011).ان الاخماج المكتسبة في المستشفيات nosocomial bacterial infections اصبحت مشكلة عالمية تحتاج الى مراقبة دائمية وثابتة ،لذلك يجب استخدام المطهرات antiseptic لتقليل ظهور وانتشار occurrence and spread الاصابات بالحمى النفاسية (Noakes *et al.*, 2008).

في معظم البلدان المتطورة بعدما كان الموت نتيجة لمعظم الامهات المصابات قبل استخدام المضادات الحيوية ففي الوقت الحالي اصبح الموت بالحمى النفاسية اقل شيوعا (Hussein *et al.*,2011).

2-4-4 الإخماج الجلدية Skin infections

تشترك بكتريا *S.pyogenes* مع بكتريا *S.aureus* في احداثها للعديد من الاخماج الجلدية .اذ تهاجم الجلد انماط مصلية مختلفة من المكورات المسبحية الحالة للدم نوع بيتا GAβHS مسببة مرض القوباء impetigo الذي هو اكثر الاخماج الجلدية انتشارا خاصة عند الاطفال الذين تتراوح اعمارهم من 2-5 سنوات (Henry,2001) .

يمكن ملاحظة الاصابات الجلدية في الاطفال من الطبقة الفقيرة والمعدمة اقتصاديا والتي تعيش في المناطق الاستوائية اوشبه الاستوائية tropical or sub tropical (Valery *et al.*,2008). يظهر مرض القوباء impetigo في البداية بشكل لطخة papule التي سرعان ما تتطور بسرعة الى حويصلة محاطة باحمرار،وبعدها تتحول الى بثور وتكبر بالحجم تدريجيا وتبدأ بالتشقق(Bisno and Stevens[c],2010). وبسبب قدرة بكتريا *S.aureus* على انتاج البنسيلينيز pencillinase المقاوم للبنسلين pencillinase resistant penicillins والسيفالوسبورينات cephalosporins لذلك تم اللجوء للبحث عن علاجات اخرى لمرض القوباء (Iovino *et al.*,2011).

من الاخماج الجلدية الاخرى مرض الحمرة Erysipelas وهو التهاب النسيج الخلوي السطحي للجلد Superficial cutaneous والذي يحدث عادة في كبار السن المنخفضي المناعة وكذلك يحدث في حديثي الولادة Neonates. ويكون المرض بشكل احمرار موضعي الذي سرعان ما ينتشر على الوجه او الاطراف،وغالبا ما يرافقه حمى مع قشعريرة وتوعك عامChills and general malaise (Celestin *et al.*,2007).

2-4-5المضاعفات المتأخرة لإخماج بكتريا Late complications of *S.pyogenes*

2-4-5-1 الحمى الرثوية Rheumatic fever

هو مرض التهابي يحدث بسبب الاصابة ببكتريا *S.pyogenes*, مثل التهاب البلعوم او الحمى القرمزية ويعتقد ان يحدث بسبب المناعة الذاتية Autoimmunity اذ يعتقد ان الحمى الرثوية هي تفاعل مناعي لبكتريا *S.pyogenes* في شخص ذو استعداد وراثي (Hahn *et al.*,2005) . ان الاصابة بالحمى الرثوية تحتاج الى إصابة اولية بالبلعوم التي تسببها بكتريا *S.pyogenes* والتي تكون عالية الضراوة اذ تحتوي على محفظة كبيرة مكونة من حامض الهيالورنيك وجزيئات M بروتين وتنتج بكتريا *S.pyogenes* العديد من المستضدات خارج و داخل خلوية التي تحفز على انتاج الأجسام المضادة في أجسام المرضى المصابين.

ان هذه الجزيئات تحتوي على محددات مستضدية Epitops التي تتفاعل تصالبيا Cross-reactive مع أنسجة العائل (Gene, 2013) . في السنوات الاخيرة سجلت حالات من الاصابة بالحمى الرثوية في الولايات المتحدة الامريكية وأدى أستخدام البنسلين الى تقليل الاصابة بهذه الحمى اذ قام اعضاء جمعية القلب الامريكية بوصف علاج طويل الامد للسيطرة على المرض ومع ذلك أستمرت الاصابة بالحمى الرثوية وذلك لأن اغلب المختصين لم يستخدموا الطريقة المناسبة للتحري عن وجود بكتريا *S.pyogenes* أو تشخيص العلامات المبكرة لألتهاب شغاف القلب Endocarditis وهذا يؤدي الى احتمال زيادة الاصابة بهذه الحمى(Akikusa , 2012).

2-4-5-2 التهاب كبيبات الكلية الحاد Acute glomerulonephritis

هو مرض يحدث بسبب الاصابة ببكتريا *S.pyogenes* يتميز بارتفاع ضغط الدم Hypertension, ترسبات بولية غير طبيعية Urinary sediment abnormalities , نقصان في كمية مكونات المتمم في المصل (Bisno[c], 2010).

يحدث التهاب كبيبات الكلية الحاد عادة في الاطفال والمراهقين ويكون معدل الاصابات اعلى في الذكور من الاناث, وهناك عوامل عدة تسهم في انتشار المرض مثل الاساليب والعادات غير

الصحية(Marshal *et al.*,2011) , وعلى الرغم من ذلك فإن انتشار المرض استمر بالاضمحلال في السنوات الاخيرة بسبب استخدام المضادات الحيوية (Cunningham[b], 2008).

2-5 العوامل المرتبطة بالأمراضية

تمتلك المسبحيات لاسيما بكتريا *S. pyogenes* العديد من العوامل التي تسهم في أمراضيتها وزيادة ضراوتها والتي يكون بعض منها جزءا من البنية المستضدية للبكتريا Antigenic structure وتشمل كلا من المستضد الكاربوهيدراتي الخاص بالمجموعة A A-CHO و المحفظة Capsule والببتيدوكلايكان Peptidoglycan والخمل المؤلف من بروتين M وحامض التيكويك الشحمي Lipoteichoic acid LTA ، و النوع الثاني من عوامل الضراوة فيها يتألف من أفرازات خارج خلوية Extracellular products كالهيمولايسينات والذيفانات الخارجيةExotoxins ، فضلا عن كل من انزيمات الستربتوكاينيز Streptokinase والهياليودورنيز Hyaluronidase والإنزيم الحال للدنا DNase والأنزيمات الحالة للبروتين Proteases (Todar,2002).

2-5-1 الستربتوكاينيز Streptokinase

تحتوي بكتريا *S. pyogenes* على عدد من عوامل الضراوة Virulence factors التي تسهل اختراق البكتريا للجهاز المناعي والاجهزة الاخرى (Tart *et al.*, 2007; Musser and Shelburne, 2009; Olsen *et al.,* 2010).

تنتج عوامل الضراوة هذه بوساطة البكتريا وتتفاعل بصورة خاصة مع بروتينات بلازما الانسان ومنها فايبرينوجين Fibrinogen , بلازمين Plasmin , الكلبيولين المناعي IgG وعدد من العوامل الاخرى(Walker *et al.*,2005) تستطيع بكتريا *S. pyogenes* ان تواجه بروتينات البلازما خلال أختراقها الاوعية الدموية, ويمكن ايضاً ان تؤثر على مكونات البلازما في موقع الاصابة عند حصول خلل في الاوعية الدموية الذي يحدث خلال الأستجابة الالتهابية في أثناء تحفيزها في العائل (Herwald[b] *et al.*,2004) اذ تتفاعل هذه البكتريا مع النظام المسؤول عن تنشيط مولد البلازمين Plasmoinogen في العائل وهذه تعد ميكانيكية مرضية دقيقة لاحداث الاصابة في الكائن الحي.

يمكن تعريف مولد البلازمين Plasmoinogen على انه سلسلة مفردة من البروتينات السكرية يتواجد في البلازما والسوائل الخارج خلوية.اذ تستطيع بكتريا *S. pyogenes* من الاتحاد بالبلازمين في سطح الخلية عن طريق البروتينات مثل بروتين M و Glyceraldehyde-3-phosphate و Streptococcal enolase .هناك عدد من الدراسات اثبتت ان بكتريا *S. pyogenes* تعتمد على منتجات بكتيرية متخصصة في امراضيتها واهم هذه المنتجات هي ستربتوكاينيز Streptokinase (Cole *et al.*,2011).

يعد انزيم الستربتوكاينيز عامل انتشار Spreading factor يسهم في تسهيل انتشار البكتريا من خلال تحليله الخثرة Clot نتيجة لتحلل الفايبرين بفعل البلازمين الذي يعمل ايضا على تنشيط انزيم ميتالوبروتيز Metalloproteases او الكولاجين Collagenases في المادة البينية للخلايا الطلائية مما يسهل الانتشار وغزو الانسجة (Cunningham[a] ,2000).

2-5-2 السستائين بروتييز Cysteine Protease

تنتج المسبحيات التابعة للنوع *S. pyogenes* انواعاً عدة من الذيفانات الخارجية المولدة للحرارة Streptococcal pyrogenic exotoxins SPE تختلف في صفاتها المستضدية وتنتمي الى الذيفانات المشطرة Mitogenic toxins التي تضم ايضا كل من الذيفان المعوي للعنقوديات و ذيفان متلازمة الصدمة السمية (Efstiou, 2000). تعمل هذه الذيفانات بوصفها مستضدات خارقة Super antigens تحفز الخلايا التائية على انتاج المركبات الخلوية Cytokines بدون الحاجة لتقديمها بفعل الخلايا العارضة للمستضد Antigen processing cells (APC) (Berhman and Kliegman, 1998) .

يسهم السستائين بروتييز في انتشار البكتريا واستيطانها وغزوها من خلال قدرته على تجزئة الفايبرونكتين Fibronectin والفترونكتين VItronectin (Kapur *et al.*, 1993), وتنشيط انزيم الميتالوبرتييز Metalloprotease في المادة البينية للخلايا البشروية. يمتلك الانزيم القدرة على تحرير الكنين Kinin الفعال من مولد الكنين ويعد انتاج الكنين الية مهمة للضراوة في الحالات الشديدة والحادة للمسبحيات مثل متلازمة الصدمة السمية (Herwald[a] *et al.*, 1996).

يتأثر أنتاج السستائين بروتييز بأنزيمات اخرى ومنها أنزيم السيرين بروتييز اذ ان السلالات التي يتم فيها أحداث طفرات فاقدة للإنزيم يحصل فيها نقصان في عملية التحلل الذاتي لمولد السستائين بروتييز وتحوله الى أنزيم فعال (Lyon and Caparon, 2004). كما يتأثر انتاج السستائين بروتييز بجينات *Pel* Pleitropic effect locus , وان أحداث طفرات في جينات *Pel* يؤدي الى تقليل كمية كل من السستائين بروتييز و الستريبتوكاينيز والستريبتولايسين S المنتجة من البكتريا (Li *et al.*, 1999).

2-5-3 الهيمولايسين البكتيري Bacterial Hemolysin

الهيمولايسين عبارة عن toxin يقوم بتدمير الغشاء الخلوي لكريات الدم الحمر مما يؤدي الى تحللها ويسبب بذلك تجرثم الدم Bacteremia (Liaw *et al.*,2000). يصنف الهيمولايسين الى ثلاثة انواع اعتماداً على قابليته لتحلل كريات الدم الحمر وإحداث الامراضية, النوع الاول يحلل الاغشية ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي نوع بيتا β-Hemolysis , اما النوع الثاني فهو يكون الثقوب في الغشاء الخلوي وتظهر منطقة ذات لون اخضر حول المستعمرة ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع الفا α-Hemolysis , اما النوع الثالث فإنه يحطم جدار الخلية بالطريقة نفسها التي تعمل فيها المنظفات, وهناك بعض الأنواع لا تظهر تحلل حول المستعمرات توصف بالبكتريا غير المحللة للدم Non-Hemolytic (Han *et al.*, 2010). لا يمكن عد الهيمولايسين عامل ضراوة مباشر ولكن من العوامل التي تشترك في الامراضية في حالات معينة ومع ذلك فإن توافره يعد عاملاً مهما لتزويد البكتريا بالحديد فضلا عن قابليته في الحث على افراز الهستامين, وكذلك له القدرة على تدمير الخلايا لا سيما كريات الدم البيضاء (الزعاك,1994).

2-5-4 الأنظيم المحلل للدنا Deoxyribonuclease

تنتج بعض السلالات البكتيرية الممرضة الأنزيمات الحالة للدنا DNase الخارج خلوية, وكمثال على ذلك فأن كل السلالات التابعة لمجموعة المسبحيات GAβHS تنتج على الأقل أنزيم واحد او أكثر من أنزيماتDNase (Paul *et al.*, 2005). ان هذه ألانزيمات تسهل اختراق العائل وأصابته بالمرض عن طريق مراوغة المناعة الذاتية Evasion of Innate Immunity بوساطة تحطيم

الخلايا العدلة الخارج خلوية التي تتكون من الكروماتين والبروتين اذ تقوم انزيماتDnases بتحليل الكروماتين وبذلك تمكن البكتريا من قنص الخلايا العدلة (Justyna *et al*., 2011).

2-5-5 البكتريوسين Bacteriocin

تعرف البكتريوسينات بأنها مركبات ذات طبيعة بروتينية وتمتلك قابلية لأبادة انواع البكتريا او الحد من نموها (Luders *et al*., 2003), ولا تعد البكتريوسينات عوامل ضراوة مباشرة وانما تزيد من امكانية التنافس لدى السلالات المنتجة (Kayaoglu and Qrsavik, 2004), تدخل هذه البروتينات الى داخل الخلية عن طريق مستقبلات خاصة وتقوم بعملية القتل عن طريق تكوين قناة ذات نفاذية للايونات في الغشاء الخلوي او تقوم بتقطيع الحامض النووي DNA في اماكن غير مخصصة او تثبيط بناء البروتينات عن طريق انشطار الوحدة 16s rRNA او تثبط طبقة الببتيدوكلايكان في جدار الخلية (Riley[a], 1998).

إن تأثير البكتريوسين في الخلية البكتيرية الحساسة قد يكون مثبطا للنمو Bacteriostatic (Sarika *et al*., 2010), او قد يكون قاتلا Bacteriocidal (Al-charrakh *et al*., 2011). صنف البكتريوسين الذي تنتجه البكتريا الموجبة لصبغة كرام على اساس الوزن الجزيئي الى اربعة اصناف (Pilet and Leroi, 2011) وهي :

- الصنف الاول : ذو وزن جزيئي اقل من 5 كيلو دالتون
- الصنف الثاني : ذو وزن جزيئي اقل من 10 كيلو دالتون
- الصنف الثالث : ذو وزن جزيئي اكبر من 10 كيلو دالتون
- الصنف الرابع : هو عبارة عن مجموعة من الببتيدات تكون بشكل خطي او دائري

2-5-6 المحفظةCapsule

تعد الخط الدفاعي الاول للبكتريا اذ تتكون من حامض الهياليورنيك Hyaluronic acid وتقوم بحماية البكتريا من عملية البلعمة Phagocytosis ،إذ أن لها علاقة بالالتصاق والاختراق Adherence and invasion (Wessels[a],2006) . تحتوي معظم سلالات بكتريا *S.pyogenes* و*S.pneumonia* والسلالات الممرضة التابعة للمجاميع المصلية C,G للمسبحيات على محفظة ,

والتي تعد من اهم عوامل ضراوتها (Stevens and Kaplan,2000).تتكون المحفظة في المراحل الاولى لنمو البكتريا في الوسط وعند انتشارها في الدم والانسجة تسهم مع بروتين M في مقاومة عملية البلعمة وتفقدها البكتريا في طور الثبات(Cywes and Wessels[b],2001). تمتاز المحفظة بأنها حساسة لإنزيم الهياليودورنيز Hyaluronidase وغير محفزة للمناعة بوصفها متشابهة كيميائيا مع مادة الهياليورنيت Hyaluranate المتوافرة في المادة الاساس للانسجة الرابطة للعائل وبذلك فإنها تعمل على اخفاء مستضدات البكتريا وتمنع تعرف النظام المناعي للمضيف عليها(Todar,2002).

2-5-7 الغشاء الحيوي Biofilim

هو تجمع لأحياء مجهرية مع إفرازاتها الخارج خلوية ويكون هذا التجمع بأشكال عدة، إما بعضها مع بعض بهيأة تجمعات Aggregates ، أو إنها تلتصق على سطح ما مثل التصاقها على سطح صخرة أو على سطح الأسنان أو على سطح بركة في فراغات دقيقة تسمى الأسطح البينية Interfaces (Donlan and Costerton,2002).

توجد علاقة وثيقة بين قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي وقدرتها على احداث الخمج والتسبب بحدوث التهاب مزمن, فالبكتريا المكونة للغشاء الحيوي لها قدرة اكبر على استعمار جسم المريض والاقامة فيه وتصبح اقل حساسية للعلاج بالمضادات الحيوية, وتنتج البكتريا بروتينات مرتبطة بالغشاء الحيوي في اثناء الاصابة BAP Biofilm-associated protein وان توافر هذه البروتينات يسهل تكوين الغشاء الحيوي المرتبط ببقاء البكتريا مدة اطول في جسم المريض, ويقوم الجسم المصاب بالاستجابة مناعيا لهذه البروتينات فيلاحظ وجود اجسام مضادة لهذه البروتينات في مصل المريض Anti-BAP antibodies (Cucarella *et al.*, 2004).

هناك عوامل عديدة لها تأثير على التصاق البكتريا وتكوين الغشاء الحيوي ومنها سطح البكتريا البروتيني ومتعدد السكريد, وخاصة متعدد السكريد المحفظي والتفاعلات الفيزوكيميائية و وجود بروتينات العائل (Tuquoc *et al.*,2007). اثبتت عدد من الدراسات ان تكوين الغشاء الحيوي في الانسجة الرقيقة يشارك في عدد من الامراض التي تسببها بكتريا *S.pyogenes* اذ تعد هذه البكتريا عامل مسبب للعديد من الامراض التي تؤثر على الاغشية الرقيقة وتتراوح من امراض سطحية بسيطة التهاب البلعوم

و القوباء الى مهددة للحياة وخطرة مرض اللفافة الناخر مثلا مرض اللفافة الناخر الذي يكون تركيب المجتمعات الكبيرة السائدة فيه ذا طبيعة نسيجية التهابية (Hidalgo *et al.*, 2006).

2-5-8 بروتين M- protein M

هو بروتين ليفي يمتد من سطح الخلية البكتيرية ويشفر له بوساطة *emm* gene .وظيفيا وفي غياب الاجسام المضادة يقوم بروتين M بتثبيط نظام المتمم ، ويتفاعل مع عدداً كبير من بروتينات العائل ويمتلك عدد من النشاطات والفعاليات الالتهابية،يشارك في الالتصاق بالسطوح المخاطية (Oehmcke *et al.*,2010) ، تكون السلالات الغنية ببروتين M M-positive strains عالية المقاومة لعملية البلعمة ، وقادرة على البقاء حية في دم الانسان والتضاعف السريع فيه ، بينما تقتل السلالات الفاقدة له M-negative strains (Jawetz[c] *et al.*,2007) . يمكن ان يصاب الانسان مرات عدة ببكتريا *S. pyogenes* وذلك لتوافر اكثر من 200 نوع من بروتين M الذي يكون عامل ضراوة مهماً ورئيساً للاصابة بهذه البكتريا . ويمكن استخدام هذا البروتين في صنع اللقاحات ضد بكتريا المسبحيات ولكن توجد صعوبة في ايجاد صيغة نهائية للقاح لوجود اكثر من 120 نمط مصلي لهذا البروتين(Turner *et al.*, 2009).

2-5-9 ستريبتولايسين Streptolysin O

ان للسموم دوراً مهماً في امراضية المسبحيات *Streptococci* من خلال مشاركتها بزيادة خطورة الاصابة وزيادة ضراوة البكتريا ، اذ ان السموم والانزيمات التي تفرزها البكتريا تسهل الامراضية واختراق الانسجة ، ويتوافر هناك نوعان محددان من الانزيمات المحللة للدم Hemolysins هما الستريبتولايسين O والستريبتولايسين S Streptolysin O and Streptolysin S، التي تسبب التحلل الدموي نوع بيتا β_hemolysis (Norrby and Kotb,2000). للSLO صفة مستضدية وينتج على الاغلب من كل السلالات التابعة ل GAβHS بالاضافة للسلالات التابعة للمجاميع G,C (Timmer *et al.*, 2009). وهو بروتين سام ويقوم بتحليل كريات الدم الحمر بغياب الاوكسجين اذ يرتبط بأغشية الخلايا الحاوية على الكوليسترول مثل كريات الدم الحمر والخلايا متعددة اشكال النوى Polymorphonuclear (PMNs) والأقراص الدموية (Sharma and Harding,2004). لكون SLO ذي طبيعة مستضدية تتولد له اجسام مضادة لذلك فإن قياس عيارية الاضداد له دور مهم في

التشخيص اذ ان ارتفاع عيارية اضداد الحالO (A.S.O.T) المتكونة بفعل التحفيز بSLO (200_160) وحدة عالمية/مل يشير الى اصابة حديثة بالبكتريا*S.pyogenes*. اذ ان لهذا الانزيم القابلية على تحفيز الجهاز المناعي وتكوين الكلوبيولين المناعي صنف IgG (Jawetz[a],1991).

2-6 وبائية بكتريا *S.pyogenes*

ان المكمن الطبيعي لل(GAβHS) هو البلعوم Human pharynx والجلد Skin وان حدوث المرض يعتمد على العمر، وموسم السنة ، والتوزيع الجغرافي والتلامس مع المريض (Berhman and Kleigman,1998). ينتقل المرض من الشخص المصاب او الحامل للبكتريا الى الشخص السليم بوساطة قطرات اللعاب او الافرازات الانفية في اثناء العطاس او السعال وكذلك يؤدي الزحام في المدارس والثكنات العسكرية الى سهولة انتقال المرض بين الاشخاص(Bisno and Stevens[c],2010;Wessels[b],2011) يكون المسبب الرئيس هو بكتريا *S.pyogenes* واكثر الاصابات تكون في الفئة العمرية للاطفال وبنسبة تتراوح بين (15-30%) اذ تظهر العلامات السريرية بعد فترة حضن (24-72) ساعة (Ozkaya *et al.*,2013).

ان معظم الدراسات الحديثة في شمال امريكا وجدت بأن هناك عوامل عدة تؤثر على تطور الامراض الغازية (Invasive diseases) التي تتفاوت تبعا للمجاميع العمرية اذ بخصوص البالغين الذين تتراوح اعمارهم من 18-44 سنة تؤثر عليهم عوامل عدة التي تؤدي الى تطور الامراض الغازية ومن هذه العوامل استخدام الادوية على شكل حقن Injection drug use التي تؤدي الى تطور الامراض الغازية وبشكل كبير وبالنسبة للأشخاص الذين تكون اعمارهم اكثر من (45) سنة فالعوامل المؤثرة هي مناعة العائل وهذه تخص المرضى المنخفضين المناعة عند اصابتهم بمرض بـ (HIV) والسكر Diabetes والسرطان Cancer والامراض القلبية Cardiac diseases (Factor *et al.*, 2003).

2-7 تركيب اللوزتين structure of tonsils

ان اللوزتين عبارة عن كتل من نسيج لمفاوي تقع في الجدار الجانبي للبلعوم الفميOropharynx في الجيب اللوزي (Snell,2004).تضم اللوزتان في الجسم البشري ثلاثة انواع رئيسة هي:

- اللوزتين الحنكيةPalatine tonsils: وهما اثنتان تقعان على جانبي مدخل البلعوم وانهما اكبر الانواع حجما.
- اللوزتين اللسانية Lingual tonsils: اثنتان تقعان عند جذر اللسان .
- اللوزة البلعومية Pharyngeal tonsils:وهي مفردة تقع في الجدار الحلقي الوسطي للبلعوم الانفي Nasopharynx (Saladin,2001).

يغطى سطح اللوزتين بنسيج ظهاري حرشفي مطبق Stratified squamous epithelium tissue ، وهناك حوالي (15)اخدود تدعى بالخلايا اللوزية Tonsillar crypts تمتد لداخلها لزيادة المساحة السطحية.تغطى اللوزتين من السطح الجانبي بطبقة من نسيج ليفي (Fibrous tissue) يدعى بالمحفظة اللوزية Tonsillar capsule، يغذي اللوزتين شريان لوزي Tonsillar artery يدخلها عن طريق الاتصال مع جدار البلعوم الفمي ،وهناك وريد حنكي palatine vein يدخل لمنطقة السطح الجانبي Lateral surface (Eroschenko,2000).

2-8 اهمية اللوزتين The importance of tonsils

للّوزتين اهمية كبيرة في حماية الممر التنفسي والممر الهضمي من دخول العوامل المخمجة ويمكن عد اللوزتين جزءاً من المواد المخاطية المقترنة بالانسجة اللمفاوية Mucosal associated lymphoid tissue(MALT)(Xie et al 2004). وهي تعد بمثابة الخط الدفاعي الاول ضد العوامل البيئية الضارة ، واهمها الممرضات الميكروبية التي تسبب الامراض(Kasenomm *et al.*, 2005). تقوم بحماية السطح المخاطي لهذه المنطقة معتمدة بذلك على المناعة الذاتية Innate immunity والتي تكون بشكل ميكانيكية دفاعية غير متخصصة ,وأيضا تقوم بالمراقبة الدائمة والمستمرة للمستضدات الغريبة التي تتوافر في مدخل الجهاز التنفسي والجهاز الهضمي (Olofsson *et al.*, 1998).

2-9 المضادات الحيوية Antibiotics

هي عبارة عن مواد تثبط اوتمنع نمو البكتريا المرضية او تقوم بتدميرها , (Rafael *et al.* 2007) وهي ذات وزن جزيئي قليل حوالي 150-500 دالتون (Brook *et al.*,2007). يتم صنع المضادات بوساطة الكائنات المجهرية مثل البكتريا اذ وجد ان حوالي 90% من المضادات يتم صنعها بوساطة الفطريات fungi والاعفان molds والبكتريا bacteria, والبقية يتم انتاجها صناعيا (Davies,2006). والية عمل المضادات اما أن تقتل وتحطم البكتريا وتسمى قاتلة للبكتريا

Bacteriocidal ، أو تمنع نمو وتكاثر البكتريا وتسمى موقفة للنمو Bacteriostatic (Peterson,2005). والمضادات عبارة عن نواتج الايض الثانوي Secondary metabolites يتم انتاجها خلال طور الاستقرار Stationary phase قبل توقف النمو البكتيري اذ يكون البناء الحيوي Biosynthesis للمضادات الحيوية عبارة عن تحوير بسيط في عمليات الايض الخلوي Metabolism والتي تتضمن تحويلاً واحداً او اكثر من منتجات الايض الرئيسة الى المضادات الحيوية (Rayan and Ray,2004).

2-9-1 تأثير المضادات على الخلية البكتيرية

يتم عمل المضادات على البكتريا الممرضة بأتباع احدى الاليات الاتية:(Hogg,2005)

1. تثبيط بناء الجدار الخلوي Inhibition of cell wall synthesis.
2. تحطيم الغشاء الخلوي Destruction of cell membrane.
3. التداخل مع بناء البروتينات Interference with protein synthesis.
4. التداخل مع بناء الحامض النووي interference with nucleic acid synthesis.
5. تثبيط العمليات الايضية الاخرى Inhibition other metabolic processes.

2-9-1-1 تثبيط بناء الجدار الخلوي Inhibition of cell wall synthesis

المجموعة الرئيسة التي تعمل على تثبيط بناء الجدار الخلوي هي مجموعة البيتالاكتام β- lactam antibiotics وتسمى بهذا الاسم لأنها تحتوي حلقة بيتالاكتام في تركيبها ويتم تحليل هذه الحلقة بوساطة انزيمات البيتالاكتاميز ومنها البنسلينيز والسيفالوسبورينيز , Cephalosporinases Penicillinases التي تعد من اليات المقاومة الاكثر اهمية (Guilfoile *et al.*,2007)., تعمل مضادات البيتالاكتام ضد طيف واسع من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ولذلك فإن هذا النوع من المضادات يكون قاتلا للبكتريا Bacteriocidal (Forbes[b] *et al.*, 2002). ومن اهم المجاميع التابعة لمضادات البيتالاكتام .

أ- البنسلينات Penicillins

تضم هذه المجموعة انواعاً عديدة من المضادات الحيوية غير السامة للإنسان اهمها البنسلين الذي ينتج طبيعيا من عفن البنسليوم , بعض السلالات الطافرة تكون مقاومة للبنسلين وذلك لإنتاجها انزيم البنسلينيز Penicillinase او يسمى ايضا β-lactamase الذي يحول البنسلين الى مركب Penicilloic acid مما يؤدي الى الفشل بالعلاج بهذا العقار (Forbes[c] *et al.*, 2007).

يعد بنسلين جي Penicillin G او الذي يسمى Benzyle Penicillin الاكثر شيوعا بين انواع البنسلينات في معالجة الاخماج التي تسببها عدد من المكورات الموجبة لصبغة كرام ويكون البنسلين جي حساس لأنزيمات β-lactamase (Mycek *et al.*,2000).

ب- السيفالوسبورينات Cephalosporins

هي مجموعة اخرى من مضادات البيتالاكتام تتشابه تركيبيا ووظيفيا مع البنسلين , .تكون هذه المضادات واسعة الطيف قليلة السمية امنة الاستعمال (Al-acamo,2001) يمكن الحصول منها على مشتقات عديدة بإجراء تحويرات جانبية ومن هذه المضادات:

الجيل الاول: تعمل هذه المضادات ضد المكورات الموجبة وبعض عصيات البكتريا السالبة منها مضادات(Keflex) Cephalexin, (Keflin) Cephalothin.

الجيل الثاني: يشمل مضادات Cefuroxime,Cofoxitin,Cefaclor وتكون فعالة ضد المكورات الموجبة وكذلك بعض عصيات البكتريا السالبة .

الجيل الثالث: يشمل مضادات (Claforan) Cefotaxime , (Fortaz)Ceftiaxone Ceftazidime (Rocephin) .

الجيل الرابع: يشمل Cefepime, Cefozopram, Cefcelis.

الجيل الخامس: مثالها مضاد Ceftobiprole ذو الفعالية ضد بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثسيلين (MRSA) وبكتريا ذات الرئة *S.pneumoinae* المقاومة للبنسلين, يعطى بالحقن لعلاج اصابات الجلد والأنسجة الرخوة (المرجاني , 2011) .

2-9-1-2 تحطيم الغشاء الخلوي Destruction of cell membrane

Polymixins احد اصناف المضادات الحيوية التي تعمل على تحطيم الدهون المفسفرة Phospholipdisالمتوافرة في الغشاء السايتوبلازمي مؤديا الى تسرب في محتويات الخلية.

2-9-1-3 التداخل مع بناء البروتينات Interference with protein synthesis

هناك عدد من المضادات الحيوية التي تعمل على الموقع الهدف Target site مثل بناء البروتينات والتي تؤثر على الايض الخلوي Cellular metabolism (Forbes[c] *et al.,*2007). المجموعة الثانية هي مجموعة الامينوكلايكوسيد Aminoglycosides والتي تتضمن الاميكاسين Amikacin و الجنتامايسين Gentamycin التي تعمل ايضا على تثبيط بناء البروتينات عن طريق الاليات التالية:

1. تتداخل مع تكوين معقد البدء الذي يكون مهماً في تكوين السلسلة الببتيدية Peptidyl chain.
2. تسبب خللاً في قراءة mRNA وبالتالي تؤدي الى خلل في تكوين الاحماض الامينية .

2-9-1-4 التداخل مع بناء الحامض النووي interference with nucleic acid synthesis

Flouroquinolones والتي تسمى ايضا الكونيلونات Quinolone هي مشتقات من حامض Nalidixic acid ومن هذه الكونيلونات Ciprofloxacin و Ofloxacin وتعمل هذه المضادات عن طريق الاتحاد والتداخل مع انزيم DNA gyrase الضروري في تنظيم اللف الفائق Supercoiling للدنا البكتيري (Omura & Satoshi, 2002). هذه العملية تكون ضرورية لأستنساخ Transcriptionوتضاعف Replication الدنا (Forbes[c] *et al.,*2007).

2-9-1-5 تثبيط العمليات الايضية الاخرى Inhibition other metabolic processes

هناك عدد من المضادات الحيوية التي تثبط بعض العمليات الايضية المهمة بالنسبة للبكتريا ومن هذه المضادات Sulfonamides , Trimethoprim, Nitrofurantoin اذ يكون مضاد

Sulfonamides فعالاً ضد مدى واسع من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ما عدا *P.aeruginosa* ويكون مضاد Trimethoprim فعالاً ضد بعض انواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام و Nitrofurantoin يكون فعالاً ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام (Forbes[c] *et al.*,2007).

2-10 انزيمات البيتالاكتاميز β-Lactamase enzyme

تستطيع العديد من الانواع البكتيرية انتاج انزيمات تعمل على تحطيم مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات والكاربابنيم وتدعى هذه الانزيمات انزيمات البيتالاكتاميز (المرجاني،2011)

1-10-2 تصنيف انزيمات البيتالاكتاميز Classification of β-lactam

هناك اعداد كثيرة وانواع مختلفة من انزيمات البيتالاكتاميز فيوجد على الأقل 340 انزيم بيتالاكتاميز بكتيري مختلف تم وصفها مما يجعل من تصنيفها امراً صعباً ، وهناك نظامان لتصنيفها: أولهما تصنيف Ambler الذي يعتمد على التشابه في تتابع الأحماض الأمينية والنظام الثاني هو نظام Bush-Jacoby-Medeiros الذي يعتمد على نسق المثبط-المادة الأساس (المرجاني،2011).

2-10-2 الية عمل انزيمات البيتالاكتاميز The of β-lactamase action mechanism

تعمل أنزيمات البيتالاكتاميز على تثبيط عمل مضادات البيتالاكتام من خلال كسرها لأصرة الأمايد Amide bond المتوافرة في حلقة البيتالاكتام β -Lactam ring (Hall *et al.*, 2004) مؤدية إلى تحطيم جزيئة المضاد، يتحول بعدها المضاد إلى مركب فاقد الفاعلية .

3-10-2 العوامل الوراثية المسيطرة في انتاج البيتالاكتاميز

يخضع أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز لسيطرة عوامل وراثية مختلفة ويمكن تقسيمها إلى:

1-3-10-2 انزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية

تحمي هذه الأنزيمات الخلية البكتيرية ضد العديد من مضادات البيتالاكتام وتكون الجينات المسؤولة عن تشفيرها محمولة على كروموسوم الخلية (Jacoby and Sutton,1985) وتقسم الأنزيمات الكروموسومية على قسمين :

أ-الأنزيمات الكروموسومية منتظمة التكوين Constitutive enzymes

تنتج هذه الأنزيمات بشكل طبيعي ومنتظم من دون الحاجة الى توافر عوامل محفزة ، ويكون إنتاجها بمستويات واطئة (الطائي ،2005).

ب-انزيمات كروموسومية محفزة Inducible enzyme

فهي أنزيمات محفزة بتوافر محفز Inducer وتسمى أنزيمات عالية التحفيز high inducible enzyme، وذلك لتحولها من قليلة الى عالية الأنتاج الأنزيمي ويخضع أنتاج هذا النوع من الأنزيمات لجينات تركيبية Structural gens (Benett and Chapro,1993) .

2-10-3-2 أنزيمات البيتالاكتاميز البلازميدية β-Lactamase – plasmid – mediated:

هنالك أنواع عدة من البلازميدات أهمها من الناحية السريرية البلازميدات الحاملة لجينات مقاومة المضادات الحيوية وجينات الضراوة ، ويمكن تقسيمها الى مجموعتين:

البلازميدات الإقترانية Conjugative plasmids وتمتاز بقابليتها على الأنتقال الذاتي والبلازميدات غير الأقترانية Nonconjugative plasmids، وهي غير قابلة للأنتقال ولكنها يمكن أن تكون محركة بوساطة بلازميدات إقترانية أخرى عندما تكون منطقة التعبئة لها Mobilizing region فعالة (Tortora *et al.*,2007; Rayan and Ray,2004) .

2-11 المقاومة للمضادات الحيوية

يكمن الهدف الأساس في علاج التهاب البلعوم واللوزتين في الوقاية من المضاعفات الثانوية التي تشمل كلا من المضاعفات غير القيحية التي تضم الحمى الرثوية والتهاب نبيبات الكلية والمضاعفات القيحية المتمثلة بالتهاب الاذن الوسطى والتهاب الجيوب الانفية الحاد وتمتاز المسبحيات التابعة للنوع *S. pyogenes* بحساسية عالية لمضادات البنسلين وباقي مضادات مجموعة البيتا لاكتام في حين تكون مقاومة لمضادات السلفانوميد Sulfanomides والتتراسايكلين Tetracyclin (Stevens and Kaplan, 2000).

وعلى الرغم من حساسية بكتريا *S. pyogenes* لمضادات البيتا- لاكتام في الزجاج فقد تزايدت حالات فشل العلاج بالبنسلين ومشتقاته من 2% في بداية السبعينات لتصل إلى 30% في بداية التسعينات (Baequero *et al.*, 1999). ويعود ذلك إلى الدور الذي تلعبه انزيمات البيتا لاكتام المنتجة من بكتريا النبيت الطبيعي للبلعوم (Normal flora) ومنها بكتريا *S. aureus* وإمكانية انتقال بلازميدات المقاومة منها إلى المسبحيات، إذ وجد بان انزيم البنسلينيز (Penicillinase) المنتج من بكتريا *E. faecalis* والمشفر ببلازميد اقتراني له القدرة على الانتقال بالاقتران إلى الانواع الاخرى للمسبحيات يكون مصدره بكتريا *S. aureus* المتوافرة في البلعوم ويمتلك هذا الانزيم القدرة على تحطيم كل من البنسلين والامبسلين والاموكسسلين (Murray[b] *et al.*, 1986). ويمكن في حالة البكتريا المنتجة للبيتا لاكتاميز استعمال الاموكسلين مع الكالفونيت (Amoxicillin and potassium clavunate) بوصفه علاجاً اذ يعمل مثبطاً انتحارياً (Suicide inhibitor) لانزيمات البيتا لاكتاميز المنتجة من البكتريا ويمنع تحطم المضاد (Brook[b], 1989).

وجد بان بكتريا *S. pyogenes* وهي ممرض خارج خلوي لها القدرة على اختراق الخلايا الطلائية للبلعوم واللوزتين والبقاء بداخلها، وان لها القدرة على البقاء حية لأكثر من سبعة أيام في الاوساط المدعمة بالمضادات الحيوية (Ostrlund *et al.*, 1997). والبكتريا التي تدخل الخلايا الطلائية تشكل خزين بكتيري لاعادة الاصابة نظرا لأنها في مأمن من اليات دفاع العائل ومن تأثير البنسلين لعدم قدرته على اختراق الخلايا بعكس مضادي الكلندامايسين Clindamycin والريفامبسين Rifampcin اللذين يمتلكان قدرة جيدة على الاختراق (Neeman *et al.*, 1998).

أظهرت الدراسات بان الكلندامايسين يكون أكثر فعالية في علاج الأمراض الناتجة عن المسبحيات من مضادات البيتا لاكتام, وانه يتصف بتأثير اطول ولا يتاثر بكثافة البكتريا ولا بمرحلة نموها بعكس مضادات البيتا لاكتام، بالاضافة الى ان له القدرة على تثبيط انتاج البروتين M والعديد من الانزيمات والذيفانات التي لها دور في مقاومة البكتريا للبلعمة ، وتثبيط انتاج البكتريا لمتعدد السكريد الدهني (LPS) الذي يحفزخلايا وحيدة النواة (Monocytes)على انتاج عامل نخر الورم TNF-α (Efstratiou, 2000; Stevens and Kaplan, 2000).

وجد Tanaka وجماعته (2005) بان للارثرومايسين والكلندامايسين القدرة على تثبيط انتاج العديد من الانزيمات والذيفانات المنتجة من بكتريا *S. pyogenes* وبضمنها الذيفان SPE A وانزيم السيستاين بروتييز SPE B والستربتولايسين O (SLO) مما يجعلها اقل قدرة على مقاومة البلعمة.

يعد الارثرومايسين البديل الامثل للبنسلين في حالة حساسية المرضى له ولكن سجلت حالات عديدة للمقاومة له في انحاء مختلفة من العالم نتيجة لتزايد استعماله لعلاج المرضى الحساسين للبنسلين كما تزايدت نسب المقاومة له بصورة ملحوظة في كل من فرنسا وايطاليا واسبانيا وفلندة (Bingen *et al.*, 2000)

يشترك الارثرومايسين والكلندامايسين (مضادات مجموعة Macrolides) مع اللنكومايسين Lincomycin التابع لمضادات Lincomsides مع الستربتوغرامين B (Streptogramin B) أو مايعرف بمضادات MLS في القدرة على تثبيط انتاج البروتين من خلال ارتباطه بالوحدة 50 S للرايبوسوم وتحفيز فك الارتباط بين معقد peptide –tRNAوالرايبوسوم (Roberts *et al.*, 1999).

توجد اليتان رئيستان في المسبحيات لمقاومة مضادات MLS الأولى تدعى بتحوير الهدف Target modification وتتضمن إضافة جزيئة أو اثنتين من المثيل إلى الادنين في الموقع (A2058) للرنا الرايبوسومي rRNA بفعل انزيمات Erythromycin Resistance Methelases المشفرة في الجين *erm*، وتحتوي المسبحيات على اربعة اصناف رئيسة لانزيمات Erm هي: Erm (A) و Erm (B) و Erm (C) و Erm (F) (Roberts *et al.*, 1999).

والآلية الثانية للمقاومة هي Active Drug Efflex أو ما يعرف بـ Macrolides drug efflex (mef) المشفر في الجين *mef A* والذي يعمل على تقليل تركيز الارثرومايسين داخل الخلية البكتيرية للحد الذي يصبح فيه غير مؤثرا (Roberts *et al.*, 1999).

وتنتقل جينات *mef A* بالاقتران من سلالات بكتريا *S. pyogenes* المقاومة إلى السلالات الحساسة لكل من *S. pyogenes* و *E. faecalies* (Kataja[a] *et al.*, 1998). وأظهرت نتائج تحليل الجينات بان جينات *mef A* المشفرة Macrolides drug efflex في بكتريا *S. pyogenes* تطابق جينات *mef E* المشفرة لمضخة الادوية في بكتريا *S. pneumonia* وبقية المسبحيات المحللة للدم بيتا بحوالي 90 % (Kataja[b] *et al.* 1999).

2-12 النسق البلازميدي Plasmid profile

البلازميد هو عبارة عن تركيب حلقي يتكون من خيطين حلزونيين من الـ DNA البكتيري ويعد من العناصر الوراثية خارج الكروموسومية وعادة ما تحمل البلازميدات جينات مسؤولة عن عوامل الضراوة او المقاومة للمضادات الحيوية في البكتريا (Levy, 2001 ; Kaye *et al.,* 2000).

للبلازميدات قابلية على التضاعف الذاتي بدون الإعتماد على كروموسوم العائل لأحتوائها على منشأ التضاعف تدعى Replicon,كذلك يتميز البلازميد بأنه مستقر وراثياً ويحتوي على جينات من1-300 جين ويوجد في بدائية النواة Prokaryotes مثل البكتريا وكذلك في حقيقية النواة Eukaryotes مثل الخمائر والفطريات وتكون الجينات المحمولة على البلازميد غير ضرورية لحياة وتكاثر الخلية البكتيرية والبكتريا الفاقدة للبلازميد تكون طبيعية في وظائفها (Prescott *et al* ., 2005).

كذلك فان حمل البلازميدات لجينات المقاومة المتعدد multiresistance يضيف بعدا اخر إلى الخطورة الصحية التي تشكلها بلازميدات الضراوة (Kumar and Talwar[b] ,2010) فقد أثبتت الدراسات إن صفة المقاومة المتعددة لمضادات الحيوية يمكن إن تنتقل كوحدة واحدة إلى خلايا أخرى عن طريق الاقتران (Raja and Selvam ,2009) ، وقد أشار الباحث Chin *et al*.,) (2005انه يمكن للبلازميد إن ينتقل من بكتريا إلى أخرى عن طريق الاقتران وكذلك عن طريق التحول الوراثي وبالتالي تنتقل معه صفة المقاومة لمضادات الحيوية (Patwardhan *et al*., 2008) ، لا يحمل البلازميد الجينات المسؤولة عن صفة المقاومة لمضادات الحيوية فقط بل قد يحمل جينات أخرى مسؤولة عن عوامل ضراوة أخرى في البكتريا مثل صفة إنتاج الكبسولة في بكتريا *Klebsiella pneumoniae* تكون الجينات المسؤولة عنها محمولة على بلازميد (Pinsky *et al*.,2009).

2-13 تحييد البلازميدات Plasmid curing

يعرف التحييد بأنه عملية فقدان العزلات البكتيرية للبلازميد ويمكن ان يكون فقدان البلازميد ذاتياً Spontaneous من خلال فشل نسخة البلازميد في الانتقال الى الخلية الجديدة او بأستعمال عوامل كيميائية Chemical agent وعوامل فيزيائية Physical agents (Prescott *et al* ., 2005) كما ان لبعض المضادات الحيوية تأثيراً على ال DNA البلازميدي مما يسهل فقدان تلك البلازميدات كمضاد Rifampicin,Novobiocin (Johuston and Richmond,1970).

هنالك الكثير من العوامل المحييدة Curing agent التي تستعمل لتحييد البلازميد قد تكون فيزياوية، وأخرى كيمائية ومنها الصبغات مثل الاكريفلافين Acriflavin (Chin *et al.*,2005) والاكريدين البرتقالي Acridin orange و بروميد الاثيديوم Ethidium bromide (Lee *et al* ;Patwardhan *et al.*,2008 .,2009)،إذ تستعمل بنجاح في تحييد البلازميدات من البكتيريا، وهذه الصبغات تثبط بشكل سريع وكامل عملية تضاعف البلازميدات ، و تستعمل (SDS) Sodium Dodecyl Sulfate في تحييد بعض البلازميدات (Lavanya *et al.*,2011 ;El-banna *et al.*,2010) إذ أن بعض الخلايا الحاوية على بلازميد أو أكثر تكون حساسة بدرجة كبيرة إلى مركب (SDS) ويكون هذا المركب أفضل من بروميد الاثيديوم ومن المعاملة الفيزيائية (باستعمال درجات حرارة عالية) في بعض البكتريا (El-banna *et al.*,2010; Raja and Selvam ,2009).

كذلك استعملت بعض مضادات الحيوية في التحييد مثل Novobiocin و Rifampicin (Raja and Selvam ,2009 ;Chin *et al.*,2005) و وغيرها و استعمل Mitomycin-C (Trevorse,1986) .

من الناحية التطبيقية يلاحظ اختلاف في العوامل والتراكيز الداخلة في تحييد البلازميدات التي تعتمد على نوع العزلات المعاملة بها ، وكفاءة العامل المحيد ومقدار التأثير والفعالية التي يعمل بها على الخلية البكتيرية (Trevorse,1986) . فقد أشار (Kumar[b] *et al.*, 2010) إلى إن إضافة صبغة بروميد الاثيديوم إلى الوسط الزرعي بتراكيز مختلفة (10,8,6,4,2) مايكروغرام /مليلتر يؤدي إلى فقدان البلازميد من البكتريا .

تستعمل بعض المعاملات الفيزيائية في تحييد البلازميدات لكنها اقل كفاءة من المعاملات الكيميائية مثل الحرارة و تغيير الحموضة pH وغيرها (Patwardhan *et al.*, 2008)، وأشار (Kumar[b] *et al.*, 2010) إلى إن استعمال درجة حرارة 45 م° في تحييد البلازميد أدى إلى فقدان البلازميد من بكتريا *Lactobacillus helveticus* ، و إن للتشعيع تأثيرا مهما في عملية التحييد ، وتؤدي عوامل عدة عملاً مهماً في كفاءة عملية فقدان البلازميدات ، مثل نوع العزلة البكتيرية ،و كمية و نوع العامل الفيزيائي المستعمل للتحييد، و مدة المعاملة، والحالة الفسيولوجية للخلايا وغيرها، علما إن عملية التحييد تحصل نتيجة التأثير في عملية البناء الحياتي للأحماض النووية أو في نفاذية الغشاء الخلوي (Trevorse , 1986) .

3- المواد وطرائق العمل

3-1 المواد Materials

جدول (3-1) الأجهزة والأدوات Equipments and instruments

اسم الجهاز	الشركة المجهزة
اسطوانات النمو اللاهوائي Candle jar	Gallen kamp(England)
اسطوانة زجاجية مدرجة Graduated glass cylinder	Supc-Orior(Germany)
الموصدة Autoclave	Andromа(India)
المازج الدوار Vortex	Labcco (Germany)
جهاز نبذ مركزي Centrifuge	Gallen kamp(England)
جهاز النبذ المركزي الصغير Microfuge	Heraeus(Germany)
جهاز التقطير Water distillatory	Manesty (England)
جهاز الترحيل الكهربائي Gel electroctrophoresis apparatus	Helena(U.S.A)
الحاضنة Incubator	Gallen kamp(England)
الحمام المائي Water bath	Gallen kamp(England)
دوارق مختلفة الأحجام Flasks	China
الفرن Oven	Memmert(Germany)
مقياس الاس الهيدروجيني pH- Meter	BIO-RAD
ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance	Memmert (Germany)
مصدر ألاشعة فوق البنفسجية UV-Transilluninator	Herolab(Germany)
مجهرضوئي مركب Compound light microscope	Olympus(Japan)

جدول (3-2) المواد الكيميائية و الصبغات Chemicals and stains

اسم المادة	الشركة المجهزة
اكاروز Agarose	Sigma(U.S.A)
الاكردين البرتقالي Acridin orange	BDH(England)
اليود Iodine	BDH(England)
ببتون Peptone	Difco(U.S.A)
بنسلين جي Penicillin G	Sundox(Australia)
بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2	Oxoid(England)
بروميد الاثيديوم Ethidium-Bromide	BDH(England)
ترس قاعدي Tris-base	BDH(England)
حامض البوريك Boric acid	Oxoid(England)
حامض الهيدروكلوريك HCL	BDH(England)
حليب الفرز Skim milk	Himedia(India)
خلاصة الخميرة Yeast extract	BDH(England)
سكروز Sucrose	Merk(Germany)
سكريات Rafinose , Salicin , Ribose , Trehalose, Lactose, Inulin, Manitol, Sorbitol,	BDH(England)
صبغة البلور البنفسجي Crystal violet stain	BDH(England)
صبغة الكونكو الحمراء Congo red stain	BDH(England)
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4	BDH(England)
فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na_2HPO_4	BDH(England)
فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين المائية	

$Na_2HPO_4.2H_2O$	BDH(England)
Sodium dodecyl sulfate كبريتات دودسل الصوديوم	BDH(England)
Ethanol(95%) كحول اثيلي	BDH(England)
$BaCl_2$ كلوريد الباريوم	BDH(England)
NaCl كلوريد الصوديوم	Fluka(Switzerland)
$CaCl_2$ كلوريد الكالسيوم	BDH(England)
Glycerol كليسرول	BDH(England)
starch نشأ	BDH(England)
Nigrosin نكروسين	Fluka(Germany)
NaOH هيدروكسيد الصوديوم	BDH(England)

جدول (3-3) الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة

اسم الوسط	الشركة المجهزة
اكار- اكار Agar – Agar	Oxoid(England)
اكار ازايد الدم Azide Blood Agar base	Biolife(Italy)
اكار الدم الأساس Blood Agar base	Oxoid(England)
اكار مولر هينتون Muller–Hinton Agar	Oxoid(England)
تربتكيز صويا اكار Trypticase soy agar	Oxoid(England)
وسط اكار المغذي Nutrient Agar	Himedia(India)
وسط اكار الدنيز الصلب DNase Agar	BDH(England)
وسط المرق المغذي Nutrient broth	Oxoid(England)

وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain–Heart infusion Broth	Oxoid(England)
وسط نقيع القلب والدماغ الصلب Brain–Heart infusion Agar	Oxoid(England)

3-1-4 المضادات الحيوية

جدول (3-4) اقراص مضادات الحياة Antibiotics Disks المستخدمة بالدراسة

اسم مضادات الحياة Antibiotics disks	الرمز Symbol	تركيز المضاد في القرص Concentration	المنشأ nation	حساسة S	متوسطة I	مقاومة R
Ampicillin	AM	10µg	Bioanalyse(Turkey)	>22	21-19	<18
Tetracyclin	TE	30 µg	Bioanalyse(Turkey)	>19	18-15	<14
Chloramphenicol	C	30 µg	Bioanalyse(Turkey)	>21	20-18	<17
Ciprofloxacin	CIP	5 µg	Oxoid (England)	>21	20-16	<15
Novabiocin	NV	1 µg	Oxoid (England)	>21	20-15	<14
Imipenem	IPM	10 µg	Oxoid (England)	>28	27-20	<19
Augmentin	AMC	30 µg	Bioanalyse(Turkey)	>18	14-17	<13
Penicillin	P	10 IU	Oxoid (England)	>20	27-21	<28
Clindamycin	CD	2 µg	Oxoid (England)	>19	18-16	<15
Gentamycin	GEN	10 µg	Bioanalyse(Turkey)	>15	14-13	<12
Amikacin	AK	10 µg	Bioanalyse(Turkey)	>17	16-15	<14
Erythromycin	E	15 µg	Bioanalyse(Turkey)	>21	20-16	<15
Trimethoprim	TMP	25 µg	Bioanalyse(Turkey)	>19	18-16	<15
Bacitracin	B	0.04 I.U	AL-Razi center	>13	12-9	<8
Vancomycin	VA	30 µg	Oxoid (England)	>12	11-10	<9
Cloxacilln	CX	1 µg	Bioanalyse(Turkey)	>14	13-10	<9

3-1-5 مواد متفرقة

3-1-5-1عدة التشخيص API 20Strep Kit

مجهزة من الشركة Bio Meriux (France) وتضم مجموعة من الفحوصات الكيموحيوية .

3-1-5-2 عدة عزل الدنا البلازميدي Plasmid Extraction

مجهزة من الشركة (USA) Promega .

3-1-5-3 مصدر الدم

دم بشري صنف AB مجهز من مصرف دم / ديالى/ مستشفى بعقوبة التعليمي.

3-2 تحضير المحاليل والكواشف والصبغات

حضرت عدد من المحاليل والكواشف والصبغات , وعقمت تلك التي تحتاج إلى تعقيم باستخدام جهاز الموصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 م ولمدة 15 دقيقة وضغط 15 باوند/انج^2, فيما استخدمت طريقة الترشيح بالمرشحات الدقيقة Millipore filter بقطر(0.22) مايكروميتر للمحاليل التي تتلف بدرجات الحرارة العالية , أما المواد الزجاجية فقد عقمت بالفرن عند درجة حرارة 180 م لمدة ساعتين.

3-2-1 المحاليل

3-2-1-1 المحلول الملحي الفسلجي Normal saline

حضر المحلول الملحي الفسلجي حسب ما جاء في (Forbes[b] *et al.*,2002) بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 90 مل ماء مقطر, ثم أكمل الحجم الى 100 مل, عقم بالموصدة وحفظ بدرجة حرارة 4 م لحين الاستعمال.

3-2-1-2 محلول ثابت العكورة القياسي Macfarland standred

حضر المحلول وفق ما جاء في (Bauer *et al.*,1996) كما يلي:-

محلول-أ- اذيب1.175 غم من كلوريد الباريوم في 90 مل من الماء المقطر، واكمل الحجم الى 100 مل.

محلول – ب– حضر 1% من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 بإضافة 1 مل من الحامض الى 90 مل من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم الى100 مل.

أضيف 0.5 مل من محلول (أ) الى 99.5 مل محلول (ب) رُج المحلول بقوة ووضع في أنابيب زجاجية محكمة الغطاء لمنع التبخر وحفظت في الظلام لحين الاستعمال . تمزج محتويات الأنبوبة جيداً قبل كل إستخدام .

3-2-1-3 محلول صبغة المحفظة

حضر بإذابة 10 غم من النيكروسين Nigrosin في 100 مل من الماء المقطر ثم غلي لمدة 20 دقيقة و رشح لمرتين، وأضيف له 0.5 مل فورمالديهايد وحفظ عند درجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال (Stukus, 1997) .

3-2-1-4 محاليل الكشف عن انزيم البيتالاكتاميز

حضرت محاليل الكشف عن انزيم بيتالاكتاميز بطريقة اليود السريعة (Rapid Iodometric method) وذلك بحسب ما ورد في (WHO,1978) والمحاليل هي

3-2-1-4-1 محلول النشأ Starch solution

حضر أنياً عند الاستعمال بإذابة 0.1 غم من مادة النشا في 10 مل من الماء المقطر, نقلت القنينة الى حمام مائي بدرجة حرارة 100 م لمدة 10 دقائق وذلك للتأكد من ذوبان النشأ, حفظ المحلول في درجة حرارة 4 م .

3-2-1-4-2 محلول اليود Iodine solution

حضر بإذابة 2.3غم من اليود و 5.32 غم من يوديد البوتاسيوم في 90 مل من الماء المقطر بعدها أكمل الحجم الى 100 مل وحفظ المحلول في قنينة معتمة ومعقمة بدرجة حرارة 4 م .

3-2-1-4-3 محلول البنسلين جي Penicillin G solution

حضر بإذابة البنسلين جي في دارئ الفوسفات المتكون من محلولين هما :

المحلول –أ– أذيب 0.907 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 في كمية من الماء المقطر, أكمل بعدها الحجم الى 100 مل .

المحلول–ب– أذيب 0.946غم من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين Na_2HPO_4 , و 1.19غم من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين المائية $Na_2HPO_4.2H_2O$ في كمية من الماء المقطر, أكمل بعدها الحجم بالماء المقطر الى 100 مل وبعد ذلك اخذ 87.6 مل من محلول أ , 12.4 مل من محلول ب , خلطا معا وضبط الأس الهيدروجيني الى 6.0 بعد تحليل هذا الدارئ ذوب فيه 0.5693 غم من بنسلين جي Penicillin G , عقم بالترشيح و وزع في عبوات صغيرة .

3-2-1-5 محاليل عزل الدنا البلازميدي

أستخدمت محاليل عزل ألدنا البلازميدي المجهزة من قبل الشركة Promega (U.S.A) وتضم المحاليل الاتية:

1. Cell lysis buffer (CLB).
2. Neutralization Solution (NS).
3. Endotoxin Removal Wash (ERW).
4. Column Wash Solution (CWS).
5. Elution Buffer (EB).

Kit name : Pure Yield^{TM} Plasmid Miniprep System .

3-2-1-6 محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions

حضرت محاليل الترحيل الكهربائي وبحسب ما ورد في (Maniatis *et al.*,1982) وكما يأتي :

- دارئ الترس بوريت TBE

حضر بتركيز نهائي 0.089 مولار ترس قاعدي Tris – base ، 0.089 مولار من حامض البوريك Boric acid و 0.002 مولار من مادة EDTA ، اكمل الحجم الى 1 لتر من الماء المقطر، ضبط الاس الهيدروجيني الى 8 وعقم بالموصدة .

- صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide

حضر محلول خزين تركيزه 5 ملغم/مل ، بإذابة 5 ملغم من صبغة بروميد الاثيديوم في 1 مل من الماء المقطر المعقم ، وخفف عند الاستعمال للحصول على تركيز نهائي مقداره 0.5% مكغم/مل .

- دارئ التحميل Loading Buffer

حضر من 30% كليسيرول ، 50% TBE، 20% ماء مقطر ، 25 .0% صبغة بروموفينول الازرق .

3-2-2 كاشف الكاتاليز Catalase Reagent

حضر من خلط 1 مل من بيروكسيد الهيدروجين المركز 30% مع 90 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 3% بيروكسيد الهيدروجين, و حفظ في الثلاجة في عبوة داكنة, استعمل للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على انتاج انزيم الكاتاليز Catalase (Collee *et al.*,1996).

3-2-3 صبغة كرام Gram stain

حضرت كما ورد في (Baron[b] *et al.*,1999) وتكونت من صبغة Crystal violet و محلول اليود Iodine و كحول الايثانول وصبغة السفرانين Safranin .

3-3 تحضير الأوساط الزرعية

تم تحضير الأوساط الزرعية الصلبة والسائلة كل بحسب تعليمات الشركة المصنعة. وبعد ضبط الأس الهيدروجيني عقمت بوساطة الموصدة بدرجة حرارة Autoclave 121م ولمدة 15 دقيقة وبضغط 15باوند/انج^2 وهذه الأوساط تشمل ما يأتي :

3-3-1 وسط غراء الدم Blood agar medium

تم تحضير وسط غراء الدم بإضافة دم انسان طازج نوع AB بنسبة 5% الى الوسط الأساسي Blood agar base المحضر بحسب طريقة الشركة المجهزة والمعقم بوساطة الموصدة والمبرد الى 45 م, اذ استخدم وسطاً لتنمية البكتريا الممرضة والتحري عن قابلية البكتريا على تحلل الدم ونوع التحلل (Baron and Finegold[a],1990).

3-3-2 وسط غراء الجوكليت Chocolate agar medium

تم تحضيره بإضافة 5% من دم انسان طازج نوع AB الى الوسط الأساس Blood agar base المعقم بجهاز الموصدة والمبرد الى 80 م لتكسير كريات الدم الحمر وتحول الوسط الى اللون البني. استعمل الوسط لتنشيط نمو البكتري (Baron and Finegold[a] ,1990).

3-3-3 وسط غراء أزايد الدم Azide blood agar medium

استخدم هذا الوسط للعزل الأولي , إذ يسمح لنمو المكورات المسبحية والمكورات العنقودية ويمنع نمو البكتريا الأخرى, وكذلك يتم التمييز بين تحلل المكورات المسبحية نوع الفا Alpha عن التحلل نوع بيتا Beta (Starr *et al.*,1981).

3-3-4 وسط غراء مولر هينتون Muller- Hinton agar medium

استخدم هذا الوسط للكشف عن حساسية البكتريا لمضادات الحياة , إذ أضيف 5% دم انسان طازج نوع AB إلى الوسط المحضر في حالة بكتريا المكورات المسبحية.

3-3-5 الوسط السائل لنقيع القلب والدماغ والدم Brain heart infusion blood broth

تم تحضيره بإضافة 5% من دم الانسان الطازج نوع AB الى وسط Brain Heart Infusion Broth بعد تعقيمه وتبريده الى 45 م استعمل هذا الوسط لتنشيط نمو البكتريا واستمراريتها (Frederickson *et al.*,1997).

3-3-6 وسط الكونكوريد اكار Congo-red agar

يتكون هذا الوسط من 37 غم وسط نقيع القلب والدماغ المغذي Brain heart infusion broth و 50 غم من السكروز Sucroce و 10 غم من اكار-اكار Agar-Agar و 0.8 غم من صبغة الكونكوريد Congo-red stain و 1000 مل من الماء المقطر, إذ أذيبت المواد في 900 مل من الماء المقطر ما عدا صبغة الكونكوريد, وعقم الوسط بالموصدة اما صبغة الكونكوريد فقد أذيبت في 100 مل من الماء المقطر وعقمت بالموصدة وبعدها اضيفت الى الوسط بعد تبريده الى 55 م وصبت في اطباق معقمة, هذا الوسط يستخدم للكشف عن قابلية البكتريا في انتاج الطبقة المخاطية Slime layer (Freeman *et al.*,1989).

3-3-7 وسط تربتيكيز صويا أكار Trypticase Soy Agar TSA

حُضر هذا الوسط بأذابة 19 غم من TSA في 500 مل من الماء المقطر بحسب تعليمات الشركة المصنعة، وأُضيفت أليه 3% من خلاصة الخميرة وعقم بالموصدة، أستخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا لإنتاج البكتريوسين (القصاب والخفاجي، 1992).

3-3-8 وسط تخمر السكريات

حضر وسط مرق تربتون الصويا بحسب تعليمات الشركة المجهزة وأضيف له واحد من السكريات آلاتية: لاكتوزLactose , تريهالوز Trehalose ، رايبوز Ribose ، سالسين Salicin ، رافينوز Raffinose ،الانيولين Inulin, المانيتول Manitol , سوربيتول Sorbitol بتركيز 1 % وكاشف احمر الفينول بتركيز 0.0018% وضبط الأس الهيدروجيني إلى 7.4 وعقم بالموصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 15 باوندا\انج^2 لمدة 15 دقيقة (عيسى، 2000).

3-3-9 وسط التحري عن إنتاج أنزيم السيستائين بروتييز

حضر وسط Skim Milk Columbia Agar كما جاء في (عيسى، 2000) وذلك بإذابة 2.3 غم ببتون و0.1 غم نشأ و 0.5 غم كلوريد الصوديوم و 3 غم أكار -أكار في 100 مل من الماء المقطر، وعدل الأس الهيدروجيني إلى 7.3 وعقم بالموصدة عند درجة حرارة 121 مْ و ضغط 15 باوندا\انج^{2}لمدة 15 دقيقة, ثم برد إلى درجة حرارة 50 مْ وأضيف له 100

مل من الحليب المقشود بتركيز 3% المعقم بالموصدة عند درجة حرارة 121 وضغط 15 باوند\انج^2 و لمدة 15 دقيقة وصب في أطباق معقمة.

3-3-10 وسط إدامة العزلات البكتيرية

لقحت الانابيب الحاوية على وسط الاكار المغذي المائل Nutrient agar slant بالعزلات البكتيرية ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة وبعدها حفظت في درجة حرارة 4 م لحين الاستخدام, وتمت عملية إدامة العزلات بشكل دوري شهريا وذلك بتنشيطها على الوسط المغذي السائل.

3-3-11وسط حفظ العزلات حفظ طويل الأمد من 8-12 شهر

حضر الوسط بإضافة 15 مل من الكليسرول إلى 85 مل من نقيع الدماغ والقلب, و وزع في قناني صغيرة ذات غطاء محكم وعقم بالموصدة وترك ليبرد في درجة حرارة الغرفة, ثم لقح بمستعمرات نقية من البكتريا النامية على الوسط الاكار المغذي باستخدام الناقلLoop, وحفظت القناني في درجة حرارة 20- بعد حضانتها لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37م استخدمت هذه الطريقة في الحفظ الدائم (Ausubel *et al.*,1987).

3-4 طرائق العمل Methods

3-4-1 جمع العيناتSamples collection

جمعت 200 مسحة لمرضى مصابين بالتهاب اللوزتين (Tonsillitis) الحاد والمزمن من المراجعين لشعبة الأنف والأذن والحنجرة في المستشفى العام في المقدادية والمراكز الصحية التابعة للقضاء للمدة من2012/9/15 الى2013/1/15 وبأعمار تتراوح مابين 1-50 سنة ومن كلا الجنسين. أخذت النماذج بعد التشخيص ألسريري للحالات المرضية من قبل الطبيب الأخصائي, إذ تم اخذ المسحات عن طريق تمرير مسحة قطنية معقمة على منطقة اللوزتين بعد خفض اللسان بخافضة اللسانTongue depressor (Atlas *et al.*,1995), زرعت العينات مباشرة على وسطي أكار الدم و أكار أزايد الدم. جرى أيضا سحب 5 مل من دم وريد المرضى المخمجين و وضع في أنبوبة معقمة وترك ليتجلط بدرجة حرارة الغرفة، ثم وضع بجهاز

النبذ المركزي لمدة 10 دقائق بالسرعة 2000 دورة لكل دقيقة للحصول على المصل بهدف إجراء فحص ASOT.

3-4-2 زرع العينات Culture of samples

زرعت العينات على طبق اكار الدم من خلال تدوير المسحة على ربع واحد من الطبق أما بقية الطبق فقد خطط بواسطة ناقل معقم (Vandipitt[b] *et al.*,2003) حضنت الاطباق هوائيا بتوفير 5-10% من غاز ثاني اوكسيد الكربون CO_2 , وبعدها حضنت لمدة 24-18 ساعة بدرجة حرارة 37 م في اسطوانة النمو اللاهوائي (Candle jar) (Mcmillan *et al.*,1996) بعد ظهور النمو نقلت مستعمرة واحدة ، وخططت على وسط غراء الدم ، وغراء أزايد الدم لغرض تنقيتها، و من ثم نقلت الى شريحة زجاجية نظيفة، وصبغت بصبغة كرام وفحصت بالمجهر الضوئي.

3-4-3 تشخيص البكتريا المعزولة (Identification of Isolated Bacteria)

تم التشخيصDiagnosis تبعا الى(Forbes[c] *et al.*,2007) بأتباع مايلي:

3-4-3-1 التشخيص ألزرعي Cultural identification

درست الصفات الزرعية للبكتريا *S.pyogenes* من خلال زراعتها على وسط غراء الدم وغراء أزايد الدم إذ تم ملاحظة الصفات الزرعية للمستعمرات النامية على هذه الأوساط من حيث الحجم واللون وشكل الحافة وقدرة البكتريا على تحليل كريات الدم الحمراء تحليلا كاملا نوع بيتا أو جزيئا نوع الفا حول المستعمرة النامية.

3-4-3-2 التشخيص ألمجهري Microscopical identification

تم التشخيص بأستخدام صبغة كرام وذلك بأخذ جزء من مستعمرة نامية على وسط غراء أزايد الدم وضعت على شريحة نظيفة, بعدها ثبتت، و صبغت بصبغة كرام ، و من ثم فحصت مجهريا بملاحظة نوع الاصطباغ وشكل تجمع الخلايا.

3-3-4-3 التشخيص الكيموحياتيBiochemical identification

3-3-4-3-1 اختبار الكاتاليزCatalase test

نقل عدد من المستعمرات النامية على شريحة زجاجية نظيفة و أضيف لهـا 1-2 قطرة من محلول بيرو كسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3% ويعد الفحص موجبا عند ظهور فقاعات غازية نتيجة لتحرير غاز الأوكسجين.

3-3-4-3-2 اختبار الحساسية للباستراسين Bacitracin sensitivity test

استخدم هذا الاختبار لتفريق مجموعة المسبحيات نوع A عن المجاميع الأخرى أخذت من 1-5 مستعمرات من البكتريا و خططت على طبق غراء الدم و حضنت من 18-24 ساعة وبعدها تم اخذ مستعمرة نقية و زرعت على طبق مولر هينتون المضاف إليه 5% من دم الانسان الطازج نوع AB و وضع قرص الباستراسين في وسط الطبق وبعد الحضن لمدة 18-24 ساعة في درجة حرارة 37م وبعدها قرأت النتائج التي تعتمد على منطقة التثبيط حول القرص (Vandipitt[b] *et al.*,2003). إذا اقل من 12 ملم تعد من مجموعة أخرى , وإذا أكثر من 21 ملم تعد من مجموعة المسبحيات A.

3-3-4-3-3 اختبار قابلية البكتريا على النمو بدرجة 10 و45 م

زرعت البكتريا على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم وحضنت عند درجة حرارة 10 و45 مْ لمدة 24 ساعة وسجل النمو(Cappuccino and Sherman, 1987).

3-3-4-3-4 اختبار تخمر السكريات

لقحت الانابيب الحاوية على اوساط السكريات بالبكتريا وحضنت عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة النتيجة الموجبة تكون بتغيير لون الوسط الاحمر الى الاصفر.

3-4-3-3-5 اختبار قابلية البكتريا على النمو اللاهوائي

زرعت البكتريا على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم وحضنت لاهوائيا باستعمال اسطوانة الجار اللاهوائي Anaerobic jar والعدة اللاهوائية الخاصة بتحرير غازي الهيدروجين وثاني اوكسيد الكاربون وحضنت عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة وسجل وجود النمو.

3-4-3-3-6 اختبار قابلية البكتريا على النمو بوجود 5% من CO_2

زرعت البكتريا على و سط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم وحضنت باستعمال اسطوانة النمو اللاهوائي لتوفير من غاز ثاني اوكسيد الكاربون بدرجة 37 مْ لمدة 48 ساعة وسجل وجود النمو.

3-5 التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا *S.pyogenes*

3-5-1 طريقة احمر الكونكو Congo-red method للتحري عن قابلية البكتريا في إنتاج الطبقة المخاطية Slime layer and Biofilm formation

نقلت مستعمرة مفردة نقية نامية على وسط اكار الدم الى أنبوبة اختبار حاوية على5 مل من محلول الملح الفسلجي المحضر في الفقرة (3-3-1-1) وبعد المزج الجيد باستعمال المازج قورنت عكورته بعكورة أنبوبة ماكفرلاند Macfarland No.0.5 المحضر في الفقرة -3-1-2) (3 ولقح وسط الكونكوريد المحضر في الفقرة (3-2-6) و حضنت الاطباق في درجة حرارة 37 م لمدة 24-48 ساعة, النتيجة الموجبة حينما تظهر المستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة, أما النتيجة السالبة فتبقى المستعمرات وردية اللون, أما النتيجة غير المحددة فتظهر المستعمرات سوداء اللون بدون وجود الكثافة البلورية الجافة (Freeman *et al.*,1989; Mathur *et al.*,2006) .

3-5-2 التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج البكتريوسين Bacteriocin

أستخدمت طريقة اقراص الاكار Cup disc: بحسب الطريقة المذكورة في (القصاب والخفاجي،1992) وكالآتي:

زرعت البكتريا المنماة مسبقا في وسط مرق نقيع القلب والدماغ وبعمر 24 ساعة بطريقة النشر على وسط اكار TSA ، ثم حضنت الاطباق في درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة. وبعد الحضن عملت اقراص في هذا الوسط ووضعت على سطح الاكار المغذي والمنشور عليه بالناشر مقدار 0.1 مل من مزروع كل من عزلات الاختبار البكتيرية المذكورة بعد ان ثبت عدد الخلايا المزروعة بمقدار 10^8 خلية / مليلتر بعد مقارنتها مع محلول ماكفرلاند القياسي المحضر ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة، بعدها قيس قطر منطقة التثبيط حول الأقراص .

3-5-3التحري عن وجود المحفظة

تم التحري عن وجود المحفظة وفق ما جاء في Stukus (1997) وذلك بأخذ ملئ الناقل من مزروع بكتيري فتي بعمر 18ساعة نامي في وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم ووضعه على شريحة زجاجية ومزجه مع قطرة من صبغة النيكروسين وتغطيتها بغطاء الشريحة وفحصها تحت المجهر النتيجة الموجبة تكون بظهور هالة شفافة غير مصطبغة بالصبغة حول الخلية البكتيرية تمثل المحفظة.

3-5-4 التحري عن إنتاج الهيمولايسين

زرعت البكتريا في وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم مع ملاحظة عمل طعنات في الاكار لملاحظة التحلل الذي يسببه الستربتولايسين الحساس للاوكسجين وحضنت الأطباق عند درجة حرارة (37) مْ لمدة (24) ساعة ثم فحصت وسجل وجود التحلل الدموي (Atlas *et al.*,1995).

3-5-5 التحري عن إنتاج إنزيم السستائين بروتييز

زرعت البكتريا على وسط كولومبيا الصلب مع الحليب الفرز وحضنت عند درجة حرارة 37مْ لمدة 24-48 ساعة. النتيجة الموجبة ظهور هالة تحلل شفافة تحيط بالمستعمرات دليل على قدرة البكتريا على إنتاج الإنزيم.

3-5-6 التحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم DNase

اعتمدت طريقة Jeffries وجماعته (1957) والتي تعد من أولى الطرائق المستعملة في الكشف عن وجود انزيم DNase وتعتمد هذه الطريقة على أساس أن DNA غير المتحلل يترسب بفعل الحامض, بينما تذوب النيوكليوتيدات القليلة الوحدات و الأحادية المتحررة بفعل انزيم DNase, إذ يتم تلقيح وسط مغذي يحوي DNA بطريقة التخطيط Streaking أو البقع Spotting وبعد مدة الحضن من18-24 ساعة يغمر سطح الوسط الصلب بحامض الهيدروكلوريك 1 عياري ويلاحظ ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات البكتيرية المنتجة للإنزيم (Blazevic and Ederer,1975) .

3-5-7 التحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم Streptokinase

اخذ ملئ 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 اخذ 0.1 مل من الأخير واستعمل لتلقيح 10 مل من الوسط نفسه وحضن بالظروف نفسها ثم نقل 0.5 مل من المزروع المنشط واضيف 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 *et al.*,1975)

3-6 فحص API 20 Strep

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 API 20 Strep. Medium الذي سبق وان 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 نفس درجة الحرارة وتقرأ النتائج مرة أخرى بالاعتماد على Analytical profile Index Strep ليتسنى لنا معرفة هوية العزلة البكتيرية .

3-7 فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotics Sensitivity test

استخدمت طريقة Bauer and Kerby القياسية لاختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية (Vandepitte[a] *et al.*,1991) و كالأتي :

- لقح 5 مل من وسط المرق المغذي بـ 2-3 مستعمرات من مزارع بكتيرية نقية بعمر 24ساعة.
- رجت الانابيب جيدا و حضنت بالحاضنة 37 م لمدة 24 ساعة.
- قورنت عكورة النمو بعكورة المحلول ثابت العكرة القياسي لإعطاء عدد تقريبي مساوي 1.5×10^8خلية \ مل.
- نقل 0.1 مل من العالق البكتيري, ونشر على وسط اكار مولر هنتون المضاف إليه 5%من الدم لكي يكون مناسباً للنمو في حالة *S.pyogenes* , ترك الطبق لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لحين جفاف المزروع.
- نقلت اقراص المضادات الحيوية الى سطح الوسط الزرعي بوساطة ملقط معقم بمعدل 6-7 اقراص 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 NCCLS(2010) .

3-8 التحري عن انتاج انزيم البيتالاكتاميز β-Lactamase

3-8-1 تحضير العالق البكتيري

لقحت انابيب اختبار تحوي كل منها على 5 مل من محلول الملح الفسلجي بـ 150 مايكروليتر من مزارع بكتيرية منماة في وسط نقيع الدماغ والقلب بعمر 18 ساعة للعزلات قيد الدراسة, مزجت بمازج ، وبذلك تم تحضير عالق بكتيري بتركيز تقريبي للخلايا 10^8 خلية/مل, وذلك بعد مقارنة عكورة النمو المتكون مع محلول ثابت العكورة القياسي.

3-8-2 استخدام طريقة اليود القياسية السريعة للتحري عن قابلية العزلات على انتاج انزيم بيتالاكتاميز بحسب ما ورد في (WHO,1978) وكما يأتي:

- حضرت مزارع للعزلات البكتيرية بعمر 24 ساعة.
- نقلت المستعمرات البكتيرية بوساطة العروة الى انابيب ابندروف الحاوية على 100 مايكروليتر من البنسلين جي المحضر في الفقرة(3-3-1-3-3) وحضنت الانابيب لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 م .
- اضيفت الى كل أنبوبة 50 مايكروليتر من محلول النشأ المحضر في الفقرة (3-3-1-3-1) و مزج جيدا مع محتويات الأنبوبة.
- أضيف 20 مايكروليتر من محلول اليود المحضر في الفقرة (3-3-1-3-2) حيث تحول لون المحلول الى ازرق غامق نتيجة تفاعل اليود مع النشأ, مزجت محتويات الانابيب جيدا لمدة دقيقة واحدة.
- احتسبت النتيجة موجبة عند حصول تغير لوني سريع من الأزرق الى الأبيض خلال دقيقة واحدة فقط من إضافة الكاشف اليود.
- أعيد الفحص بظهور نتيجة موجبة متأخرة أكثر من 5 دقائق .

3-9 التحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended β-Lactamase .

استخدمت طريقة الأقراص المتاخمة Disk approximation للتحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وذلك بحسب ما جاء في (Jarlier *et al.*,1988) و كالآتي :

- حضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة ونشر المزروع بوساطة المسحة القطنية (Swab) المعقمة على أطباق حاوية على وسط مولرهنتون المضاف إليه 5% من الدم وتركت الاطباق لمدة 10 دقائق لتجف.
- وضع قرص يحتوي على خليط من Amoxicillin/Clavulanic Acid 30µg/Disk في وسط الطبق ألزرعي الملقح, ثم رتبت اقراص المضادات الحيوية Cefotaxime , Ceftazidime , Pipracillin على بعد 3 سم من مركز قرص خليط المضاد/المثبط.
- حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 م ولمدة 18-24 ساعة.
- بعد ملاحظة مناطق التثبيط فان حدوث اتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي و واحد أو أكثر من الأقراص المذكورة دليل النتيجة الموجبة أي انتاج العزلة للإنزيم.

3-10 التحري عن قابلية البكتريا لإنتاج انزيم بيتا لاكتاميز المعدني Metallo-betalactamase باستخدام طريقة اتحاد المضاد الحيوي (Imipenem (IPM) EDTA)

- حضر العالق البكتيري للعزلات ونشر المزروع بوساطة المسحة القطنية Swab المعقمة على أطباق حاوية على وسط مولرهنتون المضاف إليه 5% من الدم , تركت الاطباق لمدة10 دقائق لتجف.
- وضع قرصين من المضاد الحيوي Imipenem(10µg) في وسط الطبق الزرعي الملقح على أن تكون المسافة بينهما 3 سم.
- تم وضع 10 مايكروليتر من محلول EDTA الى واحد من اقراص Imipenem.
- حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 م لمدة 16-18 ساعة.
- بعد ملاحظة مناطق التثبيط فإن زيادة منطقة التثبيط على 7 ملم حول قرص Imipenem مع EDTA مقارنة مع قرص Imipenem لوحده تعد النتيجة موجبة وان البكتريا منتجة لأنزيم الميتالو بيتالاكتاميز Metallo-beta lactamase (Bhalerao *et al.*,2010).

3-11 استخلاص ألدنا البلازميدي Plasmid DNA extraction

تم إستخلاص الدنا البلازميدي بإتباع الخطوات الآتية إعتماداً على تعليمات الشركة المجهزة (Promega U.S.A):

- نقل 600 مايكروليتر من المزروع البكتيري بعمر 18 ساعة الى أنبوبة ابندروف 1.5مل .
- اضيف 100 مايكروليتر من البفر المحلل للخلايا Cell Lysis Buffer ، ومزج الخليط عن طريق قلب الانبوبة 6 مرات .
- اضيف 350 مايكروليتر من محلول التعادل المبرد 4-8C° Cold Neutralization Solution ومزجت المحتويات بالقلب مرات عدة .
- نبذ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق .
- نقل الراشح تقريباً 900 مايكروليتر الى عمود تنقية Pure Yield Minicolumn وأهملت الحبيبة اللزجة المتكونة .
- وضع عمود التنقية داخل انبوبة الجمع Collection Tube ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 15 ثانية .
- تم ازالة الراسب المتكون في أنبوبة الجمع ، وإرجاع عمود التنقية داخلها.
- أضيف 200 مايكروليتر من محلول Endotoxin Removal Wash الى عمود التنقية Minicolumn ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 15ثانية .
- اضيف 400 مايكروليتر من محلول Column Wash Solution الى عمود التنقية Mincolumn ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة / دقيقة بالمنبذة الصغيرة لمدة 30 ثانية .
- نقل عمود التنقية Minicolumn الى أنبوبة إبند روف نظيفة سعة 1.5 مل ، ثم أضيف 30 مايكروليتر من محلول Elution Buffer مباشرة الى أنبوبة عمود التنقية وترك المزيج لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة .
- نبذ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة لمدة 15 ثانية ، ثم غلقت انبوبة إبندرف الصغيرة باحكام ، وحفظ الدنا البلازميدي المستخلص بدرجة 20C°- وقد اصبح جاهزاً للترحيل الكهربائي.

3-12 الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي في هلام الاكاروز Gel electrophoresis

أجريت عملية الترحيل الكهربائي لفصل خليط الدنا المستخلص وفحصه :

- تم اذابة 0.7 غم من الاكاروز في 100 مل من دارئ TBE وترك الهلام ليبرد وتصل حرارته 50 م° ، اضيف 5 مايكروليتر من محلول بروميد الايثيديوم بتركيز 5 مكغم/ مل ومزج جيداً.
- حضر قالب صب الهلام Tray وذلك باحاطة حافتي القالب بالشريط اللاصق وثبت مشط تكوين الحفر Comb على بعد واحد سنتمتر من احدى حافتي القالب، ثم صب الهلام داخل القالب الموضوع في وضع افقي تماماً وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة وفيما بعد رفع المشط والشريط اللاصق برفق ووضع القالب داخل حوض الترحيل الكهربائي المحتوي على دارئ TBE بحيث يغمر هلام الاكاروز .
- أجريت عملية تحميل عينات الدنا في حفر الهلام بعد مزج 10 مايكروليتر من محلول الدنا مع 3 مايكروليتر من دارئ التحميل Loading buffer.
- رحلت كهربائياً تحت فرق جهد قدرة 75فولت/سم وبمعدل مرور للتيار 20 ملي امبير ولمدة 90 دقيقة .
- تم فحص الهلام بوساطة جهاز UV-Transilluminator بطول موجي مقداره 336 نانوميتر ، ثم صور بوساطة الكاميرا (O'Connell,1984).

3-13 تحييد الدنا البلازميدي Curing of Plasmid DNA

3-13-1 التحييد بأستخدام مادة الاكردين البرتقالي و بروميد الاثيديوم وكبريتات دودسل الصوديوم

أستخدمت مادة الاكردين البرتقالي Acridin orange مادة محيدة وبالاعتماد على (Trevors,1986) واستخدمت مادتي بروميد الاثيديوم وكبريتات دودسل الصوديوم بوصفها مواداً محيدة وبالاعتماد على (Elbanna *et al.*,2010):

- تم عمل تخافيف مختلفة للمادة المحيدة أعلاه للحصول على التراكيز 16 , 32 , 64 , 128, 256 , 512 , 1024,2000,2500,3000 مكغم/مل.

- لقحت الأنابيب الحاوية على هذه التراكيز بـ 0.1 مل من البكتيريا المنماة في المرق المغذي بعمر 18 ساعة.
- حضنت الانابيب بدرجة 37 م° ولمدة 24 ساعة ، بعدها لوحظت كثافة النمو في الانابيب مع المقارنة بأنبوب السيطرة ، وحدد تأثير المادة المحيدة على نمو البكتيريا .
- تم تحديد التركيز المثبط الادنى للمادة المحيدة من خلال تحديد اقل تركيز له عمل على تثبيط نمو البكتيريا .
- عملت تخافيف عشرية للانبوب الحاوي على أعلى تركيز للعامل المحيد الذي عنده أستمرت البكتيريا بالنمو يسمى هذا الانبوب Subminimal inhibitory concentration.
- اخذ 0.1 مل من أنابيب التخفيف 10^{-4} الى 10^{-8} ونشرت على وسط الأكار المغذي وحضنت بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة .
- بعدها اجري فحص مضادات الحيوية للعينات التي عمل لها تحييد لغرض التأكد من فقدان صفة المقاومة لبعض مضادات الحيوية وهذا دليل على حصول التحييد .
- تم ترحيل العزلات المحيدة بالاكاروز للتحري عن فقدانها للحزم البلازميدية التي تمتلكها العزلة الاصلية .

3-14 التحليل الاحصائي Statistical Analysis

تم استخدام النظام الاحصائي الجاهز **spss** الاصدار الثامن عشر وباستخدام مربع كاي chi– square test x^2) توجد فروق المعنوية بين النتائج في الجداول عند مستوى معنوي 5%.

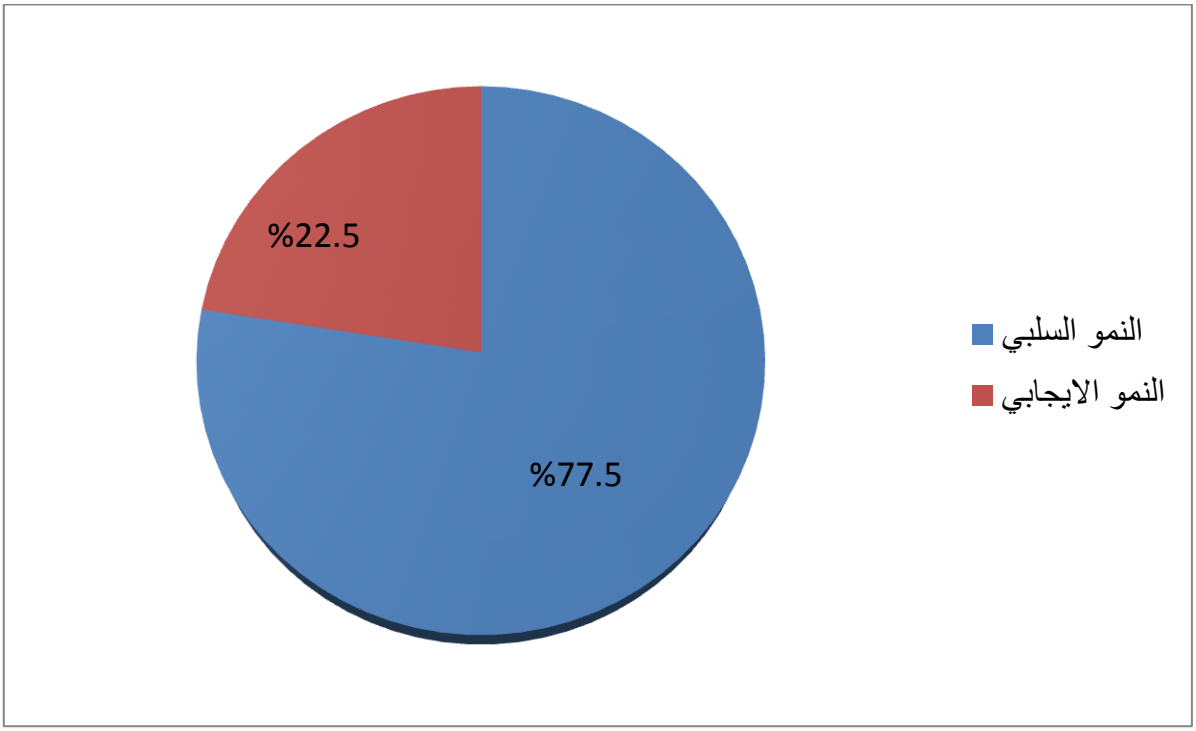
4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1 العزل والتشخيص Isolation and Identification

4-1-1 العزل Isolation

تم الحصول على 45 عزلة تابعة لجنس المسبحيات من اصل 200 مسحة ويوضح الشكل (4-1) النسب المئوية للعينات التي اظهرت 77.5% نمواً سالبا للزرع البكتريولوجي و22.5% نمواً موجبا للزرع البكتريولوجي من مجموع العينات البالغة 200 مسحة .

تم الحصول على 15 عزلة من بكتريا المسبحيات القيحية *Streptococcus pyogenes* من اصل 45 عزلة تابعة لجنس المسبحيات شكل (4-2) وللمدة من 2012/9/15 الى 2013/1/15 واستخدم وسط غراء الدم ووسط غراء ازايد الدم لزراعة المسحات وتم التأكد من تشخيصها بالاختبارات الكيميوحيوية .



شكل (4-1) النسب المئوية للعينات التي اظهرت نموا سالبا وايجابيا للزرع البكتريولوجي

4-1-2 نسبة العزل

تم الحصول على 45 عزلة تابعة لجنس المسبحيات منها 15 عزلة تعود للمسبحيات المحللة للدم تحللا كاملا من نوع بيتا وهي بكتريا *S.pyogenes* و8 عزلة تابعة لبكتريا *S.agalactiae* و7 عزلة تابعة لبكتريا *S.dysgalactiae* و 5 تابعة لبكتريا*S. equisimilis* و5عزلة تابعة لبكتريا *S.viridans* و5 عزلة تابعة لبكتريا *S.pneumoniae* وتم تمييز العزلات بالاعتماد على الجدول (4-1) .

ان نسبة عزل بكتريا *S.pyogenes* في هذه الدراسة قد وصلت الى 33.3% شكل (4-2) وبذلك تكون هذه النسبة اعلى من النسبة التي حصلت عليها العبودي (2002) اذ كانت نسبة العزل لديها 28.12% من اصل 160 مريض مصاب بالتهاب اللوزتين وأيضا هذه النسبة تكون اعلى من النسبة التي حصل عليها المهداوي (2005) الذي تمكن من عزل بكتريا *S.pyogenes* بنسبة 23% وبذلك تكون نسبة عزل البكتريا في هذه الدراسة غير متوافقة مع دراسة اجراها (Razak *et al.*,2012) إذ تمكن من عزلها بنسبة 6.6% وأيضا النتيجة التي توصلنا اليها لاتتوافق مع (Ching *et al.*,2012) إذ كانت نسبة عزل البكتريا 4.1% .وأيضا لا تتفق مع دراسة اجراها (Muthusamy *et al.*,2012) أذ كانت نسبة العزل 5.1% حصل عليها من 255 مسحة من اللوزتين ووجد كل من (Mokkapati and Yalamanchili ,2013) .

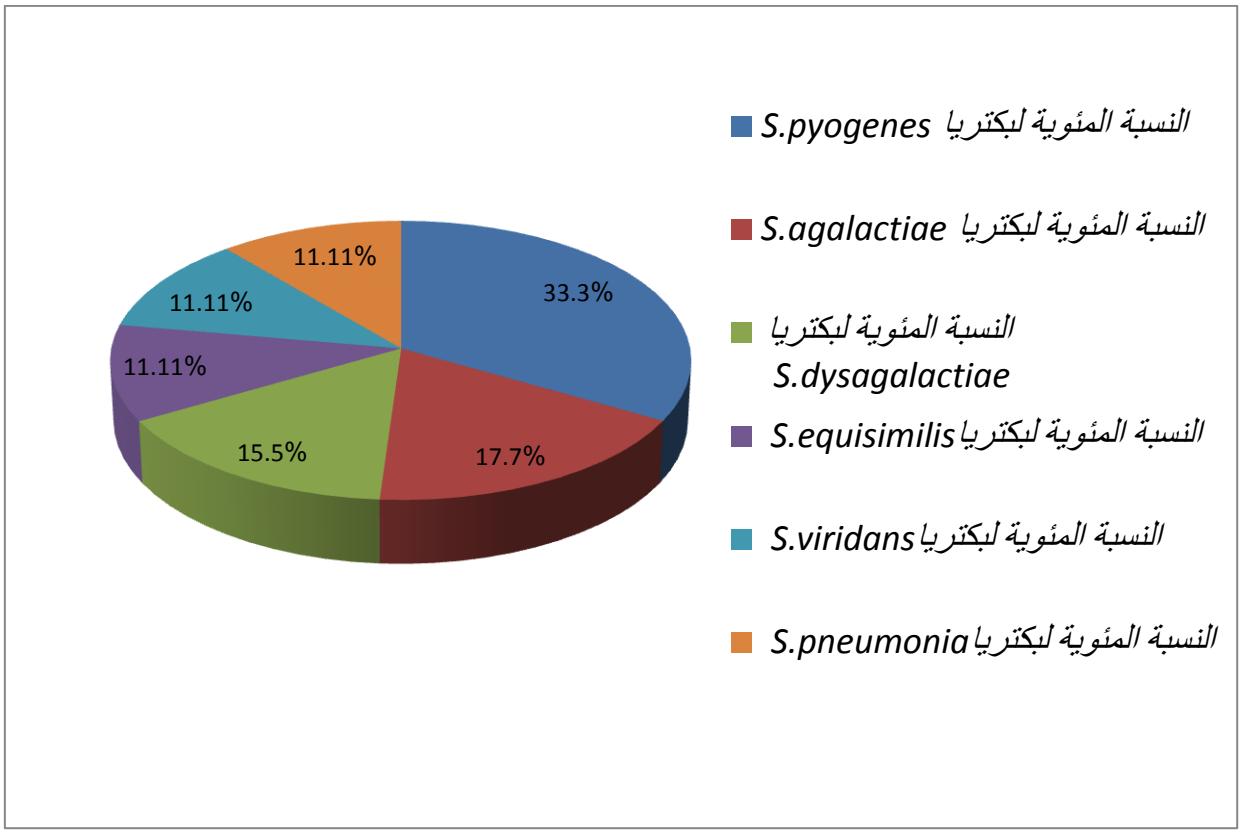
ان نسبة عزل بكتريا *S.pyogenes* كانت 25.37% وتكون متقاربة جزئيا من النتيجة التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة. وان النمطين المصلين G,C التي تعود لهما بكتريا *S.agalactiae* و *S.dysgalactiae* و *S.equisimilis* إذ نسبة العزل 17.7% و 15.5% و 11.11% على التوالي شكل (4 -2) وهذه النسبة تكون اعلى من النسبة التي توصلت اليها عيسى 2000 إذ كانت نسبة العزل لديه للنمطين المصلين C وG هي 9.4% و 4.7% على التوالي وتوصلت الشبيب 1977 الى ان النمط المصلي A يمثل 23% فقط وان النمطين المصلينC وG يمثلان 58% و14% على التوالي في المسبحيات الحالة للدم بيتا والمعزولة من الاطفال المصابين بالتهاب اللوزتين, كما وجدت كل من القوادري 2000 و العبودي 2002 بان بكتريا *S.pyogenes* يشكل 18.5% في حين توصل السعيد 1997 الى ان النمط المصلي A يمثل 32.9% وبذلك تكون مقاربة للنسبة التي حصلنا عليها وان النمطين المصلين C وB يمثلان 11% و4.1% على التوالي اما بالنسبة لبكتريا *S.pneumonia* فقد كانت نسبة العزل قيد الدراسة هي 11.11% وتكون هذه النسبة

مقاربة لما توصل اليه السعيد 1997 اذ كانت نسبة عزل هذه البكتريا 8.2% وان النسبة التي حصلنا عليها متقاربة جزئيا مع دراسة قامت بها النعيمي 2005 حيث كانت نسبة عزل هذه البكتريا لديها14.78% .

ان بكتريا *S.pneumonia* تمتلك القدرة على الاختراق والتضاعف داخل الانسجة الذي يمكنها من احداث الخمج ومما يساعدها على ذلك امتلاكها للمحفظة وبروتين M اللذين يعيقان عملية البلعمة من قبل الخلايا البلعمية (Ankur *et al.*,2010) .

وفيما يتعلق بنسبة عزل بكتريا *S.viridans* فقد كانت تشكل نسبة 11.11% وهذه النسبة تكون متقاربة نسبيا للنتيجة التي توصل اليها المهداوي 2005 إذ كانت نسبة العزل لهذه البكتريا 19.6% والنسبة التي حصلنا عليها لا تتوافق مع السعيد 1997 الذي عزل بكتريا *S.viridans* بنسبة 43.8% وقد قام (Lhja *et al.*,1997) بعزلها بنسبة 24.5% من مجموع 53 عزلة بكتيرية مختلفة الانواع تم عزلها من حالات الاصابة بخراج مجاور اللوزتين وكانت احدى تلك العزلات بصورة نقية وقد فسر ذلك الى دورها المباشر في تلك الاصابة وان هذه البكتريا من الانواع الانتهازية التي تصيب اللوزتين عند توافر الظروف المناسبة.وقد اختلفت نسبة عزل المسبحيات المحللة للدم باختلاف المصادر وذلك يعود الى اختلاف المواقع الجغرافية للعزل واختلاف الطرائق والتقنيات المستخدمة في العزل.

مكان الجدول للخصائص



شكل (4-2) النسب المئوية لعزل اجناس المسبحيات

4-1-3 توزيع الاصابات بالتهاب اللوزتين حسب جنس المريض والإصابات الحادة والمزمنة

بلغ عدد المصابين بالتهاب اللوزتين من الذكور 120 اصابة وبنسبة 60% وفي الاناث بلغت 80 اصابة وبنسبة40% جدول (4-2) وقد توزعت الاصابة الخمجية للوزتين ما بين الاصابات الحادة والمزمنة لكلا الجنسين اذ بلغت الاصابات الحادة 65 وبنسبة 32.5% والإصابات المزمنة 135 وبنسبة 67.5% من مجموع الحالات . تتفق هذه النتائج مع ما وجدته الكنزاوي 2004 في كون الاصابات المزمنة تشكل نسبة اعلى من الاصابات الحادة إذ شكلت الاصابات الحادة عند الكنزاوي 2004 , 73 اصابة وبنسبة 39% في حين كانت الاصابات المزمنة 114 اصابة وبنسبة 61% ولكن النتائج التي توصلنا اليها لا تتوافق مع العوادي 2000 التي شكلت لديها الاصابات الحادة نسبة 51% في حين كانت نسبة الاصابات المزمنة 12% ان سبب التباين في نسب الاصابات الحادة والمزمنة يعود الى كون العينات جمعت في اوقات مختلفة امتدادا من نهاية اشهر الصيف الى اشهر الشتاء ودائما ما تكون هذه الاصابات مزمنة وقد عانى اصحابها تكرار الاصابة وتضخم اللوزتين

المستمر وتبين من الدراسة الحالية ان نسبة اصابات الذكور اعلى من الاناث وهذا يعود الى طبيعة عمل الذكور واختلاطهم بالمحيط الخارجي والعمل لساعات طويلة .

جدول (4–2) توزيع الاصابات بالتهاب اللوزتين بحسب جنس المريض والإصابات الحادة والمزمنة

نوع الاصابة	الذكور	الاناث	العدد الكلي
حادة	(33.3%) 40	(31.25%) 25	(32.5%) 65
مزمنة	(66.6%) 80	(68.7%) 55	(67.5%) 135
العدد الكلي	(60%) 120	(40%) 80	(100%) 200

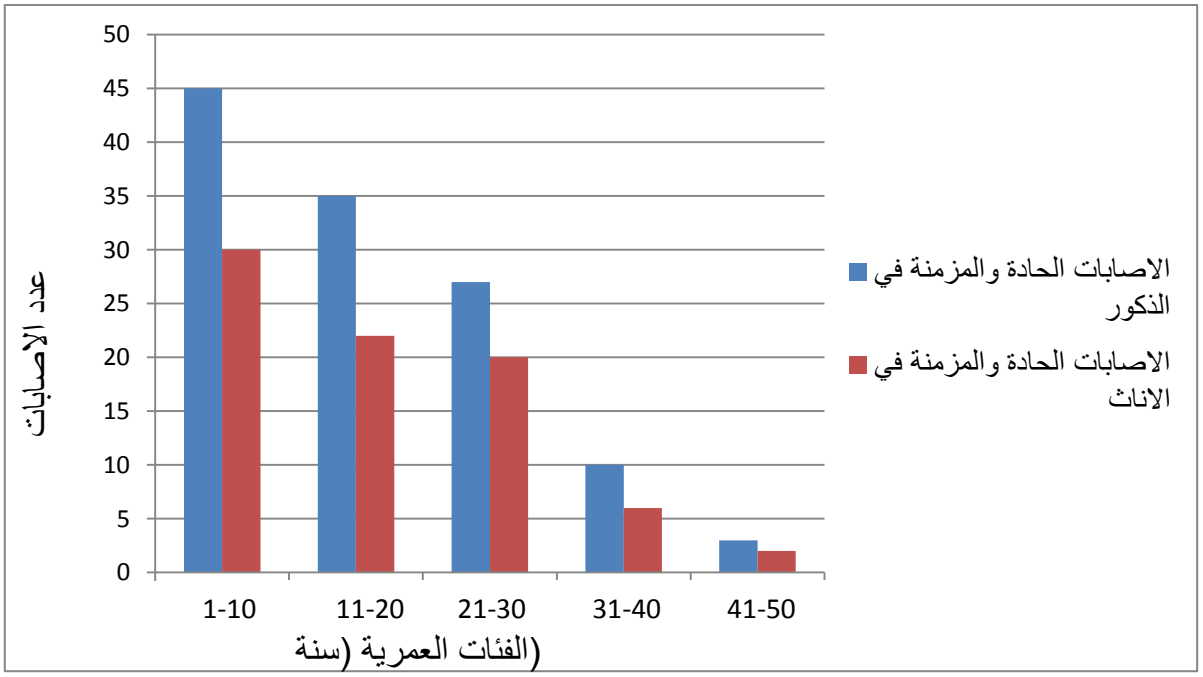
X^2 المحسوبة = 0.095 , X^2 الجدولية = 0.67

توجد فروق معنوية عند مستوى دلالة 0.05

اما توزيع الاصابات حسب الفئات العمرية شكل(4–3) إذ شمل التهاب اللوزتين الفئات العمرية ما بين 1–50 سنة , وكان الاطفال في الفئة العمرية من 1–10 سنة من كلا الجنسين هم الاكثر عرضة للإصابة بالتهاب اللوزتين وتوصل(Patel *et al.*,1992) الى النتائج نفسها أذ بلغ تردد الاصابة لهذه الفئة في الذكور الى 45 وبنسبة 37.5% تليها الفئات العمرية 11–21,20 –30 بنسبة تكرار 27,35 وبنسبة 29.1% , 22.5%على التوالي في حين كانت الفئة العمرية 41–50 هم الاقل عرضة للإصابة من غيرهم حيث كان تكرار الاصابة 3 اصابات وبنسبة 2.5% اما بالنسبة للإناث فقد كان الاطفال دون سن العاشرة هم الاكثر عرضة للإصابة وبتكرار30 وبنسبة25% تليها الفئة العمرية 11–20 بتكرار 22 وبنسبة 18.3% وكانت الفئة العمرية 41–50 ايضا هي الاقل تعرضا للإصابة فقد بلغ تكرار الاصابات 2 اصابة وبنسبة1.6% وأيضا توصل (Allos *et al.*,2009)الى ان اغلب الاصابات تكون ضمن هذه الفئة العمرية 1–10 سنة وكذلك توصل (Gerber,2007) الى نفس النتيجة.

كانت الفئة العمرية 1–10 سنة هي الاكثر تعرضا للإصابة وذلك لعدم نضوج الجهاز المناعي لديهم وتطوره لدى البالغون مقارنة مع صغار السن ويمتلك البالغين مناعة مكتسبة نتيجة تعرضهم للإصابات في مراحل حياتهم المختلفة وبالإضافة لهذه التغيرات فان الاطفال في هذه الفئة العمرية

يتعرضون لأمراض مختلفة مثل الانفلونزا Influenza والحصبة Measles وأمراض اخرى قد تؤدي الى ضعف الجهاز المناعي ضد الاصابات البكتيرية (Prescott *et al.*,1993) .



شكل (4-3) توزيع الاصابات بالتهاب اللوزتين حسب الفئات العمرية

4-1-4 توزيع مجاميع المسبحيات المعزولة حسب توزيعها بالذكور و الاناث

تم الحصول في الدراسة الحالية على 45 عزلة تابعة للمسبحيات من اصل 200 مسحة وكان توزيع العزلات في المرضى المصابين بالتهاب اللوزتين هي 15 عزلة تابعة للنط المصلي A وبنسبة 33.3% و8 عزلة تابعة للنمط المصلي B وبنسبة 17.7% و7 عزلة تابعة للنمط المصلي C وبنسبة 15.5% و5 عزلة تابعة للنمط المصلي G وبنسبة 11.11% و5 عزلة تابعة لبكتريا *S.pneumoniae* وبنسبة 11.11% و5 عزلة تابعة لبكتريا *S.viridans* وبنسبة 11.11% ويشير الجدول(4-3) الى ان نسبة عزل بكتريا *S.pyogenes* التابعة للنمط المصلي A تكون اعلى في الذكور من الاناث إذ بلغت نسبتها بالذكور 24.4% مقارنة بالإناث التي بلغت نسبتها 8.8% وكذلك هو الحال بالنسبة لباقي المجاميع الاخرى إذ كانت نسبة اصابة بكتريا *S.agalactiae* للذكور 13.3% وللإناث 4.4% كذلك نسبة اصابة بكتريا *S.dysagalactiae* للذكور 13.3% وللإناث 2.2% وبكتريا *S .equisimilis* بلغت نسبة اصابتها للذكور قد بلغت 6.6% وللإناث 4.4% اما بكتريا *S.pneumonia* كانت نسبة اصابتها للذكور 4.4% وللإناث 6.6% وبكتريا *S.viridans* اصابت الذكور بنسبة 8.8% وللإناث 2.2% نستنتج من هذه الدراسة ان اعلى الاصابات للأنواع

البكتيرية المعزولة من التهاب اللوزتين تكون اعلى في الذكور من الاناث ولكافة الانواع ما عدا بكتريا *S.pneumonia* إذ كانت نسبة اصابة هذه البكتريا للاناث اعلى من الذكور.

جدول (4-3) توزيع مجاميع المسبحيات المعزولة بحسب الذكور والاناث

انواع البكتريا المعزولة	العدد%	الذكور%	الاناث%
S.pyogenes	(33.3%)15	(24.4%)11	(8.8%)4
S.agalactiae	(17.7%)8	(13.3 %) 6	(4.4 %) 2
S.dyagalactiae	(15.5%)7	(13.3 %) 6	(2.2 %) 1
S.equisimilis	(11.11 %) 5	(6.6 %) 3	(4.4 %) 2
S.viridans	(11.11 %) 5	(8.8%) 4	(2.2%) 1
S.pneumonia	(11.11%) 5	(4.4 %) 2	(6.6 %) 3
Total	(100%) 45	(70.8%) 32	(29.2%) 13

X^2 المحسوبة = 1.248 , X^2 الجدولية = 0.67

توجد فروق معنوية عند مستوى دلالة 0.05

4-1-5 التشخيص Identification

شخصت عزلات بكتريا *S.pyogenes* بالاعتماد على صفاتها المظهرية والاختبارات المجهرية والزرعية والكيميوحيوية جدول (4-4) ، اذ كانت مستعمراتها صغيرة الحجم بقطر 0.5 ملم بيضاء رمادية دائرية الشكل وذات تحدب قليل ، واظهر الفحص المجهري للعزلات بان الخلايا كروية الشكل موجبة لصبغة كرام ومرتبة بشكل سلاسل وتكون سالبة لفحص الكاتاليز وتحتاج لكميات من غاز CO_2 تتراوح من 5-10% من اجل نموها وايضا لها القدرة على النمو تحت ظروف لاهوائية وباستخدام Anaerobic jar ، وتكون حساسة للباستراسين وليس لها القدرة على النمو بدرجات حرارية مختلفة مثل 45, 10 ، ولها القدرة على تخمير بعض انواع السكريات وتحويله من اللون الاحمر الى اللون الاصفر .

وتم التشخيص بإتباع الفحوصات التشخيصية المتبعة من قبل (Forbes[c] *et al.*,2007)

جدول (4-4) الفحوصات التشخيصية

الاختبار	*S.pyogenes*
نوع تحلل الدم	β
فحص الكاتاليز	–
النمو بوجود Co_2	+
النمو اللاهوائي	+
الحساسية للباستراسين	S
النمو بدرجة 10 مْ	–
النمو بدرجة 45 مْ	–
تخمر اللاكتوز	+
تخمر الانيولين	–
تخمر المانيتول	–
تخمر الرافينوز	–
تخمر الرايبوز	–
تخمر السالسين	+
تخمر السوربيتول	–
تخمر التريهالوز	+
نوع الاصطباغ بصبغة كرام	+
شكل الخلايا	كروية منتظمة في سلاسل

β نوع التحلل الدموي بيتا، (+) نتيجة الفحص موجبة، S حساس, (–) نتيجة الفحص سالبة

4-1-5-1 التشخيص الزرعي

ظهرت المستعمرات النامية على الاوساط الزرعية المذكورة بشكل واضح صغيرة الحجم دائرية ، محدبة كاملة الحواف ،بيضاء اللون محاطة بمنطقة تحلل كامل نوع بيتا وذلك لإنتاجها انزيم الهيمولايسين Hemolysin كانت ظروف نمو البكتريا 24-48 ساعة وبدرجة حرارة 37 مع وجود حوالي 5-10% من CO2 الذي يساعد على ظهور مناطق التحلل بصورة كبيرة (Coering *et al.*,2009) . يختلف حجم منطقة التحلل من عزلة الى اخرى ، ويتأثر بتركيز الدم المضاف الى الوسط الزرعي فعند اضافة تراكيز واطئة منه يصعب تمييز منطقة التحلل، ولذلك كانت نسبة 5% من الدم المضاف هي الافضل للعزل الاولي (Johnson *et al.*,1996) . تتميز بكتريا المسبحيات القيحية *S.pyogenes* عن بكتريا العنقوديات الذهبية *S.aureus* بوصفها تكون عند نموها في الاوساط الزرعية السائلة مثل نقيع القلب والدماغ السائل Brian-heart infusion broth تعطي راسباً حبيبياً في قعر الانبوبة بينما تعطي الاخيرة عكورة في الوسط .

4-1-5-2 التشخيص المجهري

تم التصبيغ بصبغة كرام اذ ظهرت الخلايا بهيأة سلاسل مسبحية موجبة لصبغة كرام ذات لون بنفسجي (Cunningham[b], 2008). كانت السلاسل اكثر طولا في الشرائح المحضرة من الوسط السائل بالمقارنة مع سلاسل في الشرائح المأخوذة من الوسط الصلب. (Murray[b] *et al.*,2007).

4-1-5-3 التشخيص الكيميائي- الحياتي

4-1-5-3-1 فحص الكاتاليز

هو فحص مهم جدا في التفريق بين جنس *Streptococci* غير المنتجة لإنزيم الكاتاليز عن تلك المنتجة لمثل هذه الاجناس مثل *Neisseria*, *Micrococcus*, *Staphylococci* اعطت جميع العزلات نتيجة سالبة لهذا الفحص وذلك بعدم تكون فقاعات من غاز O_2 على المستعمرات النامية على الوسط الزرعي بعد اضافة قطرة من بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3%.

4-1-5-3-2 فحص الحساسية للباستراسين 0.04U/DISC

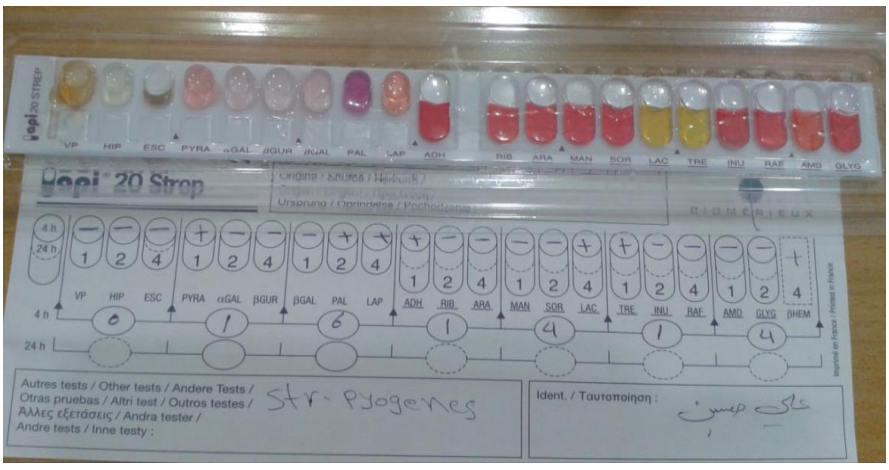
يعد هذا الفحص مهما في تفريق المكورات المسبحية المجموعة A عن باقي المجاميع الحالة للدم نوع بيتا اذ ان 99% من عزلات المجموعة A تكون حساسة للباستراسين عند التركيز 0.04U/DISC وان جميع العزلات المزروعة على وسط مولر هنتون المضاف له الدم اظهرت حساسية واضحة لهذا المضاد الحياتي (Karabay,2005).

4-1-5-3-3 تخمر السكريات

اظهرت جميع العزلات قدرتها على تخمر كل من سكر اللاكتوز والتريهالوز والسالسين من اللون الاحمر الى اللون الاصفر دليل على تكون حامض في الوسط دون انتاج غاز بينما لم تتمكن من تخمير السكريات التالية الانيولين والرافينوز والرايبوز والسوربيتول.

4-1-5-3-4النمو بدرجات حرارة 10, 45 م

لم تظهر جميع العزلات قدرة على النمو في هاتين الدرجتين الحراريتين وهذه صفة مميزة لهذه البكتريا (Cappuccino and Sherman 1987) ولتأكيد تشخيص هذه البكتريا استخدم نظام التشخيص Api 20 Strep system لتأكيد الاختبارات الكيموحيوية الروتينية فقد استعمل نظام Api 20 strep system لتشخيص الانواع البكتيرية العائدة لجنس *Streptococcus* وهو من الاختبارات التشخيصية المهمة والدقيقة والسريعة وعند استخدام هذا النظام للتشخيص يجب ان تكون العزلات نقية 100% وبعكس ذلك يمكن ان تظهر النتائج متضاربة وهذا يقلل من قيمة النظام شكل(4-4).



شكل(4-4) تشخيص بكتريا *S.pyogenes* بنظام Api 20 strep system

4-2 التحري عن بعض عوامل الضراوة المهمة لبكتريا المسبحيات القيحية

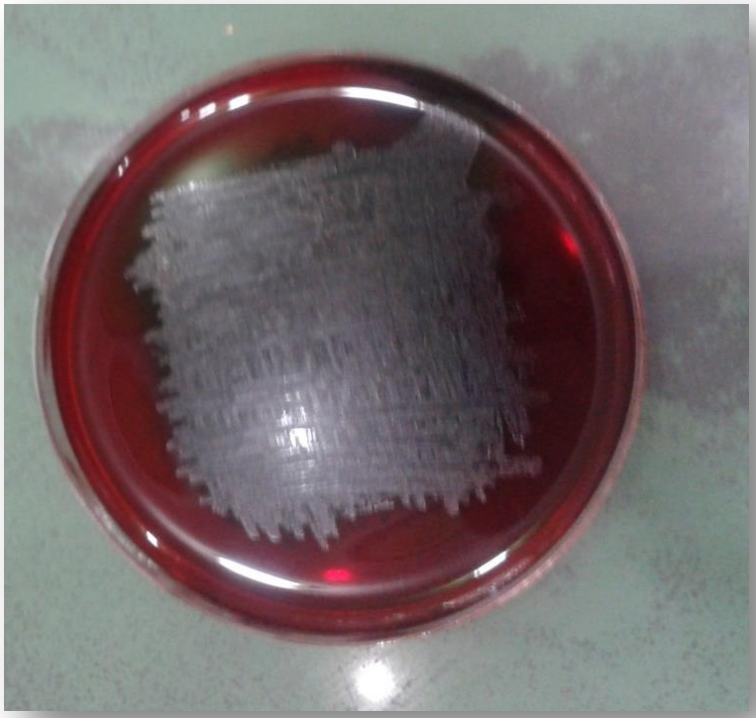
ان قابلية بكتريا *S.pyogenes* على احداث الخمج يعود لامتلاكها عدداً من عوامل الضراوة , بعضها يلعب دورا مباشرا والبعض الاخر له دور غير مباشر فإذا ما اجتمعت هذه العوامل فانها ستكون المسؤولة عن احداث الضرر في جسم العائل , اخضعت جميع العزلات البالغة 15 عزلة لدراسة هذه العوامل وكانت النتائج كما يأتي:

4-2-1 الغشاء الحيوي Biofilim production

اظهرت النتائج 86.6% من العزلات لها القابلية على انتاج الغشاء الحيوي اذ ظهرت المستعمرات المنتجة للغشاء الحيوي سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة وهذه هي النتيجة الموجبة جدول (4-5) ، شكل(4-5) بينما النتيجة السالبة تكون المستعمرات وردية اللون اما النتيجة غير المحددة تكون المستعمرات فيها سوداء اللون بدون توافر الكثافة البلورية وجاءت النتيجة التي توصلت اليها الدراسة متوافقة تقريبا مع النتيجة التي توصل اليها (Baldassarri *et al.*,2006) إذ كانت 90% من عزلاته منتجة للغشاء الحيوي وأيضا النسبة كانت متقاربة للنتيجة التي توصل اليها(Doem *et al.*,2008)اذ وجد بان 93% من عزلاته منتجة للغشاء الحيوي .

توجد علاقة وثيقة بين قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي وقدرتها على إحداث المرض والتسبب بحدوث التهاب مزمن ، فالبكتريا المكونة للغشاء الحيوي لها قابلية أكبر على استعمار جسم المريض والإقامة فيه وتصبح اقل حساسية للعلاج بالمضادات الحيوية ، وتنتج البكتريا بروتينات مرتبطة بالغشاء الحيوي في اثناء الاصابة "BAP Biofilm –Aassociated Protiens إن توافر هذه البروتينات BAP يسهل تكوين الغشاء الحيوي المرتبط ببقاء الجرثومة مدة أطول في جسم المريض. (Cucarella *et al.*, 2004) .

هناك عدد من الاليات التي تتوافر في الغشاء الحيوي والتي تؤدي الى مقاومة المضادات الحيوية وأولى هذه الاليات هي امتلاك الغشاء الحيوي للحصيرة matrix التي تمثل حاجزاً كيميائياً وفيزيائي chemical and physical barrier للمضادات الحيوية (Ciofu *et al* .,2012).والبكتريا التي تنمو في الغشاء الحيوي متحملة لعدد من المضادات الحيوية وتقاوم الاستساغة opsonization والبلعمة phagocytosis ولظروف بيئية مختلفة (Bordi and De bentzmann,2011).



شكل (4-5) اختبار التحري عن انتاج الغشاء الحيوي للعزلة *S.pyogenes*

4-2-2 انتاج البكتريوسين Bacteriocin production

اظهرت نتائج الدراسة الحالية عدم قدرة جميع عزلات بكتريا *S.pyogenes* على انتاج البكتريوسين جدول(4-5) وجاءت هذه النتيجة متطابقة مع دراسة اجراها (Mojgani *et al.*,2006) إذ وجد عدم قدرة بكتريا *S. pyogenes* على انتاج البكتريوسين وتضمنت الدراسة التي قام بها عدداً من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام. وتمكنت اجناس مختلفة من المسبحيات من انتاج البكتريوسين اذ وصلت نسبة انتاج البكتريوسين في بكتريا *S.salivarius* الى 77% وكذلك بلغت نسبة انتاجه في بكتريا *S.mutans* الى 88% في دراسة اجراها (Nes *et al.*,2007)

استخدم في الدراسة الحالية الوسط الصلب Trypticase Soy Agar TSA مضافا اليه الخميرة بنسبة 3% اذ اشار الباحث (Riley[b] *et al* .,2003) ان اضافة خلاصة الخميرة Yeast extract يزيد من انتاجية البكتريوسين , توصل الباحث (Al-charrakh *et al.*,2011) ان الوسط الصلب افضل الاوساط لانتاج البكتريوسين , وذلك بسبب وجود مستقبلات للخلية البكتيرية في الوسط الصلب وعدم وجودها في الوسط السائل .

4-2-3 المحفظة Capsule

لقد تم التحري عن احتواء العزلات على المحفظة بوساطة الفحص المجهري وباستخدام صبغة النكروسين اذ ظهرت الخلايا بشكل عصيات محاطة بهالة ,وبين الفحص المختبري ان جميع العزلات تحتوي على المحفظة جدول(4-5) وهذا يتفق مع Macfaddin (2000) الذي ذكر ان السلالات الضارية للمسبحيات تحتوي على محفظة . تلعب المحفظة دورا مهم في مقاومة بكتريا *S.pyogenes* لدفاعات العائل بوصفها مكونة من مادة الهياليورنيت المشابهة الهياليورنيت في الانسجة الرابطة للعائل , وبذلك فانها تعمل على اخفاء مستضدات البكتريا وتمنع تعرف النظام المناعي للعائل عليها(Wessels[a],2006). وجد (Cywes[a] *et al.*,2000) بان المحفظة تلعب دورا مهما في التصاق البكتريا بالخلايا الطلائية للبلعوم والخلايا المتقرنة للجلد Keratinocytes من خلال ارتباطها بالجزء CD44.فضلا عن دورها الكبير في مقاومة البكتريا للبلعمة فان المحفظة تلعب بوصفها مصدراً لتزويد بكتريا *S.pyogenes* بالحديد لقدرتها على الارتباط بالحديد الحر Free heme والهيموبكسين Hemopexin المتوافرين في المصل والسوائل الجسمية للعائل (Bates *et al.*,2003).

4-2-4 انتاج الهيمولايسين البكتيري Hemolysin production

لقد تم التحري عن قابلية العزلات على انتاج الهيمولايسين واظهرت النتائج ان جميع عزلات *S.pyogenes* لها القدرة على انتاج الهيمولايسين على وسط غراء الدم ووسط غراء ازايد الدم واتفقت هذه النتيجة مع ماتوصلت اليه البغدادي(2006) ، إذ وجدت ان 100% من عزلاتها لها القدرة على انتاج الهيمولايسين , والنتيجة التي توصلنا اليها لاتتفق مع الجبوري, (2007) الذي وجد بان 90% من العزلات التابعة لبكتريا *S.pyogenes* لها القدرة على انتاج الهيمولايسين البكتيري

اشار (Zunino *et al.*,1999) الى ان انتاج الهيمولايسين غير ضروري خلال الاصابة المبكرة ولكنه مهم في مرحلة متأخرة من الاصابة .تنتج المجاميع A,C,G نوعين من الهيمولايسينات هما الستريبتولايسين O والستريبتولايسين S ويشترك هذان الذيفانان بقدرتهما على حل الخلايا الحقيقية النواة Cytolytic toxin.

يلعب الستريبتولايسين O دورا مهما في ضراوة بكتريا *S.pyogenes* وكذلك وجد بان الفعالية الحالة للخلايا للستريبتولايسين O تسهل من غزو بكتريا *S.pyogenes* للبلعوم وتمنع القتل الداخل خلوي للبكتريا وتسهل التصاق البكتريا بالخلايا الطلائية المتقرنة في البلعوم (Haknsson *et*

al.,2005). قد وجد بان الفعالية الحالة للخلايا للستريبتولايسين S لها دور في ضراوة المسبحيات التابعة للنمط المصلي C النوع *S.iniae* وان الطفرات الفاقدة له يحدث اختزال في ضراوتها في نموذج الانسجة الرخوة Murine model مما يشير الى ان الستريبتولايسين S ضروري لاحداث اضرار الانسجة وليس في حالات غزو الدم او التعفن الدموي (Fuller *et al.*,2002).

جدول (4-5) عوامل الضراوة المتوافرة في العزلات قيد الدراسة

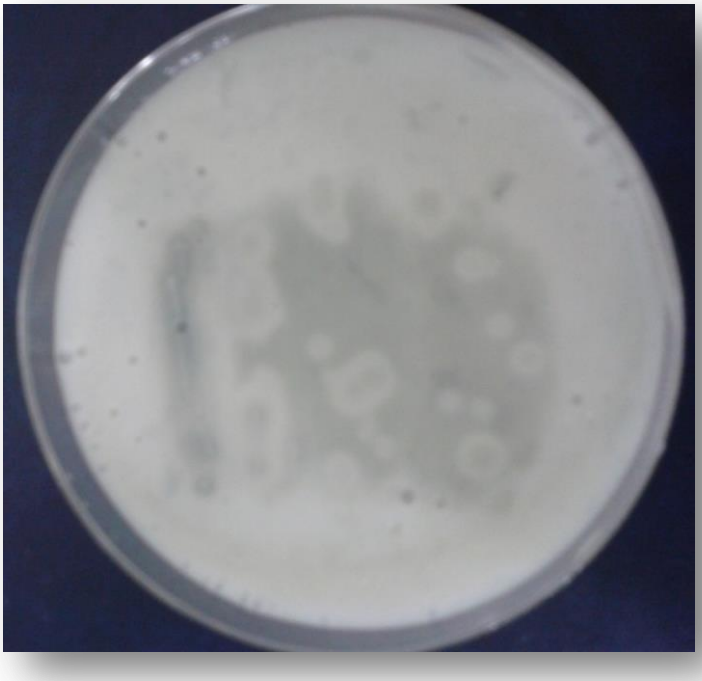
رقم العزلة	الهيمولايسين	الغشاء الحيوي	البكتريوسين	انتاج المحفظة
S.pyo 1	+	+	−	+
S.pyo 2	+	+	−	+
S.pyo 3	+	+	−	+
S.pyo 4	+	−	−	+
S.pyo 5	+	+	−	+
S.pyo 6	+	+	−	+
S.pyo 7	+	+	−	+
S.pyo 8	+	+	−	+
S.pyo 9	+	−	−	+
S.pyo 10	+	+	−	+
S.pyo 11	+	+	−	+
S.pyo 12	+	+	−	+
S.pyo 13	+	+	−	+
S.pyo 14	+	+	−	+
S.pyo 15	+	+	−	+

4-2-5 انتاج السيستائين بروتيز الذيفان SPE B Cystein Protease

تم التحري عن قدرة بكتريا *S.pyogenes* على انتاج انزيم السيستائين بروتيز ووجد بان 73.3% من العزلات منتجة لهذا الانزيم جدول(4-6) اذ احيطت مستعمراتها النامية على وسط Skim milk Columbia agar بهالة تحلل شفافة قطرها (2-7) ملم كما في الشكل (4-6) في حين لم تتمكن اي من العزلات الباقية من انتاج هذا الانزيم. .ووجد Muller-Alouf وجماعته (1997) ان 85% من عزلات *S.pyogenes* المعزولة من امراض خطيرة للمسبحيات كمتلازمة الصدمة السمية، وتجرثم الدم والحمى القرمزية منتجة للانزيم

توصلت عيسى (2000) الى ان 76.3% من بكتريا *S.pyogenes* المعزولة من امراض مختلفة كالتهاب اللوزتين ، والحنجرة ، والحمى الرثوية ، والتهاب المفاصل ، والتهاب الاذن الوسطى وان 75% من عزلات البكتريا المعزولة من الافات الجلدية منتجة للانزيم .

وجد عند دراسة 12عزلة من المسبحيات التابعة للمجموعتين C,G من المسبحيات 11 عزلة تابعة للنوع *S.dysagalactiae var.equismilis* وعزلة واحدة تابعة للنوع *S.equi var.zooepidemicus* المسببة لمتلازمة الصدمة السمية بان اي من السلالات المعزولة لم تكن حاوية على الجينات المولدة للحرارة *Spe L,Spe I,Spe H,Spe F,Spe C,Spe B Spe A* المشفرة للذيفانات *mf-2,mf-3,sme z* ما عدا الجين *Spe gg* المشفر للذيفان Spe gg المولد للحرارة الذي وجد في سبع عزلات من بكتريا *S.equisimilis* و *S.dysagalactiae.var* يتأثر انتاج السستائيين بروتييز بأنزيمات اخرى منها انزيم السيرين بروتييز اذ ان السلالات التي يتم فيها احداث طفرات فاقدة للانزيم يحصل فيها نقصان في عملية التحلل الذاتي لمولد السستائين بروتييز وتحويله الى انزيم فعال (Lyon and Caparon,2004).



شكل (4-6) اختبار التحري عن انتاج السستائيين بروتييز للعزلة *S.pyogenes*

4-2-6 انتاج الدنييز DNase production

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان نسبة انتاج البكتريا *S.pyogene* لأنزيم الدنييز قد وصلت الى 93.3% جدول (4-6) شكل (4-7) وهذه النسبة تكون متقاربة لدراسة اجرتها الحسني (2011) حيث وجدت بأن نسبة انتاج بكتريا *S.aureus* لأنزيم الدنييز قد وصلت الى 100% وهي ايضا تطابق ما توصل اليه Al-Junadi (2005) الذي وجد بأن نسبة انتاج الدنييز في بكتريا *S.aureus* قد وصلت الى 100%. ويقوم الدنييز بتحليل DNA العائل وتحطيمه ويؤدي الى زيادة امراضية بكتريا *S.pyogenes* وعلى الرغم من ذلك ذكر كل من (Turkyilmaz and Kaya, 2006) ان انتاج الدنييز لايعتبر مؤشرا او دليلا للامراضية.

تقوم بكتريا *S.pyogenes* بأنتاج اربعة اشكال من انزيمات Dnases التي تسهل انتشار البكتريا من موقع الاصابة الاولي عن طريق تقليل لزوجة المادة القيحية Purulent material (Bisno[a] *et al.*,2003).

شكل(4-7) اختبار التحري عن انتاج انزيم الدنييز للعزلة *S.pyogenes*

4-2-7 انتاج الستريبتو كاينيز streptokinase production

تم التحري عن قدرة بكتريا *S.pyogenes* على انتاج انزيم الستريبتوكاينز ,واظهرت النتائج ان 60% من العزلات قادرة على انتاج الانزيم وهذه النسبة التي توصلنا اليها تكون مقاربة لنتيجة دراسة قام بها (Razak and Al-jebori,2012) إذ وجد ان 66.6% من العزلات قادرة على انتاج الانزيم , والنتيجة التي توصلنا اليها لا تتوافق مع ماحصلت عليها عيسى (2000) اذ توصلت الى ان 85.18% من العزلات المعزولة من البلعوم منتجة للانزيم وهي اعلى من النسبة التي توصلنا اليها .وهناك دراسات توصلت الى نسب ادنى من النسبة التي حصلنا عليها واحدى هذه الدراسات تعود الى (Bhardwaj *et al.*,2013) إذ كانت نسبة العزلات المنتجة للانزيم 32.3% من اصل 34 عزلة. والستربتوكاينز عبارة عن بروتين ينتج بواسطة الانواع التابعة للمسبحيات , ويمكن ان يستخدم في معالجة الاضطرابات التي تحدث في الصمامات إذ يقوم هذا الانزيم بحل الخثرة الدموية Blood clot بوساطة تنشيط مولد البلازمين plasminogen الى بلازمين plasmin(Bhardwaj *et al.*,2013) ويستخدم ايضا في حل الخثرة الدموية التي تتكون خلال عمليات غسيل الكلية kidney dialysis

وايضا يقوم بتقليل كمية الضرر التي تحدث في العضلة القلبية من خلال حل الخثرة الدموية. ان معظم انزيمات الستربتوكاينز التي تستخدم في حل الخثرة الدموية نستطيع الحصول عليها من المسبحيات المحللة للدم نوع بيتا GABHS وخصوصا المعزولة من الاشخاص وتكون خالية من السموم المولدة للحمرة Erthrogenic toxins (El-Mongy and Taha , 2012) .ان تتابع الجين المكون للستربتوكاينز *ska* يكون متعدد الاشكال polymorphic ويمكن تقسيمه الى مجموعتين محدودتين التتابع تدعى cluster type-1 ,cluster type-2 ويمكن تقسيم cluster type-2 الى sub cluster type-2a و sub cluster type-2b (Cook *et al.*,2012) .كما يلعب دورا مهما في احداث الاخماج الجلدية ويعتقد بوجود تعاون بينه وبين plasminogen binding group A streptococcal protein (McArthur *et al.*,2008)

جدول (4-6) عوامل الضراوة المتمثلة بالانزيمات الموجودة في العزلات قيد الدراسة

رقم العزلة	الستربتوكاينز	الدنيز	السيستائين بروتيز
S.pyo 1	+	+	+
S.pyo 2	-	-	+
S.pyo 3	+	+	+
S.pyo 4	+	+	+
S.pyo 5	-	+	+
S.pyo 6	+	+	+
S.pyo 7	-	+	-
S.pyo 8	+	+	+
S.pyo 9	+	+	-
S.pyo 10	-	+	-
S.pyo 11	+	+	-
S.pyo 12	-	+	+
S.pyo 13	-	+	+
S.pyo 14	+	+	+
S.pyo 15	+	+	+

4-3 اختبار حساسية بكتريا المسبحيات القيحية للمضادات الحيوية Antibiotic Sensitivity Test of *S.pyogenes*

اختبرت حساسية جميع العزلات التابعة لبكتريا *S.pyogenes* والبالغة 15 عزلة تجاه 15 مضاداً , معظمها من الانواع الشائعة الاستخدام بالقطر لعلاج الاصابات المختلفة لمعرفة نوع الاستجابة من خلال قياس قطر منطقة التثبيط ومقارنة النتائج مع ما ورد في(2010) NCCLS ,اظهرت الدراسات تباينا واضحا في مقاومة بكتريا المسبحيات القيحية للمضادات الحيوية , فقد قاومت العزلات جميعها مضادات Trimethoprim, Ampicillin , Amikacin وبنسبة 100% شكل(4-8) وان هذه النسبة مقاربة للنسبة التي حصلت عليها البغدادي (2006) إذ كانت نسبة مقاومة عزلاتها للامبسلين 96.29% وان النسبة التي حصلنا عليها لمقاومة الامبيسلين تكون غير متقاربة للنسبة التي توصل اليها المهداوي (2005) إذ كانت نسبة المقاومة 11.8% ,كما وجدت العاني (2001) ان جميع عزلاتها كانت حساسة لهذا المضاد. اما فيما يخص مقاومة التراي ميثبريم فالنتيجة التي توصلت اليها البغدادي (2006) توافقت مع الدراسة الحالية إذ كانت جميع عزلاتها مقاومة للتراي ميثبريم وبنسبة100% وان النتيجة التي توصلنا اليها لا تتوافق مع الباحثة الكنزاوي(2004) حيث كانت مقاومة عزلاتها لهذا المضاد 52.4% ، اما مقاومة البكتريا للمضاد الحيوي الاميكاسين فقد جاءت مغايرة للنتائج التي توصل اليها كدو و العموري (2012) اذ وجدوا فقط ان 10% من عزلاتهم مقاومة للاميكاسين وفي البكتريا *S.pyogenes* ، قد يكون سبب المقاومة انتاج انزيمات ANT(4')-I اضافة الى تقليل التراكم الداخل خلوي للمضاد اما بتغير نفاذية الغشاء الخارجي الخلوي او امتلاك نظام الدفق الفعال في البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام.

ان مضاد الاميكاسين مقاوم لاكثر الانزيمات المشفرة بالبلازميدات التي تتواسط المقاومة للGentamycin, Streptomycin (Katzung,2001) . وبالنسبة لمقاومة البكتريا لمضاد التراي ميثبريم والتي وصلت الى100% إذ أن هذا المضاد يقوم بتثبيط انزيم Dihydro folate reductase DHFR وهذا الانزيم ضروري في صنع حامض الفوليك Folic acid المهم في تصنيع الحامض النووي في خلايا البكتريا . يشير الشكل (4-8) الى ان نسبة مقاومة البكتريا لمضاد الكلوكسسلين كانت 80% وهي مقاربة للنسبة التي حصلت عليها البغدادي (2006) إذ كانت مقاومة عزلاتها لهذا المضاد 73.33% وبالرجوع للدراسات السابقة نجد انه تم الحصول على نسب مقاومة ادنى من النسب في الدراسة الحالية اذ وجدت عيسى (2000) بان نسبة مقاومة بكتريا *S.pyogenes* لمضادي

الامبيسلين والكلوكسسلين 57.7% و 11.11% على التوالي يشير الشكل (4-8) الى ان مقاومة البكتريا للمضاد الحيوي الاريثرومايسين قد بلغت 73% وهذه النسبة مقاربة لما توصل اليه المهداوي(2005) إذ بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد لديه الى70.6% و بذلك تكون النسبة التي توصلنا اليها اعلى من النسبة التي حصلت عليها التميمي (2007) اذ وصلت نسبة المقاومة لديها الى 50%. وايضا النسبة التي حصلنا عليها تكون اعلى بكثير مع دراسة اجراها (Gagliotti *et al.*,2006) اذ كانت نسبة المقاومة 21%

تشير الدراسة الحالية الى ارتفاع نسبة مقاومة البكتريا لمضاد الاريثرومايسين وان اختلفت مع نتائج دراسة (Reinert *et al.*,2004) التي سجلت انخفاضا في مقاومة البكتريا لهذا المضاد ويعود سبب مقاومة البكتريا للاريثرومايسين وجود بلازميدات تحمل جينات مسؤولة عن هذه المقاومة .وان توافر عزلة واحدة مقاومة لمضاد حيوي معين مع عزلة غير مقاومة قد يوفر حماية للعزلة الثانية نتيجة قابلية الاولى على تخفيض فعل المضاد وجعل تركيزه غير كافٍ للقضاء على العزلة الثانية وكذلك يعود سبب المقاومة لحصول تغيير في الموقع الهدف واضافة مجموعة مثيل (Seppala *et al.*,1998) .

اما فيما يخص مقاومة البكتريا لمضاد التتراسايكلين فقد كانت 46.6% وهي مقاربة لدراسة اجراها (Ksia , 2013) إذ وصلت نسبة مقاومة عزلاته الى43% ,وان النسبة التي حصلنا عليها ادنى من النسب التي حصلت عليها كل من التميمي (2007) والعبيدي (2003) حيث كانت نسب المقاومة لديهم على التوالي 60% و50.5% . وفسر (Levinson and Jawetz,2000) هذه المقاومة الى فشل وصول المضاد بتراكيزه المثبطة داخل الخلية البكتيرية بفعل توافر بلازميدات مسؤولة عن عملية تقليل نفاذية المضاد او زيادة نقله الى خارج الخلية ويعمل مضاد التتراسايكلين على تثبيط تصنيع البروتين من خلال الارتباط بالوحدة الرايبوسومية الصغيرة 30s فينتج عن هذا التثبيط منع ارتباط Aminoacyl-Trna الى الموقع الخاص بالارتباط على معقد الرايبوسوم mRNA.

ان مقاومة البكتريا للنوفابايوسين وصلت الى 33.3% وهذه النسبة تكون متقاربة نوعا ما الى ما توصلت اليه البغدادي (2006) اذ كانت نسبة مقاومة العزلات البكتيرية لديها 29.6% اما بالنسبة لمقاومة العزلات البكتيرية قيد الدراسة للمضاد الحيوي الجنتامايسين فقد وصلت في هذه الدراسة الى 26.6% وهي مقاربة للنسبة التي حصلت عليها التميمي (2007) إذ وصلت عندها الى 23% وايضا مقاربة لما حصلت عليه الكنزاوي (2004) التي بلغت عندها نسبة المقاومة الى 28.57%.

تبين من الدراسة الحالية ان نسبة مقاومة العزلات قيد الدراسة لمضاد السيبروفلوكساسين الذي يعود الى مجموعة مضادات الكينولونات قد وصلت الى 33.3% وهي مقاربة للنسبة التي توصل اليه المهداوي (2005) إذ كانت نسبة المقاومة 29.4% .وايضا النتيجة التي توصلنا اليها جاءت متفقة مع (Al-saady , 2000) وايضا النسبة التي حصلنا عليها تكون اعلى من النسبة التي حصل عليها الجبوري (2007) إذ وصلت نسبة المقاومة لديه الى 20% وفيما يتعلق بنسبة المقاومة الضعيفة نسبيا الى هذا المضاد يعزى سبب ذلك الى ان هذه المضادات لم تستخدم على نطاق واسع وكذلك تمكنها من الوصول وبتراكيز عالية في المصل والانسجة . ويكون تأثير مضاد Ciprofloxoacin قاتل للبكتريا من خلال تثبيط تصنيع DNA وذلك عن طريق ايقاف انزيمDNA gyrase . (Akinjogunla and Eghafona[b],2011).

فيما يخص مقاومة البكتريا للمضاد الحيوي الكلندامايسين للعزلات قيد الدراسة ضعيفة جدا فقد وصلت الى 13.3% وهي مقاربة للنسبة التي حصل عليها (الجبوري , 2007) وتكون نسبة المقاومة للمضاد الحيوي المذكور اعلى بكثير من النسبة التي حصل عليها (Megged *et al.*,2013) وهذه الدراسة تضمنت عزل بكتريا *S.pyogenes* من مناطق مختلفة من الجسم وكانت نسبة المقاومة 1.6% وايضا نتيجة الدراسة التي حصلنا عليها متغايرة مع نتائج دراسة اجراها كل من (Moriangthem and Gurung,2013) إذ كانت جميع العزلات لبكتريا *S.pyogenes* حساسة وبنسبة 100% ولاتتوافر اي عزلات مقاومة وايضا النسبة التي توصلنا اليها تكون ادنى من النسبة التي حصل عليها (Younge *et al.*,2004) اذ كانت نسبة المقاومة 19% لديه وتوجد هناك ميكانيكية لمقاومة مجموعة Macrolide ومن ضمنها Erthromycin و Clindamycin حيث تصبح هذه البكتريا مقاومة لمجموعة Macrolide من خلال اكتسابها (A)gene *mef* (Sutcliffe *et al.*,1996). إذ أن الجين يقوم بالتشفير لبناء بروتينات مضخات الدفق Efflux pump protein synthesis التي تقوم بضخ 4-15 من حلقات Macrolide خارج الكائن الحي وبذلك تقاوم هذه المضادات .

يشير الشكل (4-8) الى ان مقاومة بكتريا *S.pyogenes* الى الاوكمنتين قد وصلت الى 6.6% وبذلك تكون متقاربة مع النسبة التي حصل عليها المهداوي(2005) إذ بلغت نسبة المقاومة لديه 5.9%. ومضاد الاوكمنتين عبارة عن خليط من الاموكسيلين وحامض الكلافيولانيك clavulanic acid إذ يؤثر الاموكسلين على تخليق الجدار الخلوي للبكتريا اما clavulanic acid فانه يدمر انزيم

البنسلينيز الذي ان وجد يبطل مفعول المضاد الحيوي ويستخدم لعلاج اخماج اللوزتين المزمنة فهو فعال ضد البكتريا المنتجة لانزيم البيتالاكتاميز (Shah,2004)

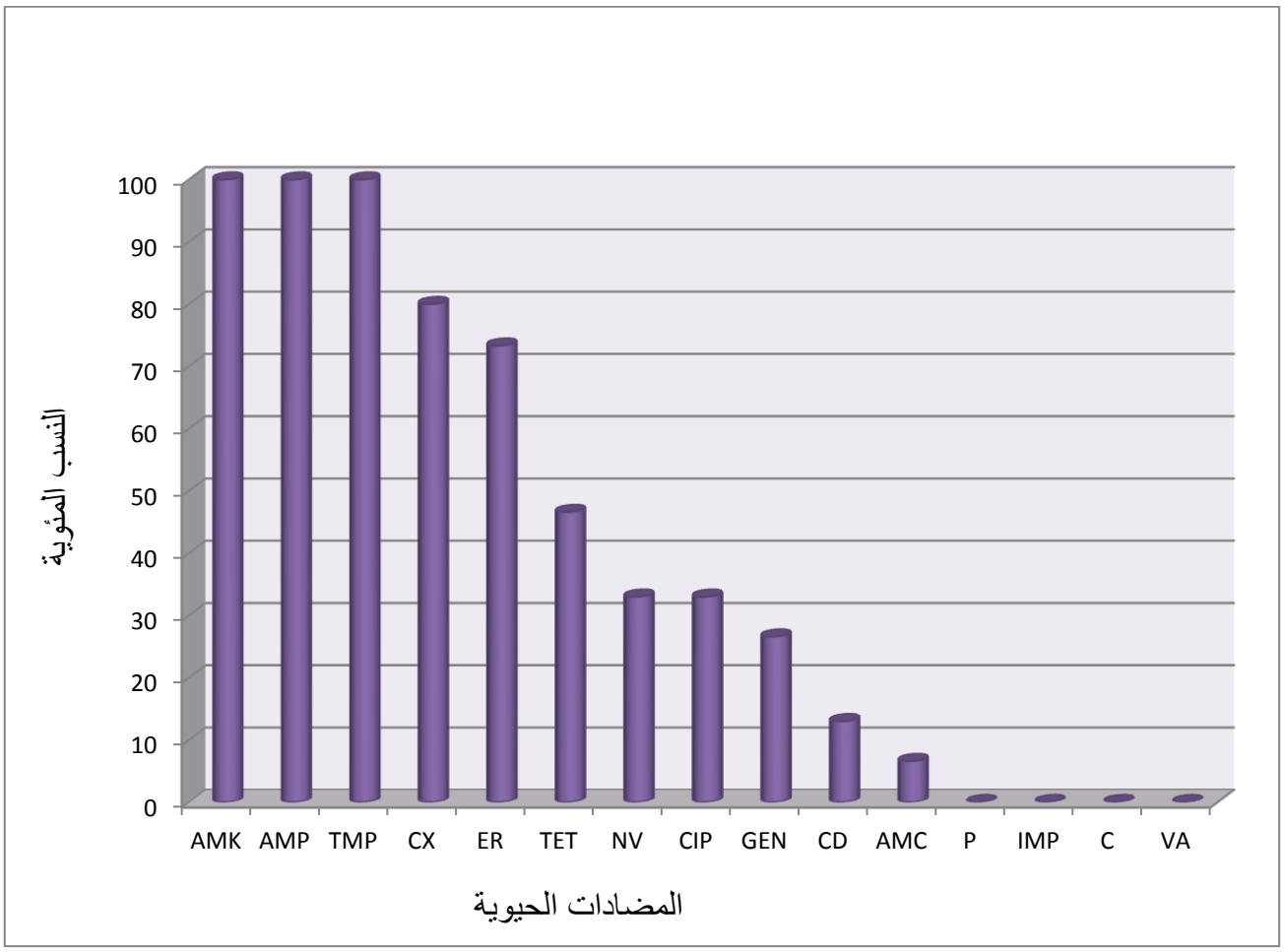
اما فيما يتعلق بمقاومة البكتريا للمضاد الحيوي البنسلين G فقد كانت جميع العزلات حساسة وبنسبة 100% وهذه النسبة متطابقة تماما مع النسبة التي حصل عليها (Koliou *et al*.,2007) اذ كانت جميع عزلاته حساسة .وان النسبة التي حصلنا عليها تكون اعلى نسبيا من النسبة التي حصل عليها (Martinez *et al*.,2004) إذ كانت نسبة الحساسية 94% وايضا هناك دراسات جرت في امريكا في عام 2009 توصلت الى نفس النتائج .

في ما يخص مقاومة بكتريا *S.pyogenes* للمضاد الحيوي Imipenem الذ يعود للـ Carbapenem فقد كانت جميع العزلات قيد الدراسة حساسة لهذا المضاد ولم تبد اي من العزلات ادنى مقاومة لهذا المضاد وجاءت هذه النتيجة متطابقة لما توصل اليه كدوو والعموري (2012) اذ كانت جميع عزلاتهم حساسة لهذا المضاد وبنسبة 100% . وفيما يتعلق بالمقاومة لهذا المضاد تكون عن طريق تثبيط بناء الجدار الخلوي البكتيري بوساطة اتصاله بالبروتينات المرتبطة بالبنسلين Penicillin-binding proteins .

تشير النتائج التي حصلنا عليها على ان حساسية البكتريا للمضاد الحيوي كلورومفينيكول 100% ولا توجد اي عزلات مقاومة لهذا المضاد وهذه النسبة التي حصلنا عليها تكون متقاربة للنسبة التي حصل عليها (Muthusamy *et al.,*2012) إذ كانت نسبة العزلات الحساسة لهذا المضاد 93% في حين هناك دراسات منها دراسة توصلت اليها عيسى (2000) لا تتطابق مع النسبة التي حصلنا عليها إذ كانت النسبة التي توصلت اليها 33.8% من عزلاتها مقاومة لهذا المضاد ومضاد الكلورومفينيكول يعد من المضادات المثبطة لنمو البكتريا Bacteriostatic والية عمله عن طريق ارتباطه مع الوحدة الرايبوسومية الكبيرة 50_s اذ يعمل على تثبيط البروتين وذلك بمنع استطالة السلسلة الببتيدية وتثبيط انزيم Peptidyl trasferase (Brooks^c *et al*.,2007).

في ما يخص حساسية العزلات البكتيرية قيد الدراسة للمضاد Vancomycin اذ كانت العزلات جميعها حساسة لهذا المضاد وبنسبة 100% وهذه النتيجة متطابقة مع ما حصل عليه (Bahman *et al*.,2011) وايضا تتفق مع النعيمي(2005) إذ كانت نسبة العزلات الحساسة 100% نستنتج من ذلك وجود مقاومة متزايدة للمضادات الشائعة الاستخدام في علاج التهاب اللوزتين ولذا ينصح بأجراء

فحص الحساسية للمضادات الحياتية قبل اعطاء او وصف اي دواء لضمان العلاج المناسب وعدم تطور المقاومة للبكتريا والتي تعزى الى انتقال الجينات المسؤولة عن ظهور صفة المقاومة لتلك المضادات والمتواجدة اما على بلازميد او كروموسوم البكتريا المقاومة وانتقالها الى الحساسة وبالتالي تحولها الى بكتريا مقاومة للمضادات الحياتية المذكورة (Cornaglia *et al.*,1996) كما ان الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية والاستعمال غير المنتظم في علاج الاصابات الخاصة بالجهاز التنفسي والتهاب اللوزتين و البلعوم يؤدي الى ظهور عزلات مقاومة .



شكل (4-8) النسب المئوية لمقاومة بكتريا *S.pyogenes* للمضادات الحيوية

4-4 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية Multiple antibiotic resistance

اصبح انتشار الجينات التي تحمل المقاومة للمضادات الحيوية مشكلة تهدد الصحة العالمية وتساهم البلازميدات في انتشار هذه المقاومة بوساطة البكتريا الممرضة (Bistue *et al.*, 2008). اظهرت الدراسة الحالية ان جميع عزلات *S.pyogenes* المحلية قيد الدراسة تحمل صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية مقاومة لأكثر من مضاد حيوي واحد تشير النتائج ان العزلة رقم 15 كانت

اكثر العزلات مقاومة للمضادات الحيوية اذ استطاعت مقاومة 11 مضاد. كما موضح بالجدول (4-7) اما العزلات 6,4 فهي العزلات الاقل مقاومة حيث قاومت 4 مضادات فقط فهي العزلات الاكثر حساسية بين العزلات قيد الدراسة. ان عدم العلاج الفعال ضد البكتريا التي تملك صفة المقاومة المتعددة للضمادات الحيوية هي مشكلة خطيرة على صحة الانسان مما يستدعي الحاجة الى البحث لأيجاد مضادات حديثة فعالة ضد البكتريا (Ueda and Sunagawa., 2003).

جدول (4-7) المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي اظهرتها عزلات *S.pyogenes*

عدد المضادات	عدد العزلات	ارقام العزلات
7	4	12 , 8 , 3 , 1
4	2	4 , 6
5	5	2 , 9 , 10 , 13 , 14
6	2	5 , 11
8	1	7
11	1	15

تم تقسيم عزلات بكتريا *S.pyogenes* قيد الدراسة الى مجموعتين على اساس عدد المضادات التي قاومتها جدول (4-8) اذ وضعت العزلات المقاومة 4-7 مضاد حيوي في المجموعة الاولى اما العزلات المقاومة من 8-11 مضاد حيوي وضعت في المجموعة الثانية , كانت المجموعة الاولى هي المجموعة السائدة في الدراسة وتحتوي على 13 عزلة وبنسبة 86.7% بينما كانت المجموعة الثانية اقل نسبة مقاومة متعددة للمضادات الحيوية وبنسبة 13.3% من العزلات الكلية جدول(4-8).

جدول(4-8) تقسيم العزلات المحلية لبكتريا *S.pyogenes* الى مجموعتين على اساس عدد المضادات التي قاومتها

المجموعة	عددالمضادات المقاومة	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية
1	7-4	13	86.7%
2	11-8	2	13.3%

4-5 النسق السائد للمقاومة المتعددة لبكتريا *S.pyogenes* للمضادات الحيوية

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان نسق المقاومة السائد للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية يقع ضمن المجموعة الثانية جدول(4-9) , وبعد تحليل النتائج والمعلومات الخاصة بمقاومة كل عزلة للمضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة تبين ان نسق المقاومة السائد لعزلات *S.pyogenes* قيد الدراسة هو 6 مضادات وكما ياتي Amp, Amk, Tmp, Cx, Er, Tet.

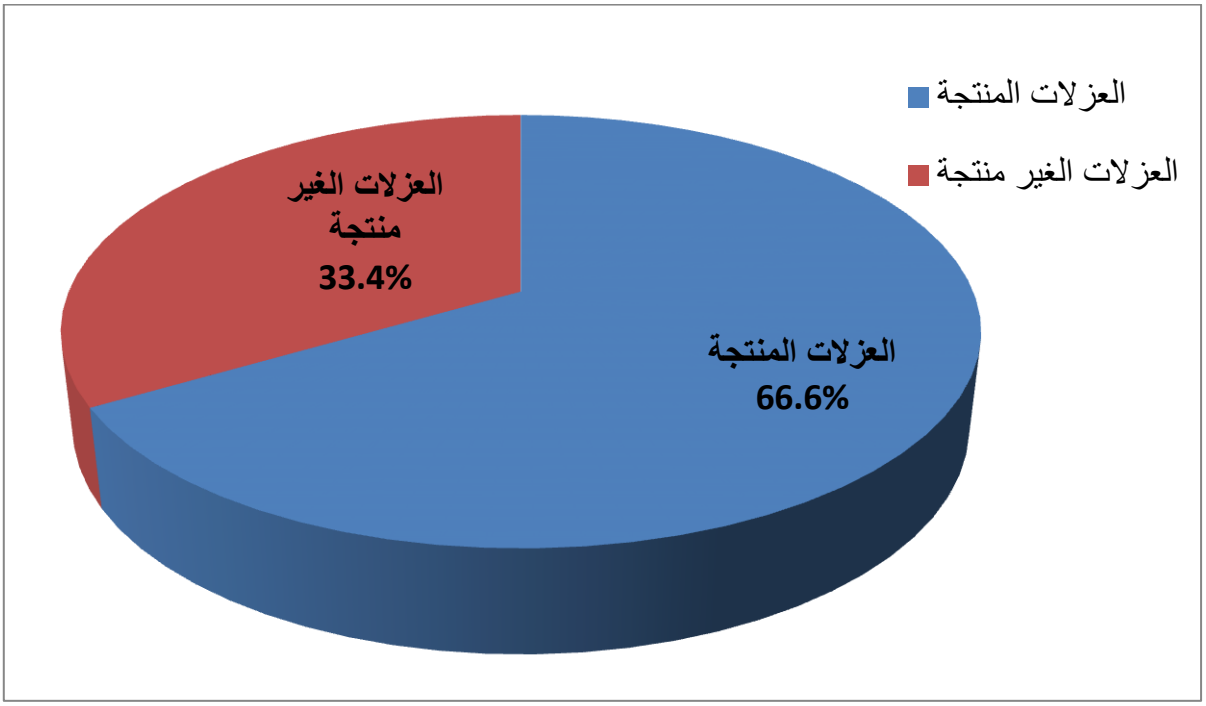
جدول(4-9) النسق السائد للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية

درجة تعدد المقاومة	نوع المضادات
6	AMP AMK TMP CX ER TET
7	AMP AMK TMP CX ER TET CIP
8	AMP AMK TMP CX ER TET CIP NV
11	AMP AMK TMP CX ER TET CIP NV GEN CD AMC

4-6 التحري عن انتاج انزيم البيتالاكتاميز Detection of beta-lactamase production

اعتمدت طريقة اليود القياسية السريعة للتحري عن قابلية انتاج انزيم البيتالاكتاميز للعزلات كافة, وهي من الطرائق السريعة في اعطاء النتائج وغير المكلفة وسهلة التطبيق لتوافر المواد اللازمة لعمل

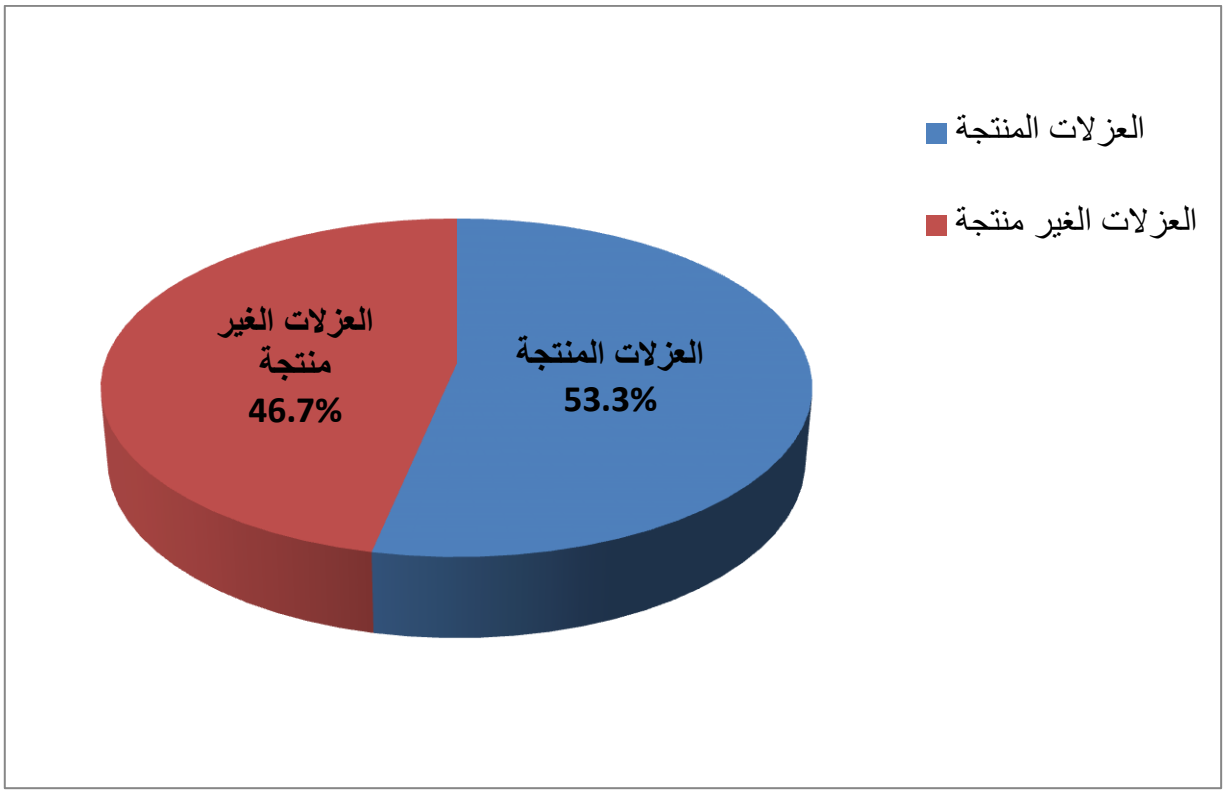
الاختبار ان النتيجة التي توصلنا اليها هي ان نسبة بكتريا *S.pyogenes* المنتجة لانزيم البيتالاكتاميز قد وصلت الى 66.6% شكل (4-9) وهي مقاربة لما توصل اليه (Aviles *et al.*,2000) إذ كانت النسبة التي توصل اليها هي69.7% وان النتيجة التي توصلنا اليها في الدراسة الحالية تكون اعلى من النسبة التي توصل اليها (Akinjogunla[a] *et al.*,2011) اذ وصلت نسبة انتاج البكتريا لإنزيم البيتالاكتاميز الى 34.8% .



شكل(4-9) النسبة المئوية للعزلات المنتجة والغير منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز

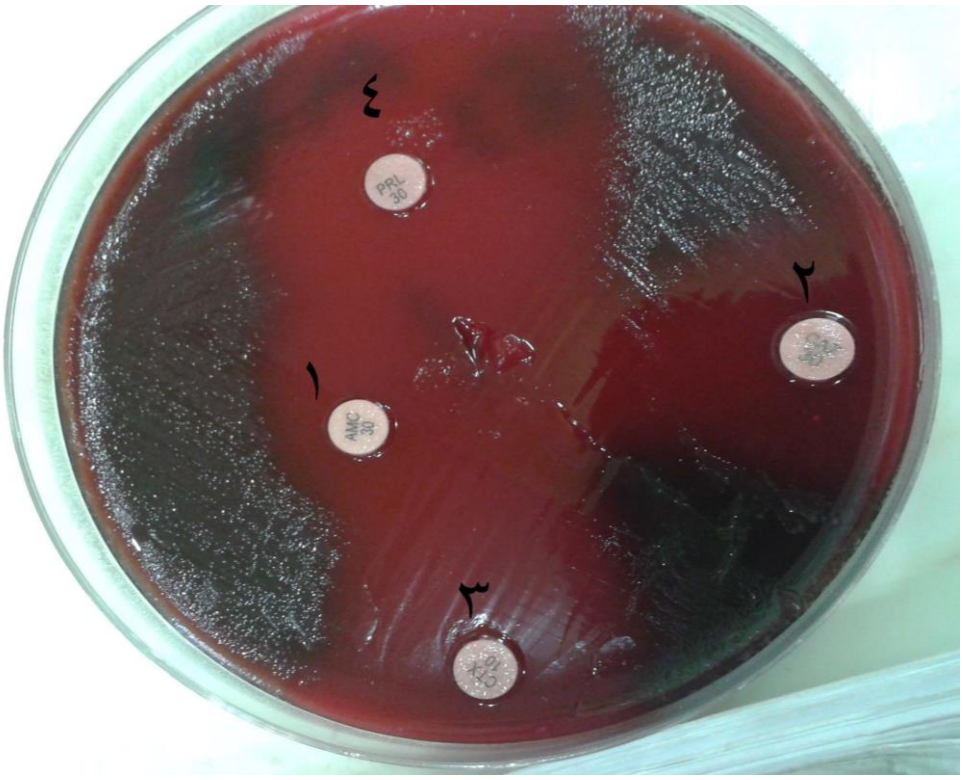
4-7 التحري عن انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Detection of extended spectrum beta-lactamase enzymes

اظهرت نتائج هذه الدراسة ان عدد عزلات *S.pyogenes* المنتجة للانزيمات واسعة الطيف كانت 8 عزلات من مجموع 15 عزلة وبنسبة 53.3% شكل (4-10) وجاءت هذه النسبة متقاربة جزئيا مع دراسة اجراها الباحثون(Shakib *et al.*,2012) على عزلات بكتريا *K.pneumoniae* المنتجة لهذه الانزيمات بلغت نسبة انتاجها حوالي 42.3% .



شكل(4-10) النسبة المئوية للعزلات المنتجة والغير منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

استخدمت هذه الدراسة طريقة الاقراص المتاخمة Disk Approximation للتحري عن انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLS extended spectrum beta-lactamase enzymes ,وهي من الطرائق السهلة والدقيقة ,وتعد النتيجة موجبة عند حدوث اتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي الحاوي على خليط الاموكزاسلين /حامض الكلافيولنك مع واحد او اكثر من المضادات الاخرى امثال Piperacillin , Cefotaxime , Ceftazidime شكل (4-11).



شكل (4-11) أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف للعزلة المحلية *S.pyogenes*

1.مضاد الأموكزاسلين / كلافيولنك 3.مضاد السيفوتاكسيم

2. مضاد السيفتازديم 4. مضاد الببراسلين

4-8 التحري عن انتاج البيتالاكتاميز المعدنية Detection of Metallo beta-lactamase production

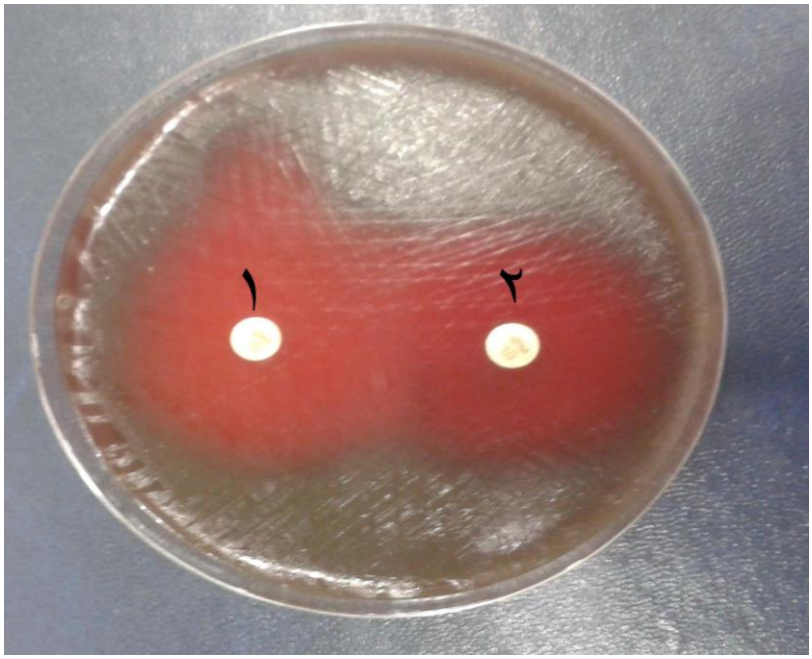
ان انتاج انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية بوساطة انواع معينة من البكتريا يمكن عده من اليات المقاومة التي تتبعها البكتريا لمقاومة المضادات الحيوية اذ يقوم هذا النوع من الانزيمات بتحليل (Hydrolyze) مضادات البيتالاكتام من ضمنها مضادات البنسلين، والسيفالوسبورين ، و الكاربابنيم ، ومن خصائص انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo β-Lactamse MBL انها تحتاج لعنصر الزنك للقيام بفعاليتها. ان العزلات المنتجة للـ MBL تكون غير حساسة لمثبطات β- Serine Lactamse مثل Clavulanate (Debasrita *et al.*, 2010). انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية تجعل البكتريا مقاومة لمدى واسع من مضادات البيتالاكتام وذلك بجعل هذه المضادات غير فعالة من

خلال تحليلها. ان الجينات التي تشفر الى هذه الانزيمات ليست فقط محمولة كروموسوميا و انما ايضا محمولة بلازميديا (Tasakris *et al.*,2008) .

اشارت النتائج التي توصلنا اليها ان عدد العزلات المنتجة لهذه الانزيمات هي 5 عزلات وبنسبة 33.3% جدول (4-10) وهذه النسبة مقاربة لما توصل اليه (Patel *et al.*, 2008) اذ كانت نسبة العزلات المنتجة لديه في بكتريا *K.pneumoniae* هي 40% وان قلة العزلات المنتجة لهذا الانزيم في هذه الدراسة قد يعود الى ان اغلب العزلات كانت حساسة لمضاد Imipenem شكل (4-12).

جدول(4-10) قابلية عزلات *S.pyogenes* على إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز المعدنية

رقم العزلة	قطر التثبيط (ملم)
1	------
2	------
3	------
4	------
5	------
6	------
7	14
8	10
9	10
10	------
11	------
12	13
13	------
14	------
15	11



شكل (4–12) النتيجة الموجبة لإنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية للعزلة المحلية *S.pyogenes*

Imipenem and EDTA -1 Imipenem -2

4–9 التحري عن عيارية اضداد الحالة O (Antistreptolysin O)

تبين من خلال نتائج دراسة عيارية اضداد الحالة O لمرض التهاب اللوزتين المصابين ببكتريا *S.pyogenes* والبالغ عددهم 15 مريضاً جدول(4–11), إذ ان 66.6% منهم بلغت عيارية الاضداد لديهم 200–400 وحدة عالمية/مل في حين اظهرت المجموعة الباقية 33.3% مستوى اعلى من هذه الحالة 800–1600 وحدة عالمية/مل .وتكون هذه النسب لعيارية اضداد ASO متقاربة نوعا ما لما توصل اليها المهداوي (2005)

تبين من النتائج التي حصلنا عليها في هذه الدراسة ان الحالة المرضية حادة او مزمنة كان لها اثر في ارتفاع عيارية هذه الاضداد 800–1600 وحدة عالمية/مل في الحالة الحادة من المرض الى 40% مماهو عليه في الحالة المزمنة 20% ان ارتفاع عيارية اضداد الحالO , A.S.O.T المتكونة

بفعل التحفيز بالStreptolysin O عن 160–200 وحدة عالمية/مل يشير الى اصابة حديثة بالبكتريا *S.pyogenes* (Jawetz[a] *et al.*,1991).

من المعروف SLO هو عامل ضراوة مهم جدا في بكتريا *S.pyogenes* إذ وجد انه عند انخفاض انتاج سم SLO يؤدي ذلك الى قلة استيطان بكتريا *S.pyogenes* داخل الجسم الحي التي تكون بوساطة التصاق البكتريا بالخلايا الظهارية Epithelial cells . الستريبتولايسين هو عبارة عن احد السموم التي تؤدي الى تكوين فتحات اوثغور في الغشاء الخلوي وبذلك يؤدي الى خروج الهيموكلوبين والمواد الاخرى اذ يقوم هذا السم بحل خلايا العائل Host cells عندما يفرز بجرعات عالية High doses من قبل بكتريا *S.pyogenes* , والكميات الاقل انتاجا من هذا السم تشارك في الامراضية من خلال زيادة استيطان البكتريا بواسطة الخلايا الظهارية الموجودة في البلعوم pharyngeal epithelial cells . يقوم SLO بسد او غلق المسار المعتمد على Clathrin– independent pathway المهم في التصاق البكتريا بسطح الخلية (Logsdon *et al.*,2011).

ان الستريبتولايسين O يفرز من قبل جميع سلالات المجموعة A وهو حساس للاوكسجين ويولد اجسام مضادة بتركيز عال تعادل نشاطه ويمكن ان تستمر لفترة طويلة وان عيارية هذا السم تختلف باختلاف عمر الاشخاص. ايضا يقوم الستريبتولايسين O بالتداخل مع نظام تنشيط المتمم Complement activation مؤديا الى تجمع الصفيحات الدموية Platelets والخلايا اللمفاوية متعددة الانوية Polymorphonucleated lymphocytes داخل الجسم الحي *Vivo* بالاضافة الى ذلك فان حقن SLO بالوريد Intervenous injection يؤدي لقتل بعض الحيوانات (Nilson , 2006).

جدول (4–11) عيارية اضداد A.S.O.T في مصل مرضى التهاب اللوزتين للمصابين ببكتريا *S.pyogenes*

المجموعة	العدد	عيارية اضداد A.S.O.T وحدة عالمية\مل			
		400-200		1600-800	
		العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية
المرضى الكلي	15	10	66.6	5	33.3
المرضى الحاد	10	6	60	4	40
المرضى المزمن	5	4	80	1	20

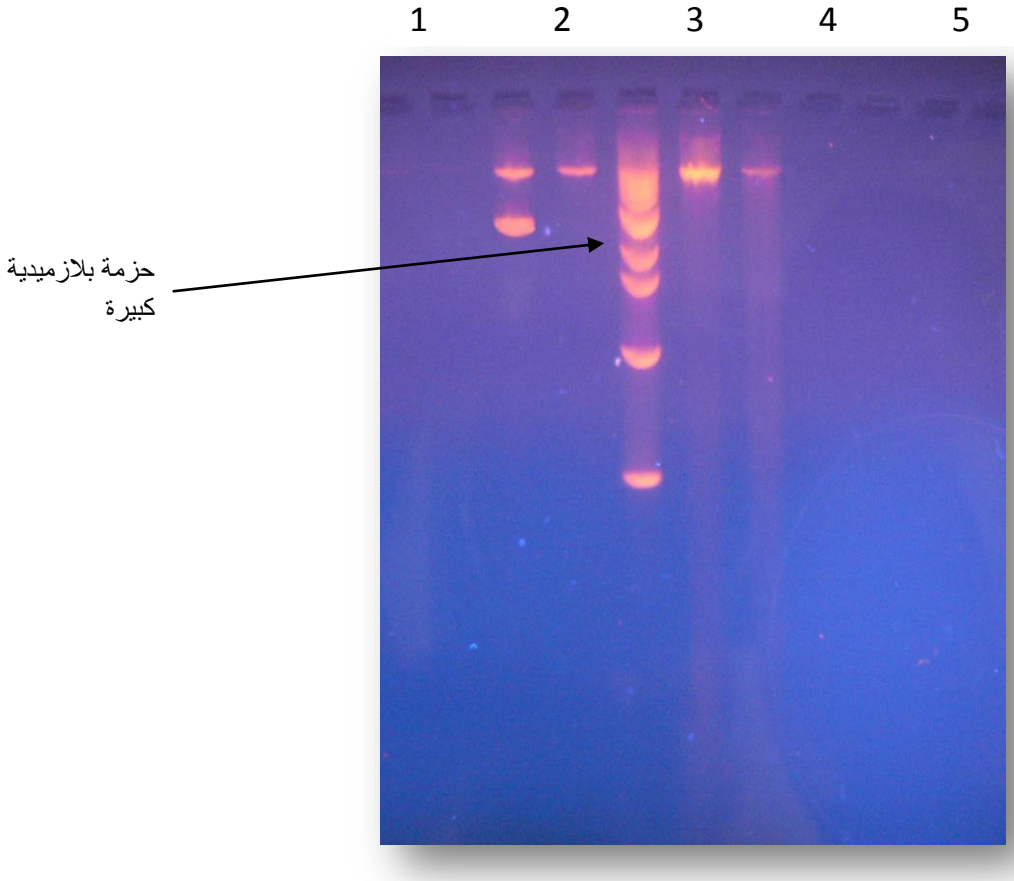
4-10 النسق البلازميدي لبكتريا *S.pyogenes*

تم التحري عن المحتوى البلازميدي لعزلة واحدة من بكتريا*S.pyogenes* باستخدام Pure Yield™ Plasmid Miniprep Kit مجهز من قبل شركة Promega وتميزت هذه العزلة بانها الافضل والاعلى ضراوة ومقاومة المضادات الحيوية وانتاج انزيمات البيتالاكتاميز . بعد عزل الدنا البلازميدي وترحيل الدنا المستخلص على هلام الاكاروز وجد ان هذه العزلة تحتوي على بلازميد مفرد كبير كما مبين بالشكل (4-13) ويمكن الاستنتاج ان هناك ارتباطاً ما بين نمط المقاومة الواسع للمضادات الحيوية وانتاج عوامل الضراوة المهمة في الاستيطان البكتيري.اذ لاتوجد علاقة بين المحتوى البلازميدي ونمط المقاومة للمضادات الحيوية فهناك نمط مقاومة يمكن ان يشفر بواسطة ترانزبوزون وعاثيات وجينات كروموسومية ولا علاقة لها بالبلازميدات (Karbaszaed *et al.*,2003) .

هذه النتيجة التي توصلنا اليها في هذه الدراسة تتفق مع النتيجة التي توصلت اليها البغدادي (2006) اذ اشتركت عزلاتها بوجود بلازميد مفرد كبير الحجم . قد اشارت الدراسات الى ان تعدد المقاومة في بكتريا *S.pyogenes* يعود في الغالب الى احتوائها على بلازميدات كبيرة نسبيا, يعتمد النسق البلازميدي للبكتريا على عدد البلازميدات المعزولة من السلالات المرضية من البكتريا وعلى حجوم البلازميدات , وان وجود التشابه في الاعداد والاوزان الجزيئية لهذه البلازميدات يعطي مؤشرا على مدى انتشارها بين السلالات البكتيرية المرضية. لقد تم استعمال البلازميدات المقترنة الحاملة لصفة المقاومة لمضادات الحيوية في تشخيص الاوبئة (Threlfall and frost,1995) . اشار الباحث Lipuma وزملائه(1989) الى امكانية استخدام النسق البلازميدي اضافة الى نسق المقاومة للمضادات الحيوية في تحديد مدى التقارب بين السلالات البكتيرية و بالتالي معرفة وبائيتها . ان قلة عدد البلازميدات مع زيادة المقاومة للمضادات الحيوية للسلالات البكتيرية يعزى الى ان جينات المقاومة قد تكون محمولة على الكروموسوم ايضا (Udo and Jacob, 2000).

ذكر Grohmamm وزملاؤه (2003) وجود بلازميدات اقترانية ذات مدى واسع من المضائف تتوافر بشكل طبيعي في جنس *Enterococcus* و *Streptococcus* ومثال عليها , pIPSOI pAMB1 التي تنقل جينات المقاومة المتعددة التي تشمل مضادات من مجموعة Macrolides و Lincosamids و Streptogramim تمتاز هذه البلازميدات بقابليتها على الانتقال ضمن مدى واسع من الاجناس تضم *Streptococci* و *Lactococci* و*Staphylococci* و *Enterococci*. ذكر

Feng وزملاؤه (2008) ان معظم جينات عوامل الضراوة و مقاومة المضادات الحيوية تحمل على عناصر وراثية متحركة مثل البلازميدات والترانسبوزونات .



شكل (4-13) فقدان الحزم البلازميدية لبكتريا *S.pyogenes* المحيدة

تركيز الهلام 0.7%، 75 فولت / سم لمدة 90 دقيقة

المسار رقم 1 يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة البكتيرية قبل عملية التحييد.

المسار رقم 2 يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة البكتيرية بعد عملية التحييد بالاكردين البرتقالي.

المسار رقم 3 يمثل الدليل الحجمي DNA lader .

المسار رقم 4 يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة البكتيرية بعد عملية التحييد ببروميد الاثيديوم .

المسار رقم 5 يمثل المحتوى البلازميدي للعزلة البكتيرية بعد عملية التحييد بكبريتات دودسل الصوديوم.

4-11 تحييد البلازميدات Plasmids curing

جرى اختيار العزلة رقم 15 لانها كانت من اكثر العزلات ضراوة ومقاومة للمضادات الحيوية والاكثر انتاجا لانزيمات البيتالاكتاميز وتم اجراء التحييد باستخدام ثلاث مواد هي Acridine orange ,Ethidium bromide, وSodium dodecyl sulfate في محاولة لربط المحتوى البلازميدي بانتاجية بكتريا *S.pyogenes* لانزيمات البيتالاكتاميز ومقاومتها لبعض المضادات الحيوية .

4-11-1 التحييد باستخدام Acridine orange

تم استخدام مادة A.O بوصفها مادة محيدة ثم نميت العزلة رقم 15 المراد تحيدها في اوساط سائلة تحتوي على هذه المادة بتراكيز 16,32,64,128,**256**,512,1024,2000,2500,3000 مكغم/مل اذ فقدت العزلة رقم 15 الحزم البلازميدية عند التركيز 256 مكغم/مل جدول (4-12) .

ان النتيجة التي توصلنا اليها تتوافق جزئيا مع ما توصلت اليه السعدي (2011) اذ ان العزلات التي استخدمتها في الدراسة والتي تعود الى بكتريا *P.aeruginosa* فقدت الحزم البلازميدية عند التركيز 512 مكغم/مل .وبعدها تم اجراء اختبار للعزلات من حيث انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز ومقاومتها للمضادات الحيوية ,وقد اظهرت العزلة رقم 15 فقدان قابليتها على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز وفقدان مقاومتها لبعض المضادات الحيوية وتحولها الى عزلات حساسة ,ويتضح من ذلك ان صفة انتاج البيتالاكتاميز والمقاومة لبعض المضادات الحيوية تكون محمولة على بلازميد وهناك بعض المضادات لم تفقد مقاومتها مما يشير الى ان صفة المقاومة لهذه المضادات قد تكون محمولة على الكروموسوم .

4-11-2 التحييد باستخدام Ethidium bromide

اظهرت النتائج ان اضافة صبغة بروميد الاثيديوم بالتراكيز 256, 128, 64, 32, 16 3000 , 2500, 2000, 1024, **512**, مايكروغرام/مليلتر الى وسط نقيع الدماغ والقلب السائل وعند تنمية العزلات البكتيرية فيه وفي درجة حرارة 37 لمدة 24 ساعة ,وبعد فترة الحضن جرى تحديد التركيز المثبط الادنى MIC للعينات من خلال الانابيب المزروعة مع انبوب السيطرة اذ كان MIC هو1024 مكغم/مل والتركيز المحيد هو 512 مكغم وبعدها خففت العينات ووزعت بطريقة النشر على وسط الاكار المغذي ثم حضنت بدرجة حرارة 37 لمدة 24 ساعة . بعد فترة الحضن اجري فحص

اختبار الحساسية باستخدام وسط المولر هنتونMuller– hinton Agar المضاف اليه الدم بنسبة 5%وتم اجراء الاختبار لغرض معرفة نجاح عملية التحييد من خلال فقدان الحساسية او عدم فقدانها وبعد اكمال فحص المضادات جرى استخلاص البلازميد للمستعمرات الحساسة للمضادات واظهرت النتائج فقدان العزلة المستخدمة بالتحييد للحزم البلازميدية التي كانت تملكها قبل اجراء عملية التحييد شكل(4–13) وهذه النتائج جاءت متفقة مع ما توصل اليه (Patwardhan *et al.*,2008) اذ اشار في دراسة اجراها على عينات الامراض المكتسبة في المستشفيات ان بكتريا الامراض المكتسبة قد فقدت قدرتها على مقاومة المضادات الحيوية عند استعمال صبغة E.B بتركيز 512–1024 مكغم/مل كمادة محيدة .وفي دراسة اجراها (El–banna *et al.*,2010) على بكتريا *Lactic acid bacteria* لغرض معرفة دور البلازميد في مقاومة هذه البكتريا للمضادات الحيوية اذ اظهرت النتائج ان استعمال صبغة E.B في التحييد ادى الى فقدان البكتريا صفة المقاومة لبعض المضادات التي كانت تقاومها.

4–11–3 التحييد باستخدام Sodium dodecyl sulfate

جرى إضافة مادة SDS بالتراكيز 2500 ,**2000**, 1024, 512, 128,256, 64, 32, 16 3000, مايكروغرام/ مليلتر إلى الوسط نقيع الدماغ والقلب السائل عند تنمية العزلات البكتيرية فيه وفي درجة37 م°مدة 24 ساعة ،بعد فترة الحضن جرى تحديد التركيز المثبط الأدنىMIC للعينات من خلال الأنابيب المزروعة مع أنبوب السيطرة إذ كان MIC 2500 مايكروغرام/مليلتر والتركيز المحيد هو2000 مكغم /مل، بعد ذلك اجري تخفيف الأنابيب المزروعة ثم زرعت على وسط الاكار المغذي باستعمال الناشر الزجاجي المعقم ثم حضنت العينات بدرجة 37 م°مدة 24 ساعة.بعد فترة الحضن لوحظ نمو المستعمرات في الوسط ثم اجري بعدها فحص اختبار الحساسية لمضادات الحيوية للمستعمرات النامية في الوسط فهناك بعض المضادات التي كانت مقاومة اصبحت حساسة والبعض الاخر التي كانت مقاومة لم تفقد مقاومتها. ثم اجري استخلاص البلازميد للمستعمرات النامية لغرض الكشف عن وجود البلازميد من عدمه إذ وجد بعد إجراء الترحيل الكهربائي للعينات المستخلصة إن جميع المستعمرات فقدت الحزمة البلازميدية التي كانت تحويها قبل التحييد. جاءت هذه النتائج مشابهه لما توصل إلية الباحث (El–banna *et al.* 2010) على بكتريا *Lactic acid bacteria* لغرض معرفة دور البلازميد في مقاومة المضادات التي تقاومها هذه لبكتريا إذ أشار هذا الباحث إن استعمال مادة SDS في التحييد أدت إلى فقدان هذه البكتريا صفة المقاومة للمضادات وبعد إجراء الترحيل الكهربائي أظهرت النتائج أنها فقدت البلازميد، وفي دراسة أخرى أجراها (Raja and Selvam 2009)على بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* إذ أشار الباحثان إلى إن استعمال مادة SDS في تحييد البلازميد أدت إلى حصول تحييد للبلازميد وبنسبة

75% من المستعمرات التي اجري لها تحييد، إذ أصبحت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* حساسة لبعض المضادات التي كانت تقاومها. يتضح من النتائج جدول(4-12) ان نتائج التحييد بوساطة مادة Acridine orange كانت افضل من نتائج التحييد بواسطة Ethidium bromide و Sodium dodecyl sulfate اذ كان التركيز المحيد باستخدام مادة A.O هو 256 مكغم /مل وياتي بعدها E.B اذ كان التركيز المحيد هو512 مكغم /مل وبعده مادة SDS اذ كان التركيز المحيد هو 2000 مكغم /مل.

جدول(4-12) نتائج التحييد لعزلات بكتريا *S.pyogenes*

التركيز مكغم/مل	الاكردين البرتقالي	بروميد الاثيديوم	كبريتات دودسل الصوديوم
16	+++	+++	+++
32	++	++	+++
64	+	++	+++
128	+	+	++
256	+	+	++
512	-	+	++
1024	-	-	+
2000	-	-	+
2500	-	-	-
3000	-	-	-

+++: نمو كثيف , ++ :نمو متوسط , +: نمو ضعيف , – : لا يوجد نمو

4-12 التحري عن حساسية العزلات قبل التحييد وبعده

اشارت النتائج التي توصلنا اليها في هذه الدراسة ان هناك بعض العزلات التي كانت مقاومة لبعض المضادات الحيوية واصبحت حساسة بعد اجراء عملية التحييد البلازميدي بثلاثة مواد هي A.O, E.B, SDS وهذا دليل على ان صفة المقاومة لهذه المضادات الحياتية محمولة بلازميديا وتبين ان هناك عزلات كانت حساسة قبل وبعد التحييد. واظهرت النتائج ان صفة المقاومة للامبيسيلين والتتراسايكلين والترايميثيبريم والارثرومايسين محمولة على البلازميدات اذ اصبحت العزلات المقاومة عزلات حساسة بعد اجراء عملية التحييد وهذا يتفق مع ما اشار اليه (Clewel*et al.*, 1981) من

انتشار البلازميدات المشفرة لمقاومة الارثرومايسين واللنكوماسين في مدى واسع من المسبحيات, وقد اشار (Chopra and Roberts , 2001) الى ان صفة المقاومة للتتراسايكلين في بكتريا المسبحيات تعود لأمتلاكها كل من جينات *tet* الكروموسومية والبلازميدية .

كما ذكر (Stevens and Kaplan, 2000) بأن مقاومة بكتريا *S.pyogenes* يعود الى امتلاكها لأحد العنصرين القافزين Tn_{916}, Tn_{370} وتبين ايضا صفة المقاومة للكلوكسسيلين غير محمولة على البلازميد اذ حافظ على مقاومته ولم تتوفر اي دراسة سابقة لأي نوع من انواع المسبحيات في ضوء المصادر المتوفرة

جدول(4-13) نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية قبل التحييد وبعده

المضادات	قبل التحييد	بعد التحييد
Ampicillin	R	S
Tetracyclin	R	S
Chloramphenicol	S	S
Ciprofloxacin	R	R
Novabiocin	R	R
Imipenem	S	S
Augmentin	R	R
Penicillin	S	S
Clindamycin	R	R
Cloxacillin	R	R
Amikacin	R	R
Erythromycin	R	S
Trimethoprim	R	S
Gentamycin	R	R
Vancomycin	S	S

R: مقاوم , S: حساس

الاستنتاجات

- تصيب بكتريا *S.pyogenes* الاطفال ضمن الفئة العمرية 1-10 سنوات اكثر من الفئات العمرية الاخرى.
- مضادات الاميكاسين ، والامبسيلين ، والترايمثبريم لم تعد فعالة ضد عزلات *S.pyogenes* المعزولة محليا نتيجة المقاومة المتزايدة لهذه البكتريا اما مضادات البنسلين، والامبنيم ، و الفانكومايسين ، والكلورومفينيكول هي الاكفأ ضد عزلات *S.pyogenes*.
- ان مادة Acridine Orange عامل محيد جيد لبكتريا *S.pyogenes* ، ويأتي بعدها Ethidium Bromide ، و اضعف المواد تحييداً هي مادة Sodium dodecyl sulfate و المحددات الوراثية لأنتاج انزيمات البيتالاكتاميز قد تكون بلازميدية في بعض عزلات *S.pyogenes*.
- ارتفاع مستوى سم Streptolysin O في الاصابات القديمة بالاضافة الى الاصابات الحديثة ، وهذا دليل على ان هذا السم يبقى فترة طويلة في دم المرضى المخمجين والذين لديهم اصابات مزمنة .

التوصيات

- اجراء دراسات موسعة عن عوامل الضراوة المهمة لهذه البكتريا من الناحية الوراثية والمناعية وبأستخدام تقنية Polymerase chain reaction (PCR) لتحديد وبائية العزلات المرضية .
- امكانية تصنيع لقاح من احد عوامل الضراوة في البكتريا مثل M-protein .
- استخدام المستخلصات النباتية في تحييد البلازميدات للعزلات المقاومة للمضادات الحيوية.

البغدادي , اسراء عدنان ابراهيم .(2006).دراسة بكتريولوجية ووراثية للمسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي .رسالة ماجستير.كلية العلوم.جامعة بابل.

التميمي , نهاية نعمة حسين.(2007).تاثير خميرة Candida albicans في بكتريا *S.pyogenes* المسببة لالتهاب اللوزتين واستعمال بعض المستخلصات النباتية في معالجتها .اطروحة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة .كلية العلوم .الجامعة المستنصرية.

الجبوري , عمار رياض قاسم.(2007). دراسة بكتيرية للمسبحيات المحللة للدم نوع بيتا المسببة لالتهاب البلعوم واللوزتين وعلاقة التركيزين المثبط الادنى القاتل لها بانتاج الهيمولايسين.رسالة ماجستير.كلية الطب.جامعة بغداد.

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

الحسني ، هالة محمد حسين. (2011).دراسة مقارنة بين انواع بكتريا *Staphylococci* المنتجة وغير المنتجة للانزيم المخثر للبلازما المقاومة للمثسلين . رسالة ماجستير.كلية العلوم . جامعة بغداد.

الزعاك ، علي (1994). البايولوجي الجزيئي لضراوة البكتريا. الطبعة الاولى جامعة بغداد.

السعدي ، لينا عبد الامير سلمان .(2011) .دراسة بكتريولوجية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في مدينة بعقوبة وضواحيها . رسالة ماجستير.كلية التربية .جامعة ديالى.

السعيد ، محمد صبري عبد الرزاق (1997). النسق الوراثي لبكتريا الجهاز التنفسي الهوائية. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم. جامعة بغداد.

الشبيب ، أسفار شهاب (1977). دراسة بكترية وراثية عن الـ *Streptococcus pyogenes* المعزولة من حناجر ولعاب الأطفال في العراق. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد.

الطائي ، هادي رحمن رشيد . (2005) . دراسة بكتريولوجية كيموحيوية وجزيئية لبكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من التهابات المجاري البولية في بعض مستشفيات مدينة بغداد . اطروحة دكتوراه .كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .

العاني ، ندى عربي حمدو (2001). دراسة تأثير المستضد الخارق المنتج من بكتريا *Streptococcus pyogenes* المعزولة من الأطفال على بعض الخلايا المناعية. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد.

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.

العبيدي، هناء سليم (2003). تنقية وتوصيف المستضد الخارق الخارجي نوع (S Pe – C) لبكتريا المكورات المسبحية القيحية وتأثيره على الأستجابة المناعية. أطروحة دكتوره . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية.

العوادي ، براء قاسم هادي.(2000). دراسة سريرية ووراثية عن بعض البكتريا الهوائية المعزولة من التهابات البلعوم والاذن والأنف. رسالة ماجستير .كلية العلوم . جامعة بغداد.

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

القصاب ، عبد الجبارعمر و الخفاجي ، زهرة محمود .(1992). تأثير الظروف المختلفة على الفعالية التثبيطية للعصيات اللبنية المعوية أتجاه البكتريا المعوية المسببة للأسهال . كلية العلوم الزراعية . مجلد (123) . العدد (7):18-26

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

القيسي,امل حسين عباس.(1998).استخلاص وتنقية جزيئية لذيفان حال الرئة من العقديات الرئوية المحلية. رسالة ماجستير .كلية العلوم.جامعة بغداد.

الكدو , عبدالغني والعموري,مصطفى(2012) .عزل الجراثيم الهوائية من لب اللوزتين عند الاطفال المصابين بالتهاب اللوزتين متكرر ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية.مجلة التشخيص المختبري,6 (5).

الكنزاوي ، فاتن حمدان (2004). تأثير الزيوت الطيارة لبعض النباتات المحلية الطبية في البكتريا الشائعة لألتهاب اللوزتين. رسالة ماجستير . كلية العلوم. جامعة البصرة.

المرجاني ، محمد فرج . (2011) . المضادات الحيوية المقاومة الحيوية البكتيرية للمضادات الحيوية. عمان: دار دجلة

المهداوي , عباس ياسين حسن.(2005) . دراسة تاثيرمستخلص قشرة ثمار الرمان على البكتريا المعزولة من مرضى التهاب اللوزتين في محافظة ديالى وبعض السمات المناعية لديهم .رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة ديالى

النعيمي ، حنان عدنان (2005). تقييم فعالية بعض المستخلصات النباتية على نمو البكتريا المرضية الموجبة الصبغة من حالات التهاب البلعوم واللوزتين. رسالةماجستير. معهد الهندسة الوراثية التقنيات الأحيائية للدراسات العليا . جامعة بغداد.

Al-Camo, I.E. (2001). Fundamental of microbiology. 6th ed . Jones and Bartelett. London. UK: 25-34.

Al-Charrakh, A.H, Yosif, S.Y. and Al-Janabi, H.S. (2011). Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocins from *Klebsiella* isolated from Hilla, Iraq. ***J.Microbial*** , 2(5):1-11.

Al-Junadi, A.A.S .(2005). Immunological study on TSST-1 Extracted from *Staphylococcus aureus* isolated from skin infections. Phd thesis. Collage of Science. Al-Mustansiriya University.

AL-Saady , L.G.H.(2000).Study of tonsillitis causative microorganisms and factors affecting their growth . M.Sc.Thesis , Collage of Science-University of Al-Mustansiriya.

Akinjogunla[a], O.J. and Enabulele, I.O.(2011). Aetiologic agents of acute otitis media: Prevalence, Antibiotic susceptibility, Beta-Lactamse and extended spectrum Beta-Lactamse production. ***J. Of Microbiology, Biotechnology and food science*** , (3): 333-353.

Akinjogunla[b] O.J, Eghafona, N.O. and Enabulele, I.O.(2011). Prevalence, haemolytic activities and flourokuinolones susceptibility profiles of *moraxella catarhalis, Streptococcus pneumonia* and *Haemophilus influenza* associated with acute otitis media. In nature and science, 9(6):85-92.

Akikusa, J.D. (2012). Rheumatologic emergences in newborns, children, and adolescents. The pedatric clinics of north America, 59: 285-299.

Allos, S.D, Rahman, H.A .and Al-Kharofa, A.W.(2009). Isolation and identification of the bacteria causing tonsillitis. ***Tikrit Medical journal*** *,* 15(1): 100-103.

Ankur, B , Alistair , J. and Jeffery, N. (2010). Three surface Exoglycosidases from *Streptococcus pneumonia* NanA ,BgaA and Str. It promote Resistance to oposonophagcytic killing human neutrophils , Infection and Immunity , American society of Microbiology, 78 (5) : 2108-2116 .

Atlas, R.M, Brown, A.E. and Parks, L.C.(1995) Laboratory Manual Experimental Microbiology. 1th ed. Mosby Yearbook, Inc.

Ausubel, F.M , Brent, R , Kingston, R. E, Moore, D. D , Smith, J. A , Seidman, J. D. and Struhi, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc. New York.

Aviles-Gonzalez, p. and Zaraqoza, O.M. (2000). *Streptococcus pyogenes* : in vitro susceptibility and role of the Beta-lactamse producing bacteria in the persistence of Streptococcus pharyngotonsillitis. Pubmed , 25(8):542-550.

Bahman, W, Hashwa, F, Araj, G. and Tokajian, S. (2011). *Emm* typing , antibiotic resistance and PFGE analysis of *Streptococcus pyogenes* in Lebanon. ***J. Med .Microbial*** *,* 60(1):98-101.

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

Baron[b], E.J , Pealle, M.A , Tenover, F.C. and Yokken, R.H. (1999). Commensal and pathogenic microorganisms in manual of clinical microbiology. 7thed , 1(27). ASM press Washington. USA

Bardassarri, L , Creti, R , Recchia , S , Imperi , M , Facinelli , B , Giovanetti , E , Pataracchia, M. and Alfarone , G. (2006). Therapeutic failures of antibiotic used to treat Macrolide susceptible *Streptococcus pyogenes* infections may be due to Biofilm formation. ***J of clinical microbiology*** , 44(8): 2721-2727.

Bates, C.S , Montanez, G.E , Woods, C.R , Vincent, R.M. and Eichenbaum, Z . (2003). Identification and characterization of *Streptococcus pyogenes* operon involved in binding of hemoproteins and acquisition of iron. ***Infect Immune*** , (71):1042-1055.

Baquero, F, Rodriguez, J. A , De Lomas, J. G , Aguilar, L . and the Spanish surveillance group for respiratory pathogens .(1999). Antimicrobial resistance of 914 β– hemolytic streptococci isolated from pharyngeal swabs in Spain: result of 1 year (1996–1997). multicenter surveillance study. ***Antimicrob. Agents Chemother*** ,43: 178-180.

Bauer, S.W, Kirby, W.M, Sherris, J.C. and Truck, M.D. (1996) . Antibiotic susceptibility testing by standardized single dose method. ***American Journal clinical path.***

Benett, P.M. and Chapro, L. (1993). Molecular basis of β – Lactamases induction in bacteria. ***Antimicrobil. Agents Chemother*** , 37: 153 – 158.

Berhrman, R. E. and Kleigman, R. M. (1998). Nelson essentials of pediatrics. 3rd ed. W. B. Saunders Company, 373–375.

Bhalerao, D.S ,Roushani ,S , Sinikar, A.G. and Akhter, I. (2010) . Study of metallo-beta-lactamase producing *P.aeruginosa* in pravara rural hospital. ***Pravara Med Rev*** : 1-5 .

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. Biological sci*** , 2(4):63-66.

Bingen, E, Fitoussi, F, Doit, C, Cohen, R, Tanna, A, George, R, Loukil, C, Brahimi, M, Thomas, I. and Deforche, D. (2000). Resistance to macrolide in *Sreptococcus pyogenes* in France in pediatric patients. ***Antimicrob. Agents Chemother***, 44: 1453-1457.

Bisno[a], A.L .and Brito , M.O. and Collins,C.M. (2003). Molecular basis of Group A streptococci virulence ***Lancet Infect Dis*** ,3:191-200.

Bisno[b], A.L.(2010).Nonsuppurative poststreptococcal sequelae : rheumatic fever and glomerulonephritis . In:principles and practice of Infections disease ,7th ed, 2611-2622.

Bisno[c], A.L.and Stevens, D.L.(2010). *Streptococcus pyogenes* In:principles and practice of infections disease,7th ed.mandell,Douglas and Bennet (eds),2593-2610.Livingstone Elsevier.philadelphia.

Bistue, A. J , Birshan, D , Tomaras, A.P, Dandekar, M , Tran, T , Newmark, J , Bui, D , Gupta, N , Hernandez, K , Sarno, R , Angeles Zorreguieta , A , Actis, L. A , Marcelo E. and Tolmasky, M. E. (2008) . *Klebsiella pneumoniae* Multiresistance Plasmid pMET1:Similarity with the Yersinia pestis Plasmid pCRY and Integrative Conjugative Elements. 3(3): doi:10.1371 ***journal. pone***.. 3: 1-9

Blazevic, D.J. and Eederer, G.M. (1975). Principles of biochemical tests in diagnostic Microbiology.Awiley Biochemical publication .john wiley and sons.

Bond ,J , Wilson ,J . and Eccles . (2006) . Protocol of north England Scotland study of tonsillectomy and adeno tonsillectomy in children (nesstaca).pragmatic randomized controlled trial comparing surgical intervention with conventional medical treatment in children with recurrent sore throats,(6):13-22.

Bonfiglio, G, Perilli, M, Stefani, S, Amicosanti, G. and Nicoletti, G. (2002). Performance of extended-spectrum β-lactamases among *Enterobacteriaceae*: an Italian survey. ***Int.J.Antimicrob. Agents*** ,19 (3): 213-217.

Bordi, C. and De Bentzmann, S . (2011) . Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. ***Annals of Intensive*** **Care** , 1:19.p.2-8

Brook[a], I. (1985). Role of beta-lactamase-producing bacteria in the failure of penicillin to eradicate group A streptococci. ***Pediatr. Infect. Dis***, 4:491-495.

Brook[b], I. (1989) . Treatment of patients with acute recurrent tonsillitis due to group A beta hemolytic streptococci: a prospective randomized comparing of penicillin and amoxicillin \clavulante potassium. ***Antimicrob. Agents Chemoter***, 24: 227-233.

Brook[c], G. F, Butel, J ,S, Carroll, K. C. and Morse, S. A . (2007) . Jawetz , Melinick , J.L. and Adlebergs Medical Microbiology , 24th ed. A lange medical book.

Carapetis , J . R , Steer, A .C, Mulholland, E .and Weber, M . (2005) . The global burden of Group A streptococci disease.***Lanset Infect Dis*** , 5:685-694.

Cappuccino, J. G. and Sherman, N. (1987). Microbiology alaboratory manual. The Benjamin Cummings publishing company Inc.

Celestin, R , Brown, J , Khiczak, G.and Schwartz, R.A.(2007).Erysipelas : acommon potentially dangerous infection *Acta Dermatovenerol Alp Panonica , E . Adriatal* ,16(3):123-127.

Chin, S.C, Abdullah, N, Siang, T.W. and Wan,H .Y.(2005). Plasmid Profiling and Curing of Lactobacillus Strains isolated from the Gastrointestinal Tract Chick**en** ***. J. Microbiology*** **, 43,(3): 25 -256.**

Ching-Tang shin , Ching-Chianq Lin.and Chung-Chinglu. (2012) . Evalution of astrepyococcal Pharyngitis score in southern Taiwan . ***FEMS Immunology and Medical Microbiology***, 53(1):49-54 .

Choby, B .A. (2009). Diagnosis and treatment of streptococcal pharyngitis. ***Am Fam Physician***, 79(5):383-390.

Chopra, I. and Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. MMBR. 65:232-260.

Ciofu, O , Mandesberg, L.F , Wang.and Hoiby, N. (2012) . Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients:implications for the treatment of *p.auruginosa* Biofilm infections . ***FEMS Immunology and Medical Microbiology*** , 65(2):215-225.

Clewell, D. B.(1981). Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus Streptococcus***. Microbiol. Rev*** , 45:409-436.

Collee, J. G , Fraser, A. G , Marmion, B. P. and Simmons, A . (1996) . Mackie and McCartney practical medical microbiology . 14th ed. Churchill Livingston . P.173-174 .

Cole[a], J.N , Henningham, A , Gillen, C.M , Ramachandran, V. and Walker , M.J .(2008) . Human pathogenic Streptococcal proteomics and vaccine development. ***Proteomics Clin Appl*** , (2):387-410.

Cole[b], J.N , Barnett , T . C , Nizet , V . and Walker , M . J . (2011) . Molecular insight into invasive Group A Streptococci overview streptococcal disease.***Nat.Rev.Microbiol*** , 9:724-736.

Coering, R , Dockrell, H , Zuckerman, M, Wakelin, D .and Poitt, I .(2009). Medical Microbiology.4thed.Mosby,USA:31-32.

Cook, S.M , Skora, A , Gillen, C.M , Walker, M.J. and McArthur, J.D .(2012). Streptokinase variants from *Streptococcus pyogenes* isolates display altered plasminogen activation characterstics-implications for pathogensis .Molecular Microbiology , 86(5):1052-1062.

Cornaglia , G , Ligozzi , M , Mazzariol , A , Valentitini , M , Orefici, G. and Fontana, R.(1996). The Italian surveillance group for antimicrobial resistance. Rapid increase of resistance to erythromycin and clindamycin in *Streptococcus pyogenes* in Italy, 1993–1995 . ***Emerg. Infect. Dis*** , 2: 339–342.

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.

Cucarella, C,Tormo, M.A, Ubed, C,Trotonda, M.P, Monzon, M, Peris, C, Amorena, B, Lasa, I. and Penades, J.R. (2004). Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. Infect. ***Immun*** , 72(4) : 2177-2158.

Cunnighaham[a] , M.W. (2000). Pathogenesis of Group A streptococcal infections. ***Clin. Microbial. Rev*** , 13:470-511.

Cunnighaham[b] , M.W. (2008). Pathogenesis of Group A streptococcal infections. And there sequelae. ***Adv Exp Med Biol*** , (609):29-42.

Cywes[a], C, Stamenkovic, I. and Wessels, M. R. (2000). CD44 as a receptor for colonization of the pharynx by group A Streptococcus. ***J. Clin. Investg*** , 106: 995-1002.

Cywes[b],C. and Wessels ,M.R.(2001). Group A streptococcus tissue invasion by CD44-mediated cell signaling nature. ***J. Clin. Investg*** , 414:648-652.

Czrkowski[a], M.P and Kondej, B. (2010) . Scarlet fever in Poland 2008. ***Przegl Epidemiol*** , (2):185-188.

Czrkowski[b] ,M . P , Kondej , B , Stazewska ,E . (2011) . Scarlet fever in Poland 2009 . ***Przegl Epidemiol*** , (2):209-212.

Davies , I . (2006) . Staphylococcus resistance of Antibiotic.***Microbiology and Biotechnology Journal*** , 34:386-390.

Debasrita , C , Saikat , B . and Satadal , D . (2010) . Astudy of infections caused by Metallo_Beta lactamase producing gram negative bacteria in intensive care with patients.***American Journal of infectious disease*** , 6(2):34-39.

Dierksen, K. P, Inglis , M and Tagg , J .R . (2000) . High pharyngeal carriage rates of *Streptococcus pyogenes* in Dunedin school children with alow incidenceof rheumatic fever.***New Zeal Med J*** , 113:496-499.

Doem , D.C, Roberts, L.A ,Hong, W, Lukomski, S ,Swords, E.W.and Reid, D.S.(2008).Bioflim formation by Group A Streptococcus : Arole for the Streptococcal regulator of virulence (Srv) and Streptococcal cysteine protease. ***Microbiology***, 155:46-52.

Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002) . Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. ***Clin. Microbiol. Rev*** , 15:167-193.

Efstratiou, A. (2000). Group A streptococci in the 1990s . ***J. Antimicrobial. Chemotherapy*** , 45: 3-12.

El-banna, K ,Hassan, G ,Khider, M.I. and Mandour, R.(2010). Safe Biodegradation of Textile Azo Dyes by Newly Isolated Lactic Acid Bacteria and Detection of Plasmids Associated With Degradation . ***J. Bioremed and Biodegrad*** ,1:2-6.

El-Mongy, M.A. and Taha, M.T.(2012).In vitro detection and optimization of streptokinase production by two streptococcal strains in arelatively low cost growth medium.***Int.Res.Med*** ,3(4):153-163.

Eroschenko, U.P. (2000) . Atlas of histology.9th ed.Lippincott Williams and Wilkins.Phaladelphia.

Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. ***Clin. Microb. Rev***. 15:613-630.

Factor, S.H ,Levin, O.S ,Schwart, Z.B, Harrison, L.H , Farley, M,M, Mcgeer ,and schuchat. (2003) . Invasive group A streptococcal disease : Risk factors for adults . ***Emerg Infect Dis*** (9):970-977.

Feng, Y.(2008).Evalution and pathogensis of *S.aureus*.Lessons learned from genotyping and comparative genomics.***FEMS.Microbiol.Rev***,32:23-37.

Forbes[a], B.A ,Sahm, D.F .and Wessifeld, A.S.(1998).Diagnostic Microbiology.10th ed.Mosby.Inc.Baltimore.

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

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

Fredrikson, F ,Myklebust, R, Raisanen,S, and Stenfors, L.E.(1997).Instu localization of *Streptococcus pyogenes* during acute tonsillitis:An Immunocytomegal study with gold markers .Acta O to laryngol,116:892-895.

Freeman, D.J, Falkiner, F.R. and Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. ***J. Clin. Pathol*** , 42:872-874.

Fuller, J. D , Camus, A.C, Duncan, C. L , Nizet, V, Bast, D. J,Thune, R. L , Low, D. E. and de Azavedo, J. C. S. (2002). Identification of a streptolysin S–associated gene cluster and its role in pathogenesis of *Streptococcus iniae.* ***Infect. Immune*** , 70: 5730–5739.

Gagliotti, C , Nobilio, L, Milandri, M .and Moro, M.L.(2006).Macrolide prescriptions and Erthromycin Resistance of *Streptococcus pyogenes*.***Oxford Journal*** , 56(12).

Gene,H.S.(2013).Rheumatic fever in the 21st century. ***Oxford Journal*** , 33:806-814.

Gerber , M.A.(2007) . Group A streptococcus . Nelson , Text book of pediatrics , International editions 18th ed . 182:1135-1139 .

Grohmann , E, Gunther, M. and Espinosa, M. (2003). Conjugative plasmid transfer in gram – positive bacteria. ***J. MMBR*** , 67: 277-301

Guilfoile , P. G , Alcamo , E. and Heymann, D. (2007) .Antibiotic – Resistance bacteria. Chelsea House Publishers , 53-62.

H

Hahn, R.G, Knox, L.M.and Forman, T.A.(2005).Evalution of post Streptococcal illness.***Am Fam Physician*** , (10):49-54.

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.

Hall, S,Shrestha, R and Vogel, S. (2004). Methicillin\Oxacillin-Resistant *Staph aureus* (MRSA\ORSA) : Laboratories Detection , 15:2-10.

Han, J. S. , Jang, I-Y. , Ryu, H-S.and Kim, W-Y.(2010) .Similarity with the Yersinia pestis Plasmid pCRY and Integrative Conjugative Elements. ***J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*** , 401-406

Hashikawa, S, Inuma, Y, Furushita, M, Ohkura, T, Nada, T, Torii, K, Hasegawa, T. and Ohta, M. (2004). Charecterization of group C and G streptococcal strains that cause streptococcal toxic shock syndrome. ***J. Clin. Microb***. 42: 186-192.

Henry, L.B .(2001) .Clinical diagnosis and Management by laboratory Methods.20thed .W.B.Saunders company .U.S.A ,47(12):2188-2189.

Henningham A, Chiarot E, Gillen CM, Cole JN, Rohde M, Fulde M, Ramachandran V, Cork AJ, Hartas J, Magor G, Djordjevic SP, Cordwell SJ, Kobe B, Sriprakash KS, Nizet V, Chhatwal GS, Margarit IYR, Batzloff MR, Walker MJ. (2012) Conserved anchorless surface proteins as group A streptococcal vaccine candidates. ***J Mol Med (Berl)***

Herwald[a], H, Collin, M , Muller-Ester , W. and Bjork, L. (1996). Streptococcal cysteine proteinse releases kinins: a noval virulence mechanism. ***J. Exp. Med*** , 184: 665-673.

Herwald[b] , D , Cramer , H , Morgelin , M , Ipussell , W , Sollenberg , V , Norrby-Teglund , A , Flodgard , H , Lindbom , L , and Bjorck , L.(2004). M protein , a classical bacterial virulence determinant , forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage, 116:367-379.

Hogg, S. (2005) .Essential microbiology , John Wiley sons ,Ltd , the atrium southern Gate , chichester , west sussex , pox 198sQ , England : 200 , 205 ,210

Hidalgo-Grass , C , Mishalian , I , Dan-Goor , M , Belotserkovsky , I , Eran , Y , Nizet , V , Reled , A . and Hanski , E.(2006). A Streptococcal protease that degrades chemokines and impars bacterial clearance from infected tissues. ***EMBO. J*** , 25(19):4628-4637.

Hussein , J ,Mavalankar , D.V , Sharma , S , Ambruosol .(2011) . A review of health system infection control measures in developing countries : What can by learned to reduce mortality . ***Health. J*** ,(7):14-22.

Hynik , O , Wescombe , P.A , Vpton , M , Regland , N , Burtan , J.P. and Tagg , J.R. (2007). Salivarcin A_2 and the novel antibiotic salivarcin B are encoded at

adjacent loci on alqo-kilobase transmissible megaplasmid in the oral probiotic strain *Streptococcal* salivarcin K_{12}. ***Apple Environ Microb*** , 73:1107-113.

Iovino SM, Krantz KD, Bianco DM, Fernández JA, Ocampo N, Najafi A, Memarzadeh B, Celeri C, Debabov D, Khosrovi B.and Anderson M. (2011).NVC-422 topical gel for the treatment of impetigo. ***Int J Clin Exp Pathol*** , 4(6):587-595.

Jacoby, G.A. and Sutton, L. (1985). β -Lactamases and β-Lactam resistance in *E . coli* . ***Antimicrob. Agents. Chemother*** , 28(5): 703-705.

Jaggi , P .and Shulman , S.T.(2007). Group A Streptococcal infection. ***Pediatrics in Review*** , (27): 99-104.

Jarlier, V , Nicolas , M , Fournier , G. and Philippon , A. (1988). Extended Broad-spectrum Beta-lactamses conferring transferable resistance to newer Beta-lactam agents in Enterobacteriaceae : Hospital prevalence and susceptibility pattern. ***Infect. Dis*** , 10(4):867-878.

Jawetz[a] , E , Melnick , J , L. and Adelberg , E.A. (1991). Medical Microbiology , 19[th]ed prentice-hall. New Jersey. U.S.A.

Jawetz[b] , E , Melnick , J , L. and Adelberg , E.A.(2004). The Streptococci in Medical Microbiology 23[th]ed , 231-247. Lang . Middle East. Library dulbin Beirut.

Jawetz[c] , E , Melnick , J , L. and Adelberg , E.A.(2007). Medical Microbiology . 24[th]ed . McGraw-Hill.

Jeffries , C.D .and Holtman , D.F. (1957). Rapid method for determining the activity of microorganism on nucleic acids. ***J. Bacteriol*** , 73:590-591.

Johnson , D.R , Kaplan , E.D , Sramek , J , Bicova , R , Havlicek , J , Havlicova , H , Motlova , J. and Kriz , P. (1996). Laboratory diagnosis of Group A Streptococcal Infections . WHO.

Johuston, J.N. and Richmond, M.H. (1970). The increased rate of loss of penicillin' s plasmids from Staphylococcus aureus in the present of rifampcin. ***J. gen. Microbiol*** , 60 : 137-139.

Justyna, E.K , Johan , P.T. and Edward , j.T. (2011). The structural characterization of a prophage encoded extracellular Dnase from *Streptococcus pyogenes.* ***Oxford*** . ***J,*** 40: 928-938.

Kapur, V Topouzis, S, Majesky, M. W, Li, L.-L,Hamrick, M. R,Hamill, R. J, Patti, J. M. and Musser, J. (1993). A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cyteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. ***Microb. Pathog*** , 15: 327-346.

Karabay,O , Ekerbicer,H and Yilmaz,F.(2005).Efficacy of throat gargle of Group A Beta-hemolytic streptococci.***Jpn.J.Infect.Dis***,(58):39-40.

Karbasizaed , V , Badami, N and Emtiazi, G. (2003) . Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. ***Afri. J. biotechnology*** ,2(10):379-383.

Kasenomm, P, Piirsoon, A , Kull, M ,Kull, M .J.and Mikelsaar,M.(2005) Selection of indicators for tonsillectomy in adults with recurrent tonsillitis. BMC Ear,Nose and throat Disorders 5:7.

Kataja[a], J, Seppala, H, Skurink, M, Sarkkinen, H. and Huovinen, P. (1998). Different erythromycin resistance mechanisms in group C and group G streptococci . ***Antimicrob. Agents Chemother*** ,142:1493-1494 .

Kataja[b], J, Huovinen, P, Skurink, M, the finish study group for antimicrobial resistance and Seppala , H . (1999). Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland . ***Antimicrob. Agents Chemother***, 43: 48-42.

Katzung, B.G. (2001). Basic and Clinical Pharmacology. (8^{th}) ed. Lange Medical Books. McGraw-Hill. New York.

Kayaoglu, G. and Qrstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*. Relationship to Endodontic disease. ***Rev. Oral. Biol. Med*** ,15(5) : 308-342.

Kaye, K, Fraimow, H. and Abrutyn, E.(2000).Pathogens resistant to antimicrobial agent .Epidemiology ,molecular mechanisms, and clinical management .***Infect.Dis.Clin.North Am*** ,14(2):319-293.

Koliou ,M, Ioannou, Y, Efstratiou, A ,Hannidon, N, Pieri, V, Alexandron.and M,Soteriades.(2007).Circulating serotypes and antimicrobial sensitivity of *Streptococcus pyogenes* isolated from children in Cyprus,13(6):645-647.

Ksia, S, Hanen, S, Kechrid, A.and Bouvet,H . (2013) . *Streptococcus pyogenes* isolated in Tunsian pediatric population : *emm* types ,T types,virulence factors and genes of resistance to Macrolide and tetracycline . Malaysin journal of Microbiology , 9(1):24-32.

Kumar[a], R, Vohra H, Chakraborty A, Sharma YP, Bandhopadhya S, Dhanda V, Sagar V, Sharma M, Shah B.and Ganguly NK.(2009) Epidemiology of group A streptococcal pharyngitis & impetigo: a cross-sectional & follow up study in a rural community of northern India. ***Indian J Med Res*** ,130(6):765-771.

Kumar[b],A. and Talwar ,A ,(2010). Antimicrobial Resistance Patterns of *Klebsiella spp*. Isolated from Raw Milk of Doon Valley. Microbiology and Molecular Biology ,1(1):21-35.

Lamganii, T.L , Darenberg , J ,Laca-Harai,B,Siljander,T,Efstratiou,A,Henriques-

Normark,B,VuopioVarkila,Bouret,A,Creti,R,Ekelund,K,Koliou,M,Reinert,R.R,Stathi,A ,Strakova,L .and Schalen,C.(2008).Strep-Eurostudy Group,Jasir,A.Epidemiology of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe.***J.Clin.Microbiol*** , 46(7):2359-2367.

Lavanya, B , Sowmiya , S, Balaji , S. and Muthuvelan , B .(2011). Plasmid Profiling and Curing of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fermented Milk for Probiotic Applications ***.J .Food Science and Technology*** , 3(2):95-101.

Lee , S .S , Oh ,T .J , Kim , J , Kim , J .B . and Lee ,H.S .(2009) .Bacteriocin from Purple Nonsulfur Phototrophic Bacteria, *Rhodobacter capsulatus* . ***J. Bacteriology and Virology*** ,39 :269 -276.

Levy, S. (2001). The challenge of antibiotic resistance. ***Sci.Am*** , 278: 32-39.

Levinson, W. and Jawets, E. (2000). Medical Microbiology and Immunology examination and board review.(6^{th}) ed.

Lhja, M, Raisanen, S, Jokinenok.and Stenfors, L.(1997).Direct microscopy of effusions obtained from peritonsillar abscesses as acomplement to bacterial culturing.***J.Laryngology.Otology*** ,111:392-395.

Li, Z, Sledjeski, D. D, Kreikemeyer, B, Podbielski, A. and Boyle, M. D. (1999). Identification of *pel,* a *Streptococcus pyogenes* that affects both surface and secreted proteins. ***J. Bacteriol*** , 181: 6019–6027

Liaw, S.J, Al, H.C, HO, S.W, Luh, K.T. and Wang, W.B. (2000). Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Proteus mirabilis* by *p*-nitrophenly glycerol. ***J. Med. Microbiol*** , 49: 725-731.

Lipuma, J.J, Stull, T.L, Dasen, S.E, Pidock, K.A. and Kazeniomiski, O.M. (1989). DAN Polymorphism among *E. coli* isolated from bacteriuria Women. ***J. Infect. Dis*** , 159: 526-531.

Logsdon, L.K, Hakansson, A.P ,Gortes, G.and Wessels,M.R. (2011).Streptolysin

O inhibits clathrin-dependent of Group A Streptococcus ***Bio*** , 2(1).

Luders, T, Birkemo, G.A, Fimland, G, Nissen-meyer, J.& Nes ,L.F. (2003). Strong synergy between eukaryotic antibacterial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria ***.Appl.Environ.Microbiol*** , 69(3):1797-1799.

Lynskey, N.N , Lawrenson , R.A .and Sriskandan , S .(2011).New understanding in *Streptococcus pyogenes*. ***Curr Opinionin infectious disease*** ,24(3):196-202.

Lyon, W. R. and Caparon, M G. (2004). Role for serine protease Htr A (Deg P). of *Streptococcus pyogenes* in the biogenesis of virulence factor spe B and the streptolysin S. ***Infect. Immun***, 72: 1618-1625.

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

Maniatis, T , Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: Alaboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring, New York.

Marshall , C.S , Cheng , A.C , Markey ,P.G , Tower , R.J , Richardson , L.J , Fagan ,P.K , Scott , L .and Karuse , V.L. (2011). Acute post-Streptococcal glomerulonephritis in the Northern territory in Australia : A review of 16 years datd and compression with literature. ***Amj. Trop. Med Ityg*** , 85(4):703-710.

Martinez , M.A , Ovalle , A , Duran , C , Reid , I , Urriola ,G , Garay , B .and Cifentes , M. (2004). Serotype and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae*. ***Rev. Med. Chil*** , 132(5):549-555.

Mathur, T , S. Singhal , S. Khan , D.J. Upadhyay , T. Fatma , and A. Rattan. (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.

Mc Arthur , J.D , Mckay , F.C , Ramachandran , V , Shyam , P , Cork ,A , Sanderson , S , Martina , L .and Cole , J.(2008). ***FASEB J*** , 22:3146-3152.

Mc Millan , J.A , Santstrom , C. and Weiner , L.B. (1996). Viral and bacterial organisms associated with acute pharyagitis in school- aged population. ***J. Pediator*** , 109(5):747-752.

Megged, O, Assous ,M , Weinberg ,G. and Schlesinger,Y.(2013).Inducible Clindamycin resistance in beta-hemolytic streptococci and *Streptococcus pneumonia*.***IMAJ.J*** .

Mandell, G. L, Bennett, J. E. and Dolin, R. (1995). Mandell, Douglas and Bennetts and practice of infectious disease, 4th ed. Vol. 2. Churchill Livingston, New York. Edinburgh. London Melbourne.

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.

Mojani, M, Ashtian ,M.P.and Khanin, S.E.(2006).Plasmid associated lactocin PN78 production in alactobacillus adairy sample in Iran.***Med.J Of Islamic World Academy Of Science*** , 16(1)19-24.

Mokkapati , A.and Yalamanchili ,M.(2013) .Bacterial isolates causing Pharyngitis . ***Int J Biol*** , 4(2):3118-3120.

Muller–Alouf, H, Geoffroy, C, Geslin, P, Felten, A, Gunther, F, Ozegwski, J. H. and Alouf, J. F. (1997). Streptococcal pyrogenic exotoxin A , streptolycin O, exoenzymes , serotype and biotype profiles of *Streptococcus pyogenes* isolates from patients with toxic shock syndrome and other sever infections. ***Zbl. Bakt***, 286: 421–433

Murray[a], B. E, Mederski-Samoraj, B, Foster, S. K, Brunton, J. and Harford, P. (1986). In vitro studies of plasmid-mediated penicillinase from *Streptococcus faecalis* Suggest a Staphylococcal Origin. ***J. Clin. Invest*** , 77: 289-293.

Murray[b] ,P.R ,Baron, E.J , Jorgensen , J.H , Landry , M.L . and Pfller , M.A (2007) . Manual of clinical Microbiology (9^{th}ed) . Washington . ASM press.

Musser, J.M. and Shelburne, S.A.(2009).Adecade of molecular pathogenomic analysis Group A Streptococcus.***J.Clin.Invest*** ,119:2455-2463.

Muthusamy, D , Boppe ,A , Appalaraju, S.and Sivakami, P.(2012).The prevalence of the group A beta hemolytic streptococcal carriers among school children in combatore.south india.***J Of Clinical and diagnostic research***,6(4):1-3.

Mycek, M.J, Harvey, R.A.and champe, P.C.(2000).Pharmacology 2^{nd}ed.Lippincott Williams and wilikins .610-617.

Nass, T, Zerbih, M, Girlich, D.and Nordmann, P. (2003). Integration of Transposon Tn1- Encoded inhibitor resistant β -Lactamase Gene *bla*TEM-67 from *Proteus mirabilis,*, into *the Escherichia coli* chromosome. ***J. Antimicrob. Chemoth***. 47 (1): 19-20.

National Committee For Clinical Laboratory Standareds. (2010). Perfomance Standared For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS. Villanova P.A.

Nes-Ingolf , F , Diep , Dzung , B .and Hlo ,H . (2007) . Bacteriocins diversity in streptococcus and enterococcus.***ASM Jof bacteriology*** ,189(4):1189-1198.

Neeman, R, Keller, N, Barzilai, A, Korenman, Z. and Sela, S. (1998). Prevalence of the internalization-associated gene, prtF1, among persisting group A streptococcus strains isolated from asymptomatic carriers. ***Lancet*** 352:1974-1977.

Nillson. (2006). Activation of human polymorphonu clear neutrophils by Streptolysin O from *Streptococcus pyogenes* leads to the release of poinflammatory mediators. Thromb Haemost , 95:982-990.

Noakes , T.D , Borrensen , J , Hew-Butter , T , Lambert , M.I .and Joordan , E. (2008). Semmelweis and aetiology of puerperal sepsis 160 years oni an historical , ***Review. Epidemiol. Infect*** , (136):1-9.

Norrby-Teglund, A .and Kotb, M. (2000). Host microbe interaction in the pathogenesis of invasive Group A *Streptococci* infections. ***J. Med Mic*** , (49):849-852.

O'Connell, M.(1984). Genetic Transfer in prokaryotes transformation, transduction and conjugation.: 2 — 13 in Advanced Molecular Genetic by publisher, A. and Timmis. K. Springer verlug — Berlin.

Oehmcke, S, Shannon, O, Morgelin, M.and Herwald ,H.(2010).Streptococcus M proteins and their role as avirulence determinants.***Clin Chim.Acta*** , 411:1172-1180.

Okamoto, S, Kawabata, S, Terao,Y, Fujitaka, H, Okuno, Y.and Hamada S.(2004). The Streptococcus pyogenes capsule is required for adhesion of bacteria to virus infected alveolan epithelial cells and lethal bacterial-viral super infection,72(10):6068-6075.

Olofasson, K ,Hellstrom, S.and Hammarstrom, M.L.(1998) The surface epithelium of recurrent infected palatine tonsils is rich in T cells. ***Clin.Exp.Immunol*** , 111: 36-47.

Olsen, R.J.I, Sikiewicz, A.A, Ayeras,V.E , Gonulal, C, Cantu ,S.B, Beres, N.M , Green, B , Lei, T , Humbrid, J, Greaver, E , Chang, W.P, Ragas, C.A , Montgomery , j.(2010).Decreased necrotizing fasciitis caused by single nucleotide mutation that alters multiple gene virulence axis ***sci. j*** ,107:888-893.

Omura, A . and Satoshi , L. (2002). Macrolide antibiotic chemical biology and particle. 2nded , Postin academic press:200-201.

Osterlund, A , Popa, R , Nikkinla, T , Sheymius, A. and Engstrand, L. (1997). Intracellular reservoir of *Streptococcus pyogenes* in vivo: A possible explanation for recurrent pharyngotonsillitis . Laryngoscope, 107: 640–647.

Ozkaya-Parlakay, A , Uysal , M .and Kara ,A .(2013). Group A *Streptococcal* tonsillopharyngitis burden In tertiary turkis. Hospital . ***the turkis J of Pediatrcs*** , (5): 474-478.

Patel[a], J , Taden , H , Sharma , S. and Orga , P.I. (1992). Effect of respiratory syncytical virus an adherence colonization and immunity of nontypable *Hemophillus influenza:* Implication for otitis media . ***In J Pediator Otorhinolaryngol*** ,(23):15-23.

Patel[b], G, Huprikar, S, Factor, S.H, Jenkins, S.G.and Calfee, D.P. (2008) ; Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. ***Infect Control Hosp Epidemiol*** , 29:1099-106.

Patwardhan, R.B , Dhakephalkar , P.K,Niphadkar , K.B. and Chopade , B.A. (2008) .A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant *Acineobacter baumannii* harbouring multiple plasmids .***J. Med Res*** ,128:178-187.

Paul,S.Kent,D,Barbian,D.J,Gardner,A.R,Whitney,D.M,Welty,J.R,Bailey,M.J,Parnell, N.P,Hoe,G.G,Adams,F.R.and Deleo,J.M,(2005).Extracellular deoxyribnuclease made by group A Streptococcus assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response,5:1679-1684.

Peterson, L.R.(2005).Squeezing the antibiotic balloon:The impactof antimicrobial classes on emerging resistance.***Clin.Microbial Infect*** ,11(5):4-16

Philippon, A , Arlet, G .and Jacoby, A.G. (2002). Plasmid-determined AmpC-Type β-Lactamases. ***Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*** ,46 (1) : 1-11.

Pilet, M . F . and Leroi , F. (2011). Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in fresh seafood and seafood products. *Food Science . **Technology and Nutrution*** ,201 :2-18.

Pinsky ,B.A , Baron ,E . J,Janda , J .M .and Banaei ,N .(2009). Bartholdi's abscess caused by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* . ***J . Medical Microbiology*** ,58 :671-673.

Plaucha, A, Mikiewicz, B and Hryniewicz, W. (1999). Concurrent out breaks of extended-spectrum β-Lactamase-producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw Hospital. ***Journal of Antimicobial Chemotherapy*** ,44 : 489-499.

Prescott[a], L.M, Harley, J.P. and Klein, D.A. (1993) .Microbiology; 2nd.ed. W.M.C. Brown. Publishers, London, Chicago

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

Raja, C .E and Selvam ,G . S .(2009). Plasmid profile and curing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* metal resistant . ***J.Environ*** ,6(2):259-266

Rafael, R.R, Bagan , J.V. and Sanchis , J.M. (2007) .Antibiotic use in dental practic , ***Med oral patol*** , 12: 86-92.

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

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

Reinert, R.R, Rodloff, A.C, Hall, E ,Baer ,W, Beyreiss, B,Seifert ,H, Wichelhaus, T.A, Maass, M.and Mehl, M.(2004).Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Germany and activity of the ketolide telithomycin :Results from the protect surveillance study.(1999-2000).***J Chemother*** ,50(3):143-151.

Riley[a], M.A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. ***Annu. Rev. Genet*** ,32 : 255-278.

Riley[b], M .A , Goldstone, C.M , Wertz,J.E and Gordon .D.(2003). A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. ***J. Evol. Biol*** ,16:690-697.

Roberts, M. C, Sutcliffe, J, Courvalin, P, Jensen, L. B, Rood, J. and Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide – lincosamide – streptogramin B resistance determinants. ***Antimicrob. Agents Chemother*** , 43: 2823-2830.

Saladin,K.S.(2001).Anatomy and physiology.2nded.Mcgraw-Hill,Newyork

Sarika , A.R ,Lipton, A. P. and Aishwarya, M .S.(2010). Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions ***.J. Food Science and Technology*** ,2(5):291-297.

Sarojamma, V. and Ramakrishna, V. (2011) .Prevalence of ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Tertiary Care Hospital. International Scholarly Research Network . ***ISRN Microbiology*** ,p: 1-5 .

Seppala,H , Skurnick,M , Soini,H . and Huovinen , P.(1998). Anovel erythromycin resistance methelase gene (ermTR) in *Streptococcus pyogenes* . American society for microbiology , 2(42):257-262 (.Iraqi virtual library).

Shakib, P , Ghafourian, S , Zolfaghary, M. R , Hushmandfar, R , Ranjbar, R. and Sadeghifard, N. (2012) ; Prevalence of OmpK35 and OmpK36 porin expression in beta-lactamase and non-betalactamase-producing *Klebsiella pneumonia*. Biologics: ***Targets and Therapy***:p. 1-4

Snell , R.S. (2004). Clinical anatomy. 7th ed. Lippincott Williams and wilkins , Philadelphia.

Starr, M.P, Stolp , H ,Truper, H.G , Balows, A .and Schlegel, H.G.(1981).The prokaryotes handbook on habitats ,Isolation and identification of bacteria .Springer.Berlin.

Stevens, D. L. and Kaplan, E .L. (2000). Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis. Oxford University Press. New York.

Stukus, P. E. (1997). Investigating microbiology a laboratory manual for general microbiology. Harcout Brace and companes

Sutcliffe, J.T, Grebe, A ,Tait-Kamrad, T. and Wondrack, L.(1996).Detection of erythromycin resistant determinants by PCR . ***Antimicrob.Agents.Chemother*** ,40:2562-2566.

Tanaka, M , Hasegawa, T, Okamoto, A, Torii, K. and Ohta, M. (2005). Effect of antibiotics on group A streptococcus exoprotein production analyzed by two dimention gel electrophorasis. ***Antimicrob. Agents Chemother*** , 49: 88 – 96.

Tart, A .H ,Walker ,M .J .and Musser ,J .M. (2007).New understanding of the group A Streptococcus pathogensis cycle . ***Trends Microbial*** , 115:318-325.

Tasakris, A .I , Konomidis. and Poulou, A.(2008).Clusters of Imipenem-resistant *Acineobacter baumanii* clones producing different carbapenemases in an intensive care unit. ***Clin Microbial Infect*** , 14(6):588-594.

Threlfall , E .and Frost , J .(1995).The identification,Typing and enginer printing of *Salmonella* :Labortary aspects and epidemiological application ***.J.Appl.Bacteriol Infect*** , 68(1):5-16.

Timmer, A.M ,Timme , J.C ,Pence ,M.A ,Itsu ,L.C ,Ghochani ,M, Freg, T.G, Karin, M, SalveseN ,G.S.and Nizet,V.(2009).Streptolysin O promotes group Astreptococcus immune evasion by accelerated macrophages apoptosis. ***J Biol chemother***,(284):862-871.

Todar, K. (2002). Streptococcus pyogenes: In Todar 's on line Textbook of Bacteriology.

Tortora, G.J. Funke, D.R. and Case, C.L.(2007). Microbiology . 3rd ed . pearson Education Inc. USA.

Trevorse, J.T. (1986) . Plasmid curing in bacteria . ***FEMS. Microbiol . Rev*** ,32 : 149–157.

Tu Quoc, P.H, P. Genevaux, M. Pajunen , H. Savilahti, C. Georgopoulos, J. Schrenzel, and W.L. Kelley. 2007. Isolation and Characterization of Biofilm Formation-Defective Mutants of *Staphylococcus aureus*. Infect. ***Immun,*** 75(3):1079-1088.

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

Turner ,C.E , Kurupati , P , Wiles , S , Edwards , R.J .(2009). Impact of immunization against spyCEP during invasive disease with two streptococcal species :*Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equi,*27:4923-4929 .

Udo, E.E,and Jacob,L.E.(2000).Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* fom Kuwait hospitals with high level fusidic acid resisrance ***.J.Med .Microbiol*** ,49(5):419-26.

Ueda, Y. and Sunagawa, M.(2003). In vitro and in vivo activity of novel 2-(thiazol-2-ylthio)-1-beta-methylcarbapenemeswith potent activity against multiresistant gram-positive bacteria. ***Antimicrob. Agents Chemother***. Aug,47 (8): 2471-8.

Valery, P.C , Wenitong, M ,Clements, V , Sheel, M , Mcmillan, D , Stirling, J ,Sriprakash, K.S, Batzlooff, M, Vohra,R.and Mccarthy, J.S.(2008).Skin infections among indigenous Australians Epidemiol Infect ,136(8):11o3-1108.

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.2nded.World health organization.Geneva,60-64.

Walker, M , McArthur, F, Mckay, M.and Ranson.(2005).Is plasminogen deployed as a *Streptococcus pyogenes* virulence factor?***Trends Microbial***,13:308-313.

Wessels[a], M.R. (2006).Capsular polysaccharide of group A streptococci :inifischetti , Novick, R.P ,Ferrrti, J.J , Portony, D.A .and Rood, J.I .Gram positive paythogenes .2nded ASM press.

Wessels[b] , M.R.(2011).Streptococcal pharyngitis. ***N Eng J Med*** , 364(7):648-655.

WHO. (1978). Techniques For The Detection Of β -Lactamase Producing Strains Of *Neisseria gonorrhoeae,* 616: 137-143.

Winokur, P.L, Canton, R ,Casellas, J-M.and Legakis, N.(2001). Variations in the performance of strains expressing an extended-spectrum β - Lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clinical Infections Diseases, 32(Suppl 2): S94-103.

Xie, Y ,Chen , X ,Nishi , S, Narita , I ,and Gejyo, F.(2004) Relationship between tonsils and IgA nephropathy as well as indications of tonsillectomy. Kidney Int, 65: 1135-1144.

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 . ***Antimicrobial agents and chemother*** , 48(7):2716:2718.

Zunino, P , Piccini, C and Fajardo, C.L.(1999).Growth:cellular differentiation and virulence factor expression by *Proteus miriabilis* in vitro and vivo .***J Med Microbial*** , 48:527-534.

ملحق (1) إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى

رقم العينة .

اسم المريض .

العمر .

الجنس .

السكن .

نوع العينة .

تاريخ جمع العينة .

مكان العزل .

معرفة هل تناول المريض مضادات حيوية ام لا .

ملحق (2) حساسية البكتريا *S. pyogenes* للمضادات الحيوية

Amc.	Va.	Am.	CX	Cip.	C.	P.	GEN	TE	Cd.	TMP.	Ipm.	NV	AMK.	Ere.	ت
S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	1
S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	2
S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	3
S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	4
S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	5
S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	6
S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	7
S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	8
S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	9
S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	10
S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	11
S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	12
S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	13
S	S	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	14
R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	15

summary

Two hundred swabs obtained from patients infected with tonsillitis attended Muqdadia Hospital and others Healthy centres from the period 15/9/2012 to 15/1/2013 .All bacterial isolates were identified by biochemical , cultural and microbial characteristics and confirmed by Api-20 Strep system .Isolation rate of *S.pyogenes* are 33.3% .This rate of infection was recorded among 1-10 year age group . Males 45 were more infected than female 30.

Results of investigation of some virulence factors of *S.pyogenes* referred to that all isolates produce hemolysin enzyme with percentage 100% and that all isolates surrounded by capsule with percentage 100% and uncapable of producing bacteriocins ,while 14 isolates 93.3% Dnase producer , 13 isolates 86.6% were Biofilm producer , 11 isolates 73.3% had the ability to produce cysteine protease enzyme ,and 9 isolates 60% were able to streptokinase production .

Ten isolates 66.6% showed the ability to produce β-lactamase ,also have the ability to produce exetended spectrum β-lactamase enzyme by using Disc Approximation , Results of revealed that 8 isolates 53.3% of *S.pyogenes* were producer to these enzymes , by using the Imp-EDTA combination disc as managed 5 isolates 33.3% producing Metalloβ-Lactamase.

The results indicated that all the local isolates of *S.pyogenes* appeared multi-resistant. Multiple resistant pattern toward antibiotics divided into two groups , first group included 13 isolates which were resistant to 4-7 antibiotics , while second group included 2 isolates were resistant to 8-11 antibiotics .

The sensitivity of these isolates where tested against 15 antibiotics , all isolates showed resistance against amikacin , Ampicillin , trimethoprim with percentage 100%,and all isolates showed sensitivity to penicillin , imipenem , Chloramphenicol, vancomycin with percentage 100%. The plasmid content of the isolate number 15 was studied, and the results showed that the isolate contain single plasmid .

Curing was conducted by use of three materials included acrdine orange , ethidium bromide , sodium dodecyl sulfate , the acrdine orange showed strongest curing material and the plasmid was lost at concentration 256 µg/ml , the ethidium bromide come after acrdine orange and plasmid was lost at concentration 512 µg/ml, while sodium dodecyl sulfate was the weaker material and the plasmid was lost at concentration 2000 µg/ml.

The production of β-lactamase and the resistance toward the antibiotic that using in study. Results showed that the isolate was unable to produce β-lactamase enzyme and lose their ability to resist Ampicillin , tetracycline , , tri-methoprim, Erythromycin.

The results of antistreptolysin O titer test revealed that these antibodies elevated in all patients with tonsillitis who infected with *S.pyogenes* .

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education & Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Science
Department of Biology

Bacteriological and Genetic Study of *Streptococcus pyogenes isolated from patients infected with tonsillitis in Muqdadiya City*

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

Zainab Amer Hatem Altimimi
B.Sc.Biology

Supervised by

Dr.Abbas Aboud Farhan Al- Dolaymi — **Professor**

Dr. Hadi Rahman Rasheed Al- Taai — **Assistant Professor**

2013 **1434**

الفصل الأول

المقدمة

الفصل الثاني

استعراض المراجع

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

الاستنتاجات
والتوصيات

المصادر

الملاحق