ميساء صالح مهدي الشكري

****

دراسة بعض الجوانب البكتريولوجية والوراثيـة لعزلات من بكتيريا Acinetobacter معزولة من مرضى في مدينة الحلة"

****

ماجستير / 2003 /العلوم/علوم الحياة

قرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة أطلعنا على الرسالة الموسومة " دراسة بعض الجوانب البكتريولوجية والوراثية لعزلات من بكتيريا *Acinetobacter* معزولة من مرضى في مدينة الحلة" وقد ناقشنا الطالبة ميساء صالح مهدي الشكري في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ 2003/2/26 ووجدنا بأنها جديرة بالقبول وبتقدير(امتياز) لنيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة /أحياء مجهرية.

رئيس لجنة المناقشة
التوقيع:
الاسم: د.فاروق خالد حسن
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: الجامعة المستنصرية ـكلية الطب

عضو الجنة
التوقيع:
الاسم: د. سامرة يونس يوسف
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: جامعة بغداد ـ كلية التقنية الإحيائية

عضو الجنة
التوقيع:
الاسم: د.ابراهيم محمد سعيد شناوة
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: جامعة بابل ـكلية العلوم

عضو الجنة
التوقيع:
الاسم: محمد صبري عبد الرزاق
المرتبة العلمية:أستاذ مساعد
العنوان: جامعة بابل ـ كلية الطب

عضو الجنة
التوقيع:
الاسم: عبدالله كاظم هندي
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: جامعة بابلـكلية علوم البنات

مصادقةعمادة كلية العلوم

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع :
الاسم : عودة مزعل الزاملي
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
العنوان : جامعة بابل ـكلية العلوم

شكر وتقدير

يشرفني أن أتقدم بعظيم الشكر والامتنان الى استاذي المشرفين الدكتور محمد صبري عبد الرزاق والدكتور عبدالله كاظم هندي اللذين أقف لهما احتراما" وتقديرا" ماحييت ،وأنه لعرفان بالجميل يتطلبه الخلق العلمي القويم ان اخص الدكتور محمد صبري بتقدير عال لما قدمه من عون وصبر ومتابعة أرجو أن يمكنني الله(عز وجل)أن أكون على مستواها .كما أتقدم بالشكر أيضا"لعمادة كلية العلوم وعمادة كلية الطب ورئاسة جامعة بابل على أتاحة الفرصة ومنحي ألاجازة لاكمال دراستي.

وتتطلب ألامانة العلمية أن أسدي بالتقدير ألى رئاسة قسم علوم الحياة وأساتذتي ألافاضل فيه لما قدموه ويقدموه من عون ،كما أنه لزما"علي أن أذكر بالتقدير مساعدة زملائي طلبة الدراسات العليا.

أن الجهد ألمخلص للآنسة بسمة مهدي الحسيني في طباعة هذه ألرسالة لاتسعه كلمات شكر بسيطة.

ميساء

2003

المحتويات

ت	العنوان	رقم الصفحة
	الفصل الاول	
1-1	مقدمة عامة	1
2-1	الصفات العامة لجنس *Acinetobacter*	2
3-1	المقاومة للمضادات الحياتية	7
1-3-1	المقاومة لمضادات البيتا لاكتام	8
2-3-1	المقاومة لمضادات مجموعة الامينوكلايكوسايد	10
3-3-1	المقاومة لمضادات مجموعة الكونيلات	12
4-1	الوبائية والانتشار	14
5-1	الامراضية وعوامل الضراوة	16
1-5-1	المحفظة	19
2-5-1	عوامل الالتصاق او الاستيطان	22
3-5-1	الهيمولايسين البكتيري	24
4-5-1	انتاج السايدروفورات	26
6-1	انتاج البكتريوسين	29
7-1	المحتوى الوراثي	32
8-1	تحييد البلازميدات	38
	الفصل الثاني – المواد وطرق العمل	
1-2	المواد والاجهزة المختبرية	41
1-1-2	الاجهزة المختبرية	41
2-1-2	المواد الكيمياوية والبايولوجية	42
1-3-1-2	المحاليل والاوساط الزرعية	43
4-1-2	الكواشف	53
1-2-2	جمع العينات	54
2-2-2	التشخيص البكتريولوجي	56
3-2-2	التشخيص البايوكيمياوي للعزلات	56
4-2-2	اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحياتية بطريقة الاقراص	60
5-2-2	**اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية على الوسط الزرعي الصلب**	**60**
6-2-2	التحري عن انتاج البكتريوسين	61
7-2-2	التحري عن المحفظة البكتيرية	62
8-2-2	تعيين مستضدات عوامل الاستعمار او الاستيطان	62
9-2-2	التحري عن انتاج الهيمولايسين البكتيري	65
10-2-2	التحري عن انتاج السايدروفور	65
11-2-2	التحري عن انتاج الانزيمات الخارجية المحللة للبروتين	65
12-2-2	تأثير حامض السالسيلك على النمو البكتيري	66
13-2-2	عزل الدنا البلازميدي	67
14-2-2	الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي على هلام الاغاروز	68

ت	العنوان	رقم الصفحة
15-2-2	التحول الوراثي	69
16-2-2	الاقتران البكتيري	71
17-2-2	تحييد البلازميدات	72
	الفصل الثالث – النتائج والمناقشة	
1-3	العزل والتشخيص	75
2-3	تأثير بعض المضادات الحياتية على العزلات البكتيرية	79
3-3	الكشف عن انتاج البكتريوسين	85
4-3	التحري عن العوامل المرتبطة بضراوة بكتريا *Acinetobater*	88
1-4-3	المحفظة Capsule	89
1-1-4-3	تأثير حامض السالسيلك وEDTA على عزلات بكتريا *Acinetobacter*	90
2-4-3	تعيين مستضدات عوامل الاستعمار CFA	97
3-4-3	التحري عن انتاج الهيمولايسين وقابلية البكتريا في تخليق السايدروفورات	98
4-4-3	التحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيمات البروتيز الخارجي	102
5-3	التحري عن وجود الدنا البلازميدي	103
6-3	التحول البكتيري	107
7-3	الاقتران البكتيري	110
8-3	تحييد البلازميدات	115
	الاستنتاجات والتوصيات	121
	المصادر	122

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
شكل (1)	يوضح انتاج البتكريوسين بوساطة العزلة رقم (10) من عزلات بكتريا *Acinetobater* وتأثيره على عزلات *Acinetobater*	86
شكل (2)	يوضح انتاج البكتريوسين بوساطة العزلة رقم (10) من عزلات بكتريا *Acinetobater* وتأثيره على بكتريا *Pseudomonas* و *Serratia*	87
شكل (3)	تأثير حامض السالسيلك على حجم المحفظةالبكتيرية	93
شكل (4)	تأثير مادة EDTA على حجم المحفظة البكتيرية	94
شكل (5)	يبين الاختلاف في حجم المستعمرة البكتيرية بوجود وعدم وجود حامض السالسيلك	95
شكل (6)	يبين الاختلاف في حجم المستعمرة البكتيرية بوجود وعدم وجود مادة EDTA	95
شكل (7)	النسق البلازميدي لعزلات بكتريا *Acinetobater*	106
شكل (8)	عملية التحول للبلازميدات المعزولة من عزلات بكتريا عملية التحول للبلاوميدات في بكتريا *E.coli*	108
شكل (9)	عملية الاقتران البكتيري بين عزلات بكتريا عملية التحول *Acinetobater* وبكتريا *E.coli*	114
شكل (10)	تعيين المستعمرات بعد عملية تحييد البلازميدات بأستخدام طريقة pick & Pach	118
شكل (11)	يبين المحتوى البلازميدي لعزلات بكتريا *Acinetobater* المعاملة بمادة SDS	119
شكل (12)	يبين المحتوى البلازميدي لعزلات بكتريا *Acinetobater* المعاملة بحامض السالسيلك	119

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1	الاجهزة المختبرية المستخدمة	41

2	المواد الكيمياوية والبايولوجية المستخدمة	42
3	توزيع العزلات حسب نوع العينة والنسب المئوية لتواجد هذه العزلات	76
4	نتائج الاختبارات التشخيصية والبايوكيميائية لبكتريا *Acinetobater*	78
5	نمط مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية	84
6	قابلية البكتريا على انتاج البكتريوسين وبعض العزلات البكتيرية الاخرى المتحسسة له	88
7	التحري عن المحفظة في العزلات البكتيرية بطريقة التصبيغ السالب	90
8	نمط المقاومة للمضادات الحياتية لبكتريا *Acinetobater* المعاملة بحامض السالسيلك	96
9	قابلية العزلات البكتيرية على انتاج مستضدات عوامل الاستعمار	99
10	التحري عن قابلية *Acinetobater* في انتاج الهيمولايسين البكتيري والسايدروفورات وانزيمات البروتيز الخارجي	103
11	النسق البلازميدي وعدد الحزم البلازميدي في العزلات البكتيرية	105
12	نتائج التحول البكتيري والمؤشرات الوراثية المنقولة خلال العملية	110
13	نتائج الاقتران البكتيري والمؤشرات الوراثية المنقولة خلال العملية	113
14	تأثير حامض السالسيلك في تحييد البلازميدات لبكتريا *Acinetobater*	120
15	تأثير SDS في تحييد البلازميدات لبكتريا *Acinetobater*	120

Abstract

The work described in this thesis was undertaken at the University of Babylon between December 2001 and October 2002 under the supervision of Dr. Muhammad Sabri Abdul-Razzaq and Dr. Abdulla Kadhim Hindi. Except where indicated by reference, it is the original work of the author and has not been submitted for any other degree.

In this study eleven isolates of *Acinetobacter* were isolated and identified out of (175) clinical specimens taken from patients admitted to, and seen at, Hilla hospitals. All isolates underwent culture and bio- chemical tests to confirm diagnosis. It was found that the highest percentage of isolation was from urine and burn samples.

The effect of some antibiotics was investigated on all bacterial isolates, and the results showed that all isolates were entirely resistant to Carbencillin and Amakacin (100%), but lesser to Pipracillin, Streptomycin Gentamycin, and Chloromphenicol, (90.9%), and much lesser to Erthromycin, Trimethprim (72.7% each) and Ampicillin (63.8%). Most strains were sensitive to Ciproflaxcin and Naldixic acid (91% and 81.8% respectively), but less sensitive to Tetracyclin and Rifampicin (63.9% and 54.5% respectively).

Some virulence factors of bacteria were also studied, and the results showed that most bacterial strains were encoded by capsules

(81.8%) which are regarded as the most virulent factor of the bacteria.

The results also showed that most strains did not have the first and the second Colonization Factor Antigens (CFA/I and CFA/II) whereas all isolates contained CFA/III.

In respect of the ability of the isolates to produce Hemolysin, Siderophores and Extracellular Protease, the results of the work showed that all the isolates were not able to produce bacterial Hamolysin. Only two isolates were able to produce siderophores; and one isolate only was able to do extracellular protease.

The ability of the bacterial isolates to produce Bacteriocin was also studied and it was found that only one isolate had the ability to produce Bacteriocin that had its effect on some isolates of *Acinetobacter* as well as on other bacteria, Such as: *Serratia* and *Pseudomonas*.

The effect of some compounds, such as Salicylic Acid and EDTA on the bacterial capsule size was likewise studied. It was noticed that Salicylic Acid had a more remarkable effect on the capsule size as compared to that of EDTA; besides,a remarkable decrease in the capsule size was noticed under negative staining examination. A decrease in absorption of 600 nms was also found, but no remarkable effect was, however, seen on the uncapsulated isolates. on the capsule size as compared to that of EDTA; besides, no remarkable effect was, however, seen on the uncapsulated isolates.

Besides, it was found that EDTA had a lesser effect on the capsule size in comparison with the Salicylic Acid.

The results of the plasmid DNA isolation showed that most isolates contained at least one plasmid each. The results of bacterial conjugation showed the ability of at least one plasmid to transfer through conjugation: Other isolates also showed the existence of more than one plasmid after conjugation.

As for bacterial transformation, it was found that the transformed strains contained common plasmid yielding resistance properties to each of (Cb^+ and E^+).

The possibility of using some conpounds to Cure the plasmid content of the bacteria was studied too, and the results showed that Salicylic Acid had only a partial effect on the curring of the plasmid content, unlike Sodium Dodecyle Sulfate which had a complete effect on the plasmid content: All bacterial isolates entirely lost plasmid content.

الخلاصة

ان العمل المنجز في هذه الرسالة قد تم في جامعة بابل للفترة من كانون الاول 2001 الى تشرين الثاني 2002 وبأشراف الدكتور محمد صبري عبدالرزاق والدكتور عبدالله كاظم هندي وبأستثناء ما مشار اليه بمصدر معين فإن المعلومات الموجودة هي من نتاج الباحثة وانها لم تقدم لنيل درجة علمية اخرى سابقاً.

من مجموع 175 عينة مختلفة مأخوذة من المرضى الراقدين والمراجعين الى مستشفيات مدينة الحلة تم عزل و تشخيص (11)عزلة عائدة لبكتريا *Acinetobacter*، وقد خضعت العزلات جميعها الى الفحوص الزرعية والبايو كيميائية لغرض التأكد من تشخيصها، وكانت اعلى نسبة للعزل هي من عينات الادرار والحروق.

درس تأثير بعض المضادات الحياتية على جميع العزلات البكترية وقد اظهرت النتائج أن العزلات جميعها كانت مقاومة الى الكاربنسلين والاميكاسين بنسبة (100%) وبدرجة اقل لكل من الببراسلين 90.9%، الستربتوماسين 90.9% والكلورومفينكول 90.9% والارثروماسين 72.7% والتراي مثبرم 72.7 والامبسلين 63.8%بينما كانت معظم السلالات حساسة لكل من السبروفلاكسين وحامض النالديكسك بنسبة 91% و81.8 (على التوالي) وحساسة بدرجة اقل لكل من التتراسيكلين (63.6%) والريفامسبين (54,5%).

تمت دراسة بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا وقد اظهرت النتائج أن معظم السلالات البكتيرية (81.8%) تمتلك المحفظة التي تعد أحد اهم عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا، واظهرت النتائج أن معظم السلالات البكترية لا تمتلك عامل الاستعمار الاول Colonization Factor Antigen (CFA/I) والثاني (CFA/II) على حين كانت العزلات البكتيرية جميعها حاوية على عامل الاستعمار الثالث (CFA/III). وكذلك اظهرت نتائج الدراسة الخاصة بقابلية العزلات على انتاج الهيمولاسين والسايدروفورات وانزيمات البروتيز الخارجية أن العزلات غير قادرة على انتاج الهيمولاسين البكتيري وكانت عزلتان فقط قادرتين على انتاج السايدروفورات وعزلة واحدة فقط لها القابلية على انتاج انزيمات البروتيز الخارجية.

اختبرت قابلية العزلات البكتيرية على انتاج البيكتريوسين (Bacteriocin) وقد اظهرت النتائج أن عزلة واحدة فقط لها القابلية على انتاج البيكتريوسين الذي يؤثر على بعض العزلات التي تعود الى بكتريا *Acinetobacter* وبعض الانواع البكترية الاخرى مثل *Pseudomonas* و *Serratia*.

وتمت دراسة تأثير بعض المركبات مثل (حامض السالسيلك، EDTA) على حجم المحفظة البكتيريةحيث لوحظ ان لحامض السالسيليك تاثيراً واضحاً على حجم المحفظة اذا ما قيس بتأثير مادة الـ EDTA اذا أظهرت النتائج أختزال واضح في حجم المحفظة عند فحصها بطريقة التصبيغ السالب كما لوحظ نقصان في معدل الامتصاص الضوئي عند استخدام الطرق اللونية وبطول موجي (600) نانوميتر في حين لم يكن هناك تأثير واضح على البكتريا التي لاتحتوي على محفظة.

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام ألاغاروز احتواء معظم العزلات البكتيرية على حزمة بلازميدية واحدة على الاقل في كل عزلة.

واظهرت نتائج الاقتران البكتيري (Bacterial conjugation) على امكانية انتقال البلازميدات بين عزلات *Acinetobacter* الواهبة وسلالة *E. coli HB101* المستلمة بشكل جزئي او كلي حيث لوحظ بان السلالة المستلمة أصبحت مقاومة لكل المضاد الحياتي (Gn, Cb, E Na)

اما نتائج التحول البكتيري (Bacterial transformation) فقد وجد أن السلالات المتحولة تحتوي على بلازميد مشترك يمنح صفة المقاومة لكل من المضاد الحياتي (E^+ وCb^+) في حين أظهرت نتائج التحييد بأن حامض السالسيلك له تأثير جزئي في تحييد المحتوى البلازميدي على العكس من ذلك اظهر مركب SDS (Sodium Dodicyle Sulfate) تأثيراً كلياً على المحتوى البلازميدي اذ فقدت العزلات البكترية البلازميدات جميعها.

الفصل الاول

1–1 مقدمة عامة

تعد *Acinetobacter* من البكتريا السالبة لصبغة كرام وغالباً ما تكون كروية مزدوجة او عصوية وكانت تعرف بأسم Mima او Herallae وصنفت ضمن مجموعة *Neisseria* الا ان التصنيف الحديث قد وضعها ضمن مجموعة *Pseudomonas* لاشتراكها في بعض الصفات البايوكيميائية (Holt *et. Al.*, 1994).

لم تكن هذه البكتريا معروفة لدى الكثير من المهتمين بالاحياء المجهرية لانها تعد من البكتريا التي تتواجد طبيعياً على جلد الانسان وفي القناة المعوية وكذلك في مهبل النساء، الا ان اهميتها ازدادت في الاونة الاخيرة بعد ان ثبت دورها المرضي في العديد من الحالات المرضية لاسيما بين المرضى الراقدين في ردهات المستشفيات وعند المرضى الذين يعانون من حالات الضعف المناعي Immunocompromised Patients (Koekman *et. al.*, 1997).

ما يؤهل هذه البكتريا على احداث الاصابات في جسم الانسان هو امتلاكها لبعض عوامل الضراوة واهمها امتلاكها للمحفظة- وكذلك على عوامل الاستيطان المختلفة التي تساعدها في الالتصاق بأنسجة المضيف زيادة على قدرتها على انتاج انواع البيكتريويسنات التي تعد احد اهم عوامل الانتشار في منطقة الاصابة (Garcia *et. al.*, 2000; Fleisher *et. al.*, 1999; Bergogn& Joly, 1991).

كما اظهرت الدراسات ان لهذه البكتريا قدرة كبيرة في مقاومة العديد من المضادات الحياتية الشائعة الاستعمال مما يزيد من خطورتها وصعوبة السيطرة عليها (Echeverria *et. al.*, 1997; Liu *et. al.*, 1997).

ان الدراسات التي اجريت حول هذه البكتريا تكاد تكون قليلة لاسيما في العراق وان الاهتمام بدورها المرضي قليل ايضاً، اما الدراسات على المستوى الجزيئي فهي قليلة جداً مما يتطلب اجراء دراسات متواصلة ومستمرة للتحري عن العناصر الوراثية ذات العلاقة بالامراضية وكذلك صفة المقاومة للمضادات الحياتية.

2–1 الصفات العامة لجنس *Acinetobacter*

تعد بكتريا *Acinetobacter* من البكتيريا السالبة لملون غرام، هوائية المعيشة اجباراً، غير مكونة للابواغ (Husni, 1999) تتمتع بنوع من الحركة الارتعاشية (Twitching motility) نتيجة لوجود خملات قطبية Polar Fimbriae (Holt *et. al.*, 1994)، سالبة لانزيم الاوكسيدز، وايجابية لانزيم الكاتاليز، تنمو على اوساط زرعية بسيطة، غالباً ما تحتوي على محفظة تحيط بها، ويعد سكر الكلوكوز هو السكر الوحيد الذي تستهلكه بعض السلالات كمصدر للكاربون والطاقة وتستطيع سلالات عديدة من هذه البكتريا استهلاك بعض السكريات الخماسية مثل ribose وarabinose (Guardabassi *et. al.*, 1999).

تظهر بكتريا *Acinetobacter* بشكل مكورات ثنائية او بشكل عصوي وهي تشبه بذلك جنس *Neisseria* في المسحات المصبوغة بملون غرام، للتمييز بين هذين النوعين نجد ان جنس *Neisseria* منتجة لانزيم الاوكسيدز اما جنس *Acinetobacter* فهو غير منتج له.

تمتاز مستعمرات بكتريا *Acinetobacter* النامية على وسط اغار ماكونكي بكونها مرتفعة، ملساء، صغيرة وشاحبة بسبب عدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز الموجود ضمن مكونات الوسط وهي بذلك تشبه افراد العائلة المعوية Enterobacteriacrae غير المخمرة لسكر اللاكتوز وللتفريق بين المجموعتين تنمى كلاً منهما على وسط Kligler Iron Agar حيث ان *Acinetobacter* لاتستطيع النمو في قعر الوسط وهذا ما تتمكن منه البكتيريا المعوية، اما تمييزها عن الجنس *Pseudomonas* فيتم بالاعتماد على تفاعل نزع مجموعة الكاربوكسيل من الحامض الاميني اللايسين، اذ لايتمكن جنس *Acinetobacter* من استهلاك اللايسين، على حين يتمكن الجنس *Pseudomonas* من فعل ذلك (Sewell, 1992).

اما مستعمرات *Acinetobacter* النامية في وسط اغار الدم، فتكون محدبة، ورصاصية الى بيضاء اللون، يتراوح قطرها ما بين 2-3 ملم. ويمتاز النوع *A.heamolyticus* فقط بفعالية حالة للدم. اما بقية الاجناس فلا تمتلك هذه الفعالية (Baron *et. al.*, 1994).

كما تمتاز بكتريا *Acinetobacter* بكونها سالبة لفحص الاندول والاحمر مثيل واختبار الفوكاس بروسكاور Voges Proskauer، لكنها موجبة لفحص استهلاك السترات

اذ تتمكن من استهلاك مادة ستـرات الصوديـوم الموجـودة فـي مكونـات وسـط سـايمون Simmons Citrate بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة (Macfadden, 2000).

وتستطيع بعض سلالات *Acinetobacter* من أماعة الجلاتين ببطء، وافراز انزيمات المحللة للدهون الخارج خلوية، كما ان الغالبية العظمى من سلالات هذا الجنس لاتختزل النترات الى نتريت (Barbaro *et. al.*,1999).

تمتاز بكتريا *Acinetobacter* بصفة فريدة هي قدرتها على النمو في أي وسط زرعي مهما كان بسيطاً عند احتوائه على أي مصدر لاعضوي للنتروجين وكذلك على أي مركب كاربوني كمصدر للكاربون والطاقة، وقد اكد Obana (1986) ان هذه البكتريا تنمو على جميع الاوساط الزرعية المختبرية مع ظهور افضل نمو لها على وسط Brain Heart Infusion Agar (BHIA) وتستطيع هذه البكتريا بشكل عام النمو ضمن مدى حراري يتراوح بين (15-44)مْ وبدرجة حرارة نمو مثلى تبلغ 33-35مْ (Bouvet & Griment, 1986)، وقد اكد Mores (1991) ان نمو هذه البكتريا عند درجة حرارة 40مْ مشابهةٌ لنموها عند درجة حرارة (30)مْ وهذا يفسر القدرة على عزل هذه البكتريا خلال فصل الصيف، و تستخدم قابلية هذه البكتريا على النمو بدرجة حرارة (44)مْ كصفة تصنيفية تميزها عن الانواع البكتيرية الاخرى السالبة لملون غرام العصوية (Quentein *et. al.*, 1997).

وتتصف هذه البكتريا بكونها منتشرة بصورة واسعة في الطبيعة وفي بيئة المستشفيات وبالامكان عزلها بسهولة من التربة والمياه وفضلات المجاري، وتعد هذه البكتريا جزءاً من النبيت الطبيعي (Normal flora) في جسم الانسان اذ تتواجد على الجلد ومهبل النساء وعلى الاغشية المخاطية (Towner, 1996).

ان لعملية تصنيف بكتريا (*Acinetobacter*) تأريخاً طويلاً اذ ادرجت هذه البكتريا عند صدور طبعة بيركي التشخيصية لعام (1984) ضمن عائلة Neisseriaceae جنباً الى جنب مع اجناس *Neisseria* و*Moraxella* تحت اسم *Acinetobacter* (June, 1984) وبسبب انتشارها في الطبيعة فقد عزل عدد من الباحثين هذه البكتيريا ولكون صفاتها الشكلية مشابهه لتلك العائدة الى اجناس بكترية اخرى وعدم حاجتها الى عوامل نمو محددة ادى الى ارباك في تصنيفها وقد اطلقت عليها اسماء كثيرة منها *Mima* من قبل De. Bord عام (1939) و*Herellae* من قبل Debort عام (1949)، وبعد ذلك لابد من اعادة تصنيف هذا الجنس اعتماداً على الاختلاف في الصفات الفسلجية والشكلية والاختبارات الكيماحيوية

فضلاً عن التباين في الصفات المحمولة على الجينات من اجل الوصول الى تصنيف علمي مقبول للجنس يضم الأنواع التابعة له.

وحالياً وحسب الطبعة الاخيرة لبيركي التشخيصية لعام (1994) ينتمي جنس *Acinetobacter* الى المجموعة الرابعة التي تضم: المكورات والعصيات الهوائية او اليفة الهواء القليل السالبة لملون غرام.

اذ قام Bovuet & Griment (1986) وبالاعتماد على تقنية تهجين الدنا DNA-hybridization في تصنيف هذا الجنس اذ تم تقسيم انواعه الى (21) نمط وراثي (Nemec *et. al.*, 1999) ومن بين أهم هذه الانواع هي:

1- *A. Calcoaceticus*

يصنف ضمن النمط الوراثي الاول (Nemec *et. al.*, 1999) ويعد النوع النموذجي لجنس *Acinetobacter* الذي وصفه اول مرة الباحثان Brisou & prevot والذي يعزل عادة من التربة (June, 1984).

2- *A. baumannii*

يصنف ضمن النمط الوراثي الثاني، وقد عزله اول مرة عام 1968 العالم Baumann ونسبةً اليه سميت بهذا الاسم (Quelle *et. al.*, 1999) اذ عزل من عينات مختلفة ومن التربة ومن حالات مرضية في الانسان وبيئة المستشفيات.

3- *A.haemolyticus*

يصنف ضمن النمط الوراثي الرابع، ويعزل من عينات مرضية واخرى بيئية (Bode *et. al.*,1996) ويعد النوع الوحيد الذي له القدرة على تحلل الدم.

4- *A.Junnii*

يصنف ضمن النمط الوراثي الخامس، سمي بهذا الاسم نسبة لمكتشفها (Juni) وقد عزل هذا النوع من عينات مرضية.

5- *A. Johnsonii*

ينتمي هذا النوع الى النمط الوراثي الخامس، وقد سمي بهذا الاسم نسبة للعالم Johnson ويعد هذا النوع من الممرضات التي تسبب الاصابات المكتسبة من المستشفيات.

6- *A. Lwoffii*

ينتمي الى النمط الوراثي الثامن، وصفه اول مرة العالم Auduream ولم تعرف لحد الان البيئة الطبيعية التي يتواجد فيها هذا النوع (Gerner - Smidt, 1994).

***A. radioresistans* -7**

وصف اول مرة عام 1988 (Nishimura, 1988) وينتمي الى ألنمط الوراثي رقم (12) ويمتاز هدا النمط بمقاومته اشعة كاما وقد عزل من التربة ومن هنا جاءت تسميتة.

1-3 المقاومة للمضادات الحياتية Antibiotics Resistance

باتت اهمية المضادات الحياتية واضحة في علاج مختلف الاصابات البكتيرية ابتداءً من الالتهابات البسيطة وصولاً الى علاج حالات انتان الدم. وقد رافق الاستخدام المتزايد الخاطئ لاغلب المضادات ظهور سلالات امتازت بمقاومتها العالية التي امتدت لتشمل مجموعة كبيرة من المضادات.

ومن المعروف ان بكتريا *Acinetobacter* من الانواع البكترية المقاومة للمضادات الحياتية اذ لوحظ ان هذا الجنس امتلك خلال وقت قصير اليات دفاعية ضد العديد من المضادات الحياتية المستخدمة مما ادى الى زيادة عزله من بيئات المستشفيات وزيادة انتشاره في تلك البيئات مما يجعل عملية القضاء عليه عملية صعبة للغاية ومن هنا اكتسب اهميته كعامل ممرض للانسان (Seifert *et. al.*, 1997).

1-3-1 المقاومة لمضادات مجموعة البيتا لاكتام β-lactam

تعد مجموعة البيتا لاكتام من المضادات الحياتية الاكثر اهمية من بين المجاميع الدوائية المضادة للبكتريا واكثرها استعمالاً. تكمن فعالية هذه المجموعة من المضادات الحياتية من خلال منع تصنيع جدار الخلية و التي بدورها تؤثر على نمو البكتريا (Katzung, 1989).

اظهرت الدراسات السابقة ان العديد من سلالات بكتريا *Acinetobacter* حساسة للامبسلين والجيل الاول من السيفالورسبورينات، ولكن بمرور الوقت اصبحت اكثر من 20% من هذه السلالات مقاومة للمضادات الحياتية المذكورة انفاً. وفي بداية الثمانينيات وعندما استخدمت مضادات الجيل الثاني من السيفالوسبورينات للحد من انتشار الاخماج المكتسبة من المستشفيات لوحظ ظهور سلالات *Acinetobacter* مقاومة لهذه المجموعة

من المضادات، اما عندما بدأ استخدام الجيل الثالث من السيفالوسبورنيات في نهاية الثمانينيات لوحظ ايضاً ان بكتريا *Acinetobacter* طورت مقاومتها لهذه المضادات بسرعة اذهلت الكثير من المهتمين في هذا المجال (Amyes, 1997).

كما تمتاز هذه البكتريا بمقاومتها للمضادات الحياتية من مجموعة البيتا لاكتام مثل Tobramycin, Pipracillin, Carbencillin بنسبة عالية جداً (Echeverria *et. al.*, 1997).

ان مقاومة بكتيريا *Acinetobacter* الى مجموعة مضادات البيتا لاكتام تكون من خلال عدد من الاليات اهمها:

أ- انتاج انزيمات بيتالاكتميز β- lactamase (Shah *et. al.*, 2001)

ب- التغير في مواقع البروتينات الموجودة على الغشاء الخلوي للبكتيريا التي ترتبط مع البنسلينات والسيفالوسبورينات.

جـ- قطع عبور المضاد من خلال ثقوب الغشاء الخارجي (Liebowiz, *et. al.*, 1990).

ويعد انتاج انزيمات البيتالاكتميز من اكثر انواع ألمقاومة شيوعاً.

وفي السنوات الاخيرة استخدمت مركبات اضيفت الى مضادات البيتا لاكتام تدعى بمثبطات انزيمات البيتالاكتميز (β- lactamase inhibition) التي تتحد مع البروتينات المسؤولة عن الارتباط بمضادات بيتا لاكتام فاسحة المجال امام المضاد الحياتي لكي يقضي على البكتيريا (Chang *et. al.*, 1995) مثل استخدام مركبات Sulbactum وClavulanate.

وقد اثبتت هذه المركبات تأثيراتها المثبطة على نمو بكتريا *Acinetobacter* (Marques *et. al*,. 1997).

واشار Wolff وجماعته (1999) الى دور هذه المركبات في تثبيط نمو بكتيريا *A. baumannii* المحقونة في الفئران اذ تم احداث خمجاً تجريبياً لهذه البكتيريا في الفئران، ثم تم حقن الفئران المصابة بالمركبات العلاجية السابقة فلوحظ شفاء 75% منها خلال خمسة ايام.

على العكس، تشير معظم الدراسات الحديثة الى استخدام المضاد الحياتي Imipenem في علاج هذه البكتريا الذي يعد من افضل المضادات الحياتية

المستخدمة في علاج الاصابات ببكتريا *Acinetobacter* (Waichu *et. al.*, 2001, Sader *et. al* 1999).

ويصنف المضاد الحياتي Imipenem ضمن مجموعة Carbepenems التي تمتاز بقدرتها على القضاء على بعض السلالات البكتيرية، في حين اظهرت بعض سلالات بكتريا *Acinetobacter* مقاومة تجاه هذه المجموعة من خلال انتاج انزيمات البيتالاكتميز (Perilli *et. al.*, 2002) وقد اشارت بعض الدراسات الى ان بكتريا *Acinetobacter* قادرة على انتاج ثلاثة انواع مختلفة من هذه الانزيمات وهي انزيمات OXA- type β- lactamase الذي يوجد في بكتريا *A. baunannii* وانزيمات Metallo- β- lactamase وهي انزيمات تحتاج الى وجود الخارصين كعامل مساعد لاداء وظيفتها، وانزيمات Imp- type β lactamase التي تمنح بكتريا *Acinetobacter* المقاومة ضمن مجموعة Carbapenem التي تضم المضاد الحياتي Imipenem الذي تم ذكره سابقاً (Waichu *et. al.*,2000).

2-3-1 المقاومة لمضادات مجموعة (Aminoglycoside)

تكمن فعالية المضادات الحيوية من مجموعة الكلايكوسيدات الامينية الى ايقاف تكوين البروتين و ايقاف تضاعف الخلية البكتيرية، ان هذه المضادات تستخدم بشكل واسع في علاج البكتريا السالبة لملون غرام.

تمتاز بكتريا *Acinetobacter* بقدرتها على مقاومة المضادات الحياتية من مجموعة الامينو كلايكوسيدات وذلك بأنتاجها انزيمات محورة للمضاد الحياتي، وقد لوحظ أن هناك جينات عديدة مسؤولة عن اظهار صفة المقاومة لهذه المضادات التي قد تكون محمولة على البلازميدات او الجينات القافزة (Devaud *et. al.*, 1982).

ان المقاومة التي تبديها بكتريا *Acinetobacter* لهذا النوع من المضادات الحياتية يكون من خلال عدة اليات هي:

1. تغير موقع الهدف الريبوسومي Alternation of the ribosomal target site.
2. اختزال في معدل امتصاص (Uptake) المضاد الحياتي للبكتيريا الى اقل نسبة ممكنة.
3. انتاج انزيم يقوم بتحوير المضاد Aminoglycoside – modifying enzyme.

اذ لوحظ احتواء *Acinetobacter* على ثلاثة انواع من الانزيمات المحورة للكلايكوسيدات الامينية وهي: Aminoglycoside O- nucleotidyl transferases (ANT)

وAminoglycoside - O-phospho transferases (APH)اللذان يحفزان تحوير مجموعة الهيدروكسيل الموجودة ضمن تركيب جزيئة الكلايكوسيدات الامينية، اما النوع الثالث Aminoglycoside- N-acetyl transferase (AAC)الذي يحور مجموعة الامين الموجودة ضمن تركيب المضاد الحياتي مما يوقف مفعوله القاتل للبكتيريا (Seward *et. al.*, 1997).

وقد اظهرت الدراسات ان نسبة مقاومة بكتريا *Acinetobacter* الى المضادات الحياتية من مجموعة الكلايكوسيدات الامينية تتراوح ما بين 69-85% (Liu *et. al.*, 1997). وقد تستخدم هذه المضادات لوحدها علاجياً او توصف سوية مع مضادات البيتا لاكتام.

3-3-1 المقاومة لمضادات مجموعة Quinolones

تعد الكونيلات مواد كيميائية استخلصت اول مرة من الاشجار اذ وجد ان لها مفعولاً قاتلاً للبكتيريا (Bactericidal) عند استخدامها بتراكيز معينة، واول مركب اكتشف من هذه المجموعة هو حامض النالديكسيك Nalidixic acid، وكذلك لوحظ انه عند اضافة ذرة فلور لهذه المضادات ستكون الكونيلات المتفلورة Fluorinated quinolones التي تكون فعاليتها اكثر من فعالية الكونيلات (Katzung, 1989).

تعمل هذه المجموعة على تثبيط تخليق الحامض النووي الرايبي منقوص الاوكسجين DNA، وتمتاز هذه المجموعة بفعاليتها ضد العديد من البكتريا السالبة لملون غرام مثل *Moraxella* و*Neisseria* و*E.coli*، اذ اشار Smith (1984)، ان حامض النالديكسك من النادر استخدامه في معالجة الاصابات التي تسببها البكتريا الموجبة لملون غرام، لذا اقتصر استخدام حامض النالديكسك في معالجة الاصابات التي تسببها البكتريا السالبة لملون غرام وبخاصة تلك التي تشترك في الاصابات البولية.

وقد اظهرت هذه المضادات ومنها المضاد حامض النالديكسك والسبروفلوكساسين Ciprofloxacin تأثيراً كبيراً على بكتريا *Acinetobacter* (Seifert *et. al.*, 1993 ; Koljalg *et. al.*,1999) اذ لوحظ ان البكتريا تظهر حساسية عالية لهذا النوع من المضادات، مع ذلك فقد سجلت حالات تكون فيها البكتريا مقاومة لهذا النوع من المضادات الحياتية مما دعا الباحثين الى اجراء دراسات لفهم آلية مقاومة جنس *Acinetobacter* لهذه المضادات، اذ تتجلى هذه المقاومة من خلال آليتين:

1- آلية وراثية Genetic Mechanism:

تحدث طفرة في الجينات الكروموسومية المسؤولة عن اظهار صفة الحساسية لهذا المضاد فتصبح البكتريا مقاومة للمضاد بعد ان كانت حساسة له (Vila, 1997).

2- آلية فسلجية Physiological Mechanism:

وذلك من خلال تغيير نفاذية الغشاء الخارجي (Outer Membrance) للبكتيريا تجاه هذه المضادات، وذلك اما بتقليل اقطار ثقوب الغشاء الى اقل قطر ممكن فتتقلص الكمية الداخلة من المضاد الى البكتيريا او قد يتم ابدال البروتينات الموجودة في الغشاء الخارجي والحاوية على مستلمات للمضاد ببروتينات اخرى لاتوجد فيها هذه المستلمات فتقل الكمية الواصلة من المضاد الى البكتريا (Milne & Gould, 1997).

واشار Grandsen وجماعته (1997) الى ان بكتريا *A. baumannii* المعزولة من عينات الدم تكون اكثر حساسة للمضاد الحياتي سبروفلوكساسين من تلك المعزولة من مواقع اخرى مثل الادرار والجروح، لذا يجب ان يراعى عند استخدام الكونيولات في علاج *Acinetobacter* المصدر الذي عزلت منه البكتريا واشار Lynch وجماعته (1993) الى ان استخدام المضادات الحياتية من نوع البيتا لاكتام وFluoroquinolone لوحدها في علاج اصابات عدوى المستشفيات الناتجة عن بكتريا *Acinetobacter* غير مجدي، اما في حالة استخدام النوعين معاً فإنه يسهل من عملية التخلص من هذه البكتريا.

استخدمت كذلك مجموعة من المضادات الحياتية الاخرى مثل Tetracyclin الذي يمتاز بقدرته على تثبيط البكتريا من خلال تثبيط تكوين البروتين على المستوى الرايبوسومي (Katzung, 1989)، يعد التتراسيكلين من المضادات الشائعة الاستخدام بالنسبة للبكتريا السالبة لملون غرام ونتيجة لهذا الاستخدام الواسع ظهرت انواع بكتيرية تمتاز بمقاومتها لهذا المضاد من خلال تغير نفاذية الغلاف الخلوي للبكتريا.

تمتاز بكتريا *Acinetobacter* بمقاومتها الى المضاد الحياتي التتراسيكلين اذ يعد هذا المضاد غير ملائم لعلاج هذه البكتريا (Ayats *et. al.*, 1997).

واشار Robert (1996) الى ان الجينات المسؤولة عن مقاومة بكتريا *Acinetobacter* للمضاد الحياتي التتراسيكلين تكون محمولة على البلازميد او على الترانسبوزونات وتمتاز هذه البكتريا بقدرتها على نقل صفة المقاومة لهذا المضاد الى الانواع البكتيرية الاخرى مثل بكتريا *E.coli* (Guardabassi *et. al.*, 2000).

واتجه في السنوات الاخيرة الى استخدام المضاد الحياتي Polymyxin B في معالجة الاصابات الناتجة عن البكتريا المتعددة المقاومة للمضادات الحياتية مثل *Acinetobacter* ، (Urabon *et. al.,* 2001) اذ وجد ان هذه البكتريا تكون حساسة للمضاد Polymyxin B بنسبة عالية (Go *et. al.,* 1994) وبين Ang (1992) وجود حالات تكون فيها هذه البكتريا مقاومة الى Polymyxin B على الرغم من انه اثبت عام (1990) ان هذه البكتريا تكون حساسة وبشكل عالٍ لهذا المضاد.

1–4 الوبائية والانتشار Epidemiology

تعد بكتريا *Acinetobacter* من البكتريا الانتهازية التي تنتقل بين ردهات المستشفيات، ولاسيما في وحدات العناية المركزة ووحدات الحروق وكذلك في ردهات الجراحة البولية، ويعتقد ان هذا ناتج عن الزيادة الحاصلة في معدل الحالات الوبائية التي تظهر في المستشفيات نتيجة الاصابة بهذه البكتريا (Bergone & Jolly, 1985) وكذلك اشتراكها في حالات مختلفة من الاصابات الانتهازية. ان العدوى المكتسبة من المرضى الراقدين قي المستشفيات تعتمد بدرجة كبيرة على مدة بقاء المريض في المستشفى وكذلك طبيعة المرض الذي يعاني منه المريض، وقد اشارت بعض الدراسات الى ان المرضى الذين يعانون من حالات الضعف المناعي وكذلك الذين يعانون من بعض الامراض المزمنة هم اكثر تعرضاً للاصابة بهذه البكتريا (Ling *et. al.,* 1997).

ولغرض السيطرة على انتشار هذه البكتريا بين ردهات المستشفيات فأنه من الضروري الكشف عن مصدر العدوى (Source of infection) وذلك عن طريق استخدام الطرق التقليدية المتوفرة كالتنميط بالعاثي (Phagetyping) او التنميط المصلي (Serotyping) والتنميط الحياتي (Biotyping). وبما ان الطرق التقليدية تعد غير كافية في تحديد مصدر العدوى لانها لاتستطيع تنميط جميع السلالات المعزولة بشكل واضح لذا تم التحري عن مصدر العدوى باستخدام تقنيات جديدة (Seifert *et. al.,* 1994) ومن اهم تلك التقنيات هي تقنية النسق البلازميدي Plasmid Profile وبصمة الكروموسومات Chromosomal fingerprinting والتنميط بأستخدام الرنا الرايبوسومي rRAN (Dijkshoorn *et. al.,* 1993). وبالامكان استخدام تقنيات اكثر تطوراً كاستخدام تقنيات التهجين المختلفة وكذلك طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) في تحديد مصدر العزلات (Marcos, *et. al.,* 1994).

اشار Shakibaie وجماعته (1998) الى ان التحريات الوبائية عن مصدر العدوى هي ليست الوسيلة الوحيدة للحد من انتشار الاصابات المختلفة لا سيما ان هناك سلالات عائدة لهذا النوع قد اظهرت مقاومة لاكثر من نوع واحد من المضادات الحياتية من خلال توفير اجيال جديدة من المضادات الحياتية تظهر لها البكتريا حساسية عالية. وان وجود البلازميدات في بعض سلالات هذه البكتريا يعد احد الوسائل المهمة في انتقال صفة المقاومة للمضادات الحياتية من سلالة لاخرى او من نوع لاخر كأن يكون عن طريق الاقتران او التحول البكتيري، لذا لابد من استخدام تقنيات التحييد في التخلص من هذه البلازميدات لغرض التعرف على دورها في الأمراضية (Seifert, *et. al.*, 1993).

1-5 الامراضية وعوامل الضراوة

خلال العقود الثلاثة الاخيرة برزت بكتريا *Acinetobacter* كممرضات انتهازية مهمة Opportunistic pathogens تتمكن من احداث اصابات عديدة وبوجود عوامل تساعد على انتشار هذه البكتيريا كأنخفاض المناعة لدى الذين يتعاطون الكحول والادوية الستيرويدية ومرضى الاورام الخبيثة والمكوث الطويل في المستشفى ووجود الاجسام الغريبة مثل القسطرة البلاستيكية مما يزيد من شدة المرض والاستخدام المفرط والخاطئ للمضادات الحياتية (Fraise, 1997) والاختلاف في الطرق المستخدمة في تشخيص هذه البكتيريا كلها عوامل تزيد من امراضية هذا الجنس.

ان جنس *Acinetobacter* من البكتيريا ذات الامراضية الاقل نسبياً بالقياس الى البكتيريا الاخرى السالبة لملون غرام مثل *E.coli* و *Pseudomonas aeruginosa* (Burwen *et. al.*, 1997).

الا انه ثبت دورها في تسببها في العديد من الاصابات والاخماج منها اخماج الجهاز التنفسي لاسيما الجزء الاسفل منه المتمثل بالرئتين(Vila *et.al.*,1989) واخماج الجهاز البولي (Urinary tract infection) (Gunha *et. al.*, 1980) واخماج الجروح والحروق (Sherertz & Sullivan, 1985) واخماج الجهاز العصبي المركزي Central Nerve System (CNS) وانتان الدم Septicaemia (Allen *et.* Tankovic *et. al.*, 1994 ; *al.*,1987) كما انها تسبب خراجات قرنية العين عند الاشخاص الذين يستخدمون عدسات العين (Hertst, 1972) وتسبب خراجات المخ Brain abscess والتهاب العظم وخراجات البشرة والتهاب القصبات وخراجات داخل الحوض

وخراجات الكلية والحالب (Glew *et. al.*, 1977) زيادة على اصابتها للمرضى الراقدين في المستشفيات مسببة لهم اخماجاً ثانوية عديدة (Koeleman *et. Al.*, 1997 ; Humpheys *et. Al.*,1997).

لم يعرف عن امراضية هذه البكتريا سوى القليل من المعلومات اذ في عام 1986 قام الباحث Obana بمحاولة لتحديد الجرعة المهلكة لـ 50% من الفئران المختبرية عند حقنها بعالق بكتيري حاوٍ على بكتيريا *A.boumannii* ووجد ان (10^{7}-10^{8}) خلية حية/ فأر تمثل الجرعة التي تسبب هلاك نصف عد الفئران المختبرية LD_{50} وهذا الرقم يدل على ان هذه البكتيريا ذات امراضية اقل من امراضية *P. aeruginosa* التي استخدمها الباحث في الدراسة نفسها لغرض المقارنة اذ وجد ان (2×10^{6}) خلية بكتيرية حية/ فأر تمثل الجرعة المهلكة من *P. aeruginosa* لنصف عدد الفئران المستخدمة في التجربة.

وتمتاز هذه البكتريا بقدرتها على الانتقال بسهولة من مريض لاخر وعلى البقاء مدة طويلة في بيئة المستشفيات مما يزيد من قدرتها على اصابة المرضى الراقدين في المستشفيات زيادة على ان لهذه البكتريا القابلية على البقاء فترة طويلة على السطوح الجافة (Wendt *et. al.*, 1997).

من ناحية اخرى فأن هذه البكتريا واسعة الانتشار في الطبيعة وقد عزلت من بيئة الاصحاء والمعدات الطبية والمواد الجافة اذ عزلت من ايدي وكفوف وثياب الاطباء والممرضين والعاملين في المستشفيات، ويعد جسم الانسان البيئة الطبيعية لنمو وتكاثر هذا النوع من البكتريا (klojalg *et. al.*, 1999).

ومما يزيد خطورة امراضية هذه البكتريا هو عدم امتلاكها لصفة فسلجية او كيموحيوية تميزها عن غيرها من الاجناس القريبة منها، الامر الذي جعل عملية تشخيصها صعبة ومن ثم فشل الطبيب في اعطاء العلاج الملائم للمريض اذ وجد ان ما يقارب 36% من حالات الوفاة التي تسببها بكتريا *A.baumannii* يعود الى الخطأ في التشخيص (Glew *et. al.*, 1977).

ووجد ان هذه البكتريا تساهم بشكل كبير في زيادة امراضية البكتيريا السالبة لملون غرام وذلك في حالة كون الاصابة ناتجة عن اكثر من جنس بكتيري، اذ اجرى Obana (1986) تجربة للتعرف على دور *Acinetobacter* في احداث الاصابة في حالة اشتراكها مع نوع بكتيري اخر، اذ قام بحقن عدد من الفئران المختبرية بعالق بكتيري من بكتيريا *A.baumannii* مع عالق بكتيري من *E.coli* ولوحظ زيادة مضاعفة في امراضية

الاخيـرة، وعنـد اعـادة التجربـة ولكـن بأسـتخدام عـالق مـن بكتريـا *Pseudomonas aeruginosa* لوحظت ايضاً هناك زيادة كبيرة في امراضية الاخيرة.

كما ولوحظت زيادة كبيرة في امراضية بكتريا *Serratia marcessens* عند حقن بكتريا *Acinetobacter* معها.

ان قابلية البكتريا على احداث الاصابة يعود الى وجود العديد من عوامل الضراوة التي يوجد بعضها ضمن التركيب الخلوي والبعض الاخر يفرز خارج الجسم مثل الذيفانات والانزيمات وتسهم هذه العوامل في جعل البكتريا المرضية قادرة على تجاوز الخطوط الدفاعية في جسم المضيف وتسهم في تخريب النسيج الذي استوطنت به البكتريا.

ان المعلومات المتعلقة بعوامل الضراوة بالنسبة للبكتريا *Acinetobacter* قليلة جداً مما جعلها محوراً لبعض الدراسات المجراة خلال السنوات الاخيرة ومن اهم عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه البكتريا هي:

1-5-1 المحفظة Capsule

تمتاز بعض الانواع البكتيرية باحتوائها على المحفظة التي تحيط بجدار الخلية البكتيرية التي هي متعدد سكريد (Polysaccaride)، وتعد المحفظة واحدة من اهم عوامل الضراوة لبعض الانواع البكتيرية كما في *Streptococci, Klebseilla*. وتسهم المحفظة في التصاق البكتريا والتقاط الغذاء ومقاومة عوامل المضيف الدفاعية (Robbris *et. al.*, 1980).

واشار Garcia وجماعته (2000) الى أحتواء بكتريا *Acinetobacter* على المحفظة او متعدد السكريد الذي يحمي البكتريا في اثناء عملية الالتهام Phagocytosis.

وقد اشار Obana (1986) الى ان حوالي 14% من سلالات *A.baumannii* كانت منتجة للطبقة المخاطية Slime layer المكونة من السكريات والبروتينات التي تغلف البكتريا وتحميها من الالتهام كما لاحظ ان ضراوة البكتريا المنتجة لهذه الطبقة اعلى من البكتريا غير المنتجة، كذلك لاحظ عند استخلاص الطبقة المخاطية لبكتيريا *A.baumannii* وحقنها في الفئران أدت الى تحطم خلايا الدم البيض العدلة (Neutrophiles)، وان لهذه الطبقة تأثيراً ساماً على الخلايا البلعمية للفئران والارانب وخنازير غينيا، اذ تؤدي الى انخفاض واضح في اعداد خلايا الدم البيض البلعمية والخلايا التائية (T.lymphocyte) مما يؤدي الى احداث خلل في الجهاز المناعي للمضيف فتتمكن البكتيريا من احداث الاصابة، ولوحظ ان هذه

الطبقة المخاطية تزيد من امراضية اجناس بكتيرية اخرى سالبة لملون غرام مثل *E.coli* (Obana & Nishino., 1988).

ويعود سبب امراضية العديد من الاصابات البكترية الى السموم التي تظهر الفعل الممرض المباشر على الخلايا الهدف (Target cell) او تتفاعل مع خلايا الجهاز المناعي التي تحرر بدورها الوسائط المناعية (Cytokines) التي تسبب التغيرات الفسلجية والمرضية.

ان هذه السموم تعد العامل الاساسي في ازدياد امراضية البكتريا وتشمل عديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharde (LPS) في البكتيريا السالبة لملون غرام ويطلق عليه ايضاً السم الداخلي (Endotoxin) وهو مركب يقع في الغشاء الخارجي للبكتريا الذي يتحرر من سطح الخلية البكترية بعد تحللها، واظهرت الدراسات ان لـ (LPS) دوراً كبيراً في النسب العالية للوفيات في مرضى المستشفيات المعرضين للاصابة المكتسبة بالبكتيريا السالبة لملون غرام (Bryan *et. al.*,1983).

وقد بينت الدراسات التي اجريت على بكتريا *Acinetobacter* احتواءها على طبقة من متعدد السكريد الشحمي LPS وان الفعالية السمية لهذه الطبقة ودورها في الاصابة يتماثل مع تلك العائدة لبقية الانواع البكتيرية السالبة لملون غرام مثل *Salmonella typhi; E.coli* (Garcia *et. al.*, 1999). ان لهذه الطبقة في بكتريا *Acinetobacter* القدرة على التحفيز في تكوين عامل نخر الاورام من نوع الفا -Tumor necrosis facter(TNF-α α) في طحال الفئران المحقونة به وان لهذه الطبقة تأثيراً مشطراً Mitogenic للخلايا اللمفاوية نوع B، وتسبب هذه الطبقة تكاثر (Proliferation) الخلايا اللمفاوية B (Garcia *et. al.*, 1999).

ووجد أن بعض سلالات بكتريا *A.baumannii* لها القدرة على افراز السموم بنوعيها الثابت بالحرارة heat stable toxin والمعطوب بالحرارة heat labile toxin (Jiwa *et. al.*, 1981).

اشارت بعض الدراسات الى ان هناك العديد من المركبات الكيميائية التي تؤثر في حجم المحفظة ومن بين هذه المركبات حامض السالسيلك Salicylic acid و ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) و يمتاز المركب الأخير بكونه من العوامل الكلابية التي لها القدرة على سحب بعض العناصر المهمة، وقد اشار Domenico جماعته (1989) الى أن هذه المركبات تؤثر في حجم المحفظة من خلال ازالة الطبقة الخارجية لها ولكن ليس لها أي تأثير على نمو البكتريا (Valvano, 1992).

وقد لاحظ Garcia وجماعته (2000) أن معاملة بكتيريا *Acinetobacter* بحامض السالسيلك و EDTA تقوم بأختزال 50-90% من حجم المحفظة البكتيرية وتؤدي هذه المركبات الى ترسيب كمية من متعدد السكريد الشحمي LPS او متعدد السكريد المحفظي CPS.

2-5-1 عوامل الالتصاق او الاستيطان (Adhesion or Colonization Factors)

يعد التصاق واستيطان البكتريا للانسجة المخاطبة لجسم المضيف المرحلة الاولى لاحداث الاصابة ولكي تستوطن البكتريا الطبقات المخاطية فأن على البكتريا ان ترتبط بالخلايا الطلائية لتلك الانسجة اولاً، وقد وجد ان الاهداب (Pili) او الخملات القطبية (Polar Fimbriae) هي التي تسهم في المرحلة الاولى لاحداث الخمج وهي الالتصاق والاستيطان للاغشية المخاطية للمسالك البولية والتناسلية والمعوية والتنفسية، ويتضمن الالتصاق التداخل بين المستقبلات الخاصة على سطح اغشية الخلايا في اللبائن والمتمثلة بالكاربوهيدرات مع المستقبلات على سطح البكتريا والمتمثلة بالبروتينات، ولعملية غزو البكتريا فإن الالتصاق يمثل خطوة اولية و ضرورية في اختراق البكتريا للنسيج (Hoseley *et. al.*,1997).

ان اول عامل هدبي تم اكتشافه هو العامل الهدبي الاول Colonization Factor Antigen (CFA/I) المعزول من بكتريا *E.coli* وهذا العامل يسبب تلزن كريات الدم الحمرالبشرية صنف (A) وكريات الدم الحمرالبقرية ايضاً وتم كذلك اكتشاف عامل هدبي اخر اطلق عليه (CFA/II) الذي يسبب تلزن دم الابقار والدجاج وهذان العاملان لايثبطان بوجود سكر المانوز زيادة على ذلك ان لهذين العاملين خصوصية مضيفية (الزعاك، 1994).

اما عامل الالتصاق او الاستعمار الثالث (CFA/III) فإنه يسبب تلازن كريات الدم الحمراء بوجود حامض التانيك (Tannic acid) وقد وجد ان العامل يقع تحت سيطرة اثنين من الجينات الكرموسومية احدهما مسؤول عن تكوين الاهداب والاخر لغرض الالتصاق (Hornick *et. al.*,1995).

وقد بينت المصادر ان بكتريا *Acinetobacter* تحتوي على الخملات القطبية (Holt *et. al.*,1994) وبين Fleisher وجماعته (1999) على احتواء بكتريا *Acinetobacter* على عوامل استيطان على سطح الخلية مما يسهل عملية الالتصاق بالانسجة وتكوين

المستعمرات، كما تمتاز بكتريا *Acinetobacter* بقدرتها على الالتصاق بسطح خلايا الدم الحمر وان الخملات القطبية هي التي تسهم في عملية الالتصاق والاستيطان (Gospodarek *et. al.*, 1999).

وقد اشار Kolijalg وجماعته (1996) الى ان قابلية بكتريا *A.baumannii* على الارتباط بالخلايا الطلائية يتوقف على مصدر العزل والموقع الذي اصابته البكتريا كذلك بين انه يمكن تثبيط هذا الارتباط بوساطة بروتينات مثل Lactoferrin وFibrinogen.

ان وجود عوامل الاستيطان او الاستعمار ضمن تركيب جدار الخلية البكتيرية يساعد البكتريا في التصاقها بالأنسجة التي تستوطنها ومن ثم وباشتراكها مع عوامل ضراوة اخرى فأنها ستحدث الاصابة وبهذا يمكن القول ان مستضدات الاستعمار عوامل ضراوة اساسية تساعد البكتريا على الاستيطان واحداث الاصابة.

3-5-1 الهيمولايسين البكتيري Bacterial Haemolysin

يعد الهيمولايسين احد انواع البروتينات الحالة لكريات الدم الحمرالتي تنتجها بعض البكتريا وهي ذات تركيب جزيئي يختلف من بكتريا الى اخرى، وغالباً مايرتبط انتاجه بالبكتريا المعزولة من حالات مرضية لذا يعد من العوامل المسهمة في الامراضية (Nassif & Sansonett., 1987). وجد ان الهيمولايسين لايؤدي دوراً مهماً في امراضية البكتريا التي تسبب اصابات معوية مثل الايشيرشيا القولونية وضمات الكوليرا لانها في مثل هذه الحالات غالباً ما تكون بكتريا منتجة للذيفانات ولاتخترق الانسجة بنفسها، الا ان دورها يكون مهماً عندما تغزو هذه البكتريا الانسجة تحت المخاطية لتصل الى الدم (Ketyi, 1984).

ان انواع عديدة من سلالات الاسرة المعوية وبعض انواع الهيموفليس لها القابلية على انتاج الهيمولايسين كذلك وجد ان بعض سلالات بكتريا المكورات الذهبية قادرة على انتاج انواع مختلفة من الهيمولايسين ولايعرف دورها في الامراضية، الا ان Nolte (1982) اشار الى ان دور الهيمولايسين عند غزو البكتريا الدم وحصول حالات التعفن الدموي البكتري، ولكن الالية الحقيقية التي يدخل فيها الهيمولايسين كعامل ضراوة له اهمية في حدوث الاصابات غير واضحة تماماً على الرغم من ان بعض الاثباتات التي تشير الأن دوره يكمن في تزويد البكتريا المرضية ما تحتاجه من الحديد (Payne, 1988).

يرتبط الهيمولايسين مع عوامل اخرى يفترض ان يكون لها دورٌ في الضراوة مثل المقاومة للمصول ووجود مستضدات خاصة بالاضافة الى وجود الاهداب لاسيما تلك المرتبطة بتلزن الدم المقاوم للمانوز أي تلزن كريات الدم الحمراء بوجود العامل الهدبي الذي لايثبطه سكر المانوز (الزعاك، 1994).

وقد اتضح ان الجينات المشفرة للهيمولايسين تكون في بعض الأحيان محمولة على بلازميدات اقترانية (Gruing & Lebek, 1985) او على بلازميدات غير اقترانية (Hull *et. Al.*, 1982).

وقد تم نقل البلازميدات المسؤولة عن انتاج الهيمولايسين بوساطة الاقتران الى بكتريا اخرى غير منتجة للهيمولايسين لاسيما بين افراد الاسرة المعوية (Macker *et. al.*,1985).

لايمكن عد الهيمولايسين عامل ضراوة مباشراً او غير مباشر ولكنه يعد من اهم العوامل التي تشترك في الامراضية في حالات اصابة معينة في مواضع مرضية معينة ومع ذلك فان وجوده يعد عاملاً مهماً في تزويد البكتريا بالحديد بالاضافة الى قابليته في الحث على افراز الهستامين وصنع الليكوترين كذلك له قدرة على تدمير الخلايا وتحرير اللايسوزايم او تدمير كريات الدم البيضاء (الزعاك، 1994).

ومن المعروف ان بكتريا *Acinetobacter* غير منتجة للهيمولايسين ما عدا النوع *A.heamolyticus* الذي يكون محللاً للدم بشكل كامل (Baron *et. al.*, 1994).

4-5-1 انتاج السايدروفورات Siderophores Production

يعد الحديد من العناصر التي تلعب دوراً اساسياً في معظم الخلايا الحية وله وظائف عدة منها نقل الالكترونات زيادة على نقله الاوكسجين وكذلك ان العديد من الانزيمات تحتاج في تنشيطها وجود تركيز معين من الحديد. ومن الوسائل التي تستخدمها البكتريا للحصول على الحديد هو انتاجها السايدروفورات (الزعاك، 1994).

والسايدروفور هي مركبات كلابية تسحب الحديد (Iron chelating) من مركباته ذات اوزان جزيئية واطئة لها آلفة عالية جداً للحديد اذ تفرزه الخلية ويرتبط بالحديد على سطحها او في البيئة التي افرز فيها وبعد ذلك يرجع الى داخل الخلية، ان البكتريا السالبة لملون غرام تختص في تخليق السايدروفور على عكس البكتريا الموجبة لاسيما المكورات التي

ليس لها قابلية على تخليقه (Payne,1988)، ولوحظ ان البكتريا التي تفقد انظمة سحب الحديد تختزل فيها معدل النمو بصورة كبيرة وقد يقود ذلك الى تغيرات شكلية كثيرة Morphological changes وان هذه الخلايا التي تفقد هذه الانظمة يتوقف فيها تصنيع الحامض النووي (DNA)، يتوقف فيها انقسام الخلية ولهذا فأن الخلايا البكتيرية تحتوي في الاقل نظاماً واحداً للحصول على هذا العنصر المهم (Goel & Kapil., 2001).

وقد وجد ان بكتريا الاسرة المعوية تنتج نوعين من السايدروفورات النوع الاول هو من المركبات الفينولية الحاوية على حلقة (2,3 dihydroxy benzoic acid) التي يرتبط الحديد بها ويعرف هذا النوع بالانتروباكتين (Enterobactin) الذي تنتجه بكتريا الكلبسيلا والشيكلا وغيرها (Perry & Clement, 1979) وكذلك بكتريا الاشريشيا القولونية (O'brien & Gibson, 1970) وقد وجد ان الجينات التي تشفر الانتروباكتين موجودة على الكروموسوم في اغلب افراد بكتريا الاسرة المعوية.

اما النوع الثاني الذي يتواجد في معظم اجناس بكتريا الاسرة المعوية لاسيما الانواع المرضية منها مثل الايروباكتين Aerobactin الذي يتكون من حامض Hydroxymatic acid وقد عزل لاول مرة من بكتريا *Aerobacter aerogenes* (Gibson & Magarath,1969). وينتج العديد من البكتريا المعوية هذا النوع لاسيما الاشريشيا والكلبسيلا والشكيلا وبعض انواع اليرسينيا *Yersinia* غير المرضية للانسان (Payne, 1988).

اما البروتينات المهمة الموجودة في جسم الانسان التي لها دور في نقل الحديد فيطلق عليها الترانسفيرين Transferrins وقد وجد ان هذا البروتين موجود في مصل الانسان ويطلق عليه الترانسفيرين المصلي (Serum transferrin) وهناك اللاكتوفيرين (Lactoferrin) الذي اكتشف اول مرة في حليب الام ويمثل 20% من مجموع بروتينات الحليب الكلية. وقد وجد في بياض البيض للدواجن ويطلق عليه بالاوفوترانسفرين (Overtransferrin) (Payne, 1988).

وعند توافر الحديد بكمية كافية فأن البروتينات ستتحول الى الهيأة المشبعة فتفقد الصفات التثبيطية لنمو البكتريا المرضية، فقد لوحظ ان اللاكتوفيرين يفقد قابليته على تثبيط نمو بكتريا الكلبسيلا والاشريشيا القولونية *Aerobacter* عند وجود تراكيز كافية من الحديد (Bishop *et. al*, 1976).

ان اهمية السايدروفور بوصفها عوامل ضراوة تأتي من خلال مساندته للبكتريا المرضية على مقاومة البروتينات الناقلة للحديد داخل جسم المضيف، فقد لاحظ Nassif وجماعته (1987) ان بكتريا الشيكلا *Sh.flexneriae* لها القابلية على العيش والبقاء في انسجة الامعاء التي فيها الحديد مقيداً بالترانسفرين مما استنبط الدور الذي يفعله الايروباكتين في موقع تواجد البكتريا داخل الامعاء.

واوضح Cox (1982) الدور الذي يفعله السايدورفور الذي تنتجه بكتريا *Pseudomonas* في مقاومة فعل بروتينات الترانسفرين، وقد اشار Yancy وجماعته (1979) الى الملاحظة نفسها اذ وجدوا ان الانتروباكتين يعكس الفعالية التثبيطية للعوامل الموجودة في مصل الانسان عند غزو بكتريا السالمونيلا. واشار Vernet وجماعته (1995) الى ان انتاج الايروباكتن عامل ضراوة ضروري بالنسبة الى بكتريا الكلبسيلا.

لكن Lawlor وجماعته (1987) أشاروا الى ان البكتريا قد لا تحتاج الى السايدروفور في داخل خلايا المضيف وربما تظهر اهميتها فقط عند وجود البكتريا خارج خلايا المضيف لغرض التضاعف.

يعتقد ان هناك علاقة بين انتاج الهيمولايسين والسايدروفور، ولاحظ Valvano وجماعته (1986) ان 99% من سلالات بكتريا الاشريشيا القولونية غير المنتجة للايروباكتين قادرة على انتاج الهيمولايسين الذي يوفر الحديد للبكتريا عند غزوها للدم وحصول حالات التعفن الدموي.

واشار Payne (1988) الى ان البكتريا تحتاج الى عامل اساسي للحصول على الحديد فأما انها تحتاج الى انتاج الهيمولايسين او السايدروفور لغرض الحصول على الحديد.

ويبدو واضحاً ان انتاج السايدروفور هو البديل للحصول على الحديد ومع ذلك، فقد وجد ان بعض انواع بكتريا هيموفلس ليس لها القابلية على انتاج كل من الهيمولايسين او السايدروفور ويعتقد ان احتياجها الى الهمين (hemin) كعامل نمو سيوفر لها ما تحتاجه من حديد Brubaker (1985).

وبين Smith وجماعته (1990) قدرة بكتريا *Acinetobacter* على انتاج السايدروفورات الذي يعتبر أحد عوامل الضراوة المهمة في هذه البكتريا.

6-1 انتاج البكتريوسين Bacteriocin Production

تمتلك العديد من السلالات البكتيرية القدرة على تصنيع البكتريوسينات التي تؤثر في تثبيط نمو عدد من السلالات البكتيرية القريبة لنوعها او تلك المزاحمة لها في بيئتها (Garcia, 1992).

يشير مصطلح البكتريوسين الى بروتينات تصنع بكميات قليلة وذات فعالية شديدة الخصوصية ترتبط بمستقبلات خاصة بها وتمتلك القدرة القاتلة لانواع مماثلة للبكتيريا المنتجة وبطيف ضيق من الفعالية (Kock *et. al.*, 1987 ; Konisky, 1982)، في حين وصفها Bradly (1967) بأنها مجموعة من الجسيمات القاتلة تعمل كل منها في الخلايا المتحسسة لها بالطريقة نفسها.

وقد كانت هناك اشارات واضحة للبكتريوسينات، فتطرق لها كل من Schwortz & Helinski (1971) على انها عوامل قاتلة تتميز عن بقية المضادات الحيوية بكبر وزنها الجزيئي وتخصص تأثيرها على الانواع القريبة منها.

تشترك البكتريوسينات بصفات عامة لايكاد كل واحد يخلو منها وهي:

1- طيف الفعالية الضيق في الانواع القريبة من السلالات المنتجة.
2- احتواؤها على جزء فعال ذي طبيعة بروتينية ويتأثر بالانزيمات المحللة للبروتين.
3- تمتلك فعالية قاتلة للبكتريا الحساسة لها.
4- اهمية وجود مستقبلات خاصة بها على سطح الخلايا الحساسة لها.
5- يتحدد انتاجها بسيطرة البلازميد.
6- يمكن حث انتاجها بأستخدام عوامل فيزياوية وكيمياوية.

لم تكن هناك معلومات كافية وحاسمة للقيام بمحاولة لتقسيم البكتريوسينات بصورة كاملة غير ان هذا لم يمنع Fredericq (1948) من القيام بالمحاولة الاولى في هذا المجال معتمداً على البكتريا المنتجة لتلك البكتريوسينات عبر ملاحظته اختلاف طيف الفعالية مما اعطى توقعاً محتملاً حول وجود اكثر من بكتريوسين ينتجه النوع الواحد. ان كل عائلة من البكتريوسينات مؤلفة من انواع مختلفة بدلالة الاختلاف الواسع في طيف فعاليتها (Reeues, 1965).

وهناك احتمال ممكن لتقسيم البكتريوسينات وذلك بوضعها في نوعين رئيسين اعتماداً على الوزن الجزيئي لكون وزنها الجزيئي عالياً او واطئاً مع شمولها بصفات اخرى مثل قابليتها للترسيب وحساسيتها للتربسين وفي كونها تتأثر بالحرارة او ثابتة (Bradly, 1967).

تختلف البكتريوسينات من حيث تأثيرها على الخلايا البكتيرية فبعضها يثبط انتاج البروتين وبعضها الاخر يؤثر على دنا الخلية البكتيرية او على الاغشية الخلوية او على مستوى ATP داخل الخلية (Konisky, 1982).

وتحتل البكتريوسينات دوراً في انتشار العزلات المرضية في ضمن البيئة التي تتواجد فيها ويوفر الحماية ويساعدها على البقاء (Richardson *et. al*., 1971) ولايمكن اعتبار البكتريوسين عامل ضراوة مباشرة ولكنها تاخذ دوراً في انتشار البكتريا المنتجة له في ضمن المنطقة التي تستوطن فيها.

تعد بكتريا الاشيريشيا القولونية من اكثر الانواع البكتيرية السالبة لملون غرام انتاجاً للبكتريوسين وقد تم الكشف عن انواع مختلفة من هذه البكتريوسينات والتي تسمى الكولسينات والتي تكون بانواع مختلفة (Cramer *et. al*., 1990). ومع ذلك فقد ظهر ان هناك انواع بكتيرية اخرى منتجة للبكتريوسين تعود الى مجموعة البكتريا الموجبة لملون غرام مثل بكتريا المكورات المسبحية *Streptococcus* والمكورات العنقودية *Staphylococcus* (Tagg *et. al*., 1976).

ووجد ان بكتريا *Acinetobacter* هي الاخرى منتجة للبكتريوسينات فقد اشار (Bergogn & Joly, 1991) الى ان بكتريا *Acinetobacter* المعزولة من حالات عدوى المستشفيات تكون منتجة للبكتريوسين وقد استخدم انتاج البكتريوسين في تنميط البكتريا ومن ثم الاستفادة منه في الدراسات الوبائية.

واشار Andrews (1986) ايضاً الى ان هذه البكتريا منتجة لانواع من البكتريوسينات التي استخدمها ايضاً في تنميط البكتريا لغرض استخدامها في الدراسات الوبائية.

7-1 المحتوىالوراثي

تمتاز البكتريا بشكل عام بأحتوائها على كرموسوم واحد بنسخة واحدة او عدة نسخ ومع ذلك فقد وجد ان هناك عناصر وراثية أخرى مستقلة عن الكرموسوم التي تسمى بالبلازميدات وهي جزيئات مكورة مغلقة تساهمياً من الحامض النووي الدنا وتوجد في سايتوبلازم الخلية بشكل مستقل عن الكروموسوم. اضافة الى ذلك فقد وجد ان هناك عناصر وراثية اخرى تدعى بالجينات القافزة (Jumping genes) او الترانسبوزون

(Transposon) التي تستطيع التحرك او القفز من موقع لاخر كتحركها من الكرموسوم الى البلازميد او بالعكس او تتحرك على الكروموسوم نفسه من موقع لاخر.

درس المحتوى الوراثي لبعض سلالات بكتريا *Acinetobacter* وقد وجد زيادة على امتلاكها الكروموسوم فأنها تحتوي على بلازميد واحد او اكثر في السلالة نفسها وهذه البلازميدات قد تكون اقترانية او غير اقترانية، وقد ازداد الاهتمام بهذه البلازميدات بعد ان عرف أن لها علاقة بالامراضية ومقاومة المضادات الحياتية. وتأخذ دوراً في الدراسات الوبائية اذ ان انتشار البلازميدات بين السلالات العائدة الى النوع البكتري نفسه والمعزولة من موقع الاصابة نفسه يمكن أن يكون مؤشراً وبائياً ناتجاً عن وجود تماثل بين هذه البلازميدات وهذا ما يسمى بالنسق البلازميدي (Garcia, *et. al,* 1997).

درس (Deodhor & DE, 1997) صفة المقاومة للمضادات الحياتية التي تبديها بعض سلالات بكتريا *Acinetobacter* والمعزولة من حالات مرضية مختلفة تكون محمولة على البلازميد وقد وجدوا أن (81%) من مجموع العزلات تحوي على بلازميد المقاومة للمضادات الحياتية (R-plasmid).

اما الدراسات الوبائية التي اجراها Garcia وجماعته (1997) في وحدة العناية المركزة في اسبانيا فقد لاحظوا ان 40% من العزلات تحوي على بلازميدات تظهر صفة المقاومة للمضادات الحياتية زيادة على انها تمتلك نسقاً بلازميدياً متماثلاً.

وقد استخدم النسق البلازميدي في تنميط عزلات بكتريا *A.baumannii* من خلال دراسة العزلات المأخوذة من مستشفيات مختلفة فقد اشار Garcia وجماعته (1997) الى أمكانية استخدام النسق البلازميدي في تنميط عزلات *Acinetobacter* من ثلاث مستشفيات مختلفة وقد وجد ان 94% من العزلات تحوي على بلازميدات تختلف عن بعضها البعض الاخر من حيث العدد والوزن الجزيئي ومع ذلك وجد ان بعض العزلات تمتلك العدد نفسه من البلازميدات والاوزان الجزيئية نفسها على الرغم من عزلها من مستشفيات مختلفة.

وقد بين Nemec وجماعته (1999) ان 89% من عزلات بكتريا *Acinetobacter* المعزلة من حالات عدوى المستشفيات تحوي على بلازميدات تختلف عن بعضها البعض من حيث العدد والحجم الجزيئي اذ تتراوح اعداد البلازميدات من (1-6) بلازميد. واشار الى ان العزلات التي تعود للمجموعة نفسها تمتلك نسقاً بلازميدياً متماثلاً.

ودرس Marcos وجماعتــه (1995) المحتــوى البلازميــدي لــبعض عــزلات *A.baumannii* المعزولة من عدد من المستشفيات وقد وجد ان النسق البلازميدي لم يكن كافياً في تحليل النتائج على المستوى الوبائي ولابد من اجراء دراسات جزيئية اخرى في تحديد مصدر العدوى ومدى التماثل بين العزلات المختلفة.

وقد استخدم Ling وجماعته (1997) طريقتين جزيئيتين في التحري الوبائي عن مصدر بكتريا *A.baumannii* المعزولة من عدوى المستشفيات واحدى هذه الطرائق المستخدمة هي طريقة النسق البلازميدي والاخرى هي طريقة التهجين بأستخدام الرنا الرايبوسومي.

واستخدم Seifert وجماعتــه (1994) طريقتين لغرض استخدامــها في الدراسات الوبائيــة وهــي طريقــة النســق البلازميــدي وطريقــة بصــمة البلازميــد Plasmid Fingerprinting التي تعد من أهم الطرق المستخدمة في الدراسات الوبائية، اذ لاحظ احتواء 84% من عزلات .*Acinetobacter* SPP على البلازميدات ولاحظ ايضاً ان العزلات التي تعزل من نفس الموقع تمتلك نسقاً بلازميدياً متماثلاً وقد اشار ايضاً الى ان طريقة بصمة البلازميد بأستخدام انزيمات التقييد تعطي دلائل كافية على ان البلازميدات ذات النسق الواحد متماثلة تماماً من حيث الحجم الجزيئي.

ان معظم الدراسات المستخدمة في التحري عن المحتوى البلازميدي من عزلات بكتريا *Acinetobacter* تختص بصفة المقاومة للمضادات الحياتية بوصفها احدى ابسط المؤشرات التي من خلالها تتم دراسة خصائص البلازميد الموجود في البكتريا ومن خلالها تتم ايضاً عملية التحري عن حالات انتقال البلازميد من بكتيريا لاخرى عن طريق التحول البكتيري Transformation او الاقتران البكتيري Conjugation.

وقد اشار Palmen وجماعتــه (1993) الى ظاهرة التحول الطبيعي (Natural transformation) التي تحصل في بكتيريا *Acinetobacter* عند تواجدها في البيئة وهذا التحول يحصل مباشرةً في بداية طور النمو الاسي وينتهي في منتصف طور الثبوت وهذا التحول الطبيعي يكون ذا تردد عالٍ ويعتمد بدرجة كبيرة على نوع الدنا المتحول وكذلك مدة حضن الدنا مع البكتيريا.

وقد فسر Guardbassi وجماعتــه (2000) اسباب المقاومة العالية التي تبديها بكتيريا *Acinetobacter* تجاه المضادات الحياتية المختلفة الذي قد يعزى الى التردد العالي لظاهرة التحول الطبيعي لبكتيريا *Acinetobacter*.

وقد اشار Towner (1997) الى ان الاهمية السريرية لصفة المقاومة للمضادات الحياتية التي تبديها هذه البكتيريا يكمن من خلال وجود بلازميدات غير اقترانية تنتقل عن طريق ظاهرة التحول الطبيعي المشارة اليها سابقاً.

ان حدوث ظاهرة التحول البكتيري تعد واحدة من الطرق التي من خلالها تكتسب بكتيريا *Acinetobacter* البلازميدات، فقد لاحظ Gerner-Smidt (1989) ان 70% من البلازميدات المنقولة عن طريق التحول الطبيعي تكون ذات وزن جزيئي اقل من (27Kb) كيلو زوج قاعدي مما يؤكد أن معظم عزلات هذه البكتريا تفتقر الى البلازميدات الاقترانية وان هذه البلازميدات معظمها غير اقتراني وان أمثل طريقة لانتقالها هي طريقة التحول البكتيري.

ومع ذلك فقد اشار العديد من الباحثين الى ان هناك بلازميدات اقترانية تنقل صفة المقاومة للمضادات الحياتية وتنتقل عن طريق الاقتران فقد اشار (De&Deodhar,1997) الى ان صفة المقاومة التي تبديها *Acinetobacter* لكل من المضاد الحياتي Chlormphenicol و Tetracyclin وكذلك Naldixic acid هي محمولة على بلازميدات اقترانية وان هذه البلازميدات موجودة في 81% من العزلات التي هي قيد الدراسة.

وبين Maruashvili وجماعته (1997) ان بكتريا *Acinetobacter* تحوي على بلازميدات اقترانية تحمل صفة المقاومة لكل من Teteracyclin و Streptomycin وتعود الى اربع مجاميع غير توافقية Incompatibility group وتكون ذات اوزان جزيئية مختلفة.

وبين Shakiabaie وجماعته (1998) ان بكتريا *Acinetobacter* تحوي على بلازميدات اقترانية لها دور في نقل صفة المقاومة للمضادات الحياتية وكذلك صفة المقاومة لاملاح الفضة فقد لاحظ ان العزلات البكتيرية اظهرت صفة مقاومة لكل من Amp وTe وC و Sm و CAR.

لم يكن للبلازميدات الدور الوحيد في نقل بعض المؤشرات الوراثية فقد اظهرت الدراسات ان بكتريا *Acinetobacter* تحوي على عناصر وراثية اضافية كأحتوائها على Transposone او الجينات القافزة.

فقد اشار Sewerd وجماعته (1998) الى وجود الجينات القافزة على كرموسوم بكتريا *Acinetobacter* وهذه الجينات يمكن ان تنتقل الى البلازميدات الموجودة في البكتريا نفسها وتمتلك صفة المقاومة لبعض مضادات Aminoglycoside.

وزيادة على ذلك فقد ذكر Devaud وجماعته (1982) ان بكتريا *Acinetobacter* تمتلك جينات قافزة تحمل صفة المقاومة لبعض المضادات الحياتية التابعة لمجموعة aminoglycoside .

لم تعد الطرق الجزيئية المألوفة كافية لتحديد بعض المؤشرات الوبائية والتشخيصية لذلك لجأ العديد من الباحثين الى استخدام طرائق جزيئية اضافية لهذا الغرض. فقد استخدموا طرائق التهجين الجزيئي بأستخدام الرنا الرايبوسومي rRNA (16S) الذي يعد واحداً من أهم المؤشرات الوراثية في تشخيص وتحديد مدى التماثل بين السلالات المعزولة من اماكن مختلفة عائدة للنوع نفسه (Ratto, *et. al.*, 1995).

وكذلك استخدمت طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) في اعداد الخرائط الوراثية لبعض العناصر الوراثية مثل الكرموسوم والبلازميد والجينات القافزة من اجل تحديد موقع الجين المسؤول عن الصفة المراد تحديدها ضمن هذه العناصر الوراثية (Debast *et. al.*, 1997; Vila *et. al*, 1994).

1-8 تحييد البلازميدات Plasmid Curing

يحصل لبعض البلازميدات انعزال تلقائي ومن ثم يحصل فقدان من الخلية البكتيرية، في الوقت نفسه تمتاز معظم البلازميدات بثباتها. لذلك يتطلب استخدام عوامل تحييد تزيد من نسبة الانعزال وبعد ذلك يسهل عملية فقدان او استئصال البلازميد نهائياً. ان اهمية تحييد البلازميدات تكمن من التخلص من الصفات التي تضيفها الى البكتيريا كصفة المقاومة للمضادات الحيوية او وجود الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة وغيرها (Snyder & Champness, 1997).

ان المواد المستخدمة في تحييد البلازميدات بعضها يسبب تثبيطاً لعملية تكرار البلازميدات مثل الاكردين البرتقالي (Acridine organe) وبعضها يثبط عمل انزيم RNA Polymerense كالمضاد الحيوي الريفامبسين (Johnston & Richmord, 1970). واستخدمت صبغة بروميد الاثيدوم في تحييد البلازميدات لاسيما بلازميدات البكتريا المعوية والمكورات الذهبية وقد وجد انها كفوءة اكثر من صبغة الاكردين

البرتقالي من خلال تثبيط تكرار البلازميدات (Rubin & Rosenbium, 1971) ووجد ان سلفات دودوسيل الصوديوم (SDS) يستطيع ان يحيد بعض البلازميدات اذ ان بعض الخلايا الحاوية على بلازميد تكون حساسة بدرجة كبيرة للـ (SDS) ويكون استخدام هذا المركب افضل من بروميد الاثيديوم في بعض البكتريا (Sonstein & Bolduin, 1972). وتستخدم الطريقة المعتمدة على رفع درجة حرارة نمو البكتريا في تحييد البلازميدات فقد وجد ان تأثيرها جزئي في تحييد البلازميدات وكفائتها اقل اذا ما قيست بالمواد الكيمياوية (May *et. al.*, 1964).

وقد استخدم Laxmi وجماعته (1987) مركبات الاكردين البرتقالي والاكريفلاذين (Acriflavin) و بروميد الاثيديوم (Ethidium bromide) في تحييد البلازميدات الموجودة في بكتريا *Acinetobacter* ولاحظ ان هذه البكتريا قد فقدت البلازميدات بشكل جزئي عند معاملتها بهذه المواد.

ان استخدام طرائق تحييد البلازميدات كتقنية من تقنيات الوراثة الجزيئية لها فائدة في تحديد الصفات المحمولة على البلازميدات، اذ تفقد البكتريا قابليتها على اظهار تلك الصفات بعد افراغها من البلازميدات وهذه الطريقة يمكن استخدامها عند عدم وجود وسائل متاحة في تحديد تلك الصفات (السعيد، 1997).

ومن هنا جاءت الدراسة الحالية والتي تهدف الى:

1- عزل وتشخيص بكتيريا *Acinetobacter* من بعض النماذج المرضية المأخوذة من المرضى الراقدين او المراجعين للمستشفيات في مدينة الحلة.

2- دراسة نمط المقاومة التي تبديها البكتيريا تجاه بعض المضادات الحياتية و دراسة بعض عوامل الضراوة ذات العلاقة بالامراضية.

3- التحري عن بعض البلازميدات الاقترانية وغير الاقترانية ودراسة علاقتها بالمقاومة للمضادات الحياتية وذلك من خلال أجراء تجارب الاقتران والتحول.

4- دراسة تأثير بعض المركبات مثل حامض السالسيلك و EDTA وSDS على بعض العوامل ذات العلاقة بالامراضية وكذلك تأثيرها على العناصر الوراثية اللاكروموسومية الموجودة في البكتيريا.

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

2-1 المواد والاجهزة المختبرية

2-1-1 الاجهزة المختبرية

جدول رقم (1) يبين الاجهزة المختبرية المستخدمة:

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة
.1	الحاضنة Incubater	Gallenkamp, England
.2	حاضنة هزازة Shaking incubater	Gallenkamp, England
.3	حمام مائي Water bath	Memmert, Germany
.4	جهاز تقطير Distillator	Ogawa Seiki, Japan
.5	فرن كهربائي Oven	Gallenkamp, England
.6	مقياس ضوئي طيفي Spectrophotometer	Bausch & Lomb
.7	دوّارة Vortex	Criffin & Georglld, UK
.8	جهاز النبذ المركزي Centrifuge	Hermle, Germany
.9	جهاز النبذ المركزي المبرد Cooling Centrifuge	M.S.C, Germany
.10	جهاز النبذ المركزي الدقيق Eppendrof Centrifuge	Hermle, Germany
.11	موصدة Autoclave	National, Japan
.12	جهاز الترحيل الكهربائي Gel electro phoresis	Shndon, Scientific Co.LTD England
.13	مصدر الاشعة فوق البنفسجيةTransilluminator	San. Gabriel, USA
.14	مرشحات بقطر 0.45 مايكرومترMilipore filter	Satorius membrane filter Gm bH, W. Germany
.15	ميزان Balance	Satorius, Germany
.16	ميزان حساس الكتروني Sensitive electronic balance	Mettler, Switzerland
.17	مجهز ضوئي Light microscope	Olympus, Japan
.18	مقياس الاس الهيدروجيني pH meter	Hoeleze & Cheluis, KG Germany
.19	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة Micropipttes	Oxford, USA

2-1-2 المواد الكيمياوية والبايولوجية

ادرجت المواد الكيمياوية والبايولوجية المستخدمة في الجدول رقم (2)

الجدول رقم (2) يبين المواد الكيمياوية والبايولوجية المستخدمة:

اسم المادة	الشركة المصنعة
A- المواد الكيمياوية 1- كلوريد الصوديوم، هيدروكسيد الصوديوم، فوسفات الصوديوم، خلات البوتاسيوم، حامض اليوريك، احمر المثيل، الفانفثول، بروموفينول الازرق، حامض الخليك، حامض السالسيلك، كلوريد البوتاسيوم، كلوريد المغنيسيوم، كلوريد الكالسيوم، dipyridyl، حامض الخليك ثلاثي الكلور، كلوريد المنغنيز، اسيتون، إيثر، كبريتات دودوسيل الصوديوم SDS و-Na_2 EDTA ، EDTA، ايثانول، كلورفورم، فينول، الاغاروز، كلوكوز، اللاكتوز، السكروز، كلسيرول، حامض التانيك، كبريتات الامونيوم، فوسفات البوتاسيوم احادية وثنائية الهيدروجين.	B.D.H
2- بروميد الاثيديوم، سكر المانوز	Ajax
3- اللايسين، وخلاصة الخميرة	Fluka
B- الاوساط الزرعية وسط الاغار المغذي، وسط اغارماكوني، وسط اغار الدم الاساسي، وسط سترات سايمون، وسط كلكر الصلب، وسط اغار التربتك سوي، وسط مولر هنتون، وسط مستخلص نقيع القلب والدماغ السائل، تربتون، ببتون، ووسط اغار اليوريا الاساس.	Oxoid
C- المضادات الحياتية امبسلين، ستربتومايسين، تراي مثبرم، جينتامايسين حامض النالديكس، الكاربنسلين تتراسايكلين، ريفامبسين	Sigma DAD معمل ادوية سامراء/ العراق
اقراص المضادات الحياتية	Oxoid

1-3-1-2 المحاليل والاوساط الزرعية

أ-المحاليل Solutions

1- محاليل المضادات الحياتية

حضرت على وفق ما ذكره Maniatis وجماعته (1982).

أ. محلول الامبسيلين Ap:

حضر بأذابة 1غم من المضاد الحيوي في 90 مل من الماء المقطر المعقم ثم اكمل الحجم الى 100 مل للحصول على تركيز نهائي 10 ملغم/ مل.

ب. محلول التتراسايكلين Te:

حضر بأذابة 0.2 غم من المضاد الحيوي التتراسايكلين في 90 مل من الايثانول 50% ثم اكمل الحجم الى 100 مل للحصول على تركيز نهائي 2 ملغم/ مل.

ج- محلول الستربتومايسين Sm:

حضر بأذابة 1 غم من المضاد الحيوي الستربتومايسين في 90 مل من الماء المقطر المعقم ثم اكمل الحجم الى 100 مل للحصول على تركيز نهائي 10 ملغم/ مل.

د- محلول الريفامسين Rd:

حضر بأذابة 0.25 غم من المضاد الحيوي الريفامسين في 90 مل من الاستون ثم اكمل الحجم الى 100 مل للحصول على تركيز نهائي 2.5 ملغم/ مل.

هـ محلول التراي مثبرمTm:

حضر بأذابة 0.25 من المضاد الحيوي التراي مثبرم في 90 مل من الاسيتون ثم اكمل الحجم الى 100 مل للحصول على تركيز نهائي 2.5 ملغم/ مل.

و- محلول حامض النالديكسك Na والسبروفلاكسين Cf:

حضرت بأذابة 0.2غم من المضاد الحيوي في 90 مل من الماء المقطر المعقم ثم اكمل الحجم الى 100 مل للحصول على تركيز نهائي 2ملغم/ مل (السعيد، 1997).

استخدمت مرشحات دقيقة (Millipore Filter) لتعقيم المضادات الحيوية ثم حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال، تضاف المضادات الحيوية من محاليلها الرئيسة الى الاوساط الزراعية الانتخابية ووفقاً للتراكيز (مايكروغرام/ مل) المذكورة فيما يأتي:

Ap	Te	Sm	Rd	Cf	Na	Tm
100	20	100	100	20	20	25

اما اقراص المضادات الحياتية والمجهزة من شركة Oxiod فتكون فاعليتها (discpotency) كما مدون وبتراكيز المايكروغرام.

Na	Cf	E	Pc	Cp	Sm	Am	Te	Cb	Rd	Ap	Gn
30	5	15	100	30	10	10	30	100	30	10	10

2- محلول 15% سكروز

يتكون من 10 ملي مولار EDTA و25 ملي مولار Tris-base ثم اضيف اليه السكروز بنسبة 15% وعدل الاس الهيدروجيني الى 8 وعقم بالتشريح (Birnbiom & Dolly., 1979).

3- محلول 1% SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)

يحتوي على 0.2 عياري NaOH الاس الهيدروجيني له 12.6 ثم اضيف له SDS بنسبة 1% وعقم بالترشيح. ويحضر انياً قبل الاستعمال (Birnbiom & Dolly., 1979).

4- محلول بروميد الاثيديوم (Ethedium bromide)

حضر بإذابة 0.25 ثم من صبغة بروميد الاثيديوم في 50 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 5ملغم/ مل (Sambrook *et. al.*, 1989).

5- محلول خلات البوتاسيوم

حضر بإضافة (60) مل من 5 مولار خلات البوتاسيوم الى 11.5 مل من حامض الخليك الثلجي ثم اكمل الحجم الى (28.5) مل من الماء المقطر عدل الاس الهيدروجيني الى 4.8، عقم بالموصدة (Birnbiom & Dolly., 1979).

6- محلول دارئ TE

يتكون من 50 ملي مولار Tris-Cl، 20 ملي مولار Na_2EDTA ثم عدل الاسي الهيدروجيني الى 7,5.

7- دارئ التحميل Loading buffer

يتكـون مـن 15% فيكـول Ficoll و 0.25% مـن صبغـة البـروموفينـول الازرق (Sambrook *et. al.*, 1989).

8- دارئ T.B.E

يتكون من 0.089 مولار Tris-base، 0.089 مولر حامض البوريك Bonic acid و0.002 مولر EDTA يذاب في 500 مل من الماء المقطر، وعدل الاس الهيدروجيني الى 8.0 وعقم بالموصدة (Sambrook *et. al.*, 1989).

9- محلول الفينول/ كلوروفورم المتعادل Neutral phenol/ Chloroform

حضر بمزج حجمين متساويين بنسبة 1:1 من كل من الفينول والكلوروفورم، غسل المحلول بحجم متماثل من 1 مولر Tris- Hcl الاس الهيروجيني 8,8، رج المحلول جيداً وبعد انفصال طبقة Tris-Hcl الى الاعلى والفينول- كلوروفوم الى اسفل، ازيلت الطبقة العليا ويوضع في عبوة زجاجية معتمة ويحفظ في الثلاجة حتى حين استخدامه (Birnoboim & Dolly, 1979).

10- محلول حامض السالسيك Salicylic acid

حضر بإذابة 0.4 غم من الحامض في 12 مل من ماء مقطر مزالة ايوناته (Deionized water) ويعدل الرقم الهيدرجيني 7.5 بأستخدام 10 عياري من NaOH ثم يكمل الحجم الى 20 مل ليصبح التركيز النهائي للحامض 20 ملغم/ مل، (السعيد، 1997).

11- محلول EDTA

حضر بإذابة 0.4 من EDTA في 12 مل من الماء المقطر ويعدل الرقم الهيدروجيني الى 8 بإضافة 10 عياري NaOH ثم يكمل الحجم الى 20 مل ليصبح التركيز النهائي للمحلول 20 ملغم/ مل (السعيد، 1997).

12- دارئ الفوسفات الفسيولوجي

يتكون من 80 غم كلوريد الصوديوم، 0.34 غم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و1.12غم من فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين، اذيبت هذه المواد في 500 مل من الماء المقطر وعدل الاس الهيروجيني الى 7.3 ثم يكمل الحجم الى 1000 مل وعقم بالموصدة (المسلماوي، 1999).

ب- <u>الاوساط الزرعية المحضرة</u>

1- وسط SOB السائل

حضر بإذابة المكونات الاتية في 950 مل من الماء المقطر:

10 غم تربتون، 5 غم مستخلص الخميرة، 0.5 غم كلوريد الصوديوم، بعد الاذابة يضاف 10مل من محلول 250 ملي مولار كلوريد البوتاسيوم ثم يكمل الحجم الى 995 مل ويعقم بالموصدة. وقبل استخدامه يضاف اليه 5 مل من محلول 2 مولار كلوريد المغنيسيوم المعقم بالترشيح (Maniatis *et. al.*, 1982).

2- وسط SOC السائل

مكونات SOB السائل نفسها ما عدا اضافة 1% من 250 ملي مولار كلوكوز الذي اضيف بعد تعقيم الوسط بالموصدة وتبريده الى درجة 50مْ (Maniatis *et. al.*, 1982).

3- وسط لوريا السائل L-Broth

حضر الوسط بأذابة المكونات الاتية في 950 مل من الماء المقطر:

10 غم تربتون، 10 غم مستخلص الخميرة، 5 غم كلوريد الصوديوم، ثم عدل الاس الهيدروجيني الى 7.2و اكمل الحجم الى 1000 مل ثم عقم بالموصدة (Maniatis *et. al.*, 1982).

4- وسط M9 السائل

ويحتوي على المكونات الاتية:

6 غم فوسفات ثنائي الصوديوم الهيدروجينية، 3 غم فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين، 0.5 كلوريد الصوديوم، و1غم كلوريد الامونيوم، ذوبت المكونات في 950 مل من الماء المقطر وعقم بالموصدة وبرد الى درجة 50م ثم اضيف اليه 2 مل من 1 مولار كبريتات المغيسيوم، 10 مل من 20% كلوكوز و0,1مل من 1مولار

$CaCl_2$ التـي عقمـت بالترشيـح كـل علـى انفـراد واكمـل الحجـم الـى 1000 مـل (Maniatis *et. al.*, 1982).

5- وسط اختزال النترات Nitrate reducation medium

حضر الوسط بإذابة 0.2 غم من نترات البوتاسيوم KNO_3، و5 غم ببتون في 950 مـل مـن المـاء المقطـر واذيبـت المكونـات بوسـاطة حمـام مـائي و أكمـل الحجـم الـى 1000مل ووزعت في انابيب اختبار نظيفة وعقمت بالموصدة (Collee *et. al.*, 1996).استخدم الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على اختزال النترات الى نتريت.

6- وسط الفنيل الانين Phenylalanine medium

حضر الوسط بإذابة 2غم من الفنيل الانين (D. phenylalanine)، 3 غم مستخلص الخميرة، 5 غم كلوريد الصوديوم، 1 غم فوسفات ثنائية الصوديوم الهيدروجينية و12 غم اغار في 500 مل من الماء المقطر ثم عدل الاس الهيدروجيني الى 7.3 وأكمل الحجم الى 1000مل ووزع الوسط في انابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة وترك ليتصلب بشكل مائل (Macfaddin, 2000).

استخدم الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على افراز انزيم Phenylalanine deaminase وتكوين Phenyl pyruvic acid من Phenylalanine

7- وسط احمر المثيل والفوكس بروسكور MR-VP meduim

حضر الوسط بإذابة 5غم من ببتون و5غم K_2HPO_4 في 500 مل ماء مقطر:
اذيبت المكونات بوساطة حمام مائي وعدل الاس الهيدروجيني الى 7.6 واكمل الحجم الى 1000مل وعقم بالموصدة، برد الوسط الى ˚50م ثم اضيف اليه 50مل من المحلول 10% كلوكوز الذي عقم بالترشيح ووزع الوسط في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة (Macfaddin, 2000) استخدم الوسط للكشف عن التحلل الكامل او الجزئي للسكريات وتكوين الحامض او الاستيل مثيل كاربون.

8- وسط نزع مجموعة الكاربوكسيل COOH من الاحماض الامينية

حضر الوسط بإذابة 5غم ببتون، 3غم مستخلص الخميرة (Yeast extract)، و1غم كلوكوز، في 950مل من الماء المقطر عدل الاس الهيدروجيني الى (6.7) ثم اضيف 10مل من دليل (Bromothymol blue) المحضر بتركيز 0.2% خلطت المواد

جيداً واكمل الحجم الى 1000مل وعقم الوسط بالموصدة ثم اضيف محلول الاحماض الامينية (اللايسين) والمحضر بتركيز 0.5% والمعقمة بالترشيح وزع الوسط في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة (Collee *et. al.*, 1996).

استخدم الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على ازاحة مجموعة الكاربوكسيل من الاحماض الامينية.

الأوساط الجاهزة:

ومجموعة من الاوساط الزرعية التي حضرت على وفق تعليمات الشركة المجهزة وعقمت بالموصدة بدرجة حرارة 121مْ وضغط 15 باوند/ انج لمدة 15 دقيقة وهذه الاوساط هي:

1- وسط اغار الدم الاساس Blood Agar Base

حضر وسط اغار الدم الاساس وعقم وترك الى ان وصلت حرارته الى 50 مْ ثم اضيف له الدم البشري بحيث يصبح تركيزه النهائي 5%.

2- وسط ماكونكي الصلب MacConkey Agar

3- وسط مولر هنتون الصلب Muller- Hinton Agar

4- وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain Heart Infusion Broth

5- وسط كليكر Kligler Iron Agar

6- وسط سترات سايمون Simmon- Citrate Agar

7- وسط ترتبك سويا الصلب Tryptic Soy Agar

8- وسط اليوريز Urease Agar

9- الوسط المغذي الصلب Nutrient Agar

ج- السلالات البكتيرية – المستخدمة في الدراسة

السلالة البكتيرية	التركيب الوراثي والصفات المظهرية	المصدر
1- السلالة البكتيرية القياسية *E.coli* HB101	Leu^-, Pro^-, Lac^-, gal^-, Sm^r thi^-, $recA^-$, $hsdR^-$, $hsdM^-$	تم الحصول عليها من قسم التقنيات الاحيائية- كلية العلوم/ جامعة بغداد
2- سلالات بكتيرية استخدمت		تم الحصول عليها من

لغرض التحري عن انتاج البكتريوسين وهي: *Serratia ،Pseudomonas Staphyllococcus aureus E.coli ،Klebsiellia*		مختبرات الاحياء المجهرية كلية العلوم – جامعة بابل

الرموز:-

Leu^-, Pro^-, thi^-:	الحاجة الى الثايمين والبرولين واللايسين
gal^-, Lac^-:	فقدان القابلية على تخمير اللاكتوز والكالاكتوز
$hsdR^-$:	عدم وجود انظمة تقييد
$hsdM^-$:	عدم وجود انظمة تحوير
$RecA^-$:	فقدان نظام اعادة الارتباط
Sm^-:	المقاومة للستربتومايسين

2-1-4 الكواشف

1- كاشف كوفاكس Kovac's indicater

حضر الكاشف بإذابة 10 غم من P-Dimethyl aminobenzaldehyde (DMAB) في 150 مل من amyl alcohol ثم اضيف 50 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز بصورة تدريجية الى المزيج، يخزن المحلول في قنينة معتمة ويرج بلطف قبل الاستعمال.

استخدم هذا الكاشف للكشف عن حلقة الاندول (Macfaddin, 2000).

2- كاشف احمر المثيل Methyl red indicater

حضر الكاشف باذابة 0.1 غم من صبغة احمر المثيل في 300 مل من 95% كحول اثيلي واكمل الحجم الى 500 مل بأستخدام الماء المقطر (Macfaddin, 2000).

3- كاشف فوكاس بروسكاور Voges – Proskauer indicater

حضر وفق ما جاء في (Collee *et. al.*, 1996) وعلى النحو الاتي:

A- كاشف الفانفثول (Alpha- nephthol) الذي حضر باذابة 5غم من المادة في 100 مل من الكحول المطلق.

B- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم الذي حضر باذابة 40غم من المادة في 100مل من الماء المقطر.

4- كاشف الاوكسيديز Oxidase indicater

يحضر الكاشف انياً عند الاستخدام باذابة 0.1 غم من Tetramethyl- P- para phenylene diamine dihydrochloride في 10 مل من الماء المقطر (Baron *et.al.*, 1995) يوضع الكاشف في قنينة معتمة.

استخدم الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الاوكسيدز.

5- كاشف اختبار الكاتاليز Catalase test indicater

حضر الكاشف باذابة 3غم من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في 100 مل من الماء المقطر المعقم وحفظ في قنينة معتمة (Baron *et. al.*, 1995).

استخدم هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم الكاتليز.

6- كاشف اختزال النترات Nitrate reduction indicater

حضر على وفق ما جاء في (Collee *et. al*, 1996) من محلولين:

A- **المحلول الاول**: حضر باذابة 8 غم من حامض السلفونلك Sulfanilic acid في 1000 مل من محلول 5 عياري حامض الخليك Acetic acid.

B- **المحلول الثاني**: حضر باذابة 5 غم من الفا- نفثيل امين (Alpha- naphthyl amine) في 1000 مل من محلول 5 عياري حامض الخليك Acetic acid يمزج قبل الاستعمال حجمان متساويان من كلا المحلولين لتكوين الكاشف.

7- كاشف كلوريد الحديديك ($FeCl_3$)

حضر الكاشف باذابة 10 غم من كلوريد الحديديك في 100 مل من الماء المقطر (Macfaddin, 2000). استخدم هذا الكاشف للكشف عن انزيم Phenyl alanine deaminase.

2-2-1 جمع العينات

1- <u>عينات الدم</u>

سحبت كمية (5) مل من دم المريض بوساطة محقنة طبية معقمة ثم اضيف مباشرة الى قنينة Vial تحتوي على وسط (BHIB) المعقم والحاوي على الهيبارين بنسبة 0.05%، تكون الاضافة بدون فتح الغطاء البلاستيكي للقنينة لمنع حدوث أي تلوث وذلك بإدخال ابرة المحقنة (Needle) في القنينة الزجاجية بعد اختراقها الغطاء البلاستيكي، ثم تسحب المحقنة و يرج الدم مع الوسط الزرعي لتجنب حدوث تحلل كريات الدم الحمر ثم يغلق الغطاء البلاستيكي للقنينة بغشاء

مانع للتسرب (Parafilm) ثم تحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة بعد ذلك تفحص القنينة ويلاحظ حدوث العكورة Turbidity ثم تؤخذ قطرة من الدم الممزوج مع الوسط الزرعي وتوضع على كل من الاوساط الاتية:

وسط اغار الدم، ووسط اغار ماكونكي وتحضن الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة (Koljalg *et. al.*, 1999).

2- عينات الادرار

تجمع عينات الادرار (Mid stream urine) في قناني زجاجية معقمة ثم بوساطة عروة ناقلة نقلت قطرة من الادرار وزرعت على طبق اغار الدم وقطرة اخرى زرعت على طبق ماكونكي وحضنت الاطباق هوائياً بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة.

3- عينات الحروق والجروح Wound specimens

جمعت عينات الحروق وذلك باستخدام مسحات قطنية معقمة سبق ان رطبت بغمسها في انابيب اختبار حاوية على 5مل من وسط نقيع القلب والدماغ (BHIB) ثم تدور المسحات في مكان الحرق وتعاد الى انابيب الاختبار لتحضن هوائياً بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة، ثم يعاد زرعها على وسط اغار الدم واغار ماكونكي لتجري عليها الاختبارات التشخيصية اللازمة.

4- عينات المهبل Vagina specimens

جمعت العينات بنفس بالطريقة المذكورة في فقرة (3).

5- عينات الاذن والبلعوم

جمعت مسحات الاذن (Ear swab) ومسحات البلعوم (Throat swab) واستخدمت الطريقة المذكورة نفسها في جمع العينات في فقرة (3).

2-2-2 الفحوصات الزرعية والمظهرية

تؤخذ مستعمرة واحدة نقية من كل نمو موجود على الاوساط الزرعية الخاصة بالزرع الاولي وتشخص مبدئياً اعتماداً على الصفات الشكلية المتضمنة حجم المستعمرات ولونها وحافاتها وارتفاعها ثم دراسة صفات الخلايا تحت المجهر بعد تصبيغها بطريقة غرام (Gram stain) والمتضمنة شكل الخلايا ولونها وتجمعها.

بعد ذلك يتم تشخيص العزلات اعتماداً على كتاب برجي الخاص بتشخيص البكتريا (Bergy's mannual for determinative bacteriology) (Holt *et. al.*,1994).

وبالاعتماد على ما اشار اليه Collee وجماعته (1996) و(Macfaddin, 2000) حول الطرائق المستخدمة والمواد والاوساط الزرعية المهمة في تشخيص البكتريا.

3-2-2 الفحوصات البايوكيمياوية

1- اختبار الاندول Indol Test

جرى تلقيح وسط ماء الببتون بالبكتريا المراد اختبارها وبعد مدة حضانة 48 ساعة اضيف 0.5مل من كاشف كوفاكس (Kovac's reagent) الى الوسط ورجت الانبوبة بهدوء، تكوّن اللون الاحمر بشكل حلقة دائرية بين الوسط والكاشف الكحولي التي ترتفع الى الاعلى تدل على ايجابية الاختبار (Macfaddin, 2000).

2- الكشف عن انزيم الكاتاليز Catalase Test

تم اجراء الفحص بنقل كمية قليلة من النمو البكتيري النامي على الوسط الزرعي بعمر 24 ساعة بواسطة العيدان الخشبية المعقمة الى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ثم اضيف لها قطرة من 3% بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)، ان ظهور الفقاعات الغازية يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et. al.*,1996).

3- الكشف عن انزيم الاوكسديز Oxidase test

تم اجراء الفحص بنقل كمية من النمو البكتيري بواسطة العيدان الخشبية المعقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف المحضر انياً، تلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجي يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et. al.*, 1996).

4- الكشف عن تخمر السكريات الثلاثية وتكوين غاز (H_2S)

تم التحري عن قابلية البكتريا على تخمير الكاربوهيدرات وانتاج كبريتيد الهيدروجين وذلك بنقل المستنبت الفتي بعمر 24 ساعة الى وسط كلكلر (KIA) Kilger's Iron Agar المائل وتم حضن الوسط بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24 ساعة. ثم تقرأ التغيرات في الدالة الحامضية (pH) في القعر والسطح المائل للوسط، يلاحظ التخمر بوساطة تغير لون الكاشف احمر الفينول من الاحمر الى الاصفر، اما تكون الغاز فيكون غالباً على شكل فقاعات اسفل الوسط الصلب اما البكتريا المنتجة لكبريتيد الهيدروجين فتكون راسب اسود في قعر الانبوب (Macfaddin, 2000).

5- اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

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

6- فحص اختزال النترات Nitrate reduction test

اجري الفحص بتلقيح وسط اختزال النترات بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة 37مْ لمدة 48-96 ساعة وبعد انتهاء فترة الحضن اضيف 1 مل من حامض السلفونيلك الحاوي على كاشف الفانفثول امين والممزوجين بحجوم متساوية والمحضرين انياً قبل الاستعمال ظهور اللون الاحمر خلال 30 ثانية يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et. al.*, 1996).

7- اختبار احمر المثيل Methyl red test

اجـري الفحـص بتلقـيح الانابيـب الحاويـة علـى الوسـط الزرعـي MR-VP Medium بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24-48 ساعة بعد ذلك تتم اضافة 5 قطرات من كاشف احمر المثيل، ان ظهور اللون الاحمر في الانبوية بعد 15 دقيقة يدل على ايجابية الاختبار (Collee *et. Al.*, 1996).

8- فحص الفوكس بروسكور Voges Proskaur test

اجري الفحص بتلقيح الوسط الزرعي MR-VP Medium بالمزروع البكتيري، وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24-48 ساعة بعد ذلك تم اضافة (0.6 من كاشف الفانفثول و0.2 من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم) الى كل انبوبة. ان ظهور اللون الوردي خلال (2-5) دقيقة يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et. al.*, 1996).

9- الكشف عن انزيم اليوريز Urease test

تم تلقيح وسط اليوريا بالمزروع البكتيري ثم حضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة ان تحول الوسط الى اللون الوردي دليل على ايجابية الاختبار.

10- اختبار ازالة مجموعة الكاربوكسيل (COOH) من الاحماض الامينية

اجري هذا الاختبار بتلقيح وسط الحامض الاميني بالمزروع البكتيري المراد فحصه ثم حضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 4 ايام، إن تحول لون الوسط من الازرق الى الاصفر خلال 10-12 ساعة ومن ثم عودة اللون الازرق خلال 24-96 ساعة دلالة على النتيجة الموجبة اما النتيجة السالبة فيستدل عليها ببقاء اللون الاصفر (Collee *et. al.*,1996).

11- الكشف عن انزيم Phenyl alanine deaminase

تم الكشف عن هذا الانزيم بتلقيح الانابيب الحاوية على وسط الفنيل الانين بالمزروع البكتيري، ثم حضنت عند درجة حرارة 37مْ لمدة 2-4 ايام بعد ذلك تتم اضافة بضع قطرات من كاشف كلوريد الحديديك، وان ظهور اللون الاخضر على السطح المائل يدل على النتيجة الموجبة .

4-2-2 اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحياتية بطريقة الاقراص

استخدم الوسط الزرعي مولر- هنتون لاجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية بأستخدام اقراص جاهزة من المضادات الحيوية التي جهزتها شركة Oxiod

وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة، اذ تم زرع البكتريا في الوسط بطريقة التخطيط ثم وضع القرص على سطح الطبق وسجلت النتائج على وفق قطر الهالة التي تعطي دلالة على منع النمو(الكرخي، 1995)، واعتماداً على المسافات القياسية لقطر الهالة التي تتوافر في النشرات التي زودت من الشركة المنتجة لهذه المضادات.

5-2-2 اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية على الوسط الزرعي الصلب

حضر وسط الاغار المغذي ووزع في دوارق وعقم بالموصدة بعدها برد لدرجة 50مْ، ثم اضيف واحد من أي من محاليل المضادات الحيوية المحضرة سابقاً وبالتراكيز المذكورة في الفقرة (2-1-3) وباستخدام الوسط الزرعي الصلب وعلى وفق ما اورده Maniatis وجماعته (1982) تصب اوساط المضادات الحيوية في اطباق معقمة وتركت لتتصلب ثم تزرع العزلات البكتيرية على هذه الاوساط بطريقة Pick and Patch، تحضن الاطباق بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة ثم تقرأ النتائج في اليوم التالي وتحدد العزلات المقاومة التي تستطيع النمو على اوساط المضادات الحيوية والعزلات الحساسة التي لاتستطيع النمو على هذه الاوساط.

6-2-2 التحري عن انتاج البكتريوسين Bacteriocin Production

اتبعت طريقة Abbot and Shannon (1958) التي طورها Abbot and Graham (1961) التي تعتمد على ملاحظة عدم نمو بعض السلالات الحساسة او الدالة للبكتريوسين الذي تنتجه سلالات اخرى على النحو الاتي:

1. زرعت السلالة المراد التحري عن قابليتها في انتاج البكتريوسين بشكل خط طولي على وسط Tryptic Soy Agar (TSA) وحضنت بدرجة 37مْ لمدة يومين لفسح المجال امام البكتريوسين بالانتشار حول الخط الزرعي.
2. زرعت في اليوم الثاني السلالات الدالة او الحساسة على وسط الاغار المغذي وحضنت بدرجة 37مْ الى اليوم اللاحق.
3. في اليوم الثالث اشبعت ورقة ترشيح بالكلوروفورم ووضعت تحت غطاء الطبق الحاوي على وسط (TSA) وقلب الطبق لمدة نصف ساعة ثم ازيل النمو البكتيري من الوسط الزرعي بأستعمال شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة وعرض الطبق وما يحويه من

البكتريوسين الى ابخرة الكلوروفورم مرة اخرى بعدها ترك الطبق مفتوحاً لمدة ساعة واحدة للتخلص من الكلورفورم.

4. زرعت السلالات الدالة او الحساسة المنماة على وسط الاغار المغذي عرضياً على وسط TSA بحيث تكون عمودية على الخط الزرعي للسلالة المراد معرفة قابليتها على انتاج البكتريوسين وحضنت بدرجة 37مْ الى اليوم التالي اذ سجل قطع النمو الحاصل لبعض السلالات الدالة بفعل البكتريوسين المنتج.

2-2-7 التحري عن المحفظة البكتيرية Capsule

تم الكشف عن احتواء عزلات بكتريا *Acinetobacter* على المحفظة بأستخدام طريقة التصبيغ السالب capsule staining على وفق ما شار اليه Cruickshank وجماعته (1975):

1. حضرت مسحة من عالق البكتريا ووضعت على شريحة زجاجية بدون تثبيت. ثم تركت الشريحة لتجف.
2. تعرض الشريحة الى 1% من محلول الكريستل البنفسجي بحيث يغطي الشريحة كاملةً وفي مدة زمنية مقدارها 4 دقائق.
3. تغسل الشريحة بمحلول 20% كبريتات النحاس.ثم تترك لتجف ثم تفحص تحت المجهر.
4. تكون هالة شفافة حول المستعمرة دليل على ايجابية الاختبار

2-2-8 تعيين مستضدات عوامل الاستعمار او الاستيطان

1- التحري عن عامل الاستعمار الاول (CAF/I)

تم استخدام طريقة تلازن كريات الدم الحمراء بوجود سكر المانوز لاختبار وجود مستضدات عامل الاستعمار الاول (CFA/I) في العزلات البكتيرية. زرعت السلالات على وسط Tryptic Soy Agar وحضنت الاطباق بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة.

حضر عالق كريات الدم الحمراء للانسان من فصيلة (A) وذلك بغسل هذه الكريات بعناية ثلاث مرات بأستخدام دارئ الفوسفات الفسيولوجي Phosphate Buffer Saline المعقم والمحضر سابقاً كما هو مذكور في الفقرة (2-1-3-1) وحضر بعدها عالق 3% (حجم/ حجم) من كريات الدم الحمراء.

حضر عالق البكتريا بأخذ نصف النمو البكتيري ولكل سلالة من على سطح وسط Tryptic Soy Agar والموجود في طبق بتري قطره 90 ملمتر وخلط جيداً في مللتر واحد

من 0.15 مولار NaCl ولغرض تعيين فحص تلازن كريات الدم الحمراء والتحري عن وجود مستضد عامل الاستعمار الاول، تخلط على شريحة زجاجية نظيفة جداً (وعلى جهة واحدة منها) قطرة واحدة (10 مايكروليتر) من عالق خلايا البكتريا مع قطرة واحدة من محلول 0.1 مولار D-Mannose في 0.15 مولار NaCl، وعلى الجهة الثانية من الشريحة نفسها، تخلط قطرة من عالق خلايا البكتريا نفسها مع قطرة من عالق كريات الدم الحمراء وقطرة من محلول 0.15 مولار NaCl بدون سكر المانوز. ثم يلاحظ حدوث تلازن كريات الدم الحمراء على جهة الشريحة في درجة حرارة الغرفة وخلال نصف دقيقة الى دقيقتين. (Symth, 1982).

2- التحري عن عامل الاستعمار الثاني (CFA/II)

ولتعيين مستضدات عامل الاستعمار الثاني تتبع الخطوات نفسها السابقة باستبدال دم الانسان (صنف A) بدم الدجاج اذ ان عامل الاستعمار الثاني يسبب تلزن كريات الدم الحمراء للدجاج والابقار (الزعاك، 1994).

3- التحري عن عامل الاستعمار الثالث (CFA/III) بوجود حامض التانيك

تم استخدام طريقة تلازن كريات الدم الحمراء بوجود حامض التانيك Tannic acid لاختبار وجود العامل الثالث (CFA/III) في السلالات البكتيرية.

زرعت السلالات على وسط (Tryptic Soy Agar) وحضنت الاطباق بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة.

حضر عالق كريات الدم الحمراء للانسان من فصيلة (A) وذلك بغسل هذه الكريات بعناية ثلاث مرات باستخدام Phosphate buffer saline (0,1 مولار) المعقم، وحضر عالق 3% (حجم/ حجم) من كريات الدم الحمراء.

حضر عالق البكتريا بأخذ نصف النمو البكتيري ولكل سلالة من على وسط Tryptic Soy Agar والموجود في طبق بتري وخلط جيداً في مللتر واحد من محلول 0.15 مولار NaCl. ولغرض تعيين فحص تلازن كريات الدم الحمراء وبالتالي احتمال وجود مستضد عامل الاستعمار الثالث. تخلط على شريحة زجاجية نظيفة (وعلى جهة واحدة منها) قطرة واحدة (10 مايكروليتر) من عالق كريات الدم الحمراء للانسان مع قطرة واحدة من محلول 0.1 مولار Tannic acid في 0.15 مولار NaCl وعلى الجهة الثانية من الشريحة نفسها تخلط قطرة من عالق البكتريا مع قطرة من عالق كريات الدم الحمراء وقطرة

من محلول 0.15 مولار NaCl بدون حامض التانيك ثم يلاحظ حدوث تلازن كريات الدم الحمراء على جهة الشريحة في درجة حرارة الغرفة خلال نصف دقيقة الى دقيقتين.

9-2-2 التحري عن انتاج الهيمولايسين البكتيري Haemolysin Production

حضر وسط اغار الدم ووزع في اطباق بتري معقمة وحضن بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم وجود تلوث، ثم زرعت السلالات جميعها لمعرفة قابليتها على انتاج الهيمولايسين وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة ثم قرأت النتائج التي تعتمد على ظهور او عدم ظهور مناطق تحلل (هالة شفافة) تحيط بمستعمرات البكتريا (De Boy *et. Al.*, 1980).

10-2-2 التحري عن انتاج السايدرفور Siderophores Production

حضر الوسط الملحي M9 المضاف اليه 2% اغار وعقم بالموصدة ثم برد الى درجة حرارة 50مْ، أ ضيف اليه 0.25 سكر الكلوكوز المعقم بالترشيح كما أضيف dipyridyl (200 مايكرومول) على وفق ما اشار اليه Nassif وجماعته (1989)، ثم فحصت قابلية العزلات البكتيرية على النمو بوجود dipyridyl وحضنت بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة وسجلت النتائج على اساس وجود النمو (+) وعدم وجود النمو (-).

11-2-2 التحري عن انتاج الانزيمات الخارجية المحللة للبروتين Extracellular Proteases Production

تم التحري عن انتاج الانزيمات المحللة للبروتين بأستخدام وسط M9 الصلب المضاف اليه 2% اغار الذي عقم بالموصدة، بعد ذلك يتم تبريد الوسط لغاية 50مْ ثم اضيف اليه 0.2% سكر الكلوكوز المعقم بالترشيح باستخدام مرشحات دقيقة كما دعم الوسط بالجيلاتين 1% ووزع في اطباق معقمة، بعد ذلك زرعت الاطباق بالسلالات البكتيرية بطريقة (Pick and Patch) gوبعد مدة حضن 24-48 ساعة وبدرجة حرارة 37مْ، اضيف لكل طبق 3مل من 5% حامض الخليك الثلاثي الكلور (Trichloroacetic acid) لغرض ترسيب البروتين غير المتحلل والكشف عن المناطق الشفافة حول المستعمرة والذي يدل على ايجابية الاختبار (Piret *et. al.*,1983).

12-2-2 تأثير حامض الساليسيلك على النمو البكتيري

درس تأثير الحامض على وفق ما اشار اليه (Domenico *et. el.*,1989) وكما يأتي:

1. حضرت تراكيز مختلفة من الحامض من التركيز الاصلي المحضر مسبقاً (محلول 10 من الفقرة 2-1-3-1) وهي كما يأتي: 10 مايكروغرام/ مل، 20 مايكروغرام، 40مايكروغرام/ مل، 60 مايكروغرام/ مل، 80 مايكروغرام/ مل، 100مايكروغرام/مل.
2. تم تهيئة وسط (M9) ووزع في انابيب معقمة تحوي كل انبوبة 10 مل من الوسط وقد دعم الوسط بـ 0.1% كلوكوز ثم اضيف كلوريد الكالسيوم بتركيز نهائي 0.054مايكروغرام/ مل وكذلك كلوريد المغنيسيوم بتركيز نهائي 2.4 مايكروغرام.
3. اضيف حامض الساليسيلك الى الانابيب الحاوية على الوسط بحيث يكون التركيز النهائي على وفق ما اشير اليه في الفقرة (1) تم تلقيح الانابيب بنقل 0.1 مل من المزروع البكتيري وتحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة، ولقحت انابيب لاتحتوي على أي تركيز من الحامض (سيطرة موجبة) واخرى بدون تلقيح (سيطرة سالبة).
4. تقرأ نتائج مقدار الامتصاص على طول موجي 600 نانوميتر.

13-2-2 عزل الدنا البلازميدي Plasmid DNA Isolation

اتبعت طريقة التحلل بالقاعدة (Alkaline lysis)(Brinboim & Dolly, 1979) وتضمنت هذه الطريقة الخطوات الاتية:

1. تم نشر الخلايا البكتيرية على طبق يحتوي الوسط المغذي الصلب وذلك لغرض الحصول على مستعمرات منفردة تؤخذ مستعمرة بكتيرية بوساطة عروة ناقلة لتلقيح 10 مل من وسط لوريا السائل وتحضن في حاضنة هزازة لمدة 18 ساعة بدرجة37مْ.
2. رُسب عالق الخلايا بجهاز النبذ المركزي بسرعة 8000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق.
3. علق راسب الخلايا في 0.1 مل من محلول 15% سكروز ووزع العالق في انابيب ابندروف معقمة.
4. أضيف 0.2 مل من محلول 1% SDS القاعدي مع قلب الانبوبة مرتين وبهدوء ثم تترك لمدة 5 دقائق في حمام ثلجي.

5. أضيف 0.15 مل من محلول 5 مولار خلات البوتاسيوم المبرد لدرجة الانجماد ثم تقلب الانبوبة عدة مرات وتترك بعدها لمدة 5 دقائق في حمام مائي ثلجي.
6. نبذ الخليط مركزياً بجهاز النبذ المركزي نوع ابندروف بمعدل 12000 دورة/ دقيقة ولمدة 5 دقائق.
7. نقل الراشح الى انبوب ابندروف جديد ومعقم وعومل مع دارئ الفينول – كلوروفورم ومزج جيداً ثم نبذ مركزياً بسرعة 12000 دورة/ دقيقة لمدة 2 دقيقة.
8. نقلت الطبقة العليا الى انبوب ابندروف حديد واضيف اليها ضعفي الحجم من الايثانول المطلق مزجت جيداً وتترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعة بعدها نبذ الخليط مركزياً بجهاز النبذ المركزي نوع ابندوف بمعدل 12000 دورة/ دقيقة لمدة عشر دقائق.
9. تم التخلص من الكحول الاثيلي المطلق وغسل الراسب بملي لتر واحد من 70% كحول اثيلي مبرد. ثم نبذ مركزياً بسرعة 12000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق.
10. ازيل الكحول الاثيلي 70% وتركت الانابيب بوضع مقلوب على ورق نشاف في درجة حرارة الغرفة لكي تجف.
11. اذيب الراسب في 50 مايكروليتر من دارئ TE وحفظت عند درجة حرارة (–20مْ) لحين الاستخدام.

14-2-2 الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي على هلام الاغاروز Agarose gel electrophoresis

اتبعت الطريقة التي وصفها Sambrook وجماعته (1989)، اذ تعد عملية امرار تيار كهربائي خلال هلام الاغاروز واحدة من الطرائق المستخدمة لفصل خليط من قطع الدنا ذات الاوزان الجزيئية المختلفة زيادة على ان هذه التقنية تسهل عملية حساب موقع او مكان الدنا في الهلام بصورة مباشرة. تبدأ عملية تحضير الهلام باذابة 0.7 غم من الاغاروز في 100 مل من دارئ (1X TBE) وتتم الاذابة باستخدام حمام مائي بدرجة (100مْ) وبرد بعد ذلك الى درجة (50مْ) ثم أضيف اليه 10 مايكروليتر من محلول 5 ملغم/ مل من صبغة بروميد الاثيديوم، تحضر صفيحة اسناد الاغاروز (Tray) وتحاط حافاتها بشريط لاصق وبشكل جيد لمنع تسرب الهلام الذائب بعد صبه. يصب الاغاروز بكمية مناسبة ثم يغمس مشط تكوين الحفر (Comb) قرب احدى نهايتي الصفيحة، ويترك ليتصلب لمدة نصف ساعة، يرفع مشط تكوين الحفر من الاغاروز المتصلب ويرفع الشريط اللاصق

ثم تثبت الصفيحة على مساندها في وحدة الترحيل ثم يغطي هلام الاغاروز بارتفاع واحد مللتر بدارئ TBE . تبدأ عملية اضافة نماذج الدنا في حفر الهلام اذ يمزج 10 مايكروليتر من الدنا البلازميدي مع 3 مايكروليتر من محلول صبغة البروموفينول الازرق (Loading buffer) ثم يُنزل مزيج الدنا والصبغة في حفر الاغاروز وتبدأ بعد ذلك عملية الترحيل الكهربائي الذي تختلف متطلباته تبعاً لنوع الدنا وحجمها، اذ استخدم فرق جهد واطئ 6 فولت/ سم وبمعدل مرور للتيار 20 ملي امبير ولمدة زمنية 1-2 ساعة بعد ذلك يتم تقصي الحزم المصبوغة للدنا البلازميدي بعد كشفها بالاشعة فوق البنفسجية.

15-2-2 التحول البكتيري (Tranformation)

تم اجراء تجارب التحول البكتيري وذلك بإتباع طريقة (Tsai *et. al.*, 1989)

أ- تحضير الخلايا المؤهلة Preparation of Competent Cells

1. تم زرع السلالة المستلمة غير المحتوية على البلازميد في 5 مل من وسط مستخلص القلب والدماغ السائل (Brain Heart Infusion Broth) وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة.
2. لقح دورق حاوي على 50 مل من الوسط السائل SOB بالمزروع البكتيري وحضن في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 37مْ حتى تصل الكثافة الضوئية للنمو (0.2 تقريباً) على طول موجي 510 نانومتر.
3. نبذ بعد ذلك المزروع البكتيري مركزياً في خمسة انابيب سعة (10 مل) بمعدل 5000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4مْ.
4. أعيد التعليق لكل انبوب (الراسب فقط) في 10 مل من محلول 0.1 مولر كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) المعقم والمبرد لدرجة 4مْ كررت العملية ورسبت الخلايا وعلقت مرة اخرى باضافة 2 مل من محلول كلوريد الكالسيوم المبرد.
5. جمعت الخلايا المعلقة في انبوب واحد وحفظت بدرجة حرارة 4مْ ويفضل تركها لليوم اللاحق لتكون جاهزة لعملية التحول.

ب- خطوات عملية التحول البكتيري

1. حضر أنبوبتين ابندروف معقمة ونقل 0.2 مل من الخلايا المؤهلة لكل انبوب.

2. أضيف الى الانبوب الاول (10) مايكروليتر من الدنا البلازميدي المطلوب نقله والمحضر سابقاً ثم أضيف للانبوب الثاني دارئ TE (سيطرة سالبة) مزج الخليط بهدوء وترك في حمام مائي ثلجي لمدة 30 دقيقة.
3. نقلت الانابيب مباشرةً بعد انتهاء مدة الحضن الى حمام مائي درجة حرارته 42 ولمدة 90 ثانية لعمل صدمة حرارية، بعد ذلك نقلت مباشرةً الى حمام ثلجي لمدة 1-2 دقيقة.
4. أضيف بعد ذلك الى كل انبوب 0.8 مل من وسط SOC السائل وحضنت في حمام مائي بدرجة حرارة 37مْ لمدة 90 دقيقة.
5. تم نشر 0.1 مل من مزروع الخلايا المتحولة على الاوساط الزرعية الصلبة من وسط SOB الصلب وحضنت بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة.
6. للتأكد من ثبوت البلازميدات المتنقلة في الخلايا المتحولة واستمرار توارثها تتم اعادة التقاط المستعمرات الناتجة وزرعها على الوسط الزرعي الانتقائي مع وجود سيطرة سالبة وموجبة. حضنت الاطباق بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة.

16-2-2 الاقتران البكتيري في الوسط الصلب

1. نميت الخلايا المستلمة في احد جهات الطبق المحتوى على الوسط المغذي فقط وفي الجهة المقابلة نميت البكتريا الواهبة *E.coli* HB101 وفي وسط الطبق مزجت الخلايا المستلمة والواهبة وحضنت بدرجة حرارة˚37م لمدة 24 ساعة.
2. علق مزيج الخلايا الواهبة والمستلمة في محلول التخفيف الفسلجي ثم نشر 0.1مل منه في الوسط الانتقائي المحتوى على المضادين احدهما المضاد المميز للسلالة المستلمة والاخر المضاد المميز للسلالة الواهبة، وذلك لغرض تنمية الخلايا المقترنة فقط وحضنت الاطباق بدرجة حرارة˚37م لمدة 24-48 ساعة وبعدها تم احتساب عدد الخلايا المقترنة.
3. ولضمان ثبوت البلازميدات المنتقلة واستمرار توارثها فقد تم اعادة تنمية المستعمرات الناتجة وزرعها في الوسط الانتقائي نفسه وحضنت الاطباق بدرجة حرارة˚37م لمدة 24 ساعة لتحديد المستعمرات المكتسبة للبلازميد فعلاً (الجيلاوي، 2000).

17-2-2 تحييد البلازميدات(Plasmid curing)

2-2-17-1 التحييد بأستخدام SDS

1. حضرت تراكيز نهائية من الـ SDS المذابة في وسط L.broth هي 1%، 1.5%، 2%، 4%، 8% من الـ SDS في وسط L.broth، ووزعت في انابيب معقمة، ثم لقحت الانابيب بنقل (0.1) مل من المزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.
2. حضنت الانابيب الحاوية على الوسط بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة، ثم لوحظ كثافة النمو للخلايا المعاملة ومقارنتها بالخلايا غير المعاملة لتحديد التركيز المثبط الادنى للـ SDS (الجيلاوي ،2000)
3. بعد مقارنة كثافة النمو في الانابيب ينشر 0.2 مل من مزروع السيطرة والمزروع المعامل بـ SDS وبتراكيز اوطأ او مقاربة للتركيز المثبط الادنى على وسط اغار المغذي الذي حضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة.
4. قارن العدد الحي للخلايا في مجموعتي السيطرة والمعاملة. وتم اختيار تراكز الـ SDS التي تسبق التركيز المثبط الادنى لاختبار التحييد.
5. وبعد تعريض الخلايا الى عوامل التحييد وعزل المستعمرات النامية على الاغار المغذي تم التحري عن الخلايا المحيدة بأنتخاب (100) مستعمرة ونقلت جميعها بوساطة عيدان خشبية وبطريقة (Pick and Patch) الى اوساط الاغار المغذي المضاف له المضاد الحياتي الملائم.
6. كررت العملية نفسها للسلالات جميعها ولكن باستخدام الاغار المغذي المضاف له المضاد الحياتي الملائم ثم لوحظ النمو للمستعمرات المنقولة فعند عدم ظهور النمو على الوسط المضاف له المضاد وظهوره في الوسط الخالي يعني ان الخلية فقدت صفة المقاومة لذلك المضاد.

2-2-17-2 التحييد باستخدام حامض السالسيلك

Curing with Salicylic acid

حضرت بحسب ما جاء في السعيد (1997):

1. حضرت تراكيز (10، 20، 40، 60، 80، 100، 200) مايكروغرام/ مل من حامض السالسيلك.
2. هيأ وسط L-broth ووزع في انابيب معقمة تحوي كل انبوبة 10 مل في الوسط.

3. اضيف حامض السالسيلك الى الانابيب الحاوية على الوسط بحيث يكون التركيز النهائي حسب التراكيز السابقة في (1).
4. لقحت الانابيب بنقل (0.1) مل من المزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37مْ مدة 24 ساعة.
5. يعين التركيز المثبط الادنى للحامض عند التركيز الذي ينعدم فيه النمو، ثم بعد ذلك يتم نشر 0.2 من التراكيز القريبة او الاوطأ من التراكيز المثبط الادنى للنمو على وسط الاغار المغذي اذ يحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة.
6. بعد ذلك يتم التحري عن الخلايا المحيدة بانتخاب 100 مستعمرة معاملة بالحامض ونقلت الى اوساط الاغار المغذي المضاف له المضاد الحيوي الملائم بوساطة عيدان خشبية وبطريقة (Pick and Patch) وتحضن لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37مْ.
7. لوحظ النمو للمستعمرات المنقولة فعند عدم ظهور النمو على وسط المضاف له المضاد وظهوره في الوسطٍ الخالي يعني ان الخلية فقدت صفة المقاومة لذلك المضاد.

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

3-1 العزل والتشخيص Isolation & Characterization

تم عزل وتشخيص (11) عزلة عائدة لبكتريا *Acinetobacter* من مجموع (175) عينة مأخوذة من المرضى المراجعين والراقدين لمستشفيات مدينة الحلة، وقد اخذت العينات من ردهات العناية المركزة وردهات الجراحة البولية وردهات الحروق، وقد اظهرت نتائج العزل الحالية (جدول رقم 3) ان اعلى نسبة للعزل قد تم الحصول عليها من المرضى الذين يعانون من التهاب المجاري البولية، اذ تم الحصول على (6) عزلات من مجموع (80) عينة ادرار أي بنسبة (3.4%) وهي بذلك تقارب الى حد ما النسبة التي توصل لها Wise & Toslini (1990) اذ كانت النسبة تشكل 5%.

اضافة الى ذلك تم عزل وتشخيص عزلتين من بكتريا *Acinetobacter* من اصابات الحروق (1,1%)، وعزلة واحدة من حالات انتان الدم (0.6%) وعزلة واحدة من كل من مسحات المهبل والبلعوم (0.6%) حيث نلاحظ ان معدل انتشار هذه البكتريا في الدم يكون قليلاً نوعاً ما، وهذا قد يعود الى الحاجة في آخذ عينات دم اكثر لغرض العزل (Jone *et. al.*, 1997).

ولوحظ ان معدل انتشار هذه البكتريا قليل اذا ما قيست بباقي الانواع البكترية الأخرى، حيث تختلف النسب المئوية لعزل هذه البكتريا من باحث لاخر لاسباب عديدة منها وقت جمع العينات والاختلاف في عدد العينات المأخوذة والتباين في طرق التشخيص المتبعة.

جدول (3) توزيع العزلات حسب نوع العينة

العينات	عدد العينات	عدد عزلات بكتريا *Acinetobacter*
عينات الدم	22	1
عينات الادرار	80	6
مسحات الحروق	22	2
مسحات المهبل	21	1
مسحات الاذن	30	1
المجموع	175	11 عزلة

وعند مقارنة النتائج المستحصلة في دراستنا الحالية بالنتائج المستحصلة في مدينة بغداد نجد ان هناك تقارب في معدل انتشار هذه البكتريا، ففي داسة اجريت في بغداد تم عزل 18 عزلة من بكتريا *Acinetobacter* من مجموع 386 عينة (الامارة، 2000)، وفي دراسة اخرى في نفس المكان تم عزل 17 عزلة من بكتريا *A.baumannii* من مجموع 217 عينة (الكرخي،2001).

واذا ما قيست النتائج المستحصلة محلياً مع النتائج المستحصلة في الدول المجاورة فقد وجد ان نسبة الاصابة بهذه البكتريا بين مرضى وحدات العناية المركزة في مستشفيات الاردن تقارب الى 28% (Shehabi & Baadran, 1996).

وفي دراسة اخرى تم عزل 45 عزلة (9%) من بكتريا *Acinetobacter* من مجموع (425) عينة واجريت هذه الدراسة في الهند (Prashanther,2000).

واشار Quentin وجماعته (1997) ان نسبة عزل هذه البكتريا تكاد تكون قليلة اذا ما قيست بباقي المسببات المرضية الاخرى اذ بلغت نسبة العزل (3%).

اما الدراسات التي اجراها Go وجماعته (1994) فكانت نسبة عزل بكتريا *Acinetobacter* والمعزولة من مسحات الحروق والجروح قد بلغت 12%.

وفي دراسة اخرى قام Jarlier وجماعته (1996) بعزل بكتريا *Acinetobacter* من اصابات عدوى المستشفيات وكانت نسبة العزل هي (9%).

علماً بأن العزلات المستحصلة في هذه الدراسة قد شخصت بالاعتماد على الاختيارات الزرعية والتشخيصية والبايوكيميائية (كما في جدول رقم 4) وحسب ما جاء في كتاب برجي الخاص بتشخيص البكتريا.

(Macfaddin, 2000 ; Colle *et.al.*, 1996 ; Holt *et.al.*, 1994).

تمتاز بكتريا *Acinetobacter* عند نموها على وسط اغار ماكونكي بتكوينها مستعمرات صغيرة شاحبة اللون، غير مخمرة لسكر اللاكتوز، ولتمييزها عن بكتريا العائلة المعوية غير المخمرة لسكر اللاكتوز نميت على وسط اغار الكلكلر (KAI) اذ تنمو هذه البكتريا على سطح الاغار ولاتنمو في قعره.

اما عند نموها على وسط اغار الدم فإنها تكون مستعمرات محدبة، رصاصية الى بيضاء اللون يتراوح قطرها ما بين (2-3) ملم وتكون غير حالة للدم بإستثناء الجنس *A.heamolyticus* الذي يكون حالاً للدم (Baron *et. al.*, 1994).

وكذلك استطاعت العزلات المعزولة من النمو جيداً على جميع الاوساط الزرعية المستخدمة لتنميتها، وكان افضل نمو لها على وسط اغار مستخلص القلب والدماغ (BHIA) (Brain Heart Infusion Agar) وهذا يتفق مع ما ذكره Kaul وجماعته (1996) بأن افضل نمو لبكتريا *Acinetobacter* هو على وسط اغار مستخلص القلب والدماغ.

جدول (4) نتائج الاختبارات التشخيصية والبايوكيميائية لبكتريا *Acinetobacter*

التسلسل	الاختبارات	النتيجة
.1	النمو على اغار ماكونكي	+
.2	تخمر سكر اللاكتوز	-
.3	النمو على اغار الدم	+
.4	تحلل كريات الدم الحمر	-
.5	استجابة الخلايا لملون غرام	-
.6	شكل الخلايا على الشريحة	Diplococci, Coccobacillary
.7	اختبار الكاتالاز	+
.8	اختبار الاوكسديز	-
.9	النمو على وسط KIA	Alkaline/ No change
.10	انتاج غاز H_2S	-
.11	فحص الاندول	-
.12	فحص اليوريز	-
.13	فحص .MR	-
.14	فحص VP	-
.15	فحص استهلاك السترات	+
.16	فحص اختزال النترات	-
.17	فحص ازالة مجموعة كاربوكيسل من اللايسين	-
.18	فحص Phenylalanine deaminase	-

3-2 تأثير بعض المضادات الحياتية على العزلات البكتيرية:

تم اختبار تأثير بعض المضادات الحياتية على السلالات المعزولة من بكتريا *Acinetobacter* وقد اظهرت نتائج فحص الحساسية تبايناً واضحاً في نمط المقاومة كما اظهرت معظم العزلات مقاومة لواحد او اكثر من تلك المضادات. ومما يبدو واضحاً من الجدول رقم (5) ان العزلات البكترية كانت مقاومة لكل من الكاربنسلين (بنسبة 100%) والببرايسيلين بنسبة (90.9%) الذين يعودان الى مجموعة البيتا لاكتام. وهي بذلك تتفق مع النتيجة التي توصل لها Shah وجماعته (2000) في قابلية بكتريا *Acinetobacter* على مقاومة المضاد الحياتي الكاربنسلين والببراسيللين بنسبة عالية وذلك من خلال انتاج انزيمات β-lactamase التي لها تأثير مثبط لعمل المضاد الحياتي.

وبين Sader وجماعته (1999) ان مقاومة بكتريا *Acinetobacter* الى المضاد الحياتي الكاربنسلين والببراسيللين تكون عالية جداً وهي بذلك تطابق ما تم التوصل اليه في الدراسة الحالية.

كذلك لوحظ ان بعض عزلات بكتريا *Acinetobacter* اظهرت مقاومة للمضاد الحياتي الامبسلين اذ بلغت نسبة المقاومة (63.6%) علماً بأن الامبسلين يعود الى نفس المجموعة السابقة، وهي بذلك تطابق ما توصل اليه Silva وجماعته (2000) في ان بكتريا *Acinetobacter* المعزولة من اصابات الحروق والادرار والاصابات التنفسية كانت مقاومة بشكل معتدل الى المضاد الحياتي الامبسلين اذا ما قيست بالسيفالوسبورنيات التي تعود الى نفس المجموعة.

واشار Kumarasinghse (1992) الى نفس الملاحظة حول مقاومة عزلات هذه البكتريا الى الامبسيلين.

في حين لاحظ Gerner-Smidt (1993) ان بعض عزلات بكتريا *Acinetobacter* تكون حساسة الى المضاد الحياتي الامبسيلين.

وعند دراسة تأثير الكلورامفينكول لوحظ ان 90.9% من عزلات بكتريا *Acinetobacter* مقاومة له، هذا يتفق مع ما ذكره Lang وجماعته (1992) في ان بكتريا *Acinetobacter* تقاوم هذا المضاد بإمتلاكها الجينات المعبرة عن انزيم ناقل استيل الكلورامفينكول Chlormphenicol acetyl transferase الذي يعطل عمل المضاد الحياتي المثبط للبكتريا.

واشار(De & Deodhar., 1997) الى ان بكتريا *Acinetobacter* تكون مقاومة بشكل كبير الى المضاد الحياتي الكلورامفينكول لنفس السبب السابق.

ومن المعروف ان هذا المضاد يندر استخدامه في العراق في علاج الاصابات المختلفة وذلك لتأثيراته الجانبية ومع ذلك، اظهرت عزلات *Acinetobacter* مقاومة كبيرة لهذا المضاد مما يؤكد امتلاكها لاليات متعددة لاظهار صفة المقاومة.

كذلك تم استخدام مضادات حياتية تعود الى مجموعة الامينوكلايكوسيدات وهي: الجنتمايسين، والاميكاسين، والستربتومايسين، والارثيرومايسين، والتراي مثبريم، اذ بلغت نسبة المقاومة الى الجنتمايسين (90.9%) اما نسبة مقاومته الى الاميكاسين فكانت (100%) وهي بذلك توافق ما بينه Prashanth وجماعته (2000) في ان نسبة مقاومة بكتريا *Acinetobacter* الى المضاد الحياتي الجنتمايسين تصل الى (96%).

وقد بين Guardabassi وجماعته (1999) ان نسبة مقاومة بكتريا *Acinetobacter* الى المضاد الحياتي الاميكاسين هي (27%) وهي بذلك تختلف عن النتيجة التي تم التوصل لها، في حين لاحظ Echeverria وجماعته (1997) ان هذه البكتريا تكون مقاومة بنسب عالية لكل من المضاد الحياتي الاميكاسين والجنتماسين اذ بلغت نسبة المقاومة (79% و73% على التوالي).

في حين بلغت نسبة المقاومة للستربتومايسين (90.9%) والاريثرومايسين وكذلك الترايمبثرم نسبة (72.7%)، وهي تطابق ما توصل له Barsic وجماعته (1997) في مقاومة بكتريا *Acinetobacter* الى المضادات الحياتية المذكورة آنفاً.

وبين Riley وجماعته (1996) ان مقاومة بكتريا *Acinetobacter* الى مجموعة الامينوكلايكوسيدات يكون نتيجة الاستخدام المفرط لهذه المضادات مما ادى اى ظهور سلالات مقاومة لهذا النوع من المضادات.

وتتفق النتائج السابقة مع ما ذكره Gould & Milne (1997) في مقاومة *Acinetobacter* الى المضادات الحياتية من مجموعة الامينوكلايكوسيدات، وذكر Liu وجماعته (1997) ان قابلية بكتريا *Acinetobacter* على مقاومة المضادات الحياتية من مجموعة الامينوكلايكوسيدات تتراوح ما بين (69%-85%).

كما استخدمت بعض المضادات التابعة الى مجموعة الكونيولات مثل حامض النالديكسك (Nalidixic acid) والسبروفلوكساسين (Ciprofloxacin) التي تستخدم حالياً بدرجة كبيرة في المستشفيات، وكانت هذه المضادات ذات تأثير كبير على بكتريا *Acinetobacter*، اذ ان البكتريا اظهرت حساسية كبيرة اتجاه هذين المضادين وبنسب عالية (82% و91% على التوالي). وتتفق هذه النتائج مع ما اشارت اليه بعض الدراسات حول حساسية بكتريا *Acinetobacter* الى مجموعة الكونيولات.

ففي دراسة اجريت في العراق اشارت الامارة (2000) الى ان بكتريا *Acinetobacter* تكون حساسة بشكل كبير الى كل من المضاد الحياتي حامض النالديكسيك والسبروفلوكساسين وهي تتفق مع ما تم التوصل اليه في الدراسة الحالية.

في حين اوضح Husni (1999) ان بكتريا *Acinetobacter* تكون مقاومة الى المضاد الحياتي السبروفلوكساسين وهي بذلك تخالف ما تم التوصل اليه في هذه الدراسة.

كما بينت بعض الدراسات ان بكتريا *Acinetobacter* تكون حساسة الى مجموعة Quinolones وان المضاد الحياتي السبروفلوكساسين يمثل المضاد الاكثر فعالية للقضاء عليها (Seifert *et. al.*, 1993; Baron *et.al.* 1994).

وقد اكد Acar وجماعته (1993) ان بكتريا *Acinetobacter* المسببة لاصابات عدوى المستشفيات تكون حساسة بشكل كبير الى مجموعة الكونيلات اذ تراوحت نسبة حساسية هذه البكتريا الى حامض النالديكسيك والسبروفلوكساسين (97-100%).

ومما يبدو واضحاً ان الاجيال الجديدة من المضادات الحياتية تكون اكثر فاعلية من الاجيال القديمة، وذلك لعدم شيوع استخدامها في الاصابات المختلفة وعدم ظهور مقاومة لها من قبل الانواع البكتيرية.

وعند دراسة تأثير المضاد الحياتي التتراسيكلين على عزلات بكتريا *Acinetobacter* لوحظ ان هناك عزلات حساسة لهذا المضاد وبنسبة (60.9%) في حين ظهرت سلالات قليلة مقاومة له (36.1%)، وهذا لايتفق مع ما ذكره العديد من الباحثين اذ اشاروا الى المقاومة العالية لسلالات بكتريا *Acinetobacter* اتجاه هذا المضاد، فقد بينت الامارة (2000) ان بكتريا *Acinetobacter* تكون مقاومة الى المضاد الحياتي التتراسكيلين،

وبين Marques جماعته (1997) الى مقاومة بكتريا *Acinetobacter* بشكل كبير الى التتراسكيلين.

ان استخدامات التتراسكيلين في الوقت الحاضر تكاد تكون قليلة لاسيما في اصابات الجهاز التنفسي والجهاز البولي وغيرها، لذا فمن الطبيعي ان تظهر في الدراسة الحالية سلالات لهذا المضاد مقاومة بدرجة قليلة اذا ما قيست بباقي المضادات التابعة الى مجموعة البيتا لاكتام السابقة الاستخدام.

وقد تم دراسة تأثير المضاد الحياتي الريفامبسين على العزلات البكترية قيد الدراسة اذ لوحظ ان هناك عزلات حساسة لهذا المضاد وبنسبة 54.6%، ومن المعروف ان المضاد الحياتي الريفامبسين نادر الاستخدام في العلاجات المختلفة ويوصف عادةً لعلاج مرض التدرن وبعض اصابات المجاري البولية، لذلك لوحظ ان العزلات المعزولة في هذه الدراسة ابدت حساسية واضحة اتجاه هذا المضاد، وان الدراسات الجزيئية تشير الى ان الجينات المسؤولة عن المقاومة اتجاه الريفامبسين تكون عادةً محمولة على الكروموسوم ونادراً ما تكون موجودة على البلازميدات لذلك هناك احتمال انتقال صفة المقاومة لهذا المضاد من بكتريا لاخرى قليلة جداً (السعيد، 1997).

3-3 الكشف عن انتاج البكتريوسين (Bacteriocin production)

تم الكشف عن قابلية عزلات *Acinetobacter* على انتاج البكتريوسين وقد تم استخدام العزلات كافة في عملية الانتاج، كما استخدمت العزلات نفسها كسلالات متحسسة اضافة الى بعض الانواع البكترية الاخرى مثل *E.coli, S.aureus, Klebsiella, Serratia* و *Pseudomonos* وقد اظهرت النتائج ان هنالك عزلة واحدة فقط كانت منتجة للبكتريوسين وهي العزلة رقم (10) وعزلتين كانت متحسسة لها وهي عزلة رقم (5) وعزلة رقم (7) (شكل رقم 1، 2) زيادة على ذلك فقط لوحظ ان العزلات التابعة لبكتريا *Pseudomonas* و *Serratia* كانت ايضاً متحسسة الى البكتريوسين المنتج من قبل نفس العزلة جدول (6) اما باقي العزلات فلم تظهر أي فاعلية للبكتريوسين وهذا يعني اما انها غير منتجة اصلاً واما انها منتجة ولكن ليس هناك بكتريا متحسسة لها لاظهار تلك الفعالية، او انها منتجة ولكن بكمية قليلة غير كافية لقتل البكتريا المتحسسة.

وكما كان متوقعاً فقد وجد ايضاً ان العزلة المنتجة لا تتأثر بالبكتريوسين الذي تنتجه (Konisky, 1982).

تتفق النتائج مع ماذكره Andrews (1986) في قابلية *Acinetobacter* على انتاج البكتريوسين الذي استخدم في تنميط البكتريا لغرض الدراسات الوبائية.

وقد كان لاستخدام طريقة التخطيط المتقاطع للتحري عن انتاج البكتريوسين فوائد كثيرة اهمها ان حضن البكتريا المنتجة لمدة (48) ساعة يعطي الوقت الكافي لافراز كمية من

البكتريوسين ومن ثم انتشارها داخل الوسط الزرعي لمسافات تظهر من خلالها مناطق تثبيط النمو الواضحة للبكتريا الدالة، ومن الجدير بالذكر ان كمية البكتريوسين لاتحـدد وحدها كبر مناطق التثبيط او صغرها بل عوامل اخرى تتداخل في ذلك منها تركيز وعمق طبقة الاغار ونوع البكتريا الدالة وكثافتها.

ومع ذلك لايمكن عد البكتريوسينات عوامل ضراوة لكنها تلعب دوراً في انتشار البكتريا المنتجة لها ضمن المنطقة التي تستوطن فيها داخل جسم المضيف ومن هنا يأتي دور انتاج البكتريوسين في الناحيتين المرضية والوبائية.

شكل (1): يوضح انتاج البكتريوسين بوساطة العزلة رقم (10) من عزلات بكتريا *Acinetobacter*

الخط الافقي الاول: يمثل العزلة (5) المتحسسة للبكتريوسين من خلال القطع الحاصل في النمو.
الخط الافقي الثاني: يمثل العزلة (6) غير المتحسسة للبكتريوسين المنتج من قبل العزلة (10).
الخط الافقي الثالث: يمثل العزلة (7) المتحسسة للبكتريوسين المنتج من قبل العزلة (10).
الخط الافق الرابع: يمثل العزلة (8) غير المتحسسة للبكتريوسين المنتج من قبل العزلة (10).

شـكل (2): يوضـح انتـاج البكتريوسـين بوسـاطة العزلـة رقـم (10) مـن عـزلات بكتريـا *Acinetobacter*

الخط الافقي الاول في الطبق الاول: يمثل بكتريا *S. aureus* غير المتحسسة للبكتريوسين المنتج من قبل العزلة (10).

الخط الافقي الثاني في الطبق الاول: يمثل بكتريا *Serratia* المتحسسة للبكتريوسين المنتج من قبل العزلة (10).

الخـط الافقـي الاول فـي الطبـق الثـاني: يمثـل بكتريـا *S. pneumoniae* غيـر المتحسسـة للبكتريوسين المنتج من قبل العزلة (10).

الخط الافقي الثاني في الطبق الثاني: يمثل بكتريا *Klebseilla* غيرالمتحسسة للبكتريوسين المنتج من قبل العزلة (10).

الخط الافقي الثالث في الطبق الثاني: يمثل بكتريا *Pseudomonas* المتحسسة للبكتريوسين المنتج من قبل العزلة (10).

جدول رقم (6) قابلية البكتريا على انتاج البكتريوسين وبعض العزلات البكتيرية الاخرى المتحسسة له

رقم العزلة	القابلية على انتاج البكتريوسين	العزلة المتحسسة	الانواع البكتيرية المتحسسة الاخرى
1	-	لايوجد	لايوجد
2	-	=	=
3	-	=	=
4	-	=	=
5	-	=	=
6	-	=	=
7	-	=	=
8	-	=	=
9	-	=	=
10	+	عزلتان فقط (عزلة رقم 5و7)	*Pseudomonas* *Serratia*
11	-	لايوجد	لايوجد

3-4 ÇáÊÍÑí Úä ÇáÚæÇãá ÇáãÑÊÈØÉ ÈÖÑÇæÉ ÈßÊÑíÇ *Acinetobacter*:

تمتلك بكتريا *Acinetobacter* العديد من العوامل التي تزيد من قابلية هذه البكتريا في احداث الاصابة، بعضها يلعب دوراً مباشراً في الاصابة والبعض الاخر يلعب دوراً غير مباشر واذا ما اجتمعت العوامل كافة فانها ستكون المسؤولة عن احداث الضرر في جسم المضيف واهم تلك العوامل التي تناولتها هذه الدراسة هي:

3–4–1 **المحفظة Capsule**

تم التحري عن احتواء عزلات بكتريا *Acinetobacter* والتي بلغت (11) عزلة على المحفظة التي تحيط الخلية البكتيرية من الخارج وذلك بإستخدام طريقة التصبيغ السالب، وقد وجد أن (9) عزلات فقط حاوية على المحفظة البكتيرية في حين ظهر ان عزلتين فقط لم تمتلك المحفظة (جدول 7).

تطابق النتائج السابقة مع ماذكره Garcia وجماعته (2000) في احتواء بكتيريا *Acinetobacter* على المحفظة البكتيرية ومتعدد السكريد المحفظي التي تحمي البكتريا

من عملية الالتهام. قد بين Obana (1986) احتواء سلالات بكتريا *A.baumannii* على المحفظة التي تحيط بالبكتريا كما بين ان بعض هذه السلالات تحتوي على طبقة مخاطية Slime layer التي تغلف البكتريا وتحميها من عملية الالتهام.

يعد وجود المحفظة احد عوامل الضراوة الاساسية في البكتريا الممرضة، فهي تحمي البكتريا اثناء عملية الالتهام كما انها تعمل كموانع تمنع ارتباط عوامل الاستساغة بالغلاف الخارجي للبكتريا ومن ثم توقف عمل الخلايا البلعمية (Phagocytic cells) في جسم المضيف (Brubaker, 1985).

وقد لوحظ ان قابلية البكتريا الحاوية على المحفظة بالافلات من الفعل القاتل لعوامل البلعمية يسهل عملية غزوها للدم وحدوث حالات التعفن الدموي البكتيري (Sparling,1983). وقد قادت هذه الملاحظات الى دراسة العوامل المؤثرة بشكل مباشر على حجم المحفظة كإستخدام حامض السالسيلك وEDTA (Domenico *et. al.*,1989).

جدول (7) التحري عن المحفظة في العزلات البكتيرية بطريقة التصبيغ السالب

رقم السلالة	مصدر العزل	التحري عن المحفظة
1	Urine	+
2	Urine	+
3	Urine	+
4	Urine	+
5	Urine	+
6	Ear	+
7	Vagina	+
8	Urine	+
9	Wound	-
10	Blood	-
11	Wound	+

1-1-4-3EDTA تأثير حامض السالسيلك على عزلات بكتريا *Acinetobacter*:

تم دراسة تأثير حامض السالسيلك على (5) عزلات من بكتريا *Acinetobacter* على (3) عزلات من هذه البكتريا. ويوضح الشكل (3) EDTAوكذلك تم دراسة تأثير EDTA في معدل الامتصاص (Absorbance) و(4) تأثير تراكيز مختلفة من الحامض الذي يعكس معدل نمو البكتريا. ويبدو واضحاً ان زيادة تركيز الحامض في وسط النمو (M9) يؤدي الى انخفاض في معدل الامتصاص وكانت اكثر التراكيز تأثيراً هي تلك التراكيز التي فوق 40 مايكروغرام/مل ولوحظ ايضاً ان لحامض السالسيلك تأثير اكبر على العزلات البكتيرية اذا ما قيس بتأثير EDTA الذي كان تأثيره اقل.

كذلك لوحظ ان ليس هناك تأثير واضح وكبير على العدد الحي للخلايا مما يؤكد ان حامض السالسيلك لم يكن له فعلاً تثبيطياً على نمو البكتريا وانما ينحصر تأثيره في حجم المحفظة (كما في الاشكال 5، 6) وهذا ما اثبتته نتائج الفحص المجهري اذ لوحظ صغر حجم المحفظة او ازالتها عند مقارنتها بالحجم الاصلي قبل التعرض للحامض، وهذا يتفق مع ماذكره Garcia وجماعته (2000) في ان معاملة بكتريا *Acinetobacter* بحامض السالسيلك و(EDTA) سوف يختزل من حجم المحفظة البكتيرية او متعدد السكريد المحفظي.

كذلك لوحظ ان تركيز حامض السالسيلك يتناسب عكسياً مع حجم المحفظة البكتيرية اذ لوحظ ان عند اضافة التراكيز المبينة في الفقرة (2-2-12) كلاً على انفراد الى وسط النمو

وبعد مدة حضن (24) ساعة بدرجة حرارة 37°م تم ترسيب الخلايا بوساطة جهاز النبذ المركزي ولوحظ ان الراسب المتكون يكون بنسب متدرجة وعلى وفق تركيز الحامض اذ تقل كمية الراسب كلما ازداد تركيز الحامض في حين يبقى عدد الخلايا الحي غير متأثر بدرجة كبيرة. وبما ان المحفظة البكتيرية تعدّ من عوامل الضراوة المهمة وان حجمها يتناسب طردياً مع الامراضية (Demenico *et.al.*, 1989; Demenico & Straus, 1985) وان أي نقصان في حجم المحفظة او فقدان يجعل عوامل البلعمة لاسيما كريات الدم البيضاء لها قدرة في القضاء على البكتريا بصورة اسهل (Simoons-smidt *et. al.*, 1986) لذا فإن استخدام حامض السالسيلك وEDTA له تأثير واضح على حجم المحفظة اذ يؤدي الى اختزال في حجمها وهذا يتفق مع ما توصل له Demenico وجماعته (1991) في ان معاملة البكتريا السالبة لملون غرام بحامض السالسيلك يؤدي الى ازالة جزء من المحفظة او اختزال في حجمها. ويأتي دور حامض السالسيلك في قدرته على التأثير في حجم المحفظة وذلك من خلال قابليته على سحب ايوني الكالسيوم والمغنيسيوم المهمين في انتاج متعدد السكريد وكذلك فإن للحامض قابلية الامدصاص على طبقتي الشحم الفوسفاتية مسبباً زيادة في الجهد السالب للغشاء الداخلي (Domenico *et.al.*, 1989).

كذلك لوحظ ان ليس هناك تأثير واضح على العزلات البكتيرية غير المحتوية على المحفظة من خلال معاملتها بحامض السالسيلك مما يشير الى تأثير حامض السالسيلك على العزلات المحتوية على المحفظة فقط.

عند اضافة حامض السالسيلك الى الوسط الحاوي على المضاد الحياتي لوحظ ان البكتريا المتحسسة للمضاد تصبح مقاومة له وهذا يأتي من خلال تأثير حامض السالسيلك على فعل المضاد وكذلك ان الحامض يقوم بالتأثير على قنوات البورين Porin channels الموجودة في جدار الخلية والمسؤولة عن نقل المضاد من خارج الخلية البكتيريةالى داخلها اذ يحدث تغيرات شكلية ومن ثم تغيرات وظيفية لعمل هذه القنوات (السعيد، 1997).

ومما يبدو واضحاً من الجدول (8) ان المضادات الحياتية الامبسلين والسبروفلاكسين والتتراسيلكين والارثرومايسين كانت مؤثرة على العزلة رقم (2) قبل اضافة الحامض الا ان البكتريا اصبحت مقاومة لهذه المضادات بعد اضافة الحامض، ونفس النتائج لوحظت مع بقية العزلات.

شكل (5): يبين الاختلاف في حجم المستعمرة البكتيرية بوجود وعدم وجود حامض السالسيلك.

* حيث يبين الطبق الاول حجم المستعمرة البكتيرية بوجود حامض السالسيلك
اما الطبق الثاني فيبين حجم المستعمرة البكتيرية بعدم وجود حامض السالسيلك

شكل (6): يبين الاختلاف في حجم المستعمرة البكتيرية بوجود وعدم وجود مادة EDTA

* حيث يبين الطبق الاول حجم المستعمرة البكتيرية بوجود مادة EDTA
اما الطبق الثاني فيبين حجم المستعمرة البكترية بعدم وجود مادة EDTA

3-4-2 تعيين مستضدات عوامل الاستعمار (CFA)

اختبرت عزلات بكتريا *Acinetobacter* حول احتواءها على مستضدات عوامل الاستعمار، اذ تم التحري عن مستضدات عامل الاستعمار الاول (CFA/I) في جميع العزلات قيد الدراسة، ووجد ان عزلة واحدة فقط تمتلك عامل الاستعمار الاول اما باقي العزلات فلم تعطي نتائج ايجابية لاختبار التلزن مع كريات الدم الحمراء للانسان من صنف (A) بوجود سكر المانوز، وعند التحري عن عامل الاستعمار الثاني (CFA/II) بوجود دم الدجاج، لوحظ أن جميع العزلات البكتيرية لا تمتلك عامل الاستعمار الثاني.

وقد تم التحري عن عامل الاستعمار الثالث الذي يلزن كريات الدم الحمراء للانسان صنف (A) بوجود حامض التانيك (Tannic acid). وبينت النتائج ان العزلات جميعها تعطي نتيجة تلزن موجبة مع كريات الدم الحمراء للانسان بوجود حامض التانيك مما يدل احتواء العزلات المعزولة جميعها على عامل الاستعمار الثالث (CFA/III) جدول (9).

ان عوامل الاستعمار او الاستيطان كما هو معروف عبارة عن تراكيب هدبية بروتينية ذات طبيعية استضدادية تتمركز على سطح الخلية وهي تراكيب صلبة او تكون عبارة عن تراكيب سلكية مرنة (Wirey flexible structure)، وتتصف هذه الاهداب بكونها متخصصة بالمضيف ولها استقلالية مصلية (الزعاك، 1994).

وقد بين Fleisher وجماعته (1999) في احتواء بكتريا *Acinetobacter* على عوامل الاستيطان على سطح الخلية التي تسهل عملية الالتصاق بالانسجة وتكوين المستعمرات. كما اشار Jolly وجماعته (1999) الى قابلية بكتريا *Acinetobacter* على تكوين تراكيب بروتنية تسمى بروتينات الالتصاق (adhesins)التي تسهل عملية التصاق البكتريا بسطح المضيف.

واشار Holt وجماعته (1994) الى احتواء *Acinetobacter* على الخملات القطبية (Polar fimbriae) التي تقوم بعملية الارتباط الاولي بالخلايا الطلائية تتوسطها مواد شبيهة باللكتين او متخصصة بسكر المانوز موجودة على سطح البكتريا التي ترتبط مع متسلمات شبيهة بالمانوز على سطح الخلايا المخاطية (Ofek *et al.*, 1977).

كما اشار Brubaker (1985) الى احتواء بكتريا *Acinetobacter* على واحد او اكثر من عوامل الاستعمار التي تساعدها على الالتصاق بسطح الخلايا الطلائية.

ومما يبدو واضحاً من النتائج المستحصلة في هذه الدراسة ان جميع العزلات تحوي على واحد من عوامل الاستعمار ما عدا عزلة واحدة تحتوي على عاملين من عوامل الاستعمار مما يزيد من كفاءتها في عملية الالتصاق ومن ثم يزيد من قابليتها على احداث الاصابة بأعتبار ان هذه العوامل هي الخطوة الاولى لاصابة جسم المضيف.

3-4-3 التحري عن انتاج الهيمولايسين وقابلية البكتريا في تخليق السايدروفورات:

Detection of Haemolysin Production and Siderophores Synthesis

يعد وجود الحديد حاجة غذائية مهمة للخلايا الحية، والحديد غير متوفر بشكل جاهز اذ ان الاحياء المجهرية الغازية لاتستطيع الحصول عليه بسهولة، ويعد توفر الحديد بشكل يصعب استغلاله من قبل البكتريا بصورة مباشرة احد الطرائق الدفاعية المهمة للمضيف (Weiberg، 1978).

جدول رقم (9) قابلية العزلات البكتيرية على انتاج مستضدات عوامل الاستعمار

رقم السلالة	CFA/I	CFA/II	CFA/III
1	-	-	+
2	-	-	+
3	-	-	+
4	-	-	+

5	-	-	+
6	-	-	+
7	-	-	+
8	+	-	+
9	-	-	+
10	-	-	+
11	-	-	+

وفي الظروف التي يحصل فيها نقص في الحديد، يقل معدل نمو البكتريا وتحدث فيها تغييرات مظهرية ووظيفية منها تكوين الخيوط filament (Clegg, 1978).

تمتلك الكائنات المجهرية بعض الاليات لغرض الحصول على الحديد من المضيف منها انتاج الهيمولايسين او انتاج مركبات لها القدرة على سحب الحديد مثل السايدروفورات (Neilands, 1995) او تكون قادرة على الاستفادة من الحديد المتوفر في الانسجة التالفة في جسم المريض بصورة مباشرة (Ward *et. al.*, 1986).

لذا تم التحري عن قابلية بكتريا *Acinetobacter* على انتاج الهيمولايسين البكتيري من خلال تنميتها على وسط اغار الدم الحاوي على 5% دم انسان، لغرض بيان قدرتها على انتاج الهيمولايسين، وقد بينت الدراسة الحالية أن العزلات جميعها غير منتجة للهيمولايسين جدول (10) وهي بذلك تتفق مع ما ذكره Baron وجماعته (1994) بان بكتريا *Acinetobacter* لاتمتلك فعالية حالة للدم ما عدا النوع *A.heamolyticus* الذي يمتاز بقدرته على تحلل الدم بشكل كامل.

كذلك بين Gerner-Smidt وجماعته (1993) ان النوع *A.heamolyticus* هو الوحيد الذي يمتلك فعالية حالة للدم اما بقية انواع بكتريا *Acinetobacter* فليس لها القدرة على تحلل الدم، لذا يعد انتاج الهيمولايسين صفة تشخيصية للانواع المختلفة لبكتريا *Acinetobacter*.

وقد اختبرت عزلات بكتريا *Acinetobacter* حول قابليتها على تخليق انظمة نقل الحديد متمثلة بالسايدروفورات (Siderophores) وذلك بالنمو على وسط (M_9) الذي يحتوي على 200 مايكرومول من مركب (Dipyridyl)، ودونت النتائج على اساس وجود النمو (+) او عدم وجوده (-) وقد بينت النتائج ان عزلتين فقط قادرة على انتاج السايدروفور من مجموع (11) عزلة، وكما مبين في جدول رقم (10).

واشار Smith وجماعته (1990) الى قدرة بكتريا *Acinetobacter* على انتاج السايدروفورات تحت ظروف يكون فيها كمية الحديد قليلة.

وبين Poolman وجماعته (1985) ان مصول المرضى الذين يعانون من اصابات ببكتريا *Acinetobacter* تحوي على اجسام مضادة ضد المستقبلات البروتينية خارج خلوية المسؤولة عن الارتباط بالسايدروفورات Iron Regulated Outer Membrane Proteins.

وبين Kapil & Goel (2001) ان الغشاء البروتيني الخارجي لبكتريا *Acinetobacter* يكون حاوٍ على كمية من السايدروفورات في حالة نمو هذه البكتريا في ظروف تقل فيها كمية الحديد مقارنةً بنموها في ظروف يكون فيها الغشاء خالٍ من هذه المركبات، كما اشار (Wiliams & Woolderidge, 1993) الى ان توفر طريقة تستطيع بها البكتريا الحصول على الحديد من اهم عوامل الضراوة التي تساعد هذه البكتريا على احداث الاصابة، كما في بكتريا *Acinetobacter* التي لها القدرة على انتاج السايدروفورات كأحد عوامل الضراوة المهمة لهذه البكتريا، اذ تمتاز هذه البكتريا بقدرتها على النمو في الوسط الحاوي على الحديد وفي حالة انعدامه تقوم هذه البكتريا بتكوين اربعة اغلفة بروتينية خارج خلوية جديدة لتعوض عن النقص الحاصل في الحديد التي تفقدها في حالة توفر الحديد في البيئة (Kapil & Goel, 2001).

ان الدور الذي يدخل فيه الهيمولايسين والسايدروفورات كعامل ضراوة يساعد في حدوث الاصابة يكون غير واضح تماماً، الا انه توجد دلائل تشير الى ان وظيفة

الهيمولايسين تكمن في تزويد الاحياء المجهرية بما تحتاجه من الحديد، اما اهمية السايدروفورات كعامل ضراوة فيأتي من خلال قابليته على جعل البكتريا قادرة على اجتياز الفعل المضاد للبروتينات الناقلة للحديد التي بدورها تحد من كمية الحديد المتوفر لنمو هذه البكتريا داخل الجسم (Valvano *et.al.*,1986).

4-4-3 التحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيمات البروتيز الخارجي

تم التحري عن قابلية عزلات بكتريا *Acinetobacter* على انتاج انزيمات البروتيز الخارجية في وسط (M_9) المدعم بـ 0.2% كلوكوز الحاوي على 1% جيلاتين وتم التحري عن قابلية البكتريا في انتاج الانزيمات بعد 24 ساعة من الحضن، وقد وجد أن اغلب العزلات البكتيرية غير قادرة على انتاج انزيمات البروتيز الخارجية اذ لم تظهر اية هالة حول مستعمرة البكتريا بعد انتهاء مدة الحضن وبعد اضافة 3مل من (5%) حامض الخليك ثلاثي الكلور Trichloro aceticacide (TAC) في حين اظهرت عزلة واحدة فقط قدرتها على انتاج انزيمات البروتين الخارجي وهي عزلة رقم (7)جدول(10).

ان انزيمات البروتيز واحدة من اهم الانزيمات التي تشترك في الاصابات المرضية ويبدو ان هذه الانزيمات لم تنتجها هذه البكتريا وهذا يعني ان هذه البكتريا عند وجودها في الدم لم تستطيع تحليل المركبات البروتينية الموجودة فيه مثل الترنسفيرينات. وهذا قد يعود الى سبب قلة عزل هذه البكتريا من عينات الدم وتواجدها في الدم ويعد هذا احد الاسباب التي جعلت عملية عزل هذه البكتريا قليلة من الدم.

جدول (10) التحري عن قابلية *Acinetobacter* في انتاج الهيمولايسين البكتيري والسايدروفورات وانزيمات البروتيز الخارجي

رقم السلالة	مصدر العزلة	القابلية على انتاج الهيمولايسين	القابلية على انتاج السايدروفورات	القابلية على انتاج انزيمات البروتيز الخارجي
1	Urine	-	-	-
2	Urine	-	-	-
3	Urine	-	-	-
4	Urine	-	-	-
5	Urine	-	-	-
6	Ear	-	-	-
7	Vagina	-	-	+
8	Urine	-	-	-

9	Wound	-	+	-
10	Blood	-	-	-
11	Wound	-	+	-

3-5 التحري عن وجود الدنا البلازميدي Screening for plasmid content

تم التحري عن المحتوى البلازميدي لـ (11) عزلة من بكتريا *Acinetobacter* وبإستخدام طريقة التحلل القاعدي (alkaline lysis) في عزل الدنا البلازميدي (Brinboim & Doly., 1979). ومن الشكل (7) تبين احتواء جميع العزلات على حزمة بلازميدية واحد على الاقل، اذ تراوحت اعداد الحزم البلازميدية الموجودة في العزلات قيد الدراسة من (1-3) حزمة بلازميدية، جدول (11)، كذلك وجد ان جميع العزلات تحوي على حزمة بلازميدية واحد متقارب في الحجم، مما يؤكد على مدى التقارب بين هذه العزلات على الرغم من اختلافها في الفعاليات المرتبطة بالامراضية وفي صفة المقاومة للمضادات الحياتية، وان وجود مثل هذا التماثل يعطي مؤشراً وبائياً وكأن العزلات تعود الى سلالة واحدة كما يعطي مؤشراً حول انتشار هذه البكتريا.

وظهر أن اغلب العزلات (7 عزلات) تحوي على 3بلازميدات مختلفة في الحجم الجزيئي في حين احتوت بقية العزلات المستخدمة قيد الدراسة على بلازميد واحد فقط.

تتفق النتائج السابقة مع ماذكره الباحثون، اذ اشار Husni (1999) الى احتواء بكتريا *Acinetobacter* المعزولة في حالات تسمم الدم على بلازميدات متماثلة في الحجم الجزيئي.

قد بين Seifert وجماعته (1994) احتواء عزلات بكتريا *Acinetobacter* المعزولة من اصابات مختلفة على بلازميدات يتراوح عددها على الاغلب ما بين (1-10) بلازميد، واشار الى ان احجام هذه البلازميدات يتراوح ما بين (30Kb – 2Kb) ثم لاحظ ان السلالات المعزولة من نفس الموقع تحوي على بلازميدات متماثلة.

وقد اشار ايضاً Nemec وجماعته (1999) الى احتواء عزلات بكتريا *Acinetobacter* المعزولة من اصابات مختلفة على بلازميدات يتراوح اعدادها ما بين (1-6) بلازميد، اذ بين ان احجام هذه البلازميدات يتراوح ما بين (2Kb–100Kb) واشار

ايضـاً الـى ان المجـاميع التـي تعـود الـى نفـس المجموعـة الوراثيـة تحـوي علـى بلازميـدات متماثلة.

ان تقنيـة النسـق البلازميـدي تعـد واحـدة مـن التقنيـات الجزيئيـة المسـتخدمة فـي علـم الوبائيات الجزيئي التي من خلالها يتم معرفة مدى التقارب بين العزلات المعزولـة من حيث المنشأ او مصدر العدوى وكذلك من خلال هذه التقنية يمكن معرفة مدى انتشارها فـي البيئـات المختلفة، وقد اظهرت نتـائج هذه الدراسـة ان هنـاك بلازميـد مشـترك واحـد موجـود فـي كافـة العزلات مما يدل على مدى انتشار هذا البلازميد بين العزلات قيد الدراسـة علـى الـرغم من الاختلاف في موقع العزل والاصابة ومع ذلك فان هذه التقنية لم تعد كافية ما لم تدعم بتقنيـات اخرى مثل تقنيات بصمة البلازميد والتهجين التـي تثبـت ان البلازميـدات ذات النسـق الواحـد متماثلة من حيث الحجم وعدد النيوكليوتيدات وكذلك نوع الجينات الموجودة فيها.

جدول (11) يبين النسق البلازميدي وعدد الحزم البلازميدية في العزلات البكتيرية

رقم السلالة	مصدر العزلة	عدد الحزم البلازميدية
1	Urine	1
2	Urine	3
3	Urine	3
4	Urine	3
5	Urine	1
6	Ear	3
7	Vagina	1
8	Urine	3
9	Wound	3
10	Blood	1
11	Wound	3

شكل (7): المحتوى البلازميدي لعزلات بكتريا *Acinetobacter*

3-6 التحول الوراثي

استخدمت طريقة التحول الوراثي كخطوة للتحري عن البلازميد الحامل لصفة المقاومة للمضادات الحياتية. اذ تم استخلاص بلازميدات عزلات بكتريا *Acinetobacter* واستخدمت *E.coli* HB 101 كخلايا مؤهلة متسلمة.

واظهرت النتائج حدوث ظاهرة التحول الوراثي في (8) عزلات من بكتريا *Acinetobacter* المستخدمة في الدراسة شكل (8)، جدول رقم (12) وذلك من خلال نموها على اوساط زرعية اختيارية حاوية على المضادات الحياتية الملائمة، اذ تراوح تردد الانتقال بين ($9 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-3}$).

وقد اوضحت النتائج ان جميع السلالات المتحولة من بكتريا *E.coli*HB101 قد اكتسبت صفة المقاومة للمضاد الحياتي الكاربنسلين مما يدل على ان الجينات المسؤولة عن صفة المقاومة لهذا المضاد تكون محمولة على البلازميد التي لها القدرة على الانتقال الى الخلايا المؤهلة. ومما يؤكد وجود بلازميد مشترك في كافة العزلات المستخدمة في هذه الدراسة اذ يمنح صفة المقاومة اتجاه المضاد الحياتي الكاربنسلين. وهذه النتيجة يمكن الاستفادة منها في الدراسات الوبائية الجزيئية وفي تحديد مصدر العزلات المأخوذة من نماذج مرضية مختلفة.

كذلك اظهرت (5) عزلات متحولة (1، 2، 4، 8، 9) صفة المقاومة للمضاد الحياتي الارثرومايسين بالاضافة الى صفة المقاومة للمضاد الحياتي الكاربنسلين، مما يدل على انتقال البلازميد المسؤول عن صفة المقاومة للمضاد الحياتي الارثرومايسين الى الخلايا المتحولة.

كذلك بينت عزلة متحولة واحدة (عزلة 11) مقاومتها للمضاد الحياتي الببراسيللين على الرغم من ان الاخير قد استخدم حديثاً في العراق في معالجة بعض الاصابات المرضية.

كما اظهرت النتائج ان معدل حدوث ظاهرة التحول في هذه البكتريا اعلى من معدل حدوث ظاهرة الاقتران، وذلك لقابلية هذه البكتريا على التحول الطبيعي بتردد عالي عند تواجدها في البيئة.

وهذه النتيجة تتفق مع ما اشار اليه palman وجماعته (1993) من ان ظاهرة التحول في بكتريا *Acinetobacter* عالية جداً اذا ما قيست بظاهرة الاقتران، كما ان صفة المقاومة التي تبديها هذه البكتريا اتجاه المضادات الحياتية تكون عالية والتي تعزى ايضاً الى نفس الظاهرة (Guardbassi *et. al.*, 2000).

واشار Seely وجماعته (1991) الى ظاهرة التحول الوراثي واكد دورها في انتقال البلازميدات المسؤولة عن صفة المقاومة للمضادات الحياتية بين عزلات بكتريا *Acinetobacter* المقاومة لهذه المضادات الى عزلات متحسسة لها.

وقد اكد Stratz وجماعته (1997) حول امكانية نقل صفة المقاومة للمضاد الحياتي الجنتمايسين من عزلات بكتريا *Acinetobacter* المقامة له الى عزلات حساسة له خلال عملية التحول الطبيعي.

شكل (8): عملية التحول للبلازميدات المعزولة من عزلات بكتريا *Acinetobacter* في بكتريا *E. coli*

جدول (12) نتائج التحول البكتيري المؤشرات الوراثية المنقولة خلال العملية

رقم السلالة	عدد البلازميدات في العزلة الواهبة	عدد البلازميدات المنقولة	* تردد التحول	الدلائل المنقولة
1	1	1	1×10^{-3}	Cb^+، E^+
2	3	3	9×10^{-3}	Cb^+، E^+
3	3	3	9.6×10^{-3}	Cb^+

Cb^+ ،E^+	10×8^{-3}	2	3	4
Cb	10×8.4^{-3}	1	1	5
E^+ ،Cb^+	10×7^{-3}	1	3	8
E^+ ،Cb^+	10×8.2^{-3}	2	3	9
Cb^+ ،Pc^+	10×7.6^{-3}	3	3	11

حيث ان:

Cb^+ يمثل انتقال صفة المقاومة للمضاد الحياتي الكاربنسلين الى الخلية المستلمة خلال عملية التحول

E^+ يمثل انتقال صفة المقاومة للمضاد الحياتي الارثرومايسين الى الخلية المستلمة خلال عملية التحول

Pc^+ يمثل انتقال صفة المقاومة للمضاد الحياتي الببراسلين الى الخلية المستلمة خلال عملية التحول

* تردد التحول: عدد الخلايا المتحولة/ تركيز الدنا البلازميدي/ عدد الخلايا المؤهلة

** تركيز الدنا البلازميدي: الكثافة الضوئية عند 260 نانومتر × عامل التخفيف ×50 مايكروغرام

3-7 الاقتران البكتيري

اجريت عملية الاقتران البكتيري كخطوة اولى لتحديد فيما اذا كانت بكتريا *Acinetobacter* تمتلك نظام متكامل لعملية الاقتران مع بكتريا اخرى ولمعرفة البلازميدات الاقترانية وغير الاقترانية والتي من خلالها يمكن معرفة أي الصفات التي يمكن ان تنتقل من العزلة الواهبة الى السلالة المستلمة وخصوصاً صفة المقاومة للمضادات الحياتية، هذا وقد اعتبرت عزلات بكتريا *Acinetobacter* السلالات الواهبة اما السلالة القياسية *E.coli*HB101 فأعتبرت السلالة المستلمة.

واظهرت نتائج الاقتران جدول (13) على قدرة (3) عزلات من بكتريا *Acinetobacter* على القيام بعملية الاقتران مع السلالة المتسلمة القياسية وذلك من خلال نموها على اوساط زرعية انتقائية حاوية على المضادات الحياتية الملائمة شكل (9).

اما العزلات المتبقية فعلى الرغم من احتوائها على بلازميدات الا انها اخفقت في تحقيق عملية الاقتران (كما في العزلة 2 والعزلة 7). وقد يعود السبب الى ان زمن الاقتران غير كافي لحدوث عملية انتقال البلازميدات في الخلية الواهبة الى الخلية المستلمة او يعود السبب الى احتواء هذه العزلات على بلازميدات غير اقترانية ليس لها القدرة على الانتقال خلال عملية الاقتران، اذ تمت الاشارة من قبل بعض الباحثين الى احتمال وجود صفة المقاومة على بلازميدات غير اقترانية (Synder & Champness, 1997).

ومن الملاحظات التي سجلت ايضاً ظهور اختلاف في عدد البلازميدات المنتقلة خلال عملية الاقتران. فقد لوحظ ان العزلة رقم (1) تحوي على بلازميد واحد فقط استطاعت منحه الى السلالة المستلمة خلال عملية الاقتران واكسبتها صفة المقاومة للمضاد الحياتي

حامض النالديكسيك مما يشير الى ان البلازميد الذي تم نقله يحمل صفة المقاومة للمضاد الحياتي حامض النالديكسيك.

كما استطاعت العزلة رقم (1) ان تنقل صفة اللزوجة الى الخلية المستلمة خلال عملية الاقتران مما يدل على ان الجينات المسؤولة عن صفة اللزوجة تكون محمولة على البلازميد.

في حين لوحظ ان العزلة رقم (6) الحاوية على (4) بلازميدات، تم انتقال اثنين فقط من هذه البلازميدات الى الخلية المستلمة اذ اكسب الخلية المستلمة صفة المقاومة للمضاد الحياتي الجنتمايسين. في حين لوحظ ان العزلة رقم (8) الحاوية على (3) بلازميدات قد تم انتقال جميع بلازميداتها الى الخلية المستلمة خلال عملية الاقتران على العكس من ذلك، وقد اظهرت البلازميدات المنقولة للخلية المستلمة صفة المقاومة لكل من المضاد الحياتي الجنتمايسين، التراي مثبرم، الكاربنسلين والارثرومايسين.

وقد يعود سبب انتقال البلازميدات جميعها الى الخلية المستلمة الى قدرة بعض البلازميدات غير الاقترانية على الانتقال بمساعدة بلازميد اخر اقتراني منتقل ذاتياً وتعرف هذه العملية بعملية التحريك (Mobilization) (Feridfelder, 1987).

في حين يعود فشل انتقال قسم من البلازميدات الى السلالة المستلمة في عمليات الاقتران على الرغم من وجود بلازميدات اقترانية منتقلة ذاتياً الى حدوث طفرة او فقدان في الجينات المشفرة للانزيمات القاطعة لشريط الدنا، مما يؤدي الى فشل في انتقال البلازميدات غير الاقترانية على الرغم من وجود تلك المقترنة معها. (Feridfelder, 1987).

وقد يعود الاختلاف في نمط الانتقال الى طبيعة تركيب هذه البلازميدات نفسها الذي قد يكون سبباً اخر في فشل انتقال البلازميدات خلال عملية الاقتران.

وتتفق النتائج السابقة مع ما اشار له Shakibaie وجماعته (1998) في قابلية بكتريا *Acinetobacter* على نقل البلازميدات المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحياتية خلال عملية الاقتران اذ تم نقل البلازميدات المسؤولة عن المقاومة لعدد من المضادات الحياتية من بكتريا *Acinetobacter* المقاومة لهذه المضادات الى عزلات بكتريا *Acinetobacter* التي تكون حساسة لها.

وقد بين Sewerd وجماعته (1998) ان (9) عزلات من مجموع (24) عزلة من بكتريا *Acinetobacter* انتقلت بلازميدتها المسؤولة عن اظهار صفة المقاومة للمضادات

الحياتيـة مـن مجموعـة الكلايكوسـيدات الامينيـة الـى الخليـة المسـتلمة خـلال عمليـة الاقتـران البكتيري.

جدول (13) عدد البلازميدات والدلائل المنقولة خلال عملية الاقتران البكتيري

رقم العزلة	مصدر العزلة	حدوث عملية الاقتران	عدد البلازميدات المنقولة	الدلائل المنقولة
1	Urine	+	1	Na^+
2	Urine	-	لايوجد	لايوجد
6	Ear	+	2	Gn^+
7	Vagina	-	لايوجد	لايوجد
8	Urine	+	3	E^+, Gn^+, Tm^+, Cb^+

حيث ان:

Na^+ يمثل انتقال صفة المقاومة للمضاد الحياتي النالديكسيك الى الخلية الواهبة خلال عملية الاقتران البكتيري.
Gn^+ يمثل انتقال صفة المقاومة للمضاد الحياتي الجنتمياسين الى الخلية الواهبة خلال عملية الاقتران البكتيري.
Tm^+ يمثل انتقال صفة المقاومة للمضاد الحياتي التراي مثبرم الى الخلية الواهبة خلال عملية الاقتران البكتيري.
Cb^+ يمثل انتقال صفة المقاومة للمضاد الحياتي الكاربنسلين الى الخلية الواهبة خلال عملية الاقتران البكتيري.
E^+ يمثل انتقال صفة المقاومة للمضاد الحياتي الارثرومايسين الى الخلية الواهبة خلال عملية الاقتران البكتيري.

شكل (9): عملية الاقتران البكتيري بين عزلات بكتريا *Acinetobacter* وبكتريا *E. coli* القياسية

3-8 تحييد البلازميدات Plasmid Curing

تم اجراء تحييد البلازميدات التي تم الكشف عنها في بعض عزلات بكتريا *Acinetobacter* وذلك عن طريق استخدام بعض المركبات الكيميائية مثل (Sodium Dodecyl Sulphate) SDS وحامض السالسيلك (Salicylic acid) اذ تم انتخاب (5) عزلات من بكتريا *Acinetobacter* الحاوية على بلازميدات وعوملت بالمركبات الكيمياوية المذكورة آنفاً كلاً على انفراد وتم تحديد التركيز المثبط الادنى للنمو لهذه المواد وكذلك تم تحديد التركيز الامثل الذي ادى الى تحييد البلازميدات في كل عزلة من العزلات المستخدمة في الدراسة بعد ذلك تم تنمية العزلات على وسط (T.S.A) وتم انتخاب (100) مستعمرة من كل عزلة ونقلت الى اوساط زرعية انتقائية حاوية على المضادات الحياتية بطريقة (Picking & Patching) كما في الجدولين (14، 15) والشكل (10- أ، ب).

وتشير النتائج الى ان مديات تراكيز SDS المثبط لنمو العزلات يتراوح بين (8%-1.5%) اما تركيز حامض السالسيلك المثبطة لنمو العزلات فيتراوح بين (8%- 6%).

ومما يبدو واضحاً من النتائج ان استخدام حامض السالسيلك في تحييد البلازميدات يعد اقل كفاءة من استخدام الـ (SDS) اذ لوحظ ان العزلات المعاملة بحامض السالسيلك حصل فيها فقدان جزئي للبلازميدات. اما العزلات المعاملة بـ (SDS) فحصل فقدان كامل للبلازميدات كما في شكل (11، 12).

وتعود قابلية السالسيلك في تحييد البلازميدات الى قدرته على سحب الايونات الموجبة الثنائية التكافؤ والمهمة في ثباتية الغشاء الخارجي للبكتريا. كذلك تأثيره في استقرارية الاغشية البلازمية وكذلك على فعالية الانزيمات الموجودة في الفسحة الموجودة حول الغشاء السايتوبلازمي. وان للحامض قابلية في الادمصاص على طبقتي الشحم الفوسفاتية مسبباً زيادة في الجهد السالب للغشاء الداخلي والتأثير على استقرار الاغشية في الخلية (Domenico *et. al.*, 1989).

ومما تجدر الاشارة اليه ان بعض العزلات المستخدمة في الدراسة الحالية والمعاملة بحامض السالسيلك لم تفقد المقاومة للمضاد الحياتي التري مثبرم، في حين اظهرت بعض المستعمرات العائدة لتلك العزلات حساسيتها لكل من المضادات الحياتية الكاربنسلين والارثيرومايسين والجنتمايسين (E, G, CAR) مما يشير الى ان تلك المستعمرات قد فقدت البلازميدات عند استخدام حامض السالسيلك.

اما نتائج التحييد بأستخدام SDS فتشير الى ان جميع العزلات المستخدمة في الدراسة قد فقدت محتواها البلازميدي بشكل كامل اذ تم ملاحظة ذلك من خلال عملية الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص كما في شكل (11). كذلك لوحظ هناك تغير في مقاومة العزلات اتجاه المضادات الحياتية جدول (15). اضافة لذلك فقد لوحظ ان المستعمرات العائدة للعزلات (2، 5، 8، 11) والمعاملة بمادة SDS وقد فقدت صفة المقاومة للمضادات (E, Tm, CAR, G) مما يدل ان الجينات المسؤولة عن صفة المقاومة لهذه المضادات تكون محمولة على البلازميدات وليس على الكرموسوم.

اما بالنسبة للعزلة رقم (10) فقد لوحظ أنها لم تفقد صفة المقاومة للمضادات الحياتية (G^+, Tm^+, E^+, CAR^+,) بعد معاملتها بـ SDS وحامض السالسيلك على الرغم من فقدانها البلازميدات التي تمتلكها وهذا يشير الى احتمال امتلاك هذه العزلة على آلية اخرى لمقاومة المضادات الحياتية ومنها التغيير في نفاذية الغشاء البلازمي اتجاه هذه المضادات او انتاج انزيمات محورة لها القدرة على تغيير او تثبيط عمل المضاد، او تكون الجينات المسؤولة عن هذه الصفة بنسختين (على الكرموسوم وعلى البلازميد) او ان صفة المقاومة للمضادات الحياتية تقع على جين قافز.

كذلك لوحظ ان هنالك تباين في تأثير العامل المحيد وفقاً للسلالة البكتيرية المستخدمة اذ اتضح ذلك من خلال الاختلاف في التراكيز المثبطة لنمو العزلات زيادة على تأثير مكونات الجدار الخارجي والطبقة الخارجية للبكتريا المستخدمة.

شكل (10): تعيين المستعمرات البكتيرية بعد عملية تحييد البلازميدات بأستخدام طريقة Picking & Paching

أ- يبين المستعمرات البكتيرية بعد عملية التحييد بأستخدام مادة SDS

ب- يبين المستعمرات البكتيرية بعد عملية التحييد بأستخدام حامض السالسيلك

شكل (11): يبين المحتوى البلازميدي لعزلات بكتريا *Acinetobacter* المعاملة بمادة SDS

شكل (12): يبين المحتوى البلازميدي لعزلات بكتريا *Acinetobacter* المعاملة بحامض السالسيلك

جدول (14) تأثير حامض السالسيلك في تحييد البلازميدات لبكتريا *Acinetobacter*

رقم العزلة	عدد المستعمرات النامية في الاوساط الانتقائية بعد استخدام الزرع بوجود حامض السالسيك			
	Cb	Gn	Tm	E
2	85	/	/	83
5	92	91	85	88
8	38	90	87	76
10	100	100	100	100
11	86	93	100	78

* تم زرع (100) مستعمرة ونقلت بطريقة (Pick & patch) الى الاوساط الانتقائية الحاوية على المضادات الحيوية الملائمة

Tm: التري مثبرم (25 مايكروغرام/ مل)
Gn: الجنتمايسين (100 مايكروغرام/ مل)
Cb: الكاربنسلين (100 مايكروغرام/ مل)
E: الارثرومايسين (100 مايكروغرام/ مل)

جدول (15) تأثير مادة SDS في تحييد البلازميدات لبكتريا *Acinetobacter*

رقم العزلة	عدد المستعمرات النامية في الاوساط الانتقائية بعد استخدام الزرع بوجود مادة SDS			
	Cb	Gn	Tm	E
2	85	/	/	75
5	78	75	90	85
8	75	44	68	65
10	100	100	100	100
11	84	90	88	78

* تم زرع (100) مستعمرة ونقلت بطريقة (Pich & patch) الى الاوساط الانتقائية الحاوية على المضادات الحيوية الملائمة

Tm: التري مثبرم (25 مايكروغرام/ مل)
Gn: الجنتمايسين (100 مايكروغرام/ مل)
Cb: الكاربنسلين (100 مايكروغرام/ مل)
E: الارثرومايسين (100 مايكروغرام/ مل)

الاستنتاجات و التوصيات

1- قدرة بكتريا *Acinetobacter* على احداث اصابات مرضية مختلفة في مواقع مختلفة من الجسم.
2- تتباين عزلات بكتريا *Acinetobacter* في مقاومتها للمضادات الحياتية المختلفة وظهور عزلات تكون مقاومة لنوعين او اكثر من المضادات الحياتية.
3- امتلاك عزلات بكتريا *Acinetobacter* على عوامل الضراوة المختلفة التي تؤهلها في احداث الاصابة في جسم الانسان مثل المحفظة البكتيرية وعوامل الاستيطان وانتاج السايدروفورات وغيرها.
4- قابلية البكتريا على انتاج عوامل تثبيطية (كالبكتريوسين) التي تساعدها على الانتشار في منطقة الاصابة.
5- احتواء عزلات بكتريا *Acinetobacter* على بلازميد مشترك واحد زيادة على احتواء بعضها على اكثر من بلازميد.
6- كفاءة العزلات البكتيرية على احداث عمليتي الاقتران والتحول البكتيري وكذلك نجاح عملية التحييد بإستخدام بعض المركبات الكيمياوية.

توصي هذه الدراسة الى ما يأتي:

1- الاستمرار في التحري عن مدى انتشار هذه البكتريا في الاصابات المختلفة وفي البيئات المختلفة التي من الممكن ان تتواجد فيها.
2- امكانية استخدام الاجيال الجديدة من المضادات الحياتية في معالجة الاصابات التي تحدثها هذه البكتريا سيما وان هذه البكتريا ابدت المقاومة لاكثر من واحد من المضادات الحياتية الشائعة الاستخدام.
3- الاستمرار في الكشف عن عزلات منتجة للبكتريوسين لغرض الاستفادة من الاخير في معالجة الاصابات التي تحدثها هذه البكتريا.
4- امكانية استخدام تقنيات جزيئية اخرى للكشف عن الجينات الموجودة في المحتوى الوراثي لهذه البكتريا.