الخمج البكتيري المتخفي في المرضى المصابين بذات الرئة

رسالة مقدمة إلى
مجلس كلية العلوم - جامعة بابل

وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم
في علوم الحياة/ علم الأحياء المجهرية

من قبل
ناظم عذاب رباط السلطاني

حزيران 2005م

وَمَا مِنْ غَائِبَةٍ فِي السَّمَاءِ وَالْأَرْضِ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ

النمل/ (75)

توصية الأستاذين المشرفين

نشهد بان اعداد هذه الاطروحة جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بابل ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / الأحياء المجهرية .

التوقيع : التوقيع:

اسم المشرف :د. ابراهيم محمد سعيد شناوة **اسم المشرف: قاسم نجم عبيد ثويني الناصري**

المرتبة العلمية : أستاذ المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان : قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بابل

التاريخ : / / **2005**

توصية رئيس القسم

إشارة إلى التوصية في أعلاه التي قدمها الأستاذين المشرفين أحيل هذه الاطروحة الـى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع :

الاسم : د. علي شعلان الاعرجي

المرتبة العلمية **: استاذ**

العنوان : قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بابل

التاريخ : / / **2005**

قرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على هذه الاطروحة وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ **2005/6/7** ووجدنا إنها جديرة بالقبول بدرجة (**جيد جداً**) لنيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / علم الأحياء المجهرية .

عضو **عضو** **رئيس اللجنة**

التوقيع **التوقيع** **التوقيع**

الاسم :د.وسام عبد الزهرة هندي **الاسم :د.محمد صبري عبد الرزاق** **الاسم : د.عدنان مهران اوانيس**

المرتبة العلمية : **استاذ مساعد** المرتبة العلمية:**استاذ مساعد** المرتبة العلمية:**استاذ مساعد**

العنوان:**المعهد الفني-بابل** العنوان:**كلية الطب-جامعة بابل** العنوان:**كلية الطب-جامعة الكوفة**

التاريخ : التاريخ : التاريخ :

عضو (المشرف)
التوقيع :
الاسم :د. ابراهيم محمد سعيد شناوة
المرتبة العلمية : أستاذ
العنوان:كلية العلوم-جامعة بابل
التاريخ :

عضو (المشرف)
التوقيع:
الاسم: د. قاسم نجم عبيد ثويني الناصري
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان:كلية العلوم-جامعة بابل
التاريخ :

مصادقة عميد كلية العلوم

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة
التوقيع
الاسم:د.عودة مزعل الزاملي
المرتبة العلمية:**استاذ**
العنوان:كلية العلوم /جامعة بابل
التاريخ: / / 2005

شكر وتقدير

اتقدم بالشكر والتقدير الى استاذي الفاضلين الاستاذ الدكتور ابراهيم محمد سعيد شناوة والاستاذ المساعد الدكتور قاسم نجم الناصري لاشرافهما على البحث ولتوجيهاتهما القيمة .

كما أتقدم بالشكر الجزيل الى رئاسة قسم علوم الحياة وعمادة كلية العلوم ورئاسة جامعة بابل لاتاحتهم الفرصة لي في اكمال دراستي .

وعرفانا بالجميل اتقدم بخالص الشكر للدكتور صالح عبد الواحد المختار ومنتسبي مختبر العيادة الاستشارية للامراض الصدرية والتنفسية / بابل .

كما أتقدم بالشكر الى جميع منتسبي مختبر مستشفى الهاشمية العام ، والى كل الذين ابدوا العون والمساعدة في اتمام هذا البحث . مع تمنياتي للجميع بالتوفيق .

ناظم

حزيران 2005 م

المحتويات

ت	العنوان	رقم الصفحة
	الخلاصة	2-1
	الفصل الاول/المقدمة	7-3
	الهدف من البحث	7
	الفصل الثاني/استعراض المراجع	28-8
1-2	تمهيد	8
2-2	آليات الدفاع في الجهاز التنفسي	8
3-2	الأحياء المجهرية الطبيعية في الجهاز التنفسي	8
4-2	الممرضات المحتملة	8
5-2	آلية حدوث المرض	10
6-2	الخصائص الممنعة للبكتريا فاقدة الجدار الخلوي	10
7-2	تشخيص البكتريا فاقدة الجدار الخلوي	11
8-2	الأعراض المرضية لالتهاب الجهاز التنفسي	11
9-2	المسببات المشاركة في التهاب الجهاز التنفسي	13
10-2	الجدار الخلوي	15
11-2	طبقة الببتيدوكلايكان	17
12-2	اثر المضادات الحيوية	17
13-2	عمل المضادات الميكروبية من خلال تثبيط تكوين الجدار الخلوي	19
14-2	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	21
15-2	الخلق البيولوجي للمضادات الحيوية	21
16-2	الأصناف الرئيسية للمضادات الحيوية	22
17-2	أنواع أخرى عديدة من المضادات الحيوية المختلفة	24
18-2	أسباب فشل المضاد الحيوي في العلاج	26
	الفصل الثالث/ المواد وطرق العمل	28
1-3	المحاليل المستخدمة	28
2-3	الكواشف	28
3-3	الصبغات	28
4-3	الأوساط الزرعية	31
5-3	التوالي المنطقي لمنوال الدراسة	33
6-3	طرق العمل	34
7-3	التعرف والتشخيص	39
8-3	اختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية	42
	الفصل الرابع/ النتائج والمناقشة	45
1-4	صفات المرضى	45
2-4	الوصف المجهري للبكتريا فاقدة الجدار الخلوي	45
3-4	حساسية البكتريا فاقدة الجدار للمضادات الحيوية	46
4-4	مقاومة المضادات الحيوية المتعددة من قبل البكتريا فاقدة الجدار الخلوي	47
5-4	الوصف المجهري للبكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار	47
6-4	الخصائص الفيزياوية للبكتريا فاقدة للجدار الخلوي	48
7-4	الخصائص الفيزياوية للبكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار	48

8-4	تطويع تقنيات مطورة للتحري عن المسببات المشاركة في التهاب الجهازالتنفسي	51
9-4	بيولوجية البكتريا فاقدة الجدار الخلوي	55
10-4	حساسية البكتريا فاقدة الجدار الخلوي المشاركة في التهاب الجهاز التنفسي	68
11-4	هيأة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية للبكتريا فاقدة الجدار والبكتريا الراجعة	72
12-4	كفاءة طرق عزل البكتريا فاقدة الجدار الخلوي من التهاب السبيل التنفسي	73
13-4	كفاءة طرق عزل البكتريا فاقدة الجدار الخلوي من السبيل التنفسي	74
	الاستنتاجات	83
	التوصيات	83
	المصادر الاجنبية	
	المصادر العربية	

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
1-3	مديات مناطق التثبيط وموقع التأثير لبعض المضادات الحيوية	44
1-4	يوضح توزيع الإصابات بالبكتريا ذات الجدار وفاقدة الجدار بين الجنسين	45
2-4	نسب عزل البكتريا فاقدة الجدار والبكتريا غير الفاقدة للجدار المسببة لخمج الجهاز التنفسي التي تم عزلها وتشخيصها في هذه الدراسة	51
3-4	صفات بكتريا *K. Pneumoniae* ذات الجدار وفاقدة الجدار	52
4-4	الوصف الكيموحيوي لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* فاقدة الجدار والراجعة	53
5-4	الوصف الكيموحيوي لبكتريا *Proteus spp* فاقدة الجدار وذات الجدار	54
6-4	الوصف الكيموحيوي لبكتريا *S. pneumoniae* فاقدة الجدار وذات الجدار	55
7-4	المجموعة I وهي سالبة في مرحلة القشع الكامل والرائق من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات	57
8-4	المجموعة II ، وهي سالبة في مرحلة القشع الكامل والرائق والراسب المغسول وموجبة لباقي التقنيات	58
9-4	المجموعة III ،وهي سالبة في المراحل الأربع الأولى من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات	59
10-4	المجموعة IV وهي سالبة في تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات	60
11-4	المجموعة V وهي سالبة في تقنية التخفيف وموجبة لباقي التقنيات	61
12-4	المجموعة VI وهي سالبة في جميع التقنيات	62
13-4	تقويم كفاءة طرق العزل لفاقدات الجدار	66
14-4	يوضح نسب عزل فاقدة الجدار وذات الجدار	67
15-4	حساسية بكتريا *Streptococcus pneumoniae* فاقدة الجدار والراجعة	75
16-4	حساسية بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* فاقدة الجدار والراجعة	76
17-4	حساسية بكتريا *Klebsiella pneumoniae* فاقدة الجدار والراجعة	77
18-4	حساسية بكتريا *Proteus spp.* فاقدة الجدار والراجعة	78
19-4أ	مكررات مقاومة بكتريا *S. Pneumoniae* فاقدة الجدار للمضادات الحيوية	79

4-19ب	مكررات مقاومة بكتريا *S. Pneumoniae* الراجعة للمضادات الحيوية	79
4-20أ	مكررات مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* فاقدة الجدار للمضادات الحيوية	80
4-20 ب	مكررات مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية	80
4-21أ	مكررات مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* فاقدة الجدار للمضادات الحيوية	81
4-21-ب	مكررات مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* الراجعة للمضادات الحيوية	81
4-22أ	مكررات مقاومة بكتريا*.Proteus spp* فاقدة الجدار الخلوي للمضادات الحيوية	81
4-22ب	مكررات مقاومة بكتريا*.Proteus spp* الراجعة للمضادات الحيوية	81
4-23	نتائج اختبار Z لتحديد افضل التقنيات لعزل فاقدات الجدار	82
	الملاحق	85
4-24 أ	نمط مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* الفاقدة للجدار للمضادات الحيوية	86
4-24ب	: نمط مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* الراجعة للمضادات الحيوية	86
4-25 أ	نمط مقاومة بكتريا *S. pneumoniae* الفاقدة للجدار للمضادات الحيوية	87
4-25 ب	نمط مقاومة بكتريا *S. pneumoniae* الراجعة للمضادات الحيوية	88
4-26-أ	نمط مقاومة بكتريا *Proteus spp*.الفاقدة للجدار للمضادات الحيوية	89
4-26ب	نمط مقاومة بكتريا *Proteus spp*. الراجعة للمضادات الحيوية	89
4-27-أ	نمط مقاومة بكتريا *P. aeruginos* فاقدة الجدار للمضادات الحيوية	90
4-27ب	نمط مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* الراجعة للمضادات الحيوية	91
4-28-أ	هيأة مقاومة بكتريا *S. pneumoniae* فاقدة الجدارالمتعددة للمضادات Resistogram	92
4-28ب	هيأة مقاومة بكتريا *S. Pneumoniae* الراجعة للمضادات الحيوية Resistogram	93
4-29-أ	هيأة مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* فاقدة الجدارللمضادات. Resistogram	94
4-29 ب	هيأة مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* الراجعةللمضادات.Resistogram	95
4-30-أ	هيأة مقاومة بكتريا *K. Pneumoniae* فاقدة الجدار للمضادات Resistogram	96
4-30ب	هيأة مقاومة بكتريا *K. Pneumoniae* الراجعة للمضادات الحيوية Resistogram	96
4-31أ	هيأة مقاومة بكتريا *.Proteus spp* فاقدة الجدارللمضادات الحيوية Resistogram	97
4-31ب	هيأة مقاومة بكتريا *Proteus spp*. الراجعة للمضادات الحيوية Resistogram	97

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
1-2	تركيب الجدار الخلوي في البكتريا	16
1-3	مخطط يوضح تقنية الزرع المتسلسل للقشع	36
2-3	مخطط يوضح تقنية التخافيف	37
3-3	مخطط يوضح تقنية الزرع المتسلسل والراشح المخفف مع المزرعة ثنائية الطور	38
1-4	الطراز المظهري لبكتريا *S. Pneumoniae* فاقدة الجدار مصبوغة بصبغة كرام وبقوة تكبير 1000x .نامية على وسط اكار الفارينت.	69
2-4	الطراز المظهري لمستعمرات بكتريا *S. Pneumoniae* الراجعة نامية على وسط الفارينت الصلب (VA) بدون تصبيغ وبقوة تكبير 100x.	69
3-4	الطراز المظهري لمستعمرات بكتريا *S. Pneumoniae* فاقدة الجدار نامية على	70

	وسط الفارينت الصلب (VA). مصبوغة بصبغة دينزوبقوة تكبير x40.	
4-4	**الطراز المظهري لمستعمرات بكتريا *K.pneumoniae* فاقدة الجدار نامية على وسط الفارينت الصلب (VA) .مصبوغة بصبغة دينز وبقوة تكبير x100 .**	**70**
5-4	**الطراز المظهري لمستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* فاقدة الجدار مصبوغة بصبغة كرام وبقوة تكبيرX100 .نامية علىVA .**	**71**

قائمة المختصرات

الرمز	المعنى
AMP	**Ampicillin**
C	**Chloramphenicol**
CX	**Cloxacillin**
AN	**Amikacin**
CF	**Cephalothine**
E	**Erythromycin**
NA	**Nalidaxic acid**
TE	**Tetracycline**
TOB	**Tobramycin**
S	**Setreptomycin**
CWDF	**Cell Wall -Deficient Form**
CWDB	**Cell Wall-Deficient Bacteria**
M. pneumoniae	***Mycoplasma pneumoniae***
R	**Resistance**
GlcNAc	**N-Acetyl glucose amine**
Mur NAc	**N- Acetyl Muramic acid**
RSV	**Respiratory Syncetial viruses**
EBV	**Epstein Bar Viruses**
BA	**Blood agar**
VA	**Variant agar**
VB	**Variant Broth**
MA	**MacConkey's agar**
NB	**Nutrient broth**
NA	**Nutrient agar**
AFB	**Acid Fast Bacillus**

الخلاصة:

تمت دراسة الخمج البكتيري المتخفي في الجهاز التنفسى للإنسان ، حيث أخضعت (125) حالة مرضية، في محاولة لتشخيص البكتريا فاقدة الجدار الخلوي المشاركة في خمج الجهاز التنفسي المستديم .أعطت(51) حالة منها نتائج تدل على وجود البكتريا فاقدة الجدار، مثلت مجموعة الاختبار. و(74) حالة مرضية اظهرت إصابات روتينية(ببكتريا غير فاقدة للجدار)،اخذت كمجموعة سيطرة Control .

جمع القشع من المرضى بالطرق القياسية وحضرت مسحات مباشرة صبغت بـ Z.N. method . النماذج الخالية من عصيات التدرن صبغت بصبغة ليشمان Leishman Stain لمعرفة مدى الاستجابة المناعية الخلوية غير المتخصصة والتي أظهرت أعداد من الخلايا اللمفية Lymphocytes والبيض متعددة أشكال النوى Polymorphonuclear(PMN) ، مما يعطي مؤشرا على الحدة المرضية واستدامتها.أظهرت الشرائح المصبوغة بصبغة ليشمان ترشح أعداد من الخلايا أحادية النواة (البلاعم الكبيرة). وحول مكان تواجد المسبب المشارك في خمج الجهاز التنفسي ، وجد انه يقع في خمس هيئات مفسرة وهيأة سادسة غير مفسرة (أي انه في الحالة الأخيرة لم يتم عزله أو تنميته على الأوساط الزرعية وبمختلف التقنيات المستخدمة) (وكانت9 حالات لم يحصل فيها نمو) والتقنيات التي استخدمت هي(تقنية الزرع المتسلسل، تقنية التخافيف، تقنية المزرعة ثنائية الطور.) وبذلك كان من الصعوبة تحديد نوعه او مكان تواجده . ومن خلال تلك التقنيات أمكن التحري عن البكتريا فاقدة الجدار الخلوي في واحد او اكثر من الأماكن التالية :القشع الكامل،رائق القشع بعد إجراء عملية الطرد المركزي،سطح الخلايا القيحية وداخل الخلايا القيحية.

ظهر من خلال التجارب التي أجريت إن افضل تقنية لتشخيص البكتريا فاقدة الجدار الخلوي المسببة لخمج الجهاز التنفسي المستديم هي تقنية التخفيف ، المزرعة ثنائية الطور وطريقة راسب الخلايا المتحللة من تقنية الزرع المتسلسل ، بالمقارنة مع التقنيات والطرق الأخرى المستخدمة في هذه الدراسة ، كما بينتها نتائج اختبار Z .

اتصفت البكتريا فاقدة الجدار الخلوي Cell Wall - Deficient Bacteria (CWDB) بمرونتها Flexible وقابليتها على الانضغاط Sequeezable ومرورها من خلال المرشحات الدقيقة Filterable .في حين اتصفت مستعمراتها النامية على وسط اكار الفارينت الصلب بأنها تشبه البيض المقلي Fried eggs ، والتي أمكن مشاهدتها بوضوح بعد تصبيغها بصبغة دينز Deines stain .

أظهرت النتائج بان بكتريا *S. pneumoniae* فاقدة الجدار الخلوي شكلت أعلى نسبة للإصابة (18حالة) بنسبة (35.29%) من الحالات و*P.aeruginosa* فاقدة الجدار(12حالة)بنسبة (23.52%) ،ثم *K.pneumoniae* و*Proteus spp.* (11حالة)بنسبة (21.56 %) و(حالة واحدة)بنسبة (1.96%) على التوالي .

شملت الدراسة كلا الجنسين ، بلغ عدد الرجال (30)(58.82%) ، والإناث (21) (41.17%) . تراوحت أعمار المرضى بين (8-81) سنة .

سجلت أعلى نسبة للإصابة في الفئة العمرية (41 سنة فما فوق) وكان عدد الرجال فيها (16)بنسبة (31.37%) و النساء (8)بنسبة (15.68%) ،تلتها الفئة العمرية(21-25) سنة (5)بنسبة (9.80%) للرجال و (3)بنسبة (5.88%) للنساء. فيما لم يتم تسجيل

أي حالة إصابة في الفئة العمرية (36-40) سنة في هذه الدراسة.درست أيضا حساسية البكتريا فاقدة الجدار الخلوي للمضادات الحيوية وظهر إن المضاد الحيوي Amikacinهو المضاد الأكثر تأثيرا في الزجاج (Invitro) (42:34) (80.95%) بالنسبة للبكتريا فاقدة الجدار و(42:26) (61.90%) للبكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار Reverted bacteria . يليه المضاد الحيوي Nalidaxic acid بنسبة(42:33)(78.57%) لفاقدة الجدارو(42:29) (69.04%) للبكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار. فيما أبدى التتراسايكلين Tetracycline حساسية (42:28) (66.6%) لفاقدة الجدار و(42:26) (61.90%) بالنسبة للبكتريا الراجعة. أما المضادات الحيوية التي تميزت بنسب مقاومة عالية من قبل البكتريا فكان الامبسلين Ampicillin هو الأكثر تعرضا للمقاومة بنسبة(100%) من قبل البكتريا فاقدة الجدار و (42:29) (69.04%) بالنسبة للبكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار. درس نمط المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية من قبل البكتريا فاقدة الجدار والبكتريا الراجعة وتبين بان هيأة المقاومة المتعددة تراوحت بين(2-10) مضادات حيوية طبقا للأنواع المستحصلة في هذه الدراسة.

الفصل الأول CHAPTER ONE

المقدمة: INTRODUCTION

البكتريا المرضية فاقدة الجدار الخلوي هي عبارة عن بكتريا كانت بالأصل تمتلك جدار خلوي فقدته نتيجة لتعرضها لإنزيمات الجسم المختلفة كالـ(Lysozyme) داخل جسم المريض، أو نتيجة البيئة الضارة داخله أو بصورة محتثة تحت تأثير المضادات الحيوية التي تعمل على منع تكوين الجدار الخلوي التي تناولها المريض(Lawson,1982;Patterson,&Glipin,1982; Clasener,1972).

الأمراض الناتجة عن الأحياء المجهرية، واحدة من هذه المسببات ،والتي يتصف قسم منها بأنه مستديم ،لا يستجيب لعلاج يتناوله المريض ،تفشل طرق الزرع البكتريولوجية الروتينية الأولية في التشخيص ، حيث تعطي طرق الزرع الأولي نتائج سلبية . البكتريا أحد الأحياء المجهرية التي تسبب مثل تلك الأمراض المستديمة في الإنسان، ومن الناحية النظرية قد تشترك استدامة الخمج البكتيري مع واحد أو اكثر من المسببات التالية :

1-البكتريا الفاقدة للجدار الخلوي (Cell wall deficient bacteria (CWDB .

2-المايكوبلازما Mycoplasma

3-المايكوبكتريم الاعتيادية او الفاقدة للجدار Normal Mycobecterium or cell wall deficient Mycobacterium .

4-الفيروسات Viruses .

5- الكلاميديا Chlamydia .

6-الفطريات Fungi .

وتشير اغلب الدراسات في هذه الجانب على ان نتائج الزرع الروتينية سالبة. (Dowling et al,1999;Rowen et al,1992; Segasothy et al,1991;*Maskell,1990)*..، وربما كانت هذه النتائج غير حقيقية لاسباب قد تتعلق بالمتطلب التغذوي للكائن المجهري المشارك في التهاب الجهاز التنفسي المستديم ، وتفاعل هذه الكائنات داخل المضيف

Host (الإنسان) قد يعـود لوجود عوامل مشجعة للنمو وظهور الميزات الخاصـة بهـا، (Domingue & Woody, 1997) .

تعد البكتريـا المرضـية فاقدة الجدار الخلـوي موضـع جدل بسبب كون نتـائج الدراسـات التي أجريت في هذا المجال غير حاسمة ، وفي بعض الأحيان متناقضة، على الـرغم مـن إن الوسع الامراضي لهذه البكتريـا سواء للإنسـان او لحيوان المختبر تسند المفهوم القائل بـأن البكتريـــا فاقـــدة الجـــدار الخلـــوي ربمـــا تكـــون هـــي العامـــل المســـبب للمـــرض. ((Mattman,1993a;Mattman,1993b; Domingue,1980; Wary ,1982. ولـوحظ مـن خـلال البحـوث التـي أجراهـا كـل مـن (Mattman , 2000; Domingue 1982 ،الناصـري – 2002 والسلطاني-2003) ، أن هناك العديـد من الأحياء المجهريـة يصـعب عزلها اوغير قابلة للزرع علـى الأوسـاط الزرعيـة الاعتياديـة ،ومـن هذه الأحيـاء ، البكتريـا فاقـدة الجـدار الخلـوي التـي تسـتطيع النمـو وإحـداث الإصـابات المتكـررة لـدى العديـد مـن المرضـى المصـابين بالتهـاب الجهـاز التنفسـي المستديم وتتمكن هذه البكتريـا مـن التموضـع والتخفي Cryptic and Localization في الانسجة.(Domingue,1995)

منذ فترة زمنية ليست بالقصيرة تمكن الباحثون في حقل الأحياء المجهريـة مـن معرفـة إن البكتريـا فاقـدة الجـدار الخلـوي (CWDB) باسـتطاعتها البقـاء حيـة والتضـاعف فـي المضـيف ، حيـث عزلـت مـن عينـات الإدرار،الـدم، القشـع، سـائل النخـاع الشـوكي ، القيح، والخراجات والإفرازات في تجاويف الجسم المختلفة ، وجرى تصـنيف اغلب البكتريـا فاقدة الجدار الخلوي بوصفها طورا انتقاليا او متغيرات غير مصـنفة (Kenny,1978).

أن قابليـة التخفـي لهـذه البكتريـا تمكنهـا مـن تجنـب التـأثير المباشـر للمضـادات الحيويـة المستخدمة فـي العـلاج ممـا يتيح لهـا استعادة نشـاطها بـزوال المضـاد أو انخفـاض مستوى تركيـزه فـي سـوائل جسـم المـريض ، مستخدمةً فقد الجـدار الخلـوي كليـا أو جزئيـا كوسـيلة لظاهرة التخفي ، ممـا يخـرج نهائيـاً المضـادات الحيويـة التـي تعمـل علـى منـع تكـوين الجـدار الخلـوي ،مـن مهمتهـا العلاجيـة ، نتيجـة لفقـدان المستلمات Receptors التـي يـرتبط فيهـا المضاد الحيوي والموجودة في الجدار الخلوي.كمـا أن استخدام الجـرع القليلـة وغيـر الكافيـة أثنـاء المعالجـة والاسـتخدام الخـاطئ للأدويـة Misuse of antibiotics وخصوصـا المضادات الحيوية هو أحد الطرق المهمة التي تحث البكتريا على فقد جدرانها بصـورة كليـة أو جزئية وقد ثبت ذلك تجريبيا من خـلال الدراسـات والبحـوث التـي أجريـت لهـذا الغـرض (الناصري-2002). ومن أهم تلك المضادات التي تعمل علـى منـع تكـون الجداران الخلويـة مجموعة البنسيلينات والسيفالوسبورينات(Baure et al ,1966).

يحـدث التهـاب الجهـاز التنفســي بطـرق متعـددة منهـا الإصـابة بالبكتريـا ،الإصـابة بالفيروسات والإصابة بالفطريات وغيرها . وتختلف طرق انتقال الإصـابة، فمنهـا مـا يحـدث نتيجـة العـدوى مـن أشـخاص مصـابين عـن طريـق الـرذاذ ، او اسـتخدام الأدوات الشخصـية للمرضــى كالمناشــف ، او عــن طريــق مــا يعــرف بخمــج المستشــفيات Nasocomial infection .(Felton& Bryeeson, 1996) . ويعـد الحـاملون المزمنـون Chronic carriers مصدرا من مصادر انتقال المرض .(Falkow, 1997).

إن بقـاء الكـائن المجهري داخـل المضـيف يعتمـد علـى درجـة مقاومـة المضـيف لـه،ففي حالة وجود مقاومة عالية من قبل المضيف تجاه الكـائن الممـرض سيتمكن مـن القضـاء عليـه

.أما في حالة ضعف الجهاز المناعي للمضيف فان الكائن الممرض قد يتخفى في مواقع معينة من الجسم بعيدا عن تأثير الأجسام المضادة ، مما يُمكن الكائن الممرض من الاستمرار بالنمو والتكاثر داخل المضيف (Walter et al,1996) .قد تسبب البكتريا فاقدة الجدار الخلوي حالات من الانتان الدموي Septicemia التي يصاحبها أعراض سريرية حادة والتي تؤدي الى حدوث مضاعفات خطيرة في الجسم (Griffin *et al*,1999;Cheadle and Polk,1997) . ويعد الانتان الدموي في النوبات الحادة من الأمراض المزمنة مصدرا من المصادر الغنية بالبكتريا فاقدة الجدار الخلوي ، حيث تم عزل العديد من البكتريا فاقدة الجدار من حالات الانتان الدموي مثل: *Actinomycetes naeslundi,Corynebacterium spp,Brucella melitensis*. (Merline *et al* ,1971; Louria *et al* , 1976; Mattman, 1974).يرافق الانتان الدموي العديد من الأمراض مثل أمراض الخثرة التجلطية Thromboembolic والتهاب الأغشية القلبية الداخليةEndocarditis والتهاب الرغامي المزمن .(Chronic Bronchitis).

(Mattman and Judge,1982;Altemeier,1969;Hill and Lewis,1964;Yamamoto and Homma,1979;Wilter *et al*,1960;Nicolaides *et al*,1972) .

تعتبر البكتريا فاقدة الجدار الخلوي أحد مسببات الامراض السرطانية خصوصا بغياب الاستجابة المناعية الواقية .هذه البكتريا الفاقدة للجدار تصبح ممرضة وتشجع نمو العديد من الأمراض مثل:أمراض المناعة الذاتية ، الإيدز والعديد من الامراض غير معروفة الأسباب.هذه البكتريا موجودة في الدم والأنسجة المكونة لجسم الإنسان (Alan,2004).

الهدف من البحث :

يهدف البحث التحري عن المسببات المشتركة مع الخمج المتخفي في السبيل التنفسي البشري ولمعرفة مدى تعلق البكتريا فاقدة الجدار باستدامة مرض الجهاز التنفسي ولتحقيق الهدف ، جرى البحث وفق الخطوات الآتية :

1-جرى اختيار مجموعتين من مرضى الجهاز التنفسي، الأولى بمرض حاد غير مستديم تمثل المقارنة والثانية مرضى ازمن واستدام لديها المرض وتمثل مجموعة الاختبار .

2-تم جمع قشع من كلا المجموعتين بالطرق القياسية .

3-خضع القشع لدراسة زرع روتينية، ولحصول نتائج سلبية بالروتين جرى العمل بطرق زرعية مطورة لاستحصال البكتريا فاقدة الجدار.

4-حددت طبيعة التغايرات الحيوية الحاصلة في العزول فاقدة الجدار.

5-درست حساسية العزول فاقدة الجدار وذات الجدار للمضادات الحيوية.

6-حددت هيأة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لكل من البكتريا فاقدة الجدار وذات الجدار ولنفس النوع.

الفصل الثاني CHPTER TWO

استعراض المراجع :Literature Review

2-1-تمهيد

تعتبر الآليات الدفاعية الجهازية والموضعية فعالة في الجهاز التنفسي ويتعرض الجهاز التنفسي للخمج على الأغلب عن طريق الاستنشاق. السعال والقشع هي الصفة المميزة للخمج. ويكون الخمج أما في المسالك التنفسية العليا Upper respiratory tract أو في المسالك التنفسية السفلى Lower respiratory tract .

2-2- آليات الدفاع في الجهاز التنفسي :

هناك العديد من الأنظمة الدفاعية المخاطية وغير المخاطية مثل :

1-الأنسجة اللمفية المرتبطة بالأنف .

2-الأنسجة اللمفية المرتبطة بالقصبة الهوائية.

3-جزء من الأنسجة المخاطية الأذنية .

هذا بالإضافة الى نظام الدفاع الخلوي لاحاديات النواة (البلاعم الكبيرة).
4-العوامل الخلطية غير المتخصصة ، مثل ألفا تربسين، اللاكتوفرين واللايسوسومات.
5-الاستجابة المناعية المخاطية المتوسطة بالخلايا.

2-3-الاحياء المجهرية الطبيعية في الجهاز التنفسي: Normal Microflora

الاحياء المجهرية الطبيعية للجهاز التنفسي العلوي على الأغلب هي هوائية مثل :

Staphylococcus spp. ***Haemophilus spp.***
Streptococcus spp. ***Neisseria spp.***
Corynebacterium spp.

أما في الجهاز التنفسي الأسفل في الشخص السليم فلا وجود لها.

2-4-الممرضات المحتملة Potential pathogens

الممرضات المحتملة للجهاز التنفسي في حالات الخمجات الشائعة كالآتي :

أولا- في الأنف :

S. aureus. ***Adenoviruses.***
S. Pneumoniae. ***Coronaviruses.***
H.influnzae. ***Enteroviruses.***
Rhinoviruses. ***RSV.***
Myxoviruses. ***Measles.***

ثانياً- **في** الأذن:

S. Pneumoniae.
S. aureus. ***H. influnzae.***
S. B- haemolytic. ***P. aeruginosa.***

ثالثاً- في الاسناخ الرئوية:

S. Pneumoniae. ***Mycoplasma pneumoniae.***
S. aureus. ***RSV.***
K.pneumoniae. ***Parainflunsae.***
E.coli ***Adenoviruses.***
M.tuberculosis. ***Histoplasma***
H.influnzae. ***Aspergillus***

رابعاً-في الحنجرة واللوزتين :

S. B- haemolytic.
Corynebacterium diphtheria. ***Measles.***
H. influnzae. ***Herpes simplex.***
Candida albicans. ***Enteroviruses.***
Adenoviruses. ***RSV.***
Myxoviruses. ***EBV***

خامساً- في القصبة الهوائية- القصيبات

H.influnzae ***Mixoviruses.***
S. Pneumoniae. ***RSV.***
M.pneumoniae.
Adenoviruses.
(Shnawa,2003)

5-2- آلية حدوث المرض Disease cause mechanism :

يتعرض الجهاز التنفسي للعديد من الأمراض المختلفة الناتجة عن إصابات ميكروبية بكتيرية ، فيروسية، فطرية، او ناتجة عن أمراض سرطانية ،او وظيفية او خلقية. الامراض الناتجة عن البكتريا تحصل عادة عن طريق استنشاق الهواء عبر المسالك التنفسية وعند وصول البكتريا المرضية (التي تواجه دفاعات مختلفة بدأً بالأنف حيث الشعيرات التي تبطن الأنف والمواد المخاطية التي تلتصق عليها الجزيئات والمواد الغريبة والكائنات المجهرية المختلفة) الى الرئتين وتمكنها من تحاشي تلك الدفاعات فإنها سوف تتمركز في القصبات الكبيرة ومن ثم تتكاثر أعدادها مسببة تفاعل التهابي وتنتشر بسرعة الى الفص وباتجاه المحيط مسببة ذات الرئة الفصي . يبدأ التفاعل الالتهابي بتوسع وعائي موضعي يعقبه انصباب نضحي يحتوي على كريات الدم الحمراء والبيضاء وخلايا بلعمية كبيرة وليفين وسائل الخزب .وتكون هذه النضحة في / او حول الاسناخ والمسالك الهوائية الصغيرة. القسم المصاب من الرئة يصبح صلدا خالي من الهواء .إن اتساع الخمج الى غشاء الجنب يولد نضحا وغالبا ما يؤدي الى التهاب الجنب الانصبابي . قد تصل الجراثيم الفعالة الى مجرى الدم بأعداد كافية مسببة الانتان الدموي Septicaemia مع احتمال حدوث خراجات نقيلية Metastatic Abscesses في أعضاء بعيدة كالدماغ والكلية.الانتشار الموضعي قد يؤدي الى التهاب التامور الحاد وحتى التهاب عضلة القلب. اندمال(Resolution) ذات الرئة يبدأ ببلع وإزالة الجراثيم والحطام Debris النضحي من قبل الكريات البيضاء والبلعمية الكبيرة مما يصفي الحيز الهوائي. الاندمال غير الكامل قد يسبب اختلاطات موضعية كخراج الرئة وتوسع القصبات وتليف موضعي وخاصة عندما يكون الخمج بسبب المكورات العنقودية والسبحية المقيحةPyogenic والكلبسيلا الرئوية(موسى1982).

6-2-الخصائص الممنعة للبكتريا فاقدة الجدار الخلوي:

المناعة المخاطية للجهاز التنفسي تؤثر على الاغلب في الرئتين والأنف وبصورة مستحثة في القصبة الهوائية . الأجسام المضادة المخاطية ذات تخصص مضاد لعوامل الخمج ، مساعدة بذلك في الوقاية منها ومن المحتمل ان تُنشئ استجابة مناعية جهازية.الفيروسات تسبب حالة من التثبيط المناعي للجهاز التنفسي ، مؤدية الى نمو البكتريا المرضية والفطريات(Mycosis). (Shnawa , 2003) .

تستعمل البكتريا فاقدة الجدار الخلوي ممنعات جيدة في الحيوانات اللبونة بوصفها حيوانات مختبرية. حيث يحفز الممنع استجابة مناعية خلطية متوسطة بالضد المتخصص بمستضدات الغشاء الخلوي لـ Protoplast او الـ Spheroplast.وقد وجد ان المسبحيات المقيحة فاقدة الجدار تنتج ضد الحال السبحيAntistreptolysin O وتشترك مع مرض يشابه الحمى الرثوية (Rheumatic fever)، وكذلك تنتج الذيفان المولد للاحمرار (Erythrogenic toxin) الذي وجد له دور مناعي منظم كما هو الحال في السلالات ذات الجدار(Lynn,1982; Barsumian et al,1978) . كما بينت دراسات أخرى إن ممنعات فاقدة الجدار من المسبحيات تحث فرط حساسية آنية ومتأخرة في الفار الابيض (Lynn,1982; Kagan et al, ,1976) . وبين (Lynn,1965) ان الأشكال البكتيرية فاقدة الجدار عند بقائها متخفية في المضيف بشكل مستديم قد تؤدي دورا في إنتاج المرض المناعي الذاتي .

2-7-تشخيص البكتريا فاقدة الجدار الخلوي (CWDB) Diagnosis of :

يعتبر القشع النموذج السريري في تشخيص خمج الجهاز التنفسي بالإضافة الى اقتطاع خزع صغيرة Exudate من القصبة الهوائية ، حيث يمثلان العينات النموذجية للتشخيص الدقيق لحالات خمج السبيل التنفسي ، مثل التدرن الرئوي والخمج الناتج عن الإصابة الفطرية Mycosis بالإضافة الى الإصابات البكتيرية الأخرى كذات الرئة البكتيري التي تحدث في هذه المنطقة.

2-8-الأعراض المرضية لالتهاب الجهاز التنفسي :

1-السعال Cough :

من أعراض الأمراض الأكثر شيوعا وغالبا ما يكون مصحوبا بخمج المسالك التنفسية وقد يكون :

أ-جافا : كما في التهاب الحنجرة الحاد ، التهاب الرغامي ، التهاب القصبات الحاد .

ب-رطبا : مع قشع كما في التهاب القصبات المزمن ، ذات الرئة ، توسع القصبات ، التدرن الرئوي وقصور القلب الاحتقاني .

ج- تشنجيا : يحدث بشكل نوبات مع شهقة وباستمرار كما في السعال الديكي . استمرارية السعال لأسابيع تشير الى احتمال الإصابة بالتدرن الرئوي أو السرطان .(موسى،1982).

2-القشع Sputum :

الشخص البالغ يطرح يوميا 100 مل من المخاط من المسالك التنفسية وعند فرط التكوين تتجمع هذه الإفرازات منبهة الغشاء المخاطي المبطن للمسالك التنفسية فتسعل وتنطرح خارجا على شكل قشع ، قد يكون القشع :

أ-مخاطيا (Muocoid) : إما أن يكون صافي أو ابيض اللون، كما في التهاب القصبات الحاد والمزمن ، انتفاخ الرئة .

ب-اسود(Black) : قد يكون مخاطي مرقط بحطام دخان السيكاير أو دخان البيئة أو نثار الفحم كما في تغبر الرئة .

ج-قيحيا(Suppurative) : يحتوي على كمية من القيح ممزوجا بالمخاط ، إذا كانت كمية القيح قليلة يسمى مخاطي قيحي ، لونه اصفر عادة يتحول الى اخضر عند الركود ذو رائحة كريهة كما في توسع القصبات وخراج الرئة.

د- الصدئ Rusty : يتكون بسبب النضح النزفي الحاد في الأسناخ كما في ذات الرئة القصبي .

هـ : مدمياً Bloody)) : كما في التدرن الرئوي ، سرطان القصبة وأحتشاء الرئة .

و- مصلياً (like Serum) : كما في خزب الرئة .

ز- رغويا (Foamy) : كما في انتفاخ الرئة .

ج- محتويا على سدادات وقوالب (Plugs & casts) ، كما في حالة زيادة الحمضات الرئوي الربوي .

3- النفث دموي (Hemoptysis) :

هو طرح الدم من المسالك التنفسية وقد يكون مصحوبا بقشع،وكمية الدم تتراوح ما بين خضاب خيطي ممزوجا بالقشع إلى نفث دموي شديد . ومن أهم أسبابه:

1-التدرن الرئوي. 2-توسع القصبات .

3-سرطان القصبة . 4-ذات الرئة .

5-احتشاء الرئة. 6-خراج الرئة.
7-التهاب القصبات الحاد والمزمن. 8-توسع الشعيرات النزفي الوراثي .
9-أورام وعائية للرئة والقصبات .
10- كاختلاط لتواجد جسم غريب في القصبة مؤديا الى التنخر في الجدار وتآكل الأوعية الدموية فيها .
11- أمراض القلب ، كالتضيق التاجي ،قصور بطيني ايسر ،خثار الإكليلي .
12- أمراض الدم النزفية : ابيضاض الدم والهيموفيليا .
13-الإصابة ببعض الأمراض المعدية كالحصبة ، الجدري واليرقان الشديد .

4- أعراض أخرى مختلفة مثل :

أ- ألم الصدر ب- عسر التنفس
ج- الازيز Wheeze . د- الحشرجة Stridore
(موسى ، 1982) .

2-9- المسببات المشاركة في التهاب الجهاز التنفسي :

1- *Streptococcus* :

بكتريا كروية الشكل تتجمع خلاياها بشكل سلاسل (Chains) لذا تعرف بالمسبحيات ، وهي موجبة لصبغة كرام ، تنمو بشكل جيد على وسط اكار الدم بشكل مستعمرات دقيقة الى متوسطة الحجم ، رصاصية اللون ، تختلف في تحليلها للدم (Blood Hamolysis) ، بعض أنواعها محللة للدم من نوع ألفاα-heamolysis كما هو الحال بالنسبة لبكتريا *S. pneumoniae* و *S. viridans*. والبعض منها محلل للدم من نوع بيتا β- heamolysis كما في بكتريا S. pyogenes . في حين إن البعض الاخر منها غير محللة للدم γ- heamolysis وهذه البكتريا سالبة لفحص الاوكسيديز والكاتاليز، وهي مسؤولة عن العديد من الأمراض كالتهاب اللوزتين والحمى القرمزية Scarlet fever ، وكذلك التهاب المجاري البولية والتهاب ذات الرئة في الأطفال ، والتهاب الأغشية الداخلية للقلب subacute endocarditis .كما تعتبر هذه البكتريا من مسببات الانتان الدموي Septicemia . (Brooks et al ,1998).

2- *Pseudomonas aeruginosa* :

هي بكتريا عصوية سالبة لصبغة كرام ، غير مكونة للابواغ ، متحركة باسواط قطبية او متعددة ، موجبة لفحص الاوكسيديز والكاتاليز. تعد من المسببات المرضية للانسان ، وهي من المسببات الشائعة في الالتهابات المكتسبة من المستشفيات ، تعزل من الحروق والجروح كما إنها تشترك في حالات الانتان الدموي ، خصوصا لدى المصابين بالحروق ومرضى السرطان. ويعود السبب في ذلك الى القابلية العالية لهذه البكتريا على الالتصاق الانتهازي ، على الخلايا المصابة كالخلايا التالفة والمحروقة من جهة وضعف مقاومة هذه الخلايا وكبر مساحتها السطحية التي تزيد من احتمال تلوثها من جهة أخرى.

يمتاز هذا النوع من البكتريا بقدرته على إفراز صبغة البايوسيانين (pyocyanin) التي لا تذوب في الماء وتذوب في الكلوروفورم إضافة الى ان هذه البكتريا تبعث رائحة الفواكه (الموز) من مستعمراتها النامية على الأوساط الزرعية .

. (Gardner and Provine ,1975; Young,1982)

***: Klebsiella* -3**

هي بكتريا عصوية سالبة لصبغة كرام وتنتمي للعائلة المعوية غير مكونة للابواغ ، غير متحركة قصيرة متثخنة(1-2x0.8) مايكرون. تحتوي على المحفظة Capsule ، وهي من مسببات الانتان الدموي عند حديثي الولادة، (Gardner and Provine,1975) .

من الصفات التشخيصية المهمة التي تميزها عن غيرها من البكتريا المعوية هي إن جميع سلالات الكلبسيلا غير متحركة ، لاتميع الجلاتين ولا تنتج Ornithin decarboxylase أوPhenyl alanin deaminase ، تنتج الغاز من الكلوكوز ، تخمر سكر اللاكتوز ، الادونيتول والاينوسيتول ، لاتنتج الاندول ولكنها تعطي تفاعل موجب للفوكس- بروسكاور ، الستريت ، اليوريز واختبار KCN . الكلبسيلا المعزولة من الأصحاء او مرضى الجهاز التنفسي ذات تغاير اكثر في تفاعلاتها . البعض منها تعطي تفاعلات متطابقة مع *K.aerogenes* والبعض الاخر منها تبين بضع اختلافات. من انواعها الاخرى var *K.pneumoniae,K.ozaenae* ,*K.rhinoscleromatis* ,*K. edwardsii* and *edwardsii* var *K.edwardsii* *atlantae*.. من صفاتها الزرعية ، تنمو جيدا على الأوساط المغذية الاعتيادية وعلاكار glucose-ammonium salte غير المضاف اليه عوامل نمو. المدى الحراري لنموها (43-12) مْ والحرارة المثلى للنمو هي (37) مْ . مستعمراتها كبيرة ، مرتفعة ، رطبة ولزجة (مخاطية) ، درجة اللزوجة تعتمد على الكمية المفقودة من الطبقة المخاطية المنتجة وهذه تعتمد على كمية الكربوهيدرات في الوسط الزرعي كما انها تختلف من سلالة الى أخرى. (Cruickshank et al ,1975) .

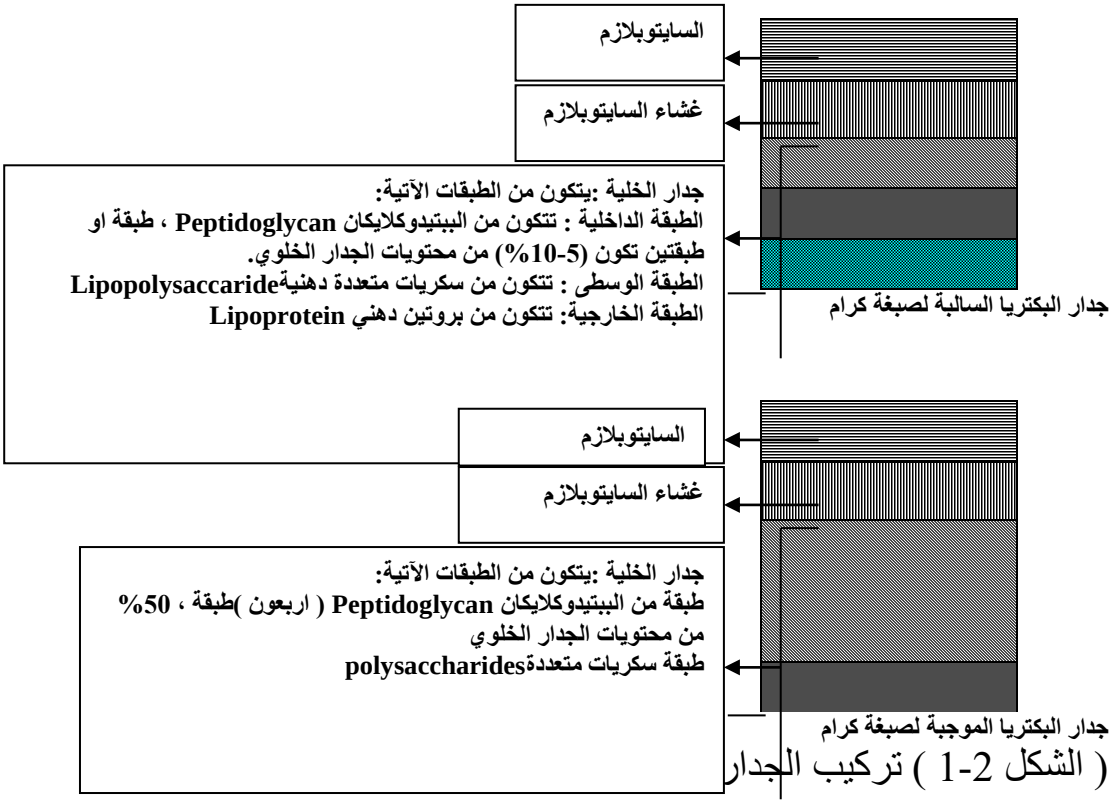
: *Proteus* -4

وهي بكتريا عصوية الشكل تنتمي الى العائلة المعويةEnterobacteriaceae سالبة لصبغة كرام ، تتراوح أشكال خلاياها من عصيات كروية Coccobacillus الى خيوط طويلة Filamentous ، غير مكونة للمحفظة وغير مكونة للابواغ ، وهي متحركة وغير مخمرة لسكر اللاكتوز. موجبة لفحص اليوريز وفحصKCN وفحص (Phenylalanine deaminase)، تمتاز هذه البكتريا بان لها رائحة السمك، ولمستعمراتها مظهر اكتضاضي متجانس(Swarming phenomena) عند زرعها على منبت صلب كالاكار المغذي واكار الدم واكار الماكونكي ، تمتاز هذه البكتريا بوجودها الطبيعي في الأمعاء ، كذلك تتواجد في التربة والماء ومياه المجاري. الأنواع المرضية منها تؤدي الى حدوث التهابات ، كالتهاب الأذن الوسطى والمجاري البولية ،وحالات من التهاب الرئتين المزمن ، اضافة الى كونها أحد مسببات الانتان الدموي.(Brooks *et al*, 1998). بالإضافة الى ذلك يتعرض الجهاز التنفسي لأنواع أخرى من البكتريا التي تسبب فيه التهابات مختلفة منها: *S.aureus(Pneumoniae);Legionella* (والتي هي عصيات سالبة لصبغة كرام تسبب التهاب ذات الرئة الفصي (lobar pneumonia) . ويتعرض الجهاز التنفسي كذلك للإصابة ببكتريا *Haemophilus influnzae* . (Muir's, 1980) .

2-10- الجدار الخلوي The cell wall :

تسمى طبقات الغلاف الخلوي المحصورة بين الغشاء البلازمي والمحفظة الجدار الخلوي الذي يتكون بصورة رئيسية من مادة الببتيدوكلايكان وأحماض التكويك في البكتريا الإيجابية

لصبغة كرام في حين يتكون الجدار في البكتريا السلبية لصبغة كرام من الببتيدوكلايكان وبروتينيات دهنية والغلاف الخارجي وطبقة من سكريات متعددة دهنية كما في الشكل(2-1).



(الشكل 2-1) تركيب الجدار

2-11- طبقة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan Layer :

تمثل هذه المادة بوليمر معقد مكون من ثلاث أجزاء هي :

1-هيكل متكون من حامض N-acetylmuramic acid .

2-N-acetylglucosamine . مرتبطة بالاصرة 1-4 من النوع â-1-4linkage

3-سلاسل جانبية مكونة من مجموعة ببتيدات رباعية متصلة بحامض N-acetyl muramic acid ومجموعة من ببتيدات متشابهة مستعرضة. يكون الهيكل متشابها في جميع أنواع البكتريا ، أما السلاسل الجانبية والمستعرضة فتختلف باختلاف الأنواع. تتكون الجسور المستعرضة في كثير من البكتريا السلبية لصبغة كرام من اصرة ببتيدية مباشرة بين مجموعة الأمين Diaminopimelic acid (DAP) لسلسلة جانبية ومجموعة الكاربوكسيل لـ D-alanine الموجودة في سلسلة جانبية ثانية.

تشترك السلاسل الببتيدية الرباعية الجانبية لجميع الأنواع في بعض الصفات، ففي اغلبها يكون الحامض الأميني L-alanine في الموقع الأول (يرتبط مع حامض N-acetylmuramic acid) ويكون D-glutamate في الموقع الثاني و D-alanine في الموقع الرابع أما الموقع الثالث فيكون اكثر المواقع تغايرا ففي البكتريا السلبية لصبغة كرام يكون الحامض الأميني Diaminopimelic في هذا الموقع . في البكتريا الإيجابية لصبغة كرام قد يرتبط هذا الحامض او L-Lysine وغيره من الأحماض الأمينية L- Amino acid . يوجد الحامض الاميني Diaminopimelic في جدران خلايا بدائية النواة فقط وهو السابق precursor في عملية التخليق الحياتي البكتيري للحامض الاميني Lysine .ترتبط سلاسل الببتيدوكلايكان ارتباطا مستعرضا وبهذا تمثل الطبقة الواحدة جزيئة عملاقة .يوجد في البكتريا الإيجابية لصبغة كرام أربعون طبقة من هذه المادة تكون(50%) من محتويات الجدار الخلوي أما البكتريا السلبية لصبغة كرام فهناك طبقة او طبقتين تكون 5-10% من محتويات الجدار الخلوي .

2-12-اثر المضادات الحيوية Effective of antibiotics :

لغرض دراسة التأثير للمضادات الحيوية على الأحياء المجهرية وخصوصا البكتيرية منها لابد من التعرف بشكل خاص على موقع تأثير المضاد الحيوي Site of action of antibiotic بالنسبة للكائن المجهري أولا ومن ثم دراسة نمط الفعل Mode of action وهنا نوجز الآتي :

1-آلية فعل المضاد الميكروبي المستخدم سريريا Mechanism of clinically used antimicrobial drug:

إن آلية عمل المضادات الحيوية تعتمد بالأساس على تثبيط نمو الكائنات المجهرية الموجودة بشكل مجموعة متأتية من تكاثر خلايا مفردة ، حيث تنقسم الخلية الواحدة الى خليتين ثم أربع وهكذا ، ولكي يؤثر المضاد في خلية الكائن المجهري يجب أن يحدث مايأتي :

أ- يدخل إلى الخلية.

ب- يرتبط فيزياويا بتركيب خلوي يشترك في عملية حيوية.

ج- تثبط هذه العملية بصورة كاملة.

يكون تأثير المضاد قاتلا للبكتريا عندما يرتبط مع مركب خلوي بشكل غير رجعي Irreversible وهذا يحدث نتيجة لتآلفه مع ذلك المركب ، أما عندما يكون اقل تالفا فان ارتباطه يكون رجعيا Reversible وبهذا فان تأثيره يكون مثبطا فقط حيث يتحلل المعقد المتكون من المضاد والمركب، عند إزالة المضاد من الوسط وبهذا تستعيد البكتريا حيويتها. (صالح ،1991).

2- السمية الانتقائيةSelective toxicity :

العوامل المضادة للجراثيم المثالية المعروفة يطلق عليها اصطلاح Selective toxicity ،(هذا المصطلح يدل على المضادات التي تسبب او تلحق ضررا بالطفيلي والتي لاتكون مؤذية للمضيف) . هذا يدل على ان المضاد في التركيز الذي يتمكن المضيف من احتماله ربما يحطم الطفيلي . وان العوامل المضادة للميكروبات يتطلب عملها التماس مع مستلمات خاصة، او قد تعتمد على منع او تثبيط تفاعلات كيموحيوية أساسية للطفيلي

دون المضيف. إن آلية فعل معظم المضادات الميكروبية لم تكن مفهومة تماما، وعلى أية حال توضع هذه الآليات في الوقت الحاضر تحت أربعة عناوين هي :

1-تثبيط تكوين الجدار الخلوي Inhibition of cell wall synthesis.
2-تغيير نفاذية غشاء الخلية او تثبيط آلية النقل الفعال عبر غشاء الخلية
Alteration of cell membrane permeability or inhibition of active transport across cell membrane.
3-تثبيط عملية صنع البروتين (مثل، الترجمة والاستنساخ للمادة الوراثية)
Inhibition of protein synthesis (i.e.; Inhibition of translation & transcription of genetic material) .
4-تثبيط تصنيع الحامض النووي Inhibition of nucleic acid synthesis .
(Jawetz,1987) .وما يعنينا هنا في هذا المجال البحثي هو الجدار الخلوي ، الذي يعتبر الهدف للكثير من المضادات الحيوية ، فضلا عن أهميته في المحافظة على الخلية من العوامل والمؤثرات الخارجية الأخرى .

2-13- عمل المضادات الميكروبية من خلال تثبيط تكوين الجدار الخلوي :

هناك العديد من المضادات الحيوية التي تعمل على تثبيط تكوين الجدار الخلوي، مثل :
.Bacitracin, Cephalosporines, Cycloserine, Penicillins, Ristocetin, Vancomycin
على العكس من الخلايا الحيوانية ، تمتلك البكتريا طبقة خارجية متصلبة Rigid outer layer تحافظ على شكل الكائن المجهري (البكتريا) ، التي تمتلك ضغطا ازموزيا داخليا عاليا .الضغط الداخلي يكون اعظم(3-5) مرات في البكتريا الموجبة لصبغة كرام عما هو عليه في البكتريا السالبة لصبغة كرام ،(جرح جدار الخلية Cell wall injury) ، على سبيل المثال بواسطة الأنزيمات الحالة Lysozymes ، أوتثبيط تكوينه قد يؤدي إلى تحلل الخلية . في البيئة ذات الضغط العاليHypertonic environment (مثل،20 % سكروز) المكونات الفاقدة للجدار الخلوي تؤدي إلى تكوين بكتريا كرويةSpherical يصطلح عليها(Protoplasts) ، للبكتريا الموجبة لصبغة كرام ، او(Spheroplasts) للبكتريا السالبة لصبغة كرام . هذه الأشكال محددة بواسطة غشاء سايتوبلازمي هش . إذا وضعت الـ Protoplasts او الـ Spheroplasts في ضغط اعتيادي تنفجر.(Jawetz, 1987).
يحتوي جدار الخلية على معقد بولميري كيمياوي متميز ، Mucopeptide (murin, Peptidoglycan) يتكون من متعدد سكريات والعديد من الروابط متعددة الببتيدات . متعدد السكريات يحتوي بصورة منتظمة على سكريات أمينية N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid ، الاخير موجود في البكتريا فقط . السكريات الأمينية ترتبط بسلاسل خماسية الببتيد . الصلابة النهائية لجدار الخلية البكتيرية متأتية من الروابط الموجودة بين السلاسل الببتيدية ، مثل Pentaglycine bonds ، كنتيجة لتفاعل الاواصر الببتيدية المستعرضة Transpeptidation الحاصل نتيجة عمل عدة إنزيمات. طبقة الببتيدوكلايكان اكثر سمكا في البكتريا الموجبة لصبغة كرام من البكتريا السالبة لصبغة كرام. جميع البنسلينات والسيفالوسبورينات (البيتا لاكتام) هي مثبطات اختيارية لتكوين الجدار الخلوي للبكتريا .
يمكن تقسيم مثبطات الجدار الخلوي الى صنفين :
1-مثبطات تصنيع مادة Peptidoglycan وهي الأغلبية .
2-مثبطات تصنيع او ارتباط بقية مكونات الجدار الخلوي ، والمضاد الوحيد العائد لها الذي درست ميكانيكية عمله بصورة كافية هو المضاد Bicyclomycin الذي يثبط تصنيع او

ارتباط الشحوم البروتينية Lipoprotein الموجودة في الغشاء الخارجي للبكتريا السلبية لصبغة كرام ، ومن الواضح انه يؤثر في أفراد هذه المجموعة فقط .
ويمكن تصنيف مثبطات تصنيع مادة الببتيدوكلايكان في ثلاث مجاميع اعتمادا على العملية التي يتم فيها التداخل :
1-مثبطات تكون وحدات البناء مثل Cycloserine و Phosphomycin .
2-مثبطات تكون الدايمر dimer ومثبطات انتقاله الى سلسلة متعدد الببتيد النامية وتشمل Flavomycin. و Ristocillin و Bacitracin وVancomycin.
3-مثبطات الارتباط المستعرض Cross linking مثل Cephalosporin وPenicillin و Cephalomycin و Thienamycin .تشارك هذه المثبطات بكونها قاتلة في تأثيرها ولا تؤثر في الخلايا الخاملة او الخلايا التي تفتقد الى وجود الجدار الخلوي مثل Mycoplasma و L- forms والبروتوبلاست Protoplast .
من الأمثلة على مثبطات تصنيع الجدار الخلوي: البنسلين والسيفالوسبورين ، تؤثر هذه المضادات من خلال منعها لعملية نضوج الـ Peptidoglycan مؤدية الى موت الخلية كما يلي :
1-تثبط الإنزيمات المسؤولة عن الارتباط المستعرض Transpeptidase بسبب تركيبها المشابه لـ D alanyl-Dalanine .
2- يؤدي عدم وجود الارتباط المستعرض الى تكوين جدار خلوي ضعيف .
3- يؤدي تكون المواد السايتوبلازمية في الخلية الى زيادة الضغط على الجدار الخلوي مؤديا الى انفجارها وموتها .(صالح،1991).

14-2-اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic sensitivity test :

مضادات الحياة مواد ناتجة عن أيض الأحياء المجهرية ذات وزن جزيئي واطئ (150-5000 دالتون) تمتلك القدرة على تثبيط او منع نمو الكائنات المجهرية الأخرى عند استعمالها بتراكيز قليلة(اقل من ملغم/سم^3) . لا تشمل مضادات الحياة الأنزيمات مثل Lysozyme كذلك البروتينيات المعقدة ذات التأثير المضاد في البكتريا، يدخل ضمن المضادات الحيوية مجموعة مضادات الحياة نصف المصنعة التي تشمل :
1-المنتجات المستحصلة بواسطة التحوير الكيمياوي للمضادات الطبيعية وغيرها من منتجات الايض الميكروبي .
2-المنتجات المستحصلة بواسطة التحوير الميكروبي للمواد المصنعة .
(صالح، 1991).

15-2- الخلق البيولوجي للمضادات الحيوية Biosynthesis of antibiotics

تعد المضادات الحيوية نواتج تمثيل ثانوية Secondary metabolites لا تمتلك وظيفة ظاهرة في الخلية وتنتج عادة بعد توقف النمو في الطور المسمى Idiophase ويعد التخليق الحياتي للمضادات عملية تحوير بسيط للايض الخلوي الاعتيادي . يمكن وضع المضادات الحيوية في المجاميع الآتية على أساس ميكانيكية الخلق الحياتي :
1-مشابهات المواد الأساسية الناتجة عن الايض(Primary metabolites) مثل (الأحماض الأمينية ، النيوكلوسيدات ، الإنزيمات المساعدة) ، وتكون هذه بشكل جزيئات صغيرة وتكون غالبا متشابهة على مستوى التركيب الكيمياوي .
2-مضادات مشتقة بعملية البلمرة Polymerization وتشمل :

أ-مضادات متعددة الببتيد Polypeptide antibiotics ومشتقاتها وتنتج عن طريق تكثيف الاحماض الأمينية لانتاج سلسلة متعددة الببتيد التي تحور فيما بعد بواسطة تفاعلات أخرى.

ب- مضادات مشتقة من الخلات والبروبيونات وتتغاير هذه كيمياويا ولكنها تشتق جميعا من التفاعلات التي تعقب الخلق الحياتي للاحماض الشحمية .

ج- مضادات التيربينويد Terpenoid antibiotics ، وتشتق هذه من تصنيع الـ Isoprene وتنتج هذه المجموعة بواسطة الفطريات فقط .

د- مضادات الكلايكوسايد الامينـي Aminoglycoside ، وتشتق من تكثيف جزيئات السكر ، وغالبا السكريات الامينية Amino sugar وكذلك من تكثيف جزيئات الكحول الاميني Amino alcohol . عدا هذا قد يتم الخلق البيولوجي للمضادات الحيوية بطرق غير مشابهة لطرق الخلق الاعتيادي وذلك عن طريق تكثيف اجزاء الوحدات Sub units الناتجة من طرق الخلق المذكورة سابقا .

16-2- الأصناف الرئيسية للمضادات الحيوية : Principal classes of antibiotics

1- مضادات البيتا لاكتام β-Lactam :

تشمل هذه المضادات، البنسلينات والسيفالوسبورينات Penicillins & Cephalosporins أعطيت هذا الاسم بسبب احتواء تركيبها على حلقة رباعية الذرات تسمى **β - Lactam** تصنع هذه المضادات بواسطة الفطريات العائدة للجنس ***Cephalosporium*** و ***Penicillium*** وقد وجد ان الجنسين***Nocardia*** و***Streptomyces*** العائدة لمجموعة الاكتينومايسيتات وكذلك الجنس البكتيري ***Pseudomonas*** تنتج هي الأخرى مضادات عائدة لنفس هذه المجموعة .تخلق هذه المضادات بيولوجيا من بلمرة الأحماض الأمينية .تؤثر هذه المضادات في البكتريا من خلال تثبيطها لعملية تصنيع مادة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan الموجودة في الجدار الخلوي وبهذا تسبب تلفا غير رجعي Irreversible ولا تؤثر هذه المضادات في الفطريات بسبب عدم امتلاك الأخيرة لمادة الببتيدوكلايكان في جدارها ، كذلك لا تؤثر في ***Mycoplasma*** لعدم امتلاكها لجدار خلوي . (صالح،1991).

2-مضادات الكلايكوسيدات الأمينية Aminoglycosides :

تمثل هذه مجموعة كبيرة من المضادات تنتجها الأجناس البكتيرية : ***Streptomyces,Micromonospora,Bacillus*** ،يتميز تركيبها الكيمياوي بوجود كحول أميني حلقي Cyclic aminoalcohol المرتبط ببعض السكريات الامينية وتشتق جميع هذه المركبات من الكلوكوز بواسطة الخلق الحياتي. تؤثر هذه المضادات في عملية تصنيع البروتين في البكتريا ويكون تأثيرها قاتلا خصوصا ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام .ومن هذه المضادات Streptomycin الذي استعمل في علاج مرض السل ،وهو أول مضاد حيوي اكتشف في هذه المجموعة .كذلك ينتمي لهذه المجموعة أعداد أخرى مثل، Amikacin,GentamycinTobramycin,Kanamycin ، التي تكون فعالة تجاه المجاميع البكتيرية ذات الحساسية الواطئة للـ Streptomycin . أفراد هذه المجموعة شديدة الذوبان في الماء بسبب تركيبها الكيمياوي لذا لا تمتص عند إعطائها عن طريق الفم، (صالح،1991).

3-مجموعة التتراسايكلين Tetracyclines :

تـؤثر فـي عـدد كبيـر مـن البكتريـا وهـي ذات قابليـة علاجيـة مثبطـة وتشـمل Tetracycline, Chlorotetracycline,Oxytetracycline ، تنـتج هـذه المجموعـة مـن المضادات من عترعائدة للجنس *Streptomyces* وهي تخلق حياتيا بعملية Cyclization لسلسلة ناتجة من تجمع وحدات الخلات والمالونات Acetate and malonate ويتكون تركيبها الكيمياوي من أربع حلقات ومن هنا جاءت تسميتها . تؤثر هذه المجموعة في عملية تصـنيع البـروتين الرايبـوزي ويكـون تأثيرهـا رجعـي reversible لـذا فهـي مثبطـةBacteriostatic وغير قاتلة للبكتريا ، تشمل فعاليتها البكتريا الإيجابية والسلبية لصبغة كرام والركيتسيا والكلاميديا وبعض الابتدائيات وهي لا تذوب في دالة الحموضة المتعادلة لذا يمكن إعطائها عن طريق الفم . (صالح1991).

4- مجموعة الماكروليدز Macrolides :

تمتلك هذه المضادات تركيبا كيمياويا يتكون من حلقة مكونة من(12) ذرة من الكربون في الأقل ومغلقة تسمى بمجموعة اللاكتون Lactone ، تنتج هذه المضادات من مجموعة ***Streptomyces*** وتخلق حياتيا عن طريق تجمع الخلات والبروبيونات Acetate and propionate وهي تقسم الى صنفين :

1-مضادات البكتريا Antibacterial Macrolides :

تتميز باحتواء حلقات اللاكتون فيها على(12-16) ذرة ترتبط بها جريئتين من السكر على الأقل وهي تؤثر في عملية صنع البروتين بواسطة تداخلها مع الرايبوسومات 50S) (subunit ويكون تأثيرها رجعي وهي لذلك مثبطة. تؤثر هذه المجموعة في البكتريا الإيجابية لصبغة كرام ويمثلها المضاد Erythromycin وهي تؤخذ عن طريق الفم .

2-مضادات الفطريات ومضادات الابتدائيات :

حلقات اللاكتون فيها تتكون من30 اواكثر من الذرات مع وجود الهيدروكسيل كبدائل وتشمل سلاسل تحتوي على 4-7 أواصر ثنائية مقترنة Conjugate double bond،وهي فعالة فقط عند حقنها في الوريد وتسبب تخريب الغشاء الخلوي بتداخلها مع الستيرول الموجود ولهذا تكون غير فعالة ضد البكتريا لعدم احتوائها على الستيرول في غشائها.تكون هذه المجموعة سامة لذا يقتصر استعمالها على الحالات الصعبة واحسن مضاد يمثلها Amphotericin B .(صالح،1991).

5- مجموعة Ansamycin :

تتكون من سلسلة اليفاتية تربط حلقة اروماتية من نقطتين متضادتين بشكل يشبه المقبض ومن هنا جاءت التسمية .تنتج من عتر عائدة لعدة أجناس من رتبة Actinomycetales ، وتقسم هذه المجموعة الى مجموعتين هما النفثالينات naphthalenes والبنزينات benzenes اعتمادا على نوع الحلقة الاروماتية الموجودة .المجموعة الأولى مضادة للبكتريا وهي متخصصة على مستوى تأثيرها في الأنزيم RNA polymerase حيث تقوم بتثبيطه، أما المجموعة الثانية فهي اقل تخصصا وقد يكون البعض منها مواد مضادة للأورام Antitumer agents ، مثل mytansin . يقع المضاد الحيوي Rifamycin ضمن مجموعة naphthalene وهو شديد الفعالية ضد البكتريا الإيجابية لصبغة كرام وكذلك Mycobacterium لا يستعمل Rifamycin الطبيعي في العلاج ولكن الريفامايسينات نصف المصنعة مثلRifamycin SV تكون ذا فائدة علاجية.

2-17- أنواع أخرى عديدة من المضادات الحيوية المختلفة التي لها تأثيرات مثبطة او قاتلة للأحياء المجهرية مثل ، مجموعة البوليبتايد والدسيبتايد التي منها: gramicidin,Bacitracin,polymyxin ويعتبر أكثرها أهمية polymyxin ويكون فعالا جدا ضد البكتريا السلبية لصبغة كرام رغم إن له بعض السمية . تتداخل هذه المضادات مع تركيب الغشاء البلازمي ولهذا فان تأثيرها يكون قاتلا ، في حين بعضا منها يؤثر من خلال تداخله مع تصنيع البروتين .كما إن هناك مضادات اخرى لايمكن أن تصنف في أي مجموعة من المجاميع المذكورة وتستعمل في علاج الأمراض مثل: Chloramphenicol,Lincomycin,Fusidic acid,Vancomycin, Grisofulvin, Daunomycin and Adrimycin. (Franklin et al, 1975;Lancini et al,1983) .

1-المقاومة لمضادات البيتا لاكتام β- Lactam Resistant : من المحتمل ان تكون المقاومة لهذه المضادات ناتجة عن واحد او اكثر من المسببات الآتية :

1-إنتاج أنزيمات **β -Lactamase** التي تشفر بواسطة جينات كروموسومية . (Moellering,1993;Fournier et al,1999).

2- تحمل المضادات كما يحصل في *S. aureus* . (Bradely et al,1980; Sabath,1980)

3-نتيجة لطفرة كروموسومية في الجين المشفر للبروتينات الرابطة للبنسلين ، مؤدية الى تغايره (Henry, 1993) .

4-نتيجة لفقدان الثقوب التي يحتويها جدار الخلية كما في حالة*K.pneumoniae* . (Martize, 1999).

2-المقاومة للكلايكوسيدات الأمينية مثل الـ Tobramycin و Gentamycin والـ Streptomycin: قد تعزى لكل من :

1-بروتين (12) المشفر لطفرة جينية كروموسومية الذي يعمل كمستلم للستربتومايسين. (Metha& Champeny, 2002).

2-تلف نفاذية الأدوية نتيجة لجين معيوب يشفر لتوليد طاقة امتصاص.(Miller et al,1980) .

3-إنتاج عقاقير محورة للإنزيمات من خلال تغيير مجاميع أمينية او كربوكسيلية لمضاد الكلايكوسيد الأميني (Madel,1984; Shanon&philips ,1982) .

3-المقاومة للـ Erythromycin و الـ Clindamycin : يمكن ان تحصل نتيجة اكتساب مستلم دوائي آخر على الرايبوسوم 50 S في rRNA . (Bingin *et al* 2002).

4-المقاومة للريفادين Rifampicin Resistant تحصل هذه المقاومة نتيجة لطفرة في تحت الوحدة (B- Subunit) في الجين على RNA Polymerase التي تؤدي الى ارتباط غير وظيفي.(Damon et al 2002).

5-المقاومة للتتراسايكلين والفانكومايسين Tetracycline & Vancomycin : يمكن ان تكون كنتيجة لتلف نفاذية غشاء الخلية البكتيرية متجنبة دخول المضاد الحيوي لها. (Fariel et al,1978;Stewart&Dublin,1994).

6-المقاومة للكلورامفنيكول Chloramphenicol Resistant: في هذا النوع من المقاومة ، البكتريا تطور نظام إنزيمي يستطيع تحوير العقار الى الشكل غير الفعال(Shaw, 1984) **7- مقاومة *Pseudomonas aeruginosa*** : للعقاقير يمكن ان تعزى الى :

أ-وجود بروتين مرتبط بالغشاء يستطيع نقل أو تحويل مسار العقار بعيدا عن الخلية مما يجعله غير فعال في حف او (إحاطة) الحشوة (Matrix) .(James,1999).
ب- تحوير مركب غير وظيفي ، يسد الموقع الهدف لمستلم العقار، او يقلل من نفاذية العقار. (Lyobo et al,1994) .

18-2- أسباب فشل المضاد الحيوي في العلاج :

هناك العديد من العوامل التي تؤدي الى فشل المضاد الحيوي في العلاج ، ومن هذه العوامل الآتي :

1-عوامل العقار:

أ- الجرعة غير كافية.
ب-طريقة التناول خاطئة.
ج- طول الفترة الفاصلة بين جرعة وأخرى.
د- فشل انتشار واختراق المضاد للمنطقة المصابة.
هـ-عدم تطابق مزج المضاد مع السوائل المعطاة عن طريق الوريد .
ز- الفشل في مراعاة الخصائص الفيزياوية للمضاد ، مثل العلاقة بين الفعالية والأس الهيدروجيني pH .
ح- الفشل في مراعاة آلية الفعل للمضاد الحيوي (مثل تنافس السلفانومايد مع حامض البارااميبنزوك).
ط- الحمى العلاجية Drug fever (هل الحرارة بسبب المضاد نفسه؟).
(Gardner & Provine,1975).

2-عوامل الممرض Pathogen factors :

أ-الممرض البكتيري يصبح مقاوم للمضاد الحيوي وراثيا او مظهريا.
Genetically or phenotipically.
ب-البكتريا في طور نشط او خامل. أشكال L- Form اوSpheroplasts هي المشكوك فيها.
ج- الخمج قوي جدا.

3- عوامل المضيف :

1-تقيح غير جاف ، قناة مسدودة او جسم غريب .
2-التهاب الوريد (Phlebitis) في موقع الحقن الوريدي او في موقع الحقن العضلي.
3-تغايرات طبيعية متوقعة في مسلك العلاج السريري .
4-عيب او خلل في الدفاعات الخلطية والخلوية.
5- لدى المريض سلسلة من الأمراض المرافقة.

4- عوامل الإنسان :

1- تشخيص خاطئ.
3-المضاد الحيوي معطى بطريقة خاطئة.
(Gardner & Provine ,1975).

الفصل الثالث CHAPTER THREE :

المواد وطرق العمل Materials and methods

3-1: المحاليل المستخدمة :

3-1-1- المحلول المحلي الطبيعي : Normal saline

تـم تحضـير هـذا المحلـول بتركيـز (0.85%) باذابـة 0.85 غـم مـن مـادة كلوريـد الصوديوم(NaCl) شركةBDH (الوزن الجزئي 58.44) في كمية قليلة من الماء المقطر واكمل الحجم الى 100 مل وعقم بجهاز الموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1.5 بارد لمدة 15 دقيقة . استخدم هذا المحلول في تقنية التخافيف Dilution method technique. (Domingue ,1982) .

3-1-2 - محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 :

حضر بتركيز(3%) كما ورد في (Stukus , 1997) . استخدم لغرض الكشف عن قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم الكاتاليز Catalase .

3-2 - الكواشف :

3-2-1- كاشف الأنزيم المؤكسد Oxidase reagent :

حضـر بإذابـة 1 غـم مـن Tetramethyl-para-phenylene diamine dihydrochloride في 100 مل من الماء المقطر ، حضر الكاشف قبل أجزاء الفحص بفترة قليلة تجنبا لتأكسده السريع عند تعرضه للضوء، (Cruikshank et al,1975) .

3-3- الصبغات Stains :

3-3-1- صبغة كرام Gram s stain :

حضرت هذه الصبغة كما ورد في Baker et al , 1978 من المواد التالية :

3-3-2- صبغة Crystal violate : حضرت باذابة 0.5 غم من الصبغة في100 مل من الماء المقطر.

3-3-3- محلول اليود Iodine :

حضر بإذابة 1 غم من اليود و 2 غم من يوديد البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر.

3-3-4- كحول مطلق Absolute alcohol

3-3-5- صبغة السفرانين Sufranin :

حضرت بإذابة(1.5) غم من الصبغة في 100 مل ماء مقطر .

3-3-6- صبغة دينز Dienes stain :

حضرت كما ورد في(Domingue , 1982) ، استعملت هذه الصبغة لفحص البكتريا الفاقدة للجدار الخلوي ، وتتكون الصبغة من المواد التالية :

0.5gm	Methylen blue
1.25gm	Azure II
10gm	Maltose

0.25gm Na2CO3
0.20gm Benzoic acid
100ml Distilled water

وعقمت قبل الاستعمال بطريقة الترشيح باستعمال مرشحات ذات ثقوب بقطر0.22 مايكرون .

3-3-7 - صبغة ليشمان Leishman stain :

تحضر هذه الصبغة من إذابة (0.1 غم) من الصبغة في (50مل) من الكحول الاثيلي المطلق ، ثم ترشح ثلاث مرات بعدها تكون الصبغة جاهزة للاستخدام (Cruickshank et al, 1975) .وتجرى عملية التصبيغ كما يلي :

1-تحضر مسحة من القشع على سطح شريحة زجاجية نظيفة ، بأخذ كمية من القشع بواسطة مطباق خشبي Wooden applicator ، تجفف المسحة بالهواء او عن طريق امرارها فوق لهب هادئ عدة مرات .

2-تغمر المسحة بصبغة ليشمان لمدة دقيقة واحدة .

3-يضاف المحلول الدارئ (بمقدار ضعف حجم الصبغة المضافة) الى الصبغة الموجودة على الشريحة الزجاجية .

4- تمزج الصبغة جيدا باستعمال ماصة باستور بطريقة النفخ .

5- تترك الشريحة مع الصبغة مدة تسعة دقائق .

6- تغسل بعدها بالماء.

7- تنظف الشريحة المصبوغة من الأسفل للتخلص من بقيا الصبغة العالقة .

8- تجفف بالهواء ، تفحص تحت العدسة الزيتية للتحري عن نوع الخلايا الدفاعية الموجودة في المسحة ،(تم عد اكثر من 10 خلايا دفاعية والتي غالبا ما كانت من نوع الخلايا اللمفاوية والخلايا متعددة أشكال النوى Polymorphonuclear (PMN) .

3-3- 8- صبغة العصيات المقاومة للقصر بالحامض(AFB) Acid fast stain) :

يعرف التصبيغ بهذه الصبغة بطريقة Ziehl - Neelsen method نسبة الى العالمين اللذين قاما بتحوير الطريقة الأصلية لـ (Ehrlich's method , 1882) كصبغة تفريقية Differential للعصيات المقاومة للقصر بالحامض وتتكون الصبغة من المواد الآتية:

1-Ziehl - Neelsen's (strong) carbol fuchsin
Basic fuchsin……10gm
Absolute alcohol (ethanol…..100ml
Solution of phenol (5 percent in water….. 1000ml)

تذاب الصبغة في الكحول وتضاف الى محلول الفينول ، يذاب الفوكسين في الفينول في دورق سعة لتر واحد فوق حمام مائي يغلي مدة خمس دقائق وترج المحتويات بين فترة وأخرى وعندما يُحل تماما يضاف الكحول ويمزج بشدة ثم يضاف الماء المقطر.

2-Sulfuric acid 20 % solution
3-Alcohol 95%
Ethanol 95 ml plus water to 100 ml.
4- counter stain (Loffler's methylene blue)

تحضر مسحة من القشع وتصبغ كالاتى:

1- تغطى الشريحة بصبغة الكاربول فوكسين المرشحة ، وتسخن حتى يلاحظ تصاعد البخار (مع تجنب الغليان) تترك فترة خمس دقائق ويكون التسخين على فترات متقطعة للاحتفاظ بالصبغة ساخنة (من الضروري إضافة صبغة الفوكسين في حالة عدم تغطيتها للشريحة بصورة كاملة) .
2-تغسل الشريحة بالماء.
3-تغطى الشريحة بمحلول حامض الكبريتيك ذو تركيز 20% ، مدة دقيقة واحدة ،حتى يتغير اللون الأحمر الى اللون البني المصفر Yellowish brown ، وقد يحتاج الى إعادة هذه العملية عدة مرات ، والغرض من ذلك هو إزالة معقد الصبغة مع الحامض . تنتهي عملية القصر عندما يشاهد لون وردي خفيف .
4-تغسل الشريحة جيدا بالماء .
5-تضاف الصبغة المضادة Methylene blue لفترة 15-20 ثانية . بعدها تجفف الشريحة ثم تفحص ، بحثا عن عصيات التدرن(Cruickshank et al , 1975).

3-4- الأوساط الزرعية Culture media :

3-4-1- وسط نقيع(القلب-الدماغ السائل)

: Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

حضر هذا الوسط استنادا الى تعليمات الشركة المصنعة (Oxoid) ، واستخدم في تحضير وسطي الفارينت السائل والصلب .

3-4-2- وسط الماكونكي الصلب MacConkey's agar (MA) :

حضر هذا الوسط استنادا الى تعليمات الشركة المصنعة (Mast) ، واستعمل للتفريق بين البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز وغير المخمرة له ، وكذلك للتفريق بين البكتريا السالبة لصبغة كرام والموجبة لها .

3-4-3- وسط اكار الدم الصلب Blood agar (BA) :

حضر هذا الوسط استنادا الى تعليمات الشركة المنتجة (Oxoid) ، بإضافة 5% من دم انسان الى وسط غراء الدم الاساس . Blood agar base.

3-4-4- وسط كلكلر والحديد الصلب(KIA) Kligler Iron agar :

حضر هذا الوسط استنادا الى تعليمات الشركة المصنعة (Oxoid) ، استعمل لمعرفة قابلية البكتريا على تخمر السكريات وانتاج غاز H2S . يحتوي هذا الوسط على نوعين من السكريات هما اللاكتوز والكلوكوز0.1% .

3-4-5- وسط الفارنيت السائل Variant Broth :

حضر هذا الوسط كما جاء في (Domingue , 1982) ، بإذابة 37 غم من وسط نقيع القلب- الدماغ السائل(BHIB) و100 غم من السكروز(fluka) و5 غم من خلاصة الخميرة Yeast extract (Mast) في لتر واحد من الماء المقطر ثم ضبط الأس الهيدروجيني (pH) للوسط بين (7.6-7.4) ثم وزع في أنابيب زجاجية سعة(25 مل) بمعدل 10 مل للأنبوبة الواحدة ثم عقم بالموصدة بدرجة حرارة 121مْ لمدة 15 دقيقة.

3-4-6-وسط اكار الفارينت الصلب Variant agar (VA) :

حضر هذا الوسط بإضافة 12 غم من مادة الأكار (Biolife) الى نفس مكونات وسط الفارينت السائل أعلاه ، وعقم بالموصدة بدرجة حرارة 121مْ لمدة 15 دقيقة، ثم صب في أطباق بلاستيكية معقمة (Domingue , 1982) .

3-4-7- الوسط ثنائي الطور Biphasic medium (Bim) :

حضر هذا الوسط بصب 10 مل من وسط الفارينت الصلب في أنابيب زجاجية ذات قاعدة مسطحة Flat bottom (سعة 25 مل) محكمة السد وعقمت بالموصدة بدرجة حرارة 121مْ لمدة 15 دقيقة، ثم وضعت بشكل مائل لحين تصلب الوسط ، ثم أضيف لكل أنبوبة 5 مل من وسط الفارينت السائل المعقم .

3-4-8- وسط تخمر السكريات Carbohydrate Fermentation Medium:

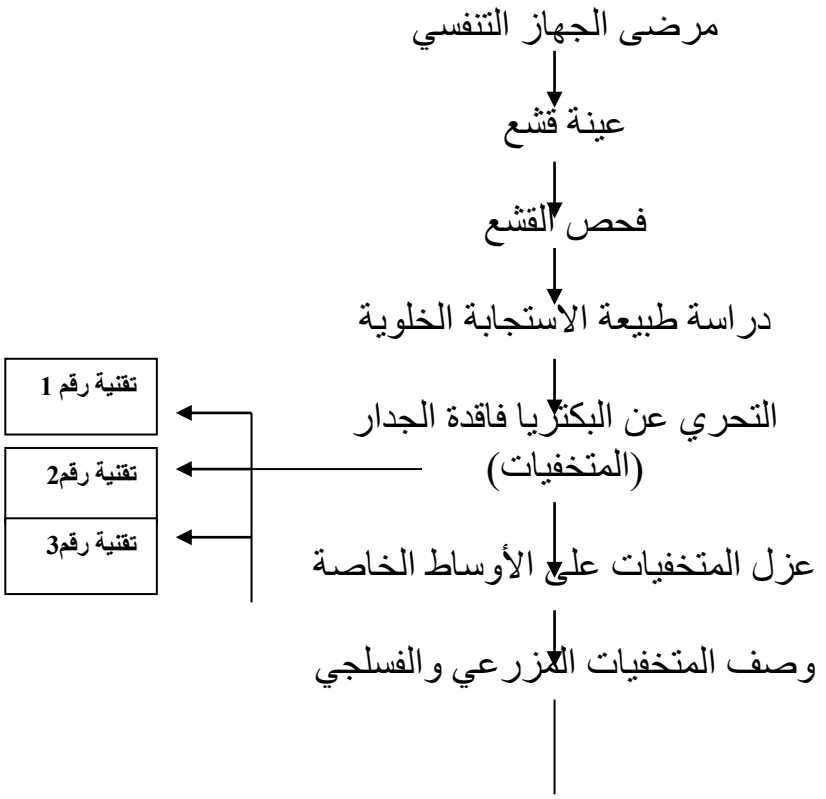
حضر هذا الوسط كما ورد في (Macfaddin , 2000) من 10غم ببتون و1 غم خلاصة اللحم Beef extract و5 غم من Nacl و 0.018 غم من دليل الفينول الأحمر في 1000 مل من الماء المقطر ، وضبط الأس الهيدروجيني إلى 7.4 ثم وزع بأنابيب اختبار ، واضيف لكل أنبوبة اختبار أنبوب درهم للتحري عن انتاج الغاز وعقمت بالموصدة بدرجة حرارة 121مْ لمدة 15 دقيقة، ثم حضرت محاليل السكريات بتركيز1% لكل من (سكروز ، مالتوز ، كلوكوز ، لاكتوز ، زايلوز ، مانيتول،تريهالوزواينوسيتول) ، وعقمت بالترشيح ووزعت على أنابيب الاختبار بمقدار(1) مل لكل أنبوبة . استعمل هذا الوسط لمعرفة قدرة البكتريا على تخمير السكريات وانتاج الحامض والغاز منها .

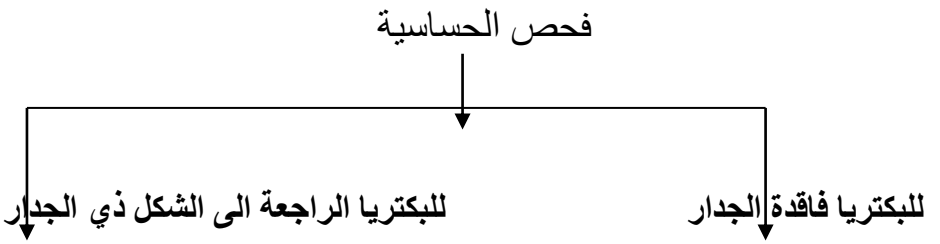
3-4-9- وسط احمر المثل-فوكس بروسكور

(Macfaddin, 2000) Methyl red- Vogus proskaur).

3-4-10- وسط ماء الببتون Peptone Water : حضر هذا الوسط من 10 غم ببتون و 5 غم كلوريد الصوديوم NaCl في لتر واحد من الماء المقطر ثم وزع في انابيب زجاجية وعقم بالموصدة بدرجة حرارة121مْ لمدة 15 دقيقة، واستعمل لغرض الكشف عن إنتاج جذر الاندول. (Macfaddin, 2000) .

3-5- التوالي المنطقي لمنوال الدراسة





3-6 - طرق العمل Methods :

3-6-1- : جمع العينات :

تم جمع 51 عينة قشع للفترة من أيلول2003 ولغاية منتصف تشرين الاول2004 من العيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية / بابل ومستشفى الهاشمية العام في محافظة بابل من الذكور والإناث المرضى والذين يعانون من إصابات مستديمة لا تستجيب للعلاج ، سالبة الزرع في المزارع الروتينية ، بواسطة عبوات خاصة معقمة ومحكمة الغلق، وتم جمع 74 عينة كسيطرة (إصابة ببكتريا سويةIntact bacteria)، وجرى نقل العينات، خلال فترة لا تجاوز3 ساعات ، ومن ثم اجريت لها الاختبارات اللازمة .

تراوحت أعمار المرضى ما بين (8-81) سنة ، حيث تم اختيار العينات بالاستناد الى تشخيص الطبيب الاختصاصي والتشخيص السريري للحالة ، ووجود تاريخ لمراجعات متكررة ، وتلك المراجعات تؤكد الآتي :

1-فحص القشع المباشر للتحري عن عصيات التدرنAcid fast Bacilli(AFB) سالب.

2-وجود اكثر من 10 خلايا قيحية Pus cells .

3-يتعاطون العلاج ولايوجد تحسن .

4-نتائج الزرع البكتريلوجية الروتينية سالبة (لايوجد نمو للبكتريا المرضية) . لذا أجريت الفحوصات الزرعية بعد اخذ العينات،على الاوساط الزرعية الاعتيادية(الزرع الروتيني) ، مثل وسط اكار الدم واكار الماكونكي للتأكد من انها سالبة النتائج(انعدام نمو المسبب الممرض) لغرض ادخالها في هذا المجال البحثي.

3-6-2 - تقنيات الزرع للتحري عن فاقدات الجدار من المسببات المشاركة في التهاب الجهاز التنفسي المستديم :

بعد اخذ نموذج القشع من المريض ونقله تحت الظروف القياسية ، تم زراعته بسبعة طرق للزرع هي :

1-زراعة القشع الكامل بالطرق الاعتيادية المعروفة في مختبرات الأحياء المجهرية .

2-زراعة رائق القشع بعد إجراء عملية الطرد المركزي .

3-زراعة راسب القشع غير المغسول .

4-زراعة راسب القشع المغسول بماء الملح الوظيفيNormal saline .

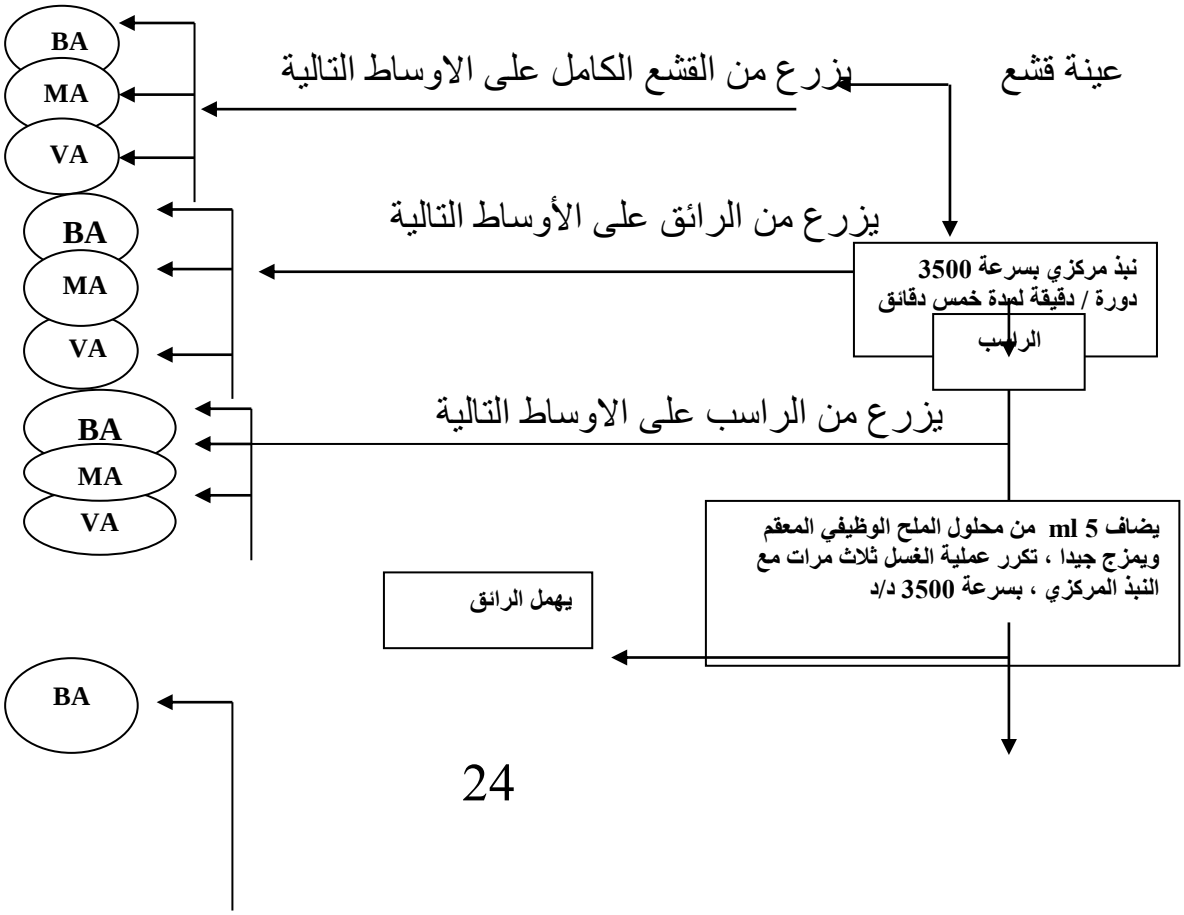
5-زراعة راسب القشع المكسر أو المحلل Lysis بالماء المقطر المعقم بعد النبذ .

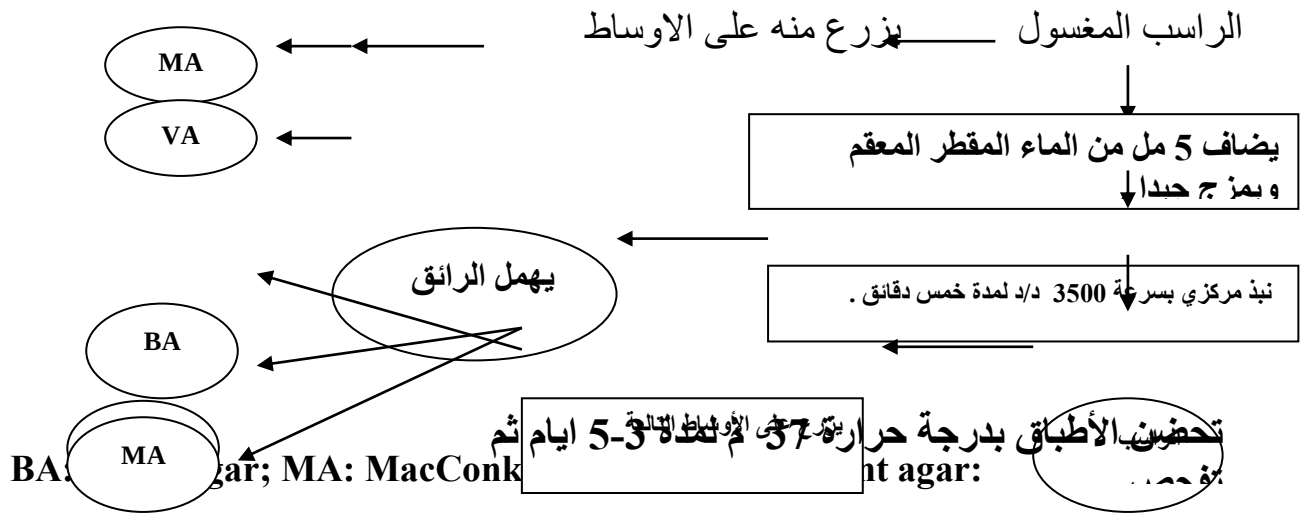
6-زراعة رائق القشع المرشح المخفف .

7-المزرعة ثنائية الطور .

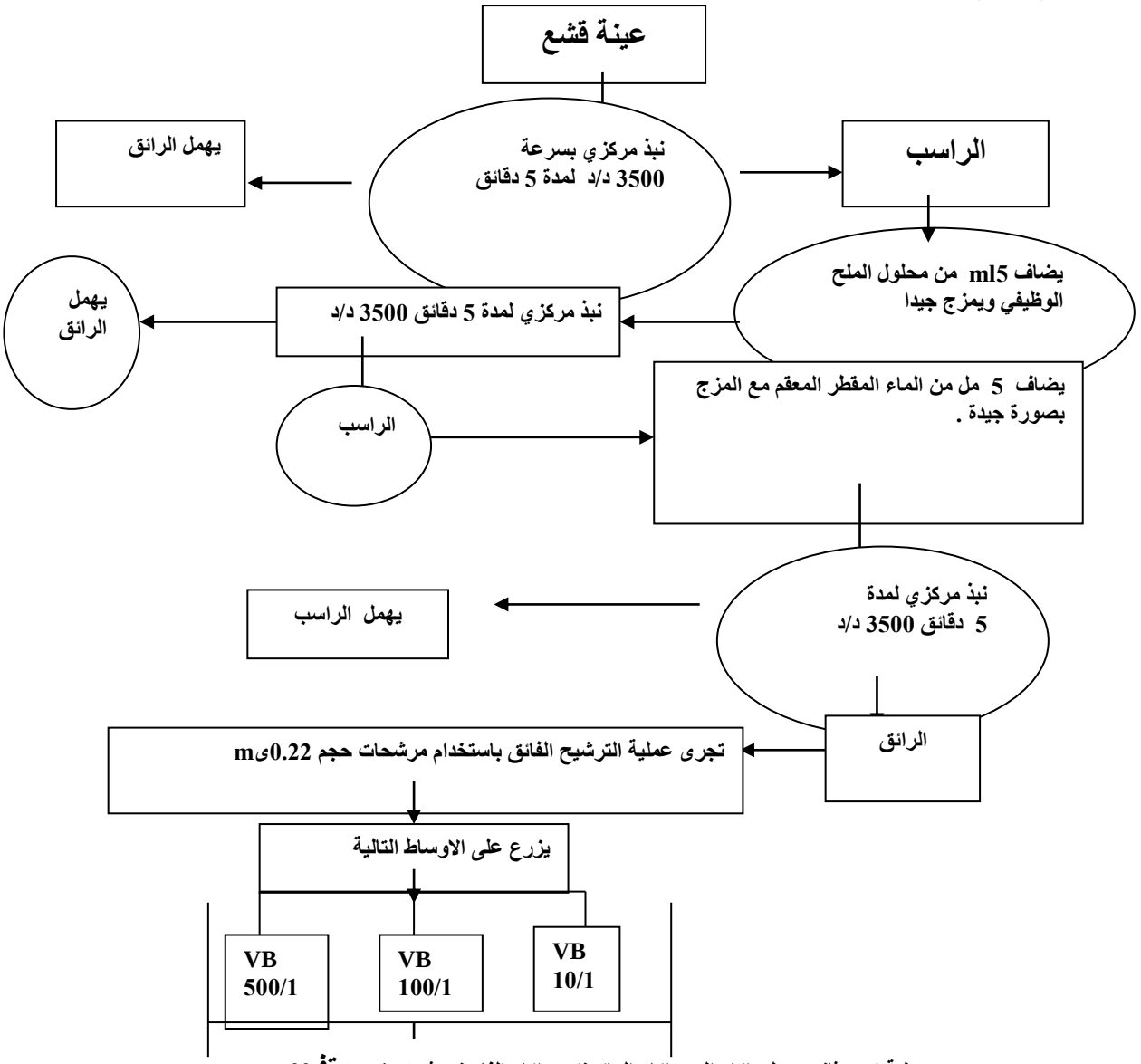
وتندرج هذه الطرق ضمن ثلاث تقنيات لزرع القشع هي :
1-تقنية الزرع المتسلسلSerial culture technique كما موضح في الشكل رقم(3-1)
2-تقنية الترشيح الفائق للرائق وتخفيفه (تقنية التخافيف) Dilution method technique
.كما موضح في الشكل (3-2).
3-تقنية زرع القشع المتسلسل رقم (1) والراشح المخفف ، تقنية رقم (2) ، مع المزرعة ثنائية الطور (Biphasic medium) ، كما موضح في الشكل رقم (3-3) .
وتتطلب كل من الطرق السبعة المشار اليها اعلاه الى أربعة أنواع من الاوساط الزرعية هي :
1-وسط مرق الفارينت (Variant Broth (VB .
2-وسط اكار الفارينت (Variant Agar (VA) .
3- وسط اكار الدم (Blood Agar (BA)
4-وسط اكار الماكونكي (MacConkey's Agar (MA) .
بالإضافة إلى مرشح دقيق Millipore Filter paper 0.22µm وأنابيب بلاستيكية نبيذه ومعقمة وأنابيب زجاجية معقمة سعة 25ml، ومحاقن طبية قياس 5ml نبيذة . ويتطلب إكمال التقنيات المشار اليها من (5-7) أيام للعينة . ومن خلال هذه التقنيات أمكن التحري عن المسبب المشارك في مادة القشع، على اسطح الخلايا أو داخل الخلايا القيحية.

الشكل رقم (3-1) مخطط يوضح تقنية الزرع المتسلسل للقشع

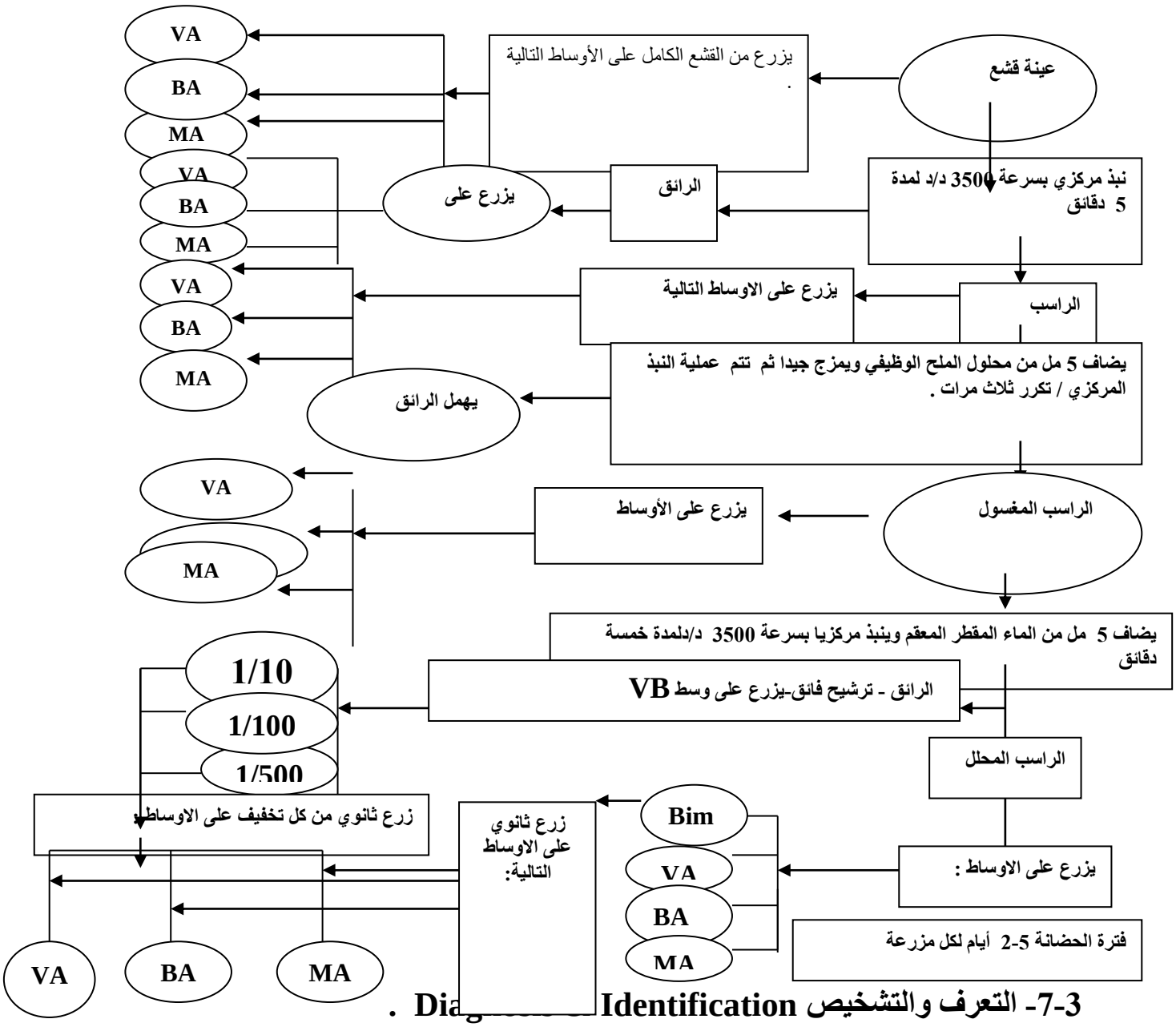




الشكل (3-2) مخطط يوضح تقنية التخافيف



الشكل (3-3) مخطط يوضح تقنية الزرع المتسلسل والراشح المخفف مع المزرعة ثنائية الطور



3-7- التعرف والتشخيص Identification . Dia

3-7-1- الشكل الخارجي Morphology .

جرى تحضير مسحات مباشرة من المستعمرات النامية على الأوساط الزرعية المختلفة وبعد تثبيتها بامرارها على نار هادئة تم صبغها بصبغة كرام ، كذلك جرى تصبيغ المستعمرات النامية على وسط الفارنيت الصلب (VA) الفاقدة للجدار الخلوي بصبغة دينز باستعمال تقنية غطاء الشريحة وتقنية قالب الاكار :-

أ-تقنية غطاء الشريحة Cover slip technique :

1-اخذ غطاء شريحة زجاجية نظيف ووضع على سطح الوسط الزرعي الحاوي على المستعمرات البكتيرية الفاقدة للجدار الخلوي وضغط للأسفل بهدوء بواسطة ملقط معقم وذلك لكي تلتصق عليه المستعمرات البكتيرية.

2- نقل غطاء الشريحة المحمل بالمستعمرات البكتيرية بواسطة ملقط معقم ووضع على شريحة تم تثبيت غطاء الشريحة على الشريحة الزجاجية بوضع قطرات ماء عند الزوايا.

ثبتت المسحة على الشريحة بوضع عدة قطرات من كحول الميثانول على غطاء الشريحة ، ثم جفف بالهواء .
3-أضيفت عدة قطرات من صبغة دينز عند حافة غطاء الشريحة وترك مدة 3 دقائق لغرض صبغ المستعمرات البكتيرية الفاقدة للجدار الخلوي .
4-غسلت الشريحة أعلاه بوضعها بلطف في حمام مائي بارد تجنبا لإزاحة غطاء الشريحة وما تحته من المستعمرات عن الشريحة الزجاجية .
5-جففت الشريحة الزجاجية في الهواء ، ثم فحصت تحت العدسة ذات القوة الصغرى10 , x 4x لمشاهدة المستعمرات البكتيرية الفاقدة للجدار الخلوي .

ب-تقنية قالب الاكار Agar block technique :

اخذ مقطع رقيق من وسط اكار الفارينت الصلب الحاوي على المستعمرات البكتيرية قيد البحث بواسطة سكين حاد ومعقم ، ووضع على سطح شريحة زجاجية نظيفة وترك لحين الجفاف لتتمكن المستعمرات من الالتصاق على سطح الشريحة الزجاجية .
1-فحصت الشريحة تحت القوة الصغرى ,x10X4 لتحديد المستعمرات الفاقدة للجدار.
2- أضيف(2-3) قطرات من صبغة دينز على قالب الاكار، ثم غسلت الشريحة بالماء البارد.
3-فحصت الشريحة في الأماكن التي تم تحديدها قبل التصبيغ بواسطة العدسة ذات القوة الصغرى X10, X4 .

3-7-2- : الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Test

1-اختبار الكوكيولاز Coagulase test :

تم مزج بلازما دم الإنسان (تخفيف 1/5) مع حجم مماثل من المزروع البكتيري السائل في أنبوب زجاجي ، وحضن المزيج بدرجة حرارة 37م ، ثم وضع في أنبوب زجاجي آخر حجم من بلازما دم الانسان ومزج معه حجم مماثل من المرق المغذي السائل Nutrient Broth الخالي من البكتريا واستعمل كسيطرة . ان تكون الخثرة في (1-4) ساعة في الأنبوب الأول دليل النتيجة الموجبة (Macfaddin ,2000)) .

2-اختبار الكاتاليز Catalase test :

تم هذا الاختبار بوضع قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين H2O2 ذو تركيز 3% على شريحة زجاجية نظيفة وبواسطة عروة ناقلة نقلت كمية قليلة من النمو النقي على وسط اكار الفارينت ووضعت على المحلول ، ان تكون الفقاعات (أي تحرر الأوكسجين) دليل على إيجابية الاختبار ، وعدم ظهور تلك الفقاعات دليل على سلبية الاختبار (Macfaddin ,2000) .

3-اختبار الحساسية للاوبتوجين Optochin susceptibility test :

تم تخطيط نقلة من العزلة النقية للبكتريا المراد اختبارها على وسط اكار الدم (BA) ووضع قرص الاوبتوجين(ذي قطر 6 ملم) في مركز الطبق ، ثم حضن لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م في Candle jar ، بعد ذلك تلاحظ مناطق التثبيط على اساس انه اذا كانت مساوية او اكبر من 14 ملم حول القرص فتعد حساسة ، وهو دليل تأكيدي للبكتريا *Streptococcus pneumoniae*. (Macfaddin, 2000) .

4-اختبار الاوكسيديز Oxidase test :

يقطر(2-1) قطرة من كاشف الاوكسيديز (Tetramethyl- para - phenylene diamine dihydrochloride (1%) على ورقة ترشيح في طبق بتري معقم ، ثم يلتقط

براس عود خشبي (Wooden applicator) جزء صغير من المستعمرة المراد الكشف عنها ومن ثم تدلك تلك النقلة الصغيرة على قطرات الكاشف، ان تحول لون المستعمرة الى اللون البنفسجي او الازرق بعد مرور حوالي10 ثوان هو دليل على ايجابية الاختبار.(Macfaddin, 2000).

5-التفاعلات على اكار كليكلر والحديد (KIA) Kligler's Iron agar reaction

استعمل هذا الوسط لتحديد تخمر الكربوهيدرات وانتاج كبريتيد الهيدروجين H2S بوصفة خطوة أولى في تشخيص العصيات السالبة لصبغة كرام . تلتقط المستعمرات النامية على الوسط الصلب بواسطة إبرة ناقلة معقمة وتزرع بطريقة التخطيط على السطح المائل Streaking وبطريقة الطعن في قعر الأنبوبةStabbing . يلاحظ التخمر بواسطة تغير لون الكاشف (احمر الفينول) من اللون الأحمر الى اللون الاصفر . يقرأ التغير في الأس الهيدروجيني pH في القعر والسطح المائل خلال 24-18 ساعة حضانة . أن تكون الغاز غالبا ما يلاحظ على شكل فقاعات اسفل الوسط الصلب . البكتريا المنتجة لكبريتيد الهيدروجين تكون راسب اسود (Cowan,1985) .

6-اختبار الكشف عن تخمر السكريات وانتاج الغاز :

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط بالنمو البكتيري لعمر 24 ساعة ثم حضنت بدرجة حرارة 37 مْ لفترة 2-5 أيام . ان تغير اللون الى الأصفر دليل على تخمر السكريات وانتاج الحامض وظهور الفقاعات في أنبوب درهم دليل وجود الغاز(Macfaddin,2000).

7- اختبار احمر المثلMethyl Red Test :

لقح وسطMR-VP بالنمو البكتيري وبعد48 ساعة حضانة بدرجة حرارة37 مْ أضيفت 5 قطرات من كاشف احمر المثل لكل انبوبة .ان تحول لون الوسط الى اللون الأحمر دليل النتيجة الموجبة ،وعدم تغير اللون دليل النتيجة السالبة(Benson , 1998) .

8-اختبار الفوكس بروسكور Vogus - Proskaur Test :

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط MR-VP بالنمو البكتيري وبعد فترة حضانة 48 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ اضيفت 6 قطرات من كاشف الفانفثول وقطرتان من كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم ، ظهور لون وردي دليل على النتيجة الموجبة والتحلل الجزئي للسكريات (Benson ,1998) .

9- اختبار الكشف عن إنتاج جذر الاندول Indol Test :

لقحت الأوساط الحاوية على وسط ماء الببتون بالبكتريا وبعد فترة حضانة لمدة 24 ساعة بدرجة 37مْ يضاف 6 قطرات من كاشف احمر المثيل، يلاحظ تكون حلقة حمراء التي تشير الى النتيجة الموجبة أي إنتاج جذر الاندول ، وانعدام تلك الحلقة الحمراء هو دليل النتيجة السالبة(Macfaddin ,2000) .

3-8-اختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية :

اختبرت العزلات البكتيرية المستحصلة في هذا البحث من البكتريا الفاقدة للجدار الخلوي والبكتريا الاعتيادية ولكل الأنواع بطريقة الانتشار من القرص Disc diffusion method (Bauer et al ,1966) .

1-8-3- اختبار حساسية البكتريا الفاقدة للجدار الخلوي للمضادات الحيوية :

تم اختبار الحساسية للمضادات الحيوية استناد الى طريقة دومينك (Domingue , 1982) حيث تم قطع جزء من الاكار الحاوي على 5-10 مستعمرات بكترية فاقدة للجدار

الخلوي بشكل قالب بواسطة إبرة ناقلة معقمة ، وتم نقلها الى وسط مرق الفارنيت (VB) وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ مدة 3-5 ساعات ، وبعد فترة الحضانة هذه تم نقل جزء من الزرع النامي بواسطة مسحة قطنية الى وسط اكار الفارنيت (VA) الصلب ، حيث تم تخطيط اللقاحة بثلاث اتجاهات ،وضعت الاطباق المخططة في الحاضنة مدة نصف ساعة لغرض الجفاف ، من ثم ثبتت الاقراص الخاصة بالمضادات الحيوية بواسطة ملقط معقم وبمسافات متساوية وبمعدل (6-8) أقراص للطبق واعيدت للحاضنة لفترة (3-5) أيام بدرجة حرارة 37 مْ . وهنا تم استخدام وسط مرق الفارينت بدلا من المرق المغذي كما استعيظ عن وسط Muller - Hinton بوسط اكار الفارينت الصلب (VA) . يعمل طبق سيطرة أيضا يتم فيه تخطيط العزلة البكتيرية وحضنها لنفس الفترة بدون وضع أقراص المضادات الحيوية لملاحظة كثافة النمو بعد الحضانة اللازمة .

تم قياس مناطق انعدام النمو Inhibition zone بواسطة مسطرة شفافة بالاعتماد على ما ورد في طريقة Kirby-Bauer 1995 . وكما موضع في المخطط في الجدول(3-1).

3-8-2- اختبار حساسية البكتريا ذات الجدار للمضادات الحيوية :

تم استخدام طريقة القرص Disk method لبور وجماعته (Bauer et al,1966) مع أجراء تحويرات بسيطة عليها ، وذلك باستخدام وسط الفارينت السائل بدلا من وسط المرق المغذي كما استعيظ عن وسط مولر - هنتون الصلب بوسط الفارينت الصلب VA.

وتم نقل (4-5) مستعمرات بكتيرية ذات الجدار الى وسط الفارينت السائل (VB) وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 5 ساعات وبعد ظهور النمو بشكل عكورة واضحة نقل جزء من النمو البكتيري بواسطة مسحة قطنية معقمة من وسط الفارينت السائل الى وسط اكار الفارينت الصلب (VA)حيث خطط الطبق بثلاث اتجاهات وتركت الاطباق في الحاضنة لمدة نصف ساعة لغرض الجفاف ، ثم وزعت اقراص المضادات الحيوية على الطبق ، بواسطة ملقط معقم وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة ثم تم قياس أقطار مناطق التثبيط لكل مضاد حيوي مستخدم بواسطة المسطرة الشفافة الاعتيادية ثم حددت حساسية البكتريا أو مقاومتها للمضادات الحيوية اعتمادعلىالجدول(3-1).

الجدول 3-1 مديات مناطق التثبيط وموقع التأثير لبعض المضادات الحيوية .

Significance of zone of inhibition in Kirby - Bauer method of Antimicrobial sensitivity testing (1995), & Avram goldestein et al, 1974; Benson,1998; Difco,1984 .

Antimicrobial agent	Disc potency	R/ mm	I/mm	S/mm	Mode of action
Amikacin(aminoglyco-sides)	30mgc	14>	15-16	17 <	Inhibition of protein synthesis
Amoxicillin/ clavunic acid	30mgc	14>	14-17	18<	Inhibition of cell wall synthesis.
Ampicillin	75mgc	17>	15-16	18<	Inhibition of cell wall
Cloxacillin	1mg	14>	17-14	18 <	Inhibition of cell wall synthesis
Cephalothin	30mcg	12>	15-17	18<	Inhibit cell wall synthesis
Chloramphenicol	30mcg	12>	17-13	18<	Inhibition of protein synthesis
Claehithromyein	15mcg	13>	14-17	18<	Inhibit protein synthesis
Erythromycin	15mcg	13>	22-14	23<	Inhibition protein
Gentamycin/Aminogly -cosides	10mcg	12>	14-13	15<	Inhibits protein synthesis
Kanamycin /Aminoglycosides	30mcg	13>	17-14	18<	Inhibits protein synthesis
Nalidixic acid	30mcg	13>	18-14	19<	Blocks DNA synthesis
Lincomycin	2mg				Inhibition of protein synthesis
Tetracycline	30mg	14>	15-17	18 <	Also
Neomycin	10mg	=	=	=	Also
Streptomycin	10mg	=	=	=	Also
Tobramycin	5mg	=	=	=	Also
Penicillin	10units	28>	=	29<	Prevent cell wall synthesis

R = Resist, S = Sensitive ,I= Intermediate

الفصل الرابع CHAPTER FOUR

النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1- صفات المرضى :

اتصف المرضى الذين اخضعوا لهذه الدراسة بأنهم يعانون من التهاب مزمن في الجهاز التنفسي ، تناولوا انواع مختلفة من المضادات الحيوية ولم يحصل تحسن للحالة التي يعانون منها وادخلوا قيد الدراسة بعد احالتهم للفحص من قبل الطبيب الاختصاصي. ويبين الجدول (4-1) عدد ونسب توزيع الاصابات بين الجنسين بالبكتريا فاقدة الجدار (CWDB) والمصابين بالبكتريا غير الفاقدة للجدار (الاصابات الروتينية).

جدول (4-1) يوضح توزيع الإصابات بالبكتريا ذات الجدار وفاقدة الجدار بين الجنسين:

عدد المرضى	ذكور %	إناث %	الكلي
عدد المرضى المصابين بالبكتريا ذات الجدار	74:41 (55.4)	74:33(44.5)	74
عدد المرضى المصابين بالبكتريا الفاقدة للجدار الخلوي	51:30 (58.8)	51:21(41.1)	51
عدد المرضى الكلي	125:71(56.8)	125:4 (43.2)	125

4-2- الوصف المجهري للبكتريا فاقدة الجدار الخلوي :

من خلال التحضيرات المجهرية للبكتريا النامية على الأوساط الزرعية الخاصة بفاقدات الجدار المطورة والاعتيادية بعد فترة حضانة تراوحت بين(48-96) ساعة ، تم قطع طبقة رقيقة من قالب الاكارمع البكتريا النامية عليه ،Agar block technique ، ووضع على سطح شريحة زجاجية نظيفة ، وجرى تصبيغها بصبغة كرام ، حيث لوحظت البكتريا الفاقدة للجدار الخلوي بشكل تجمعات رقيقة نتيجة فقدها للجدار الخلوي، وكان أخذها للصبغة يبدو ضعيفا بالمقارنة مع نفس النوع البكتيري المتحول الى الشكل ذي الجدار Reverted bacteria والذي تميز بأخذه للصبغة بصورة قوية وواضحة . في حين تم ملاحظة أشكال كروية أو بيضوية ومنتفخة متعددة منها الكروي Globular والخيطي Filamentous ، والمستطيل Oblong . حيث يمكن القول بأنها تتخذ أشكال متعددة Polymorphic . التركيب الأساسي لهذه البكتريا هو الكروي (Sphere) والذي يتفاوت ما بين (0.05) مايكرون(يدعى بالأجسام الكروية الابتدائية Elementary bodies) الى(50) مايكرون (يدعى بالأجسام الضخمةLarge bodies) وفي بعض الأحيان يصل حجمها الى حجم البكتريا التي نشأت منها . (Kenny,1978;Domingue, 1982;Domingue et al, 1997) وأشارت النتائج الدراسية الى ان البكتريا الفاقدة للجدار الخلوي (CWDB) المعزولة من المرضى ذات شكل مظهري غير ثابت (Unstable) مكونة أشكالا لايمكن التنبؤ بها وذات تحولات عكسية Reversible transitions الى فاقدة للجدار او اشكال ذات جدار في الحي والزجاج بعد زوال العامل الحاث (Domingue et al, 1997).

4-3-حساسية البكتريا فاقدة الجدار للمضادات الحيوية:

تم اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية وفق طريقة(Domingue 1982) وطريقة (Bauer et al 1966) ،أجريت بعض التحويرات للاوساط الزرعية المستخدمة في اختبار الحساسية للمضادات الحيوية حيث استخدم وسط الفارينت الصلب(VA) بدلا من وسط (Muller-Hinton) كما تم استخدام المسحة القطنية بدلا من العروة الناقلة(Loop) لنقل النمو البكتيري النامي على وسط الفارينت السائل (Variant Broth)الذي استعيظ به عن وسط المرق المغذي(Nutrient Broth) المستخدم في الاختبارات الروتينية، كما ان فترة الحضانة هي الأخرى قد اختلفت عما هو مألوف في الطرق الروتينية إذ استمرت حضانة

الزرع البكتيري مدة تراوحت من 5-7 أيام بعد تثبيت الأقراص الخاصة بالمضادات الحيوية . أشارت بعض الدراسات الى وجود فروقات بين البكتريا فاقدة الجدار والبكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار فيما يتعلق بحساسيتها للمضادات الحيوية.(Slomska,1982). تمتاز البكتريا فاقدة الجدار الخلوي بعدم حساسيتها للمضادات الحيوية التي تعمل على منع أو تثبيط تكوين الجدار الخلوي(خصوصاً مجموعة البيتالاكتام) Hewitt,1968;Hubertetal,1972;Kagan,1972;Slomska&Roux,1978;Wieckiewicz ;1979Yamamoto&Homma,1978).

4-4-مقاومة المضادات الحيوية المتعددة من قبل البكتريا فاقدة الجدار الخلوي :

تمتاز البكتريا فاقدة الجدار الخلوي في الإصابات المستديمة بمقاومة عالية للمضادات الحيوية التي تعمل على منع تكوين الجدار الخلوي (البنسلينات والسيفالوسبورينات) . إن سبب هذه المقاومة ناتج عن فقد الجدار الخلوي الحاوي على مستلمات خاصة للمضادات الحيوية وبفقد الجدار تفقد هذه المستلمات وبذلك يصبح المضاد الحيوي عديم الفائدة في معالجة مثل هذه الإصابات البكتيرية الفاقدة للجدار الخلوي.

جرى دراسة أنماط المقاومة للمضادات الحيوية للبكتريا المستحصلة في هذه الدراسة وتم تحديد المقاومة المتعددة ، التي انحصرت بين(مقاومة لنوعين من المضادات الحيوية الى مقاومة الى ستة انواع من المضادات الحيوية) في البكتريا فاقدة الجدار، في حين كانت محصورة بين مقاومة مضادين الى عشرة مضادات حيوية في البكتريا ذات الجدار لبكتريا *S. pneumoniae* وكانت هذه النتيجة مماثلة لما وجده (Shnawa et al, 2004) .

أما مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* فاقدة الجدار للمضادات الحيوية فكانت محصورة بين المقاومة لمضادين الى مقاومة لسبعة مضادات حيوية. أما مقاومة البكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار لنفس النوع البكتيري اعلاه فكانت محصورة بين المقاومة لمضادين الى مقاومة لستة مضادات ، وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Shnawa et al, 2004) .

وكانت مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* فاقدة الجدار المتعددة للمضادات الحيوية محصورة بين (2-7) مضادات ، و(3-7) مضادات بالنسبة للبكتريا الراجعة للشكل ذي الجدار ولنفس النوع البكتيري أعلاه . وهذه النتائج موازية لما توصل اليه (Shnawa *et al*, 2004) . أما البكتريا الأخرى المستحصلة في هذه الدراسة والتي تم عزلها بعينة واحدة فقط هي بكتريا *Proteus spp*. فكانت نسبة مقاومة الشكل فاقد الجدار المتعددة للمضادات الحيوية لتسعة مضادات، في حين ان الشكل السوي لها بلغت مقاومته المتعددة للمضادات الحيوية مقاومة لعشرة مضادات وهي مقاومة لجميع المضادات المستخدمة في هذه الدراسة . كذلك جاءت هذه النتيجة موازية لما توصل اليه (Shnawa *et al* ,2004) .

5-4- الوصف المجهري للبكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار :

تم ملاحظة نوع من المستعمرات البكتيرية الفاقدة للجدار بصورة جزئية ، حيث تميزت المناطق الحاوية على الجدار بكونها داكنة وذات بريق معدني ومناطق اخرى على نفس المستعمرة بدت وكأنها مناطق شفافة فاتحة اللون حيث لم يكتمل جدارها الخلوي ، كونها في

طور الانتقال الى الشكل الكامل ذي الجدار . كذلك لوحظت مستعمرات بكتيرية ذات جدار تميزت عند فحصها بالمجهر الضوئي وعلى الوسط الزرعي النامية عليه(وسط اكار الفارينت) داكنة اللون، ويبدو انها مستعمرات راجعة الى الشكل ذي الجدار(Revertant) وهذا يتفق مع ما توصل إليه كل من:
(Heidger et al,1982; Bisset,1978;Tedeschi et al,1978 أما الخلايا البكتيرية من هذا النوع (الشكل ذي الجدار) فلم تختلف عما هو مألوف من أشكال البكتريا الاعتيادية . حيث حضرت مسحات من البكتريا وجرى تصبيغها بصبغة كرام ، وكانت جميع مواصفاتها لا تختلف في شيء عما هو معروف من حيث التصبغ بالصبغات السالبة والموجبة.

4-6- الخصائص الفيزياوية للبكتريا فاقدة للجدار الخلوي :

تميزت هذه البكتريا بقابليتها على الانضغاط ومرونتها ومرورها من خلال المرشحات الدقيقة (Millipore filter paper 0.22مى) . قد تكون هذه الخصائص ثابتة او ممكنة الارتداد الى الشكل ذي الجدار وحسب النوع .كما تبين من تقنية مزارع الترشيح والتخفيف.

4-7- الخصائص الفيزياوية للبكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار :

لم تتغير خصائص البكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار، عن البكتريا التي تمتلك جدارا خلويا ولم تتعرض الى حالة فقد الجدار من الناحية المظهرية.

4-7-1- الخصائص الزرعية :

تم تطويع تقنيات مطورة للتحري عن المسببات المشاركة في التهاب الجهاز التنفسي. إذ تم جمع 51 عينة قشع تمثل حالات مرضية مستديمة ذات مواصفات نموذجية (التهاب مستديم في الجهاز التنفسي مع نتائج زرع روتينية سالبة) .أظهرت نتائج الدراسة على العينات المأخوذة من المرضى ان (51/42) (82.35%) منها أعطت نتائج تدل على وجود البكتريا الفاقدة للجدار الخلوي بعد زراعتها على الأوساط الزرعية الخاصة بفاقدة الجدار وبذات الجدار .

4-7-1-أ -الوصف المزرعي للبكتريا الفاقدة للجدار الخلوي :

جرى تصبيغ مباشر للمستعمرات النامية على وسط اكار الفارينت بصبغة دينز Dinese stain وفحصت مجهريا تحت القوة (10x,4x) وتميزت المستعمرات التي تم مشاهدتها بأنها تشبه البيض المقلي Fried eggs ،حيث ظهرت المستعمرة الواحدة ذات منطقة مركزية غامقة يحيطها منطقة متجانسة تشبه الشريط الزيتيLacy periphery ، كذلك لوحظ عدد من المستعمرات البكتيرية الفاقدة للجدار الخلوي بصورة جزئية وتميزت بوجود منطقة غامقة(دلالة على وجود الجدار الخلوي) ومنطقة شبه شفافة على جانب من المستعمرة ، قد تكون هذه الأشكال هي في حالة طور انتقالي Transition بين الشكل الفاقد للجدار الى الشكل ذي الجدار(Lawson,1982;Patterson&Gilpin,1982;Clasener, 1972). تميزت البكتريا الفاقدة للجدار الخلوي بقدرتها على النمو، في الاوساط الزرعية السائلة والصلبة ، التي توفر ضغطا ازموزيا يحافظ على هذه البكتريا من التحلل او الانفجار نتيجة فقدها للجدار الخلوي ، او عند تعرضها لبيئة خارجية لاتوفر مثل هذه الظروف الملائمة، وبصورة اقل تتمكن ايضا من النمو على الاوساط الزرعية الروتينية الاغنائية Enrichment كوسط اكار الدم والمصل ، وكذلك تنمو على وسط اكار الجلاتين والأوساط السائلة والمعقدة مثل وسط نقيع القلب-الدماغ ووسط خلاصة الخميرة-البيتون. تنمو أيضا على الاوساط الكيمياوية المصنعة وشبه المصنعة الحاوية على أحماض أمينية وسكر الكلوكوز ومن الجدير بالذكر ان

البكتريا فاقدة للجدار الخلوي تتشابه مع المايكوبلازما Mycoplasma (بكتريا لا تمتلك اساسا في تكوينها على جدار خلوي) بكون مركز المستعمرة متكون من حبيبات متماسكة، (Embedded granules) ، وظاهرة تعدد الأشكال Polymorphic ، البكتريا الفاقدة للجدار الخلوي هي بالأساس بكتريا كانت تمتلك جدارا خلويا إلا إنها فقدت جدارها ، لاسباب قد تكون خارجية او داخلية مختلفة ، كالتحلل المائي Hydrolysis أو نتيجة التعرض للإنزيمات الحالة مثل Lysozyme أو بواسطة فعل المضادات الحيوية التي تمنع تكوين الجدار الخلوي (من مجموعة البيتا لاكتام مثلا) أو أحد مصادر تكوينه مثل منع تكوين طبقة الببتيدوكلايكان . او قد يعود السبب الى التراكيزالعالية لاحماض أمينية معينة، Phenyl alanine,Glycine,Methionine، وبعض الأملاح غير العضوية كالزئبق ، الليثيوم والكادميوم ، وهي مواد يُحتاج اليها في بناء الجدار الخلوي للبكتريا وموازنة النمو، ولكن بدرجة محدودة ، أما التراكيز العالية لها فإنها تحث على تكوين اشكال (L-form) ، والتي تتكون في بعض الأحيان بصورة تلقائية دون عوامل حاثة. كما تمتاز البكتريا فاقدة للجدار بتكوينها للغشاء الحيويBiofilm (Hibma et al ,1996) .

4-7-1-ب-الوصف المزرعي للبكتريا ذات الجدار بالمقارنة مع فاقدة الجدار :

تكون المستعمرات البكتيرية الاعتيادية ذات حواف متميزة وارتفاع او انبعاج محدد. وكذلك مرور الضوء منها او عدم مروره له أهمية تشخيصية مهمة ، بالإضافة الى لون المستعمرة ورائحتها تكون ذات فائدة في التعرف ، ونموها في الوسط السائل له خصائص محددة لكل مجموعة من مجاميع البكتريا،(Brooks et al, 2004) .

تميزت البكتريا الراجعة Reverted من الشكل الفاقد للجدارالى الشكل ذي الجدار بنفس المواصفات الزرعية للبكتريا التي لم تتعرض لهذه الظاهرة (البكتريا المرضية السوية Intact bacteria التي لم تفقد الجدار تحت أي تأثير) ،حيث لوحظ نمو هذه البكتريا على الأوساط الزرعية الاعتيادية والمطورة ، بالإضافة الى إنتاجها للصبغات التي تفرزها بعض انواع البكتريا في الوسط الزرعي الذي تنمو عليه مثل صبغة الـ pyocyanin بالنسبة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ، ومن الجدير بالملاحظة ان إنتاج هذه البكتريا للصبغة المشار إليها قد لوحظ في الشكل الفاقد الجدار قد انخفض بشكل ملحوظ عما في الشكل ذي الجدار .

أما بكتريا *Klebsiella pneumoniae* والمعروف من إنتاجها لمادة مخاطية لزجة في حالة البكتريا السوية قد انخفض في الشكل فاقد الجدار.

4-7-1-ت : الوصف الحيوي الكيمياوي لفاقدات الجدار :

كان النمو البكتيري ينقل بواسطة قطع جزء من قالب الاكار الحاوي على النمو البكتيري ، بواسطة سكين حاد ومعقم ، وليس عن طريق العروة الناقلة التي استخدمت في نقل البكتريا ذات الجدار، وكانت القابليات الايضية لفاقدات الجدار ، مثل التخمرFermentation والكاتاليز Catalase والاوكسيديز Oxidase وانتاج كبريتيد الهيدروجين H2S كما هو الحال في ذات الجدار.

4-8: التنوع Diversity :

بالنسبة للبكتريا فاقدة للجدار الخلوي وجد بان المسببات المشاركة تشمل كل من البكتريا الموجبة لصبغة كرام والسالبة لها وهي كما في (الجدول 4-2)

التنوع Diversity		
البكتريا فاقدة الجدار الخلوي		
نوع البكتريا	العدد / من	%
S. pneumoniae	18 / 51	35.29
P.aeruginosa	12 / 51	23.52
K.pneumoniae	11 / 51	21.56
Proteus spp.	1 / 51	1.96
البكتريا ذات الجدار		
S.pneumoniae	91 / 74	25.67
P.*aeruginosa*	17 / 74	22.97
K.pneumoniae	31 / 74	41.89
Proteus spp.	1 / 74	1.35
Actinomycetes spp.	3 / 74	4.05
Nocardia spp.	1 / 74	1.35

الجدول (4-2) نسب عزل البكتريا فاقدة الجدار والبكتريا غير الفاقدة للجدار المسببة لخمج الجهاز التنفسي التي تم عزلها وتشخيصها في هذه الدراسة.

الجدول(4-3) صفات بكتريا *K. Pneumoniae* ذات الجدار وفاقدة الجدار

الصفات	النتيجة	
	ذات الجدار	فاقدة الجدار
1- مجهرية	*سالبة كرام *عصوية	* كذلك * متغايرة
2- مزرعية	* نمو مخاطي لزج. *غير مكونة للابواغ.	*نمو مخاطي اقل لزوجة. *غير مكونة للابواغ.
3-كيموحيوية		
*الكاتاليز	+	+

*الاوكسيديز	-	-
*إنتاج غاز H2S	-	-
*في وسط TSI	A/A	A/A
4- تخمر السكريات		
*لاكتوز	A	A
*سكروز	-A	-A
IMViC-5		
*الاندول	V-	-V
*احمر المثل	V-e	V-e
*فوكس بروسكور	V+e	V+e
*سترات (سيمون)	V+e	V+e

A= Acid, A/A= Acid/ Aid,V+e: positive,V-e: Negative, -V: Variable usually negative.

الجدول(4-4) الوصف الكيموحيوي لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* فاقدة الجدار والراجعة الى الشكل ذي الجدار.

الصفات	النتيجة	
	ذات الجدار	فاقدة الجدار
1- المجهرية	عصيات سالبة لصبغة كرام	متغايرة
2- المزرعية	تفرز صبغة البايوسيانين الى الوســـط الزرعـــي ، وذات رائحة تشبه رائحة الموز	تفرز الصبغة الى الوسط الزرعي ولكن بصورة اقل . ذات رائحة تشبه رائحة الموز .
3-الكيموحيوية		
أ- الاوكسيديز	+	+
ب- الكاتاليز	+	+
د- تخمر السكريات		
* الكلوكوز	A	A
* التريهالوز	_	_
* اينوسيتول	_	_

A = Acid، + : نتيجة موجبة ، -: نتيجة سالبة.

الجدول(4-5) الوصف الكيموحيوي لبكتريا *Proteus spp* فاقدة الجدار وذات الجدار

الصفات	النتيجة	
	ذات الجدار	فاقدة الجدار
1- المجهرية	عصوية سالبة لصبغة كرام	متغايرة
2- المزرعية	تتميـــز بظـــاهرة الانتشـــار Swarming	كذلك
3- كيموحيوية		
أ- الاوكسيديز	_	_
ب- الكاتاليز	+	_
ج- إنتاج H2S من :(KIA/TSI)		
*- TSI	A/ALK	A/ALK
د- تخمر السكريات		
**- الكلوكوز	A	A
**- اللاكتوز	_	_
**- السكروز	_	_
هـ- IMViC		
***- الاندول	_	_
***- احمر المثل	متغاير	متغاير
***- فوكس- بروسكاور	_	_
***- ستريت (سيمون)	_	_

+= النتيجة الموجبة ، -=النتيجة السالبة .A=Acid,ALK= Alkaline

IMViC=Indole Methyl Red Vogus Proscauer Citrate

الجدول (4-6)-الوصف الكيموحيوي لبكتريا *Streptococcus pneumoniae* فاقدة الجدار وذات الجدار .

الصفات	النتيجة	
	ذات الجدار	فاقدة الجدار
المجهرية	تترتب بشكل خلايا ثنائية او على شكل مسبحي طويل او قصير . موجبة لصبغة كرام .	متغايرة في الشكل والتصبيغ
الزرعية	تتميز بحساسيتها للمضاد الحيوي Optochin .	كذلك
الكيموحيوية		
أ- الاوكسيديز	-	-
ب- الكاتاليز	_	_
ج-تخمر السكريات		
*- اللاكتوز	A	A
*- تريهالوز	A	A

A=Acid، -: نتيجة سالبة ، +: نتيجة موجبة

وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه كل من (Domingue et al,1997;Mattman,1993) ,ولكن ظهور النتائج يكون أبطأ واقل وضوحا في البكتريا الفاقدة للجدار عما هو عليه الحال في البكتريا ذات الجدار. قد يحدث تغير بسيط في بعض الإنزيمات أو فقدان هذه الأنزيمات عند فقد الجدار الخلوي(Mattman, 1993a) .

4-9-تطويع تقنيات مطورة للتحري عن المسببات المشاركة في التهاب الجهاز التنفسي.

من خلال التحري عن البكتريا الفاقدة للجدار الخلوي والمشاركة في التهاب الجهاز التنفسي المستديم ، لوحظ أنها توزعت في ستة مجاميع ، خمس من هذه المجاميع كانت مفسرة النتائج ومجموعة واحدة غير مفسرة وذلك لعدم التمكن من عزل الكائن المسبب للمرض باستخدام التقنيات الزرعية المطوعة لهذا الغرض. استعملت تقنية الزرع المتسلسل وتقنية التخفيف وتقنية المزرعة ثنائية الطور في التحري عن المسببات البكتيرية فاقدة الجدار الخلوي والمشاركة في التهاب الجهاز التنفسي .هذه المجاميع هي من (I-VI) وكما يلي :

المجموعة I :تضمنت(9) عينات، وهي سالبة في مرحلة القشع الكامل والرائق من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات .(جدول4-7) .

المجموعة II : تضمنت (8) عينات ، وهي سالبة في مراحل القشع الكامل والرائق والمغسول وموجبة لباقي التقنيات . (جدول4-8) .

المجموعة III : تضمنت (10) عينات ،وهي سالبة في المراحل الأربع الأولى من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات. (جدول 4-9).

المجموعة IV : تضمنت (3) عينات، وهي سالبة في تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات . (جدول 4-10) .

المجموعـة V : تضـمنت(12) عينـة، وهـي سـالبة فـي تقنيـة التخفيـف وموجبـة لبـاقي التقنيات.(جدول4-11) .

المجموعة VI : تضمنت(9) عينات ، وهي سالبة في جميع التقنيات.(جدول4-12).

الجدول (4-7) المجموعة I وهي سالبة في مرحلة القشع الكامل والرائق من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات : (9) عينات.

1- تقنية الزرع المتسلسل Serial culture technique

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
	+	-	+	-	+	-
القشع الكامل	0	9	0	9	0	9
رائق القشع	0	9	0	9	0	9
راسب النبذ	9	0	6	3	9	0
الراسب المغسول	9	0	6	3	9	0
الراسب المتحلل	8	1	5	4	8	1

2- تقنية التخافيف Dilution technique

العينة	التخافيف	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
		+	-	+	-	+	-
رائـــــق الراســـب المكسر	10/1	9	0	7	2	9	0
	100/1	5	4	1	8	7	2
	500/1	0	9	0	9	1	8

1- تقنية المزرعة ثنائية الطور: Biphasic medium culture technique

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
	+	-	+	-	+	-
الراسب المحلل	8	1	6	3	8	1

الجدول(4-8) : المجموعة II ، وهي سالبة في مرحلة القشع الكامل والرائق والراسب المغسول وموجبة لباقي التقنيات : (8) عينات .

1- تقنية الزرع المتسلسل Serial culture technique

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
	+	-	+	-	+	-
القشع الكامل	0	8	0	8	0	8
رائق القشع	0	8	0	8	0	8
راسب النبذ	8	0	3	5	8	0
الراسب المغسول	0	8	0	8	0	8
الراسب المتحلل	8	0	5	3	8	0

2-تقنية التخافيف Dilution technique

العينة	التخافيف	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
		+	-	+	-	+	-
رائق الراسب المكسر	10/1	8	0	6	2	8	0
	100/1	3	5	2	6	4	4
	500/1	0	8	0	8	0	8

3-تقنية المزرعة ثنائية الطور: Biphasic medium culture technique

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
	+	-	+	-	+	-
الراسب المحلل	8	0	7	1	8	0

+ : يعني وجود نمو ، - : يعني انعدام النمو .

الجدول (4-9) : المجموعة III تضمنت (10) عينات ،وهي سالبة في المراحل الأربع الأولى من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات.

1- تقنية الزرع المتسلسل Serial culture technique

العينة	اكار الدم		اكار الفارينت		اكار الماكونكي	
	+	-	+	-	+	-
القشع الكامل	0	10	0	10	0	10
رائق القشع	0	10	0	10	0	10
راسب النبذ	0	10	0	10	0	10
الراسب المغسول	0	10	0	10	0	10
الراسب المتحلل	10	0	3	7	0	10

2-تقنية التخافيف Dilution technique

العينة	التخافيف	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
رائـــــق		+	-	+	-	+	-
الراســـب	10/1	10	0	5	5	10	0
المكسر	100/1	7	3	2	8	9	1
	500/1	0	10	0	10	4	6

3-تقنية المزرعة ثنائية الطور: Biphasic medium culture technique

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
	+	-	+	-	+	-
الراسب المتحلل	9	1	5	5	9	1

الجدول(4-10): المجموعة IV : تضمنت (3) عينات، وهي سالبة في تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات .

1- تقنية الزرع المتسلسل Serial culture technique

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
	+	-	+	-	+	-
القشع الكامل	0	3	0	3	0	3
رائق القشع	0	3	0	3	0	3
راسب النبذ	0	3	0	3	0	3
الراسب المغسول	0	3	0	3	0	3
الراسب المتحلل	0	3	0	3	0	3

2-تقنية التخافيف Dilution technique

العينة	التخافيف	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
رائق		+	-	+	-	+	-
الراسب	10/1	3	0	1	2	3	0
المكسر	100/1	2	1	1	2	3	0
	500/1	1	2	1	2	1	2

3-تقنية المزرعة ثنائية الطور: Biphasic medium culture technique

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
	+	-	+	-	+	-
الراسب المتحلل	3	0	2	1	3	0

+ : يعني وجود نمو ، - : يعني انعدام النمو .

الجدول (4-11) : المجموعة V : تضمنت(12 عينة)، وهي سالبة في تقنية التخفيف وموجبة لباقي التقنيات.

1- تقنية الزرع المتسلسل Serial culture technique

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
	+	-	+	-	+	-
القشع الكامل	0	12	0	12	0	12
رائق القشع	0	12	0	12	0	12
راسب النبذ	4	8	2	10	4	8
الراسب المغسول	2	10	1	11	3	9
الراسب المتحلل	10	2	3	9	10	2

2-تقنية التخافيف Dilution technique

العينة	التخافيف	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
		+	-	+	-	+	-
رائق الراسب المكسر	10/1	0	12	0	12	0	12
	100/1	0	12	0	12	0	12
	500/1	0	12	0	12	0	12

3-تقنية المزرعة ثنائية الطور: Biphasic medium culture technique

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
	+	-	+	-	+	-
الراسب المحلل	12	0	4	8	12	0

+ : يعني وجود نمو ، - : يعني انعدام النمو .

الجدول(4-12): المجموعة VI تضمنت(9) عينات، وهي سالبة في جميع التقنيات.

1- تقنية الزرع المتسلسل Serial culture technique

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
	+	-	+	-	+	-
القشع الكامل	0	9	0	9	0	9
رائق القشع	0	9	0	9	0	9

راسب النبذ	0	9	0	9	0	9
الراسب المغسول	0	9	0	9	0	9
الراسب المتحلل	0	9	0	9	0	9

2-تقنية التخافيف Dilution technique

العينة	التخافيف	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
		+	-	+	-	+	-
رائق الراسب المكسر	10/1	0	9	0	9	0	9
	100/1	0	9	0	9	0	9
	500/1	0	9	0	9	0	9

3-تقنية المزرعة ثنائية الطور: Biphasic medium culture technique

العينة	اكار الدم		اكار الماكونكي		اكار الفارينت	
	+	-	+	-	+	-
الراسب المحلل	9	0	0	9	0	9

+ : يعني وجود نمو ، - : يعني انعدام النمو .

ويمكن تفسير النتائج التي ظهرت في هذه المجاميع على النحو الآتي :

هيأة رقم 1 :

وهي المجموعة التي أعطت نتائج موجبة في جميع التقنيات المستخدمة باستثناء طريقتي، فحص القشع الكامل (المباشرة) وطريقة الرائق من تقنية الزرع المتسلسل التي أعطت نتائج سالبة بسبب صعوبة عزل البكتريا فاقدة الجدار الخلوي بهذه الطريقة (Phair et al,1974) أما النمو الحاصل في باقي التقنيات فانه يدل على وجود المسبب المرضي خارج الخلايا الرئوية (الاسناخ) او الخلايا القيحية، او انه ملتصق على الأغشية الخلوية لهذه الخلايا .وظهور النمو في تقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية الطور هو دليل على ان المسبب البكتيري فاقد للجدار كليا .ان نمو المسبب على الأوساط الزرعية الاعتيادية مثل وسط اكار الدم واكار الماكونكي الصلب والأوساط الخاصة بفاقدة الجدار المطورة مثل وسط الفارينت السائل ووسط الفارينت الصلب هو دليل على وجود البكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار Reverted bacteria ، وبكتريا في مرحلة الطور الانتقالي (Transitional) والبكتريا فاقدة للجدار. وهذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه العديد من العاملين في هذا المجال، (Domingue et al, 1997;Schifferli et al,1986;Sela et al,2000;Woody et al,1982)

هيأة رقم 2 :

هذه المجموعة أعطت نتائج سالبة في مراحل القشع الكامل والرائق والراسب المغسول، ونتائج إيجابية في المراحل والتقنيات الأخرى المستخدمة، تدل على عدم إمكانية نمو المسبب الفاقد للجدار على الأوساط الاعتيادية والمطورة ، وذلك بسبب فقده للجدار كليا ، يعزز ذلك تمكنه من النمو في/ أو على وسط اكار الفارينت ووسط الفارينت السائل ، وانه متواجد داخل الخلايا .في حين تمكنه من النمو في مرحلتي راسب القشع المنبوذ والراسب المتحلل هو نتيجة تواجده ملتصق على أسطح الأغشية الخلوية ، وكذلك تواجده داخل تلك الخلايا بشكل فاقد للجدار كليا خصوصا بالنسبة لمرحلة تحلل الخلايا او تكسيرها، وان النمو على الاوساط

الاعتيادية يوحي بوجود بكتريا في مرحلة الطورالانتقالي أما النمو على الاوساط الزرعية المطوعة (وسطي الفارينت السائل والصلب) هو دليل على إن المسبب النامي هو فاقد للجدار بصورة كلية وذو ميل للإقامة الطفيلية داخل خلوية.(Domingue & Woody, 1997) .

هيأة رقم 3 :

كانت نتائج هذه المجموعة سالبة في المراحل الأربع الأولى من تقنية الزرع المتسلسل ، وموجبة للمرحلة الأخيرة من هذه التقنية ، بالإضافة الى التقنيات الأخرى المستخدمة ، تدل على ان النمو في مرحلة الراسب المتحلل من تقنية الزرع المتسلسل هو وجود المسبب داخل الخلايا بدليل نموه على الاوساط المستخدمة بعد عملية تكسير الخلايا ، وهي فاقدة للجدار كليا وجزء منها في مرحلة انتقال Transitional لأنها نمت على الأوساط الروتينية والمطوعة .(Domingue,1975) .أما النمو الحاصل في تقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية الطور فهو دليل على ان المسبب موجود داخل الخلايا وانه فاقد للجدار بصورة كاملة.(Domingue, 1997) .

هيأة رقم 4 :

وهي المجموعة التي أعطت نتائج سالبة في تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات ، وهذا يدل على إن المسبب المشارك فاقد للجدار بشكل كلي وانه موجود داخل الخلايا.ربما يكون السبب الذي أدى الى فقد الجدار الخلوي يعود الى بيئة المضيف الضارة (Deleterious host environment) اوانه يعود للظروف البيئية والفسيولوجية،(Lawson,1982). ومن المحتمل ان تكون البكتريا فاقدة الجدار الخلوي ذات نزعة للإقامة الطفيلية داخل خلوية فقط وهي من النوع غير الثابت .

.(Domingue and Woody, 1997)

هيأة رقم 5 :

وهي التقنية التي أظهرت نتائج إيجابية في المراحل الثلاث الأخيرة من تقنية الزرع المتسلسل والمزرعة ثنائية الطور وانعدام النمو في تقنية التخافيف . تدل على وجود المسبب خارج الخلايا او ملتصق على أسطح الأغشية الخلوية كون المسبب قد تمكن من النمو في راسب النبذ والراسب المغسول ، وبشكل فاقد للجدار كليا كون المسبب تمكن من النمو بعد تكسير الخلايا ، ونموه في المزرعة ثنائية الطور دليل على ان المسبب فاقد للجدار كليا ومتموضع (Localized) داخل الخلايا بسبب ميله للإقامة الطفيلية فيها تجنبا لتأثير بيئة الطفيلي (Domingue, 1997) . أما انعدام النمو في تقنية التخفيف قد تكون نتيجة وجود المسبب في طور الانتقال ، حيث لوحظت أشكال فاقدة للجدار بصورة جزئية، وهذه الأشكال لم تتمكن من المرور عبر المرشحات الدقيقة ذات القطر0.22 مايكرون.

هيأة رقم 6 :

توضح النتائج انعدام النمو بجميع التقنيات الزرعية الاعتيادية والمطورة على حد سواء، والتي استخدمت في هذه الدراسة ، بالرغم من وجود الأعراض السريرية التي تدل على وجود حالة مرضية ، قد يعود السبب هنا لواحد او اكثر من الأسباب الآتية :

1- ان الإصابة ناتجة عن مسبب آخر يصعب عزله في التقنيات المستخدمة في هذه الدراسة ، كالفيروسات اوالركتسيا Viruses or Rickettsia .

. (Jawetz et al,1987; Collee et al, 1996)

2-أن الممرض متخفٍ (Cryptized) في مناطق محمية من الجهاز التنفسي (Brooks et al 1998) .
3-ان يكون هناك انسداد او تليف في الخلايا المصابة يمنع المسبب من الخروج مع القشع (Davison et al ,1995;Rowen et al 1992) .
1- أن تكون هناك حالة إصابة بالسرطان ناتج عن الإصابة بالبكتريا الفاقدة للجدار الخلوي نفسها .(Alan, 2004) .

الجدول(4-13) تقويم كفاءة طرق العزل لفاقدات الجدار :كانت كفاءة طرق العزل لفاقدات الجدار كالآتي:

ت	التقنية	الموجب : الكلي : %
1	(تقنية 1) القشع الكاملDirect (طريقة1)	0 : 51 : 0.0
	رائق القشع Supernatant (طريقة2)	0 : 51 : 0.0
	راسب القشع Sediment (طريقة 3)	21 : 51 : 41.17
	الراسب المغسول Washing (طريقة4)	11 : 51 : 21.56
	الراسب المكسر Lysis (طريقة5)	36 : 51 : 70.58
2	الرشح المخفف Dilution (تقنية2)	30 : 51 : 58.8

3	المزرعة ثنائية الطورBiphasic (تقنية 3)	78.43 : 51: 40

الجدول(4-14) : يوضح نسب عزل فاقدة الجدار وذات الجدار للبكتريا المسببة لالتهاب الجهاز التنفسي.عدد العينات الكلي=125 عينة.(51 عينة لبكتريا فاقدة للجدار،74 عينة لبكتريا ذات جدار)

نوع البكتريا	نسبة عزل فاقدة الجدار		نسبة عزل ذات الجدار	
	بطرق العزل المطورة الخاصة بفاقدة الجدار		بطرق العزل المباشرة	
	العدد الموجب	%	العدد الموجب	%
Klebsiella pneumoniae	11:125	8.8	31:125	24.8
S. Pneumoniae	18:125	14.4	19:125	5.2
P. aeruginosa	12:125	9.6	17:125	13.6
Proteus spp.	1:125	0.8	1:125	0.8
Actinomycetes spp.	0:125	0.0	3:125	2.4
Nocardia spp.	0:125	0.0	1:125	0.8
S. Viridans	1:125	0.8	1:125	0.8
S.Pneumoniae, Aspergillus spp.	0:125	0.0	1:125	0.8

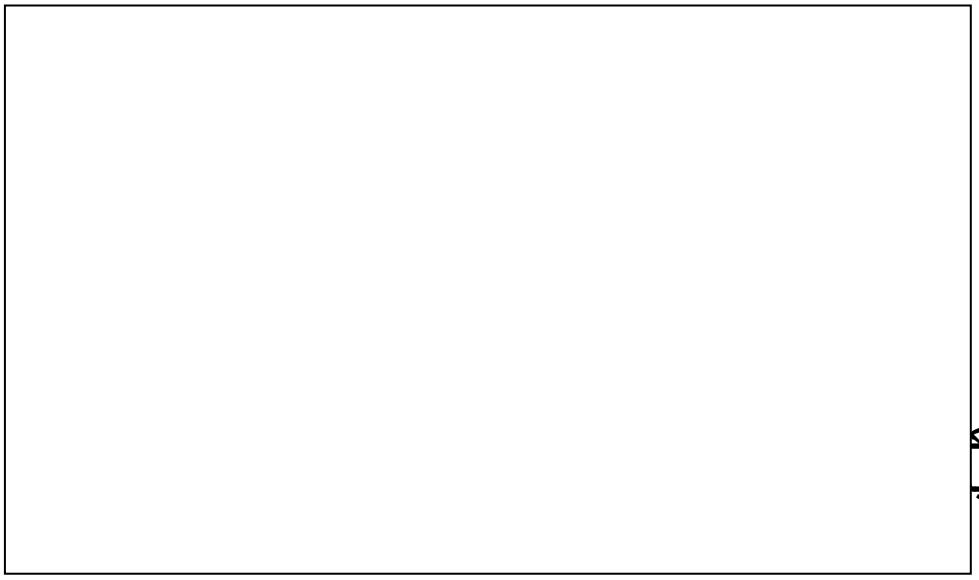
4-10: بيولوجية البكتريا فاقدة الجدار الخلوي :

بين الفحص المجهري لمستعمرات البكتريا فاقدة الجدار الخلوي التي عزلت بتقنيات الزرع المطورة التي أجريت في هذه الدراسة ، بأنها تبدو بشكل أجسام دائرية او بيضوية منتفخة ومتلاحمة بشكل تجمعات خلوية بسبب فقدها للجدار ، وبعض هذه الأجسام الدائرية كبير Large bodies والبعض الاخر منها دقيق Tiny bodies وهذا يتفق مع ملاحظات عدد من العلماء والباحثين في هذا المجال ،منهم (Kudlai et al,1961;Domingue & Schlegel,1977; Domingue et al,1979) ، تمتاز البكتريا فاقدة الجدار الخلوي بان لمستعمراتها النامية على وسط الفارينت الصلب ذات مظهر يشبه مظهر البيض المقلي Fried eggs ، وتم ملاحظة هذا المظهر من خلال تصبيغ تلك المستعمرات بصبغة دينز . وهذا يتفق مع ما توصل اليه العديد من العلماء الذين حددوا صفات مستعمرات البكتريا فاقدة الجدار بهذا المظهر ، منهم (James et al,1965; Klieneberger,1951; Medill- Brown et al,1960;Panos,1965;Weibull and Beckman,1960) .وتمتاز مستعمرة البكتريا فاقدة الجدار الخلوي بكونها دقيقة (Tiny) وشفافة (Translucent)، بعضها لماع عند سقوط الأشعة المائلة عليها (الناصري-2002).كما تمتاز البكتريا فاقدة الجدار بإمكانية مرورها عبر المرشحات الدقيقة ذات ثقوب بقطر 0.22 مايكرون وهذا يؤكد كونها ذات طبيعة مرنة وقابلة للانضغاط (Flexible and Squeezable) وهذا يتفق مع ما جاء به كل من (Weinberger et al, 1950;Zubkov and Shchegolev, 1976;Ponig et al,1972;Domingue et al,1974;Dienes and Sharp,1956;Klienberger1949;Marston,1961).

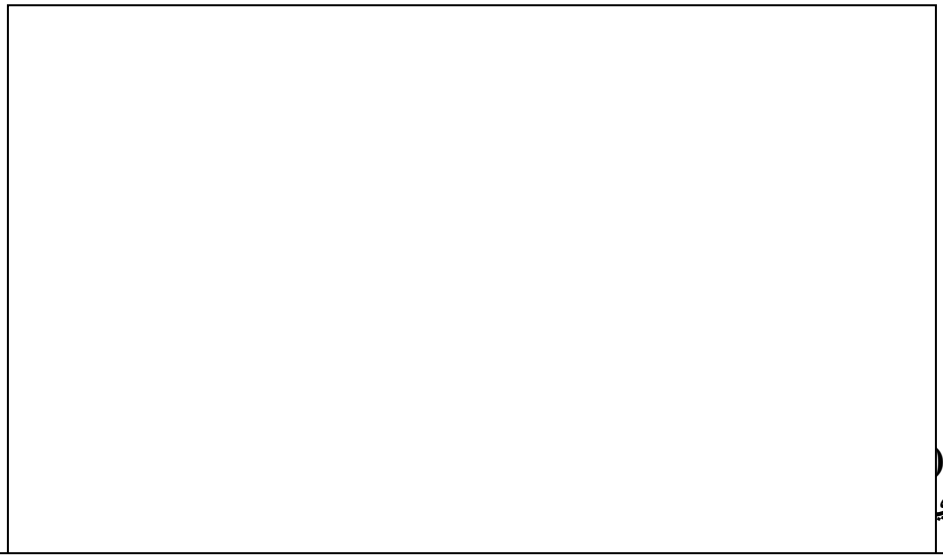
كما تمتاز البكتريا الفاقدة للجدار بقدرتها على الارتداد Reverted الى الشكل السوي ذي الجدار، وقد تكون ثابتة غير قادرة على الرجوع الى اصلها، حيث لا تتمكن من إعادة تكوين جدارها الخلوي مرة اخرى وهذا يتفق مع ما توصل إليه(Wyric et al ,1973).

الشك

مصبوغة بصبغة كرام وبقوة تكبير 1000x .نامية على وسط اكار الفارينت.

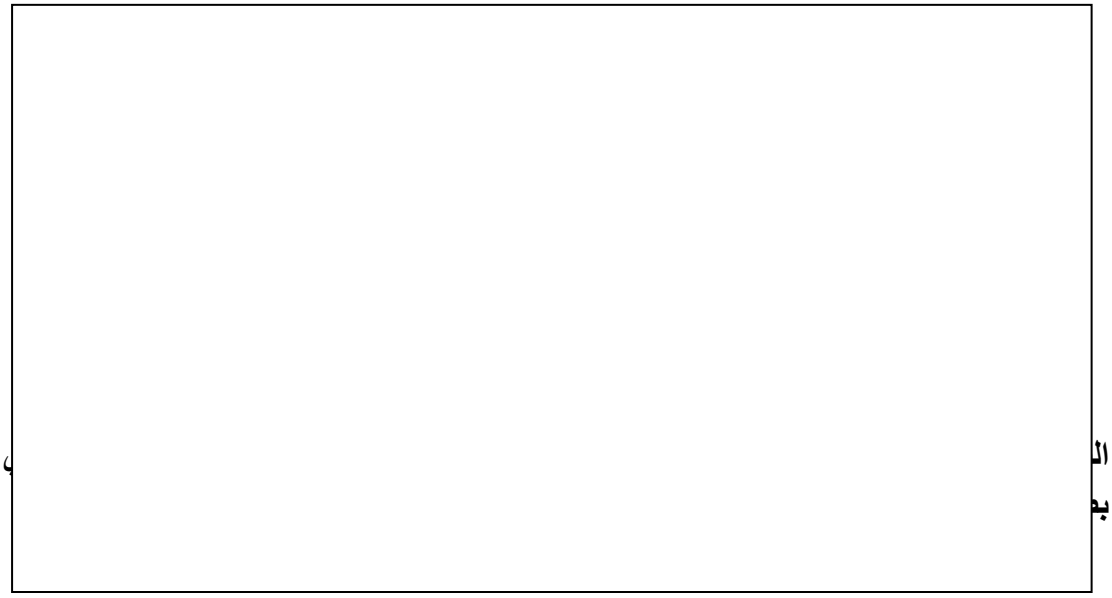


الشكل ذي الجدار
الشك
نامي



الشكل (
الخلوي
x40.

الشـ
علـ
لـوي النـاميـة



ال
مصبوغة
بـ

4-11-حساسية البكتريا فاقدة الجدار الخلوي المشاركة في التهاب الجهاز التنفسي للمضادات الحيوية:

كانت المكورات الرئوية ***S. Pneumoniae*** فاقدة الجدار الخلوي حساسة للكلورامفنيكول Chlpramphenicol (C30) بنسبة 94.4% وللـ Amikacin بنسبة 88.8% وبصورة اقل حساسة للـ Nalidaxic acid بنسبة77.7% والريفادين بنسبة 44.4% والتوبرامايسين بنسبة 38.8% في حين كانت مقاومة للامبسيلين بنسبة 100 % وكذلك الكلوكساسلين Cloxacillin اما البكتريا الراجعة فكانت حساسة للتتراسايكلين بنسبة 83.3% ولكل من Amikacin وNalidaxic acid بنسبة 72.2% وللامبسيلين بنسبة 66.6% فيما انخفضت الحساسية للكلورامفنيكول الى 38.8% والتوبرامايسين الى66.6% .كما موضح بالجدول(4-15) . وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (Shnawa et al,2004).أما حساسية بكتريا ***P.***

aeruginosa فاقدة الجدار الخلوي فسجلت أعلى حساسيةللـ Amikacin بنسبة 100% وكذلك لـ Nalidaxic acid . في حين بلغت نسبة حساسيتها للتتراسايكلين 83.3% والتوبرامايسين بنسبة 66.6% . اما حساسية البكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار لهذا النوع البكتيري فبلغت75% لكل من Amikacin وحامض الناليدكسك وبنسبة 58.3% بالنسبة للتتراسايكلين . اما مقاومة البكتريا فاقدة الجدار الخلوي فبلغت 100% لكل من المضادين الحيويين Ampicillin و Cloxacillin . في حين سجلت البكتريا الراجعة للشكل ذي الجدار مقاومة بنسبة 100% للـ Cloxacillin و83.3% بالنسبة للـ Ampicillin .كما سجلت أيضا مقاومة بنسبة 75% لكل من الكلورامفينيكول والارثرومايسين .كما مبين في الجدول(4-16). وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Shnawa et all, 2004). كما سجلت بكتريا *K. pneumoniae* فاقدة الجدار الخلوي حساسية عالية تجاه الـ Nalidaxic acid بنسبة 100% ، وكانت حساسة ايضا لكل من الاميكاسين بنسبة 90.9% وبنسبة 81.8% للتتراسايكلين .في حين كانت مقاومة لكل من Ampicillin و Cloxacillin بنسبة 100% ومقاومة ايضا لكل من التوبرامايسين بنسبة 90.9% والارثرومايسين Erythromycin بنسبة 81.8% . اما البكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار فبلغت أعلى حساسية لها تجاه الكلورامفنيكول بنسبة 100% وبنسبة 27.7% لكل من المضادات الاميكاسين والتتراسايكلين وحامض الناليدكسك . في حين بلغت أعلى مقاومة للمضادات الريفادين، الكلوكساسلين ، التوبرامايسين والارثرومايسين بنسبة 100% ، وبلغت نسبة المقاومة للامبسلين 90.9% . في حين كانت مقاومة للاميكاسين بنسبة 18.1% وللـ Nalidaxic acid بنسبة27.2%. كما موضح في الجدول (4-17) . فيما أبدت *Proteus spp*. فاقدة الجدار الخلوي حساسية بنسبة 100% لكل من الريفادين وحامض الناليدكسك ، ومقاومة بلغت 100% لكل من الامبسيلين والكلوكساسلين والتوبرامايسين والارثرومايسين .في حين كانت حساسية البكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية كآلاتي : حساسية 100% لكل من الاميكاسين وحامض الناليدكسك والامبسلين والكلورامفنيكول .فيما أبدت مقاومة للتتراسايكلين والتوبرامايسين والارثرومايسين بنسبة 100% . كما موضح في الجدول (4-18) .وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (Shnawa et all, 2004).

4-12- هيأة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية للبكتريا فاقدة الجدار والبكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار.

انحصرت المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية بين (2R-6R) في البكتريا فاقدة الجدار في حين كانت محصورة بين (2R-10R) في البكتريا الراجعة بالنسبة لبكتريا *S. Pneumoniae* كما موضح في الجدول (4-18-أ ،ب).

أما المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتريا *P.aeruginosa* فاقدة الجدار الخلوي فكانت محصورة بين المقاومة لمضادين حيويين (2R) الى مقاومة لسبعة مضادات حيوية (7R) ، اما بالنسبة للبكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار لهذا النوع البكتيري فكانت مقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية محصورة بين (2R-6R) كما موضح في الجدول (4-19-أ،ب) .

أما المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتريا *K.pneumoniae* فاقدة الجدار فكانت محصورة بين (2R-7R) و (3R-7R) بالنسبة للبكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار .(الجدول4-20-أ،ب) .

في حين كانت المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتريا *Proteus spp.* فاقدة الجدار فكانت مقاومة متعددة لتسعة مضادات حيوية ، اما البكتريا الراجعة الى الشكل ذي الجدار فكانت مقاومة لعشرة مضادات حيوية .(الجدول 4-21-أ،ب) .وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (Shnawa et al, 2004) .

4-13- كفاءة طرق عزل البكتريا فاقدة الجدار الخلوي من السبيل التنفسي :

من خلال نتائج اختبار Z تبين بان طريقة المزرعة ثنائية الطور ثم الراسب المتحلل واخيرا الرائق المخفف كانت الاكثر معنوية ، حيث ظهرت قيمةZ المحسوبة 14.8 ، 11.92 و10.6 على التوالي مقارنة بقيمة Z الجدولية (3.63) ، وهي اكثر جدوى من زراعة الراسب المغسول.(الجدول 4-23) .

الجدول(4-15) حساسية بكتريا *Streptococcus pneumoniae* فاقدة الجدار والراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية . عدد العينات= 18 عينة.

Antibiotics	CWDB						Reverted bacteria					
	*S	%	R*	%	I*	%	S	%	R	%	I	%
AN	16	88.8	2	11.1	0	0	13	72.2	5	27.7	0	0
RA	8	44.4	10	55.5	0	0	7	38.8	11	61.1	0	0
NA	14	77.7	4	22.2	0	0	13	72.2	4	22.2	1	5.55
TE	15	83.3	3	61.6	0	0	15	83.3	3	16.6	0	0
AMP	0	0	18	100	0	0	12	66.6	6	33.3	0	0
C	17	94.4	1	5.55	0	0	7	38.8	10	55.5	1	5.55

CX	0	0	18	100	0	0	3	16.6	13	72.2	2	11.1
TOB	7	38.8	11	61.1	0	0	3	16.6	15	83.3	0	0
S	15	83.3	3	16.6	0	0	5	27.7	13	72.7	0	0
E	16	88.8	2	11.1	0	0	10	55.5	7	38.8	1	5.55

AN: Amikacin

RA: Revampicin

NA:Nalidaxic acid

TE:Tetracyclin

AMP:Ampicillin

C: Chloramphenicol

CX: Cloxacillin

TOB:Tobramycin

S: Streptomycin

E: Erythromycin
***S: Sensitive, R: Resistant ,I: Intermediate.**

الجدول (4-16) حساسية بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* فاقدة الجدار والراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية. عدد العينات = 12 .

Antibiotic	CWDB						Reverted bacteria					
	S	%	R	%	I	%	S	%	R	%	I	%
AN	12	100	0	0	0	0	9	75	2	16.6	1	8.3
RA	0	0	12	100	0	0	0	0	12	0	0	0
NA	12	100	0	0	0	0	9	75	1	8.3	2	16.6
TE	10	83.3	1	8.3	1	8.3	7	58.3	4	33.3	1	8.3

AMP	**0**	**0**	**12**	**100**	**0**	**0**	**2**	**16.6**	**10**	**83.3**	**0**	**0**
C	**3**	**25**	**9**	**75**	**0**	**0**	**3**	**25**	**9**	**75**	**0**	**0**
CX	**0**	**0**	**12**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**12**	**100**	**0**	**0**
TOB	**8**	**66.6**	**4**	**33.3**	**0**	**0**	**4**	**33.3**	**4**	**33.3**	**4**	**33.3**
E5	**4**	**33.3**	**8**	**66.6**	**0**	**0**	**3**	**25**	**9**	**75**	**0**	**0**

الجدول (4-17) حساسية بكتريا *Klebsiella pneumoniae* فاقدة الجدار والراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية ،عدد العينات = 11

Antibiotics	**CWDB**						**Reverted bacteria**					
	S	**%**	**R**	**%**	**I**	**%**	**S**	**%**	**R**	**%**	**I**	**%**
AN	**10**	**90.9**	**0**	**0**	**1**	**9.09**	**8**	**72.7**	**2**	**18.1**	**1**	**9.09**
RA	**0**	**0**	**11**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**11**	**100**	**0**	**0**
NA	**11**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**8**	**72.7**	**3**	**27.2**	**0**	**0**
TE	**9**	**81.8**	**1**	**9.09**	**1**	**9.09**	**8**	**72.7**	**2**	**81.1**	**1**	**9.09**
AMP	**0**	**0**	**11**	**100**	**0**	**0**	**1**	**9.09**	**10**	**90.9**	**0**	**0**
C	**11**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**11**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**
CX	**0**	**0**	**11**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**11**	**100**	**0**	**0**

TOB	**0**	**0**	**10**	**90.9**	**1**	**9.09**	**0**	**0**	**11**	**100**	**0**	**0**
E	**0**	**0**	**9**	**81.8**	**2**	**81.8**	**0**	**0**	**11**	**100**	**0**	**0**

الجدول(4-18) حساسية بكتريا *Proteus spp.* فاقدة الجدار والراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية.عدد العينات = (1) عينة واحدة .

Antibiotic	**CWDB**						**Reverted (intact bacteria)**					
	S	**%**	**R**	**%**	**I**	**%**	**S**	**%**	**R**	**%**	**I**	**%**
AN	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**
CF	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**
RA	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**
NA	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**
TE	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**
AMP	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**
C	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**
CX	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**

TOB	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**
E	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**100**	**0**	**0**

الجدول (4-19-أ) مكررات مقاومة بكتريا *S. Pneumoniae* فاقدة الجدار للمضادات الحيوية.

Frequency No.of R.	Resistogram	%	Incidence
2 R	AMP-C. AMP-CX .	11.11	2:18
3 R	AMP-RA-TOB. AMP.CX-S. AMP-CX-AN .	22.22	4:18
4 R	RA-AMP-CX-TOB.(3 Times) AMP-CX-TOB-E. RA-TE-AMP-CX. RA-AMP-CX-S.	33.33	6:18
5 R	AMP-CX-TOB-E-S. RA-TE-AMP-CX-S. RA-AMP-CX-TOB-S. RA-AMP-CX-E-S	22.22	4:18
6 R	RA-NA-AMP-CX-TOB-S. RA-AMP-CX-TOB-E-S .	11.11	2:18

الجدول (4-19-ب) مكررات مقاومة بكتريا *S. Pneumoniae* الراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية .

FrequencyNO.ofR.	Resistogram	%	Incidence
2R	RA-TOB. C-CX. AMP-CX.(2Times)	22.22	4:18
3R	AN-AMP-E **and** RA-AMP-CX.	11.11	2:18
4R	AMP-CX-TOB-E. **and** RA-TE-CX-E.	11.11	2:18
6 R	RA-AMP-C-TOB-CX-E	11.11	2:18

	AN-NA-C-TOB-E-S .		
10R	AN-RA-NA-TE-AMP-C-CX-TOB-E-S.	5.55	1:18

الجدول (4-20-أ) مكررات مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* فاقدة الجدار للمضادات الحيوية.

Frequency NO.of: R	Resistogram	%	Incidence
2R	AMP-CX.	8.3	1:12
3R	RA-AMP-CX. AMP-CX-E.	16.6	2:12
4R	RA-AMP-CX-TOB. AMP-CX-E-S. RA-AMP-CX-E. AMP-C-CX-E.(2 times)	41.6	5:12
6R	RA-AMP-TE-CX-TOB-E-S.	8.3	1:12
7R	RA-AMP-C-CX-TOB-E-S.	8.3	1:12

الجدول (4-20- ب) مكررات مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* الراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية .

FrequencyNO.of :R	Resistogram	%	Incidence
2R	C-CX. E-CX.	16.6	2:12
3R	RA-AMP-CX.	8.3	1:12
4R	RA-AMP-CX-E.	8.3	1:12
5R	RA-AMP-CX-E-S. RA-AMP-CX-E-S. RA-TE-CX-E-S.	25.0	3:12
6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S. RA-AMP-CX-TOB-E-N. RA-TE-AMP-CX-E-S. AN-TE-CX-TOB-E-S.	33.3	4:12

الجدول (4-21أ) مكررات مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* فاقدة الجدار الخلوي للمضادات الحيوية

FrequencyNO.of:R	Resistogram	**%**	Incidence
2 R	AMP-CX.	9.09	1:11
5R	RA-AMP-CX-TOB-E-S.(2Times)	18.18	2:11
6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S.(6Times)	54.54	6:11

7R	RA-AMP-C-CX-TOB-E-S. RA-AMP-NA-CX-TOB-E-S.	18.18	2:11

الجدول (4-21-ب) مكررات مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* الراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية.

FrequencyNO.of :R	Resistogram	%	Incidence
3R	AN-CX-NA.	9.09	1:11
5R	RA-AMP-CX-E-S.	9.09	1:11
6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S. (6Times)	54.54	6:11
7R	RA-TE-AMP-CX-TOB-E-S.(2Times) RA-AMP-CX-TOB-E-S- NA.	27.27	3:11

الجدول (4-22أ) مكررات مقاومة بكتريا*.Proteus spp* فاقدة الجدار الخلوي للمضادات الحيوية .

FrequencyNOof :R	Resistogram	%	Incidence
9R	AN-NA-TE-AMP-C-CX-TOB-E-S	100	1:1

الجدول(4-22-ب) مكررات مقاومة بكتريا*.Proteus spp* الراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية .

FrequencyNO.of :R	Resistogram	%	Incidence
10R	AN-RA-NA-TE-AMP-C-CX-TOB-E-S.	100	1:1

الجدول (4-23) نتائج اختبار Z لتحديد افضل التقنيات لعزل فاقدات الجدار.

التقنية	عدد العزلات	نسبة العزل%	قيمة $Z_{0.01}$ الجدولية	المحسوبة
زراعة راسب القشع Sputum sediment	21	41.17	0.9564	1.71
زرع الراسب المغسول Washing of sediment	11	21.56	0.9890	2.29
الراسب المتحلل Lysis sediment	36	70.58	3.63	11.92
الراشح المخفف Dilution filtrate	30	58.8	3.63	10.6
المزرعة ثنائية الطور	40	78.43	3.63	14.8

Biphasic medium			

(Knapp,1992) ، (الراوي، 1977) .

الاستنتاجات Conclusions

1-بما ان البكتريا فاقدة الجدار الخلوي تسبب أمراض مستديمة كما بينتها هذه الدراسة ودراسات أخرى في هذا المجال، فأن الاستخدام الخاطئ للمضادات الحيوية (Misuse of antibiotics) هو المسبب الأكثر واقعية لمثل هذه الحالات.

2-يمكن أن تكون جميع أنواع البكتريا المرضية (وغير المرضية) معرضة لفقد جدارها واحداث حالات مرضية مستديمة.

3-البكتريا فاقدة الجدار الموجبة والسالبة لصبغة كرام تشترك في التهاب الجهاز التنفسي.

التوصيات:Recommendation

1-إجراء دراسة خاصة حول قدرة البكتريا فاقدة الجدار الخلوي من إحداث الاصابة بالسرطان وذلك باستخدام حيوانات مختبرية مختلفة تجريبياً، ومحاولة إعادة عزلها بعد ذلك من الحيوان.

2- إضافة الأوساط الزرعية الخاصة بالبكتريا فاقدة الجدار الخلوي للأوساط الزرعية الأخرى المستخدمة روتينيا.

3-إضافة الفحوصات السيريولوجية والجزيئية.

الملاحــق
APPENDIX

الملاحـــق Appendix

الجدول (4-24 - أ) نمط مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* الفاقدة للجدار للمضادات الحيوية

رقـــم العزلة	نوع المقاومة للمضادات الحيوية									
	AN30	RA30	NA30	TE30	AMP10	C30	CX1	TOB5	E5	S10
4		R			*R*	*R*	*R*	*R*	*R*	*R*
5		*R*			*R*		*R*	*R*	*R*	*R*
6		*R*			*R*		*R*		*R*	*R*
7		*R*			*R*		*R*		*R*	*R*
11		*R*			*R*		*R*	*R*	*R*	*R*

22		***R***			***R***		***R***	***R***	***R***	***R***
23		***R***			***R***		***R***	***R***	***R***	***R***
26		***R***			***R***		***R***	***R***	***R***	***R***
30		***R***			***R***		***R***	***R***	***R***	***R***

الجدول (4-24-ب) : نمط مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* الراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية .

رقم العزلة	AN30	RA30	NA30	TE30	AMP10	C30	CX1	TOB5	E5	S10
4		**R**			**R**		**R**	**R**	**R**	**R**
5		**R**			**R**		**R**	**R**	**R**	**R**
6		**R**			**R**		**R**		**R**	**R**
7		**R**		**R**	**R**		**R**	**R**	**R**	**R**
11		**R**		**R**	**R**		**R**	**R**	**R**	**R**
22		**R**			**R**		**R**	**R**	**R**	**R**
23		**R**			**R**		**R**	**R**	**R**	**R**
26		**R**			**R**		**R**	**R**	**R**	**R**
30		**R**			**R**		**R**	**R**	**R**	**R**

الملاحـــق Appendix

الجدول (4-25- أ) نمط مقاومة بكتريا *Streptooccus pneumoniae* الفاقدة للجدار للمضادات الحيوية.

رقم العزلة	نوع المقاومة للمضادات الحيوية									
	AN30	RA30	NA30	TE30	AMP 10	C30	CX1	TOB5	E5	S10
1					***R***		***R***			***R***
8					***R***	***R***				
16					***R***		***R***	***R***	***R***	***R***
18		***R***	***R***		***R***		***R***	***R***		***R***
19		***R***			***R***		***R***	***R***		
20		***R***			***R***			***R***		

21		***R***			***R***		***R***	***R***		
27					***R***		***R***			
29	***R***				***R***		***R***			
31					***R***		***R***	***R***	***R***	
32		***R***		***R***	***R***		***R***			
33		***R***		***R***	***R***		***R***			***R***
34		***R***			***R***		***R***			
35		***R***			***R***		***R***			***R***
36		***R***			***R***		***R***	***R***		***R***
37		***R***			***R***		***R***	***R***	***R***	***R***
40		***R***			***R***		***R***		***R***	***R***
42		***R***			***R***		***R***	***R***		

الملاحـــق Appendix

الجدول (4-25- ب) : نمط مقاومة بكتريا *Streptococcus pneumoniae* الراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية .

رقـــم العزلة	AN30	RA30	NA30	AMP10	C30	CX1	TOB5	E5	S10
1				**R**					
8	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**
16		**R**		**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	
18	**R**		**R**		**R**		**R**	**R**	**R**
19		**R**					**R**		
20							**R**		
21	**R**			**R**				**R**	
27	**R**								
29					**R**	**R**			
31				**R**		**R**	**R**	**R**	
32		**R**		**R**		**R**			
33		**R**				**R**		**R**	

34									
35				**R**		**R**			
36									
37									
40				**R**		**R**			
42		**R**	**R**	**R**		**R**	**R**		

الملاحـــق Appendix

الجدول (4-26-أ) نمط مقاومة بكتريا *Proteus spp* الفاقدة للجدار للمضادات الحيوية.
عدد العينات = 1

رقـــم العزلة	نوع المقاومة للمضادات الحيوية									
	AN30	**RA30**	**NA30**	**TE30**	**AMP10**	**C30**	**CX1**	**TOB5**	**E5**	**S10**
28	***R***		***R***	***R***	***R***	***R***	***R***	***R***	***R***	***R***

الجدول (4-26-ب) : نمط مقاومة بكتريا *Proteus spp*. المتحولة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية .

رقـــم العزلة										
	AN30	**RA30**	**NA30**	**TE30**	**AMP10**	**C30**	**CX1**	**TOB5**	**E5**	**S10**
28	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**

الملاحـــق Appendix

الجدول (4-27-أ) نمط مقاومة بكتريا *Pseudomonas aeruginos* فاقدة للجدار للمضادات الحيوية

رقـــم العزلة	نوع المقاومة للمضادات الحيوية									
	AN30	RA30	NA30	TE30	AMP10	C30	CX1	TOB5	E5	S10
2		R			R		R			
3		R			R	R	R	R	R	R
9					R		R			
10		R			R		R		R	R
12		R			R		R	R		
13					R		R		R	R
14		R		R	R		R		R	R
15		R			R		R		R	
17					R	R	R		R	
24					R	R	R		R	
25							R		R	
39		R			R		R		R	R

الجدول (4-27-ب) : نمط مقاومة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* الراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية .

رقـــم العزلة	AN	RA	NA	TE	AMP	C	CX	TOB	E	S
2		R			R		R			
3		R			R		R	R	R	R
9	R			R	R	R	R			R
10		R			R		R		R	R
12		R	R		R		R	R	R	
13		R			R		R		R	R
14		R		R	R		R		R	R
15		R			R		R		R	
17							R		R	
24				R						
25						R	R			
29		R		R			R		R	R

الملاحـــق Appendix

الجدول (4-28-أ) هيأة مقاومة بكتريا *Streptococcus pneumoniae* الفاقدة للجدار الخلوي المتعددة للمضادات الحيوية (Resistogram) (18) عزلة.

رقم العزلة	NO. of : R	Rsistogram
1	3R	AMP-CX-S
8	2R	AMP-C
16	5R	AMP-CX-TOB-E-S
18	6R	RA-NA-AMP-CX-TOB-S
19	4R	RA-AMP-CX-TOB
20	3R	RA-AMP-TOB
21	4R	RA-AMP-CX-TOB
27	2R	AMP-CX
29	3R	AN-AMP-CX
31	4R	AMP-CX-TOB-E
32	4R	RA-TE-AMP-CX
33	5R	RA-TE-AMP-CX-S
34	3R	RA-AMP-CX
35	4R	RA-AMP-CX-S
36	5R	RA-AMP-CX-TOB-S
37	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
40	5R	RA-AMP-CX-E-S
42	4R	RA-AMP-CX-TOB

الملاحـــق Appendix

الجدول (4-28-ب) هيأة مقاومة بكتريا *S. Pneumoniae* الراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية ، Resistogram.

رقم العزلة	No. :R	Resistogram
1	1R	S

8	10R	AN-RA-NA-TE-AMP-C-CX-TOB-E-S
16	6R	RA-AMP-C-TOB-CX-E
18	6R	AN-NA-C-TOB-E-S
19	2R	RA-TOB
20	1R	TOB
21	3R	AN-AMP-E
27	1R	AN
29	2R	C-CX
31	4R	AMP-CX-TOB-E
32	3R	RA-AMP-CX
33	4R	RA-TE-CX-E
35	2R	AMP-CX
40	2R	AMP-CX
42	3R	RA-CX-TOB

الملاحـــق Appendix

الجدول (4-29-أ) هيأة مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* الفاقدة للجدار الخلوي للمضادات الحيويـة. Resistogram ، عدد العزلات= 12 عزلة .

رقم العزلة	NO. of :R*	Resistogram
2	3R*	RA-AMP-CX
3	7R*	RA-AMP-C-CX-TOB-E-S
9	2R	AMP-CX
10	5R	RA-AMP-CX-E-S

12	4R	RA-AMP-CX-TOB
13	4R	AMP-CX-E-S
14	6R	RA-TE-AMP-CX-E-S
15	4R	RA-AMP-CX-E
17	4R	AMP-C-CX-E
24	4R	AMP-C-CX-E
25	3R	AMP-CX-E
39	5R	RA-AMP-CX-E-S

R3* : تعني المقاومة لثلاث مضادات حيوية والمبينة في حقل Resistogram .

R7* : = = لسبعة = = = = = = وهكذا.

No.of R* : تعني عدد المضادات التي حصلت لها مقاومة من قبل البكتريا.

الملاحـــق Appendix

الجـــدول(4-29 ب) هيـــأة مقاومـــة بكتريـــا *aeruginosa P.* الراجعـــة الـــى الشـــكل ذي الجدار.Resistogram للمضادات الحيوية. (12) عزلة .

رقم العزلة	NO. of :R	Resistogram
2	3R	RA-AMP-CX
3	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
9	6R	AN-TE-CX-TOB-E-S
10	5R	RA-AMP-CX-E-S
12	6R	RA-NA-AMP-CX-TOB-E

13	5R	RA-AMP-CX-E-S
14	6R	RA-TE-AMP-CX-E-S
15	4R	RA-AMP-CX-E
17	2R	CX-E
24	1R	TE
25	2R	C-CX
39	5R	RA-TE-CX-E-S

الملاحـــق Appendix

الجدول (4-30-أ)هيأة مقاومة بكتريا *K. Pneumoniae* الفاقدة للجدار الخلوي للمضادات الحيوية Resistogram. (11) عزلة.

رقم العزلة	NO. of :R	Resistogram
4	7R	RA-AMP-C-CX-TOB-E-S
5	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
6	5R	RA-AMP-CX-E-S
7	5R	RA-AMP-CX-E-S
11	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
22	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
23	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
26	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
30	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
38	7R	RA-AMP-CX-TOB-E-S-NA
41	2R	AMP-CX

الجدول (4-30-ب) هيأة مقاومة بكتريا *K. Pneumoniae* الراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية.

رقم العزلة	NO. of :R	Resistogram

4	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
5	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
6	5R	RA-AMP-CX-E-S
7	7R	RA-TE-AMP-CX-TOB-E-S
11	7R	RA-TE-AMP-CX-TOB-E-S
22	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
23	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
26	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
30	6R	RA-AMP-CX-TOB-E-S
38	7R	RA-AMP-CX-TOB-E-S-NA
41	3R	AN-CX-NA

الملاحـــق Appendix

الجدول (4-31أ) هيأة مقاومة بكتريا *Proteus spp.* الفاقدة للجدار الخلوي للمضادات الحيوية.(عزلة واحدة) .

رقم العزلة	NO. of :R	Resistogram
28	10R	AN-RA-NA-TE-AMP-C-CX-TOB-E-S

الجدول(4-31ب) هيأة مقاومة بكتريا *Proteus spp.* الراجعة الى الشكل ذي الجدار للمضادات الحيوية .

رقم العزلة	NO. of :R	Resistogram
28	10R	AN-RA-NA-TE-AMP-C-CX-TOB-E-S

الفصل الأول
المقدمة
Introduction

الفصل الثاني
استعراض المراجع

Literature Review

الفصل الثالث
المواد وطرق العمل
Materials and Methods

الفصل الرابع
النتائج والمناقشة
Results and discussion

المصادر الأجنبية

References:

Alan, R.Cantwell, J.M.D.(2004).Cant. Medline Int.

Altemeier,W.A.;Hill,E.O. and Fullen , W.D.(1969). Acute and recurrent thromboembolic disease: anew concept of etiology. Ann. Surg.

Avram,G. and Lewis Aranow(1975). Sumner, M. Kalman. In: principles of drugs action . JPHN Willy and Sons.

Baker,F.J. andR.E.Silverton(1978). For introduction Medical Laboratory Technology, 5th ed. P.454-456. London.

Barsumia, E.L.; Schlivert , P.M.& Watson, D.W.(1978). Non-specific and specific immunological mitogenicity by group A. *Streptococcal pyogenic* exotoxin . Immunity,22:681-688.

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M.; shirrs. And Turck, M.(1966).Antibiotic susceptibility testing by standarized single disc method.Am.J.Clin. path.,45(4) 439-493.

Benson, H.J. (1998). Microbiology applications Laboratory manual general microbiology.7th ed. P158-162 WCB.MC Graw - Hill.

Bingin, E.Leclerq, R.; Fitoussi,F; Bramhimi,N.; Malbrung ,B. ; Deforche D. and Cohen, R.(2002). Emergence of Group A *Streptococcus* strains with different mechanisms of Macrolide resistance Antimicrob.agentchemother.46(5):1199-1203.

Bisset, K.A. and Bartlett, R. (1978) .The isolation and characters of L - forms and reversions of *Bacillus licheniformis var indoparasitcs* (Benedek) associated with the Erythrocyte of clinically normal persons J. Med. Microbial.11:335-349.

Bradely, H.E.; Wetmur.J.G. and Nodes ,D.S. 1980.Tolerance in *Staphylococcus aureus* :evidence for bacteriophage role J.Info.Dis.141-: 233-237.

Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morses, A.A.(2004).Jawetz,Melnik and Adelberge's Medical Microbiology,23rd ed.int.ed Macgraw Hill, Boston.

Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morses, S.A.(1998).; Jawetz, Melnik and adelberge's medical microbiology. 21 ed.,p 226-230.Appelton and Lange California.

Carleton, J. and Fraser, G. (1972). The slow bacterial effect of Tetracycline and Minocylline on Wall- defective *Staphylococcus* . J. Infect.Dis. , 126:457-459.

Cheadl, W.G. and Polk, H.C. (1997).Prevention of sepsis and septic complication in surgical patients. Crit.Med., 3:308-313.

Clasener, H. (1972). Pathogenicity of L- phase of bacteria. Ann.Rev. Microbiology ,p.55-84.

Collee, J.G.;Fraser,A.G.;Marmion,B.P. And Simmons A.(1996).Mackie and McCarteny practical medical microbiology.14th ed . The Churchill Livingstone.Inc.,U.S.A.

Cowan, S.J. (1985). Cowan and Steel manual for identification of medical bacteria,2nd ed. Cambridge Univ.press.UK.

Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.p.& Swain, R.H.A. (1975) Medical Microbiology. Vol. 2,12th ed. P.459 the English languge Book.

Damon, H.; Galirnand, M. ; Gerbaud, G. and Courvalin,p. 2002.Rpob mutation conferring Rifampin resistance in *Streptococcus pyogens*.Antimicrob. agent. Chemothera.46(5) :1571-1573.

Davison, A.M.; Cumming, A.D.& Swainson, C.P. (1995). Disease of the kidney& genitourinary system in : Davisons principles & practice of Medicine ,17th ed . Edwards , C.R.W.;Buchier, I.A.D. & Hasslett,C. Churchill Livingston, Edinburgh.

Dienes, L. and Sharp, J.T. (1956). The role of high of electrolyte concentration in the production and growth of L-forms of bacteria. J.bacteria.,71:208-213.

Difco manual of dehydrated culture media and reagent from microbiology and clinical laboratory procedures (1984). 10th ed. ;Difco laboratories, Detroit, Michigan ,U.S.A.

Domingue, G.J. and Schlegel, J.U.(1977). Novel bacterial structures in human blood : Cultural isolation inf.

Domingue, G.J. (1995). Electron dense cytoplasmic particles & chronic infection:Bacterial pleomorphy hypothesis.Endocytobiosis cell Res.,11(1):19-40 (Medline Abst.)

Domingue, G.J. & Woody, H.B. (1997). Bacterial persistance & expression of disease . Clin. Microbiol. Rev., 10(2): 320-344.

Domingue, G.J. (1982). Cell wall- deficient bacteria basic principles and clinical significance p.437-439.

Domingue, G.J.; Tuner, B.and Schlegel, J.U. (1974). Cell wall -deficient bacteria variant in kidney tissue. Detected by immunofluorescence .J.Urol.;3(3):288-292.

Dowling, J.R., McCarthy, M.; Riley, D., Morris, A.J. (1999). Med. J., 112(1098):412. Medline abst.

Falkow , S.C.(1997). Epidemiology and clinical microbiology .In: Microbiology dynamics and diversity . Perry , J.J. and Staley, J.T. (ed.) p. 824-825.Saunders college publishing .Harcount &Brace college publishers.

Favielle, R.J.; Zaske, D.E.and Kaplan E. L. (1978) *Staphylococcus endocarditis* compined therapy with Vancomycin and Rifampin.J. Am. Med .Ass .240: 1963-1965.

Felton, J.M. and Bryceson, A.D.M. (1996). Fever in the returning traveller .Br.J. Hos.Med.

Fournier, B.; Gravel, A.,Hopper,D.Cmd.Roy ,.P. 1999 .Strength and Reynlation of the different promoters for chromosomal β- lactamase of K. oxytoca. Antimicrob., Agent chemother.43(4): 850-855.

Franklin, J.J. and Snow, G.A.(1975) . Biochemistry of antimicrobial action 2nd ed. Chapman and Hall. London.

Gardner,P.and Provine ,H.T. (1975). Manual of acute bacterial infections. Early Diagnosis and treatment p.161-301. Little , Brown and Company Boston.

Griffin, G.E.Sissons, J.G.P.; Chiodini,P.I. and Mitchell,D.M.(1999). Disease due to infection.In: Davidson's principles and practice of midicine.18th ed., Haslett, C.; Chilvers, E.R.; Hunteruy , J.A.A. and Boon, N. (eds.) p.123-125. Churchilli-Livingstone, Edinburgh and Cambridge.

Heidger, P.F.; Domingue , G.J.; Larsen, W.J. and Smith,T.W.(1982).Fine Structure studies of Cell Wall - Deficient Bacteria from human blood & urine. In: Cell Wall-Deficient Bacteria Basic Principles and Clinical Significance. Domingue , G.J. (ed). Addison-Wesley publishing com. Reading Mass.

Henry, F.C. and Hackbarth, C. J. 1993. Iand Bla RI. Regulate B-Lactamases and pbp2a production in Mithicillin resistance to *Saureus antimicrob.* Agent Chemother. 9:91-97.

Hewitt, W.L.; Selingman, S.J.and Deich, RA. (1968) . Relationship of the antibiotic sensitivity of enterococci to acquired resistance in their L-forms . In: Microbial protoplasts & L-forms. Guze, L.B. (ed.) p.311-313. Williams and Willkins Company ,Baltimore.

Hibma, A.; Jassim, S.and Griffiths, M.(1996). In: vivo bioluminescence to detective attachment of L.- forms of Listeria monocytogenes to food and clinical cotact surfaces . Intern.

Hibma,A. ; Jassim,S. and Griffiths, M.(1996).In: Vivo bioluminescence to detective attachment of L- forms .Intern.

Hill, E.O. and Lewis , S,(1964). L-form isolated from Surgical infections Bacteriol. Proc.Am. Soc.Microbiol. p.48.

Hubert,E.J.; Kalmanson, G.M.; M.ontgomerie, J.Z. and Guze, L.B.(1972) .Activity of Methacycline , related tetracycline and other antibiotics against various L-forms and their parent bacteria in vitro .Antimicrobial agents chemother. ;2:276-280.

James, J. (1999) .The mechanisms and the spread of antibiotic resistance. Pediater. Ann. ,28(7) 466-452.

Jawetz , E.Melnick, J.L. and Adelberg, E.A. (1987). Review of Medical Microbiology . 17th ed. ,p.241-244. Appelton and Lange , California.

Kagan, B.M.(1972) .L-forms In: The *Staphylococcui.* Cohen J.O. (ed.) p. 65-74.ohn Wiley and sons, INC., U.S.A.

Kenney, J.F. (1978). Role of cell wall- defective variant in human infections.South-Med. J.,71(2) :180-190.

Klienberger -Noble, E. (1949).On *Streptobacillus moniliformis* and filterability of its L-forms .J. Hyg. , 47:393-395.

Klienberger, E. . (1951). Filterable forms of bacteria,Rev. ,15:77-103.

Knapp, R.G. ; Miller, M.C.(1992). Clinical epidemiology and biostatistics. The national medical series for independent study . Williams &Wilkins.Awaverly comp.

Kudlai,D.G.; Solovien ,N.N. and Prozorovsky,S.V.(1961). Penicillin protoplasts of intestinal bacteria ZN.Mikrobol. Epidemiol.Immunobiol.,32:22-28.

Lancini,G. and Pacini, F. (1983). Antibiotics and Integral view . Springer-Verlage Newyork.

Lawson, J.W.(1982) . Induction of the L-form of bacteria basic principle and clinical significance Domingue ,G.J. (ed.) p.75-99. Wesley publishing company , Reading Mass.

Louria , D.B. ; Kaminski , T. ; Kapila, R.; Teeson , F. and Smith, L. (1976).Study on usefulness of hypertonic culture media .J.clin. Microbiol.,4: 208-213.

Lyobo, S; Junoda; M.and Misuhashi, S. 1994.Cloning and Expression in Enterobacteriaceae of extended spectrum of β-lactamase gene from plasmid FEMS microb.Lett.121:175-180.

Lynn,R.J.(1982). Serological & immunogical characteristics of cell Wall -deficient bacteria: Basic principles & clinical Significance.Domingue, G.J.(ed.),p.59-74.Addison-Wesley publishing co, Reading Mass.

Macfaddin,J.F.(2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria, 3rd ed. ,p 27-439. Lippincott Williams & Wilkins co.,Baltimore,USA.55-Madel , U.; Murphy EST and Miller ,1984. Gentamycin uptake in *S.aureus* processing plasmid- encoded . gent.chemother. 26:553-559.

Madel,U.:Murphy EST and Miller, 1984. Gentamycin uptake in *S. aureus* processing plasmid -encoded. Agent Chemother 26: 553-559.

Marston,J. (1961) .Observation on L-forms of *Staphylococci* J.Infect. Dis. 108:75-84.

Martize,L.; Pascual.A.S.; Dize , D.Suoreze ,A. and Tran.J. 1999.Role of β- lactamase and Porine inactivities of carbohs.Antimicrob. agent. Chemother. 43(7) : 1669-1673.

Maskell,R.(1990). Apparently sterile pyuria in children (letter) . Br. J. Gen. Pract.,40(333):165-166.

Mattman ,L.h. (1974). Cellwall-deficient form. CRC press, Cleveland.

Mattman, L.H.(1993a).Rhumatic fever & erysipelas cross-reacting antibody . In: cell wall-deficient bacteria forms: Stealth pathogens ,2nd ed., Mattman ,L.H. (ed.).p.155-CRC. Press, Inc. Boca Raton, Fla.

Mattman,L.H. and Judge, M.S.(1982). Septicemia and some associated infections :Demonstration of cell wall- deficient bacteria. In: Cell Wall - Deficient Bacteria Basic Principles and Clinical Significance . Domingue, G.J. (ed.) p.427-451. Addison-Wesley pub.co.Reading Mass.

Mattman,L.H.(1993b). Sarcoidosis . In: cell wall -deficient forms : Stealth pathogens,2nd ed. Mattman,L.H.(ed.). p.187 CRC. Press, Inc. Boca roton, Fla.

Medill-Brown, M.; Hutchinsom,W.G. and Cocklin,E.(1960).TheL-forms of *Proteus mirabilis* Ann. Acad .Sci, 79:374-379.

Merline ,J.R.; Golden ,A.and Mattman , L.H. (1971).Cell wall -deficient bacterial variants from man in experimental cardiopathy Am.J. Clin. Path., 55:212-220.

Metha, R. and Champney, 5.2002. 30S ribosomal subunit assembly is atarget for inhibition by aminoglycosides in E.coli antimicrob.chemother. 46(5):1546-1549.

Miller,M.H.; Edeberg ,S.C. and Model ,C.F. 1980 Gentamycin up take in wild type and aminoglycosides resistance small colony mutants of *S. aureus* antimicrob. Chemother. 18:722- 729.67-Moellering, R.C.1993.Meeting the

challenges of β-lactamases.J.Antimicrob. chemother.31(Supp.A) :1.
Moellering, R.C.1993. Meeting the challenges of B-lactamases ,J. Antimicrob.chemother .31(Supp.A):1
Muir's, J.R. ; Anderson, C.B.E. 1980. Donald Heath and J.M.Kay.In: Muir's text book of pathology p.432.
Nicolaides ,A.N.; Kakkar,v.v. ; Field, E.S. and Spindler,J. (1972).Antibiotics post operative infection and deep vein thrombosis.Br.J.Surg.,59:303.
Orr, M.M.; Tamarind,D.L.; Cook,J.; Fincham,W.J.; Hawley, P.R.; Quilliam, J.P. & Irving , M.H.(1974).Preliminary studies On the response of rabbit bowel to Intramural injections Of L-form bacteria .Br.J. Surg., 61:921.
Ponig,B.;D.omingue,G.J. and Schlegel,J.(1972).The role of invitro induced microbial L- forms in :Experimental hematogeneous pyelonephritis.Invist. urol.,9(4) :282-285.
Panose,C.(1965). Cellular physiology during logarithmic growth of a *Streptococcal* L-form, J.Gen.microbiol., 39:131-138.
Patterson,S.K.and Gilpin ,R.W.(1982). Basic biology of cell wall-deficient bacteria in: cell wal-deficient bacteria basic principles and clinical significance.Domingue G.J.(ed.) p.1-44. Addison-Wesley pub.co. Reading Mass.
Phair,J.P.;Votankunakorn ,C.; Linneman , C. and Carlenton, J. (1974).Attempts to isolate cell wall -defictive microbial variants from clinical specimence. Amer. J.Clin. pathol., USA;26:601-603.
Pleczar, M.J.Chan,E.C.S.(1981). Element of microbiology of McGraw Hill jnc.Tokyo.
Rowen,D.; Carn,C.A.; Sonnex ,C. (1992). Staghorn calculus presinting as sterile pyuria. Genitourin.Med. 68(6):404-404.
Sabath,C.D.(1980).Mechanisms of resistance to β- lactam antibiotics in Strains of *Staphylococcus aureus.* Ann. Inter.med.47:334-339.
Schifferli,J.A.;Ng.,Y.C.& Peters,D.K.(1986).The role of complement & its receptor in the elimination of immune complexs. N. Engl.J. Med.,315:488-495.
Segasothy,M.;Fairley ,K.F.;Brich,D.F.&Kincaid , S.P.(1991).
Sela,S.Neeman,R.; Killer,N&Barzilai ,A.(2000). Relationpship between a symptomatic carriage of *Streptococcus pyogens* & the ability of the strains to adhere to & be internalised by cultured epithelial cells J. Med. Microbiol.,49:499-502.
Shanon,K.and Philips ,I. (1982). Mechanisms of resistance to

aminoglycosieds in clinical isolates.J.Antimicrobial chemother., 19:91-102.78-Shaw,W.W.(1984). Bacterial resistance to Chloramphenicol.Brit.Med.Bull.40:36.

Shnawa, I.M.S.(2003). Notes on advanced Clinical Respiratory Tract Infection.Microbiology Ph.D. Course Babylon Univ. Coll. SC. Biol. Dpt.

Shnawa,M.S.(2004).Resistance & Resistograms ofmajor human Mammary associated bacterial pathogens.J. of Babylon Univ.822 :1786

Shaw,w.w.(1984) Bacterial resistanceto Chloramphenicol. Brit.Med.Bull.40:36.

Slomska,J.and Roux, J. (1977).Cell wall-defective organisms as a model for the study of antibiotic activity . In: Spheroplasts and L- forms of bacteria . Roux, J. (ed.). p. Editions INSERM , vol. 64 , paris.

Slomska, J.S.(1982). Antibiotic susceptibilities of cell wall - deficient bacteria & reverted bacteria in clinical & experimental studies. In: Cell Wall-Deficient Bacteria Basic Principles & Clinical Significance.Domingue, G.J. (ed.) p.489-523. Addison Wesley pub.co.Reading Mass.

Stewart, P.R. and Dublin DT.(1994) . Is.257 and small plasmid insertion in the Mec-region of the chromosome of*Staphylococcus aureus* plasmids.31:12.

Stukus,P.E. (1997).Investigation microbiology a laboratory manual for general microbiology .p.439-442.Harcourt Brace &Company.

Tedschi, G.G.; Bondi,A.; ;Paparelli,M. and Sprovieri,G.(1978). Electron microscopical evidance of evolution of *Corynebacterium* -like organismswithin human erythrocyte,Experientia, 34:458-460.

Walter, J.B.; Talbot, I.C.; Gardner, H.A.;Halloran,P.F. ;Zuckerman ,Mbrid,A.G.and Forbes,A. (1996).Walter & Israel & general pathology .7th ed. ,p.154-196.Churchill-Livingstone, New York.

Wary,D.(1982).Recurrent aphthus stomatitis & the L-form of *Streptococcus sanguis* principles, In: Cell wall- deficient Bacteria, Basic principles & Clinical Significance. Domingue,G.J. (ed.). p.361.Addison -Wesley Publishing Co. , Reading Mass.

Weibull,C. and Beckman,H. (1960). Growth of bacterial L- forms and bacterial protoplasts ,J.Bacterial.

Weinberger, H.J.; Madoff, S. and Dienes ,L.(1950). The properties of L-forms isolated from *Salmonella & the isolation of*

*L-forms from Shigella.*J.bacteriol.,59:765-775.
Wieckiewicz, J. (1979). Loss of virulance FROM *S. aureus* L-forms Variants in comparison with the parent strain.J.Hy.Epid. Microbiol.Immunity. Vol.2, 6th ed. P.2004. Edward Arnold,London.
Wittler, R.G.; Malizia,W.F.;Kramer,P.E.;Tuckett,J.D.;Prictchard,H.N. and Baker,H.J.(1960).Isolation of *Corynebacterium* and its transitional forms a case of sub acute bacterial endocarditis treated with antibiotics. J.Gen. Microbiol., 23:325-333.
Woody, H.B. ;Walker ,P.D.& Domingue,J.G.(1982).Genesis of the urinary oval body by intracellular lipid -adsorbing Cell Wall - Deficient Bacteria Basic Principles &Clinical Significance Domingue, G. (ED,) P.219-230. AddisonWesley pub..co.Reading Mass.
Wyric, P.B. & Rogers, H.J. (1973). Isolation & characterization of cell wall-defective variants of *Bacillus subtillis & Bacillus lichniformis* J.Bacteriol.,:116: 335-362.
Yamamoto,A.& Homma Y.(1978). L-forms of *Pseudomonas aeruginosa*. II Antibiotic sensitivity of L-forms & their parent form. Jpn.Exp. med. ,48: 335-362.
Yang, L.S. (1982). Gram colonization and bacteremia in the compromised host infection.10(5):310-323.
Zubkov, M.N. and Shchegolev ,A.G.(1976). Comparative characteristics ofantigenic peculiarities and several other properties of stable long-term culture of *Salmonella* L-forms .Zh. microbiology epidemiol. Immunobiol.,(3)38-42.

المصادر العربية:

1-الناصري ، قاسم نجم عبيد (2002) .دراسة بايولوجية جراثيم فاقدة الجدار لمرضى البيلة القيحية والبيلة الدموية المستديمة. رسالة دكتوراه، جامعة بابل - كلية العلوم.

2-السلطاني ، شيماء جاسم (2003). اثر المتخفيات البكتيرية في الحمى المعوية .رسالة ماجستير جامعة بابل - كلية العلوم.
3-موسى، عبد الجبار(1982) .الامراض التنفسية.الباب الثاني ، الفصل الرابع ص(44-47).
4-صالح، ضحى سعد(1991).علم الأحياء المجهرية،ج/ 5.فص- 17 ،ص 487.
5-الراوي، خاشع (1977). مدخل الى علم الإحصاء.

CRYPTIC BACTERIAL INFECTION
In Pneumonic patients

A thesis

Submitted to the college of science council
Babylon university
In a Partial Fulfillment Of The Requirements
Of
Master Degree In Biology / Microbiology.

By

Nadhom Azab Rubbat Al- sultany

June/2005

Summery

125 cryptic bacterial infection case was examined in attempt to isolate and identified Cell wall- Deficient Bacteria (**CWDB)** .51 proved to have a result of CWDB. And 74 were negative to CWDB regarded as a control.

TB was excluded by Z.N.stain for all the sputum sample examined. Sputum collected by standard methods, and examined 1st by Z.N stain those with negative Z.N stain examined by Leishman stain which will show the non- specific immune cellular response by the lymphocytes and neutrophils number to give us an idea about the cutness and severity of infection.

The stained slides show filtration a number of mononuclear cells. And about the site of causatives, it's found in 5 interpretative patterns with one were uninterpretative that mean we couldn't isolated or grown it upon the utilized media and in different techniques (9 cases were given no growth from the 51 cases). (The methods used include, serial culture technique, dilution technique and biphasic culture technique). Therefore, were difficult to define the site of infection by these techniques. CWDB discovered in the whole sputum, in the surface of pus cells and inside pus cells. It appears that the best technique is the dilution technique, and the precipitate exam of centrifuged sputum, according to Z –test results.

The CWDB Characterized by its flexibility, sequeezable and filterable with their colonies on variant agar being similar to fried eggs after staining by Deines stain.

CWDB of *S. pneumoniae* formed 35.29% (18/51) of total infections ,*P.aeruginosa* formed 23.52% (12/51) ,then followed by *K.pneumoniae and Proteus spp.*in 21.56%(11/51)and 1.96%(1/51) upon followings.

The study involved both sexes 58.82% (30 male) and 41.17% (21 of female), in the age range 8-81 years.

Highest infection rate occur at 41 years old and over in 34.37% (16/51) male and 15.68% (8/51) of female, then followed by (21-25) age fiction, in 5 cases of men (9.80%) and 3 cases (5.88%) of women. No infection case recorded in age of 36-40 years.

Sensitivity test of CWDB to antibiotics were investigated, and it proved that Amikacin was more effective in vitro (34/42) 80.95% and

(26/42) 6.90% for reverted bacteria. Followed by Nalidixic acid in a percentage of 78.57% for CWDB and 69.04% for reverted bacteria

Tetracycline is the 3rd in 66.6 % (28/42) for CWDB and 61.90%(26/42) for reverted bacteria.

Those bacteria show resistance to Ampicillin in 100% for CWDB and 69.04% (29/42) for reverted bacteria. Multiple antibiotic resistance was seen in (2-10) antibiotics according to bacterial species taken in this study.