

بايولوجية جراثيم فاقدة الجدار المشتركة مع خمج الحمى المعوية المتخفي في الانسان

رسالة مقدمة الى
مجلس كلية العلوم- جامعة بابل
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم
الحياة/ علم الاحياء المجهرية

من قبل الطالبة
شيماء جاسم محييد السلطاني

ايلول 2003م

رجب 1424هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

رَبَّنَا آتِنَا مِنْ لَدُنْكَ رَحْمَةً
وَهَيِّئْ لَنَا مِنْ أَمْرِنَا رَشَدًا

صدق الله العلي العظيم

سورة الكهف / 10

توصية الأستاذ المشرف

اشهد ان إعداد هذه الرسالة جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة/ الأحياء المجهرية.

التوقيع

اسم المشرف: د. قاسم نجم عبيد

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان: كلية طب الأسنان/ جامعة بابل

التاريخ:

توصية رئيس القسم

إشارة الى التوصية أعلاه التي قدمها الأستاذ المشرف أحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع

اسم رئيس القسم: د. فكريت مجيد حسن

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان: قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل

التاريخ:

قرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ 2003/12/3 ووجدنا أنها جديرة بالقبول بدرجة (جيد جدا) لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الأحياء المجهرية

عضو	رئيس اللجنة
التوقيع	التوقيع
الاسم : د. انتصار محمود جمعه الدوري	الاسم : د. ابراهيم محمد سعيد شناوة
المرتبة العلمية : استاذ مساعد	المرتبة العلمية : استاذ
العنوان: الكلية التقنية / جامعة بغداد	العنوان: كلية العلوم / جامعة بابل
التاريخ:	التاريخ:

المشرف	عضو
التوقيع	التوقيع
الاسم : د. قاسم نجم عبيد	الاسم: د. جميلة غضبان عودة
المرتبة العلمية : استاذ مساعد	المرتبة العلمية : استاذ مساعد
كلية طب الاسنان / جامعة بابل	العنوان: كلية طب الكندي / جامعة بغداد
التاريخ:	التاريخ:

مصادقة عميد كلية العلوم

اصادق على ما جاء في قرار اللجنة
التوقيع :
الاسم: د. عودة مزعل ياسر الزامل
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
العنوان: عميد كلية العلوم / جامعة بابل
التاريخ:

بسم الله الرحمن الرحيم

شكر وتقدير

أقدم بالشكر والتقدير الى أستاذي الفاضل الدكتور قاسم نجم عبيد لإشرافه على البحث ولآرائه القيمة في إتمام هذا البحث.
وعرفاناً بالجميل أقدم بالشكر الجزيل الى رئاسة جامعة بابل وعمادة كلية العلوم وقسم علوم الحياة لإتاحة الفرصة لإكمال دراستي.
و أقدم بالشكر والتقدير الى الاستاذ الدكتور ابراهيم محمد سعيد شناوة لآرائه القيمة وتوجيهاته السديدة والمستمرة خلال مدة البحث.
و اشكر أيضاً الدكتور عبد الهادي الخفاجي والدكتور علاء الصادق لدورهم المهم في تشخيص المرضى كما اشكر ايضاً كافة منتسبي مختبر مستشفى الحلة التعليمي.

ومن الله التوفيق

شيماء جاسم

الخلاصة

تهدف هذه الدراسة للتعرف على بايولوجية الجراثيم فاقدة الجدار المسببة للحمى المعوية المستديمة إذ شملت هذه الدراسة 268 مريضاً مصاباً بالانتان الدموي كان بينهم 68 مريضاً بالحمى المعوية المستديمة بلغ عدد الاناث 38 وبنسبة (55.8%) وعدد الذكور 30 وبنسبة (44.1%). كل عينة دم كانت تزرع بسبع منهجيات تتدرج ضمن ثلاث تقنيات: الزرع المتسلسل، التخفيف والمزرعة ثنائية الطور. طوعت هذه التقنيات لعزل البكتريا فاقدة الجدار المسببة للمرض التي يصعب عزلها باستعمال طريقة زرع الدم الروتينية (Blood Culture).

نتج عن هذه التقنيات عزل المسبب وكذلك معرفة موضعه إذ تبين أنه يقع في خمس هيآت مفسرة وسادسة غير مفسرة أي لم يتم عزل المسبب فيها وبذلك يصعب تحديد هويته أو موضعه.

وقد وجدت البكتريا فاقدة الجدار في واحد او اكثر من المواقع الآتية:

الدم الكامل، رائق الدم بعد التنبيد، سطح الخلايا الدموية، في داخل هذه الخلايا الدموية. وتبين بأن تقنية زراعة راشح الدم المخفف والمزرعة ثنائية الطور هي افضل طريقة لتشخيص المسبب للحمى المعوية المستديمة قياساً بالطرائق الاخرى كما بينتها نتائج احصاء Z ومؤشر الحساسية لهذه الطرائق.

ومن خلال الخصائص الزرعية والمظهرية للكائن المسبب للمرض امكن رسم مسار حياة المسبب المرضي المفترض الذي تمثل بوجود وحدات تكاثرية بدائية ممكنة التوالد (Elementary Reproductive Units) (ERUs) والتي تقع خارج الخلايا أو على سطوح الخلايا او في داخل الخلايا وعند توافر ظروف ملائمة لنموها فإنها تنمو خلال أي مرحلة من تقنيات الزرع المستعملة وامتازت فاقدات الجدار المعزولة بالمرونة وقابلية النفوذ خلال المرشحات الفائقة ذات ثقب بقطر $0.22 \mu m$.

عزلت بكتريا السالمونيلا فاقدة الجدار المسببة للحمى المعوية المستديمة من 56 عينة (82.3%) من ضمنها ثلاث حالات اصابة مشتركة للحمى المعوية مع حمى مالطا او المتوجة وبنسبة (4.4%).

B

توزعت نسبة بكتريا السالمونيلا فاقدة الجدار على بكتريا *Salmonella typhi* إذ عزلت من 49 عينة وبنسبة (72%) وبكتريا *Salmonella paratyphi B* عزلت من 5 عينات بنسبة (7.3%) وبكتريا *Salmonella paratyphi A* عزلت من عینتین وبنسبة (2.9%).

تراوحت اعمار المرضى بين (6-53) سنة اعلى نسبة اصابة سجلت لدى المرضى الذين تراوحت اعمارهم بين (16-20) سنة والبالغ عددهم 16 وكانت النسبة (23.5%) تلتها الفئة العمرية من (11-15) سنة والفئة العمرية (26-30) وكان عددهم 10 اشخاص وبنسبة (14.7%).

وتمت دراسة حساسية البكتريا فاقدة الجدار المعزولة من عينات دم المرضى بالحمى المعوية المستديمة تجاه المضادات الحيوية فوجد أنها تظهر حساسية عالية للمضاد الحيوي Ciprofloxacin وبنسبة (92.8%).

وجرى مقارنة نمط الحساسية للنوع نفسه من فاقدة الجدار وذات الجدار فوجد أنّ ذات الجدار تظهر مقاومة اكثر تجاه المضادات الحيوية لاسيما تجاه المضادات التي تؤثر في تصنيع البروتين والاحماض النووية قد يعود السبب في ذلك لوجود الجدار الخلوي الذي يساعد في حماية البكتريا من تأثير تلك المضادات الحيوية.

المحتويات

الصفحة	الموضوع	ت
III- I	الخلاصة بالعربية	
V- IV	المحتويات	
VI	قائمة الجداول	
VII	قائمة الاشكال والصور	
	قائمة المختصرات	
23-1	الفصل الاول- المقدمة	1
2-1	المقدمة	1.1
	اهداف الدراسة	2.1
	الفصل الثاني – استعراض المراجع	2
4-2	الحمى المعوية	1.2
5-4	الحمى المعوية المستديمة	1.2.2
7-5	اخماج الدم	2.2.2
9-7	مسالك خمج الدم	3.2.2
11-9	آلية حدوث المرض	4.2.2
12	تقنيات زرع عينات الدم	3.2
16-12	المسببات المشاركة لانتان الدم	4.2
	وبائية الحمى المعوية	5.2
18-17	دور البكتريا فاقدة الجدار للحمى المعوية المستديمة	6.2
20-18	الخصائص الزرعية لفاقة الجدار	7.2
21	الخصائص الكيموحيوية للبكتريا فاقدة الجدار	8.2
22-21	حساسية البكتريا فاقدة الجدار لمضادات الحيوية	9.2
41-24	الفصل الثالث- المواد وطرائق العمل	3
31-24	المواد	1.3
	الاجهزة والادوات	1.1.3
	الصبغات	2.1.3
	الكواشف والمحاليل	3.1.3
31	طرائق العمل	2.3
26	جمع عينات الدم	1.2.3
27	تطويع تقنيات الزرع للتحري عن المسببات المشاركة في الحمى المعوية المستديمة	2.2.3
30	التعرف والتشخيص	3.2.3
30	الاختبارات الكيموحيوية	3.3.2.3
35	اختبار الحساسية لمضادات الحيوية	4.2.3
37	التحليل الاحصائي	5.2.3
38	الفصل الرابع- النتائج والمناقشة	4
38	نتائج العزل والتشخيص	1.4
38	تطويع تقنيات مطورة للتحري عن المسببات المشاركة للحمى المعوية المستديمة	2.4
48	بايولوجية البكتريا فاقدة الجدار الخلوي	3.4
52	مسار حياة البكتريا فاقدة الجدار الخلوي المسببة للحمى المعوية المستديمة	4.4

54	طبيعة المسببات المشاركة للحمى المعوية المستديمة	5.4
54	الفئة العمرية والجنس والحمى المعوية المستديمة	6.4
55	مضادات الحيوية وبكتريا فاقدة الجدار المشاركة للحمى المعوية المستديمة	7.4
59	الاستنتاجات	
60	التوصيات	
61	المصادر	
	الخلاصة باللغة الانكليزية	

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
	الايواسط الزرعية	1.3
39	خصائص الاختبارات الكيموحيوية المتعلقة ببكتريا السالمونيلا	2.3
41	اقراص مضادات البكتيرية واقطار مناطق التثبيط ومديات المقاومة وتفسيراتها.	3.3
44	المجموعة I وهي موجبة الزرع في التقنيات الثلاث.	1.4
45	المجموعة II وهي سالبة لتقنية الزرع المتسلسل وموجبة لتقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية الطور.	2.4
46	المجموعة III وهي سالبة في المراحل الثلاث الاولى لتقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات.	3.4
47	المجموعة IV وهي سالبة للمرحلة الاولى من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات.	4.4
48	المجموعة V وهي موجبة لتقنيتي الزرع المتسلسل والتخفيف وسالبة بتقنية المزرعة ثنائية الطور.	5.4
49	المجموعة VI وهي سالبة الزرع في كل التقنيات.	6.4
53	جدوى تقنيات زرع الدم المطوعة المختلفة	7.4
53	جدوى استعمال طرائق الزرع المختلفة بالقياس مع زرع الدم الكامل بتطبيق اختبار احصاء Z.	8.4
54	مؤشر الحساسية لطرائق زرع الدم المستعملة.	9.4
56	خواص فاقدة الجدار المعزولة من مرضى الحمى المعوية المستديمة.	10.4
61	البكتريا فاقدة الجدار المسببة للحمى المعوية المستديمة.	11.4
	الفئة العمرية ونسبة الاصابة.	12.4
64	حساسية بكتريا السالمونيلا ذات الجدار وفاقدة الجدار للمضادات الحيوية.	13.4

قائمة الاشكال والصور

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
29	طريقة الزرع المتسلسل (تقنية I) والراشح المخفف (تقنية II) مع المزرعة ثنائية الطور (تقنية III)	1.3
50	الطراز المظهري لبكتريا السالمونيلا <i>S. typhi</i> فاقدة الجدار المأخوذة من وسط مرق الفاريننت بعمر 18 ساعة وهي بشكل تجمعات خلوية نتيجة فقدانها الجدار ومصبوغة بصبغة كرام بقوة تكبير $1600 \times$.	1.4
51	خلايا بكتريا السالمونيلا <i>S. typhi</i> فاقدة الجدار الخلوي المأخوذة من وسط الفاريننت الصلب مصبوغة بصبغة كرام وبقوة تكبير $1600 \times$.	2.4
53	مخطط العلاقات المحتملة ومسار حياة مفترض لبكتريا فاقدة الجدار المستحصلة من الحمى المعوية المستديمة.	3.4

قائمة المختصرات

Cell Wall Defective Bacteria :CWDB -1

Variant Agar :VA -2

Variant Broth :VB -3

MacConkey Agar :MA -4

Blood Agar :BA -5

Elementary Reproductive Units :ERUs -6

CHAPTER ONE الفصل الاول

المقدمة Introduction

1.1- المقدمة

تكون نتائج الفحوصات الميكروبية المخبرية بصورة عامة إما ايجابية وإما سلبية. والنتائج السلبية هي نتائج معبرة وحقيقية عندما تكون العينة المأخوذة ممثلة لحديثات المرض وعند استعمال تقنيات قياسية دقيقة للتعامل مع العينة لاجل معرفة المسبب وعندما تكون مدة الحضانة وظروفها ملائمة وكذلك عند توافر الخبرة الكافية لدى المسؤول عن الحكم التشخيصي الميكروبي.

وقد تكون النتيجة السلبية كاذبة او غير معبرة عن واقع الحال ويتأتى هذا عن واحد او اكثر من الامور الآتية الأوساط الزراعية او طريقة الزرع غير الملائمة، مدة الحضانة غير ملائمة، العينة غير ممثلة للحالة المرضية، عند وجود الجراثيم المخالطة والملوثة، وفي حالة عدم توافقت اخذ العينة مع الوقت الأفضل لاخذ العينة الذي يزامن أمراض وإمراضية المسبب.

وتسجل النتيجة سلباً او ايجاباً بشكل نسبي ظرفي ومحدد وليس بالمطلق وهذه السلبية ترتبط ارتباطاً جدياً مع الأزمان في الحالة المرضية ومن الاخماج التي تتصف بالأزمان والاستدامة هي الحمى المعوية المزمنة المتخفية (Cryptic Chronic Enteric Fever) في الانسان ولوحظ من نتائج الزرع لعينات الدم المأخوذة من المصابين بالحمى المعوية المستديمة نتائج سالبة الزرع وهذه النتيجة السالبة لا تعبر عن واقع الحال إذ إنّ الحداثيات الالتهابية متكونة ومتسببة عن عامل ممرض. لذا فإنّ هذه النتيجة السلبية ظرفية نسبية وغير معبرة لأسباب تتعلق بالمتطلب التغذوي للمسبب وعدم وجود عوامل مشجعة للنمو (Domingue & Woody, 1997).

ومن استعراض المراجع المهمة في هذا المجال عن الممرضات التي يصعب زرعها او غير قابلة للزرع تبين أن البكتريا الفاقدة للجدار قد تشترك مع الاخماج البشرية المستديمة وأنها تتموضع في الأنسجة بصورة متخفية (Cryptized) (Domingue, 1995; Domingue & Woody, 1997). وهذا التخفي يوفر لها الحماية من تأثير مضادات الحيوبيية المختارة

(Brooks et al, 1998).

2.1 اهداف الدراسة

- 1- تطويع تقنيات مطورة لزراع الدم باستعمال طريقة الزرع المتسلسل والتخفيف والمزرعة ثنائية الطور.
- 2- عزل البكتريا المتخفية وتحديدأ فاقدة الجدار لجراثيم الحمى المعوية.
- 3- رسم دورة الحياة المفترضة لبكتريا السالمونيلا فاقدة الجدار.
- 4- قياس نمط الحساسية لمضادات الحيوية لكل من الجراثيم فاقدة الجدار ولذات الجدار، والموازنة بينهما.

الفصل الثاني CHAPTER TWO

2 - استعراض المراجع Literatures Review

1.2 الحمى المعوية Enteric Fever

تعد الحمى المعوية من الامراض المهمة التي تحتل مكاناً بارزاً بين الامراض المعدية المستوطنة والشائعة الانتشار في البلدان النامية في حين تندر الاصابة بها في البلدان المتقدمة (Griffin et al, 1999). ومسبباتها هي بكتريا *Salmonella typhi* المسببة لحمى التيفوئيد (Typhoid Fever) وبكتريا *S. paratyphi A* و *S. Paratyphi B* و *S. Paratyphi C* المسببة لحمى الباراتيفوئيد (Paratyphoid Fever) (Singleton, 1997; Brooks et al, 1998).

تحصل الاصابة بالحمى المعوية عن طريق الماء والطعام الملوثين ببراز الاشخاص المصابين بالمرض او عن طريق الحيوانات المنزلية الليفة (الرجب والقزاز, 1984; Swaddiwudhipong & Kanlayanaphotporn, 2001). وقد تنتقل الاصابة عن طريق المسافرين العائدين الى بلدانهم، حيث لوحظ إن اغلب حالات حمى التيفوئيد المسجلة في المملكة المتحدة اكتسبت خلال الرحلات لشبه القارة الهندية (Felton & Bryceson, 1996).

ويعد الحاملون المزمنون (Chronic carriers) مصدراً من مصادر انتقال المرض المهمة إذ أصبح 2.5% من مرضى الحمى المعوية حاملين مزمنين نتيجة لبقاء البكتريا المسببة للمرض في مرارتهم حتى بعد الشفاء. وهذا ما حصل مع السيدة Mary Mallon التي اصبحت حاملة مزمنة للمرض وتسببت باصابة العديد من الاشخاص بمرض التيفوئيد الذي عرف بـ (Typhoid Mary) من خلال عملها كطباخة ومديرة منزل (Falkow, 1997). ويسجل سنوياً 16.000.000 حالة اصابة بالحمى المعوية في العالم ويحصل من ضمنها 600.000 حالة وفاة. أمّا في الولايات المتحدة الامريكية فيسجل سنوياً 400 حالة اصابة بالحمى المعوية واغلبها في الاشخاص ذوي الاعمار دون العشرين سنة (Prince, 2002).

وللوقاية من الاصابة بالحمى المعوية يجب اتباع قواعد النظافة اثناء تحضير الغذاء وحفظه بالمكان المناسب بعيداً عن القوارض والحشرات وكذلك طبخ الطعام بصورة جيدة للقضاء على البكتريا الممرضة و يجب منع المصابين والحاملين المزمنين من العمل في المطاعم

لكي لا يتسببوا في تفشي المرض (Brooks *et al*, 1998). ومن طرائق الوقاية المهمة هو اخذ لقاح متخصص بالعامل الممرض إذ تمكن العلماء حديثاً وبعد ابحاث مضمينة من تطوير لقاح حي وفعال ضد حمى التيفوئيد، يعطى بالفم وينتج عنه مناعة مكتسبة لا تقل مدتها عن ثلاث سنوات وبنسبة حماية تصل الى % 80 ويوصى بإعطائه للأشخاص المعرضين للعدوى في المناطق الموبوءة بالتيفوئيد (الشهابي، 1998).

1.2.2 الحمى المعوية المستديمة

هي احدى الاصابات الجرثومية المزمنة التي تمتاز بتكرار حدوث المرض. وهناك مظاهر عامة للالتهابات المزمنة مع احتمال وجود اختلافات بين انواع هذه الالتهابات فانها معتمدة جزئياً على انسجة المضيف وجزئياً على العامل المسبب وهذه المظاهر هي نوعاً من الالتهاب الحاد، التدمير او الالتهام، الشفاء- الاصلاح واعادة الانقسام، الاستجابة المناعية (Walter *et al*, 1996).

إنّ بقاء الكائن المجهري في المضيف يعتمد على درجة مقاومة المضيف له، ففي حالة وجود مقاومة عالية من قبل المضيف تجاه الكائن الممرض سيتمكن من القضاء عليه أما في حالة عدم قدرة الجهاز المناعي للمضيف من القضاء على الكائن الممرض. وعندها المسبب المرضي قد يتخفى في مواقع معينة من الجسم بعيداً عن تأثير الاجسام المضادة كما هو الحال في بكتريا السالمونيلا التي تستطيع البقاء داخل الخلايا البلعمية والخلايا احادية النواة بعيداً عن تأثير الجسم المضاد وبالتالي فإنّ الكائن الممرض سوف يستمر بالنمو والتكاثر داخل المضيف (Walter *et al*, 1996).

2.2.2 اخماج الدم

يعرف التواجد المؤقت للحياة المجهرية في المجرى الدموي بالتجرثم الدموي (Bacterimia) وقد يحدث بصورة عرضية مصاحباً لعملية خلع الاسنان او اثناء الاصابة ببعض الامراض كما هو الحال في الحمى المعوية والحمى المتموجة ومن دون اعراض مرضية ملحوظة. ويتم القضاء عليها من قبل خلايا الجهاز المناعي الموجودة في الجسم أما في حالة عدم قدرة الجهاز المناعي على القضاء على الاحياء المجهرية وتمكنها من غزو المجرى الدموي فعندئذ تعرف هذه الحالة بالانتان الدموي (Septicemia) إذ يصاحبها ظهور اعراض سريرية حادة. و إنّ الانتان الدموي يؤدي بدوره الى مضاعفات خطيرة في الجسم (Cheadle & Polk, 1997; Griffin *et al*, 1999). فقد يؤدي الانتان الدموي ببكتريا S.

typhi في بعض الاحيان الى الاصابة بالتهاب الاغشية القلبية الداخلية (Endocarditis) (Walter et al, 1996).

ويعد الانتان الدموي في النوبات الحادة من الامراض المزمنة مصدراً من المصادر الغنية بالبكتيريا فاقدة الجدار حيث تم عزل العديد من انواع البكتيريا فاقدة الجدار من حالات الانتان الدموي مثل *Actinomyces naeslundii*, *Corynebacterium*, *Brucella melitensis*

(Merline et al, 1971; Mattman, 1974; Louria et al, 1976). وبدراسة قام بها Labar تمكن من عزل ثلاثة اجناس من البكتيريا المعوية هي *Escherichia*, *Serratia*, *Salmonella* (Labar, 1977).

وقد عزلت بكتيريا *Streptobacillus moniliformis* الفاقدة للجدار من طفلين مصابين بالانتان الدموي المسبب تديم (Persistent septicemia) (Dolman, 1951). إذ رافق الانتان الدموي ببكتيريا فاقدة الجدار العديد من الامراض كمتلازمة لوفلر (Loeffler's syndrom) وامراض الخثرة التجلطية (Thromboembolic diseases) والتهاب الاغشية القلبية الداخلية (Endocarditis) والتهاب الرغامي المزمن (Wittler et al, 1960 Hill & Lewis, 1964; Altemeier et al, 1969; Nicolaidis et al, 1972; Yamamoto & Homma, 1979; Mattman & Judge, 1982).

وغالباً ما يحدث الانتان الدموي لدى مرضى الضعف المناعي (Immunocompromised patients) وذلك لوجود خلل في ميكانيكيات الدفاع عن الجسم تجاه البكتيريا المسببة للمرض. وقد يكون هذا الضعف المناعي إما ضعفاً مناعياً اولياً ناتج عن الاصابة بأحد الامراض الخلقية كأمرض العجز في المناعة الخلطية او الخلوية الولادي، وإما ضعفاً مناعياً ثانوياً يحصل نتيجة لفعاليات مختلف الامراض المزمنة والاصابات الحادة، أو من التأثير السلبي للعلاج الكيماوي والاشعاعي المستعمل لعلاج هذه الامراض المزمنة وقد يعود هذا الضعف المناعي الثانوي أيضاً لحالات طبيعية غير مرضية كعدم اكتمال ونضج الجهاز المناعي (Immaturity of immune system) عند الاطفال حديثي الولادة (Neonate) او نتيجة الشيخوخة المناعية في كبار السن (Elderly) او نتيجة الحمل عند النساء وذلك نتيجة للاختلال الهرموني (Gardner & Provine, 1975).

وقد لوحظ أنّ الاصابة بالانتان الدموي تزداد لدى الاشخاص الذين يعانون من سوء التغذية (Malnutrition) وفقر الدم الحاد (Acute anemia) ولاسيما الاطفال.

وكذلك يصاب مرضى السرطان (Cancer Patients) بالإنتان الدموي وذلك لأن مرض السرطان غالباً ما يكون مصحوباً بنقصان في عدد كريات الدم البيضاء الذي بدوره يؤدي الى حصول نقص في الاستجابة المناعية الخلطية والمتمثل بانخفاض مستوى الاضداد (Antibodies) والكلوبيولينات المناعية (Immunoglobulines) في مصل هؤلاء المرضى مما يمكن البكتريا الممرضة من غزو المجرى الدموي ومن ثم احداث المرض (Berkow et al, 1987).

3.2.2 مسالك خمج الدم

تصل الأحياء المجهرية الى المجرى الدموي عن طريق احدى الطرائق الثلاث الآتية (Walter et al, 1996):

1- الغزو المباشر للاوعية الدموية Direct invasion of blood vessels

ويحصل هذا نتيجة لوجود شقوق في الجلد او جروح تمكن الاحياء المجهرية من الدخول والوصول الى الدم مسببة التجرثم الدموي والانتان الدموي.

2- التهاب الاوردة السطحية المتقيح Suppurative thrombophlebitis

عند غزو الاحياء المجهرية للخرثرة (Thrombus) الناتجة عن الالتهاب ستقوم هذه الكائنات المجهرية بتفتيت الخثرة الى اجزاء صغيرة لتنتشر في الدم محدثة حالة تقيح الدم (Pyæmia) الذي سينتقل بعد ذلك لباقي اعضاء الجسم مما يؤدي الى الاصابة بالعديد من الحالات المرضية.

3- الانتشار عن طريق الجهاز اللمفاوي Spread from the lymphatic system

تنتقل الاحياء المجهرية الممرضة الداخلة للجسم من العقد اللمفية الى الاقنية اللمفية الرئيسية لتصل الى المجرى الدموي محدثة التجرثم الدموي ثم تنتقل البكتريا المحمولة بالدم الى بقية اعضاء الجسم المختلفة مسببة حدوث المرض وغالباً ما تنتقل بكتريا *S. typhi* عبر هذا المسلك مسببة مرض التيفويد.

ومن الأسباب التي تمكن البكتيريا الممرضة من الانتقال من المسلك اللمفي والوصول الى المجرى الدموي هي:

- 1- عندما يكون معدل جريان سائل اللمف عالياً وهذا يحصل اثناء التهابات الانسجة او اثناء تمارين العضلات لذا ففي حالة وجود التهاب او جرح في موقع معين من الجسم يجب الاقلال من حركة هذا الموقع وذلك لزيادة نسبة الترشيح (Filtration) لسائل اللمف في العقد اللمفية.
- 2- عندما يكون تركيز البكتيريا عالياً إذ إنّ كفاءة عملية الترشيح لسائل اللمف والعقد اللمفية تكون جيدة في بداية الاصابة البكتيرية ولكن في المراحل المتأخرة من الاصابة تصبح عملية الترشيح غير كفوءة وذلك نتيجة لزيادة اعداد البكتيريا الواصلة للعقد اللمفية وتعود الزيادة في عدد البكتيريا الى تمكنها من التكاثر في موقع الاصابة و إنّ الاجسام المضادة تصل متأخرة الى البكتيريا فلا تؤثر عليها لان البكتيريا تكون قد التهمت من قبل الخلايا البلعمية (Phagocytic cells) الموجودة في العقد اللمفية.
- 3- عندما لا تتمكن الخلايا البلعمية (Phagocytic cells) الموجودة في العقد اللمفية من هضم الكائن المجهرى المسبب للمرض مما يسبب عدم كفاءة الترشيح في العقد اللمفية (Mims, 1982).

4.2.2 آلية حدوث المرض Pathogenesis

يحدث المرض نتيجة لدخول البكتيريا الممرضة عن طريق الفم الى الاغشية المخاطية في الامعاء الدقيقة فتبدأ مقاومة الجسم لها وذلك بالتهامها من قبل الخلايا البلعمية الموضوعية التي تتضاعف داخلها عصيات البكتيريا الممرضة لتنتقل معها الى لطخ باير (Payer's patches) لتمر من خلال العقد اللمفية والمساريقية الى المجرى الدموي عبر القناة الصدرية محدثة تجرثم دموي مؤقت (Transient bacterimia) ثم تنتقل البكتيريا المرضية الى الكبد والطحال ونخاع العظم وكيس الصفراء (Khosla, 1977; Thomas, 1983; Walter et al, 1996). وفي نهاية مدة الحضانة البالغة 10-14 يوماً سوف تظهر المرحلة الحادة من المرض نتيجة لانتشار البكتيريا داخل اعضاء الجسم وفي المجرى الدموي وتظهر اعراض المرض من ارتفاع درجة الحرارة، وقلة النبض، وصداع، ونحول عام، في الجسم مع ظهور بقع وردية اللون على جسم المصاب فضلاً عن حصول انتان دموي في

الاسبوع الاول من المرض (Wilson & Miles, 1975; Pearson & Guerrant, 1995)

ويتحرى عن الانتان الدموي بزرع الدم في هذه المرحلة (Cheesbrough & Rigby, 1989). ثم تعود البكتريا الى الامعاء الدقيقة مرة اخرى عن طريق كيس الصفراء. ويؤدي استمرار المرض لأسبوعين او ثلاثة اسابيع الى حدوث مضاعفات كتقرح وتخرخ لطح باير فضلاً عن حدوث امراض اخرى كذات الرئة (Pneumonia) والتهاب عضلة القلب (Myocarditis) والتهاب المرارة (Cholecystitis) والتهاب المفاصل (Arthritis) والتهاب نقي العظم (Osteomyelitis) والتهاب المفاصل والعظام (Joints & Bones infection) ولاسيما للاطفال المصابين بامراض الخلايا المنجلية (Mann *et al*, Sickle cell diseases) (1995). وقد يعاني المريض من فقر الدم ووجود مستويات مرتفعة من Transaminases وكذلك نقصان كريات الدم البيض (Leucopenia) في اكثر من نصف المرضى ومستوى واطى في الخلايا الحمضة (Eosinophils)، أما الشائع في الاطفال فهو الاسهال وزيادة كريات الدم البيض (Leucocytosis) (Felton and Bryceson, 1996).

وقد يؤدي استمرار المرض ومن دون مداخله علاجية الى التهاب الورك العجزي (Sacroiliitis) (Alsoub, 1997; Arya, 1998). وفي حالات نادرة تؤدي الحمى المعوية الى التهاب البنكرياس (Pancreatitis). وقد تكون بإحدى المسببين احدهما ناتجة عن الاصابة ببكتريا *S. typhi* والحالة الاخرى ناتجة عن الاصابة ببكتريا *S. paratyphi A* (Kadappu *et al*, 2002). وقد تؤدي الحمى المعوية ومن دون مداخله علاجية الى الاصابة بالتهاب الغدة الدرقية (Thyroiditis) (Jasmi *et al*, 1998) وتقيح الكبد (Liver abscess) (Ciraj *et al*, 2001; Rogers & Wadula, 2001).

وقد يصاحب حمى التيفوئيد ظهور اعراض لا نمطية مختلفة عن الاعراض المرضية المعروفة. وفي دراسة اجريت على مرضى التايفوئيد في مستشفى في جنوب الهند وعلى مدى سبع سنوات اتضح الى ظهور اعراض لا نمطية غير الاعراض المعروفة للتيفوئيد تمثلت بوجود حرقه في البول واسهال واضطراب الدماغ وتضخم الكبد والتهاب الرئة وتثبيط نخاع العظم في الاسبوع الاول من المرض وقد بين أنّ ظهور هذه الاعراض لا يعني بالضرورة سوء حالة المريض (Dutta *et al*, 2001).

أما امراضية حمى الباراتفوئيد فإنها تمتاز بأنها اقل شدة مما عليه الحال في حمى التيفوئيد وأنّ مدة حضانتها اقصر (MacSween & Whaley, 1992; Griffin *et al*, 1999). وقد تشترك آلية حدوث

مرض الحمى المعوية مع امراض لمسببات اخرى مما يسبب صعوبة في تشخيص المرض في بادئ الامر. فقد يحدث مرافقاً لمرض عجز الكبد الحاد الناتج عن الاصابة بفايروس الكبد E (Pandey *et al*, 2002)، او مصاحباً لتقيح اللوزتين الناتج عن بكتريا *Staphylococcus aureus* المقاومة للمثيسيلين (Gouthaman *et al*, 2001).

3.2 تقنيات زرع عينات الدم

تستعمل عادة طريقة زرع الدم (Blood culture) عند تشخيص الاصابة بالحمى المعوية (Enteric fever) (Brooks *et al*, 1998).
أما في هذه الدراسة فقد جرى تطوير تقنية الزرع المتسلسل وتقنية التخفيف وتقنية المزرعة ثنائية الطور لعزل البكتريا فاقدة الجدار (الناصري، 2002).

4.2 الجراثيم المسببة لانتان الدم

1- بكتريا السالمونيلا *Salmonella*

وتشمل الانواع الآتية *S.typhi* المسببة لحمى التيفوئيد و *S.paratyphi A* و *S.paratyphi B* المسببة لحمى الباراتفوئيد (Jawetz *et al*, 1987).

وتمتاز هذه البكتريا بكونها تنتمي لعائلة البكتريا المعوية *Enterobacteriaceae* وهي عصيات مختلفة الطول سالبة لصبغة غرام غير مكونة للابواغ (non-sporeforming) متحركة باسواط محيطية (peritrichous flagella) تنمو على الاوساط البسيطة وتنتج *S.typhi* غاز H_2S في حين لا تنتج بكتريا *S. paratyphi A*. و إن هذه الأنواع مقاومة لبعض المواد الكيميائية مثل (Brilliant green ، Sodium deoxycholate ، Sodium tetrathionate) المثبطة للاجناس البكتيرية المعوية الاخرى لذا تستعمل هذه المواد الكيميائية في الاوساط الزرعية المستعملة لعزل بكتريا السالمونيلا من البراز (الشبيب، 1989).

وفيما يخص تركيبها المستضدي فهي تملك المستضد الجسمي O والمستضد السوطي H وهو بطورين في بكتريا *S. paratyphi B* و بطور واحد في بكتريا *S. typhi* وبكتريا *S. paratyphi A* كما تمتلك مستضد المحفظة K الذي يدعى بمستضد الضراوة Vi (Collins & Vollum *et al*, 1970; Cruickshank *et al*, 1973; Lyne, 1989; Holt *et al*, 1994).

2- بكتريا البروسيلا *Brucella*

وتضم الانواع *B. melitensis* و *B. suis* و *B. abortus* المسببة لداء البروسيلات في الانسان (Brucellosis) الذي يشمل الحمى المتموجة (Undulant fever)، وحمى مالطا (Malta fever)، والذي ينتقل عن طريق الحيوانات المصابة ببكتريا البروسيلا وتتصف البكتريا بكونها سالبة لصبغة كرام، كروية الى عصوية الشكل، هوائية، غير مكونة للابواغ، مكونة للمحفظة، غير متحركة لا تنمو على الاوساط الاعتيادية وتحتاج متطلبات خاصة لنموها كما تحتاج بكتريا *B. abortus* الى CO_2 بنسبة (5-10)% وتمتاز بطول مدة الحضانة التي قد تستمر الى ثلاثة اسابيع (Prescott et al, 1990; Yousif & Aladin, 1998).

3- انواع بكتيرية اخرى

اضافة لما ورد اعلاه من مسببات مشتركة مع الانتان الدموي وجدت مسببات مشتركة اخرى وينسب اقل للحدوث مثل *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Neisseria spp.* (Gardner & Provine 1975; Young, 1982; Brooks et al 1998).

5.2 وبائية الحمى المعوية

تعد الحمى المعوية من الامراض الوبائية الانتقالية بين المجتمعات البشرية في بقاع المعمورة من هذا العالم ويعتبر العراق من الاقطار التي تصنف من المناطق المتوطنة بالنسبة للحمى المعوية السالمونيلية وهناك دراسات في العراق تؤكد هذا المفهوم (الوردي والعبيدي، 1980؛ الجبوري، 1999؛ الوزني، 2001).

وقد طورت طرق كثيرة حديثة في تشخيص الحمى المعوية مثل استخدام الوراثة الجزيئية للبكتريا كتقنية تضاعف الدنا المتسلسل PCR وتقنية كلونة جين السالمونيلات كوسيلة للقاح مانع للمرض او ما يعرف بلقاح الدنا (Brooks et al, 1998).

6.2 دور البكتريا فاقدة الجدار في الحمى المعوية المستديمة

تعد البكتريا فاقدة الجدار ذات دور في العديد من الاصابات التي تحدث للانسان ولاسيما الاصابات المتكررة المزمنة (Recurrent chronic) ومن هذه الامراض هي الحمى المعوية (Charache, 1968; Schegolev, 1970; Clasener, 1972).

تمتاز البكتريا فاقدة الجدار بكونها تؤدي الى حدوث اصابات مزمنة وذلك لانها تتخفى في مواقع محمية من الجسم و إنّ الاصابات التي تحدثها تمتاز بكونها ساكنة وتحفز بوساطة التغيرات المناعية والكيموحيوية في المضيف (Domingue, 1980).

ومما يسهل دخول البكتريا وإحداث المرض وجود خلل في ميكانيكيات الدفاع عن الجسم مما يمكن البكتريا من الدخول وصولاً الى الانسجة وهناك قد تفقد البكتريا جدارها كلياً او جزئياً ومن دون هذه الاغشية الخلوية المولدة للمناعة فإنّ البكتريا فاقدة الجدار تستطيع تجنب تميزها من قبل الجهاز المناعي للمضيف لتدخل وتتكاثر داخل خلايا المضيف. و تمتاز البكتريا فاقدة الجدار بأنّ لها قدرة على احداث المرض كما هو الحال في الخلايا الاصل أي ذات الجدار مادامت تملك القدرة على التكاثر و انتاج الانزيمات الحالة والذيفانات. و إنّ البكتريا فاقدة الجدار قد تترتد الى بكتريا ذات جدار داخل خلايا المضيف

(Dansinger & Suter, 1962 ; Domingue *et al*, 1979; Domingue *et al*, 1997).

تمتاز البكتريا فاقدة الجدار بأنّ من الصعوبة اثبات دورها في إحداث المرض بحسب فرضيات كوخ لكونها متطفلة متخفية وشكلها الخارجي متغير وغير متنبأ بنموها في الزجاج (*in vitro*) ودورة حياتها معقدة، حيث تمتاز بصعوبة عزلها وتشخيصها وعدم امكانية رجوعها الى البكتريا الطبيعية في الوسط الزراعي وهذا ما يعقد عملية تصنيف هذه البكتريا (Domingue, 1982)

وتمتاز هذه البكتريا بصعوبة عزلها باستعمال الطرائق الروتينية في الزرع إذ قد يبدو دم الاشخاص المرضى عقيماً عند زرعه بتلك الطرائق ولكن يمكن ان يظهر النمو واضحاً عند استعمال الاوساط الزراعية المناسبة لعزل هذا النوع من البكتريا فقد تمكن Domingue & Schlegel من عزل البكتريا فاقدة الجدار بعد زراعة راسح الدم المتحلل على اوساط زرع خاصة بالبكتريا فاقدة الجدار (Domingue & Schlegel, 1977; Domingue & Schlegel, 1978).

إنّ امكانية رجوع البكتريا فاقدة الجدار الى البكتريا الطبيعية أي ذات الجدار درست باهتمام إذ قام الناصري (2002) باجراء تجربة اثبت خلالها امكانية تحول اشكال L الثابتة في الزجاج الى بكتريا حاوية على الجدار وذلك بعد حقنها في الحيوان المختبري. وقد تكون البكتريا فاقدة الجدار في بعض الاحيان غير قادرة على الرجوع الى البكتريا ذات الجدار (Prescott *et al*, 1990).

وعلاوة على ذلك من توافر الكثير من المعلومات عن استجابة الانسجة الحية لغزو البكتريا الكلاسيكية فإنّ القليل من المعلومات متوافرة بخصوص استجابة خلايا الانسجة الحية للبكتريا فاقدة الجدار (Domingue, 1982).

7.2 الخصائص الزرعية لفاقة الجدار

تتمكن البكتريا فاقدة الجدار من النمو على اوساط الاكار شبه الصلب والجيلاتين والاوساط السائلة والمعقدة مثل وسط نقيع القلب- الدماغ ووسط خلاصة الخميرة-البيتون وبنجاح، وتنمو ايضاً على الاوساط الكيميائية المصنعة او شبه المصنعة الحاوية على احماض امينية وسكر الكلوكوز (Patterson & Gilpin, 1982).

فعد نمو البكتريا فاقدة الجدار على الاوساط الصلبة يلاحظ أنّ مستعمراتها ذات شكل يشبه البيض المقلي ("fried-egg" colony) وذات محيط خارجي شبيه بالشريط الزيتي (Lacy periphery) يحيط بمركز المستعمرة المتكون من حبيبات متماسكة (Embedded granules) وتملك المايكوبلازما (Mycoplasma) نفس الصفة ومن الجدير بالذكر أنّ البكتريا فاقدة الجدار تتشابه مع المايكوبلازما في صفات اخرى كقابليتها على المرور من خلال المرشحات الدقيقة ذات ثقوب بقطر $(0.22 \mu m)$ وبظاهرة تعدد الاشكال (Polymorphic) وتتكونها من الاجسام الابتدائية (Elementary bodies) بحجم $(0.3 - 0.1)$ مايكرون والاجسام الكبيرة (Large bodies) بحجم $(5 - 50)$ مايكرون (Domingue, 1982).

تختلف المايكوبلازما عن فاقدة الجدار بكونها لا تمتلك اصلاً جدار خلوي في حين ان البكتريا فاقدة الجدار كانت بدءاً تمتلك جداراً خلوياً ولكنها فقدت ذلك الجدار لعدد من الاسباب إمّا بسبب التحلل المائي او بسبب الانزيم الحال (Lysozyme) وإمّا بسبب ايقاف تصنيع طبقة الببتيدوكلايكان باحد المضادات الحيوية كالبنسلين او قد يكون السبب التراكيز العالية لاحماض امينية معينة مثل (Phenylalanine , Glycine , Methionine) وبعض الاملاح غير العضوية كالزئبق والليثيوم والكاديوم وهي مواد مطلوبة في بناء الجدار الخلوي وموازنة النمو ولكن بدرجة محدودة إمّا التراكيز العالية لها فإنها تحث على تكوين اشكال L وفي حالات قليلة تنتج اشكال L تلقائياً ومن دون وجود عوامل حادثة وهذه الحقيقة لوحظت في البكتريا التي تمتلك انظمة انزيمية للتحلل الذاتي (Autolysis) فعالة جداً كما في بعض الاجناس مثل *Neisseria*, *Streptobacillus*, *Streptococcus* (Clasener, 1972; Lawson, 1982).

و تمتاز البكتريا فاقدة الجدار بتكوينها للغشاء الحيائي (Biofilm) (Hibma et al., 1996).

في عملية الزرع الثانوي يتم قطع قالب صغير من طبق الاكار الحاوي على مستعمرة واحدة او اكثر من البكتريا فاقدة الجدار باستعمال شفرة معقمة للكحول الايثيلي %70 ثم يقب المقطع على سطح طبق جديد من الاكار الطري ويضغط بهدوء. أما بالنسبة لنموها في الاوساط السائلة فينصح برج المزارع بهدوء وذلك بسبب نزعتها للبقاء بشكل تجمعات او سلاسل طويلة ويتابع النمو باستعمال الكثافة الضوئية (Optical density) والتعداد الحي (Viable counts). والكثافة الضوئية هي الطريقة المعول بها لمتابعة نمو فاقدة الجدار في مزرعة الوجبة السائلة (Liquid batch culture) وخلال الطور اللوغارتمي فقط. حيث تستطيع البكتريا فاقدة الجدار من النمو في المزارع المستمرة (Continuous culture). ويمكن تنميتها في المزارع الخلوية لخلايا اللبائن ومثال ذلك ادخال المسبقيات المعوية *Streptococcus faecalis* في مزرعة خلايا الكلى لجنين الانسان ومن ثم امرار الزرع الثانوي على مزارع جديدة خلال فترة (1-2) شهر يلاحظ بعدها وجود البكتريا فاقدة الجدار وعند دراسة هذه البكتريا وجد انها قد تكون اجسام غير قابلة للزرع في الزجاج وهذه الاجسام يمكنها التحول الى شكل ذي جدار من نفس البكتريا بعد استدامتها في خلايا المزارع النسيجية ومن ملاحظات الفحص المجهرى الالكتروني ثبت تواجد هذه البكتريا داخل الخلايا (Patterson&Gilpin,1982).

8.2 الخصائص الكيموحيوية للبكتريا فاقدة الجدار

لوحظ أن الخواص الكيموحيوية لبكتريا فاقدة الجدار هي نفس الخواص للبكتريا ذات الجدار ولكن ظهور النتائج يكون بصورة متأخرة وأقل وضوحاً وقد يحدث تغيير بسيط فقط في بعض الانزيمات إذ تفقد هذه الانزيمات عند فقد الجدار. حيث يتم تلقیح الأوساط السائلة في الفحوصات الكيموحيوية بطريقة قالب الاكار الحاوي على النمو (Mattman, 1993).

9.2 حساسية البكتريا فاقدة الجدار لمضادات الحيوية

اشارت بعض الدراسات الى وجود فرق بين البكتريا فاقدة الجدار والبكتريا ذات الجدار وذلك فيما يتعلق بحساسيتها تجاه مضادات الحيوية ويعد هذا من الضروريات الواجب مراعاتها عند علاج الاصابات المتكررة او المزمنة (Slomska, 1982).

تمتاز البكتريا فاقدة الجدار بعدم حساسيتها لمضادات الحيوية من مجموعة (β -lactam) التي تثبط عملية تصنيع الجدار الخلوي (Hewitt *et al*, 1968; Hubert *et al*, 1972; Kagan, 1972; Slomska & Roux, 1977; Yamamoto & Homma, 1979; Wieckiewicz, 1978). في حين تكون حساسية البكتريا فاقدة الجدار اكثر من البكتريا ذات الجدار تجاه مضادات الحيوية التي تثبط عملية تصنيع البروتين (Carleton & Phair, 1972) وكذلك الحال بالنسبة للمضادات الحيوية التي تثبط تصنيع الاحماض النووية RNA و DNA حيث يكون تأثيرها في البكتريا فاقدة الجدار اكبر من تأثيرها في البكتريا ذات الجدار لنفس النوع (Slomska, 1982).

CHAPTER THREE الفصل الثالث

3 - المواد وطرائق العمل Materials & Methods

1.3 - المواد

1.1.3- الاجهزة والأدوات Equipments and Tools

المصدر	اسم الجهاز	ت
Gallen Kamp, England.	فرن حراري	-1
Olympus, Japan	مجهر ضوئي مركب	-2
Hermle Z 230	جهاز طرد مركزي	-3
Gallen Kamp, England	حاضنة	-4
Sartorius, U. K	ميزان	-5
Memmert, Germany	حمام مائي	-6
Kar Kolb, Germany	الموصدة	-7
Ishtar, Iraq	الثلاجة	-8
Germany	أنابيب طرد مركزي	-9
AFMA- Dispo.	أنابيب بلاستيكية معقمة	-10
Sterilin, England	أطباق بتري بلاستيكية معقمة	-11
Whatman 0.22 μ m Whatman, 0.45 μ m	أوراق ترشيح	-12
Meheco, China	شرايح واغطية زجاجية نظيفة	-13
Philips, Holand	جهاز قياس الأس الهيدروجيني	-14
Volac, U.K	ماصات زجاجية مختلفة الأحجام	-15
Tibset, Turkey	سرنجات معقمة مختلفة الأحجام	-16

2.1.3 - الصبغات Stains

1.2.1.3 - صبغة كرام Gram's stain

حضرت هذه الصبغة كما ورد في (Buxton and Fraser, 1977) من المواد الآتية:

- صبغة Crystal Violet:

حضرت بإذابة 0.5 غرام من الصبغة في 100 مل من الماء المقطر.

- محلول اليود:

حضر باذابة 1 غرام من اليود و 2 غرام من يوديد البوتاسيوم في 300 مل من الماء المقطر.

- كحول مطلق **Absolute Alcohol** : ويستعمل لقصر الصبغة الاولى.
- صبغة السفرانين:

حضرت باذابة 0.5 غرام من الصبغة في 100 مل ماء مقطر.

استعملت هذه الصبغة لتصبغ عزلات البكتريا لغرض التفريق بين البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام ودراسة الخصائص المجهرية.

2.2.1.3 صبغة دينز Diene's stain

حضرت كما ورد في (Domingue, 1982)

واستعملت لفحص البكتريا فاقدة الجدار وتتكون الصبغة من المواد الآتية:-

0.5 gm	Methylene blue
1.25 gm	Azure II
10 gm	Maltose
0.25 gm	Na ₂ CO ₃
0.20 gm	Benzoic Acid
100 ml	Distal Water

وعملت الصبغة قبل الاستعمال بوساطة الترشيح باستعمال مرشحات ذات ثقوب بقطر $0.22 \mu m$. وهناك تقنيتان لاستعمال صبغة دينز.

1.2.2.1.3- تقنية غطاء الشريحة Coverslip technique

1- تم اخذ غطاء شريحة زجاجي نظيف ووضع على سطح الوسط الصلب الحاوي على

المستعمرات البكتيرية فاقدة الجدار وضغط للاسفل بقوة بوساطة ملقط معقم وذلك لكي

تلتصق المستعمرات البكتيرية بغطاء الشريحة.

2- بعد ذلك نقل غطاء الشريحة بوساطة الملقط ووضع على سلايد زجاجي نظيف (Smear)

slide up

3- ثبت غطاء الشريحة على السلايد بقطرات مائية عند الزوايا.

4- ثبتت المسحة على السلايد بوضع قطرات من كحول الميثانول على غطاء الشريحة ثم جفف

بالهواء.

5- اضيفت صبغة دينز وتركت لمدة ثلاث دقائق.

6- ثم غسل السلايد بوضعه بلطف في حمام مائي بارد جداً تجنباً لازاحة غطاء الشريحة عن السلايد.

7- جفف السلايد في الهواء ثم فحص.

2.2.2.1.3 - تقنية قالب الاكار Agar block technique

1- بطريقة معقمة تم اخذ مقطع من وسط الاكار الحاوي على المستعمرات البكتيرية بواسطة شفرة معقمة ووضع على سلايد زجاجي نظيف وترك لمدة دقيقتين ليحفظ وتلتصق المستعمرات البكتيرية على السلايد.

2- فحص السلايد على القوة الصغرى للتأكد من وجود المستعمرات المطلوبة.

3- اضيفت (2-3) قطرة من صبغ دينز على قالب الاكار ثم غسل فوراً بالماء البارد.

4- فحص السلايد على القوة الصغرى لملاحظة الموقع الذي تمت ملاحظته قبل الصبغ.

3.1.3 - الكواشف والمحاليل

1.3.1.3 - كاشف احمر المثيل Methyl red reagent

حضر الكاشف بإذابة 0.1 غرام من صبغة احمر المثيل في 300 مل من الكحول الايثيلي Ethanol بتركيز 95% ثم اكمل الحجم الى 500 مل باضافة الماء المقطر (Stukas, 1997).

2.3.1.3 - كاشف الفانفتول وهيدروكسيد البوتاسيوم

- naphthol & KOH reagent^α

أ- الفانفتول: حضر بإذابة 5 غرام من مسحوق الفانفتول في 100 مل من الكحول المطلق

Absolute ethanol

ب- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH):

حضر بإذابة 40 غرام من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100 مل ماء

مقطر (Macfaddin, 2000).

3.3.1.3 - كاشف كوفاكس Kovac's reagent

حضر بإذابة 10 غرام من P- Dimethyl- aminobenzaldehyde في 150 مل

كحول اميلي (Isoamyle Alcohol) ثم اضيف 50 مل من حامض HCl المركز

بيطء (Cruickshank et al, 1975).

4.3.1.3 - كاشف الانزيم المؤكسد Oxidase Reagent

حضر بإذابة 1 غرام من Tetramethyl- p-phenylene diamine dihydrochloride في 100 مل ماء مقطر وحضر الكاشف قبل اجراء الفحص مباشرة خوفاً من تأكسده (Cruickshank *et al*, 1975).

5.3.1.3 - محلول بيروكسيد الهيدروجين (H₂O₂)

حضر بتركيز 3% كما ورد في (Stukus, 1997).

6.3.1.3 - المحلول الملحي الطبيعي Normal Saline

حضر بتركيز 0.85% وذلك بإذابة 0.85 غم من مادة كلوريد الصوديوم NaCl في 100 مل ماء مقطر ثم عقم بالموصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1.5 بار لمدة 15 دقيقة (Wisteriech and Lechtman, 1980).

جدول 1.3 - الأوساط الزرعية Culture Media

ت	اسم الوسط	الشركة المنتجة/ المصدر	موجز طرق التحضير	الاستعمال
1.	وسط نقيع القلب- الدماغ السائل Brain Heart Infusion Broth	Oxoid	حضر بإذابة 37 غم من الوسط في لتر ماء مقطر معقم ثم عقم بالموصدة.	استعمل هذا الوسط لغرض زرع الدم (Blood culture) وفي تحضير الأوساط الزرعية الخاصة.
2.	وسط الماكونكي الصلب MacConkey Agar	Mast	حضر بإذابة 50 غم من الوسط في لتر ماء مقطر ثم عقم بالموصدة	ويستعمل هذا الوسط للتفريق بين البكتريا المخمرة للاكتوز وغير المخمرة للاكتوز.
3.	وسط اكار الدم الصلب Blood Agar	Mast	حضر بإذابة 37.5 غم من وسط غراء الدم الاساس في لتر ماء مقطر ثم عقم بالموصدة وبرد لدرجة حرارة 45 مْ ثم اضيف له 5% من دم الانسان.	وسط اغناء
4.	وسط سترات سيمون الصلب Simmon's Citrate Agar	Oxoid	حضر بإذابة 22 غم من الوسط في لتر ماء مقطر ثم عقم بالموصدة.	استعمل هذا الوسط لمعرفة قدرة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون.
5.	وسط كلكر والحديد الصلب Kligler's Iron Agar	Oxoid	حضر بإذابة 55 غم من الوسط في لتر ماء مقطر ثم عقم بالموصدة.	استعمل هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على تخمير السكريات ونتاج غاز H ₂ S.

استعمل لغرض الكشف عن التحلل الكلي والجزئي لسكر الكلوكوز.	حضر باذابة 7 غم بيتون و 5 غم كلوكوز و 5 غم فوسفات البوتاسيوم الثنائية K_2HPO_4 في لتر ماء مقطر ووزع في انابيب اختبار زجاجية و عقم بالموصدة.	(Macfaddin, 2000)	وسط احمر المثل - فوكس بروسكور Methyl red- Vogus Proskaur	.6
استعمل لغرض الكشف عن انتاج جذر الاندول	حضر من 10 غم بيتون و 5 غم كلوريد الصوديوم NaCl في لتر ماء مقطر ثم وزع في أنابيب زجاجية و عقم بالموصدة.	(Macfaddin, 2000)	وسط ماء البيتون Peptone Water	.7
استعمل لغرض معرفة قدرة البكتريا على الحركة	حضر باذابة 10 غم تريبتوز و 5 غم كلوريد الصوديوم و 5 غم اكار في لتر ماء مقطر ثم عقم بالموصدة.	Difco	وسط الحركة Motility Medium	.8
استعمل للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم اليوريز urease .	حضر باضافة 5 مل من محلول 40% يوريا معقمة الى وسط urea agar base ثم وزع في انابيب و عقم بالموصدة و ترك ليتصلب بشكل مائل.	Oxoid	وسط اليوريا الصلب Urea Agar	.9
يستعمل للكشف عن قدرة البكتريا على نزع مجموعة الكربوكسيل من الاحماض الامينية.	حضر من 5 غم بيتون و 3 غم خلاصة خميرة و 1 غم كلوكوز و 5 غم لايسين و 0.02 غم من صبغة (Bromo cresol purple) في 1000 مل ماء مقطر وضبط الأس الهيدروجيني pH الى 6.8 ووزع في أنابيب و عقم بالموصدة.	(Macfaddin, 2000)	وسط نزع مجموعة الكربوكسيل من الاحماض الامينية	.10
استعمل هذا الوسط لمعرفة قدرة البكتريا على تخمير السكريات و انتاج الحامض والغاز منها	حضر من 10 غم بيتون و 1 غم خلاصة اللحم Beef extract و 5 غم NaCl و 0.018 غم من دليل الفينول الأحمر في 1000 مل ماء مقطر وضبط الأس الهيدروجيني الى 7.4 ثم وزع بانابيب اختبار و اضيف لكل انبوبة اختبار انبوب درهم للتحري عن وجود الغاز و عقت بالموصدة. ثم حضرت محاليل السكريات بتركيز 1% لكل من (سكروز، مالتوز، كلوكوز، لاكتوز، زايلوز، مانيتول) و عقت بالترشيح ووزعت على أنابيب الاختبار بمقدار 1 مل لكل انبوبة	(Macfaddin, 2000)	وسط تخمر السكريات	.11
استعمل هذا الوسط لمعرفة قدرة البكتريا على استهلاك المالونيت كمصدر وحيد للكربون.	حضر باذابة 9.3 غم من الوسط في لتر ماء مقطر ثم عقم بالموصدة.	Difco	وسط مرق المالونيت Malonate Broth	.12

استعمل لغرض تنمية البكتريا لفاقدة الجدار.	حضر باذابة 37غم من نقيع القلب الدماغ السائل (Oxoid) و 100 غم من السكروز (fluka) و 5غم من خلاصة الخميرة (Mast) Yeast extract في 1000 مل ماء مقطر ثم ضبط الأس الهيدروجيني للوسط بين (7.4-7.6) ثم وزع في انابيب زجاجية بمعدل 10مل للانبوبة ثم عقم بالموصدة	(Domingue, 1982)	وسط الفارينت السائل Variant Broth	.13
استعمل للحصول على مستعمرات البيض المقلي لفاقدة الجدار.	حضر باضافة 12 غم من الاكار (Biolife) الى نفس مكونات وسط الفارينت السائل وضبط الاس الهيدروجيني بين (7.4-7.6) وعقم بالموصدة ثم صب في الاطباق المعقمة	(Domingue, 1982)	وسط الفارينت الصلب (VA) Variant Agar	.14
استعمل لغرض تنمية البكتريا لفاقدة الجدار.	حضر الوسط بصب 10مل من وسط الفارينت الصلب في أنابيب زجاجية ذات قاعدة مسطحة (flat bottom) سعة 25 مل محكمة السد وعقمت ثم وضعت بشكل مائل لحين انجماد الوسط ثم اضيف لكل انبوبة 5مل من وسط الفارينت السائل المعقم.	(الناصري، 2002)	الوسط ثنائي الطور Biphasic Medium	.15

2.3- طرائق العمل Methods

1.2.3 جمع عينات الدم

جمعت 268 عينة دم من مرضى الحمى المعوية المستديمة من مستشفيات بابل للولادة والاطفال والحلة التعليمي ومرجان التخصصي خلال المدة من تشرين الاول/ 2002 ولغاية حزيران/ 2003 وذلك بسحب كمية الدم (10) مل من الوريد بعد تعقيم المنطقة المراد السحب منها وتحت ظروف معقمة قياسية. زرع (5) مل من العينة مباشرة بعد السحب بطريقة (Blood culture) و (5) مل الاخرى وضعت بأنابيب معقمة ونقلت للمختبر لإجراء الدراسة عليها في غضون ساعة واحدة من جمعها.

كانت الحمى المعوية المستديمة من النوع المتكرر اعتماداً على تشخيص الطبيب الاختصاص ووجود تاريخ لمراجعات متعددة سابقة للمريض تؤكد ما يأتي:

1- نتيجة زرع الدم سالبة.

2 - فحص ويدال موجب.

3- يتعاطى العلاج ولا يوجد تحسن في حال التأكد من ان المريض ملتزم بوصف الطبيب

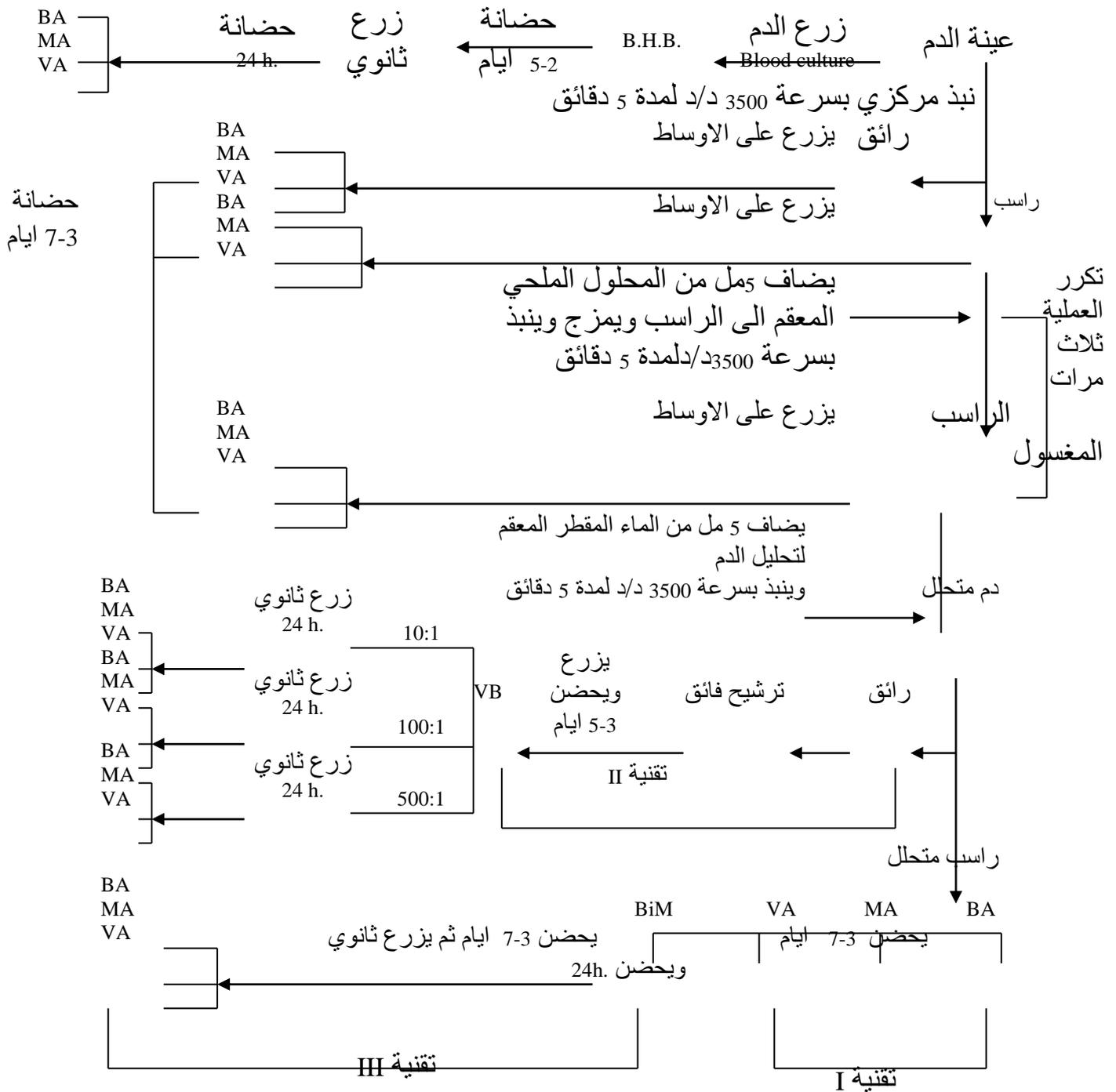
المعالج.

وجرى توثيق التشخيص السريري للحمى المتموجة عن طريق فحص روز بنكال.

2.2.3 تطوير تقنيات الزرع للتحري عن المسببات المشاركة في الحمى المعوية المستديمة.
بعد جمع عينة الدم من المريض وتحت الظروف المعقمة تمت زراعتها بسبع طرائق للزرع هي:

زراعة الدم الكامل بصورة تقليدية blood culture وذلك مباشرة بعد اخذ العينة وكانت نسبة الدم الى الوسط 10:1 حجم/حجم (Shanson, 1978). وزراعة رائق الدم بعد التنبيد بالمنبذ وراسب الدم بعد التنبيد وراسب الدم المغسول بماء الملح الوظيفي المعقم بعد التنبيد وراسب الدم المتحلل بالماء المقطر المعقم مع النبذ ورائق الدم المتحلل المرشح المخفف والمزرعة ثنائية الطور. كما موضح في الشكل (1.2)

حيث تتدرج هذه الطرائق السبع ضمن ثلاث تقنيات لزرع الدم المتسلسل تقنية I والراشح المخفف تقنية II والمزرعة ثنائية الطور تقنية III (الناصرى, 2002).
وتحتاج هذه التقنيات الى خمسة انواع من الأوساط الزرعية هي نقيع القلب- الدماغ السائل، وسط ماكونكي الصلب، وسط اكار الدم الصلب، وسط الفاريننت الصلب ووسط الفاريننت السائل وقد تحتاج الى مرشح دقيق وأنابيب بلاستيكية نبيدة معقمة ومحاقن بقياس 5مل و 10مل ويتطلب اكمال التقنيات الزرعية قرابة 5-7 أيام للعينة الواحدة.
من خلال هذه التقنيات يمكن التعرف على موقع المسبب للمرض فيما ان يكون منتشرأ في الدم الكامل أو منتشرأ في رائق الدم بعد التنبيد أو عالقأ على سطوح الخلايا الدموية أو متخفياً داخل الخلايا. واستنادأ الى نتائج تطبيق التقنيات أمكن رسم مسار حياة الكائن المسبب للمرض.



الشكل (1-3) مخطط يوضح طريقة الزرع المتسلسل (تقنية I) والراشح المخفف (تقنية II) مع المزرعة ثنائية الطور (تقنية III)

3.2.3 - التعرف والتشخيص Diagnosis & Identification

1.3.2.3 Morphology - الشكل الخارجي

تم التعرف على الشكل الخارجي للبكتيريا وذلك بعد اخذ مسحات من المستعمرات البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية المختلفة وثبيتها على السلايد ثم صبغها بصبغة كرام وصبغة دينز.

2.3.2.3 Cultural Characteristics - الخصائص المزرعية

بعد مرور مدة الحضانة الكافية وظهور نمو المستعمرات البكتيرية على الاوساط الزرعية المختلفة تم وصف شكل المستعمرة ولونها وحجمها وتميزت بكتريا فاقدة الجدار بكون شكل المستعمرة يشبه البيض المقلى (Fried Egg Colony) وبكونها دقيقة (Tiny).

3.3.2.3 Biochemical Tests - الاختبارات الكيموحيوية

1- اختبار الكاتليز Catalase Test

تم الاختبار بوضع قطرات من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3% على شريحة زجاجية نظيفة ثم نقلت كمية من النمو البكتيري بواسطة العروة الناقلة (Loop) الى قطرة من بيروكسيد الهيدروجين الموجود على الشريحة. ظهور الفقاعات هو دليل النتيجة الموجبة في حين أنّ عدم ظهور الفقاعات هو دليل على أنّ النتيجة سالبة (Macfaddin, 2000).

2- اختبار الاوكسيديز Oxidase Test

تم الاختبار بوضع قطرات من كاشف الاوكسيديز المحضر في الفقرة (4.3.1.3) على ورقة ترشيح ثم نقل جزء من الاكار الذي نمت عليه المستعمرات البكتيرية بواسطة أعواد خشبية نظيفة ومسحها بالورقة المشبعة بالكاشف. ظهور اللون البنفسجي بعد ثوان قليلة دليل على النتيجة الموجبة وعدم تحول اللون هو نتيجة سالبة (Collee et al, 1996).

3- اختبار الحركة Motility Test

تم الاختبار بطعن الوسط شبه الصلب بجزء من النمو البكتيري بأستعمال ابرة معقمة needle وبعد مرور مدة حضانة 24-48 ساعة تم ملاحظة النتيجة ففي حالة انتشار النمو عن خط الطعن يمثل نتيجة موجبة أمّا بقاء النمو على خط الطعن فهو نتيجة سالبة (Macfaddin, 2000).

4- التفاعل على وسط كليكلر والحديد الصلب Kligler's Iron Agar Reaction

جرى الاختبار بتخطيط المائل وطعن القعر بالنمو البكتيري وبعد مرور مدة حضانة 24-18 ساعة سجلت النتائج إذ يستدل على إنتاج الحامض بالتحول من اللون الاحمر الى الاصفر وبقاء اللون الاحمر دليل القاعدية ويستدل على انتاج الغاز بتكون الفقاعات أما H_2S فيظهر بشكل راسب اسود (Cowan, 1985).

5- اختبار استهلاك السترات

جرى الاختبار بتخطيط وسط سترات سيمون المائل الاخضر اللون بالنمو البكتيري وبعد 24-18 ساعة لوحظت النتيجة الموجبة بالتحول الى اللون الأزرق نتيجة لتحلل السترات أما بقاء اللون الاخضر فهو دليل على النتيجة السالبة, (Baron & Finegold, 1990).

6- اختبار احمر الميثيل Methyl Red Test

لقح وسط VP - MR بالنمو البكتيري وبعد مرور 48 ساعة الحضانة وبدرجة 37مُ اضيفت 5 قطرات من كاشف احمر الميثيل لكل انبوبة. إن تحول لون الوسط الى الاحمر دليل على النتيجة الموجبة أي التحلل التام للكوكوز وعدم تغير لون الوسط دليل على النتيجة السالبة (Benson, 1998).

7- اختبار الفوكس بروسكور Voges- Proskauer Test

لقت الأنابيب الحاوية على وسط MR- Vp بالنمو البكتيري وبعد حضانة 48 ساعة بدرجة 37مُ اضيفت 6 قطرات من كاشف الفانفثول وقطرتان من كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم و ظهور اللون الوردي دليل على النتيجة الموجبة والتحلل الجزئي للكوكوز (Benson, 1998).

8- اختبار الكشف عن انزيم اليوريز Urease Test

لقت الانابيب الحاوية على وسط يوريا الصلب المائل بالتخطيط وبعد 24 ساعة سجلت النتيجة الموجبة بالتحول من اللون الاصفر الى الوردي نتيجة لتحلل اليوريا, (Macfaddin, 1979).

9- اختبار الكشف عن انتاج الاندول Indol Test

لقت الانابيب الحاوية على وسط ماء البيتون بالبكتريا وبعد 24 ساعة من الحضانة بدرجة 37مُ. اضيفت قطرات من كاشف كوفاكس وظهور الحلقة الحمراء دليل على النتيجة الموجبة أي انتاج الاندول (Macfaddin, 2000).

10- اختبار استهلاك المالونيت Malonate Utilization Test

لقح مرق المالونيت بالنمو البكتيري وحضن من (2-5) أيام واستدل على النتيجة الموجبة بتحول لون الوسط الى الأزرق وذلك لتخميرها للمالونيت. (Difco, 1984)

11- الكشف عن انزيم الديكاربوكسيليز

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط بالنمو البكتيري ثم حضنت بدرجة 35م لمدة 96-24 ساعة لوحظ في 10-12 ساعة الاولى من الحضانة تغير لون الوسط من الازرق الى الاصفر نتيجة موجبة لتخمير سكر الكلوكوز وتكون الحامض أمّا بعد مرور 24 ساعة او اكثر فلوحظ عودة لون الوسط الى البنفسجي وهو دليل على النتيجة الموجبة أمّا بقاء اللون الاصفر بعد مرور مدة حضانة كاملة فهو دليل على النتيجة السالبة (Macfaddin, 2000).

12- اختبار الكشف عن تخمر السكريات وانتاج الغاز.

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط تخمر السكريات بالنمو البكتيري بعمر 24 ساعة ثم حضنت بدرجة 37م من (2-5) أيام و تغير اللون الى الأصفر دليل تكون الحامض وظهور الفقاعات في انبوب درهم دليل وجود الغاز (Macfaddin, 2000).

الجدول 2.3. خصائص الاختبارات الكيموحيوية المتعلقة ببكتريا السالمونيلا المعزولة من مرضى الحمى المعوية المستديمة.

<i>S. paratyphi B</i>	<i>S. paratyphi A</i>	<i>S. typhi</i>	الاختبارات
-	-	-	الاوكتيديز
+	+	+	الكاتليز
-	-	-	الاندول
+	+	+	احمر المثيل
-	-	-	الفوكس بروسكور
+	+	-	السترات
ق/ح	ق/ح	ق/ح	تفاعل كلكلير والحديد الصلب
+	-	+	انتاج غاز H ₂ S
-	-	-	اليوريا
-	-	-	المالونيت
+	+	+	نزع مجموعة الكاربوكسيل من اللايسين
+	+	+	الحركة
+	+	+	تخمير الكلوكوز
+	+	+	مالتوز
-	-	-	لاكتوز
-	-	-	سكروز
+	+	+	زايلوز
+	+	+	مانيتول

(Edwards & Ewing, 1972; WHO, 1983; Difco, 1984; Baron & Finegold, 1990)

ق: قاعدة

ح: حامض

+: الفحص موجب

-: الفحص سالب

4.2.3 - اختبار الحساسية لمضادات الحيوية

1.4.2.3 - اختبار حساسية البكتريا فاقدة الجدار لمضادات الحيوية.

تم الاختبار بحسب طريقة Domingue إذ تم قطع الاكار الحاوي (5-10) مستعمرات بكتيرية فاقدة الجدار على شكل قالب الاكار ونقل الى وسط مرق الفاريننت وحضن بدرجة 35م من (7-10) ايام ثم نقل جزء من النمو البكتيري بوساطة ماسحة قطنية معقمة من الوسط الى الطبقة الحاوي على وسط الفاريننت الصلب وخطط الطبقة بثلاثة اتجاهات ثم وزعت أقراص مضادات الحيوية على الطبقة وحضن من (7-10) أيام وحضر أيضا طبق سيطرة الذي تميز بعدم احتواءه على اقراص لمضادات الحيوية لذا فبعد مرور مدة الحضانة لوحظ ظهور نمو كثيف جداً خلال هذه المدة. أما بالنسبة للطباق الحاوية على المضادات الحيوية فإنّ

ظهور نمو بكتيري مجاوراً للقرص دليل على مقاومة البكتيريا لمضاد الحيوية وعدم ظهور النمو حول القرص دليل على حساسيتها لمضاد الحيوية (Domingue, 1982).

2.4.2.3 - اختبار حساسية البكتيريا ذات الجدار لمضادات الحيوية.

تم الاختبار بحسب طريقة Kirby- Bauer وبحسب ما ورد في (Bauer *et al*, 1966) مع وجود بعض التحويلات حيث استعمل وسط مرق الفارينت بدلاً من وسط المرق المغذي (Nutrient agar) واستعمل وسط الفارينت الصلب بدلاً من وسط مولر- هنتون الصلب وتم نقل (4-5) مستعمرات بكتيرية لذات الجدار الى وسط مرق الفارينت وحضن بدرجة 37 م° لمدة (4-5) ساعات وبعد ظهور النمو بشكل عكورة واضحة نقل جزء من النمو البكتيري بواسطة ماسحة قطنية معقمة من وسط مرق الفارينت الى وسط الفارينت الصلب حيث خطط الطبق بثلاثة اتجاهات وتركنت الاطباق مدة (3-5) دقائق ثم وزعت اقراص مضادات الحيوية على الطبق بواسطة ملقط معقم وحضنت الاطباق بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم قيس قطر منطقة التثبيط بواسطة المسطرة الاعتيادية و حددت حساسية البكتيريا ومقاومتها للمضادات اعتماداً على الجدول 2.2.

الجدول 3.3 اقراص المضادات البكتيرية واقطار مناطق التثبيط ومديات المقاومة وتفسيراتها.

مضادات البكتيرية	قوة القرص	قطر المنطقة (مم)	
		المقاومة	الحساسية
Amikacin (AN)	30 μ g	14 or less	17 or more
Ampicillin (AMP)	10 μ g	13 or less	17 or more
Amoxycillin (AMI)	30 μ g	13 or less	18 or more
Ceftriaxone (CRO)	30 μ g	14 or less	18 or more
Chloramphenicol (C)	30 μ g	12 or less	18 or more
Ciprofloxacin (Cip)	30 μ g	15 or less	21 or more
Gentamicin (CN)	10 μ g	12 or less	15 or more
Pencillin G (P)	10 μ g	11 or less	22 or more
Tetracycline (TE)	30 μ g	14 or less	19 or more

Trimethoprim/ Sulfamethoxazole (SXT)	25 μ g	10 or less	16 or more
--	------------	------------	------------

(Difco, 1984; Benson, 1998)

5.2.3 التحليل الاحصائي

جرى دراسة جدوى الطرق المطوعة لدراسة البكتريا فاقدة الجدار من خلال استعمال اختبار Z كما ورد في (Knapp & Miller, 1992; Gardiner, 1997) وتم حساب قيمة

$$Z = \frac{y_i - \mu}{\sigma}$$

Z من المعادلة الآتية:

y_i : العينة

μ : المتوسط الحسابي

σ : الانحراف المعياري

وتم احتساب مؤشر الحساسية للطرق المستخدمة في هذه الدراسة وفق (الناصرى،

2002).

$$\text{النسبة المئوية لمؤشر الحساسية} = \frac{\text{قيمة موجبة حقيقية} - \text{قيمة سالبة كاذبة}}{\text{قيمة موجبة حقيقية}} \times 100$$

وكانت القيمة السالبة الكاذبة تساوي (12) لجميع المعاملات.

واحتسبت قوة التكبير للمجهر الضوئي المركب وفق المعادلة الآتية: (Barown &

Finegold, 1990)

$$\text{قوة التكبير} = \text{قوة تكبير العدسة العينية} \times \text{قوة تكبير العدسة الشيئية}$$

CHAPTER FOUR الفصل الرابع

Results & Discussion 4 - النتائج والمناقشة

1.4 نتائج العزل والتشخيص

جرى تطويع تقنيات مطورة للتحري عن المسببات المشاركة للحمى المعوية المستديمة. إذ تم اخذ 268 عينة دم من مرضى مصابين بالانتان الدموي، كان منها 68 عينة دم ضمن المواصفات النموذجية الممثلة (حمى معوية مستديمة وزرع روتيني سالب) و اظهرت النتائج الزراعية أنّ (82.3%) منها اعطت دلائل على وجود بكتريا فاقدة الجدار بعد زراعتها على الاوساط الخاصة بفاقة الجدار وذات الجدار وكما مبينة في فقرة تطويع التقنيات المطورة للزرع.

2.4 تطويع تقنيات مطورة للتحري عن المسببات المشاركة للحمى المعوية المستديمة.

عند التحري عن البكتريا المشاركة للحمى المعوية المستديمة توزعت هذه البكتريا على ست مجموعات، خمس منها مفسرة ومجموعة واحدة غير مفسرة وذلك لعدم التمكن من عزل الكائن المسبب للمرض باستعمال تقنيات الزرع المطوعة في هذه الدراسة حيث استعملت تقنية الزرع المتسلسل وتقنية التخفيف وتقنية المزرعة ثنائية الطور في التحري عن المسببات المشاركة للحمى المعوية المستديمة.

بعد انتهاء اجراءات الزرع بالطرق الروتينية والطرق المطوعة لدراسة فاقدات الجدار امكن تبويب تلك التي تخص فاقدة الجدار الى ست مجاميع ومن النتائج الاولية المتحصلة من الزرع الاولي.

والمجموعات هي من (VI-I) وكما يأتي:

المجموعة I: وهي موجبة الزرع لتقنيات الزرع المتسلسل والتخفيف والمزرعة ثنائية الطور وتضمنت احدى عشرة عينة (جدول 1.4)

المجموعة II: وهي سالبة بتقنية الزرع المتسلسل وموجبة بتقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية الطور وتضم تسع عينات. (الجدول 2.4)

المجموعة III: وهي سالبة الزرع في المراحل الثلاث الاولى من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة بزرع الراسب المغسول والراسب المكسر وموجبة ايضاً بتقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية الطور وتضم خمس عشرة عينة (الجدول 3.4).

المجموعة IV : وهي سالبة بزراع الدم الكامل فقط أي المرحلة الأولى من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات وتضم ثلاث عشرة عينة. (الجدول 4.4)

المجموعة V : وهي موجبة بتقنية الزرع المتسلسل وتقنية التخفيف وسالبة لتقنية المزرعة ثنائية الطور وتضم ثمان عينات (الجدول 5.4).

المجموعة VI : وهي غير مفسرة لأنها سالبة الزرع في جميع التقنيات وتضم اثنتي عشرة عينة. (الجدول 6.4).

الجدول 1.4- المجموعة I وهي موجبة الزرع في التقنيات الثلاث.

اكار الفارينت		اكار الماكونكي		اكار الدم		العينة		C
-	+	-	+	- *	+ **			
0	11	11	0	0	11#	الدم الكامل		تقنية الزرع المتسلسل I
0	11	11	0	0	11	رائق النبذ		
0	11	9	2	0	11	راسب النبذ		
0	11	10	1	0	11	الراسب المغسول		
0	11	9	2	0	11	الراسب المتحلل		
0	11	10	1	0	11	10:1	تخفيف رائق الراسب المكسر	تقنية التخفيف II
0	11	9	2	1	10	100:1		
0	11	10	1	1	10	500:1		
0	11	6	5	0	11	الراسب المتحلل		تقنية المزرعة ثنائية الطور III

مفتاح المجاميع المختلفة
 ** الموجب (+) يعني وجود النمو الزراعي.
 □ السالب (-) يعني انعدام النمو.

في دراسة الزرع الروتيني للمستشفى كانت هذه المجموعة سالبة على اكار الدم ولكن بعد اعادة دراسة المرضى في هذه الدراسة اعطت نتائج موجبة على اكار الدم.

الجدول 2.4- المجموعة II وهي سالبة لتقنية الزرع المتسلسل وموجبة لتقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية الطور.

اكار الفارينت		اكار الماكونكي		اكار الدم		العينة		ن
-	+	-	+	-	+			
9	0	9	0	9	0	الدم الكامل		تقنية الزرع المتسلسل I
9	0	9	0	9	0	رائق النبذ		
9	0	9	0	9	0	راسب النبذ		
9	0	9	0	9	0	الراسب المغسول		
9	0	9	0	9	0	الراسب المتحلل		
0	9	6	3	1	8	10:1	التخفيف رائق المكسر الراسب	تقنية التخفيف II
0	9	7	2	2	7	100:1		
0	9	7	2	2	7	500:1		
0	9	6	3	0	9	راسب الخلايا المكسرة		تقنية المزرعة ثنائية

الجدول 3.4- المجموعة III وهي سالبة في المراحل الثلاث الاولى لتقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات

اكار الفارينت		اكار الماكونكي		اكار الدم		العينة		ن
-	+	-	+	-	+			
15	0	15	0	15	0	الدم الكامل		تقنية الزرع المتسلسل I
15	0	15	0	15	0	رائق النبذ		
15	0	15	0	15	0	راسب النبذ		
0	15	13	2	1	14	الراسب المغسول		
0	15	13	2	0	15	الراسب المكسر		
0	15	8	7	3	12	10:1	التخفيف رائق المكسر الراسب	تقنية التخفيف II
1	14	8	7	4	11	100:1		
2	13	8	7	5	10	500:1		
0	15	7	8	2	13	راسب الخلايا المكسرة		تقنية المزرعة ثنائية الطور III

الجدول 4.4- المجموعة IV وهي سالبة بالمرحلة الاولى من تقنية الزرع المتسلسل وموجبة لباقي التقنيات.

اكار الفارينت		اكار الماكونكي		اكار الدم		العينة		ن
-	+	-	+	-	+			
13	0	13	0	13	0	الدم الكامل		تقنية الزرع المتسلسل I
0	13	5	8	1	12	رائق النبذ		
0	13	7	6	0	13	راسب النبذ		
0	13	7	6	0	13	الراسب المغسول		
0	13	6	7	0	13	الراسب المتحلل		
0	13	9	4	0	13	10:1	التخفيف المكسر الراسب رائق	تقنية التخفيف II
0	13	10	3	2	11	100:1		
1	12	10	3	3	10	500:1		
0	13	8	5	0	13	راسب الخلايا المكسرة		تقنية المزرعة ثنائية الطور III

الجدول 5.4- المجموعة V وهي موجبة لتقنيتي الزرع المتسلسل والتخفيف وسالبة لتقنية المزرعة ثنائية الطور.

اكار الفارينت		اكار الماكونكي		اكار الدم		العينة		ن
-	+	-	+	-	+			
0	8	5	3	1	7	الدم الكامل		تقنية الزرع المتسلسل I
0	8	4	4	0	8	رائق النبذ		
0	8	4	4	0	8	راسب النبذ		
0	8	5	3	2	6	الراسب المغسول		
0	8	4	4	2	6	الراسب المتحلل		
0	8	4	4	1	7	10:1	التخفيف المكسر الراسب رائق	تقنية التخفيف II
0	8	5	3	2	6	100:1		
0	8	5	3	2	6	500:1		
8	0	8	0	8	0	راسب الخلايا المكسرة		تقنية المزرعة ثنائية الطور III

الجدول 6.4 - المجموعة VI وهي سالبة الزرع في كل التقنيات.

اكار الفارينت		اكار الماكونكي		اكار الدم		العينة		ن
-	+	-	+	-	+			
12	0	12	0	12	0	الدم الكامل		تقنية الزرع المتسلسل I
12	0	12	0	12	0	رائق النبذ		
12	0	12	0	12	0	راسب النبذ		
12	0	12	0	12	0	الراسب المغسول		

12	0	12	0	12	0	الراسب المتحلل	
12	0	12	0	12	0	10:1	التخفيف الراسب المكسر
12	0	12	0	12	0	100:1	
12	0	12	0	12	0	500:1	
12	0	12	0	12	0	الراسب الخاليا المكسرة	
التخفيف II تقنية الطور III							
تقنية ثانية المزرعة							

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

هياة رقم 1:

توضح نتائجها بأن ظهور النمو في جميع مراحل الزرع المتسلسل دليل على وجود المسبب المرضي خارج الخلايا الدموية أو أنه ملتصق على الاغشية الخلوية لهذه الخلايا الدموية او كلاهما معاً (Domingue *et al*, 1997).

وظهور النمو الجرثومي في تقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية الطور دليل على أن المسبب فاقد للجدار كلياً ويقع داخل الخلايا. إمّا قدرة المسبب من النمو على جميع الأوساط الزرعية المستعملة الاعتيادية مثل وسط اكار الدم ووسط الماكونكي الصلب والاوساط الخاصة بالبكتريا فاقدة الجدار وهي وسط مرق الفاريننت ووسط الفاريننت الصلب وهو دليل على وجود البكتريا ذات الجدار والبكتريا الانتقالية (Transitional) والبكتريا فاقدة الجدار معاً وهذا يتفق مع دراسات الكثير من المشتغلين في هذا المجال (Woody *et al*, 1982; Schifferli *et al*, 1986; Sela *et al*, 2000).

هياة رقم 2:

توضح نتائجها بان ظهور النمو الجرثومي لكل من تقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية الطور دليل على وجود بكتريا فاقدة الجدار كلياً CWDB وانها مستقرة داخل الخلايا. وفقدانها للجدار قد يعود للظروف البيئية والفسولوجية (Lawson, 1982). او لتأثيرات المضيف الضارة (Domingue & Schlegel, 1978).

هياة رقم 3:

توضح نتائجها وجود المسبب المرضي داخل الخلايا لكونه تمكن من النمو بعد زرع الراسب المغسول والراسب المكسر. و أنّ ظهور النمو البكتيري في تقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية الطور دليل على وجود البكتريا داخل الخلايا وإنها فاقدة للجدار كلياً وهذا ما يؤكد نموها

على الاوساط الخاصة. أما ظهور النمو على الاوساط الاعتيادية فهو دليل على وجود البكتريا ذات الجدار والبكتريا الانتقالية (Domingue, 1995).

هياة رقم 4:

توضح نتائج هذه المجموعة عدم تمكن المسبب المرضي من النمو على جميع الاوساط بالمرحلة الاولى من تقنية الزرع المتسلسل وهي زرع الدم الكامل إذ من الصعوبة عزل البكتريا فاقدة الجدار الخلوي باستعمال هذه الطريقة (Phair et al, 1974).
وقد أوضحت النتائج ظهور النمو في باقي مراحل الزرع المتسلسل مما يدل على وجود البكتريا المسببة للمرض خارج الخلايا او ملتصقة على سطوحها.
وظهور النمو البكتيري في تقنيتي التخفيف والمزرعة ثنائية الطور دليل على وجود بكتريا فاقدة للجدار كلياً وانها موجودة داخل الخلايا. وظهور النمو على الاوساط الاعتيادية دليل على وجود بكتريا ذات جدار. أما النمو الكثيف على الاوساط الخاصة فهو دليل على وجود بكتريا فاقدة الجدار.

هياة رقم 5:

توضح نتائجها وجود خلايا فاقدة للجدار خارج الخلايا الدموية او ملتصقة على اغشيتها الخلوية وذلك لظهور النمو بتقنية الزرع المتسلسل. أما ظهور النمو بتقنية التخفيف فهو دليل على وجود بكتريا فاقدة الجدار كلياً مستقرة داخل الخلايا. ووجود نمو جزئي على الأوساط الاعتيادية دليل على وجود الخلايا الانتقالية ايضاً (Domingue, 1995).

هياة رقم 6:

توضح نتائجها عدم وجود نمو بكل التقنيات الزرعية المستعملة في هذه الدراسة على الرغم من وجود الأعراض السريرية المؤشرة لوجود المرض وهذا قد يعود لأسباب منها:
1- ان الكائن المسبب للمرض يتخفى في مناطق محمية في الجسم (Brooks et al, 1998).
2- إن الإصابة ناتجة عن مسبب آخر (Fastidious organism) صعب العزل كبعث الجراثيم كالفايروسات والريكتسيا *Rickettsia* (Jawetz et al, 1987).
3- احتمال ان المسبب لهذه الحالة لهذه الحالة يكون بكتريا مغطاة بالصد (Harada et al, 1992).

جدوى تقنيات زرع الدم المطوعة

من خلال دراسة 68 عينة دم لمرضى الحمى المعوية المستديمة وزرعها بالتقنيات المختلفة وجد ان زرع الراشح المخفف والمزرعة ثنائية الطور ذات نتائج ايجابية عالية قياساً بالطرائق الاخرى. (الجدول 7.4)

الجدول 7.4 – جدوى تقنيات زرع الدم المطوعة المختلفة

رقم التقنية	الطريقة	الموجب : الكلي (%)
1	الدم الكامل (منهجية رقم 1)	18 : 68 (26.47)
	رائق النبذ (منهجية رقم 2)	31 : 68 (45.58)
	رسابة الدم (منهجية رقم 3)	32 : 68 (47.05)
	الراسب المغسول (منهجية رقم 4)	44 : 68 (64.70)
	الراسب المكسر (منهجية رقم 5)	45 : 68 (66.17)
2	الراشح المخفف (تقنية رقم 2)	51 : 68 (75.00)
3	المزرعة ثنائية الطور (تقنية رقم 3)	46 : 68 (67.64)

الجدول 8.4 جدوى استعمال طرائق الزرع المختلفة بالقياس مع زرع الدم الكامل بتطبيق

اختبار احصاء Z.

نوع الطريقة	عدد العزلات	نسبة العزل	قيمة Z محسوبة جدولية $p \leq 0.05$
طريقة زرع الدم الكامل	18	26.47	-6.96 -0.0001
طريقة المزرعة ثنائية الطور	46	67.64	1.89 0.9706
طريقة زرع راشح الدم المخفف	51	75	3.48 0.9997
طريقة زرع الراسب المتحلل	45	66.17	1.58 0.9429

P: مستوى المعنوية

بعد اجراء اختبار Z كما ورد في (Knapp & Miller, 1992 Gardiner, 1997).

اظهرت النتائج وجود فروقات معنوية احصائياً وذلك لان قيمة Z المحسوبة اكبر من قيمة Z

الجدولية لطرائق المزرعة ثنائية الطور والراشح المخفف والراسب المتحلل زيادةً على ان قيم Z المحسوبة والجدولية لطرائق المزرعة ثنائية الطور والراشح المخفف والراسب المتحلل هي اكبر من قيمة Z المحسوبة والجدولية لطريقة المقارنة أي زرع الدم الكامل.

الجدول 9.4: مؤشر الحساسية لطرائق زرع الدم المستعملة

الطريقة	مؤشر الحساسية
1- طريقة زرع الدم الكامل	33.3
2- طريقة المزرعة ثنائية الطور	73.9
3- طريقة زرع راشح الدم المخفف	76.4
4- طريقة زرع الراسب المتحلل	73.3

ويظهر من النتائج أن مؤشر الحساسية لطريقة المزرعة ثنائية الطور وطريقة زرع راشح الدم المخفف وطريقة زرع الراسب المتحلل هي اعلى من مؤشر الحساسية لطريقة زرع الدم الكامل مما يوحي بأفضلية استعمال هذه الطرائق الثلاث في تقنيات زرع الدم المطوعة.

3.4 بايولوجية البكتريا فاقدة الجدار الخلوي

اظهر الوصف المجهرى للبكتريا فاقدة الجدار التي عزلت من عينات دم مرضى الحمى المعوية المستديمة بتقنيات الزرع المطوعة التي اجريت في هذه الدراسة، أنها تبدو بشكل اجسام دائرية او بيضوية منتفخة ومتلاحمة بشكل تجمعات خلوية بسبب فقدها للجدار الخلوي وبعض هذه الاجسام الدائرية كبير (Large bodies) والبعض الآخر دقيق (Tiny bodies) وهذا يتفق مع بعض الدراسات السابقة (Kudlai *et al*, 1961; Domingue &Schlegel, 1977, Domingue *et al*, 1979).

وتمتاز البكتريا فاقدة الجدار بأن لمستعمراتها النامية على وسط الفاريننت الصلب مظهراً شبيه بمظهر البيض المقلي ويتضح هذا من خلال صبغها بصبغة دينز وهذا يتفق مع وصف العديد من العلماء الذين حددوا صفات مستعمرات البكتريا فاقدة الجدار بهذا المظهر (Klieneberger- Nobel, 1951; Medill- Brown *et al*, 1960; Weibull & Beckman, 1960; James *et al*, 1965; Panos, 1965) و تمتاز مستعمرة فاقدة الجدار بكونها دقيقة (Tiny) وشفافة (Transluscent) وتلمع عند سقوط الاشعة الضوئية المائلة عليها (الناصري، 2002).

وتمتاز البكتريا فاقدة الجدار الخلوي بإمكانية المرور عبر المرشحات الدقيقة ذات ثقوب بقطر $0.22 \mu m$ وهذا يؤكد كونها ذات طبيعة مرنة (Squeezable) قابلة للانضغاط والمرور عبر هذه المرشحات الدقيقة وهذا يتفق مع دراسة العديد من العلماء.

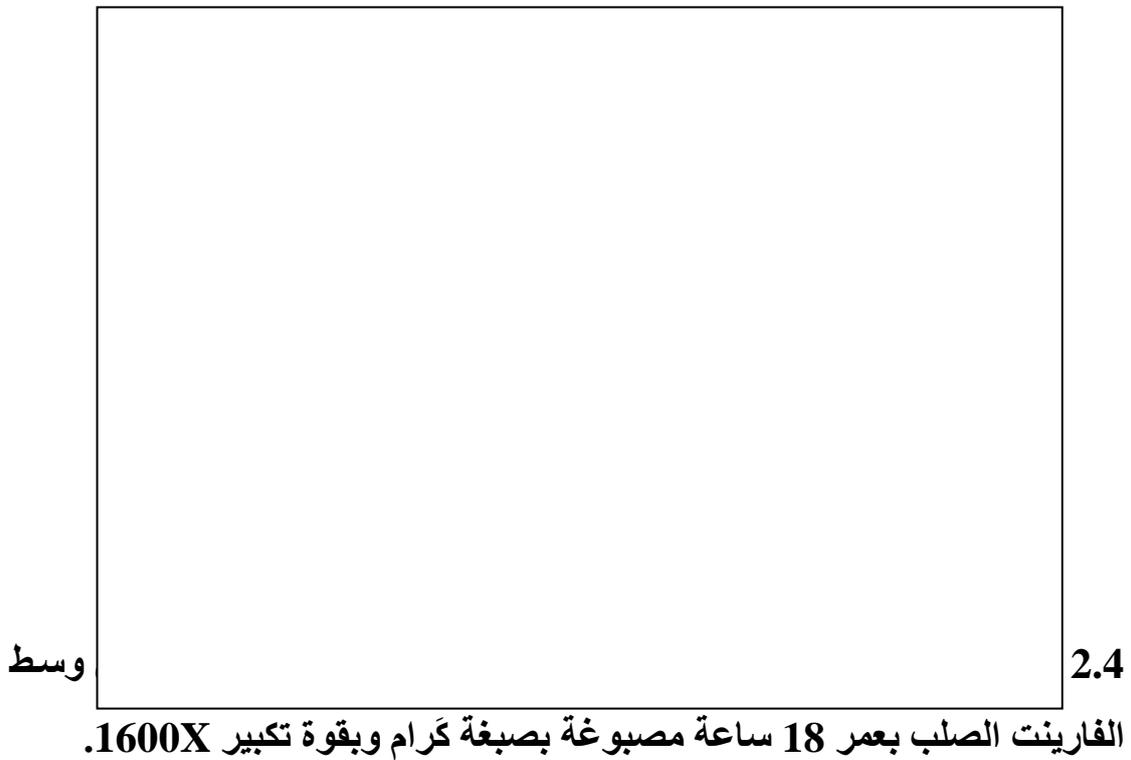
(Dienes, 1939 Klienberger- Nobel, 1949; Weinberger *et al*, 1950; Dienes & Sharp, 1956; Marston, 1961; Ponig *et al*, 1972; Domingue *et al*, 1974; Zubkov & Shchegolev, 1976).

وتمتاز البكتريا فاقدة الجدار بقدرتها على الارتداد الى البكتريا ذات الجدار وقد تكون ثابتة ولا ترجع الى اصلها أي لا تتمكن من تصنيع جدارها الخلوي مرة اخرى وهذا يتفق مع Wyrick وجماعته (1973) وتوضح الأشكال (1.4)، (2.4) مواصفات البكتريا فاقدة الجدار.

الجدول 10.4 - خواص فاقدة الجدار

ت	الحقيقة	اوصاف فاقدة الجدار
-1	الخصائص المزرية	تنمو في الوسط السائل وتنمو في الوسط الصلب على شكل مستعمرات دقيقة وشفافة ولماعة عند سقوط الأشعة الضوئية عليها ولمستعمرتها مظهر البيض المقلي.
-2	الوصف المجهري	اشكال بيضوية منتفخة وتلاحم بشكل تجمعات خلوية نتيجة لفقدائها الجدار الخلوي.
-3	الخصائص الفيزيائية	مرنة وقابلة للانضغاط والمرور عبر المرشحات الدقيقة وممكنة الارتداد او ثابتة حسب النوع.

1.4 الطراز المظهري لبكتريا السالمونيلا *S. typhi* فاقدة الجدار المأخوذة من وسط مرق الفاريننت بعمر 18 ساعة وهي بشكل تجمعات خلوية نتيجة فقدانها الجدار ومصبوغة بصبغة كرام وبقوة تكبير 1600 X



وسط

2.4

الفاريننت الصلب بعمر 18 ساعة مصبوغة بصبغة كرام وبقوة تكبير 1600X.

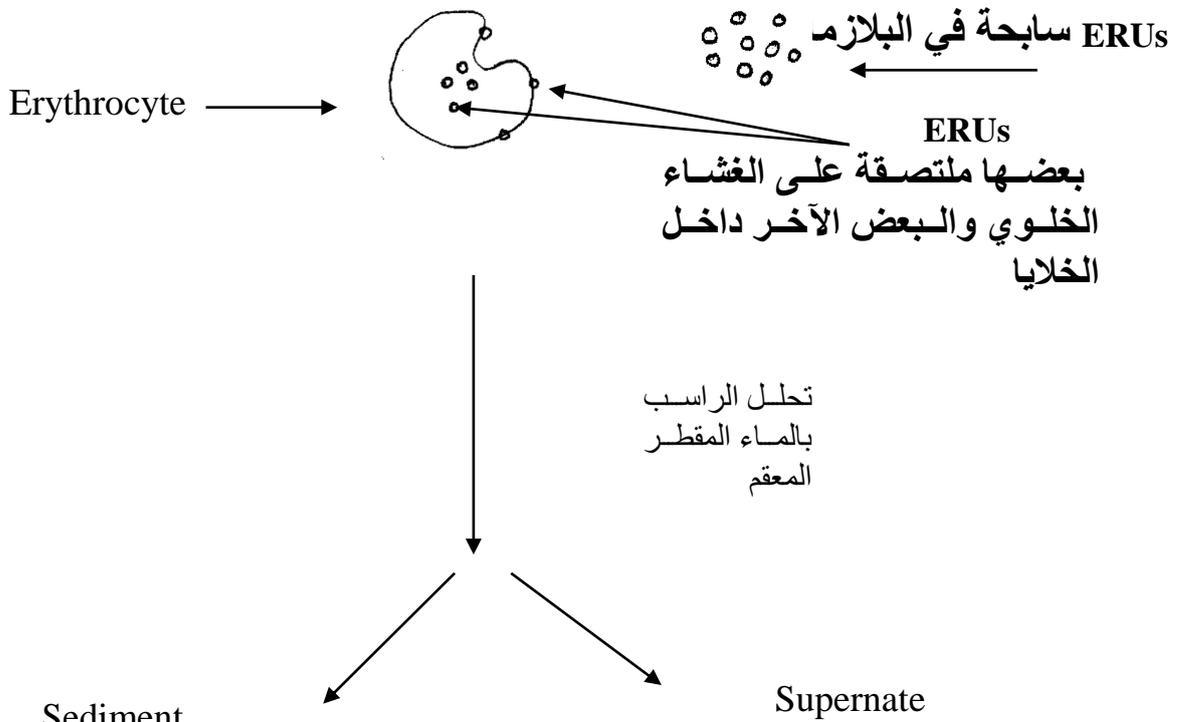
4.4 مسار حياة البكتريا فاقدة الجدار الخلوي المسببة للحمى المعوية المستديمة.

من خلال النتائج التي تم التوصل اليها في هذه الدراسة امكن تحديد دورة مسار حياة البكتريا فاقدة الجدار حيث يحتمل وجود وحدات تكاثرية بدائية ممكنة التوالد (ERUs) Elementary Reproductive Units توجد إمّا بصورة حرة خارج الخلايا الدموية وإمّا تكون ملتصقة على سطوح الخلايا وإمّا تكون موجودة داخل هذه الخلايا.

تتمكن (ERUs) الواقعة خارج الخلايا من النمو خلال تقنية الزرع المتسلسل. أمّا (ERUs) الملتصقة بالخلايا أو الموجودة داخل الخلايا فانها تحرر وتتمكن من النمو بعد عملية تحلل الراسب إذ إنها تمر من خلال المرشحات الفائقة ذات ثقب بقطر $0.22 \mu m$ عند ترشيح رائق النبذ الذي يسبق تقنية التخفيف (Heidger *et al*, 1982).

ففي رائق النبذ المرشح المزروع في مرق الفارينت لوحظ وجود اشكال كروية كبيرة واشكال متطولة يعتقد أن فاقدة الجدار تنشأ منها. وجدت بكتريا متوسطة (Intermediate) وهي فاقدة للجدار جزئياً وبكتريا راجعة (Revertant) أي ذات جدار خلوي وبكتريا فاقدة الجدار الخلوي عند زرع الراسب المكسر على الاوساط الزرعية الصلبة والمزرعة ثنائية الطور.

ومن الجدير بالذكر أن (ERUs) تستطيع اعادة مسار حياتها عند توافر الظروف الملائمة. إن مسار حياة البكتريا فاقدة الجدار المفترض في هذه الدراسة اتفق مع دراسات اخرى (Bisset & Bartlett, 1978; Tedeschi *et al*, 1978)



5.4 طبيعة المسببات المشاركة للحمى المعوية المستديمة

في هذه الدراسة تم عزل بكتريا السالمونيلا فاقدة الجدار المسببة لمرض الحمى المعوية المستديمة وبنسبة 82.3%. كانت حصة بكتريا *S. typhi* منها 72% ثم تلتها *S. paratyphi B* بنسبة 7.3% واخيراً *S. paratyphi A* بنسبة 2.9%. كما سجلت ايضاً اصابات مشتركة للحمى المعوية الناتجة عن *S. typhi* مع حمى مالطا او الحمى المتموجة الناتجة عن *Brucella spp.* بنسبة 4.4%.

الجدول 11.4- البكتريا فاقدة الجدار المسببة للحمى المعوية المستديمة

المسبب المرضي	عدد العزلات : الكلي	(%)	
<i>Salmonella typhi</i>	68: 46	67.6	احادي الخمج
<i>S. paratyphi B</i>	68: 5	7.3	
<i>S. paratyphi A</i>	68: 2	2.9	
<i>S. typhi + Brucella spp.</i>	68: 3	4.4	ثاني الخمج
الكلي	68: 56	82.3	

6.4 الفئة العمرية والجنس والحمى المعوية المستديمة

شملت الاصابة بالحمى المعوية المستديمة كل من الذكور وكانت نسبة الاصابة 44.1% (30: 68) والاناث وكانت نسبة الاصابة 55.8% (38: 68).

وتراوحت اعمار المرضى ما بين (6-53) سنة. اكثر نسبة للاصابة كانت للفئة التي تراوحت اعمارها بين (16-20) سنة وبنسبة 23.5%. ثم تلتها الفئة العمرية بين (11-15) سنة ومن (26-30) وكانت النسبة 14.7%. ونلاحظ أن أعلى نسبة اصابة سجلت للاعمار دون 22 سنة وهذا يتفق مع Prince (2002) ومع Khosla (1977) الذي اشار الى أن السالمونيلا المسببة للحمى المعوية نادراً ما تصيب الاطفال الرضع وشائعة للاعمار (10-35) سنة.

جدول 12.4- الفئة العمرية ونسبة الاصابة.

العمر	المرضى	النسبة المئوية (%)
5-1	-	-
10-6	8	11.7
15-11	10	14.7
20-16	16	23.5
25-21	3	4.4
30-26	10	14.7
35-31	5	7.3
40-36	9	13.2
45-41	3	4.4
50-46	2	2.9
55-51	2	2.9

7.4 - مضادات الحيوية وبكتريا فاقدة الجدار المشاركة للحمى المستديمة.

اشارت نتائج اختبار حساسية البكتريا لمضادات الحيوية الى عدد من الحقائق وهي: أن البكتريا فاقدة الجدار اظهرت مقاومة عالية لمضاد الحيوية الذي يثبط تصنيع الجدار الخلوي وبنسبة 100% كما موضح في الجدول (12.3) وهذا يتفق مع العديد من البحوث السابقة (Barile *et al*, 1959; Schonfeld, 1959; Montgomerie *et al*, 1966; Blumberg

(Strominger, 1974). وقد كانت البكتيريا فاقدة الجدار حساسة أكثر من البكتيريا ذات الجدار تجاه المضادات التي تؤثر في عملية تصنيع البروتين ولاسيما الكلورامفينيكول. وايضاً تجاه المضادات التي تؤثر في تصنيع الاحماض النووية وقد يعود السبب في ذلك الى فقدانها الجدار الخلوي، مما يسهل دخول المضاد الحيوي وتأثيره على العضية الهدف وهذا يتفق مع بعض الدراسات الاخرى (Schegolev, 1970; Hubert *et al*, 1972; Kagan, 1972; Yamamot & Homma, 1978). وهذا يؤكد ما اشار إليه Domingue وجماعته (1997) من وجود اختلاف بين البكتيريا ذات الجدار والبكتيريا فاقدة الجدار في حساسيتها لمضادات الحيوية المختلفة وايضا يتفق مع دراسة الناصري (2002) حول البكتيريا فاقدة الجدار. واطهرت النتائج أن للبكتيريا ذات الجدار وفاقدة الجدار نفس نسبة الحساسية تجاه المضاد الحيوي Ceftriaxone وهذا يتفق مع دراسات اخرى (Slomska *et al*, 1967; Guze *et al*, 1976) حينما اشاروا الى ان للبكتيريا ذات الجدار وفاقدة الجدار الخصائص نفسها من حيث حساسيتها للمضادات الحيوية والضرارة والتفاعلات السيرولوجية. وقد اظهرت بكتيريا السالمونيلا حساسية عالية تجاه المضاد الحيوي Ciprofloxacin إذ إن لهذا المضاد الحيوي كفاءة عالية في علاج الاصابات المتكررة ومنها الحمى المعوية كما تمتاز البكتيريا فاقدة الجدار بحساسيتها العالية تجاه هذا المضاد الحيوي، كما ان لهذا المضاد الحيوي اهمية في علاج الحمى المعوية الناتجة عن السلالات المقاومة (*S. typhi*; Griffin *et al*, 1998; Finch, 2000; Al- Musawi, 2001). أما وجود عزلات مقاومة من بكتيريا *S. typhi* للمضادات الحيوية فانه يعزى الى الاستعمال العشوائي لهذه المضادات وهذا يتفق مع دراسات عدد من الباحثين في هذا المجال (Abdel- Meseeh & Rafla, 1993; James, 1999; Ackers *et al*, 2000; 2001, Ahmad, 2002) الوزني وكذلك توجد عزلات مقاومة تعود لبكتيريا *S. Paratyphi A* (Chandel *et al*, 2000). وقد اكد Reese وجماعته على ضرورة عدم استعمال المضادات الحيوية بصورة عشوائية وذلك لفائدة المريض من جهة ولاطالة عمر المضاد الحيوي من جهة اخرى (Reese *et al*, 2000). ووضح Slomska وجماعته ان السبب في فشل العلاج بالمضادات الحيوية للبكتيريا فاقدة الجدار هو تخفي البكتيريا في انسجة المضيف زيادة على امكانية رجوعها الى البكتيريا ذات الجدار (Slomska *et al*, 1981).

الجدول 13.4 حساسية بكتريا السالمونيللا ذات الجدار وفاقدة الجدار المعزولة من مرضى الحمى المعوية المستديمة لمضادات الحيوية.

مضادات الحيوية	بكتريا فاقدة الجدار				بكتريا ذات جدار*			
	S	%	R	%	S	%	R	%
Cip	52	92.8	4	7.1	51	91.97	5	8.9
CRO	51	91.07	5	8.9	51	91.07	5	8.9
C	48	85.7	8	14.2	46	82.1	10	17.8
SXT	47	83.9	9	16	45	80.3	11	19.6
AMP	44	78.5	12	21.4	42	75	14	25
AMI	40	71.4	16	28.5	40	71.4	16	28.5
TE	25	44.6	31	55.3	24	42.8	32	57.1
CN	22	41	34	60.7	20	35.7	36	64.2
AN	13	23.2	43	76.7	12	21.4	44	78.5
P	0	0	56	100	2	3.5	54	96.4

□ تم الحصول على البكتريا ذات الجدار من خلال تحويل البكتريا فاقدة الجدار الى ذات الجدار بعملية الامرار المتسلسل Serial passage.

Cip: Ciprofloxacin, CRO: Ceftriaxone, C: Chloramphenicol, SXT: Trimethoprim/ Sulfamethoxazole, AMP: Ampicillin, Aml: Amoxycillin, TE: Tetracycline, CN: Gentamicin, AN: Amikacin, P: Pencillin G.

الاستنتاجات Conclusions

- 1- كانت تقنية التخفيف والمزرعة الثنائية الطور أكثر جدوى في استحصال اعلى نتائج زرعية من بين الطرائق.
- 2- البكتريا فاقدة الجدار من مجموعة السالمونيلا لها دور في استدامة مرض الحمى المعوية.
- 3- البكتريا المتخفية المشتركة مع استدامة الحمى المعوية كانت بجمع احادي وجمع مختلط.
- 4- استدامة الحمى المعوية كانت بنسب ضئيلة من المرضى %17.6 (12: 68) غير مفسرة وفق التقنيات المطبقة.
- 5- الوحدات التوالدية الاولية قد تكون سابحة في البلازما وتصيب الخلايا وتتموضع إمّا تحت الغشاء البلازمي وإمّا في الكتلة البروتوبلازمية كما وضحت نتائج الزرع.
- 6- بين اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية فروقاً واضحة بين فاقدة الجدار وذات الجدار لنفس النوع البكتيري ولنفس المضاد الحيوي.

التوصيات Recommendations

- 1- اضافة وسط مرق الفاريننت مع بقية الاوساط المستعملة في الزرع الروتيني لعينات الدم من مرضى الحمى المعوية المستديمة.
- 2- اجراء دراسة امراضية لبكتريا السالمونيلا فاقدة الجدار المتسببة في الحمى المعوية المستديمة باستعمال موديل تجريبي في الحيوانات المختبرية.
- 3- اجراء دراسات جزيئية حيوية (Molecular biological studies) لتحديد الاختلافات على المستوى الجزيئي في مكونات كل من البكتريا ذات الجدار والفاقدة للجدار المعزولة من مرضى الحمى المعوية المستديمة.
- 4- اجراء دراسات وراثية لتحديد الاختلافات الجينية والكروموسومية والبلازميدية بين البكتريا ذات الجدار والفاقدة للجدار المعزولة من مرضى الحمى المعوية المستديمة او المعزولة من امراض مقارنة.
- 5- محاولة تجربة طرق تقنية حديثة في الكشف والتشخيص المبكر لهذه الحمى او الامراض الناجمة عن البكتريا فاقدة الجدار مثل تطبيق احدى تقنيات PCR او التقنيات الاكثر حساسية والمتعلقة باستخدام امصال معلمة وغيرها من الطرق.

المصادر العربية

- الجبوري، حنان سلمان حسن، (1999). دراسة عن السالمونيلا والشيكللا من حالات الاسهال عند اطفال محافظة بابل، رسالة ماجستير، جامعة بابل- كلية العلوم.
- الرجب، وفاء حليم والقزاز، حسن، (1984). علم الاحياء المجهرية، الجزء الثاني، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل.
- الشبيب، اسفار شهاب (1989). البكتريا المرضية المعوية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. رئاسة الجامعة المستنصرية.
- الشهابي، عاصم عطا (1998). الميكروبات المعدية للانسان (1)، مركز الكتب الاردني، عمان، الاردن. ص 242-245.
- الناصرى، قاسم نجم عبيد (2002). دراسة بايولوجية جراثيم فاقدة الجدار لمرضى البيلة القححية والبيلة الدموية المستديمة. اطروحة دكتوراه، جامعة بابل- كلية العلوم.
- الوردي، حسين علي والعبيدي، فائزة محمود (1980). السالمونيلا وامراض معوية اخرى. الاصدار الثالث. وزارة الصحة- اللجنة العلمية في مستشفى اليرموك التعليمي.
- الوزني، وفاء صادق محسن (2001). دراسة عن الانتان الدموي في مرضى الضعف المناعي، رسالة ماجستير، جامعة بابل- كلية العلوم.

References

المصادر

- Abdel- Meseeh, M.A & Rafla, H. (1993). Diagnosis of typhoid fever by detection of specific IgM antibodies. Med. J. Cairo. Univ., 16 (1): 239- 244.

- Ackers, M.L.; Puhr, N.; Touxe, R.V. & Mintz, E.D. (2000). Laboratory: based surveillance of *Salmonella* serotype *typhi* infection in the United States. *JAMA.*, 383 (20): 2668- 2673.
- Ahmad, K. (2002). Experts call for surveillance of drug- resistant typhoid at a global level. *Lancet*, 359 (9306): 592.
- Alsoub, H. (1997). Sacroiliitis due to *Salmonella typhi*: A report of two cases. *Ann. Saudi. Med.*, 17: 331- 333.
- Altemeier, W. A.; Hill, E.O. & Fullen, W.D. (1969). Acute and recurrent thromboembolic disease: a new concept of etiology. *Ann. Surg.*, 170: 547-558.
- Al Musawi, H. K. (2001). Isolation and identification of cell- wall defective bacteria (L- form) from patients with urinary tract infection. Master's thesis, college of sciences, Kufa University.
- Arya, S.C. (1998). Sacroiliitis causing *Salmonella typhi*. *Ann. Saudi. Med.*, 18 (4): 370.
- Barile, M. F.; Van Zee, G.K. & Yaguchi, R. (1959). The occurrence of failures in penicillin- treated gonorrhoeal Urethritis. *Antibiotic Med. Clin. Therapy*, 6:470.
- Baron, E.J. & Finegold, S.M. (1990). *Baily's and Scott's Diagnostic Microbiology*, 8 th ed., Mosby- Year Book Inc., London. P. 249- 257.

- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, I. & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. *Am. J. Clin. Path.*, 45 (4): 439- 493.
- Benson, H.J. (1998). *Microbiology Applications Laboratory Manual in General Microbiology*. 7 th ed., WCB. McGraw- Hill. P. 158-162.
- Berkow, R.; Fletcher, A.J. & Chir, B. (1987). *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. 15 th ed., the Merck & co., Inc., USA.
- Bisset, K. A. & Bartlett, R. (1978). The isolation and characters of L-forms and reversions of *Bacillus licheniformis* var. *endoparasiticus* (Benedek) associated with the erythrocytes of clinically normal persons. *J. Med. Microbiol.*, 11: 335-349.
- Blumberg, P.M. & Strominger, J.L. (1974). Interaction of penicillin with the bacterial cell: Penicillin- binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. *Bacteriol. Rev.*, 38: 291-335.
- Brooks, G.F.; Butel, J.S. & Morse, S.A. (1998). Jawetz, Melnick and Adelberg's *Medical Microbiology*. 21 st ed., Appelton and Lange California. P. 226-230.
- Buxton, A. & Fraser, G. (1977). *Animal Microbiology*. (vol.) (1). 1 st ed., Black Well Scientific Pub. Ltd.
- Carleton, J. & Phair, J.P. (1972). The slow bactericidal effect of tetracycline and minocycline on wall- defective *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.*, 126: 457-459.

- Chandel, D.S.; Chaudhry, R.; Dhawan, B.; Pandey, A. & Dey, A.B.(2000). Drug- resistant *Salmonella enterica* serotype *paratyphi* A in India. *Emerg. Infect. Dis.*, 6 (4): 420-421.
- Charache, P. (1968). A typical bacterial forms in human disease In: *Microbial protoplasts, spheroplasts and L- form*. Guze, L.B. (ed.), Williams and Wilkins Co., Baltimore. p. 484-495.
- Cheadle, W.G. & Polk, H. C. (1997). Prevention of sepsis and septic complications in surgical patients. *Crit. Care. Med.*, 3: 308-313.
- Cheesbrough, J.S. & Rigby, A. (1989). Laboratory diagnosis of *Salmonella* infections. *Postgrad. Do.*, 12 (8): 348-358.
- Ciraj, A.M.; Reetika, D.; Bhat, G.K.; Pai, C.G. & Shivananda, P.G. (2001). Hepatic abscess caused by *Salmonella typhi*. *J. Assoc. Physicians. India*, 49: 1021-1022.
- Clasener, H. (1972). Pathogenicity of the L-phase of bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, P. 55-84.
- Collee, J.G.;Fraser,A.G.; Marmion, B.P. & Simmons, A. (1996). Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology. 14 th ed., The Churchill Livingstone Inc., U.S.A.
- Collins, C.H.& Lyne,P.M. (1989). *Microbiology Methods*. 6 th ed., Butter worths company Ltd.

- Cowan, S.J. (1985). Cowan and Steel Manual for Identification of Medical Bacteria, 2nd ed. Cambridge Univ. Press. U.K.
- Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B. P. & Swain, R.H.A. (1973). Medical Microbiology. Vol. 1, 12th ed., P. 314- 319. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion & Swain, R.H.A. (1975). Medical Microbiology. Vol. 11, 12th ed., London, Churchill Livingstone.
- Dansinger, B.L. & Suter, E. (1962). Endotoxic activity of L- forms derived from *Salmonella paratyphi B*. proc. Exptl. Biol. Med., 111: 399-400.
- Dienes, L. (1939). "L" organism of Klieneberger and *Streptobacillus moniliformis*. J. Infect. Dis., 65: 24-42.
- Dienes, L. & Sharp, J. T. (1956). The role of high electrolyte concentration in the production and growth of L-forms of bacteria. J. Bacterial., 71: 208- 213.
- Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagent for Microbiology and Clinical Laboratory Procedures (1984). 10th ed., Difco Laboratories. Detroit, Michigan, U.S.A.
- Dolman, C.E.; Kerr, D.E.; Chang, H. & Shearer, A.R. (1951). Two cases of rat- bite fever due to *Streptobacillus moniliformis*. Can. J. Public Health, 42: 228- 241.

- Domingue, G.J. (1980). Filterable cell associated cryptic bacterial forms in immunogenic renal disease. *Urol. Survey*, 30:1.
- Domingue, G.J. (1982). *Cell wall- Deficient Bacteria Basic Principles and Clinical Significance*. Addison- Wesley Pub. Com., Reading, Mass. P. 560-586.
- Domingue, G.J. (1995). Electron dense cytoplasmic particles & chronic infection: Bacterial pleomorphy hypothesis. *Endocytobiosis cell Res.*, 11 (1): 19-40 (Abs.)
- Domingue, G. J. & Schlegel, J.U. (1977). Novel bacterial structures in human blood: Cultural isolation. *Infect. Immun.*, 15: 621-627.
- Domingue, G.J.& Schlegel, J.U. (1978). Novel bacterial structures in human blood: Bacterial variants as etiologic agents in idiopathic hematuria. *Tran. Am. Assoc. Genito- Urinary Surgeons*, 69: 61-64.
- Domingue, G.J.; Thomas, R.; Walters, F.; Serrano, A. & Heidger, P.M. (1997). Elusive bacteria in idiopathic hematuria. *J. Urol.*: to be published.
- Domingue, G.; Turner, B. & Schlegel, J.U. (1974). Cell- wall deficient bacterial variants in kidney tissue detected by immunofluorescence. *J. Urol.*, 3 (3): 288- 292.

Domingue, G; Woody, H.B.; Farris, K. & Schlegel, J.U. (1979). Bacterial variants in urinary casts and renal epithelial cells. Arch. Intern. Med., 139: 1355- 1360.

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

Dutta, T.K; Beeresh & Ghotekar, L.H. (2001). A typical manifestations of typhoid fever. J. Postgrad. Med., 47 (4): 248- 251.

Edwards, P.R. & Ewing, W.H. (1972). Identification of *Enterobacteriaceae*. 3rd ed. Minnepolici Burgess publishing Company.

Falkow, S.C. (1997). Epidemiology and Clinical Microbiology. In: Microbiology Dynamics and Diversity. Perry, J.J. & Staley, J.T. (eds.), Saunders college publishing. Harcourt & Brace College publishers. p. 824-825.

Felton, J.M & Bryceson, A.D. M. (1996). Fever in the returning traveller. Br. J. Hos. Med., 55 (11): 705-711.

Finch, R. G. (2000). Ciprofloxacin efficacy and indications. J. Chemother., 12 suppl. 1: 5-7.

Gardiner, W.P. (1997). Statistical Analysis Methods for Chemists. A Soft Ware- Based Approach. The Royal Society of chemistry.

- Gardner, P. & Provine, H. T. (1975). Manual of Acute Bacterial Infections Early Diagnosis and Treatment. Little, Brown & company Boston. P. 161-301.
- Gouthaman, S.; Mathew, M.; Sekhar, U.; Manjunath, S.; Arthur, P. & Abraham, G. (2001). Diagnostic dilemma in coinfection. J. Assoc. Physicians India, 49: 1023- 1025.
- Griffin, G.E.. Sissons, J.G.P.; Chiodini, P.L. & Mitchell, D.M. (1999). Diseases due to infection. In: Davidson's Principles and Practice of Medicine. 18 th ed., Haslett, C.; Chilvers, E.R.; Hunter, J.A.A. & Boon, N. (eds.), Churchill- Livingstone, Edinburgh and Cambridge. p.123- 125.
- Guze, L.B.; Harwich, H.J. & Kalmanson, G.M. (1976). *Klebsiella* L-forms; effect of growth as L form on virulence of reverted *K. Pneumonia*. J. Infect. Dis., 133: 245-252.
- Heidger, P.F.; Domingue, G.J.; Larsen, W.J. & Smith, T.W. (1982). Fine Structural Studies of Cell Wall- Deficient Bacteria Isolated from Human Blood and Urine. In: Cell Wall- Deficient Bacteria Basic Principles and Clinical Significance. Domingue, G.J. (ed.), Addison- Wesley publishing com., Reading, Mass. p. 149-185.
- Hewitt, W.L.; Seligman, S.J. & Deich, R.A. (1968). Relationship of the antibiotic sensitivity of enterococci to acquired resistance in their L- forms. In: Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L- forms.

- Guze, L.B. (ed.), Williams & Wilkins company, Baltimore. p. 311-313.
- Harada, Y.; Deguchi, T.; Kuriyama, M.; Ban, Y. & Kawada, Y. (1992). Clinical evaluation of SD- 8828 (antibody coated bacteria assay kit) in urinary tract infection. *Kansenshogaku. Zasshi.*, 66 (9) 1283-1287.
- Hibma, A.; Jassim, S. & Griffiths, M. (1996). *In vivo* bioluminescence to detect the attachment of L- forms of *Listeria monocytogenes* to food and clinical contact surfaces. *Intern. J. Food Microbiol.*, 33 (2-3): 157-167.
- Hill, E.O. & Lewis, S. (1964). L- form of bacteria isolated from surgical infections. *Bacteriol. Proc. Am. Soc. Microbiol.*, P. 48.
- Holt, J.G. Krieg, N.R.; Sneath, P.H.; Staley, J.T. & Stanley, W.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 th ed., Williams and Wilkins, U.S.A. p. 175-188.
- Hubert, E.G.; Kalmanson, G.M.; Montgomerie, J.Z. & Guze, L.B. (1972). Activity of methacycline, related tetracycline and other antibiotics against various L- forms and their parent bacteria *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2: 276-280.
- James, A.M.; Hill, M.J. & Maxted, W.R. (1965). A comparative study of the bacterial cell wall, protoplast membrane and L- form envelope of *Streptococcus pyogenes*. *Antonie Von Leeuwenhoek*, 31: 423-432.

- James, J. (1999). The mechanisms and the spread of antibiotic resistance. *Pediatr. Ann.*, 28 (7): 446-452.
- Jasmi, A.Y.; Rohaizar; Meah, F.A & Sulaiman, B.T. (1998). Typhoid thyroiditis. *Med. J. Malaysia*, 53 (1): 109-111.
- Jawetz, E.; Melnick, J.L. & Adelberg, E.A. (1987). Review of Medical Microbiology. 17 th ed., Appelton and Lange California. p. 241-244.
- Kadappu, K.K.; Rao, P.V.; Srinivas, N. & Shastry, B.A. (2002). Pancreatitis in enteric fever. *Indian J. Gastroenterol.*, 21 (1): 32-33.
- Kagan, B.M. (1972). L- forms. In: *The Staphylococci*. Cohen, J.O. (ed.), John Wiley and Sons, Inc., U.S.A. p. 65-74.
- Khosla, S. N. (1977). Typhoid perforation. *J. Trop. Med. Hyg.*, 80 (4): 83-87.
- Klieneberger- Nobel, E. (1949). On *Streptobacillus moniliformis* and filtrability of its L- forms. *J. Hyg.*, 47: 393-395.
- Klieneberger- Nobel, E. (1951). Filterable forms of bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 15: 77-103.
- Knapp, R.G. & Miller, M.C. (1992). *Clinical Epidemiology and Biostatistics*. Williams & Wilkins Awaverly Company. P. 144-415.

- Kudlai, D.G.; Soloviev, N.N. & Prozorovsky, S.V. (1961). Penicillin protoplasts of intestinal bacteria. *ZN. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 32: 22-28.
- Labar, W.D. (1977). Isolation and identification of cell wall- deficient microorganisms from infection. Master thesis, Department of biological sciences, Wayne state University, Detroit, Michigan.
- Lawson, J.W. (1982). Induction of The L- form of Bacteria. In: Cell wall- Deficient Bacteria Basic Principle and Clinical Significance. Domingue, G.J. (ed.), Wesley publishing. Com., Reading, Mass. p. 75-99.
- Louria, D.B.; Kaminski, T.; Kapila, R.; Tecson, F. & Smith, L. (1976). Study on usefulness of hypertonic culture media. *J. Clin. Microbiol.*, 4: 208-213.
- Macfaddin, J.F. (1979). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 1 st ed., Baltimore: Williams and Wilkins company.
- Macfaddin, J.F. (2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 3 rd ed., Lippincott Williams & Wilkins Co., Baltimore, U.S.A. p. 27-439.
- MacSween, R.N.M.& Whaley, K. (1992). *Muir's Text Book of Pathology*. 13 th ed., Arnold international student's edition. p. 706-707.

- Mann, C.V.; Russell, R.C.G. & Williams, N.S. (1995). Bailey's & Love's short practice of surgery. 22 nd ed., Chapman & Hall Medical. p. 798.
- Marston, J. (1961). Observations on L- forms of Staphylococci. J. Infect. Dis., 108: 75-84.
- Mattman, L.H. (1974). Cell wall- deficient forms. CRC press, Cleveland.
- Mattman, L.H. & 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. (ed.), Addison – Wesley pub. Co., Reading, Mass. p. 427-451.
- Mattman, L.H. (1993). Rheumatic fever & Erysipelas Cross- Reacting Antibody. In: Cell wall- Deficient Forms: Stealth Pathogens, 2 nd ed., Mattman, L. H. (ed.), CRC press, Inc. Boca Raton, Fla. p. 155.
- Medill- Brown, M.; Hutchinsom, W.G. & Cocklin, E. (1960). The L- forms of *Proteus mirabilis*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 79: 374-379.
- Merline, J.R.; Golden, A. & Mattman, L.H. (1971). Cell wall- deficient bacterial variants from man in experimental cardiopathy Am. J. Clin. Pathol., 55: 212-220.
- Mims, C.A. (1982). The Pathogenesis of Infectious Disease. 2 nd ed., Academic press, London. LTD. p. 85-92.

- Montgomerie, J.Z.; Kalmanson, G.M. & Guze, L.B. (1966). The effects of antibiotics on the protoplast and bacterial forms of *Streptococcus faecalis*. J.Lab. Clin. Med., 68: 543-551.
- Nicolaides, A.N.; Kakkar, V.V.; Field, E.S. & Spindler, J. (1972). Antibiotics, postoperative infection, and deep- vein thrombosis. Br. J. Surg., 59: 303.
- Pandey, C.K.; Singh, N.; Kumar, V.; Agarwal, A. & Singh, P.K. (2002). Typhoid, hepatitis E, or typhoid and hepatitis E: The cause of fulminant hepatic failure a diagnostic dilemma. Crit. Care. Med., 30 (2): 376-378. (Abs.)
- Panos, C. (1965). Cellular physiology during logarithmic growth of a Streptococcal L- form. J. Gen. Microbiol., 39: 131-138.
- Patterson, S.K. & Gilpin, R.W. (1982). Basic biology of cell wall-deficient bacteria. In: Cell Wall- Deficient Bacteria Basic Principles and Clinical Significances. Domingue, G.J. (ed.), Addison- Wesley publishing co., Reading, Mass. p. 1-44.
- Pearson, R.D. & Guerrant, R.L. (1995). Enteric fever and other causes of abdominal symptoms with fever. In: Principles and Practice of Infectious Diseases. 4 th ed., Mandell, G.L.; Bennett, J.E. & Dolin, R. Churchill Livingstone, New York. p. 998- 1012.
- Phair, J.P.; Votankunakorn, C.; Linnemann, C. & Carleton, J. (1974). Attempts to isolate wall- defective microbial variants from clinical specimens. Amer. J. Clin. Pathol., (U.S.A.), 62: 601-603.

- Ponig, B.; Domingue, G. & Schlegel, J. (1972). The role of *in vitro* induced microbial L- forms in experimental hematogenous pyelonephritis. *Invest. Urol.*, 9 (4): 282-285.
- Prescott, L.M.; Harley, J.P. & Klein, D.A. (1990). *Microbiology*. W.M.C. Brown publishers. P. 53.
- Prince, A. (2002). Infectious disease. In: *Nelson Essentials of Pediatrics*. 4 th ed. Behrman, R.E. & Kliegman, R.M. (ed.), W.B. Saunders company. p. 416.
- Reese, R.E.; Betts, R.F. & Gumstop, B. (2000). *Handbook of antibiotics*. 3 rd ed., Lippincott Williams and Wilkins. p. 285.
- Rogers, T. & Wadula, J. (2001). *Salmonella typhi* liver abscess. *S. Afr. J. Surg.*, 39 (4): 137-138.
- Schegolve, A.G. (1970). On certain general regularities of individual response of typhoid fever bacteria strains to L- transforming effect of penicillin. *Antibiotiki*, 15: 240-243.
- Schifferli, J.A.N.; Ng, Y.C. & Peters, D.K. (1986). The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N.Engl. J. Med.*, 315: 488-495.
- Schonfeld, J.K. (1959). L- forms of Staphylococci; their reversibility; changes in the sensitivity pattern after several intermediary passages in the L- phase. *Antonie VanLeeuwenhoek*, 25: 325-331.

- Sela, S.; Neeman, R.; Killer, N. & Barzilai, A. (2000). Relationship between a symptomatic carriage of *Streptococcus pyogenes* and the ability of the strains to adhere to be internalised by cultures epithelial cells. *J. Med. Microbiology*, 49: 499-502.
- Shanson, D.C. (1978). Blood culture techniques. In: *Modern Topics in Infection*. Williams, J.D. (ed.), William Heinemann medical books limited, London. p. 14-31.
- Singleton, p. (1997). *Bacteria in biology, biotechnology and medicine*. 4 th ed., John Wiley and Sons. p.241.
- Slomska, J.S. (1982). Antibiotic susceptibilities of cell wall- deficient bacteria and reverted bacteria in clinical and experimental studies. In: *Cell Wall- Deficient Bacteria: Basic Principles and Clinical Significance*. Domingue, G. J. (ed.), Addison Wesley publishing co. Reading Mass. p. 489-523.
- Slomska, J.S.; Sacqute, E. & Caravano, R. (1967). Group A Streptococcal L- forms persistence among inoculated mice. *J. Bacteriol.*, 93 (1): 451-455.
- Slomska, J.; Caravano, R.; Anol, M.; M.; Gay, B. & Roux, J. (1981) *In vivo* conversion of *Brucella suis* to L- forms after pencillin treatment. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*.132 A- 252- 265.
- Slomska, J. & Roux, J. (1977). Cell wall- defective organism as a model for the study of antibiotic activity. In: *Spheroplasts, Protoplasts and*

L- forms of Bacteria. Roux, J. (ed.), Editions INSERM, vol. 64, Paris. p. 185-196.

Stukus, P.E. (1997). Investigating Microbiology A Laboratory Manual for General Microbiology. Harcourt Brace & company. P. 439-442.

Swaddiwudhipong, W. & Kanlayanaphotrporn, J. (2001). A common-source water- borne out break of multidurg- resistant typhoid fever in a rural Thai. Community. J. Med. Assoc. Thai., 84 (1): 1513-1517.

Tedeschi, G.G.; Bondi, A.; Paparelli, M. & Sprovieri, G. (1978). Electron microscopical evidence of evolution of *corynebacterium*- like microorgansims within human erythrocytes. Experientia, 34: 458-460.

Thomas, C.G. (1983). Medical Microbiology. 5 th ed., Bailliere Tindolly, London. p. 253-265.

Vollum, R.L.; Jamison, D.G. & Cummins, C.S. (1970). Fair Brother's Text Book of Bacteriology, 10 th ed., chap. XVII, Arnold Heinemann, India. p. 202-221.

Walter, J.B; Talbot, I.C.; Gardener, H.A.; Halloran, P.F., Zuckerman, M.; Bird, A.G. & Forbes, A. (1996). Walter and Israel General Pathology. 7 th ed., Churchill- Livingstone, New York. p. 154-196.

Weibull, C. & Beckman, H. (1960). Growth of bacterial L- forms and bacterial protoplasts. J. Bacterial., 79: 638-649.

- Weinberger, J. H.; Madoff, S. & Dienes, L. (1950). The properties of L-forms isolated from *Salmonella* and the isolation of L-forms from *Shigella*. J. Bacteriol., 59: 765- 775.
- Wieckiewicz, J. (1979). Loss of virulence of revertants from *Staphylococcus aureus* L-forms variants in comparison with the parent strain. J. Hy. Epid. Microbiol. Immunol., 23: 326-331.
- Wilson, S.G. & Miles, S.A. (1975). Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Vol.2, 6 th ed. Edward Arnold, London. P. 2004.
- Wisteriech, G.A. & Lenchtman, M.D. (1980). Laboratory exercises in microbiology. 4 th ed., Glenco publishing co. U.S.A.
- Wittler; R.G.; Malizia, W.F.; Kramer, P.E.; Tuckett, J.D.; Pritchard, H.N. & Baker, H.J. (1960). Isolation of a *Corynebacterium* and its transitional forms from a case of subacute bacterial endocarditis treated with antibiotics. J. Gen. Microiol., 23: 325-333.
- Woody, H.B.; Walker, P.D. & Domingue, G. (1982). Genesis of the Urinary oval body by intracellular lipid- adsorbing cell wall-deficient bacteria In: Cell Wall- Deficient Bacteria Basic Principles and Clinical Significance. Domingue, G. (ed.), Addison Wesley publishing Co., Reading Mass. p. 219-230.
- W. H. O. (1983). Manual for Laboratory Investigation of Acute Enteric Infection. WHO/ CDD/83.3.
- Wyrick, P.; McConnell, M. & Rogers, H. (1973). Genetic transfer of the stable L-form state to intact bacterial cells. Nature 24: 505-507.

- Yamamoto, A. & Homma, J.Y. (1978). L- form of *Pseudomonas aeruginosa* 11. Antibiotic parent forms, Jpn. J. Exp. Med., 48: 355-362.
- Yamamoto, A. & Homma, J.Y. (1979). Isolation of unstable L-forms from clinical specimens with *Pseudomonas* infection during antibiotic therapy. Jpn. J. Exp. Med. 49: 361-364.
- Young, L.S. (1982). Gram negative bacillary colonization and bacteremia in the compromised host. *Infection*, 10 (5): 310-323.
- Yousif, Z. A. & Aladin, A.S.A. (1998). Guide to chemotherapy and chemoprophylaxis in bacterial infection, 2 nd ed., World Health Organization.
- Zubkov, M.N. & Shchegolev, A.G. (1976). Comparative characteristics of antigenic peculiarities and several other properties of stable long- term culture of *Salmonella* L-forms. *Zh. Microbiology. Epidemiol. Immunobiol.*, (3): 38:42.

Summary

The aim of the present work was to study the biology of cell wall defective bacteria associated with persistent enteric fever.

This study was including 268 sepsis patients 68 of them were persistent enteric fever patients, the number of males was 30: 68 (44.1%) and the number of females was 38: 68 (55.8%).

Each blood sample was processed in seven methodologies. These methodologies were included in three techniques: Sequential cultures, dilution and biphasic cultures.

These techniques were used to isolate the cell wall defective bacteria (CWDB) because the isolation of these bacteria was difficult by using the routine blood culture.

The localization of the causative agents were concerned, CWDB were occurred in five interpreted patterns and one was uninterpreted where the causative couldn't be cultivated and identified by the applied techniques.

The CWDB was found in one or more of the following locations:

Whole blood, Blood supernate, White or red cell surfaces, Inside white blood or red blood cells.

It was evident that cultivation of the diluted filtered blood and biphasic cultures were the best in identification of CWDB among the others applied in this study.

As Z statistics and index of sensitivity were indicated for these methods.

From the morphological and cultural characteristics the life cycle of CWDB was suggested. The life cycle was starting with elementary reproductive units (ERUs).

The CWDB was filterable and sequezzable. The results showed that the cell wall defective *Salmonella* was isolated from 56 (82.3%) of cases.

In 3 cases (4.4%) the enteric fever was associated with malta fever. The *Salmonella typhi* was isolated from 49 cases (72%), *Salmonella paratyphi B* was isolated from 5 cases (7.3%) and *Salmonella paratyphi A* was isolated from two cases (2.9%).

The ages of patients were (6-53) years. The infection was higher in the ages between (16-20) years 16:68 (23.5%) cases then ages between (11-15) years and the ages (26-30) 10: 68 (14.7%) cases.

The antibiotic sensitivity of CWDB was studied and showed that the ciprofloxacin was the most effective drug. (92.8%). And the CWDB was very resistant to pencyllin which act on the cell wall but the CWDB was sensitive to the drugs which act on the protein synthesis and nucleic acids.

Biology of Cell Wall Defective Bacteria Associated with Cryptic Enteric Fever in Human

A thesis

Submitted to the college of science. University of Babylon In A partial fulfillment of the requirements for the degree of Master In Biology/ Microbiology.

By

Shaimaa Jassim Mohemeed

Al- Sultany

September 2003