Bacteriological and Genetic Studies on Streptococci Isolated from the Upper Respiratory Tract Infections

A Thesis
Submitted to the Council of the College of Science
University of Babylon
In Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree in Biology / Microbiology

By

Israa Adnan Ibraheam Al - Baghdady

May-٢٠٠٦ **Rapee Althani -١٤٢٧**

دراسة بكتريولوجية ووراثية للمسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي

رسالة مقدمة إلى
مجلس كلية العلوم - جامعة بابل
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير
علوم الحياة / أحياء مجهرية

من

إسراء عدنان إبراهيم البغدادي

أيار- ٢٠٠٦ ربيع الثاني-١٤٢٧

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ اللَّهُ نُورُ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ مَثَلُ نُورِهِ كَمِشْكَاةٍ فِيهَا مِصْبَاحٌ
الْمِصْبَاحُ فِي زُجَاجَةٍ الزُّجَاجَةُ كَأَنَّهَا كَوْكَبٌ دُرِّيٌّ يُوقَدُ مِنْ
شَجَرَةٍ مُبَارَكَةٍ زَيْتُونَةٍ لَا شَرْقِيَّةٍ وَلَا غَرْبِيَّةٍ يَكَادُ زَيْتُهَا يُضِيءُ وَلَوْ لَمْ
تَمْسَسْهُ نَارٌ نُورٌ عَلَى نُورٍ يَهْدِي اللَّهُ لِنُورِهِ مَنْ يَشَاءُ وَيَضْرِبُ اللَّهُ
الْأَمْثَالَ لِلنَّاسِ وَاللَّهُ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ ﴾

صدق الله العلي العظيم
سورة النور
(الآية ٣٥)

الإهداء

إلى الشمعة التي تنير طريقي ..... والدي الحنون

الى من وضعت الجنة تحت اقدامها ..... والدتي

إلى من ساندوني طيلة حياتي .....

اخوتي حسنين وامل وابتسام

اسراء

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين محمد الامين وعلى آله الطيبين الطاهرين.

بعد الشكر لله على ما أمدني من قوة وصبر ومثابرة وتوفيق في إتمام بحثي أتقدم بوافر الشكر والتقدير إلى الدكتورة رباب عمران راضي لاقتراحها موضوع البحث واشرافها المباشر عليه طوال مدة البحث والكتابة وفقها الله لدوام الخير والعطاء.

يسرني ان أتقدم بالشكر الجزيل إلى كل من رئاسة جامعة بابل وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة لاتاحتهم الفرصة لاكمال دراستي .

واتقدم بالشكر الجزيل إلى إلى كل من مد يد العون والمساعدة ولو بكلمة طيبة من اساتذتي الافاضل وأخص منهم بالذكر الأستاذ الدكتور إبراهيم محمد سعيد شناوة المشرف على مختبر الأحياء المجهرية المتقدم، كما اتقدم بالشكر الجزيل إلى جميع منتسبي قسم علوم الحياة والمكتبة المركزية في جامعة بابل ومنتسبي وحدة الاطاريح في جامعة بغداد.

شكري وامتناني إلى أخواتي (زينة هادي وزينب خضر وعروبة كطوف وأنوار علي وذكرى عبد العال وأنوار كاظم ولبنى عبد العظيم ولبنى عبد المطلب وأميرة) في مختبري الأحياء المجهرية المتقدم والفطريات المتقدم، كما أتقدم بشكري وتقديري إلى شقيقي الحبيب (الدكتور حسنين عدنان) ولا أنسى شقيقتي (أمل وابتسام) لما أبدوه من تحفيز وتشجيع خلال فترة الدراسة.

F

توصية الأستاذ المشرف

أشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (**دراسة بكتريولوجية و وراثية للمسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي**) قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / أحياء مجهرية.

التوقيع
المشرف: د. رباب عمران راضي
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى توصية الأستاذ المشرف أعلاه، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:
الاسم: د. كريم حميد رشيد
المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

ز

قرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة التقويم والمناقشة، بأننا اطلعنا على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالبة اسراء عدنان ابراهيم البغدادي في محتوياتها، وفيما له علاقة بها، ووجدنا أنها جديرة لنيل درجة ماجستير في علوم الحياة– الاحياء المجهرية.

رئيس اللجنة

التوقيع:
الاسم: د. محمد شمخي جبر
المرتبة العلمية: استاذ
العنوان:
التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: د. محمد صبري عبد الرزاق
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: كلية الطب/ جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: د. حسن فاضل ناجي
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع:
الاسم: د. رباب عمران راضي
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

مصادقة عمادة كلية العلوم

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه.

التوقيع:
الاسم: أ. د. عوده مزعل ياسر
المرتبة العلمية: استاذ
العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل
التاريخ: / /٢٠٠٦

الخلاصة

تم عزل ٢٧ عزلة من البكتريا التابعة للمسبحيات من ٩٤ مسحة بلعوم لمرضى مصابين بأمراض الجهاز التنفسي العلوي للفترة من كانون الثاني ٢٠٠٤ ولغاية أب ٢٠٠٤.

شخصت المسبحيات المعزولة بالاعتماد على صفاتها الزرعية و المظهرية و الكيموحيوية والمصلية فكانت ١٥ عزلة منها تعود للنوع *Streptococcus pyogenes* و ٥ عزلات تعود للنوع *S. mitis* و٣ عزلات للنوع *S. equi* و عزلتين لكل من النوعين *S. salivarius* و *S. suis*.

أظهرت نتائج دراسة بعض عوامل الضراوة التي قد تمتلكها المسبحيات المعزولة بان جميع العزلات تحتوي على المحفظة وان جميع العزلات العائدة للنوعين *S. pyogenes* و *S. equi* منتجة للهيمولايسين بيتا وانزيم الستربتوكاينيز. كما اظهرت عزلتين من *S. pyogenes* وعزلة واحدة من *S. equi* القدرة على انتاج انزيم السيستاين بروتييز , و اظهرت اربعة عزلات من *S. pyogenes* وعزلة واحدة من *S. equi* القدرة على انتاج الذيفانات المولدة للحمرة , في حين لم تتمكن أي من المسبحيات المعزولة من انتاج السايدروفور.

اختبرت حساسية المسبحيات المعزولة لبعض المضادات الحيوية وبينت النتائج بان العزلات جميعها مقاومة لمضاد التراي مثبريم (١٠٠%) في حين تباينت مقاومتها للمضادات الاخرى فقد كانت مقاومتها للامبسلين (٩٦.٢٩%) والاموكسسلين (٨٨.٨٨%) والريفامبسين (٨٥.١٥%) و الكلوكسسلين (٨١.٤٨%)، كما كانت مقاومتها للكلندامايسين (٦٦.٦٦%) و السيفالكسين (٤٨.١٤%) والارثرومايسين والسيفاكلور (٤٤.٤٤%) و التتراسايكلين و اللنكومايسين (٤٠.٧٤%) و النوفابايوسين (٢٩.٦٢%) والستربتومايسين والكلورامفنيكول(٢٥.٩٢%) ، في حين كانت جميع العزلات حساسة لمضاد الفانكومايسين.

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص من المسبحيات المعزولة اشتراكها بوجود بلازميد منفرد كبير الحجم واحتواء العزلات١٥,١٤,١٣,١٢,٩,٨,٦,٤,٣,١ *S. pyogenes* و١ *S. mitis* و١,٢ *S. salivarius* و١ *S. suis* على بلازميدات صغيرة الحجم. كما بينت نتائج الاقتران البكتيري للعزلات ٩ , ٨ , ١ *S. pyogenes* والعزلات ١ *S. mitis* و ١ *S. salivarius* ٢ , بان البلازميدات الموجودة في هذه العزلات غير قادرة على الانتقال بالاقتران إلى البكتريا السالبة لصبغة غرام إذ لم تتمكن من الانتقال إلى العزلة القياسية *E. coli* MM٢٩٤ أو *E. coli* HB١٠١ الخاليتين من البلازميدات. وعند اجراء التحول الوراثي لهذه البلازميدات الى الخلايا المؤهلة من بكتريا *E. coli* MM٢٩٤ اظهرت النتائج انتقال صفة المقاومة للامبسلين و الاموكسسلين و الارثرومايسين و التتراسايكلين و التراي مثبريم و الستربتومايسين و الكلورامفنيكول

والكلندامايسين و السيفالكسين إلى الخلايا المتحولة, مما قد يشير إلى كون هذه الصفات محمولة على البلازميد كذلك يشير إلى قابلية هذه البلازميدات على التعبير الجيني في البكتريا السالبة لصبغة غرام.

Summery

٢٧ isolates of streptococci were isolated from ٩٤ throat swabs which collected from patients suffering from upper respiratory tract infections during , the period of January, ٢٠٠٤ to August, ٢٠٠٤.

The isolated streptococci were identified according to their morphological, cultural, biochemical, and serological properties. The results revealed that ١٥ isolates belong to *Streptococcus pyogenes*, five isolates to *S. mitis*, three isolates to *S. equi*, and two isolates to both *S. suis* and *S. salivarius*.

Some of the virulence factors of the isolates were studied, and the results showed that these isolates were capsulated, and all *S. pyogenes* and *S. equi* isolates were able to produce the β-hemolysin, only two isolates of *S. pyogenes* and one of *S. equi* had the ability to produce cystein protease (erythrogenic toxin B), and four isolates of *S. pyogenes* and only one of *S. equi* showed the ability to produce erythrogenic toxins. While non of all the isolated streptococci appeared to produce siderophores.

Also the antibiotic sensitivity tests showed that all of the isolates were resistant to trimethoprim (١٠٠٪), and variably resistant to the other antibiotics including, ampicillin (٩٦.٢٩٪) amoxicillin (٨٨.٨٨٪), rifampcin (٨٥.١٥٪), cloxacillin (٨١.٤٨٪), clindamycin (٦٦.٦٦٪), cephalexin (٤٨.١٤٪), erythromycin and cefaclor (٤٤.٤٤٪), tetracycline and lincomycin (٤٠.٧٤٪), novabiocin (٢٩.٦٢٪), streptomycin and chloramphenicol (٢٥.٩٢٪). All isolates were sensitive to vancomycin.

The agarose gel electrophoresis, of DNA samples of the isolates showed, the presence of a common large plasmid in all the isolates, also the

presence of small plasmid bands in the isolates *S. pyogenes* ١, ٣, ٤, ٦, ٨, ٩, ١٢, ١٣, ١٤, ١٥, *S.mitis* ١, *S. salivarius* ١, ٢ and *S. suis* ١ .

The results of conjugation experiments, using three isolates of *S. pyogenes*, one isolate of *S. mitis* and *S. salivarius*, as doner and the plasmidless standerd strainS *E. coli* MM٢٩٤ and *E. coli* HB١٠١ as recipients, revealed that neither large, nor small plasmid bands, were able to transfer by conjugation. While the transformation experiments, showed the ability of these plasmids, to transform *E. coli* MM٢٩٤ into multidrug resistant, and this indicate that these plasmids, may harbour the genes encoding for drug resistance, and had the ability to show its expression in gram negative bacteria.

المحتويات

الموضوع	الصفحة
المحتويات	III
قائمة الجداول	VI
قائمة الأشكال	VII
قائمة المختصرات	VIII
الفصل الاول: المقدمة	
١-١ المقدمة	١
الفصل الثاني: استعراض المراجع	
٢-١ بكتريا *S. pyogenes*	٣
٢-٢ العوامل المرتبطة بالامراضية	٥
٢-٢-١ المحفظة	٦
٢-٢-٢ انزيم الستربتوكاينيز	٩
٢-٢-٣ انظمة نقل الحديد	١٢
٢-٢-٣-١ انتاج الهيمولايسين	١٢
٢-٢-٣-٢ انتاج السايدروفور	١٦
٢-٢-٤ الذيفانات المولدة للحرارة	١٩
٢-٢-٥ المقاومة للمضادات الحيوية	٢٣
٢-٣ التكوين الوراثي للمسبحيات	٢٩
الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل	
٣-١ المواد والاجهزة المختبرية	٣٥
٣-١-١ الاجهزة والادوات المختبرية	٣٥
٣-١-٢ المواد الكيمياوية والبايولوجية	٣٦
٣-١-٣ سلالات البكتريا والبلازميدات	٣٧
٣-١-٤ الحيوانات المختبرية	٣٧
٣-٢ المحاليل	٣٧
٣-٢-١ محاليل المضادات الحيوية	٣٧
٣-٢-٢ محاليل كواشف الاختبارات الكيموحيوية	٣٩
٣-٢-٣ المحاليل والصبغات المستعملة في التحري عن عوامل الضراوة	٣٩
٣-٢-٤ انبوبة ماكفرلاند رقم ٥	٤٠
٣-٢-٥ دارئ Sline- EDTA	٤٠
٣-٢-٦ دارئ STE	٤١
٣-٢-٧ محلول ٢٥٪ SDS	٤١
٣-٢-٨ محلول الفينول	٤١
٣-٢-٩ الكلوروفورم: ايزواميل الكحول	٤١
٣-٢-١٠ مزيج الفينول: الكلوروفورم: ايزواميل الكحول	٤١
٣-٢-١١-٩ دارئ TE	٤٢
٣-٢-١٢ محلول صبغة بروميد الاثيديوم	٤٢
٣-٢-١٣ دارئ التحميل	٤٢
٣-٢-١٤ دارئ TBE	٤٢
٣-٣ الاوساط الزرعية	٤٢

الموضوع	الصفحة
٣-٣-١ الاوساط الزرعية الجاهزة	٤٢
٣-٣-٢ الاوساط الزرعية المحضرة	٤٣
٣-٤ طرائق العمل	٤٦
٣-٤-١ العزل	٤٦
٣-٤-٢ التشخيص	٤٦
٣-٤-٣ الحفظ	٤٩
٣-٤-٤ اختبار مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية	٥٠
٣-٤-٤-١ اختبار مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية بطريقة الاقراص	٥٠
٣-٤-٤-٢ اختبار مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية النمو في الوسط الصلب	٥١
٣-٤-٥ التحري عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا	٥١
٣-٤-٥-١ التحري عن وجود المحفظة	٥١
٣-٤-٥-٢ انظمة نقل الحديد	٥١
٣-٤-٥-٢-١ انتاج الهيمولايسين	٥١
٣-٤-٥-٢-٢ التحري عن انتاج السايدروفور	٥١
٣-٤-٥-٣ التحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الستربتوكاينيز	٥٢
٣-٤-٥-٤ التحري عن انتاج انزيم السيستاين بروتييز	٥٢
٣-٤-٥-٥ التحري عن انتاج الذيفانات المولدة للحمرة	٥٢
٣-٤-٦ عزل الدنا	٥٣
٣-٤-٧ الترحيل الكهربائي	٥٤
٣-٤-٨ الاقتران البكتيري	٥٥
٣-٤-٩ التحول الوراثي	٥٦
الفصل الرابع: النتائج والمناقشة	
٤-١ العزل والتشخيص	٥٨
٤-٢ التحري عن بعض عوامل ضراوة المسبحيات	٦١
٤-٢-١ المحفظة	٦١
٤-٢-٢ انظمة نقل الحديد	٦٤
٤-٢-٢-١ الهيمولايسين	٦٤
٤-٢-٢-٢ السايدروفور	٦٥
٤-٢-٣ انزيم الستربتوكاينيز	٦٦
٤-٢-٤ التحري عن قدرة المسبحيات على انتاج انزيم السيستاين بروتييز	٦٨
٤-٢-٥ التحري عن قدرة المسبحيات على انتاج الذيفانات المولدة للحمرة	٧٠
٤-٣ مقاومة المسبحيات للمضادات الحيوية	٧٣
٤-٤ المحتوى البلازميدي	٧٨
٤-٥ الاقتران البكتيري في الوسط الصلب	٨٢
٤-٦ التحول الوراثي	٨٤
الفصل الخامس: الاستنتاجات والتوصيات	
٥-١ الاستنتاجات	٩٠
٥-٢ التوصيات	٩١
المصادر	٩٢
المخلص باللغة الانكليزية	

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
(٢-١)	مدى المضائف لبلازميدات مقاومة الماكروليدز في المسبحيات	٣١
(٤-١)	التوصيف الكيموحيوي و المصلي للمسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي	٦٠
(٤-٢)	بعض عوامل ضراوة بكتريا المسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي	٦٣
(٤-٣)	قدرة بعض عزلات المسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي على إنتاج الذيفانات المولدة للحمرة	٧٣
(٤-٤)	مدى مقاومة المسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي للمضادات الحيوية المستعملة	٧٥
(٤-٥)	النسب المئوية لمقاومة الأنواع المختلفة للمسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي للمضادات الحيوية المستعملة	٧٦
(٤-٧)	صفات المقاومة المنقولة بعملية التحول الوراثي وتردد التحول	٨٩

الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
(٢-١)	الخارطة الكروموسومية للسلالة *S. pyogenes* SF٣٧٠ (النمط المصلي M١)	٣٤
(٤-١)	اختبار قدرة بكتريا *S. pyogenes* و*S. mitis* و *S. equi* على إنتاج الذيفانات المولدة للحمرة في جلد الأرنب	٧٢
(٤-٢a,b)	الترحيل الكهربائي للدنا الكلي المستخلص من بكتريا *S. pyogenes* المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي	٧٩-٨٠
(٤-٣)	الترحيل الكهربائي للدنا الكلي المستخلص من بعض عزلات بكتريا *S. mitis* و *S. equi* المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي	٨١
(٤-٤)	الترحيل الكهربائي لدنا الخلايا المتحولة *E. coli* transformants و السلالات الواهبة ٩ , ٨ , ١ *S. pyogenes* والسلالة القياسية المستلمة *E. coli* MM٢٩٤	٨٧
٤-٥	الترحيل الكهربائي لدنا المتحولات *E. coli* transformants و السلالات الواهبة ١ *S. mitis* و ١,٢ *S. salivarius*	٨٨

قائمة المختصرات

الاختصار	المصطلح
ABC transporter	ATP Binding Casscatte transporter
APSGN	Acute post streptococcal glomerulonephritis
APC	Antigen processing cells
CCCP	Carbonyl cyanide chlorophenylhdazone
Erm	Erythromycin resistance methelases
Ex	Element X
has	hyaluronic acid synthesis
IS	Insertion sequence
LTA	Lipotocoic acid
Mef	Macrolides drug efflux
MF	Mitogenic factor or SPE F
Mga	Multiple gene activator
PAM	Plasminogen- binding group A streptococcal protein
Pel	Pleiotropic effect locus
Plr	Plasminogen receptor
Shr	Streptococcal hemoprotein receptor
Sia	Streptococcal iron acquisition system
SPE	Streptococcal pyrogenic exotoxin
SLO	Streptolysin O
SLS	Streptolysin S
TCR	T-Cell receptors
TNF	Tumor necrosing factor
V١	Variable region ١
V٢	Variable region ٢

١-١ المقدمة

تضم المسبحيات (Streptococci) انواعاً عديدة من البكتريا الممرضة للانسان والحيوان وتعد بكتريا *Streptococcus pyogenes* من أهم أنواع المسبحيات الممرضة للإنسان وأكثرها شيوعا، وتكون مسؤولة عن مدى واسع للاخماج تتدرج من الاخماج الخفيفة والمعتدلة كالتهاب البلعوم واللوزتين والإخماج الجلدية كالقوباء إلى الاخماج الخطرة المهددة للحياة كمتلازمة الصدمة السمية وتجرثم الدم وتنخر الطبقة تحت الجلدية، كما تسبب عددا من الاخماج غير القيحية التي تشمل كلا من الحمى الرثوية والتهاب نبيبات الكلية الحاد (Descheemaeker *et al.*, ٢٠٠٠).

تمتلك المسبحيات و بالاخص بكتريا *S. pyogenes* والمسبحيات للمجاميع المصلية C و G العديد من العوامل التي تسهم في امراضيتها وضراوتها كالمحفظة وبروتين M التي تساعد في مقاومة البكتريا لعملية البلعمة وتعمل على تسهيل التصاق واستعمار البكتريا للجهاز التنفسي العلوي (Cunninghamm, ٢٠٠٠). فضلا عن ذلك فان لهذه البكتريا القدرة على إنتاج العديد من المواد والانزيمات الخارج خلوية (Extracellular products) ، إذ تنتج بكتريا *S. pyogenes*ما يزيد عن ٢٠ نوع من الافرازات الخارجية ومنها انزيم الستربتوكاينيز و الهيالودورنيز التي تسهم في انتشار الخمج وغزو البكتريا للأنسجة من خلال حلها للخثرة والأنسجة الرابطة للمضيف لذلك تعد من عوامل الانتشار (Spreading factors) (Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠). كما تنتج بكتريا *S. pyogenes* عدة أنواع من الذيفانات الخارجية المولدة للحرارة (Streptococcal pyrogenic exotoxins) التي تشترك في الاخماج الحادة والخطرة للمسبحيات كالحمى القرمزية ومتلازمة الصدمة السمية، كما ان لها القدرة على إنتاج نوعين من الانزيمات الحالة للدم احدهما حساس للاوكسجين (Streptolysin O) والثاني مقاوم له (Streptolysin S) التي لها دور كبير في امراضية البكتريا (Efstratiou, ٢٠٠٠).

وبالنظر لأهمية هذه البكتريا في احداث اخماج الجهاز التنفسي العلوي ومايرافقه من مضاعفات ثانوية فقد هدفت الدراسة إلى دراسة بعض عوامل ضراوة البكتريا على المستوى الجزيئي. وتضمنت عدة محاور هي:

١. عزل وتشخيص بكتريا المسبحيات.
٢. التحري عن بعض عوامل الضراوة التي قد تمتلكها البكتريا المعزولة مثل المحفظة و أنظمة نقل الحديد وانزيم السستاين بروتييز والذيفانات المولدة للحمرة ودراسة مقاومتها لعدد من المضادات الحيوية المستخدمة حاليا في العلاج.
٣. دراسة النسق البلازميدي للبكتريا المعزولة.
٤. إجراء عمليتي الاقتران البكتيري والتحول الوراثي للتحري عن انتقال الصفات المحمولة على البلازميدات.

٢-١ بكتريا *S. pyogenes*

تضم المسبحيات Streptococci أنواعا مختلفة من البكتريا التي تتصف خلاياها بكونها كروية أو بيضوية الشكل قطرها اقل من ٢ مايكرومتر وتترتب بشكل أزواج أو سلاسل، موجبة لصبغة غرام وغير مكونة للسبورات. وتكون معظم أنواعها لا هوائية اختيارية سالبة للكاتليز والاوكسيديز غير متحركة، ولاتختزل النترات. تنمو المسبحيات بدرجات حرارية تتراوح بين ٢٢-٤٠ مْ ودرجة الحرارة المثلى لنموها ٣٧ مْ ويكون نموها ضعيفا في الاوساط الزرعية الاعتيادية ويتحسن بإضافة المصل أو الدم (Macfaddin, ٢٠٠٠; Holt *et al.*, ١٩٩٤) .

وضعت عدة تصنيفات للمسبحيات أقدمها التصنيف الذي وضعه Brown في عام ١٩١٩ الذي يعتمد على نوع تحلل الدم (Hemolysis) على أوساط أكار الدم الذي صنفت المسبحيات بموجبه إلى ثلاث مجاميع رئيسة: المجموعة الأولى تمثل المسبحيات المحللة للدم تحللا تاما (β- Hemolytic Streptococci) وتكون مستعمراتها محاطة بمنطقة تحلل كلي والمجموعة الثانية تضم المسبحيات المحللة للدم ألفا (α- Hemolytic Streptococci) وتكون مستعمراتها محاطة بمنطقة تحلل جزئي(منطقة خضراء اللون) والمجموعة الثالثة تضم المسبحيات المحللة للدم كاما (γ-Hemolytic Streptococci) وتكون غير محللة للدم.وقسمت Lancefield في عام ١٩٣٣ المسبحيات المحللة للدم تحللا كليا على أساس الاختلافات المستضدية لمتعدد السكريد في جدار البكتريا إلى ١٨ مجموعة سميت بمجاميع لانسفيلد (Lancefield Groups) ويرمز لها بالأحرف الإنكليزية من A إلى U باستثناء الحرفين I و J (Facklam, ٢٠٠٢) . وقسم Sherman في عام ١٩٣٧ المسبحيات إلى أربع مجاميع رئيسة اعتمادا على نوع التحلل الدموي و نوع المستضد الكاربوهيدراتي لجدار البكتريا (مجاميع لانسفيلد) والنمو بوجود كلوريد الصوديوم بتركيز % ٦.٥ (تحمل الملوحة) وتخمر السكريات إلى:

١. المسبحيات القيحية (Pyogenic streptococci) وتضم المسبحيات المحللة للدم بيتا العائدة للمجاميع A وB وC وG وF.
٢. المسبحيات المخضرة (Viridans streptococci) وتضم المسبحيات المحللة للدم الفا وكاما غير الخاضعة لتصنيف لانسفيلد.
٣. المسبحيات اللبنية (Lactic streptococci) التي تضم المسبحيات المحللة للدم كاما والعائدة للمجموعة N.
٤. المسبحيات المعوية (Enteric streptococci) وتضم المسبحيات المحللة للدم الفا وكاما العائدة للمجموعة D لتصنيف لانسفيلد (Facklam, ٢٠٠٢).

حديثا استخدمت الوراثة الجزيئية واضيفت اختبارات كيموحيوية جديدة مما ادى الى تقسيم المسبحيات (Streptococci) إلى ثلاث أجناس هي: جنس *Enterococcus* الذي يضم المسبحيات المعوية (Enterococci) وجنس Lactococcus الذي يضم المسبحيات اللبنية (Lactic streptococci) وجنس *Streptococcus* الذي يضم المسبحيات القيحية

(Pyrogenic streptococci) والمسبحيات الفموية (Oral streptococci) والمسبحيات اللاهوائية (Unaerobic streptococci) ومسبحيات اخرى تضم ٨ أنواع اخرى منها النوع *S. bovis* (Holt *et al.*, ١٩٩٤).

يمثل النوع *S. pyogenes* الذي وصف لاول مرة من قبل العالم Rosenbach في عام ١٨٨٤ المجموعة A للمسبحيات المحللة للدم تحللا كليا حسب تصنيف لانسفيلد (Hardie, ١٩٨٦). وهي بكتريا لا هوائية اختيارية لا تنمو في الاوساط الزرعية الاعتيادية وإنما تحتاج لاوساط أغنائية، لها القدرة على تخمير الكلوكوز واللاكتوز والسالسين والتريهالوز وإنتاج حامض بدون تحرير غاز، محللة للارجنين وغير محللة لهيبارات الصوديوم (Sodium Hipurit) أو للاسكولين (Esculin) وليس لها القدرة على النمو في الاوساط الحاوية على أملاح الصفراء بتركيز ٤٠٪ أو الملح NaCl بتركيز٦.٥٪، مقاومة للاوبتوكين وحساسة للبستراسين و لا تنمو عند درجة حرارة ١٠ أو ٤٥ مْ (Macfaddin, ٢٠٠٠; Holt *et al.*, ١٩٩٤). تظهر بكتريا *S. pyogenes* تحت المجهر الضوئي كروية أو بيضوية الشكل بقطر ٠.٥ -١ مايكرومتر موجبة لصبغة غرام ومرتبة بشكل أزواج أو سلاسل وسلالاتها الضارية تكون محاطة بمحفظة (Hardie, ١٩٨٦).

تصنف بكتريا *S. pyogenes* إلى انماط مصلية اعتمادا على المستضدات البروتينية لجدارها البكتيري (M وT وR) ويعد بروتين M اكثرها اهمية في التنميط المصلي، إذ تم التوصل لاكتشاف اكثر من ١٠٠ نمط مصلي لبروتين M تسبب امراضا مختلفة للانسان (Efstrayiou, ٢٠٠٠).

مؤخرا استعملت الطرائق الوراثية لتنميط البكتريا ومنها التنميط الوراثي لجينات *mga* المشفرة لبروتين Mga المنظم لعمليات التعبير الجيني لعوامل الضراوة أو ما يعرف بـ Vir typing، والتنميط لجينات *emm* المشفرة لبروتين M (Hookey *et al.*,١٩٩٦). كما استعملت طرائق اخرى للتنميط اهمها التنميط المظهري (Phenotyping) كالتنميط بالبكتريوسين (Bacteriocin typing) والتنميط بالعاثي (Phage typing) لكنها تكون اقل استعمالا (Efstrayiou, ٢٠٠٠).

٢-٢ العوامل المرتبطة بالامراضية

تمتلك المسبحيات لاسيما بكتريا *S. pyogenes* العديد من العوامل التي تسهم في امراضيتها وزيادة ضراوتها والتي يكون بعض منها جزءا من البنية المستضدية للبكتريا (Antigenic structure) وتشمل كلا من المستضد الكاربوهيدراتي الخاص بالمجموعة A (A-CHO) والمحفظة (Capsule) والببتيدوكلايكان (Peptidoglycan) والخمل المؤلف من بروتين M وحامض التيكويك الشحم LTA (Lipoteichoic acid)، و النوع الثاني من عوامل الضراوة فيها يتألف من افرازات خارج خلوية (Extracellular products)

كالهيمولايسينات والذيفانات الخارجية (Exotoxins)، فضلا عن كل من انزيمات الستربتوكاينيز(Streptokinase) والهيالودورنيز(Hyalodorinase)والإنزيم الحال للدنا (DNase) والانزيمات الحالة للبروتين(Proteases) (Todar,٢٠٠٢; Patterson,٢٠٠٠).

٢-٢-١ المحفظة

تحتوي معظم سلالات بكتريا *S. pyogenes,S. pneumonia* والسلالات الممرضة التابعة للمجاميع المصلية C و G للمسبحيات على محفظة تعد من اهم عوامل ضراوتها (Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠). وهي عبارة عن طبقة سميكة من حامض الهيالورونيك (Hyaluaronic acid) بشكل بوليمر خطي مؤلف من وحدات مكررة من هيالورونيت (Hyaluronate) و (N- acetylglucosamine) (Stoller and Dorfman, ١٩٦٩).

تتكون المحفظة في المراحل الأولى لنمو البكتريا في الوسط وعند انتشارها في الدم والأنسجة وتفقدها البكتريا في طور الثبات، وتمتاز المحفظة بانها حساسة لانزيم الهاليدورنيز (Hyaluloridase) وغير محفزة للمناعة ويعود ذلك لكونها مشابهه كيميائيا لمادة Hyaluranate الموجودة في المادة الأساس للأنسجة الرابطة للمضيف وبذلك فإنها تعمل على اخفاء مستضدات البكتريا وتمنع تعرف النظام المناعي للمضيف عليها (Todar, ٢٠٠٢; Patterson, ٢٠٠٠).

يعود الشكل المخاطي للمستعمرات (Mucoid phenotype) عند نمو ها على الاوساط الحاوية على الدم لانتاج كميات كبيرة من السكريدات المتعددة للمحفظة وليس بروتين M (Wessels *el at.*, ١٩٩١) وان سلالات *S. pyogenes* الحاوية على المحفظة تكون ممرضة للفار في حين ان السلالات الفاقدة للمحفظة تكون غير مرضية وسرعان ما تقتل بعملية البلعمة (Phagocytosis).

أشار Schmidt وجماعته (١٩٩٦) إلى دور المحفظة وبروتين M في مقاومة البكتريا لعملية البلعمة. ووضح Moses وجماعته (١٩٩٧) دور البيئة الدقيقة(Microenviroment) في الاهمية النسبية لكل منهما في المقاومة ففي تجرثم الدم مثلا يكون بقاء وتكاثر البكتريا في مجرى الدم معتمدا على بروتين M، اما في خارج الاوعية الدموية مثل الجلد والانسجة المخاطية للبلعوم والرئتين فان مقاومة البكتريا للبلعمة تعتمد على المحفظة لقلة بروتينات البلازما. تعمل المحفظة كحاجز ميكانيكي يمنع ارتباط بروتينات المتمم والخلايا البلعمية بسطح البكتريا وبالتالي تمنع عملية البلعمة (Dale *et al.*, ١٩٩٦) وهذا يتفق وملاحظات الباحثين (Foley and Wood, ١٩٥٩; Rothbard, ١٩٤٨) من ان معاملة المسبحيات الحاوية على المحفظة (Encapsulated) بانزيم Hyaluronidase تزيد من حساسيتها لعملية البلعمة.

فضلا عن ذلك فان المحفظة تلعب دورا مهما في التصاق (Adhesion) واستعمار (Colonization) بكتريا *S. pyogenes* للبلعوم في نموذج الفار(Mice Model)

(Wessels and Bronze, ١٩٩٤) وذلك يعود الى قدرتها على الارتباط بالجزء CD٤٤ للخلايا الطلائية للبلعوم مما يسهل عملية استعمارها في البلعوم وهي خطوة ضرورية لامراضيتها (Cywes *et al.*, ٢٠٠٠; Schiager *et al.*, ١٩٩٨)

كما تلعب دورا مهما في دخول بكتريا *S. pyogenes* للخلايا المتقرنة (Keratinocytes) واحداث الاخماج الجلدية (Schager *et al.*, ١٩٩٦)، فضلا عن الدور الذي تلعبه في استعمار المسبحيات الرئوية (*S. pneumonia*) للانسجة مما يشير الى دورها في ضراوة البكتريا (Magee and Yother, ٢٠٠١). وبين Miller و Neely (٢٠٠٥) بان دور المحفظة في الامراضية لا يقتصر على المسبحيات الممرضة للانسان وانما يمتد ليشمل المسبحيات الممرضة للحيوان ومنها بكتريا *S. iniae* الممرضة للبشر والاسماك، اذ يؤدي فقدانها للمحفظة بعملية التطفير (Mutagenesis) الى اختزال للضراوة.

يحتاج تخليق المحفظة في المسبحيات التابعة للنمطين المصليين A وC لثلاث جينات هي *has A, has B, has C* التي تتموضع ضمن الاوبرون الكروموسومي *has* (Doughetry and Rijn,١٩٩٢; Carter *et al.*,١٩٩٥)(hyaluronic acid synthesis)، اذ يشفر الجين *has A* للانزيم Hyaluronate synthase الذي يقوم بربط وحدات متبادلة من N-acetyl glucosamine وGluconate (Hyaluranate) لتكوين البوليمر الخطي المكون للمحفظة (Doughetry and Rijn, ١٩٩٤ ; DeAnglis *et al.* , ١٩٩٣)، في حين يشفر الجينان *has B* و*has C* للانزيمين UDP- ٦ -Glucose dehydrogenase و UDP-glucose phosphorylase على التوالي ويقوم الانزيم الأول بانتاج Glucoronic acid من UDP-Glucose في حين يقوم الاخر بانتاج UDP- glucose من UTP و – l -Glucose- phosphate (Carter *et al.*, ١٩٩٥; Dougherty and Rijn, ١٩٩٣).

وجد Ashbaugh وجماعته (١٩٩٨) بان الجينين *has B* و*has A* فقط هما الضروريان لانتاج المحفظة في المسبحيات التابعة للنمط المصلي A وان التثبيط الوراثي للجين *has C* المشفر لانزيم UDP-glucose plgrophosphrylase في السلالات ذات المحفظة كبيرة الحجم لايؤثر على انتاج المحفظة في حال توفر UDP-glucose في الوسط، كما وجد De Angelis وجماعته (١٩٩٣) بان استنسال الجينين *has A* و*has B* في السلالات التابعة لكل من *Echerichia coli* و *Enteroccocus faecalis* غير المكونة للمحفظة يؤدي الى انتاجها للمحفظة.

تتباين المسبحيات التابعة للنمط المصلي A في انتاجها للمحفظة ويعود ذلك للاختلافات في حفاز الاوبرون has (operon *has* promoter) إذ يكون هذا الحفاز اكثر فعالية في العزلات ذات الانتاج المفرط للمحفظة (Alberti *et al.*, ١٩٩٨).

تحتوي معظم السلالات المرضية التابعة للنوع (*S. agalagtiae*) على محفظة من متعدد السكريد الدهني والتي تعد عاملا مهما في ضراوتها، وهي عبارة عن بوليمر مؤلف من

سكريات احادية (Glucose وGalactose) وN- acetylglucoseamine و Sialic acid (Wessls *et al.*,١٩٨٧).وتترتب الجينات المسؤولة عن تكوينها بشكل مشابه لما هو موجود في *E. coli* و*Heamophilus influenzae* (Kroll *et al.*, ١٩٨٩; Boulnios *et al.*, ١٩٨٧). وتقسم الجينات المشفرة لها الى ثلاث مجاميع المجموعة الأولى تكون نواتج تعبيرها الجيني مسؤولة عن تخليق السكريات الاحادية وتنشيطها وتضم الجينين *csp E* و *csp F*، والمجموعة الثانية تكون مسؤولة عن تكوين وحدات السكريات قليلة التعدد (Oligopoly saccharide) وتضم الجينات *csp D* و*csp G* و *csp H* و *csp I* و*csp J*. اما المجموعة الثالثة فتضم الجينات *csp R* و *csp A* و *csp B* و *csp C* وتقوم نواتج تعبيرها الجيني ببلمرة الوحدات قليلة التعدد ونقل البوليمر الناضج الى خارج الخلية البكترية لتكوين المحفظة (Rubens *et al.*, ١٩٩٥).

٢-٢-٢ انزيم الستربوكاينيز

الستربتوكاينيز بروتين إفرازي ذو وزن جزيئي ٤٦ كيلو دالتون يفرز من المجاميع A وC وG للمسبحيات، وله القدرة على الارتباط بمولد البلازمين (Plasminogen) وتحويله الى بلازمين فعال (Active plasmin) (Cunningham, ٢٠٠٠).

تتكون جزيئة الانزيم من ثلاث مقاطعات (Domains)، الأولى تتألف من١٤٧ حامض أميني وتكون مشابهه لانزيم الستافيلوكاينيز SAK (Staphylokinase) المفرز من العنقوديات (Staphylococci) إلا ان قدرتها على الارتباط بالبلازمين تكون عشرة أضعاف قدرة الستافيلوكاينيز (Arai *et al.*, ١٩٩٨)، وتعمل هذه المقاطعة كمنظم (Regulator) لفعالية بقية الجزيئة، اما المقاطعتين الثانية والثالثة فتكون ضرورية لتنشيط مولد البلازمين وتحويله الى بلازمين فعال (Parrado *et al.*, ١٩٩٦; Rodrignez *et al.*, ١٩٩٥). تحتوي المقاطعة الأولى للانزيم المنتج من المجاميع A وC للمسبحيات على عروة (Loop) مكونة من ٢٥ حامض اميني تكون مفقودة في الانزيم المنتج من العنقوديات والمجموعة G للمسبحيات (النوع *S. uberis*)(Wang *et al.*, ١٩٩٨) ، وتكون ضرورية في عملية تعرف (Recognition) الانزيم على مولد البلازمين اذ ان ازالة ١٢ حامض اميني منها تؤدي الى انخفاض كبير في كمية البلازمين المنشطة بفعل الانزيم (Wakehann *et al.*, ٢٠٠٢).

يعد الستربتوكاينيز عامل انتشار(Spreading factor) يسهم في تسهيل انتشار البكتريا من خلال تحليله للخثرة (Clot) نتيجة لتحلل الفايبرين بفعل البلازمين الذي يعمل ايضا على تنشيط انزيم Metalloproteases أو Collagenases في المادة البينية للخلايا الطلائية مما يسهل في الانتشار وغزوالانسجة (Cunningham ٢٠٠٠) .

كما يلعب دورا مهما في إحداث الاخماج الجلدية و يعتقد بوجود تعاون بينه وبين (Plasminogen-binding group A Streptococcal Protein) أو ما يعرف بالـ PAM يؤدي الى تسهيل غزوالبكتريا لانسجة المضيف واحداث الاخماج الجلدية (Ringdhl *et al.*,

(١٩٩٨، و درس Svensson وجماعته (٢٠٠٢) دورهما في احداث الاصابة الجلدية بالمسبحيات القيحية *S. pyogenes* باستعمال نماذج مختبرية مشابهه لمرض القوباء (Impetigo) في البشر وجد بان التثبيط الوراثي لجينات الستربتوكاينيز أو PAM يؤدي الى فقدان جزئي ولكن ملحوظ في ضراوة البكتريا وان تاثير الستربتوكاينيز يكون اكبر من تاثير PAM في احداث الخمج، اذ لوحظ بان التثبيط الوراثي لجينات الستربتوكاينيز له تاثير اكبر في خفض الضراوة من التثبيط الوراثي لجينات PAM. ويؤدي عبور البكتريا للجلد (Skin passage) الى حدوث زيادة في انتاج الستربتوكاينيز، حيث وجد بان بكتريا *S. pyogenes* المعزولة من اصابة شديدة في طحال الفار بعد انتقالها من خمج الجلد يزداد فيها انتاج الستربتوكاينيز ويعود سبب ذلك لحدوث زيادة في عمليات التعبير الجيني لجينات الستربتوكاينيز ونقص انتاج السيستاين بروتييز الذي يقوم بتحطيم الستربتوكاينيز في الزجاج (Rezcollah *et al.*, ٢٠٠٤)

تحتوي كافة سلالات المسبحيات التابعة للنوع *S. pyogenes* والمجاميع C وG للمسبحيات على الجينات المشفرة لانتاج الستربتوكاينيز، ولكن ليست جميع هذه السلالات لها القدرة على انتاج الستربتوكاينيز(Huang *et al.*, ١٩٨٩a).

يلعب انزيم الستربتوكاينيز دورا مهما في احداث الخمج بالتهاب نبيبات الكلية الحاد (APSGN) (Acute post streptococcal glomerulonephritis) ما بعد اخماج الجهاز التنفسي، إذ توصل Nordstrand وجماعته (١٩٩٨) إلى ان احداث طفرات فاقدة للانزيم في السلالة NZ١٣١ *S. pyogenes* المسببة لالتهاب نبيبات الكلية الحاد (APSGN) يؤدي إلى فقدانها القدرة على احداث هذا المرض.

وجد Huang وجماعته (١٩٨٩b) بان تسلسل الاحماض الامينية في الستربتوكاينيز المنتج من السلالة NZ١٣١ *S. pyogenes* المولدة لالتهاب نبيبات الكلية يطابق ٩٠٪ من الاحماض الامينية للستربتوكاينيز المنتج من السلالات غير المسببة لهذا الخمج. وان الاختلافات في الاحماض الامينية تقع في منطقتي تغاير الأولى تمتد من الاحماض الامينية في الموقع ١٧٤ الى ٢٤٤ وتدعى (V١) Variable region ١ والثانية تمتد من الموقع ٢٧٠ الى ٢٩٠ وتدعى (V٢) Variable region ٢. وتكون الاحماض الامينية في منطقة التغاير الأولى للسلالات المولدة لالتهاب الكلية كارهة للماء (Hydrophobic)وذات محتوى اكبر من التراكيب الثانوية من السلالات غير المولدة لالتهاب الكلية (Stevens and Kaplan,٢٠٠٠).

ويعتقد بان الاختلافات في طبيعة الاحماض الامينية في مناطق التغاير تؤدي الى اختلاف الفة الستربتوكاينيز لنبيبات الكلية في السلالات المولدة للخمج عنه في السلالات غير المولدة له (Holm, ١٩٨٨). وهذا يتفق مع ما اشار له Peak وجماعته(١٩٩١) من ان انزيم الستربوكاينيز المنتج من السلالات المولدة للخمج يرتبط بنبيبات الكلية (goloumri) بشدة اكبر من ارتباط انزيم الستربوكاينيز المنتج من السلالات غير المولدة للخمج. كما درس

Nordstrand وجماعته (٢٠٠٠) دور التغايرات الاليلية في احداث الاصابة بـ APSGN ووجد بان استبدال الاليل *ska* ١ في السلالة NZ١٣١ *S. pyogenes* المولدة للخمج بالاليل *skc* ٥ للسلالة H٤٦A *S. equimilis* غير المولدة يؤدي الى فقدان قدرة السلالة على احداث الخمج.

تخضع عملية التعبير الجيني لجينات الستربتوكاينيز في *S. pyogenes* للتنظيم السالب بفعل بروتين Cov R الذي يعمل كمنظم سالب للعديد من عوامل الضراوة التي يحدث تعبيرها الجيني في الطورين اللوغارتمي وطور الثبات، والطفرات الفاقدة له يحدث فيها زيادة ملحوظة في انتاج الستربتوكاينيز(Federle *et al.*, ١٩٩٩). كما تتاثر بالاوبرون *fas BCAX* المشفر لبروتين Fas A الذي يعمل كمنظم موجب للستربتوكاينيز (Kreikemeyer, *et al.*, ٢٠٠١). وقد وجدSteiner و Malke (٢٠٠٢) بان انتاج الستروكاينيز في المجموعة C للمسبحيات (النوع *S. dysgalactiae*) يتاثر ايضا بكلCov R من والاوبرون *fas* باستثناء عدم احتواء الاوبرون على الجين *fas B*.

٢-٢-٣ انظمة نقل الحديد

٢-٢-٣-١ انتاج الهيمولايسين

الهيمولايسين احد انواع البروتينات المحللة لكريات الدم الحمر (Erythrocytes) و الذي تنتجه بعض انواع البكتريا وهو ذو تركيب جزيئي يختلف من بكتريا الى اخرى وغالبا ما يرتبط انتاجه بالبكتريا المعزولة في الحالات المرضية لذا يعد من العوامل المساهمة في الامراضية (Nassif and Sansonetti, ١٩٨٧).

يعد انتاج الهيمولايسين في المسبحيات من اهم صفاتها التشخيصية اذ صنفت المسبحيات على اساس تحليلها للدم الى ثلاث مجاميع رئيسة المجموعة الاولى تضم المسبحيات الحالة للدم بيتا (β-hemolytic streptococci) التي تحلل الدم تحللا تاما وتمتاز بظهور مستعمراتها النامية على أوساط الدم محاطة بهالة شفافة تمثل مناطق التحلل الكلي. و المجموعة الثانية تضم المسبحيات الحالة للدم الفا (α-hemolytic streptococci) التي تحلل الدم تحللا جزئيا وتظهر مستعمراتها محاطة بمنطقة خضراء تمثل مناطق التحلل الجزئي، اما المجموعة الثالثة فتضم المسبحيات الحالة للدم كاما أو غير المحللة للدم (γ – hemolytic streptococci) وتكون غير قادرة على احداث التحلل الدموي (Facklam, ٢٠٠٢; Hardie, ١٩٨٦). وبالرغم من ذلك سجل وجود سلالات غير محللة للدم تعود للمجاميع A وC وG من المسبحيات وهي المجاميع المحللة للدم تحللا كليا (Facklam, ٢٠٠٢; Dierkse and Tagg, ٢٠٠٠)، كما سجل Taylor وBarkham (٢٠٠٢) حصول حالة وفاة بذات الرئة سببها سلالات غير محللة للدم تعود للنوع *S. pyogenes*.

تنتج المسبحيات التابعة للمجاميع A وC وG نوعين من الهيمولايسين، الأول يكون حساس للاوكسجين ويدعى بالستربتولايسين O (Streptolysin O) الذي يعود لعائلة الذيفانات

الحالة للخلايا والمنشطة بالثايول التي تضم ايضا ذيفان العنقوديات الفا والنيمولايسين وتمتاز بقدرتها على حل الخلايا حقيقية النواة من خلال ارتباطها بالكوليسترول الموجود في غشائها الخلوي (Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠).

ويمتاز الستربتولايسين O (SLO) المنتج من بكتريا *S. pyogenes* بقدرته المستضدية كما يمتاز بقدرته على تحفيز الخلايا وحيدة النواة (Monocytes) على انتاج عامل نخر الورم الفا (TNFα) والانترليوكين IL-١β والتداخل مع التفاعلات الالتهابية لجسم المضيف (Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠).

وجد Stassen وجماعته (٢٠٠٣) بان (SLO) له القدرة على تحفيز الخلايا البلعمية (Macrophages) وانتاج عامل نخر الورم الفا (TNFα) (Tumor necrosing factor α) من خلال مسارين الأول هو مسارالـ (P٣٨-Mitogen Activation Protein Kinase) (MAP) والثاني هو مسار Protein kinase C-dependent .

يحدث الانتاج الامثل لهذا الهيمولايسين في نهاية الطور اللوغاريتمي اذ ينتشر الى الوسط ويوجد على الاقل شكلين فعالين منه الأول ذو وزن جزيئي ٦٩٠٠٠ ومعامل ترسيب S٣.٩, والثاني وزنه الجزيئي ٥٧٠٠٠ ويتكون نتيجة لازالة ٣٣ حامض اميني من الأول بفعل انزيمات البروتييز (Pinkey *et al.*, ١٩٩٥; Bhakdi *et al.*, ١٩٨٤).

وجد Kehoe وجماعته (١٩٨٧) بان الستربتولايسين O يشفر له الجين الكروموسومي *slo* وان متعدد الببتيد الناتج (الستربتولايسين O) يحتوي على ثمالة الحامض الاميني سيستين بالقرب من النهاية الكاربوكسيلية للجزيئة مشابها في ذلك بقية الذيفانات المنشطة بالثايول ومنها النيمولايسينO (Pneumolysin O). تتاثر عملية التعبير الجيني لـ *slo* في بكتريا *S. pyogenes* التابعة للنمط المصلي M١ بتسلسل يقع اعلى مجرى الجين بـ ٤٦٧ كيلو قاعدة ويدعى EX (Element X) (Savic and Ferretti , ٢٠٠٣). كمااقترح Savic وجماعته (٢٠٠٣) بان كلا من الجين *slo* المشفر للستربتولايسين O والجين *nga* المشفر للانزيم NAD glycohydrolase ينتظمان في ما يشبه الاوبرون (Opron like) وان الجين *slo R* في بكتريا *S. pyogenes* له تاثير سالب في عملية التعبير الجيني لـ*slo* .

اما النوع الثاني من الهيمولايسين فيكون مقاوما للاوكسجين ويدعى بالستربتولايسين S (Streptolysin S)، ويفرز من المسبحيات النامية بوجود المصل أو الألبومين أو التوين (Tween) ولا يمتلك قابلية استضدادية وهو المسؤول عن التحلل الدموي حول المستعمرات السطحية في أكار الدم لكونه لا يتأثر بالاوكسجين (Stevens and Kaplan,٢٠٠٠)، ويتاثر حدوث التحلل الدموي بالعديد من العوامل منها مكونات الوسط ونوع الدم المستعمل وضغط الحضن (Incubation pressure) (Facklam, ٢٠٠٢)، كما يتاثر بالتداخل البكتيري الناتج عن بكتريا *S. salivarius* (Upton *et al.*, ٢٠٠١, Dierksen *et al.*, ٢٠٠٠)

ينتج الستربتولايسين S من اكثر من ٩٥% من سلالات المسبحيات التابعة للمجاميع A وB وG كما ينتج من بعض السلالات التابعة للمجاميع E وH وI ويحدث الإنتاج الامثل له في طور الثبات ويشترك مع الستربتولايسين O في قابليته على إتلاف أغشية الخلايا حقيقية النواة (Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠).

أشار Fontaie وجماعته (٢٠٠٣) إلى دور كل من SLO وSLS في ضراوة بكتريا *S. pyogenes* التابعة للنمط المصلي M٥، ودرس Sierg وجماعته (٢٠٠٣) دورهما في زيادة ضراوة بكتريا *S. pyogenes* غير المحتوية على المحفظة وتوصلوا الى ان SLO يزيد من ضراوة بكتريا *S. pyogenes* المحتوية على المحفظة وغير الحاوية عليها في حين أن دور SLS يقتصر على زيادة ضراوة البكتريا غير الحاوية على المحفظة فقط.

ذكر Carr وجماعته (٢٠٠١) بان تحلل كريات الدم الحمر بفعل الستربتولايسين S (SLS) لا يختلف كثيرا عن التحلل الحاصل بفعل نظام المتمم وان كليهما يكون معتمدا على الحرارة والتركيز , وان الـ SLS يتمكن من الارتباط بكريات الدم الحمر بدرجة حرارة أوطا من ١٧ مْ الا انه لا يتمكن من تحليلها الا بدرجة حرارة اعلى من ٢٣ مْ.

يقع انتاج الستربتولايسين في المسبحيات التابعة للنمط المصلي A تحت سيطرة الاوبرون Sag المكون من تسع جينات هي: *sag A* و*sag B* و*sag C* و*sag D* و*sag E* و *sag F* و*sag G* و*sag H* و*sag I* وتوجد تسلسلات انهاء غير معتمدة على *rho* بين الجينين *Sag A* و*Sag B* تنظم عملية التعبير الجيني للاوبرون بكامله (Nizet *et al.*, ٢٠٠٠). وبين Fuller وجماعته (٢٠٠٢) بان انتاج الستربتولايسين S في بكتريا *S. inae* يشفرله تسع جينات كروموسومية تناظر جينات الاوبرون Sag في المسبحيات التابعة للنمط المصلي A.

أشار Kihlberg وجماعته (١٩٩٥) إلى ان البروتين المنظم Mga ينظم إنتاج الستربتولايسين S إما بصورة مباشرة أو غير مباشرة وان الطفرات الفاقدة لـMga تنتج كميات اكبر من الستربتولايسينS وتكون أكثر سمية للمفوسايت. ويكبح التعبير الجيني لجينات *sag* في بكتريا *S. pyogenes* بفعل النظام CsrR-CsrS وان البروتين CsrR يعمل كمنظم سالب لإنتاج الستربتولايسين S (Health et al., ١٩٩٩).

كما ان انزيم السيرين بروتييز HtrA (Serine protease HtrA) يلعب دورا مهما في زيادة ضراوة بكتريا *S. pyogenes* الناتجة عن الستربتولايسين S وانزيم السيستايين بروتييز وان حدوث طفرة في الجين *htrA* المشفر للسيرين بروتييز يؤدي إلى زيادة كمية الستربتولايسين المفرز من الخلايا لكنه لا يزيد من الضراوة في نموذج الفار لكون الستربتولايسين الناتج يكون غير فعالا (Lyon and Gaparon, ٢٠٠٤).

٢-٢-٣-٢ انتاج السايدروفور

يعد الحديد من العناصر الأساسية للخلايا الحية، إذ يلعب دورا رئيسا في عمليات نقل الالكترونات فضلاً عن دوره المهم في نقل الاوكسجين (الزعاك، ١٩٩٤). كما إن العديد من الأنزيمات تحتاج لفعاليتها وتنشيطها إلى وجود تركيز معين من الحديد والبكتريا التي يحصل فيها فقدان لأنظمة سحب الحديد يختزل فيها معدل النمو بصورة ملحوظة وقد يؤدي أيضا إلى حصول تغيرات شكلية للخلايا أو توقف انقسامها نتيجة لتوقف تضاعف الدنا فيها (Payne, ١٩٨٨).

والحديد عنصر أساسي (Essential nutrient) لنمو العديد من أنواع المسبحيات ومنها بكتريا *S. pneumonia*، وتعد عملية اخذ البكتريا المرضية للحديد من المضيف خطوة أساسية لإحداث الخمج إذ يكون الحديد ضروريا لتضاعف أعداد البكتريا وهي خطوة مهمة للاستعمار (Colonization) (Tai *et al.*, ١٩٩٣).

وجد Eichenbaum وجماعته (١٩٩٦ b) بان الحديد يكون ضروريا لنمو السلالة *S. pyogenes* JRS٤ التابعة للنمط المصلي (M٦) وان احتواء الوسط على مادة ساحبة للحديد مثل (Nitriotriacetic acid) يؤدي إلى تثبيط نمو هذه البكتريا، كما يلعب دورا مهما في مقاومة بكتيريا *S. pyogenes* لعملية البلعمة (Phagocytosis) إذ يؤدي نقصه إلى حدوث انخفاض في عملية التعبير الجيني للجين *emm* ٦.١ المسؤول عن تكوين البروتين M المضاد لعملية البلعمة (Mc Iver *et al.*, ١٩٩٥).

وجد Smoot وجماعته (٢٠٠١) بان نمو بكتريا *S. pyogenes* في ظروف نقص الحديد بدرجة ٤٠ مْ يؤدي الى حدوث تغيرات عديدة في عمليات التعبير الجيني (Gene expression) للعديد من الجينات وبضمنها الجينات المشفرة لبروتينات نقل الحديد وإنزيمات Superoxide dismutase كما انه يؤدي إلى حصول زيادة في إفراز الهيمولايسينات باستثناء الستربتولايسين O الذي يحدث نقص في إنتاجه. ويؤدي حدوث نقص في تركيز الحديد في الطور اللوغارتمي لهذه البكتريا (إضافة Nitriotriacetic acid) يؤدي إلى حدوث تغيرات عديدة في عملية التعبير الجيني في كل من البروتينات المفرزة من البكتريا والمرتبطة بجدارها وبضمنها مستقبل البلازمين Plr (Streptococcal plasmin receptor)، اذ تحصل زيادة في تحرير الـPlr وإفرازه إلى الوسط وهذه الظروف تكون مشابهه للظروف في جسم المضيف ولذلك أهمية في زيادة ضراوة البكتريا ففي حالة بقاء الـPlr مرتبطا بجدار خلية البكتريا يكون تأثيره في المضيف مقتصرا على الأماكن التي توجد فيها البكتريا ولكن في حالة إفرازه من البكتريا فانه سوف ينتشر بسهولة ويصل تاثيره لاماكن بعيدة عن موضع الخمج (Eichenbaum *et al.*, ١٩٩٦a).

الحديد بشكله الحر غير متوفر بكميات كبيرة في جسم المضيف إذ يتواجد ٩٥ % من حديد جسم الإنسان في كريات الدم الحمر وخلايا الكبد والطحال والعضلات وتتواجد معظم الكمية القليلة الباقية– بهيئة حديد مرتبط مع بروتينات عالية الاتحاد مثل الترانسفرين

(Transfferin) في المصل واللاكتوفرين في الافرازات الجسمية (Eichenbaum *et al.*, ١٩٩٦b)، ويكون الترانسفرين واللاكتوفرين بهيئة بروتينات غير المشبعة لتثبيط نمو الأحياء المجهرية في السوائل الجسمية لذلك تحتاج البكتريا إلى تطوير آلية تستطيع بوساطتها الحصول على الحديد (الجيلاوي,٢٠٠٠).

تستطيع البكتريا السالبة لصبغة غرام الحصول على الحديد بواسطة إنتاجها للسايدروفورات (Siderophores)، وهي مركبات كلابية (Chelitors) ذات أوزان جزيئية واطئة لها القدرة على سحب الحديد من مركباته وذات ألفة عالية جدا للحديد، تفرز من الخلية البكترية وترتبط بالحديد على سطحها ومن ثم تعود للداخل (Payne, ١٩٨٨).

وتنتج بكتريا الأسرة المعوية نوعين من السايدروفورات الأول من المركبات الفينولية الحاوية على حلقة التي يرتبط بها الحديد dihydroxy benzoic acid ٢, ٣ ويعرف بالانتروبكتين (Enterobactin) (Perry and Clement, ١٩٧٩). والثاني هوالايروبكتين (Aerobactin) الذي يتكون من حامض Hydroxymatic acid (Gibson and Magarath, ١٩٦٩).

تتمكن المسبحات التابعة للنمط المصلي A من استعمال مركبات الهيمي بروتين (Hemeproteins) كمصدر للحديد اذ تتمكن من استعمال مركبات الهيموغلوبين (hemoglobin) والمايوغلوبين (Myoglobin) وهيموغلوبين – هيباتوغلوبين (Hemoglobin – hepatoglobin) والهيمي – البومين (Heme – albomin) والكاتاليز (Catalase) لكنها لا تتمكن من استعمال مركبات السايتوكروم أو اللاكتوفرين أو الترانسفرين، ويشير ذلك إلى عدم قدرة هذه البكتريا على إنتاج سايدروفورات قادرة على سحب الحديد من هذه المركبات (Eichenbaum *et al.*, ١٩٩٦).

تحتوي بكتريا *S. pyogenes* التابعة للنمط المصلي M١ على بروتين في جدارها الخلوي له القدرة على الارتباط بالحديد الموجود في كل من الـ Hemoglobin و Myoglobin و Heme–albomin و Hemoglobin–hepatoglobin بنسبة ١:١ولكن ليس له القدرة على الارتباط بالحديد الموجود في Apo-hepatoglobin ، يدعى هذا البروتين بمستقبل الهيموبروتين المسبحي Shr (Streptococcal hemoprotein receptor)وتكون عملية الاستنساخ للجين *shr* الكروموسومي متزامنة مع استنساخ تسع جينات تضم الجينات *spy ١٧٩٥ (hts A)* و*spy ١٧٩٤ (hts B)* و*spy ١٧٩٣ (hts C)* المشفرة لانظمة ABC لنقل الحديد(ATP Binding Casscatte Transporter) (Lie *et al.*,٢٠٠٢).

وجد Lie وجماعته (٢٠٠٣) بان بكتريا *S. pyogenes* النمط المصلي M١ تحتوي على بروتين أخر في جدارها يعمل كمستقبل للهيمي بروتين بالاضافة للـ Shr له القدرة على الارتباط بهذه المركبات بنسبة (١ : ١) يدعى بالـ Hts A أو Sia A وان عملية الاستنساخ لجينات تزداد تحت ظروف نقص الحديد. وتوصل Bates وجماعته (٢٠٠٣) إلى أن الجينات

المشفرة لأنظمة نقل الحديد في المسبحيات (Streptococcal iron acqiuasition system) أو ما يعرف بـ Sia تقع في أوبرون واحد مؤلف من ١٠ جينات وان الجين الأول في الاوبرون *shr*يشفر لـ Shr والجين الثالث *sia A* أو مايعرف بـ *hts A* يشفر للبروتين الدهني Sia A (Hts A)، اما الجين الرابع للاوبرون *siaB (hts B)* فيشفر لـ Sia B أو مايعرف بـ Membrane premrase في حين يشفر الجين الخامس *sia C* لـ (Mts C) Sia C. ويشابهSia A السايدروفور Sir A في بكتريا *S. aureus* في عمله، في حين يشابه Sia B السايدروفورSir B (Bates *et al.*, ٢٠٠٣).

كما يحتوي الاوبرون Sia على منظم لعمله هوالبروتين Mts R الذي يعمل كمنظم سالب لاستنساخ جينات الاوبرون، والتثبيط الوراثي له يؤدي إلى حصول زيادة في عمليات التعبير الجيني للابرون (Bates *et al.*, ٢٠٠٥) .

٢-٢-٤ الذيفانات المولدة للحرارة

تنتج المسبحيات التابعة للنوع *S. pyogenes* عدة أنواع من الذيفانات الخارجية المولدة للحرارة SPE (Streptococcal Pyrogenic Exotoxins) تختلف في صفاتها المستضدية، وتنتمي إلى الذيفانات المشطرة (Mitogenic toxins) التي تضم أيضا كلا من الذيفان المعوي للعنقوديات وذيفان متلازمة الصدمة السمية (Efstatiou, ٢٠٠٠). وتعمل هذه الذيفانات كمستضدات خارقة (Superantigens) تحفز الخلايا التائية على إنتاج السايتوكينات (Cytokines) بدون الحاجة لتقديمها بفعل الخلايا المقدمة للمستضد (Antigen processing cells) APC (Berhman and Kliegman, ١٩٩٨).

تدعى الذيفانات SPE A وSPE B وSPE C بالذيفانات المولدة للحمرة أو ذيفانات الحمى القرمزية (Scalatina or Erythrogenic Toxins) وتكون مسؤولة عن ظهور الطفح الجلدي المصاحب للحمى القرمزية (Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠). وتشترك بكونها مولدة للحرارة (Pyrogenic) لقدرتها على تحرير مواد رافعة للحرارة الداخلية (Endogenic pyrogenes) من الخلايا الحبيبية فضلا عن كونها مميتة وسامة للخلايا، كما ان لها القدرة على زيادة حساسية الحيوانات المختبرية لصدمة الذيفان الداخلي وكبح استجابة النظام الشبكي البطاني (Reticuloendothelial system) ومنع تكوين الأجسام المضادة (Schlivert and Garry, ١٩٨٩; Barsumian *et al.*, ١٩٧٨).

يعمل الذيفانان SPE A وSPE B على تحفيز الخلايا وحيدة النواة (اللمفوسايت والمونوسايت) على انتاج عامل نخر الورم ألفا (TNFα) والانترليوكينات من نوع IL–β١ و IL- ٦ ، كما يتمكن الذيفان SPE A من التحفيز على إنتاج عاملي نخر الورم TNFα و TNFβ في المزارع النسيجية الحاوية على المونوسايت واللمفوسايت بالإضافة إلى عمله

التازري مع الستربتولايسين S على تحفيز هذه الخلايا على إنتاج الانترليوكين الفعال IL-β١ (Stevens and Kaplan , ٢٠٠٠).

و الذيفان SPE B هوعبارة عن انزيم السيستاين بروتييز Cystein protease الذي يفرز على شكل مولد انزيم Zymogene ذو وزن جزيئي ٤٠ كيلو دالتون والذي سرعان ما يتحول إلى انزيم فعال ذي وزن جزيئي ٢٨ كيلو دالتون بفعل التحلل الذاتي للبروتين (Cunningham, ٢٠٠٠). وتكون الجينات المشفرة له كروموسومية ومحفوظة (Conserved) في جميع سلالات بكتريا *S. pyogenes* (Yu and Ferretti, ١٩٩١).

يساهم السيستاين بروتييز في انتشار واستيطان وغزو البكتريا من خلال قدرته على تجزئة الفايبرونكتين(Fibronectin) والفترونكنين(Vitronectin)(Kapur *et al.*, ١٩٩٣)، وتنشيط انزيم الـ Metalloprotease في المادة البينية (Matrix) للخلايا البشروية (Burn *et al.*, ١٩٩٦). يمتلك الانزيم القدرة على تحرير الكنين Kinin الفعال من مولد الكنين ويعد انتاج الكينين آلية مهمة للضراوة في الحالات الشديدة والحادة للمسبحيات مثل متلازمة الصدمة السمية (Herwald *et al.*, ١٩٩٦).

يعمل الانزيم تازريا مع الستربتولايسين S ومستضدات الجدار الخلوي للبكتريا على احداث اضرار في رئة الجرذ (Shanley *et al.*, ١٩٩٦). وقد وجد Lukomski وجماعته (١٩٩٩) بان التثبيط الوراثي لجينات السيستاين بروتييز يؤدي إلى تقليل الهلاكات الحاصلة في الحيوانات المختبرية المحقونة ببكتريا *S. pyogenes* التابعة للنمطين المصليين M٣ و M٤٩، كما ذكر Kuo وجماعته (١٩٩٨) بان الطفرات الفاقدة للانزيم يحدث فيها اختزال للضراوة مقارنة بالسلالات البرية إذ تكون الهلاكات فيها اقل والأضرار بالأنسجة اقل.

يزيد الانزيم من مقاومة البكتريا لعملية للبلعمة من خلال قتله للخلايا البلعمية، و التثبيط الوراثي له يؤدي إلى خفض مقاومة البكتريا للبلعمة وتقليل انتشارها إلى الأعضاء (Lumski *et al.*, ١٩٩٨). ويتمكن الانزيم من تحليل مستقبلات اليوروكاينيز (Urokinase) من على سطوح المونوسايت مما يثبط من قدرتها على الهجرة لموضع الخمج لانخفاض استجابتها لعوامل الجذب الكيماوي (Chemotaxis) مما يزيد من ضراوة البكتريا (Wolf *et al.*, ١٩٩٤). كما ان له القدرة على تحليل إنزيم C٥a Peptidase المحفز لعوامل الجذب الكيمياوي مما يثبط هجرة خلايا الدم البيض ويمنع وصولها إلى موضع الخمج (Berge and Bjork, ١٩٩٥). وللانزيم القدرة على تحفيز القتل المبرمج (Apoptosis) لخلايا U٩٣٧ الشبيهة بالخلايا الوحيدة النواة في الانسان وتثبيط فعالية البلعمة لهذه الخلايا (Kuo *et al.*,١٩٩٩).

على الرغم من وجود الجينات المشفرة للسستاين بروتييز في جميع سلالات بكتريا *S. pyogenes* إلا انه ليست جميع السلالات قادرة على إنتاج هذا الانزيم (Chaussee *et al.*, ١٩٩٦). ويتأثر إنتاج هذا الانزيم بالعديد من البروتينات المنظمة ومنها Mga الذي يعمل كمنظم موجب للعديد من عوامل الضراوة في المسبحيات التابعة للنوع (Podbielski *et al.*,

S. pyogenes (١٩٩٦. والبروتين المنظم Rgg الذي يدعى أيضا بـ Rop B وان احداث طفرات في جينات *rgg* في السلالة NZ١٣١ *S. pyogenes* يؤدي إلى تقليل كمية الانزيم المنتجة من البكتريا ولكنه لا يؤثر في إنتاج الستربتولايسين O و الستربتوكاينيز (Chaussee *et al.*, ١٩٩٩).

ويتأثر إنتاج السيستاين بروتييز بانزيمات أخرى ومنها انزيم السيرين بروتييز Htr A اذ ان السلالات التي يتم فيها إحداث طفرات فاقدة للانزيم يحصل فيها نقصان في عملية التحلل الذاتي لمولد السيستاين بروتييز وتحوله إلى انزيم فعال (Lyon and Caparon, ٢٠٠٤). كما يتأثر إنتاج السيستاين بروتييز بجينات *pel* (Pleitropic Effect Locus) وان إحداث طفرات في جينات *pel* يؤدي إلى تقليل كمية كل من السيستاين بروتييز والستربتوكاينيز والستربتولايسين S المنتجة من البكتريا (Li *et al.*, ١٩٩٩).

تكون الجينات المشفرة للذيفانين SPE A وSPE C محمولة على العاثي، ويعتمد إنتاج SPE A على تحول العاثي الخامل Temporate الى Lysogenic بطريقة مشابهه لذيفان الدفتريا *Corynebacterium diphtheriae*(Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠).

تتواجد جينات *spe A* في حوالي١٥% من سلالات بكتريا *S. pyogenes* وتزداد لتصل إلى٥٠% في السلالات المعزولة من حالات مرضية شديدة الخطورة كالحمى القرمزية ومتلازمة الصدمة السمية والحمى الرثوية (Yu and Ferretti, ١٩٩١). و تنتج بكتريا *S. pyogenes* أنواعا أخرى من الذيفانات المولدة للحرارة ومنها الذيفانات SPE F وSPE D وSPE G و SPE H وSPE I وSPE J وSPE K (Proft *et al.*, ٢٠٠١; Proft *et al.*, ١٩٩٩)، يدعى الذيفان SPE F أيضا بالذيفان المشطر (Mitogenic factor) وتكون جينات *mf* المشفرة له محفوظة في جميع سلالات بكتريا *S. pyogenes* بشكل مماثل لجينات *spe B* (Cunningham,٢٠٠٠).. يحفز الذيفان SPE F الخلايا التائية بطريقة مشابهة للذيفانين SPE A وSPE B ويتمكن من التحفيز على إنتاج كميات كبيرة من الانترفيرون γ وعامل نخر الورم β (Norrby *et al.*, ١٩٩٤).

وجد Federle وجماعته (١٩٩٩) بان التثبيط الوراثي لـ Cov RS يؤدي الى زيادة كمية كل من SPE A وSPE F المنتجة من البكتريا لكنه لايؤثر في انتاج SPE B. يتميز الذيفانين SPE G وSPE H بكونهما مشطرين للخلايا اللمفية للدم المحيطي للانسان (Proft *et al.*,١٩٩٩). كما وجد Ptoft وجماعته (٢٠٠١) بان بكتريا *S. pyogenes* تنتج نوعين اخرين من الذيفانات المولدة للحرارة هما SPE J وSPE I وان الذيفانSPE J يشابه الذيفان SPE C في حين يكون SPE I اكثر شبها بالذيفان SPE H والذيفان المعوي للعنقوديات. و تتواجد جينات *spe H* و*spe I* بتردد ٢٤% و١٦% على التوالي في سلالات بكتريا *S. pyogenes* ويكونان محمولين على العاثي ، ويشترك الذيفانان SPE J وSPE I بكونهما مشطرين للخلايا اللمفية للدم المحيطي للإنسان إلا ان الذيفان SPE I يحفز الخلايا التائية الحاوية على منطقة بيتا

المتغايرة ١٨.١ في حين يفضل الذيفان SPE J تحفيز الخلايا التائية الحاوية على منطقة بيتا المتغايرة ٢.١ (Proft *et al.*, ٢٠٠١) .

٢-٢-٥ المقاومة للمضادات الحيوية

يكمن الهدف الأساسي في علاج التهاب البلعوم واللوزتين في الوقاية من المضاعفات الثانوية التي تشمل كلا من المضاعفات غير القيحية التي تضم الحمى الرثوية والتهاب نبيبات الكلية والمضاعفات القيحية المتمثلة بالتهاب الاذن الوسطى والتهاب الجيوب الانفية الحاد وتمتاز المسبحيات التابعة للنوع *S. pyogenes* بحساسية عالية لمضادات البنسلين وباقي مضادات مجموعة البيتا لاكتام في حين تكون مقاومة لمضادات السلفانوميد (Sulfanomides) والتتراسايكلين (Tetracyclin) (Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠).

وعلى الرغم من حساسية بكتريا *S. pyogenes* لمضادات البيتا- لاكتام في الزجاج فقد تزايدت حالات فشل العلاج بالبنسلين ومشتقاته من ٢% في بداية السبعينات لتصل إلى ٣٠% في بداية التسعينات (Baequero *et al.*, ١٩٩٩). ويعود ذلك لعدة أسباب منها قدرة البكتريا على إنتاج انزيمات البيتا لاكتاميز (β-Lactamase) التي تحطم حلقة البيتا لاكتام للمضاد وتمنع تأثيره والتي من الممكن أن تكون الجينات المشفرة لها محمولة على بلازميدات اقترانية (Brook, ١٩٨٥)، إضافة إلى الدور الذي تلعبه انزيمات البيتا لاكتام المنتجة من بكتريا النبيت الطبيعي للبلعوم (Normal flora) ومنها بكتريا *S. aureus* وإمكانية انتقال بلازميدات المقاومة منها إلى المسبحيات، إذ وجد بان انزيم البنسلينيز (Penicillinase) المنتج من بكتريا *E. faecalis* والمشفر ببلازميد اقتراني له القدرة على الانتقال بالاقتران إلى الانواع الاخرى للمسبحيات يكون مصدره بكتريا *S. aureus* الموجودة في البلعوم ويمتلك هذا الانزيم القدرة على تحطيم كل من البنسلين والامبسلين والاموكسسلين (Murray *et al.*, ١٩٨٦). ويمكن في حالة البكتريا المنتجة للبيتا لاكتاميز استعمال الاموكسلين مع الكالفونيت (Amoxicillin and potassium clavunate) كعلاج، اذ يعمل كمثبط انتحاري (Suicide inhibitor) لانزيمات البتا لاكتاميز المنتجة من البكتريا ويمنع تحطم المضاد (Brook, ١٩٨٩).

وجد مؤخرا بان بكتريا *S. pyogenes* وهي ممرض خارج خلوي لها القدرة على اختراق الخلايا الطلائية للبلعوم واللوزتين والبقاء بداخلها، وان لها القدرة على البقاء حية لأكثر من سبعة أيام في الاوساط المدعمة بالمضادات الحيوية (Ostrlund *et al.*, ١٩٩٧). والبكتريا التي تدخل الخلايا الطلائية تشكل خزين بكتيري لاعادة الاصابة نظرا لكونها في مأمن من اليات دفاع المضيف ومن تاثير البنسلين لعدم قدرته على اختراق الخلايا بعكس مضادي الكلندامايسين (Clindamycin) والريفامبسين (Rifampcin) اللذين يمتلكان قدرة جيدة على الاختراق (Neeman *et al.*, ١٩٩٨; Molinari and Chatwab, ١٩٩٨).

أظهرت الدراسات بان الكلندامايسين يكون أكثر فعالية في علاج الأمراض الناتجة عن المسبحيات من مضادات البيتا لاكتام, وانه يتصف بتاثير اطول ولا يتاثر بكثافة البكتريا ولا

بمرحلة نمو ها بعكس مضادات البيتا لاكتام، بالاضافة الى ان له القدرة على تثبيط انتاج البروتين M والعديد من الانزيمات والذيفانات التي لها دور في مقاومة البكتريا للبلعمة وتثبيط انتاج البكتريا لمتعدد السكريد الدهني (LPS) الذي يحفز المونوسايت على انتاج عامل نخر الورم (Efstratiou, ٢٠٠٠; Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠).

وقد وجد Tanako وجماعته (٢٠٠٥) بان للارثرومايسين والكلندامايسين القدرة على تثبيط انتاج العديد من الانزيمات والذيفانات المنتجة من بكتريا *S. pyogenes* وبضمنها الذيفان SPE A وانزيم السيستاين بروتييز SPE B والستربتولايسين O (SLO) مما يجعلها اقل قدرة على مقاومة البلعمة.

يعد الارثرومايسين البديل الامثل للبنسلين في حالة حساسية المرضى له ولكن سجلت حالات عديدة للمقاومة له في انحاء مختلفة من العالم كنتيجة لتزايد استعماله لعلاج المرضى الحساسين للبنسلين كما تزايدت نسب المقاومة له بصورة ملحوظة في كل من فرنسا وايطاليا واسبانيا وفلندة (Bingen et al., ٢٠٠٠; Cornaglia, ١٩٩٨; Cornaglia *et al.*, ١٩٩٦).

يشترك الارثرومايسين والكلندامايسين (مضادات مجموعة Macrolides) مع اللنكومايسين (Lincomycin) التابع لمضادات Lincomsides مع الستربتوغرامين B (Streptogramin B) أو مايعرف بمضادات MLS في القدرة على تثبيط انتاج البروتين من خلال ارتباطه بالوحدة S ٥٠ للرايبوسوم وتحفيز فك الارتباط بين معقد peptide –tRNA والرايبوسوم (Roberts *et al.*, ١٩٩٩).

توجد اليتين رئيسيتين في المسبحيات لمقاومة مضادات MLS الأولى تدعى بتحوير الهدف(Target modification) وتتضمن إضافة جزيئة أو اثنتين من المثيل إلى الادنين في الموقع (A٢٠٥٨) للرنا الرايبوسومي rRNA بفعل انزيمات Erythromycin Resistance Methelases المشفرة في الجين *erm*، وتحتوي المسبحيات على اربعة اصناف رئيسة لانزيمات Erm هي: Erm (A) وErm (B) و Erm (C) و Erm (F) (Roberts *et al.*, ١٩٩٩).

والآلية الثانية للمقاومة هي Active Drug Efflex أو ما يعرف بـ Macrolides drug efflex (mef) المشفر في الجين *mef A* والذي يعمل على تقليل تركيز الارثرومايسين داخل الخلية البكتيرية للحد الذي يصبح فيه غير مؤثرا (Roberts *et al.*, ١٩٩٩).

وتنتقل جينات *mef A* بالاقتران من سلالات بكتريا *S. pyogenes* المقاومة إلى السلالات الحساسة لكل من *S. pyogenes* و *E. faecalies* (Kataja *et al.*, ١٩٩٨). وأظهرت نتائج تحليل الجينات بان جينات *mef A* المشفرة Macrolides drug efflex في بكتريا *S.*

pyogenes تطابق جينات *mef E* المشفرة لمضخة الادوية في بكتريا *S. pneumonia* وبقية المسبحيات المحللة للدم بيتا بحوالي ٩٠ % (Kataja *et al.* ١٩٩٩).

كما يوجد نظام اخر لـ Active Drug Efflex اخر في بكتريا *S. pyogenes* فضلاً عن نظام mef A لا يثبط بالمثبطcarbonyl cyanide chlorophenylhydrazone (cccp) ولايشفر بالجين *mef A*، واقترح بان تكون الجينات المشفرة له مشابهة لجينات *msr A* و*msr A* في المكورات الموجبة لصبغة غرام والتي تمنحها صفة المقاومة لكل من الارثرومايسين والستربتوغرامين B (مضادات مجموعة MS) (Giovanetti *et al.*, ٢٠٠٢).

تكون معظم مقاومة بكتريا *S. pyogenes* للارثرومايسين ناتجة عن احتوائها على جينات *erm TR* و*erm AM* و*mef A* الكروموسومية (Mihaila *et al.*, ٢٠٠٤; Kataja *et al.*, ٢٠٠٠; Seppala *et al.*, ١٩٩٨)، فضلا عن وجود البلازميدات المشفرة للمقاومة المتعددة لكل من Lincomycin وErythromycin وVernamycin B (Bu- Hoi *et al.*, ١٩٨٤; Malke *et al.*, ١٩٨١; Clewel and Franke, ١٩٧٤)

وجد Giovanetti وجماعته (٢٠٠٣) بان جينات *erm (A)* المشفرة لمقاومة الارثرومايسين تنتقل بالاقتران من سلالات *S. pyogenes* المقاومة له الى السلالات الحساسة التابعة للأنواع *S. pyogenes* و*E. faecalies* و*Listeria innoca*.

كما تلعب الطفرات الرايبوسومية (Ribosomal Mutations) التي تحدث في الموقع C٢٦١١ للرنا الرايبوسومي من نوع ٢٣S أو البروتين الرايبوسومي L٤ دورا مهما في مقاومة كل من بكتريا *S. pyogenes* و*S. pneumonia* لمضادات الـ MLS (Malbruny *et al.*, ٢٠٠٢; Tait – Kamradt *et al.*, ٢٠٠٠).

سجلت مقاومة بكتريا *S. pyogenes* للتتراسايكلين في أنحاء مختلفة من العالم ومنها تونس والدنمارك واليابان والبرازيل وايران (Jassir *et al.*, ٢٠٠٠; De Melo *et al.*, ٢٠٠٠). ويعمل التتراسايكلين كمثبط لانتاج البروتين من خلال منعه لارتباط معقد aminoacyl-tRNA بالرايبوسوم وتعود مقاومة البكتريا للتتراسايكلين لامتلاكها لواحد أو اكثر من جينات *tet*، التي تمتلك المسبحيات ستة انواع من بروتينات Tetهي Tet K وTet L وTet M وTet O و Tet Q و Tet T المشفرة في جينات *tet K* و*tet L* و*tet M* و*tet O* و*tet Q* و *tet T* على التوالي (Chopra and Robert, ٢٠٠١; Burdet *et al.*, ١٩٨٢).

يشفر *tet K* و*tet L* لبروتينات غشائية (Membrane proteins) تعمل كمضخات (Drug pump) تقوم بضخ التتراسايكلين من الداخل الى خارج الخلية البكترية وتمنح صفة المقاومة لكل من التتراسايكلين والكلوروسايكلين (Chopra and Robert, ٢٠٠١; Robert, ١٩٩٦)، وغالبا ماتكون جيناتهما محمولة على بلازميدات صغيرة اقترانية أو قابلة للتحريك (Mobilization) ومن الممكن ان تحتوي السلالة الواحدة على الجينين معا (Brown and

tet T و tet S و tet Q و tet M و tet O بينما يشفر .Robert, ١٩٩١; Burdet *et al.*, ١٩٨٠) لبروتينات الحماية الرايبوسومية (Ribosomal protection proteins) التي ترتبط بالرايبوسوم وتعمل على تقليل حساسيته للديوكسي سايكلين والمونوسايكلين (Dantley *et al.*, ١٩٩٦)، والـ Tet M له القدرة على تمكين معقد aminoacyle – t RNA من الارتباط بالرايبوسوم بوجود التتراسايكلين باستهلاك طاقة يحصل عليها من تحويل جزيئة GTP إلى GDP (Burdet, ١٩٩٦).

تعد جينات *tet M* هي أول و أكثر جينات مقاومة التتراسايكلين وجودا في بكتريا *S. pyogenes*، يليها جينات *tet O* التي شخص وجودها سابقا في بكتريا *S. pneumonia* (Chopra and Robert, ٢٠٠١). وتوصل Hammerum وجماعته (٢٠٠٤) إلى وجود جينات *tet S* في بكتريا *S. pyogenes* المقاومة للمونوسايكلين.

تكون غالبية جينات *tet M* في المسبحيات محمولة على عناصر قافزة اقترانية تعود لعائلة *Tn ١٥٤٥* و*Tn ١٩٦* (Clewel *et al.*, ١٩٩٥)، في حين تكون جينات *tet O* محمولة على عناصر قافزة غير اقترانية يمكن ان تنتقل بالاقتران فقط في حالة انغراسها (Insertion) في بلازميدات اقترانية (Chopra and Roberts, ٢٠٠١).

ذكر Clewel وجماعته (١٩٩٥) بان العناصر القافزة (Transposons) المشفرة لجينات *tet* لها القدرة على الارتباط بعناصر قافزة اخرى وتكوين وحدات ذات أوزان جزيئة اكبر، وان جينات *tet M* تتمكن من الاتحاد مع العنصر القافز الحاوي على جينات *erm B* المشفرة لمقاومة مضادات مجموعة الـ MLS و*cat* المشفر لانزيم Chloromphenicol actytransferase الذي يمنح صفة المقاومة للكلورامفنيكول والمشفر لانزيم aminoglycosglycosida phosphorase الذي يمنح صفة المقاومة للكانامايسين وتكوين وحدة اكبر تحمل صفة المقاومة لاربع مضادات معا. كما ان جينات *tet Q* و*tet M* غالبا ما تتحد مع جينات *erm F* (Robert *et al.*, ١٩٩٩). والعنصر القافز *Tn ٣٧٠١* أول وحدة من هذا النوع تسجل في بكتريا (Le Bouguenec *et al.*, ١٩٨٨) *S. pyogenes*، كما سجلت هذه الحالة من في المسبحيات التابعة للنمط المصلي B حيث سجل وجود وحدة بحجم ٦٧ كيلو قاعدة (الوحدة cat–tet–erm) تشفر للمقاومة لكل من التتراسايكلين والارثرومايسن والكلورومفنيكول (Inamine and Burdet, ١٩٨٥). ووجد Giovanetti وجماعته (٢٠٠٣) بان جينات *tet O* في بكتريا *S. pyogenes* غالبا ما تكون مرتبطة بجينات *mef A* أو *erm A* المشفرة لمقاومة الارثرومايسين.

٢-٣ التكوين الوراثي للمسبحيات

بالرغم من كثرة الدراسات الوراثية عن بكتريا *S. pyogenes* الا ان المعروف عن التنظيم الجيني لجيناتها الكروموسومية ما يزال ضئيلا، إذ اقتصرت هذه الدراسات على دراسة جينات ألـ *mga* والجينات المشفرة لبروتين M وانزيم C٥a peptidase ومستقبلات الكلوبيولينات IgG و IgA وهذه الجينات تشكل ٠.٥% فقط من الجينوم البكتيري (Fonstein

(Haselkorn, ١٩٩٥ and ، إلى أن وضع Survorov و Ferretti (١٩٩٦) الخريطة الكروموسومية للسلالة *S. pyogenes* SF٣٧٠ التابعة للنمط المصلي M١ باستعمال الانزيمات القاطعة *Sma* I و*Sfi* I و*Sgr* AI واستعمال تقنية الترحيل الكهربائي النبضي (Plused field electrophoresis) لفصل القطع الناتجة، حيث توصلا إلى معرفة مواقع الجينات ووجدا بان اغلب الجينات ذات الأهمية في ضراوة البكتريا (جيينات*emm* و*ska* و*slo* و*plr* و *spe B*) تتموضع ضمن منطقة واحدة حجمها ٣٢٠ كيلو زوج قاعدة (شكل (٢ – ١)).

يبلغ حجم الكروموسوم في المسبحيات التابعة للسلالة *S. pyogenes* SF٣٧٠ (النمط المصلي M١) ١٩٢٠ كيلو زوج قاعدي وهو بذلك يمثل اقل من نصف حجم الكروموسوم في بكتريا *E. coli* البالغ ٤٧٠٠ كيلو زوج قاعدي وكروموسوم بكتريا *Bacillus subtilis* البالغ ٥٧٠٠ كيلو زوج قاعدي (Suvorov and Ferretti, ١٩٩٦).

وفضلا عن ذلك تحتوي المسبحيات على عناصر وراثية خارج كروموسومية تمثل البلازميدات المشفرة لمقاومة المضادات الحيوية وبعض الصفات المظهرية كإنتاج الهيمولايسين والبكتريوسين (Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠) .

عزلت بلازميدات المقاومة في المسبحيات لاول مرة من قبل العالم Courvalin وجماعته (١٩٧٢)، إذ أشار إلى وجود Satellite DNA في سلالات بكتريا *E. faecalis* المقاومة للمضادات الحيوية وعدم وجودها في السلالات الحساسة، و توصل Dunny وجماعته(١٩٧٣) إلى وجود البلازميدات الصغيرة في النوع *S. mutans* (Clewel, ١٩٨). و البلازميد*pAC١* ذو الوزن الجزيئي 17×10^6 أول بلازميد تم اكتشافه في المسبحيات التابعة للنوع *S. pyogenes* ويحمل صفة المقاومة لكل من الارثرومايسين و اللنكومايسين و Vernamycin Bα ويتواجد بواقع نسختين للكروموسوم .(Clewell and Franke, ١٩٧٤) و قد أثبتت نتائج تهجين الدنا بان*pAC١* المعزول من السلالة *S. pyogenes* AC-١ يطابق البلازميد المشفر لمقاومة نفس المضادات في السلالة٥ DS – التابعة للنوع *E. faecalis* بنسبة ٩٥ % (Yagi *et al.*, ١٩٧٥).

كما توصل Malke وجماعته (١٩٧٦) إلى وجود بلازميد آخر في بكتريا *S. pyogenes* هو البلازميد *pERL١* الذي يحمل صفة المقاومة لكل من الارثرومايسين و اللنكومايسين والستافلولايسين ويتواجد هذا البلازميد بواقع خمس نسخ نسبة للكروموسوم، ووجد Malke وجماعته (١٩٨١) بان هذه البكتريا تحتوي على بلازميد ثالث يشفر لمقاومة الارثرومايسين واللنكومايسين هو البلازميد *pSM١٠٤١٩* الذي يبلغ وزنه الجزيئي 15×10^6.

اشار الباحثون Malke (١٩٧٤) و Evans وMacarina (١٩٨٣) إلى امكانية انتقال البلازميد *pIP٥٠١* المشفر لمقاومة الكلورومفنيكول والارثرومايسين بالاقتران من بكتريا *E. faecalis* المقاومة الى سلالات *S. pyogenes* و*S. pneumonia* والسلالات الحساسة التابعة

للمجاميع B وC وD وF وH للمسبحيات. كما ذكر Buu و جماعته (١٩٨٤) وSchaberg و Zervos (١٩٨٦)بان بلازميدات المقاومة لمضادات مجموعة الماكروليدز (MLS) غالبا ما تكون صغيرة وتتصف بمدى واسع للمضيف (Broad host range) في المسبحيات (جدول ١)) (٢ –، في حين تكون البلازميدات المشفرة للمقاومة المتعددة (Multiple resistance) للتتراسايكلين والامينوكلايكوسيدات والكلورومفنيكول وبلازميدات الهيمولايسين والبكتريوسين كبيرة الحجم و ذات مدى ضيق للمضيف (Narrow host range) (Schaberg and Zervos, ١٩٨٦; Horoniceanu *et al.*, ١٩٨٢; Engel, *et al.*, ١٩٨٠).

جدول (٢ – ١) مدى المضائف لبلازميدات مقاومة الماكروليدز في المسبحيات (Schaberg and Zervos, ١٩٨٦)

Recipients	Plasmid
B. subtilis, *Lactobacillus* species, *S. aureus*, *S. cremoris*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. lactis*, *E. faecalis*, *S. sanguis*, *S. thermophilus*	*pPAMβ١*
S. aureus, *S. pyogenes*, *E. faecalis*	*pAC١*, *pSM١٥٣٤٦*
S. sanguis , group A and B streptococci	*pRI٤٠٢*
S. aureus, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *S. pneumonia*	*pRI٤٠٥*
Listeria innocua, *S. aureus*, group A, B, C, G, and H streptococci, *S. lactis*, *S. milleri*, *S. pneumonia*, *Pediococcus* species	*pIP٥٠١*
L. innocua, *S. aureus*, group A, B, C, G, and H, *S. pneumonia*	*pIP٦٤٦*, *pIR٦٥٩*, *pIP٦١٣*

وبصورة عامة فان البلازميدات شائعة الوجود في اغلب أنواع المسبحيات وليس من المستبعد الحصول على سلالة من *E. faecalis* أو *S. lactis* حاوية على ٥ بلازميدات أو أكثر لكنها تكون نادرة الوجود في النوعين *S. mutans* و*S. pneumonia*. وتتراوح أحجام البلازميدات في المسبحيات بين بضعة Mdal الى Mdal ٧٥ وتكون حوالي٨٥ % من البلازميدات ذات وزن جزيئي اقل من Mdal ٤٠، وتتواجد البلازميدات ذات الاوزان الجزيئية الواطئة بتردد عالي يتراوح بين ١٠ و ٣٠ نسخة للكروموسوم في حين تتواجد البلازميدات الأكبر بتردد اقل يتراوح بين ٢ إلى ١ نسخة للكروموسوم (Clewell, ١٩٨١).

يعد النقل بالعاثي (Transduction) أول طريقة لنقل المعلومات الوراثية تم اكتشافها في بكتريا *S. pyogenes* والنقل بالعاثي لا يقتصر على نقل الجينات الكروموسومية فحسب وإنما الجينات المحمولة على البلازميدات كذلك اذ وجد بان البلازميد *pERL ١* المشفر لمقاومة الارثرومايسين واللنكومايسين له القدرة على الانتقال بالعاثي من السلالات المقاومة التابعة للنوع *S. pyogenes* إلى السلالات الحساسة التابعة للمجموعتين C وG فضلا عن النوع *S. pyogenes* (Clewell, ١٩٨١).

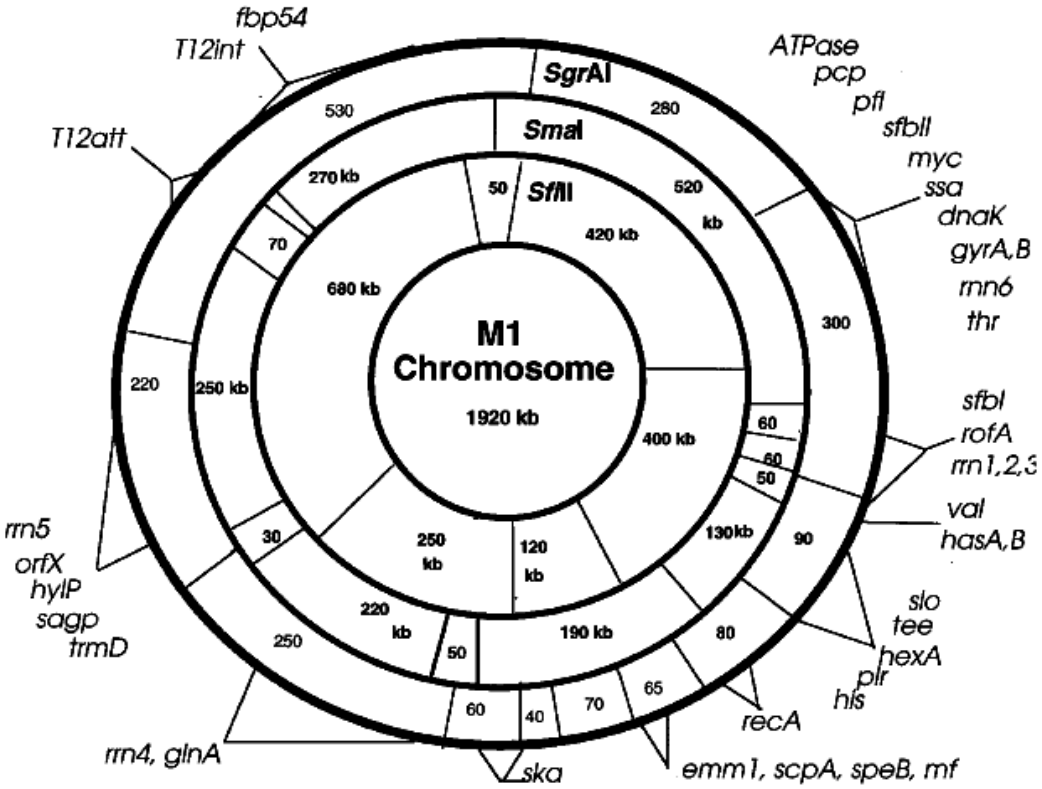
درس Stuart و Ferretti (١٩٧٣) صفة المقاومة للريفامبسين الكروموسومية ووجد انها تنتقل بالعاثي من سلالات *S. pyogenes* المقاومة إلى السلالات الحساسة. كما قام هذين الباحثين بدراسة الأسس الوراثية لانتقال صفة المقاومة في بكتريا *S. pyogenes* لخمسة عشر مضادا مختلفا باستعمال العاثي A٢٥ ووجدا بان صفة المقاومة لكل من الستربتومايسين والريفامبسين والارثرومايسين والبستراسين وThiostrepton وFusidic acidو وKasugamycin وSpectinpmycin وStreptolydiagn وSpiramycin تنقل بالعاثيA٢٥ في حين ان المقاومة لكل من الجنتامايسين والكانامايسين والنيومايسين والنوفابايوسين وOleondomycin تكون غير قابلة للنقل بالعاثي A٢٥، وأشارا ايضا الى ان المقاومة للارثرومايسين وسبارامايسين و Spectinpmycin تنتقل كدفعة واحدة وكذلك الحال بالنسبة للستربتومايسين والبستراسين وKasugamycin وFusidic acid، وكل من الريفامبسين والستربتوكلايدكان (Stuart and Ferretti, ١٩٧٨).

لاحظ Horodniceanu وجماعته(١٩٨١) بان مقاومة المضادات الحيوية تنتقل بالاقتران في سلالات بكتريا *S. pyogenes* و*S. pneumonia* والمجاميعB و F وG للمسبحيات حتى في غياب البلازميدات وهذا يشير الى كون هذه الصفات محمولة على عناصر قافزة اقترانية (Conjugative transposons). ويعد العنصر القافز*Tn ٩١٦* و*Tn ٣٧٠١* من اكثر العناصر القافزة التي تتم دراستها في المسبحيات التابعة للنوع *S. pyogenes* (Stevenes and Kaplan, ٢٠٠٠). وجد العنصر القافز *Tn ٩١٦* لاول مرة في بكتريا *E. faecalis* ويبلغ حجمه ١٨ كيلو زوج قاعدي ويتألف من الجين *tetM* المشفر لمقاومة التتراسايكلين، كما يحتوي في احدى نهايتيه

على جينات مشابهة لجينات *int* و*xis* في العاثي البكتيري التي تلعب نواتج التعبير الجيني لهما دورا في excision و integration العنصر القافز *Tn ٩١٦* (Rice, ١٩٩٨).

اما العنصر القافز الاقتراني *Tn ٣٧٠١* فيكون اكبر حجما من *Tn ٩١٦* ويتألف من العنصر القافز *Tn ٩١٦* الذي اضيف لاحدى نهايتيه جينات *erm* المشفرة لمقاومة الارثرومايسين (Le Bouguenece, ١٩٨٨). تحتوي كل من بكتريا *S. pyogenes* و *S. pneumonia* على عنصر قافز اقتراني بحجم ٢٥.٢ كيلو زوج قاعدي هو *Tn ١٥٤٥* الذي يتكون نتيجة لاتحاد العنصر القافز *Tn ٩١٦* مع جينات *tet M* و*erm AM* و *aphA-٣* المشفرة لمقاومة التتراسايكلين الارثرومايسين والكانامايسين على التوالي (Poyart *et al.*,١٩٩٠).

كما تحتوي بكتريا *S. pyogenes* على أنواع قليلة جدا من تسلسلات الغرس IS (Insertion sequences) كالتسلسل *IS ١٢٣٩* المؤلف من ١.١١ كيلو زوج قاعدي الذي يتواجد في حوالي ٪٣٣ من سلالات بكتريا *S. pyogenes* وليس من المستبعد ان تحتوي السلالة الواحدة على اكثر من نسخة واحدة منه حيث وجد بان كروموسوم بكتريا *S. pyogenes* التابعة للنمط المصلي M١ تحتوي على ١٢ نسخة منه (Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠).



شكل (٢-١) الخارطة الكروموسومية للسلالة *S. pyogenes* SF٣٧٠
(النمط المصلي M١) (Suvorov and Ferretti, ١٩٩٦)

٣-١ المواد والأجهزة المختبرية

٣-١-١ الأجهزة والأدوات المختبرية

استخدمت في هذه الدراسة الأدوات و الأجهزة المختبرية المدرجة ادناه:

اسم الجهاز	الشركة المصنعة
حاضنة مبردة Cooled CO_2 incubator	Gallen Kamp, England
حاضنة هزازة Shaker incubator	Gallen Kamp, England
حمام مائي Water bath	Tafesa, Germany
مقياس الأس الهيدروجيني PH-meter	Fisher
موصدة Autoclave	National, Japan
فرن كهربائي Electric oven	Gallen Kamp, England
جهاز النبذ المركزي Centrifuge	Hermle, Germany
جهاز تقطير Distillater	GFL, Germany
مازج ميكانيكي Vortex	Scientific Industries Inc, USA
مجهر ضوئي Light microscope	Olympus, Japan
مطياف ضوئي ٢١ Spectronic	Bausch & Lomp
ميزان Balance	Satorius, Germany
ميزان حساس Sensitive balance	Satorius, Germany
مرشحات دقيقة Millipore filters	Satorius, Germany
ثلاجة	Frigidaiere
مصدر الاشعة فوق البنفسجية UV-transilluminator	Hero Lab, Germany
جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis	Helena Laboratories, USA
مجهز التيار الكهربائي Power supplier	Gelman Sciences Inc
محرك مغناطيسي Magnatic stirrer	Gallen Kamp, England
ماصات دقيقة Micropipetts	Oxford, England

٣-١-٢ المواد الكيمياوية والبايولوجية

استخدمت في هذه الدراسة المواد الكيمياوية والبايولوجية المدرجة ادناه:

اسم المادة	الشركة المصنعة
كلوريد الصوديوم، أزايد الصوديوم، البنفسج البلوري، اينولين، لاكتوز، مانيتول، سوربيتول، الفا نفثول، الفانفثيل امين، اوكزالات الامونيوم، نيكروسين، D- سفرا نين، EDTA ، Na٢-EDTA، Tris base، Tris – Cl، أيودين، يوديد البوتاسيوم.	Fluka,Germany
هيدروكسيد الصوديوم، هيدروكسيد البوتاسيوم، توركوليت الصوديوم، كلوكوز، سكروز، رايبوز، رافينوز، سالسين ، تريهالوز، احمر الفينول ، نترات البوتاسيوم، كليسيرول، كلوروفورم، فينول، اكاروز، ايثانول، ايزوبروبانول، ايزو اميل الكحول، حامض الكبريتيك، حامض السلفونيك، حامض الخليك، حامض الهيدروكلوريك، كلوريد البار يوم، كلوريد الكالسيوم، كلوريد المغنيسيوم، كلوريد البوتاسيوم، فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين، كبريتات دودسيل الصوديوم SDS، برومو فينول الازرق، اسيتون، فورمالدهايد، زايلول.	B D H ,England
اللايسوزايم	Cinno Gen Inc., Iran
بروميد الاثيوديوم، انزيم البرونيز.	Sigma ,USA
نشاء، حليب الفرز، اكار اكار، وسط نقبع القلب والدماغ الصلب، وسط نقبع القلب والدماغ السائل، وسط مولر هنتون الصلب، وسط MR-VP السائل	Himedia ,India
وسط تربتون الصويا السائل ، وسط الاكار المغذي الصلب.	Oxoid ,England
تربتون، ببتون، خلاصة الخميرة	Difco ,USA
العدة اللاهوائية	AL-Razi Diagnostics, Iraq
عدة التشخيص المصلي للمجموعة A	Bio Merieux, France
اقراص المضادات الحيوية	Bioanalysis, France
المضادات الحيوية ستربتومايسين، كلورومفنيكول امبسلين، تتراسايكلين ريفامبسين اموكسلين تراي مثبريم	Ajanta pharma limited, India Troge, Germany MacLeods Pharmaceuticals LTD, India Asia pharmaceutical Industries, Syria SDI, Iraq

٣-١-٣ سلالات البكتريا القياسية والبلازميدات

استخدمت في هذه الدراسة سلالات البكتريا القياسية والبلازميدات المدرجة ادناه:

اسم السلالة أو البلازميد	التركيب الوراثي والصفة المظهرية	المصدر
E. coli MM ٢٩٤	*hsd R$^-$,hsd M$^+$,end AI ,pro$^-$, thi$^-$,Rif^r*	معهد الهندسة الوراثية -جامعة بغداد
E. coli HB١٠١	*hsd R$^-$, hsd M$^-$, rec A$^-$, leu$^-$, Pro$^-$, lac, gal$^-$,Sm^r*	معهد الهندسة الوراثية -جامعة بغداد
البلازميد *pBR* ٢٣٢	*tra$^-$,Ap^r ,Tc^r*	معهد الهندسة الوراثية -جامعة بغداد

hsd M$^-$,hsd M$^+$: وجود نظام التحويراو عدمه. *rec A$^-$*:فاقدة لنظام اعادة الارتباط.

end AI : فاقدة لفعالية Endonuclease I. *tra$^-$* : فاقدة للجينات المسؤولة عن الاقتران.

hsd R$^-$:فاقدة نظام التقييد. *gal* فاقدة لتخمر الكالكتوز.

Pro$^-$, thi$^-$, leu$^-$: الحاجة للثايمين والبرولين والليوسين.

Sm ,Rif^r, Ap^r , Tc^r:المقاومة للتتراسايكلين والامبسلين والريفامبسين والستربتومايسين.

٣-١-٤ الحيوانات المختبرية

استخدمت في هذه الدراسة الارانب النيوزلندية البيضاء *Oryctalagus cuniculus*.

٣-٢ المحاليل

٣-٢-١ محاليل المضادات الحيوية

٣-٢-١-١ محلول الامبسلين (Amp)

حضر باذابة ٠.٥ غم من المضاد في كمية من الماء المقطر المعقم واكمل الحجم الى ٥٠ مل للحصول على تركيز ١٠ ملغم\مل (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

٣-٢-١-٢ محلول الاموكسلين (Amx)

حضر باذابة ٠.٥ غم من المضاد في كمية من الماء المقطر المعقم واكمل الحجم الى ١٠٠ مل للحصول على تركيز نهائي ٥ ملغم\مل.

٣-٢-١-٣ محلول الستربتومايسين (Sm)

حضر بإذابة ٠.٧٥ غم من المضاد في كمية من الماء المقطر المعقم واكمل الحجم الى ٧٥ مل للحصول على تركيز ١٠ ملغم\مل (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

٣-٢-١-٤ محلول التتراسايكلين (Tc)

حضر باذابة ٠.٢٥ غم من المضاد في كمية من الكحول واكمل الحجم الى ١٢٥ مل للحصول على تركيزنهائي ٢ ملغم\مل (Miniatis *et al.*, ١٩٨٢).

٣-٢-١-٥ محلول الريفامبسين (Rif)

حضر بإذابة ٠.٢٥ غم من المضاد في كمية من الاسيتون واكمل الحجم الى ١٠٠ مل للحصول على تركيز نهائي ٢.٥ ملغم\مل (Miniatis *et al.*, ١٩٨٢).

٣-٢-١-٦ محلول التراي مثبريم (Tmp)

حضر باذابة ٠.١ غم من المضاد في كمية من الاسيتون واكمل الحجم الى ٢٠ مل للحصول على تركيز ٥ ملغم\مل (الجيلاوي، ٢٠٠٠).

٣-٢-١-٧محلول الكلورامفينيكول (Cm)

حضر بإذابة ٠.٢٥ غم من المضاد في كمية من الاسيتون واكمل الحجم الى ١٠٠مل للحصول على تركيز ٢.٥ ملغم\مل (Miniatis *et al.*, ١٩٨٢).

عقمت المحاليل المذكورة اعلاه بامرارها على مرشحات دقيقة (Millipore filters) بقطر ٠.٢٢ مايكروميتر وحفظت عند درجة حرارة ٢٠- مْ في عبوات معتمة ومعقمة و أضيفت إلى الأوساط الزرعية الانتخابية وفقا للتراكيز (مايكروغرام \مل) المذكورة أدناه.

المضاد الحيوي	Amp	Amx	Sm	Tc	Rif	Tmp	Cm
التركيز مايكروغرام \مل	١٠٠	٥٠	١٠٠	٢٠	١٠٠	٥	٥٠

٣-٢-٢ محاليل كواشف الاختبارات الكيموحيوية

٣-٢-٢-١ محاليل صبغة كرام

حضرت وفقا لما جاء في المصادر Stukus (١٩٩٧) و Benson (١٩٩٨).

٣-٢-٢-٢ كاشف اختزال النترات

محلول (A) حضر باذابة ٠.٨ غم من حامض السلفونيك في ١٠٠ مل من ٥ عياري حامض الخليك، وحفظ في قنينة معتمة عند درجة حرارة ٤ مْ.

محلول (B) حضر باذابة ٠.٥ غم من الفا نفثيل اميل في ١٠٠ مل من ٥ عياري حامض الخليك، وحفظ في قنينة معتمة عند درجة حرارة ٤ مْ.

وعند الاستعمال تمزج كميات متساوية من المحلولين A و B (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٢-٣ كاشف الفوكس-بروسكاور

حضرت محاليله حسب ما جاء في Macfaddin (٢٠٠٠) :

محلول (A) حضر بإذابة ٠.٥ غم من الفا نفثول في ١٠٠ مل من الكحول الاثيلي ٩٥٪ وحفظ في قنينة معتمة.

محلول (B) حضر بإذابة ٤٠ غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في كمية من الماء المقطر واكمل

الحجم الى ١٠٠ مل.

٣-٢-٣ المحاليل والصبغات المستعملة في التحري عن عوامل الضراوة

٣-٢-٣-١ المحلول الملحي الفسيولوجي

حضر باذابة ٠.٨٥ غم من كلوريد الصوديوم في كمية من الماء المقطر واكمل الحجم الى ١٠٠ مل وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ وضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٣-٢ محلول كلوريد الكالسيوم

حضر بإذابة ٠.٢٥ من كلوريد الكالسيوم في كمية من الماء المقطر واكمل الحجم الى ١٠٠ مل وعقم بالترشيح باستعمال مرشحات دقيقة بقطر٠.٤٥ مايكرومتر.

٣-٢-٣-٣ محلول صبغة المحفظة

حضر بإذابة ١٠ غم من النيكروسين (Nigrosin) في ١٠٠ مل من الماء المقطرثم غلي لمدة ٢٠ دقيقة و رشح لمرتين، وأضيف له ٠.٥ مل فورمالديهايد وحفظ عند درجة حرارة ٤ مْ لحين الاستعمال (Stukus, ١٩٩٧) .

٣-٢-٣-٤ محلول 2,2-dipyridyl

حضر بتركيز ٠.٢ مولار وعقم بالترشيح بمرشحات دقيقة بقطر٠.٢٢ مايكرومتر (Nassif and Sansonetti, ١٩٨٧).

٣-٢-٤ أنبوبة ماكفرلاند رقم ٥

حضرت من المحاليل التالية وحسب ما جاء في Stukus (١٩٩٧) :

(١) محلول كلوريد الباريوم ١٪

حضر بإذابة ١غم من كلوريد الباريوم في كمية من الماء المقطر المعقم وأكمل الحجم الى ١٠٠ مل .

(٢) محلول حامض الكبريتيك ١٪

حضر بمزج١ مل من حامض الكبريتيك المركز في كمية من مرق نقيع القلب والدماغ السائل المعقم وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل.

ثم اخذ ٠.٥ مل من محلول ١ وأضيف إلى ٩.٥ مل من محلول ٢ للحصول على عكورة تساوي تقريبا 15×10^{8}خلية/ مل.

٣-٢-٥ دارئ Saline- EDTA

يتكون من ٠.١٥ مولار NaCl و٠.١ مولار EDTA عدل الاس الهيدروجيني له الى ٨، وأكمل الحجم إلى ١لتر وعقم بالموصدة عند درجة ١٢١ مْ وضغط ١.٥ جو لمدة ١٥

دقيقة(Murmur,١٩٦١).

٣-٢-٦ دارئ STE

يتكون من ٠.١ مولار NaCl و ١٠ ملي مولار Tris-Cl و١ ملي مولار EDTA عدل الاس الهيدروجيني الى ٨ وعقم بالموصدة بدرجة حرارة ١٢١ مْ وضغط ١.٥ جو لمدة ١٥دقيقة (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

٣-٢-٧ محلول ٢٥٪ SDS

حضر انيا باذابة ٢.٥ غم من Sodium Dodecyl Sulfate في ١٠ مل من محلول دارئ Saline-EDTA(Murmur,١٩٦١).

٣-٢-٨ محلول الفينول (٨ pH)

حضر بإذابة الفينول المضاف له (٠.١ %) من مادة ٨-hydroxyquinoline في حمام مائي عند درجة حرارة ٦٨ مْ .وأضيف له حجم مساوي من ٠.٥ مولار Tris-Cl (pH= ٨) ومزج جيدا باستعمال المحرك المغناطيسي (Magnetic stirrer) لمدة ١٥ دقيقة، ثم ترك بدون تحريك وعند انفصال الطبقتين رفعت الطبقة المائية بماصة زجاجية وأعيدت المعاملة السابقة باستعمال ٠.١ مولار Tris Cl (pH= ٨) وكررت العملية لحين وصول الأس الهيدروجيني إلى ٨. بعدها أزيلت الطبقة المائية وحفظ الفينول تحت طبقة من الدارئ السابق في عبوة معتمة عند درجة حرارة ٤ مْ وبقي صالحا للاستعمال لأكثر من شهر (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩)

٣-٢-٩ مزيج الكلوروفورم : ايزواميل الكحول (٢٤ :١)

حضر بمزج ٢٤٠ مل كلوروفورم مع ١٠ مل من الكحول الا يزواميلي وحفظ في عبوة معتمة عند درجة حرارة ٤ مْ (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩) .

٣-٢-١٠ مزيج الفينول : كلوروفورم : ايزواميل الكحول (٢٥ : ٢٤ : ١)

حضر بمزج ٢٥٠ مل من محلول الفينول مع ٢٥٠ مل من مزيج الكلوروفورم: ايزواميل الكحول (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

٣-٢-١١ دارئ TE

يتكون من ١٠ ملي مولار Tris-c و١ملي مولار EDTA وعدل الاس الهيدروجيني له الى ٨ وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ وضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة وحفظ عند درجة حرارة ٤ مْ (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩) .

٣-٢-١٢ محلول صبغة بروميد الاثيديوم

حضر بإذابة ٠.٢٥ غم من صبغة بروميد الاثيديوم في ٥٠ مل من الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي ٥ ملغم \مل (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

٣-٢-١٣ دارئ التحميل loading buffer

يتكون من ٠.٢٥ % من صبغة البروموفينول الازرق و٤٠ % محلول السكروز في الماء المقطر وحفظ عند درجة حرارة ٤ مْ (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

٣-٢-١٤ دارئ TBE

يتكون من ٠.٠٨٩ مولار من Tris base و٠.٠٨٩ مولار حامض البوريك و٠.٠٠٢ مولار Na٢-EDTA، عدل الأس الهيدروجيني إلى ٨ وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ و ضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩) .

٣-٣ الأوساط الزرعية

٣-٣-١ الأوساط الزرعية الجاهزة

٣-٣-١-١ مرق تربتون الصويا

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ و ضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة .

٣-٣-١-٢ وسط نقيع القلب والدماغ السائل

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ و ضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة .

٣-٣-١-٣ وسط نقيع القلب والدماغ الصلب

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ و ضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة.

٣-٣-١-٤ وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم

حضر بإضافة ٥ % من دم الإنسان فصيلة A إلى وسط نقبع القلب والدماغ الصلب المعقم بالموصدة والمبرد إلى درجة حرارة ٥٠ مْ.

٣-٣-١-٥ وسط MR-VP السائل

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة ووزع على أنابيب الاختبار وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ وضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة.

٣-٣-١-٦ وسط مولر هنتون الصلب

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة وعقم بالموصدة ثم برد إلى درجة حرارة ٥٠ مْ وأضيف له الدم البشري بنسبة ٥ % وصب في إطباق معقمة.

٣-٣-٢ الأوساط الزرعية المحضرة

٣-٣-٢-١ وسط تربتون الصويا مع الازايد والبنفسج البلوري

حضر بإذابة ٣ غم من وسط مرق تربتون الصويا، و ٠.٠٠٢ غم من أزايد الصوديوم و١ مايكروغرام من البنفسج البلوري في ٩٠ مل من الماء المقطر وضبط إلا س الهيدروجيني إلى ٧.٣ وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل ووزع على أنابيب الاختبار وعقم بالموصدة عند درجة

حرارة ١٢١ مْ و ضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة .

٣-٣-٢-٢ وسط اختزال النترات

حضر بإذابة ٣ غم من مرق تربتون الصويا و ٠.١ غم من نترات البوتاسيوم في ١٠٠ مل من الماء المقطر، ثم ضبط الأس الهيدروجيني إلى ٧.٣ وأكمل الحجم إلى١٠٠ مل ووزع على أنابيب الاختبار وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ و ضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة .

٣-٣-٢-٣ وسط تحمل الملوحة

حضر مرق تربتون الصويا حسب تعليمات الشركة المجهزة وأضيف له كلوريد الصوديوم بتركيز ٦.٥ % ووزع على أنابيب الاختبار وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ و ضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة (عيسى، ٢٠٠٠) .

٣-٣-٢-٤ وسط اختبار القدرة على النمو في أملاح الصفراء

حضر مرق تربتون الصويا حسب تعليمات الشركة المجهزة وأضيف له توركوليت الصوديوم بتركيز ٤٠ % ووزع على أنابيب الاختبار وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ و ضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة (عيسى، ٢٠٠٠).

٣-٣-٢-٥ وسط تخمر السكريات

حضر وسط مرق تربتون الصويا حسب تعليمات الشركة المجهزة وأضيف له واحد من السكريات آلاتية: (مانيتول Mannitol، انيولين Inulin، لاكتوز Lactose، تريهالوز Trehalose، رايبوز Ribose، سالسين Salicin، رافينوز Raffinose، سوربتول Sorbitol) بتركيز ١٪ وكاشف احمر الفينول بتركيز ٠.٠٠١٨ % وضبط الأس الهيدروجيني إلى ٧.٤ وعقم بالموصدة بدرجة حرارة ١٢١ مْ وضغط ١.٥ جو لمدة ١٠ دقائق (عيسى، ٢٠٠٠).

٣-٣-٢-٦ وسط M٩ الصلب

حضر بإذابة ٦ غم Na_2HPO_4 و٥ غم كلوريد الصوديوم و٣ غم كلوريد الامونيوم و٠.٥ غم أكار-أكار في ٩٨٨ مل ماء مقطر وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ و ضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة، ثم برد لدرجة حرارة ٥٥ م وأضيف له ٢ مل من محلول ١ مولار كبريتات المغنيسيوم و١٠ مل من محلول ٢٠% كلوكوز المعقمين بالترشيح بمرشحات دقيقة بقطر٠.٢٢ مايكرومترا (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

٣-٣-٢-٧ وسط إنتاج السايدروفور

حضر بإضافة ٠.٢ ملي مولار من محلول ٢,٢-dipyridyl إلى ١٠٠ مل من وسط M٩ المعقم والمبرد إلى ٥٠ مْ وصب في أطباق معقمة (Nassif and Sansonetti, ١٩٨٧).

٣-٣-٢-٨ وسط التحري عن إنتاج أنزيم السيستاين بروتييز

حضر وسط Skim Milk Columbia Agar كما جاء في (عيسى، ٢٠٠٠) وذلك باذابة ٢.٣ غم ببتون و١.٠ غم نشا و٠.٥ غم كلوريد الصوديوم و ٣غم أكار -أكار في مل ١٠٠ من الماء المقطر، وعدل الأس الهيدروجيني إلى ٧.٣ وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ و ضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة, ثم برد إلى درجة حرارة ٥٠ مْ وأضيف له ١٠٠ مل من الحليب المقشود بتركيز ٣ % المعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ وضغط ١.٥ جو لمدة ١٠ دقائق وصب في أطباق معقمة.

٣-٣-٢-٩ وسط SOC السائل

حضر باذابة ٢ غم تربتون و٥ .٠ غم خلاصة الخميرة و٠.٠٥ غم كلوريد الصوديوم في ٩٠ مل ماء من الماء المقطر المزالة ايوناته (Deionized water) ثم اضيف له١ مل من محلول ٠.٢٥ مولار كلوريد البوتاسيوم وعدل الاس الهيدروجيني له إلى ٧ و اكمل الحجم الى ١٠٠ مل وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ و ضغط ١.٥ جو لمدة ١٥ دقيقة. وقبل الاستعمال اضيف له ٠.٥ مل من ٢ مولار كلوريد المغنيسيوم و١ مل ٠.٢٥ مولار كلوكوز المعقمين بالترشيح (Sambrook *et al*., ١٩٨٩)

٣-٤ طرائق العمل

٣-٤-١ العزل

أخذت ٩٤ مسحة بلعوم من مرضى مصابين بامراض الجهاز التنفسي العلوي (التهاب الحنجرة و اللوزتين) من كلا الجنسين وباعمار مختلفة للمدة من كانون الثاني ٢٠٠٤ ولغاية نهاية شهر اب ٢٠٠٤ .

زرعت المسحات مباشرة في وسط مرق تربتون الصويا مع الازايد والبنفسج البلوري وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤-٤٨ ساعة، و فيما بعد اخذ ملئ الناقل من النمو وخطط على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم للحصول على مستعمرات منفردة وحضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة ثم فحصت الأطباق للتحري عن المستعمرات النموذجية للمسبحيات ولوحظ كل من نوع التحلل وصفات المستعمرة وخططت المستعمرات المشكوك فيها في وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم مرة أخرى مع عمل طعنات في الاكار للتأكد من نوع التحلل وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة.

٣-٤-٢ التشخيص

شخصت المسبحيات المعزولة بالاعتماد على صفاتها الزرعية و المجهرية و الكيموحيوية والمصلية وفقا لما جاء في Holt وجماعته (١٩٩٤)، وبالاعتماد على الطرائق التي ذكرها Macfaddin (٢٠٠٠) .

٣-٤-٢-١ الصفات الزرعية

اعتمد على الصفات الزرعية للمستعمرات الفتية النامية على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم من حيث شكل المستعمرات وحجمها ونوع حافاتها وارتفاعها.

٣-٤-٢-٢ الصفات المجهرية

تم عمل مسحات من المستعمرات النامية على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم وصبغت بصبغة غرام بطريقة هوكر المحورة (Hucker modification) المذكورة في Benson و جماعته (١٩٩٨) وفحصت تحت العدسة الزيتية للمجهرلملاحظة تفاعل الخلايا مع الصبغة وشكلها وحجمها و ترتيبها.

٣-٤-٢-٣ الصفات الكيموحيوية و المصلية

١. اختبار الكاتاليز

زرعت البكتريا على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة، ثم اخذ ملئ الناقل ووضع على شريحة زجاجية واضيف اليه قطرة من محلول ٣% بيروكسيد الهايدروجين.تكون النتيجة الموجبة بظهورفقاعات من غاز الاوكسجين.

٢. اختبار اختزال النترات

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط الاختبار بالبكتريا وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٤٨ ساعة ثم أضيف قطرات من الكاشف. ظهور لون احمر خلال ٣٠ ثانية دليل على النتيجة الموجبة.

٣. اختبار قابلية البكتريا على النمو اللاهوائي

زرعت البكتريا على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم وحضنت لاهوائيا باستعمال الجار اللاهوائي (Unaerobic jar) والعدة اللاهوائية الخاصة بتحرير غازي الهيدروجين وثاني اوكسيد الكاربون وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٤٨ ساعة وسجل وجود النمو.

٤. اختبار قابلية البكتريا على النمو بوجود ٥٪ غاز ثاني اوكسيد الكاربون

زرعت البكتريا على و سط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم وحضنت باستعمال جار الشمعة (Candle jar) لتوفير من غاز ثاني اوكسيد الكاربون بدرجة ٣٧ مْ لمدة ٤٨ ساعة وسجل وجود النمو.

٥. اختبار الحساسية للبستراسين وSXT وOptochin

زرعت البكتريا على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم ووضعت عليها اقراص المضادات الحيوية التفريقية (Differential) التالية :

١. بستراسين (Bacitracin) بتركيز ٠.٠٤ وحدة عالمية لكل قرص

٢. اوبتوكين (Optochin) بتركيز ٥ مايكروغرام لكل قرص

٣. SXT الحاوية على Sulfamethoxasole وTrimethoprim بتركيز٢٣.٧٥ و ١.٢٥ مايكروغرام على التوالي لكل قرص. وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة ثم قيست اقطار التثبيط حول الاقراص وقورنت بالاقطار المذكورة في Macfaddin (٢٠٠٠).

٦. اختبار قابلية البكتريا على النمو بدرجة ١٠ و٤٥ م

زرعت البكتريا على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم وحضنت عند درجة حرارة ١٠ و٤٥ مْ لمدة ٢٤ ساعة وسجل النمو.

٧. اختبار تحمل الملوحة

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط الاختبار بالبكتريا وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة وسجل النمو.

٨. اختبار قابلية البكتريا على النمو بوجود املاح الصفراء ٤٠٪

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط املاح الصفراء وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة وسجل النمو.

٩. اختبار تخمر السكريات

لقحت الانابيب الحاوية على اوساط السكريات بالبكتيريا وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة النتيجة الموجبة تكون بتغيير لون الوسط الاحمر الى الاصفر.

١٠. فحص الفوكس بروسكاور(VP) او اختبار انتاج الاسيتون

لقحت الانابيب الحاوية على وسط MR-VP وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٤٨ ساعة ثم اضيف لها ٦ قطرات من الكاشف A وقطرتين من الكاشف B.تكون النتيجة الموجبة بظهور لون احمر خلال ٣-٥ دقائق.

١١. الفحص المصلي

اجري الفحص باستعمال عدة التشخيص المصلي الخاصة بالنمط المصلي A للتحري عن بكتريا *S. pyogenes* حسب تعليمات الشركة المجهزة كالاتي :

١. اخذ ملئ الناقل من مزروع البكتريا النامي على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم بعمر ١٨ ساعة واضيف الى انبوب اختبار حاوي على ٠.٤ مل من انزيم الاستخلاص Extraction enzyme (المحضر باضافة ١٠ مل من الماء المقطر المعقم الى العبوة الحاوية على الانزيم المجفد) ومزج باستعمال المازج (vortex).

٢. حضنت الانابيب عند درجة حرارة ٣٧ مْ في حمام مائي لمدة ١٥ دقيقة لاستخلاص المستضد الكاربوهايدراتي لجدار الخلية.

٣. وضعت قطرة من المستخلص على شريحة زجاجية ومزجت مع قطرة من من عالق الـ latex الحاوي على الاجسام المضادة الخاصة بالمجموعة المصلية A .

٤. دورت الشريحة الزجاجية لمدة دقيقتين وسجلت النتيجةبالمقارنة مع محلول السيطرة الموجبة (Positive control) اذ يحدث التلازن خلال ٣-٢ دقائق في الفحص الموجب.

٣-٢-٣ الحفظ

اخذت مستعمرة منفردة بعمر ساعة نامية على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم وزرعت على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم المائل وحضنت لمدة ١٨ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ مْ ، وخزنت عند درجة حرارة ٤ مْ واستعملت لحفظ البكتيريا لفترة لاتزيد عن الاسبوعين. ولاجل خزن البكتيريا لفترات اطول زرعت مستعمرة منفردة بعمر١٨ ساعة نامية على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم في ٠.٨ مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل وحضنت لمدة ١٨ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ مْ ثم أضيف لها ٠.٢ مل من الكيليسيرول المعقم بالموصدة ومزجت باستعمال المازج الميكانيكي وحفظت عند درجة حرارة ٢٠- مْ لمدة تزيد على السنتين (Benson , ١٩٩٨; Stukus, ١٩٩٧).

٣-٤-٤ اختبارمقاومة البكتريا للمضادات الحيوية

٣-٤-٤-١ اختبار مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية بطريقة الأقراص

اجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية بالاعتماد على طريقة Kirby-Bauer المذكورة في Stukus (١٩٩٧) وكما ياتي:

١. نميت البكتريا على وسط نقيع القلب والدماغ السائل بدرجة ٣٧ مْ لمدة ١٨ ساعة لحين وصول عكورتها الى عكورة مساوية لعكورة انبوبة ما كفرلاند رقم ٥.

٢. نشرت البكتريا على وسط مولر هنتون الصلب مع الدم باستعمال مسحة قطنية معقمة بثلاث اتجاهات وتركت الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٢٠ دقيقة.

٣. وضعت عليها اقراص المضادات الحيوية وحضنت الاطباق بدرجة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة ثم قيست اقطار التثبيط وقورنت باقطار التثبيط القيا سية National Committee for Clinical Laboratory Standers (١٩٩٧)المذكورة في ادناه:

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز (مايكروغرام/قرص)	اقطار التثبيط (ملم)		
			حساسة	متوسط الحساسية	مقاومة
Vancomycin	VA	٣٠	>١٢	١٠-١١	<٩
Lincomycin	L٢	٢	>١٥	١٠-١٤	<٩
Amoxicillin	AX	٢٥	٢٠	-----	١٩
Novabiocin	NV	٣٠	>٢١	١٥-٢٠	<١٤
Cefaclor	Cec	٣٠	>١٨	١٥-١٧	<١٤
Clindamycin	DA	٢	>٢١	١٥-٢٠	<١٤
Ampicillin	AMP	١٠	>١٤	١٢-١٣	<١١
Streptomycin	Sm	١٠	>١٥	١٢-١٤	<١١
Trimethoprim	Tmp	٥	>١٦	١١-١٥	<١٠
Cloxacillin	CX	١	>١٤	١٠-١٣	<٩
Chloramphenicol	C	٣٠	>١٨	١٣-١٧	<١٢
Erythromycin	E	١٥	>٢٣	١٤-٢٢	<١٣
Rifampicin	RA	٥	>٢٠	١٧-١٩	<١٦
Cephalexin	Cl	٣٠	>١٨	١٥-١٧	<١٤
Tetracyclin	TE	٣٠	>١٩	١٥-١٨	<١٤

٣-٤-٤-٢ اختبار مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية بطريقة النمو في الوسط الصلب

حضر وسط نقيع القلب والدماغ الصلب أو وسط الاكار المغذي الصلب وعقم بالموصدة وبرد لدرجة حرارة ٥٠ مْ وأضيف له واحد من محاليل المضادات الحيوية وبالتراكيز المذكورة سابقا وصب في إطباق معقمة وترك ليتصلب ثم حضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة للتأكد من خلوها من التلوث ثم زرعت البكتريا بطريقة Picking and patching وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة.

٣-٤-٥ التحري عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا

٣-٤-٥-١ التحري عن وجود المحفظة

تم التحري عن وجود المحفظة وفق ما جاء في Stukus (١٩٩٧) وذلك بأخذ ملئ الناقل من مزروع بكتيري فتي بعمر١٨ ساعة نامي في وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم ووضعه على شريحة زجاجية ومزجه مع قطرة من صبغة النيكروسين وتغطيتها بغطاء الشريحة وفحصها تحت المجهر النتيجة الموجبة تكون بظهور هالة شفافة غير مصطبغة بالصبغة حول الخلية البكتيرية تمثل المحفظة.

٣-٤-٥-٢ انظمة نقل الحديد

٣-٤-٥-٢-١ إنتاج الهيمولايسين

زرعت البكتريا في وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم مع ملاحظة عمل طعنات في الاكار لملاحظة التحلل الذي يسببه الستربتولايسين الحساس للاوكسجين وحضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة ثم فحصت وسجل وجود التحلل الدموي.

٣-٤-٥-٢-٢ التحري عن إنتاج السايدروفور

زرعت البكتيريا في وسط إنتاج السايدروفور وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة ثم فحصت للتحري عن وجود نمو أو عدمه. النتيجة الموجبة تكون بقدرة البكتيريا على النمو بوجود مادة dipridyl -٢,٢ الساحبة للحديد الحر.

٣-٤-٥-٣ التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الستربتوكاينيز

اخذ ملى الناقل من مزروع بعمر ١٨ ساعة نامي في وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم واستعمل لتلقيح ١٠ مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة بعدها اخذ ٠.١ مل من الأخير واستعمل لتلقيح ١٠ مل من الوسط نفسه وحضن بالظروف نفسها ثم نقل ٠.٥ مل من المزروع المنشط واضيف إلى أنبوبة اختبار معقمة حاوية على ٠.٢ مل من البلازما البشري و ٠.٨ مل من المحلول الملحي الفسيولوجي و٠.٢٥ مل من محلول كلوريد الكالسيوم وحضن عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة وقورن مع أنبوبة السيطرة الحاوية على ٠.٥ مل من الوسط المعقم والمعاملة تحت نفس الظروف. النتيجة الموجبة تكون بعدم تكون خثرة في أنبوبة الاختبار مقارنة مع أنبوبة السيطرة.

٣-٤-٥-٤ التحري عن إنتاج إنزيم السيستاين بروتييز

زرعت البكتريا على وسط كولومبيا الصلب مع الحليب الفرز وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤-٤٨ ساعة. النتيجة الموجبة ظهور هالة تحلل شفافة تحيط بالمستعمرات دليل على قدرة البكتريا على إنتاج الإنزيم.

٣-٤-٥-٥ التحري عن قدرة البكتريا على إنتاج الذيفانات المولدة للحمرة

تم التحري عن قدرة البكتيريا على إنتاج الذيفانات المولدة للحمرة باستعمال اختبار الجلد في الارنب (Dick skin test) وكالاتي:

١. زرعت البكتيريا المراد اختبار قدرتها على انتاج الذيفانات المولدة للحمرة في٥ مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة.

٢. اخذ ٠.١ مل من المزروع المنشط واستعمل لتلقيح ٥ مل من الوسط نفسه وحضن تحت الظروف ذاتها.

٣. نبذ المزروع بسرعة ١٠٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق لترسيب الخلايا ومكونات الوسط وأهمل الراسب وعقم الرائق بالترشيح بمرشحات دقيقة بقطر٠.٢٢ ما يكرومتر، ثم اخذ١ مل من الأخير وأضيف اليه ضعف الحجم من الأسيتون المبرد الى٢٠- مْ، ثم نبذ بسرعة ١٠٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة.

٤. أزيل الرائق ووضعت الأنابيب بصورة مقلوبة على ورق ترشيح معقم للتخلص من بقايا الأسيتون.

٥. اذيب الراسب في ٠.٥ مل من المحلول الملحي الفسيولوجي، وحقن ٠.١ مل منه في جلد الأرنب وفحص موضع الحقن بعد ٦ و ١٨ و ٢٤ ساعة وقورن مع السيطرة السالبة الناتجة من حقن ٠.١ مل من راشح الوسط غير المزروع والمعامل بنفس المعاملة.

٦. سجلت اقطار مناطق الاحمرار والتثخن وقورنت مع الاقطار المذكورة في Dick و Dick (١٩٢٤) وسجلت نتيجة الفحص.

٣-٤-٦ عزل الدنا

تم استخلاص الدنا الكلي للعزلات بطريقة التمليح الخارجي (Salting out) لـ Pospiech و Neuman (١٩٩٥) كالاتي:

١. نشرت البكتريا المراد استخلاصها في وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة، بعدها اخذ ملئ الناقل من المزروع البكتيري واستعمل لتلقيح ٥٠ مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل المضاف له مضاد حيوي مناسب و بالتراكيز المذكورة سابقا وحضن تحت الظروف ذاتها.

٢. نقل المزروع البكتيري إلى أنبوبة بولي اثيلين معقمة ونبذ بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠دقائق .

٣. نبذ المزروع بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق وعلق الراسب في ٥ مل من دارئ STE نبذت الأنابيب بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة وكررت عملية الغسل لمرتين بعدها علق الراسب في ٥ مل من الدارئ .

٤. أضيف ٥٠٠ مايكروليتر من محلول اللايسوزايم (Lysozyme) المحضر انيا (بتركيز٢٠ مايكروغرام \مل) إلى عالق الخلايا ومزج بقلب الانبوبة مرتين بهدوء و حضن في حمام مائي عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ساعة واحدة.

٥. اضيف ٦٠٠ مايكروليتر من محلول ٢٥٪ SDS المسخن لدرجة حرارة ٥٥ مْ و ١٠٠ مايكروليتر من انزيم البرونيز (Pronase) (بتركيز ٢ مايكروغرام \مل) ومزج بقلب الأنبوبة مرتين بهدوء و وضع في حمام مائي عند درجة حرارة ٥٥ مْ لمدة ٢-٣ ساعة.

٦. أضيف ٢ مل من ٥ مولارNaCl ومزج بقلب الأنبوبة مرتين بهدوء وتركت الأنابيب لتبرد لدرجة حرارة الغرفة. بعدها أضيف ٥ مل من مزيج فينول- كلوروفورم-ايزواميل الكحول ومزج بالتقليب المستمر لمدة ٣٠ دقيقة.

٧. نبذت الأنابيب بسرعة ١٠٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق، ثم نقلت الطبقة المائية إلى أنبوبة بولي اثيلين جديدة ومعقمة وكررت عملية الاستخلاص بالفينول .

٨. نبذت الأنابيب بسرعة ١٠٠٠٠دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق، ثم نقلت الطبقة المائية الى أنبوبة جديدة ومعقمة ورسب الدنا بإضافة ٠.٦ حجم: حجم ايزوبروبانول مبرد الى٢٠- مْ.

٩. لف الدنا على ماصة باستور وغسل في ايثانول ٧٠ % ثم جفف واذيب في ٤٠٠ مايكروليتر من دارئ TE وحفظ عند درجة حرارة ٢٠- مْ لحين الاستعمال.

٣-٢-٧ الترحيل الكهربائي

أجريت عملية الترحيل الكهربائي لفصل مستخلص الدنا الكلي للخلايا وفحصه وبدأت هذه االعمليه بإذابة ١ غم من الاكاروز في ١٠٠ مل من دارئ TBE في حمام مائي عند درجة حرارة ١٠٠ مْ وترك الهلام ليبرد لدرجة حرارة ٥٠ مْ ثم أضيف له ١٥ مايكروليتر من محلول بروميد الاثيديوم بتركيز ٥ ملي غرام/ مل ورج جيدا. وفي أثناء ذلك حضر قالب صب الهلام (Tray) باحاطة حافتيه المفتوحتين بشريط لاصق وتثبيت مشط تكوين الحفر (Comb) على بعد ١ سم من إحدى حافتي القالب ثم صب الهلام داخل القالب الموضوع في وضع أفقي تماما وترك ليتصلب لمدة ٣٠ دقيقة وفيما بعد رفع المشط والشريط اللاصق برفق ووضع القالب داخل حوض الترحيل الكهربائي الحاوي على دارئ TBE بحيث غمر سطح الهلام بالدارئ. اجريت عملية تحميل (Loading) العينات في حفر الهلام بأخذ ٢٥ مايكرو ليتر من عينة الدنا ومزجها مع ٦ مايكروليتر من دارئ التحميل loading buffer ثم اخذ ٢٥ مايكروليتر من المزيج باستعمال ماصة دقيقة ووضع في حفر الهلام.

ثم رحلت العينات بامرار فرق جهد قدره ٤٠ فولت ولمدة ٠.٥-١.٥-٣ ساعة وتم التقصي عن الدنا بتعريضه إلى مصدر للأشعة فوق البنفسجية (UV-transilluminator) بطول موجي ٢٥٦ نانومترا (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩) .

٣-٢-٨ الاقتران البكتيري في الوسط الصلب

أجريت عملية الاقتران البكتيري في الوسط الصلب بالاعتماد على الطرائق التي ذكرها Miller (١٩٧٢) كالاتي :

١. نميت الخلايا الواهبة(*S. pyogenes*١,٨,٩; *S. mitis*١; *S.salivarius*١,٢) في احد جهات الطبق الحاوي على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب الخالي من أي مضاد وفي الجهة المقابلة نميت البكتريا المستلمة *E. coli* MM٢٩٤ و *E.coli* HB١٠١ الخالية من أي بلازميد وفي وسط الطبق مزجت الخلايا المستلمة والواهبة وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة.

٢. علق مزيج الخلايا الواهبة والمستلمة في محلول التخفيف الفسلجي ثم نشر ٠.١ مل منه على الوسط الانتقائي الحاوي على مضادين احدهما المضاد المميز للسلالة المستلمة والأخر مميز للبلازميد المراد نقله لغرض تنمية الخلايا المقترنة فقط وحضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤-٤٨ ساعة.

٣-٢-٩ التحول الوراثي

أجريت عملية التحول الوراثي (Transformation) حسب ما ورد في Sambrook و جماعته (١٩٨٩) واتبعت هذه الطريقة لاجراء التحول الوراثي للخلايا المؤهلة من بكتريا اشريشيا القولون *E. coli* MM ٢٩٤ وتمت كالاتي :

٣-٢-٩-١ تحضير الخلايا المؤهلة

١. نميت الخلايا المستلمة في ٥ مل من وسط SOC السائل وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ في الحاضنة الهزازة بسرعة ٦٠ دورة / دقيقة لمدة ١٨ ساعة لتنشيط الخلايا.

٢. لقح ٥٠ مل من وسط SOC السائل بواحد مل من المستنبت المنشط وحضنت البكتريا بالظروف أنفة الذكر لمدة أقصاها ٣ ساعات حتى تصل الامتصاصية الضوئية إلى ٠.٣ على طول موجي ٥٥٠ نانوميترا.

٣. وزع مستنبت البكتريا في أنابيب اختبار معقمة بعد انتهاء مدة الحضن ثم بردت في حمام ثلجي لمدة ١٠ دقائق

٤. نبذت خلايا البكتريا مركزيا بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق. ثم اخذ راسب الخلايا وعلق في ٢٠ مل من ٠.١ مولار من محلول كلوريد الكالسيوم المعقم والمبرد لدرجة الصفر المئوي ثم وضع في حمام ثلجي لمدة ٣٠ دقيقة.

٥. نبذت خلايا البكتريا بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق ثم اخذ راسب الخلايا وأعيد تعليقها في ١ مل من محلول كلوريد الكالسيوم ثم وزعت الخلايا المؤهلة في أنابيب ابندروف معقمة ومبردة بواقع ٢٠٠ مايكرو ليترا من عالق الخلايا لكل أنبوب وحفظت عند درجة حرارة ٤ مْ لمدة ١٢-١٨ ساعة.

٣-٢-٩-٢ التقاط الدنا البلازميدي

١. وضعت ٨ أنابيب ابندروف حاوية على الخلايا المؤهلة في حمام ثلجي لمدة ١٥ دقيقة.

٢. أضيف للأنبوب الأول ١٠ مايكروليتر من دنا البلازميد *pBR* ٣٢٢ لاستعماله كسيطرة موجبة وأضيف للثاني ١٠ مايكروليتر من دارى TE كسيطرة سالبة وللأنابيب الستة الباقية ١٠ مايكرو ليتر من دنا العزلات المدروسة ومزج الخليط بهدوء وترك في الحمام الثلجي لمدة ٤٥ دقيقة.

٣. عرضت الخلايا المؤهلة لصدمة حرارية عند درجة حرارة ٤٢ مْ لمدة ٩٠ ثانية ثم أعيدت للحمام الثلجي لمدة ٣ دقائق ثم أضيف إلى كل أنبوب ٠.٨ مل من وسط SOC السائل وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٤٥ دقيقة.

٤. تم تخفيف النماذج الثمانية عشريا (١٠-) ونشرت على الأوساط الانتقائية المحتوية على المضادات الحيوية بواقع ٠.١ مل لكل طبق وفيما بعد حضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤-٤٨ ساعة.

٥. حسب عدد المستعمرات المتحولة (Transformants) والعدد الكلي للخلايا المؤهلة لحساب تردد التحول (Transforming frequency) حسب القانون التالي :

$$\text{تردد التحول للخلايا المتحولة} = \frac{\text{عدد الخلايا المتحولة}}{\text{تركيز الدنا البلازميدي بالمايكروغرام/العدد الكلي}}$$

اذ إن: تركيز الدنا بالمايكروغرام/مل = الكثافة الضوئية المقرؤة على طول موجي ٢٦٠ نانومتر × معامل التخفيف × ٥٠ مايكروغرام/مل

وللتأكد من ثبوت البلازميدات المنتقلة في الخلايا المتحولة واستمرار توارثها تم إعادة التقاطها وتنميتها على الأوساط الزرعية الانتقائية نفسها وفيما بعد نميت المستعمرات المتحولة على كل المؤشرات الأخرى المدروسة (المقاومة للمضادات الحيوية كافة) لمعرفة الانتقال المتزامن (Co-transfer) للمؤشرات المدروسة.

٤-١ العزل والتشخيص

تم جمع ٩٤ مسحة بلعوم (Throat swab) من مرضى مصابين بأمراض الجهاز التنفسي العلوي (التهاب الحنجرة واللوزتين) لكلا الجنسين، وبمختلف الأعمار للمدة من ٢٠٠٤/١/٤ ولغاية ٢٠٠٤/٨/٢٤.

زرعت المسحات مباشرة في مرق تربتون الصويا مع الازايد والبنفسج البلوري لتثبيط نمو كل من البكتريا السالبة لصبغة غرام والفطريات والمكورات العنقودية المتواجدة في التجويف التنفسي للإنسان، ونميت على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب مع الدم للتحري عن المستعمرات النموذجية للمسبحيات وملاحظة نوع التحلل. وتم الحصول على٢٧ (٢٦.٥٪) عزلة بكتريا تابعة للمسبحيات (Streptococci) شخصت تشخيصا أوليا بالاعتماد على صفاتها الزرعية والمجهرية، إذ كانت مستعمراتها صغيرة الحجم بقطر ٠.٥ ملم بيضاء-رمادية اللون دائرية الشكل وذات تحدب قليل، واظهر الفحص المجهري للعزلات بان الخلايا كروية الشكل موجبة لصبغة غرام ومرتبة بشكل سلاسل (Chains).

كانت ١٨ عزلة من المسبحيات المعزولة محللة للدم تحللاً كلياً والثلاث الباقية محللة للدم تحللاً جزئياً (α-hemolytic Streptococci)، وبذلك تكون نسبة عزل المسبحيات الحالة للدم نوع بيتا ١٩.١٤ % وهي اعلى من النسبة التي حصلت عليها عليها العاني (٢٠٠١) حيث تمكنت من الحصول على ٢٤ عزلة (١٢ %) من المسبحيات الحالة للدم بيتا من ٢٠٠ مسحة من مسحات اللوزتين.

وبذلك تكون نسبة عزل المسبحيات المحللة للدم بيتا في هذه الدراسة أدنى من نسب العزل لدى كل من الشبيب (١٩٧٧) التي عزلت المسبحيات الحالة للدم بيتا بنسبة عزل ٣٤ % من الأطفال في العراق والقوادري (٢٠٠٠) التي عزلت ٥٤ عزلة (٣٧.٧٦ %) من المسبحيات الحالة للدم بيتا من ١٤٣ مسحة من أطفال مصابين بالتهاب اللوزتين وعيسى (٢٠٠٠) التي عزلت ٦٤ عزلة (٤٣.٨٤ %) من المسبحيات الحالة للدم بيتا من ١٤٨مسحة بلعوم في حين تمكنت العبودي (٢٠٠٢) من الحصول على ٤٥ عزلة (٢٨.١٢ %) من ١٦٠مريض مصاب بالتهاب اللوزتين.

وقد اختلفت نسبة عزل المسبحيات المحللة للدم باختلاف المصادر و ذلك يعود إلى اختلاف المواقع الجغرافية للعزل واختلاف الطرائق والتقنيات المستخدمة في العزل، وفي هذه الدراسة تم استعمال وسط مرق تربتون الصويا مع إضافة كل من الازايد والبنفسج البلوري إليه لتحويله إلى وسط انتقائي(Selective media) لتثبيط نمو الأنواع البكتيرية الأخرى التي تتواجد مع المسبحيات وقد تم اختيار هذا الوسط بالاعتماد على ما توصلت إليه الشبيب (١٩٧٧) من ان وسط تربتون الصويا هوالأفضل لعزل المسبحيات من مصدري الحنجرة واللعاب إذ تبلغ النسبة المئوية الايجابية له ٩٣ % و ٩٦ % على التوالي وهي أعلى من بقية الأوساط .

شخصت المسبحيات المعزولة بالاعتماد على صفاتها الزرعية و الكيموحيوية و المصلية وفقا لما جاء في Holt وجماعته (١٩٩٤) واعتمادا على الطرائق التي ذكرها كل من (١٩٩٧) Stuks و Macfaddin (٢٠٠٠) (جدول (٤-١)). فكانت ١٥عزلة من المسبحيات المعزولة والحالة للدم بيتا تعود للنوع *S. pyrogenes* والعزلات الثلاث الباقية تعود للنوع *S. equi*، أما العزلات الحالة للدم ألفا فكانت٥ عزلات منها تعود للنوع *S. mitis* وعزلتين لكل من *S. suis* و *S. salivarius*. وبذلك فان النوع *S pyogenes* يشكل ٨٣.٣٣ % من المسبحيات الحالة للدم بيتا وهذه النسبة تقارب النسبة التي حصلت عليها عيسى (٢٠٠٠) حيث وجدت بأنها تمثل % ٨٥.٩ وان النمطين المصليين C وG يشكلان ٩.٤ % و٤.٧ % على التوالي من المسبحيات المحللة للدم بيتا والعاني (٢٠٠١) التي وجدت بأنها تمثل ٧٥ %من المسبحيات الحالة للدم بيتا في حين توصلت الشبيب (١٩٧٧) الى ان النمط المصلي A (بكتريا *S. pyogenes*) يمثل ٢٣ % فقط وان النمطين المصليين G وC يمثلان ٥٨ % و١٤ % على التوالي من المسبحيات الحالة للدم بيتا و المعزولة من الاطفال المصابين بالتهاب اللوزتين، كما وجد كل من القوادري (٢٠٠٠)و العبودي(٢٠٠٢) بان النوع *S. pyogenes* يشكل ١٨.٥١ %

جدول (٤-١) التوصيف الكيموحيوي والمصلي للمسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي

الاختبار	*S. pyogenes*	*S. mitis*	*S. equi*	*S. salivarius*	*S. suis*
نوع تحلل الدم	β	α	β	α	α
فحص الكاتاليز	-	-	-	-	-
اختزال النترات	-	-	-	-	-
النمو بوجود CO_2	+	+	+	+	+
النمو اللاهوائي	+	+	+	+	+
الحساسية للبستراسين	S	R	R	R	R
الحساسية لـ SXT	R	S	S	S	S
الحساسية للاوبتوكين	R	R	R	R	R
النمو بدرجة١٠ مْ	-	-	-	-	-
النمو بدرجة٤٥ مْ	-	+	-	-	-
تحمل الملوحة	-	-	-	-	+
النمو في املاح الصفراء بتركيز ٤٠٪	-	-	-	+	+
تخمر اللاكتوز	+	+	+	+	+
تخمر الانيولين	-	-	-	+	+
تخمر المانتول	-	-	-	-	-
تخمر الرافينوز	-	+\-	+	+	-
تخمر الرايبوز	-	+\-	+	+	+
تخمر السالسين	+	+	+	+	+

تخمر السوربتول	-	-	-	-	-
تخمر التريهالوز	+	+	+	+	+
فحص إنتاج الاسيتون	-	-	-	-	-
النمط المصلي	A	Not A	Not A	Not A	Not A

β نوع التحلل الدموي بيتا، + نتيجة الفحص موجبة، S حساس، A النمط المصلي

α نوع التحلل الدموي الفا، - نتيجة الفحص سالبـة، R مقاوم، Not A لا يعود للنمط المصلي A

و ٢٦.٦٦ % على التوالي من المسبحيات الحالة للدم بيتا. في حين توصل السعيد(١٩٩٧) إلى ان النمط المصلي A يمثل ٣٢.٩ % من المسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي و ان النمطين C و B يمثلان ١١ % و٤.١ % على التوالي، كما ان النوع *S. pneumonia* يمثل % ٨.٢ في حين ان النسبة الباقية (٤٣.٨ %) تعود للمسبحيات المخضرة (Viridans streptococci). وقد اشارت البحوث إلى دور المجاميع الاخرى للمسبحيات وبالاخص المجاميع C و G في احداث اخماج الجهاز التنفسي العلوي التي تكون المسبب الرئيسي لاخماج الجهاز التنفسي العلوي في المناطق الحارة في حين ان النمط المصلي A يكون سائدا في المناطق المعتدلة (Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠).

٤-٢ التحري عن بعض عوامل ضراوة المسبحيات

تم التحري عن بعض عوامل الضراوة التي قد تمتلكها المسبحيات والتي تزيد من امراضيتها منها :

٤-٢-١ المحفظة Capsule

تم التحري عن احتواء بكتريا المسبحيات المعزولة على المحفظة بطريقة التصبيغ السالب (Negative staining) باستعمال صبغة النيكروسين (Nigrosin), فوجد بان جميع العزلات التابعة للنوع *S. pyogenes* والأنواع الأخرى للمسبحيات تحتوي على المحفظة (جدول –٢)) (٤، اذ ظهرت الخلايا تحت المجهر محاطة بهالة شفافة غير مصطبغة بالصبغة تمثل المحفظة البكتيرية. وهذا يتفق مع ما ذكره كل من Holt (١٩٩٤) وMacfadin (٢٠٠٠) من احتواء السلالات الضارية للمسبحيات على محفظة.

وتلعب المحفظة دورا مهما في مقاومة بكتريا *S. pyogenes* لدفاعات المضيف لكونها مؤلفة من مادة الهيالورونيت المشابهة للهيالورونيت في الانسجة الرابطة للمضيف و بذلك فانها تعمل على اخفاء مستضدات البكتريا وتمنع تعرف النظام المناعي للمضيف عليها و تؤدي معاملة خلايا البكتريا بانزيم الهيالودورنيز إلى تقليل مقاومتها لعملية البلعمة (Foley and Wood, ١٩٥٩; Rothbard, ١٩٤٨). ربطت الدراسات الوبائية بين وجود المحفظة و الاصابة بالامراض الشديدة الخطورة للمسبحيات (Cunningham, ٢٠٠٠) واشار Johnson وجماعته (١٩٩٢) إلى ان السلالات المخاطية (Mucoid strains) لبكتريا *S. pyogenes* غالبا ماترتبط بالامراض الشديدة الخطورة والحادة كالحمى الرثوية. واشار Wessels وجماعته (١٩٩١) وMoses جماعته (١٩٩٧) إلى دور المحفظة وبروتين M في ضراوة بكتريا *S. pyogenes* التابعة للنمطين المصليين M١٨ وM٢٤ ومقاومتها لعملية البلعمة وان السلالات الفاقدة للمحفظة تفقد جزءا كبيرا من ضراوتها مقارنة بالسلالات البرية وسرعان ما تقتل بعملية البلعمة.

توصل Wessels وBronz (١٩٩٤) إلى ان المحفظة ضرورية لالتصاق بكتريا *S. pyogenes* واستعمارها للبلعوم. وجد Scharger وجماعته (١٩٩٨) وCywes وجماعته (٢٠٠٠) بان المحفظة تلعب دورا مهما في التصاق البكتريا بالخلايا الطلائية للبلعوم والخلايا

المتقرنة للجلد (Keratinocytes) من خلال ارتباطها بالجزء CD٤٤. و فضلا عن دورها الكبير في مقاومة البكتريا للبلعمة فان المحفظة تعمل كمصدر لتزويد بكتريا *S. pyogenes* بالحديد لقدرتها على الارتباط بالحديد الحر(Free heme) والهيموبكسين (Hemopexin) الموجودين في المصل والسوائل الجسمية للمضيف (Bates *et al.*, ٢٠٠٣).

وقد وجد بان دور المحفظة في الامراضية لا يقتصرعلى المسبحيات الممرضة للإنسان وانما يمتد ليشمل المسبحيات الممرضة للحيوان وان فقدان بكتريا *S. iniae* الممرض المشترك لكل من الانسان و الاسماك للمحفظة يؤدي إلى تقليل قدرتها على مقاومة البلعمة (Miller and Neely, ٢٠٠٥).

جدول (٤- ٢) بعض عوامل ضراوة بكتريا المسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي

العزلة	وجود المحفظة	نوع الهيمولايسين المنتج	إنتاج السايدروفور	إنتاج انزيم الستربتوكينيز	إنتاج انزيم السيستايين بروتييز
S. pyogenes ١	+	β	-	+	-
S. pyogenes ٢	+	β	-	+	-
S. pyogenes ٣	+	β	-	+	-
S. pyogenes ٤	+	β	-	+	-
S. pyogenes ٥	+	β	-	+	+
S. pyogenes ٦	+	β	-	+	-
S. pyogenes ٧	+	β	-	+	-
S. pyogenes ٨	+	β	-	+	-
S. pyogenes ٩	+	β	-	+	-
S. pyogenes ١٠	+	β	-	+	-
S. pyogenes ١١	+	β	-	+	-
S. pyogenes ١٢	+	β	-	+	-
S. pyogenes ١٣	+	β	-	+	-
S. pyogenes ١٤	+	β	-	+	+
S. pyogenes ١٥	+	β	-	+	-
S. mitis ١	+	α	-	-	-

S. mitis ٢	+	α	-	-	-
S. mitis ٣	+	α	-	-	-
S. mitis ٤	+	α	-	-	-
S. mitis ٥	+	α	-	-	-
S. equi ١	+	β	-	+	+
S. equi ٢	+	β	-	+	-
S. equi ٣	+	β	-	+	-
S. salivarius ١	+	α	-	-	-
S. salivarius ٢	+	α	-	-	-
S. suis ١	+	α	-	-	-
S. suis ٢	+	α	-	-	-

+ النتيجة موجبة - النتيجة سالبة β نوع التحلل بيتا α نوع التحلل الفا

٤-٢- ٢ أنظمة نقل الحديد

٤-٢- ٢- ١ الهيمولايسين

تم التحري عن قدرة المسبحيات المعزولة على إنتاج الهيمولايسين البكتيري (الستربتولايسين) وأظهرت جميع العزلات قدرتها على إنتاج انتاجه (جدول (٤- ٢))، إذ أظهرت جميع العزلات التابعة للنوعين *S. pyogenes* و *S. equi* القدرة على إحداث التحلل الدموي الكلي (β- hemolytic) في كل من الظروف الهوائية واللاهوائية في حين أظهرت العزلات التابعة للأنواع *S. mitis* و*S. suis* و*S. salivarius* القدرة على إحداث التحلل الدموي الجزئي (α- hemolytic) في الظروف الهوائية فقط.

يعد إنتاج الهيمولايسين من أهم الصفات التشخيصية للأنواع المختلفة للمسبحيات، اذ صنفت المسبحيات على أساس تحليلها للدم الى ثلاث مجاميع رئيسة هي المسبحيات المحللة للدم بيتا وتضم المجاميع A وC وG للمسبحيات، والمسبحيات المحللة للدم الفا التي تضم المسبحيات المخضرة (Viridans streptococci) أما المجموعة الثالثة فتضم المسبحيات غير المحللة للدم. تنتج المجاميع A وC وG نوعين من الهيمولايسينات هما الستبرتولايسين O و الستربتولايسين S ويشترك هذين الذيفانين بقدرتهما على حل الخلايا حقيقية النواة (Cytolytic toxin) ويعدان من اهم عوامل ضراوة المسبحيات اذ يمتلكان القدرة على احداث اضرار بالأنسجة، كما ان الستربتولايسين له القدرة على التداخل مع التفاعلات الالتهابية في جسم المضيف وحث إنتاج السايتوكينات (Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠).

يلعب الستربتولايسين O دورا مهما في ضراوة بكتريا *S. pyogenes* في نموذج الفأر، واحداث طفرات فاقدة له يؤدي إلى اختزال الهلاكات الحاصلة بالبكتريا مقارنة بالسلالات البرية (Limbago *et al.*, ٢٠٠٠)، كما وجد Betschel وجماعته (١٩٩٨) بان احداث طفرات فاقدة للستربتولايسين S يؤدي إلى اختزال ضراوتها. والفعالية الحالة للخلايا (Cytolytic effect) للستربتولايسين O تزيد من ضراوة بكتريا *S. pyogenes* الممحفظة وغير الحاوية على المحفظة في حين يزيد الستربتولايسين Sمن ضراوة بكتريا*S. pyogenes* غير الحاوية على المحفظة فقط (Sierg *et al.*, ٢٠٠٣). كذلك وجد بان الفعالية الحالة للخلايا للستربتولايسين O تسهل من غزو بكتريا *S. pyogenes* للبلعوم وتمنع الـ interization لها من قبل الخلايا الطلائية المتقرنة للبلعوم كما تمنع القتل داخل الخلوي لها بفعل القتل باللايسوسوم (Haknsson *et al.*, ٢٠٠٥).

وقد وجد بان الفعالية الحالة للخلايا للستربتولايسين S لها دور في ضراوة المسبحيات التابعة للنمط المصلي C (النوع *S.iniae*) وان الطفرات الفاقدة له يحدث اختزال في ضراوتها في نموذج الانسجة الرخوة (Murine model) وليس في نموذج الـ Whole blood killing ، مما يشير إلى ان الستربتولايسين S ضروري لاحداث اضرار الانسجة وليس في حالات غزو

الدم أو التعفن الدموي (Fuller *et al.* , ٢٠٠٢) .

٤-٢-٢-٢ السايدروفور

بالنظر لكون السايدروفورات واحدة من اهم الوسائل التي تستعملها البكتريا للحصول على الحديد فقد تم التحري عن قدرة المسبحيات المعزولة على إنتاج السايدروفور من خلال قدرتها على النمو في وسط M٩ الصلب الحاوي على مادة ٢,٢-dipyridyl الساحبة للحديد. أظهرت جميع العزلات التابعة للنوع *S. pyogenes* والأنواع الأخرى للمسبحيات عدم قدرتها على إنتاج السايدروفور، إذ لم تتمكن أي من العزلات من النمو على هذا الوسط (جدول (٤-٢)). وهذا يتفق وماذكره Payne (١٩٨٨) من عدم قدرة المكورات الموجبة لصبغة غرام على إنتاج السايدروفور وEichenbaum (١٩٩٦b) من ان احتواء الوسط على مادة ساحبة للحديد (Cheliting agent) مثل Nitriloriacetic acid (NTA) يؤدي إلى تثبيط نمو السلالة *S. pyogenes* JRS٤ التابعة للنمط المصلي M٦ لبكتريا *S. pyogenes*. كما ان وجود ١٠ ملي مولار من مادة NTA يؤدي إلى تثبيط نمو بكتريا *S. pyogenes* SF٢٧٠ التابعة للنمط المصلي M١ و*S. pyogenes* JRS٤ التابعة للنمط المصلي M٦ والظروف المثلى للنمو تتحدد باضافة ٢٢ ملي مولار هيموغلوبين أو٦ ملي مولار هيموالبومين أودم كامل بنسبة ٠.١٢٥ % إلى الوسط السابق (Bates *et al.*, ٢٠٠٣).

اشار Lei وجماعته (٢٠٠٣) إلى انه على الرغم من عدم قدرة المسبحيات التابعة للنوع *S. pyogenes* على إنتاج السايدروفور فان لها القدرة على الاستفادة من السايدروفورات المنتجة من الأنواع البكتيرية الأخرى المتواجدة معها في تجويف البلعوم بالاستعانة بالبروتينات الناقلة المشفرة في *spy*٠٣٨٣ و*spy*٠٣٨٤ و*spy*٠٣٨٥ و*spy*٠٣٨٦ للحصول على الحديد المرتبط بهذه السايدروفورات، واشار Andrade وجماعته (٢٠٠٢) بان الكروموسوم في بكتريا *S. pyogenes*(النمط المصلي M١) يحتوي على نسختين من مقاطعة NEAT واقترح بان البروتين المشفر بهذه المقاطعة يعمل كمستقبل لمعقد الحديد- سايدروفور.

يعتقد بوجود علاقة بين إنتاج الهيمولايسين والسايدروفور وان البكتريا تحتاج لعامل اساسي واحد للحصول على الحديد ولذلك فانها تكون منتجة اما للهيمولايسين أو السايدروفور و ان المسبحيات المحللة للدم تكون غير منتجة للسايدروفور Pyane (١٩٨٨)، وعزى Eichenbaum (١٩٩٦b) عدم قدرة المسبحيات للنوع *S. pyogenes* على إنتاج السايدروفور لامتلاكها لانزيمات الستربتوكاينيز و الستربتولايسين و البروتييز التي تمكنها من حل الخلايا و احداث اضرار بانسجة المضيف و تحرير مركبات الهيم و الهيموغلوبين و المايوغلوبين و الـ Ferritin التي توفر للبكتريا ما تحتاجه من حديد.

٤-٢-٣ انزيم الستربتوكاينيز

تم التحري عن قدرة المسبحيات المعزولة على إنتاج انزيم الستربتوكاينيز، وأظهرت

جميع العزلات التابعة للنوعين *S. equi* و*S. pyogenes* القدرة على إنتاج هذا الانزيم في حين لم تتمكن أي من العزلات التابعة للأنواع الأخرى من إنتاجه (جدول (٤- ٢)). وبذلك تكون نسبة بكتريا *S. pyogenes* و *S. equi* المنتجة للانزيم ١٠٠ % وهي أعلى من النسبة التي حصلت عليها الشبيب (١٩٧٧) والتي وجدت بان ٨٦ % من المسبحيات التابعة للنوع *S. pyogenes* و ٢٦.٩٢ % من المسبحيات المحللة للدم بيتا المعزولة من الاطفال منتجة للانزيم وعيسى(٢٠٠٠) التي وجدت بان ٨٥.١٨ % من العزلات المعزولة من البلعوم منتجة للانزيم.

يعد الستربتوكاينيز عامل انتشار(Spreading factor) يسهم في انتشار البكتريا وتسهيل غزوها للانسجة من خلال قدرته على تحويل مولد البلازمين إلى بلازمين فعال (Kuuslla et al., ١٩٩٢)، وله القدرة على تنشيط الصفيحات الدموية مما يؤدي إلى تقليل فعاليتها كعوامل تخثر (Thrombloting agents) وتحفيز انتاجها لثرمبوكسان A٢ (Thermpoxan A٢) (Redmond et al., ٢٠٠٠). كما انه يلعب دورا مهما في احداث الاخماج الجلدية بالمسبحيات الجلدية التابعة للنوع *S. pyogenes* واحداث مرض القوباء (Svensson *et al*., ٢٠٠٢).

والستربتوكاينيز المنتج من المجاميع C وG للمسبحيات يعمل على تنشيط مولد البلازمين و تحويله إلى بلازمين فعال من خلال ربطه ببروتين شبيه ببروتين M (Ben Nasr *et al*., ١٩٩٤). فضلا عن ذلك فان الستربتوكاينيز المنتج من المسبحيات التابعة للنمط المصلي C (*S. uberis)* المسببة لالتهاب الثدي (Mastitis) يعمل على تنشيط البلازمين الموجود في الحليب (Endogenous plasmogen) وتجزئة بروتينات الحليب وتحرير ببتيدات حاوية على بعض الاحماض الامينية الاساسية لهذه البكتريا فضلا عن دوره في تسهيل استعمار البكتريا من خلال تنشيطه للبلازمين الفعال الذي يقوم بتجزئة البروتينات الرابطة للخلايا الطلائية (Johnson et al., ١٩٩٩).

٤-٢-٤ التحري عن قدرة المسبحيات على إنتاج انزيم السيستايين بروتييز (الذيفان SPE B)

تم التحري عن قدرة المسبحيات المعزولة على إنتاج انزيم السيستايين بروتييز ووجد بان عزلتين من بكتريا *S. pyogenes* وعزلة واحدة من بكتريا *S. equi* لها القدرة على إنتاج هذا الانزيم (جدول (٤- ٢))، اذ أحيطت مستعمراتها النامية على وسط Skim milk columbia agar بهالة تحلل شفافة قطرها ٢ الى ٧ ملم في حين لم تتمكن أي من العزلات الباقية من إنتاج هذا الانزيم وبذلك تكون نسبة بكتريا *S. pyogenes* المنتجة للانزيم في هذه الدراسة ١٣.٣٣%

من بكتريا *S. pyogenes* المعزولة من حالات التهاب اللوزتين والحنجرة وهذه النسبة أدنى بكثير من نسبة البكتريا المنتجة للانزيم والمعزولة من حالات مرضية اشد خطورة فقد توصل Wealer وجماعته (١٩٩١) الى ان ٧٣ % من عزلات بكتريا *S. pyogenes* المسببة لتجرثم الدم في الأطفال منتجه للانزيم، كما وجد Muller- Alouf وجماعته (١٩٩٧) إلى ان ٨٥ % من عزلات بكتريا *S. pyogenes* المعزولة من أمراض خطيرة للمسبحيات كمتلازمة الصدمة السمية وتجرثم الدم والحمى القرمزية و٩٣ % من عزلات البكتريا المسببة لالتهاب الهلل منتجة للانزيم.

في حين توصلت عيسى (٢٠٠٠) الى ان ٧٦.٣ % من بكتريا *S. pyogenes* المعزولة من امراض مختلفة كالتهاب اللوزتين والحنجرة والحمى الرثوية والتهاب المفاصل والتهاب الأذن الوسطى وان ٧٥ % من عزلات البكتريا المعزولة من الآفات الجلدية منتجة للانزيم.

يتضح من ذلك دور هذا الانزيم في ضراوة البكتريا إذ يرتبط إنتاجه بالامراض الخطيرة للمسبحيات، كما ان احداث طفرات فاقدة للانزيم في سلالات بكتريا *S. pyogenes* يؤدي إلى اختزال لضراوتها في نموذج الفار إذ تكون الهلاكات والاضرار بالانسجة اقل من السلالات البرية (Kuo *et al.*, ١٩٩٨). كما وجد Lukomski وجماعته (١٩٩٧) بان التثبيط الوراثي لجينات السيستاين بروتييز في بكتريا *S. pyogenes* التابعة للانماط المصلية M٣ وM٤٩ يؤدي إلى تقليل الهلاكات الحاصلة في الحيوانات المختبرية المحقونة بالبكتريا.

ويتاثر انتاج البكتريا للسيستاين بروتييز بالعديد من المؤثرات الخارجية ومنها توفر المغذيات حيث وجد بان إنتاجه يحدث كاستجابة لنقص المغذيات (Chausse *et al.*, ١٩٩٧)، كما ان عبور البكتريا للدم (Blood passage) في الانسان والفار إلى احداث تغيرات عديدة في عمليات التعبير الجيني لعوامل الضراوة ومنها انزيم السستاين بروتيز إذ تفقد البكتريا القدرة على انتاجه ويكون ذلك مصحوبا بتحولها إلى (Large capsular form) نتيجة لزيادة التعبير الجيني لجينات المحفظة وبروتين M (Raeder *et al.*, ٢٠٠٠).

كما ظهرت مستعمرات العزلة١ *S. equi* النامية على وسط Skim milk Colombia agar محاطة بهالة تحلل مما يشير إلى قدرة هذه العزلة على إنتاج انـزيم السيستاين بروتيـز (الذيفان SPE B) أو ان العزلة منتجـة لذيفان يشابه الذيفـان SPE B المنتج من بكتـريا *S. pyogenes* في قدرته على تحليل البروتين، إذ لم تتوفر في ضوء المصادر المحصل عليها أي اشارة سابقة لقدرة هذه البكتريا على إنتاج هذا الذيفان الا ان Korman وجماعته (٢٠٠٤) سجلوا حصول حالة وفاة بمتلازمة الصدمة السمية سببها سلالة تعود للنوع *S. equi* var. *zooepidemicus* وعلى الرغم من عدم احتواء هذه السلالة على اي من الجينات المشفرة للذيفانات المولدة للحرارة في بكتريا *S. pyogenes* إلى ان الادلة كانت تشير إلى عكس ذلك. ووجد Hashikawa وجماعته (٢٠٠٤) عند دراسته لـ ١٢ عزلة من المسبحيات التابعة للمجموعتين C وG من المسبحيات (١١عزلة تابعة للنوع *S. dysagalactiae* var.

equismilis وعزلة واحدة تابعة للنوع (*S. equi* var. *Zooepidemicus*) المسببة لخمج متلازمة الصدمة السمية بان أي من السلالات المعزولة لم تكن حاوية على الجينات المولدة للحرارة *spe A* و*spe B* و*spe C* و*spe F* و*spe H* و *spe I* و *spe J* و *spe L* المشفرة للذيفانات أوالجينات ٢ -*mf* و٣ -*mf* و *sme Z* المشفرة للذيفانات المشطرة ماعدا الجين *spe gg* المشفر للذيفان spe gg المولد للحرارة الذي وجد في سبع عزلات من بكتريا *S. dysagalactiae* var. *equismilis*.

٤-٢-٥ التحري عن قدرة المسبحيات على إنتاج الذيفانات المولدة للحمرة

تم التحري عن قدرة العزلات*S. pyogenes* ٥, ١٤ و*S. equi* ١ المنتجة لانزيم السيستاين بروتييز (SPE B) والعزلات ٢, ٣, ٧ *S. pyogenes* غير المنتجة للانزيم والعزلة ١ *S. mitis* المعزولة من حالة إصابة بالحمى القرمزية (Scarlet fever) على إنتاج الذيفانات المولدة للحمرة باستعمال اختبار الجلد (Skin test) في الارنب النيوزلندي، فوجد بان جميع العزلات المنتجة لانزيم السيستاين بروتييز والعزلتين ٢, ٧ *S. pyogenes* لها القدرة على إنتاج هذه الذيفانات في حين لم تتمكن العزلتين٣ *S. pyogenes* والعزلة ١ *S. mitis* من إنتاج هذه الذيفانات (جدول(٤- ٣)).

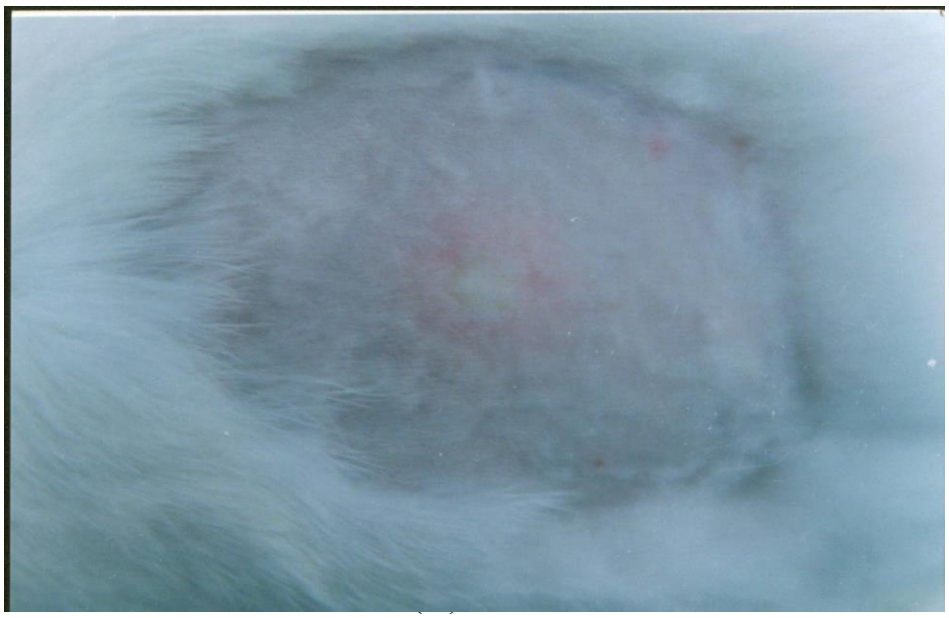
وهذا يدل على ان العزلتين ٢, ٧ *S. pyogenes* منتجة لواحد أو أكثر من الذيفانات المولدة للحمرة التي تعود لأي من الأنواع الأخرى للذيفانات عدا الذيفان SPE B. ذكر Yu و Ferritti (١٩٩١)بان ١٥ % من سلالات بكتريا *S. pyogenes* المعزولة من حالات مرضية مختلفة تكون حاوية على الجينات المشفرة للذيفان SPE A، وان هذه النسبة تزداد لتصل الى % ٥٠ في الحالات المرضية الاكثر خطورة (الحمى القرمزية، متلازمة الصدمة السمية).

كما توصل Descheemaeker وجماعته (٢٠٠٠) إلى ان ٢٤.٨ % و٥٣.٦ % من سلالات بكتريا *S. pyogenes* المعزولة من امراض مختلفة في بلجيكا تحتوي على الجينات المشفرة للذيفانين SPE A وSPE C على التوالي ، ووجد Kapur وجماعته (١٩٩٢) ان ٥٠٪ من المسبحيات التابعة للنوع *S. pyogenes* المعزولة من امراض مختلفة حاوية على الجينات المشفرة للذيفان SPE C .

وقد اكدت النتائج قدرة العزلة ١ *S. equi* على إنتاج الذيفان المولدة للحمرة الذي من المحتمل ان يكون انزيم السيستاين بروتييز (الذيفان SPE B) أو ذيفان اخر مولد للحرارة يشابه انزيم السيستاين بروتييز في امتلاكه للفعالية الحالة للبروتين إذ لم تتوفر وفي ضوء المصادر المحصل عليها اشارة لقدرة هذه البكتريا على انتاج انزيم السيستاين بروتييز، إذ تمتلك بكتريا *S. equi* القدرة على انتاج ذيفانات مولدة للحرارة ومنها الذيفانين SPE L وSPEL M اللذين تشترك هذه البكتريا مع بكتريا *S. pyogenes* (Proft *et al.*, ٢٠٠٣). كما تنتج بكتريا *S. equi* نوعين آخرين من الذيفانات هما SePE H وSePE I و الذيفان SePE H يشابه الذيفان SPE H المنتج من بكتريا *S. pyogenes* إلا انه يختلف عنه بتسلسل ثلاث أحماض امينية فقط

بينما يختلف SePE I عن SPE I المنتج من *S. pyogenes* بتسلسل حامض أميني واحد فقط (Artiushin *et al.* , ٢٠٠٢).

تشترك الذيفانات المولدة للحمرة بقدرتها على التداخل مع الاستجابة المناعية للمضيف وكبح استجابة النظام الشبكي البطاني ومنع إنتاجه للاضداد، بالاضافة إلى تحفيز الخلايا التائية على الانقسام وانتاج السايتوكينات ومنها الانترليوكين ١ IL-β وعوامل نخر الورم TNFα و TNFγ الضرورية لاحداث متلازمة الصدمة السمية (Efstratiou, ٢٠٠٠). كما انها تعمل تأزريا مع عوامل الضراوة الاخرى حيث يرتبط الذيفان SPE A مع منطقة Core region لمتعدد السكريدات الدهني لجدار البكتريا مكونة معقد LPS-SPE A القاتل للخلايا التائية (Stevens and Kaplan, ٢٠٠٠)، ويعمل الذيفان SPE B تازريا مع الستربتولايسين S والجدار الخلوي للبكتريا لاحداث اضرار في رئة الفار (Shanely *et al.*, ١٩٩٦).



(ب)

شكل (٤-١) اختبار قدرة بكتريا *S. pyogenes* و*S. mitis* و *S. equi* على إنتاج الذيفانات المولدة للحمرة في جلد الأرنب النيوزلندي

(أ) نتيجة موجبة (ب) سيطرة سالبة

جدول (٤- ٣) قدرة بعض عزلات المسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي على إنتاج الذيفانات المولدة للحمرة

العزلة	قطر منطقة الاحمرار (ملم)	نتيجة الاختبار
S. pyogenes ٢	١٨	+
S. pyogenes ٣	٥	-
S. pyogenes ٥	١٩	+
S. pyogenes ٧	١٩	+
S. pyogenes ١٤	١٧	+
S. equi ١	٢١	+
S. mitis ٢	٨	-

٤-٣ مقاومة المسبحيات للمضادات الحيوية

تم التحري عن حساسية المسبحيات المعزولة للمضادات الحيوية (جدول (٤-٤)) بطريقة الانتشار من القرص وأظهرت العزلات اشتراكها بمقاومة التراي مثبريم (١٠٠٪) وتباينت العزلات في مقاومتها للمضادات الاخرى وهي الامبسلين (٩٦.٢٩ %) والاموكسسلين (٨٨.٨٨٪) والريفامبسين (٨٥.١٨٪) والكلوكساسلين (٨١.٤٨٪) والكلندامايسين (٦٦.٦٦٪) والسيفالكسين (٤٨.١٤ %) والارثرومايسين والسيفاكلور (٤٤.٤٤٪) والتتراسايكلين واللنكومايسين (٤٠.٧٤٪) والنوفابايوسين (٢٩.٦٢٪) و الستربتومايسين والكلورامفنيكول (٢٥.٩٢٪) في حين كانت جميع العزلات حساسة للفانكومايسين.

كما اختلفت النسب المئوية للمقاومة بين الأنواع المختلفة للمسبحيات (جدول (٤-٥)) فقد كانت مقاومة النوع *S. pyogenes* لمضاد اللنكومايسين (٦.٦٦٪) في حين كانت (١٠٠٪) لكل من *S. equi* و*S. suis* و(٨٠٪) و (٥٠٪) لكل من *S. mitis* و *S. salivarius* على التوالي. وكانت مقاومة النوع *S. pyogenes* لكل من الكلندامايسين والكلوكساسلين والامبسلين (٥٣٪) و(٧٣.٣٣٪) و(٩٣.٣٣٪) على التوالي في حين كانت في بقية الأنواع ١٠٠٪ لكل من الامبسلين والكلندامايسين وأكثر من (٨٠٪) للكلوكساسلين.

في حين كانت مقاومة النوعين *S. pyogenes* و*S. equi* لمضاد التتراسايكلين متساوية (٦٦.٦٦%)، والنوعين *S. suis* و*S. salivarius* لنفس المضاد(١٠٠٪) وتساوت مقاومة هذين النوعين لمضاد الكلورامفينيكول (١٠٠٪) كما كانت مقاومة النوعين *S. equi* و*S. mitis* لمضادي الريفامبسين والارثرومايسين متساوية (١٠٠٪).

وبذلك تكون مقاومة النوع *S. pyogenes* لأغلب المضادات المستخدمة في الدراسة (اللنكومايسين والنوفابايوسين والسيفاكلور والستربتومايسين والكلوكساسلين والكلورامفينيكول الارثرومايسين) أدنى من مقاومة الأنواع الأخرى للمسبحيات.

ونلاحظ بان مقاومة بكتريا *S. pyogenes* لمضادات مجموعتي البيتا لاكتام و السيفالوسبورينات (الامبسلين و الاموكسسلين و الكلوكسسلين و السيفالكسين) اعلى من نسب المقاومة التي حصلت عليها عيسى(٢٠٠٠) التي وجدت بان مقاومة بكتريا *S. pyogenes* لهذه المضادات (٥٧.٧٪) و(٦٣.٤٪) و(١١.١١٪) و(٣٦.٦٪) على التوالي، والعاني(٢٠٠١) التي وجدت بان مقاومة البكتريا للامبسلين والاموكسسلين والسيفالكسين (٠٪)، كما وجدت الشبيب (١٩٧٧) بان مقاومة بكتريا الانواع المخنلفة للمسبحيات لمضاد الامبسلين (٢٠٪) وان مقاومة بكتريا *S. pyogenes* للامبسلين ٥٠ %.

ويعود السبب في ازدياد المقاومة لهذه المضادات إلى الاستعمال المتكرر لهذه المضادات في علاج التهاب اللوزتين والبلعوم المسبحي الناتج عن الاعتقاد الشائع بحساسية المسبحيات لها على الرغم من ظهور حالات متزايدة لفشل العلاج بهذه المضادات مما يؤدي لحصول ضغط انتخابي للسلالات المقاومة فضلا عن امكانية انتقال بلازميدات المقاومة من السلالات المقاومة إلى الحساسة وتحويلها إلى مقاومة.

جدول (٤-٤) مقاومة المسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي للمضادات الحيوية بطريقة الانتشار من القرص

المضاد الحيوي / العزلة	VA	L٢	AX	NV	Cec	DA	Amp	Sm	Tmp	CX	C	Cl	E	RA	TE
*S. pyogenes*١	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
*S. pyogenes*٢	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
*S. pyogenes*٣	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
*S. pyogenes*٤	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
*S. pyogenes*٥	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
*S. pyogenes*٦	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
*S. pyogenes*٧	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
*S. pyogenes*٨	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
*S. pyogenes*٩	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
*S. pyogenes*١٠	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
*S. pyogenes*١١	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
*S. pyogenes*١٢	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
*S. pyogenes*١٣	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
*S. pyogenes*١٤	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
*S. pyogenes*١٥	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
S. mitis ١	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
S. mitis ٢	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	*S. mitis* ٣
+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	*S. mitis* ٤
-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	*S. mitis* ٥
+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	*S. equi* ١
+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	*S. equi* ٢
-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	*S. equi* ٣
+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	*S. salivarius*١
+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	*S. salivarius*٢
+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	*S. suis* ١
+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	*S. suis* ٢

ملاحظة : + مقاوم - حساس

VA فانكومايسين بتركيز ٣٠ مايكروغرام/قرص ، L٢ لنكومايسين بتركيز ٢ مايكروغرام/قرص

AX اموكسسلين بتركيز ٢٥ مايكروغرام/قرص ، NV نوفابايوسين بتركيز ٣٠ مايكروغرام/قرص

Cec سيفاكلور بتركيز ٣٠ مايكروغرام/قرص ، DA كلندامايسين بتركيز ٢ مايكروغرام/قرص

Amp امبسلين بتركيز ١٠ بتركيز مايكروغرام/قرص ، Sm ستربتومايسين بتركيز ١٠ مايكروغرام/قرص

Tmp تراي مثبريم بتركيز٥ مايكروغرام/قرص ، CX كلوكساسلين بتركيز ١ مايكروغرام/قرص

C كلورامفنيكول بتركيز ٣٠ مايكروغرام/قرص ، Cl سيفالكسين بتركيز ٣٠ مايكروغرام/قرص

E ارثرومايسين بتركيز ١٥ مايكروغرام/قرص ، RA ريفامبسين بتركيز ٥ مايكروغرام/قرص

TE تتراسايكلين بتركيز ٣٠ مايكروغرام/قرص

جدول (٤- ٥) النسب المئوية لمقاومة الأنواع المختلفة للمسبحيات المعزولة من اخماج الجهاز التنفسي العلوي للمضادات الحيوية المستخدمة

المضاد الحيوي / النوع	VA	L٢	AX	NV	Cec	DA	AMP	S	TMP	CX	C	CL	E	RA	TE
S.pyogenes	٠	٦٦.٦٦	٩٣.٣٣	٢٠	٢٦.٦٦	٥٣	٩٣.٣٣	٢٠	١٠٠	٧٣.٣٣	١٣.٣٣	٤٠	٢٦.٦٦	٩٣.٣٣	٦٦.٦٦
S. mitis	٠	٨٠	٨٠	٤٠	٦٠	١٠٠	١٠٠	٤٠	١٠٠	٨٠	٦٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٦٦.٦٦
S. equi	٠	١٠٠	٦٦.٦٦	٣٣.٣٣	٦٦.٦٦	١٠٠	١٠٠	٣٣.٣٣	١٠٠	١٠٠	٣٣.٣٣	٣٣.٣٣	١٠٠	١٠٠	١٠٠
S.salivarius	٠	٥٠	١٠٠	٥٠	٥٠	١٠٠	١٠٠	٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٠	٠	١٠٠
S. suis	٠	١٠٠	١٠٠	٥٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٥٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٥٠	٥٠	١٠٠

VAفانكومايسين بتركيز ٣٠ مايكروغرام/قرص

L٢ لنكومايسين بتركيز ٢ مايكروغرام/قرص

AX اموكسسلين بتركيز ٢٥ مايكروغرام/قرص

NV نوفابايوسين بتركيز ٣٠ مايكروغرام/قرص

Cec سيفاكلور بتركيز ٣٠ مايكروغرام/قرص

DA كلنداميسين بتركيز ٢ مايكروغرام/قرص

Amp امبسلين بتركيز ١٠ بتركيز مايكروغرام/قرص

Sm ستربتومايسين بتركيز ١٠ مايكروغرام/قرص

Tmp تراي مثبريم بتركيز٥ مايكروغرام/قرص

CX كلوكساسلين بتركيز ١ مايكروغرام/قرص

C كلورامفنيكول بتركيز ٣٠ مايكروغرام/قرص

Cl سيفالكسين بتركيز ٣٠ مايكروغرام/قرص

E ارثرومايسين بتركيز ١٥ مايكروغرام/قرص

RA ريفامبسين بتركيز ٥ مايكروغرام/قرص

TE تتراسايكلين بتركيز ٣٠ مايكروغرام/قرص

كما يلاحظ حصول انخفاض في مقاومة هذه البكتريا لمضادي الكلورامفنيكول والستربتومايسين ويرجع ذلك لندرة استعمال هذه المضادات في علاج اخماج الجهاز التنفسي والاخماج الاخرى بالنظر للمضاعفاتها الجانبية إذ انخفضت نسبة المقاومة من (٦٣.٣٣٪) الكلورامفنيكول و(١٠٠٪) للستربتومايسين لدى الشبيب (١٩٧٧)، إلى(٣٣.٨٪) لدى عيسى(٢٠٠٠) حتى وصلت إلى(١٣.٣٣٪) في الدراسة الحالية. وعلى العكس من ذلك مضاد الريفامبسين الذي يلاحظ حصول زيادة كبيرة في مقاومة البكتريا له نتيجة لاستعماله في علاج امراض الجهاز التنفسي المختلفة إذ كانت نسب المقاومة له لدى العاني(٢٠٠١) وعيسى (٢٠٠٠) (٣٨.٨٨٪) و(٢٢.٥٪) على التوالي في حين وصلت في هذه الدراسة إلى (٩٣.٣٣٪).كما نلاحظ وجود مقاومة عالية لمضادي التراي مثبريم والتتراسايكلين على الرغم من عدم استعمال هذين المضادين في علاج اخماج الجهاز التنفسي، وقد سجلت مقاومة البكتريا للتتراسايكلين منذ الخمسينات وتزايدت في اغلب بلدان العالم(Chopra and Robert, ٢٠٠١).

واشارت البحوث إلى حدوث زيادة مماثلة في مقاومة بكتريا *S. pyogenes* للتراسايكلين في البلدان المجاورة إذ وجد Jassir وجماعته (٢٠٠٠) بان مقاومة بكتريا *S. pyogenes* المعزولة من اماكن مختلفة في ايران تزايدت من (٢٣٪) في الفترة من ١٩٨٩ إلى ١٩٩١ لتصل إلى اكثر من (٤٢٪) عام (١٩٩٧) ولوحظت مثل هذه الظاهرة في البرازيل وعزيت الى الضغط الانتخابي للتتراسايكلين المستعمل في علاج الامراض المختلفة في ظهور وانتشار السلالات المقاومة لهذه البكتريا (De Melo *et al.*, ٢٠٠٣) .

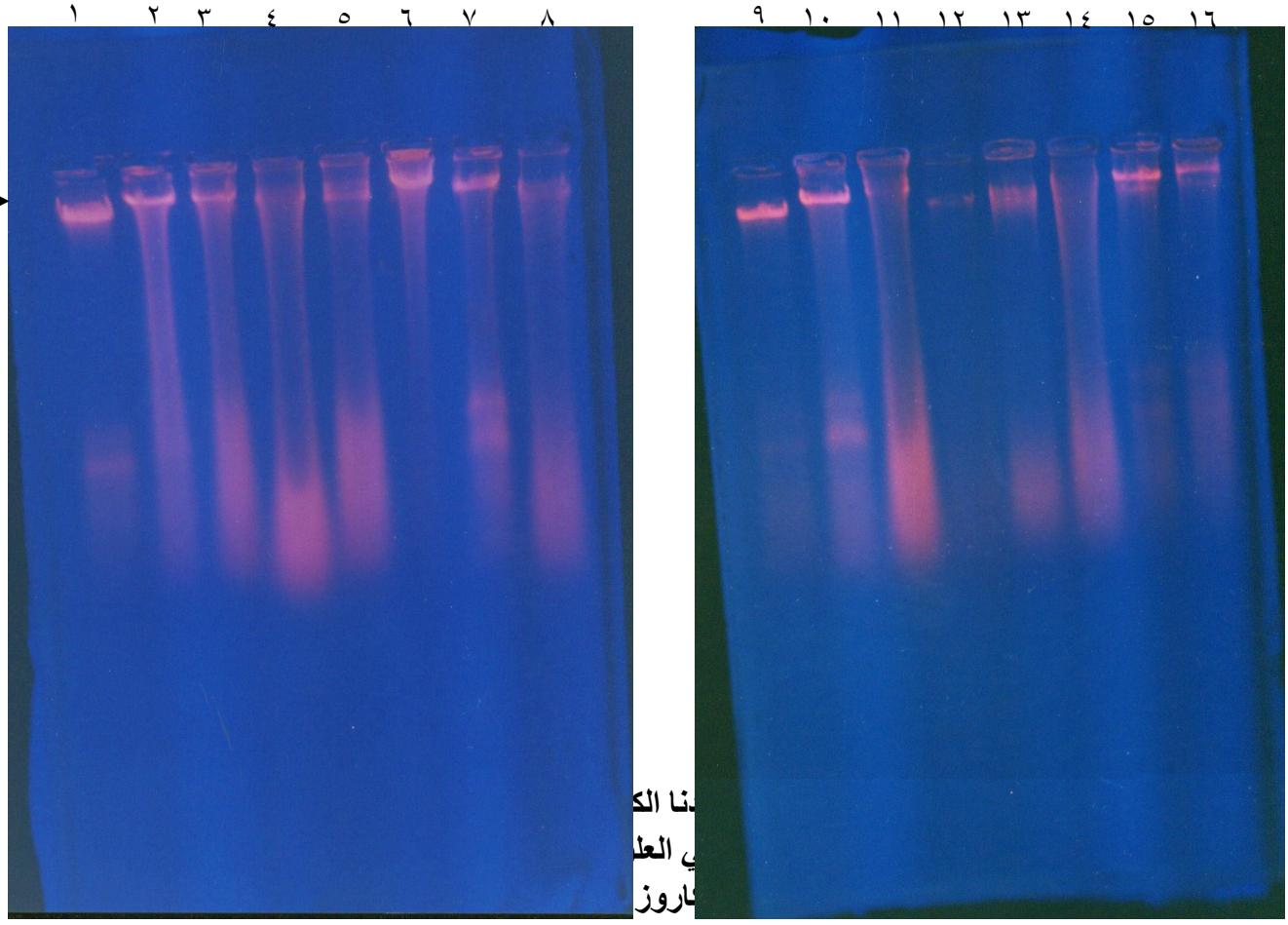
واشارت نتائج هذه الدراسة الى حدوث تغير في مقاومة البكتريا المعزولة لمضادات مجموعة الـMLS وبالاخص الارثرومايسين والكلندامايسن في السنوات الاخيرة إذ انخفضت مقاومة البكتريا الارثرومايسين ٢٦.٦٦ % من (٦١.١١٪) لدى العاني(٢٠٠١) ، كما انها كانت ادنى من النسب التي حصلت عليها عيسى(٢٠٠٠) والشبيب (١٩٧٧)(٥٦.٣٪) و(٥٦.٧٪) وعلى التوالي. اما الكلندامايسين فقد كانت المقاومة له اعلى من النسب التي حصلت عليها كل من العاني (٢٠٠١) وعيسى (١١.١١٪) (٢٠٠٠) و (٢٥.٤٪) على التوالي، وعلى العموم فان هذه النسب اعلى من نسب المقاومة في اغلب بلدان العالم إذ وجد Ciftci وجماعته (٢٠٠٣) بانها لاتزيد عن (٣٪) و(٣.٨٪) على التوالي في تركيا، ووجد Bingen وجماعته (٢٠٠٠) بانها لاتزيد عن (٦.٢٪) و(٢.٨٪) في بكتريا *S. pyogenes* المعزولة من الاطفال في فرنسا وذكرBaquero وجماعته (١٩٩٩) بان المقاومة للارثرومايسين في اغلب بلدان العالم لا تزيد عن (٥٪)، وعلىالرغم من ذلك فقد سجلت حالات لتزايد المقاومة لهذه المضادات في بعض دول العالم مثل اسبانيا وفلندة وايطاليا، إذ وصلت نسبة المقاومة للارثرومايسين في فلندة إلى (Kataja *et al.*, ١٩٩٨)(١٧٪)وفي اسبانيا وصلت إلى ٢٣ % (Morosini *et al.*, ٢٠٠٣) وتزايدت بدرجة ملحوظة في ايطاليا من (٥.١٪) عام (١٩٩٣) لتصل إلى (٤٠٪) في (Cornoglia et al., ١٩٩٨)(١٩٩٨).

ولم تسجل في هذه الدراسة أي مقاومة لمضاد الفانكومايسين وهذا يتفق وما اشارت له البحوث من حساسية الانواع المختلفة للمسبحيات لهذا المضاد وعدم ظهور حالات مقاومة له في

بكتريا *S.pyogenes*على الرغم من ظهور حالات لتحمل هذا المضاد في المجاميع C وG للمسبحيات الحالة للدم بيتا (Baqauero *et al.*, ١٩٩٩; Zaoutis *et al.*, ١٩٩٩)، وظهور حالات لمقاومته في المسبحيات التابعة للنمط المصلي D (النوع *S. bovis*) يشفر لهذه المقاومة جينات *van B* المحمولة على عناصر قافزة اقترانية مشابهه لما في بكتريا *E. faecalis* (Poyart *et al.*, ١٩٩٧).

٤-٤ المحتوى البلازميدي

تم التحري عن المحتوى البلازميدي للمسبحيات المعزولة بعد استخلاص الدنا الكلي بطريقة التمليح الخارجي (Salting out) ولدى إجراء عملية الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص من العزلات لوحظ وجود نمطين للنسق البلازميدي إذ اشتركت العزلات كافة بوجود بلازميد مفرد كبير الحجم. واحتوت العزلات ١٥ ,١٤ ,١٣ ,١٢ ,٩ ,٨ ,٦ ,٤ ,٣ ,١ *S. pyogenes* والعزلات ١ *S. mitis* و ٢ ,١ *S. salivarius* و١ *S. suis* على حزمتين بلازميدية صغيرة الحجم كما مبين (بالاشكال (٤-٢) و(٤-٣)).



ونصف)

المسار الاول : المحتوى الوراثي لبكتريا *E.coli* الحاوية على البلازميد *pBR* ٣٢٢

المسار الثاني : المحتوى الوراثي للعزلة ١ *S. pyogenes*

المسار الثالث : المحتوى الوراثي للعزلة٢ *S. pyogenes*

المسار الرابع : المحتوى الوراثي للعزلة ٣ *S. pyogenes*

المسار الخامس : المحتوى الوراثي للعزلة ٤ *S. pyogenes*

المسار السادس : المحتوى الوراثي للعزلة ٥ *S. pyogenes*

المسار السابع : المحتوى الوراثي للعزلة ٦ *S. pyogenes*

المسار الثامن : المحتوى الوراثي للعزلة ٧ *S. pyogenes*

المسار التاسع : المحتوى الوراثي للعزلة ٨ *S. pyogenes*

المسار العاشر : المحتوى الوراثي للعزلة ٩ *S. pyogenes*

المسار الحادي : المحتوى الوراثي للعزلة ١٠ *S. pyogenes*

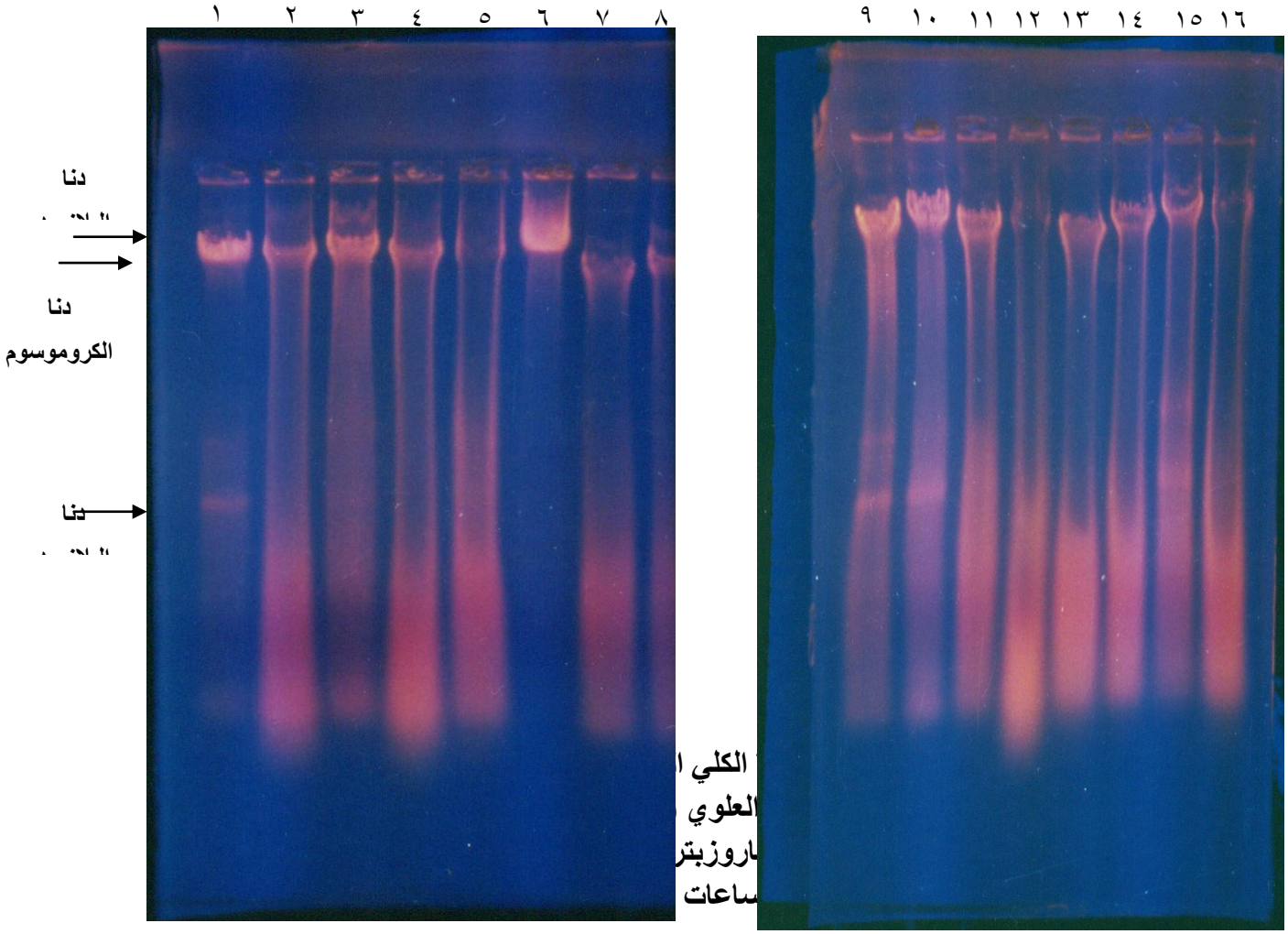
المسار الثاني عشر : المحتوى الوراثي للعزلة ١١ *S. pyogenes*

المسار الثالث عشر: المحتوى الوراثي للعزلة ١٢ *S. pyogenes*

المسار الرابع عشر : المحتوى الوراثي للعزلة ١٣ *S. pyogenes*

المسار الخامس عشر : المحتوى الوراثي للعزلة ١٤ *S. pyogenes*

المسار السادس عشر : المحتوى الوراثي للعزلة ١٥ *S. pyogenes*



المسار الاول : المحتوى الوراثي لبكتريا *E.coli* الحاوية على البلازميد *pBR* ٣٢٢

المسار الثاني : المحتوى الوراثي للعزلة ١ *S. pyogenes*

المسار الثالث : المحتوى الوراثي للعزلة٢ *S. pyogenes*

المسار الرابع : المحتوى الوراثي للعزلة ٣ *S. pyogenes*

المسار الخامس : المحتوى الوراثي للعزلة ٤ *S. pyogenes*

المسار السادس : المحتوى الوراثي للعزلة ٥ *S. pyogenes*

المسار السابع : المحتوى الوراثي للعزلة ٦ *S. pyogenes*

المسار الثامن : المحتوى الوراثي للعزلة ٧ *S. pyogenes*

المسار التاسع : المحتوى الوراثي للعزلة ٨ *S. pyogenes*

المسار العاشر : المحتوى الوراثي للعزلة ٩ *S. pyogenes*

المسار الحادي : المحتوى الوراثي للعزلة ١٠ *S. pyogenes*

المسار الثاني عشر : المحتوى الوراثي للعزلة ١١ *S. pyogenes*

المسار الثالث عشر: المحتوى الوراثي للعزلة ١٢ *S. pyogenes*

المسار الرابع عشر : المحتوى الوراثي للعزلة ١٣ *S. pyogenes*

المسار الخامس عشر : المحتوى الوراثي للعزلة ١٤ *S. pyogenes*

المسار السادس عشر : المحتوى الوراثي للعزلة ١٥ *S. pyogenes*

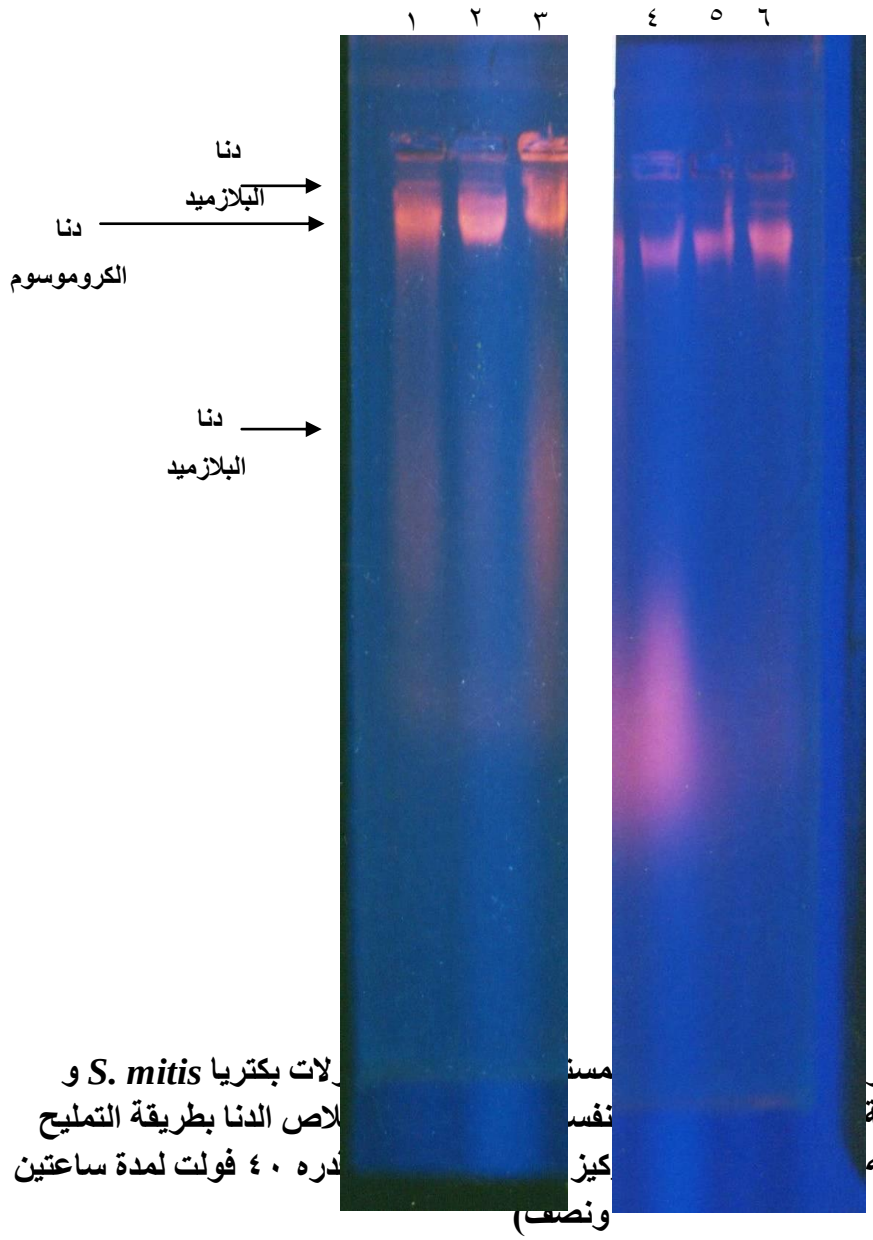
المسار السابع : المحتوى الوراثي للعزلـة ٦ *S. pyogenes*

المسار الثامن : المحتوى الوراثي للعزلـة ٧ *S. pyogenes*

المسار الرابع عشر : المحتوى الوراثي للعزلة ١٣ *S. pyogenes*

المسار الخامس عشر : المحتوى الوراثي للعزلة ١٤ *S. pyogenes*

المسار السادس عشر : المحتوى الوراثي للعزلة ١٥ *S. pyogenes*



شكل (٤-٣) التر ... مسـ ... لات بكتريا *S. mitis* و *S. equi* المعزولة ... نفسـ ... لاص الدنا بطريقة التمليح الخارجي وتم ترحيله ... كيز ... دره ٤٠ فولت لمدة ساعتين ونصف)

المسار الاول: المحتوى الوراثي للعزلة ١ *S. mitis*

المسار الثاني: المحتوى الوراثي للعزلة ٣ *S. mitis*

المسار الثالث: المحتوى الوراثي للعزلة ٤ *S. mitis*

المسار الرابع:المحتوى الوراثي للعزلة ١ *S. equi*

المسار الخامس:المحتوى الوراثي للعزلة ٢ *S. equi*

المسار السادس:المحتوى الوراثي للعزلة ٣ *S. equi*

٤ـ ٥ الاقتران البكتيري في الوسط الصلب

تم التحري عن الطبيعة الاقترانية للبلازميدات التي تمتلكها البكتريا بإجراء عملية الاقتران البكتيري على الوسط الصلب، واستعملت العزلات ٩ ,٨ ,١ *S. pyogenes* التابعة للنوع *S.*

pyogenes والعزلات ١ *S. mitis* و ٢ ,١ *S. salivarius* كسلالات واهبة والعزلتين القياسيتين *E. coli* MM٢٩٤ و *E.coli* HB١٠١ من كسلالات مستلمة.

وتم اجراء الانتخاب في الأوساط الانتقائية الحاوية على مضادين احدهما مميز للسلالة الواهبة (امبسلين أو اموكسسلين أو ستربتومايسين أو تتراسايكلين أو تراي مثبريم أو كلورامفنيكول) والثاني خاص بالسلالة المستلمة (ريفامبسين أو ستربتومايسين)، لم تتمكن أي مستعمرة من النمو على هذه الأوساط ولأي من الاقترانات الست.

كررت هذه التجربة لثلاث مرات وعلى الرغم من ذلك لم يتم الحصول على مستعمرات مقترنة وهذا يشير إلى احتمال كون البلازميد ذا طبيعة غير اقترانية أوقد أوقد يكون البلازميد ذا طبيعة اقترانية لكنه فشل بالاقتران بسبب حاجز النوع ووجود اختلافات كبيرة بين الجنسين أوان البلازميد له القدرة على الانتقال بالاقتران فقط بين الانواع العائدة للمسبحيات أوالبكتريا الموجبة لصبغة غرام، فقد أشار Clewell (١٩٨١) وSchaber و Zervos (١٩٨٦) ان الاقتران في البكتريا في المكورات الموجبة لصبغة غرام وبعكس البكتريا السالبة لا يعتمد على تكوين جسور الاقتران أوالأهداب (Pili) وإنما يعتمد على حصول التماس المباشربين الخليتين الواهبة والمستلمة.ومن الممكن أن تكون هذه قابلة للنقل بطرق أخرى غير الاقتران المباشر مثل التحريك (Mobilization) أو التحول الوراثي(Transformation) أو النقل بالعاثي (Transduction)، إذ إن البلازميد *pMV١٥٨* غير الاقتراني والواسع الانتشار في الأنواع المختلفة للمسبحيات يمكن تحريكه بالبلازميد الاقتراني *pIP٥٠١* المشفر لمقاومة الكلورومفنيكول والارثرومايسين (Grohmann *et al.*, ٢٠٠٣;Evans & Macrina,١٩٨٣) ، كما أشار Grohmann وجماعته(٢٠٠٣) إلى إمكانية تحريك هذا البلازميد بالاستعانة ببلازميدات اقترانية أخرى غير البلازميد *pIP٥٠١* مثل البلازميدات*pE١٩٤* و*pT١٨١* و*pU١١٠* ، حيث تساهم التسلسلات الباندرومية (Palindromic sequence)(pal ID) للبلازميد المسبحي *pIP٥٠١* والبلازميدات *pE١٩٤* و*pT١٨١* و*pU١١٠* في المكورات العنقودية (Staphylococci) في عملية التحريك (Prieb and Lack, ١٩٨٩).

وجد Gibson وجماعته (١٩٧٩) بان البلازميد *pMV١٥٨* يمكن نقله بالاقتران بالاستعانة بالبلازميد *pAMβ١* ونقله إلى بكتريا *L. lactis* var. lactis، و وجد Van der Lelie وجماعته (١٩٩٠) بان البلازميد *pMV١٥٨* بعد نقله الى السلالة*L. lactis* var. lactis IL١٤٠٣ فان انتقاله بالاقتران الى السلالات الحساسة من *L. lactis* لا يشترط فيه احتواء السلالة الواهبة على احد البلازميدين *pIP٥٠١* أو*pAMβ١* ، وإنما يحتاج الى بروتين فعال مشفر بالبلازميد *pMV١٥٨* نفسه وان هذا البروتين يكون مشابه للبروتينMob A المشفر في البلازميدات الاقترانية الصغيرة لبكتريا *S. aureus* مثل البلازميد *pT١٨١*.

كما وجد مؤخرا بان البروتين Mob M المشفر في البلازميد *pMV١٥٨* نفسه يلعب دورا مهما في عملية التحريك إذ يعمل على قطع البلازميد المشفر له من نقطة Origin of

transfer ومن ثم ينقل بالاقتران الميسر باحد البلازميدين *pIP٥٠١* أو *pAMβ١*

(Grohmann *et al.*, ١٩٩٩, Farias *et al.*, ١٩٩٩, Guzman *et al.*, ١٩٩٧).

ذكرFarias وEspinosa (٢٠٠٠) بان من الممكن تحريك *pMV١٥٨* ونقله إلى بكتريا *E. coli* بمساعدة *pRP٤* أو *Inc WR٣٣٨* اللذين يعملان auxiliary plasmid. كما ان البلازميد *pMV١٥٨* في بكتريا *E. faecalis* بعد نقله بعملية التحول الوراثي (Transformation)الى السلالات العائدة للمجموعة F من المسبحيات تصبح لديه القدرة على الانتقال بالاقتران الى أنواع معينة من المسبحيات تشمل *S. mutans* و *S. sanguis* و *S. salivarius* مسببا مقاومتها للارثرومايسين واللنكومايسين (Le Blank *et al.*, ١٩٧٨). كما أشارKuramintsu وTrapa(١٩٨٩) الى ان صفات مقاومةالمضادات الحيوية البلازميدية و الكروموسومية في المسبحيات الفموية (Oral streptococci) تنتقل بالاقتران من بكتريا *S. mutans* الى كل من *S. milleri* و *S. sanguis* خلال النمو المختلط.

٤- ٦ التحول الوراثي

أجريت عملية التحول الوراثي (Transformation) باستعمال الدنا المستخلص من ٣ عزلات تابعة للنوع *S. pyogenes* (العزلات *S. pyogenes* ٩ ,٨ ,١) وعزلة واحدة تابعة للنوع *S. mitis* (العزلة ١ *S. mitis*) وعزلتين تابعتين للنوع *S. salivarius* كسلالات واهبة (Doners)واستعمل الدنا المستخلص من البلازميد *pBR٣٢٢* المشفر لمقاومة الامبسلين والتتراسايكلين كسيطرة موجبة (Positive control) والخلايا المؤهلة للعزلة القياسية *E. coli* MM٢٩٤ الخالية من البلازميدات كسلالة مستلمة(Reciepent) .

فأمكن الحصول على مستعمرات متحولة (Transformant) على الأوساط الانتقائية الحاوية علىالمضادات الحيوية المميزة للسلالات الواهبة (امبسلين، اموكسسلين، تراي مثيريم ستربتومايسين، كلورامفنيكول) بتردد تراوح بين ٩.٠١×١٠$^{-٥}$ و٢.٢١×١٠$^{-٣}$ (جدول (٤- ٦)).

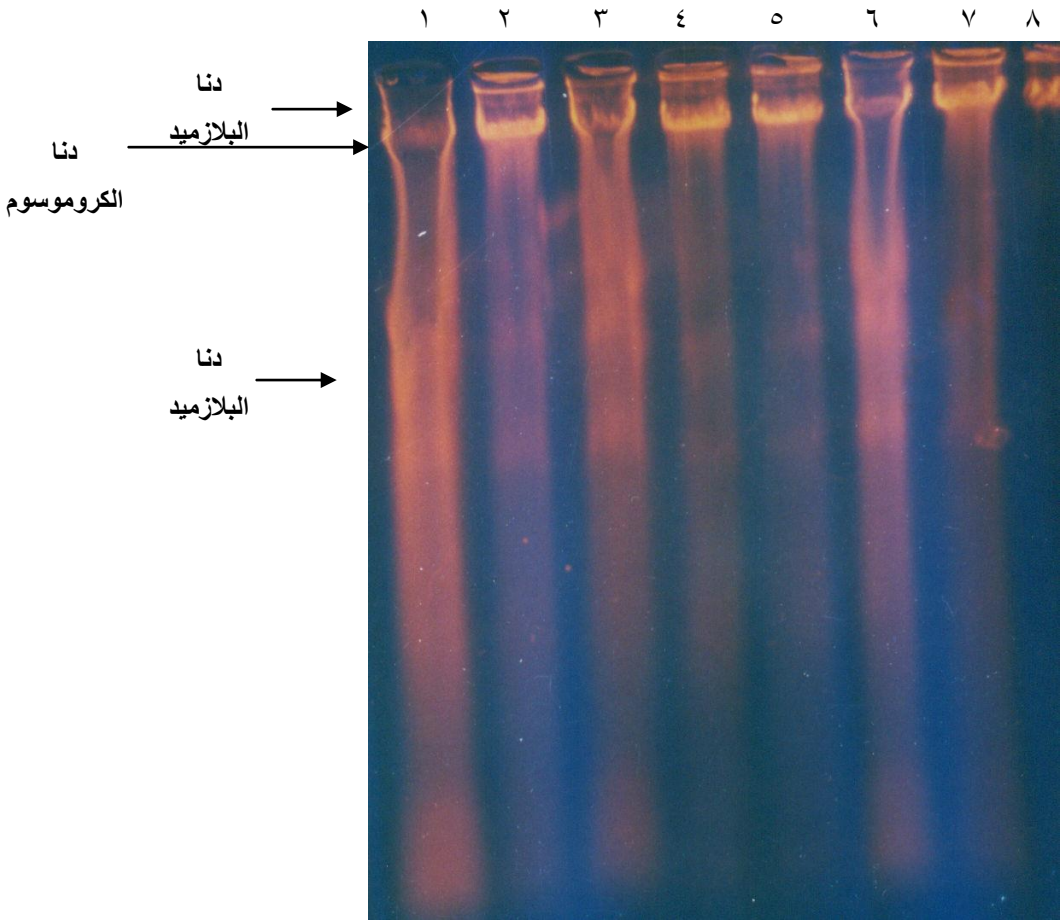
أظهرت نتائج التحول ان صفة المقاومة لمضاد الكلوكسسلين في النوع *S.pyogenes* غير محمولة على البلازميدات إذ انتقلت جميع البلازميدات الموجودة في العزلات *S. pyogenes* ١, ٨, ٩ إلى المستعمرات المتحولة *E. coli* SP ١, ٨, ٩، في حين لم تظهر أي منها صفة المقاومة لهذا المضاد وكذلك الحال في على *S. mitis* ١ و *S. salivarius* ١, ٢ التابعة للنوعين *S. mitis* و*S. salivarius* ، إذ لم تنتقل للمستعمرات المتحولة صفة المقاومة لهذه المضاد على الرغم من انتقال جميع بلازميدات السلالات الواهبة اليها، وهذا يشير إلى مقاومة العزلات المدروسة لهذا المضاد غير محمولة على البلازميدات ولم تتوفر أي دراسة سابقة لوراثة هذه الصفة لاي نوع من أنواع المسبحيات في ضوء المصادر المتوفرة.

كما أظهرت النتائج بان صفة المقاومة للنكومايسين في السلالتين *S. mitis* ١ و *S. salivarius* ٢ والمقاومة للنوفابايوسين في السلالة *S. salivarius* ٢ غير محمولة على

البلازميدات ايضا، إذ لم تنتقل المقاومة لهذين المضادين بانتقال البلازميدات التي تحتويها السلالات الواهبة إلى المستعمرات المتحولة. وهذا يخالف ما أشارت له البحوث السابقة لكل من Clewell و Franke (١٩٧٤) وMalke وجماعته (١٩٨١) من ان صفة المقاومة للنكومايسين و الارثرومايسين في بكتريا *S. pyogenes* محمولة على البلازميد، وما توصل له Bouguelert وجماعته (١٩٨١) من ان صفة المقاومة للنكومايسين والماكروليدز(MLS) والكلورومفنيكول في المسبحيات التابعة للنمطين المصليين G وC يشفر لها بلازميدات اقترانية ذات أوزان جزيئية 17×10^6 و 20×10^6، و ما أشار له كل من Engel وجماعته (١٩٨٠) و Schaberg و Zervos (١٩٨٦) من انتشار بلازميدات مقاومة الـMLS في مدى واسع من انواع المسبحيات.

وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما اشار Kataja وجماعته (١٩٩٩) من انتشار جينات مقاومة الماكروليدز الكروموسومية في الانواع المختلفة للمسبحيات اكثر من جينات المقاومة المشفرة بالبلازميدات.

أظهرت النتائج بان صفة المقاومة للامبسلين والاموكسسلين والتتراسايكلين والتراي مثبريم والتتراسايكلين والستربتومايسين والسيفالكسين والارثرومايسين محمولة على البلازميدات اذ انتقلت صفة المقاومة لهذه المضادات بانتقال البلازميدات الموجودة في السلالات الواهبة، وهذا يتفق وما اشار له Clewel وجماعته (١٩٨١) من انتشار البلازميدات المشفرة لمقاومة الارثرومايسين واللنكومايسين والكلورامفنيكول في مدى واسع من المسبحيات وما ذكره Van Embdman وجماعته (١٩٧٧) من كون صفة المقاومة للكلورامفنيكول والارثرومايسين والتتراسايكلين في النمط المصلي D للمسبحيات محمولة على البلازميدات، كما بين (١٩٨٠) Burdett بان بلازميدات مقاومة التتراسايكلين موجودة ايضا في المسبحيات التابعة للنمط المصلي B (النوع *S. agalagtiae*). ووجد Horodniceae وجماعته (١٩٨١) بان المقاومة المتعددة للكلورامفنيكول والتتراسايكلين ومضادات الـMLS في المجاميع A و B وC وD وG تكون محمولة على عناصر قافزة اقترانية تنتقل بين السلالات التابعة لهذه المجاميع حتى بغياب وجود البلازميدات. وتتضح حالة المقاومة العائدة إلى العناصر القافزة في السلالة *S. salivarius* ١ إذ انتقلت جميع بلازميداتها إلى المستعمرات المتحولة *E. coli* SS١B و*E. coli* SS١ A على الرغم من ذلك تباينت هاتين المتغايرتين في نمط مقاومتهما للتتراساكلين إذ كانت احداهما حساسة للتتراسايكلين في حين كانت الاخرى مقاومة له، وهذا يشير إلى احتمال كون صفة المقاومة للتتراسايكلين في هذه العزلة عائدة إلى وجود العناصر القافزة المحمولة على البلازميدات وليس البلازميدات بحد ذاتها. وقد اشار Chopra و Roberts (٢٠٠١) إلى ان صفة المقاومة للتتراسايكلين في بكتريا المسبحيات تعود لامتلاكها كل من جينات الـ *tet* الكروموسومية والبلازميدية. كما ذكر Stevens و Kaplan (٢٠٠٠) بان مقاومة بكتريا *S. pyogenes* للتتراسايكلين تعود لامتلاكها لاحد العنصرين القافزين *Tn* ٩١٦ و*Tn* ٣٧٠١ .



شكل (٤-٤) الترحيل الكهربائي لدنا الخلايا المتحولة *E. coli* transformants والسلالات الواهبة ١, ٨, ٩ *S. pyogenes* والسلالة القياسية المستلمة *E. coli* MM٢٩٤ (تم استخلاص الدنا بطريقة التمليح الخارجي Salting out وتم ترحيله في هلام الاكاروز بتركيز ١%و فرق جهد قدره ٤٠ لمدة ثلاث ساعات ونصف)

المسار الاول : المحتوى الوراثي للعزلة الواهبة ١ *S. pyogenes*

المسار الثاني : المحتوى الوراثي للخلية المتحولة ١SP *E. coli*

المسار الثالث : المحتوى الوراثي للعزلة الواهبة ٨ *S. pyogenes*

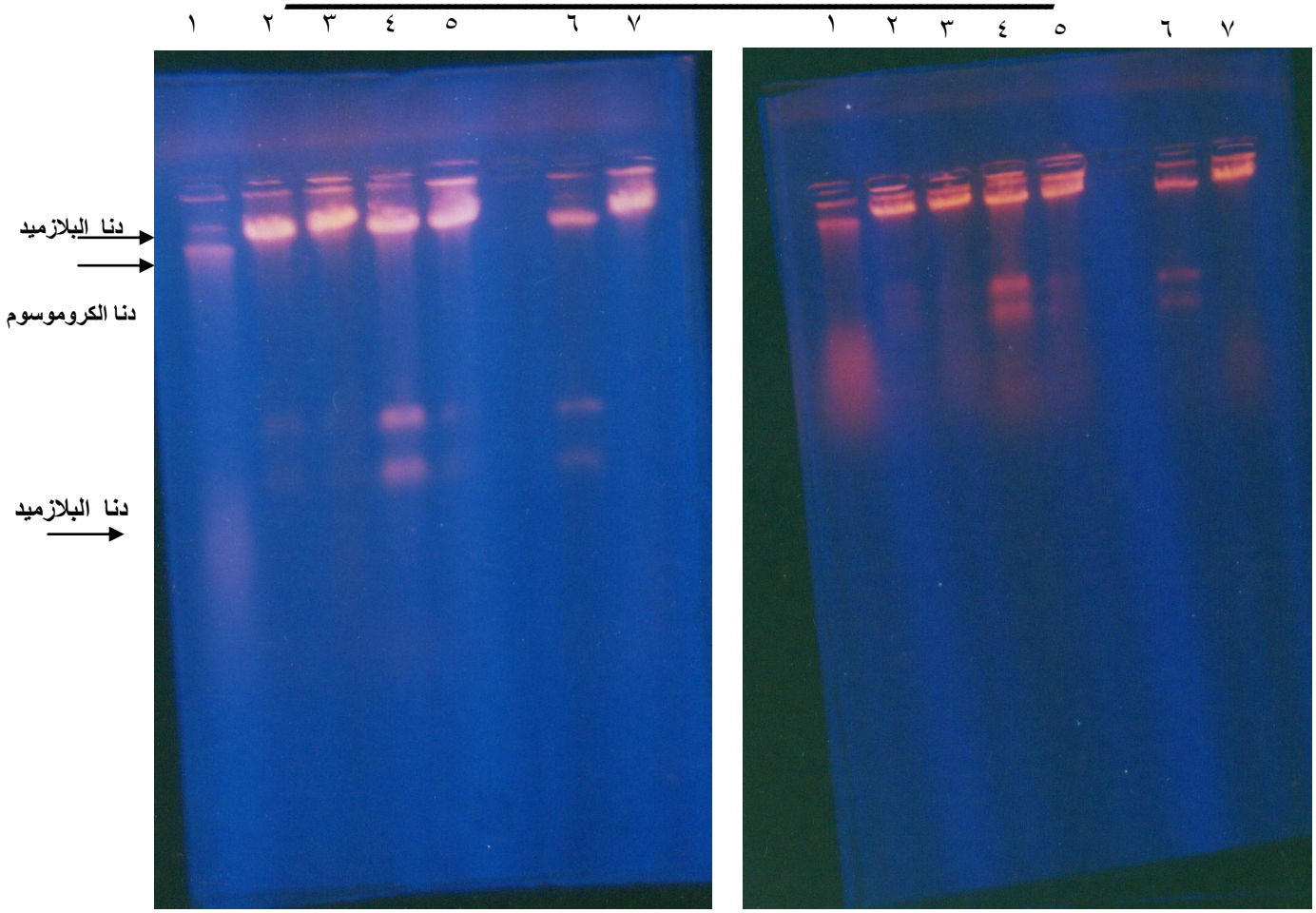
المسار الرابع : المحتوى الوراثي للخلية المتحولة ٨ SP *E. coli*

المسار الخامس : المحتوى الوراثي للخلية المتحولة ٨SP *E. coli*

المسار السادس : المحتوى الوراثي للعزلة الواهبة ٩ *S. pyogenes*

المسار السابع : المحتوى الوراثي للخلية المتحولة ٩SP *E. coli*

المسار الثامن : المحتوى الوراثي للسلالة المستلمة ٢٩٤MM *E. coli*



(أ) بعد ساعة ونصف **(ب) بعد ساعتين ونصف**

شكل (٤-٥) الترحيل الكهربائي لدنا الخلايا المتحولة *E. coli* transformants والسلالات الواهبة *S. mitis* ١ و *S. salivarius* ١, ٢ (تم استخلاص الدنا بطريقة التمليح الخارجي Salting out و تم ترحيله في هلام الاكاروز بتركيز ١% و فرق جهد ٤٠ فولت)

المسار الاول : المحتوى الوراثي للعزلة الواهبة ١ *S. mitis*
المسار الثاني : المحتوى الوراثي للخليه المتحولة *E. coli* SM١
المسار الثالث : المحتوى الوراثي للعزلة الواهبة ١ *S. salivarius*
المسار الرابع : المحتوى الوراثي للخليه المتحولة *E. coli* SS١A
المسار الخامس : المحتوى الوراثي للخليه المتحولة *E. coli* SS١B
المسار السادس: المحتوى الوراثي للعزلة الواهبة ٢ *S. salivarius*
المسار السابع : المحتوى الوراثي للخليه المتحولة *E. coli* SS٢

جدول (٤-٦) صفات المقاومة المنقولة بعملية التحول الوراثي وتردد التحول

الخلايا المتحولة	تردد التحول	A	AX	T	Tc	Sm	DA	Cl	C	L٢	NV	Cec	CX	E

										mp		**mp**		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	٥.٧٩×١٠$^{-٤}$	*E. coli* SP١
-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	٨.٣١×١٠$^{-٤}$	*E. coli* SP٨
-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	٤.٥٢×١٠$^{-٤}$	*E. coli* SP٩
+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	٩.٠١×١٠$^{-٥}$	*E. coli* SM١
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	٢.٢١×١٠$^{-٣}$	*E. coli* SS١A
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	٧.٧٩×١٠$^{-٥}$	*E. coli* SS١B
-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	٥.٦٤×١٠$^{-٤}$	*E. coli* SS٢

+ مقاوم -حساس

Amp المقاومة للامبسلين
AX المقاومة للاموكسسلين
Tmp المقاومة للتراي مثبريم
Tc المقاومة للتتراسايكلين
Sm المقاومة للستربتومايسين
DA المقاومة للكلندامايسين
Cl المقاومة للسيفالكسين
C المقاومة للكلورامفنيكول
L٢ المقاومة للنكومايسين
NV المقاومة للنوفابايوسين
Cec المقاومة للسيفاكلور
CX المقاومة للكلوساسلين
E المقاومة للارثرومايسين

٥-١ الاستنتاجات

١. تم عزل المسبحيات المحللة للدم بيتا من اخماج الجهاز التنفسي العلوي العائدة بنسبة ١٩.١٤ %، وكانت نسبة عزل بكتريا *S. pyogenes* اعلى من بكتريا *S. equi* إذ شكلت الاخيرة نسبة واطئة من المجموع الكلي للعينات .

٢. اظهرت نتائج دراسة بعض عوامل الضراوة بان جميع المسبحيات المعزولة حاوية على المحفظة وان جميع العزلات التابعة للنوعين *S. pyogenes* و *S. equi* منتجة للستربتوكاينيز و الهيمولايسين بيتا في كل من الظروف الهوائية واللاهوائية، في حين لم تظهر أي من المسبحيات المعزولة القدرة على إنتاج السايدروفور.

٣. تمكنت ١٣.٣٣٪ من العزلات التابعة للنوع *S. pyogenes* من إنتاج انزيم السيستاين بروتييز (الذيفان SPE B)، وأظهرت العزلات ١٤, ٧, ٥, ٢ *S. pyogenes* القدرة على إنتاج واحد أو اكثرمن الذيفانات المولدة للحمرة (Erythrogenic toxins).

٤. سجلت احدى عزلات النوع *S. equi* لاول مرة القدرة على إنتاج انزيم السيستاين بروتييز، واكد اختبار الحساسية في جلد الارنب النيوزلندي قدرة هذه العزلة على انتاج واحد أو اكثرمن الذيفانات المولدة للحمرة (Erythrogenic toxins).

٥. أظهرت المسبحيات المعزولة مقاومة متعددة لعدد من المضادات الحيوية المدروسة، و أظهرت مقاومة عالية لمضادات التراي مثبريم و البيتا لاكتام والتتراسايكلين و الريفامبسين و مضادات مجموعة الـ MLS ومقاومة متوسطة لمضادات السيفالكسين و النوفابايوسين و الكلورامفنيكول، في حين أظهرت حساسية عالية لمضادي الستربتومايسين و الفانكومايسين.

٦. أظهرت نتائج التحول بان صفة المقاومة لمضادات الامبسلين و الاموكسسلين و التراي مثبريم و التتراسايكلين و الستربتومايسين و الكلندامايسين و السيفالكسين في المسبحيات التابعة للانواع *S. pyogenes* و *S. salivarius* و *S. mitis* محمولة على البلازميدات.

٥-٢ التوصيات

١. توصي هذه الدراسة باجراء دراسات جزيئية باستعمال تقنية الـ PCR للتحري عن الجينات المشفرة لعوامل الضراوة للمسبحيات.

٢. تنقية و توصيف الذيفان المنتج من بكتريا *S. equi* ومقارنته مع الذيفان المنتج من بكتريا*S. pyogenes* .

المصادر العربية

الجيلاوي، رباب عمران (٢٠٠٠). دراسة وراثية لصفة اللزوجة في بكتريا الكلبسيلة *Klebseilla pneumoniae*. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم- جامعة بغداد.

الشبيب، أسفار شهاب (١٩٧٧). دراسة بكترية وراثية عن الـ *Streptococcus pyogenes* المعزولة من حناجر ولعاب الأطفال في العراق. رسالة ماجستير، كلية العلوم- جامعة بغداد.

العاني، ندى عربي حمدو (٢٠٠١). دراسة تأثير المستضد الخارق المنتج من بكتريا *Streptococcus pyogenes* المعزولة من الأطفال على بعض الخلايا المناعية. رسالة ماجستير، كلية العلوم- جامعة بغداد.

العبودي، مها عبد الجبار (٢٠٠٢). عزل وتنقية Streptolysin O جزئيا من بكتريا *Streptococcus pyogenes* المعزولة من الأطفال ودراسة فعاليته. رسالة ماجستير، كلية العلوم-الجامعة المستنصرية.

الزعاك، علي (١٩٩٤). البايولوجي الجزيئي لضراوة البكتريا. الطبعة الاولى جامعة بغداد.

السعيد، محمد صبري عبد الرزاق (١٩٩٧). النسق الوراثي لبكتريا الجهاز التنفسي الهوائية. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم- جامعة بغداد.

القوادري، فايزة أحمد (٢٠٠٠). تأثير متعدد السكريد المستخلص من بكتريا *Streptococcus pyogenes* المعزولة من الأطفال على الخلايا المناعية. رسالة ماجستير، كلية العلوم-الجامعة المستنصرية.

عيسى، مي طالب فليح (٢٠٠٠). دراسة على انزيم الـ Cystein protease المنتج من بكتريا *Streptococcus pyogenes*. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم- جامعة بغداد.

المصادر الأجنبية

Alberti, S.; Ashbaugh, C. D. and Wessels, M. R. (١٩٩٨). Structure of the has operon promoter and regulation of hyaluronic acid capsule expression in group A streptococcus. Mol. Microbiol. ٢٨: ٣٤٣–٣٥٣.

Andrade, A. A.; Ciccarelli, F. D.; Perez-Iratxeta, C. and Bork, P. (٢٠٠٢). NEAT a domain duplicated in genes near the components of a putative Fe siderophore transporter from Gram–positive pathogenic bacteria. Genome Biology.٣: ٠٠٤٧.١–٠٠٤٧.٥.

Arai,K.; Madoiwa, S.; Mimuro, J.; Asakura, S.; Matsuda, M.; Sako,T. and Sakata, Y. (١٩٩٨). Role of the Kringle Domain in Plasminogen Activation with Staphylokinase. J. Biochem. ١٢٣: ٧١–٧٧.

Artiushin, S. C.; Timoney, J. F.; Sheoran, A. S. and Muthupalani, S. K. (٢٠٠٢). Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE H and SePE I of *Streptococcus equi*. Microb. Pathog. ٣٢: ٧١–٨٥.

Ashbaugh, C. D.; Alberti, S. and Wessels; M. R.(١٩٩٨). Molecular analysis of the capsule gene region of group A streptococcus: the *hasAB* genes are sufficient for capsule expression. J. Bacteriol. ١٨٠: ٤٩٥٥–٤٩٥٩.

Baquero, F.; Rodriguez, J. A.; De Lomas, J. G.; Aguilar, L. and the Spanish surveillance group for respiratory pathogens (١٩٩٩). Antimicrobial resistance of ٩١٤ beta – hemolytic streptococci isolated from pharyngeal swabs in Spain: result of ١ year (١٩٩٦–١٩٩٧). multicenter surveillance study. Antimicrob. Agents Chemother.٤٣: ١٧٨–١٨٠.

Barsumian, E. L.; Schlieveret, P. M. and Watson, D. W. (١٩٧٨). Non specific and specific immunological mitogenicity by group A streptococcal pyrogenic exotoxins. Infect. Immun. ٢٢: ٦٨١–٦٨٨.

Bates,C. S.; Montanez,G. E.; Woods, C. R.; Vincent, R. M. and Eichenbaum, Z. (٢٠٠٣). Identification and characterization of *Streptococcus pyogenes* operon involved in binding of hemoproteins and acquisition of iron. Infect. Immun. ٧١: ١٠٤٢–١٠٥٥.

Bates,C. S.; Toukoki, C.; Neely, M. N. and Eichenbaum, Z. (٢٠٠٥). Characterization of Mts R, a new metal regulator in group A Steptococcus, involved in iron acquisition and virulence. Infect. Immun. ٧٣: ٥٧٤٣–٥٧٥٣.

Benson, H. J. (١٩٩٨).Microbiology applications laboratory manual general microbiology . ٧th ed. Graw-Hill.

Ben Nasr, A.; Wistedt, A.; Ringdahl,U. and Sjobring , U. (١٩٩٤). Streptokinase activates plasminogen bound to human group C and G streptococci through M-like proteins**.** European Journal of Biochemistry, ٢٢٢**:** ٢٦٧–٢٧٦**.** (Abstract)

Berge, A. and Bjorck, L. (١٩٩٥). Streptococcal cystein protease release biologically active fragments of streptococcal surface proteins. J. Biol. Chem. ٢٧٠: ٩٨٦٢–٩٨٦٧.

Berhrman, R. E. and Kleigman, R. M. (١٩٩٨). Nelson essentials of pediatrics. ٣rd ed. W. B. Saunders Company. ٣٧٣–٣٧٥.

Betschel, S. D.; Borgia, S. M.; Barg, N. L.; Low, D. E. and De Azavedo, J. C. (١٩٩٨). Reduced virulence of group A streptococcal *Tn* ٩١٦ mutants that do not produce streptolysin S. Infect. Immun. ٦٦: ١٦٧١–١٦٧٩.

Bhakdi, S.; Roth, M.; Sziegoleit, A. and Tranum-Jensen, J.(١٩٨٤). Isolation of two hemolytic forms of streptolysin O. Infect. Immun. ٤٦: ٣٩٤–٤٠٠.

Bingen, E.; Fitoussi, F.; Doit, C.; Cohen, R.; Tanna, A.; George, R.; Loukil, C.; Brahimi, M.; Thomas, I. and Deforche, D. (٢٠٠٠). Resistance to macrolide in *Sreptococcus pyogenes* in France in pediatric patients. Antimicrob. Agents Chemother**.** ٤٤: ١٤٥٣–١٤٥٧.

Bouguleret, L.; Beith, G. and Horodniceanu, T. (١٩٨١). Conjugative R plasmids in group C and group G streptococci. J. Bacteriol. ١٤٥: ١١٠٢–١١٠٥.

Boulnois, G. J.; Roberts, I. S.; Hodge, K. R.; Jann, K. B. and Timmis, K. N. (١٩٨٧). Analysis of the K١capsule biosynthesis genes of Escherichia coli: definition of three functional regions for capsule production. Mol. Gene. Genet. ٢٠٨: ٢٤٢–٢٤٦.(Medline)

Brook, I. (١٩٨٥). Role of beta-lactamase-producing bacteria in the failure of penicillin to eradicate group A streptococci. Pediatr. Infect. Dis. ٤:٤٩١–٤٩٥.(Medline)

Brook, I. (١٩٨٩). Treatment of patients with acute recurrent tonsillitis due to group A beta hemolytic streptococci: a prospective randomized comparing of penicillin and amoxicillin \clavulante potassium. Antimicrob. Agents Chemoter. ٢٤: ٢٢٧–٢٣٣.

Brown, M. B. and Roberts, M. C .(١٩٩١). Tetracycline resistance determinants in streptococcal species isolated from the bovine mammary gland. Vet. Microb. ٢٩: ١٧٣–١٨٠.

Burdett, V. (١٩٨٠). Identification of tetracycline resistance R plasmids in *S. agalactiae* (group B). Antimicrob. Agents Chemother. ١٨: ٧٥٣–٧٦٠.

Burdett, V. (١٩٩٦). Tet (M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent. J. Bacteriol. ١٧٨: ٣٢٤٦–٣٢٥١.

Burdett, V.; Inamine, J. and Rajagopalan, S. (١٩٨٢). Heterogeneity of tetracycline resistance determinants in *Streptococcus*. J. Bacteriol. ١٤٩: ٩٩٥–١٠٠٤.

Burns, E. H.; Marceil, A. M. and Musser, J. M. (١٩٩٦). Activation of a ٦٦ – kildalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *S.pyogenes* extracellular cystiene protease. Infect. Immun. ٦٤: ٤٧٤٤ – ٤٧٥٠.

Buu – hoi, A.; Bieth, C. and Horaud, T. (١٩٨٤). Broad host rang of streptococcal macrolide resistance plasmids. Antimicrob. Agents Chemother. ٢٤: ٢٨٩–٢٩١.

Carr, A.; Sledjeski, D. D.; Podbielski, A.; Boyle, M. D. and Kreikemeyer, B. (٢٠٠١). Similarities between complement mediated and streptolysin S mediated hemolysis. J. Biol. Chem. ٢٧٦: ٤١٧٩٠–٤١٧٩٦.

Chaussee, M. S.; Ajdaic, D.; Ferretti, J. J. (١٩٩٩). The *rgg* gene of *Streptococcus pyogenes* NZ١٣١ positively influnces exracellular SPE B production. Infect. Immu. ٦٧: ١٧١٥–١٧٢٢.

Chaussee, M. S.; Liu, J.; Stevens, D. L. and Ferretti, J. J.(١٩٩٦). Genetic and phenotypic diversity among isolates of *Streptococcus pyogenes* from ivasive infection. J. Infect. Dis. ١٧٣: ٩٠١–٩٠٨.

Chaussee, M. S.; Phillips, E. R; Ferrtti, J. J. (١٩٩٧). Temporal production of streptococcal erythrogenic toxin B (streptococcal cystein proteinase). in response to nutrient depletion. Infect. Immun. ٦٥: ١٩٥٦–١٩٥٩.

Chopra, I. and Roberts, M. (٢٠٠١). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. MMBR. ٦٥:٢٣٢–٢٦٠.

Ciftici, E.; Dogru, U.; Curiz, H.; Ayser. D. and Ince, E. (٢٠٠٣). Antibiotic susceptibility of *S. pyogenes* strains isolated from throat cultures of children with tonsillopharyngitis. J. Ankara Medical School ٢٥:١٥–٢٠.

Clewell, D. B.(١٩٨١). Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. Microbiol. Rev. ٤٥:٤٠٩–٤٣٦.

Clewell, D. B. and Franke, A. (١٩٧٤). Characterization of a plasmid determining resistance to erythromycin, lincomycin and vernamycin B in a strain of *S. pyogenes*. Antimicrob. Agent Chemother.٥ : ٥٣٤–٥٣٧.

Clewell, D. B.; Flannagan, S. E. and Jaworski, D. D. (١٩٩٥). Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn ٩١٦–Tn ١٥٤٥ family of conjugative transposons. Trends Microbiol. ٣: ٢٢٩–٢٣٦. (Medline)

Cornaglia , G.; Ligozzi , M.; Mazzariol , A.; Valentitini , M.; Orefici, G. The Italian surveillance group for antimicrobial resistance and Fontana, R.(١٩٩٦). Rapid increase of resistance to erythromycin and

clindamycin in *Streptococcus pyogenes* in Italy, ١٩٩٣–١٩٩٥ . Emerg. Infect. Dis. ٢: ٣٣٩–٣٤٢.

Cornaglia, G. (١٩٩٨). The spread of macrolide resistance in Italy. APUA. ١٦: ١–٤.

Crater, D. L. and van de Rijn, I. (١٩٩٥). Hyaluronic acid synthesis operon (*has)* expression in group A streptococci. J. Biol. Chem. ٢٧٠: ١٨٤٥٢–١٨٤٥٨.

Crater, D. L.; Dougherty, B. A. and van de Rijn , I. (١٩٩٥). Molecular characterization of *has C* from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci . J. Biol. Chem. ٢٧٠: ٢٨٦٧٦–٢٨٦٨٠.

Cunningham, M. W. (٢٠٠٠). Pathogenesis of group A streptococci infections. Clin. Microbiol. Rev. ١٣: ٤٧٠–٥١١.

Cywes, C.; Stamenkovic, I. and Wessels, M. R. (٢٠٠٠). CD٤٤ as a receptor for colonization of the pharynx by group A *Streptococcus*. J. Clin. Investg. ١٠٦: ٩٩٥–١٠٠٢.

Dale, J. B.; Washburn, R. G.; Marques, M. B. and Wessels, M. R. (١٩٩٦). Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. Infect. Immun. ٦٤: ١٤٩٥–١٥٠١.

Dantley, K. A.; Dannelly, H. K. and Burdett, V. (١٩٩٨). Binding interaction between Tet(M) and the ribosome: requirements for binding. J. Bacteriol. ١٨٠: ٤٠٨٩–٤٠٩٢.

De Angelis, P. L.; Papacontantinou, J. and Weigel, P. H. (١٩٩٣). Molecular cloning, identification, and sequence of the hyaluronan synthase gene from group A *Streptococcus* . J. Biol. Chem. ٢٦٨: ١٩١٨١–١٩١٨٤.

De Melo, M. C.; Figueiredo, A. M. and Carvalho, B. T. (٢٠٠٣). Antimicrobial susceptibility patterns and genomic diversity in strains

of *Streptococcus pyogenes* isolated in ١٩٧٨–١٩٩٧ in different Brazilian cities. J. Med. Microbiol. ٥٢: ٢٥١–٢٥٨.

Descheemaker, P.; Van Loock, F.; Hauchecorne, M.; Vandamme, P. and Goossens, H. (٢٠٠٠). Molecular characterization of group A streptococci from ivasive and non invasive disease episodes in Belgium during ١٩٩٣- ١٩٩٤. J. Med. Microbiol**.** ٤٩: ٤٦٧–٤٧١.

Dick, G. F. and Dick, G. H. (١٩٢٤). A skin test for susceptibility to scarlet fever. J. Amer. M. Ass. ٨٢: ٢٦٥–٢٦٧.

Dierksen, K. P. and Tagg, J. R. (٢٠٠٠). Haemolysin -deficient variants of *S. pyogenes* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* may be overlooked as aetiological agents of pharyngitis. J. Med. Microbiol. ٤٩: ٨١١–٨١٦.

Dierksen, K. P.; Ragland, N. L. and Tagg, J. (٢٠٠٠). A new alkaline pH medium enhances detection of B–hemolytic streptococci by minimizing bacterial interference due to *Streptococcus salivarius*. J. Clin. Mirobiol. ٣٨: ٦٤٣–٦٥٠.

Dougherty, B. A. and Van de Rijn , I . (١٩٩٤). Molecular characterization of *has* A from an operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. J. Biol. Chem. ٢٦٩: ١٦٩–١٧٥.

Dougherty, B. A. and Van de Rijn, I. (١٩٩٢). Molecular characterization of a locus required for hyaluronic acid capsule production in group A streptococci. J. Exp. Med. ١٧٥: ١٢٩١–١٢٩٩. (Abstract)

Dougherty, B. A. and Van de Rijn , I. (١٩٩٣). Molecular characterization of *has* B from has operon required for hyaluronic acid synthesis in group A streptococci. J. Biol. Chem. ٢٦٨: ٧١١٨–٧١٢٤.

Efstratiou, A. (٢٠٠٠). Group A streptococci in the ١٩٩٠s. J. Antimicrobial. Chemotherapy. ٤٥: ٣–١٢.

Eichenbaum, Z.; Green, B. D. and Scott, J. R. (١٩٩٦). Iron starvation causes release from the group A *Streptococcus* of ADP- ribosylating protein called plasmin receptor or surface glyceraldehydes – ٣ – phosphate – dehydrogenase. Infect. Immum. ٦٤: ١٩٥٦–١٩٦٠.

Eichenbaum, Z.; Muller, E.; Morse, S. A. and Scott, J. R. (١٩٩٦). Acquisition of iron from host proteins by group A Streptococcus. Infect. Immum. ٦٤: ٥٤٢٨–٥٤٢٩.

Engle, H.; Soedirman, N.; Rost , J.; Van Leeunen, W. and Van Embedman, J. D. (١٩٨٠). Transferability of macrolide, lincomycin, and streptogramin resistance between group A, B and D streptococci, *S. pneumonia* and *Staphylococcus aureus.* J. Bacteriol. ١٤٢: ٤٠٧– ٤١٣.

Evans , R. P.; and Macrina , F. (١٩٨٣). Streptococcal R plasmid pIP٥٠١ : Endonuclease site map, resistance determinant location, and construction of noval derivatives. J. Bacteriol. ١٥٤ : ١٣٤٧–١٣٥٥.

Facklam, R. (٢٠٠٢). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin. Microb. Rev. ١٥:٦١٣–٦٣٠.

Farias, M. F. and Espinosa, M. (٢٠٠٠). Conjucal transfer of plasmid pVM١٥٨: uncoupling of the pVM١٥٨ origin of transfer from the mobilization gene *mob M* and modulation of pVM١٥٨ transfer in *Escherichia coli* mediated by Inc plasmids. Microb. ١٤٦: ٢٢٥٩–٢٢٦٥

Farias, M. F.; Grohman, E. and Espinosa, M. (١٩٩٩). Expression of the *mob M* gene of the streptococcal plasmid pMV١٥٨ in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. FEMS. Microbiol. Lett. ١٧٩: ٤٠٣–٤١٠.(Abstract)

Federle, M. J.; McIver, K. S. and Scott, J. (١٩٩٩). A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A *streptococcus.* J. Bacteriol. ١٨١: ٣٦٤٩–٣٦٥٧.

Foley, S. M. J. and. Wood, W. B. (١٩٥٩). Studies on the pathogenicity of group A streptococci. The antiphagocytic effects of the M protein and the capsular gel. J. Exp. Med. ١١٠: ٦١٧– ٦٢٢.

Fonstein, M. and Haselkorn, R. (١٩٩٥). Physical mapping of bacterial genomes. J. Bacteriol. ١٧٧: ٣٣٦١–٣٣٦٩.

Fontaine, M. C.; Lee, J. J. and Kehoe, M. (٢٠٠٣). Combined contribution of streptolysin O and streptolysin S to virulence of serotype M٥ *Streptococcus pyogenes*. Infect.Immun. ٧١: ٣٨٥٧– ٣٨٦٥.

Fuller, J. D.; Camus, A. C.; Duncan, C. L.; Nizet, V.; Bast, D. J.; Thune, R. L.; Low, D. E. and de Azavedo, J. C. S. (٢٠٠٢). Identification of a streptolysin S–associated gene cluster and its role in pathogenesis of *Streptococcus iniae*. Infect. Immun. ٧٠: ٥٧٣٠–٥٧٣٩.

Gibson, E. M; Chace, N. M.; London, S. B.; London, J. (١٩٧٩). Transfer of plasmid – mediated antibiotic resistance from streptococci to lactobacilli. J. Bacteriol.١٣٧: ٦١٤–٦١٩.

Gibson, F. and Margrath, D. (١٩٦٩). The isolation and characterization of a hydroxymatic acid (aerobactin). formed by *Aerobacter aerogenes* ٦٢ – I.Biochem. Biophys Acta. ١٩٢: ١٧٥–١٨٤.

Giovanetti, E.; Brenciani, A.; Burioni, R.; Varaldo, P. E. (٢٠٠٢a). A noval efflux system in inducibly erythromycin resistant strain of *S. pyogenes*. Antimimicrob. Agents Chemother. ٤٦: ٣٧٥٠–٣٧٥٥.

Giovanetti, E.; Brenciani, A.; Lupidi, R.; Roberts, M. C. and Varaldo, P. E. (٢٠٠٣). Presence of the *tet (O)* gene in erythromycin and tetracycline resistant strains of *S. pyogenes* and linkage with either the *mef (A)* or the *erm (A)* gene. Antimimicrob. Agents Chemother.٤٧: ٢٨٤٤–٢٨٤٩.

Giovanetti, E.; Magi, G.; Brenciani, A.; Spinaci, C.; Lupidi, R.; Facinelli, B. and Varaldo, P. E.(٢٠٠٢b).Conjugative transfer of the *erm* (A) gene

from erythromycin resistant strain of *Streptococcus pyogenes* to macrolide susceptible *Streptococcus pyogenes E. faecalis* and *Listeria innocuae* . J. Antimicrob Chemother. ٥٠: ٢٤٩ – ٢٥٢.

Grohmann , E.; Gunther, M. and Espinosa, M. (٢٠٠٣). Conjugative plasmid transfer in gram – positive bacteria. J. MMBR. ٦٧: ٢٧٧–٣٠١.

Grohmann, E.; Guzman, L. M . and Espinosa, M. (١٩٩٩). Moblisation of the streptococcal plasmid pMV١٥٨: interaction of Mob M protein with its congnate ori T DNA region. Mol. Gen. ٢٦١: ٧٠٧ –٧١٥.

Guzman, L. M . and Espinosa, M. (١٩٩٧). The Mobiolization protein, Mob M , of the streptococcal plasmid pMV١٥٨ specifically cleaves supercoiled DNA at the plasmid ori T. J. Mol. Biol. ٢٦٦: ٦٨٨–٧٠٢.

Hakansson, A.; Bentley, C. C.; Shakhnovic, E. A. and Wessels, M. R. (٢٠٠٥). Cytolysin dependent evasion of lysosomal killing. Proc. Natl. Sci. USA ١٠٢: ٥١٩٢–٥١٩٧.

Hammerum, A. M.; Nielsen, H. U. K.; Agerso, Y.; Ekelund, K. and Frimodt-Moller, N. (٢٠٠٤). Detection of tet (M) tet (O) and tet (S) in tetracycline / minocycline - resistant *Streptococcus pyogenes* bacteraemia isolates. J. Antimicrob. Chemother. ٥٣: ١١٨–١١٩.

Hardie, J. M. (١٩٨٦). Gram positive cocci. In: Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology. " Sneath, A..; Mair, N. S. Sharp, M. E. and Holt, J.C. eds.".Vol ٢.pp: ١٠٤٣ -١٠٥٤. Williams and Wilkins, USA.

Hashikawa, S.; Inuma, Y.; Furushita, M.; Ohkura, T.; Nada, T.; Torii, K.; Hasegawa, T. and Ohta, M. (٢٠٠٤). Charecterization of group C and G streptococcal strains that cause streptococcal toxic shock syndrome. J. Clin. Microb. ٤٢: ١٨٦–١٩٢.

Heath, A.; DiRita, V. J. Barg, N. L. and Engleberg, N. C. (١٩٩٩). A Two-Component Regulatory System, CsrR-CsrS Represses Expression of

Three *Streptococcus pyogenes* Virulence Factors, Hyaluronic Acid Capsule, Streptolysin S, and Pyrogenic Exotoxin B. Infect. Immun. ٦٨: ٥٢٩٨–٥٣٠٥.

Herwald , H.; Collin, M.; Muller-Ester , W. and Bjork, L. (١٩٩٦). Streptococcal cysteine proteinse releases kinins: a noval virulence mechanism. J. Exp. Med. ١٨٤: ٦٦٥–٦٧٣.

Holm, S. E. (١٩٨٨). The pathogenesis of acute post streptococcal glomerulonephritis in new lights. APMS. ٩٦: ١٨٩ – ١٩٣.

Holt, J. C.; Krieg, N. R.; Sneath, A.; Starchleg, J. T. and William, S. T. (١٩٩٤). Bergy's Manual Determinating Bacteriology. ٩th ed, USA.

Hookey, J. V.; Saunders, N. A.; Clewley, J. P.; Efstratiou, A. and George, R. C. (١٩٩٦). Virulence regulon polymorphism in group A streptococci revealed by long PCR: implications for epidemiological and evolutionary studies. J. Medical. Microbiol. ٤٥: ٢٨٥–٢٩٣.

Horodniceanu, T.; Bouanchaud , D. and Biet, G. (١٩٨١). Conjugative transfer of multiple- antibiotic resistance markers in beta-hemolytic group A, B, F, and G streptococci in absence of extrachromosomal deoxy ribonucleic acid.Plasmid. ٥: ١٢٧–١٣٧.

Horodniceanu, T.; Bouanchaud , D.; Biet, G. and Chabbert, Y. (١٩٧٦). R plasmids in *Streptococcus agalatiae* (group B). Antimicrob. Agents Chemether. ١٠:٧٩٥–٦٠١.

Horodniceanu, T.; Buu – hoi, A.; Le Bouguenec, C. and Biet, G. (١٩٨٢). Narrow host range of some streptococaceae R plasmids. Plasmid. ٨: ١٩٩–٢٠٦

Huang, T. T.; Malke, H. and Ferretti, J. J. (١٩٨٩). Heterogeneity of the streptokinase gene in group A streptococci. Infect.Immun.٥٧:٥٠٢–٥٠٦.

Huang, T. T.; Malke, H. and Ferretti, J. J. (١٩٨٩). The streptokinase gene of group A streptococci: cloning, expression in *Escherichia coli*, and sequence analysis. Mol. Microbiol. ٣:١٩٧–٢٠٥. (Medline)

Inamine, J. A. and Burdett,V. (١٩٨٥). Structural organization of a ٦٧- kilo base streptococcal conjugative element mediating multiple antibiotic resistance. J. Bacteriol. ١٦١: ٦٢٠–٦٢٦.

Jassir, A.; Tannas, A.; Noorani, A.; Mirsalehian, A.; Efstratiou, A. and Schalen, C.(٢٠٠٠). High rate of tetracycline resistance of *S. pyogenes* in Iran an epidemiological study. J. Clin. Microb. ٣٨: ٢١٠٣–٢١٠٧.

Johnsen, L. B.; Poulsen, K.; Kilian, M. and Petesen, T. E. (١٩٩٩). Purification and Cloning of a Streptokinase from *Streptococcus uberi*. Infect. Immun. ٦٧: ١٠٧٢–١٠٧٨.

Johnson , D. R.; Stevens, D. L. and Kaplan E. L. (١٩٩٢). Epidemiologic analysis of group A streptococcal serotypes associated with severe systemic infections , rheumatic fever , or uncomplicated pharyngitis. J. Infect. Dis. ١٦٦**:** ٣٧٤–٣٨٢ . (Abstract)

Kapur, V.; Nelson, K; Schlievert, P. M.; Selander, R. K.and Musser, J. M. (١٩٩٢). Molecular population genetic evidence of horizontal spread of two alleles of the pyrogenic exotoxin C gene (*spe C*). among pathogenic clones of *S. pyogenes.* Infect. Immun. ٦٠: ٣٥١٣–٣٥١٧.

Kapur, V.; Topouzis, S.; Majesky, M. W.; Li, L.-L.; Hamrick, M. R.; Hamill, R. J.; Patti, J. M. and Musser, J. (١٩٩٣). A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cyteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. Microb. Pathog. ١٥: ٣٢٧–٣٤٦.

Kataja, J.; Seppala, H.; Skurink, M.; Sarkkinen, H. and Huovinen, P. (١٩٩٨). Different erythromycin resistance mechanisms in group C and

group G streptococci . Antimicrob. Agents Chemother.١٤٢:١٤٩٣–١٤٩٤

Kataja, J.; Huovinen, P.; The macrolide resistance study group and Seppala , H. (٢٠٠٠). Erythromycin resistance genes in group A streptococci of different geographical origins. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٦: ٧٨٩–٧٩٢.

Kataja, J.; Huovinen, P.; Skurink, M.; the finish study group for antimicrobial resistance and Seppala , H . (١٩٩٩). Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland . Antimicrob. Agents Chemother. ٤٣: ٤٨–٤٢.

Kehoe, M. A.; Miller, L.; Walker, J. A. and Boulnois, G. J. (١٩٨٧). Nucleotide sequence of the streptolysin O (SLO). gene: structural homologies between SLO and other membrane – damaging, thiol activated toxins. Infect. Immun. ٥٥:٣٢٢٨– ٣٢٣٢

Kihlberg, B.; Cooney, J.; Caparon, M. G.; Olsen, A. and Bjorck, L. (١٩٩٥). Biological properties of mutant generated by Tn ٩١٧ insertion in *mga.* Microbiol. Pathol. ١٩: ٢٩٩–٣١٥.

Korman, T. M.; Boers, A.;Gooding T. M.; Curtis, N. and Visvanathan, K. (٢٠٠٤). Fetal case of toxic shock like syndrome due to group C *Streptococcus* associated with superantigen exotoxin. J. Clin. Microb. ٤٢: ٢٨٦٦–٢٨٦٩.

Krah, E. R. and Macarina, F. L. (١٩٨٩). Genetic analysis of the conjugal transfer determinats encoded by the board – host range plasmid pIP٥٠١.J. Bacteriol. ١٧١: ٦٠٠٥–٦٠١٢.

Kreikemeyer, B.; Boyle, M. D.; Leonard Buttaro; B. A.; Heinemann, M. and Podbielski, A. (٢٠٠١). Group A streptococcal growth phase – associated virulence factor regulation by noval operon (Fas). with

homologies to two component – type regulators requires a small DNA molecule. Mol. Microbiol. ٣٩: ٣٩٢–٤٠٦. (Medline)

Kroll, J. S.; Zamze, S.; Loynds, B. and Moxon E. R. (١٩٨٩). Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysacchrides in *Haemophilus influenzae*. J. Bacteriol. ١٧٦: ٣٣٤٣–٣٣٤٧.

Kuo, C.; Tsai, P.; Kao, F.; Lei, H.; Lin, K. Y. and Lin, Y. S.(١٩٩٩). Streptococcal pyrogenic exotoxin B induces apoptosis and reduced phagocytosis activity in U٩٣٧ cells. Infect. Immun. ٦٧: ١٢٦–١٣٠.

Kuo, C.; Wu, J. J.; Lin, K. Y.; Tsai, P.; Lee, S. C.;. Jin, J. T.; Lei, H. and Lin, Y. S. (١٩٩٨). Role of streptococcal pyrogenic exotoxin B in the mouse model of group A streptococcal infection. Infect. Immun. ٦٦: ٣٩٣١–٣٩٣٥.

Kuramintsu, H. K. and Trapa, V. (١٩٨٩). Genetic exchange between oral streptococci during mixed growth. J. Gen. Microbiol. ١٣٠: ٢٤٩٧ – ٢٥٠٠. (Medline)

Kuusela, P.; Ullberg, M.; Sakela, O. and Kronvall, G. (١٩٩٢). Tissue – type plasmogen activator mediated activation of plasminogen on the surface of group A, C, G streptococci. Infect. Immun. ٦٠: ١٩٦–٢٠١.

Le Black, D. J.; Hawlery, R. T.; Lee, L. N. and Martin, E. J. (١٩٧٨). Conjucal plasmid transfer among oral streptococci. Microbiol. ٧٥: ٣٤٨٤–٣٤٨٧.

Le Bouguenec, C.; De Cespedes, G. and Horaud, T. (١٩٨٨). Molecular analysis of a composite chromosomal conjugative element (Tn ٣٧٠١) of *Streptococcus pyogenes*. J. Bacteriol. ١٧٠: ٣٩٣٠–٣٩٣٦.

Lei, B.; Liu, M.; Voyich, J. M.; Prater, C. I.; Kala, S. V.; De Leo, F. R. and Musser, J. M. (٢٠٠٣). Identification and characterization of Hts A, a

second heme – binding protein made by *Streptococcus pyogenes*. Infect. Immun. ٧١: ٥٩٦٢–٥٩٦٩.

Lei, B.; Smoot, L. M.; Menning, H. M.; Voyich, J. M.; Kala, S. V.; DeLeo, F. R.; Reid, S. D. and Musser, J. M. (٢٠٠٢). Identification and characterization of a novel heme- associated cell surface protein made by *Streptococcus pyogenes*. Infect. Immun. ٧٠: ٤٤٩٤–٤٥٠٠.

Li, Z.; Sledjeski, D. D.; Kreikemeyer, B.; Podbielski, A. and Boyle, M. D. (١٩٩٩). Identification of *pel,* a *Streptococcus pyogenes* that affects both surface and secreted proteins. J. Bacteriol. ١٨١: ٦٠١٩–٦٠٢٧.

Limbago, B.; Penumalli, V.; Weinrick,B. and Scott, J. R. (٢٠٠٠). Role of streptolysin O in a mouse model of invasive group A streptococcal disease. Infect. Immun. ٦٨: ٦٣٨٤–٦٣٩٠.

Lukomski, S.; Burns, E. H.; Wyde , P. R.; Podobielski , A.; Rurangirwa, J.; Moore-Poveda, D. K. and Musser, J. M. (١٩٩٨). Genetic inactivation of an exracellular cystein protease (spe B). expressed by *Streptococcus pyogenes.* Infect. Immun. ٦٦: ٧٧١–٧٧٦.

Lukomski, S.; Sreevatsan, S.; Amberg, C.; Reichardt, W.; Woischnik, M.; Podbielski, A. and Musser, J.M.(١٩٩٧). Inactivation of *S. pyogenes* extracellular cystein protease significally decreases mouse lethality of serotype M٣ and M٤٩ Strains. J. Clin. Invest. ٩٩: ٢٥٧٤–٢٥٨٠.

Lyon, W. R. and Caparon, M. G. (٢٠٠٤). Role for serine protease Htr A (Deg P). of *Streptococcus pyogenes* in the biogenesis of virulence factor spe B and the streptolysin S. Infect. Immun. ٧٢: ١٦١٨–١٦٢٥.

Macfaddin, J. F. (٢٠٠٠). Biochemical tests for identification of medical bacteria."`٣rd edition". The Williams and Wilkins. Baltimor, USA.

Magee, A. D. and Yother, J. (٢٠٠١). Requirement for capsule in colonization by *S. pneumoniae* . Infect. Immun. ٦٩: ٣٧٥٥–٣٧٦١.

Malbruny, B.; Nagai, K. Coquemont, M.; Bozdogan, B. andrasevic, A. T.; Hupkova, H.; Leclercq, R. and Appewlbaum, P. C. (٢٠٠٢). Resistance to macrolides in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* due to ribosomal mutations. J. Antimicrob Chemother. ٤٩: ٩٣٥–٩٣٩.

Malke, H. (١٩٧٤). Genetics of resistance to macrolide antibiotics and lincomycin in natural isolates of *Streptococcus pyogenes* . Mol. Gen. Genet.١٣٥: ٣٤٩–٣٦٧. (Medline)

Malke, H.; Jacob, H. E. and Strol, K.(١٩٧٦). Characterization of the antibiotic resistance of the plasmid ERL١ from *Streptococcus pyogenes* . Mol. Gen. Genet. ١٤٤: ٣٣٣– ٣٣٨. (Medline)

Malke, H.; Reichard, W.; Hartman, M. and Walter, F. (١٩٨١). Genetic study of plasmid associated zonal resistance to lincomycin in *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. ١٩: ٩١–١٠٠.

Mc Iver, K.; Health, A. S. and Scott, J. R. (١٩٩٥). Regulation of virulence by environmental signals in group A streptococci: influence of osmolarity, temperature, gas exchange, and iron limitation on *emm* transcription. Infect. Immun. ٦٣: ٤٥٤٠–٤٥٤٢.

Mc Redmond, J. P.**;** Harriot, P.; Walker, B. and Fitzgerald, D. J. (٢٠٠٠). Streptokinase-induced platelet activation involves anti streptokinase antibodies and cleavage of protease–activated receptor–١. Blood. ٧٩: ١٣٠١–١٣٠٨.

Mihaila – Amrouch, L.; Bouvet, A. and Loubinoux., J. (٢٠٠٤). Clonal spread of emm type ٢٨ isolates of *Streptococcus pyogenes* that are multiresistant to antibiotics. J. Clin. Microbiol. ٤٢: ٣٨٤٤–٣٨٤٦.

Miller, J. H. (١٩٧٢). Episome transfer: direct selection In: " experiments in Molecular Genetics ". Cold Spring Harbour Laboratory. New York. pp : ٨٢ – ٨٧.

Miller, J. D. and Neely, N. M. (٢٠٠٥). Large –scale screen highlights the importance of capsule for virulence in the zoonotic pathogen *Streptococcus iniae*. Infect. Immun. ٧٣: ٩٢١–٩٣٤.

Miniatis, T.; Fritsch, E. and Sambrook, J. (١٩٨٢). Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory. New York.

Molinari, G. and Chhatwal, G. S. (١٩٩٨). Invasive and survival of *Streptococcus pyogenes* in eukaryitic cells correlates with the source of the clinical isolates. J. Infect. Dis. ١٧٧: ١٦٠٠–١٦٠٧.

Morosin, M.; Caton, R.; Loza, E.; De Campo, R.; Almaraz, F. and Baquero, F. (٢٠٠٣). *Streptococcus pyogenes* isolates with characterized macrolide mechanisms in Spain: in vitro activities of telithromycin and cethromycin. J. Antimicrob Chemother. ٥٢: ٥٠–٥٥.

Moses, A.; Wessels, M. R.; Zalcam, K.; Alberiti, S.; Natason, S.; Menes, T. and Hanski, E. (١٩٩٧). Relative contribution of hyaluronic acid capsule and M protein to virulence in a mucoid strain of the group A *Streptococcus.* Infect. Immun. ٦٥: ٦٤–٧١.

Muller–Alouf, H.; Geoffroy, C.; Geslin, P.; Felten, A.; Gunther, F.; Ozegwski, J. H. and Alouf, J. F. (١٩٩٧). Streptococcal pyrogenic exotoxin A , streptolycin O, exoenzymes , serotype and biotype profiles of *Streptococcus pyogenes* isolates from patients with toxic shock syndrome and other sever infections. Zbl. Bakt. ٢٨٦: ٤٢١–٤٣٣.

Murmur, J. (١٩٦١). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. J. Mol. Biol. ٣: ٢٠٨–٢١٨.

Murray, B. E.; Mederski-Samoraj, B.; Foster, S. K.; Brunton, J. and Harford, P. (١٩٨٦). In vitro studies of plasmid-mediated penicillinase from *Streptococcus faecalis* Suggest a Staphylococcal Origin. J. Clin. Invest. ٧٧: ٢٨٩–٢٩٣.

Nassif, X. and Sansonetti, P. J. (١٩٨٧). Bacterial iron uptake synthesis their role in virulence. Bull. Inst. Pasteur. ٨٥: ٣٠٧–٣٢٧.

National Committee for Clinical Laboratory Standers. (١٩٩٧).Performance Stanndards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test- Six Edition: Approved Standrad M٢-A٦. NCCLS, Wayne, PA, USA.

Neeman, R.; Keller, N.; Barzilai, A.; Korenman, Z. and Sela, S. (١٩٩٨). Prevalence of the internalization-associated gene, prtF١, among persisting group A streptococcus strains isolated from asymptomatic carriers. Lancet ٣٥٢:١٩٧٤-١٩٧٧.(Medline)

Nizet, V.; Beall, B.; Bast, D. J.; Datta, V.; Kilburng, L.; Low, D. L. and De Azavedo, J. C. (٢٠٠٠). Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococci . Infect. Immun. ٦٨: ٤٢٤٥– ٤٢٥٤.

Nordstrand, A.; Norgren, M.; Ferretti, J. J. and Holm, S. E. (١٩٩٨). Streptokinase as a mediator of acute post-streptococcal glomerulonephritis in an experimental mouse model. Infect. Immun. ٦٦: ٣١٥–٣٢١.

Nordstrand, A.; McShan, W. M.; Ferretti, J. J.; Holm, S. E. and Norgren, M. (٢٠٠٠). Allele Substitution of the Streptokinase Gene Reduces the Nephritogenic Capacity of Group A Streptococcal Strain NZ١٣١. Infect. Immun. ٦٨: ١٠١٩–١٠٢٥.

Norrby-Teglund, A.; Norgren, M. and Holm, S. E. (١٩٩٤). Similar cytokine induction profiles of a novel streptococcal exotoxin, MF, and pyrogenic exotoxins A and B. Infect. Immun. ٦٢:٣٧٣١ –٣٧٣٨.

Osterlund, A.; Popa, R.; Nikkinla, T.; Sheymius, A. and Engstrand, L. (١٩٩٧). Intracellular reservoir of *Streptococcus pyogenes* in vivo: A possible explanation for recurrent pharyngotonsillitis . Laryngoscope. ١٠٧: ٦٤٠–٦٤٧.

Parrado, J., Conejero-Lara, F., Smith, R.A.G., Marshall, J.M., Ponting, C.P. and Dobson, C.M. (١٩٩٦). The domain organization of streptokinase: nuclear magnetic resonance, circular dichroism, and functional characterization of proteolytic fragments. Protein Sci. ٥: ٦٩٣–٧٠٤.

Patterson, M. J. (٢٠٠٠). Streptococcus General Concepts: In Baron ' s Medical Micobiology (On – line version).

Payne, S. (١٩٨٨). Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae. Crit. Rev. Microbiol. ١٦١: ٨١–١٠٤.

Peak, P. W.; B. A. Pussell, T. E. Karplus, E. H. Riley, and Charlesworth, J. A. (١٩٩١). Post-streptococcal glomerulonephritis: studies on the interaction between nephritis strain-associated protein (NSAP), complement and the glomerulus. APMIS ٩٩: ٤٦٠–٤٦٦. (Medline)

Perry, R. and Clements, S. (١٩٧٩). Siderophoes synthesis in Klebsiella pneumonia and Shigella sonei during iron deficiency. J. Bacteriol. ١٤٠: ١١٢٩–١١٣٢.

Pinkney, M.; Kapur, V.; Smith, J.; Weller, U.; Palmer, M.; Glanville, M.; Messner, M.; Musser, J. M.; Bhakdi, S. and Kehoe, M. A. (١٩٩٥). Different forms of streptolysin O produced *Streptococcus pyogenes* and by *Escherichia coli* expressing recombinant toxin: cleavage by streptococcal cystein protease. Infect. Immun. ٦٣: ٢٧٧٦–٢٧٧٩.

Podbielski, A.;Woischnik, M.; Pohl, B. and Schmidt, K. H. (١٩٩٦). What is the size of the group A streptococcal *vir* regulon? The Mga regulator affects expression of secreted and surface virulence factors. Med. Microbiol. Immunol. ١٨٥: ١٧١–١٨١.

Pospiech, A. and Neuman, A. (١٩٩٥). Preperation and analysis of genomic and plasmid DNA in . " Genomic DNA isolation,T. Kieserv eds. " Johnines center, USA.

Poyart, C.; Pierre, G.; Quesne, B.; Pron, B.; Berche, P. and Trieu- Cuot, P. (١٩٩٧). Emergnce of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: characterization of van B transferable determinant in *Streptococcus bovis*. Antimicrob. Agents Chemother. ٤١: ٢٤–٢٩.

Poyart, C.; Trieu-Cuot, P.; Carlier, C. and Courvalin, P. (١٩٩٠). The integration-excision system of the conjugative transposon Tn ١٥٤٥ is structurally and functionally related to those of lambdoid phages. Mol. Microbiol. ٤: ١٥١٣-١٥٢١.

Priebe, S. and Lacks, S. A. (١٩٨٩). Region of the streptococcal plasmid pMV١٥٨ required for conjugative mobiolization. J . Bacteriol. ١٧١: ٤٧٧٨–٤٧٨٤. (Medlline).

Proft, T.; Arcus, V. L.; Handley, V.; Baker, E. N. and Fraser, J. D. (٢٠٠١). Immunological and biochemical characterization of Streptococcal Pyrogenic Exotoxins I and J (SPE I SPE J). J. Immunology. ١٦٦: ٦٧١١–٦٧١٩.

Proft, T.; Moffatt, S. L.; Berkahn, C. J. and Fraser, J. D.(١٩٩٩). Identification and characterization of novel superantigens from *Streptococcus pyogenes*. J. Exp. Med. ١٨٩: ٨٩–١٠١.

Proft, T.; Webb, P. D.; Handley, V. and Fraser, J. D. (٢٠٠٣). Two novel superantigens found in both group A and C *Streptococcus* .Infect. Immun. ٧١: ١٣٦١–١٣٦٩.

Raeder, R.; Harokopakis, E.; Hollingshead, S. and Boyle, M. D. P. (٢٠٠٠). Absence of SPE B production in virulent large capsular forms of group A streptococcal strain ٦٤. Infect. Immun. ٦٨: ٧٤٤–٧٥١.

Rezcallah, M. S.; Boyle, M. and Sledjeski, D. D. (٢٠٠٤). Mouse skin passage of *Streptococcus pyogenes* in increased streptokinase expression and activity. Microb. ١٥٠: ٣٦٥–٣٧١.

Rice, L. B. (١٩٩٦). Tn٩١٦ Family Conjugative Transposons and Dissemination of Antimicrobial Resistance. J. Antimicrob. Chemother. ٤٢: ١٨٧١–١٨٧٧.

Ringdahl, U.; Svensson, M.; Wistedt, A. C.; Renne, T.; Kellner, R.; Muller – Esterl, W. and Sjobring, U. (١٩٩٨). Molecular co –operation between PAM protein and streptokinase for plasmin acquisition by *Streptococcus pyogenes.* J. Biol. Chem. ٢٧٣: ٦٤٢٤–٦٤٣٠.

Roberts, M. C. (١٩٩٦). Tetracycline resistant determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility and distribution. FEMS Microbiol. Rev. ١٩: ١–٢٤.

Roberts, M. C.; Sutcliffe, J.; Courvalin, P.: Jensen, L. B.; Rood, J. and Seppala, H. (١٩٩٩). Nomenclature for macrolide and macrolide – lincosamide – streptogramin B resistance determinants. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٣: ٢٨٢٣–٢٨٣٠.

Rodriguez, P.; Fuentes, P.; Barro, M.; Alvarez, J. G.; Munoz,E., Collen, D. and Lijnen, R. (١٩٩٥). Structural domains of streptokinase involved in the interaction with plasmimogen. Eur. J. Biochem. ٢٢٩: ٨٣–٩٠.

Rothbard, S. (١٩٤٨). Protective effect of hyaluronidase and type specific anti-M serum on experimental group A streptococcus infections in mice. J. Exp. Med. ٨٨: ٣٢٥–٣٤٢.

Rubens, C. R.; Halft, R. M. and Wessels, M. R. (١٩٩٥). Characterization of the capsular polyssachride genes of group B streptococci . Dev. Biol. Stand. ٨٥: ٢٣٧–٢٤٤.

Sambrook, J.; Friegan, E. and Miniatis, T. (١٩٨٩). Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory. New York.

Savic, D. J. and Ferretti, J. J. (٢٠٠٣). Noval genomic rearrangement that affect of the expression of the *Streptococcus pyogenes* streptolysin O (*slo*). gene. J. Bacteriol. ١٨٥: ١٨٥٧–١٨٦٩.

Savic, D. J.; McShan, W. M. and Ferretti, J. J. (٢٠٠٢). Autonomous expression of the *slo* gene of the bicistronic *nga* – *slo* operon of *Streptococcus pyogenes.* Infect. Immun. ٧٠: ٢٧٣٠–٢٧٣٣.

Schaberg, D. R. and Zervos, M. (١٩٨٦). Intergenic and iterspecies gene exchange in gram – positive cocci. Antimicrob. Agents Chemother. ٣٠: ٨١٧– ٨٢٢.

Schlivert, P. M. and Garry, E. D. (١٩٨٩). Group A streptococcal pyogenic exotoxin (scarlet fever toxin). type A and blastogen A are the same protein. Infect. Immun. ٥٧: ١٨٦٥–١٨٦٧.

Schmidt, K. H.; Gunther, E. and Courtney, H. S.(١٩٩٦). Expression of both M protein and hyaluronic acid capsule by group A streptococci strains result in a high virulence for chicken embryos. Med. Microbiol. Immun. ١٨٤: ١٦٩ – ١٧٣.(Medline).

Schrager, H. M.; Rheinwald, J.G. and Wessels, M. R. (١٩٩٦). Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infections . J. Clin. Invest. ٩٨: ١٩٥٤–١٩٥٨.

Schrager, H. M.; Alberti, S. Cywes, C.; Dougherty, G. J and Wessels, M. R. (١٩٩٨). Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A streptococcus to CD٤٤ on human keratinocytes. J. Clin. Investig. ١٠١: ١٧٠٨–١٧١٦.

Seppala, H.; Skrnik, M.; Sonini, H.; Roberts, M. and Huovinen, P.(١٩٩٨). A noval erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in

Streptococcus pyogenes. Antimicrob. Agents Chemother.٤٢:٢٥٧–٢٦٢.

Seppala, H.; Hanpera, M.; Al – Juhaish, M.; Jarvinen, H.; Jalava, and Huovinen, P. (٢٠٠٣). Antimicrobial susceptibility patterns and macrolide resistance genes of viridance group streptococci from normal flora. Antimicrob. Agents Chemother. ٥٢: ٦٣٦–٦٤٤.

Shanley, T. ; Schrier, D.; Kapur, V.; Keho, M.; Musser, J. M. and Ward, P. (١٩٩٦). Streptrococcal cystein protease arguments lung ingury induced by products of group A streptococci. Infect. Immun. ٦٤:٨٧٧–٨٨٧

Sierg, G.; Cywes, C.; Wessle, M. R. and Ashbaught, C. D.(٢٠٠٣). Cytolytic effects of streptolysin O and streptolysin S enhance the virulence of poorly encapsulated group A streptococci. Infect. Immun.٧١: ٤٤٦–٤٥٥.

Smoot, L. M.; Smoot, J. C.; Graham, M. R.; Sommerville, G. A.; Sturdevant, D. E.; Migiaccio, C. A.; Sylva, G. L. and Musser, J. M. (٢٠٠١). Global differential gene expression in response to growth temperature alteration in group A *Streptococcus*. Proc. Natl. Sci. USA ٩٨: ١٠٤١٦–١٠٤٢١.

Stassen, M.; Muller, C.; Richter, C.; Neudorfl, C.; Hultner, L.; Bhakdi, S.; Walev, I. and Schmitt, E. (٢٠٠٣). The streptococcal exotoxin streptolysin O activates mast cells to produce tumor necrosis factor alpha by p^{٣٨} mitogen – activated protein kinase and protein kinase C – dependent. Infect. Immun. ٧١: ٦١٧١–٦١٧٧.

Steiner, K. and Malke, H. (٢٠٠٢). Dual control of streptokinase and strepyolysin S production by the *cov RS* and *fas CAX* two – component regularors in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Infect. Immun.٧٠: ٣٦٢٧–٣٦٣٦.

Stevens, D. L. and Kaplan E. L. (٢٠٠٠). Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis. Oxford University Press. New York.

Stoolmiller, A. C. and Dorfman, A. (١٩٦٩). The biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus.* J . Bacteriol. ٢٤٤: ٢٣٦–٢٤٦.

Stuart, J. G. and Ferretti, J. J. (١٩٧٨). Genetic analysis of antibiotic resistance in *Streptococcus pyogenes.* J. Bacteriol. ١٣٣: ٨٥٢–٨٥٩.

Stukus, P. E. (١٩٩٧). Investigating microbiology a laboratory manual for general microbiology. Harcout Brace and companes.

Suvorov, A. N. and Ferretti, J. J. (١٩٩٦). Physical and genetic chromosomal map of M type ١ strain of *S. pyogenes*. J. Bacteriol. ١٧٨: ٥٥٤٦–٥٥٤٩.

Svensson, M. D.; Sjobring, U.; Luo, F. and Bessen, D. E.(٢٠٠٢). Roles of the plasminogen activaror streptokinase and the plasminogen–associated M protein in an experimental model for streptococcal impetigo. Microb. ١٤٨: ٣٩٣٣–٣٩٤٥.

Tai, S. S.; Lee, C. J. and Winter, R. E. (١٩٩٣). Hemin utilization is related to virulence of *S. pneumoniae.* Infect. Immun. ٦١: ٥٤٠١–٥٤٠٥.

Tait-Kamradt, A.; Davis, T.; Cronan, M.; Jacobs, M. R.; Appelbaum, P. C. and Sutcliffe, J. (٢٠٠٠). Mutations in ٢٣S and ribosomal protein L٤ account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by microlide passage. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٤: ٢١١٨–٢١٢٥.

Tanaka, M.; Hasegawa, T.; Okamoto, A.; Torii, K. and Ohta, M. (٢٠٠٥). Effect of antibiotics on group A streptococcus exoprotein production analyzed by two dimention gel electrophorasis. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٩: ٨٨ – ٩٦.

Taylor, M. B.and Barkham, T. (٢٠٠٢). Fatal case of pneumonia caused by a nonhemolytic strain of *S. pyogenes*. J. Clin. Microbiol. ٤٠: ٢٣١١–٢٣١٢

Todar, K. (٢٠٠٢). Streptococcus pyogenes: In Todar 's on line Textbook of Bacteriology.

Upton, M.; Tagg, J. ; Wescombe, P. and Jenkinson, H. F. (٢٠٠١). Intra–and interspecies signsling between *S. salivarius* and *S. pyogenes* mediated by SalA and SalA١ lintibiotic peptides. J. Bacteriol. ١٨٣: ٣٩٣١–٣٩٣٨.

Van Embden , J.; Engle, H. and Van Klingern , B. (١٩٧٧). Drug resistance in group D streptococci of clinical and nonclinical origin, prevalence , transferability, and plasmid properties. Antimicrob. Agents Chemother. ١١: ٩٢٥–٩٣٢.

Van der Lelie, D.; Wosten, H. A.; Baron, S.; Oskam, L. and Venema , G. (١٩٩٠). Conjugal mobilization of streptococcal plasmid pMV١٥٨ between strains of *Lactococcus lactis* subsp . *lactis* . J. Bacteriol. ١٧٢: ٤٧–٥٢.

Wakeham, N.; Terzyan, S.; Loy, J. A.; Tang, J. and Zhang, X. C. (٢٠٠٢). Effect of deletion of streptokinase residues ٤٨–٥٩ on plasminogen activation. Protein Engineering. ١٥: ٧٥٣–٧٦١.

Wang, X.; Lin, X.; Loy, J. A.; Tang, J. and Zhang, X.C. (١٩٩٨). Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. Science ٢٨١. ١٦٦٢–١٦٦٥.

Weeks, C. R. and Ferretti, J. J.(١٩٨٤). The gene for type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin). is located in the bacteriophage T١٢. Infect. Immun. ٤٦: ٥٣١–٥٣٦.

Wessels, M. R. and Bronze, M. S. (١٩٩٤). Critical role of group A streptococcal capsule in pharyngeal colonization and infection in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. ٩١: ١٢٢٣٨–١٢٢٤٢.

Wessels, M. R.; Moses, A. E.; Goldberg, J. B. and Diceare, T. G. (١٩٩١). Hyaluronic acid capsule is a virulence factorfor mucoid group A streptococci. Pro. Nalt. Acad. Sci. USA. ٨٨: ٨٣١٧–٨٣٢١.

Wessels, M. R.; Pozsgy, V.; Kasper, D. L. and Jennings, H. J. (١٩٨٧). Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular poly saccharide of type III group B streptococcal poly saccharide antigen. J. Biol. Chem. ٢٦٢: ٨٢٦٢ –٨٢٦٧.

Whealer, M. C.; Roe, M. H.; Kaplan, F. I.; Schlievert, P. M. and Todd, J. K. (١٩٩١). Out break of group A streptococci septicemia in children clinical, epidemiologic, and microbiological correlates. JAMA. ٢٦٦: ٥٣٣–٥٣٧. (Abstract)

Wolf, B. B.; Gibson, C. A.; Kapur, N.; Hussaini, M.; Musser, J. M. and Goias, S. L. (١٩٩٤). Proteolytically active streptococcal pyrogenic exotoxin B cleaves monocytic cell urokinase receptor and releases an active fragment of the receptor from the cell surface. J. Bacteriol. ٢٦٩: ٣٠٦٨٢–٣٠٦٨٧.

Yagi, Y.; Franke, A. E. and Clewell, D. B. (١٩٧٥). Plasmid – mediated resistance to erythromycin comparison of strains of *S. pyogenes* with *S. faecalis* with regard to plasmid homology and resistance inducibly. Antimicrob. Agents Chemother . ٧: ٨٧١–٨٧٣.

Yu, C. E. and Ferretti, J. J. (١٩٩١). Frequency of the erythrogenic toxin B and C genes (*speB* and *speC*). among clinical isolates of group A streptococci. Infect. Immun. ٥٩: ٢١١–٢١٥.

Zaoutis, T.; Schneider, B.; Noore, L. S. and Klein, J. D. (١٩٩٩). Antibiotic susceptibilities of group C and G streptococci isolated from patients with invasive infections: evidence of vancomycin tolerance among group G serotype. J. Clin. Microb. ٣٧: ٣٣٨٠–٣٣٨٣.