دراسة بكتريولوجية ووراثية لاغشية الحيوية على الغدد الطبية

داليا صلاح مهدي عباس

ماجستير/٢٠٠٦/العلوم /الاحياء المجهرية

قائمة المحتويات

فهرس المواضيع

الموضوع	رقم الصفحة
الخلاصة	***I***
قائمة المحتويات	***III***
فهرس المواضيع	III
فهرس الجداول	V
فهرس الأشكال	VI
فهرس الملاحق	VI
المختصرات	VII
الفصل الأول : المقدمة	***١***
١.١ المقدمة	١
الفصل الثاني : استعراض المراجع	***٣***
١.٢ الغشاء الحيوي	٣
٢.٢ لمحة تاريخية عن الغشاء الحيوي	٤
٣.٢ نماذج الغشاء الحيوي	٥
٤.٢ الغشاء الحيوي و العدد الطبية	٦

.....

٢.٥ مراحل تكون الغشاء الحيوي على العدد الطبية ٧
.....

٢.٥.١ الأرتباط ٧
.....

٢.٥.٢ الألتصاق وتكوين المستعمرات المجهرية ٨
.....

٢.٥.٣ انفصال وانتشار خلايا الغشاء ٩
.....

٢.٦ العوامل المساعدة على تكوين ونضج الغشاء الحيوي على العدد الطبية ٩
...

٢.٦.١ خصائص السطح الذي ينشأ عليه الغشاء ٩
.....

٢.٦.٢ وجود الطبقة التكيفية ١٠
.....

٢.٦.٣ القوى المائية ١٠
.....

٢.٦.٤ خصائص الوسط السائل ١٠
.....

٢.٦.٥ خصائص الخلية البكتيرية ١١
.....

٢.٦.٦ تحسس النصاب ١١
.....

٢.٧ الأصابات المرضية الناشئة عن وجود الغشاء الحيوي على العدد الطبية... ١٢

٢.٨ البكتريا الشائعة في تكوين الغشاء الحيوي ١٢
.....

٢.٩ المقاومة البكتيرية لمضادات الحياة ١٤
.....

١.٩.٢ مقاومة مضادات البيتالاكتام ١٥
.....
٢.٩.٢ مقاومة الأمينوكلايكوسيدات ١٦
.....
٣.٩.٢ مقاومة التتراسايكلين ١٧
.....
٤.٩.٢ مقاومة الكلورامفينيكول ١٨
.....
٥.٩.٢ مقاومة مضادات الماكروليد (الأرثرومايسين) ١٩
.....
٦.٩.٢ مقاومة الكوينولونات ٢٠
.....
٧.٩.٢ مقاومة الريفامبسين ٢٠
.....
٨.٩.٢ مقاومة التراي ميثوبرم ٢٠
.....
١٠.٢ تأثير المطهرات على البكتريا ٢١
.....
١.١٠.٢ آليات عمل المطهر ٢٢
.....
٢.١٠.٢ حساسية البكتريا للمطهرات ٢٢
.....
٣.١٠.٢ أهم أنواع المطهرات ٢٤
.....
١.٣.١٠.٢ الفينول والمركبات الفينولية ٢٤
.....
٢.٣.١٠.٢ الكحول ٢٥
.....
٣.٣.١٠.٢ الهالوجينات ٢٥

....
٢.١٠.٣.٤ مركبات الأمونيا الرباعية ٢٦
....
٢.١٠.٤ تقدير كفاءة المطهرات ٢٦
....
٢.١١ المحتوى الوراثي ٢٧
....
٢.١٢ تحييد البلازميدات ٢٨
....
٢.١٣ العلاجات المقترحة ٢٨
....
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل ٣٠
٣.١ المواد ٣٠
....
٣.١.١ الأجهزة و الأدوات ٣٠
....
٣.١.٢ المواد الكيميائية ٣١
....
٣.١.٣ الأوساط الزرعية ٣٢
....
٣.١.٤ مضادات الحياة ٣٢
....
٣.١.٥ المطهرات ٣٣
....
٣.١.٦ السلالة البكتيرية القياسية المستخدمة ٣٤
....
٣.١.٧ المحاليل والدواريء والكواشف ٣٤
....
٣.١.٨ الأوساط الزرعية ٤٠

....
٣.١.٨.١ الأوساط الزرعية الجاهزة ٤٠
٣.١.٨.٢ الأوساط الزرعية المحضرة ٤١
٣.٢ طرائق العمل ٤٤
٣.٢.١ جمع العينات ٤٤
٣.٢.٢ التشخيص ٤٤
٣.٢.٢.١ الخصائص المظهرية ٤٤
٣.٢.٢.٢ الفحوصات الكيموحيوية ٤٤
٣.٢.٣ حفظ وادامة العزلات ٤٧
٣.٢.٤ اختبار الحساسية الدوائية لمضادات الحياة ٤٨
٣.٢.٥ تقدير كفاءة المطهرات ٤٨
٣.٢.٦ استخلاص وتنقية ال DNA ٤٩
٣.٢.٧ الترحيل الكهربائي الهلامي ٥٠
٣.٢.٨ تحييد البلازميدات ٥١
الفصل الرابع : النتائج والمناقشة ٥٢
٤.١ العزل والتشخيص ٥٢

.....

١.١.٤ أنواع وأعداد البكتريا المكونة للأغشية الحيوية على العدد الطبية ٥٥
.....

٢.٤ اختبار حساسية البكتريا لمضادات الحياة ٦١
.....

٣.٤ تقدير كفاءة المطهرات ٦٩
.....

٤.٤ المحتوى البلازميدي ٧٢
.....

٥.٤ تحييد البلازميدات ٧٦
.....

الأستنتاجات و التوصيات ***٧٩***

المصادر ***٨١***

الخلاصة باللغة الأنكليزية ***i***

فهرس الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
٣-١	مساحيق مضادات الحياة	٣٢
٣-٢	أقراص مضادات الحياة	٣٣
٣-٣	أنواع المطهرات المختبرة، تراكيزها، والشركات المصنعة لها.....	٣٣
٣-٤	السلالة البكتيرية ، تركيبها الوراثي، ومصدرها	٣٤
٤-١	الأعداد الكلية والنسب المئوية للعدد الطبية الحاوية على الأغشية الحيوية.....	٥٢
٤-٢	الأختبارات الكيموحيوية للعزلات الموجبة لصبغة غرام	٥٣
٤-٣	الأختبارات الكيموحيوية للعزلات السالبة لصبغة غرام	٥٤
٤-٤	العلاقة بين مدة بقاء العدة داخل الجسم وتكوين الأغشية الحيوية عليها	٥٧
٤-٥	حساسية البكتريا المعزولة من الأغشية الحيوية لمضادات الحياة شائعة الأستعمال	٦٥
٤-٦	النسب المئوية لمقاومة البكتريا المعزولة من الأغشية الحيوية لمضادات الحياة	٦٨
٤-٧	التراكيز القاتلة وقيم معامل الفينول للمطهرات المستعملة في مستشفى الحلة التعليمي العام لبكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* ...	٧٢
٤-٨	العزلات البكتيرية المختارة لدراسة نسقها البلازميدي	٧٣
٤-٩	تأثير مادة SDS في تحييد البلازميدات من العزله *S. typhimurium* (ST٥٤) والعزله (SE٢٠) *S. epidermidis*	٧٧

فهرس الأشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
٤-١	النسب المئوية للعزلات السالبة والموجبة لصبغة غرام المعزولة من الأغشية الحيوية للعدد الطبية	٥٦
٤-٢	توزيع النسب المئوية للعزلات السالبة لصبغة غرام المعزولة من الأغشية الحيوية للعدد الطبية	٥٦
٤-٣	توزيع النسب المئوية للعزلات الموجبة لصبغة غرام المعزولة من الأغشية الحيوية للعدد الطبية	٥٧
٤-٤	النسب المئوية للعزلات البكتيرية المتحركة وغير المتحركة المعزولة من الأغشية الحيوية للعدد الطبية	٦٠
٤-٥	النسق البلازميدي لبعض عزلات البكتريا السالبة لصبغة غرام المكونه للأغشيه الحيويه على العدد الطبيه.....	٧٤
٤-٦	النسق البلازميدي لبعض عزلات بكتريا العنقوديات المكونه للأغشيه الحيويه على العدد الطبيه.....	٧٥
٤-٧	المحتوى الوراثي للعزلتين البكتيريتين *S.typhimurium* ST٥٤ و *S.epidermidis* SE٢٠ بعد التحييد بمادة SDS	٧٨

فهرس الملاحق

رقم الملحق	العنوان	رقم الصفحة
١	مضادات الحياة شائعة الاستعمال ورموزها ونسب التحميل القياسية للاقـــــــراص واقطـــــــار التثبـــــــيط (NCCLS,١٩٩٨)	١٠٨

المختصرات

EPS……Exopolymeric substances

SEM…….. Scanning electron microscope

CLSM…….. Confocal laser scanning microscope

ABC……. ATP-binding cassette

Crc……. Catabolite repression control protein

$CBSI_s$……. Catheter-related blood stream infections

PIA…….. Polysaccharide intracellular adhesion protein

Bap…… Biofilm associated protein

PBPs…….. Penicillin binding protein

arm……..Aminoglygoside resistance methylase

CAT…… Chloramphenicol acetyl transferase

erm……Erythromycin ribosome methylation

DHFR……Dihydrofolate reductase

SDS……..Sodium dodecyl sulphate

NCCLS.....National Committee for Clinical Laboratory Standards

FDA……..Food and drug administration

MIC……..Minimum inhibitary concentration

MBC……..Minimum bactericidal concentration

TE buffer…….Tris-EDTA buffer

T.B.E. buffer…….....Tris-Boric acid-EDTA buffer

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ هو الله الخالق البارئ المصور له الأسماء الحسنى

يسبح له ما في السموات والأرض وهو العزيز الحكيم ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة الحشر، الآية (٢٤)

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين ، والصلاة والسلام على أشرف الخلق أجمعين أبي القاسم محمد خاتم الأنبياء والمرسلين وآله الطيبين الطاهرين وأصحابه الغر الميامين . . .

يشرفني أن أتقدم بجزيل الشكر ووافر الإمتنان الى الأستاذ المساعد الدكتور حسن فاضل ناجي لإقتراحه موضوع الرسالة وإشرافه على العمل والكتابة وإمدادي بكل ما يخص البحث من معلومات قيمة ودعم معنوي ، أمده الله بالصحة والعافية ووفقه لإرتقاء الدرجات العلمية العلى .

كما يطيب لي أن أتقدم بالشكر والإمتنان إلى كل من رئاسة جامعة بابل ، عمادة كلية العلوم ، ورئاسة قسم علوم الحياة من تدريسين و منتسبين وعلى رأسهم الأستاذ الدكتور كريم حميد رشيد ، وعرفانا بالجميل أشكر الأستاذ الدكتور إبراهيم محمد سعيد شناوة لإتاحته لي فرصة إجراء البحث في مختبر الأحياء المجهرية المتقدم ، والأستاذ المساعد الدكتورة رباب عمران راضي لرفدها إياي بالمعلومات القيمة ومتابعتها الدؤوبة للجزء الوراثي من البحث وتوفيرها الوسائل اللازمة لإجراء هذا الجزء .

كما يزيدني شرفا أن أتقدم بعظيم امتناني وتقديري الى الست رواء هادي / أمينة مجلس كلية العلوم لمؤازرتي وإعانتي في مشواري وتذليلها لي الصعاب ، وفقها الباري وسدد خطاها ومكنها من نيل أعلى المراتب .

كما أتقدم بوافر الشكر والتقدير الى شعبة المختبرات / قسم الأحياء المجهرية في مستشفى الحلة التعليمي العام وأخص بالذكر كلاً من البكتريولوجية إيمان و م . بكتريولوجي نريد ، كما أشكر الكادر الطبي من أطباء وممرضين في هذه المستشفى لتعاونهم الجاد في انجاز البحث .

كما يسعدني أن أقدم خالص شكري وتقديري الى كل من د . ميساء السعيد ، د . سناء الكفيشي ،

د . ياسمين وليد طاهر ، وطالبة الماجستير فرح جاسم لتقديمهم يد العون في جمع العينات ، تمنياتي لهم بدوام الموفقية . ولأن كلمات الشكر تقف عاجزة ، فإني أتضرع الى الباري بالدعاء الى الشمعتين اللتين احترقتا لأجلي وأنارتا بضيائهما طريقي – والديّ الكريمين – بموفور الصحة والعافية وأن يديهما ذخراً لي ، والى من ساندوني وشدوا من أزري وأحاطوني بمحبتهم ورعايتهم ، أخوتي نريد ، دريد ورواء متمنية لهم كل التوفيق والنجاح في حياتهم .

كما يسرني أن أقدم جزيل الشكر والإمتنان إلى جميع طلبة الدراسات العليا الذين ساعدوني وخاصة زميلي السيد نهاد كاظم والزميلة إسراء عدنان ، وفقهم الله لما فيه الخير والصلاح ومكنهم من نيل أعلى المراتب العلمية .

ويسعدني أن أقدم باقة ورد معطرة بأريج الحب الى رفيقات دربي و أخواتي أوفى ، حلا ، رويدا ، وسها لمساندتي معنويا وحثي على تقديم الأفضل ، أدامهم الله ذخرا لي ووفقهم لتحقيق ما يطمحون له .

ختاما ، أقدم خالص شكري إلى الآنسه إيفان والسيد عدي جاسم لتعاونهما في إتمام طباعة هذه الرسالة ، جزاهما الله خير الجزاء وأنار لهما طريق العلم والمعرفة ، وإلى منتسبي المكتبة المركزية وخصوصا قسم الأطاريح الجامعية كونهم خير معين لي في مشواري الطويل ، زادهم الله من نعمائه وجزيل إحسانه .

الخلاصة

جمعت ١٣٠ عينة من العدد الطبية (القثاطر، العدد داخل رحمية، عدد تثبيت الكسور، والمصارف بأنواعها) المستخدمه في علاج المرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى الحلة التعليمي العام في محافظة بابل خلال المدة من كانون الأول- ٢٠٠٤ الى نيسان- ٢٠٠٥ .

احتوت ٤٦ عينة على الأغشية الحيوية البكتيرية اذ عزلت منها ٥٦ عزلة بكتيرية شخصت اعتمادا على صفاتها الزرعية والمجهرية والكيموحيوية ، وكانت العزلات السالبة لصبغة غرام هي السائدة (٨٠.٤%) على العزلات الموجبة لصبغة غرام (١٩.٦%) وشكلت بكتريا *Escherichia coli* أكثر النسب بين العزلات الكلية (٢٥%). أما نسب العزلات السالبة لصبغة غرام فقد بلغت ١٧.٩ % لبكتريا *Klebsiella pneumoniae*، ١٢.٥% لبكتريا *Enterobacter cloacae*، ٨.٩% لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*، ٧.١% لبكتريا *Salmonella typhimurium*، ٥.٤% لبكتريا *Proteus mirabilis*، و ٣.٦ % لبكتريا *Shigella dysenteriae* بينما كانت بكتريا *Staphylococcus epidermidis* هي الأكثر تواجدا (١٢.٥%) من بين العزلات الموجبة لصبغة غرام مقارنة ببكتريا *S. aureus* (٧.١%). كما وجد أن البكتريا المتحركة هي السائدة في تكوين الأغشية الحيوية اذ بلغت نسبتها ٥٨.٩% على غير المتحركة (٤١.١%) .

اختبرت مقاومة تلك العزلات لبعض مضادات الحياة شائعة الإستعمال اذ كانت أعلى نسبة مقاومة للأمبسيلين (٩٦.٣٦%) في حين أقل نسبة كانت للأميكاسين (٢١.٨%) .

لدى تقدير معامل الفينول للمطهرات المستخدمة في مستشفى الحلة التعليمي العام باستخدام عزلتين بكتيريتين احدهما تعود لبكتريا *S. aureus* والأخرى لبكتريا *P. aeruginosa* وجد أن اعلى قيمة كانت لمطهر اليود (٦٥٠)، بينما اقل قيمة كانت لمطهر الايثانول (٠.٧ للعزلة الأولى و٠.٠٠٧ للعزلة الثانية).

كما تم انتخاب عزلة واحدة من كل جنس بكتيري من العزلات قيد الدراسة لدراسة نسقها البلازميدي ، وأظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص احتواء العزلات السالبة لصبغة غرام على حزمة بلازميدية واحدة صغيرة ذات حجوم جزيئية مختلفة ، في حين اشتركت العزلات الموجبة لصبغة غرام بوجود حزمتين بلازميديتين صغيرتين متساويتين بالحجم الجزيئي ، كما أظهرت تجارب تحييد البلازميدات بأستخدام مادة SDS في العزلتين *S. typhimurium* ST٥٤ و *S. epidermidis*

SE٢٠ ان التركيز الأمثل لهذه المادة قد تباين في العزلتين اذ بلغ ٢٥ و ٧٥ ملغم / مل على التوالي . كما أظهرت النتائج احتواء العزلة ST٥٤ *S. typhimurium* على بلازميدين ، يشفر الأول لمقاومة كل من الأمبسيلين ، التتراسايكلين و الأرثرومايسين ، في حين يشفر الثاني لمقاومة كل من الكلورامفينيكول ، التراي ميثوبريم والجنتامايسين . اما العزلة الثانية SE٢٠ *S. epidermidis* فانها تمتلك بلازميدين ، الأول يشفر لمقاومة كل من التتراسايكلين ، الأرثرومايسين و الكلورامفينيكول ، بينما يشفر الثاني لمقاومة كل من الأمبسيلين ، التراي ميثوبريم والجنتامايسين .

Summary

١٣٠ samples of medical devices (catheters, intrauterine devices, fracture fixation devices, and different types of drains) were collected from out and in patients of Al-Hilla General Educational Hospital of Babylon Governorate through the period of December - ٢٠٠٤ to April - ٢٠٠٥ .

٤٦ samples were contained bacterial biofilms and ٥٦ bacterial isolates were isolated from these samples. These isolates were diagnosed depending on their morphological and biochemical tests . It was noted that the Gram negative isolates were predominant (٨٠.٤%) on the Gram positive isolates (١٩.٦%), *Escherichia coli* was prevalence on all isolates (٢٥%) while the ratio of other Gram negative isolates were ١٧.٩% for *Klebsiella pneumoniae*, ١٢.٥% for *Enterobacter cloacae*, ٨.٩% for *Pseudomonas aeruginosa*, ٧.١% for *Salmonella typhimurium*, ٥.٤٪ for *Proteus mirabilis* and ٣.٦% for *Shigella dysenteriae*. The *Staphylococcus epidermidis* was represented the prevalence bacteria (١٢.٥%) of Gram positive isolates in comparison with *S. aureus* (٧.١%). On the other hand, it was found that the motile bacteria were the predominant biofilm formation bacteria (٥٨.٩%) on the non-motile bacteria (٤١.١%) .

. The antibiotics sensitivity of the isolated bacteria were tested against some predominant medical antibiotics , It was showed that the highest resistant ratio was to ampicillin (٩٦.٣٦%) while the lowest resistant ratio was to amikacin (٢١.٨%).

The phenol coefficient of disinfectants that used in Al-Hilla General Educational Hospital using two bacterial isolates (*S.aureus* and *P.aeruginosa*) was estimated . It was noted that the highest value was ١٥٠ for iodine, while the lowest value was to ethanol (first isolate ٠.٧ and second isolate ٠.٠٠٧) .

One isolate from every bacterial genous was chosen to study their plasmid profile , and the results of gel electrophoresis of extracted DNA showed that all Gram negative isolates contained one small plasmid band with different molecular volume, while the Gram positive isolates were contained two small plasmid bands with the same molecular volume.

The plasmid curing experiments of *S. typhimurium* ST٥٤ and *S. epidermidis* SE٣٠ by using SDS were showed that the optimum concentration of SDS differed in these two isolates : ٢٥ mg/ml for the first and ٧٥ mg/ml for the second . Beside that , the results of these experiments showed that *S. typhimurium* ST٥٤ was contained two plasmids , the first plasmid encoded for resistance to ampicillin , tetracycline and erythromycin while the second plasmid encoded for resistance to chloramphenicol , trimethoprim and gentamicin . The other isolate *S. epidermidis* SE٣٠ was also contained two plasmids but the first one encoded for resistance to tetracycline , erythromycin and chloramphenicol and the other one encoded for resistance to ampicillin , trimethoprim and gentamicin .

١.١ المقدمة Introduction

يمثل الغشاء الحيوي (Biofilm) مجتمعاً مايكروبياً ارتبطت خلاياه بسطح رطب، وغلفت بصورة أساسية بقالب من مواد بوليميرية خارج خلوية [Exopolymeric substances(EPS)] منتجة من تلك الخلايا التي تظهر طرازا مظهريا مغايرا للخلايا عندما تكون حرة من ناحية نسبة النمو والتعبير الجيني (Donlan & Costerton , ٢٠٠٢). يتكون الغشاء من طبقة واحدة مستمرة، أو من عدة طبقات ذو تركيب ثلاثي الأبعاد، أو قد يتخذ شكل العرهون (Chmielewski & Frank , ٢٠٠٣).

يعزى تكونه على العدد الطبية الى ارتباط الكائنات المجهرية بسطوح تلك العدد، وقد يكون مصدر هذه الكائنات داخليا من النبيت الطبيعي لجسم المريض، أو البكتريا الملوثة أصلا لمنطقة وجود العدة، أو قد يكون مصدرها خارجيا من جلد المريض، الكادر الطبي، أو البيئة المحيطة بسبب عدم كفاءة المطهر المستخدم نتيجة تخفيفه عشوائيا، بالإضافة الى احتمالية انخفاض الحساسية البكتيرية للمطهرات لإمتلاكها آليات مقاومة ضدها(Donlan, ٢٠٠١) .

يتكون الغشاء الحيوي على العدد الطبية بعدة مراحل، أولها الإرتباط البكتيري بسطح العدة، ثم الإلتصاق وتكوين المستعمرات المجهرية، وآخرها انفصال وانتشار خلايا الغشاء. ويتم ذلك بمساعدة جملة من العوامل كخصائص السطح الناشيء عليه الغشاء، وجود الطبقة التكيفية، القوى المائية، خصائص الوسط السائل، خصائص الخلية البكتيرية، وتحسس النصاب (Quorum sensing) (Donlan , ٢٠٠٢).

يسبب وجود الغشاء على العدد الطبية الداخلة في جسم الإنسان عدد من الإصابات المرضية، منها التليف الحوصلي (Cystic fibrosis)، التهاب شغاف القلب الداخلي (Endocarditis)، التهاب الأذن الوسطى (Otitis media)، التهاب البروستات (Prostatitis)، التهاب ما حول السن (Periodontitis) ، التهاب المجاري البولية المرتبط بالقثطار(Catheter- related urinary tract infection) ، التهاب المجرى الدموي المرتبط بالقثطار(Catheter-related blood stream infection) وغيرها (Donlan & Costerton, ٢٠٠٢).

تعد البكتريا السالبة لصبغة غرام ولاسيما بكتريا العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) المكون الرئيس لتلك الأغشية لإمتلاكها العديد من العوامل التي تمكنها من تكوين الأغشية، مثل احتوائها على وسائل الحركة وانتاجها للسيليلوز إذ يلعبان دورا مهما في التصاق الخلايا بالسطوح غير الحية والتفاعلات بين الخلايا (Solano *et al.*, ٢٠٠٢).

تتميز البكتريا المكونة للغشاء الحيوي بمقاومتها العاليه لمضادات الحياة وجهاز المضيف المناعي نتيجة لطبيعة تركيب الغشاء، والخصائص الفسلجية للكائنات المكونة له، اضافة الى إمتلاكها جينات مقاومة قد تكون محمولة بلازميديا أو كروموسوميا (Ryder , ٢٠٠٥).

ولتجنب تكون الأغشية على العدد الطبية، فقد اقترحت مجموعة من الحلول كإستخدام تقنية التعقيم خلال الغرس، استخدام مضادات الحياة الحديثة، تقليل مدة بقاء العدة في الجسم، استخدام مرشح داخل العدة، انشاء حاجز ميكانيكي لمنع دفق الكائنات، وتغليف التجويف الداخلي للعدة بعامل مضاد للميكروبات (Maki , ١٩٩٤).

ولأن تكون الأغشية الحيوية على العدد الطبية يسبب مشاكل جمة تؤدي الى تفاقم الحالة الصحية للمريض , لذا هدفت هذه الدراسة الى معرفة النسق البلازميدي للعزلات المكونة للأغشية الحيوية وعلاقته بالمقاومة , اذ تضمنت خطة البحث المحاور الآتيه :

١. عزل وتشخيص البكتريا المكونة للأغشية الحيوية على العدد الطبية.

٢. دراسة مقاومتها لمضادات الحياة الشائعة طبيا في حالتها الحرة وعند تكوينها للغشاء.

٣. تقدير كفاءة المطهرات المستخدمة في المستشفيات بطريقة معامل الفينول.

٤. دراسة النسق البلازميدي لتلك العزلات وتحديد مواقع جينات مقاومة بعض مضادات الحياة لعزلتين بكتيريتين منها باستخدام تقنية تحييد البلازميدات.

١.٢ الغشاء الحيوي Biofilm

عرف الغشاء الحيوي على أنه مجتمعات معقدة من الكائنات المجهرية التصقت بسطوح داخليه أو بينيه ، وتتكون غالبا من نوع واحد أو عدة أنواع بكتيرية تتداخل مع بعضها ومع البيئة التي تعيش فيها (O'Toole *et al.*, ٢٠٠٠; Davey *et al.*,٢٠٠٠).

أما Diebel (٢٠٠٠) فتصفه بأنه خليط من الكائنات المجهرية مع مواد مغذية إضافة إلى مواد بوليميرية خارج خلوية منتجة من تلك الكائنات .

يتكون الغشاء الحيوي بصورة رئيسة من كائنات مجهريه متحركة وغير متحركة مطمورة في مواد بوليميرية خارج خلوية (Costerton,١٩٩٩; Chmielewski and Frank,٢٠٠٣) . تحتوي هذه المواد على سكريات متعددة ,بروتينات ,دهون مفسفرة ,حامض التيكويك وأحماض نووية, إضافة إلى مواد بوليميرية أخرى مذابة في محتوى مائي عال (٨٥-٩٥ %) (Sutherland,١٩٨٣).

ومن الممكن أن يحتوي قالب الغشاء المتكون خارج الجسم الحي على مواد لا خلوية مثل جزيئات المعادن , الدقائق الطينية أو الغرينية وغيرها اعتمادا على البيئة التي يتكون فيها الغشاء (Donlan,٢٠٠٢).

للغشاء الحيوي مستوى عال من التنظيم يتجلى بإمكانية تواجده بهيئة مجتمعات أحادية النوع البكتيري أو متعددة الأنواع, كما قد يتكون من طبقة واحدة أو بهيئة تركيب ثلاثي الأبعاد شبيه بالعرهون , تتخلله قنوات مائية تسيطر على التبادل الغذائي والغازي فيه ، كما قد يحتوي على فراغات بينية كبيرة بين المستعمرات المجهرية المكونة له (Bryers *et al.*,١٩٨٧; Bagge *et al.*, ٢٠٠١;).

إن تكون الغشاء الحيوي مرهون بتوفر الظروف البيئية الملائمة لتكونها كوجود سطح رطب صلب, مغذيات كافية, ومحتوى مائي عال (Espinosa-Urgel, ٢٠٠٣)، كما إن الكائنات المجهرية المكونة للغشاء الحيوي تخضع لتغييرات عميقة خلال انتقالها من حالتها الحرة الطافية (Planktonic cells) إلى أجزاء من المستعمرات المكونة للأغشية, وهذه التغييرات تنعكس على الخصائص المظهرية الجديدة لها واستجابتها للعوامل البيئية المحيطة بها (O'Toole *et al.*,٢٠٠٠).

تتواجد الاغشية الحيوية على أنواع مختلفة من السطوح متضمنة الأنسجة الحية, العدد الطبية, مينا الأسنان, السطوح الداخلية لأنابيب توزيع المياه, وأسطح الصخور المحاذية لمجاري الأنهار (Donlan,٢٠٠٢). إن أفضل مثال على الغشاء الحيوي هو الغشاء الموجود في السبيل المعدي–المعوي اذ تتواجد أعداد هائلة وأنواع عديدة من البكتريا مستعمرة السطح الداخلي للطبقة المخاطية المعوية, حيث يعمل كطبقة واقية تثبط التصاق الأنواع البكتيرية الممرضة على ذلك السطح (Deibel,٢٠٠٠; Netting,٢٠٠١).

٢.٢ لمحة تاريخية عن الغشاء الحيوي Historical perspective of biofilm

في نهاية القرن السابع عشر,لاحظ Anton Van Leeuwenhoek تجمعاً من الكائنات المجهرية عندما فحص الطبقة المتكونة على سطوح الأسنان (البلاك) تحت مجهره الضوئي البسيط ,وكانت تلك بداية اكتشاف الغشاء الحيوي (Netting ,٢٠٠١;Donlan,٢٠٠٢;Donlan &Costerton,٢٠٠٢).

وفي عام ١٩٤٣ درس Zobel الغشاء الحيوي المتكون على الأسطح المحيطة بمياه البحر, اذ لاحظ انجذاب البكتريا المائية للارتباط بالسطوح, وإن أعداد البكتريا الملتصقة بالسطوح كانت أكثر من تلك الحرة الطافية في محيط ماء البحر(Pulcini,٢٠٠١).

تبع ذلك دراسة Jones وجماعته عام ١٩٦٩ لمرشحات التقطير الموجودة في حاويات معالجة مياه الصرف الصحي, اذ لاحظ وجود أعداد وأنواع كثيرة من الكائنات المجهرية فيها مكونة للغشاء الحيوي. كما تمكن من معرفة إن السكريات المتعددة هي المادة المكونة للقالب التركيبي المغلف للخلايا البكتيرية في ذلك الغشاء من خلال تصبيغها بصبغة احمر الروثينيوم (Ruthenium Red) الخاصة بتصبيغ السكريات المتعددة وربطها بالمثبت Osmium Tetroxide (Donlan,٢٠٠٢).

وفي أوائل عام ١٩٧٣ درس Characklis الأغشية المخاطية الميكروبية في أنظمة المياه الصناعية ولاحظ إن هذه الأغشية بالإضافة لكونها متماسكة فهي تتميز بمقاومتها العالية للمعقمات مثل الكلورين (Donlan ,٢٠٠٢).

كما وضع Costerton وزملاؤه في عام ١٩٧٨ أربع نظريات عن تكون الأغشية الحيوية تشرح آلية التصاق الكائنات المجهرية بمواد حية وغير حية, من خلال دراسته للغشاء الحيوي المتكون على سطوح الأسنان (Donlan & Costerton ,٢٠٠٢).

أمـــا فـــي العقـــدين الماضـــيين فقـــد أصـــبح المجهـــر الإلكترونـــي الماســـح [Scanning Electron Microscope (SEM)] وتقنيات الزرع الميكروبي القياسية هما الوسيلتين الأكثر اعتمادا لتشخيص الأغشية الحيوية (Donlan ,٢٠٠٢).

ومن الجدير بالذكر, إن دراسة الغشاء الحيوي في المدة الأخيرة تركزت على جانبين رئيسيين, همـــا : معرفـــة تكـــوين الغشـــاء باســـتخدام المجهـــر الماســـح الليـــزري متحـــد البـــؤر [Confocal Laser Scanning Microscope(CLSM)] , واكتشاف الجينات المسؤولة عن التصاق البكتريا بالسطوح وتكوين الغشاء الحيوي (Donlan,٢٠٠٢).

٣.٢ نماذج الغشاء الحيوي Biofilm Models

من ناحية المحتوى الميكروبي, هناك نموذجان رئيسيان للغشاء الحيوي:

I. الغشاء الحيوي ذو المزرعة النقية (Pure culture biofilm) الذي يكون شائعا على العدد الطبية التي لها علاقة بالأمراض الالتهابية.

II. الغشـاء الحيـوي ذو المزرعـة المختلطـة(Mixed culture biofilm) الـذي يتواجـد فـي البيئـة (Donlan, ٢٠٠٢).

يتكون النوع الأول من مستعمرات مجهريه أحادية النوع البكتيري, أما النوع الثاني فيتألف من مستعمرات مجهرية متعددة الأنواع, اعتمادا على الظروف البيئية التي يتكون فيها الغشاء ,كخصائص السطح الخارجي والبيني, وفرة المغذيات, مكونات المجتمع الميكروبي, والديناميكية المائية (Davey & O'Toole , ٢٠٠٠).

أما من ناحية الشكل الخارجي, فهناك ثلاث نظريات اتفق عليها اغلب العلماء لتفسير شكل وتركيب الغشاء الحيوي:

i. نظرية الغشاء الحيوي أحادي الطبقة (The monolayer biofilm theory): تعد أول نظرية وضعت لتفسير تركيب الغشاء الحيوي, وتفترض كون هذا الغشاء مستمرا بشكل طبقة واحدة, أملس, مسطح, ومتجانس.
ii. نظريـة الغشـاء الحيـوي ثلاثـي الأبعـاد – متعـدد الطبقـات (The multilayer -٣dimension structure biofilm theory) : تشير هذه النظرية إلى أن الغشاء يكون متعدد الطبقات ثلاثي الأبعاد بشكل طبقة مستمرة غير متجانسة التركيب.
iii. نظرية الجريان (The current theory): وضعت هذه النظرية بالإعتماد على نتائج CLSM, إذ وصف الغشاء الحيوي على انه يتخذ شكل العرهون ويحتوي على قنوات مائية تعمل بمثابة جهاز دوران يقوم بنقل المغذيات والغازات. وتفترض هذه النظرية إن هذا الشكل يعود لكون الخلايا المحيطية نشطة النمو بحكم قربها من القنوات المائية, أما الخلايا القاعية فتكون بطيئة النمو. (Sutherland ,٢٠٠١; Zottola ,٢٠٠١; Donlan ,٢٠٠٢ ; Chmielewski & Frank , ٢٠٠٣) .

٤.٢ الغشاء الحيوي والعدد الطبية Biofilm and medical devices

يتكون الغشاء الحيوي على العدد الطبية الداخلة في جسم الانسان نتيجة ارتباط البكتريا على أسطح تلك العدد، ومصدر هذه البكتريا إما خارجي (جلد المريض، الكادر الطبي، أو البيئة المحيطة بالمريض) أو داخلي (النبيت الطبيعي لجسم المريض، أو دخول العدة الى منطقة ملوثة اصلاً بالبكتريا كمنطقة مصابة بالتهاب بكتيري). ان تلك البكتريا قد تكون سالبة او موجبة لصبغة غرام او كليهما، واكثر العزلات المكونة للغشاء شيوعاً هي بكتريا العائلة المعوية (Enterobacteriaceae)، بكتريا *P. aeruginosa*، وبكتريا المكورات العنقودية (Staphylococci) (Donlan, ٢٠٠١; Donlan & Costerton, ٢٠٠٢; Ryder, ٢٠٠٥). قد تتألف البكتريا المكونة للغشاء من نوع بكتيري واحد او عدة انواع، اعتماداً على نوع العدة الطبية ومدة بقائها في الجسم، فعلى سبيل المثال، يتألف الغشاء الحيوي المتكون على القثطارالبولي من نوع بكتيري واحد اساساً، الا ان بقاء القثطار الطويل في الجسم يؤدي الى تكون غشاء متعدد الانواع البكتيرية (Stickler, ١٩٩٦).

وبصورة عامة، هناك نوعان رئيسيان من العدد الطبية اعتماداً على مدة بقائها في الجسم:

a) عدد قصيرة الأمد (اقل من ١٠ ايام): تكون النسبة الاكبر من الغشاء الحيوي على سطحها الخارجي.
b) عدد طويلة الامد (٣٠ يوم): تكون النسبة الاكبر من الغشاء الحيوي على التجويف الداخلي للعدة (Raad *et al.*, ١٩٩٣).

من هذه العدد: القثاطر البولية(Urinary catheters)، الأنابيب المعدية-الانفية (Nasogastric tubes)، القثاطر الوريدية المركزية [Central venous catheters(Cannula)]، الأنابيب الصدرية (Chest tubes)، عدة تثبيت الكسر (البلاتين) (Fracture fixation device)، مصارف القيح (Pus drains)، مصارف الغرزة (Stich drains)، والعدد داخل رحمية (اللوالب) (Intrauterine devices) ، أما تركيبها فقد يكون من مواد بلاستيكية (البولي اثيلين) أو من السيليكون أو اللاتكس (Donlan & Costerton , ٢٠٠٢) .

يتميز الغشاء الحيوي المتكون على تلك العدد بكونه متماسك وعالي المقاومة لمضادات الحياة، فقد وجدت الباحثة Anwar وجماعتها (١٩٩٢) ان المعاملة بمستويات من مضاد التوبرامايسين (Tobramycin) اعلى بكثير من تركيزه المثبط الادنى قد خفض العدد الحي لخلايا بكتريا *P. aeruginosa* المكونة للغشاء الحيوي بحدود دورتين لوغارتيميتين من النمو، بينما خفضت نفس هذه الجرعة العدد الحي لخلايا هذه البكتريا الحرة غير المكونة للغشاء بمقدار ثماني دورات. وتعزى اسباب هذه المقاومة الى عدد من الآليات هي:

١. تحديد نسبة دخول جزيئات مضادات الحياة ، جزيئات المتمم ، والبلاعم الكبيرة الى الغشاء لكونه يمثل حاجزا انتشاريا (Donlan and Costerton,٢٠٠٢; Stewart,٢٠٠٢; Ryder,٢٠٠٥) .
٢. تحديد انتشار المغذيات والأوكسجين في الغشاء مما يولد بيئة لاهوائية لخلايا الطبقات العميقة ويجعلها بطيئة أو عديمة النمو وبالتالي يكون أخذها بطيئا لمضادات الحياة عند دخولها الغشاء (Donlan and Costerton,٢٠٠٢;Gilbert *et al.*,٢٠٠٢; Ryder,٢٠٠٥) .

٣. حدوث التغيرات البيئية في الحرارة ، الأس الهيدروجيني ، والأوزموزية التي تؤدي الى تقليل أخذ المضاد من قبل خلايا الغشاء (Dagostino *et al.*,١٩٩١;Tresse *et al.*,١٩٩٥) .

٤. انتقال بلازميدات مقاومة مضادات الحياة بين خلايا الغشاء نتيجة التلامس بينها (Stewart,٢٠٠٢; Parsek and Singh,٢٠٠٣) .

٥. وجود كثافة سكانية عالية من الخلايا الدائمية (Persister cells) التي هي عبارة عن خلايا متغايرة في الطراز المظهري عن الطراز البري ، تتواجد في طبقات الغشاء الحيوي العليا وتتميز بتحملها الدوائي المتعدد فهي لاتنمو ولاتموت بوجود المضادات بل تبقى كامنة لحين توقف اعطاء المضادات اذ تبدأ بتكوين خلايا جديدة بدل الخلايا التي أبيدت ، وتنشيء الغشاء من جديد (Stewart and Costerton,٢٠٠١; Keren *et al.*,٢٠٠٤) .

٥.٢ مراحل تكون الغشاء الحيوي على العدد الطبية

Stages of biofilm formation on medical devices

إن تكون الغشاء الحيوي يتم بعدد من الخطوات المتسلسلة التي تختلف جزيئياً من كائن لاخر لكنها متشابهة في المراحل الاساسية لمدى واسع من الكائنات المجهرية. تتضمن هذه الخطوات:

١.٥.٢الارتباط Attachment

يحدث الارتباط البكتيري عند التلامس المباشر للبكتريا مع سطح العدة مما يؤدي الى تغيير الطراز المظهري للكائن المجهري، اذ يبدأ بانتاج بروتين الالتصاق اللزج (Adhesin) الذي يربط الخلية بالسطح (Ryder, ٢٠٠٥). ان التلامس الأولي يكون عند ادخال العدة خلال طبقات الجلد الحاوية على النبيت الطبيعي، اذ ان ٢٠% منها تتمكن من البقاء على سطح العدة وتكوين الاغشية الحيوية (Hendley & Ashe, ١٩٩١; Costerton *et al.*, ٢٠٠٣).

حال دخول العدة الى الجسم، فإن بروتينات بلازما الدم ترتبط بسرعة مع سطح العدة، يتبعها في الدقائق القليلة تحفيز سلسلة التجلط (Coagulation cascade) ونظام المتمم (Complement system) ، اذ تنجذب الصفيحات الدموية وكريات الدم البيض متعددة الانوية للعدة باعتبارها جسماً غريباً، وبذلك تؤلف هذه المكونات المتجمعة على سطح العدة " الطبقة التكيفية" (Conditioning layer) التي تحيط العدة بغلاف ليفي (Ryder, ٢٠٠٥). تزيد هذه الطبقة من قابلية البكتريا على الارتباط بالسطح كما ثبت في عدد من الدراسات اذ يحدث ارتباط بين مستقبلات الخلايا البكتيرية وهذه المكونات (Bryers, ١٩٨٧; Deibel, ٢٠٠٠)..

ان تأثير بروتينات الدم لوحدها او مكونات الدم بأكملها يعتمد على السلالة البكتيرية، فعلى سبيل المثال ان الدم بأكمله يحفز تكوين غشاء بكتريا *P. aeruginosa* الحيوي، بينما بروتينات البلازما مثل مولد الليفين (Fibrinogen) والفايبرونكتين (Fibronectin) يحسن ارتباط بكتريا *S. aureus*، لكنها تثبط التصاق كل من بكتريا *S. epidermidis* والبكترياالسالبة لصبغة غرام (Sinha *et al.*, ١٩٩٩; Williams *et al.*, ٢٠٠٢; Ryder, ٢٠٠٥).

٢.٥.٢ الالتصاق وتكوين المستعمرات المجهرية Adhesion and Microcolony formation

في هذه الخطوة، يحصل تقدم ملحوظ في تغيير الطراز المظهري للبكتريا، فخلال بضعة ثوان تنتج البكتريا بروتينات اخرى متخصصة بالنوع البكتيري (فضلا عن بروتين الالتصاق) تثبت الخلايا البكتيرية بالسطح لاعكسياً (Vandecasteele *et al.*, ٢٠٠٣; Ryder, ٢٠٠٥).

وفي غضون اقل من ١٢ دقيقة، تقوم جينات الخلايا البكتيرية الملتصقة بانتاج البروتينات المتجمعة والسكريات المتعددة الخارج خلوية التي تربط الخلايا بقوة بالمادة الاساس وببعضها البعض، كما توجه الانقسام الثنائي الاسي. وبينما تستمر الخلايا بالانقسام تنتشر الخلايا البنوية فوق نقطة الارتباط وحولها لتكون عناقيد خلوية (Ryder, ٢٠٠٥).

ان السكريات المتعددة الخارج خلوية او المادة اللزجة (Slime) تغمر الخلايا المتجمعة لتكون مستعمرات مجهرية، اذ تتألف هذه المستعمرات من ١٠-٢٥% من الخلايا البكتيرية و٧٥-٩٠% من قالب الـ EPS (Costerton *et al.*, ٢٠٠٣) . ان انتاج الـ EPS يحدث استجابة لارتباط الخلايا بالسطح ولحوافز بيئية مثل الضغط الاوزموزي، الاس الهيدروجيني، ونقص المغذيات (Donlan, ٢٠٠٢).

تزداد الكثافة الخلوية للغشاء لتصل الى حالة ثابتة خلال مدة تتراوح من اسبوع الى اسبوعين اعتماداً على الانواع البكتيرية والظروف البيئية العامة، ثم يتطور النمو المتزايد الى تركيب معقد من التجمعات الخلوية الذي قد يكون بهيئة طبقة واحدة مستمرة من الخلايا، او ذا تركيب ثلاثي الابعاد مكون من عدة طبقات من الخلايا، او ذا شكل شبيه بالعرهون (O'Toole *et al.*, ٢٠٠٠; Davey & O'Toole, ٢٠٠٠; Ryder, ٢٠٠٥) . اضافة الى كون سمك الغشاء متغاير (١٣-٦٠ ملم) وسطحه الخارجي غير مستو. ان التنظيم التركيبي للغشاء يتأثر بإشارات تنظيمية شبيهة بالهرمونات تطلقها خلايا الغشاء نفسها تفاعلاً مع ظروف النمو (تحسس النصاب) (Pulcini, ٢٠٠١).

٣.٥.٢ انفصال وانتشار خلايا الغشاء Detachment & Dissemination of Biofilm cells

لأجل استعمار اسطح جديدة، ولمنع نقص المغذيات المتسببة من زيادة الكثافة الخلوية ضمن الغشاء الناضج، فإن خلايا الغشاء يجب ان تنفصل عنه وتنتشر، يحصل الانفصال عندما تتحرر الخلايا البنوية من البكتريا النامية بصورة فعالة في المناطق العليا من المستعمرات المجهرية، حيث ان زيادة الكثافة الخلوية تحث تبادل الاشارات بين خلية واخرى (تحسس النصاب) لتوجيه التحلل الكيميائي للـ EPS، مما يؤدي الى انفصال كتل من الغشاء وانتشارها في المحيط (Donlan, ٢٠٠٢; Ryder, ٢٠٠٥).

ان كتل الغشاء المنفصلة ربما تحتوي على آلاف الخلايا البكتيرية التي تتحرر من طبقة الخلايا الملتصقة بالسطح، لكنها قد تكون اغشية حيوية جديدة على اسطح اخرى (Costerton *et al.*, ٢٠٠٣; Fux *et al.*, ٢٠٠٤). كما ان هذه الخلايا المنفصلة قد تسبب التهابات عديدة اعتماداً على جهاز المضيف المناعي، ومن جهة اخرى يمكن السيطرة على هذه الخلايا باستخدام المضادات الحيوية، و/أو دفاعات جهاز المضيف المناعي (Ryder, ٢٠٠٥).

اضافة لما ذكر، هناك فرضيات عديدة تفسر سبب انفصال خلايا الغشاء، منها تكون بيئة لاهوائية داخل الغشاء الناضج والمتثخن، فعندما تزداد كمية الغاز غير المذاب والحامض فإنها تضعف تركيب الغشاء وتؤدي الى انسلاخ طبقات البوليمر من السطح الداعم (Bryers, ١٩٨٧).

كما ان انسلاخ او انفصال طبقات الغشاء قد يحصل عندما يكون هناك تذبذب في كمية المغذيات او تغير في نسبة الكربون (Kim & Frank, ١٩٩٥). الى جانب ذلك، تساعد قوة الاندفاق ايضاً في الانفصال، فعندما تتغلب قوة اندفاق السائل المار بالعدة على قوة توتر لزوجة الغشاء، تتكسر قطع او شظف من الغشاء خاصة ذو الشكل الشبيه بالعرهون (Wimpenny *et al.*, ٢٠٠٠).

٦.٢ العوامل المساعدة على تكوين ونضج الغشاء الحيوي على العدد الطبية

The assistance factors for the formation and maturation of biofilm on medical devices

١.٦.٢ خصائص السطح الذي ينشأ عليه الغشاء Characteristics of the substratum

ان لذلك السطح عدة خصائص مهمة تؤثر على عملية ارتباط البكتريا به. فقد لاحظ Characklis وجماعته (١٩٩٠) ان نسبة استعمار الكائنات المجهرية لسطح ما تزداد بزيادة خشونته لان قوى الاجهاد تقل والمساحة السطحية للسطح الخشن تكون اكبر. كما ان للخصائص الفيزيوكيميائية لذلك السطح تأثيراً كبيراً على نسبة الارتباط، حيث وجد الباحثون ان الكائنات المجهرية تلتصق بشكل اسرع بالسطوح غير القطبية الكارهة للماء مثل التفلون (Teflon)، والمواد البلاستيكية مقارنة بالمواد المحبة للماء مثل الزجاج والمعادن (Bendinger *et al.*, ١٩٩٣).

٢.٦.٢ وجود الطبقة التكيفية The presence of conditioning layer

ان وجود هذه الطبقة يؤثر على نسبة التصاق البكتريا بالسطوح، اذ اثبتت عدد من الدراسات ان الارتباط البكتيري يحدث بشكل افضل على السطوح المكيفة مسبقاً (Deibel, ٢٠٠٠; Donlan, ٢٠٠٢).

٣.٦.٢ القوى المائية Hydrodynamics

تسلك الخلايا البكتيرية كدقائق في سائل، وان نسبة ارتباطها بسطح نصف مغمور تعتمد بصورة كبيرة على خصائص سرعة ذلك السائل، وسمك الطبقة المائية المجاورة لذلك السطح. فعندما تكون السرعة الخطية لجريان السائل واطئة جداً، فإن سمك الطبقة المائية المجاورة يكون كبيراً او ضخماً مما يعيق ارتباط الخلايا بسهولة، وعندها سيعتمد هذا الارتباط على حجم الخلية وحركتها بشكل كبير. اما

عندما تزداد السرعة فإن سمك تلك الطبقة يتناقص مما يسهل ارتباط الخلايا بالسطح بشكل اسرع، الى ان تصبح تلك السرع عالية بشكل كاف لتسليط قوى على الخلايا الملتصقة تؤدي الى انفصالها (Rjinaarts *et al*., ١٩٩٣; Zheng *et al*., ١٩٩٤).

٤.٦.٢ خصائص الوسط السائل Characteristics of the aqueous medium

تلعب خصائص الوسط السائل دوراً مهماً في التصاق الخلايا البكتيرية بالسطوح،مثل الاس الهيدروجيني، مستويات المادة المغذية، القوة الايونية، ودرجة الحرارة (Donlan, ٢٠٠٢). إذ إن الاس الهيدروجيني لوسط النمو، والمغذيات يؤثران على شحنة سطح الخلية البكتيرية، فقد وجد ان احتواء وسط النمو على الكلوكوز وحامض اللبنيك يقللان السالبية الكهربائية للجدار الخلوي لبكتيريا *Listeria monocytogenes* من خلال معادلة شحنة السطح وإنتاج بروتينات مقاومة للحامضية (Brocklehurst *et al*., ١٩٨٧). كما أظهرت دراسة Crown وجماعته (١٩٩١) ان زيادة تركيز المادة المغذية له علاقة بزيادة عدد الخلايا البكتيرية الملتصقة. اضافة لذلك، فإن الزيادة في تركيز بعض الأيونات موجبة الشحنة (Fe, La, Ca, Na) تؤثر في التصاق بكتريا *Pseudomonas fluorescens* بالسطوح الزجاجية عن طريق تقليل قوى التنافر بين الخلايا البكتيرية والسطوح الزجاجية. كما ان النمو في درجات حرارة عالية له علاقة بزيادة قدرة الارتباط البكتيري، وقد يعزى ذلك الى انتاج بروتينات مقاومة للحرارة مرتبطة بسطح الخلية (Smoot & Pierson, ١٩٩٨).

٥.٦.٢ خصائص الخلية البكتيرية The properties of the bacterial cell

ان عدم ألفة سطح الخلية للماء، امتلاكها وسائل حركة ، وانتاج الـ EPS من العوامل المؤثرة على نسبة ومدى ارتباط الخلايا البكتيرية بالسطح (Rosenberg & Kjelleberg, ١٩٨٦).

كما أن إنتاج البكتريا للبروتينات من العوامل المساعدة للالتصاق، اذ اظهرت عدة دراسات ان معاملة الخلايا المرتبطة بالانزيمات المحللة للبروتين سبب تحرر ملحوظ لتلك الخلايا من السطح والتي منها بروتين adhesin المنتج من قبل البكتريا (Bashan & Levanony, ١٩٨٨; Chmielewski & Frank, ٢٠٠٣).

٦.٦.٢ تحسس النصاب Quorum sensising

ان تحسس النصاب هو نظام تحاور بين الخلايا البكتيرية يتكون من ثلاثة أركان رئيسة هي الاشارات المكونة من مركبات كيميائية تدعى المحفزات الذاتية (Auto inducers) التي تفرز عند حصول تغييرات في كثافة المجتمع البكتيري أما الى البيئة الخارجية أو تبقى مرتبطة بالخلية ، وأنظمة التعرف على تلك الإشارات ، والجينات المشفرة لإنتاج الإشارات وأنظمة التعرف (Bassler,١٩٩٩;Donlan, ٢٠٠٢;Visick and Fuqua,٢٠٠٥) .

يختلف نظام التحاور في البكتريا السالبة لصبغة غرام عن الموجبة لصبغة غرام ، ففي الأولى تتكون المحفزات الذاتية من Acylated homoserine lactone اذ تشفر من قبل الجين *luxI* ، ويتم التعرف عليها من قبل بروتين منشط استنساخي مشفر من قبل الجين *luxR* (Visick and Fuqua,٢٠٠٥) . أما في البكتريا الموجبة لصبغة غرام ، تمثل جزيئات الأشارة ببتيدية (Peptide signaling molecules) المحفزات الذاتية عبر بروتين ناقل يدعى ATP-binding cassette] [(ABC) ويتم التعرف عليه من قبل بروتينين متحسسين ينتجان من أصل واحد (Kleerebezem *et al.*,١٩٩٧; Novick and Muir,١٩٩٩) .

يتحكم تحسس النصاب بعدد كبير من الفعاليات الحيوية البكتيرية منها العلاقات التعايشية مع الكائنات متعددة الخلايا ، تعبير النواتج الخارجية وبضمنها عوامل الضراوة ، حركة البكتريا ،والبدء في الطور التمهيدي لنمو وتكوين المجتمعات البكتيرية المكونة للغشاء الحيوي (Bassler,١٩٩٩; Lazazzera,٢٠٠٠;Visick and Fuqua,٢٠٠٥) .

٧.٢ الاصابات المرضية الناشئة عن وجود الغشاء الحيوي على العدد الطبية Infectiuos diseases caused by biofilm on medical devices

ان ارتباط الكائنات المجهرية بسطوح العدد الطبية يؤدي الى تكوين اغشية حيوية والتي تؤدي في بعض الاحيان الى حدوث الاصابات المرضية (Ryder, ٢٠٠٥)، اذ وجد ان هذه الاغشية تكون مسؤولة عن ٦٥% من الاصابات المنتشرة في العالم النامي (Costerton *et al.*, ١٩٩٩). تتميز هذه الاصابات بمقاومتها العالية لمضادات الحياة ولدفاعات الجسم، وتتمركز في ثلاثة مواقع رئيسة تمثل مداخل العدد الطبية العلاجية وهي: المجرى البولي، المجرى التنفسي، ومجرى الدم (Donlan & Costerton, ٢٠٠٢; Ryder, ٢٠٠٥). فقد وجد ان ٩٥% من المرضى المستخدمين للقثطار البولي أصيبوا بالتهابات المجرى البولي ، و٨٦% من المرضى المستخدمين للأنبوب الصدري اصيبوا بأمراض ذات الرئة ، و٨٧% من المرضى المستخدمين للقثطار الوريدي المركزي أصيبوا بالتهابات مجرى الدم الذي يعد من اكثر الانواع تهديداً للحياة (Ryder, ٢٠٠٥).

٨.٢ البكتريا الشائعة في تكوين الغشاء الحيوي Common biofilm forming bacteria

تعد بكتريا العائلة المعوية من أكثر البكتريا تكويناً للغشاء الحيوي على العدد الطبية داخل جسم الإنسان وبالتالي إحداث الإصابات المرضية المرتبطة بالغشاء مثل التهاب البروستات ، والتهاب

المجاري البولية المرتبط بالقثطار (Bouza *et al.*, ٢٠٠١). تمتلك هذه البكتريا العديد من العوامل التي تمكنها من تكوين الغشاء الحيوي مثل احتوائها على الاهداب المتموجة (Curli fimbriae) المشفرة من قبل الجينات *csgD* و*csgA* التي تتواجد ضمن اوبرون (*csg BAC*)، كما في بكتريا *E. coli*، *S. typhimurium*، *K. pneumoniae*، و *Enterobacter spp*. (Bian *et al.*, ٢٠٠٠; Uhlich *et al.*, ٢٠٠١; Zogaj *et al.*, ٢٠٠٣).

كما يعد انتاج السليلوز من العوامل الاخرى المساعدة على تكوين الغشاء الحيوي، الذي يشفر بواسطة الجين *bcsA* المتواجد ضمن اوبرون *bcsABZC*، كما في بكتريا *Salmonella spp*، *E. coli*، *K. pneumoniae*، واغلب عزلات *Enterobacter spp*. (Solano *et al.*, ٢٠٠٢; Zogaj *et al.*, ٢٠٠٣).

من العوامل الاخرى المساعدة على تكوين الغشاء الحيوي، امتلاكها عوامل الاستعمار/الالتصاق (Adherence/colonization factors)، كما هو الحال في بكتريا *E. coli* الحاوية على P pili tip fibrillum papE protein signature، و P pili tip fibrillum papFprotein signature وغير ذلك. كذلك بكتريا *Salmonella spp* التي تحتوي على Flagellium signature وFlagellar protein FigJ signature وغيرها (Zogaj *et al.*, ٢٠٠٣). في دراسة Pancer وجماعته (٢٠٠٥) للتحري عن عوامل الالتصاق في بكتريا *E. cloacae* المعزولة من احدى مستشفيات بولندا ودورها في تكوين الغشاء الحيوي، فقد وجد انها تحتوي على ثلاثة انماط للالتصاق: التجمعي (Aggegative)، الموضعي (Localized)، والالتصاق المنتشر (Diffuse adhesion)، وجميعها لها دور مهم في تكوين الغشاء.

الى جانب ذلك، قد تمتلك البكتريا مستضداً سطحياً هو (Ag٤٣) الذي هو بروتين سطحي يساعد على تجمع الخلايا مع بعضها، يشفر من قبل الجين *flu* ويتواجد في بكتريا *E. coli* او يحسن قابليتها على تكوين الغشاء الحيوي (Kjaergaard *et al.*, ٢٠٠٠; Schembri *et al.*, ٢٠٠٣; Klemm *et al.*, ٢٠٠٤).

كما تمتاز بكتريا *P. aeruginosa* بتكوينها الغشاء الحيوي الذي يشبه العرهون (Mushroom-like biofilm) على العدد الطبية داخل جسم الانسان مسببة العديد من الامراض مثل التليف الحوصلي (Cystis fibrosis)، ويساعد في تكوين الغشاء امتلاكها جملة من العوامل منها Type IV pilus الذي يتوسط الحركة الارتعاشية (Twitching motility) والمشفر من الجينين *pilB* و*pilA*، حيث تساهم هذه الحركة في تجمع او تكتل الخلايا البكتيرية مع بعضها للبدء بتكوين الغشاء الحيوي (O'Toole & Kolter, ١٩٩٨;O'Toole *et al.*, ٢٠٠٠; Tolker-Nielsen *et al.*, ٢٠٠٠).

اضافة الى دور بروتين سيطرة كبح التقويض [Catabolite repression control protein (Crc)] الذي ينظم ايضاً الكربون في تكوين الغشاء الحيوي من قبل بكتريا *P. aeruginosa* كما انها تمتلك اهداباً من نوع N-methyl-phenylalanine pili تساعدها على الالتصاق بالسطوح (O'Toole *et al.*, ٢٠٠٠).

ومن الجدير بالذكر، ان السكر المتعدد الخارج خلوي المخاطي (Mucoid exopolysacchaide) والذي هو بوليمر متكرر من حامضي المانورونيك والكلوكورونيك يصطلح عليه Alginate، المنتج من قبل السلالات المخاطية (Mucoid strains)العائدة لهذه البكتريا، يعد المكون الاساسي لقالب غشاء *Pseudomonas* الحيوي (Davies & Geesey, ١٩٩٥).

كما تكون بكتريا المكورات العنقودية الاغشية الحيوية على العدد الطبية مسببة العديد من الاصابات المرضية مثل التهاب المجرى الدموي المرتبط بالقثطار يتوسط ذلك عدد من العوامل مثل انتاجها بروتين الالتصاق الداخل خلوي متعدد سكريد [Polysaccharide intracellular adhesion protein (PIA)] المشفر من قبل الجين *icaADBC* كما في بكتريا *S. epidermidis* (Foster & McDevitt, ١٩٩٤; Ziebuhr *et al*., ١٩٩٧; Gerke *et al*., ١٩٩٨; Rohde *et al*., ٢٠٠١).

ان امتلاك البكتريا لبروتين سطحي ممكن ان يتوسط في الارتباط بين الخلايا البكتيرية والطبقة التكيفية المكونة من بروتينات جسم المضيف على سطح العدة، فقد وجد Cucarella وجماعته (٢٠٠١) ان هذا البروتين يوجد على سطح خلايا بكتريا *S. aureus* وقد يتوسط ارتباطها ببروتينات المضيف، اضافة لدوره في تجمع الخلايا خلال مراحل تكوين الغشاء ويدعى Biofilm associated protein (Bap) مشفر من قبل الجين *bap*.

اضافة الى ذلك، تمتلك بكتريا *S. epidermidis* بروتينات سطحية تتدخل في تكوين الغشاء الحيوي منها AtlE autolysin, SSP_2, SSP_1، حيث تساعد على ارتباط البكتريا الاولي بسطح العدة (Veenstra *et al*., ١٩٩٦; Heilmann *et al*., ١٩٩٧).

ومن العوامل الاخرى المؤثرة في تكوين الغشاء الحيوي على العدد الطبية من قبل بكتريا المكورات العنقودية هو انتاجها للهلام (Slime) المتكون من سكريات متعددة والتي تشكل بالمقابل جزءاً من قالب الغشاء(Foster & McDevitt, ١٩٩٤) .

٩.٢المقاومة البكتيرية لمضادات الحياة Bacterial resistance to antibiotics

ان مقاومة البكتريا لمضادات الحياة قد تكون وراثية الاصل مكتسبة والتي تكون اما كروموسومية نتيجة حدوث طفرات تلقائية او غير تلقائية في الجينات المسؤولة عن حساسية البكتريا لمضاد ما والمحمولة على الكروموسوم، او قد تكون خارج كروموسومية (بلازميدية) نتيجة انتقال بلازميدات حاوية على جينات المقاومة تلك الى البكتريا. كما قد تكون تلك المقاومة وراثية الاصل طبيعية نتيجة امتلاك البكتريا اصلاً جينات مقاومة محمولة كروموسومياً او بلازميدياً فيها. اضافة لذلك قد تعزى هذه المقاومة الى وجود او انتقال عناصر قافزة (Transposons) حاملة لصفة مقاومة المضادات من بلازميد الى كروموسوم او بالعكس من بكتريا لاخرى.

كما ان المقاومة قد تكون غير وراثية الاصل بسبب فقدان موقع هدف المضاد او عدم نفاذية الغشاء الخلوي البكتيري للمضاد (Kim & Park, ١٩٩٨).

وبصورة عامة، تحصل المقاومة البكتيرية لمضادات الحياة بعدد من الآليات منها وجود انزيم مثبط للمضاد، وجود انزيم بديل للأنزيم الأصلي الذي يثبطه المضاد، حدوث طفرة في موقع هدف المضاد، تحوير موقع هدف المضاد، تقليل أخذ المضاد من قبل الخلية البكتيرية، وأمتلاك آلية الدفق الفعال (Active efflux system) الطارحة للمضاد خارجا(Fluit *et al.*,٢٠٠١)

١.٩.٢ مقاومة مضادات البيتالاكتام Resistance to Beta-Lactam antibiotics

يعد انتاج انزيمات البيتالاكتاميز (β-lactamases) هو الآلية الاساسية لمقاومة هذه المضادات (Fluit *et al.*, ٢٠٠١; Valverde *et al.*, ٢٠٠٤) وتدعى الجينات المشفرة لهذه الانزيمات *bla* genes وقد تكون محمولة بلازميديا او كروموسوميا (Poirel *et al.*, ١٩٩٩; Marchandin *et. al.*, ٢٠٠٠; Fluit *et al.*, ٢٠٠١) .

تتواجد أنواع عديدة من هذه الأنزيمات منها نوع VEB-١ الذي تنتجه بكتريا *E.coli* وبكتريا *K. pneumoniae*، والمشفر من قبل الجين *bla VEB-١* المحمول على بلازميد حجمه الجزيئي ١٠٠ كيلو قاعدة (Poirel *et al.*, ١٩٩٩).

كذلك نوع TEM المنتج من بكتريا *K. pneumoniae* وتكون الجينات المشفرة لهذا النوع محمولة بلازميديا (Bermudes *et al.*, ١٩٩٩) كما وجد ان نفس البكتريا احتوت على نوعين اخرين من هذه الانزيمات هما VIM-١ و SHV-٥ باستخدام تقنية التفاعل التسلسلي لأنزيم بلمرة DNA (PCR) يشفران بواسطة جينين محمولين على بلازميدين مختلفين، في عدة سلالات معزولة من احدى مستشفيات فرنسا وهي مشابهة لسلالات عزلت في اليونان ايضاً (Kassis-Chikhani *et al.*, ٢٠٠٦).

أشار Bret وجماعته (١٩٩٨) و Yagi وجماعته (٢٠٠٥) الى وجود صنف اخر من اصناف انزيمات البيتالاكتاميز هو Amp-C-type β-lactamase تنتجه بكتريا العائلة المعوية والجين المشفر له يدعى *amp-C-type β-lactamase* الذي قد يحمل كروموسوميا كما في بكتريا *E. cloacae* و *P. mirabilis* ، أو قد يحمل بلازميديا كما في بكتريا *E.coli* و *K. pneumoniae* على نفس البلازميد الحامل للجينات المشفرة لانزيمات بيتا لاكتاميز نوع TEM و SHV في البكتريا الأخيرة (Martinze *et al.*, ١٩٩٩) . كما وجد هذا النوع من الانزيمات في بكتريا *P. aeruginosa* عزلت من مرضى راقدين في احدى مستشفيات كولومبيا (Villegas *et al.*, ٢٠٠٦) .

اضافة لذلك يوجد صنف آخر شبيه بالأنزيم السابق (AmpC-like β-lactamase) يدعى CMY-١٦ يشفر له الجين *CMY-١٦* المحمول كروموسوميا والمعزول من بكتريا *P. mirabilis* (D'Andrea *et al.*,٢٠٠٦) . بالأضافة الى نوع آخر هو CTX-١ مسؤول عن مقاومة مضاد السيفوتاكسم اذ يعمل على تحلله مائيا (Chanal *et al.*,١٩٩٦) ،اضافة لمقاومته من قبل انزيم بيتالاكتام نوع TEM (Sougakoff *et al.*, ١٩٨٨). هناك مجموعة اخرى هي انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo-β-lactamases تعمل على التحلل المائي للسيفالوسبورينات وبعض انواع البنسلينات، وهي على انواع مختلفة منها TEM-١٢ ، TEM-١٥، TEM-٢٦، TEM-١٩K، ويشفر لانتاجها جينات تدعى IMP *bla* محمولة بلازميدياً (Stapleton *et al.*, ١٩٩٩). وقد تكون محمولة على انتكرون (Integron) والذي هو عبارة عن عناصر وراثية مرتبطة بمقاومتها المتعددة لمضادات الحياة كما وجدت في العصيات السالبة لصبغة غرام المعزولة في اليابان (Arakawa *et al.*,١٩٩٥;Senda *et al.*,١٩٩٦).

اضافة لوجود آليات اخرى للمقاومة مثلاً حصول طفرات في الجينات المشفرة للبروتينات المرتبطة بالبنسلين (PBPs) مما يؤدي الى تقليل ميل ارتباط مضادات البيتا لاكتام بهذه البروتينات، او انتاج بروتينات بديلة مرتبطة بالبنسلين (Alternative PBPs) تدعى ($PBP_{٢a}$) تشفر من قبل جين *mecA* المحمول على كروموسوم وهي الالية المسؤولة عن المقاومة العالية المستوى لأغلب مضادات البيتا لاكتام في المكورات العنقودية (Berger-Bachi,١٩٩٤) كما انها قد تقاوم تلك المضادات بأنتاجها المفرط لانزيمات البيتالاكتاميز، زيادة مستويات البروتينات المرتبطة بالبنسلين ، او بتقليل ميل ارتباط تلك المضادات بهذه البروتينات، الا ان كل ما ذكر يمنحها مقاومة منخفضة المستوى (Tomasz *et al.*,١٩٨٩; Barg *et al.*,١٩٩١). اضافة لوجود آلية أقل شيوعا هي تقليل دخول المضاد الى البكتريا اما لحصول تغيرات في الجدار الخلوي او لوجود نظام دفق فعال (Fluit *et al.*, ٢٠٠١).

٢.٩.٢ مقاومة الامينوكلايكوسيدات Resistance to Aminoglycosides

ان انتاج انزيمات تحوير الامينوكلايكوسيدات (Aminoglycoside-modfying enzymes) هو من اكثر آليات مقاومة البكتريا لهذه المضادات شيوعاً، اذ يتم تحوير المضاد تركيبياً بواسطة انزيمات متخصصة تنتج من قبل البكتريا المقاومة (Jacoby & Archer, ١٩٩١; Kotra *et al.*, ٢٠٠٠; Fluit *et al.*, ٢٠٠١; Galimand *et al.*, ٢٠٠٣) .

حيث تعزى مقاومة البكتريا السالبة لصبغة غرام للجنتامايسين وانواع اخرى من الامينوكلايكوسيدات الى وجود انزيمات الصنف الثاني نوع ANT("٢") ،اما الجين المشفر لها فهو *aadB* وهو محمول على بلازميدات ذات احجام جزيئية ٦٨ و ١٥٠ كيلو قاعدة (Tenover *et al.*, ١٩٨٤). كما اظهرت دراسة اخرى لـ Tenover وجماعته (١٩٨٩) احتواء ٢١٩ عزلة من البكتريا السالبة لصبغة غرام على انزيم الصنف الثالث نوع I-(٣) AAC المشفر من قبل جين

aaCC١، كما وجد انزيم AAC (٣)-V في دراسة مشابهة للبكتريا السالبة لصبغة غرام والمقاومة للجنتامايسين (Barg,١٩٨٨). وقد وجد ان انزيمات الصنف الثالث (AAC) تنتج من قبل انواع عائدة لبكتريا العائلة المعوية مقاومة للجنتامايسين وتشفر من قبل جينات *aaC٢* المحمولة بلازميدياً اكثر من *aacC١* (Alvarez and Mendoza,١٩٩٣) . كما تنتج هذه الانزيمات (AAC) من قبل بكتريا *P. aeruginosa* وذلك لاحتوائها على الجين *aacC١* (Fluit *et al.*, ٢٠٠١).

اما بكتريا المكورات العنقودية فتعزى مقاومتها للجنتامايسين الى انتاجها انزيمات تحوير ثنائية الوظيفة (٦') AAC، (٢'') APH والجين المشفر لها هو *aac (٦')-Ietaph (٢'')* ويقع على العنصر القافز Tn٤٠٠١ (Fluit *et al.*, ٢٠٠١).

اشار Tran Van Nieu وجماعته (١٩٩٢) الى ان وجود جين *aaCA٤* المشفر لانزيمات الصنف الثالث نوع (٦') AAC هو سبب مقاومة البكتريا السالبة لصبغة غرام للاميكاسين، فمن بين ٧٠ عزلة مقاومة لذلك المضاد وجد ان ٤٤% منها انتجت هذا الانزيم، ومن بين هذه العزلات بكتريا العائلة المعوية، اذ لوحظ وجود هذا الانزيم بصورة اكبر في بكتريا *Klebsiella* و*E.coli* و*Enterobactor* كما وجد في بكتريا *P. aeruginosa*.

ان انتاج انزيم الصنف الثاني نوع I-(٤') ANT المشفر من قبل الجين *ant (٤')-Ia* هو سبب مقاومة بكتريا المكورات العنقودية للاميكاسين. يحمل هذا الجين عادة على بلازميدات صغيرة تتحد في بلازميدات اقترانية اكبر مثل PSK٤١ ثم تنتقل الى منطقة mec region على كروموسوم بعض عزلات بكتريا *S. aureus* (Byrne *et al.*,١٩٩١;Archer and Niemeyer,١٩٩٤; Stewart *et al.*,١٩٩٤)

هناك آلية اخرى لمقاومة الامينوكلايكوسيدات تتضمن تحوير الموقع الهدف لارتباط المضاد، اذ لوحظت هذه الآلية في البكتريا السالبة لصبغة غرام من خلال التحوير بعد عملية الأستنساخ (Post transcriptional modification) لموقع الهدف ١٦S rRNA في الرايبوسوم، مما يؤدي الى فقدان ميل المضاد للارتباط بهذا الموقع. ان تحوير الموقع الهدف (١٦S rRNA) يتم بواسطة انزيم يدعى ١٦S rRNAm^{٧}G methyl transferase والجين المشفر له هو *armA* (aminoglycoside resistance methylase) ، فقد وجد هذا الجين في بكتريا *K. pneumoniae* اضافة لأحتوائها على جينات مقاومة الأمينوكلايكوسيدات الأخرى مثل *aac ٣-IIa* (Galimand *et al.*, ٢٠٠٣).

وقد تقاوم البكتريا الممرضة للانسان الامينوكلايكوسيدات عن طريق تقليل التراكم الداخل خلوي للمضاد اما بتغيير نفاذية الغشاء الخارجي للخلية، تقليل عملية النقل في الغشاء الداخل خلوي، او الدفق الفعال (Galimand *et al.*, ٢٠٠٣) .

٣.٩.٢ مقاومة التتراسايكلين Resistance to Tetracycline

تقاوم البكتريا مضادات التتراسايكلينات باحدى آليتين هما وجود انظمة الدفق والحماية الرايبوسومية (Ribosomal protection)،وكلا هاتين الآليتين لا تعملان على تدمير المضاد. اذ تستهدف انظمة الدفق طريق وصول المضاد الى الموقع الهدف من خلال طرحه خارج الخلية بعد احتجازه من قبل بروتينات مرتبطة بالاغشية الداخلية والاغشية البلازمية المحيطية، ونتيجة لذلك سوف يقل تجمع المضاد بسبب ازدياد الدفق من الخلية الى خارجها وتعتمد هذه الانظمة على الطاقة (Alekshum & Levy, ١٩٩٧; Ziha-Zarifi *et al*., ١٩٩٩; Chopra and Roberts, ٢٠٠١).

تتواجد هذه الانظمة في البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام وهي المسؤولة عن مقاومتها لعدد من المضادات والتي من ضمنها التتراسايكلين حيث تحتوي على بروتينات مرتبطة بالاغشية تحتجز المضاد، مشفرة من قبل جينات تدعى *tet* efflux genes ، وهي مقسمة الى مجاميع اعتماداً على تسلسل الحامض الاميني فيها (Bolhius *et al.,* ١٩٩٧; Chopra and Roberts, ٢٠٠١).

تتواجد الجينات المشفرة لأنظمة الدفق في البكتريا السالبة لصبغة غرام على بلازميدات كبيرة اغلبها تكون اقترانية ، والى جانب احتوائها على هذه الجينات فهي تحتوي على جينات مقاومة مضادات اخرى، جينات مقاومة المعادن الثقيلة، و/أو عوامل ضراوة مثل السموم (Chopra and Roberts, ٢٠٠١). اما في البكتريا الموجبة لصبغة غرام فقد تحمل على بلازميدات صغيرة قابلة للتحريك (Small transmissible plasmids) والتي تندمج في بعض الحالات في الكروموسوم كما في بكتريا المكورات العنقودية (Gillespie *et al.,*١٩٨٧). بالاضافة الى انظمة الدفق، تقاوم البكتريا مضاد التتراسايكلين عن طريق احتوائها على بروتينات سايتوبلازمية تحمي الرايبوسومات من فعل المضاد اذ وجد ان جنس *Staphylococcus* يحتوي على هذه البروتينات اضافة لإحتوائها على أنظمة الدفق(Warsa *et al*., ١٩٩٦; Trzcinski *et al*., ٢٠٠٠; Fluit *et al*., ٢٠٠١) .

٤.٩.٢ مقاومة الكلورامفينكول Resistance to Chloramphenicol (C)

تعزى المقاومة البكتيرية للكلورامفينيكول عموماً الى تثبيط المضاد بانتاج انزيم Chloramphenicol acetyl transferase (CAT)، الذي يقوم بتحوير المضاد عن طريق تحطيم جزيئته بوجود عامل مساعد (Acetyl coA) مما يؤدي الى تكوين جزيئة غير فعالة (١,٣-Diacetyl chloramphencicol). يشفر لهذا الانزيم جينات محمولة على بلازميد تدعى *cat* genes موجودة في كل من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام (Dever & Dermody, ١٩٩١; Murray & Shaw, ١٩٩٧; Fluit *et al*., ٢٠٠١).

٥.٩.٢ مقاومة مضادات الماكروليد (الارثرومايسين)Resistance to macrolide antibiotics

[Erythromycin (E)]

تقاوم البكتريا هذه المضادات بعدد من الآليات، اولها تحوير الموقع الهدف (الرايبوسومي) بواسطة التحوير بعد عملية الأستنساخ لـ ٢٣S rRNA بمساعدة الانزيم adenine-N^{6}-methyltransferase، وتعد هذه الآلية الاكثر شيوعاً (Fluit *et al.*, ٢٠٠١). ان الجينات المشفرة لانزيمات تحوير (مثيلة) موقع هدف مضاد الارثرومايسين تدعى *erm* (erythromycin ribosome methylation) ، كما ان صفة المقاومة للارثرومايسين غير متعلقة بصنف جين *erm* لكنها تعتمد على تسلسل المنطقة المنظمة اعلى مجرى الجين من الجين التركيبي المشفر لانزيم المثيلة Schwarz *et al.*,١٩٩٨; Werckentyin *et al.*,١٩٩٩) .

الآلية الاخرى هي دفق الماكروليد (Macrolide efflux)، التي وجدت بنسبة متزايدة في البكتريا الموجبة لصبغة غرام (Luna *et al.*,١٩٩٩; Roberts *et al.*,١٩٩٩) بواسطةعدد من جينات مقاومة المضاد المختلفة تشفر لبروتينات الدفق التي تضخ المضاد الى خارج الخلية او خارج الغشاء الخلوي مما يؤدي الى المحافظة على تراكيز واطئة للمضاد داخل الخلية وحماية الرايبوسومات من المضاد (Fluit *et al.*, ٢٠٠١).

اظهرت الدراسات ان هناك صنفين من جينات الدفق المسؤولة عن المقاومة للمايكروليدز في المكورات الموجبة لصبغة غرام هما: *mef* و*msr* ، وجد الصنف الاول (*mef*) في اجناس مختلفة عائدة لهذه البكتريا ، كما ان العديد من جينات هذا الصنف مرتبطة بعناصر قافزة اقترانية موجودة على الكروموسوم تنتقل اقترانياً عبر حواجز الجنس والنوع (Luna *et al.*,١٩٩٩).

اما جينات الصنف الثاني (*msr*) فهي تختلف عن الاول بكونها تحمل المقاومة للماكروليدز ومضادات اخرى (Streptogramin B)، من هذه الجينات: جين *msrA*/*msrB* الذي وجد في بكتريا *S. aureus* (Schmitz *et al.*,٢٠٠٠) .

اما الآلية الثالثة فهي انتاج انزيمات تثبيط المضاد مثل EreA وEreB المشفرة من قبل جينات *ereA* و*ereB* على التوالي، حيث تؤدي هذه الانزيمات الى التحلل المائي لحلقة اللاكتون لنواة macrocyclic. اضافة الى انزيمات phosphotransferases (type I) المشفرة من قبل جين *mphA* التي تثبط تلك المضادات بإضافة فوسفات الى مجموعة hydroxyl group-٢' في السكر الاميني، حيث وجدت هذه الانزيمات في اعداد من البكتريا العائدة للعائلة المعوية وفي بكتريا *S. aureus* (Weisblum ,١٩٩٥; Roberts *et al.*,١٩٩٩) .

اضافة لآليات المقاومة المذكورة سابقاً، قد تقاوم العصيات السالبة لصبغة غرام مضادات الماكروليدز عن طريق نفاذية الغشاء الخلوي الخارجي المنخفضة لتلك المضادات الكارهة للماء (Weisblum,١٩٩٥).

٦.٩.٢ مقاومة الكوينولونات [Nalidixic acid (NA)] Resistance to Quinolones

تتمحور آلية المقاومة البكتيرية للكوينولونات في محورين اساسيين:

الأول هو تغيير انزيمات هدف المضاد DNA gyrase في البكتريا السالبة لصبغة غرام ، و Topoisomerase IV أو DNA gyrase في البكتريا الموجبة لصبغة غرام اعتمادا على تركيب الكوينولون ، وهي الآلية الأكثر شيوعا (Hooper ,١٩٩٨) .

اذ أثبتت عدد من الدراسات أن حصول الطفرات في جين *gyrA* يؤدي الى تغييرات في تكوين موقع ارتباط المضاد و/أو شحنته مما يؤثر على ارتباط الكوينولون بانزيم DNA gyrase (Drlica and Zhao, ١٩٩٧; Hooper,١٩٩٨) . كما ان حدوث طفرات في الجينات المشفرة لأنزيم Topoisomerase IV يؤدي الى مقاومة الكوينولونات كما في بكتريا *S.aureus* (Schmitz *et al.*,١٩٩٨) .

أما المحور الثاني فهو تغيير نفاذية الخلية للكلوينولونات عن طريق حدوث تغييرات في الغشاء الخلوي والتي تمثل احدى آليات مقاومة البكتريا السالبة لصبغة غرام لهذه المضادات، ولا تتواجد في البكتريا الموجبة لصبغة غرام (Drlica and Zhao,١٩٩٧; Hooper ,١٩٩٨).

٧.٩.٢ مقاومة الريفامبسين Resistance to Refampicin(RA)

تقاوم البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام مضاد الريفامبسين بسبب حدوث طفرة تؤدي الى استبدال زوج قاعدي واحد (Single base pair) في الجين *rpoB* المشفر لتحت الوحدة بيتا (Beta subunit) لانزيم DNA-dependent RNA polymerase (Jin & Cross, ١٩٨٨; Reynolds, ٢٠٠٠).

اذ اظهرت دراسة Damon وجماعتها (١٩٩٨) اسباب مقاومة الريفامبسين من قبل المكورات العنقودية (بضمنها ٤٠٠٠ عزلة لبكتريا *S. aureus*) هي حصول طفرة في جين *rpoB*، كما ايد ذلك كل من Yu وجماعته (٢٠٠٥) وKawamura وجماعته (٢٠٠٥) ، اما Schmitz وزملاؤه (٢٠٠١) فقد بين في دراسة له ان مقاومة بكتريا *S. aureus* لهذا المضاد تعزى الى حدوث تبديل في الشفرات ٤٦٨، ٤٧٧، و ٤٨١ للجين *rpoB* المحمول كروموسومياً. كما اشار Xu وجماعته (٢٠٠٥) ان مقاومة البكتريا السالبة لصبغة غرام ايضاً تعزى الى حصول طفرات في الجين *rpoB* تؤدي الى استبدال زوج قاعدي واحد.

٨.٩.٢ مقاومة التراي ميثوبرم Resistance to Trimethoprim (TMP)

ان مقاومة البكتريا لهذا المضاد ممكن ان تحصل بواسطة عدد من الآليات والتي من ضمنها الانتاج المفرط لانزيم [Dihydrofolate reductase (DHFR]، حصول طفرات في الجين التركيبي المشفر لانزيم DHFR، واكتساب جين *dfr* المشفر لانزيم DHFR وتعتبر الآلية الاخيرة هي الاكثر اهمية في العزلات الطبية(Fluit *et al.,* ٢٠٠١).

هناك على الاقل ١٥ انزيماً من نوع DHFR معروفة اعتماداً على خصائصها ، فقد وجد نوعان من هذه الانزيمات type I وtype II في عزلات متنوعة من البكتريا السالبة لصبغة غرام، حيث اظهرت مستويات مقاومة عالية للتراي ميثوبرم (Fling *et al.,*١٩٨٢) .

باستعمال المجس المعلم بالبايوتين (Biotinylated fragment probe) اظهرت احدى الدراسات التي اجريت على بكتريا العائلة المعوية المعزولة من مستشفيات Nottingham في المملكة المتحدة، والمقاومة للتراي ميثوبرم انها تحتوي على ٦٨ بلازميداً من اصل ٨٣ حاوياً على الجين المشفر لانزيم DHFR typeI(Carter *et al.,*١٩٨٧) ، كما دلت على ذلك دراسات مشابهة باستخدام نفس الطريقة وجود الجينات المشفرة لانزيمات DHFR type I, II and V في بكتريا العائلة المعوية معزولة من مرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية في اليونان (Tsakris *et al.,*١٩٩٣) وفي تايوان (Chang *et al.*,١٩٩٢). لكن في بعض الاحيان تحمل جينات انزيم DHFR type I على كروموسوم (Fluit *et al.*, ٢٠٠١).

كما كشفت احدى الدراسات المجراة في الهند على عزلات بكتيرية مقاومة للتراي ميثوبرم باستعمال مجسات Fragment probes متخصصة للجينات المشفرة لإنزيمات DHFR type Ia, IIa, III, IV, V and VII ان DHFR type Ia هو الاكثر شيوعاً (Tait and Aymes,١٩٩٤).

هناك دراسات مقارنة أجريت على بكتريا العنقوديات للتحري عن جينات مقاومة التراي ميثوبرم فيها أظهرت أنها ممكن أن تكون محمولة كروموسومياً وبلازميدياً (Galletto *et al.*,١٩٨٧; Tennent *et al.*,١٩٨٨).

١٠.٢ تأثير المطهرات على البكتريا The effect of disinfectans and antiseptics on bacteria

تعرف المطهرات على انها مركبات كيمياوية قادرة على اهلاك الأحياء المجهرية او منع نموها ونشاطها الايضي، وتختلف هذه المركبات في الاغراض المستخدمة لها، فهناك المطهرات المستخدمة للتقليل والسيطرة على عدد الأحياء المجهرية في هواء غرف العمليات وارضية المستشفيات، واخرى لتعقيم الجلد، وهناك ما يستخدم لتطهير المياه....الخ. (Pelczar *et al.*, ١٩٨٦).

ان المطهرات التي تهمنا في هذه الدراسة هي المطهرات المستعملة في المستشفيات، والتي تكون اما مطهرات مبيدة للجراثيم (Disinfectants) التي تستخدم لتطهير الاشياء غير الحية (Inanimate objects) او مطهرات مانعة للإنتان (Antiseptics) التي تستخدم لتعقيم الجلد . وقد تكون هذه المطهرات قاتلة (Bactericide) او مثبطة Bacteriostatic (Prescott and Harley, ١٩٩٩).

من الضروري توفر جملة من الخصائص المهمة في هذه المركبات الكيمياوية كي تستخدم للتعقيم مثل شدة فعاليتها، قابليتها ذوبانها، ثبوتيتها، سميتها للاحياء المجهرية وعدم

سميتها للانسان والحيوان، وتوفرها بكميات كبيرة واسعار معتدلة . ويتم اختيار المركب الملائم تبعاً لطبيعة المواد المراد تطهيرها، نوع الكائن المجهري المراد قتله او تثبيطه، والعوامل البيئية (Pelczar *et al.*, ١٩٨٦). كما تؤثر عدة عوامل على عملية التطهير منها التركيز، الوقت ، درجة الحرارة ، وطبيعة الوسط المحيط (Prescott and Harley,١٩٩٩) .

١.١٠.٢ آليات عمل المطهر Mechanisms of disinfectant action

يؤثر المطهر على منطقتين رئيستين في الخلية البكتيرية هما :الغشاء الخلوي، والبروتينات الخلوية ، إذ تمتلك كل الخلايا الحية غشاء نصف نفاذ ينظم مرور المواد من والى الخلية، وان أي تمزق يحصل في هذا الغشاء يسمح بتسرب الايونات اللاعضوية الاساسية ، الاحماض النووية، الانزيمات المساعدة ، والاحماض الامينية من الخلية مما يمنع دخول المواد الاساسية الى الخلية لأن هذا الغشاء ينظم دخولها عن طريق النقل الفعال . وهكذا فإن أي مادة ممكن ان تثبط الوظائف الاساسية للغشاء تؤدي إما الى موت الخلية او تثبيط نموها اعتماداً على مقدار الضرر الحاصل للغشاء. أما البروتينات فتمثل العمود الفقري للتركيب الخلوي ، اذ ان كل التفاعلات الايضية الخلوية تتحفز بواسطة الانزيمات المتكونة اصلاً من البروتينات. لذلك فأن أي عامل كيميائي يتحد مع البروتينات سيمنعها من اداء وظيفتها الطبيعية محدثاً تأثيراً مثبطاً او قاتلاً(Babb, ١٩٩٦; Prescott and Harley , ١٩٩٩) .

٢.١٠.٢ حساسية البكتريا للمطهرات Bacterial sensitivity to disinfectants and antiseptics

تتأثر حساسية البكتريا لمدى واسع من المطهرات والعوامل المضادة للأحياء المجهرية لعدد من الأسباب منها ، غياب الموقع الهدف أو عدم قدرة العامل المضاد للكائن المجهري للتجمع على هذا الموقع مما يجعل الكائن مقاوم لهذا العامل تحت كل ظروف النمو(Hancock,١٩٩٨). كما ان حساسية البكتريا قد تتغير تجاه هذه العوامل نتيجة لحدوث تغير في طرازها المظهري (Phenotypic change) قد يكون ناتجا عن تغير في طبقات الخلية الخارجية مما يعني اعاقة دخول العامل ووصوله الى الموقع الهدف (Paulsen *et al.,* ١٩٩٦)، أو بسبب مرور الكائن في مرحلة سكون شبيهة بتكوينه الأبواغ الداخلية (Endospores) استجابة لنقص المغذيات عندما يكون الكائن في مستهل طور الثبات (Dodd *et al.*,١٩٩٨;Foley *et al.*,١٩٩٩) ، كما يعد نمو البكتريا بهيئة غشاء حيوي أحد التغييرات المظهرية المؤدية الى انخفاض الحساسية تجاه تلك العوامل (Brown and Gilbert, ١٩٩٣; McDonnell and Russell, ١٩٩٩; Gilbert *et al.*, ٢٠٠٢) .

يعد امتلاك البكتريا لأنظمة الدفق من الأسباب المهمة لمقاومة البكتريا السالبة لصبغة غرام للعديد من العوامل المتضمنة المطهرات ، الصبغات ، المنظفات ، والمضادات الحيوية (Lewis *et al.*,١٩٩٧; Nikaido, ١٩٩٨) . تتحفز هذه الأنظمة عند تعرض البكتريا لتراكيز شبه قاتلة

من تلك العوامل ، وهي مشفرة من قبل اوبرون محمول كروموسوميا في الغالب وقد يحمل بلازميديا (Nikaido,١٩٩٨) منها نظام الدفق *acrAB* في بكتريا *E.coli* (George and Levy, ١٩٨٣; Ma *et al.*, ١٩٩٤) وأنظمة الدفق *mexAB,mexCD,mexEF* في بكتريا *P. aeruginosa* (Schweizer,١٩٩٨) . ولاتقتصر هذه الأنظمة على البكتريا السالبة لصبغة غرام فقط بل تتواجد في البكتريا الموجبة أيضا، اذ تحتوي بكتريا *S. aureus* على أنظمة دفق متعددة منها *qacA* و *qacG* التي يعزى لها التحمل الدوائي لهذه البكتريا (Rouche *et al.*,١٩٩٠) .

كما ان حساسية البكتريا لتلك العوامل قد تتغير بسبب حدوث تغير مستحث فيها (Inductive change) ناتج عن تصنيع البكتريا وافرازها انزيمات محطمة لهذه العوامل تستحث عند التعرض المفاجيء لتراكيز شبه قاتلة منها ثم تتبع بحدوث ضغط انتخابي لتلك العزلات البكتيرية مما يؤدي الى سيادتها في البيئة التي تتواجد فيها (Gilbert and McBain,٢٠٠٣) .

وقد يعزى انخفاض الحساسية البكتيرية للمطهرات الى حصول تغير في طرازها الوراثي الذي قد يكون كروموسوميا (Chromosomal change) ناتج عن حدوث طفرات كروموسومية في الجين المشفر للموقع الهدف، أو بسبب تثبيط ذلك الجين أوحذفه ، أو قد يكون ذلك التغير متوسط بالبلازميد (Plasmid-mediated change) ناتج عن اكتساب عناصر وراثية خارجية المنشأ مشفرة لآليات المقاومة البكتيرية للمطهرات ، اذ تكون هذه العناصر مسؤولة عن انتقال المقاومة ضمن أفراد المجتمع البكتيري (Gilbert and McBain,٢٠٠٣) .

٣.١٠.٢ أهم أنواع المطهرات The important types of disinfectants and antiseptics

١.٣.١٠.٢ الفينول والمركبات الفينولية Phenol and phenolic compounds

يتميز الفينول (Carbolic acid) باستخدامه مضاداً للأحياء المجهرية في الطب قبل اكثر من ١٠٠ عام، ويستخدم ايضا كمقياس لقياس فعالية المركبات الكيمياوية الاخرى المضادة للميكروبات .استخدمه لاول مرة العالم Lister في محاولاته الاولى في الجراحة، وتكمن اهميته في تقليل الالتهابات الناتجة عن العمليات الجراحية، وقد يكون مثبطاً او قاتلاً اعتماداً على تركيزه المحضر وقد وجد ان تركيزه الفعال هو ٢-٥% (Pelczar *et al.*, ١٩٨٦; Prescott and Harley, ١٩٩٩) .

ان الفينول ومشتقاته مواد فعالة جداً ضد الاحياء المجهرية فقد وجد ان ٥% من محلول الفينول يقضي بسرعة على كافة خلايا الاحياء المجهرية الخضرية، واغلب الفطريات. الا ان الابواغ تكون مقاومة لفعل الفينول، كما ان تأثيره على الفيروسات يختلف تبعاً لوجود او عدم وجود غلاف يحيط الكابسد الفيروسي (Pelczar *et al*., ١٩٨٦; McDonell & Russell, ١٩٩٩) .

يؤثر الفينول ومشتقاته على الاحياء المجهرية عن طريق تضرر الاغشية الخلوية، ترسيب البروتينات، شلل النشاط الانزيمي، وخسارة الحوامض الامينية من الخلايا (Pelczar *et al*., ١٩٨٦; Gilbert and McBain, ٢٠٠٣).

ومن الجدير بالذكر، ان فعالية مركبات الفينول تقل في المحيط القاعدي، درجة الحرارة الواطئة، وعند وجود المواد العضوية والصابون (Pelczar *et al*., ١٩٨٦). ومن امثلة مركبات الفينول المستخدمة للتطهير هو Chloroxylenol الذي يعرف تجارياً الديتول (Dettol)، وهو من المركبات القاتلة للبكتريا، الا انه لا يؤثر على الابواغ، ويستخدم لتطهير الجلد والاغشية المخاطية (McDonell & Russell, ١٩٩٩).اضافة الى مركب Chlorhexidine gluconate المسمى تجارياً (Hexatane) وهو ذو فعالية قاتلة للبكتريا، لكن فعاليته تقل بوجود الدم والقيح وبقية المواد العضوية، يستخدم في محاليل حاوية على ٢٠٠ مايكروغرام/مل منه حيث يكون هذا التركيز فعالاً ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام، وهو غير قابل للامتصاص عن طريق الجلد، وغير سام مما يجعله واسع الانتشار لتعقيم اليدين، تطهير الجلد قبل العمليات الجراحية، وتطهير الفم عند التهاب اللثة. يؤدي هذا المركب الى مسخ البروتينات الخلوية وتجلط محتويات الخلية (Prescott and Harley, ١٩٩٩; Gilbert and McBain, ٢٠٠٣).

٢.٣.١٠.٢ الكحول Alcohol

يستخدم الكحول في تقليل عدد الاحياء المجهرية على سطح الجلد ومحارير قياس درجة حرارة الجسم. ويعتبر الكحول الاثيلي من اكثر الكحولات استخداماً وشيوعاً للتعقيم (Pelczar *et al*., ١٩٨٦; Gilbert and McBain, ٢٠٠٣). يكون الكحول الاثيلي فعالاً بتركيز ٥٠-٩٠% ضد خلايا الاحياء المجهرية الخضرية، لكنه غير فعال ضد الابواغ الداخلية البكتيرية، فقد وجد ان ابواغ بكتريا *B. subtilis* قاومت الكحول لمدة ٢٠ سنة (Prescott and Harley, ١٩٩٩; Pelczar *et al*., ١٩٨٦). كما ان تركيز ٦٠% من الكحول يكون فعالاً ضد الفيروسات، لكن وجود مركبات عضوية مع الفيروسات يؤثر في فعالية الكحول عليها بسبب اتحاده مع تلك المركبات وبالتالي حماية الفيروسات (Pelczar *et al*., ١٩٨٦).

ان التركيز الفعال للكحول الأثيلي هو ٧٠% وهو افضل تركيز مؤثر لاغلب الاغراض، في حين يكون الكحول النقي ١٠٠% اقل فعالية لانه يسبب ازالة الرطوبة من الخلايا البكتيرية وبالتالي تحسين امكانية نجاتها (Prescott and Harley, ١٩٩٩).

يتجلى تأثير الكحول على الاحياء المجهرية بتغييره طبيعة البروتين الكيمياوية للخلايا، كما انه مذيب للدهون فقد يعمل على اذابة المركبات الدهنية التي تشكل جزءاً من الجدار الخلوي. واضافة لذلك قد يزيل الاحياء المجهرية ميكانيكياً (McDonell & Russell, ١٩٩٩; Gilbert and McBain, ٢٠٠٣).

٣.٣.١٠.٢ الهالوجينات Halogens

يعد اليود احد اقدم واكثر المركبات الهالوجينية فعالية ضد الاحياء المجهرية، فقد عرفت فعاليته في الولايات المتحدة منذ عام ١٩٣٠. يتميز هذا المركب بذوبانه المحدود في الماء، لكنه يذوب بسهولة في الكحول وفي المحاليل المائية لمركبات ايوديد البوتاسيوم وايوديد الصوديوم (Prescott and Harley, ١٩٩٩).

يكون اليود فعالاً ضد كل انواع البكتريا، وكذلك الابواغ اعتماداً على عوامل معينة (مثل تركيزه ووجود المركبات العضوية)، كما انه مضاد للفطريات بدرجة محدودة، ومضاد للفيروسات (Pelcazr *et al*., ١٩٨٦; McDonell & Russell, ١٩٩٩).

يستخدم اليود لتطهير الجلد بالدرجة الاولى، كما يستخدم لتطهير المياه والهواء (رذاذ اليود)، وهو اكثر فائدة من الكلور بسبب استمرار فعاليته في مديات مختلفة من الأس الهيدروجيني (Prescott and Harley , ١٩٩٩). قد يتحد اليود مع جزيئات حاملة كبيرة مثل Polyvinyl pyrrolidine (PVP) تدعى حاملات اليود (Iodophores) ، هذه الجزيئات تكون ذائبة في الماء، وعندما تذاب تحرر اليود الحر ببطء من المعقد، اضافة الى كونها لا تصبغ وغير مخدشة (Pelcazr *et al*., ١٩٨٦; McDonell & Russell, ١٩٩٩).

ان تأثير اليود غير مفهوم تماماً، لكن بما انه مادة مؤكسدة فيعتقد ان دوره المضاد للاحياء المجهرية يكون عن طريق هذه الخاصية التي تؤدي الى ابطال فعالية المركبات الايضية مثل البروتينات التي تحمل مجاميع الثايول (SH-group). كما يعتقد انه يعمل على هلجنة وحدات الحامض الاميني التايروسين الداخل في تركيب الانزيمات وغيرها من بروتينات الخلية التي تتطلب التايروسين لنشاطها (Pelcazr *et al*., ١٩٨٦).

٤.٣.١٠.٢ مركبات الامونيا الرباعية Quaternary ammonium compounds

تتألف من عدد من المركبات الحاوية على أربع ذرات كاربون قابلة للابدال ومرتبطة تساهمياً بذرة نتروجين مركزية. تمتاز بكونها ذائبة جيداً بالماء، لها ثبات في المحلول وغير مخدشة. كما انها

منظفة وبنفس الوقت قاتلة للاحياء المجهرية اذ تتحد مع المنظفات غير الايونية محدثة ذلك التأثير. تستخدم هذه المركبات لتقليل اعداد الاحياء المجهرية في معامل الصناعات الغذائية، تعقيم المطاعم وادوات الطعام، كما انها مطهرة للجلد وحافظة للمواد الصيدلانية ، ومن امثلتها مركب السترامايد (Citramide) (Pleczar *et al*., ١٩٨٦).

قد تكون هذه المركبات قاتلة او مثبطة اعتماداً على تركيزها المستخدم، ففي التراكيز العالية (مثلاً ١:٣٠٠٠٠) تكون هذه المركبات قاتلة، اما في التراكيز الواطئة (مثلاً ١:٢٠٠٠٠٠) فتكون مثبطة (Babb, ١٩٩٦; Gilbert and McBain, ٢٠٠٣).

تتميز هذه المركبات بكونها فعالة جداً ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام لكن فعاليتها اقل ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام، كما انها فعالة ضد الفطريات والابتدائيات، لكن الفيروسات أكثر مقاومة لها (Pleczar *et al*., ١٩٨٦; McDonell & Russell, ١٩٩٩).

لوحظ ان تأثير هذه المركبات على الاحياء المجهرية يكون عن طريق تغيير طبيعة البروتين الكيمياوية مما يعرقل دورة انتاج الطاقة (Glycolysis) ويسبب ضرراً للاغشية الخلوية حيث يحدث خلل في نفاذيتها (Prescott and Harley, ١٩٩٩).

٤.١٠.٢ تقدير كفاءة المطهرات Estimation of disinfectants' efficiency

يبقى الاحتمال قائماً في ان المطهر قد يتعرض لعوامل مختلفة تؤدي الى فقدان فعاليته المضادة للاحياء المجهرية، لذا لا بد من اختبار كفاءته للتأكد من فعاليته. ولأجل هذا الغرض تستخدم طرق عديدة منها، طريقة معامل الفينول (Phenol Coefficient) المستخدمة من قبل منظمة الغذاء والدواء الامريكية ، وهي طريقة قياسية يقارن فيها المطهر مع الفينول تحت ظروف قياسية باستخدام كائنات مجهرية معينة هي:

S. typhi و*P. aeruginosa* و*S. aureus* حيث يتم تحديد معامل الفينول لمطهر ما بتقسيم اعلى تخفيف للمطهر قاتل للبكتريا خلال ١٠ دقائق على اعلى تخفيف للفينول الذي يعطي نفس النتيجة وخلال نفس الفترة الزمنية (Pelczar *et al*., ١٩٨٦).

١١.٢ المحتوى الوراثي Genetic content

تحتوي البكتريا بصورة عامة على كروموسوم واحد ، وعلى عناصر وراثية خارج كروموسومية تدعى البلازميدات والتي هي جزيئات من الدنا لها القدرة على التضاعف بصورة مستقلة عن كروموسوم المضيف ، وتحمل عادة جينات ضراوة لها علاقة بالأمراضية مثل جينات مقاومة مضادات الحياة ، انتاج السموم ، وغير ذلك (Snyder &Champness , ١٩٩٧)

فقد أشارت دراسات متعددة الى كون جينات مقاومة كل من مضادات البيتا لاكتام ، الأمينوكلايكوسيدات ، الكلورامفينيكول ، الناليديكسيك أسيد ، الأرثرومايسين ، التتراسايكلين ، المعادن الثقيلة ، و/ أو انتاج

السموم محمولة على البلازميدات في البكتريا السالبة لصبغة غرام ، أما جينات مقاومة مضاد التراي ميثوبريم فقد تكون محمولة على البلازميدات أو على الكروموسوم ، لكن جينات مقاومة مضاد الريفامبسين تحمل على الكروموسوم في هذه البكتريا .

أما في بكتريا المكورات العنقودية فقد وجد أن كل من جينات مقاومة مضادات البيتا لاكتام ، الأميكاسين ، التتراسايكلين ، الكلورامفينيكول تحمل على البلازميدات ، وقد تحمل جينات مقاومة مضاد التراي ميثوبريم على البلازميدات أو على الكروموسوم ، أما جينات مقاومة مضادات الماكروليدز فقد يحمل بعضها على عناصر اقترانية موجودة في الكروموسوم ، لكن جينات مقاومة مضاد الريفامبسين تحمل على الكروموسوم (Dever & Dermody, ١٩٩١; Fluit *et al.*, ٢٠٠١;Chopra and Roberts, ٢٠٠١) .

تتراوح أحجام هذه البلازميدات من عدة الى مئات الالآف من الأزواج القاعدية (Snyder & Champness , ١٩٩٧) ، ففي دراسة O'Reilly وجماعته (١٩٨١) وجد أن بكتريا *S.aureus* تحتوي على بلازميدات تتراوح أحجامها بين ٢.٤-٤٢ كيلو زوج قاعدي . كما لوحظ احتواء البكتريا السالبة لصبغة غرام على بلازميدات ذات أحجام ٦٨ و ١٥٠ كيلو قاعدة (Tenover *et al.*,١٩٨٩) .

١٢.٢ تحييد البلازميدات Plasmids curing

يمكن تعريف عملية التحييد بأنها انعزال البلازميدات وتنحيها من الخلية . تحدث بصورة تلقائية لكن يمكن احداثها باستخدام عوامل تحييد تزيد من نسبة الإنعزال مما يسهل فقدان البلازميد نهائيا من الخلية (Snyder & Champness , ١٩٩٧) .

تكمن أهمية التحييد في تحديد الصفات المحمولة على البلازميدات ، اذ تفقد البكتريا قابليتها على اظهار تلك الصفات بعد إفراغها من البلازميدات ، وهذه الطريقة يمكن استخدامها عند عدم وجود وسائل متاحة في تحديد تلك الصفات ، ولأجراء التحييد يمكن استخدام عوامل كيمياوية مثل صبغة بروميد الأثيديوم لاسيما في تحييد بلازميدات البكتريا المعوية والمكورات العنقودية الذهبية ، اذ تسبب تثبيطا لتكرار البلازميدات (Sonstein & Baldwin , ١٩٧٢) . كما يمكن استخدام صبغة الأكريدين البرتقالي في التحييد والتي لها نفس تأثير الصبغة السابقة لكنها أقل كفاءة منها (Johnston & Richmond , ١٩٧٠).

اضافة الى امكانية استخدام مادة سلفات دوديسيل الصوديوم (SDS) لغرض التحييد والتي تكون أفضل من بروميد الأثيديوم في تحييد بلازميدات بعض الأنواع البكتيرية (Sonstein & Baldwin , ١٩٧٢) .

كما أشار عدد من البحوث الى قابلية بعض مضادات الحياة على التحييد البلازميدي مثل novobiocin , coumemycin , rifampicin (Novick,١٩٦٩ ; Johnston & Richmond,١٩٧٠).

الى جانب ذلك ، يمكن اجراء تحييد البلازميدات بواسطة عوامل فيزياوية متمثلة بتغيير درجة الحرارة المثلى لنمو البكتريا ، الا ان هذه الطريقة ذات تأثير جزئي وكفاءتها أقل اذا ما قيست بالطريقة المعتمدة على استخدام العوامل الكيمياوية (May *et al.*,١٩٦٤) .

١٣.٢ العلاجات المقترحة Suggestic treatments

تناولت دراسات عدة تأثير انواع مختلفة من العلاجات المضادة لتكون الغشاء الحيوي على العدد الطبية ، اذ وجد Freeman و Govld(١٩٨٥) ان اضافة Sodium metabisulfite الى dextrose heparine في قثطار الشريان الايسر يقلل استعمار الأحياء المجهرية على هذه القثاطر. كما ان القثاطر المنقوعة بالمينوسايكلين والريفامبين تكون اقل إستعماراً بكتيرياً (Darouiche *et al.*,١٩٩٩) . وفي دراسة Kamal وجماعته (١٩٩١) وجد ان القثاطر المغلفة بخافض التوتر السطحي السالب الشحنة Tidodecyl methyl ammonium chloride كانت اقل تلوثاً واحتمالاً لتكوين الغشاء عليه مقارنة بالقثاطر غير المعاملة بهذه المادة. كما وجدت Flowers وجماعتها(١٩٨٩) ان طرف القثطارالمغروس الحاوي على ايونات الفضة منح تأثيراً حافظاً له. وهذا ما أيده Illingrowth وجماعته (١٩٩٨) اذ وجد ان الصمام القلبي الميكانيكي المغطى بايونات الفضة المغروس في خنزير غينيا والملوث ببكتريا *S. epidermidis* كان اقل التهاباً من غير المغطى بالفضة .

وبناء على ذلك، اقترح Maki (١٩٩٤) عدة طرق للسيطرة على الغشاء على القثاطر الوعائية، تتضمن استخدام تقنية التعقيم خلال الغرس، استخدام المضادات الحديثة، تقليل مدة بقاء العدة في الجسم، استخدام مرشح داخل العدة لادخال سوائل داخل الوريد، انشاء حاجز ميكانيكي لمنع دفق الكائنات يربط العدة بطرف مغروس جراحياً، تغليف التجويف الداخلي للقثطار بعامل مضاد للأحياء المجهرية ، وازالة العدة الملوثة.

كما اكتشفت بضعة ستراتيجيات للسيطرة على الاغشية الحيوية المتكونة على القثاطر البولية منها استخدام المراهم المضادة للأحياء المجهرية والزيوت، غسل المثانة البولية، وضع العوامل المضادة للأحياء المجهرية في اكياس جمع الادرار، تشريب القثطار بعوامل مضادة للأحياء المجهرية مثل اوكسيد الفضة، او استخدام المضادات الجهازية (Donlan, ٢٠٠١). وربما في المستقبل تصنع العلاجات المضادة للغشاء على اساس تثبيطها للجينات التي لها علاقة بارتباط الخلايا بالسطح وتكوين الغشاء (Donlan & Costerton, ٢٠٠٢).

١.٣ المواد Materials

١.١.٣ الأجهزة والأدوات Equipments and tools

Autoclave (Webeco, Germany)	**١. موصدة**
Oven (Gallenkamp, England)	**٢. فرن**
Incubator (Gallenkamp, England)	**٣. حاضنة**
Shaking incubator(Gallenkamp, England)	**٤. حاضنة هزازة**
Refrigerator (Frigidaire, USA)	**٥. ثلاجة**
Sensitive balance (Sartorius, Germany)	**٦. ميزان حساس**
Distiller (Ogawaseiki, Japan)	**٧. جهاز تقطير**
pH-meter (Fischer, USA)	**٨. جهاز قياس الأس الهيدروجيني**
Centrifuge (Hermle, Germany)	**٩. جهاز طرد مركزي**
Microfuge (Eppendorf, USA)	**١٠. جهاز طرد مركزي دقيق**
Water bath (Memmert, Germany)	**١١. حمام مائي**
Magnetic stirrer (Gallenkamp,England)	**١٢. مازج مغناطيسي**
Compound light microscope (Olympus, Japan)	**١٣. مجهر ضوئي مركب**
Gel electrophoresis cell (Helena laboratories, USA)	**١٤. جهاز الترحيل الكهربائي الهلامي**
Power supplier (Gelman sciences Inc.)	**١٥. مجهز قدرة**
UV-Transilluminator (Herolab, Germany)	**١٦. مصدر الأشعة فوق البنفسجية**
Photographic camera(Yoshica, Japan)	**١٧. كاميرا فوتوغرافية**
Digital camera(Orite, Taiwan)	**١٨. كاميرا رقمية**
Millipore filters(٠.٢٢,٠.٤٥mm) (Sartorius, Germany)	**١٩. مرشحات غشائية نبيذة ذات ثقوب بقطر ٠.٢٢ و٠.٤٥ مايكروميتر**
Micropipettes (Oxford,England)	**٢٠. ماصات دقيقة مختلفة الأحجام**

٢.١.٣ المواد الكيمياوية Chemicals

١. كلوريد الصوديوم، لايسين، آرجنين، صبغة الفينول الحمراء، فنيل الانين،لاكتوز،تربتون،خلاصة الخميرة،ألفا-نفثيل أمين*ρ* - dimethylaminobenzaldehyde	Fluka, Switzerlad
٢. هيدروكسيد الصوديوم، أثيلين-ثنائي أمين-رباعي حامض الخليك-ثنائي الصوديوم، كبريتات دوديسيل الصوديوم، أيزوبروبانول، فينول، فوسفات ثنائية الصوديوم الهيدروجينيه اللامائيه، صبغة البروموفينول الزرقاء، كليسيرول، كلوريد الباريوم المائي، حامض الكبريتيك المركز، ٨.هيدروكسي كوانيلين، بيروكسيد الهيدروجين، هيدروكسيد البوتاسيوم، نترات البوتاسيوم ، كلوريد الحديديك، حامض الهيدروكلوريك المركز،حامض السلفونيك ، حامض الخليك ، كلوكوز، سكروز، مانيتول، زايلوز، تريهالوز، مانوز، مالتوز، كلوروفورم، أيودين.	B.D.H., England
٣. حامض البوريك، ترس الحامضي، البلورات البنفسجية، صبغة السفرانين، صبغة أحمر المثيل	Merck, Germany
٤. أسيتون	Diagnostic internatiol Inc.,USA
٥. ألفا-نفثول	Surechem, England
٦. كحول أثيلي	Gainland Chemical Company, U.K.
٧. صبغة بروميد الأثيديوم ، أكاروز	Sigma,USA
٨. ببتون	HiMedia Laboratoris,Spain
٩.لايسوزايم	CinnaGen Inc.,Iran

٣.١.٣ الأوساط الزرعيه Culture media

١. وسط أكار الدم الأساس،وسط المرق المغذي،وسط مرق صويا التربتيكيز ، وسط تربتون الصويا السائل	Oxoid, England
٢. وسط الاكار المغذي، وسط أكار الماكونكي، وسط مولر هنتن، وسط نقيع القلب والدماغ السائل، وسط أكار كلكلر الحديد، وسط أكار سترات سيمون، وسط مرق أحمر المثيل	HiMedia Laboratoris, Spain

والفوكس بروسكاور، وسط أكاراليوريا الأساس، وسط أكار سالمونيلا-شيكلا، وسط أكار المانيتول الملحي، وسط أكار المثيلين – الايوسين

٤.١.٣ مضادات الحياة Antibiotics

جدول٣-١. مساحيق مضادات الحياة Antibiotic powders

مضاد الحياة	الرمز	الشركة المصنعة
أمبسيلين (Ampicillin)	Ap	S.D.I.,Iraq
أمبكلوكس (Ampiclox)	Apx	
تتراسايكلين (Tetracyclin)	Tc	
كلورامفينيكول(Chloramphenicol)	Cm	Sigma,USA
تراي ميثبريم (Trimethoprim)	Tp	
جنتامايسين (Gentamycin)	G	
ارثرومايسين (Erythromycin)	E	

جدول٣-٢. أقراص مضادات الحياة Antibiotic disks

مضاد الحياة	الرمز	التركيز (مايكروغرام)	الشركة المصنعة
أميكاسين (Amikacin)	Ak	٣٠	Bioanalyse
أموكسيسيلين (Amoxicillin)	Ax	٢٥	
أمبسلين (Ampicillin)	Ap	١٠	
كلورامفينيكول (Chloramphenicol)	Cm	٣٠	
ارثرومايسين (Erythromycin)	E	١٥	
جنتامايسين (Gentamycin)	G	١٠	
نالديكسيك اسيد (Naliddixic acid)	Nal	٣٠	
ريفامبسين (Rifampicin)	Rif	٥	
تتراسايكلين (Tetracyclin)	Tc	٣٠	
تراي ميثبريم (Trimethoprim)	Tp	٥	

سيفوتاكسم (Cefotaxime)	CTX	٣٠	Oxoid,England
نوفوبايوسين (Novobiocin)	NV	٣٠	Sigma,USA

٣.١.٥ المطهرات Disinfectants

جدول٣-٣. انواع المطهرات المختبرة ، تراكيزها ، والشركات المصنعة لها

الأسم التجاري	التركيب الكيمياوي	التركيز	الشركة المصنعة
هكساتان (Hexatane)	Chlorhexidine gluconate	%٥	S.D.I., Iraq
ديتول (Dettol)	Chloroxy lenol	%٥	S.D.I., Iraq
سابتون (Sapton)	Chlorhexidine+Citramide	%١٥+%١.٥	Al-Rahma pharmaceutical Co.,Jordan
أيودين (Braunol)	Polyvinyl pyrrolidone - Iodine	%١٠	B.Braun Medical AG,Switzerland
كحول (Alcohol)	Ethyl Alcohol	%٧٠	S.D.I., Iraq

٣.١.٦ السلالة البكتيرية القياسية المستخدمة Standard bacterial strain

جدول٣-٤. السلالة البكتيرية ، تركيبها الوراثي ، ومصدرها

السلالة البكتيرية	التركيب الوراثي	المصدر
E.coli MM٢٩٤	*hsdM*$^{+}$, *hsdR*$^{-}$, *recA*$^{-}$, *Rif* ^{r}, *end AI*$^{-}$, *pro*$^{-}$, *thi*$^{-}$	معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الأحيائية للدراسات العليا – جامعة بغداد

المختصرات:

hsdM^{+} : عدم وجود نظام التحوير.

hsdR^{-} : عدم وجود نظام التقييد.

rec A^{-} : فقدان نظام اعادة الارتباط.

Rif ^{r} : المقاومة للريفامبسين.

end AI^{-} : فاقدة لانزيم endonuclease

pro^- , thi^- : الحاجة للثايمين و البرولين

٧.١.٣ المحاليل والدواريء والكواشف Solutions, Buffers and Reagents

١.٧.١.٣ محاليل صبغة غرامGram stain solutions

تم تحضيرها وفق تعليمات الشركة المنتجة لها وكما جاء في Macfaddin (٢٠٠٠) ،استعملت هذه المحاليل لدراسة الخصائص المظهريه لخلايا البكتريا المعزوله تحت القوة الكبرى للمجهر الضوئي المركب.

٢.٧.١.٣ محلول ماكفرلاند Macfrland solution

حضر هذا المحلول حسب ما جاء في Macfaddin (٢٠٠٠) ويتكون من جزئين:

المحلول الأول:حضر بإذابة ١.٧٥غم من كلوريد الباريوم المائي ($BaCl_2H_2O$) في ١٠٠مل من الماء المقطر.

المحلول الثاني:حضر بإضافة ١مل من حامض الكبريتيك المركز(H_2SO_4) إلى ١٠٠مل من الماء المقطر.

أضيف ٠.٥ من المحلول الأول إلى ٩٩.٥ من المحلول الثاني. استعمل هذا المحلول لإعطاء عدد تقريبي للخلايا البكتيرية($15*10^8$ خلية/مل) عند إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية.

٣.٧.١.٣ محلول كلوريد الصوديوم NaCl(٥ مولاري)

حضر هذا المحلول بإذابة ٢٩.٢١ غم من كلوريد الصوديوم في ٩٠ مل من الماء المقطر واكمل الحجم الى ١٠٠ مل ثم عقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند/انج^2 لمدة ١٥ دقيقة . استعمل هذا المحلول في عملية استخلاص الدنا (Pospiech & Neuman,١٩٩٥) .

٤.٧.١.٣ محلول كبريتات دوديسيل الصوديوم SDS (٢٥٪)

حضر هذا المحلول باذابة ٢٥ غم من SDS في ١٠٠ مل ماء مقطر. استعمل هذا المحلول في عملية استخلاص الدنا(Pospiech & Neuman,١٩٩٥) .

٥.٧.١.٣ محلول كبريتات دوديسيل الصوديوم (SDS) (١٠٪)

حضر المحلول بإذابة ١٠ غم من هذه المادة في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم الى ١٠٠ مل ، ثم سخن المحلول الى درجة حرارة ٥٥ م لمدة ٣-٢ دقيقة ، وحفظ عند درجة حرارة الغرفة. استعمل هذا المحلول في تجارب التحييد وحضرت منه تراكيز مختلفة (Pospiech & Neuman,١٩٩٥) .

٦.٧.١.٣ محلول الفينول Phenol solution

حضر باذابة بلورات الفينول الشفافة داخل قنينة معتمة بوضعها في حمام مائي عند درجة حرارة ٦٨ م° واضيف لها ٠.١ غم من مادة 8-hydroxy quaniline كمادة مانعة للأكسدة و أضيف له حجم مساوي من ٠.٥ مولاري Tris-Cl (PH=٨) مزج المحلول جيدا باستعمال المازج المغناطيسي لمدة ١٥ دقيقة ثم ترك بدون تحريك وبعد انفصال الطبقة المائية الحاوية على Tris-Cl والشوائب إلى الأعلى والفينول إلى الأسفل رفعت الطبقة المائية بماصة زجاجية وأعيدت المعاملة السابقة باستخدام ٠.١ مولاري Tris-Cl (PH=٨) وكررت العملية لحين وصول الأس الهيدروجيني إلى ٨ ، بعدها أزيلت الطبقة المائية وحفظ الفينول تحت طبقة من الدارئ في عبوة معتمة عند درجة حرارة ٤ م° وبقى صالحا للاستخدام لمدة شهر (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩) .

٧.٧.١.٣ محلول الكلوروفورم : ايزواميل الكحول

حضر بمزج الكلوروفورم مع الايزواميل بنسبة ٢٤: ١ . إستعمل هذا المحلول في عملية استخلاص الدنا (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩) .

٨.٧.١.٣ محلول الفينول : كلوروفورم : ايزواميل الكحول

حضر بمزج الفينول مع الكلوروفورم والايزواميل بنسبة ٢٥:٢٤:١.استعمل هذا المحلول في عملية استخلاص الدنا (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩) .

٩.٧.١.٣ محلول بروميد الاثيديوم Ethydium bromide

حضر بإذابة ٠.٢٥غم من صبغة بروميد الاثيديوم في ٥٠ مل من الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي ٥ ملغم / مل . استعملت هذه الصبغة لتصبيغ حزم الدنا المراد ترحيلها

. (Sambrook *et al.*,١٩٨٩)

١٠.٧.١.٣ محاليل مضادات الحياة الخزينة Stock antibiotic solutions

حضرت هذه المحاليل اعتمادا على Miniatis وجماعته ١٩٨٢ و Sambrook وجماعته ١٩٨٩ ، وعقمت جميعها بالترشيح ، وكالآتي :

١. محلول الامبسلين Ampicillin (Ap)

حضر بأذابة ٠.٥ غم من مضاد الحياة في كمية من الماء المقطر المعقم ثم اكمل الحجم الى ٥٠ مل للحصول على تركيز نهائي ١٠ ملغم/مل .

٢. محلول الأمبكلوكس Ampiclox (Apx)

حضر بأذابة ٠.٥ غم من مضاد الحياة في كمية من الماء المقطر المعقم ثم اكمل الحجم الى ٥٠ مل للحصول على تركيز نهائي ١٠ ملغم/مل .

٣. محلول التتراسايكلين Tetracyclin (Tc)

حضر بأذابة ٠.٢٥ غم من مضاد الحياة في كمية من الكحول ثم أكمل الحجم الى ١٢٥ مل للحصول على تركيز نهائي ٢ ملغم/مل .

٤. محلول التراي ميثوبريم Trimethoprim (Tp)

حضر بأذابة ٠.١ غم من مضاد الحياة في كمية من الاسيتون ثم أكمل الحجم الى ٢٠ مل للحصول على تركيز نهائي ٥ ملغم/مل .

٥. محلول الكلورامفينيكول Chloramphenicol (Cm)

حضر بأذابة ٠.٢٥ غم من مضاد الحياة في كمية من الاسيتون ثم اكمل الحجم الى ١٠٠ مل للحصول على تركيز نهائي ٢.٥ ملغم/مل .

٦. محلول الجنتامايسين Gentamicin (G)

حضر باذابة ٠.٨ غم من مضاد الحياة في كمية من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم الى ٨٠ مل للحصول على تركيز نهائي ١٠ ملغم/مل .

٧. محلول الأرثرومايسين Erythromycin (E)

حضر بأذابة ٠.٥ غم من مضاد الحياة في كمية من الماء المقطر المعقم ثم اكمل الحجم الى ٥٠ مل للحصول على تركيز نهائي ١٠ ملغم/مل .

١١.٧.١.٣ دارئ Tris-HCl (٠.١ مولاري)

حضر باذابة ١.٢١١٤غم من هذه المادة في ٩٠ مل ماء مقطروعدل الأس الهيدروجيني الى ٨ ثم اكمل الحجم الى ١٠٠مل . استخدم هذا الدارئ في غسل الفينول (Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

١٢.٧.١.٣ دارئ Tris-HCl(٠.٥ مولاري)

حضر باذابة ٦.٥٧غم من هذه المادة في ٩٠ مل ماء مقطروعدل الأس الهيدروجيني الى ٨ ثم اكمل الحجم الى ١٠٠مل . استخدم هذا الدارئ في غسل الفينول Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

١٣.٧.١.٣ دارئ Tris-EDTA

حضر من ١٠ ملي مولاري Tris-HCl،١ ملي مولاري Na_2 EDTA أذيبت في ٩٠ مل من الماء المقطر، عدل الأس الهيدروجيني إلى ٨ وأكمل الحجم إلى ١٠٠مل ثم عقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند/انج^2 لمدة ١٥ دقيقة. استخدم هذا الدارئ في عملية استخلاص الدنا (Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

١٤.٧.١.٣ دارئ التحميل Loading buffer

يتكون من ٠.٢٥ غم من صبغة البروموفينول الأزرق و٤٠ % سكروز في ١٠ مل من الماء المقطر. استعمل هذا الدارئ لتحميل مستخلص الدنا قبل وضعه في الهلام لترحيله كهربائيا (Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

١٥.٧.١.٣ دارئ Tris – Boric acid – EDTA buffer(T.B.E.)

يتكون من ٠.٠٨٩ مولاري Tris-base، ٠.٠٨٩ مولاري حامض البوريك، ٠.٠٠٢ مولاري EDTA اذيبت في ٥٠٠ مل من الماء المقطر وعدل الأس الهيدروجيني إلى ٨ ثم عقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند/انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة.استعمل هذا الدارئ لتحضير هلام الأكاروز ولغمر الهلام في وحدة الترحيل (Sambrook *et al.*,١٩٨٩) .

١٦.٧.١.٣ كاشف الكاتاليز Catalase reagent

مزج بإذابة ٣٠ مل من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) في ٧٠ مل من الماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة عند درجة حرارة ٤ م^{o} .استعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الكاتاليز (Macfaddin,٢٠٠٠) .

١٧.٧.١.٣ كاشف الاوكسيديز Cytochrome c oxidase reagent

حضر هذا الكاشف آنيا بإذابة ١ غم من مادة *N*',*N*',*N*,*N*,-tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride في ١٠٠مل من الماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة . استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الاوكسيديز (Macfaddin, ٢٠٠٠)..

١٨.٧.١.٣ كاشف كوفاكس Kovac's reagent

حضر بإذابة ٥ غم من مادة *p*-Dimethyl amino benzaldehyde في ٧٥ مل من الكحول الاميلي باستعمال الحمام المائي عند درجة حرارة ٥٠ م^{o} ثم برد وبعدها أضيف ٢٥ مل من حامض الهيدروكلوريك المركز بصورة تدريجية إلى المزيج وحفظ في قنينة معتمة. استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج جذر الاندول (Macfaddin, ٢٠٠٠).

١٩.٧.١.٣ كاشف احمر المثيل Methyl red reagent

حضر بإذابة ٠.١ غم من احمر المثيل في ٣٠٠ مل من الكحول الاثيلي (٩٥٪) واكمل الحجم إلى ٥٠٠ مل من الماء المقطر. استعمل هذا الكاشف للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج حامض كناتج نهائي للتحلل الكامل للسكريات (Macfaddin,٢٠٠٠).

٢٠.٧.١.٣ كاشف فوكس بروسكاور Voges-Proskauer reagent

حضر هذا الكاشف اعتمادا على ما جاء في Macfaddin(٢٠٠٠) على النحو التالي :

١- كاشف ألفا نفثول (Alpha-nephthol): حضر بإذابة ٥ غم منه في ١٠٠مل من الماء المقطر.

٢- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH (٤٠%): حضر بإذابة ٤٠ غم منه في ١٠٠مل من الماء المقطر. استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على التحليل الجزئي للسكريات .

٢١.٧.١.٣ كاشف كلوريد الحديديك $FeCl_3$ reagent

حضر هذا الكاشف بإذابة ١٢ غم من كلوريد الحديديك في ٢.٥ مل من حامض الهيدروكلوريك المركز وأكمل الحجم إلى ١٠٠مل من الماء المقطر. استعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم Phenyl alanine deaminase (Macfaddin,٢٠٠٠).

٢٢.٧.١.٣ كاشف اختزال النترات Nitrate reduction reagent

حضر هذا الكاشف حسب ما جاء في Macfaddin(٢٠٠٠) ويتكون من محلولين هما :

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 م^{o} .

محلول B : حضر باذابة ٠.٥ غم من ألفا- نفثيل أمين في ١٠٠ مل من ٥ عياري حامض الخليك وحفظ في قنينة معتمة عند درجة حرارة ٤ م^{o} .

وعند الإستعمال تمزج كميات متساوية من المحلولين . استعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على اختزال النترات .

٨.١.٣ الاوساط الزرعية Culture media

١.٨.١.٣ الاوساط الزرعية الجاهزة

١. وسط اكار الماكونكي MacConkey agar

استعمل هذا الوسط لتنمية البكتريا السالبة لصبغة غرام ومعرفة قابليتها على تخمير اللاكتوز.

٢. وسط الاكار المغذي الصلب Nutrient agar

استعمل هذا الوسط للعزل الأولي للبكتريا وعدها ودراسة الخصائص المظهرية للمستعمرات.

٣. وسط اكار مولر-هنتن الصلب Muller-Hinton agar

استعمل هذا الوسط لأجراء اختبار الحساسية لمضادات الحياة .

٤. وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain heart infusion broth

استعمل هذا الوسط لتنشيط البكتريا .

٥. وسط الاكار المغذي السائل Nutrient broth

استعمل هذا الوسط لتنمية وتنشيط البكتريا المعزولة .

٦. وسط اكار تربتك سوي Tryptic soya agar

استعمل هذا الوسط لتنمية وتشخيص بكتريا *P.aeruginosa* .

٧. وسط اكار كلكر Kligler's iron agar

استعمل هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على تخمير سكري الكلوكوز واللاكتوز وانتاج غاز H_2S .

٨. وسط اكار سترات سيمون Simmon's citrate agar

استعمل هذا الوسط للتحري عن قدرة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون

٩. وسط مرق احمر المثيل والفوكس بروسكاور Methyl Red-Voges Proskaur broth (MR-VP broth)

استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على التحليل الكامل والجزئي للسكريات.

١٠. وسط اكار ايوسين-ازرق المثيلين Eosine-Methylene blue agar.

استعمل هذا الوسط لتنمية وتشخيص بعض الأجناس البكتيرية العائدة للعائلة المعوية .

١١. وسط اكار سالمونيلا- شيگلا *Salmonella- Shigella* agar

استعمل هذا الوسط لعزل وتشخيص عزلات بكتريا *Salmonella* و*Shigella*.

١٢. وسط اكار المانيتول الملحي Mannitol salt agar.

استعمل هذا الوسط لتنمية وتشخيص بكتريا العنقوديات المخمرة لسكر المانيتول .

حضرت جميع هذه الاوساط حسب تعليمات الشركة المصنعة لها وعقمت باستخدام الموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م^{o} وضغط ١٥ باوند/انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة باستثناء وسط اكار سالمونيلا- شيگلا الذي عقم بالتسخين حتى الغليان لمدة ٢-٣ دقيقة (Macfaddin, ٢٠٠٠).

١٣. وسط اكار الدم Blood agar

حضر هذا الوسط بإضافة ٥% من دم الانسان الى وسط اكار الدم الاساس (Blood base) المعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند/انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة والمبرد الى درجة حرارة ٤٥ م^{o} .استعمل هذا الوسط لعزل وتنمية جميع الأنواع البكتيرية ومعرفة قابليتها على تحليل كريات الدم الحمر ونوع ذلك التحلل (Macfaddin, ٢٠٠٠).

١٤. وسط اكار اليوريا Urea agar

حضر هذا الوسط بأضافة ١٠ مل من محلول اليوريا المحضر بتركيز ٢٠% بعد تعقيمه بالترشيح الى ١٠٠ مل من وسط اكار اليوريا الاساس (Urea agar base) المعدل رقمه الهيدروجيني الى ٦.٨ والمعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند/انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة والمبرد الى درجة حرارة ٥٠ م^{o}.استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم اليوريز(Macfaddin, ٢٠٠٠).

٢.٨.١.٣ الاوساط الزرعية المحضرة

١. وسط لوريا- بيرتاني السائل Lauria-Bertani broth

حضر هذا الوسط بأذابة المكونات الاتية في ٩٥٠ مل من الماء المقطر: ١٠ غم تربتون و١٠ غم كلوريد الصوديوم و٥ غم مستخلص الخميرة ، ثم عدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٢ واكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ثم عقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند/انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة.استعمل هذا الوسط لتنمية البكتريا المراد استخلاص الDNA لها (Maniatis *et al.*, ١٩٨٢).

٢. وسط ماء الببتون Peptone water (١%)

حضر هذا الوسط بأذابة ١٠ غم من الببتون و٥ غم من كلوريد الصوديوم في لتر من الماء المقطر باستعمال حمام مائي، بعدها وزع في انابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند/انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة.استعمل هذا الوسط للتحري عن امكانية البكتريا على انتاج جذر الأندول (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣. وسط الفنيل الانين Phenylalanine

حضر هذا الوسط بأذابة ٢ غم من الفنيل الانين و٣ غم مستخلص الخميرة و٥ غم كلوريد الصوديوم و١ غم فوسفات الصوديوم الهيدروجينية اللامائية و١٢ غم اكار في ٥٠٠ مل من الماء المقطر، ثم عدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٣ واكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل ووزع في أنابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند/انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة وترك ليتصلب بشكل مائل .استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الفنيل الانين دي امينيز وتكوين حامض الفنيل بايروفيك (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٤. وسط ازالة مجموعة الكربوكسيل COOH– من الآرجنين

حضر هذا الوسط بأذابة ٥ غم ببتون و٣ غم مستخلص الخميرة و١ غم كلوكوز أذيبت جميعها في ٩٥٠ مل من الماء المقطر ثم عدل الاس الهيدرجيني الى ٦.٧ ، ثم اضيف ١٠ مل من دليل Bromothymol Blue المحضر بتركيز ٠.٢%، خلطت المواد جيداً وأكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل وعقم الوسط بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند/انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة ثم اضيف محلول الآرجنين (والمحضر بتركيز ٠.٥% بعد تعقيمه بالترشيح) . وزع الوسط في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة .استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على ازالة مجموعة الكربوكسيل من الآرجنين (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٥. وسط تخمر السكريات Sugar's fermentation medium

يتكون هذا الوسط من:

أ- الوسط الاساس Basal medium

حضر هذا الوسط بأذابة ١٠ غم من الببتون ،١ غم من خلاصة اللحم ،٥ غم كلوريد الصوديوم، ٠.٠١٨ غم من صبغة الفينول الاحمر، و٥ غم من الاكار في لتر من الماء المقطر، ثم عدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٥ ، بعدها وزع في انابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ باوند/انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة وبرد الى درجة حرارة ٤٥-٥٠ م^{o} (Macfaddin, ٢٠٠٠).

ب- محاليل السكريات Sugar solutions

حضرت هذه المحاليل بأذابة ١٠ غم منها في ١٠٠ مل من الماء المقطر واضيف لكل ١٠٠ مل من الوسط الاساس المعقم ١٠ مل من محلول السكر ذو التركيز ١٠% المعقم بالترشيح ليكون التركيز النهائي للسكر ١% (Macfaddin, ٢٠٠٠).

استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على استهلاك السكريات وانتاج غاز .

٦. وسط اختزال النترات Nitrate reduction medium

حضر باذابة ٣ غم من مرق تربتون الصويا و٠.١ غم من نترات البوتاسيوم في ٩٥ مل من الماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني الى ٧.٣ وأكمل الحجم الى ١٠٠ مل ثم وزع في أنابيب اختبار وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م^{o} وضغط ١٥ باوند/انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة. استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على اختزال النترات (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٧. وسط الحركة Motility medium

حضر هذا الوسط بأذابة ٣ غم من خلاصة اللحم و١٠ غم من الببتون و٥ غم كلوريد الصوديوم و٤ غم من الاكار في لتر من الماء المقطر باستعمال الحمام المائي وضبط الأس الهيدروجيني الى ٧.٣ بعدها وزع الوسط في انابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م^{o} وضغط ١٥ باوند/انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة.استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على الحركة (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٢.٣ طرائق العمل Methods

١.٢.٣ جمع العينات Samples collection

خلال المدة من كانون الاول ٢٠٠٤ الى نيسان ٢٠٠٥ جمعت ١٣٠ عينة من العدد الطبية (القثاطر، العدد داخل رحمية ، عدد تثبيت الكسور ، والمصارف بأنواعها) المستخدمة في علاج المرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى الحلة التعليمي العام في الحلة. جمعت هذه العينات بقص ٥ سم من فوهة العدة الداخلة في الجسم (Ryder,٢٠٠٥) ووضعت في أنابيب اختبار حاوية على ٥ مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل المعقم ، وحضنت هوائياً ولاهوائياً بواقع أنبوبتي اختبار لكل عينة عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤-٤٨ ساعة، بعد ذلك أعيد زرعها على الأوساط الزرعية المختلفة.

٢.٢.٣ التشخيص Diagnosis

تم تشخيص العزلات البكتيرية المستحصل عليها اعتماداً على ما جاء في Macfaddin(٢٠٠٠) وكما يأتي:-

١.٢.٢.٣ الخصائص المظهرية Morphological characteristics

درست الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية ، ثم فحصت الصفات المظهرية للخلايا تحت المجهر الضوئي المركب بعد تصبيغها بصبغة غرام وملاحظة تفاعلها مع صبغة غرام، شكل الخلايا وانتظامها مع بعضها، وغيرها من الصفات .

٢.٢.٢.٣ الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

١.اختبار الكشف عن انتاج انزيم الكاتاليز Test for detection of catalase production

نقلت كمية قليلة من النمو البكتيري بواسطة اعواد خشبية معقمة (Sticks) الى شريحة زجاجية نظيفة وجافة ووضع فوقها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين (٣٠%)، النتيجة الايجابية لهذا الاختبار هي تكون فقاعات هوائية نتيجة تحرر غاز الاوكسجين من النمو البكتيري المختبر (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٢.اختبار الكشف عن الانزيم المؤكسد Test for detection of cytochrome C oxidase

أضـيفت عـدة قطـرات مـن كاشـف *N′,N′,N,N*-tetramethyl-*ρ*-phenylene diamine dihydrochloride (١%) المحضر آنياً على ورقة ترشيح نظيفة وجافة كانت قد وضعت في طبق بتري معقم، نقل جزء قليل من المستعمرة بعمر ٢٤ ساعة بواسطة عود خشبي معقم الى ورقة الترشيح المشبعة بالكاشف. النتيجة الايجابية لهذا الاختبار هي تحول لون النمو البكتيري المنقول الى اللون البنفسجي الغامق خلال ١٠ ثوان (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣. اختبار الكشف عن انزيم مخثر بلازما الدم Coagulase test

أضيف ٠.١ مل من المزروع البكتيري بعمر ١٨ ساعة الى أنبوبة زجاجية معقمة حاوية على ٠.٤ مل من بلازما بشرية وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ م° ثم سجلت النتائج اذ يشير تكتل البلازما خلال مدة تتراوح من ٥ دقائق الى ٤ ساعات الى النتيجة الموجبة (Macfadddin,٢٠٠٠) .

٤.اختبار الاندول Indol test

لقح وسط ماء الببتون بالمزروع البكتيري وحضن لمدة ٢٤-٤٨ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ م° ، ثم اضيف لكل انبوبة ٥ قطرات من كاشف كوفاكس ورجت الانبوبة بهدوء، دل تكون حلقة دائرية حمراء في اعلى الوسط على ايجابية الاختبار نتيجة انفصال جذر الاندول من الببتون (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٥.اختبار احمر المثيل- فوكس بروسكاور Methyl red- Voges proskaur test

اجري هذا الاختبار بتلقيح مجموعتين من الانابيب الحاوية على وسط MR-VP السائل بالمزروع البكتيري وحضنت كلتا المجموعتين عند درجة حرارة ٣٧ م° ، المجموعة الاولى لمدة ٤٨ ساعة بعد الحضن اضيف لها ٥ قطرات من كاشف احمر المثيل دل تحول لون الوسط من اللون الاصفر الشاحب الى اللون الاحمر على التحلل الكامل للسكر وانتاج الحامض. اما المجموعة الثانية فقد حضنت لمدة ٢٤ ساعة ثم أضيف لها ٠.٦ مل من كاشف الفانفثول و٠.٢ مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (٤٠٪) دل تحول لون الوسط من الاصفر الشاحب الى الاحمر الكرزي بعد مرور ١٥-٣٠ دقيقة على التحلل الجزئي للسكر وانتاج مركب Acetyl methyl carbonil (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٦.اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test

لقح وسط اكار سيمون ستريت المائل بالمزروع البكتيري وحضن عند درجة حرارة٣٧ م° لمدة ٢٤-٤٨ ساعة. ايجابية هذا الاختبار تمثلت بتحول لون الوسط من الاخضر الى الازرق نتيجة قدرة البكتريا على استهلاك سترات الصوديوم كمصدر وحيد للكربون (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٧.اختبار الكشف عن انزيم اليوريز Urease Test

لقح وسط اكار اليوريا المائل بالمزروع البكتيري وحضن عند درجة حرارة ٣٧ م° وفحص بعد مرور ٤-٢٤ ساعة. النتيجة الايجابية لهذا الاختبار هي تغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي نتيجة انتاج انزيم اليوريز (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٨.اختبار تخمر السكريات وانتاج غاز كبريتيد الهيدروجين Sugar fermentation test & H_2S production

لقح وسط اكار كلكر والحديد المائل بالمزروع البكتيري بطريقة الطعن والتخطيط وحضن عند درجة حرارة٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة، لوحظت التغيرات الحاصلة في لون الوسط نتيجة التخمر حيث يحوي هذا الوسط على كاشف احمر الفينول الذي يتغير لونه بتغير الأس الهيدروجيني للوسط، كما لوحظ تكون الغاز او عدم تكونه في اسفل الأنبوبة الذي يؤدي تكونه الى حصول تشققات في الوسط وارتفاعه الى الأعلى ، وايضاً لوحظ تكوين غاز كبريتيد الهيدروجين من قبل بعض العزلات البكتيرية بهيئة راسب اسود في قعر الانبوبة نتيجة وجود ثايوسلفات الصوديوم و سترات الامونيوم والحديد (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٩.اختبار تخمر السكريات Sugar fermentation test

لقح وسط تخمر السكريات بالمزروع البكتيري وحضن عند درجة حرارة٣٧ م° لمدة ٢٤-٤٨ ساعة. ان تغير لون الوسط من الاحمر الى الاصفر دل على ايجابية الاختبار ولوحظ احياناً تكون غاز بهيئة فقاعات غازية في الوسط باستعمال انبوبة درهم (Macfaddin, ٢٠٠٠).

١٠.اختبار اختزال النترات Nitrate reduction test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط اختزال النترات بالمزروع البكتيري وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٤٨ ساعة ثم أضيفت قطرات من الكاشف . دل ظهور اللون الأحمر خلال ٣٠ ثانية على النتيجة الموجبة (Macfaddin, ٢٠٠٠) .

١١.اختبار ازالة مجموعة الكربوكسيل Decarboxylase test

لقح وسط Falkow decarboxylase السائل الحاوي على الحامض الاميني اللايسين او الآرجنين بالمزروع البكتيري وحضن عند درجة حرارة٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة. النتيجة الايجابية لهذا الاختبار هي بقاء لون الوسط البنفسجي كما هو نتيجة ازالة مجموعة الكربوكسيل من الحامض الاميني، في حين تحول الوسط من البنفسجي الى الاصفر دليل على سالبية الاختبار نتيجة تخمر السكر الموجود في الوسط (Macfaddin, ٢٠٠٠).

١٢.اختبار ازالة مجموعة الأمين من الفنيل الانين Phenylalanine deaminase test

لقح وسط اكار الفنيل الانين المائل بالمزروع البكتيري وحضن عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة . تمثلت النتيجة الموجبة بتكون اللون الأخضر على السطح المائل بعد اضافة كاشف كلوريد الحديديك بسبب انتاج انزيم Phenylalanine deaminase وتكون Phenyl pyruvic acid من Phenylalanine (Macfaddin, ٢٠٠٠).

١٣. اختبار الحركة Motility test

لقح وسط الحركة بالمزروع البكتيري بطريقة الطعن باستعمال ابرة ناقلة معقمة، وحضن عند درجة حرارة٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة. النتيجة الايجابية لهذا الاختبار هي انتشار النمو البكتيري خارج محور الطعن وحدوث عكورة في الوسط أي ان البكتريا متحركة في حين دل بقاء النمو في محور الطعن على سالبية الاختبار أي ان البكتريا غير متحركة (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣.٢.٣ حفظ وادامة العزلات Storage and maintenance of isolates

١.٣.٢.٣ الحفظ قصير الأمد

لقح وسط الأكار المغذي بالعزلات المشخصة وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة ثم أحيطت الأطباق بشريط شمعي لاصق (Para film) . جمعت الأطباق داخل أكياس معلمة وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ م° لمدة شهر واحد (Harly and Prescott,١٩٩٦) .

٢.٣.٢.٣ الحفظ متوسط الأمد

لقح وسط ط الأكار المغذي المائل بالعزلات المراد حفظها ثم حضن عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة بعد ذلك أحيطت سدادات الأنابيب بشريط شمعي لاصق وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ م° لمدة تتراوح بين ١-٤ أشهر (Harly and Prescott,١٩٩٦).

٣.٣.٢.٣ الحفظ طويل الأمد

لقحت أنابيب حاوية على ١٠ مل من المرق المغذي بمقدار ٠.١ مل من مزروع بكتيري عمره ٤ ساعات ، حفظت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة بعدها أخذ ١ مل من المزروع البكتيري النامي ونقل الى أنابيب معقمة حاوية على ١ مل من الكليسيرول المعقم ثم حفظت عند درجة حرارة -٢٠ م° لمدة ٦ أشهر (Karch *et al.*,١٩٩٥) .

٤.٢.٣ اختبار الحساسية الدوائية لمضادات الحياة Antibiotics sensitivity test

استعملت طريقة Kirby وBauer (١٩٦٦) المذكورة في Stukus (١٩٩٧) باستخدام اقراص مضادات الحياة المبينة أنواعها وتراكيزها واقطار التثبيط لها في ملحق١. ، اذ تم تحضير عالق بكتيري في الوسط المغذي السائل في انبوبة اختبار نظيفة ومعقمة، ثم حضنت في حاضنة عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢-٥ ساعات لحين الوصول إلى عكورة مقاربة لعكورة انبوبة ماكفرلاند المستخدمة كعالق قياسي، بعد ذلك نقل ٠.١ مل من العالق البكتيري ونشر على سطح وسط مولر- هنتن الصلب بواسطة ناشر(Spreader) معقم او مسحة قطنية معقمة وبثلاثة اتجاهات للحصول على نمو متجانس ، ترك الطبق لمدة ٣-٥ دقائق، ثم وضعت اقراص مضادات الحياة باستخدام ملقط معقم على سطح الوسط ، حضنت الأطباق عند درجة حرارة٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة، بعد ذلك قرئت النتائج بقياس اقطار مناطق التثبيط حول كل قرص بواسطة مسطرة ثم قورنت تلك الاقطار بالمعدلات القياسية لاقطار تثبيط مضادات الحياة اعتمادا على National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS) (١٩٩٧) .

٥.٢.٣ تقدير كفاءة المطهرات Estimation of disinfectants' effeciency

استخدمت الطريقة الامريكية المعتمدة من قبل هيئة الغذاء والدواء الأمريكية Food and Drug Adminstration (FDA) لتقدير فعالية المطهرات وهي طريقة معامل الفينول او طريقة AOAC (Association official agricultural chemists) والمذكورة في Pelczar وجماعته (١٩٨٦). حيث قدر معامل الفينول للمطهرات المستخدمة في مستشفى الحلة التعليمي العام (اليود ،الديتول ،السابتون ،الهكساتان، والكحول الاثيلي) على العزلات البكتيرية *P. aeroginosa* و *S. aureus*. وتلخصت هذه الطريقة كالاتي:-

١. حضرت سلسلة من تخافيف المطهر موزعة في أنابيب اختبار بحجم ٥ مل لكل انبوبة، ثم كررت نفس العملية على الفينول حيث حضرت منه تخافيف مكافئة لتخافيف ذلك المطهر.

٢. اضيف ٠.٥ مل من مزروع البكتريا بعمر ٢٤ ساعة الى تخافيف المطهر وبنفس الوقت تجري نفس العملية بإستخدام نفس التخافيف من مادة الفينول.

٣. حضنت كافة الانابيب (انابيب المطهر + البكتريا وانابيب الفينول + نفس البكتريا) في حمام مائي درجة حرارته ٢٠ م° على ثلاث مدد زمنية: ٥ ، ١٠ ، و١٥ دقيقة.

٤. بواسطة العروة الناقلة (Loop) نقل لقاح من كل انبوبة ونشر في اطباق معقمة حاوية على وسط الأكار المغذي الصلب .

٥. حضنت جميع الأطباق في حاضنة عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة ثم لوحظ النمو من عدمه.

٦. حدد التركيز القاتل الأدنى (MBC) لكل مطهر خلال ١٠ دقائق وليس ٥ وكذلك الحال بالنسبة للفينول ، ثم قدر معامل الفينول بتقسيم اعلى تخفيف من المطهر يقضي على البكتريا خلال ١٠ دقائق على اعلى تخفيف من الفينول يقضي على نفس البكتريا بنفس المدة الزمنية، أي ان:

$$\text{معامل الفينول للمطهر} = \frac{\text{اعلى تخفيف قاتل من المطهر خلال ١٠ دقائق}}{\text{اعلى تخفيف قاتل من الفينول خلال ١٠ دقائق}}$$

٦.٢.٣ استخلاص وتنقية الـDNA Extraction & purification of DNA

اتبعت طريقة الاخراج الملحي (Salting out) المحوره والمذكورة في Omran (٢٠٠٦) وتضمنت الطريقة الخطوات الاتية:-

١. نميت البكتريا المراد استخلاص الـ DNA منها بأخذ ملء الناقل من المزروع البكتيري النقي وتلقيحه في ٥٠ مل من وسط لوريا- بيرتاني السائل المضاف له مضاد حياة مناسب، وحضنت في حاضنة هزازة عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ١٨ ساعة وبسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة.

٢. جمعت الخلايا البكتيرية من الوسط السائل بواسطة الطرد المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق. تم التخلص من الرائق والاحتفاظ بالراسب واضيف له ٥ مل من دارئ TE ثم كررت عملية الطرد المركزي بنفس السرعة والزمن السابقين.

٣. كررت العملية السابقة مرتين الى ثلاث مرات لحين التخلص من بقايا الوسط الزرعي ثم علق الراسب في ٥ مل من داريء TE .

٤. اضيف ٥٠٠ مايكروليتر من محلول اللايسوزايم المحضر آنيا بتركيز ٢٠ مايكروغرام /مل الى العالق ومزج بقلب الأنبوبة مرتين بهدوء ، ثم حضن في حمام مائي عند درجة حرارة٣٧ م° لمدة ساعة.

٥. اضيف ٦٠٠ مايكروليتر من محلول SDS (٢٥%) وحضن في حمام مائي عند درجة حرارة ٥٥ م° لمدة ١٠ دقائق حتى يصبح المحلول رائقاً.

٦. اضيف ٢ مل من محلول كلوريد الصوديوم (٥ مولار) ثم مزج الخليط بقلب الأنبوبة مرتين الى ثلاث مرات بهدوء ثم تركت الأنابيب لتبرد الى درجة حرارة الغرفة .

٧. اضيف ٥ مل من مزيج فينول: كلوروفورم:آيزوأميل الكحول الى الخليط السابق ومزج بالتقليب المستمر لمدة ٣٠ دقيقة.

٨. نبذت الأنابيب بسرعة ١٠٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق، بعد ذلك سحبت الطبقة المائية العليا باستخدام ماصة دقيقة دون المساس بالطبقة الوسطى البروتينية ثم وضعت في انبوبة نظيفة ومعقمة.

٩. كررت الخطوتين ٧ و٨ لاجل التخلص من البروتينات قدر الامكان.

١٠. اضيف الايزوبروبانول المبرد عند درجة حرارة -٢٠ م° الى الرائق بحجم يعادل ٠.٦ من حجم الرائق.

١١. لفت خيوط الدنا باستخدام ماصة باستور معقمة وغسلت بايثانول ٧٠% مبرد للتخلص من الاملاح ثم تركت لتجف قليلاً بعدها ذوبت في ٤٠٠ مايكروليتر من دارئ TE وحفظت في انبوبة ابندروف عند درجة حرارة -٢٠ م° لحين الإستعمال .

٧.٢.٣ الترحيل الكهربائي الهلامي Gel electrophoresis

حضر هلام الاكاروز Agarose (٠.٨%) بإذابة ٠.٨ غم من الاكاروز في ١٠٠ مل من دارئ T.B.E ، سخن الاكاروز الى درجة حرارة ١٠٠ م° حتى الذوبان ثم برد الى درجة حرارة ٥٠ م° ، بعد ذلك اضيف له ١٥ مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم (٥ ملغم/مل)، سكب الهلام في صفيحة الاسناد (Gel Former) المحاطة حافاتها المفتوحة بالشريط اللاصق والموضوع قرب احد نهاياتها مشط تكوين الحفر (Comb) على بعد حوالي ١ سم من الحافة، ثم ترك الهلام يتصلب بوضع افقي لمدة ٣٠ دقيقة.

بعد التأكد من التصلب التام للهلام، رفع المشط والشريط اللاصق منه ووضعت صفيحة الاسناد الحاوية على الهلام في وحدة الترحيل الكهربائي الافقية ثم غمر الهلام بدارئ T.B.E بعد ذلك اضيفت مستخلصات الـ DNA الممزوجة بدارئ التحميل (٢٠ مايكروليتر من مستخلص الـ DNA مع ٥ مايكروليتر من دارئ التحميل) الى حفر الهلام بواقع ٢٥ مايكروليتر لكل حفرة بواسطة ماصة دقيقة، ثم ربطت اقطاب وحدة الترحيل الكهربائي الى مجهز القدرة ومرر التيار الكهربائي بفرق جهد مقداره ٤٠ فولت لمدة ١.٥-٣.٥ ساعة ، بعد ذلك فحص الهلام بالاشعة فوق البنفسجية عند طول موجي ٢٥٦ نانوميتر للتقصي عن الدنا وتم تصويره بكاميرا رقمية وفوتوغرافيه (Sambrook *et al.*,١٩٨٩) .

٨.٢.٣ تحييد البلازميدات Plasmids curing

اعتمـادا علـى Tomoeda وزملائـه (١٩٧٤) أجريـت عمليـة التحييـد باسـتخدام محاليـل SDS بتراكيز مختلفة بدءاً من ١% وصولاً الى ١٠% الى ان تم التوصل الى التركيز الامثل وكالاتي:-

١. حضرت التراكيز النهائية المذكورة من SDS مذابة في وسط لوريا- بيرتاني السائل، ثم وزعت في أنابيب معقمة .

٢. لقحت الأنابيب بنقل ٠.١ مل من المزروع البكتيري المنشط ، كما لقح أنبوب سيطرة يحوي على وسط لوريا- بيرتاني السائل فقط، وحضنت جميع الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة .

٣. نشر ٠.١ مل من التراكيز العالية التي أظهرت نموا، ومن أنبوب السيطرة على وسط الأكار المغذي ، وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة .

٤. تم التحري عن الخلايا المحيدة بانتخاب ١٠٠ مستعمرة نقلت الى أطباق حاوية على وسط الأكار المغذي المضاف له مضاد الحياة الملائم بتقنية الألتقاط والنقل Pick and Patch ، والى أطباق اخرى حاوية على نفس الوسط لكنها خالية من المضاد لتكون بمثابة أطباق مرجعية (Master plates) ،وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة .

٥. حددت المستعمرات التي فشلت في النمو على الأوساط الحاوية على مضاد الحياة والذي يدل على فقدانها صفة مقاومتها لذلك المضاد .

١.٤ العزل والتشخيص Isolation and diagnosis

اظهرت نتائج هذه الدراسة ان ٤٦ عينة من العدد الطبية (٣٥.٤%) من اصل ١٣٠ احتوت على الغشاء الحيوي البكتيري، توزعت اعدادها ونسبها كما هو موضح في جدول ٤-١ ، عزلت منها ٥٦ عزلة بكتيرية شخصت من خلال صفاتها المظهرية (الزرعية والمجهرية) والاختبارات الكيموحيوية (جدول٤-٢ و٤-٣) اعتماداً على جداول وطرائق تشخيص قياسية ذكرت في Holt وجماعته (١٩٩٤) و Macfaddin (٢٠٠٠).

جدول٤-١: الاعداد الكلية والنسب المئوية للعدد الطبية الحاوية على الاغشية الحيوية .

العدد الطبية	العدد الكلي للعدد	نسبتها المئوية	العدد الكلي للعدد الحاوية على الاغشية	نسبتها المئوية	عدد العزلات
١. مصرف القيح	٤٨	%٣٦.٩	١٩	%٣٩.٦	٢٢
٢.القثطار البولي	١٧	%١٣.١	٩	%٥٢.٩	١٢
٣.العدة الداخل رحمية	٢٢	%١٦.٩	٦	%٢٧.٣	٨

٤.الأنبوب الصدري	١٨	%١٣.٨	٤	%٢٢.٢	٦
٥.القثطار الوريدي المركزي	١٢	%٩.٢	٣	%٢٥	٣
٦.الأنبوب المعدي- الأنفي	٧	%٥.٤	٣	%٤٢.٩	٣
٧.مصرف الغرزة	٣	%٢.٣	١	%٣٣.٣	١
٨.عدة تثبيت الكسر	٣	%٢.٣	١	%٣٣.٣	١
العدد الكلي	١٣٠	%١٠٠	٤٦	%٣٥.٤	٥٦

جدول٤-٢: الاختبارات الكيموحيوية للعزلات الموجبة لصبغة غرام.

العزلة / الاختبار	*S. aureus*	*S. epidermidis*
انتاج انزيم الأوكسيديز	-	-
انتاج انزيم الكاتاليز	+	+
فحص النترات	+	+
تخمر سكر الكلوكوز	+	+
تخمر سكر اللاكتوز	+	+
حساسية مضاد النوفوبايوسين	S	S
انتاج انزيم مخثر البلازما	+	-
تخمر سكر المانيتول	+	-
تحلل كريات الدم الحمراء	β	α
انتاج الصبغات	صفراء	بيضاء

الرموز : +: نتيجة موجبة؛ -: نتيجة سالبة؛ *β*: تحلل الدم الكامل؛ α: تحلل الدم الجزئي

جدول٤-٣: الأختبارات الكيموحيوية للعزلات السالبة لصبغة غرام.

العزلة / الأختبار	*E. coli*	*K. pneumoniae*	*E. cloacae*	*P. mirabilis*	*S. typhimurium*	*S. dysenteriae*
انتاج انزيم الكاتاليز	+	+	+	+	+	+
انتاج انزيم الأوكسيديز	-	-	-	-	-	-
تحلل كريات الدم الحمر	γ	γ	β	γ	γ	γ
النمو على وسط أكار سالمونيلا-شيكلا	-	-	-	-	+	+
اختبار الحركة	+	-	+	+	+	-
اختبار الأندول	+	-	-	-	-	م
اختبار احمر المثيل	+	-	-	+	+	+
اختبار فوكس بروسكاور	-	+	+	م	-	-
اختبار استهلاك السترات	-	+	+	م	+	-
اختبار تحلل اليوريا	-	+	م	+	-	-
النمو على وسط كلكلر الحديد	ح/ح	ح/ح	ح/ح	ق/ح	ق/ح	ق/ح
انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين	-	-	-	+	+	-
تخمر سكر الكلوكوز/انتاج غاز	+/+	+/+	+/+	-/+	+/+	-/+
تخمر سكراللاكتوز	+	+	+	-	-	-

تخمر سكر السكروز	+	+	+	م	-	-
تخمر سكر المالتوز	+	+	+	-	-	م
تخمر سكر المانوز	+	+	+	-	+	+
تخمر سكر الزايلوز	+	+	+	+	+	-
تخمر سكر التريهالوز	+	+	+	+	+	م
تخمر سكر المانيتول	+	+	+	-	+	-
الكشف عن انزيم الفنيل الانين دي امينيز	+	-	-	+	-	-
اختبار ازالة مجموعة كربوكسيل من الآرجنين	+	+	+	-	+	-

الرموز:+:نتيجة موجبة؛-:نتيجة سالبة؛ح:حامض؛ ق:قاعدة؛ م:نتيجة متغايرة؛β :تحلل الدم الكامل؛γ:لايوجد تحلل

كما أظهرت النتائج بأن بكتريا *P. aeruginosa* هي بكتريا سالبة لصبغة غرام ، متحركة ، موجبة لفحص الأوكسيديز والكاتاليز، سالبة لفحص الاندول وأحمر المثيل وفحص فوكس بروسكاور لكنها مستهلكة للسترات وموجبة لفحص اليوريز، مستهلكة لسكر الكلوكوز، السكروز، المالتوز، الزايلوز والمانيتول لكنها لا تستهلك سكر اللاكتوز، المانوز والتريهالوز. وهي غير منتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين ، كما أنها غير منتجة لأنزيم الفنيل ألانين دي أمينيز وغير قادرة على ازالة مجموعة كربوكسيل من الآرجنين وتتفق هذه النتائج مع Holt وجماعته (١٩٩٤) .

٤.١.١ أنواع وأعداد البكتريا المكونة للاغشية الحيوية على العدد الطبية

Types and numbers of biofilm forming bacteria on medical devices

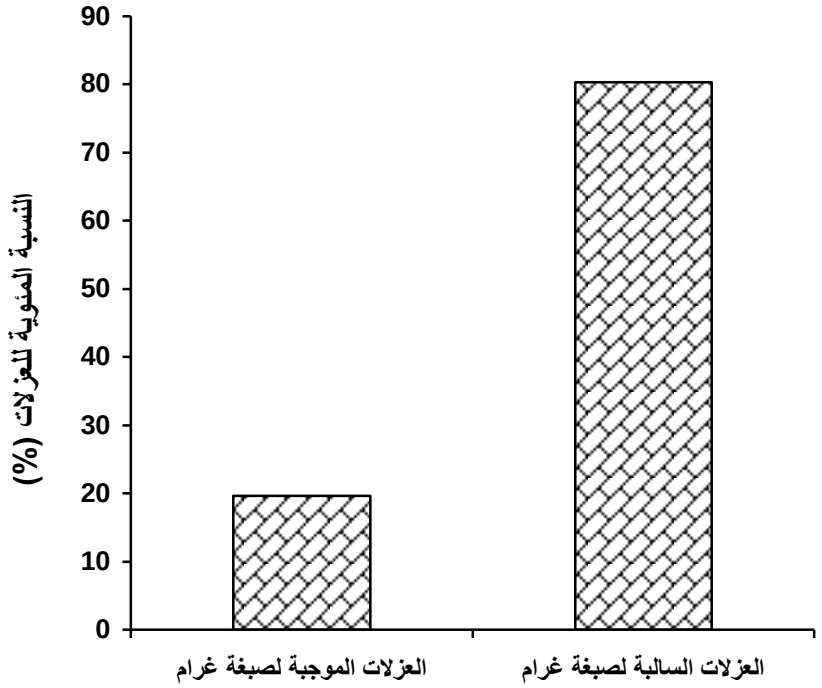
تم عزل ٥٦ عزلة بكتيرية من ٤٦ عينة عدة طبية، وكانت البكتريا السالبة لصبغة غرام هي السائدة في تكوين هذه الاغشية بنسبة ٨٠.٤% (شكل٤-١) وتضمنت كل من بكتريا *E. coli* بنسبة ٢٥% اذ شكلت النسبة الاعلى من بين العزلات السالبة لصبغة غرام، و بكتريا *K. pneumoniae* بنسبة ١٧.٩ %، *E. cloacae* بنسبة ١٢.٥%، *P. aerouginosa* بنسبة ٨.٩ %، *S. typhimurium* بنسبة ٧.١ %، *P. mirabilis* بنسبة ٥.٤%، و *S. dysenteriae* بنسبة ٣.٦ % (شكل ٤-٢).

اما البكتريا الموجبة لصبغة غرام فشكلت نسبة ١٩.٦% واحتوت على بكتريا *S. epidermidis* بأعلى نسبة (١٢.٥%) اضافة الى بكتريا *S. aureus* بنسبة ٧.١% (شكل٤-٣).

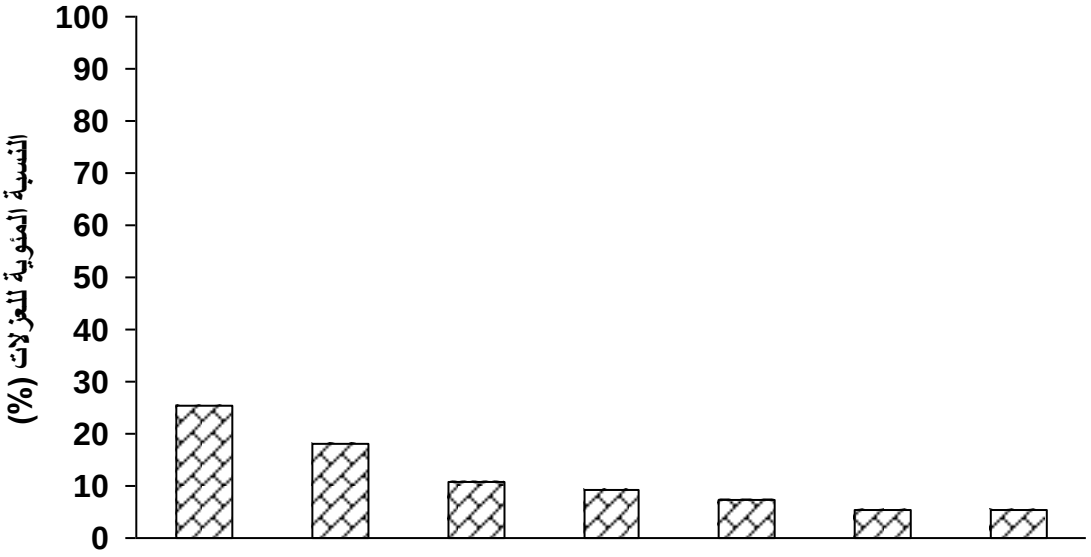
تطابق هذا مع ما ذكره كل من O'Toole وجماعته (٢٠٠٠) و عزيز (٢٠٠٤) عن كون البكتريا السالبة لصبغة غرام هي الشائعة في تكوين الغشاء وان بكتريا *E.coli* تمثل النسبة الاعلى من بين العزلات المكونة للغشاء. كما اشار Donlan (٢٠٠١) الى ان كل من بكتريا *E. coli*، *K.*

pneumoniae، *P. aerouginosa*، *S. aureus*،و *S. epidermidis* هي من العزلات البكتيرية الشائعة في تكوينها للاغشية الحيوية على العدد الطبية العلاجية.

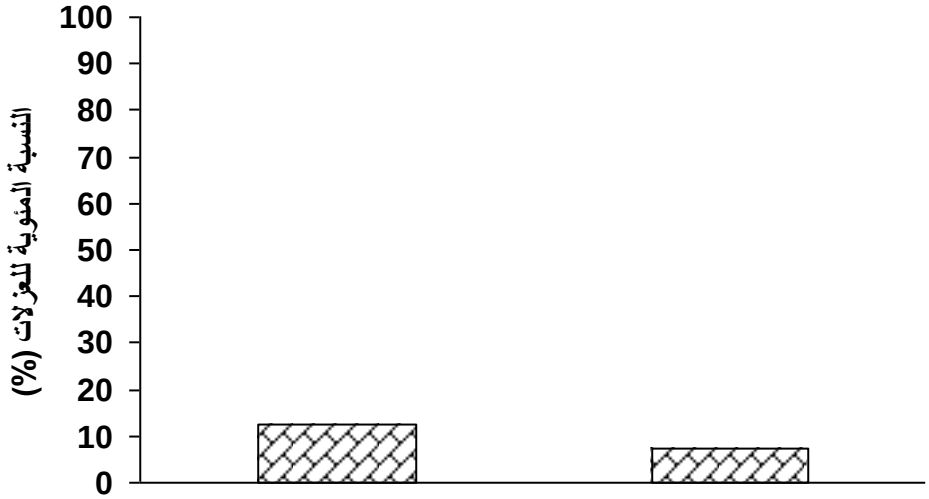
اضافة لذلك، اظهرت النتائج ان الاغشية الحيوية المتكونة على تلك العدد قد تتكون من نوع بكتيري واحد او عدة انواع اعتماداً على مدة بقاء العدة داخل الجسم، فكلما ازدادت المدة ازداد عدد الانواع المكونة (جدول٤-٤)، وهذا مماثل لما ذكره Donlan (٢٠٠١).



شكل ٤-١: النسب المئوية للعزلات السالبة والموجبة لصبغة غرام المعزولة من الاغشية الحيوية للعدد الطبية.



شكل ٤-٢: توزيع النسب المئوية للعزلات السالبة لصبغة غرام المعزولة من الاغشية الحيوية للعدد الطبية.



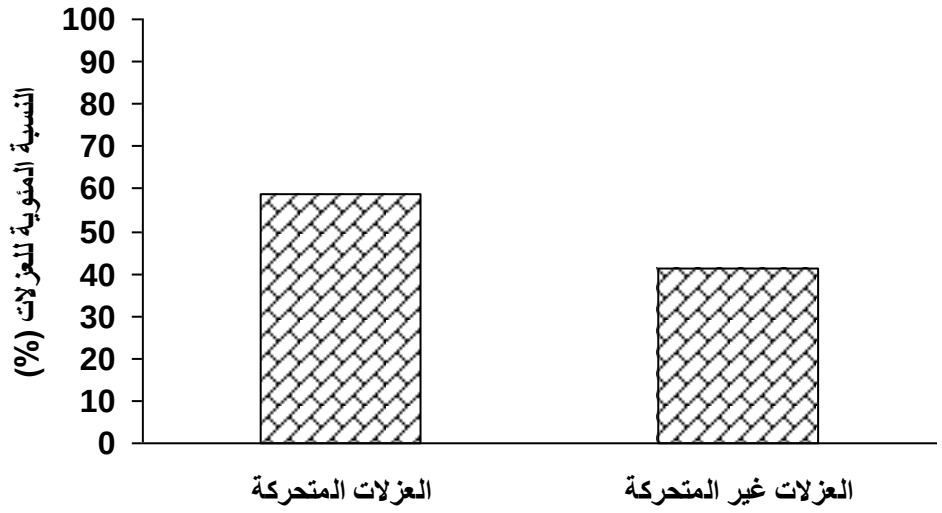
شكل ٤-٣ توزيع النسب المئوية للعزلات الموجبة لصبغة غرام المعزولة من الاغشية الحيوية للعدد الطبية.

جدول ٤-٤: العلاقة بين مدة بقاء العدة داخل الجسم وتكوين الاغشية الحيوية عليها.

العزلة	مدة بقائها(يوم)	نوع العدة
		١.مصرف القيح
E.cloacae	١	
S.aureus	٢	
S.aureus	٢	
E.coli	٢	
E.cloacae	٤	
E.coli	٤	
S.aureus	٥	
S.epidermidis	٥	
S.dysenteriae	٥	
E.cloacae	٥	
S.dysenteriae	٥	
E.cloacae	٦	
E.coli	٦	
K.pneumoniae	٧	
E.coli	٧	
E.coli	٧	
P.aeruginosa+P.mirabilis	١٠	
E.coli + K.pneumoniae	١١	
E.coli+ E.cloacae	٣٠	
		٢.القثطار البولي
S.aureus	٢	
S.epidermidis	٢	
E.cloacae	٢	
E.coli	٣	
E.coli	٦	
S.typhimurium	٧	

نوع العدة	مدة بقائها(يوم)	العزلة
	٩	*E.coli* + *K.pneumoniae*
	٣٠	*E.coli* + *K.pneumoniae*
	٣ اشهر	*P.aeruginosa+P.mirabilis*
٣.العدة داخل رحمية		
	سنة و شهران	*S.typhimurium*
	سنة و٦ أشهر	*S.epidermidis*
	٣ سنوات و ٨ أشهر	*S.epidermidis*
	٤ سنوات	*S.epidermidis*
	٤ سنوات و ٤ أشهر	*E.coli* + *K.pneumoniae*
	٨ سنوات	*E.coli* + *K.pneumoniae*
٤.الأنبوب الصدري		
	٣	*S.typhimurium*
	٦	*P.aeruginosa*
	٨	*E.coli* + *K.pneumoniae*
	٨	*P.aeruginosa+P.mirabilis*
٥.القثطار الوريدي المركزي		
	٣	*P.aeruginosa*
	٣	*S.epidermidis*
	٣	*S.epidermidis*
٦.الأنبوب المعدي - الأنفي		
	٤	*K.pneumoniae*
	٥	*K.pneumoniae*
	٧	*S.typhimurium*
٧.مصرف الغرزة	٣	*K.pneumoniae*
٨.عدة تثبيت الكسر	٣	*E.cloacae*

كما بينت النتائج ان البكتريا المتحركة لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي بنسبة اكبر من غير المتحركة، اذ شكلت البكتريا المتحركة نسبة ٥٨.٩% بينما كانت نسبة البكتريا غير المتحركة ٤١.١% (شكل٤-٤). جاءت هذه النتيجة مطابقة لما وجدته عزيز(٢٠٠٤) و Donlan (٢٠٠٢) اذ ذكر الأخير ان البكتريا غير المتحركة قليلاً ما تكون الغشاء الحيوي لعدم امتلاكها وسائل الحركة مثل الاسواط والاهداب. كما اكد كل من Kumar وجماعته (١٩٩٨)، Deibel (٢٠٠٠)، و Frank & Chmielewski (٢٠٠٣) على دور وسائل الحركة (الأسواط والأهداب) في الارتباط بالسطح، من خلال امكانية حركة الخلايا البكتيرية ووصولها الى مواقع الارتباط على السطح.



شكل٤-٤: النسب المئوية للعزلات البكتيرية المتحركة وغير المتحركة المعزولة من الاغشية الحيوية للعدد الطبية.

٢.٤ اختبار حساسية البكتريا لمضادات الحياة

Antibiotic sensitivity test of bacteria

اختبرت حساسية العزلات البكتيرية المعزولة من الاغشية الحيوية المتكونة على العدد الطبية والبالغ عددها ٥٦ عزلة لإثني عشر مضاداً حيوياً مختلفاً بطريقة الإنتشار بالأقراص وتم تحديد الحساسية اعتماداً على قياس قطر منطقة تثبيط النمو ومقارنتها مع الجدول القياسي لاقطار التثبيط المذكور في NCCLS (١٩٩٧).

ومن خلال النتائج المستحصلة والمبينة في جدول (٤-٥) يمكننا ملاحظة تطابق نمط مقاومة بعض العزلات البكتيرية العائدة لنفس الجنس البكتيري لمضادات الحياة المختبرة مما يدل على أنها قد تكون عائدة لنفس العزلة البكتيرية وقد استوطنت في بيئة المستشفى ، كما هو الحال في العزلات ٢٩ ، ٣٢ ، ٣٣ العائدة لبكتريا *E. coli* ، كذلك العزلتين ١٨ و ٥١ العائدتين لبكتريا *K. pneumoniae* والعزلتين ٢٢ و ٢٧ العائدتين لنفس البكتريا المذكورة ، وأيضا العزلتين ٥٢ و ٥٣ العائدتين لبكتريا *S. dysenteriae* ، اضافة الى العزلتين ٧ و ٨ العائدتين لبكتريا *S. epidermidis* والعزلتين ٣٠ و ٤٦ العائدتين لنفس البكتريا المذكورة .

كما أظهرت النتائج المبينه في جدول(٤-٦) ان اعلى نسبة مقاومة ابدتها العزلات البكتيرية كانت لمجموعة البنسلينات، حيث بلغت ٩٦.٤% لمضاد الامبسلين، ٩٢.٩% لمضاد الاموكسيسيلين، و٨٩.٣% لمضاد الامبكلوكس. وهذه النتائج مقاربة لدراسات كل من Fluit وجماعته (٢٠٠١) و الخالدي (٢٠٠٢) اذ كانت نسبة مقاومة عزلاتهم للبنسلينات ٩٧%.

اما السيفالوسبورينات مثل مضاد السيفوتاكسم، فكانت نسبة المقاومة له اقل (٥٨.٩%) وهذا مشابه لما حصل عليه Shanahan وزملاؤه (١٩٩٣)، وقد يفسر ذلك الى كون هذا المضاد حديث الاستخدام مما جعل البكتريا سريعة الاستجابة له.

ويعود السبب الرئيس لمقاومة مضادات البيتالاكتام الى انتاج انزيمات البيتالاكتاميز والتي تكون من نوع Amp-C type في بكتريا العائلة المعوية و*P. aeruginosa* وقد تحمل الجينات المشفرة لها كروموسومياً كما في بكتريا *E. cloacae* (Yagi *et al.*, ٢٠٠٥) و *P. mirabilis* (Bret *et al.*, ١٩٩٨) او قد تحمل بلازميدياً كما في بكتريا *E. coli* و *K. pneumoniae* (Yagi *et al.*, ٢٠٠٥) اضافة لاحتواء النوعين البكتيريين الأخيرين على انزيم بيتالاكتاميز نوع VEB-١ يحمل الجين المشفر له بلازميدياً (Poirel *et al.*, ١٩٩٩).

كمـا وجـد ان مقاومـة مضـاد الامبسـلين ومجموعـة السـاليفوسـبورينات قـد تعـزى الـى وجود انزيمات بيتالاكتاميز نوع ١-SHV و١-LEN في البكتريا السالبة لصبغة غرام ، وكذلك امتلاكها انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية التي يشفر لانتاجها جينات محمولة بلازميدياً(Eggman *et al.*, ١٩٩٧).

اضافة الى ذلك قد يكون سبب المقاومة امتلاك البكتريا لانزيمات بيتالاكتاميز نوع TEM كما في بكتريا *K. pneumoniae* اذ تحمل الجينات المشفرة لها بلازميدياً وتكون قافزة، كما تحتوي هذه البكتريا على نوعين اخرين من هذه الأنزيمات هما ١-VIM و ٥-SHV جيناتها محمولة بلازميدياً (Bermudes *et al.*, ١٩٩٩). او قد يكون سبب المقاومة احتواء البكتريا على انزيم شبيه بأنزيم Amp-C-type β-lactamase الذي وجد في بكتريا *P.mirabilis* يدعى ١٦-CMY ويحمل الجين المشفر له كروموسومياً (D'Andrea *et al.*, ٢٠٠٦).

وقد تقاوم البكتريا هذه المضادات بانتاج بروتينات مرتبطة بالبنسلين بديلة (Alternative PBPs) مشفرة من قبل الجين *mecA* المحمول كرموسومياً، كما في بكتريا المكورات العنقودية والتي تقاوم هذه المضادات ايضاً بانتاجها المفرط لانزيمات البيتالاكتاميز، زيادة مستويات البروتينات المرتبطة بالبنسلين، او تقليل ميل المضاد للارتباط بهذه البروتينات (Tomasz *et al.*,١٩٨٩; Barg *et al.*,١٩٩١).

كما اشار Chanal وجماعته (١٩٩٦) الى ان مقاومة مضاد السيفوتاكسم تكون بامتلاك البكتريا لانزيم بيتالاكتاميز نوع ١-CTX، اضافة الى نوع TEM .

اما بالنسبة لمضادات الامينوكلايكوسيدات، فقد بينت النتائج تفاوتاً في نسب مقاومة العزلات لها، اذ بلغت ٥٧.١% لمضاد الجنتامايسين بينما كانت ٢٣.٢% لمضاد الاميكاسين وهذا يتفق مع نتائج Baquero and Blazquez (١٩٩٧)، اذ أبدت عزلاته تغايرا في مقاومتها لهذه المضادات.

ويعزى سبب المقاومة الرئيس لهذه المضادات الى انتاج البكتريا لانزيمات تحوير الامينوكلايكوسيدات من الصنف الثاني نوع ("٢) ANT، ومن الصنف الثالث نوع ACC (٣)-I وAAC(٣)-V والمشفرة جميعها من قبل جينات محمولة بلازميدياً في البكتريا السالبة لصبغة غرام مما يمنحها المقاومة لمضاد الجنتامايسين (Tenover *et al.*, ١٩٨٩)، اضافة لوجود انزيمات تحوير ثنائية الوظيفة لتلك المضادات نوع AAC(٦') وAPH(٢") مشفرة من قبل جين قافز Tn *٤٠٠١* في بكتريا المكورات العنقودية تمنحها المقاومة لذلك المضاد (Fluit *et al.*, ٢٠٠١).

اما مضاد الاميكاسين فيعود سبب مقاومته لانتاج انزيمات الصنف الثالث نوع AAC(٦') في البكتريا السالبة لصبغة غرام كما اشار Tran Van Nieu وجماعته (١٩٩٢).

اضافة لوجود اسباب اخرى لهذه المقاومة تتضمن التحوير بعد عملية الأستنساخ للموقع الهدف ١٦SrRNA على الرايبوسوم مما يؤدي الى فقدان ميل المضاد للارتباط بالهدف كما ذكر Galimand وزملاءه (٢٠٠٣).

وفي البكتريا الموجبة لصبغة غرام قد يكون سبب المقاومة انتاج انزيمات ANT(٤')-I (Stewart *et al.,*١٩٩٤) اضافة الى تقليل التراكم الداخل خلوي للمضاد اما بتغير نفاذية الغشاء الخارجي الخلوي او امتلاك نظام الدفق الفعال في البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام (Galimand *et al.*, ٢٠٠٣).

وفي ما يخص مضاد التتراسايكلين، بلغت نسبة مقاومة العزلات له ٧١.٤% وهي مشابهة لما حصل عليه Souza وجماعته (١٩٩٩). ويعزى سبب هذه المقاومة الى امتلاك البكتريا انظمة الدفق مثل نظام Acr في بكتريا *E. coli* وانظمة Mex المتعددة (OprM, MexB, MexA) في بكتريا *P. aeruginosa* (Masuda *et al.*, ٢٠٠٠; Lambert *et al.*, ٢٠٠١). اضافة الى انظمة اخرى تتواجد في البكتريا السالبة لصبغة غرام هي Tet(A)، Tet(B)، Tet(C)، Tet(D)، Tet(E)، Tet(G)، Tet(H) وقد تحتوي على Tet(I)و Tet(J) ايضاً، وتشفر جميعها من قبل جينات محمولة على بلازميدات كبيرة اغلبها اقترانية(Chopra and Roberts,٢٠٠١) . كما يمنح نظاما الدفق Tet(K)، Tet(L) المشفران من قبل جينات محمولة على بلازميدات صغيرة قابلة للتحريك مندمجة في بعض الحالات في كروموسوم بكتريا المكورات العنقودية اضافة لنظام دفق اخر هو Tet(Z) (Gillespie *et al.,*١٩٨٧; Tauch *et al.,*٢٠٠٠).كما اشار Chopra and Roberts(٢٠٠١) الى ان البكتريا قد تقاوم التتراسايكلين عن طريق امتلاكها بروتينات الحماية الرايبوسومية Tet(M)،Tet(O)، Tet(S) ، Tet(W)،Tet(P)، Tet(Q)، Tet(T) .

بينما اظهرت النتائج مقاومة عالية لمضاد الارثرومايسين (٩١.١%) وهذا مشابه لما حصلت عليه Sherley وجماعتها (٢٠٠٠)،وقد عزى Fluit وزملاؤه (٢٠٠١) هذه المقاومة الى امتلاك البكتريا عدداً من الآليات،الاولى التحوير بعد عملية الأستنساخ للموقع الهدف ٢٣SrRNA بواسطة انزيم Adenine-N^{6}-methyltransferase. اما الآلية الثانية فهي وجود نظام دفق، الذي وجد بنسبة متزايدة في البكتريا الموجبة لصبغة غرام، ويشفر له صنفان من الجينات: *mef* اذ تكون مرتبطة بعناصر اقترانية موجودة على الكرموسوم (Luna *et al.,*١٩٩٩) و*msr* التي وجدت في بكتريا *S. aureus* (Schmitz *et al.,*٢٠٠٠). اضافة لآلية ثالثة تتضمن انتاج انزيمات تثبيط المضاد مثل EreA وEreB المؤدية الى التحلل المائي لحلقة اللاكتون في نواة Macrocyclic للمضاد وانزيمات Phosphotransferase (type I)، اذ وجد هذان النوعان في بكتريا العائلة المعوية وبكتريا *S. aureus* Weisblum (Roberts *et al.,*١٩٩٩;١٩٩٥,). وقد تقاوم البكتريا السالبة لصبغة غرام هذا المضاد عن طريق النفاذية المنخفضة للغشاء الخلوي الخارجي له الى جانب الآليات المذكورة سابقاً (Weisblum,١٩٩٥).

بينت نتائج هذه الدراسة انخفاضاً نسبياً لمقاومة مضاد الكلورامفينيكول حيث بلغت النسبة ٤٦.٤% لكل منهما،وهي مقاربة للنتائج التي حصل عليها Bell and Turnidge (١٩٩٥) وقد يعود السبب في ذلك الى انحسار استخدامها مما جعل البكتريا حساسة لها بدرجة اكبر. وقد ذكركل من Dever & Dermody (١٩٩١) و Murray & Show (١٩٩٧) الى ان سبب مقاومة البكتريا لمضاد الكلورامفينكول يعود الى انتاج انزيم Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) الذي يحور المضاد بتحطيم جزيئته وتحويله الى الشكل غير الفعال (١,٣ Diacetyl Chloramphenicol) بوجود العامل المساعد Acetyl CoA وتحمل الجينات المشفرة لذلك الانزيم على بلازميد .

اما مضاد حامض النالديكسيك فبلغت نسبة مقاومة العزلات السالبة لـه ٤٦.٤ % وهذا مشابه لما حصل عليه Fluit وجماعته (٢٠٠١). ان مقاومة البكتريا لهذا المضاد تكون أما عن طريق تغيير انزيمات هدف المضاد (DNAgyrase في البكتريا السالبة لصبغة غرام وTopoisomerasIV او DNAgyrase في البكتريا الموجبة لصبغة غرام) عن طريق حدوث طفرات في الجين المشفر لتلك الانزيمات مما يؤثر على ارتباط المضاد به.
او عن طريق تغيير نفاذية الخلية للمضاد نتيجة حصول تغييرات في الجدار الخلوي، وتوجد هذه الآلية تحديداً في البكتريا السالبة لصبغة غرام (Drlica and Zhao,١٩٩٧; Hooper, ١٩٩٨ ;Schmitz *et al.*,١٩٩٨) .

كما نلاحظ من نتائج هذه الدراسة ان نسبة مقاومة العزلات لمضاد الريفامبسين كانت ٧١.٤% وهي تقترب من نتائج Sherley وجماعتها (٢٠٠٠) اذ فسرت آلية المقاومة لهذا المضاد الى حدوث طفرة في الجين المشفر لأنزيم DNA dependent RNA polymerase الذي يعتبر الموقع الهدف للمضاد، مما تؤدي الى استبدال زوج قاعدي واحد لذلك الجين (*rpoB*) المحمول كرموسومياً (Jin & Cross, ١٩٨٨; Mary, ٢٠٠٠; Schmitz *et al.*, ٢٠٠١) .

أما مضاد التراي ميثوبرم فكانت نسبة مقاومة العزلات لـه ٦٤.٣% وهي قريبة من النتائج المستحصل عليها في دراسة Goni-Urizza وزملائه (٢٠٠٠).ويعزى سبب مقاومة هذا المضاد الى الانتاج المفرط لانزيم Dihydrofolate reductase (DHFR) او الى حصول طفرات في الجين التركيبي المشفر لهذا الانزيم (*dfr*)، كما قد تعزى الى اكتساب هذا الجين من قبل البكتريا الذي قد يحمل بلازميدياً او كرموسومياً ، او قد تكون هذه الجينات قافزة(Fluit *et al.*, ٢٠٠١).

وبصورة عامة، يعزى انتشار العزلات البكتيرية عالية المقاومة لبعض مضادات الحياة الشائعة الإستخدام طبياً في بيئة المستشفى الى ظاهرة الضغط الإنتخابي (Selective pressure) التي تحدث نتيجة التعرض المستمر لتلك المضادات مما يؤدي الى سيادةالعزلات البكتيرية المقاومة لها على العزلات الحساسة في المجتمع البكتيري (Fluit *et al.*,٢٠٠١).

جدول ٤-٥ : حساسية البكتيريا المعزولة من الأغشية الحيوية لمضادات الحياة شائعة الأستعمال .

رقم العزلة	نوع العزلة	مصدرها	نمط حساسيتها لمضادات الحياة (مايكروغرام/قرص)											
			Ap ١٠	Ax ٢٥	Apx ٢٥	CTX ٣٠	G ١٠	Ak ٣٠	Tc ٣٠	E ١٥	Cm ٣٠	Nal ٣٠	Rif ٥	Tp ٥
١	*P. aeruginosa*	مصرف القيح	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
٢	*P. mirabilis*	مصرف القيح	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
٣	*P. aeruginosa*	قثطار بولي	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
٤	*P. mirabilis*	قثطار بولي	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
٥	*P. aeruginosa*	قثطار وريدي	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
٦	*K. pneumoniae*	انبوب صدري	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
٧	*S. epidermidis*	قثطار وريدي	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-

-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	قثطار وريدي	*S. epidermidis*	٨
+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	قثطار بولي	*S. aureus*	٩
+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	مصرف القيح	*E. cloacae*	١٠
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	مصرف القيح	*E. coli*	١١
-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	مصرف القيح	*S. aureus*	١٢
+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	مصرف القيح	*S. aureus*	١٣
+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	قثطار بولي	*S. epidermidis*	١٤
+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	مصرف القيح	*S. aureus*	١٥
+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	عـدة داخـل رحمية	*K. pneumoniae*	١٦
-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	عـدة داخـل رحمية	*S. epidermidis*	١٧
-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	عـدة داخـل رحمية	*K. pneumoniae*	١٨
-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	عـدة داخـل رحمية	*E. coli*	١٩
+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	مصرف القيح	*S. epidermidis*	٢٠
+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	قثطار بولي	*E. coli*	٢١
+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	قثطار بولي	*K. pneumoniae*	٢٢
+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	مصرف القيح	*E. coli*	٢٣
+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	انبـوب صدري	*E. coli*	٢٤
+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	قثطار بولي	*E. coli*	٢٥
-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	قثطار بولي	*E. coli*	٢٦
+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	قثطار بولي	*K. pneumoniae*	٢٧
-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	مصرف القيح	*E. coli*	٢٨
-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	قثطار بولي	*E. coli*	٢٩
-	-		-	+	+	-	+	+	+	+	+	عـدة داخـل رحمية	*S. epidermidis*	٣٠
+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	مصرف القيح	*K. pneumoniae*	٣١
-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	مصرف القيح	*E. coli*	٣٢
-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	مصرف القيح	*E. coli*	٣٣
+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	انبـوب صدري	*P. aeruginosa*	٣٤
+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	مصرف القيح	*E. cloacae*	٣٥
+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	مصرف القيح	*E. coli*	٣٦
+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	انبوب معدي-أنفي	*K. pneumoniae*	٣٧
-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	انبوب معدي-أنفي	*K. pneumoniae*	٣٨
+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	انبـوب صدري	*S. typhimurium*	٣٩
-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	قثطار بولي	*S. typhimurium*	٤٠
+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	مصرف القيح	*E. coli*	٤١
-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	انبـوب صدري	*P. mirabilis*	٤٢
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	عـدة تثبيـت الكسر	*E. cloacae*	٤٣
-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	عـدة داخـل رحمية	*S. typhimurium*	٤٤
+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	مصرف القيح	*K. pneumoniae*	٤٥
-	-		-	+	+	-	+	+	+	+	+	عـدة داخـل رحمية	*S. epidermidis*	٤٦
+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	انبـوب صدري	*P. aeruginosa*	٤٧
+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	مصرف القيح	*E. cloacae*	٤٨
+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	مصرف القيح	*E. cloacae*	٤٩
+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	قثطار بولي	*E. cloacae*	٥٠

-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	مصــــــرف الغرزة	*K. pneumoniae*	٥١
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	مصرف القيح	*S. dysenteriae*	٥٢
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	مصرف القيح	*S. dysenteriae*	٥٣
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	انبوب معدي-أنفي	*S. typhimurium*	٥٤
+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	مصرف القيح	*E. cloacae*	٥٥
-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	عـــدة داخـــل رحمية	*E. coli*	٥٦

المختصرات : Ampicillin: Ap ; Amoxicillin : Ax ; Ampiclox : Apx ; Cephotaxim : CTX ; Gentamicin : G ; Amikacin : Ak ; Tc ; Tetracyclin : Erythromicin : E ; Chloramphenicol : Cm ; Nalidixic acid : Nal ; Rifampicin: Rif ; Trimethoprim: Tp .

٣.٤ تقدير كفاءة المطهرات Estimation of disinfectants' efficiency

لتحديد فيما اذا كانت المطهرات المستخدمة في المستشفيات كفوءة تحت ظروف العمل ام لا، اتبعت طريقة معامل الفينول المعتمدة رسميا من قبل هيئة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) والمذكورة في Pelczar وزملائه(١٩٨٦) اذ قدر معامل الفينول للمطهرات المستخدمة في مستشفى الحلة التعليمي العام (اليود، الديتول، الهكساتان، السابتون، والكحول الأثيلي) باستخدام سلالتين بكتيريتين احداهما عائدة لبكتريا *S. aureus* والأخرى لبكتريا *P. aeruginosa* .

كما تم تحديد التركيز المثبط الأدنى لجميع المطهرات وقد لوحظ انخفاض في التركيز المثبط الأدنى (MIC) لمطهر الأيودين مقارنة ببقية المطهرات اذ بلغ $٧٧*١٠^{-٨}$ مايكروغرام/مل لكلا العزلتين البكتيريتين اما التركيز القاتل (MBC) فكان $٧٧*١٠^{-٧}$ مايكروغرام/مل لكلاهما وهذا يتفق مع التركيز الموصى به من قبل الشركة المصنعة. تدل هذه النتائج على الكفاءة العالية لهذا المطهر والتي تجلت بأعلى قيمة لمعامل الفينول (٦٥٠) من بين القيم الأخرى للمطهرات، ويعزى ذلك الى كونه مادة مؤكسدة لها القدرة على ابطال فعالية المركبات الأيضية كالبروتينات، اضافة الى قابليتها على هلجنة وحدات الحامض الأميني (التايروسين) الذي يدخل في تركيب الأنزيمات وبروتينات الخلية مما يجعله فعالا ضد كل انواع البكتريا، الأبواغ، الفيروسات، والفطريات بدرجة محدودة. اضافة الى استمرار فعاليته في مديات مختلفة من الأس الهيدروجيني (Pelczar *et al.*, ١٩٨٦; McDonell & Russell, ١٩٩٩).

اما بالنسبة لمطهري الهكساتان والديتول، فقد كانت قيم MIC_S لها مرتفعة عند اختبارهما على كلا العزلتين البكتيريتين، اذ بلغت $٤*١٠^{-٦}$ مايكروغرام/مل لبكتريا *S. aureus* وهذا يتفق مع دراسات عديدة (Brumfitt *et al.*,١٩٨٥;Al-Masaudi *et al.*,١٩٩١; Cookson *et al.*,١٩٩١) والتي أشارت الى أن قيم MIC قد تتراوح من ٤ الى ٨ مايكروغرام/مل في سلالات البكتريا المذكورة منخفضة الحساسية لهذين المطهرين مقارنة بقيم MIC لسلالات مماثلة لكنها حساسة لهما تصل الى ٢ مايكروغرام/مل كحد أقصى. اما في بكتريا *P.aeruginosa* فكانت قيم MIC_S لهذين المطهرين أعلى بكثير مما هو عليه في بكتريا *S. aureus*، اذ بلغت ٤٠٠ مايكروغرام/مل، وهذا مشابه لما وجده Stickler and Thomas (١٩٨٠) في دراسة على عدة عزلات بكتيرية سريرية منخفضة الحساسية لهذين المطهرين وبضمنها بكتريا *P. aeruginosa*، اذ تراوحت من ٢٠٠ الى ٨٠٠ مايكروغرام/مل مقارنة بعزلات مماثلة حساسة بلغت أعلى قيمة لها ٥٠ مايكروغرام/مل. وقد يعزى ذلك الى الإستخدام المفرط لهذين المطهرين في المستشفيات وبتراكيز عالية شبه قاتلة مما أدى الى حث آليات

مقاومتها في العزلات البكتيرية ومن ثم سيادتها على العزلات الحساسة بسبب حدوث ظاهرة الضغط الإنتخابي.

ان ارتفاع قيم MIC أدى الى ارتفاع قيم MBC وبالتالي انخفاض قيم معامل الفينول للمطهرين آنفي الذكر اذ بلغت ١٢٥ لبكتريا *S. aureus* في حين وصلت الى ٦.٢٥ لبكتريا *P. aeruginosa*.

أما في ما يخص مطهر السابتون المتألف من مركبين هما الكلوروهكسيدين والسترامايد، فقد لوحظ انخفاض قيم MIC_S و MBC_S للمركب الأول مقارنة بالمركب الثاني لكلا العزلتين البكتيريتين، ويعود السبب الى انخفاض تأثير مركبات الأمونيوم الرباعية على البكتريا عموما لإمتلاكها آليات مقاومة تجاهها والتي منها أنظمة الدفق، وعلى بكتريا *P. aeruginosa* خصوصا بسبب طبيعة غشائها الخلوي اذ يحتوي على قنوات ضيقة تدعى قنوات البورون تحتجز العامل المضاد للميكروب وتعيق دخوله، اضافة لإمتلاكها أنظمة دفق متعددة. فقد لوحظ أن قيمة MIC لها بلغت ٥٠٠ مايكروغرام/مل وهذا يتفق مع ما ذكره Langsrud and Sundheim (١٩٩٧) في أن هذه القيمة قد تزيد عن ٢٠٠ مايكروغرام/مل. ونتيجة لإرتفاع قيم MIC و MBC لبكتريا *P. aeruginosa* تجاه مركبي الكلوروهكسيدين و السترامايد انخفضت قيم معامل الفينول لهما اذ بلغت ١٢.٥ للأول و ٨.٣ للثاني مقارنة ببكتريا *S. aureus* التي بلغت ١٦٦.٦ و ١٦.٦ للمركبين على التوالي.

اما الأيثانول فقد مثل المطهر الأوطأ كفاءة من بين بقية المطهرات، اذ بلغت قيمMIC_S له $3*10^{-3}$ مايكروغرام/مل لبكتريا *S. aureus* و $3*10^{-1}$ مايكروغرام/مل لبكتريا *P. aeruginosa* . اما قيم MBC_S فكانت $7*10^{-3}$ مايكروغرام/مل للبكتريا الأولى و $7*10^{-1}$ مايكروغرام/مل للثانية، حيث اتفقت هذه النتائج مع ما ذكره كلا من Pelczar وجماعته (١٩٨٦) و McDonell & Russell(١٩٩٩)، وبالتالي فانه المطهر الأقل كفاءة وهذا ما يتجلى في قيمة معامل الفينول البالغة ٠.٧ لبكتريا *S. aureus* و ٠.٠٠٧ لبكتريا *P. aeruginosa*.

من النتائج المذكورة سابقا، يمكننا ملاحظة ارتفاع قيم MIC_S و MBC_S لبكتريا *P.aeruginosa* مقارنة ببكتريا *S.aureus* لكل المطهرات أي أنها اكثر مقاومة للعوامل المضادة للميكروبات، و يعزى ذلك الى امتلاكها انظمة دفق متعددة منها MexAB، MexCD و MexEF التي تعمل كنواقل لطرح تلك العوامل خارج الخلية، أضافة لطبيعة غشائها الخلوي كما ذكرنا آنفا (Schweizer , ١٩٩٨).

من هذه النتائج المستحصلة يمكننا الإستنتاج أن سبب الانتشار البكتيري في بيئة المستشفيات لايعود الى عدم كفاءة المطهرات، لكون معامل الفينول لجميع هذه المطهرات قد تجاوز ١ (بإستثناء الكحول)، لكن قد يعزى السبب الى التخفيف العشوائي لتلك المطهرات وعدم الإلتزام بالتخفيف الموصى به من قبل الشركات المنتجة لها، والذي قد يكون عاليا لايؤدي الى ابادة البكتريا أو تثبيط نموها، أو منخفضا يقترب في بعض الأحيان من التراكيز شبه القاتلة مما يؤدي الى حث آليات المقاومة البكتيرية تجاه المطهرات وبالتالي توليد عزلات بكتيرية مقاومة لها تسود تدريجيا على العزلات الحساسة في المجتمع البكتيري في حالة التعرض المستمر لتلك المطهرات وهو مايعرف بالضغط الإنتخابي.

أن تغير الطراز المظهري للبكتريا وذلك نتيجة لتغير في طبقات غشائها الخلوي الخارجي (Paulsen *et al.*,١٩٩٩) أو مرورها في مرحلة سكون عند حدوث نقص في المغذيات (Dodd *et al.*,١٩٩٨;Foley *et al.*,١٩٩٩) أو نموها بهيئة غشاء حيوي (Brown and Gilbert,١٩٩٣; McDonnell and Russell,١٩٩٩;Gilbert *et al.*,٢٠٠٢) هو أحد الأسباب المؤدية الى انخفاض حساسية البكتريا للمطهرات، اضافة الى امكانية حدوث تغير مستحث فيها ناتج عن تعرضها لتراكيز شبه قاتلة من المطهرات يؤدي الى حث أنظمة الدفق فيها أو انتاج انزيمات محطمة للمطهرات (Lewis *et al.*,١٩٩٧;Nikaido,١٩٩٨; Gilbert and McBain,٢٠٠٣). كما ان حدوث تغير في طرازها الوراثي من الأسباب المهمة والذي قد ينتج عن حدوث طفرات في الجينات المشفرة للموقع الهدف أو نتيجة اكتساب بلازميدات حاملة للجينات المشفرة لآليات المقاومة والذي يؤدي الى التطور السريع للمقاومة بين أفراد المجتمع الميكروبي الواحد (Gilbert and McBain,٢٠٠٣).

جدول ٤-٧ : التراكيز القاتلة وقيم معامل الفينول للمطهرات المستعملة في مستشفى الحلة التعليمي العام لبكتريا *S. aureus* و *P. aeruginosa* .

المطهرات	التراكيز القاتلة الدنيا (مايكروغرام/مل)		معامل الفينول	
	S.aureus	*P.aeruginosa*	*S.aureus*	*P.aeruginosa*
الفينول	٥*١٠-٣	٥*١٠-٣	١	١
الهكساتان	٤*١٠-٥	٨*١٠-٤	١٢٥	٦.٢٥
الديتول	٤*١٠-٥	٨*١٠-٤	١٢٥	٦.٢٥

السابتون	Cl.	٣*١٠-٥	٤*١٠-٤	١٦٦.٦	١٢.٥
	Ci.	٣*١٠-٤	٦*١٠-٤	١٦.٦	٨.٣
الأيودين		٧٧*١٠-٧	٧٧*١٠-٧	٦٥٠	٦٥٠
الأيثانول		٧*١٠-٣	٧*١٠-١	٠.٧	٠.٠٠٧

المختصرات : Citramide : Ci. ; Chlorhexidine : Cl.

٤.٤ المحتوى البلازميدي Plasmid content

تم التحري عن المحتوى البلازميدي لعدد من العزلات البكتيرية المعزولة من الأغشية الحيوية المتكونة على العدد الطبية بواقع عزلة واحدة لكل نوع بكتيري (جدول ٤-٨) ، وباستخدام طريقة التمليح الخارجي المحوره(Salting out) والمذكورة في Omran (٢٠٠٦) لعزل الدنا الكلي، اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز احتواء جميع عزلات البكتريا السالبة لصبغة غرام على حزمة بلازميدية صغيرة واحدة متغيرة الموقع في الهلام مما يعني أن حجمها الجزيئي مختلف من عزلة لأخرى كما يتضح في شكل ٤-٥.

تتباين هذه البلازميدات في احجامها الجزيئية، فقد ذكر Poirel وجماعته (١٩٩٩) احتواء كل من بكتريا *E. coli* و *K. pneumoniae* على بلازميد حجمه الجزيئي ١٠٠ كيلو قاعدة يحمل الجين المشفر لإنزيم البيتالاكتاميز. كما أشار Tenover وزملاؤه (١٩٨٩) الى كون جينات مقاومة الأمينوكلايكوسيدات محمولة على بلازميدات ذات احجام جزيئية ٦٨ و١٥٠ كيلو زوج قاعدي في البكتريا السالبة لصبغة غرام.

أما بالنسبة للعنقوديات، فنلاحظ من خلال شكل ٤-٦ أن العزلتين اشتركتا بوجود حزمتين بلازميديتين صغيرتين تتواجدان في موقعين مختلفين في الهلام وهذا يدل على اختلاف الحجم الجزيئي لهما.

ومما تجدر الأشارة اليه أن البلازميدات الصغيرة الحجم شائعة الوجود في جنس المكورات العنقودية وخصوصا في بكتريا *S.aureus*، اذ اكدت عدة دراسات احتواء هذه البكتريا على بلازميدات صغيرة الحجم ذات حجم جزيئي ٤.٤ كيلو زوج قاعدي تقريبا تحمل جينات مقاومة التتراسايكلين (Shaffrman *et al.*,١٩٧٨; Groves , ١٩٧٩). وقد تحتوي هذه البكتريا على بلازميدات ذات أحجام مختلفة تتراوح بين ٤.٢ – ٤٢ كيلو زوج قاعدي (O'Reilly *et al.*,١٩٨١).

جدول ٤-٨ : العزلات البكتيرية المختارة لدراسة نسقها البلازميدي

رقم العزلة	نوع العزلة	نمط مقاومتها لمضادات الحياة المختبرة											
		Ap ١٠	Ax ٢٥	Apx ٢٥	CTX ٣٠	G ١٠	Ak ٣٠	Tc ٣٠	E ١٥	Cm ٣٠	Nal ٣٠	Rif ٥	Tp ٥
١١	*E. coli*	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
٦	*K. pneumoniae*	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
٤٣	*E. cloacae*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
١	*P. aeruginosa*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
٤	*P. mirabilis*	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
٥٤	*S typhimurium*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
٥٢	*S. dysenteriae*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
٩	*S. aureus*	+	+	+	+	+	-	+	+	+		-	+
٢٠	*S. epidermidis*	+	+	+	+	+	-	+	+	-		+	+

المختصرات : Ap: Ampicillin ; Ax : Amoxicillin ; Apx : Ampiclox ; CTX : Cephotaxim ; G : Gentamicin ; Ak : Amikacin ; Tc : Tetracyclin ; E : Erythromicin ; Cm : Chloramphenicol ; Nal : Nalidixic acid ; Rif: Rifampicin ; Tp: Trimethoprim .

٥.٤ تحييد البلازميدات Plasmid curing

تم اجراء تحييد البلازميدات في عزلتين بكتيريتين احداهما سالبة لصبغة غرام عائدة لبكتريا *S.typhimurium* (ST٥٤) والأخرى موجبة لصبغة غرام عائدة لبكتريا *S.epidermidis* (SE٢٠) باستخدام مادة سلفات دوديسيل الصوديوم (SDS) لتحديد فيما اذا كانت جينات مقاومة تلك العزلات لبعض مضادات الحياة محمولة بلازميديا أو كروموسوميا. اذ عوملت العزلتان المذكورتان بتراكيز مختلفة من مادة SDS كلا على انفراد، وتم تحديد التركيز الأمثل (OC) للنمو بوجود هذه المادة الذي أدى الى تحييد بلازميدات كل عزلة اذ بلغ ٢٥ ملغم / مل للعزلة ST٥٤ ، بينما كان ٧٥ ملغم / مل للعزلة SE٢٠ واختبرت حساسيتها لبعض مضادات الحياة لملاحظة حدوث تغير في مقاومتها لتلك المضادات أم لا.

وبعد اختبار حساسية العزلتين المعاملتين لكل من مضادات الأمبسيلين، التتراسايكلين، الأرثرومايسين، الكلورامفينيكول، التراي ميثوبريم، والجنتامايسين التي أضيفت بتراكيز معينة وفقا لما هو مذكور في Sabath (١٩٧٠) و (١٩٧٦) (جدول ٤-٩) ، لوحظ احتواء العزلة ST٥٤ على ثلاث مجاميع من المستعمرات (A,B,C) ، مجموعة A (٣٠ %) فقدت مقاومتها لكل من الأمبسيلين ، التتراسايكلين و الأرثرومايسين بينما احتفظت بمقاومتها للمضادات الأخرى ، مجموعة B (٤٠ %) فقدت مقاومتها لكل من الكلورامفينيكول ، التراي ميثوبريم و الجنتامايسين بينما احتفظت بمقاومتها للمضادات الأخرى ، ومجموعة C (٣٠ %) فقدت مقاومتها لكل المضادات المختبرة مقارنة بالعزلة البرية . تدل هذه النتائج على أن المجموعة الأولى قد فقدت فقط البلازميد المشفر لمقاومة كل من الأمبسيلين ، التتراسايكلين و الأرثرومايسين ، بينما فقدت المجموعة الثانية البلازميد الآخر المشفر لمقاومة الكلورامفينيكول ، التراي ميثوبريم و الجنتامايسين ولم تفقد البلازميد الأول ، أما المجموعة C فقد فقدت كلا البلازميدين .

كما أظهرت النتائج احتواء العزلة SE٢٠ على ثلاث مجاميع من المستعمرات (A,B,C) ، فقدت مجموعة A (٣٥%) مقاومتها لكل من التتراسايكلين ، الأرثرومايسين و الكلورامفينيكول ولم تفقد مقاومتها للمضادات الأخرى ، في حين فقدت مجموعة B (٣٠%) مقاومتها لكل من الأمبسيلين ، التراي ميثوبريم والجنتامايسين لكنها لم تفقد مقاومتها لبقية المضادات ، أما مجموعة C (٣٥%) فقد فقدت مقاومتها لكل المضادات مقارنة بالعزلة البرية مما يدل على احتمال فقدان أحد البلازميدين في المجموعة الأولى والذي يشفر لمقاومة كل من التتراسايكلين ، الأرثرومايسين و الكلورامفينيكول ، في حين فقدت المجموعة الثانية البلازميد الآخر المشفر لمقاومة الأمبسيلين ، التراي ميثوبريم والجنتامايسين ولم تفقد البلازميد الأول ، أما المجموعة C فقد فقدت كلا البلازميدين .

جدول ٤-٩ : تأثير مادة SDS في تحييد البلازميدات من العزله (ST٥٤) *S.typhimurium* والعزله *S.epidermidis* (SE٢٠)

رقم العزلة	مجاميع المستعمرات	نمط مقاومة العزلات المحيدة لمضادات الحياة	النسب المئوية	التركيزالأمثل

	البكتيرية المحيدة	(مايكروغرام/مل)						للمستعمرات المحيدة (%)	للـSDS (ملغم/مل)
		Ap ٢٥	Tc ٥٠	E ٢٥	Cm ٢٥	Tp ١٠	G ١٠		
٥٤	*S. typhimurium* ♀♀ : العزلة البرية (Wild type)	+	+	+	+	+	+		٢٥
	مجموعة A	-	-	-	+	+	+	٣٠	
	مجموعة B	+	+	+	-	-	-	٤٠	
	مجموعة C	-	-	-	-	-	-	٣٠	
٢٠	*S. epidermidis* : العزلة البرية ((Wild type	+	+	+	+	+	+		٧٥
	مجموعة A	+	-	-	+	+	+	٣٥	
	مجموعة B	-	+	+	+	-	-	٣٠	
	مجموعة C	-	-	-	-	-	-	٣٥	

المختصـــرات : Ap : Ampicillin ; Tc : Tetracyclin ; E : Erythromicin ; Cm : Chloramphenicol ; Tp : Trimethoprim ; G : Gentamicin .

ومـن خـلال الترحيـل الكهربـائي للـدنا المسـتخلص مـن مجموعـة C للعـزلتين المحيـدتين *S. typhimurium* ST٥٤ و *S. epidermidis* SE٢٠ ، لوحظ فقدان البلازميدات بشكل كامل (شكل -٧ ٤) ممـا يؤكـد وجـود جينـات مقاومـة مضـادات الحيـاة (Ap,Tc,E,Cm,Tp,G) علـى تلـك البلازميـدات المفقودة.

المصادر العربية Arabic References

الخالـدي ، بهيجـة عبـيس (٢٠٠٢). دراسـة البكتريـا الهوائيـة المسـببة لعـدوى المستشـفيات ومقاومتهـا للمطهرات . رسالة ماجستير، كلية العلوم – جامعة القادسية .

عزيز، حوراء وهاب (٢٠٠٤). دراسة البكتريا الملوثة والمكونة للأغشية الرقيقة الحيوية في حاويات الحليب . رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة بابل .

المصادر الأجنبية Foreign References

Alekshum, M.N. and Levy, S.B. (١٩٩٧). Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulation. Antimicrob. Agents Chemother. ٤١: ٢٠٦٧-٢٠٧٥ .

Al-Masaudi, S.B.; Russell, A.D. and Day, M.J. (١٩٩١). Comparative sensitivity to antibiotics and biocides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from Saudi Arabia and Great Britain. J. Appl. Bacteriol. ٧١:٣٣١-٣٣٨ .

Alvarez, M., and Mendoza, M. C. (١٩٩٣). Molecular epidemiology of two genes encoding ٣-N-aminoglycoside acetyltransferases AAC(٣).I and AAC(٣).II among gram-negative bacteria from a Spanish hospital. Eur. J. Epidemiol. ٩:٦٥٠-٦٥٧.

Anwar, H.; Strap , J .L. ; Chen , K and Costerton, J.W. (١٩٩٢). Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and pipracillin . Antimicrob. Agents Chemother. ٣٦: ١٢٠٨ – ١٢١٤.

Arakawa, Y.; Murakami, M.; Suzuki, K.; Ito, H.; Wacharotayankun, R.; Ohsuka, S.; Kato, N. and Ohta, M. (١٩٩٥). A novel integron-like element carrying β-lactamase gene bla_{IMP}. Antimicrob. Agents Chemother. ٣٩: ١٦١٢-١٦١٥ .

Archer, G. L., and Niemeyer, D. M. (١٩٩٤). Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. Trends Microbiol. ٢:٣٤٣-٣٤٧ .

Badd, J.R. (١٩٩٦). Application of disinfectants in hospitals and other health care establishments. Infect. Control J. ١:٤ – ١٢.

Bagge, D.; Hjelm, M.; Johansen, C.; Huber, I. and gram, L. (٢٠٠١). *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. Appl. Environ. Microbiol. ٦٧ (٥): ٢٣١٩ – ٢٣٢٥.

Baquero, F. and Blazquez, J. (١٩٩٧). Evolution of antibiotic resistance. Trends Ecol. Evol. ١٢:٤٨٢-٤٨٨ .

Barg, N. L. (١٩٨٨). Construction of a probe for the aminoglycoside ٣-V-acetyltransferase gene and detection of the gene among endemic clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. ٣٢:١٨٣٤-١٨٣٨ .

Barg, N.; Chambers, H. and Kernodle, D. (١٩٩١). Borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins is not conferred exclusively by the hyperproduction of beta-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. ٣٥:١٩٧٥-١٩٧٩ .

Bashan, Y. and Levanony, H. (١٩٨٨). Active attachment of _*Azospirillum brasilense* Cd to quartz sand and to a high – textured soil by protein bridging. J .Gen .Microboil. ١٣٤: ٢٢٦٩ – ٢٢٧٩.

Bassler , B.L (١٩٩٩). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Curr. Opin. Microbiol. ٢:٥٨٢-٥٨٧.

Bauernfeind, A.; Schneider, I.; Jungwirth, R.; Sahly, H.; and Ullmann, U. (١٩٩٩) . A novel type of AmpC β-lactamase, ACC-١ produced by a *Klebsiella*

pneumoniae strain causing nosocomial pneumoniae . Antimicrob. Agents. Chemother. ٤٣ (٨) : ١٩٢٤ - ١٩٣١ .

Bell, J. and Turnidge, J. (١٩٩٥). National antimicrobial resistance surveillance program. ١٩٩٥ Report. Canberra: National Health and Medical Research Council.

Bendinger, B.; Rijnaarst, H.H.M.; Altendor, K. and Zehnder, A.J.B. (١٩٩٣). Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryne form bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. Appl. Environ. Microbiol. ٥٩: ٣٩٧٣ – ٣٩٧٧.

Berger-Bächi, B. (١٩٩٤). Expression of resistance to methicillin. Trends Microbiol. ٢ : ٣٨٩-٣٩٣ .

Bermudes, H.; Jude, F.; Chaibi, E.; Arpin, C.; Bebear, C.; Labia, R. and Quentin, C. (١٩٩٩). Molecular characterization of TEM-٥٩ (IRT-١٧) , a novel inhibitor - resistant TEM- derived β- Lactamase in a clinical isolates of *Klebsiella oxytoca*. Antimicrob. Agents. Chemother. ٤٣ (٧) : ١٦٧ - ١٦٦١ .

Bian, Z.; Brauner, A.; Li, Y. and Normark, S. (٢٠٠٠). Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. J. Infect. Dis. ١٨١: ٦٠٢-٦١٢.

Bolhius, H.; van Veen, H.W.; Poolman, B.; Driessen, A.J.M. and Konings, W.N. (١٩٩٧). Mechanisms of multi–drug transporters. FEMS Microbiol. Rev. ٢١:٥٥-٨٤ .

Bouza, E.; San Juan, R.; Munoz, P.; Voss, A. and Kluytmans, J. (٢٠٠١). A European perspective on nosocomial urinary tracts infectionII. Report on incidence, clinical characteristics and outcome (ESGNI-

٠٠٤ study). European study group on nosocomial infection. Clin. Microbial. Infect. ٧:٥٣٢ – ٥٤٢.

Bret, L.; Chanal, C.; Sirot, D.; Chaibi, E. B.; Labia, R. and Sirot, J. (١٩٩٨). Chromosomally encoded AmpC type β-Lactamase in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. Antimicrob. Agents. Chemother. ٤٢ (٥) : ١١١٠ - ١١١٤.

Brocklehurst, T.F.; Zaman – Wong, C.M. and Lund, B.M. (١٩٨٧). Anote on the microbiology of retail packs of prepared salad vegetables. J . Appl. Bacteriol. ٦٣:٤٠٩ – ٤١٥.

Brown, M.R.W. and Gilbert, P. (١٩٩٣). Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. J. Appl. Microbiol.٧٤:٨٧-٩٧ .

Brumfitt, W.S.; Dixson, J. and Hmilton-Miller, M.T. (١٩٨٥). Resistance to antiseptics in methicillin and gentamicin resistant *Staphylococcus aureus.* Lancet. ١:١٤٤٢-١٤٤٣ .

Bryers, J.D. (١٩٨٧). Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms. Biotechnol. Prog. ٣ (٢): ٥٧ – ٦٨.

Byrne, M. E ; Gillespie, M. T. and Skurray. R. A. (١٩٩١). ٤', ٤''-Adenylyltransferase activity on conjugative plasmids isolated from *Staphylococcus aureus* is encoded on an integrated copy of pUB١١٠. Plasmid ٢٤:٧٠-٧٥.

Carter, G.I.; Towner, K.J. and Slack, R.C.B. (١٩٨٧). Rapid detection of a specific trimethoprim resistance gene using a biotinylated DNA probe. J. Antimicrob. Chemother. ٢٠:٣٣٥-٣٤١ .

Chanal, C.M.; Sirot, D.L.; Romaszko, J.P.; Bret, L. and Sirot, J.L. (١٩٩٦). Survery of prevalence of extended spectrum β-lactamases among Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. ٣٨(١):١٢٧-١٣٢ .

Chang, L.-L.; Chang, S.-F.; Chow, T.-H.; Wu, W.-J. and Chang, J.-C. (١٩٩٢). The distribution of the DHFR genes in trimethoprim-resistant urinary tract isolates from Taiwan. Epideiol. Infect. ١٠٩:٤٥٣-٤٦٢ .

Characklis, W.G.; (١٩٧٣). Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. Water Res. ٧: ١٢٤٩-١٢٥٨ . Cited by Donlan (٢٠٠٢) .

Characklis , W.G. ; McFeters , G.A. and Marshall , K.C.. Physiological ecology in biofilm systems . In : Characklis , W.G. and Marshall , K.C., editors (١٩٩٠). Biofilms . New York : John Wiley & Sons . p.٣٤١-٣٩٤ .

Chmielewski, R.A. and Frank, J.F (٢٠٠٣). Biofilm formation and control in food processing facilities. J. CRFSFS. ٢: ٢٢ – ٣٢

Chopra, I. and Roberts, M. (٢٠٠١). Tetracyclin antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Reviews, ٦٥(٢):٢٣٢-٢٦٠.

Cookson, B.D.; Bolton, M.C. and Platt, M. (١٩٩١). Chlorhexidine resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or just an elevated MIC.An in vitro and in vivo ssessment. Antimicrob. Agents Chemother. ٣٥:١٩٩٧-٢٠٠٢ .

Costerton, J.W.; Geesey, G.G. and Cheng, K.-J.(١٩٧٨). How bacteria stick. Sci. Am. ٢٣٨: ٨٦-٩٥ . Cited by Donlan & Costerton (٢٠٠٢) .

Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (١٩٩٩). Bacterial biofilm: a common cause of persistent infection. Sci. J. ٢٨٤ (٥٤١٨): ١٣١٨ – ١٣٢٢.

Costerton, W.; Veeh, R.; Shirtliff , M.; Pasmore, M.; Post, C. and Ehrlich, G. (٢٠٠٣). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. J. Clin .Invest. ١١٢: ١٤٦٦ – ١٤٧٧.

Crown, M .M.; Warren, T.M. and Fletcher, M. (١٩٩١). Mixed species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms. Biofouling ٣: ٢٣ – ٣٤.

Cucarella, C.; Solano, C.; Valle, J.; Amorena, B.; Lasna, I. and Penade`s, J.R. (٢٠٠١). Bap, a *Staphylococus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J. Bacteriol. ١٨٣ (٩): ٢٨٨٨ – ٢٨٩٦.

Dagostino, L.; Goodman, A.E. and Marshall, K.C. (١٩٩١). Physiological responses induced in bacteria adhering to surfaces . Biofouling, ٤ : ١١٣ - ١١٩ .

Damon, H.A.; Soussy, C.-J. and Courvalin, P. (١٩٩٨). Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٢(١٠):٢٥٩٠-٢٥٩٤ .

D'Andrea, M.M.; Nucleo, E.; Luzzaro, F.; Giani, T. and Migliavacca, R. (٢٠٠٦). CMY-١٦, a novel aquired AmpC-type β-lactamase of the CMY/LAT lineage in multifocal monophyletic isolates of *Proteus mirabilis* from nothern Italy. Antimicrob. Agents Chemother. ٥٠(٢):٦١٨-٦٢٤ .

Darouiche, R. O. ; Raad, I.I.; Heard, S.O.; Thornby, J.I.; Wenker, O.C. and Gabrielli, A. (١٩٩٩). A comparison of two antimicrobial – impregnated central venous catheters. N. Engl. J. Med. ٣٤٠: ١ – ٨.

Davey, M.E. and O`Toole, G.A. (٢٠٠٠). Microbial befouls: from ecology to molecular genetics. J .Microbiol .Mol. Rev. ٦٤ (٤): ٨٤٧ – ٨٦٧.

Davies, D.G. and Geesey, G. G. (١٩٩٥). Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. ٦١: ٨٦٠-٨٦٧.

De Jonge, B.L.M.; Chnag, Y. S.; Gage, D. and Tomasz, A. (١٩٩٢). Peptidogly can compostion of a highly methicillin resistance *Staphylococcus aureus* strain. the role of penicillin binding protein ٢a. J. Biology Chemotherapy. ٢٦٧: ١١٢٤٨ – ١١٢٥٤.

Deibel, V. (٢٠٠٠). Biofilms. Interest J. of Food Safety. ١: ٦ – ٧.

Dever, L.A. and Dermody, T.S. (١٩٩١). New mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. Arch. Intern. Med. ١٥١:٨٨٦-٨٩٥ .

Dodd, C.E.R.; Bloomfield, S.R.; Booth, I.R. and Stewart, G.S.A.B. (١٩٩٨). Suicide through stress: a cell's response to sublethal injury. Biochemist. **April**:١٢-١٤ .

Donlan, R.M. (٢٠٠١). Biofilms and device – associated infections . J.Emerging Infections Diseases. ٧ (٢): ١-١٠ .

Donlan, R.M. (٢٠٠٢). Biofilm: microbial life on surface . J. Emerging Infections Diseases. ٨ (٩): ٨٨١ – ٨٩٠ .

Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (٢٠٠٢). Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. ١٥ (٢): ١٦٧ – ١٩٣.

Drlica, K. and Zhao, X.L. (١٩٩٧). DNA gyrase topoisomerase IV and the ٤-quinolones. Microbiol. Rev. ١٦:٣٧٧-٣٩٢ .

Eggman, S.; Lofdahl, S. and Burman, L. (١٩٩٧). An allelic variant of the chromosomal gene for class A B-lactamase K٢, specific for Klebsiella pneumoniae is the Ancestor of SHV-١. Antimicrob. Agents Chemother. ٤١(١٢):٢٧٠٥-٢٧٠٩ .

Espinosa – Urgel, M. (٢٠٠٣). Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. J. Bacteriol. ١٨٥ (٣). ٦٩٩ – ٧٠٠.

Fling, M.E.; Walton, L. and Elwell, L.P. (١٩٨٢). Monitoring of plasmid – encoded , trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase genes: detection of a new resistant enzyme. Antimicrob. Agents Chemother. ٢٢:٨٨٢-٨٨٨ .

Flowers, R.H.; Schwenzer, K.J.; Kopel, R.F.; Fisch, M.J.; Tucker, S.I. and farr, B.M. (١٩٨٩). Efficacy of an attachable subcutaneous cuff for the prevention of intravascular catheter – related infection. JAMA. ٢٦١: ٨٧٨ – ٨٨٣.

Fluit, C.; Visser, M.R. and Schmitz, F. (٢٠٠١). Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev. ١٤(٤):٨٣٦-

Foley, I.; Marsh, P.; Wellington, E.M.H.; Smith, A.W. and Brown, M.R.W. (١٩٩٩). General stress response master regulator *rpoS* is expressed in human infection: a possible role in chronicity. J. Antimicrob. Chemother. ٤٣:١٦٤-١٦٥ .

Foster T. J. and McDevitt, D. (١٩٩٤). Molecular basis of adherence of staphylococci to biomaterials. American Society for Microbiology. ٢:٣١.

Freeman, R. and Govld, F.K. (١٩٨٥). Infection and intravascular catheters. J. Antimicrob. Chemother. ١٥: ٢٥٨.

Fux, C.A.; Wilson, S and Stoodley, P. (٢٠٠٤). Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. J. Bacteriol. ١٨٦: ٤٤٨٦ – ٤٤٩١.

Galimand, M.; Courvalin, P. and Lambert, T. (٢٠٠٣). Plasmid – mediated high – level resistance to aminoglucosides in Enterobacteriaceae due to ١٦S rRNA methylation. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٧:٢٥٦٥-٢٥٧١ .

Galletto, D.W.; Johnston, J.L. and Archer, G.L. (١٩٨٧). Molecular epidemiology of trimethoprim resistance among coagulase – negative Staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. ٣١:١٦٨٣-١٦٨٨ .

George, A.M. and Levy, S.B. (١٩٨٣). Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. J.Bacteriol. ١٥٥:٥٣١-٥٤٠ .

Gerke, C.; Schweitzer, O and Gotz, F. (١٩٩٨).Characterization of the N – acetylglucosaminyl transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis*. polysaccharide intracellular adhesion. J. Biol. Chem. ٢٧٣: ١٨٥٨٦-١٨٥٩٣.

Gilbert, P.; Maira – Litran, T.; Mc Bain, A.J.; Rickord, A.H. and white, F.W. (٢٠٠٢). The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. Adv. Microb. Physiol. ٤٦: ٢٠٣ – ٢٥٦.

Gilbert, P. and McBain, A.J. (٢٠٠٣). Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. Clin. Microbiol. Rev., ١٦:١٨٩-٢٠٨.

Gillespie, M.T.; Lyon, B.R.; Loo, L.S.L.; Mathews, P.R.; Stewart, P.R. and Skurray, R.A. (١٩٨٧). Homologous direct repeat sequences associated with mercury , methicillin, tetracycline and trimethoprim resistance in *Staphylococcus aureus* .FEMS Microbiol. Lett. ٤٣:١٦٥-١٧١ .

Goni-Urizza, M.; Capdepuy, M.; Arpin, C.; Raymond, n.; Caumette, P. and Quentin, C. (٢٠٠٠). Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. Appl. Environ. Microbiol. ٦٦:١٢٥-١٣٢.

Groves, D.J. (١٩٧٩). Interspecific relationships of antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp: Isolation and comparison of plasmids determining tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Can. J. Microbiol. ٢٥:١٤٦٨-١٤٧٥ .

Hancock, R.E.W. (١٩٩٨). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin. Infect. Dis. ٢٧:٩٣-٩٩ .

Harly, J.P. and Prescott, L.M. (١٩٩٦). Laboratory exercises in microbiology , "٣rd ed." WCB. McGraw Hill, New York.

Heilmann, C.; Hussain, M.; Peters, G. and Gëtz , F. (١٩٩٧). Evidence for auto lysine–mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. Mol. Microbial. ٢٤: ١٠٢٤.

Hendley, J.O. and Ashe, K.M. (١٩٩١). Effect of topical antimicrobial treatment an aerobic bacteria in the stratum corneum of human skin. Antimicrob. Agents Chemother. ٣٥: ٦٢٧ – ٦٣١.

Holt, J.G.; Kreig, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. and Williams, S.T. (١٩٩٤). Bergy's manual of determinative bacteriology ."٩th ed." .Williams and Wilkins Co. Baltimore, London .

Hooper, D.C. (١٩٩٨). Bacterial topoisomerases, anti- topoisomerases and anti-topoisomerases resistance. Clin. Infec. Dis. ٢٧:٥٤-٦٣ .

Illingrowth, B.L.; Twenden, K.; Schroeder, R.F. and Cameron, J.D. (١٩٩٨). Invivo efficacy of silver – coated (silzone). infection – resistant polyester fabric against a biofilm – producing bacteria , *Staphylococus epidermidis*. J. Heart Valve Dis. ٧:٥٢٤-٥٣٠ .

Jacoby, G.A. and Archer, G.L. (١٩٩١). New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. N. Engl. J. Med. ٢٨:٦٠١-٦١٠ .

Jin, D.J. and Cross, C.A. (١٩٨٨). Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli rpoB* gene that lead to rifampicin resistance. J. Mol. Biol. ٢٠٢(١):٤٥-٥٨ .

Johnston, J.H. and Richmond, M.H. (١٩٧٠). The increased rate of loss of penicillinase and rifampicin. J. Gen. Microbiol. ٦٠:١٣٧-١٣٩.

Jones, H.C.; Roth, I.L. and Saunders, W.M.(١٩٦٩). Electron microscopic study of a slime layer. J. Bacteriol. ٩٩: ٣١٦-٣٢٥ .Cited by Donlan (٢٠٠٢) .

Kamal, G.D.; Pfaller, M.A.; Rempe, L.E. and Jebson, P.J.R. (١٩٩١). Reduced hntravascular catheter infection by antibiotic bonding. A prospective, randomized, controlled trial. JAMA. ٢٦٥: ٢٣٦٤ – ٢٣٦٨.

Karch, H.; Russmann, H.; Schmidt, H.; Schwar, Z.K. and Heesemann, J. (١٩٩٥). Long – term shedding and clonal turnover of EHEC ٠١٥٧ in diarrhea disease. J. Clin. Microbiol. ٣٣:١٦٠٢ .

Kassis-Chikhani, n.; Decre, D.; Gautier, V.; Burghoffer, B. et al. (٢٠٠٦). First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla* VIM-١ and *bla* SHV-٥ in a French university hospital. J. Antimicrob. Chemother. ٥٧(١):١٤٢-١٤٥ .

Kawamura, N.; Kurokawa, K.; Ito, T.; Hamamoto, H.; Koyama, H.; Kaito, C. and Sekimizu, K. (٢٠٠٥). Participation of Rho – dependent transcription terminator in oxidative stress sensitivity caused by an *rpoB* mutation. Genes to Cells, ١٠:٤٧٧-٤٨٧ .

Keren, I.; Shah, D.; Spoering, A.; Kaldalu, N. and Lew is, K. (٢٠٠٤). Specialized persister cells and the mechanism of multi drug tolerance in *Escherichia coli*. Bacteriol .١٨٦: ٨١٧٢ – ٨١٨٠ .

Kim, K.Y. and Frank, J.F. (١٩٩٥). Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. J. Food Prot. ٥٨ (١): ٢٤ – ٢٨.

Kim , W.J. and Park , S.C. (١٩٩٨). Bacterial resistance to antimicrobial agents. Yonsef Med. J. ٣٩:٤٨٨-٤٩٤.

Kjaergaard, K.; Schembri , M .A.; Ramos, C. Molin, S. and Klemm , P . (٢٠٠٠). Antigen ٤٣facilities formation of multi species biofilms. Environ. Micrbiol. ٢ (٦):٦٩٥-٧٠٢.

Kleerebezem , M; Quadri, L.E.; Kuipers , O.P. and de Vos , W.M. (١٩٩٧).Quorum sensing by peptide pheromones and two – component signal transduction systems in gram positive bacteria. Mol. Microbiol. ٢٤:٨٩٤-٩٠٤.

Klemm, P.; Hjerrild , L.; Gjermansen, M. and Schembri, M .A. (٢٠٠٤). Structure – function analysis of the self-recognizing antigen٤٣ auto transporter protein from *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. ٥١:٢٨٣ - ٢٩٦.

Kotra, L.P.; Haddad, J. and Mobashery, S. (٢٠٠٠). Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٤(١٢):٣٢٤٩-٣٢٥٦ .

Kumar, C.G. and Anand, S.K. (١٩٩٨). Significance of microbial biofilms in food industry : a review. Int. J. Food Microbiol., ٤٢ : ٩ - ٢٧ .

Langsrud, S. and Sundheim, G. (١٩٩٧). Factors contributing to the survival of poultry associated Pseudomonaas spp. exposed to a quaternary ammonium compound. J. Appl. Microbiol. ٨٢:٧٠٥-٧١٢.

Lazazzera , B.A. (٢٠٠٠).Quorum sensing and starvation: signals for entry into the stationary phase. Curr. Opin. Microbiol. ٣:١٧٧-١٨٢.

Lewis, K.; Hooper, D.C. and Quellette, M. (١٩٩٧). Multidrug resistnce pumps provide broad defense. ASM News. ٦٣:٦٠٥-٦١٠ .

Lewis, K. (٢٠٠١). Riddle of biofilm resistance. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٥: ٩٩٩ – ١٠٠٧.

Luna, V.A.; Coates, P.; Eady, E.a.; Cove, J.H.; Nguyen, T.T. and Roberts, M.C. (١٩٩٩). A variety of gram – positive bacteria carry mobile *mef* genes. J. Antimicrob. Chemother. ٤٤:١٩-٢٥ .

Ma, D.; Cook, D.N.; Hearst, J.E. and Nikaido, H. (١٩٩٤). Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. Trends Microbiol. ٢:٤٨٩-٤٩٣ .

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

Maki.D.G. (١٩٩٤). Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention, and management. p.١٥٥-٢١٢. In. A.L. Bisno and F. Waldovogel (ed.). Infections associated with indwelling medicl devices. "٢nd ed." .American Society for Microbiology, Washigton, D.C.

Marchandin, H.; Jean, H.; Champs, C.; Sirt, D.; Darbas, H.; Perigauit, P. and Carriere, C. (٢٠٠٠). Production of a TEM-٢٤ plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. Agents Chemother. ٤٤:٢١٣-٢١٦ .

Martinze, L.; Pascual, A.; Alles, S.; Dize, D.; Suarez, A. and Tran, J. (١٩٩٩). Role of β-lactamases and porins in activities of Carbapenems and Cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae* . Antimicrob. Agents. Chemother. ٤٣ (٧) : ١٦٦٩ -١٦٧٣ .

May, J.W.; Houghton, R.H. and Perret, C.J. (١٩٦٤). The effect of growth at elevated temperatures on some heritable properties of *Staphylococcus aureus* .J. Gen. Microbiol. ٣٧:١٥٧-١٦٩.

McDonnell, G. and Russell, A.D. (١٩٩٩). Antiseptics and disinfectants activity, action, and resistance. Clin. Microbiol. Rev. ١٢:١٤٧-١٧٩ .

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

Murray, I.A. and Shaw, W.V. (١٩٩٧). O-Acetyl transferase for Chloramphenicol and other natural products. Antimicrob. Agents Chemother. ٤١(١):١-٦ .

National Committee for Clinical Laboratory Standards (١٩٩٧). Performnce stnderds for antimicrobial disk susceptibility text. "٦th ed.": approved standerd M٢-A٦.NCCLS, Wayne, Pa, USA.

Netting, J. (٢٠٠١). Sticky situations. The Weekly News Magazine of Science. ١٦٠ (٢): ٢٨ – ٤٣.

Nikaido, H. (١٩٩٨). Multiple antibiotic resistance and efflux. Curr. Opin. Microbiol. **August**:٥١٦-٥٢٣ .

Novick, R.P. (١٩٦٩). Extrachromosomal inheritance in bacteria. Bacteriol. Rev. ٣٣:٢١٠-٢٣٥ .

Novick, R.P. and Muir, T.W. (١٩٩٩). Virulence gene regulation by peptides in Staphylococci and other Gram-positive bacteria. Curr. Opin. Microbiol. ٢:٤٠-٤٥ .

Olson, M.E.; Ceri, H.; Morck, D.W.; Buret, A.G. and Read, R.R. (٢٠٠٢). Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can. J. Vet. Res. ٦٦(٢): ٨٦-٩٢ .

Omran , R . (٢٠٠٦) . The detection of transposable ampicillin - resistance in *K. pneumoniae* .

O'Reilly, M.G.; Foster, T.J. and Arbuthnott, J.P. (١٩٨١). Plasmids in epidermolytic strains of *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. ١٢٤:٩٩-١٠٧ .

O`Toole, G. A. and Kolter, R. (١٩٩٨). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol. Microbiol. ٣٠:٢٩٥-٣٠٤.

O` Toole, G.; Keplan, H.B .and kolter, R. (٢٠٠٠). Biofilms formation as microbial development. Annu. Rev. Microb. ٥٤: ٤٩ – ٧٩ .

Pancer, K.W.; Fila, S.; Trzcinska, ; Laudy, A.E.; Wernik, T.; Mikulak, E.; Gliniewicz, A.and StaypulKowska – Misurewicz, H. (٢٠٠٥). Strains of *Enterobacter cloacae* isolated in hospital environment: ability to adherence to Hep-٢ cell line and to biofilm forming. European Society of Clinical Microbiology and Infections Diseases, ٣: ٤٢١-١١٣٤.

Parsek, M.R. and Singh, P.K. (٢٠٠٣). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu. Rev. Microbiol. ٥٧:٦٧٧ – ٧٠١.

Paulsen, I.T.; Brown, M. and Skurray, R.A. (١٩٩٦). Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. ٦٠:٥٧٥-٦٠٨ .

Pelczar, M.J.; Chan, E.C.S. and Krieg, N.R. (١٩٨٦). Microbiology ."٥th ed.".McGraw-Hill Book Co.N.Y.

Poirel, L.; Naas, T.; Guibert, M.; Chaibi, E.B.; Labia, R. and Nordmann, P. (١٩٩٩). Molecular and biochemical characterization of VEB-١, a novel class

A extended spectrum β-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٣(٣):٥٧٣-٥٨١ .

Prescott , L.M.; Harley , D.A. (١٩٩٩). Microbiology ."٤th ed." .V.S.P. p. :١٣٨ – ١٤٨.

Pulcini, E.D. (٢٠٠١). Biofilms: sensing and signaling. J .Cal. Den. Ass. ٢٩ (٩): ١٩٤ – ١٩٨.

Raad, I.; Costerton, W.; Sabharwal, .; Sacilowsk, M. ; Anaissie , W. and Bodey, G. (١٩٩٣). Ultra structural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relation ship between luminal colonization and duration of placement. J. Infec. Dis. ١٦٨: ٤٠٠ – ٤٠٧.

Reberts, M.E. and Stewart, P.S. (٢٠٠٥). Modeling protection form antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. Microbiology, ١٥١: ٧٥ – ٨٠.

Reynolds, M.G. (٢٠٠٠). Compensatory evolution in rifampin – resistant *Escherichia coli*. Genetics, ١٥٦:١٤٧١-١٤٨١ .

Rjinaarts, H.H.; Norde, W.; Bouwer, E.J.; Lyklema, and Zehnder , A. (١٩٩٣). Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. Appl. Environ. Microbiol. ٥٩: ٣٢٥٥ – ٣٢٦٥.

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

Rohde, H.; Knobloch, J. K.; Horst Kotte, M. A. and Mack, D. (٢٠٠١). Correlation of the biofilm expression types of of the *Staphylococus*

epidermidis. with polysaccharide intracellular adhesion synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype – independent factors. Med. Microbiol. Immunol. ١٩٠: ١٠٥-١١٢.

Rosenberg, M. and Kjelleberg, S. (١٩٨٦). Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. Advances in Microbial Ecology. ٩:٣٥٣-٣٩٣.

Rouche, D.A.; Cram, D.S.; DiBernadino, D.; Littlejohn, T.G. and Skurray, R. A. (١٩٩٠). Efflux-mediated antiseptic gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline and sugar-transport proteins. Mol. Microbiol. ٤:٢٠٥١-٢٠٦٢ .

Ryder, M.A. (٢٠٠٥). catheter – Related Infections: It's All About Biofilm. Advanced practice nursing e J. ٥ (٣) : ١-١٥ .

Sabath, L.D.; Gerstein, D.A.; Leaf, C.D. and Finland, M. (١٩٧٠). Increasing the usefulness of antibiotics: treatment of infections caused by gram-negative bacilli. Clin. Pharmacol. Ther. ١١:١٦١-١٦٧ .

Sabath, L.D.; Garner, C.; Wilcox, C. and Finland, M. (١٩٧٦). Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to ٦٥ antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. ٩(٦):٩٦٢-٩٦٩ .

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (١٩٨٩). Molecular cloning: a laboratory manual."٢nd ed.".Cold Spring Harbor Laboratory Press.Cold Spring Harbor, N.Y.

Schembri, M. A.; Hjerrild , L.; Gjermansen, M. and - Klemm, P . (٢٠٠٣). Differential expression of the *Escherichia coli* auto aggregation factor antigen ٤٣. J. Bacteriol. ١٨٥: ٢٢٣٦ – ٢٢٤٢.

Schmitz.F.J.; Jones, M.E.; Hofman, B.; Hansen, B.; Scheuring, S.; Luckefahr, M.; Fluit, A.C.; Verhoef, J.; Hadding, U.; Heinz, H.P. nd Kohrer, K. (١٩٩٨).

Characterization of *grlA*, *grlB*, *gyrA* and *gyrB* mutations in ١١٦ unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* in relation to minimal inhibitory concentrations of Ciprofloxacin. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٢:١٢٤٩-١٢٥٢.

Schmitz, F.J.; Sadurski, R.; Kray, A.; Boss, M.; Geisel, R.; Kohrer, k.; Verhoef, J. and Fluit, A.C. (٢٠٠٠). Prevalence of macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from ٢٤ European university hospitals. J. Antimicrob.Chemother. ٤٥:٩٢١-٩٢٣.

Schmitz, F.-J.; Fluit, A.C.; Beeck, A.; Perdikouli, M. and von Eiff, C. (٢٠٠١). Development of chromosomally encoded resistance mutations in small – colony variants of *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. ٤٧:١١٣-١١٥ .

Schweizer, H.P. (١٩٩٨). Intrinsic resistance to antibiotics of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٢:٣٩٤-٣٩٨ .

Schwarz, S.; Lange, C. and Werckenthin, C. (١٩٩٨). Molecular analysis of the macrolide – lincosamide resistance gene region of a novel plasmid from *Streptococcus hyicus*. J. Med. Microbiol. ٤٧:٦٣-٧٠ .

Senda, K.; Areca, Y.; Akimbo, S.; Nakashima, K.; Ito, H.; Ohsuka, S.; Shimokata, K.; Kato, N. and Ohta, M. (١٩٩٦). PCR detection of metallo-β-lactamase genes(*bla* IMP). in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β-lactams. J. Clin. Microbiol. ٣٤:٢٩٠٩-٢٩١٣ .

Shaffrman, A.; Shalita, Z.A. and Hertman, I. (١٩٧٨). Cleavage maps of tetracycline plasmid from *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. ١٣٤:٣٤٥-٣٤٨ .

Shanahan, P.M.; Wylie, B.A.; Adrian, P.V., Koornhof, H.J.; Thomson, C.J. and Amyes, S.G. (١٩٩٣). The prevalence of antimicrobial resistance in human faecal flora in South Africa. Epidemiol. Infect. ١١١:٢٢١-٢٢٨ .

Sherley, M.; Gordon, D.M. and Collignon, P.J. (٢٠٠٠). Variations in antibiotic resistance profile in Enterobacteriaceae isolated from wild Australian mammals. Environmental Microbiology , ٢(٦) : ٦٢٠-٦٣١ .

Schnappinger, D. and Hillen, W. (١٩٩٦). Tetracycline's : antibiotic action, uptake and resistance mechanisms. Arch. Microbiol., ١٦٥ : ٣٥٩ - ٣٦٩ .

Sinha, B. Francois, P, P; Nube, O., Fot ; , M. Hartfort , O .M.; Vandanx, P.; Foster, T.J; Lew, D.P.; Herrmann, M. and Krause, K. (١٩٩٩). Fibronectin-binding protein such as *Staphylococcus aureus* invasion via fibronectin binding to integrin ٥B١. Cell Microbial, ١:١٠١ -١١٧.

Smooth, L.M. and Pierson, M.D. (١٩٩٨). Influence of environmental stress on the Kinetics and strength of attachment of *Lesionella Monocytogenes* Scott A to buna – n rubber and stainless steel. J. Food Prot. ٦١ (١٠): ١٢٨٦ – ١٢٩٢ ٠

Snyder, L.and Champness, W. (١٩٩٧). Molecular genetics of bacteria. American Society for Microbiology .ASM press, Washington D.C.

Solano, C. ; and Lasa, I. (٢٠٠٢). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. Mol. Microbiol. ٤٣: ٧٩٣ – ٨٠٨.

Sonstein, S.A. and Baldwin, J.N. (١٩٧٢). Loss of the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium dodecyl sulphate . Bacteriol.١٠٩(١):٢٦٢-٢٦٥.

Sougakoff, W.; Goussard, S.; Gerband, G. and Courvalin, P. (١٩٨٨). Plasmid – mediated resistance to third – generation Cephalosporins caused by points mutations in TEM-type penicillinase genes. Rev. Infect. Dis. ١٠(٤):٨٧٩-٨٨٤ .

Souza, V.; Rocha, M.; Valera, A. and Eguiarte, L. (١٩٩٩). Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. Appl. Environ. Microbiol. ٦٥:٣٣٧٣-٣٣٨٥ .

Stapleton, P.D.; Shannon, K.P. and French, G.L. (١٩٩٩). Carbapenem resistance in *Escherichia coli* associated with plasmid – determined CMY-٤ β-lactamases production and loss of an outer membrane protein. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٣:١٢٠٦-١٢١٠ .

Stewart, P. R., Dubin, D. T.; Chikramane, S. G.; Inglis, B.; Matthews, P. R. and Poston, S.M.(١٩٩٤). IS ٢٥٧ and small plasmid insertions in the *mec* region of the chromosome of *Staphylococcus aureus*. Plasmid, ٣١:١٢-٢٠ .

Stewart, P.S. and Costerton, J.W. (٢٠٠١). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. ٣٥٨: ١٣٥ – ١٣٨.

Stewart, P.S. (٢٠٠٢). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int. J. Med. Microbiol. ٢٩٢: ١٠٧ – ١١٣ .

Stickler, D.J. and Thomas, B. (١٩٨٠). Antiseptic and antibiotic resistance in gram-negative bcteria causing urinary tract infection. J. Clin. Pathol. ٣٣:٢٨٨-٢٩٦ .

Stickler, D. and Hewett, P. (١٩٩١). Activity of antiseptics against biofilms of mixed bacterial species growing on silicone surfaces. Eur .J. Clin. Microbial. Infect. Dis. ١٠:٤١٦ – ٤٢١.

Stickler, D.J.; King, J.; Nettelton, J. and winters, C. (١٩٩٣). The structure of urinary catheter encrusting bacterial biofilms. Cells and Materials, ٣:٣١٥ – ٣١٩.

Stickler, D.J. (١٩٩٦). Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. Biofouling Journal, ٩٤: ٢٩٣ – ٣٠٥.

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

Sutherland, I.W. (١٩٨٣). Microbial exopolysaccharides : their role in microbial adhesion in aqhesion in aqueous systems. Crit. Rev. Microbial. ١٠ (٢).

Sutherland, I.W (٢٠٠١). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky from work .J. Microbiol. ١٩٧: ٣ – ٩.

Tauch, A.;Puhler, A.; Kalinowski, J. and Thierbach, G. (٢٠٠٠). TetZ, a new tetracycline resistance determinant discovered in gram-positive bacteria, shows high homology to gram-negative regulated efflux systems. Plasmid, ٤٤ : ٢٨٥ - ٢٩١ .

Tennent, J.M.; Young, H.-K.; Lyon, B.R.; Aymes, S.G.B. and Skurray, R.A. (١٩٨٨). Trimethoprim resistance determinants encoding a dihydrofolate reductase in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase–negative Staphylococci. J. Med. Microbiol. ٢٦:٦٧-٧٣ .

Tenover, F. C.; Gootz, T.D.; Gordon, K. P.; Tompkins, L.S.; Young, S.A. and Plorde, J.J.(١٩٨٤). Development of a DNA probe for the structural

gene of the ٢″ -O- adenyl transferase aminoglycoside - modifying enzyme. J. Infect. Dis. ١٥٠ : ٦٧٨ - ٦٨٧ .

Tenover, F.C.; Phillips, K.L.; Gilbert, T.; Lockhart, P.; O'Hara, P.J. and Plorde, J.J.(١٩٨٩). Development of DNA probe from the deoxyribonucleotide sequence of a ٣-N-aminoglycoside acetyle teansferase[AAC(٣)-I] resistance gene . Antimicrob. Agents. Chemother. ٣٣ : ٥٥١ - ٥٥٩ .

Tit, S. and Aymes, S.G.B. (١٩٩٤). Trimethoprim resistant dihydrofolate reductase in normal faecal flora isolated in India. Epidemiol. Infect. ١١٣:٢٤٧-٢٥٨ .

Tolker-Nielsen, T.; Brinch, V .C. ; Ragas, P. C.; Andersen, J. B.; Jacobsen, C. S. and Molin, S. (٢٠٠٠). Development and Dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms, J. Bacteriol. ١٨٢ (٢٢):٦٤٨٢-٦٤٨٩.

Tomasz, A.; Drugeon, H. B.; de Lencastre, H. M.; Jabes, D.; McDougall, L. and Bille, J. (١٩٨٩). New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP٢a gene and contain normal penicillin-binding protein with modified penicillin-binding capacity. Antimicrob. Agents Chemother. ٣٣:١٨٦٩-١٨٧٤ .

Tomoeda, M.; Inazuka, M.; Anto, S. and Mikonishi (١٩٧٤). Curing action of sodium dodecyl sulphate on *Proteus mirabilis* R+ strain. J. Bacteriol. ١٢٠(٣):١١٥٨-١١٦٣ .

Tran Van Nieu, G.; Bordon, F. and Collatz, E. (١٩٩٢). Incidence of an aminoglycoside ٦-N-acetyl transferase , AAC(٦')-١b, in amikacin-resistant clinical isolates of gram-negative bacilli, as determined by

DNA-DNA hybridization and immunoblotting . J. Med. Microbiol. ٣٦ : ٨٣ - ٨٨ .

Tresse, O.; Jouenne, T.; and Junter, G.-A. (١٩٩٥). The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and β-lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. ٣٦ : ٥٢١ - ٥٢٦.

Trzcinski, K.; Cooper, B.S.; Hryniewics, W. and Dowson, C.G. (٢٠٠٠). Expression of resistance to tetracyclins in strains of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemother. ٤٥:٧٦٣-٧٧٠ .

Tzakris, A.; Johnson, A.P.; Legakis, N.J. and Tzouvelekis, L.S. (١٩٩٣). Prevalence of the type I and type II DHFR genes in trimethoprim-resistant urinary isolates of E.coli from Greese. J. Antimicrob. Chemother. ٣١:٦٦٥-٦٧١ .

Uhlich, G. A.; Keen J.E. and Elder, R.O. (٢٠٠١). Mutations in the *csg D* promoter associated with variations in curli expression in certain strains of *Escherichia coli* ٠١٥٧:H٧. Appl. Microbiol. ٦٧: ٢٣٦٧-٢٣٧٠ .

Valverde, A.; Coque, t.M.; Sanchez-Moreno, M.P.; Rollan, A.; Baquero, F. and Canton, R. (٢٠٠٤). Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended– spectrum β-lactamase – producing Enterobacteriaceae during non outbreak situations in Spain. J. Clin. Microbiol., ٤٢(١٠):٤٧٦٩-٤٧٧٥ .

Vandecasteele, S.J., peetermans, W.E.; Merckx , R. and Van Eldere, J. (٢٠٠٣). Expression of biofilm–associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. J. Infect. Dis. ١٨٨: ٧٣٠ – ٧٣٧ .

Veenstra, G.J.; Cremers, F.F.; Van Dijk, H. and fleer A. (١٩٩٦). Ultra structural organization and regulation of a biomaterial adhesion of *Staphylococcus epidermidis*. J. Bacteriol. ١٧٨: ٥٣٧ - ٥٤١.

Villegas, M.V.; Lolans, K.; Olivera, M.; Saurez, C.J.; Correa, A.; Queenan, A.M. and Quinn, J.P. (٢٠٠٦). First detection of Metallo-β -lactamase VIM-٢ in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. Antimicrob. Agents Chemother. ٥٠(١):٢٢٦-٢٢٩.

Visick, K.L. and Fuqua, C. (٢٠٠٥). Decoding microbial chatter: cell-cell communication in bacteria. J. Bacteriol. ١٨٧(١٦):٥٥٠٧-٥٥١٩.

Warsa, V.C.; Nonoyma, M.; Ida, T.; Okamoto, R.; Okubo, T.; Shimauchi, C.; Kuga, A. and Inoue, M. (١٩٩٦). Detection of *tetK* and *tetM* in *Staphylococcus aureus* of Asian countries by the polymerase chain reaction. J. Antibiot.٤٩:١١٢٧-١١٣٢ .

Weisblum, B. (١٩٩٥). Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. Antimicrob. Agents Chemother. ٣٩:٧٩٧-٨٠٥ .

Werckentyin, C.; Schwarz, S. and Westh, H. (١٩٩٩). Structural alterations in the translational attenuator of consecutively expressed *ermC* genes. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٣:١٦٨١-١٦٨٥.

William R.J.; Hendrson, B.; Sharp, L. J. and Nair, S. P. (٢٠٠٢). Identification of a fibronectin–binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immune.٧٠: ٦٨٠٥-٦٨١٠.

Wimpenny, J.; Manz, W. and Szewzy K, V. (٢٠٠٠). Heterogeneity in biofilms. FEMS Microbial Rev. ٢٤ : ٦٦١ – ٦٧١.

Xu, M.; Zhou, Y.N.; Goldstein, B.P. and Adurugamuwa, D.J.J. (٢٠٠٥). Cross – resistance of *Escherichia coli* RNA polymerases conferring rifampin resistance to different antibiotics. J. Bacteriol. ١٨٧(٨):٢٧٨٣-٢٧٩٢ .

Yagi, T.; Wachino, J.; Kurokawa, H.; Suzuki, S.; Yamane, K.; Doi, Y.; Shibata, N.; Kato, H.; Shibayama, K. and Arakawa, Y. (٢٠٠٥). Practical methods using boronic cid copounds for identification of ClassC β-lactamase –producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichi coli*. J. Clin. Microbiol. ٤٣(٦): ٢٥٥١-٢٥٥٨ .

Yu, J.; Wu, J.; Francis, K.P.; Purchio, T.F. and Jagath, L.K. (٢٠٠٥). Monitoring invivo fitness of rifampicin–resistant *Staphylococcus aureus* mutants in a mouse biofilm infection model. J. Bacteriol. ١٨٧(٨): ٢٧٨٣-٢٧٩٢ .

Yung – Hua , L.; Lau, P.C.Y.; Lee, J.H.; Ellen, R .P .and Cvitkovitch, D.G (٢٠٠١). Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. J. Bacteroil. ١٨٣: ٨٩٧-٩٠٨.

Zheng, D. ; Taylor, G .A. and Gyananth, G. (١٩٩٤). Influence of laminar flow velocity and nutrient concentration on attach went of marine bacterioplankton. Biofouling, ٨: ١٠٧ – ١٢٠.

Ziebuhr, W.; Heilmann, C.; Gotz, F.; Meyer, P. Wilms, K.; Straube, E AND Hacker, J. (١٩٩٧). Detection of the intracellular adhesion gene cluster (*ica*). and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. Infect. Immun. ٦٥:٨٩٠-٨٩٦.

Ziha-Zarifi, I.; Llanes, C.; Kohler, T.; Pechere, J. and Pleasiant, P. (١٩٩٩). In vitro emergence of multidrug resistant mutants of *Pseudomonas*

aeruginosa over expressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. Antimicrob. Agents Chemother. ٤٣: ٢٨٧-٢٩١ .

Zobell, C.E.(١٩٤٣). The effect of solid surfaces on bacterial activity. J.Bacteriol. ٤٦: ٣٩-٥٦ .Cited by Pulcini (٢٠٠١) .

Zogaj, X.; Bokrnaz, W.; Nimtz, M. and Romling, N. (٢٠٠٣). Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobactariaceae isolated from the human gastro intestinal tract. Infect. and Immun. J. ٧١ (٧): ٤١٥١ – ٤١٥٨.

Zottola, E.A. (٢٠٠١). Reflections on *Salmonella* and other wee beasties in foods. J .Food. Tech. **٥٥** (٩): ٦٠ – ٦٧.

الأستنتاجات Conclusions :

١. ظهر ان العزلات البكتيرية السالبة لصبغة غرام كانت هي السائدة في الغشاء الحيوي المتكون على العدد الطبية ، والعزلات البكتيرية المتحركة هي السائدة على غير المتحركة.
٢. سيادة بكتريا *E. coli* على جميع الأنواع البكتيرية المعزولة ، وان العزلة *S. epidermidis* هي الأكثر سيادة من بين العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة غرام.
٣. كانت اعلى نسب مقاومة للبكتريا المعزولة من الأغشية الحيوية هي لمضاد الأمبسلين ، وأقل نسب مقاومة هي لمضاد الأميكاسين .
٤. يعمل الغشاء الحيوي كطبقة عازلة تمنع وصول تأثير مضادات الحياة للأحياء المجهرية المكونة للغشاء، اذ سجلت اعلى نسب مقاومة لمضاد الأمبسلين ، واقل نسب المقاومة لمضاد الأميكاسين.
٥. اثبتت المطهرات المستخدمة في مستشفى الحلة التعليمي العام (اليود، الديتول، الهكساتان، السابتون) بأستثناء الكحول كفاءتها في التعقيم مما يدل على أن استخدام هذه المطهرات كان غير صحيح في المستشفى المذكور آنفا، بالاضافة الى انخفاض حساسية البكتريا تجاهها.
٦. كانت جينات مقاومة كل من الأمبسيلين، التتراسايكلين، الأرثرومايسين، الكلورامفينيكول، التراي ميثوبريم، والجنتامايسين محمولة على البلازميدات الصغيرة .

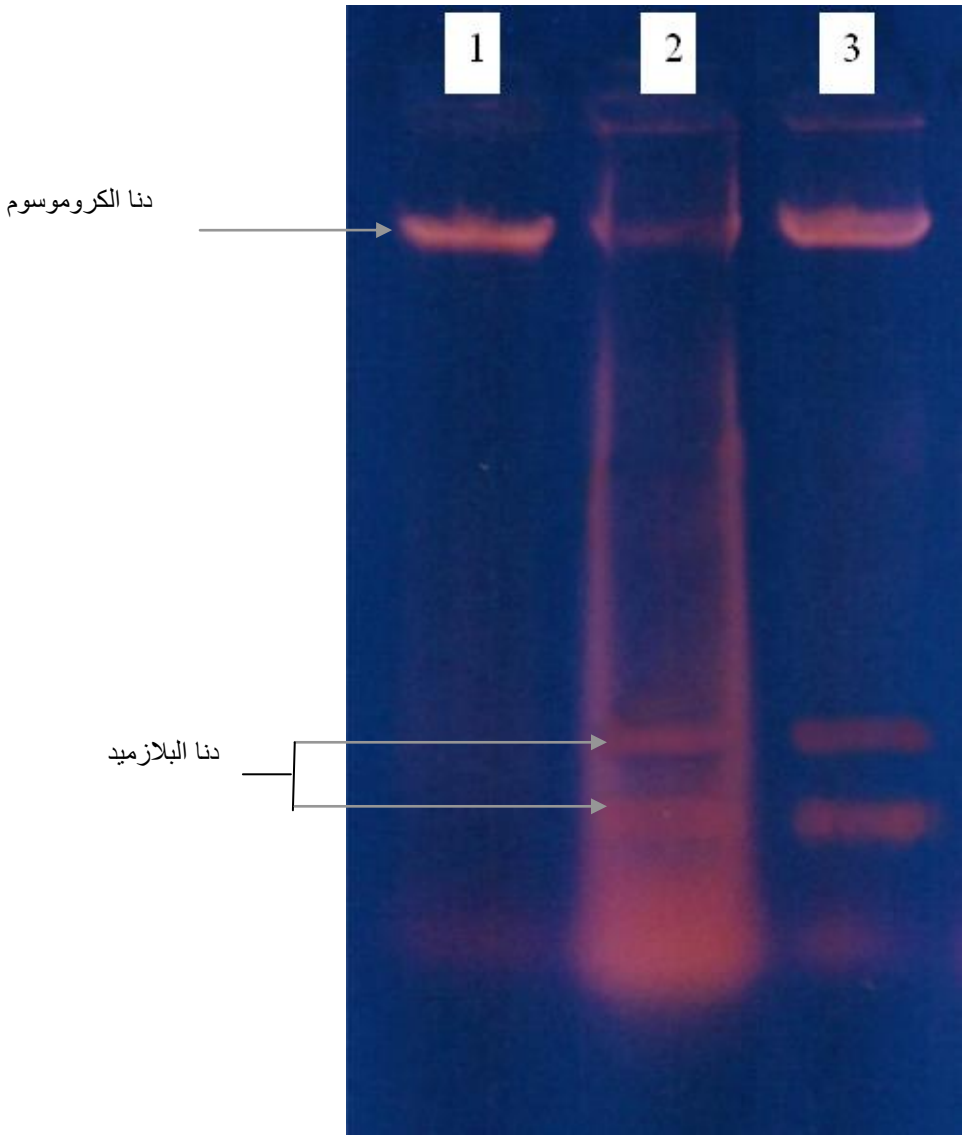
وعلى ضوء ذلك نوصي بالآتي :

١. اجراء دراسات مستفيضة عن الغشاء الحيوي المتكون على العدد الطبية والتركيز على تجريب علاجات جديدة مضادة لتكونه على تلك العدد .
٢. التأكد من كون العدة الطبية جديدة ومعقمة قبل ادخالها في جسم المريض، وعدم وضعها لمدة طويلة داخل الجسم.
٣. تجنب الأستخدام المفرط و العشوائي للمطهرات، واستحداث وحدة سيطرة للعمل على تقييس و تحضير تخافيف المطهرات المستخدمة في المستشفيات.
٤. دراسة المحتوى الوراثي للبكتريا المكونة للأغشية الحيوية على العدد الطبية باستخدام التقنيات الجزيئية المتطورة كتقنية PCR وتقنية RFLP لتحديد السلالات المستوطنة في المستشفى لتكون مرجعا للدراسات المستقبلية .

جدول ٤ –٦ . النسب المئوية لمقاومة البكتريا المعزولة من الاغشية الحيوية لمضادات الحياة.

مضاد الحياة / العزلة البكتيرية	*E.coli*		*K.pneumoniae*		*E.cloacae*		*P.aeruginosa*		*P.mirabilis*		*S.typhimurium*		*S.dysenteriae*		*S.auerus*		*S.epidermidis*		النسبة المئوية للمقاومة الكلية
	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة	
Ap	١٤	١٠٠	١٠	١٠٠	٦	٨٥.٧	٥	١٠٠	٢	٦٦.٦	٤	١٠٠	٢	١٠٠	٤	١٠٠	٧	١٠٠	٩٦.٤
Ax	١٤	١٠٠	١٠	١٠٠	٦	٨٥.٧	٥	١٠٠	٣	١٠٠	٣	٧٥	٢	١٠٠	٢	٥٠	٧	١٠٠	٩٢.٩
Apx	١٢	٨٥.٧	١٠	١٠٠	٥	٧١.٤	٤	٨٠	٢	٦٦.٦	٤	١٠٠	٢	١٠٠	٤	١٠٠	٧	١٠٠	٨٩.٣
CTX	٦	٤٢.٨٥	٤	٤٠	٦	٨٥.٧	٥	١٠٠	٢	٦٦.٦	١	٢٥	٢	١٠٠	٣	٧٥	٤	٥٧	٥٨.٩
G	٤	٢٨.٥٧	٣	٣٠	٧	١٠٠	٤	٨٠	١	٣٣.٣	٣	٧٥	٢	١٠٠	١	٢٥	٧	١٠٠	٥٧.١
Ak	٠	٠	٠	٠	٥	٧١.٤	٤	٨٠	٠	٠	٢	٥٠	٢	١٠٠	٠	٠	٠	٠	٢٣.٢
Tc	١١	٧٨.٥٧	٣	٣٠	٥	٧١.٤	٥	١٠٠	٢	٦٦.٦	٣	٧٥	٢	١٠٠	٢	٥٠	٧	١٠٠	٧١.٤
E	١٢	٨٥.٧	١٠	١٠٠	٦	٨٥.٧	٤	٨٠	٣	١٠٠	٤	١٠٠	٢	١٠٠	٣	٧٥	٧	١٠٠	٩١.١
Cm	٥	٣٥.٧	٤	٤٠	٥	٧١.٤	٥	١٠٠	٢	٦٦.٦	٢	٥٠	٢	١٠٠	١	٢٥	٠	٠	٤٦.٤
Nal	٦	٤٢.٨٥	٣	٣٠	٤	٥٧.٢	٥	١٠٠	٢	٦٦.٦	٤	١٠٠	٢	١٠٠	-	-	-	-	٤٦.٤
Rif	١٢	٨٥.٧	١٠	١٠٠	٤	٥٧.٢	٥	١٠٠	٢	٦٦.٦	٢	٥٠	٢	١٠٠	٠	٠	٣	٤٢.٨	٧١.٤
Tp	٧	٥٠	٧	٧٠	٧	١٠٠	٥	١٠٠	٠	٠	٢	٥٠	٢	١٠٠	٣	٧٥	٣	٤٢.٨	٦٤.٣

المختصرات: Ap :أمبسيلين، Ax : أموكسيسيلين، Apx : أمبكلوكس، CTX : سيفوتاكسيم، G : جنتامايسين، Ak : أميكاسين، Tc : تتراسايكلين، E : ارثرومايسين، Cm : كلورامفينيكول، Nal : ناليديكسيك أسيد، Rif : ريفامبسين، Tp : تراي ميثوبريم .



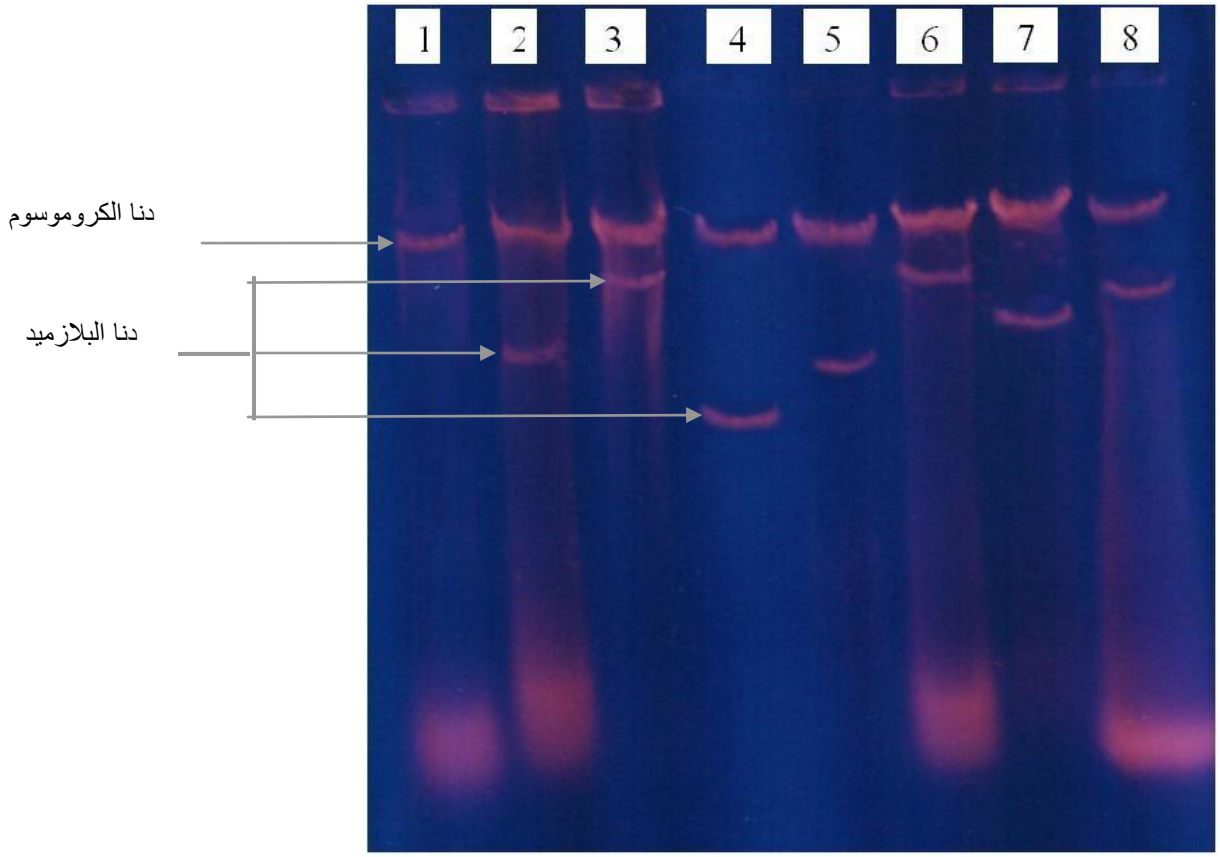
شكل ٤-٦ . النسق البلازميدي لبعض عزلات بكتريا العنقوديات المكونه للأغشيه الحيويه على العدد الطبيه .

تم الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز (٠.٨%) بفرق جهد ٤٠ فولت لمدة ٣ ساعات .

المسار ١. المحتوى الوراثي للسلالة القياسية *E. coli* MM ٢٩٤ .

المسار ٢. المحتوى الوراثي لبكتريا *S. aureus* ٩ .

المسار ٣. المحتوى الوراثي لبكتريا *S. epidermidis* ٢٠ .



شكل ٤-٥ .النسق البلازميدي لبعض عزلات البكتريا السالبة لصبغة غرام المكونه للأغشيه الحيويه على العدد الطبيه .

تم الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز (٠.٨%) بفرق جهد ٤٠ فولت لمدة ٥ ساعات .

المسار ١. المحتوى الوراثي للسلالة القياسية *E. coli* MM ٢٩٤ .

المسار ٢. المحتوى الوراثي لبكتريا *E. coli* ١١ .

المسار ٣. المحتوى الوراثي لبكتريا *K. pneumoniae* ٦ .

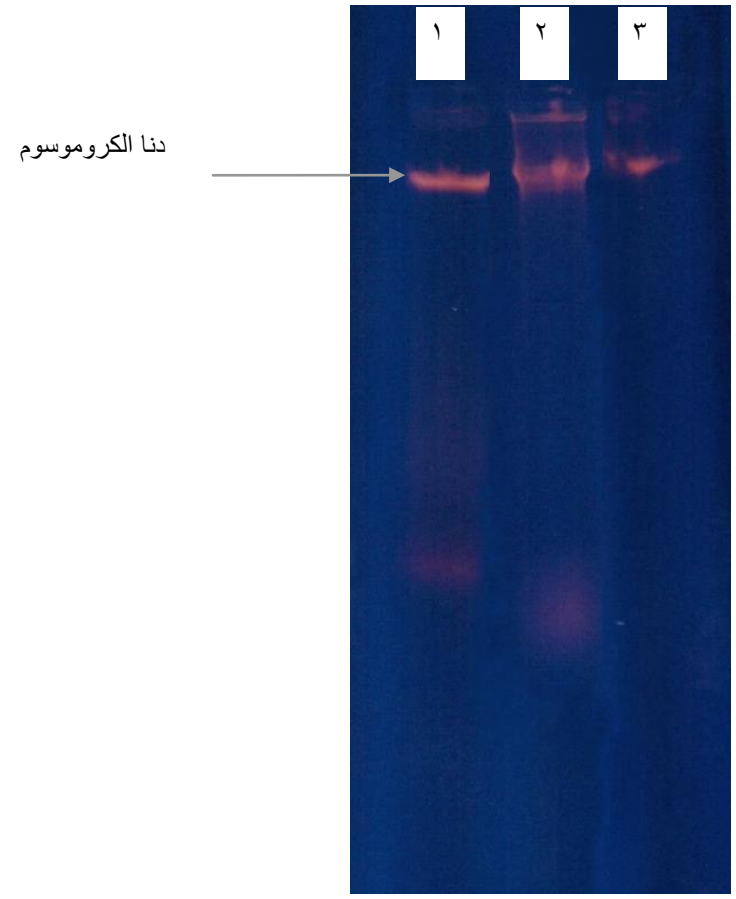
المسار ٤. المحتوى الوراثي لبكتريا *E. cloacae* ٤٣ .

المسار ٥. المحتوى الوراثي لبكتريا *P. aeruginosa* ١ .

المسار ٦. المحتوى الوراثي لبكتريا *P. mirabilis* ٤ .

المسار ٧. المحتوى الوراثي لبكتريا *S. dysenteriae* ٥٢ .

المسار ٨. المحتوى الوراثي لبكتريا *S. typhimurium* ٥٤ .



شكل ٤-٧ . المحتوى الوراثي للعزلتين البكتيريتين *S. typhimurium* ST٥٤ و *S. epidermidis* SE٢٠ بعد التحييد بمادة SDS .

تم الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز (٠.٨%) بفرق جهد ٤٠ فولت لمدة ساعتين .

المسار ١. المحتوى الوراثي للسلالة القياسية *E. coli* MM ٢٩٤ .

المسار ٢. المحتوى الوراثي لبكتريا *S. epidermidis* SE٢٠ . .

المسار ٣. المحتوى الوراثي لبكتريا *S. typhimurium* ST٥٤ .

ملحق ١ . مضادات الحياة شائعة الاستعمال ورموزها ونسب التحميل القياسية للأقراص واقطار التثبيط (NCCLS,١٩٩٧) .

مضاد الحياة	الرمز	تحميل القرص	أقطار التثبيط القياسية(ملم)

		(مايكروغرام)	مقاوم	حساس
ارثرومايسين	E	١٥	أقل من ١٣	أكثر من ٢٣
أمبسيلين	Ap	١٠	أقل من ١١	أكثر من ١٤
أموكسيسيلين	Ax	٢٥	٢٠	١٩
أميكاسين	Ak	٣٠	أقل من ١٤	أكثر من ١٧
تتراسايكلين	Tc	٣٠	أقل من ١٤	أكثر من ١٩
تراي ميثوبريم	Tp	٥	أقل من ١٠	أكثر من ١٦
جنتامايسين	G	١٠	أقل من ١٢	أكثر من ١٥
ريفامبيسين	Rif	٥	أقل من ١٦	أكثر من ٢٠
سيفوتاكسيم	CTX	٣٠	أقل من ١٢	أكثر من ١٨
كلورامفينيكول	Cm	٣٠	أقل من ١٢	أكثر من ١٨
ناليديكسيك أسيد	Nal	٣٠	أقل من ١٣	أكثر من ١٩
نوفوبايوسين	NV	٣٠	أقل من ١٤	أكثر من ٢١