دراسة بكتيريولوجية ووراثية للعنقوديات السالبة للأنزيم المختثر لبلازما الدم

رسالة مقدمة من

نـهاد كاظم جاسم

الى مجلس كلية العلوم – جامعة بابل

وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم

في علوم الحياة / التقانة الأحيائية

بأشراف أ. م. د. حسن فاضل ناجي

تشرين الأول – ٢٠٠٦ **شوال – ١٤٢٧**

Bacteriological and Genetically Studies on coagulase – negative Staphylococci

A Thesis

Submitted by Nehad Kadhim Jassim

To the council of College of Science

University of Babylon

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master in Biology – Biotechnolgy

Supervisor

Assi. Prof. Hassan Fadhil Naji

October – ٢٠٠٦ **Shewal - ١٤٢٧**

Summary

A total of ٣٦٠ specimens were collected from Al-Hilla General Educational Hospital involved ٢٤٠ clinical specimens and ١٢٠ specimens for hospital staff .The clinical specimens divided into two groups , the first were ١٢٠ for in patients and the second were ١٢٠ for out patients, for both males and females at different ages . This research was performed during the period of December- ٢٠٠٤ to May- ٢٠٠٥.

The isolates were identified depending on morphological characterization (culturing and microscopy), the results showed that ٢٣٢ isolates were staphylococci , these isolates were recharecterized with the help of biochemical tests which confirmed that ٧٣ isolates were *Staphylococus aureus*, ١٣٣ isolates were *S. epidermidis* and ٢٦ isolates were *S. saprophyticus* .

The detection of coagulase production was done using tube test while the clumbing factor test was performed using slide test with human plasma, The results showed that ١٦٥ isolates were coagulase negative, about ٧١% of staphylococci and ١٦١ were negative for clumbing factor . The most isolates were *S. epidermidis* (٥٧%) and *S. saprophyticus* (١١%).

The number of infections due to these staphylococci were ٤٠ for in patients, while it was ٣٨ for out patients.

About ٥٢ isolates were chosed for antibiotic susceptibility test using disk diffusion technique toward ١٤ of most usable antibiotics , it was showed that the major percentage of resistance were ١٠٠٪ for penicillin G , ٦٦٪ for methicillin, ٧.٥% for rifampicin and ٠٪ for vancomycin.

The phenol coefficient was determined of some antiseptics and disinfectants .It was found that the maximum value were ٦٥٠ for iodine complex at concentration of ٧.٧٪ and the minimum value were ٠.٧ for ethanol at concentration of ٧٠% .

The total bacterial DNA were extracted using salting out technique with the help of lysozyme for four multible resistant isolates that presentable members of most isolates. The DNA extracts were electrophoresed using agarose –gel electrophoresis, The results showed that there were a symelarities on plasmids contained of these isolates ,just two plasmid bands were showed .

The four isolates were tested for curing experiments using sodium dodecyle sulphate (SDS) and the results showed that the optimum concentrations of SDS were ٢.٥-٧.٥ mg/ml whereas, the curing efficiency was ٨٥٪ for some isolates. The genes responsible for coagulase production were located on the chromosome while, it was appeared that penicillin G, ampicillin, tetracyclin, erythromycin, trimethoprim, gentamycin,dettol and saptone genes were located on the plasmids.

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿يا معشر الجن والإنس إن استطعتم أن تنفذوا من
أقطار السموات والأرض فانفذوا لا تنفذون إلا
بسلطان﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة الرحمن الاية (٣٣)

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد الأنام محمد الأمين وعلى أهل بيته الطيبين الطاهرين وبعد....

فأتقدم بخالص الشكر والعرفان إلى أستاذي الفاضل الدكتور حسن فاضل ناجي لاقتراحه موضوع الدراسة ودعمه المتواصل لي أعزه الله بعزته وأدامه أستاذا و معلماً كريماً...

كما أتقدم بالشكر والامتنان الى رئاسة قسم علوم الحياة والى جميع الأساتذة فيه والى عمادة كلية العلوم....

ويطيب لي ان أتقدم بالشكر الجزيل للكادر الطبي في مستشفى الحلة التعليمي العام مديراً وأطباء وكوادر طبية واخص بالذكر منهم كادر مختبر الأحياء المجهرية الأخوان كريم وزيد والست الفاضلة ايمان. وعرفاناً وامتناناً وافرين للدكتورة الفاضلة رباب عمران أمدها الله تعالى علماً وعمراً مديداً....

واقف احتراماً وإكراما للأستاذ الفاضل الدكتور إبراهيم شناوة اباً وأستاذاً فاضلاً، كما أتقدم بالشكر للدكتور قاسم نجم لسؤاله ومتابعته الأخوية الكريمة المخلصة. وأتقدم بالشكر الجزيل إلي زميلتي ورفيقة رحلتي الدراسية الأخت الفاضلة داليا صلاح اجلها الله تعالى واعزها وأكرمها.....

كما أتقدم بوافر شكري واحترامي لزملائي طلاب الدراسات العليا واخص منهم الأخوان شاكر حماد وفاخر مكطوف أدامهم الله تعالى أعزةً كراماً....

كما أوجه شكري للأخت الفاضلة الست ضحى...لمساعدتي في إتمام طباعة الرسالة، وفقها الله تعالى الى كل خير وبركة.....

نهاد

الخلاصة

جمعت ٣٦٠ عينة من مستشفى الحلة التعليمي العام اذ شملت ٢٤٠ عينة سريرية و١٢٠ عينة من الكادر الطبي للمستشفى. توزعت العينات السريرية الى مجموعتين ضمت الأولى ١٢٠ عينة للمرضى الراقدين في المستشفى والثانية ١٢٠ عينة لمرضى مراجعين ومن كلا الجنسين وباعمار مختلفة.تم جمع العينات خلال المدة الممتدة من كانون الاول-٢٠٠٤ الى مايس-٢٠٠٥.

شخصت العزلات اعتماداً على الصفات المظهرية (الزرعية والمجهرية) فأظهرت النتائج ان ٢٣٢ عزلة تعود لجنس العنقوديات والتي تم تشخيصها اعتماداً على الفحوصات الكيموحيوية الى ٦٩ عزلة عائدة لبكتريا *Staphylococcu auerus* و ١٣٧ عزلة لبكتريا *S. epidermidis* و ٢٦ عزلة لبكتريا *S. saprophyticus*.

اجري فحص انتاج الانزيم المخثر لبلازما الدم بطريقة انابيب الاختبار وفحص عامل التكتل بطريقة الشريحة الزجاجية باستخدام بلازما دم الانسان اذ أظهرت النتائج ان ١٦٥ عزلة كانت سالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم شكلت نسبة ٧١% من العنقوديات المعزولة. كانت نسبة بكتريا *S. epidermidis* هي ٥٩% ونسبة بكتريا *S. saprophyticus* ١١% اما نسبة بكتريا *S. aureus* فكانت ٢٩%. بلغت نسبة الأخماج بهذه العنقوديات في المرضى الراقدين ٥٢%فيما كانت ٤٨% في المرضى المراجعين.

تم اختيار ٥٢ عزلة من العنقوديات المعزولة لاجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية بطريقة الاقراص المشبعة تجاه ١٤ مضاداً حيوياً شائع الاستعمال طبياً، فكانت نسب المقاومة لمضاد البنسلين ج ١٠٠% والمثيلين ٦٦% والريفامبسين ٧% والفانكومايسين ٠%.

حدد معامل الفينول لبعض المطهرات الشائعة الاستعمال فكانت اعلى قيمة له هي ٦٥٠ لمعقد اليود (Polyvinyl pyrrolidone - Iodine) بتركيز ٧.٧% وادنى قيمة ٠.٧ للكحول الاثيلي بتركيز ٧٠%.

أظهرت دراسة النسق البلازميدي لأربع عزلات تميزت بالمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية الى وجود حزمتين بلازميديتين صغيرة الحجم مشتركة في هلام الأكاروز.ووجد من نتائج تحييد هذه البلازميدات بوساطة كبريتات الصوديوم ثنائية الأسيل (SDS) بتركيز ٢٥-٧٥ملغم/مل بانها تشفر الى مقاومة البنسلين ج ,الامبسلين ,التتراسايكلين ,الارثرومايسين ,الترايميثوبريم والجنتامايسين ومطهري الديتول والسابتون .في حين وجد ان الجينات المشفرة للأنزيم المخثر لبلازما الدم هي كروموسومية الموقع .

اذ احتوت بكتريا *S.aureus* على بلازميدين يشفر احدهما لمقاومة مضادات البنسيلين ج ,الأمبيسيلين, التتراساكلين والأريثرومايسين,ويشفر الأخر لمقاومة مضادات الكلورامفينيكول ,الترايميثوبريم والجنتامايسين. كما احتوت بكتريا *S. epidermidis* على بلازميدين ايضا يشفر الأول لمقاومة مضادات البنسيلين ج ,الأمبيسيلين , الكلورامفينيكول والأريثرومايسين , ويشفر الأخرلمقاومة مضادات التتراسايكلين ,الترايميثوبريم والجنتامايسين .فيما احتوت بكتريا *S. saprophyticus* على ثلاثة بلازميدات اثنان منها مشابهة لبلازميدي بكتريا *S. epidermidis* فيما يشفر الثالث لمقاومة مضاد البنسيلين ج فقط .

المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
	الخلاصة.....	I
	المحتويات.....	II
	الأشكال	IV
	الجداول	V
	المختصرات	VI
١-	الفصل الأول-المقدمة	١
	الفصل الثاني-استعراض المراجع	٣
٢-١	الصفات العامة لجنس العنقوديات	٣
٢-٢	الأهمية الطبية للعنقوديات السالبة للإنزيم المختر لبلازما الدم...	٤
٢-٣	الانزيم المختر لبلازما الدم	٤
٢-٤	الأخماج المكتسبة من المستشفى	٦
٢-٥	العنقوديات الذهبية السالبة للإنزيم المختر لبلازما الدم	٦
٢-٦	الامراضية	٧
٢-٧	عوامل الضراوة	٧
٢-٨	الوبائية	٩
٢-٩	المحتوى الوراثي للعنقوديات	٩
٢-١٠	مقاومة البكتريا المضادات الحيوية	١٣
٢-١١	الأساس الوراثي للمقاومة	١٣
٢-١٢	آلية انتقال البلازميدات	١٥
٢-١٣	المطهرات	١٥
٢-١٣-١	آلية عمل المطهرات	١٦
٢-١٣-٢	حساسية البكتيريا للمطهرات	١٧
٢-١٣-٣	معامل الفينول	١٨
٢-١٤	تحييد البلازميدات	١٨

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
٣-	الفصل الثالث – المواد وطرائق العمل	٢٠
٣-١	الأجهزة والمواد	٢٠
٣-١-١	الأجهزة و الأدوات المستعملة	٢٠
٣-١-٢	المواد الكيميائية	٢١
٣-١-٣	المضادات الحيوية.....	٢٢
٣-١-٤	المطهرات	٢٣
٣-١-٥	السلالة البكتيرية القياسية	٢٣
٣-١-٦	الأوساط الزرعية	٢٤

٣-١-٧	المحاليل والدواريء	٢٦
٣-١-٨	الكواشف	٣٠
٣-٢	طرائق العمل	٣١
٣-٢-١	التعقيم	٣١
٣-٢-٢	جمع العينات	٣١
٣-٢-٣	العزل	٣٢
٣-٢-٤	التشخيص	٣٢
٣-٢-٥	حساسية المضادات الحيوية	٣٤
٣-٢-٦	تحديد معامل الفينول	٣٤
٣-٢-٧	استخلاص وعزل الدنا الكلي	٣٥
٣-٢-٨	تحييد البلازميدات	٣٦
٣-٢-٩	الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز	٣٧
٤-	الفصل الرابع – النتائج والمناقشة	٣٨
٤-١	جمع العينات	٣٨
٤-٢	العزل والتشخيص	٣٨
٤-٣	حساسية العزلات للمضادات الحيوية	٤٤
٤-٣-١	حساسية بكتريا *S.epidermidis* للمضادات الحيوية..	٤٥
٤-٣-٢	حساسية بكتريا *S.aureus* للمضادات الحيوية.....	٥٣
٤-٣-٣	حساسية بكتريا *S.saprophyticus* للمضادات الحيوية.....	٥٧

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
٤-٤	حساسية البكتريا للمطهرات والمعقمات.....	٦١
٤-٥	استخلاص الدنا	٦٤
٤-٦	النسق البلازميدي	٦٤
٤-٧	تحييد البلازميدات	٦٧
٤-٨	الاستنتاجات	٧٢
٤-٩	التوصيات	٧٢
	المصادر	٧٣
	ملخص الرسالة باللغة الإنكليزية	A

الاشكال

الرقم	العنوان	الصفحة
٤-١	النسب المئوية لمقاومة العنقوديات المعزولة للمضادات الحيوية.....	٦٠
٤-٢	النسق البلازميدي لعزلات بكتريا المكورات العنقودية في هلام الاكاروز ٠.٨% بفرق جهد ٤٠ فولت.....	٦٦
٤-٣	النسق البلازميدي لعزلات بكتريا المكورات العنقودية المحيدة بمركب SDS فرق جهد ٤٠ فولت	٦٩

الجداول

الرقم	العنوان	الصفحة
٢-١	عوامل ضراوة العنقوديات وفعاليتها.....	٨
٢-٢	بعض جينات المقاومة في العنقوديات.....	١٠
٢-٣	اهم انواع البلازميدات في العنقوديات	١٢
٢-٤	آلية المقاومة واساسها الوراثي للمضادات الحيوية	١٤
٢-٥	آلية عمل المطهرات المستخدمة في الدراسة الحالية.....	١٧
٣-١	اقراص المضادات الحيوية	٢٢
٤-١	مصادر واعداد العينات وانماط العنقوديات المعزولة منها.....	٣٨
٤-٢	توزيع العزلات السريرية السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم حسب مصدر العينات	٣٩
٤-٣	اعداد ونسب المكورات العنقودية المعزولة.....	٤٠
٤-٤	الأختبارات الكيموحيوية لعزلات العنقوديات.....	٤٣
٤-٥	حساسية بكتريا *S.epidermidis* للمضادات الحيوية	٥١
٤-٦	النسب المئوية لمقاومة بكتريا *S.epidermidis* للمصادات الحيوية	٥٢
٤-٧	حساسية بكتريا *S. aureus* الموجبة لانزيم مخثر البلازما للمضادات الحيوية	٥٤
٤-٨	حساسية بكتريا S. aureus السالبة لانزيم مخثر البلازما للمضادات الحيوية	٥٤
٤-٩	النسب المئوية لمقاومة بكتريا *S.aureus* الموجبة للانزيم المخثر لبلازما الدم للمضادات الحيوية	٥٥
٤-١٠	النسب المئوية لمقاومة بكتريا *S.aureus* السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم للمضادات الحيوية	٥٦
٤-١١	حساسية بكتريا *S. saprophyticus* للمضادات الحيوية	٥٨
٤-١٢	النسب المئوية لمقاومة بكتريا *S.saprophyticus* للمضادات الحيوية	٥٩
٤-١٣	التراكيز المثبطة والقاتلة ومعامل الفينول للمطهرات المستخدمة لبكتريا *S.aureus*.....	٦٣

المختصرات

المختصر	المصطلح
BA	Blood Agar
BHIA	Brain Heart Infusion Agar
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
CCC	Covalently Closed Circular
CF	Chromosomal Fingerprinting
CNS	Coagulase-Negative Staphylococci
CNSA	Coagulase –Negative *S.aureus*
CPS	Coagulase –Positive Staphylococci
CPSA	Coagulase-positive *S. aureus*
EDTA	Ethylen Diamine Tetra Acetic acid
MIC	Minimum Inhipition Concentration
MLC	Minimum Lethal Concentration
NA	Nutreint Agar
NB	Nutreint Broth
OC	Optimum Concentration
PCR	Polymerase Chain Reaction
PP	Plasmid Profile
SDS	Sodium Dodecyle Sulphate
SET	Sodium EDTA Tris-HCl
TBE	Tris-Base-EDTA

المقدمة **Introduction**

تعد المكورات العنقودية السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم (Coagulase-Negative Staphylococci) من النبيت الطبيعي (Normal flora) للجلد والأغشية المخاطية للإنسان وبعض اللبائن (Foster, ١٩٩٤). كما تعد ايضا من البكتريا الانتهازية (Opportunestics) (Huebner & Goldman, ١٩٩٩). والتي تظهر قدرتها الامراضية عند المرضى الذين يعانون من الضعف المناعي (Immunocompromised patients) وحالات الإمراض المزمنة والمرضى الراقدين لمدد طويلة في المستشفى (Christof *et al*., ٢٠٠١).اذ تدخل هذه البكتريا مجرى الدم وتسبب اخماجا في جهاز الدوران سيما في الحالات المصاحبة لاستخدام بعض العدد الطبية كأنابيب القثطرة(Christof *et al*., ٢٠٠١; Patel *et al*., ٢٠٠٠). كما انها تعد من اهم الانواع البكتيرية المسببة للأخماج المكتسبة من المستشفيات (Nosocomial infections)، اذ اشارت تقارير National Nosocomial Infections Survillance (١٩٩٩) الى ارتفاع نسب الاصابة بهذه العنقوديات الى ٣٧.٣% فضلا عن ارتفاع نسبتها في المستشفيات الى ٨٠%، اذ تمتاز هذه الانواع

البكتيريـــة بقـــدرتها علـــى النمـــو فـــي مـــديات حراريـــة مـــن(١٥- ٤٣)م وتحملهـــا الملحي NaCl (١٥%) ومقاومة التراكيز المثبطة الدنيا لبعض المطهرات الشائعة الأستعمال فضلا عن مقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية (Hirmatsu ,١٩٩٧).وبعض انواعها تنتج الذيفانات المعوية الخارجية مسببة التسمم الغذائي .

من ابرز صفات العنقوديات هي مقاومتها لمركبات البيتلاكتام كما تعد السلالات المقاومة لمضاد المثيسلين اكثر اهمية من الناحية الوبائية (Maria *et al.*, ٢٠٠٢). اذ ظهرت سلالات واطئة التحسس او مقاومة لمضادات الكلايكوبيتايدز واهمها الفانكومايسين وهو من المضادات الحيوية المؤثرة في المكورات العنقودية (Sieradzki *et al.*, ١٩٩٨;Garrett *et al.*, ١٩٩٩) .

ان اغلب اليات المقاومة في هذه المكورات العنقودية تشفر لها بلازميدات مما يوفر فرصة لانتقال هـــذه المقاومـــة الـــى الانـــواع والاجنـــاس الاخـــرى المتعايشـــة معهـــا (Forbes *et al.,* ١٩٨٣;Groves ,١٩٧٩) فالبلازميدات هي عوامل وراثية خارج كرموسومية قادرة علـــى الانتقـــال مـــن بكتريـــا لاخـــرى باليـــات مختلفـــة مثـــل الأقتـــران ,التحـــول والتوصـــيل. (Archer&Johnston, ١٩٨٣; Arian & Marcus, ١٩٩٨).

يعد استعمال المطهرات وفق الاسس العلمية للتقييس من اهم عوامل السيطرة على هذه المجموعة من المكورات العنقودية داخل المستشفيات وخارجها (Gilbert & Bain,٢٠٠٣).وتعد طريقة تحديد معامل الفينول من افضل الطرائق في هذا المجال (Pelczar *et al*, ١٩٨٦; Prescott&Harly, ١٩٩٩).

اصبحت الطرق التقليدية المعتمدة في الفحوصات الكيموحيوية قليلة الأعتماد في تشخيص وتصنيف افراد هذه المجموعة من العنقوديات (Hebret *et al*,١٩٨٨) مما حدى بالباحثين الى اعتماد التقنيات الوراثية لاغراض التشخيص والتصنيف الدقيق وتعد دراسة النسق البلازميد احد التقنيات الوراثية المعتمدة في هذا المجال(Arian & Marcus, ١٩٩٨)، فمن خلال الترحيل الكهربائي لمستخلصات الدنا لاي عزلة بكتيرية تابعة لهذه المجموعة يمكن تحديد المحتوى الوراثي لها ومقارنته مع المحتوى الوراثي لسلالة قياسية تابعة لنفس المجموعة(اذ توفر هذه التقنية امكانية تشخيص أي سلالة جديدة تساهم في احداث العدوى داخل المستشفيات.فقد أشار Alan وNeil(١٩٩٨) الى اعتماد تقنية الأخراج الملحي في استخلاص وعزل الدنا البلازميدي لهذه المجموعة من المكورات العنقودية مع استخدام الأنزيمات المحللة للجدار الخلوي كأنزيم للايزوزايم (Pospiech&Neuman,١٩٩٥). كما استخدمت تقنية الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز في فصل الدنا البلازميدي بشكل حزم اعتمادا على وزنها الجزيئي (Etienne *et al.*, ١٩٩٠; Unal *et al.*, ١٩٩٢). وبسبب التغاير في مواقع بعض جينات مقاومة المضادات الحيوية بين كرموسومي او بلازميدي ساهمت تجارب التحييد البلازميدي في تحديد مواقع هذه الجينات باستخدام مواد كيمياوية محيدة كمركب كبريتات الصوديوم ثنائية الاسيل بتراكيز اقل من التراكيز المثبطة الدنيا (Trevors,١٩٨٦).

وللأهمية السريرية للمكورات العنقودية السالبة لأنزيم مخثر بلازما الدم فقد هدفت هذه الدراسة الى معرفة دور البلازميدات في المقاومة وارتباط انتاج الأنزيم المخثر لبلازما الدم بأمراضية هذه البكتريا اذ تضمنت الدراسة الموضوعات الآتية:

١. عزل وتشخيص العنقوديات السالبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم من حالات مرضية ومن الكادر الطبي والفني في المستشفى.
٢. دراسة نمط الحساسية الدوائية لبعض العزلات تجاه بعض المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام .
٣. تحديد معامل الفينول لبعض المطهرات المستعملة في المستشفى بشكل روتيني.
٤. دراسة النسق البلازميدي لبعض العزلات ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية .
٥. تحديد مواقع الجينات المسؤولة عن انتاج الأنزيم المخثر لبلازما الدم وعن مقاومة المضادات الحيوية والمطهرات عن طريق تحييد البلازميدات.

٢- استعراض المراجع Literature Review

٢-١: الصفات العامة لجنس العنقوديات

تتصف خلايا العنقوديات بكونها كروية موجبة لصبغة غرام، يتراوح حجم الخلية ٠.٥-١ مايكروميتر، تنتظم غالبا بشكل عناقيد (Graps) وهي غير متحركة وغير مكونة للسبورات وغالباً ما تكون غير مكونة للمحفظة، هوائية ولاهوائية اختيارياً (Kloos & Schleifer, ١٩٧٥). تنمو على الأوساط الاعتيادية عند درجة الحرارة المثلى ٣٧°م، تظهر المستعمرات دائرية رقيقة ولماعة يصل قطر المستعمرة ٢-٣ملم، تنمو في مدى حراري (١٥-٤٣)°م، قادرة على تحمل تراكيز ملح NaCl تصل الى ١٥% منتجة للصبغات الكاروتينية بتراكيز مختلفة يتراوح من الأصفر الذهبي الى الابيض اعتماداً على نوع السلالة وظروف النمو (Forbes *et al*., ١٩٩١; Foster *et al*., ١٩٩٤; Nesin *et al*, ١٩٩٥) .

تصنف العنقوديات اعتماداً على إنتاج الأنزيم المخثر لبلازما الدم (Coagulase) الى مجموعتين رئيستين:-

١.العنقوديات الموجبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم

وهي العنقوديات القادرة على انتاج الانزيم المخثر لبلازماالدم في زمن غير محدد يتراوح بين ٥ دقائق-٢٤ ساعة.

٢.العنقوديات السالبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم وهي مجموعة غير قادرة نهائياً على انتاج الانزيم المخثر.

(Christof *et al*., ٢٠٠١; Peters *et al*., ١٩٩٥; Leung *et al*., ١٩٩٨)

تتضمن المجموعة الاولى النوع *S. aureus* بينما تتضمن المجموعة الثانية ٣٤ نوعاً صنف ١٤ نوعاً ذات علاقة بالإنسان وهذه صنفت الى مجموعتين اعتماداً على مقاومتها للمضاد الحيوي النوفوبايوسين وهي:

أ-المكورات العنقودية السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم الحساسة لمضاد النوفوبايوسين وتتضمن :

S. epidermidis , S. haemolyticus, S. auricularis, S. capitis, S. caprae, S. hominis, S. lugdunensis, S. pasteuri, S. saccharolyticus , S. schleiferi

ب-المكورات العنقودية السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم المقاومة لمضاد النوفوبايوسين وتتضمن :

S. saprophyticus, S. cohnii , S. sciuri , S. xylosus

٢-٢: الاهمية الطبية للعنقوديات السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم

تأتي الاهمية الطبية لهذه الانواع من العنقوديات من خلال ارتفاع نسب الخمج بها في المرضى الراقدين في المستشفيات سيما المرضى الذين يعانون من الضعف المناعي ومرضى العناية المركزة والاطفال الرضع (Kloos & Bannerman, ١٩٩٤)، فضلا عن مشاركتها في العديد من الاخماج في كلا الجنسين (Anday & Talbot, ١٩٨٥).

ان قدرة هذه الانواع على التعايش داخل المستشفيات مكنتها من اكتساب المقاومة للعديد من المضادات الحيوية وصلت الى ١٠٠% لمركبات β-lactam و٨٠% للمثيسلين وهي نسب تفوق احياناً مقاومة النوع *S. aureus* (Jacques *et al*., ٢٠٠٠).

هناك تقارير عديدة تشير الى قدرة النوع *S.epidermidis* على اصابة عضلة القلب (Endocarditis) واحداث الخمج في العديد من الحالات المصاحبة لاستخدام العدد الطبية العلاجية وخاصة انابيب القثطرة فضلا عن قدرة هذا النوع على احداث التهابات الحروق والاذن والمجاري البولية (National Nosocomial Infections Survillance, ١٩٩٩; Christof, ٢٠٠١). والقدرة العالية للنوع *S. saprophyticus* على خمج المجاري البولية للاناث والذكور البالغين. كما اشار Patêl وجماعته (٢٠٠٠) الى قدرة النوع *S. lugdunensis* على غزو مجرى الدم واصابة عضلة القلب. تكمن خطورة هذه العنقوديات في قدرتها على التعايش مع الانواع البكتيرية الاخرى ونقل عوامل المقاومة البلازميدية اليها مما يعزز دورها الوبائي داخل المستشفيات (Burnie *et al*., ١٩٩٧; Aires *et al* , ٢٠٠٠).

٢-٣: الانزيم المخثر لبلازما الدم Coagulase

لم يعد الانزيم المخثر لبلازما الدم انزيماً متخصصاً لسنوات عديدة لدى الباحثين في حقول الاحياء المجهرية (Foster, ١٩٩٤; Tenover *et al*., ١٩٩٤)، ولكن بعد التطورات الحاصلة في علم الحياة الجزيئي والتقنيات الاحيائية الحديثة تمكن العلماء والباحثون من استخلاص وفصل هذا البروتين وتصنيفه من الانزيمات المتخصصة والمحفزة بالمادة الاساس النوعية وهي بروتين البروثرومبين (Prothrombin) محولاً اياه الى ثرومبين (Thrombin) يتضمن هذا التفاعل تكوين معقد

(Staphylothrombin complex)، ويعمل الثرومبين منشطاً لتفاعل تحول الفايبرينوجين الموجود في بلازما دم اللبائن بصورة عامة الى فايبرين وتتكون شبكة دقيقة من الالياف هي المسؤولة عن تكون الخثرة (Smyth *et al*., ١٩٨٨; Golledg *et al*., ١٩٨٩).

يرتبط اختبار التحري عن انتاج الانزيم المخثر لبلازما الدم بطريقة انابيب الاختبار مع اختبار التحري عن عامل التكتل (Clumping factor) بطريقة الشريحه الزجاجية (Macfaddin, ٢٠٠٠).

ويعد عامل التكتل بروتيناً سطحياً مرتبطاً بجدار الخلية البكتيرية وهو مشابه لبروتين A الموجود في العديد من سلالات البكتريا الموجبة لصبغة كرام، ولهذا البروتين صفة مستضدية (Foster, ١٩٩٤).

ان الدراسات الوراثية على بكتريا المكورات العنقودية اثبتت استقلال مواقع جينات الأنزيم المخثر عن عامل التكتل فقد اختبرت طافرات فاقدة للانزيم المخثر بامتلاكها لعامل التكتل ومن جهة اخرى اختبرت طافرات فاقدة لعامل التكتل تمتلك القدرة على انتاج الانزيم المخثر . كما اكدت هذه الدراسات بأن المواقع الجينية لهذين العاملين هي كرموسومية ومعزولة عن بعضها (Vandenech *et al*., ١٩٩٤).

فقد اشار كل منEngles وجماعته (١٩٧٨) و Christine وجماعتها (١٩٩٤) بأن الجين المشفر للانزيم المخثر للبلازما هو ***coa*** والذي ينظم عمله الموقع الجيني ***agr*** وان عملية التنظيم قد تكون ايجابية او سلبية اعتماداً على ظروف النمو وان اقصى انتاج للانزيم يكون في الطور اللوغارتمي واشار Novick وجماعته (١٩٩٢) الى أن التنظيم الايجابي مرتبط بمستويات جزيئة RNAIII، فقد وضع Cheunge وجماعته (١٩٩٢) فرضية وجود تداخل بين جزئية الانزيم المفرز وجزئية RNAIII مؤدية الى تكوين معقد بروتيني نووي (Nucleoprotein complex) مما يسبب انخفاض فاعلية الانزيم، في حين افترض Novick وجماعته (١٩٩٣) ان انخفاضاً في مستوى جزئيات RNAIII بما لا تكفي للتحفيز على انتاج الانزيم وهذا ما يحدث في بداية النمو، فقد اشار Vandenesch وجماعته (١٩٩٣) الى امكانية حدوث تغير في التركيب الثانوي لجزئية RNAIII يفقدها تأثيرها المحفز مستنداً الى ما توصل اليه Novick وجماعته (١٩٩٣) بأن RNAIII ممكن ان يكون محفزاً او مثبطاً ليس على الجين الهدف فقط وانما في مرحلتي الاستنساخ والترجمة.

٢-٤: الأخماج المكتسبة من المستشفى Nosocomial infections

يشير مصطلح عدوى المستشفيات الى الاخماج التي يصاب بها المريض خلال مدة رقوده في المستشفى وتعد من المشاكل الرئيسية التي تواجه علاج المرضى الراقدين، ان العنقوديات السالبة للانزيم المختر لبلازما الدم هي من الانواع المهمة في هذا المجال من حيث مقاومتها للمضادات الحيوية والمطهرات الشائعة الاستعمال في المستشفيات (Her waldt *et al*., ١٩٩٢; Holger *et al*., ٢٠٠٤).

ان قدرة هذه الانواع البكتيرية على الانتقال داخل المستشفى فضلا عن قدرة انتقال عوامل المقاومة الى الانواع والاجناس الاخرى ساهمت في زيادة خطورة الأخماج المكتسبة من المستشفيات وجعلتها من اهم المشاكل الصحية التي تواجه العالم بأسره (Ruppy & Archer, ١٩٩٤).

ان ظهور سلالات من بكتريا المكورات العنقودية السالبة للانزيم المختر لبلازما الدم مقاومة لمضاد المثيسيلين في المستشفيات قد زاد من خطورة الامر فهذه السلالات تكون عادة متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (Berger *et al*., ٢٠٠٢; Ieven *et al*., ١٩٩٥).

تزداد خطورة عدوى المستشفيات في بعض الوحدات الخاصة كوحدات العناية المركزة والحروق ورعاية الاطفال ووحدات مرضى الضعف المناعي (Heilmann & Peters, ٢٠٠٠ ; Ruoden & Miller, ٢٠٠٢). ومن اهم مصادر التلوث الجرثومي في المستشفيات هم المرضى والكادر الطبي والزائرين والعدد الطبية والاسَرة والاغطية والحمامات وغيرها، كما تساهم المطهرات في انتشار البكتريا المقاومة داخل المستشفى اذا ما اعدت بطريقة خاطئة (Ayliffe *et al*., ١٩٩٣; AlKhalidy, ٢٠٠٢).

٢-٥: العنقوديات الذهبية *S. aureus* السالبة للانزيم المختر لبلازما الدم

ذكرت هذه البكتريا في تقرير للباحث Smyth وزملائه (١٩٨٨) في عينة دم لمريض يعاني من اصابة عضلة القلب (Endocarditis) (Golledge & Gordon, ١٩٨٩) وكان اختبار عامل التكتل لهذه العزلة موجباً. لم تجدي الطرق التقليدية نفعاً في تصنيف هذه العزلة وتباينت نتائج انظمة تشخيص العنقوديات Vitek system ونظام STAPH-IDENT (Woo *et al*., ٢٠٠١). ولكن باستخدام تقنيات تفاعل البلمرة المتسلسل(Polymerase Chain Reaction) و DNA sequencing وS rRNA sequencing ١٦ تم تحديد الجين المسؤول عن انتاج الانزيم المختر لبلازما الدم واعتبرت سلالة تابعة للنوع *S. aureus* اذ كانت تعاني من فشل في عملية الاستنساخ او ما بعد الاستنساخ (Vandenesch *et al*., ١٩٩٤).

٢-٦: الامراضية Pathogenicity

صنف ١٤ نوع من بكتريا المكورات العنقودية السالبة للانزيم المختثر لبلازما الدم ذات علاقة بالانسان فهي قادرة على اصابة أي من اجهزة الجسم ابتداءاً من الجلد حتى القلب والنخاع الشوكي، اذ تمتلك هذه البكتريا العديد من المؤهلات التي مكنتها من اكتساب هذا المدى الواسع من الامراضية كأمتلاكها للعديد من عوامل الضراوة ومقاومتها العالية والمتعددة للمضادات الحيوية والمطهرات فضلا عن القدرة على التحمل الملحي (Kloos & schleifer, ١٩٧٥; Christensen *et al*., ١٩٨٣; Jacques *et al*., ٢٠٠٠).

تنشط هذه العنقوديات في حالات الضعف المناعي والامراض المزمنة خاصة عند المرضى الراقدين في المستشفى ويرتفع مستوى امراضيتها عندما تتوافر لها وسيلة لدخول الجسم. اذ تعد من الجراثيم الممرضة الانتهازية (Kloos & Banner man ١٩٩٤). ان لهذه البكتريا القدرة على خمج الجهاز التنفسي والجهاز البولي والتناسلي الانثوي، خمج عضلة القلب، التهاب العظم، التهاب الاذن، التهاب العيون، التهاب الثدي، التهاب الجروح والحروق والمشاركة في التهابات عديدة اخرى (Christof, *et al* ٢٠٠١; Ruppy & Archer, ١٩٩٤).

وقد اشارت تقارير عديدة الى ارتفاع نسب المكورات العنقودية السالبة للانزيم المختثر لبلازما الدم وخاصة النوع *S. epidermidis* في اخماج الدم وبنسبة وصلت ٣٥% في حين كانت ٦% للنوع *S. aureus* (Males *et al*., ١٩٧٥; Maria *et al*., ٢٠٠٢).

وتشير العديد من الدراسات الى امتلاك النوع *S.epidermidis* وبعض الانواع السالبة للانزيم المختثر لبلازما الدم لعامل التصاق والمكون من متعدد السكريات يمكنها من الالتصاق على العدد الطبية البلاستيكية وخاصة انابيب القثطرة وتشكيل غشاء حيوي مخاطي يعرف Biofilm يعمل على حماية البكتريا من دفاعات المضيف، كما يمنع وصول المضاد الحيوي للبكتريا (Huebner & Goldman, ١٩٩٩ ; Holger *et al*., ٢٠٠٤).

٢-٧: عوامل الضراوة Verulance factors

تمتلك المكورات العنقودية العديد من عوامل الضراوة التي تزيد من فعالياتها وامراضيتها وتجعلها قادرة على احداث الخمج(جدول ٢-١) ,ويعد امتلاكها لحامض التايكويك وعامل الالتصاق من اهم العوامل التي تساعدها على الالتصاق والاستيطان, كما انها تمتلك عوامل اخرى تمكنها من التخلص من دفاعات المضيف او تدميرها احيانا كانزيم الستافلوكاينيز(Staphylokinase) وعوامل اخرى تمكنها من الغزو او الأنتشار كانزيم الهيالورونيديز(Hyaluronidase) (Michael *et al* ., ١٩٨٨ Christoff *et al*., ٢٠٠١).

جدول. ٢-١: عوامل ضراوة العنقوديات وفعاليتها.

(Dubin *et al*., ٢٠٠٥; Modum *et al*., ١٩٩٨; Foster *et al*., ١٩٩٨)

ت	عامل الضراوة	الفعالية
١.	حامض التايكويك (Teichoic acid)	التصاق البكتريا على سطوح الخلايا
٢.	بروتين أ (Protein A)	تثبيت IgG
٣.	عامل التكتل (Clumping factor)	الارتباط مع الفايبرينوجين
٤.	البروتين المرتبط بالبكتين الليفي (Fibronectin-binding protein)	الارتباط مع الفايبرونكتين
٥.	البروتين المرتبط بالكولاجين الليفي (Collagen-binding protein)	الارتباط مع الكولاجين
٦.	الذيفانات المحللة للدم (Haemolysins)	تحليل الغشاء الخلوي
٧.	الذيفان المحلل لكريات الدم البيضاء (Lecocidin Toxin)	تحطيم غشاء البلعم الكبير
٨.	الذيفانات المحللة للبشرة (Epidermolytic toxins)	تسبب تبثر الجلد
٩.	الذيفان المسبب لمتلازمة الصدمة السمية (Toxick-shock syndrome Toxin)	قدرة مستضدية -استجابة مناعية
١٠.	الذيفانات المعوية (Enterotoxins)	تسبب تقيء، اسهال، قدرة مستضدية
١١.	الانزيم المختر لبلازما الدم (Coagulase)	يختر بلازما الدم
١٢.	الانزيم المحلل للانسجة الرابطة (Hiyaluronidase)	تحليل الانسجة الرابطة
١٣.	انزيم ستافلوكاينيز (Staphylokinase)	يحلل الفايبرين
١٤.	انزيم اللايبيز وفوسفولايبيز (Lipase, phospholipase)	يحلل الدهون والدهون المفسفرة
١٥.	الانزيم الحال للحامض النووي الدنا (DNAase)	يحلل الدنا
١٦.	انزيم البروتيز (Protease)	يحلل البروتين
١٧.	انزيم البيتالاكتاميز (β-lactamase)	مقاومة مضادات بيتالاكتام -β lactam
١٨.	بروتين ستافلوفرين أ , ب (Staphyloferrins A, B)	سحب أيونات الحديد
١٩.	عامل الالتصاق متعدد السكريات (Polysaccharide adhesion factor)	عامل التصاق

(Dubin *et al.*, ٢٠٠٥; Modum *et al.*, ١٩٩٨; Foster *et al.*, ١٩٩٨)

٢-٨: الوبائية Epidemiology

تعد المكورات العنقودية من المسببات الرئيسية للأخماج المكتسبة من المستشفيات والعديد من أخماج المجتمع المكتسبة (Community-acquired infections) لذا فمن الضروري تحديد مصادر

السلالات المعزولة في اثناء المسح الوبائي من خلال اتباع طرائق تشخيص سريعة ودقيقة (Foster *et al.*, ١٩٩٤; Rupp & Archer, ١٩٩٤).

اشارت دراسات عديدة الى ان بكتريا *S. epidermidis* تحقق اعلى نسبة تلوث في المستشفيات تصل الى ٨٥% (Hedin, ١٩٩٣; Maria *et al.*, ٢٠٠٢). ان قدرة العنقوديات على التحمل والتكيف مكنتها من الانتقال والانتشار داخل المستشفيات من طريق التلامس والالبسة والاغطية والارضية. كما ان التواجد المستمر لهذه البكتريا في المستشفيات نشأ عنه مقاومة للعديد من المضادات الحيوية والمطهرات مما جعلها اكثر خطورة عندما تحدث الخمج او تشارك فيه (Groves, ١٩٧٩ ; Huebner & Goldman, ١٩٩٩). اذ تلعب هذه العنقوديات دوراً مهماً في نقل عوامل المقاومة البلازميدية الى الانواع البكتيرية الاخرى لذا اعتمدت طريقة تحديد النسق البلازميدي في تشخيص وتصنيف العنقوديات في الدراسات الوبائية (Archer *et al* ., ١٩٨٤; Frebourg *et al.*, ٢٠٠٠).و بسبب التشابه الكبير في المحتوى البلازميدي في هذه العنقوديات انخفضت نسبة الحساسية والنوعية لهذه الطريقة واغلب الطرائق التقليدية الاخرى ومع اكتشاف التقنيات الوراثية الحديثة تمكن الباحثون في حقول الدراسات الوبائية من تشخيص وتصنيف هذه المجموعة من البكتريا الى مستوى تحت النوع ومستوى السلالة (Frebourg *et* al., ٢٠٠٠; Arian & Marcus *et al.*, ١٩٩٨).

٢-٩: المحتوى الوراثي للعنقوديات Genetic content of Staphylococci

يضم المحتوى الوراثي للعنقوديات كل من الكروموسوم و البلازميدات .

١.الكروموسوم Chromosome

يتركب الكرموسوم من شريط مزدوج من الحامض النووي DNA يزيد طوله عن ١ملم, يحمل ما يقرب من ثلاثة الاف جين، اذ وضع Pattee وجماعته (١٩٨٤) الخارطة الجينية لبكتريا *S.auerus* وتمكن من تحديد ٤٠ موقع جيني مسؤول عن مقاومة العديد من المضادات الحيوية والمطهرات والمعادن الثقيلة كما مبين في الجدول ٢-٢. ومن ابرز المواقع الجينية في كروموسوم المكورات العنقودية هو الموقع *agr* المسؤول عن تنظيم انتاج الذيفانات الخارجية والموقع *bla* المسؤول عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز و*eut* المسؤول عن انتاج الذيفانات المعوية و*pig* المسؤول عن انتاج الصبغة الذهبية و*coa* المسؤول عن انتاج الانزيم المخثر لبلازما الدم.

جدول. ٢-٢ بعض جينات المقاومة في العنقوديات(Pattee *et al.*, ١٩٨٤)

الجين	صفة المقاومة	آلية المقاومة	الموقع
aacA-aphD	جنتمايسين، تراي مثبريم	نظام الدفق	كروموسوم، بلازميد، جين قافز
aada	ستربتومايسين، سبكتينومايسين	نظام الدفق	بلازميد
aade	نيومايسين، كنومايسين	نظام الدفق	بلازميد
apha	ستربتومايسين	نظام الدفق	بلازميد
aphc	نيومايسين	نظام الدفق	بلازميد
asa	ارسنيت	نظام الدفق	كروموسوم، بلازميد
asi	ارسنيت،	نظام الدفق	كروموسوم، بلازميد
bis	بزموث	ارتباط ايوني	بلازميد
bla	بنسلين	بيتا لاكتاميز	كروموسوم ، بلازميد
cad	كادميوم،زنك	نظام الدفق	كروموسوم، بلازميد
cat	كلورام فنيكول	ارتباط ايوني	بلازميد
dfr	تراي مثبريم	اختزال الفة انزيم داي هايدرو فوليت المختزل	كروموسوم
erm	ماكرولويدات، لينكوزامايد وستربتوكرامين	ميثلة الرنا الرايبوسومي	كروموسوم، جين قافز

٢. البلازميدات Plasmids

تحوي العنقوديات العديد من البلازميدات صنفت الى اثنتي عشر نوعاً اعتماداً على المجموعة اللاتوافقية (Incompatibility group) (Snyder & Champness, ١٩٩٨).

تمتاز بلازميدات العنقوديات بكونها صغيرة الحجم غالباً لا يزيد وزنها الجزيئي على ٥×١٠^٦ دالتون بما يعادل ٨ كيلو زوج قاعدة (Kbp) تتواجد بنسخ عديدة داخل الخلية تصل الى ١٠٠ نسخة أي انها من البلازميدات المسترخية (Archer *et al.*, ١٩٨٢) (Relaxed plasmids). كما ان اغلبها قادرة على الانتقال ذاتياً من بكتريا لاخرى ضمن جنس المكورات العنقودية واحياناً الى اجناس اخرى متعايشة معها قد تكون موجبة او سالبة لصبغة غرام لذا تصنف من البلازميدات الاقترانية ذات المدى المضيفي الواسع (Lacy, ١٩٧٥ ; Parisi *et al.*, ١٩٨٠; Eteinne *et al.*, ١٩٩٠).

ان من اهم الصفات التي تشفر لها الجينات البلازميدية هي مقاومة المضادات الحيوية والمطهرات والمعادن الثقيلة، وتعد بلازميدات المقاومة (R-plasmids) من اهم انواع البلازميدات في البكتريا (Michio *et al.*, ١٩٨٦). وقد صنفت البلازميدات في الانواع الممرضة من البكتريا اعتماداً على صفة المقاومة لمضاد ما او لمجموعة من المضادات فيرمز للبلازميدات التي تحمل جينات المقاومة لمضاد البنسلين ومشتقاته ببلازميدات البيتالاكتاميز(β-lactamase plasmids) والتي تمنح البكتريا الحاملة لها القدرة على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز المحطمة لمعظم مضادات البيتالاكتم (Coia *et al.*, ١٩٨٨ ; David & Christopher, ١٩٩٨).

وقد اشار كل من Lyon و Skurry (١٩٨٧) في دراسة مستفيضة الى انواع البلازميدات المكتشفة في العنقوديات واحجامها وصفة المقاومة التي تحملها كما في الجدول ٢-٣. كما تحتوي المكورات العنقودية على العديد من الجينات القافزة التي لها القدرة على الانفصال والانغراس في شريط الدنا الكروموسومي او البلازميدي وتشفر لبعض المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة (Lyon & Skurry, ١٩٨٧).

جدول. ٢-٣ : اهم انواع البلازميدات في العنقوديات.

البلازميد	صفة المقاومة	الحجم (كيلو زوج قاعدة)
pSK	ترايميثوبريم, جنتامايسين, معادن ثقيلة	٤.٥
pUB	بيتالاكتم, معادن ثقيلة	٤.١
pWG	ترايميثوبريم, جنتامايسين, كانامايسين, معادن ثقيلة, مطهرات	٤٢
pRN	معادن ثقيلة	١٥.٩
pI ; pII	بيتالاكتم, معادن ثقيلة	٣١.١
pSH	نيومايسين, كانومايسين	١٥.١
pTC	نيومايسين, كانومايسين, تتراسايكلين, ترايميثوبريم	٣٦
pAP	نيومايسين, كانومايسين, ترايميثوبريم	٤.٥
pIP	ترايميثوبريم, معادن ثقيلة	٤.٥
pUW	جنتامايسين, ترايميثوبريم, كانومايسين, بيتالاكتم	٣٧.٥
pTU	جنتامايسين, ترايميثوبريم, بيتالاكتم	٤٨
pCRG	جنتامايسين, بيتالاكتم, مطهرات	٤٨
pLJM	جنتامايسين, ترايميثوبريم, معادن ثقيلة	٤٦
pJE	جنتامايسين, ترايميثوبريم ,معادن ثقيلة	٣٨
pSC	كلورمفنيكول وستربتومايسين	٧.٢

(Lyon & Skurry, ١٩٨٧)

٢-١٠: مقاومة البكتريا للمضادات الحيويةBacterial resistant for antibiotics

منذ اكتشاف أول مضاد حيوي وهو البنسلين اظهرت المكورات العنقودية المقاومة لهذا المضاد (Wesley *et al.*, ١٩٩٨). كما اظهرت مقاومة عالية لاغلب المضادات الحيوية مثل التتراسايكلين ,الارثرومايسين ومركبات السلفا وغيرها وقد وصل مستوى المقاومة لمضادات β-lactum الى ١٠٠% (Baron *et al.*, ١٩٩٨). ان القدرة العالية للعنقوديات على اكتساب المقاومة للمضادات الحيوية تزيد من امراضيتها وخطورتها وخاصة في المستشفيات، ومما ساعد في نشوء السلالات

البكتيرية المقاومة هو الاستخدام الكبير والعشوائي للمضادات الحيوية (Mickelsen *et al* ., ١٩٨٥; Suzuki *et al* ., ١٩٩٢ ; WHO, ٢٠٠٠).

وكون العنقوديات من المستنبت الطبيعي لجلد الانسان (Skin Normal flora) وهذا يجعلها في تعرض مستمر لجميع المضادات التي يتناولها المريض مما يحفزها على اظهار آليات مقاومة مختلفة (Arakawa *et al*., ٢٠٠٠). ان الاليات الرئيسة لمقاومة البكتريا للمضادات الحيوية هي:

١. افراز انزيمات قادرة على تحطيم المضاد الحيوي مثل انزيمات β-lactamase المحللة للبنسلينات.
٢. امتلاك البكتريا لانزيمات قادرة على تحوير المضاد الحيوي وابطال مفعوله.
٣. تغيير بعض المسارات الايضية التي يؤثر فيها المضاد الحيوي.
٤. تغيير في تركيب بعض الجزيئات الخلوية التي يعمل عليها المضاد.
٥. تغيير في نفاذية الغشاء الخلوي لمنع دخول المضاد.
٦. قدرة البكتريا على التخلص من المضاد الحيوي بقذفه خارج الخلية بالية تسمى نظام الدفق (Efflux pump system)(Eady *et al*.,١٩٩٣).
٧. قدرة البكتريا على تكوين طبقة رقيقة مخاطية لزجة تدعى Biofilm تعيق او تمنع وصول المضاد الحيوي لخلايا البكتريا(Heilmann *et al*., ١٩٩٧ *et al*.,١٩٨٩ Sambrook)

٢-١١: الاساس الوراثي للمقاومة

اعتماداً على الاساس الوراثي للمقاومة صنفت اليات المقاومة الى نوعين الاول ذات منشأ لاوراثي (Non-genetic origin) مثل تركيب الجدار الخلوي وامتلاك مسارات ايضية بديلة او القدرة على تجنب المضاد . والثاني ذات منشأ وراثي (genetic origin) أي ان الية المقاومة مشفر لها بجينات خاصة محمولة اما على الكروموسوم او على البلازميدات (Grek *et al*.,١٩٩٨ ; Walsh & Howe, ٢٠٠٢)، ففي حالة المقاومة الكروموسومية يرجح نشوؤها من طفرات وراثية ناجمة عن التعرض المستمر لجرعات عالية من المضاد الحيوي (Jacoby & Archer, ١٩٩١)، او عن طريق انغراس قطع بلازميدية داخل الكروموسوم تسمى العناصر القافزة Transposons (Townsemd *et al*., ١٩٨٤)، وللعنقوديات كلا النوعين من المقاومة فمقاومتها لمركبات Aminoglycosides ومركبات β-lactams هي كرموسومية وبلازميدية (Dennis *et al*., ١٩٨٦; Arakawa, ٢٠٠٠). وهناك تداخل وراثي في مقاومة العديد من المضادات الحيوية بين كروموسومي وبلازميدي المنشأ، مبينة في الجدول ٢-٤.

تحمل العنقوديات العديد من بلازميدات المقاومة للمضادات الحيوية (R- plasmids) اغلبها اقترانية يتراوح وزنها الجزيئي بين ٢-٣٠×١٠ [٦] دالتون ومن اهم انواع هذه البلازميدات هي pAM وpUM وpGO وpSE (Zhang *et al*., ٢٠٠٣). كما توجد العديد من العناصر القافزة في المكورات العنقودية اهمها Tn٥٥١ و Tn٥٥٤ (Dennes & Marcos, ١٩٨٦; Khan *et al*., ١٩٨٠) التي تحمل الجينات المسؤولة عن مقاومة مضاد الارثرومايسين.

جدول. ٢-٤ : الية المقاومة واساسها الوراثي للمضادات الحيوية

(Archer , *el al*. ١٩٨٢ ; Foster , ١٩٩٤ ; Giusti *et al*. ,١٩٩٩)

المضاد الحيوي	آلية المقاومة	الأساس الوراثي
بنسلين.ج	انتاج انزيمات البيتالاكتاميز	كروموسوم، بلازميد, جين قافز
مثيسلين	انتاج البروتينات المرتبطة بالبنسلين	كروموسوم، بلازميد, جين قافز
تتراسايكلين	تحوير في جزيء الرايبوسوم	بلازميد
كلورامفينيكول	تعطيل انزيمي للمضاد الحيوي	بلازميد
ارثرومايسين	تحوير انزيمي في جزيء الرايبوسوم	بلازميد , جين قافز
ستربتومايسين	تحوير في جزيء الرايبوسوم	كروموسوم
لنكومايسين	نظام الدفق	كروموسوم ,جين قافز
جنتامايسين	تعطيل انزيمي للمضاد الحيوي	كروموسوم، بلازميد, جين قافز
ترايميثوبريم	تحوير انزيم الدايهايدروفوليت المختزل	بلازميد ,جين قافز
فانكومايسين	تحوير في جزيء متعدد الببتيد	بلازميد ,جين قافز
ريفامبسين	تحوير في جزيء انزيم بلمرة الرنا	كروموسوم
سيفوتاكسيم	انتاج انزيمات السيفالوسبورينيز	كروموسوم

(Archer , *el al*. ١٩٨٢ ; Foster , ١٩٩٤ ; Giusti *et al.* ,١٩٩٩)

٢-١٢: آلية انتقال البلازميدات Mechanism of plasmids transmission

من الصفات المهمة لبلازميدات المقاومة (R-plasmids) هي قدرتها على التحفيز على الاقتران اضافة الى قدرتها العالية على الانتقال الى انواع بكتيرية اخرى لاحتوائها على موقعين جينيين يحفز احدهما تكون الاهداب الجنسية (Sex pilli) والثاني يحفز الانتقال يدعى ***tra*** gene (Tait, ١٩٩٧; Alyssin, ٢٠٠٤). كما انها تساعد على انتقال بلازميدات غير اقترانية اخرى، ولاجل فهم الية انتقال البلازميدات بصورة عامة اقترح كل من Larry & Wendy (١٩٩٧) ان هناك نوعين من البلازميدات القادرة على الانتقال وهي:

١. البلازميدات ذاتية الانتقال (Self-transmissible plasmid) وهي بلازميدات لها قدرة ذاتية على الانتقال من خلال امتلاكها لمواقع جينية متكاملة تمكنها من الانتقال واهم هذه المواقع هي ***oriT*** site, ***tra***-genes (Archer & Johnston, ١٩٨٣).
٢. البلازميدات المحمولة (Mobilizable plasmids) وهي بلازميدات غير قادرة على الانتقال الذاتي ولكن يمكن انتقالها بمساعدة النوع الاول (Larry & Wendy, ١٩٩٧;Forbes & Schaberg, ١٩٨٣; Cohn *et al*., ١٩٨٢).

٢-١٣: المطهرات Antiseptics

تعد المطهرات عوامل كيمياوية لها القدرة على تثبيط او قتل العديد من الاحياء المجهرية، وان مدى تأثيرها واسع لذا فهي تختلف في هذه الصفة عن المضادات الحيوية والتي يكون تأثيرها انتقائي ونوعي (AL-Masaudi *et al*., ١٩٩١a; Lansing *et al*., ١٩٩٩).

ان الاستخدام الواسع والعشوائي للمطهرات الكيميائية من غير الاعتماد علىالاسس العلمية للتقييس ادى الى ظهور سلالات مقاومة للمطهرات في العديد من انواع البكتريا وباليات مقاومة متعددة. وان اساسها الوراثي بلازميدي على الاغلب (Vaudaux *et al*., ١٩٩٤).

لغرض الفهم الدقيق لالية عمل المادة المطهرة قسمت المطهرات اعتماداً على نوع وشدة تأثيرهاالى أربعة أنواع :

١. Antiseptics :وهي المواد التي تستخدم لتطهير الانسجة الحيوية مثل الجلد والاغشية المخاطية.

٢. Disinfectants: وهي المواد التي تستخدم لتطهير الاجزاء غير الحيوية مثل العدد والارضيات.

٣. Bacteriostatic: يشير هذا المصطلح الى ان تأثير المطهر هو مثبط او موقف للنمو المايكروبي.

٤. Bactericidal : يشير الى ان التأثير قاتل للنمو المايكروبي (Ayliffe, ١٩٩٣; Wesley, ١٩٩٨).

٢-١٣-١: الية عمل المطهر Mechanism of disinfectant and antiseptic action

تختلف الية عمل المواد المطهرة تبعاً لتركيبها الكيميائي والمجاميع الفعالة التي تحملها جزيئة المطهر وعلى هذا الاساس صنفت المواد المطهرة الى عدة اصناف هي مركبات الفينول، الكحولات، الهالوجينات، المعادن الثقيلة ومركباتها، الاصباغ،مركبات الغسيل، مركبات الامونيوم الرباعية، الالديهايدات، والغازات (Pelczar *et al*., ١٩٨٦).

ومن اهم اليات تأثير المواد المطهرة على الخلايا البكتيرية هي:

١. التأثير على الغشاء الخلوي وخاصة المركبات الدهنية مسببة الارتشاح او التمزق او كلاهما كالكحولات والمركبات الكتايونية (Kataionic).
٢. احداث تغيرات كيميائية للجزيئات الحيوية مثل الانزيمات والاحماض النووية من خلال كسر الاواصر الهيدروجينية والكبريتية.
٣. اكسدة بعض المحتويات الخلوية مثل مركبات الكلور.
٤. التداخل السمي كما هي الحال مع مركبات اليود والالكيلات (Lansing *et al*., ١٩٩٩; Dommani, ١٩٩٧).

وتجدر الاشارة الى ان اغلب المواد المطهرة تؤثر بأكثر من الية في خلايا البكتريا وبذا فأن تأثيرها غير نوعي، وتتأثر فعالية المطهر بعدة عوامل اهمها درجة الحرارة ودالة الحموضة pH ووقت التعرض وطور النمو البكتيري (Dommani, ١٩٩٧).

ان لبعض المطهرات تداخلاً في الاستخدام والتأثير مثل مركبات Chlorhixidin فهي تستخدم بتراكيز واطئة (١-٢%) لتطهير الجروح، في حين يمكن استخدامها بتركيز ٥% لتطهير الارضيات، وكذلك للعديد من المطهرات عند رفع تراكيزها تتحول من موقفة للنمو الى قاتلة (Lansing, ١٩٩٩).

٢-١٣-٢: حساسية البكتريا للمطهرات

Bacterial susceptibility for antiseptics&disinfectants

تعد الية نظام الدفق (Efflux pump system) هي اكثر الاليات شيوعاً في مقاومة العنقوديات والعديد من الاجناس البكتيرية الاخرى للمطهرات (Rouche et al.,١٩٩٠). كما اشار Gilbert وجماعته (٢٠٠٣) الى ان مستوى المقاومة في العنقوديات يمكن اعتباره نوعاً من القدرة على التحمل او عدم التحسس وليس مقاومة بالمعنى الدقيق في حين اشار Leelaporn وزملاؤه (١٩٩٤) الى احتواء العنقوديات وخاصة *S. aureus* و*S. epidermidis* على جينات بلازميدية مسؤولة عن مقاومة مركبات الامونيوم الرباعية. وقد اشار Cookson وجماعته (١٩٩٧) الى ان العنقوديات المقاومة للمثيسيلين ابدت تحسساً واطئاً تجاه الكلورهكسدين ويقصد بالتحسس الواطىء هو ارتفاع قيم MIC في السلالات المقاومة عنه في الحساسة، كما هدفت دراسات عديدة الى ايجاد علاقة بين مقاومة المطهرات ومقاومة المضادات الحيوية (AL-Masaudi *et al.*, ١٩٩١b).

ويبين الجدول ٢-٥ الية عمل المطهرات قيد الدراسة وتصنيفها كيميائياً.

جدول. ٢-٥ : الية عمل المطهرات المستخدمة في الدراسة الحالية.

المادة المطهرة	المجموعة التصنيفية	الية العمل
الفينول	مركبات الفينول	تحطيم الغشاء السايتوبلازمي، مسخ الانزيمات، تخثر البروتينات، تأثير سام
الكحول الاثيلي	الكحولات	ترسيب البروتينات الخلوية
الديتول	مركبات الفينول	مسخ الانزيمات، تخثر البروتينات
هكساتان	الهالوجينات-فينول	اكسدة المحتويات الخلوية
اليود	الهالوجينات	هلجنة حامض التايروسين مسخ الانزيمات والبروتينات، الاكسدة
سابتون	هالوجين+ مركبات الامونيوم الرباعية	مسخ الانزيمات والبروتينات تدمير الغشاء البلازمي

(Pelczar *et al.*, ١٩٨٦; Lansing *et al.*, ١٩٩٩; MC donnel & Russel, ١٩٩٩)

٢-١٣-٣: معامل الفينول Phenol Coefficient

هنالك عدة طرق مختبرية يتم بوساطتها تقييم شدة تأثير المركبات الكيميائية المضادة للاحياء المجهرية وتعد طريقة معامل الفينول من افضل الطرق المستخدمة في تقييم المطهرات، وهي الطريقة الاساسية المعتمدة رسمياً من هيئة الغذاء والدواء الدولية وتسمى كذلك بالطريقة الامريكية Associated Official Agriculture Chemists (AOAC) (Lansing *et al.*, ١٩٩٩; Pelczar *et al.*, ١٩٨٦) .

تعتمد هذه الطريقة على اختيار احد السلالات القياسية للانواع البكتيرية *S. aureus* او *S. typhi* و *P. aeroginosa* (Pelczar *et al.*, ١٩٨٦).

اشار كل من Al-Masaudi وزملاؤه (١٩٨٨) و MCdonnel و Russel (١٩٩٩) الى ضرورة اختيار العزلة (او السلالة) من داخل المستشفى لكي تكون النتائج اكثر دقة واقرب الى الواقع .كما تقتضي هذه الطريقة تحديد التراكيز المثبطة والقاتلة للفينول والمواد المطهرة قيد الدراسة ومن ثم تحديد التراكيز المتكافئة من المادة المطهرة والفينول والتي تعطي تأثيرا متشابها في زمن تعرض لايقل عن ١٠ دقائق وهي التراكيز التي يختفي عندها النمو كليا.

٢-١٤: تحييد البلازميدات Plasmids curing

تمتاز البلازميدات بكونها عوامل وراثية خارج كروموسومية تحمل جينات تمكن البكتريا من اكتساب صفات اضافية جديدة تزيد من كفاءة البكتريا ومقاومتها للعديد من المضادات الحيوية والمطهرات وبعض المعادن الثقيلة ولكنها لاتشفر للصفات الاساسية كالنمو والتكاثر لذا اصبح من الممكن للبكتريا ان تتخلص من بعض البلازميدات (Alan & Neil, ١٩٩٨) ان اليات التخلص من البلازميدات او ما يسمى الشفاء البلازميدي اوالاقصاء البلازميدي يمكن ان يحدث طبيعياً او بوساطة بعض المحفزات الفيزيائية والكيميائية (Larry & Wendy, ١٩٩٧). اذ ان الفقدان التلقائي للبلازميدات من خلية البكتريا يمكن ان يحدث باليات متعددة، قد يحدث فقدان لبلازميد ما في اثناء الانقسام الاعتيادي للبكتريا حيث يكون توزيع البلازميدات عشوائياً وتسمى هذه الالية التحييد العشوائي (Random curing) فتظهر افراد فاقدة لصفات ذلك البلازميد. كما ان هناك الية اخرى تحفز البكتريا ذاتياً على تحييد بعض البلازميدات تسمى الية عدم التوافق البلازميدي (Incompatibility) فلا يمكن لبلازميدين يعودان للمجموعة التوافقية نفسها (Inc-group) من التواجد في الخلية نفسها، فقد أشار Meacock وجماعته (١٩٨٠) الى ان السبب في ذلك يعود الى تشابه مواقع ارتباط البلازميدين (***Par*** site) على الغشاء البلازمي للبكتريا في اثناء الانقسام مما يسبب فقدان احدهما.

اظهرت بعض العوامل الفيزيائية كفاءة عالية في تحفيز البكتريا على تحييد بلازميداتها ومن اهم هذه العوامل درجة حرارة النمو إذ اشار الصفاوي وعبد الرزاق (٢٠٠٥) الى ان نمو العنقوديات الذهبية

عند درجة حرارة ٤٣ ْم يمكنها من فقدان بعض بلازميدات المقاومة (R-plasmids) لبعض المضادات الحيوية وخاصة المشفرة لانزيمات البيتالاكتميز.

كما استعملت بعض المواد الكيمياوية في تجارب التحييد كصبغات الاكردين وبروميد الاثيديوم واستخدم حامض السالسيلك لهذا الغرض ايضاً، وكان لاستخدام مركب كبريتات الصوديوم ثنائية الاسيل كفاءة عالية في تحييد البلازميدات للعديد من انواع البكتريا وضمنها العنقوديات (Sonstein *et al.*, ١٩٧٢).

تحمل البلازميدات العديد من الجينات المشفرة لمقاومة المضادات الحيوية لذا اعتمدت هذه الصفات في تقنيات تحييد البلازميدات فالبكتريا الفاقدة للبلازميد الحامل لجينات المقاومة تتحول من مقاومة الى حساسة (Trevors , ١٩٨٦).

تحوي العنقوديات بلازميدات اقترانية صغيرة مسؤولة عن مقاومة بعض المضادات الحيوية مثل التتراسايكلين ,الارثرومايسين ,الكلورامفينكول والامبسلين وغيرها (Franklin, ٢٠٠٣). اشار كل من Michio وجماعته (١٩٨٦) و Dennis وجماعته (١٩٨٦) الى وجود تداخل وراثي كرموسومي-بلازميدي في مقاومة مضادات البيتالاكتام والمضادات الامينوكلاكوسيدية ومن خلال هذا التداخل تجلت الاهمية العلمية لتجارب التحييد فمن خلالها يمكن تحديد المواقع البلازميدية عن المواقع الكروموسومية لجينات المقاومة. وتجدر الاشارة الى دور الجينات القافزة (Transposons) في هذا التداخل الوراثي إذ تمكن العلماء والباحثون من تشخيص العديد من الجينات القافزة في العنقوديات (Wesley, ١٩٩٨; Arian & Marcus, ١٩٩٨).

جدول ٤-٥ .حساسية بكتريا *S.epidermidis* للمضادات الحيوية

رقم العزلة	مصدر العزلة	PG ١٠	Ap ١٠	Ax ٢٥	Cm ٣٠	Ctx ٣٠	E ١٥	G ١٠	Mt ٥	Rif ٥	Tc ٣٠	Va ٣٠	Tp ٥	Ln ٢	y
٢	قشع	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	
٣٢	قشع	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	
٦٣	ادرار	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
٧٢	ادرار	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	
١٠١	ادرار	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	
١١٨	جروح	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	
١٣٥	حروق	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	
١٤١	حليب	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	
١٦٣	مسحة مهبلية	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	
١٦٩	انابيب قثطرة	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	

١٨٤	انابيب قثطرة	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
١٨٧	دم	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
١٩٥	دم	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
٢٠٢	دم	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
٢٠٩	حب الشباب	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
٢٢١	دنابل	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-
٢٢٢	دنابل	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
٢٣٦	عيون	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
٢٥٠	مسح عام	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
٢٧٧	مسح عام	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
٢٩٣	مسح عام	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
٣١٥	مسح عام	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
٣٢٠	مسح عام	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-		-
٣٤١	مسح عام	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-

الرموز : + مقاوم ، - حساس

جدول ٤-٧ حساسية بكتريا *S. aureus* الموجبة لانزيم مخثر البلازما للمضادات الحيوية

العزلة	مصدر العزلة	PG ١٠	Ap ١٠	Ax ٢٥	Cm ٣٠	Ctx ٣٠	E ١٥	G ١٠	Ox ٥	Rif ٥	Tc ٣٠	Va ٣٠	Mt ٥	Ln ٢
٤	قشع	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
٧	ادرار	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+
١٢	جروح	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
١٣	حليب	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
١٤	مسحة مهبلية	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
١٨	انابيب قثطرة	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
١٩	دم	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
٢١	دنابل	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
٢٩	العيون	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
٣٠	مسح عام	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+

جدول ٤-٨ حساسية بكتريا *S. aureus* السالبة لانزيم مخثر البلازما للمضادات الحيوية

العزلة	مصدر العزلة	PG ١٠	Ap ١٠	Ax ٢٥	Cm ٣٠	Ctx ٣٠	E ١٥	G ١٠	Mt ٥	Rif ٥	Tc ٣٠	Va ٣٠	Tp ٥	Ln ٢
٩	ادرار	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+
٩	ادرار	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-

الرموز : + مقاوم ، - حساس

جدول ٤-١١ حساسية بكتريا *S. saprophyticus* للمضادات الحيوية

مصدر العزلة	PG ١٠	Ap ١٠	Cm ٣٠	Ctx ٣٠	E ١٥	G ١٠	Ox ٥	Rif ٥	Tc ٣٠	Va ٣٠	Mt ٥	Ln ٢	Nv ٣٠	Nal ٣٠
ادرار	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
ادرار	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
ادرار	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
ادرار	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
ادرار	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
ادرار	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
ادرار	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
ادرار	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
مسحة مهبلية	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
مسحة مهبلية	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
مسحة مهبلية	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
مسحة مهبلية	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
مسحة مهبلية	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
مسحة مهبلية	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
مسحة مهبلية	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
مسحة مهبلية	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-

الرموز : + مقاوم ، - حساس

٣- المواد وطرائق العمل Materials & Methods

٣-١ الاجهزة والمواد :

٣-١-١: الاجهزة والادوات المستعملة

١. جهاز النبذ المركزي	Centrifuge (Hermle, Germany)
٢. جهاز تقطير	Distiller (Ogawa, Japan)
٣. جهاز ترحيل كهربائي	Gel electrophoresis (Shndon, England)
٤. مجهز التيار الكهربائي	Power supplier (Shndon, England)
٥. باعث الأشعة فوق بنفسجية	U.V Transilluminator (San. Gabril, USA)
٦. حاضنة	Incubator (Gallenkamp, England)
٧. حاضنه هزازة	Shaking incubator(Gallenkamp, England)
٨. حمام مائي	Water bath (Memmert, Germany)
٩. فرن كهربائي	Oven (Gallenkamp, England)
١٠. مجهر ضوئي مركب	Compound light microscope (Olympus, Japan)

١١.	مقياس الأس الهيدروجيني	pH-meter (Fischer)
١٢.	ميزان حساس	Sensitive balance (Sartorius, Germany)
١٣.	موصده	Autoclave (Webeco, Germany)
١٤.	مرطبان لاهوائي	Anaerobic Jar (Gallenkamp, England)
١٥.	كاميرا تصوير رقمية	H.B. ٤MPX (China)
١٦.	اوراق ترشيح دقيقة	Milliporefilter paper (GMbH, W, Germany)
١٧.	ماصات آلية دقيقة	Micropipettes (Oxford, USA)`
١٨.	مصباح بنزن	Benzen Burnner (Shndon, England)
١٩.	عروة ناقلة	Loop (Shndon, England)

٣-١-٢ : المواد الكيمياوية

المواد المستخدمة	الشركة المصنعة
١. حامض الكبريتيك(H_2SO_4)	(BDH-England)
٢. حامض الهيدروكلوريك(HCl)	(BDH-England)
٣. حامض الخليك(CH_3COOH)	(BDH-England)
٤. حامض السلفانيلك(Sulfanilic Acid)	(BDH-England)
٥. هيدروكسيد الصوديوم(NaOH)	(BDH-England)
٦. هيدروكسيد البوتاسيوم(KOH)	(BDH-England)
٧. كلوريد الصوديوم(NaCl)	(BDH-England)
٨. كلوريد البوتاسيوم(KCl)	(BDH-England)
٩. كلوريد الباريوم المائي($BaCl_2$)	(BDH-England)
١٠. فوسفات البوتاسيوم(KH_2PO_4)	(BDH-England)
١١. كبريتات الصوديوم ثنائية الاسيل(SDS)	(Fluka Switzerland)
١٢. اثيلين-ثنائي امين-رباعي حامض الخليك [Ethylen Diamine Tetra Acitic Acid (EDTA)]	(BDH-England)
١٣. اثياين-ثنائي امين-رباعي حامض الخليك–ثنائي الصوديوم (Na_2EDTA)	(BDH-England)
١٤. ترس قاعدي (Tris-base)	(BDH-England)
١٥. ترس حامضي(Tris-Cl)	(BDH-England)
١٦. فينول	(BDH-England)
١٧. كلوروفورم	(BDH-England)

١٨.ايثانول	(BDH-England)
١٩. ايزوبروبانول	(BDH-England)
٢٠. ايزواميل الكحول	(BDH-England)
٢١. كليسرول	(BDH-England)
٢٢. فورمالديهايد	
٢٣. زايلول	
٢٤.اسيتون	(Diagnostic International Inc-USA)
٢٥. اكاروز	(Sigma-USA)
٢٦. كلوكوز	(Fluka-Switzerland)
٢٧. سكروز	(Fluka-Switzerland)
٢٨.لاكتوز	Fluka-Switzerland)
٢٩.يوديد البوتاسيوم	(BDH-England)
٣٠.بروموفينول الازرق	(BDH-England)
٣١.بروميد الاثيديوم	(Sigma-USA
٣٢.الايودين	(BioMerieux-France)
٣٣.السفرانين	(BioMerieux-France)
٣٤.البنفسج البلوري	(BioMerieux-France)
٣٥.المثيلين الازرق	(BioMerieux-France)
٣٦.بيروكسيد الهيدروجين	(BDH-England)
٣٧. انزيم اللايسوزايم	Lysozyme (Cinnogen Inc. Iran)

٣-١-٣ :المضادات الحيوية

A - اقراص المضادات الحيوية

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز بالقرص (مايكروغرام)	الشركة المصنعة
بنسيلين ج	PG	١٠	Bioanalysis
أمبيسيلين	Amp	١٠	Bioanalysis
أموكسيسيلين	Amx	٢٥	Bioanalysis
كلورامفينيكول	Cm	٣٠	Bioanalysis
سيفوتاكسيم	Ct	٣٠	Sigma
أريثرومايسين	E	١٥	Bioanalysis
جنتامايسين	Gm	١٠	Bioanalysis
أوكساسيلين	Ox	٥	Bioanalysis
ريفامبيسين	Rfi	٥	Bioanalysis
تتراسايكلين	Tc	٣٠	Bioanalysis

فانكومايسين	VA	٣٠	Sigma
ميثيسيلين	Mt	٥	Bioanalysis
لنكومايسين	Ln	٢	Bioanalysis
نوفوبايوسين	Nv	٣٠	Sigma
حامض الناليديكسك	NA	٣٠	Bioanalysis
ترايميثوبريم	Tp	٥	Bioanalysis

B - مساحيق المضادات الحيوية

١.مسحوق الامبسلين	Torge-Germany
٢.مسحوق البنسلين ج	Torge-Germany
٣.مسحوق تتراسايكلين	Macleods pharma
٤. مسحوق ارثرومايسين	Macleods pharma
٥. مسحوق كلورامفنيكول	Torge-Germany
٦. مسحوق ترايميثوبريم	Torge-Germany

٣-١-٤: المطهرات

١.الهكساتان	Hexatan (M.O.H. Iraq)
٢.الديتول	Detol (M.O.H. Iraq)
٣.الكحول الاثيلي	Ethanol (M.O.H. Iraq)
٤.الايودين	Iodine (B.Braunn, Switzerland)
٥.السابتون	Sapton (AlRahma pharma. Jordan)
٦.كلورهكسين	Chlorhexidine (AlRahma pharma. Jordan)
٧.الستريمايد	Citrimid (AlRahma pharma. Jordan)

٣-١-٥: السلالة البكتيرية القياسية Standard bacterial strain

السلالة البكتيرية	التركيب الوراثي	المصدر
E.coli MM٢٩٤	*hsd*M$^+$, *hsd*R$^-$, *rec*A$^-$, *Rif*^{r}, *end* AI$^-$	معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الأحيائية للدراسات العليا – جامعة بغداد

الرموز:

$hsdM^+$ عدم وجود نظام التحوير.

$hsdR^-$ عدم وجود نظام التقييد.

rec A^- فقدان نظام اعادة الارتباط.

Rif^r المقاومة للريفامبسين.

end AI^- فاقدة لانزيم endonuclease

٣-١-٦: الاوساط الزرعية

١. وسط اختزال النترات السائل Nitrate Reduction Broth :

حضر بأذابة ٥ غم ببتون و ٠.٢ غم نترات البوتاسيوم في ٩٥٠ مل من الماء المقطر واكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل وعدل الأس الهايدروجيني الى٧.٢، وزع الوسط السائل في انابيب اختبار (٥ مل) وعقمت بالموصدة (Macfaddin, ٢٠٠٠). استعمل هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على اختزال النترات الى نتريت.

٢. وسط لوريا-برتاني السائل Luria-Bertani Broth

حضر بأذابة ١٠غم تربتون و ٥غم مستخلص الخميرة و١٠ غم كلوريد الصوديوم في ٩٥٠ مل ماء مقطر وعدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٢ واكمل الحجم الى ١٠٠٠ مل وعقم بالموصدة (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩). استعمل هذا الوسط لاجراء تجارب التحييد، كما استخدم كوسط اغنائي في تجارب استخلاص DNA.

٣. وسط الادامة Maintenance Broth

حضر باضافة ١٥% كليسرول الى وسط نقيع القلب والدماغ السائل، عقم بالموصدة (Macfaddin, ٢٠٠٠). استعمل هذا الوسط لحفظ البكتريا المعزولة والمشخصة لمدة طويلة.

٤. وسط التخمر السكري السائل Sugar fermintation broth

حضر بإذابة:

١٠ غم ببتون و ١ غم خلاصة اللحم و٥ غم كلوريد الصوديوم و٠.٨ غم صبغة الفينول الاحمر و ٠.١ محلول سكر اللاكتوز (او أي سكر قيد الاختبار), وعدل الأس الهايدروجيني الى٧.٢

صب الوسط في انابيب اختبار حاوية على انابيب درهم وتم التأكد من عدم وجود فقاعات داخل الانابيب. استعمل هذا الوسط لمعرفة قدرة البكتريا على تخمير بعض السكريات (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٥. وسط الدم الصلب Blood Agar Base

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة**(oxoid)** وعقم بالمؤصدة، ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة ٤٥ ْم واضيف اليه ٥% من دم الانسان. استعمل هذا الوسط لمعرفة قابلية المكورات العنقودية على تحليل الدم وتحديد نوع التحلل (Baron *et al.*, ١٩٩٤).

٦. وسط اختبار الحركة Motility Medium

حضر باذابة ١٢ غم تربتون **(Fluka)** و٦ غم من كلوريد الصوديوم و٥ غم من الاكار في لتر من الماء المقطر وضبط الاس الهيدروجيني الى ٧.٢. تم توزيع الوسط في انابيب اختبار(٥ مل للانبوب) وعقمت بالموصدة (Macfaddin, ٢٠٠٠). استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على الحركة.

٧- الاوساط الزرعية الجاهزة

حضرت هذه الاوساط على وفق تعليمات الشركة المجهزة وعقمت بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ ْم وضغط ١٥ باوند/انج لمدة ١٥ دقيقة وهي:-

أ- وسط المرق المغذي Nutrient Broth (Difco) .

استعمل هذا الوسط في عزل البكتريا وفي اختبار المطهرات.

ب- الوسط المغذي الصلب Nutrient Agar (Difco) .

استعمل لغرض تنقية المزارع البكتيرية والحفظ لمدد قصيرة.

جـ- وسط المانيتول الملحي Mannitol Salt Agar (oxoid).

استعمل لغرض تفريق العنقوديات المخمرة للمانيتول عن غير المخمرة.

د- وسط مولر-هنتون الصلب (Muller-Hinton Agar (oxoid.
استعمل هذا الوسط في اختبارات الحساسية الدوائية.

هـ- وسط مرق نقيع القلب والدماغ (Brain-Heart Infusion Broth (Difco.

استعمل هذا الوسط كوسط اغنائي في عزل العنقوديات. كما استعمل كوسط ادامة بعد خلطه مع الكليسرول وكوسط انمائي في تجارب استخلاص DNA.

و- وسط نقيع القلب والدماغ الصلب (Brain-Heart Infusion Agar (Difco.
استعمل كوسط اغنائي في تجارب التحييد واستخلاص الدنا.

٣-١-٧: المحاليل والدوارئ

١- المحلول الملحي الفسلجي Physiological Normal Saline

حضر بأذابة ٠.٨٥ غم من كلوريد الصوديوم في حجم قليل من الماء المقطر واكمل الحجم الى ١٠٠ مل وعقم بالموصدة (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٢- محاليل صبغة غرام Gram's Stain Solution

تم تحضيرها وفق تعليمات الشركة المنتجة (Difco, ١٩٧٥).

٣- محاليل ماكفرلاند Macfarland's Solutions

أ- المحلول الاول

حضر بأذابة ١.١٧٥ غم من كلوريد الباريوم المائي ($BaCl_2 . H_2O$) في ١٠٠ مل ماء مقطر.

ب- المحلول الثاني

حضر بإضافة ١ مل من حامض الكبريتيك المركز (H_2SO_4) الى ١٠٠ مل ماء مقطر. وعند الاستعمال اضيف ٠.٥ مل من المحلول الاول الى ٩٩.٥مل من المحلول الثاني. الدلالة العددية لهذا المحلول (١.٥×$١٠^٨$ خلية/مل) (NCCLS, ١٩٧٦).

٤- محلول دارئ Saline-EDTA

يتكون من ٠.١٥ مولار من NaCl و٠.١ مولار من EDTA عدل الأس الهايدروجيني الى٨. اكمل الحجم الى ١ لتر وعدل الاس الهيدروجيني الى ٨، عقم بالموصدة(Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

٥- محلول STE Saline-Tris-EDTA

يتكون من ٠.١ مولار من NaCl و١٠ ملي مولار من Tris-HCl و ١ ملي مولار من EDTA، عدل الاس الهيدروجيني الى ٨، عقم بالموصدة (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

٦- محلول كبريتات الصوديوم ثنائية الاسيل SDS ٢٥%

حضر انياً بأذابة ٢.٥ غم من SDS في ١٠ مل من محلول دارئ Saline-EDTA، عدل الاس الهيدروجيني الى ٨، عقم بالموصدة (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

٧- محلول الفينول I

تم تحضير هذا المحلول بطريقة التميع اذ وضعت بلورات الفينول في عبوة زجاجية معتمة محكمة الغلق في حمام مائي عند درجة حرارة ٦٨ ْم حتى التميع الكامل.

يعد هذا المحلول محلولاً خزيناً بتركيز ١٠٠% استخدم لتحضير التراكيز المكافئة للمواد المطهرة في اختبار تحديد معامل الفينول(Sambrook *et al.*, ١٩٨٩) .

٨- محلول الفينول II

حضر بأذابة الفينول المعامل بمانع الاكسدة 8-hydroxy quinoline في حمام مائي عند درجة حرارة ٦٨ ْم واضيف له حجم مساوي من ٠.٥ مولار Tris-HCl (pH ٨) ومزج جيداً باستخدام محرك مغناطيسي Magnetic Stirrer لمدة ١٥ دقيقة ثم ترك بدون تحريك لكي ينفصل المحلول الى طبقتين سحبت الطبقة المائية العليا بماصة زجاجية. اعيدت المعاملة السابقة باستخدام ٠.١ مولار Tris-HCl (pH ٨) وكررت العملية لحين وصول الاس الهيدروجيني الى ٨، ازيلت الطبقة المائية وحفظ الفينول تحت طبقة من الدارئ في عبوة معتمة

عند درجة حرارة ٤ ْم يمكن استخدامه لمدة لا تزيد عن شهر واحد في استخلاص الدنا (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩)

٩- محلول كلوروفورم-ايزواميل (٢٤:١)

حضر بمزج ٢٤٠ مل كلوروفورم مع ١٠ مل من الكحول الايزواميلي وحفظ في عبوة معتمة عند بدرجة حرارة ٤ ْم (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

١٠- محلول الفينول: كلوروفورم: ايزواميل الكحول (٢٥:٢٤:١)

حضر بمزج ٢٥٠ مل من محلول الفينول مع ٢٥٠ من مزيج كلوروفورم- ايزواميل الكحول يحفظ عند درجة حرارة ٤م في عبوة معتمة (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

١١- محلول دارئ TE

يتكون من ١٠ ملي مولار Tris-HCl و١ ملي مولار EDTA وعدل الاس الهيدروجيني الى ٨ وعقم بالموصدة وحفظ عند درجة حرارة ٤ ْم (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

١٢- محلول صبغة بروميد الاثيديوم

حضر بأذابة ٠.٢٥ غم من صبغة بروميد الاثيديوم في ٥٠ مل من الماء المقطر للحصول على تركيز ٥ ملغم/مل يحفظ في عبوة معتمة عند درجة حرارة الغرفة (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩)

١٣- محلول دارئ TBE (٠.٥x)

يتكون من ٠.٠٨٩ مولار Tris-base و٠.٠٨٩ مولار حامض البوريك و٠.٠٠٢ مولار Na_2-EDTA، ذوب في ٥٠٠ مل ماء مقطر وعدل الاس الهيدروجيني الى ٨ وعقم بالموصدة (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

١٤- محلول دارئ التحميل Loading buffer

يتكون من ٠.٢٥% من صبغة البروموفينول الزرقاء و٤٠% من محلول السكروز، حفظ عند درجة حرارة ٤ ْم (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

١٥- محلول الامبسلين

حضر باذابة ٠.٥ غم من المضاد الحيوي في ١٠ مل من الماء المقطر المعقم واكمل الحجم الى ٥٠ مل للحصول على تركيز ١٠ ملغم/مل .

١٦- محاليل والارثرومايسين والكلورامفينكول

حضرت بأذابة ٢٥٠ ملغم من المضاد الحيوي في ٥ مل من الايثانول واكمل الحجم الى ٢٥ مل للحصول على تركيز ١٠ ملغم/مل٠

١٧- محلول التتراسايكلين

حضر باذابة ٢٥٠ملغم من المضاد الحيوي في ١٠ مل من الماء المقطر المعقم واكمل الحجم الى٢٥ مل للحصول على تركيز ١٠ ملغم/مل٠

١٨-محلول البنسلين ج

حضر باذابة ٠,٥ غم من المضاد الحيوي من الماء المقطر المعقم واكمل الحجم الى ٥٠ مل للحصول على تركيز ١٠ ملغم/مل .

١٩- محلول الجنتامايسين

حضر باذابة ٨٠ ملغم من المضاد الحيوي في ٨ مل من الماء المقطر المعقم للحصول على تركيز ١٠ ملغم/مل.

٢٠- محلول الترايموكسازول

حضر باذابة ٨٠ ملغم ترايمثيربريم و٤٠٠ ملغم سلفاميثوكسازول في ١٠مل من الماء المقطر المعقم واكمل الحجم الى ٤٠ مل لكل منهما على انفراد للحصول على تركيز ٢ملغم/مل ترايميثوبريم و١٠ ملغم/مل سلفاميثوكسازول ٠

حضرت محاليل المضادات الحيوية لغرض اجراء تجارب التحييد البلازميدي وحددت التراكيز المثبطة الدنيا لكل مضاد حيوي اعتمادا على ما ذكر في Sabath وجماعته(١٩٧٦)و Sambrook وجماعته(١٩٨٩) ٠ حفظت جميع المحاليل عند درجة حرارة -٢٠م٠

٢١- بلازما اختبار انزيم التجلط Plasma of Coagulase test

استخدمت بلازما دم إنسان مجهزة من (وزارة الصحة العراقية-دائرة صحة بابل-مصرف الدم المركزي) في عبوة بلاستيكية سعة ٥٠٠ مل جرى توزيع ١٠٠مل من البلازما في انابيب اختبار معقمة محكمة الغلق سعة ٥ مل وحفظها مجمدة لغرض الاستخدام اليومي.

٢٢. محاليل المطهرات

حضرت محاليل المطهرات بواقع ستة تراكيز لكل مطهر زيادة على ستة تراكيز مكافئة من الفينول. لغرض تحديد التراكيز الفعالة والمتكافئة لكل مادة مطهرة مع التركيز الفعال للفينول لاستخراج معامل الفينول كما يلي:-

أ- الفينول(Phenol)

حضرت التراكيز التالية (٥×١٠$^{-٣}$ -٥×١٠$^{-٨}$) ملغم/مل.

ب- الهكساتان (Hixatane)

حضرت التراكيز التالية (٤×١٠$^{-٢}$ -٤×١٠$^{-٧}$) ملغم/مل.

جـ- الديتول(Detol)

حضرت التراكيز التالية (٤×١٠$^{-٢}$ -٤×١٠$^{-٧}$) ملغم/مل.

د- الايودين (PVP)

حضرت التراكيز التالية (٧٧×١٠$^{-٣}$-٧٧×١٠$^{-٨}$) ملغم/مل.

هـ- السابتون (Saptone)

كلورهكسدين (٣×١٠$^{-٣}$ -٣×١٠$^{-٨}$) ملغم/مل.

ستريمايد (٣×١٠$^{-٢}$ -٣×١٠$^{-٧}$) ملغم/مل.

و- الكحول الاثيلي(Ethyl Alcohol)

حضرت التراكيز التالية (٧ ,٠-٧×١٠$^{-٦}$) ملغم/مل.

٣-١-٨: الكواشف Reagents

١. **كاشف الكاتاليز Catalase Reagent**
حضر بإضافة ٣ مل من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) الى ٩٧ مل من الماء المقطر للحصول على تركيز ٣% (Baron *et al.*, ١٩٩٤).

٢. **كاشف الاوكسديز Oxidase Reagent**
حضر انياً عند الاستعمال باذابة ١.٠ غم من مادة (*N*′*N*′ *N,N*-Tetramethyl-*P*-phenylen diamine dihydrochloride) في ١٠ مل من الماء المقطر ووضع في قنينة معتمة (Baron *et al.*, ١٩٩٤).

٣. **كاشف اختزال النترات Nitrate Reduction Reagent**
حضر حسب ما ذكره Macfaddin (٢٠٠٠) ويتكون من محلولين:

المحلول الأول : حضر بأذابة ٠.٨ غم من حامض السلفانيلك في ١٠٠ مل من ٥ عياري حامض الخليك وحفظ في قنينة معتمة عند درجة حرارة ٤ ْم.

المحلول الثاني : حضر بأذابة ٠.٥ غم من الفانفثيل امين في ١٠٠ مل من ٥ عياري حامض الخليك وحفظ في قنينة معتمة عند درجة حرارة ٤ ْم. وعند الاستعمال خلط حجمان متساويان من المحلولين لغرض اجراء الكشف.

٣-٢: طرائق العمل Methods

٣-٢-١: التعقيم Sterilization

أجريت عمليات التعقيم حسب ما ذكر في Macfaddin (٢٠٠٠) :

١. عقمت الاوساط الزرعية و محاليل استخلاص الدنا باستعمال المؤصدة عند درجة حرارة ١٢١ ْم لمدة ١٥ دقيقة.

٢. عقمت محاليل المضادات الحيوية بطريقة الترشيح باستخدام أوراق ترشيح ذات قطر ٠.٢٢ مايكرومتر.

٣-٢-٢: جمع العينات Sample collections

جمعت ٣٦٠ عينة من مستشفى الحلة التعليمي العام خلال المدة من كانون الثاني ٢٠٠٤ ولغاية مايس ٢٠٠٥ منها ٢٤٠ عينة سريرية و١٢٠ عينة مسح عام للكوادر الطبية والفنية في المستشفى جمعت العينات السريرية من مرضى بأعمار مختلفة ومن كلا الجنسين ومن اصابات مختلفة.

جمعت العينات تبعاً لنوع الاصابة فقد استخدمت المسحات المباشرة في جمع عينات الجروح والحروق والالتهابات الجلدية وعينات الجهاز التناسلي الأنثوي وعينات المسح العام وعينات انابيب القثطرة، في حين جمعت عينات البلغم ,الادرار ,الدم والحليب من اصابات كل من جهاز التنفس والجهاز البولي وجهاز الدوران والتهاب الثدي على التوالي، في انابيب اختبار معقمة، كما استخدمت طريقة الغسل بالمحلول الملحي الفسلجي لانابيب القثطرة للحصول على عينات اكثر دقة.

كما جمعت عينات الدم بسحب ٥ مل من دم المريض وزرعت مباشرة في قناني تحوي ٥٠ مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل وحضنت عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة، أعيد زرعها بأخذ ٠.١ مل من المزرعة ونشرها على وسط الدم الصلب وحضنت عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة (Macfaddin, ٢٠٠٠).

اما عينات المسح العام للعاملين في المستشفى فقد جمعت بطريقة المسح القطنية المباشرة لـ ٣٠ عامل في مستشفى الحلة التعليمي اذ أخذت اربع مسحات لكل عامل من الأنف, البلعوم, الأيدي والملابس الخارجية.

زرعت المسحات هوائيا على وسطي الدم الصلب بظروف هوائية ولاهوائية عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة (Baron, *et al*., ١٩٩٨).

٣-٢-٣: العزل Isolation

زرعت العينات السريرية هوائيا في وسط نقيع القلب والدماغ السائل وحضنت عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة,ثم أعيد زرعها على وسطي الدم الصلب والمغذي الصلب لغرض دراسة الصفات المظهرية للمستعمرات النامية والعمل على تنقيتها لأغراض التشخيص .

٣ -٢-٤: التشخيص Diagnosis

شخصت العزلات المستحصل عليها اعتماداً على Bergys وجماعته (١٩٩٤) و (٢٠٠٠) Macfaddin, على وفق الاسس الاتية:-

١. الخصائص المظهرية Morphological characteristics

درست الصفات المظهرية للعزلات على وسطي الآكار المغذي وآكار الدم من حيث شكل المستعمرة، الحجم، اللون، الحواف، العتمة والقوام وغيرها. كما درست الصفات المظهرية للخلايا بعمل مسحات جافة للفحص المجهري المباشر لملاحظة شكل ولون الخلايا وانتظامها وتفاعلها مع صبغة كرام.

٢. الاختبارات الكيموحيوية Biochemical test

قبل اجراء الاختبارات نشطت البكتريا على وسط نقيع القلب والدماغ السائل او المرق المغذي واستخدمت كأوساط خزينة وفيما يلي الاختبارات التي تم اجراؤها للتشخيص:-

أ- اختبار الكاتليز Catalase test

تم اجراء الفحص بنقل جزء من مستعمرة بكتيرية منماة على الوسط المغذي الصلب بعمر ٢٤ ساعة باستخدام عيدان خشبية معقمة الى شريحة زجاجية نظيفة وجافة مضاف لها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين (٣%)، ان تكون فقاعات هوائية هو دليل على الاختبار الموجب (Baron, *et al.*, ١٩٩٨).

ب- اختبار الاوكسديز Oxidase test

تم اجراء الفحص بنقل جزء من مستعمرة بكتيرية منماة على الوسط المغذي الصلب بعمر ٢٤ ساعة باستخدام عيدان خشبية معقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بكاشف (N'N' N,N-Tetramethyl-*P*-phenylen diamine dihydrochloride). ان ظهور اللون البنفسجي خلال ١٠ ثواني دليل الاختبار الموجب (Baron, *et al.*, ١٩٩٨).

جـ- اختبار تحلل الدم Haemolysin test

نمي المزروع البكتيري على وسط الدم الصلب وحضن عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة، ان ظهور هالة شفافة حول المستعمرات النامية هو دليل على تحلل كريات الدم الحمراء تحللاً كاملاً (β)(Macfaddin, ٢٠٠٠).

د- اختبار تخمر المانيتول Mannitol fermentation test

تم زراعة العالق البكتيري على وسط المانيتول الملحي الصلب وحضن عند درجة حرارة ٣٧ْم لمدة ٢٤ ساعة، النتيجة الموجبة لتخمر سكر المانيتول هو تحول لون الوسط من الوردي الى الاصفر (Macfaddin, ٢٠٠٠).

هـ- اختبار تخمر سكري اللاكتوز والكلوكوز

Glucose & Lactose fermentation test

لقح وسط التخمر السكري السائل الحاوي على ٠.١ مل من سكري اللاكتوز والكلوكوز كل على حدة بالعالق البكتيري وحضن عند درجة حرارة ٣٧ْم لمدة ٢٤ ساعة، النتيجة الموجبة هي تغير لون الوسط من الاحمر الى الاصفر مع تكون الغاز في انبوب درهم (Macfaddin, ٢٠٠٠).

و- اختبار مقاومة مضاد النوفوبايوسين Novobiocin Resistance test

تم اجراء هذا الفحص بزرع العالق البكتيري المقيس على محلول ماكفرلاند(٠.٥) على وسط مولر-هنتون الصلب، واستخدمت اقراص النوفوبايوسين (٣٠ مايكروغرام/قرص)، اذ تعد بكتريا *S. saprophyticus* مقاومة لهذا المضاد (Macfaddin, ٢٠٠٠).

ز- اختبار النمو لاهوائياً Anaerobic growth test

زرعت عزلات المكورات العنقودية المشخصة في ظروف لاهوائية على وسط الدم الصلب باستعمال المرطبان اللاهوائي (Anaerobic Jar) وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ْم لمدة ٤٨-٧٢ ساعة (Baron, *et al*., ١٩٩٨).

ح- التحري عن الانزيم المخثر لبلازما الدم وعامل التكتل

Coagulase & Clumping factor detection

استخدمت طريقة انابيب الاختبار للتحري عن الانزيم المخثر لبلازما الدم ، اذ نميت البكتريا في وسط نقيع القلب والدماغ السائل عند درجة حرارة ٣٧ْم لمدة ٢٤ ساعة. مزج ٠.١ من المزروع البكتيري مع ٠.٥ مل من بلازما الانسان الطبيعي غير المخفف في انبوبة اختبار زجاجية معقمة وحضنت في حمام مائي عند درجة حرارة ٣٧ْم لمدة ٤ ساعات مع المراقبة كل ١٥ دقيقة . سجلت

النتـــائج الموجبـــة عنـــد تكـــون الخثـــرة وتصـــلب البلازمـــا (Christemsen, *et al.*,١٩٨٣;Macfaddin,٢٠٠٠).

فـي حـين تـم التحـري عـن عامـل التكتـل باسـتخدام طريقـة الشـريحة الزجاجيـة (Slide test)، اذ وضعت قطرتان من البلازما على جانبي الشريحة واضيف الى احداها النمو البكتيري بينما اضيف الـى الاخرى قطرة من المحلول الملحي الطبيعي لغرض المقارنة (سيطرة) ان حدوث أي تخثر للبلازما مقارنة مع السيطرة دليل على ايجابية الفحص (Macfaddin, ٢٠٠٠).

٣-٢-٥: حساسية المضادات الحيوية Antibiotics susceptibility

استخدمت طريقة الاقراص المشبعة بالمضادات الحيوية اذ تم تحضير العالق البكتيري بتنميته في الوسط المغذي السائل وتقييسه اعتماداً على انبوبة ماكفرلاند القياسية (٠.٥)، بعد ذلك نشر العالق على وسط مولر- هنتون الصلب وترك لمدة ٥-١٠ دقائق ليجف، بعدها وضعت اقراص المضادات الحيوية بواقع اربعة اقراص للطبق الواحد وحضنت عند درجة حرارة ٣٧°م مدة ٢٤ ساعة. قرأت النتائج بقياس اقطار مناطق التثبيط بالملم وقورنت بالمعدلات القياسية لمناطق التثبيط المبينة بالملحق -١ وحددت العزلات الحساسة والمقاومة(Baur *et al.*, ١٩٦٦;Prescott&Harley, ١٩٩٩).

٣-٢-٦: تحديد معامل الفينول Phenol coefficient determination

أولاً: تم اعتماد طريقة Associated Official Agriculture Chemists (AOAC) (١٩٨٦) المعتمدة من منظمة الغذاء والدواء [Food and Drug Adminsration(FDA)] في تحديد معامل الفينول للمطهرات قيد الدراسة. تم تحضير ستة تخافيف لكل مادة مطهرة مع ستة تخافيف مكافئة من الفينول. أجري الأختبار باضافة ٠.٥ مل من المزروع البكتيري السائل بعمر ٢٤ ساعة الى ٥ مل من تراكيز مختلفة من المادة المطهرة واخرى من الفينول ولفترات زمنية لاتقل عن ١٠الى ١٥ دقيقة وبعد كل فترة تعرض للمادة المطهرة زرعت البكتريا في الوسط المغذي السائل وحضنت عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة. سجلت النتائج من خلال تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MLCللفينول والمواد المطهرة, تم استخراج معامل الفينول بقسمة التركيز القاتل الأدنى للمادة المطهرة على التركيز القاتل الأدنى للفينول خلال فترة تعرض لا تقل عن ١٠-١٥ دقيقة (Pelczar *et al.*, ١٩٨٦;Prescott & Harley, ١٩٩٩) وفق المعادلة الآتية :

معامل الفينول=التركيز القاتل الأدنى للمطهر \ التركيز القاتل الأدنى للفينول

ثانياً: تحديد التراكيز المثبطة والقاتلة للمطهرات

استعملت طريقة التخافيف المئوية المتسلسلة في تحديد التراكيز المثبطة والقاتلة للمطهرات المقترحة في هذه الدراسة كما ورد في الفقرة ٣-١-٧-٢٢ ٠

٣-٢-٧: استخلاص وعزل الدنا الكلي

Extraction and Isolation of DNA

استخدمت طريقة الاخراج الملحي(Salting out) في استخلاص وعزل الدنا للمكورات العنقودية ، وتضمنت الطريقة الخطوات الاتية:-

١- نميت البكتريا المعدة للاستخلاص في ٥٠ مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل المضاف له مضاد الأمبيسيلين بتركيز ١٠ مايكروغرام / مل وحضنت في حاضنة هزازة بسرعة ١٥٠ دورة\دقيقة عند درجة حرارة ٣٧ ْم لمدة ٢٤ ساعة.
٢- اجريت عملية الطرد المركزي للمزروع السائل بسرعة ٤٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق. وعلق الراسب بحجم مكافئ من محلول TE واعيد الطرد المركزي بنفس السرعة والزمن وعلق في محلول ٥ مل TE.
٣- اضيفت ٥٠٠-٧٥٠ مايكروليتر من محلول انزيم اللايسوزايم بتركيز ٢٠ مايكروغرام \مل ، مزج بلطف مع العالق البكتيري وحضن في حمام مائي عند درجة حرارة ٣٧ ْم لمدة ساعة واحدة.
٤- اضيف ٦٠٠ مايكروليتر من محلول SDS بتركيز ٢٥% مسخن لدرجة حرارة ٥٥ ْم ومزج بلطف ووضع في حمام مائي عند درجة ٥٥ ْم لمدة ٥-٦٠ دقيقة لحين حدوث التحلل الكامل بتحول المحلول من معلق ابيض اللون الى رائق .
٥- اضيف ٢ مل من ٥ مولاري NaCl ومزج بلطف وترك ليبرد.
٦- اضيف ٥ مل من محلول فينول-كلوروفورم-ايزواميل الكحول ومزج بلطف لمدة ٣٠ دقيقة.
٧- اجريت عملية طرد مركزي للمستحلب المتكون بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٥ دقيقة، سحبت الطبقة الرائقة العليا الحاوية على الدنا ونقلت الى انبوبة بولي اثيلين جديدة ومعقمة , اعيدت هذه الخطوة مرتين لغرض تنقية الدنا.
٨- اضيف كحول الايزوبروبانول بحجم ٠.٦ من حجم الرائق و حركت الانبوبة بلطف تتكاثف خيوط الدنا بشكل غمامة بيضاء يزداد تكاثفها واستقرارها بعد دقائق.
٩- لفت خيوط الدنا على ماصة باستور كانت قد عققت بشكل كلاب باستعمال مصباح بنزن.
١٠- غسل الدنا المتجمع على الماصة بالايثانول(٧٠%) وترك لدقائق ليجف.
١١- علقت خيوط الدنا في دارئ TE في انابيب ابندروف وحفظت عند درجة حرارة -٢٠ ْم لحين استعمالها لأغراض الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز (Pospiech &Neuman,١٩٩٥;Goering & Duensing, ١٩٩٠)

٣-٢-٨: تحييد البلازميدات Plasmid Curing

تم اختيار اربع عزلات شملت الأنواع المعزولة في هذه الدراسة لأجراء تجارب التحييد البلازميدي كما موضح في جدول ٤-١٠ كما استعمل مركب SDS في اجراء عملية التحييد وبتراكيز ١-١٠% في وسط لوريا-برتاني السائل ووزع في انابيب اختبار(٥ مل للانبوب) ثم لقحت الانابيب

بالمزروع البكتيري وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ْم لمدة ٢٤ ساعة اذ تم تحديد التركيز المثبط الادنى لمركب SDS، ثم عرضت كل عزلة لتركيز دون التركيز المثبط الادنى وحضنت لمدة ٢٤ ساعة. بعدها زرعت على الوسط المغذي الصلب.

تم التحري عن الخلايا المحيدة بأختبار ١٠٠ مستعمرة ونقلها بتقنية Pick & Patch الى مجموعتين من الاطباق تحوي المجموعة الاولى الوسط المغذي الصلب الحاوي على المضاد الحيوي المناسب للأختبار , فيما كانت المجموعة الثانية خالية من المضاد الحيوي لغرض عزل المستعمرات المحيدة منها.

ان انعدام نمو البكتريا على الوسط الحاوي على المضاد الحيوي يدل على فقدان صفة المقاومة لذلك المضاد الحيوي وان البكتريا اصبحت حساسة له وتأكيد فقدانها للبلازميد الحامل لجين المقاومة (Tomoeda *et al* ,١٩٧٤)

٣-٢-٩:الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز

Agarose- gel electrophoresis

تحضير هلام الاكاروز

حضر هلام الاكاروز حسب ما جاء (Sambrook *et al.*,١٩٨٩) باذابة ٠.٨غم من مسحوق الاكاروز في ١٠٠ مل من محلول TBE في حمام مائي عند درجة حرارة ١٠٠ْم، ثم اضيفت صبغة الاثيديوم بروماید (١٥ مايكروليتر/١٠٠مل) بعد ان برد الهلام الى درجة حرارة ٥٠ْم .

تحضير القالب

استخدم الشريط اللاصق الشفاف لاحاطة الحافتين الامامية والخلفية للقالب (Tray) بأحكام ووضع مشط التثقيب (Comb)على بعد ١ سم من الحافة الامامية. ُملئ القالب حسب سعته بالاكاروز المحضر وترك ليتصلب لمدة ٣٠ دقيقة. رفعت الاشرطة اللاصقة والمشط بحذر وادخل القالب في خلية الترحيل الكهربائي على ان يكون مغموراً في محلول الترحيل TBE.

التحميل Loading

مزجت عينة الدنا بمحلول التحميل(Loading buffer) بحجم ٥ مايكروليتر لكل ١٥ مايكروليتر من العينة ونزلت بحذر داخل حفر الهلام.

الترحيل الكهربائي

استخدم مجهز القدرة الكهربائية (Power supplier) لتجهيز خلية الترحيل بفرق جهد ٤٠ فولت لمدة ١-٣ ساعة عند درجة حرارة الغرفة. كما استخدم جهاز UV-transilluminator كمصدر للاشعة فوق البنفسجية بطول موجي ٢٥٦ نانوميتر لفحص مواقع حزم الدنا الكرموسومي والبلازميدي(Mary .,١٩٩٨;Struelens *et al* .,١٩٩٢) وبعد اكتمال عملية الترحيل صورت النتائج باستخدام كاميرا رقمية H.B. ٤ MPX.

٤-٨ الاستنتاجات Conclusions

١. ارتفاع نسبة المكورات العنقودية السالبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم في العزل السريري والعزل العام .
٢. مقاومة المكورات العنقودية السالبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم للعديد من المضادات الحيوية وبعض المطهرات الشائعة الأستعمال طبيا.
٣. اظهر مركب كبريتات الصوديوم ثنائية الأسيل (SDS) كفاءة بلغت ٨٥% في تحييد بلازميدات المكورات العنقودية .
٤. ان الأساس الوراثي لمقاومة معظم المضادات الحيوية قيد الدراسة كمضادات البيتا لاكتم , الأمينوكلايكوسايد , الماكرولويد ,التتراسايكلين والترايميثوبريم هو بلازميدي.
٥. أكدت تجارب التحييد ان موقع الجين المسؤول عن انتاج الانزيم المخثر لبلازما الدم هو كرموسومي بأحتفاظ العزلات المحيدة بقدرتها على انتاج الأنزيم.
٦. ان موقع الجينات المسؤولة عن تحمل او مقاومة بعض المطهرات قيد الدراسة هو بلازميدي .
٧. أكدت تجارب الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز تشابه المحتوى البلازميدي للعزلات قيد الدراسة بأحتوائها على حزمتين بلازميديتين فقط.

٤-٩ التوصيات Recommendations

١. الاهتمام بدراسة المكورات العنقودية السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم لاظهار دورها الامراضي في الأخماج المكتسبة من المستشفيات .
٢. استخدام المطهرات على وفق الأسس العلمية التي تضمن فعاليتها .
٣. استخدام بعض التقنيات الوراثية الحديثة في تعزيز عملية تشخيص وتصنيف البكتريا .

٤. اجراء دراسات مسحية دورية في المستشفيات لمتابعة مستوى التلوث المايكروبي وتحديد مصادره والتغيرات الوراثية الحاصلة على البكتريا وخاصة مقاومتها للمضادات الحيوية والمطهرات .

اولا: المصادر العربية Arabic References

الخالدي, بهيجة عبيس. (٢٠٠٢). دراسة البكتريا الهوائية المسببة لعدوى المستشفيات ومقاومتها للمطهرات . رسالة ماجستير، كلية العلوم – جامعة القادسية .

الصفاوي، نوار طلال وعبد الرزاق خضر محمود. (٢٠٠٥). تحييد المحتوى البلازمي لجرثومة *S.aureus* باستخدام عوامل كيميائية وفيزيائية. مجلة تكريت للعلوم الصرفة. مجلد-١٠ (١):٥-١١.

ثانيا :المصادر الاجنبية **Foreign References**

Alan, P.J. & Neil, W. (١٩٩٨). Molecular Bacteriology : protocols and clinical applications central public health laboratory , London. UK.

Al-Masaudi, S.B.; Day, M.J. & Russell, A.D. (١٩٨٨). Sensitivity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains to some antibiotics, antiseptics and disinfectants. J. Appl. Bacteriol., ٦٥: ٣٢٩-٣٣٧.

Al-Masaudi, S.B.; Day, M.J. & Russell, A.D. (١٩٩١)a. Antimicrobial resistance and gene transfer in *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Bacteriol., ٧٠: ٢٧٩-٢٩٠.

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

Aires, D.S ; Santos, M.L. & Lancaster, H.D. (٢٠٠٠). Epidemiological study of Staphylococcal colonization and cross-infection in two west African hospital .Microb .Drug .Resist . ٦:١٣٣-١٤١ .

Anday, E.K.A. & Talbot, G.H. (١٩٨٥). Coagulase-negative staphylococci bacteremia-arising threat in the new born in font. Association of Clinical Scientists, ١٥:٢٤٦-٢٥١.

Arakawa, Y.; Murakami, M.; Suzuki, K.; Wacharotayankun, R.; Ohsuka, S.; Kato, N. & Ohta, M. (٢٠٠٠). A novel integron-like element carrying β-lactamase gene *bla*$_{IMP}$. Antimicrob. Agents Chemother. ٣٩:١٦١٢-١٦١٥

Archer, G.L. & Johnston, J.L. (١٩٨٣). Self transmissible plasmids in staphylococci that encode resistance to aminoglycosides. Antimicrob. Agents Chemother., ٢٤: ٧٠-٧٧.

Archer, G.L. & Pennel, E. (١٩٩٠). Detection of Methicillin-resistance in staphylococci by using DNA probe. Antimicrob. Agents Chemother., ٣٤: ١٧٢٠-١٧٢٤.

Archer, G.L.; Dletrick, D.R & Jonston J.L. (١٩٨٤). Molecular epidemiology of transmissible Gentamycin resistance among Coagulase-negative staphylococci. J. Inf. Dis., ١٥١: ٢٤٣-٢٥١.

Archer, G.L.; Vishniavsky, N. & Stever, H.G. (١٩٨٢). Plasmid pattern analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with prosthetic valve endocarditis. Infect. Dis., ٣٥: ٦٢٧-٦٣٢.

Arian, D. & Marcus, J.S. (١٩٩٨). Nosocomial infection caused by staphylococci. Molecular Bacteriology. Homana press Inc., Totowa, P.٤٣١-٤٦٨.

Ayliffe, A.D. & Mcdonnel, A. (١٩٩٣). Antiseptics and disinfectants activity , action and resistant .Clin.Microbiol . ١٢:١٤٧-١٧٩ .

Baron , E.J.; Peterson, L.R. & Fingold, S.M.(١٩٩٤). Medical microbiology .٩th ed .,The C.V. Mosby Co. USA.

Baron, E.J.; Peterson L.R.& Fingold, S.M. (١٩٩٨). Diagnostic microbiology. "١٥th ed".The C.V.Mosby Co. Toronto. Canada.

Baur, A.W.; Kirby, W.M.; Sherrris, I. & Turek, M. (١٩٦٦). Antibiotic susceptibility testing by standerized single disc method. Am. J. Clin. Path., ٤٥:٤٩٣-٤٩٦.

Berger, B.A. ;Strassle ,J.E.& kayser , F.H. (٢٠٠٢). Maping and characterization of multiple chromosomal factores involved in methicillin resistant in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemotherp . ٣٦ :١٣٦٧-١٣٧٣.

Burnie , J.P ; Nasab , M. ;Loudon , K.W. & Matthews R.C. (١٩٩٧). An epidemiological study of blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci demonstrating hospital –aquired infection .J.Clin.Microbiol. ٣٥:١٧٦٤-١٧٥٠ .

Chambers, H.F. (١٩٨٧). Coagulase-negative staphylococci resistant to β-lactum antibiotics *in vivo* produce penicillin-binding protein ٢a. Antimicrob. Agent Chemother., ٣١: ١٩١٩-١٩٢٤.

Cheung ,A.L. ; Koomey , J.M. ; Butler , C.A. & Fischetti , V.A. (١٩٩٢). Regulation of exoprote in expression in *Staphylococcus aureus* by alocus (*sar*) from *agr.*Proc.Natl. Acad. ٨٩: ٦٤٦٢-٦٤٦٦ .

Chopra, I.; Lacey, R.W. & Connolly, J. (١٩٧٤). Biochemical and genetic basis of tetracycline resistance in *Staphlococcus aureus*. Antimicrob. Agent. chemotherp. ٦:٣٩٧-٤٠٤ .

Christensen, G.D.; Parisi, J.T.; Bisno, A.L.; Simpson, W.A. & Beachey, E.H. (١٩٨٣). Characterization of clinically significant strain of coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Micrbiol., ١٨: ٢٥٨-٢٦٩.

Christensen, G.D.; Baddour, L.M. & Simpson, W.A. (١٩٨٧). Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production *in vitro* and *in vivo*. Infect. Immun., ٥٥: ٢٨٧٠-٢٨٧٧.

Christine , L. ; Vandenesch , F. & Greenland , T. (١٩٩٤) . Coagulase Expression in *Staphlococcus aureus* and Negatively modulated by an *agr* – depedent mechanism . J. Microbiol . ١٧٦ : ٥٥٣٤-٥٣٦

Christof, V.E.; Richard, A.; Proctor, M.D.& George, P. M. (٢٠٠١). Coagulase-negative staphylococci pathogens have major role in nosocomial in reactions. ١١٠(٤):٦٣-٧٦.

Cohen, M.L.; Wong, E.S. & Falkow, S. (١٩٨٢). Common R-plasmid in *Staphylococcus aureus* & *Staphylococcus epidermidis* during nosocomial outbreak. Antimicrob. Agents Chemother., ٢١: ٢١٠-٢١٥.

Coia , J.E.; Hussain, N.I. & Platt, D.J. (١٩٨٨). Plasmid profile and restriction enzyme fragmentation patterns of plasmids of methicillin resistant of *Staphylococcus aureus* from hospital and the community . J.Med. Microbiol. ٢١:٢٧١-٢٧٦.

Collee,J.G.; Fraser,A.G.; Marmian,B.P. & Simmon, S.A. (١٩٩٦). Practical medical microbiology "١٤th ed" The Churchill living stone Inc., USA.

Cookson ,B.D. ;Bolton , C. & platt , M. (١٩٩٧) Chlorhexidine resistance in methecillin – resistance *Staphylococcus aureus* . Antimicrob. Agents chemother. ٣٥: ٩٩٥ – ١٠٠١.

David, J. & Christopher, J. (١٩٩٨). Molecular approaches for the detection and identification of β-lactamases. Mol. Bacteriol. Ch., ٢٥: ٤٩٥-٥١٢.

Dennes, R.G. & Marcus, J.Z. (١٩٨٦). Intergeneric and interspecies genes exchange in gram-positive cocci .ASFM. Ant. Agent. Dec. ٣٠:٨١٧ -٨٢٢.

DeJonge, B.L.; Change, Y.S. ; Gage, D. & Tomasz, A. (١٩٩٢). Peptidoglycon composition of a highly methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain, The role of penicillin binding protein ٢A. J. Biol. Chem., ٢٦٧:١١٢٤-١١٢٨.

Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology and Clinical Laboratory Procedures.(١٩٧٥). "١٠th ed". Difco laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.

Dommani,A.F. (١٩٩٧).Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. ASM. ٥: ١٠٩٩-١١٠٣.

Dubin, D.T.; Fitzgibbon, J.E.; Navi, M.D. & John, J.F. (١٩٩٩). Molecular genetics of antibiotic resistance in bacteria. Antimicrob. Agents Chemother., ٤٣:١٦٣١-١٦٣٧.

Eady, E.A.; Ross, J.I.; Tipper, J.L. & Noble, W.C. (١٩٩٣). Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and erythromycin efflux pump in staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother., ٣١:٢١١-٢١٧.

Engles, W., Kamps, M. & Van Boven, C. P. (١٩٧٨) . Influence of cultivation condition on the production of staphylocoayulase by *staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. ١٠٩: ٢٣٧-٢٤٣.

Etienne, J.; Bes, F.; Renud, M. & Fleurette, J. (١٩٩٠). Instability of characteristics among coagulase-negative staphylococci using endocarditis. J. Med. Micrbiol., ٣٢: ١١٥-١٢٢.

Fass, R.J.; Helsel, V.L.; Barnishan, J. & Ayers, L.W.(١٩٨٦).*In-vitro* susceptilities of four species of coagulase-negative staphylococci. Antimicrobial Agents and Chemother., ٣٠: ٥٤٥-٥٥٢.

Fluit, A.C.; Visser, M.R. & Franz, J. (٢٠٠١). Molecular detection of antimicrbiol resistance. Clin. Micrbiol. Rev., ١٤: ٨٣٦-٨٧١.

Forbes, B.A. & Schaberg, D.R. (١٩٨٣). Transfers of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* & *S. aureus* evidence for conjugative exchange of resistance. J. Bacteriol., ١٥٣: ٦٢٧-٦٣٤.

Forbes, K.J., Bruce, K.D.; Jordens, J.Z. & Pennington, T.H. (١٩٩١). Rapid methods in bacterial DNA fingerprinting. J. Gen. Microbiol. ١٣١½:٢٠٥١-٢٠٥٨ .

Foster, M.K .(١٩٩٤). Coagulase-negative staphylococci.clinical manifestation. Antimicrobial Agents and Chemother., ١:٣٠٩-٣٢٠.

Foster, T.J. & Devitt, M.C. (١٩٩٨). Infections associated with indwelling medical devices . ASFM .D.C. ٥٥:١٣٨-١٥٢ .

Franklin, D.L. (٢٠٠٣). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus* . J. Clin.Invest. ١١١:١٢٦٥-٧٣.

Frebourg, N.B.; Lefebrres, N. & Baert, S. (٢٠٠٠). Perbased assay for discrimination between invasive and contaminating Staphylococcus epidermidis strains. J. Clin. Microbiol., ٣٨:٨٧٧- ٨٨٠.

Garrett, D.O.; Jochimsen, E.; Murfitt, K. & Jarvis, W.R.(١٩٩٩) .The emergence of decreased susceptibility to vancomycin in Staphylococcus. spp. Infect. Cont. &Hosp. Epidemiol .٢٠:١٦٧-١٧٠ .

George, W.; & Paul, D.H. (١٩٩٧). Susceptibility of three groups of *Staphylococcus aureus* to newer antimicrobial agents. ASFM. ١١(١):٧-١٢.

Gerard, L.; Alain, Q. & Jerome, F. (١٩٩٩). Distribution of gene Encoding resistance to macrolides, lincossamides, and Strepto graminis among staphylococci.ASFM.,٤٣:١٠٦٢-١٠٦٦.

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

Gillespie, M.T; May, J.W. & Skurray, R.A. .(١٩٨٦).Detection of an itegrated tetracycline-resistance plasmid in the chromosome of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* .J.Gen .Microbiol . ١٣٢:١٧٢٣-١٧٢٨ .

Giusti, D.M.; Pacifico, L.; Tufi, D.; Panero, A. & Chisa, C. (١٩٩٩). Phenotypic detection of nasocomial mecA-positive coagulase-negative staphylococci from neonants. J. Antimicrob. Chemother., ٤٤: ٣٥١-٣٥٨.

Goering ,R.V.& Duensing ,T.D. (١٩٩٠). Rapid field inversion gel electrophresis in combination with an rRNA gene probe in staphylococci .J.Clin .Microbiol . ٢٨:٤٢٦-٤٢٩ .

Golledge, C. & Gordon, A. (١٩٨٩). Slide coagulase-positive tube coagulase-negative *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Path., ٤٢: ٤٣٣-٤٣٥.

Grek, C.; Kroft, A.; Sussmuth, R. & Gotz, F. (١٩٩٨).Characterization of the N-acetylglucosamin-yltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intracellular adhesion. J.Biol.Chem., ٢٧٣:١٨٥٨٦-١٨٥٩٣.

Groves, D.J. (١٩٧٩). Interspecific relationships of antibiotic resistant in staphylococci isolation and comparison of plasmid determining tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* and S. *epidermidis* .Can. J. Microbiol. ٢٥:١٤٦٨-١٤٧٥.

Hartman, B.J. & Tomaza, A. (١٩٨٤). Low affinity penicillin binding protein associated with β-lactamase resistance in *Staphylococcus aureus.* J. Bacteriol., ١٥٨: ٥١٣-٥١٦.

Hebret, G.A.; Crowder, C.G.; Hncock,G.A.; Javvis, W.R. & Thornbery, C. (١٩٨٨). Characterization of coagulase-negative staphylococci that help differentiate the species and other member of the family micrococcuce.J.Clin.Microbiol.,٢٦:١٢٦-١٢٨.

Hedin, G. (١٩٩٣). *Staphylococcus epidermidis* hospital epidemiology and the detection of methicillin resistance. scand J. Iifect. Dis. suppl. ٩٠:١-٥٩ .

Heilman, C. & Peters, G. (٢٠٠٠). Biology and pathogenicity of S*taphylococcus epidermidis*. DC: American society for microbiology. ٤:٤٤٢-٤٤٩.

Heilmann, C.; Hussain, M. & Peters, G. (١٩٩٧). Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to polystyrene surface. Mol. Micrbiol., ٢٤: ١٠١٣-١٠٢٤.

Herwaldt, L.A.; Hollis, R.J.; Boykin, L.D. & Pfaller, M.A. (١٩٩٢). Molecular epidermiology of Coagulase-negative staphylococci isolated from immunocompromised patients. Infect. Control & Hosp. Epidemiol., ١٣: ٨٦-٩٢.

Hirmatsu, K. C . (١٩٩٧). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduce vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother., ٤٠:١٣٥-١٣٦.

Holger, R.; Mathios, K. & Dietrich, M. (٢٠٠٤). Detection of virulence-associated genes not useful for discrimination between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit . J. Clin. Micro. ٤٢:٥٦١٤-٥٦١٩.

Holt, J.G. ; Kreig, N.R. ; Sneath, P.H.A. ; Staly, J.T. & Williams, S.T. (١٩٩٤). Bergys manual of determinative bacteriology .^{9th} ed. Williams and Wilkins co. Baltimore ,London.

Huebner, J. & Goldman, DA. (١٩٩٩) .Coagulase-negativ staphylococci. Role as pathogens. Annu Revwed. ٥٠:٢٢٣-٢٣٦.

Iordanescu, A.; Surdeanu, M.; Latta, P.D. & Novick, R. (١٩٧٨). Incompatibility and molecular relationships between small staphylococcal plasmids carring the same resistance markers. Plasmid., ١: ٤٦٨-٤٧٩.

Ieven, M.; Verhoeven, J.; Patlyn, S.R.; & Goossens, H.(١٩٩٥). Arapid and commercial method for the species identification of clinically significant coagulas-negative staphylococci. J. Clin. microbial. ٣٣:١٠٦٠-١٠٦٣.

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

Jacques,O.; Anne M. & Nevin, E. (٢٠٠٠). Phenotypic and molecular typing of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain susceptible to gentamicin isolated in France from ١٩٩٥ to ١٩٩٧. ASFM. ٣٨:١٨٥-١٩٠.

Jaffe, H.W.; Sweeney, H.M.; Welstein, R.A.; Kabins, S.A.; Nathan, C. & Cohen, S. (١٩٨٢). Structural and phenotypic varieties of Gentamycin resistance plasmid in hospital strain of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother., ٢١: ٧٧٣-٧٧٩.

KayserF. H; Berger, B. & Beck, W.D. .(١٩٨٦).Genetic of multiply-resistant *Staphylococcus aureus* .J. Hosp. Infect. ٧(suppl. A): ١٩-٢٧ .

Khan, S.A. & Novick, R.P. (١٩٨٠). Terminal nucleotide sequences of Tn٥٥١, a transposon specifying erythromycin resistance in staphylococci. Plasmid. ٤:١٤٨-١٥٤.

Kloos, W.E. & Wolf, J.F. (١٩٨٢). Identification of *Staphylococcus* species with Apistaph-identsyst J. Clin. Microbiol., ١٦:٥٠٩-٥١٦.

Kloos, W.E. & Schleifer, K.H. (١٩٧٥). Simplified scheme for routine identification of human *staphylococcus* species. J. Clin. microbiol. ١:٨٢-٨٨.

Kloos, W.E. & Bannerman, T.L. (١٩٩٤). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci clin.microbiol. ١:١١٧-١٤٠.

Lacy ,R.W. (١٩٧٥).Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and there clinical importance .Bacteriol .Rev . ٣٩:١-٣٢ .

Lambert ,O.; Michea, M. ; Koler ,T. & Pechere, J.(٢٠٠١). Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and seprofloxacin in gram-positive cocci .Antimicrob .agent. chemotherp. ٤٤:٥٧١-٥٧٦ .

Larry, S. & Wendy, C. (١٩٩٧). Molecular Genetics of Bacteria. Department of Microbiology, Michigan State University.

Leclaporn, A.; Paulsen, I.T.; Iennet, J.M.; LittliJohn, T.G. & Skurray, R.A. (١٩٩٤). Multidrug resistance to to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. J. Med. Micrbiol., ٤٠: ٢١٤-٢٢٠.

Lyon, B.R. & Skurray, R.A. (١٩٨٧). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis. Micrbiol. Rev., ٥١: ٨٨-١٣٤.

Lyon, B.R.; May, J.W. & Skurray, R.A. (١٩٨٤). Gentamycin & kanamycin resistance transposons in *Staphylococcus aureus*. Mol. Gen., ١٩٣: ٥٥٤-٥٥٦.

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

Males, B.M.; Rogers, W.A. & Parisi, J.T. (١٩٧٥). Virulence factors of biotypes of *Staphylococcus epidermidis* from clinical surces. J. Clin. Micrbiol., ١: ٢٥٦-٢٦١.

Maria, D.L. ; Sinzato, Y.K. ; & Silveria, L.A. (٢٠٠٤) .Comparison of methods for identification coagulase negative staphylococci . ٩٩(٨) :٨٥٥-٨٦٠ .

Maria, M.; Couto, I., & Sandrof. F. (٢٠٠٢) .Molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* clones .ASFM .clin.microbiol. ٤٠ : ٤٣٠-٤٣٨ .

Mary, E.K. (١٩٩٨). Pulsed-Field Gel Electrophoresis .Molecular Bacteriology .Central public health laboratory ,London,UK. ٣:٣٣-٥٠ .

Mattews, P.R . & Stewart, P.R. (١٩٨٤) .Resistance heterogeneity in methicillin–resistance *Staphylococcus aureus*. FEMS. Microbiol. lett . ٢٢:١٦١ -١٦٦ .

Mcdonell, G. & Russel, A. (١٩٩٩). Antiseptic and disinfectants activity. Action and resistance. Clin. Micrbiol. Rev., ١٢: ١٤٧-١٧٦.

Meacock, P.A. & Cohen, S.N. (١٩٨٠). Partitioning of bacterial plasmid during cell division . Cell.J. ٢٠:٥٢٩-٥٤٢.

Michael, A.; pfaller, A.M. & Loreen, A. H. (١٩٨٨). Laboratory, clinical, and Epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. ASFM. ١:٢٨١-٢٩٩.

Michio, M.; Min, D.; Fumitoshi, M. & Masatoshi, K. (١٩٨٦). Molecular cloning of the gene of penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to β-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus* .ASFM. ١٦٧:٩٧٥-٩٨٠.

Mickelsen, P.A.; Plorde, J.J.; Gordon, K.P. & TompKins, L.S. (١٩٨٥). Instability of antibiotic resistance in strain of *Staphylococcus epidermidis* isolated from outbreak of prosthetic valve endocarditis . J. Infect. Dis. ١٥٢:٥٠-٥٨ .

Mims,C.; Dockrell, H.M.; Goering, R.V.& Zuckerman ,M .(٢٠٠٤). Medical Microbiology ٣rd ed .Mosby of Elsevier Limited .

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

Modun, B.; Evans, R. & Williams,P.(١٩٩٨). Receptor-mediated recognition and uptake of Iron from Human transferring by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis.* ASFM ٦٦: ٣٥٩١-٣٥٩٦.

National Committee for Clinical Laboratory Standard.(١٩٩٧). Performance standards for antimicrobial Disc susceptibility tests-supplemental tables M١٠٠-٥٩-NCCLS,Wayne.

National Nosocomial infections surveitlance (NNIS) system report. summary١٩٩٠-١٩٩٩. ٢٧(٦):٥٢٠-٥٣٢.

Nesin, M.; Projan, S.J.; Bolt, Y. & Novick, R.P. (١٩٩٥).Molecular epidemiology of Staphylococcus epidermidis blood isolates from neonantal intensive care unit patients. J. Hosp. Infect. ٣١:١١١-١٢١.

Novick, R,; Ross, F. H.; Projan, S. J. & Moghazeh, S. (١٩٩٢). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory) RNA molecule. EMBO. J. ١٢: ٣٩٦٧-٣٩٧٥.

Novick, R.;Projan,S.J.;Ross,F.H.;Kreiswirth ,B.& Vanenesch,F.(١٩٩٣) .The *agr*P٢ operon on autocatalytic sensory transduction in *Staphylococcus aureus* .Mol.Gen . ٢٤٨:٤٤٦-٤٥٨.

Ommran, R. (٢٠٠٥). Detection of ampicillin transposon in *Klebcialla pneumonia*. Babylon. Clin. Microbiol. ٤: ٥٦١-٥٦٦.

Oscar, C. ; Emilia, C.; & Juses, G. (٢٠٠٤). Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp*. in spain: Five nationwide prevalence studies,١٩٨٦ to ٢٠٠٢.American Society for Microbiology. ٤٨:٤٢٤٠-٤٢٤٥.

Parisi, J.T. & Hechet, D.W. (١٩٨٠). Plasmid profile in epidemiologia studies of infectious by *Staphylococcus epidermidis*. J. Infect. Dis., ١٤١: ٦٣٧-٦٤٣.

Patel, R.; Piper, K.E. & Rouse, M.S. (٢٠٠٠). Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunesis* among staphylococcal isolates causing endocarditic. J. Clin. Micrbiol., ٣٨: ٤٢٦٢-٤٢٦٣.

Pattee, P.A.; Jones, J.M. & Yost, S.C. (١٩٨٤). Chromosome map of *Staphylococcus aureus* .J. Bacteriol. ٣:١٢٦-١٣٠

Pelczar , M.J; Chan ,E.C.S. & Krieg ,N.R. (١٩٨٦) .Microbiology , ٥ th ed. McGraw –Hill Book .Co. New york.

Peters, G.; Voneiff, C. & Hermann, M. (١٩٩٥). The changing pattern of Coagulase-negative staphylococci as infectious pathogens. Curr. Opi. Infect. Dis., ٨: ١٢-١٩.

Pfaller, M.A. & Herwaldt, L.A. (١٩٨٨). Laboratory, clinical & epidemiological aspects of a coagulase-negative staphylococci. Clin. Microbiol Rev., ١: ٢٨١-٢٩٩.

Pinho, M.G.; Filip, S.R. ; Delencastre, H. & Tomasz, A. (٢٠٠١). Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin binding protein ٢ (PBP٢) by the drug resistance protein PBP٢A in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., ١٨٣: ٦٥٢٥-٦٥٣١.

Pospiech, A. & Neuman, A. (١٩٩٥). Preparation and analysis of genomic and plasmid DNA. In "Genomic DNA isolation, T. Kieser eds." Johninnes Center, Norwich NR٤٧ UH, U.K.

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

Reinhold , B. & Hans, M.(١٩٨٥).Regulation of the inducible chloramphenicol acetyltransferase gene of the *Staphylococcus aureus* plasmid pob١١٢. E.J. ٤:٢٢٩٥-٢٣٠٠.

Rodden, D.L. & Miller, J.M. (٢٠٠٢).Four-year prospective study of staph-ident system and conventional method for reference identification of *Staphylococcus*, *Stomatococcus*. J. Clin. Microbial., ٣٣:٩٦-٩٨.

Rouche, D.A.; Cram, D.S.; Dibernadino, D.; T.G., &, Skurray, R.A. (١٩٩٠). Efflux-mediated antiseptic gene *qac*A from *Staphylococcus aureus* common ancestry with tetracycline and sugar transport protein. Mol. Microbial., ٤: ٢٠٥١-٢٠٦٢.

Ruppy, M.E. & Archer, G.L. (١٩٩٤). Coagulase-negative staphylococci: Pthogens associated with medical progress. Clin. Infect. Dis., ١٩:٢٣١-٢٤٥.

Russel ,A.D. (١٩٨٥). The role of plasmids in bacterial resistance to antiseptics ,disinfectants and preservatives.J.Hosp .Infect . ٦: ٩-١٩ .

Russel ,A .D . (١٩٩٩) .Plasmids and bacterial resistance to biocides . J .Appl .Microbiol .٨٢: ١٥٥-١٦٥ .

Ryffel, C.; Kayser, F.H. & Perger, B. (١٩٩٢). Correlation between regulation of mecA transcription and expression of Methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob. Agent Chemother., ٣٦:٢٥-٣١.

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

Sambrook, J.; Friegan, E. & Miniatis, T. (١٩٨٩). Molecular cloning a laboratory manual cold spring Harbour Laboratory.NewYork.

Sidhu, M.S.; Heir, E.; Sorum, H. & Holk, A. (٢٠٠١). Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and β-

Lactam antibiotics in food related *Staphylococcus spp*. Microb.

Drug Resist., ½: ٣٦٣-٣٧١.

Sieradzki ,K.;Villar ,P .&Tomasa ,A . (١٩٩٨) .Decreased susceptipilities to tiecoplanin and vancomycin among coagulase-negative methecillin resistant clinical isolates of staphylococci . Antimicrob .Agent Chemother . ٤٢:١٠٠-١٠٧.

Smyth, E.G.; Wright, E.D. & Marples, R.R. (١٩٨٨). New type of staphylococcal endocarditis. J. Clin. Path., ٤١: ٨٠٩-٨١٠.

Snyder, M.J. & Chambness, L.M. (١٩٩٨) .Transposable elements of gentamicin in staphylococci .ASFM . ١٩: ٢٣٣-٢٣٨

Sonstein, S.A. & Baldwin, J.N. (١٩٧٢). Loss of the pencillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium dodecylesulfate. J. Bacteriol., ١٠٩: ٢٦٢-٢٦٥.

Struelens, M.J.; Deplano, A; & Serruys ,E.(١٩٩٢) .Epidemiological typing and delineation of genetic relatedness of methicillin –resistant Staphylococcus aureus .J.Clin .Microbiol . ٣٠:٢٥٩٩-٢٦٠٢ .

Suzuki, E.; Hiramatsu, K. & Yokota, T. (١٩٩٢). Survey of methicillin–resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mec* A gene disterbution. Antimicrob. Agents Chemother, ٣٦: ٤٢٩-٤٣٤.

Suzuki, E.; Kuahara-Arai, K.; Chardson, J.F.R. & Hiromatsu, K. (١٩٩٣). Distributionof *mec*Agene regulater in methicillin -resistant *Staphylococcus* clinical strains. Antimicrob. Agents Chemother., ٣١:١٢١٩-١٢٢٦.

Tait ,R .C . (١٩٩٧) .An introduction to molecular biology .Horizon scientific Press .

Tenover, F.C.; Arbiet, B. & Archer, G.B. (١٩٩٤). Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., ٣٢: ٤٠٧-٤١٥.

Tenover, F.C.; Lancaster, M.V.; Hill, B.C.; Steward, C.D.; Stocker, S.A. & Hancock,G. (١٩٩٨). Characterization of staphylococci with reduce susce ptilities to vancomycin and other glycopeptides. J. Clin. Microbiol. ٣٦:١٩١٩-٢٤.

Terugoito, Y. (٢٠٠١).Structural comparison of three types of *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*.integrated in the chromosome in methicillin-resistant *S. aureus* .American Society for Microbiology, ٤٥:١٣٢٣-١٣٣٦.

Tomoeda, M.; Inazuka, M.; Anto, S. & Konishi, M. (١٩٧٤). Curing action of sodium dodecyle sulfate. J. Bacteriol., ١٢٠(٣):١١٥٨-١١٦٣.

Townsend , D.E .; Down, N.A. & Grubb, W.B. (١٩٨٤). Transposition of gentamicin resistance to staphylococcal plasmids encoding resistance to cataionic agents .J .Antimicrob .Chemother . ١٤:١١٥-١٢٤ .

Trevors, J.T. (١٩٨٦). Plasmid curing in bacteria. FEMS Microbiol. Rev., ٣٢: ١٤٩-١٥٧.

Trilla, A.; Nettleman, M.D.; Hollis, R.J.; Wenzel, R.P. & Pfaller, A. (١٩٩٣). Restriction endonuclease analysis of plasmid DNA from methivillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect. Control Hosp. Epidemio., ١٤: ٢٩-٣٥.

Unal,S.; Hoskins, J.; & Skatrud , P.L. (١٩٩٢). Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction . J. Clin. Microbial. ٣٠: ١٦٨٥-١٦٩١.

Valentine , C.R.; Yandle, S.H.; Marsik, F.J. & Dowson, M.S. (١٩٨٨). Evalution of the variety plasmid profiles in *Staphylococcus epidermidis* isolated from hospital patients and staff .infect. control. Hosp. Epidemiol. ٩: ٤٤١-٤٤٦ .

Vandenesch, F.; Lebeau, C. & Bes, M. (١٩٩٤). Coagulase deficiency in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* involve transcription R post-transcriptional defect. J. Med. Microbiol., ٤٠: ٣٤٤-٣٤٩.

Vaudaux ,P .E . ;Lew ,D .P . &Wald vogel ,F .A . (١٩٩٤) .Infections associated with indwelling medical devices .٢nd ed .ASM .Washington ,D .C .

Voneiff, C.; Heilmann, C. & Peters, G. (١٩٩٩). New aspects in the molecular basis of polymer-associated infections due to staphylococci. Eur. J. Clin. Micrbiol. Infect. Dis., ١٨: ٨٤٣-٦.

Walsh, T.R. & Howe, R.A. (٢٠٠٢). The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* .Annu. Rev. Microbial. ٥٦:٦٥٧-٦٧٥.

Wesley, A.V. (١٩٩٨). Basic microbiology ٧th edition. School of medicin Uni. Of Virginia .

WHO. (٢٠٠٠). Drug. Information for skin infections. Geneva.

Woo, P.C.Y.; Leung, A.S.P. & Yuen, K.Y.(٢٠٠١) .Identification of slide coagulase-positive,tube coagulase- negative *Staphylococcus aureus* by ١٦S ribosomal RNA gene sequencing. J. Clin Pathol . ٥٤:٢٤٤-٢٤٧ .

Zhang, Y.Q.; Ren, S.; Wang, W. & Wen, Y.(١٩٩٣).Genome-based analysis of virulence genes in non biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC١٢٢٢٨). Mol. Microbiol. ٤٩:١٥٧٧-١٥٩٣.

٤- النتائج والمناقشة Results & Discussion

٤-١: جمع العينات Sample collections

جمعت العينات من مرضى يعانون من اصابات مختلفة في الجسم وكما هو مبين في الجدول ٤-١، توزعت العينات على كلا الجنسين من المرضى الراقدين و المراجعين لمستشفى الحلة التعليمي العام وباعمار مختلفة كما مبين في الجدول ٤- ٢.

ان جمع العينات وتوزيعها بهذا الشكل يوضح المدى الامراضي للمكورات العنقودية ودورها في الاخماج المكتسبة من المستشفيات، كما ساهمت خطوة جمع عينات المسح العام للكادر الطبي والفني في المستشفى في عزل وتشخيص المكورات العنقودية ذات المقاومة العالية والمتعددة للمضادات الحيوية والتي تساهم الكوادر الطبية والفنية باستيطانها وانتقالها داخل المستشفى . ومن خلال هذا التوزيع يمكن تحديد الاختلاف في نسب الاصابة بالعنقوديات السالبة للأنزيم المختر لبلازما الدم بين الجنسين ، والاختلاف في نسب الاصابة بين المرضى الراقدين والمراجعين وهذا ما أشار اليه كل من Pfaller & Herwaldt(١٩٨٨).

٤-٢: العزل والتشخيص

عزلت ١٣١ عزلة عائدة لبكتريا العنقوديات من مجموع ٢٤٠ عينة سريرية اذ شكلت نسبة ٥٤% كما عزلت ١٠١ عزلة من بكتريا العنقوديات من مجموع ١٢٠ عينة مسح عام للكوادر الطبية والفنية اذ شكلت نسبة ٨٤%. كانت نسبة العنقوديات السالبة للانزيم المختر لبلازما الدم في العزل السريري ٥٩% وفي المسح العام ٨٦% وكما هو مبين في الجدول ٤-١.

جدول ٤-١ . مصادر واعداد العينات وانماط العنقوديات المعزولة منها .

مصدر العينة	عدد العينات	عدد العينات الموجبة للعنقوديات	العزلات السالبة للإنزيم المختر لبلازما الدم
الجهاز التنفسي	٥٠	٢٤	١٤

الجهاز البولي	٦٠	٢٢	١٦
المهبل	١٠	٤	٣
الجروح	١٥	١٠	٦
الحروق	١٠	٨	٤
الدم	٢٠	٤	٢
انابيب القثطرة	٢٠	١٢	٨
حب الشباب	٢٥	٢٤	١٥
الدنابل	١٠	٨	٥
التهاب الثدي	٢٠	١٥	٥
المجموع	٢٤٠	١٣١	٧٨
المسح العام للعاملين	١٢٠	١٠١	٨٧
المجموع العام	٣٦٠	٢٣٢	١٦٥

يظهر الجدول ٤-٢ ارتفاعاً في نسب المكورات العنقودية السالبة للانزيم المختثر لبلازما الدم عند المرضى الراقدين اذ بلغت ٤٠ عزلة بينما كانت ٣٨ عزلة عند المرضى المراجعين(كانت ٢٠عزلة منها عائدة لحالات حب الشباب والدنابل) وهذه النتائج تتفق مع العديد من الدراسات في هذا المجال فالمرضى الراقدين وخاصة المصابين بالامراض المزمنة يكونون عرضة للاصابة بالعنقوديات اكثر من غيرهم لما يمر به جسم المريض من حالات الضعف المناعي في اثناء فترة الرقود وكون العنقوديات من الجراثيم الانتهازية التي تستغل هذه الظروف لاحداث الاصابة. كما ان استخدام انابيب القثطرة البلاستيكية ساهم في رفع نسب الاصابة بالعنقوديات السالبة للانزيم المختثر لبلازما الدم حيث تساعدها على الألتصاق والأستيطان (Voneiff *et al.*, ١٩٩٩,Maria *et al.*,٢٠٠٤).

جدول ٤-٢ . توزيع العزلات السريرية السالبة للانزيم المختثر لبلازما الدم حسب مصدر العينات .

مصدر العينة	عدد العينات	عدد العزلات السالبة للأنزيم المختثر لبلازما الدم	مصدر العزلات					
			راقد			مراجع		
			ذكور	اناث	اطفال	ذكور	اناث	اطفال
الجهاز التنفسي	٥٠	١٤	٢	٢	٣	١	٣	٣
الجهاز البولي	٦٠	١٦	١	٨	٢	١	٤	٠
المهبل	١٠	٣	٠	٣	٠	٠	٠	٠
الجروح	١٥	٦	٢	١	٠	٣	٠	٠
الحروق	١٠	٤	٤	٠	٠	٠	٠	٠
الدم	٢٠	٢	٠	٠	٢	٠	٠	٠
أنابيب القثطرة	٢٠	٨	٢	٤	٢	٠	٠	٠

حب الشباب	٢٥	١٥	٠	٠	٠	٣	١٢	٠
الدنابل	١٠	٥	٠	٠	٠	٣	٢	٠
الثدي	٢٠	٥	٠	٢	٠	٠	٣	٠
المجموع	٢٤٠	٧٨	١١	٢٠	٩	١١	٢٤	٣

كما يظهر جدول ٤-٣ ارتفاعاً في عدد العزلات العائدة لبكتريا *S. epidermidis* في عينات الجهاز التنفسي، الجروح، انابيب القثطرة، حب الشباب والمسح العام اذ بلغت ١٣٧ عزلة في حين كانت ٦٧ عزلة عائدة لبكتريا *S. aureus* الموجبة للانزيم المخثر لبلازما الدم.

جدول ٤-٣ .اعداد ونسب انواع المكورات العنقودية المعزولة .

مصدر العينة	نوع العينة	عدد العينات	Coagulase positive *S.aureus*		Coagulase negative *S.aureus*	*S. epidermidis*		*S. saprophyticus*	
الجهاز التنفسي	قشع	٥٠	١٤		-	١٠		-	
الجهاز البولي	ادرار	٦٠	٦		٢	٥		٩	
المهبل	مسحات	١٠	١		-	١		٢	
الجروح	مسحات	١٥	٦		-	٨		-	
الحروق	مسحات	١٠	٢		-	٢		-	
الدم	دم	٢٠	٢		-	٢		-	
أنابيب القثطرة	مسحات	٢٠	٤		-	٧		١	
حب الشباب	مسحات	٢٥	٣		-	١٧		-	
الدنابل	مسحات	١٠	٧		-	٥		-	
الثدي	حليب	٢٠	١٠		-	٥		-	
المسح العام	مسحات	١٢٠	١٢		-	٧٣		١٤	
المجموع	%	٣٦٠	٦٧	%١٨	٢	١٣٧	%٣٨	٢٦	%٧

حازت العنقوديات السالبة للانزيم المختر لبلازما الدم على اهتمام الباحثين في حقلي الاحياء المجهرية والطب كونها تمثل المسببات الرئيسية لخمج المستشفيات (Christensen *et al.*,١٩٨٧) ويمكن القول ان جميع الدراسات التي انجزت في هذا المجال اظهرت ارتفاعاً في نسب هذه العنقوديات عن انواع البكتريا الاخرى ، فقد وصلت نسبة العنقوديات السالبة لأنزيم مختر البلازما في بعض الدراسات الى ٩٥% وهذا يقدم دليلاً على هيمنة هذه الانواع على اجواء المستشفيات وما تسببه من مشاكل صحية للمرضى الراقدين، اذ أشار كل من Arian و Marcus Kloos (١٩٩٤) , و Bannerman (١٩٩٨)، Heilmann و (٢٠٠٠) Peters و National Nosocomial Infections Surveilance (١٩٩٩) الى سيادة بكتريا *S.epidermidis* كمسبب مرضي في الاخماج المكتسبة من المستشفيات.كما أشار كل من Archer و Ruppy (١٩٩٤) وHeilmann وجماعته (١٩٩٧) ان ارتفاع نسب العنقوديات السالبة للانزيم المختر لبلازما الدم في العزل السريري والمسحي للمستشفيات بصورة عامة ناتج عن عدة عوامل منها:-

مقاومة العنقوديات للعديد من المضادات الحيوية والمطهرات الشائعة الاستعمال وكون العنقوديات تمثل النبيت الطبيعي للجلد والاغشية المخاطية للانسان فضلا عن استخدام بعض العدد الطبية كانابيب القثطرة والتصريف البلاستيكية لمدد زمنية قد تزيد عن ثلاثة أيام أو أكثر.

وفي دراسة لـ Maria وجماعتها (٢٠٠٢) أشير الى ارتفاع نسب العنقوديات السالبة للانزيم المختر لبلازما الدم في دراسة مسحية لثلاث دول هي الدنمارك، اليونان والمكسيك اذ وصلت ٧٨% وسجلت ارتفاعاً في عدد السلالات المقاومة لمضاد المثيسيلي (Methicillin-Resistant *S.epidermidis*) وهي سلالات اخطر من غيرها من ناحية الامراضية وذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية (Males *et al.*, ١٩٧٥). كما اشار كل من Miller Rhoden (٢٠٠٢) في دراسة على العنقوديات في الولايات المتحدة الأمريكية للمدة من ١٩٩٥-١٩٩٨ والتي تضمنت ١١٠٦ عينة ان نسبة بكتريا *S.epidermidis* كانت ٩٧% من العنقوديات المعزولة.

واشار Christof وجماعته (٢٠٠١) في دراسة مسحية للاخماج المكتسبة من المستشفيات امتدت لعشر سنوات (١٩٩٠-١٩٩٩) الى ارتفاع نسب العنقوديات السالبة للانزيم المختر لبلازما الدم عند مرضى المستشفيات وبصورة خاصة مرضى العناية المركزة ومرضى انابيب القثطرة ، واشار الى ارتفاع نسبة بكتريا *S.epidermidis* (٣٧.٣%) وانخفاض نسبة بكتريا *S. aureus* (١٢.٦ %) في اخماج مجرى الدم (Blood-stream infections).

تم تشخيص العزلات قيد الدراسة اعتماداً على الفحوصات المظهرية والكيموحيوية كما مبين في جدول٤-٤ وحسب ما جاء فيBergys (١٩٩٤) وجموMacfaddin (٢٠٠٠) .

اظهرت نتائج الفحص المجهري لمسحة رقيقة من مستعمرات العنقوديات بعد صبغها بصبغة غرام بأن العنقوديات هي مكورات موجبة لصبغة كرام تنتظم بشكل ازواج او رباعيات وغالباً بشكل عناقيد ونادراً ما تتخذ سلاسل قصيرة ، غير مكونة للابواغ وغالباً غير مكونة للمحفظة (Foster *et al.*, ١٩٩٤). كما اظهرت نتائج الفحص الزرعي بأن نمو بكتريا المكورات العنقودية على وسط الاكار المغذي كان بشكل مستعمرات دائرية لماعة منتجة للصبغات بعضها بيضاء او صفراء او ذهبية، وعند

نموها على وسط اكار الدم كانت المستعمرات بيضاء الى رمادية دائرية محدبة قليلاً، بعضها يحلل كريات الدم الحمراء تحللاً كاملاً(β-haemolysis) والبعض الاخر غير محلله كما موضح في الجدول ٤-٤ .

اما نتائج الفحوصات الكيموحيوية فقد اثبتت بأن جميع العزلات منتجة لانزيم الكاتاليز وغير منتجة لانزيم الاوكسديز كما موضح في الجدول ٤-٤ .

وتباينت العزلات في قدرتها على تخمير سكر المانيتول فالعزلات العائدة لبكتريا *S.aureus* الموجبة للانزيم المخثر لبلازما الدم خمرت المانيتول في ١٨ ساعة في حين ان عزلات هذه البكتريا السالبة للانزيم المخثر خمرته في ٣٦ ساعة بينما لم تتمكن العزلات الاخرى السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم من تخمير المانيتول،تتفق هذه النتائج مع نتائج و Vandenesch وجماعته (١٩٩٤) و Christensenوجماعته (١٩٨٣) .

جدول ٤-٤ . الاختبارات الكيموحيوية لعزلات العنقوديات .

الاختبارات	Coagulase positive *S.aureus*	Coagulase negative *S.aureus*	*S. epidermidis*	*S. saprophyticus*
أنتاج الصبغات	صفراء ذهبية	صفراء ذهبية	بيضاء	صفراء شاحبة
الحركة	-	-	-	-
النمو لاهوائياً	+	+	+	+
الكاتاليز	+	+	+	+
الاوكسديز	-	-	-	-

عامل التكتل	+	+	-	-
الأنزيم المخثر لبلازما الدم	+	-	-	-
تخمر الكلوكوز	+	+	+	+
تخمر المانيتول	+	+	-	-
تخمر اللاكتوز	+	+	+	+
اختزال النترات	+	+	+	+
تحلل الدم	β	β	ℓ	ℓ
مقاومة نوفوبايوسين	-	-	-	+

الرموز:- **+ النتيجة موجبة ، β تحلل كامل للدم**

- النتيجة سالبة ، ℓ غير محللة للدم

اظهرت نتائج فحصي الانزيم المخثر لبلازما الدم وعامل التكتل بأن جميع العزلات العائدة لبكتريا *S.aureus* لها القدرة على انتاج الانزيم المخثر وعامل التكتل عدا عزلتين غير قادرتين على انتاج الانزيم المخثر وقادرتين على انتاج عامل التكتل ، وتباينت قدرة العزلات المنتجة للانزيم المخثر من حيث الوقت فبعض العزلات اعطت نتائج موجبة في ٣ دقائق بينما اعطت عزلات اخرى تابعة لنفس النوع نتائج موجبة بعد ٤ ساعات، في حين اعطت جميع العزلات التابعة للانواع الاخرى نتائج سالبة وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره كل من Cheung وجماعته (١٩٩٢) و Christine وزملائها (١٩٩٤) .

استخدم فحصي تخمر سكري الكلوكوز واللاكتوز لتفريق العنقوديات عن جنس المكورات *Micrococcus* اذ اظهرت النتائج قدرة العنقوديات على تخمير السكرين مع انتاج غاز CO_2 خلال ٢٤ ساعة في حين اشير في Macfaddin (٢٠٠٠) الى ان بكتريا *Micrococcus* غير مخمرة لسكر الكلوكوز وان تخمرها لسكر اللاكتوز يكون متأخراً وخلال ٤٨-٧٢ ساعة . كما كانت العنقوديات موجبة لاختبار فحص النترات.

يعد تشخيص وتصنيف العنقوديات السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم مهما وخاصة في الدراسات المسحية والوبائية (Ieven *et al.*, ١٩٩٥) ، لذا وضعت عدة انظمة ساعدت في تشخيص العنقوديات اهمها نظام STAPH-IDENT System ونظام Vitek System وانظمة GPI و API ورغم ذلك فأن هذه الانظمة لم تكن دقيقة جدا (Maria *et al.*, ٢٠٠٤; Christensen *et al.*, ١٩٨٧). لذا اعتمدت التقنيات الوراثية في تشخيص وتصنيف هذه المجموعة من العنقوديات وبنسبة عالية من الحساسية والنوعية قد تصل الى ١٠٠% (Arian & Marcus, ١٩٩٨; Maria *et al.*, ٢٠٠٤).

ان الكلفة العالية وصعوبة توفير هذه الانظمة والتقنيات قللت من استخدامها خاصة في الدول الفقيرة ، لذا تستخدم الطرق التقليدية للتشخيص والتصنيف . وفي هذه الدراسة من المتوقع وجود انواع من العنقوديات السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم قد شخصت وصنفت ضمن النوع *S.epidermidis* وهذا يدعم تفسير ارتفاع نسبة هذا النوع عن الانواع الاخرى. وقد وفرت الطرق التقليدية للتشخيص امكانية تشخيص النوع *S.saprophyticus* من خلال فحص مقاومته لمضاد النوفوبايوسين على انه النوع الوحيد المقاوم لهذا المضاد.

اظهرت نتائج فحص الانزيم المخثر لبلازما الدم اختلافاً في وقت انتاج الانزيم واحداث الخثرة بالنسبة للعزلات الموجبة العائدة لبكتريا *S. aureus*، اما العزلات السالبة فتم تأكيد سلبيتها بتركها لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة الغرفة. لم يعط أي من الانواع السالبة فحصاً موجباً للانزيم في حين اعطت عزلتان فقط تابعة لبكتريا *S. aureus* نتيجة سالبة للانزيم وموجبة لفحص عامل التكتل. واعطت عزلتان من الانواع السالبة تابعة لبكتريا *S. saprophyticus* فحصاً موجباً لعامل التكتل، وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره كل من Foster & Devitt (١٩٩٨)، Maria وزملائها (٢٠٠٤) و Woo وزملاءه (٢٠٠١).

٤-٣: حساسية العزلات للمضادات الحيوية

Antibiotics susceptibility for isolates

تم اختيار اربعة عشر مضاداً حيوياً من المضادات الشائعة الاستخدام في المستشفيات، كما تم اختيار عدد من العزلات شملت جميع انواع العينات قيد الدراسة بواقع عشر عزلات عائدة لبكتريا *S. aureus* موجبة للانزيم المخثر لبلازما الدم وعزلتين من هذه البكتريا سالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم، واربع وعشرون عزلة عائدة لبكتريا *S.epidermidis* وست عشرة عزلة عائدة لبكتريا *S.saprophyticus* وكما هو مبين في الجداول (٤-٥) الى (٤-١٢) .

٤-٣-١: حساسية بكتريا *S. epidermidis* للمضادات الحيوية

اظهرت النتائج الموضحة في الجدولين ٤-٥ و٤-٦ تبايناً في انماط ونسب المقاومة فقد اظهرت بعض العزلات مقاومة لعشرة مضادات حيوية بضمنها مضاد المثيسلين فالسلالات المقاومة للمثيسلين تكون متعددة المقاومة وخاصة لمضادات β-lactam وMacroloides و Aminoglycoside كما اظهرت العزلات ٢,٢٢٢,٢٣٦ و٢٥٠ نمطا متشابها من المقاومة . (Mattews & Stewart .,١٩٨٤;Gerard *et al.*, ١٩٩٩; Oscar *et al.*, ٢٠٠٤)

A – البيتالاكتم β -Lactam

كانت ابرز صفات المقاومة في هذه المكورات العنقودية هي مقاومتها لمضادات البيتالاكتام بكافة انواعها التقليدية والواسعة الطيف (Extended Spectrum β-Lactams) فقد اشار Giusti وجماعته (١٩٩٩) و David & Christopher (١٩٩٨) الى ان المكورات العنقودية قادرة على انتاج عدة انواع من أنزيمات البيتالاكتاميز بأصنافها الثلاث المعروفة وهيTAM-١,TAM-٢,SHV١ اذ تعمل هذه الأنزيمات على كسر حلقة البيتالاكتم وابطال عمل المضاد الحيوي, فضلا عن ذلك فالمكورات العنقودية تمتلك آلية أخرى في مقاومة هذه المجموعة من المضادات الحيوية هى تحوير بروتينات الجدار المرتبطة بالبنسلين (Penicillin Binding Proteins)(Hartman&Tomaz,١٩٨٤;Dejong *et al.*,١٩٩٢) فتكون أقل ألفة للأرتباط بالمضاد الحيوي فقد اشار Archer & Pennel (١٩٩٠) ان الجينات المسؤولة

عن مقاومة مضادات البيتالاكتم وخاصة البنسيلينات قد تكون كروموسومية او بلازميدية. أظهرت النتائج في جدول ٤-٥ أن نسب المقاومة لمضاد البنسلين ج ١٠٠% في حين بلغت ٥٨، ٥،٧٥, ٨٤% لمضادات الاموكسلين والامبسلين والاوكساسيلين على التوالي والتي تعد من البنسلينات الواسعة الطيف، وبلغت ٦٢% لمضاد المثيسلين المقاوم للعديد من انزيمات البنسلينيز. ان ارتفاع نسب المقاومة لمضادات البيتالاكتام في هذه الدراسة يتفق مع العديد من الدراسات فقد اشار كل من Fass وجماعته (١٩٨٦)، Chambers (١٩٨٧)، Ryffel وجماعته (١٩٩٢) و Giusti وجماعته (١٩٩٩) الى ان مقاومة العنقوديات لهذه المجموعة من المضادات بلغت ١٠٠% مع التزايد المستمر في نسب السلالات المقاومة للمثيسلين الى اكثر من ٥٠% فقد اشار Oscar وجماعته (٢٠٠٤) الى ارتفاع نسب المقاومة للعديد من المضادات في دراسة مسحية في اسبانيا امتدت ستة عشر عاماً فكانت النسب تتزايد كل عام حتى بلغت ٧٥.٣ % في مقاومة مضاد الاوكساسيلين .

B- السيفالوسبورينات Cephalosporins

اظهرت النتائج في جدول ٤-٥ ان نسبة المقاومة لمضاد السيفوتاكسيم هي ٢١% ويعد هذا المضاد من الجيل الثالث من مركبات السيفالوسبورينات وهي مضادات اثبتت فعاليتها ضد العديد من انواع البكتريا المشاركة في عدوى المستشفيات (Lambert *et al.*,٢٠٠١)وقد استخدمت وما زالت بشكل كبير في مستشفى الحلة التعليمي ولفترة زمنية طويلة وربما يكون هذا هو السبب لارتفاع نسبة المقاومة لهذه المضادات، فقد اشارGusti وجماعته (١٩٩٩) الى ارتفاع نسب المقاومة للجيل الثالث من السيفالوسبورينات في العنقوديات الحاملة للجين *mecA* المسؤول عن انتاج انزيمات البنسيلينيز وان الاساس الوراثي لهذه المقاومة ناتج عن طفرات كروموسومية ثابتة وموروثة كما اشار Jacoby وArcher (١٩٩١) الى ظهور سلالات من المكورات العنقودية مقاومة لمضادات الجيل الثالث من السيفالوسبورينات . ان اليات المقاومة الكروموسومية المنشأ تحد كثيراً من استخدام المضادات الحيوية وخاصة السيفالوسبورينات وهذا يفسر انتاج عدة اجيال من هذه المضادات وصلت الى الجيل الرابع او الخامس (Terugoito,٢٠٠١;Dubin, *et al* ٢٠٠٥).

C- الامينوكلاكوسيدات Aminoglycosides

بلغت نسبة المقاومة للمضاد الحيوي الجنتامايسين ٥٠% والذي يعد من ابرز واكثر المضادات الأمينوكلايكوسيدية استخداما في المستشفيات ,فقد اشارGeorge و Paul (١٩٩٧) ومركز NNIS(١٩٩٩) الى ارتفاع نسبة المقاومة لهذا المضادالحيوي اذ بلغت ٦٠%.في حين اشار Oscar وجماعته (٢٠٠٤) ان نسبة المقاومة لمضاد الجنتامايسين في اسبانيا لم تتعدى ٢٧% .

ان مقاومة العنقوديات لمضادات الأمينوكلايكوسيدات ومنها الجنتامايسين تتم من خلال انتاجها للانزيمات الناقلة (Transferase) والتي تعمل على تحوير جزيئة المضاد وابطال مفعوله اذ اشار Fluit وجماعته (٢٠٠١) و Lyon وجماعته (١٩٨٤) ان المكورات العنقودية تمتلك ثلاثة أنواع من أنزيمات التحوير للأمينوكلاكوسيدات هي -N, Phosphotransferase

Adenyl transferase, acetyle transferase وان الجينات المشفرة لها هي بلازميدية غالبا .

كما اشار Jaffe وجماعته (١٩٨٢) ان جينات مقاومة مضاد الجنتامايسين محمولة على اكثر من نوع من البلازميدات مؤكداً بذلك تغاير المحتوى الجيني لبلازميدات العنقوديات. ان السبب الرئيسي لازدياد نسب المقاومة للمضادات بصورة عامة هو ظاهرة الضغط الانتخابي (Selective pressure) الناتجة عن الاستخدام الكبير والعشوائي للمضادات الحيوية فضلا عن قدرة الجينات الوراثية المسؤولة عن المقاومة على الانتقال من بكتريا الى اخرى بعدة اليات (Townsend *et al.*,١٩٨٤;Dennes & Marcus, ١٩٨٦).

D- الماكرولايدات و التتراسايكلينات Macrolides&Tetracyclines

اظهرت النتائج ان نسبة المقاومة لمضادي الارثرومايسين والتتراسايكلين هي ٦٥% و٨٥% على التوالي. وقد اشارت تقارير ودراسات عديدة لمنظمة الصحة العالمية (٢٠٠٠) ومركز NNIS (١٩٩٩) الى تراجع كبير في استخدام هذين المضادين اذ بلغت نسب مقاومة العنقوديات لهما من ٦٠-١٠٠% وكذا الحال لانواع بكتيرية عديدة موجبة وسالبة لصبغة غرام.

ان الجينات المسؤولة عن مقاومة هذين المضادين محمولة على بلازميدات اقترانية صغيرة الحجم تساهم في انتشار المقاومة لهذين المضادين الى الانواع البكتيرية الاخرى (Gerard *et al.*, ١٩٩٩; Oscar *et al.*, ٢٠٠٤; Chopra *et al.*, ١٩٧٤).

وقد اشار Frankin (٢٠٠٣) ان العديد من العنقوديات الموجبة والسالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم وخاصة السلالات المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية تحمل بلازميد كبير الحجم مسؤول عن مقاومة مضادات البيتالاكتام، الارثرومايسين والجنتامايسين .

وقد اظهرت النتائج ان بعض العزلات كانت حساسة للارثرومايسين اذ بلغ قطر منطقة التثبيط ٢٨ ملم. ان ظهور مثل هذه العزلات ربما يعود الى حدوث طفرة وراثية في جين الأرثرومايسين المحمول على البلازميد المسؤول عن مقاومته او انغراس جين اخر داخل جين الارثرومايسين ادى الى تعطيله (Archer *et al.*, ١٩٨٢).

E- الكلورامفينيكول Chloramphenicol

اظهرت النتائج ان نسبة المقاومة لمضاد الكلورامفينكول بلغت ١٠% و قد اشارت العديد من الدراسات الى ان نسبة مقاومة الكلورامفينكول لا تتعدى ٢٥% (Reinhold & Hans, ١٩٨٥; Modum *et al.*, ١٩٩٨).

ان الانخفاض في نسب المقاومة لهذا المضاد في تناقص مستمر وذلك يعود الى قلة استخدامه سواء في المستشفيات او خارجها الا في بعض حالات التايفوئيد لما لهذا المضاد من تأثيرات جانبية على نخاع العظم. ان مواقع جينات مقاومة الكلورامفينكول في العنقوديات هي بلازميدية اذ يحمل البلازميد pUB١١٢ جين *cat* المسؤول عن تخليق انزيم (Chloramphenicol Acetyl Transferase) و الذي يبطل تأثير المضاد (Reinhold & Hans, ١٩٨٥). ويعد هذا الجين من الجينات المستحثة (Inducible) لذا فأن عدم استخدام المضاد لفترة طويلة يساعد البكتريا على التخلص من البلازميد او استبدال جين الكلورامفينكول بجين جديد يساهم في مقاومة مضاد اخر تتعرض له البكتريا باستمرار وهذا الاستنتاج ناتج عن كون العزلات الحساسة للكلورامفينكول مقاومة لعدة مضادات حيوية اخرى.

F- الكلاكوببتيدات Glycopeptides

اظهرت النتائج ان نسبة المقاومة لمضاد الفانكومايسين هي صفر لجميع العزلات قيد الدراسة، وقد اشارت دراسات عديدة بأن للعنقوديات حساسية عالية لمضادات كلايكوببتايد وتضم نوعين رئيسيين هما الفانكومايسين وتايكوبلانين وقد استخدم الفانكومايسين في الحد من خطورة العنقوديات وخاصة في الاخماج المكتسبة من المستشفيات لسنوات طويلة في الولايات المتحدة والمملكة المتحدة وفي العديد من الدول الاخرى(Garrett *et al.*,١٩٩٩). ان الية فعل هذا المضاد هو تأثيره في بناء الجدار الخلوي اذ يرتبط بشدة مع D-alanine ويمنع تخليق متعدد الببتيد، ورغم ذلك ظهرت بعض العزلات المقاومة لهذا المضاد، وان الاساس الوراثي للمقاومة هو كرموسومي (Maria *et al.*, ٢٠٠٢; Sabath *et al.*, ١٩٧٦)، اذ يحدث تحوير في جزيئة متعدد الببتيد يمنع ارتباطها بالمضاد الحيوي (Franklin, ٢٠٠٣). كما أشار Oscar وجماعته (٢٠٠٤) الى ان مقاومة العنقوديات لهذا المضاد هي صفر بالرغم من كون العزلات قيد الدراسة مقاومة للمثيسيلين والريفامبسين والسبروفلوكساسين بنسب ٦١ ، ٦ ، ٤٤ % على التوالي. ان قلة استخدام هذا المضاد او عدم استخدامه على الاغلب لما له من تأثيرات جانبية على الكلى والكبد والاذن والاعصاب حالت دون ظهور العزلات المقاومة له ويبقى استخدام هذا المضاد في الحالات الخطيرة والمتسببة من العنقوديات والمسبحيات الموجبة لصبغة غرام (Dubin, *et al* ٢٠٠٥).

G-السلفونامايدات والترايميثوبريم Sulfonamides &Trimethoprim

بلغت نسبة المقاومة لمضاد التراي ميثوبريم ٥٠% وهو من المضادات الشائعة الاستخدام مع مركبات السلفانومايد اذ يشترك بنفس المسار الايضي ونفس الية التأثير على البكتريا من خلال تأثيره على تخليق حامض الفولك. ظهرت العديد من سلالات العنقوديات المقاومة لهذا المضاد وان اساس المقاومة يتمثل بتحوير في جزئية الهدف وهو انزيم Dihydrofolate reductase فقد اشار Sabath وجماعته (١٩٧٦) و Franklin (٢٠٠٣) الى ازدياد نسب المقاومة

لهذا المضاد مع تقدم الزمن وكثرة استخدامه اذ بلغت نسبة المقاومة ٦٥% في حين اشار Oscar وجماعته (٢٠٠٤) ان نسبة المقاومة لهذا المضاد لم تتعدى ٢٠%.ان التباين في نسب المقاومة لهذا المضاد ربما يكون ناتج عن الاختلاف في مصادر العزلات واختلاف الموقع الجغرافي للدراسات المنجزة حول هذا المضاد وبصورة عامة يعد مركب Trimethoprim-sulfamethaxozol قليل الاستخدام مقارنة بالمضادات الحيوية الاخرى لما له من تأثيرات جانبية على الكلى والكبد وظهور حالات فرط الحساسية لهذا المركب (Wesley, ١٩٩٨).

H – اللنكومايسين Lincomycin

أظهرت العزلات العائدة لهذا النوع من المكورات العنقودية مقاومة لمضاد اللنكومايسين بلغت ٥٠% وهو من المضادات التي تؤثر على البناء البروتيني للبكتريا من خلال ارتباطه بالوحدة الثانوية الرايبوسومية ٥٠S وايقاف بناء متعدد الببتيد (Wesley, ١٩٩٨) ويكثر استخدام هذا المضاد كبديل عن البنسلين عند المرضى الذين يظهرون فرط الحساسية للبنسلين. وقد اظهرت العنقوديات الموجبة والسالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم مقاومة كرموسومية لهذا المضاد كما اشار Sanchez (١٩٩٣) , Gerard وجماعته (١٩٩٩) الامتلاك المكورات العنقودية لآلية أخرى لمقاومة هذا المضاد الحيوي يشفر لها الجين البلازميدي *linA* وان نسبة تواجده في العنقوديات السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم اعلى مما هو عليه في بكتريا *S.aureus* بواقع ١٤% الى ٢% على التوالي. اشار Fluit وجماعته (٢٠٠١) ان جين *linA* له القدرة على الأنغراس في أي بلازميد مما يوفر فرصة لانتقاله الى سلالات اخرى ورفع نسبة المقاومة لهذا المضاد. يشفر *linA* الى انتاج بروتين غشائي يحيط المضاد عند دخوله الخلية البكتيرية ولفظه الى خارج الخلية بالية تسمى نظام الدفق اذ اشار كل من Gerard وجماعته (١٩٩٩) و Fluitوجماعته (٢٠٠١) الى وجود علاقة في تواجد بعض الجينات المشابهة لهذا الجين في العنقوديات والمسبحيات مسؤولة عن مقاومة مضادات Macroloides, Streptogramins .

I – الريفامبيسينات Rifampicines

اظهرت بكتريا *S. epidermidis* حساسية عالية لمضاد الريفامبسين فكانت نسب المقاومة له ٦,٢ ومن المعروف ان جينات مقاومة هذا المضاد هي كرموسومية فمضاد الريفامبسين يؤثر في انزيم DNA-dependent RNA polymerase (Prescott & Harley, ١٩٩٩) .كما اشار Mims وجماعته (٢٠٠٤) الى ان آلية المقاومة ناتجة عن

حدوث طفرة نقطية (Point mutation) تؤدي الى تحوير في جزئية الانزيم وتقلل من الفة ارتباطه مع المضاد الحيوي ومما يزيد من خطورتها انها طفرات ثابتة وموروثة للاجيال اللاحقة للبكتريا، ولكن قلة استخدام هذا المضاد ساعد في انخفاض نسب المقاومة. فقد اشار Oscar وجماعته (٢٠٠٤) الى ان نسبة المقاومة للريفامبسين لم تتجاوز ٦% على مدى خمسة عشر عاماً. كما اشار Forbes & Schaberg (١٩٨٣) الى الدور الذي تلعبه بكتريا *S.epidermidis* في نقل عوامل المقاومة البلازميدية بين العنقوديات وربما بين الاجناس الاخرى، مما ساهم في انتشار عوامل المقاومة للمضادات الحيوية والمطهرات في السلالات البكتيرية داخل المستشفيات.

جدول ٤-٦ . النسب المئوية لمقاومة بكتريا S. epidermidis للمضادات الحيوية

المضاد الحيوي	الاستجابة	عدد العزلات	%
بنسيلين ج	م	٢٤	١٠٠
	ح	٠	٠.٠
امبيسيلين	م	١٨	٧٥
	ح	٦	٢٥
اموكسيسيلين	م	١٤	٥٨
	ح	١٠	٤٢
ميثيسيلين	م	١٥	٦٢.٥
	ح	٩	٣٧.٥
اوكساسيلين	م	٢٠	٨٤.٥
	ح	٤	١٥.٥
سيفاتاكسيم	م	٥	٢١
	ح	١٩	٧٩
جينتامايسين	م	١٢	٥٠
	ح	١٢	٥٠
كلورامفينيكول	م	٤	١٥.٥
	ح	٢٠	٨٤.٥
ريفامبيسين	م	٢	٦.٢
	ح	٢٢	٩٣.٧٥
تتراسايكلين	م	٢١	٨٧.٥
	ح	٣	١٢.٥
اريثرومايسين	م	١٥	٦٢.٥
	ح	٩	٣٧.٥
لينكومايسين	م	١٢	٥٠

	ح	١٢	٥٠
ترايميثوبريم-سلفاميثوكسازول	م	١١	٤٦
	ح	١٣	٥٤
فانكومايسين	م	٠	٠.٠
	ح	٢٤	١٠٠
نوفوبايوسين	م	٠	٠.٠
	ح	٢٤	١٠٠

الرموز: ح: حساسة ؛ م : مقاومة

*** عدد العزلات المختبرة هي ٢٤ عزلة موزعة على مصادر العينات**

٤-٣-٢: حساسية بكتريا *S. aureus* للمضادات الحيوية

اظهرت جميع عزلات بكتريا *S.aureus* الموجبة والسالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم نسب مقاومة للمضادات الحيوية مشابهة لبكتريا *S. epidermidis* عدا بعض الاختلافات المبينة في الجداول **٤-٧ الى ٤-١٠** واهمها مقاومة مضاد المثسيلين اذ كانت نسبة المقاومة له ٨٠% في حين كانت نسبة المقاومة للريفامبسين ١٠%. اما حساسية مضاد الفانكومايسين فكانت ٠ % كما اظهرت عزلة واحدة انخفاضاً في مستوى الحساسية بقطر تثبيطي ١٢ ملم مع العلم ان القطر القياسي لحساسية الفانكومايسين هو ١٩ ملم حسب ما جاء في NCCLS (١٩٩٧). اذ اشار Garrett وجماعته (١٩٩٩) في تقرير لمركز الامراض الانتقالية في المملكة المتحدة الى خطورة سلالات العنقوديات قليلة الحساسية لمضاد الفانكومايسين .

جدول ٤-٩ . النسب المئوية لمقاومة بكتريا *S. auerus* الموجبة للانزيم المخثر لبلازما الدم للمضادات الحيوية

المضاد الحيوي	الاستجابة	عدد العزلات	%
بنسيلين ج	م	١٠	١٠٠
	ح	٠	٠.٠
امبيسيلين	م	٨	٨٠
	ح	٢	٢٠
اموكسيسيلين	م	٧	٧٠
	ح	٣	٣٠
ميثيسيلين	م	٨	٨٠
	ح	٢	٢٠
اوكساسيلين	م	٩	٩٠
	ح	١	١٠
سيفاتاكسيم	م	٣	٣٠
	ح	٧	٧٠
جينتامايسين	م	٤	٤٠

	ح	٦	٦٠
كلورامفينيكول	م	٤	٤٠
	ح	٦	٦٠
ريفامبيسين	م	١	١٠
	ح	٩	٩٠
تتراسايكلين	م	٨	٨٠
	ح	٢	٢٠
اريثرومايسين	م	٨	٨٠
	ح	٢	٢٠
لينكومايسين	م	٤	٤٠
	ح	٦	٦٠
ترايميثوبريم-سلفاميثوكسازول	م	٥	٥٠
	ح	٥	٥٠
فانكومايسين	م	٠	٠
	ح	١٠	١٠٠
نوفوبايوسين	م	٠	٠
	ح	١٠	١٠٠

الرموز: ح: حساسة ؛ م : مقاومة

*** عدد العزلات المختبرة هي ١٠ عزلات موزعة على مصادر العينات**

جدول ٤-١٠ . النسب المئوية لمقاومة بكتريا *S. auerus* السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم للمضادات الحيوية.

المضاد الحيوي	الاستجابة	عدد العزلات
بنسيلين ج	م	٢
	ح	٠
امبيسيلين	م	٢
	ح	٠
اموكسيسيلين	م	١
	ح	١
ميثيسيلين	م	٢
	ح	٠
اوكساسيلين	م	٢
	ح	٠
سيفاتاكسيم	م	١
	ح	١

جينتامايسين	م	١
	ح	١
كلورامفينيكول	م	٠
	ح	٢
ريفامبيسين	م	٠
	ح	٢
تتراسايكلين	م	٢
	ح	٠
اريثرومايسين	م	٢
	ح	٠
لينكومايسين	م	١
	ح	١
ترايميثوبريم-سلفاميثوكسازول	م	٢
	ح	٠
فانكومايسين	م	٠
	ح	٢
نوفوبايوسين	م	٠
	ح	٢

الرموز: ح: حساسة ؛ م : مقاومة

٤-٣-٣: حساسية بكتريا *S. saprophyticus* للمضادات الحيوية

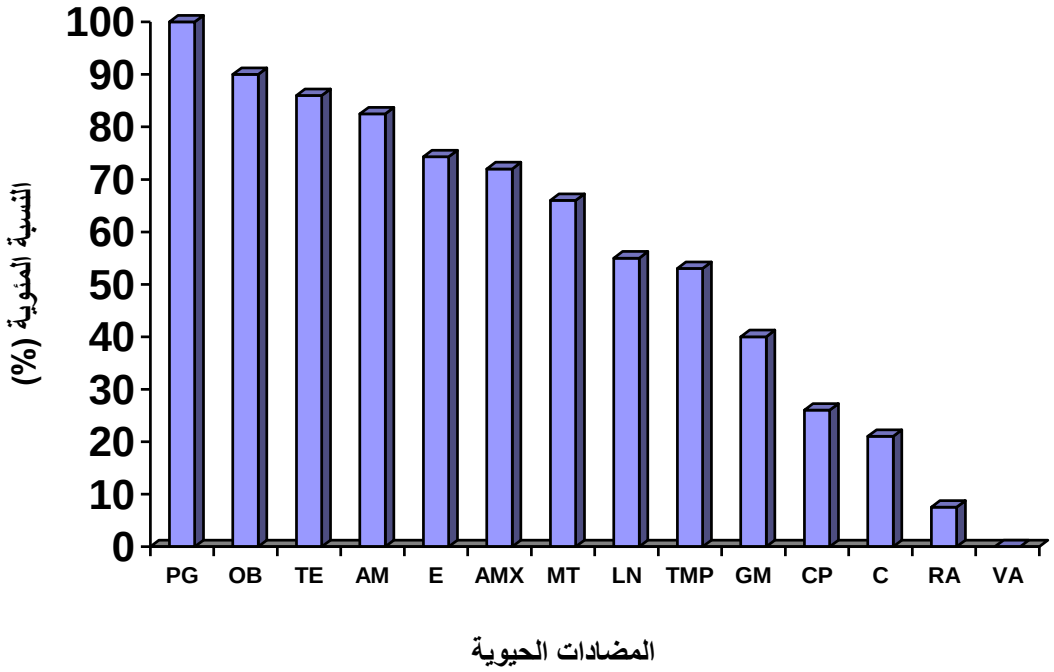
يبين الجدولين ٤-١١ و ٤-١٢ نمط الحساسية و النسب المئوية لمقاومة بكتريا *S. saprophyticus* للمضادات الحيوية. كانت نسبة المقاومة لمضاد المثيسلين هي ٦٠,٥% فيما بقيت نسبة المقاومة للفانكومايسين صفرا. اظهرت عزلات هذه البكتريا ارتفاعاً واضحاً في نسبة المقاومة لمضاد اللنكومايسين(٦٩%) وهذه النسب تتفق مع العديد من الدراسات فقد اشار Michael وجماعته (١٩٨٨) وGerard وجماعته (١٩٩٩) الى ان نسبة مقاومة هذه العنقوديات لمضاد المثيسلين تجاوزت ٥٠% وللجنتامايسين واللنكومايسين ٦٠% في حين ان حساسيتها كانت مطلقة للفانكومايسين.

جدول ٤ -١٢ . النسب المئوية لمقاومة بكتريا S. saprophyticus * للمضادات الحيوية.

المضاد الحيوي	الاستجابة	عدد العزلات	%
بنسيلين ج	م	١٦	١٠٠
	ح	٠	٠.٠
امبيسيلين	م	١٢	٧٥
	ح	٤	٢٥
اموكسيسيلين	م	١١	٦٩
	ح	٥	٣١
ميثيسيلين	م	١٠	٦٢.٥
	ح	٦	٣٧.٥
اوكساسيلين	م	١٤	٨٧.٥
	ح	٢	١٢.٥
سيفاتاكسيم	م	٤	٢٥
	ح	١٢	٧٥
جينتامايسين	م	٥	٣١
	ح	١١	٦٩
كلورامفينيكول	م	٣	١٩
	ح	١٣	٨١
ريفامبيسين	م	٢	١٢.٥
	ح	١٤	٨٧.٥
تتراسايكلين	م	١٤	٨٧.٥
	ح	٢	١٢.٥
اريثرومايسين	م	١٢	٧٥
	ح	٤	٢٥
لينكومايسين	م	١١	٦٩
	ح	٥	٣١
ترايميثوبريم-سلفاميثوكسازول	م	٩	٥٦
	ح	٧	٤٤
فانكومايسين	م	٠	٠
	ح	١٦	١٠٠
نوفوبايوسين	م	١٦	١٠٠
	ح	٠	٠

الرموز: ح: حساسة ؛ م : مقاومة

*** عدد العزلات المختبرة هي ١٦ عزلة موزعة على مصادر العينات**



شكل ٤-١ . النسب المئوية لمقاومة العنقوديات للمضادات الحيوية.

٤-٤: حساسية البكتريا للمطهرات والمعقمات

Bacterial susceptibility for antiseptics & disinfectants

تم اختيار العزلة ١٥٩ العائدة لبكتريا *S.aureus* الموجبة لانزيم مخثر البلازما الدم، مقاومة للمثيسلين باعتبارها سلالة متعددة المقاومة وقد عزلت من داخل المستشفى لغرض اختبار وتقييم فعالية المطهرات والمعقمات المستخدمة في المستشفى وتحديد معامل الفينول لكل منها.

اظهرت النتائج المبينة في الجدول ٤-١٣ اختلافاً طفيفاً في التراكيز المثبطة الدنيا للهكساتان والسابتون اذ بلغت٠,٤ و٣ مايكروغرام/مل على التوالي في حين كانت التراكيز القاتلة هي ٠,٠٤ و٠,٠٣ ملغم/مل على التوالي فقد اشار كل من Russel وجماعته (١٩٩٩) وGilbert وجماعته (٢٠٠٣) ان تراكيز الكلورهكسدين والسترمايد المثبطة للعنقوديات هي ٠,٣ و٣ مايكروغرام \مل على التوالي وان التراكيز القاتلة كانت ٠,٠٤ و٠,٠٣ مايكروغرام \مل على التوالي. ان ارتفاع التراكيز المثبطة للهكساتان والسابتون للعزلة ١٥٩ العائدة لبكتريا *S.aureus* يؤكد قدرة هذه البكتريا على تحمل او مقاومة التراكيز المؤثرة على العزلات الحساسة في حين لم تتمكن هذه العزلة من تحمل التركيز القاتل للمادتين وهذا ما اكده Cookson وجماعته (١٩٩٧) بأن العنقوديات الذهبية قادرة على تحمل تركيز ٥ مايكروغرام /مل من الكلورهكسدين ومركبات الامونيوم الرباعية. كما اتفقت النتائج مع تعليمات الشركة المصنعة للهكساتان باستخدامه بدون تخفيف لاغراض التعقيم مع مراعاة التوافق بين حجم المحلول وحجم المنطقة المعدة للتعقيم، كذلك اتفقت النتائج مع تعليمات الشركة المصنعة للسابتون (كلورهكسدين٠.٣%+سترمايد ٣%) بأمكان تخفيفه الى النصف لاغراض تعقيم الجلد.

كما اظهرت النتائج ارتفاعاً في التراكيز المثبطة للكلوروزايلينول (الديتول) والكحول الاثيلي (٧٠٠،٤) مايكروغرام/مل على التوالي وتوافقاً في التراكيز القاتلة فكانت ٠,٠٤ و ٧ ملغم/مل على التوالي وتتفق هذه النتائج مع ما اشار اليه كل من MCdonnel & Russel (١٩٩٩) و Gilbert وجماعته (٢٠٠٣) بأن قيمة MIC الديتول في العنقوديات الذهبية كانت ٣ مايكروغرام /مل وان قيمة MLC هي ٠,٠٣ملغم/مل وللكحول الاثيلي بلغت ٦٠٠ مايكروغرام/مل و٧ ملغم/مل على التوالي.

واظهرت النتائج الكفاءة العالية لمعقد الايودين (PVP) في تطهير الجلد والاغشية المخاطية وبالتركيز المثبت من قبل الشركة المصنعة فكان MIC هو ٠,٠٧٧ مايكروغرام/مل و MLC هو ٠,٠٠٧٧ملغم/مل، ويستخدم هذا المحلول بصورة مباشرة بدون تخفيف بتركيز ٧.٧مايكروغرام/مل

حسب تعليمات الشركة المصنعة في تطهير الجلد في صالات العمليات الجراحية، ان نجاح معقد الايودين في قتل اغلب انواع البكتريا المساهمة في الاخماج المكتسبة من المستشفيات يعود لعدة اسباب منها:

١. الالفة العالية للارتباط مع العديد من الانزيمات والبروتينات المايكروبية.
٢. القدرة على هلجنة الحامض الاميني التايروسين وايقاف البناء البروتيني.
٣. القدرة على اكسدة عدة مركبات بكتيرية.
٤. تأثيره الفعال والشامل على السبورات البكتيرية والفطريات والفايروسات (MCdonnel & Russel, ١٩٩٩).

اذ اشار MCdonnel & Ayliffe (١٩٩٣) و Pelczar و جماعته (١٩٨٦) الى ان معامل الفينول لبعض معقدات اليود يصل الى ٧٥٠، في حين للاتتعدى قيمته ٥٠٠ لأغلب مشتقات الفينول.

يظهر من مجمل هذه النتائج بأن العنقوديات قادرة على تحمل تراكيز منخفضة من المطهرات الشائعة الاستخدام في المستشفى وخاصة السلالات المقاومة للمثيسلين. فقد اشارت دراسة Leelaporn وجماعته (١٩٩٤) الى ان ظاهرة الضغط الانتخابي الناجم عن تعرض البكتريا المستمر والعشوائي لهذه المطهرات يؤدي الى استحداث البكتريا لاليات تمكنها من تحمل او مقاومة هذه المطهرات. تعد الية نظام الدفق من ابرز الاليات المكتشفة في العنقوديات عامة وان اساسها الوراثي غالباً ما يكون بلازميدي مما يوفر فرصة انتقالها الى انواع واجناس اخرى داخل المستشفى (Russell, ١٩٨٥). كما ان التخفيف العشوائي للعديد من المطهرات يساهم بشكل فاعل بنشوء سلالات عالية التحمل او مقاومة لتلك المطهرات وبذا ينفرد معقد الايودينPVP لكونه يستخدم بصورة مباشرة بدون تخفيف في قدرته على ابادة اغلب انواع البكتريا في المستشفى، وتوافقاً مع موضوع هذه الدراسة حول العنقوديات السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم تم اختيار العزلة ٦٣ العائدة لبكتريا *S.epidermidis* كونها تشكل اعلى نسبة في العزل بلغت ٥٨% منالمكورات العنقودية المعزولة واهم انواع العنقوديات السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم لاختبار فعالية المطهرات قيد الدراسة ومقارنتها مع النوع *S.aureus* اذ اظهرت النتائج تماثلاً في التراكيز القاتلة واختلافاً طفيفاً في التراكيز المثبطة الدنيا ما عدا تأثير الديتول اذ اظهرت هذه العزلة ارتفاعاً كبيراً في تحمل تركيز لغاية ٦ مايكروغرام /ملكتركيز مثبط اما التركيز القاتل فكان ٠,٠٦ملغم/مل مما ساهم في خفض قيمة معامل الفينول لهذا المطهر الى ١٢٠ للعزلة ٦٣ في حين كان ١٢٥ للعزلة ١٥٩العائدة لبكتريا*S.aureus* ، ان استخدام مطهر الديتول بشكل كبير في الحياة العامة وبشكل عشوائي مع تعرض العنقوديات له باستمرار قد ساهم في نشوء سلالات عالية التحمل لهذا المطهر وانتقالها واستيطانها في المستشفى.

جرى اعادة اختبار العزلتين ١٥٩ و٦٣ بعد التحييد البلازميدي فلم تظهر العزلة ١٥٩ أي اختلاف في التراكيز المثبطة للمطهرات قيد الدراسة، في حين اظهرت العزلة ٦٣ انخفاضاً في تركيز الديتول المثبط الى ٤ مايكروغرام/مل وربما يدل ذلك على الاساس البلازميدي للمقاومة او التحمل وقد اشار كل من Rouch وجماعته (١٩٩٠) وSidhu (٢٠٠١) الى الاساس البلازميدي لالية نظام الدفق في العنقوديات تجاه العديد من المطهرات بضمنها كلوروزايليول (الديتول) في حين اشار Cookson وجماعته (١٩٩٧) الى الاساس الكرموسومي لهذه الالية.

جدول ٤-١٣ . التراكيز المثبطة والقاتلة ومعامل الفينول للمطهرات المستخدمة لبكتريا *S.aureus*.

المادة المطهرة		التركيز الخام (ملغم /مل)	التركيز المثبط الادنى (مايكروغرام/مل)	التركيز القاتل الادنى (ملغم/مل)	معامل الفينول
الفينول		٥	٥٠	٥	١
الهسكاتان		٤٠	٠.٤	٠.٠٤	١٢٥
الديتول		٤٠	٤	٠.٠٤	١٢٥
سابتون	كلورهكسدين	٣	٣	٠.٠٣	١٦٦
	ستريمايد	٣٠	٣٠	٠.٣	١٦.٦
معقد اليود PVP		٧٧	٠.٠٧٧	٠.٠٠٧٧	٦٥٠
الكحول الاثيلي		٧٠٠	٧٠٠	٧	٠.٧

٤-٥: استخلاص الدنا DNA Extraction

استخدمت طريقة الاخراج الملحي (Salting out) اعتمادا على ما أورده Pospiech Neuman و (١٩٩٥) اذ استخدم محلول انزيم اللايسوزايم (Lysozyme) بتركيز ٢٠مايكروغرام \مل لعدم توفر الانزيم الخاص بالعنقوديات وهو انزيم Lysostaphin، اذ حورت طريقة العمل من خلال زيادة كمية انزيم اللايسوزايم المضافة للعالق البكتيري المحضر للأستخلاص من ٥٠٠ مايكروليتر الى ٧٥٠ مايكروليتر وكذلك زيادة فترة الحضن في الحمام المائي من نصف ساعة الى ساعة واحدة، فقد اشار Goering و Duensing (١٩٩٠) وMary (١٩٩٨) الى امكانية استخدام انزيم اللايسوزايم لاستخلاص دنا العنقوديات مع مراعاة تركيز الانزيم المستخدم وزمن الحضن في الحمام المائي واشاروا الى ضرورة رفع كمية الانزيم وزمن الحضن للعنقوديات السالبة للانزيم المخثر لبلازما الدم كونها تمتلك جدارا خلويا صلبا يتكون من ثلاث طبقات من الببتيدوكلايكان لايمكن تحللها بتراكيز واطئة من أنزيم اللايسوزايم.

اذ تم استخلاص كميات وفيرة من الدنا ظهرت بشكل غمامة بيضاء متكاثفة ولزجة بما يشبه خيوط القطن الملتفة حول بعضها جففت بالايثانول وحفظت بعد اذابتها بمحلول TE عند درجة حرارة - ٢٠ْم لاغراض الترحيل الكهربائي.

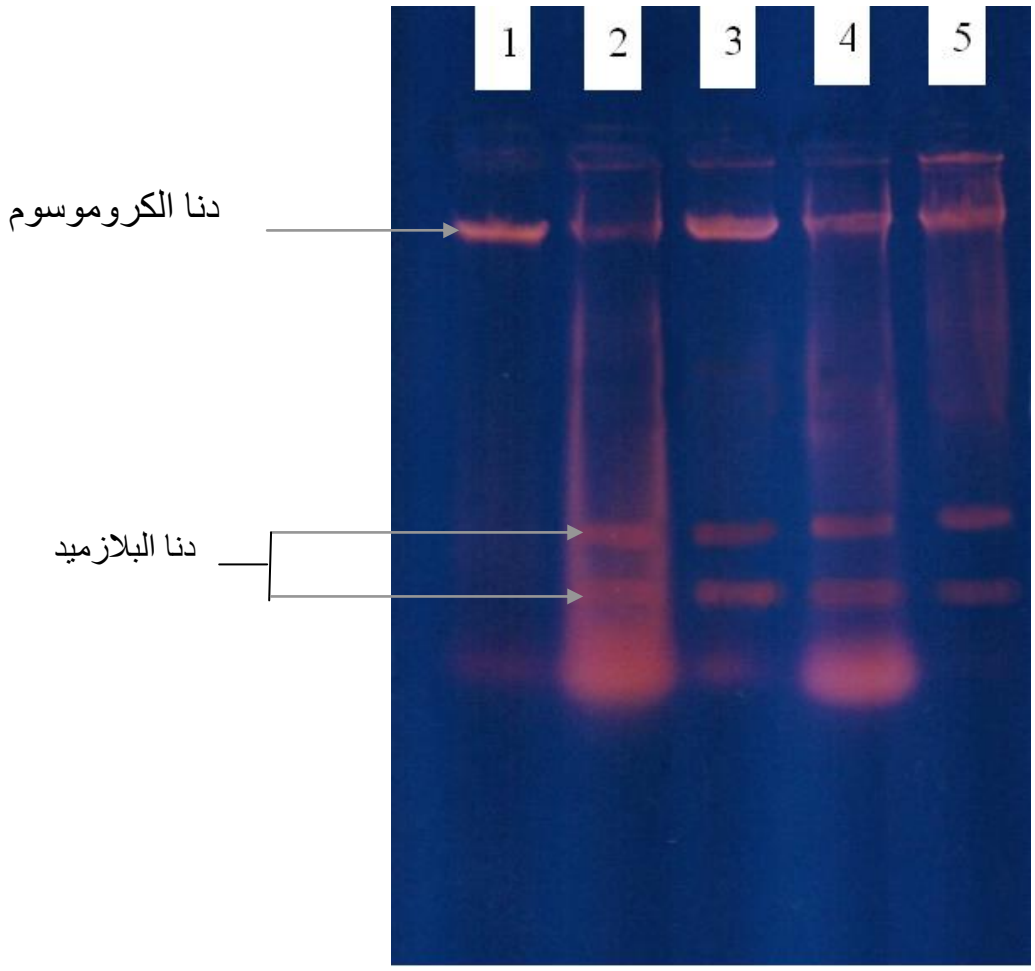
٤-٦: النسق البلازميدي Plasmid profile

استخدمت طريقة الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز لدراسة النسق البلازميدي للعزلات المختارة وهي العزلة ١٥٩العائدة لبكتريا *S.aureus* الموجبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم ،العزلة ٩٣ العائدة لبكتريا *S.aureus* السالبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم ،العزلة ٦٣ العائدة لبكتريا *S.epidermidis* والعزلة ٢٨٨ العائدة لبكتريا *S.saprophyticu* ,اذ تميزت هذه العزلات بمقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية .

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي الموضحة في الشكل ٤-١ تشابهاً في المحتوى البلازميدي للعزلات قيد الدراسة اذ احتوت كل عزلة على حزمتين بلازميديتين ان تجمع البلازميدات بشكل حزم يدل على تشابه او تقارب الوزن الجزيئي لهذه البلازميدات، ويرجح ان تكون البلازميدات صغيرة الحجم لا تزيد عن ٢-٥ ميكادالتون وهذا ما اكدته تجارب التحييد اذ اظهرت العزلات المحيدة حساسية لثلاث مضادات على الاقل وبشكل متغاير (Archer *et al.*, ١٩٨٤).

اكد Lacey (١٩٧٥) في دراسة مستفيضة عن المقاومة البلازميدية المنشأ في العنقوديات اذ اشار الى صغر حجم البلازميدات المحتوية على الجينات المسؤولة عن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية . واشار Iordanescu وجماعته (١٩٧٨) بأن العنقوديات تحمل غالباً بلازميدات صغيرة الحجم وان التشابه الكبير في المحتوى البلازميدي يعود الى ظاهرة عدم التوافق (Incompatibility). كما ان تشابه المحتوى الوراثي للعنقوديات يشكل عائقاً في الدراسات والبحوث الوبائية والتي تعتمد اساساً على تصنيف البكتريا ، فقد اشار Arian & Marcus (١٩٩٨) الى امكانية استخدام النسق البلازميدي في تصنيف العنقوديات في الدراسات الوبائية اعتمادا على جداول قياسية تبين المحتوى البلازميدي للمكورات العنقودية المعزولة من المنطقة الخاضعة للدراسة .

في حين اعتمد العديد من الباحثين (Trilla *et al.*, ١٩٩٣; Maria *et al.*, ٢٠٠٢) على استخدام التقنيات الوراثية في تشخيص وتصنيف المكورات العنقودية السالبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم وصممت خرائط جينية للعديد من الاحياء المجهرية وضمنها العنقوديات فمن خلالها يمكن متابعة أي اختلاف وراثي على مستوى القاعدة الواحدة ضمن شريط DNA (Tenover *et al.*, ١٩٩٤; Prevost *et al.*, ١٩٩٢).


1
2
3
4
5
دنا الكروموسوم
دنا البلازميد

شكل ٤-٢:النسق البلازميدي لعزلات بكتريا المكورات العنقودية في هلام الآكاروز.

تم الترحيل الكهربائي في هلام الآكاروز ٠.٨% بفرق جهد ٤٠ فولت لمدة ساعتين.

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

المسار ٢. المحتوى الوراثي لبكتريا ١٥٩ Coagulase-positive *S.aureus*.

المسار ٣. المحتوى الوراثي لبكتريا ٩٣ Coagulases-negative *S.aureus*.

المسار ٤. المحتوى الوراثي لبكتريا ٦٣ *S. epidermidis*.

المسار ٥. المحتوى الوراثي لبكتريا ٢٨٨ *S. saprophyticus* .

٤-٧: تحييد البلازميدات Plasmids curing

تم اختيار العزلات الأربع المستخدمة في دراسة النسق البلازميدي و التي اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي احتواء كل عزلة منها على حزمتين بلازميديتين لغرض اجراء تجارب التحييد البلازميدي عليها كما موضح في الجدول ٤-١٤، اختيرت مادة SDS لما لها من كفاءة عالية في تحييد بلازميدات المكورات العنقودية (Trevors, ١٩٨٦)اظهرت النتائج كفاءة SDS اذ يظهر الشكل ٤-٣ خلو مستخلصات الدنا منالمحتوى البلازميدي وتراوحت نسبة التحييد ٣٨-٨٥% اما الدراسات التي استخدمت درجة الحرارة او حامض السالسيلك كعوامل محيدة، فهي لم تتجاوز ٤٠% و٣٤% على التوالي(الصفاوي وعبد الرزاق،٢٠٠٥) كما اشارSonstein وBaldwin (١٩٧٢) الى فاعلية مركب SDS في الاقصاء البلازميدي لبكتريا *S.aureus* اذ اظهرت العزلة ١٥٩ العائدة لبكتريا *S.aureus* حساسية للمضادات الحيوية قيد الاختبار بصورة متفاوتة فنسبة المستعمرات الحساسة تراوحت بين ٤٥-٧٠% عند تركيز ٢٥ ملغم/مل من مركب SDS، في حين اظهرت العزلة ٩٣ عند نفس التركيز من SDS نسبة تحييد تراوحت بين ٤٨-٧٥%. كذلك العزلة ٢٨٨ تراوحت نسبتها بين ٤٧-٨٥%. اما العزلة ٦٣

العائدة لبكتريا *S.epidermidis* فقد اظهرت ارتفاعاً في MIC بلغ ٩٠ ملغم/مل، اما التركيز الامثل فقد بلغ ٧٥ ملغم/مل وتراوحت نسبة التحييد بين ٣٨-٧٥%.

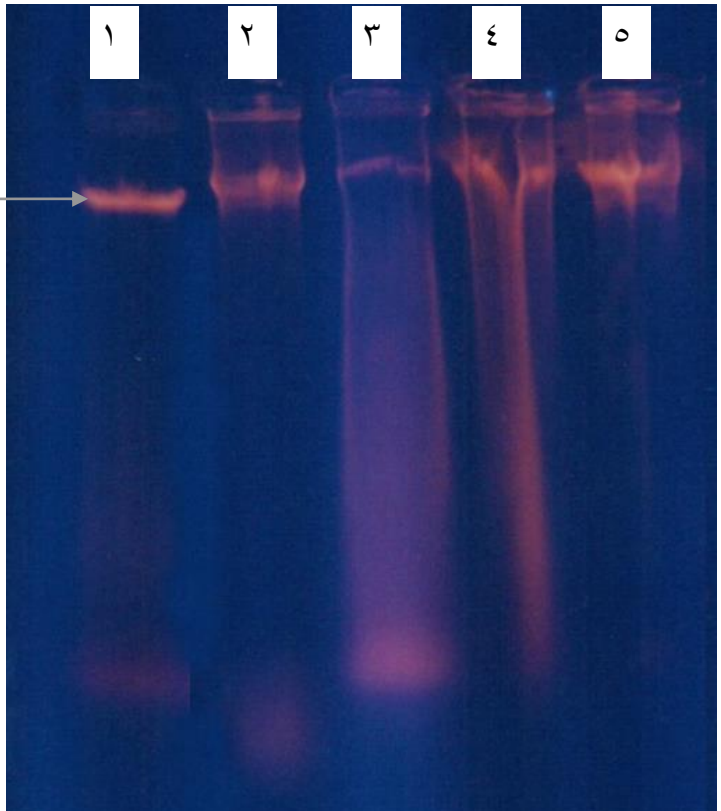
تشير هذه النتائج الى ان الجينات المسؤولة عن مقاومة هذه المجموعة من المضادات الحيوية محمولة على بلازميدات صغيرة الحجم غالباً، اذ اشار Dennes & Marcus (١٩٨٦) و Eady وجماعته (١٩٩٣) ان العنقوديات عامة تحمل بلازميدات صغيرة الحجم متعددة النسخ لا يتعدى وزنها الجزيئي٥×١٠^{٦} دالتون اذ اظهرت المستعمرات المحيدة حساسية للمضادات الحيوية (بنسلين ج، امبسلين، تتراسايكلين، كلورامفينكول، جنتامايسين، ارثرومايسين، تراي ميثوبرين). أظهرت العزلة ١٥٩العائدة لبكتريا *S.aureus* الموجبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم نمطين من التحييد البلازميدي كما موضح في جدول ١٤-٤ فالنمط الأول المتمثل بالمجموعة A كانت نسبة المستعمرات المحيدة ٢٥% والتي أظهرت حساسية تجاه مضادات البنسيلين ج , الأمبيسيلين , التتراسايكلين والأريثرومايسين ,في حين أن النط الثاني المتمثل بالمجموعة B كانت نسبة المستعمرات المحيدة ٤٥% والتي أظهرت حساسية لجميع المضادات قيد الأختبار مما يشير الى ان الجينات المشفرة لمقاومة هذه المجموعة من المضادات هي بلازميدية الموقع . فيما أظهرت العزلة ٩٣ العائدة لبكتريا *S.aureus* السالبة للأنزيم المخثر لبلازما الدم نمطين من التحييد البلازميدي يتمثل النمط الأول بالمجموعة A بنسبة ٢٧% من المستعمرات المحيدة والتي أظهرت حساسية تجاه مضادات البنسيلين ج , الأمبيسيلين , الكلورامفينيكول والأريثرومايسين .

جدول ١٤-٤ . تأثير مركب SDS في تحييد بلازميدات المكورات العنقودية .

رقم العزلة	مجاميع مستعمرات البكتريا المحيدة	المستعمرات المحيدة على أوساط المضادات الحيوية(مايكروغرام \مل)							التركيز الامثل SDS (ملغم /مل)	التركيز المثبط الأدنى SDS (ملغم/مل)	عدد المستعمرات الكلي
		PG ٢٥	Amp ٢٥	Tc ٥٠	E ٢٥	Cl ٢٥	Tp ١٠	Gm ١٠			
١٥٩	Coagulase positive *S. aureus*	+	+	+	+	+	+	+	٢٥	٦٠	١٠٠
	مجموعة A(٢٥)	-	-	-	-	+	+	+			
	مجموعةB (٤٥)	-	-	-	-	-	-	-			
٩٣	Coagulase negative *S. aureus*	+	+	+	+	+	+	+	٢٥	٦٠	١٠٠
	مجموعة A(٢٧)	-	-	-	+	-	+	+			
	مجموعةB(٤٨)	-	-	-	-	-	-	-			
٦٣	*S. epidermidis*	+	+	+	+	+	+	+	٧٥	٩٠	١٠٠
	مجموعة A(٣٤)	-	+	-	-	-	+	+			
	مجموعةB(٣٨)	-	-	-	-	-	-	-			

٢٨٨	*S. saprophyticus*	+	+	+	+	+	+	+	٢٥	٦٠	١٠٠
	مجموعة A(٢٠)	-	+	+	+	+	+	+			
	مجموعةB(١٨)	-	-	+	+	-	-	+			
	مجموعةC (٤٧)	-	-	-	-	-	-	-			

المختصـــرات :PG بنســـيلين ج Apx :أمبيســـيلين ; Tc:تتراســـايكلين ; E:اريثرومايســـين;
Cl:كلورامفينيكول ; Tp:ترايميثوبريم ; Gm:جنتامايسين .



شكل ٤-٣: االمحتوى الوراثي لبكتريا المكورات العنقودية بعد التحييد بمادة SDS

تم الترحيل الكهربائي في هلام الآكاروز ٠.٨% بفرق جهد ٤٠ فولت لمدة ساعتين.

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

المسار٢. المحتوى الوراثي لبكتريا ١٥٩ *S.aureus* Coagulase-positive.

المسار٣. المحتوى الوراثي لبكتريا ٩٣ *S.aureus* Coagulases-negative .

المسار٤. المحتوى الوراثي لبكتريا ٦٣ *S. epidermidis*.

المسار ٥. المحتوى الوراثي لبكتريا ٢٨٨ *S. saprophyticus* .

في حين أن النمط الثاني المتمثل بالمجموعة B كانت نسبة المستعمرات المحيدة ٤٨% والتي أظهرت حسلسية لجميع المضادات قيد الأختبار .أما العزلة ٦٣ العائدة لبكتريا *S.epedermidis* فقد أعطت نمطين من التحييد البلازميدي كانت نسبة الأول المتمثل بالمجموعةA ٣٤% اذ أظهلرت المستعمرات المحيدة في هذه المجموعة حساسية تجاه مضادات البنسيلين ج , الأمبيسيلين , الكلورامفينيكول والأريثرومايسين في حين كانت نسبة النمط الثاني المتمثل بالمجموعةB ٣٨% اذ أظهرت مستعمرات هذه المجموعة حساسية لجميع المضادات قيد الأختبار .في حين أن العزلة ٢٨٨ العائدة لبكتريا *S.saprophyticus*فقد أعطت ثلاثة أنماط من التحييد البلازميدي تمثل الأول بالمجموعة A بنسبة ٢٠% من المستعمرات المحيدة والتي أظهرت حساسية لمضاد البنسيلين ج فقط أما النمط الثاني المتمثل بالمجموعة B كانت نسبته ١٨% وهو مشابه لنمط المجموعة A العائدة للعزلة ٩٣ ,أما النمط الثالث المتمثل بالمجموعة الثالثة C كانت نسبتها ٤٧% من المستعمرات المحيدة والتي أظهرت حساسية تجاه جميع المضادات قيد الأختبار .

تشير نتائج التحييد البلازميدي للمكورات العنقودية الموضحة في جدول ٤-١٤ الى سيادة نمطين من بلازميدات المقاومة للمضادات الحيوية .وهي بلازميدات متقاربة بالوزن الجزيئي تحمل جينات تش**فر لمقاومة** ثلاثة او أربعة مضادات حيوية على الأكثر.

ان احتفاظ بعض المستعمرات بصفة المقاومة بالرغم من تعرضها لمركب SDS وعدم الحصول على كفاءة تحييد ١٠٠% يعود الى عدة اسباب اهمها:-

١. طور النمو- يفضل ان يكون المزروع البكتيري في الطور اللوغارتمي اذ ان سرعة الانقسام في هذا الطور مع وجود العامل الكيمياوي المحيد يساعد على فقدان البلازميدات في الاجيال المتعاقبة (Tomoeda *et al*., ١٩٧٤).
٢. امتلاك البكتريا لعدد كبير من النسخ البلازميدية لم تقصى بالكامل (Eady *et al*., ١٩٩٣; Larry & Windy, ١٩٩٧).
٣. امتلاك البكتريا لاليات مقاومة كرموسومية المنشأ كما هي الحال لمضادات الريفامبسين والسيفوتاكسيم (Sabath *et al*., ١٩٧٦).
٤. امتلاك بعض السلالات البكتيرية لاليات مقاومة طبيعية.
ان التماثل في المحتوى البلازميدي لهذه العنقوديات ربما يعود الى التماثل في البيئة.

والى عدم الالتزام في المعايير العامة باستخدام المعقمات الذي مكن هذه الانواع من العنقوديات من اكتساب المقاومة ونقلها الى الانواع البكتيرية الاخرى

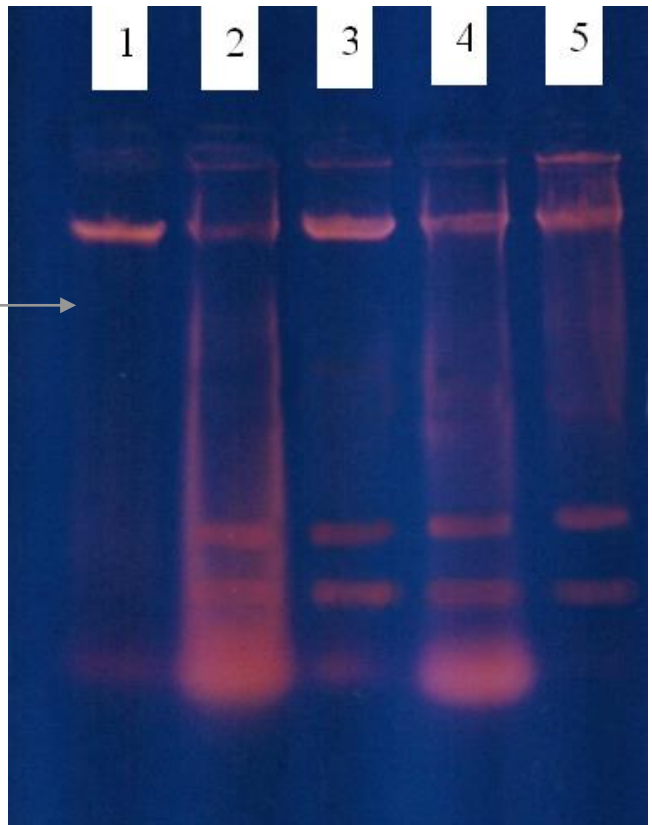
(Larry & Windy, ١٩٩٧; Archer *et al*., ١٩٨٤).

ان البلازميدات الصغيرة الحجم والتي يتراوحوزنها الجزيئي ٢-٦×١٠^{٦} دالتون مثل البلازميدات الحاوية على الجينات المشفرة لمقاومة مضادات الامبسلين، والتتراسايكلين، الارثرومايسين تتواجد بنسخ عديدة في الخلية وتعرف بالبلازميدات المسترخية وتتضاعف بكثرة خاصة بوجود المحفز وهو المضاد الحيوي وهو عامل اساسي متوفر في بيئة المستشفى وكون هذه المكورات العنقودية من النبيت الطبيعي

للانسان لذا فهي في تعرض مستمر لمختلف انواع المضادات الحيوية كما ان ارتفاع عدد النسخ البلازميدية يقلل من كفاءة التحييد (Sonstein &Baldwin, ١٩٧٢; Meacock &Cohen, ١٩٨٠).

وتجدر الاشارة الى وجود تداخل وراثي في اليات المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية وان اساس هذا التداخل هي الجينات القافزة (Gillespie *et al.*,١٩٨٦;Dommani,١٩٩٧) وهي الية معقدة نوعاً ما، فما الذي يحفز البكتريا على نقل جين معين من الكرموسوم الى البلازميد او من بلازميد لاخر او تغيير موقع هذا الجين على نفس الكرموسوم ؟ ان الخلية البكتيرية في بحث مستمر عن حالة التوازن مع الظروف المحيطة وبالتحديد نوع المضادات التي تتعرض لها البكتريا لذا فأن استحداث جين مقاومة بلازميدي يجب ان لا يؤثر على التركيب الوراثي للبلازميد المضاف له الجين او استحداث بلازميد جديد قد يكون على حساب بلازميد اخر قد يتسبب هذا بأقصائه خارج الخلية لذا تبحث البكتريا عن منفذ لا يتسبب بخسارتها لاي جين على البلازميد المتعرض للاقصاء فتلجأ الى نقله على الكرموسوم او على بلازميد اخر يستوعب هذا الجين، وهذا يضع تفسيراً للمقاومة المشتركة لبعض المضادات أي ان اساسها الوراثي كرموسومي وبلازميدي في العديد من سلالات العنقوديات وتتضح هذه الظاهرة في مقاومة مضادات β-lactams بالالية المعروفة Pencillin-Binding protein اذ صنفت عدة انواع من هذا البروتين تختلف في الفة الارتباط مع مضادات β-lactams حسب ما اشار Hartmanو Tomaza (١٩٨٤) واعتماداً على الاساس الوراثي للتشفير فقد صنفها Larry وWindey (١٩٩٧) الى نوعين اساسيين هما PBP١, PBP٢ الاول تشفر له جينات كروموسومية والثاني بلازميدية. وقد اشار Dennes (١٩٨٦) الى نفس حالة التداخل في مقاومة مضاد الجنتامايسين من قبل العنقوديات.

ومن مجمل هذه الحقائق يتضح ان المقاومة الكرموسومية تكون اكثر ثباتاً من المقاومة البلازميدية المنشأ. كما تجدر الاشارة الى اعادة اختبار العزلة ١٥٩ التابعة لبكتريا *S. aureus* من حيث القدرة على انتاج الانزيم المخثر لبلازما الدم وعامل التكتل بعد عملية التحييد فأعطت نتائج موجبة للفحصين مما يؤكد ان الاساس الوراثي للانزيم المخثر وعامل التكتل هو كرموسومي وليس بلازميدي.



شكل ٤-٢: الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز (٠.٨%) بفرق جهد ٤٠ فولت لمدة ساعتين والذي يظهر مواقع حزم الدنا البلازميدي والكروموسومي لعزلات بكتريا العنقوديات .

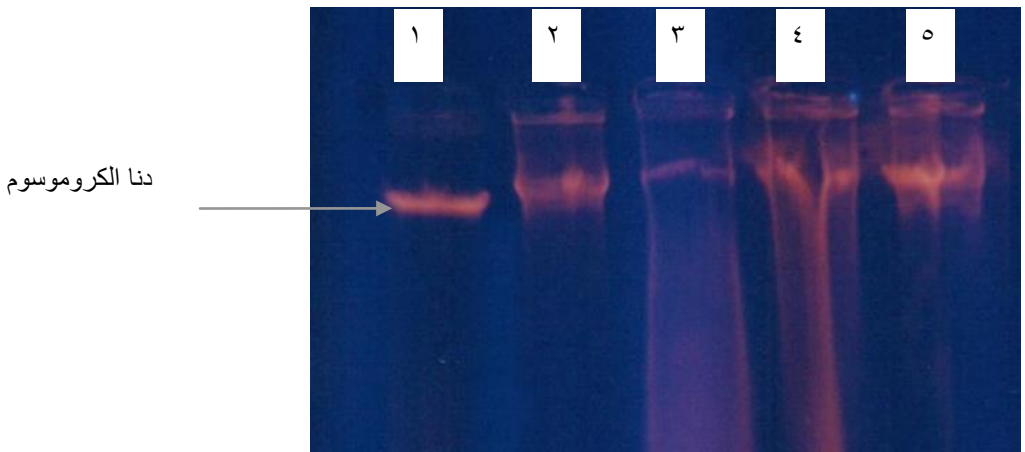
المسار ١. المحتوى الوراثي للسلالة القياسية *E.coli* MM ٢٩٤ .

المسار٢. المحتوى الوراثي لبكتريا Coagulase-Positive *S.aureus* .

المسار٣. المحتوى الوراثي لبكتريا Coagulase-Negative *S.aureus* .

المسار٤. المحتوى الوراثي لبكتريا *S. epidermidis*.

المسار ٥. المحتوى الوراثي لبكتريا *S. saprophyticus* .



شكل ٤-٣: الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز (٠.٨%) بفرق جهد ٤٠ فولت لمدة ساعتين والذي يظهر الدنا الكروموسومي لعزلات بكتريا العنقوديات المحيدة بمادة .

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

المسار٢. المحتوى الوراثي لبكتريا **Coagulase-Positive *S.aureus* .**

المسار٣. المحتوى الوراثي لبكتريا **Coagulase-Negative *S.aureu* .**

المسار٤. المحتوى الوراثي لبكتريا ***S. epidermidis*.**

المسار ٥. المحتوى الوراثي لبكتريا ***S. saprophyticus*** **.**

ملحق ١. المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام ورموزها ونسب تحميل ألاقراص واقطار التثبيط.

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز بالقرص (مايكروغرام)	أقطار التثبيط القياسية		
			حساس	متوسط	مقاوم
بنسيلين ج	PG	١٠	٢٩ فأكثر	٢١-٢٨	٢٠ فأقل
أمبيسيلين	Amp	١٠	٢٩ فأكثر	٢١-٢٨	٢٠ فأقل
أموكسيسيلين	Amx	٢٥	٢٨ فأكثر	٢٠-٢٧	١٩ فأقل
كلورامفينيكول	Cl	٣٠	١٨ فأكثر	١٣-١٧	١٢ فأقل
سيفوتاكسيم	Ct	٣٠	١٨ فأكثر	١٣-١٧	١٢ فأقل
أريثرومايسين	E	١٥	٢٣ فأكثر	١٤-٢٢	١٣ فأقل

جنتامايسين	Gm	١٠	١٥ فأكثر	١٤-١٣	١٢ فأقل
أوكساسيلين	Ox	٥	٢٠ فأكثر	١٩-١٦	١٩ فأقل
ريفامبيسين	Rfi	٥	٢٠ فأكثر	١٩-١٧	١٦ فأقل
تتراسايكلين	Tc	٣٠	١٩ فأكثر	١٨-١٥	١٤ فأقل
فانكومايسين	VA	٣٠	١٩ فأكثر	١٨-١٦	١٥ فأقل
ميثيسيلين	Mt	٥	١٤ فأكثر	١٣-١٠	٩ فأقل
لنكومايسين	LN	٢	١٧ فأكثر	١٦-١٤	١٣ فأقل
نوفوبايوسين	NV	٣٠	٢٢ فأكثر	٢١-١٨	١٧ فأقل
حامض النااليديكسك	NA	٣٠	١٩ فأكثر	١٨-١٤	١٣ فأقل
ترايميثوبريم	TP	٥	١٦ فأكثر	١٥-١١	١٠ فأقل

(Wesley , ١٩٩٨)