جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة تشخيصية و جزيئية لبكتريا *Streptococcus* spp المعزولة من امراض الفم والجهاز التنفسي العلوي في مدينة بعقوبة

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

هديل جليل ابراهيم

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2010

بإشراف

أ . د . عباس عبود فرحان الدليمي **أ . د . هادي رحمن رشيد الطائي**

1440 هـ **2018 م**

المقدمة Introduction

المكورات المسبحية *Streptococcus* مكورات موجبة لصبغة غرام وتضم العديد من الانواع وتكون ذات صفات مشتركة فيما بينها اذ تكون لاهوائية اختيارية وكروية الشكل ، حيث تعد جزءا من الفلورا الطبيعية في الانسان وتكون متعايشة في بيئته ، كذلك تعد من الممرضات المهمة في الانسان والحيوان وتمتلك القدرة على احداث العديد من الاصابات المختلفة في مواقع عديدة من الجسم مثل ذات الرئة وتسوس الاسنان والتهاب الاذن الوسطى (Brooks واخرون ، 2010) .

ان إمراضية جنس *Streptococcus* تكون مرتبطة بقدرتها على انتاج عدد من عوامل الضراوة التي تشتمل على انتاج السموم المحللة للدم مثل الهيمولايسين والتي تكون على انواع منها كاما وبيتا والفا اضافة الى انتاجها سموما معوية تسبب تسمما غذائيا ، كما انها تمتلك القدرة على انتاج العديد من الانزيمات الخارج خلوية مثل اللايبيز والبروتينيز والستربتوكاينيز التي تساعد البكتريا في غزو الانسجة وانتشار الاخماج ، بالإضافة الى امتلاك البكتريا جدار خلوي وان هذا الجدار يعد تركيبا مستضديا نتيجة لاحتوائه على تراكيب مستضدية ومنها (حامض التكويك ، وبروتين M ، والببتيدوكلايكان) ، حيث يقوم هذا الجدار بمقاومة الجهاز المناعي للمضيف ويشكل كذلك حماية ازموزية للخلية البكتيرية وغيرها من العوامل مما يعطي القدرة لهذا الجنس على الانتشار والتضاعف داخل انسجة العائل (Gillespie وHawkey، 2006) .

ان لهذا الجنس القدرة على التسبب بالعديد من الامراض مثل التهاب البلعوم واللوزتين وذات الرئة والتهاب السحايا وتجرثم الدم Bacteremia وكذلك التهاب الاجزاء الداخلية للقلب والتهابات الفم والانسجة الرخوة والحمى القرمزية ومتلازمة الصدمة السمية والحمى الروماتيزمية الناتجة عن التهاب المفاصل وغيرها من الامراض (Willems واخرون ،2013)

تعد مضادات Tetracycline من اهم عوائل المضادات الحياتية ، وذلك لأنها تستخدم في علاج العديد من الامراض التي تسببها البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة غرام ، ان الية عمل التتراسايكلين هي تثبيط عملية تصنيع البروتينات عن طريق الارتباط بالجزء 16s من الوحدة 30s للبكتريا وبالتالي ايقاف عملية الترجمة Translation (Mankin، 2008) . ان سوء استخدام المضادات الحياتية وكذلك كثرة الاستخدام من الاسباب التي ادت الى نشوء المقاومة المتعددة لمضادات الحياة مما ادى الى تدفق كبير للجينات في عالم الميكروبات اذ انتشرت المقاومة بشكل واسع بواسطة البلازميدات وغيرها من وسائل انتقال الجينات مما ساعد

الممرضات على مواجهة الضغط الانتخابي الذي تفرضه عليها المضادات الحيوية ، اذ اصبحت لديها مقاومة متعددة (الخفاجي، 2007، Larson ; 2008) . ان مقاومة Tetracycline ومشتقاته الاخرى تكون واسعة الانتشار في البكتريا الموجبة لصبغة غرام الكروية حيث تم ملاحظة زيادة المقاومة للتتراسايكلين في كافة انحاء العالم ، وان اليات المقاومة ضد عائلة التتراسايكلين هي اما بواسطة تغير موقع الهدف لعمل المضاد Alteration of target site أو تقليل نفاذية المضاد من خلال الغشاء الخارجي او من خلال التعبير الجيني للجين القافز Transposon الحاوي على جينات *tet* gene التي تشفر لهذه الالية ، او من خلال الدفق بواسطة انظمة الدفق الخارجي Efflux system (Reyes واخرون ،2007) . يعتبر الترانسبوزون من العناصر الوراثية الاساسية التي تشفر لمقاومة المضادات الحياتية وبعض من الصفات المظهرية مثل البكتريوسين وانتاج الهيمولايسين وهذه العناصر الوراثية تكون خارج كروموسومية Extra chromosomal genetic element (Kaplan و Stevene ،2000) .

ولقلة وجود الدراسات في العراق وبالأخص محافظة ديالى في موضوع الكشف الجزيئي عن طرق المقاومة لبكتريا *Streptococcus* spp لمضادات Tetracycline بين المرضى في مستشفيات محافظة ديالى فقد جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على ما يأتي:

1 – عزل بكتريا *S. pneumoniae* و *S.viridans* وتشخيصهما بالطرق المظهرية والكيموحيوية والجزيئية باستخدام الجينين التشخيصيين 16SrRNA و *rpo*A .

2 – معرفة حساسية البكتريا للمضادات الحياتية قيد الدراسة الحديثة الاستخدام في العراق وكذلك معرفة التركيز المثبط الادنى لمضاد التتراسايكلين

3 – دراسة بعض عوامل الضراوة المهمة الخاصة بالبكتريا .

4 – الكشف عن الجين *tet*M المشفر لمقاومة التتراسايكلين وكذلك معرفة احتواء العزلات البكتيرية على الجين *Tn916* وباستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR .

الخلاصة Summary

يعتبر مرض ذات الرئة وتسوس الاسنان من اكثر الامراض شيوعا في العالم ، وتلعب بكتريا *S. pneumoniae* و *S . viridans* دورا مهما في بداية المرض ،ونظرا لخطورة هذين المرضين وعدم وجود حلول ناجحة لعلاجهما فقد جاءت هذه الدراسة لمعرفة مسبباتها البكتيرية وتشخيصها باستخدام الجينين التشخيصيين وباستعمال تقنية PCR ، وتضمنت الدراسة جمع 150 عينة من مصادر سريرية شملت (القشع والفم) من مستشفى بعقوبة التعليمي ، والمركز التخصصي لطب الاسنان ومن العيادة الاستشارية للأمراض الصدرية وذلك للمدة الزمنية من 2017/8/6 ولغاية 2017/12/1 ، حيث اظهرت 60 عينة وبنسبة (40%) نموا سالبا للزرع البكتيري في حين ان 90 عينة وبنسبة (60%) اظهرت نموا موجبا للزرع . تم الحصول على 50 عزلة تعود للجنس*Streptococcus* spp شخصت العزلات باستخدام الاختبارات الكيموحيوية ، والزرعية ، والمجهرية ، وجزيئياً باستخدام الجينين التشخيصيين 16SrRNA و A*rpo* باستخدام تقنية PCR Conventional

تم اختبار حساسية جميع العزلات تجاه ثمان مضادات حياتية ، حيث اظهرت النتائج ان جميعها وبنسبة 100 % مقاومة لمضاد Bacitracin ، بينما كانت مقاومة *Streptococcus pneumoniae* للتتراسايكلين بنسبة 63.3% ، والسيبروفلوكساسين 72.7% ، والارثرومايسين 63.3% ، والكلندامايسين 18% ، والاوكمنتين 45% ، والدوكسيسايكلين 72% ، والكلارثرومايسين 36% . اما النوع . *S viridans* فقد كانت نسب المقاومة كالاتي 71.4% للتتراسايكلين و 57% لكل من للاوكمنتين والسيبروفلوكساسين والارثرومايسين والدوكسيسايكلين و 28% لكل من للكلارثرومايسين للكلندامايسين .

وحُدَّد التركيز المثبط الادنى MIC للعزلات البكتيرية قيد الدراسة لمضاد التتراسايكلين ، اظهرت العزلات *S. pneumoniae* و *S. viridans* مقاومة تجاه هذا المضاد عن طريق فحص الحساسية باستخدام طريقة الاقراص حيث تراوحت قيمة MIC للعزلات من (8-1024) مايكروغرام /مل .

تم التحري عن قابلية عزلات *S. pneumoniae* و *S. viridans* على انتاجها لبعض عوامل الضراوة وقد بينت النتائج قابلية تلك العزلات على انتاج بعض الانواع من الانزيمات والتي تسهم في امراضيتها ، كانت نسبة انتاج بكتريا *S. pneumoniae* لإنزيم البروتيز هي 27% ، والغشاء الحيوي 72% ، والبكتيريوسين 36% ، والهيمولايسين 63% ، والدنييز 63% ، والمحفظة 36% ، واللايبيز 9% ، في حين كانت نسبة انتاج بكتريا *S. viridans*