وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

التحري الجزيئي عن جينات بعض السموم لانواع البكتريا المسببة لألتهاب الأذن الوسطى

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل

شهادة الماجستير في علوم الحياة

من الطالبة

رؤى علي نوري

بكالوريوس علوم حياة / كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى (2021)

بإشراف

أ.د. صبا جاسم جواد الزبيدي

1447هـ **2025م**

الخلاصة Abstract

تضمنت الدراسة جمع 172 عينة من المرضى المصابين بالتهاب الأذن الوسطى المراجعين عيادات الأذن والانف والحنجرة (ENT) Ear Nose and Throat في مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى جلولاء العام في محافظة ديالى خلال المدة من شهر أيلول 2024 إلى شهر كانون الثاني 2025.إذ أظهرت نتائج الزرع أن 149 عينة أظهرت نموا أيجابيا بنسبة 86.60% على الأوساط الزرعية Blood agar وMacConkey agar والأوساط الانتقائية وسط السترمايد Cetrimide Agar، وسط المانيتول الملحي Mannitol Salt Agarووسط الأيوسين المثلين الأزرق Eosin Methylene Blue Agar (EMB)، و23 عينة بنسبة 13.40% لم تعطِ أيّ نمو ، فالعينات التي أعطت نمواً بكتيرياً 123 عينة بنسبة 71.5% 94 عزلة سالبة لصبغة كرام بنسبة 63% و29 عزلة الموجبة لصبغة كرام بنسبة 37%. شخصت العزلات بالطرق التقليدية وتم تأكيد التشخيص باستخدام جهاز Vitek2 compact system. كانت النسب للأنواع المعزولة هي بكتريا *P. aeruginosa* أكثر أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام تواجداً بنسبة 62(36%)، وتليها بكتريا *K. pneumoniae* بنسبة 19(11%)، بكتريا *P. mirabilis* و *E. coli* 6(3.4%) وأقلها ظهوراً *A. baumannii* بنسبة 1(0.58%)، وأما بالنسبة للبكتريا الموجبة لصبغة كرام كانت بكتريا *S. aureus* أكثر أنواع البكتريا الموجبة تواجداً بنسبة 19(11%) وتليها بكتريا *S.epidermidis* بنسبة 8(4.6%) وأقلها ظهورا بكتريا *E. faecalis* بنسبة 2(1.1%) .

بينتّ الدراسة ارتفاع نسبة الإصابة بالتهاب الأذن الوسطى في الذكور أعلى من الإناث وبفارق غير معنوي، والفئات العمرية (16-30) (1-15) على التوالي كانت أكثر الفئات العمرية تعرضاً للإصابة وبفارق غير معنوي، وبينتّ الدراسة أن التهاب الأذن الوسطى المزمن أكثر تواجداً لدى المرضى المصابين وبفارق غير معنوي ، وأما بالنسبة للموقع الجغرافي فإن نسبة الإصابة في المناطق الحضرية 59.3% بينما في المناطق الريفية بنسبة 40.7% وبفارق غير معنوي، ويؤثر المستوى التعليمي بشكل كبير في حدوث الاصابة وبفارق معنوي، وأظهرت الدراسة أنّ نسبة 43.6 % من المصابين هم من المدخنين ونسبة 26.2% من المصابين المعرضين للتدخين السلبي وبفارق غير معنوي أيضاً.

أظهرت نتائج اختبار مقاومة المضادات الحيوية ل 62عزلة من بكتريا *P. aeruginosa* ل 11 مضاد من المضادات الحيوية و19 عزلة من بكتريا *S. aureus* ل 9 مضادات حيوية، وهي الأكثر شيوعاً في علاج التهاب الأذن الوسطى، بطريقة الأقراص Kirby- Bauer لمعرفة نوع الاستجابة بالاعتماد على قياس منطقه التثبيط ومقارنه النتائج مع الجداول التي وردت في (CLSI

،2024)، إذ أظهرت نتائج الدراســة الحالية ان نســبة مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* كالتالي (Cefepimeبنسبة100%، Ticarcillin - Clavulanate بنسبة94.7%، Ceftazidimeبنسبة 73.6%، Ofloxacin بنســبة28.9 %، Piperacillin بنســبة 23.6%، Aztreonam بنســبة 23.6%، Ciprofloxacin بنســبة15.7%، Piperacillin _tazobactam بنســبة7.8 %، Imipenem بنسـبة5.2%، Meropenem بنسـبة 5.2%، Netilmicin بنسـبة5.2%) ،و، وأما بالنسـبة لبكتريا *S. aureus* فقد كانت نسـبة المقاومة كالتالي (Clarithromycinبنسـبة78.9%، Ofloxacinبنسـبة63.1%، Clindamycin بنسـبة52.6% ، Doxycycline بنسـبة 42.1%، Chloramphenicolبنسـبة31.5%، Gentamicin بنسـبة26.3%، Rifampin بنسـبة26.3%، Nitrofurantoinبنسبة 21.0%، Co - trimazole بنسبة15.7%).

تم التحري المظهري عن بعض عوامل الضراوة Virulence Factorsفكانت جميع عزلات بكتريا *P. aeruginosa* القيد الدراســة لها القدرة على إنتاج الغشــاء الحيوي القوي بنســبة 14(100%)، وقـدرتهـا على إنتـاج إنزيم البروتييز Protease وإنتـاج إنزيم اللايبيز Lipase بنسبة14(100%) و، وأما بالنسبة لبكتريا *S. aureus* فكانت أيضا جميع العزلات لها لقدرة على إنتاج الغشـاء الحيوي القوي وإنزيم التجلط Coagulase بنسبة 14(100%) ، وأما بالنسبة لإنتاج إنزيم الجلاتينيز Gelatinase فقد أظهرت 7 عزلات من بكتريا *S. aureus* وبنســبة (50%) قدرتها على إنتاج إنزيم الجلاتينيز في حين كانت 7 عزلات وبنسبة (50%) غير قادرة على إنتاجه.

أظهرت نتائج الكشــف الجزيئي عن أربع جينات الســموم *ToxA, Exo U* تابعه لبكتريا *P. aeruginosa* و *Pvl*، *Eta* تابعه لبكتريا *S. aureus* باسـتخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسـلسـل Polymerase Chain Reacton (PCR)وباسـتخدام بوادئ متخصـصـة للجينات فكانت نسـبة وجودها كالتالي: في بكتريا*P. aeruginosa* وجود الجين *ToxA* بنسـبة 14(100%)، وأما جين *ExoU* فوجد بنســبة 1(7.14%) ، وأما بالنســبة لبكتريا *S. aureus* فلم تظهر أيّ عزلة حاملة لجين *Pvl*، في حين ان جين *Eta* وجد بنسبة 1(7.14%).

الفصل الأول

المقدمـة

Introduction

1.المقدمة Introduction

التهاب الأذن الوسطى Otitis media هو أحد الأمراض المهمة التي تصيب جميع الفئات العمرية وكلا الجنسين، ويحدث نتيجة عدوى من مجموعة متنوعة من الكائنات الحية الدقيقة بما في ذلك البكتريا والفطريات والفيروسات ،إذ تنتقل هذه الكائنات من الانف والبلعوم الانفي عبر قناة أوستاكي Eustachian canal ،وتتجمع على الغشاء المخاطي الذي يبطن الشق الأوسط من الأذن مسببة التهاب الأذن الوسطى (Neeff وآخرون ،2016)، فهناك ثلاثة أنواع من التهاب الأذن الوسطى الأول هو التهاب الأذن الوسطى الحاد Acute Otitis Media، الذي يستمر لمدة تقل عن ستة أسابيع، والنوع الثاني هو التهاب الأذن الوسطى المزمن Chronic Otitis Media، عادة ما يكون مصحوبا بثقب في غشاء طبلة الأذن وإفرازات تخرج من الغشاء المثقوب، ويستمر لأكثر من ستة أسابيع. ، وأما النوع الثالث فهو التهاب الأذن الوسطى الإفرازي Otitis Media with Effusion، الذي يتميز بوجود إفرازات مصلية أو مخاطية أو قيحية في الأذن الوسطى أثناء الالتهاب (Poluanوآخرون ،2021).

يعد هذا المرض من الأمراض الالتهابية التي تؤثر على بطانة الغشاء المخاطي للأذن الوسطى والأجزاء المرتبطة بها (Jung وآخرون,2021)، ووفقًا لمنظمة الصحة العالمية (WHO) في عام 2015، إذ يقدر ان أكثر من 5% من سكان العالم، أيٍّ حوالي 328 مليون شخص بالغ و32 مليون طفل يعانون من فقدان السمع الناتج عن الإصابة التي عادة ما ينتج عن انتقال العدوى من الجهاز التنفسي العلوي عبر الانبوب البلعومي الانفي إلى الأذن الوسطى ومن ثم إلى الأذن عبر انبوب قناة أوستاكي (Elmanamaوآخرون، 2014).

هنالك عدة مسببات بكتيرية الالتهاب الأذن الوسطى ومن أهمها *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus pneumoniae* فضلاً عن البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae* و *Proteus mirabilis* (Swain وآخرون،2019)، وتوجد العديد من العوامل التي تؤدي في حدوث الإصابة بما في ذلك العمرو الجنس و الوضع الاجتماعي والاقتصادي و المستوى التعليمي والتدخين ووجود الامراض المزمنة وغيرها، وان تكرار الاستخدام لنفس المضادات الحيوية ضد النوع البكتيري نفسه ساهم في اكتساب البكتريا للمقاومة، وتصبح غير متأثرة بهذه المضادات الحيوية ، فيعود ذلك إلى تغييرات في الجدار الخلوي للبكتريا، أو إفراز الإنزيمات المحللة، وتعديل مواقع المستقبلات بالإضافة إلى العوامل الوراثية (Breijehوآخرون،2020).

إنّ تكرار حدوث البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية أصبحت معالجة الإصابات البكتيرية صعبة بسبب تكرار الإصابة بالبكتريا المقاومة للمضادات الحيوية، مما جعلها تمثل مشكلة كبيرة في علاج الأمراض، وتعد مقاومة هذه البكتريا للمضـــادات الحيوية من التحديات التي يواجهها الأطباء والباحثون في الوقت الحالي (Chinemerem وآخرون ،2022).

تتميز البكتريا بوجود العديد من عوامل الضـــراوة التي تســـاهم في التســـبب في الإصـــابة بالعدوى، وتشـمل هذه العوامل ما يتعلق بتركيب البكتريا نفسـها، مثل عوامل الالتصـاق كالأهداب، وكذلك السـموم مثل السـموم الداخلية (LPS) والخارجية مثل (السـموم العصـبية Neurotoxins، الســـموم المعويـة Enterotoxins، الســـموم الخلويـة Cytotoxins والســـموم الجلـديـة Dermotoxins) (Liuوآخرون ،2022) بالإضـــافة إلى إنزيمات مثل إنزيمات التحلل الدموي واليوريز واللايبيز والبروتييز.

الهدف من الدراسة:

إنّ التهاب الأذن الوسـطى مشـكله صـحية يعاني منها الكثير من الأشـخاص، ونظراً لأهمية الموضـــوع جاءت هذه الدراســـة لتهدف إلى عزل بعض الأنواع البكتيرية المســـببة لالتهاب الأذن الوسطى وتشخيصها ودراسة تأثير بعض العوامل على انتشار الإصابة فضلاً عن الكشف الجزيئي عن بعض جينات السموم للبكتريا المسببة للمرض، ولتحقيق الهدف اتبعت الخطوات الأتية:

1- عزل بعض أنواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وتشخيصها بالطرق التقليدية وتأكيد التشخيص باستخدام الفايتك.
2- دراسة تأثير بعض العوامل على انتشار المرض (الجنس، العمر، السكن، التدخين، مستوى التعليم، نوع الإصابة).
3- إجراء اختبار الحساسية لمجموعة من المضادات الحيوية.
4- الكشف المظهري عن بعض عوامل الضراوة للبكتريا الأكثر سبباً (الموجبة _السالبة لصبغة كرام) للالتهاب الأذن الوسطى.
5- الكشف الجزيئي عن بعض جينات السموم.

- بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* الكشف الجزيئي عن جين (*ExoU*،*ToxA*).
- بكتريا *Staphylococcus aureus* الكشف الجزيئي عن جين (*Eta* ،*Pvl*).