Rafidain Journal of Science
Vol. 29, No. 3, pp.14 -26 , 2020

DOI : 10.33899/rjs.2020.166315

https://rsci.mosuljournals.com

ISSN: 1608-9391
e-ISSN: 2664-2786

Received:22/5/2020
Accepted:17/7/2020

التحري عن قدرة بعض الجراثيم المعزولة من القثاطر الوريدية على تكوين الاغشية الحيوية وفعالية بعض المواد في إزالتها

***رعد محمد محمود**

مستشفى الحمدانية العام/ دائرة صحة نينوى/ وزارة الصحة

أميرة محمود محمد الراوي

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

***E-mail: moradraad713@yahoo.com**

الملخص

تضمن البحث التحري عن بعض الجراثيم الملوثة لأجهزة القثاطر الوريدية لدى مرضى الغسيل الكلوي في مستشفى إبن سينا التعليمي (الموقع البديل) ثم اختبار قدرة الجراثيم المعزولة على تكوين الغشاء الحيوي بالطريقتين اكار احمر الكونغو والانبوب فضلاً عن تقييم فعالية بعض المواد على إزالة الغشاء الحيوي.

أظهرت النتائج أن الجراثيم الملوثة لأجهزة القثاطر الوريدية شملت: *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus haemolyticus* و *Burkholderia cepacia*. كما أظهرت الدراسة الحالية أن قدرة الجراثيم اعلاه على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الانبوب جاءت بواقع 2،3 و0 جرثومة على التوالي، أما قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة اكار احمر الكونغو جاءت بواقع 1،2 و0 جرثومة على التوالي. كما بينت النتائج القدرة العالية للمضادين Vancomycin و Meropemen 10% لكل منهما ومادة الشب 20% فضلاً عن عصير الليمون الطبيعي على إزالة الغشاء الحيوي المتكون بواسطة جرثومة *S.aureus* أما المواد الاخرى التي استخدمت فلم تبد قدرتها على ازالة الغشاء الحيوي.

الكلمات الدالة: القثاطر الوريدية، الغشاء الحيوي، *Staphylococcus aureus*، المواد المثبطة للغشاء الحيوي

المقدمة

تعرف القثطرة الوريدية Cervical Vein Catheter (CVC) على انها جهاز يستخدم في عملية الغسيل الكلوي في الحالات الطارئة التي تتطلب عملية الغسيل بصورة مستعجلة، يتم ادخال الجهاز في الوريد في منطقة الرقبة، يُصنع جهاز القثطرة الوريدية من مواد عديدة من اهمها السليكون والبولي يوريثين ويتم تغليف الجهاز بمواد مانعة للتخثر ومواد مضادة للجراثيم للمحافظة على الجهاز لفترة اسبوعين او ثلاثة اسابيع، من المضاعفات المرافقة لاستخدام جهاز القثطرة الوريدية هو التهاب النسيج في منطقة الرقبة بسبب تعرضه للجراثيم وتكون القيح في منطقة خروج الجهاز من الجسم مع احمرار وتورم وألم وقد تمتد الالتهابات ونمو الجراثيم الى داخل الجهاز مؤدياً الى تجرثم الدم Bacteremia (Nissenson and Fine, 2017) ،من اهم الانواع الجرثومية المسببة لتجرثم الدم هي .*Staphylococcus* spp وغالباً ما يكون تجرثم الدم عن طريق القثاطر الوريدية، إضافةً الى قدرة أغلب الجراثيم المسببة لتجرثم الدم على تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) على اجهزة القثاطر الوريدية مما يزيد من امراضية وفوعة هذه الاصابات خاصةً في حال وصولها الى اجزاء اخرى من الجسم (Glerup *et al.*, 2019 ; Pelletier *et al.*, 2016) تعرف الاغشية الحيوية على انها عبارة عن مجتمع يتكون من نوع واحد او أنواع مختلفة من الكائنات الحية الدقيقة المرتبطة مع بعضها على اسطح معينة ومن ضمنها الاجهزة الطبية المنغرزة في جسم المريض، تلجأ الجراثيم الى تكوين الغشاء الحيوي كواحدة من اليات الدفاع مما يؤدي الى زيادة مقاومة هذه الجراثيم للمضادات الجرثومية (Piegerovă *et al.*, 2019 ; Iglesias *et al.*, 2019). يعد منع التصاق الجراثيم على السطوح احدى الخطوات المهمة لمنع تكوين الاغشية الحيوية، والطرق الجديدة والمثيرة للاهتمام لمنع التصاق الجراثيم هي استخدام الطلاء الخلوي مع الببتيدات المضادة للجراثيم التي تغير الخصائص الكيميائية للسطح وبالتالي تتداخل مع التصاق الجراثيم وتمنع التصاقها بالسطح فيمنع تكوين الاغشية الحيوية على الاجهزة الطبية الاصطناعية، يستخدم العديد من الطلاءات البوليمرية لطلاء السطوح لمنع التصاق الجراثيم، قد تكون هذه الطلاءات مضادات حيوية او مواد طبيعية (Somma *et al.*,2020)، ذكر الباحث (2016) Algburi *et al.*, أنه يوجد بعض الزيوت الاساسية لمنع تكوين او إزالة الاغشية الحيوية المتكونة بفعل انواع من الجراثيم مثل *Staphylococcus aureus* و.*Pseudomonas* spp ومن هذه الزيوت: القرفة الصينية cassia، زعتر احمر red thyme ، زيت شجرة الشاي tea tree oil، زيت البلسم بيرو، زيت الزيتون و زيت الحبة السوداء وغيرها. أما الباحث Jocker (2018) ذكر سبعة مواد منها الكركم وشراب خل التفاح وبعض زيوت التوابل وزيت النعناع والثوم وبيربرين Berberine والفحم المنشط لتحطيم او منع تكوين الاغشية الحيوية. كذلك اشار الباحثان Kumari (2017) و Bhattacharya، أن عصير الليمون يحتوي على بروتينات واحماض امينية اساسية مثل الليوسين وهذه المكونات غير سامة لخلايا الجسم بالإضافة الى عدم احتواء العصير على كيتونات ويمكن استخدام الليوسين تجارياً في معالجة بعض الحالات المرضية وفي إزالة الاغشية الحيوية المتكونة بواسطة بعض الجراثيم، فيما ذكر الباحث Al-Talib *et al.*, (2016) أن الشب له تأثيرات ممتازة مضادة للجراثيم المنتجة للرائحة الابطية ويوصى باستخدامه إما مباشرة عن طريق التطبيق الموضعي أو كعنصر نشط في مزيلات الروائح ومضادات التعرق، بالإضافة الى التأثير العالي للشب ضد أنواع مختلفة من الجراثيم ومن ضمنها *S.aureus* والتركيز المثبط لهذه المادة أكثر من 5%، تعزى بعض الافتراضات الى ان الشب له تأثير مضاد للجراثيم عن طريق تقليل الحموضة وبالتالي التأثير الضار على جدار الخلية الجرثومية وتحطيمها، علاوة على ذلك تؤكد الدراسات النسيجية سلامة ملح الشب لاستهلاك الثدييات، أما الباحث Lu *et al.*, (2014)فقد ذكروا أن العسل يمكنه الدخول الى طبقة الغشاء الحيوي للجرثومة *S.aureus* وقتل الخلايا الجرثومية وبذلك إزالة الغشاء الحيوي للجرثومة واضافوا ان هذه الخاصية تعتمد على نوع العسل المستخدم.

هدفت الدراسة الحالية التحري عن مدى تلوث بعض اجهزة القثاطر الوريدية لدى مرضى الغسيل الكلوي واختبار قدرة الجراثيم المعزولة على تكوين الاغشية الحيوية بطريقتي أكار احمر الكونغو والانبوب فضلاً عن التحري عن فعالية بعض المواد على إزالة الغشاء الحيوي.

المواد وطرائق العمل

أولاً: المواد

الاجهزة والمواد المستخدمة

جهاز القثطرة الوريدية (CVC) ، جهاز فايتك Vitek 2 System

المضادان Vancomycin وMeropenem: استخدمت بتركيز 10 % لكل مضاد تم أذابة 1 غرام من كل مضاد (الشركة المجهزة للمضادين Neroside / تركيا) في 10 سم^3 من الماء المقطر المعقم.

تم استخدام الزيوت الطبيعية والمجهزة من معمل عماد/ نينوى وهذه الزيوت شملت: زيت الزيتون، زيت الحبة السوداء، زيت الجزر، زيت النعناع، زيت السمسم وزيت الزعتر، العسل الطبيعي (العسل العراقي والعسل الفرنسي الابيض) عصير الليمون الطبيعي جميع المواد اعلاه أُستخدمت بدون تخفيف، لبان الذكر وبيكربونات الصوديوم استخدمت بتركيز 10%، الشب تم استخدامه بتركيزين 10% و20%، جميع المواد المذكورة اعلاه تم تعقيمها بالبسترة لغرض التأكد من عدم تلوثها.

الاوساط الزرعية

وسط أكار احمر الكونغوCongo red agar، وسط Tryptic soy broth المضاف له 1% كلوكوز، وسط أكار الماكونكي MacConky's agar medium، وسط أكار الدم Blood agar medium، وسط أكار الجوكليت Chocolate agar medium ، وسط مرق منقوع المخ والقلب Brian heart infusion broth (جميع الاوساط اعلاه تم تجهيزها من شركة Lab Media/ المملكة المتحدة)، وتم تحضير كل وسط بالاعتماد على

(Cappuccion and Welsh, 2018; Sultan and Nabiel, 2019)

المحاليل والصبغات: المحلول الفوسفاتي الملحي المنظم، صبغة كريستال البنفسجية، صبغة احمر الكونغو

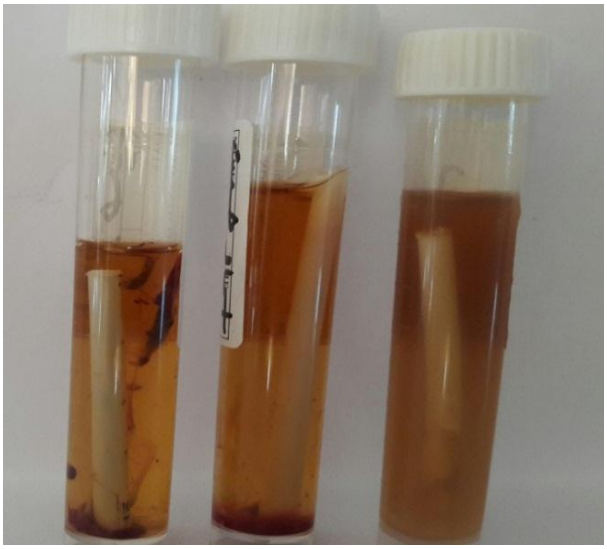
الاختبارات التشخيصية:

تم تشخيص جميع العزلات بإستخدام جهاز فايتك Vitek 2 System من شركة Biomerieux الفرنسية وأجريت الفحوصات في مستشفى بار في اربيل/ العراق. ثم أُجري اختباران لكل نوع جرثومي للتحري عن قابلية كل نوع على تكوين الغشاء الحيوي وتضمن الاختباران: طريقة الانبوب Tube Method وطريقة اكار احمر الكونغو Congo Red Agar Method.

ثانياً: طرائق العمل

جُمعت 10 قثاطر وريدية (العدد الذي تم الحصول عليه اثناء مدة الدراسة) من المرضى الخاضعين لعملية الغسيل الكلوي في مستشفى ابن سينا التعليمي (الموقع البديل) بعد ان يوصي الطبيب بضرورة رفع جهاز القثطرة الوريدية من جسم المريض بسبب انسداد الجهاز نتيجة حدوث تخثر الدم داخل الجهاز او نتيجة حدوث التهاب للنسيج المحيط بالجهاز وخروج قيح مع رائحة كريحة من منطقة الالتهاب بحيث لا يمكن اجراء عملية الغسيل بالجهاز حينها يقوم الكادر الطبي بسحب جهاز القثطرة الوريدية من رقبة المريض، تم وضع جهاز القثطرة الوريدية مباشرةً داخل كيس معقم كما في الصورة (1 أ)، تم ايصال جهاز القثطرة الوريدية الى مختبر المستشفى مباشرةً وتحت ظروف معقمة تم تقطيع جهاز القثطرة الوريدية بواسطة مقص معقم الى قطع صغيرة كل قطعة حوالي 4-6 سنتيمتر، وضعت كل قطعة مباشرةً داخل انبوب اختبار حاوٍ على وسط منقوع المخ والقلب (BHI) المحضر مسبقاً والمحفوظ في الثلاجة كما في الصورة (1 ب)، ثم حُضن الوسط الحاوي على قطع جهاز القثطرة الوريدية في الحاضنة عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة، بعد انتهاء فترة التحضين رجت الانابيب وأُخذت قطرات منها وتم تلقيح وسط أكار الماكونكي و وسط اكار الدم و وسط الجوكليت (تم اخذ عينات من جميع الاوساط الحاوية على قطع القثطرة الوريدية لنفس المريض)، ثم حُضنت الاوساط عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة (وضع وسط الجوكليت في الجار لتوفير CO2)، بعد انتهاء مدة التحضين تم ملاحظة كل وسط للتحري عن وجود نمو جرثومي عليه ثم أُجريت الفحوصات التشخيصية للأنواع النامية، بعد انتهاء الفحوصات التشخيصية تم نقل جزء من المستعمرات النامية ولقحت في وسط منقوع المخ والقلب (BHI) المحضرة مسبقاً

في انابيب اختبار والمحفوظة في الثلاجة، حُضنت الانابيب عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة، بعد انتهاء مدة التحضين حُفظت العينات الجرثومية في الثلاجة لحين الاستخدام.



أ ب

الصورة 1: جهاز القثطرة الوريدية أ. جهاز القثطرة الوريدية بصورة كاملة داخل كيس معقم
ب. قطع جهاز القثطرة الوريدية داخل انبوب اختبار حاوٍ على وسط منقوع المخ والقلب(BHI)

بعد الانتهاء من تشخيص العزلات تم إجراء اختبار قدرة الجراثيم المعزولة من عينات القثطرة الوريدية على تكوين الغشاء الحيوي وبطريقتين:

أ _ طريقة الانبوب Tube Method

باستخدام لوب معقم أُخذ حملة لوب من وسط منقوع المخ والقلب (BHI) الحاوي على الجرثومة المشخصة والمعزولة من عينات القثطرة الوريدية وتم تلقيح وسط أكار الماكونكي بالنسبة للجراثيم السالبة لصبغة كرام او وسط أكار الدم و وسط اكار المانيتول الملحي بالنسبة للجرثومة .*Staphylococcus* spp، حُضنت الاوساط عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة، بعد انتهاء مدة التحضين تم أخذ جزء من المستعمرة الجرثومية النامية ولقح كل نوع داخل انبوب اختبار يحتوي على وسط trypticase soy broth المعقم والمحضر مسبقا والمضاف له 1% كلوكوز، تم تحضين الاوساط لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ، بعد انتهاء مدة التحضين سُكبَ الوسط ثم غُسل الانبوب بمحلول الفوسفات الملحي المنظم phosphate buffer saline، وضع الانبوب بصورة معكوسة ليجف ثم أُضيف صبغة الكريستال البنفسجية بتركيز 1% الى كل انبوب لمدة 15 دقيقة ثم غُسل الانبوب بماء خالٍ من الايونات deionized water، وُضع الانبوب بصورة معكوسة ليجف، تم ملاحظة تكوين الاغشية الحيوية في كل انبوب (Sultan and Nabiel,2019).

ب_ طريقة اكار احمر الكونغو Congo Red Agar Method

أُخذت حملة لوب من كل نوع من الجراثيم المشخصة والمعزولة من عينات القثطرة الوريدية والمحفوظة في وسط منقوع المخ والقلب وتم تلقيحها في اطباق حاوٍ على وسط اكار الماكونكي بالنسبة للجراثيم السالبة لصبغة كرام أو وسط أكار الدم و وسط اكار المانيتول الملحي بالنسبة للجرثومة .*Staphylococcus* spp، حُضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ، بعد انتهاء مدة

التحضين تم أخذ جزء من المستعمرة الجرثومية النامية لكل نوع وتم تلقيح كل نوع في وسط اكار احمر الكونغو المحضر مسبقا، حُضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ بعد انتهاء فترة التحضين تم الكشف عن قابلية الجراثيم المعزولة على تكوين الاغشية الحيوية من خلال تحول لون الوسط الى اللون الاسود وظهور المستعمرات بلون اسود بلوري (2018) ,.Shrestha *et al*.

بعد الانتهاء من اختبار قدرة الجراثيم المعزولة على تكوين الغشاء الحيوي تم اختيار جرثومة *Staphylococcus aureus* في تجربة التحري عن قابلية بعض المواد على إزالة الغشاء الحيوي المتكون بواسطة الجرثومة اعلاه وكالاتي:

تحت ظروف معقمة تم تقطيع جهاز القثطرة الوريدية الى عدة قطع كل قطعة بحدود 3–4 سنتيمتر، وضعت القطع في انبوب اختبار حاوٍ على وسط منقوع المخ والقلب السائل كما في الصورة (2)، عُقم الوسط مع القطع باستخدام الاوتوكليف بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 15 باوند /إنج² لمدة 15 دقيقة، تم تحضير معلق لجرثومة *S.aureus* بتركيز 1× 10^8خلية/ سم³ بالمقارنة مع محلول ماكفرلاند الانبوب رقم 0.5، بواسطة عروة معقمة نُقل جزء من المعلق الجرثومي الى وسط منقوع المخ والقلب الحاوي على قطع القثطرة الوريدية ثم حُضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 72 ساعة لضمان تكوين الغشاء الحيوي على القطع، بعد انتهاء مدة التحضين تم التأكد من ظهور النمو بشكل واضح في الوسط (الجرثومة اعلاه تم اختبار قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي سبق ذكرها) ثم باستخدام ملقط معقم نقلت جميع القطع و وضعت في المادة المراد معرفة فعاليتها على إزالة الاغشية الحيوية المتكونة على قطع القثاطر الوريدية.

بعد مرور ساعتين وباستخدام ملقط معقم تم سحب قطعة واحدة من قطع القثاطر الوريدية الموجودة في المادة و وضعت القطعة مباشرةً في انبوب اختبار حاوٍ على وسط منقوع المخ والقلب المحضر والمعقم مسبقاً ثم وضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ، وبعد مرور 6 ساعات تم سحب قطعة اخرى و وضعت في وسط منقوع المخ والقلب ثم وضعت في الحاضنة، كررت العملية بعد 6، 12 ،24 و 48 ساعة، بعد 48 ساعة تم سحب القطعة الاخيرة و وضعت في وسط منقوع المخ والقلب وحضنت لمدة 24 ساعة، بعد انتهاء فترة التحضين تم ملاحظة وجود النمو الجرثومي(العكورة) في كل انبوب يحتوي قطعة القثطرة الوريدية، إن وجود النمو في الانبوب الاخير(الوقت الاخير48 ساعة) دلالة على عدم فعالية المادة المستخدمة في إزالة الاغشية الحيوية المتكونة على قطعة القثطرة الوريدية، ولغرض التأكد من وجود نمو لجرثومة *S.aureus* تم تمرير قطعة القثطرة الوريدية بعد كل مدة زمنية (2، 6، 12، 24 و48 ساعة) بشكل الرولة على وسط أكار المانيتول الملحي وحُضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة بعد انتهاء فترة التحضين تم ملاحظة وجود نمو للجرثومة اعلاه.

ان بقاء وسط مرق نقيع المخ والقلب رائق دلالة على فعالية المادة المستخدمة على إزالة الاغشية الحيوية، سُجلت الأوقات التي تم إزالة الاغشية الحيوية من قبل كل مادة قيد الدراسة، وللتأكد من عدم وجود نمو جرثومي على قطعة القثطرة الوريدية سُحبت القطعة باستخدام ملقط معقم ومررت بشكل الرولة على وسط أكار المانيتول الملحي وحُضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة، بعد انتهاء مدة التحضين وعدم ظهور نمو جرثومي على الوسط دلالة على الوقت المناسب لإزالة الأغشية الحيوية بواسطة المادة المستخدمة.

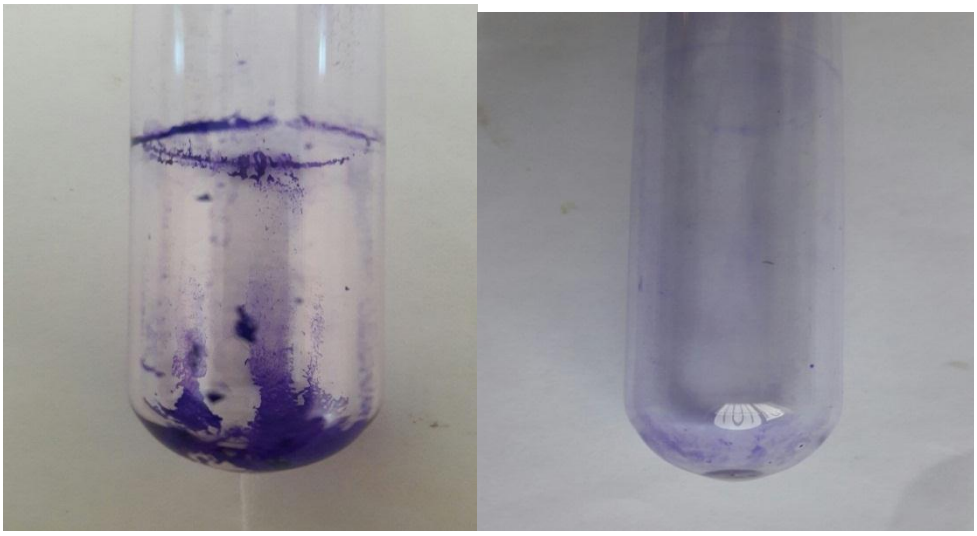
الصورة 2: قطع القثطرة الوريدية في وسط نقيع المخ والقلب

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج التحري عن قابلية الجراثيم المعزولة من عينات القثطرة الوريدية على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الانبوب بدلالة ظهور طبقة بنفسجية على جدران أو قعر الانابيب دلالة على النتيجة الموجبة كما في الصورة (1 أ) أما الجراثيم غير المكونة للغشاء الحيوي تم تميزها ببقاء الانبوب دون ظهور طبقة بنفسجية على جدرانها او قعر الانبوب كما في الصورة (1 ب).

أما عند استخدام طريقة اكار احمر الكونغو فظهرت الجراثيم المكونة للغشاء الحيوي بشكل مستعمرات سوداء اللون وبلوري المظهر كما في الصورة (2 أ) في حين ظهرت الجراثيم غير المكونة للغشاء الحيوي بشكل مستعمرات حمراء او وردي اللون كما في الصورة (2ب).

جاءت هذه النتائج مطابقة للعديد من الدراسات التي اشارت الى أن ظهور طبقة بنفسجية في قعر الانبوب اثناء التحري عن الجراثيم المكونة للأغشية الحيوية بطريقة الانبوب دلالة على النتيجة الموجبة، اما ظهور المستعمرات بلون اسود براق بطريقة اكار احمر الكونغو دلالة أن الجراثيم مكونة للأغشية الحيوية بهذه الطريقة.(Kirmusaogu, 2019 ; Shrestha *et al.*,2018)



(أ) (ب)

الصورة 1: اختبار تكون الغشاء الحيوي بطريقة الانبوب

أ. نتيجة موجبة **ب. نتيجة سالبة**

(أ) **(ب)**

الصورة 2: اختبار تكون الغشاء الحيوي بطريقة أكار احمر الكونغو

أ. نتيجة موجبة **ب. نتيجة سالبة**

الجراثيم المكونة وغير المكونة للأغشية الحيوية وباستخدام الطريقتين أكار احمر الكونغو وطريقة الانبوب موضحة في (الجدول 1).

أظهرت جرثومتي *S.aureus* و*S.haemolyticus* قدرتهما على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الانبوب اعلى من قدرتهما على تكوين الغشاء بطريقة أكار احمر الكونغو ، فيما يخص جرثومة *Burkholderia cepacia* أظهرت نتائج التحري عن قدرة الجرثومة على تكوين الغشاء الحيوي انها غير قادرة على تكوين الغشاء الحيوي وبالطريقتين الانبوب واكار احمر الكونغو.

الجدول 1: الجراثيم الموجبة والسالبة لتكوين الغشاء الحيوي بطريقتي الانبوب وأكار احمر الكونغو

نوع الجرثومة	قدرة الجراثيم المعزولة على تكوين الغشاء الحيوي	عدد العزلات الموجبة والسالبة لتكوين الغشاء الحيوي			
		طريقة الانبوب		طريقة اكار احمر الكونغو	
		الموجبة	السالبة	الموجبة	السالبة
S.aureus	4	3	1	2	2
S.haemolyticus	2	2	0	1	1
Burkholderia cepacia	3	0	3	0	3

ذكر الباحث Halim *et al.*, (2018) أن قدرة جرثومة *S.aureus* على تكوين الغشاء الحيوي اعلى من قدرة *S.haemolyticus* على ذلك، وذكروا أن نسب تكوين الاغشية الحيوية بطريقة الانبوب او طريقة اكار احمر الكونغو تتفاوت من جرثومة الى اخرى ويعزى سبب ذلك الى اختلاف الحساسية والتخصصية لكل طريقة، وذكروا أنه عند استخدام طريقة الانبوب للتحري عن قدرة *S.haemolyticus* على تكوين الغشاء الحيوي كانت هذه الطريقة اكثر حساسية وتخصصية من طريقة اكار احمر الكونغو، وكذلك الباحثتان العمري و الراوي (2013) ذكرتا أن طريقة الانبوب أفضل من طريقة أكار احمر الكونغو للكشف عن قدرة الجراثيم على تكوين الغشاء الحيوي وكذلك في الدراسة الحالية لاحظنا تفاوت في النتائج بين الطريقتين وظهرت قدرة الجراثيم على تكوين الاغشية الحيوية بطريقة الانبوب اعلى من طريقة اكار احمر الكونغو، كذلك تقاربت نتائج الدراسة الحالية مع

نتائج الباحثان (2015) Devaraj و Sajjan، إذ اشارا الى ان جرثومة *S.aureus* كونت الغشاء الحيوي بطريقة الانبوب بنسبة 63.63% فيما لم تتفق نتائجنا معهما بنسبة تكوين الجرثومة للغشاء الحيوي بطريقة اكار احمر الكونغو إذ كونها بنسبة 27.27% فقط، اما الباحثة (2014) Deka، فقد اشارت الى ان 21% من عزلات *S.haemolyticus* قادرة على تكوين الغشاء الحيوي وبذلك لم تتفق نتائجنا في هذا المجال ربما يعزى سبب ذلك الى ان دراسة الباحث لم تكن سريرية أو قلة العزلات اثناء دراستنا الحالية.

نتائج اختبار فعالية بعض المواد على إزالة الغشاء الحيوي

جاءت نتائج استخدام بعض المواد لإزالة الغشاء الحيوي المتكون على جهاز القثطرة الوريدية (CVC) بواسطة جرثومة *S. aureus* كالاتي:

ابدى المضادان Vancomycin و Meropemen فعالية عالية لإزالة الغشاء الحيوي إذ تبين ان طبقة الغشاء الحيوي قد زالت بعد 2 ساعة من وضع جهاز القثطرة في انبوب اختبار يحتوي على أحد المضادين.

جاءت هذه النتائج متفقة مع دراسة مشابهه للباحث Post *et al.*, (2016) إذ اشاروا الى القدرة العالية للمضاد الحيوي Vancomycin لإزالة الغشاء الحيوي للجرثومة *S.aureus* المتكونة على الواح التيتانيوم والالمنيوم وخلال وقت قصير جداً، كذلك دراسة الباحث Badha *et al.*, (2019) على إزالة الغشاء الحيوي المتكون على العضلات ونخاع العظم داخل الجسم وجدوا أن الوقت الكافي لإزالة الغشاء الحيوي بواسطة 10% من مضاد Vancomycin من 6 −12 ساعة، وعند اختبار الباحث Tavernler *et al.*, (2017) لعدد من المضادات الحيوية ضد أنواع مختلفة من الجراثيم مكونة للغشاء الحيوي لاحظوا أن الغشاء الحيوي لجرثومة *S.aureus* يتأثر بشكل كبير عند استخدام المضادات Meropenem ،Vancomycin و Imepenem ،فيما لم تتفق نتائجنا مع نتائج الباحث Domenico *et al.*, (2019) إذ لم يُظهر المضاد Vancomycin قدرته على ازالة الغشاء الحيوي المتكون بواسطة جرثومة *S.aureus*.

وعند استخدام عصير الليمون الطبيعي لإزالة الغشاء الحيوي فقد أظهرت النتائج القدرة العالية للعصير في ازالة الغشاء الحيوي وجاءت فعاليته مشابهة لفعالية المضادين السابقين إذ أزال الغشاء الحيوي المتكون على قطعة القثطرة الوريدية خلال 2 ساعة.

بينت العديد من الدراسات فعالية الليمون على الجراثيم، من هذه الدراسات تجربة الباحث Al-Ani *et al.*, (2010) لثلاثة انواع من العصائر من بينها عصير الليمون وبتراكيز مختلفة استخدمت لمعرفة فعاليتها ضد انواع مختلفة من الجراثيم ومن ضمنها *S.aureus* حيث أظهرت نتائجهم التأثير القاتل لعصير الليمون بتراكيز بين 10% − 20% وذكروا أن استخدام عصائر الحمضيات ومن بينها عصير الليمون أعطت تأثير قاتل للجراثيم أقوى من المضادات الحيوية التي استخدمت في نفس الوقت، وفي دراسة للباحثة Burhan (2018) لتقييم فعالية بعض المواد الطبيعية على تثبيط الاغشية الحيوية المتكونة على الواح تقطيع الاسماك الطازجة أظهرت نتائجها التأثير القاتل لعصير الليمون الممزوج مع ملح الطعام في القضاء على جميع الجراثيم المتكونة على هذه الالواح ومن بين هذه الجراثيم كانت .*Staphylococcus* spp، كما جاءت نتائج الدراسة الحالية متفقة مع نتائج الباحثان Kumari (2017) و Bhattacharya حيث اشارا الى التأثير الكبير لعصير الليمون في إزالة الغشاء الحيوي لجرثومة *S.aureus* وكذلك ذكرا أن عصير الليمون يحتوي على بروتينات واحماض امينية مثل الليوسين وهذه المكونات غير سامة لخلايا الجسم.

أما مادة الشب التي استخدمت بتركيزين 10% و20% فتبين أن التركيز الاول أزالت الغشاء الحيوي بعد 12 ساعة أما التركيز الثاني كان له تأثير أقوى إذ أزالت الغشاء خلال ساعتين فقط (تم استخدام تركيزين للشب لمعرفة تأثير زيادة التركيز في ازالة الغشاء الحيوي بوقت اقل).

أشارت العديد من الدراسات الى فعالية الشب ضد أنواع مختلفة من الجراثيم فضلاً على استخدام هذه المادة في مجالات اخرى، ذكر الباحثان Roqaiya (2015) و Begum أن الشب دواء معدني من اصل يوناني أُستخدم كمضاد للجراثيم حيث أبدت فعاليتها في إزالة تسوس الاسنان عند استخدامها كمحلول غرغرة فهو يعالج التهابات اللثة والاسنان وبالتالي يزيل الجراثيم المكونة للغشاء الحيوي على الاسنان فضلاً على استخدام الشب كمضاد لأمراض العين وغيرها من الاستخدامات لهذه المادة، كما بين الباحث Ali (2018)، اثناء دراسته لأنواع مختلفة من الجراثيم المقاومة لطيف واسع من المضادات الحيوية إلا ان هذه الجراثيم كانت حساسة لمادة الشب بتراكيز 16% و20%، وأضافَ ان مادة الشب تعتبر قاتلة للجراثيم وبنفس الوقت يمكن استخدامها كمادة مزيلة للأغشية الحيوية المتكونة بواسطة بعض الجراثيم، أما الباحث Bnyan *et al.*, (2014) فقد أشاروا الى فعالية الشب ضد انواع مختلفة من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام ومن بينها *S.aureus* واكدوا أن التركيز 20% هو التركيز الادنى لتثبيط النمو.

أما المواد الاخرى التي استخدمت ولم تبدِ فعاليتها في إزالة الغشاء الحيوي شملت:

لبان الذكر وبيكاربونات الصوديوم والتي استخدمت بتركيز 10% لكل منهما، العسل الجبلي العراقي والعسل الابيض الفرنسي، زيت الزيتون، زيت الحبة السوداء، زيت السمسم، زيت الزعتر، زيت النعناع، زيت الجزر.

بينت نتائج الباحث Birkenhauer *et al.*, (2014) أن وجود لبان الذكر او ما يسمى الكولاجين لا يمنع التصاق الجراثيم على سطح انابيب الاختبار بل يزيد من التصاق هذه الجراثيم وتكوينها للغشاء الحيوي على انابيب الاختبار لذلك عند وجود هذه المادة على البشرة لفترات طويلة قد يؤدي الى تكوين الاغشية الحيوية للجراثيم الموجودة بشكل طبيعي على الجلد.

لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الباحثين Yaseen (2016) و Najm، إذ اشارا الى فعالية بيكاربونات الصوديوم والعسل ضد تكوين الغشاء الحيوي بواسطة جرثومة *S.aureus* وذكرا ان هذه المواد عندما تعطى للمريض مع المضادات الحيوية يزيد من تأثير وفعالية المضادات المستخدمة، كذلك اشار الباحث Dobay *et al.*, (2018) أن بيكاربونات الصوديوم يمكنها اختزال نمو الجراثيم ومن ضمنها *S.aureus*.

ذكر الباحث Alandejani *et al.*, (2008) أن العسل له تأثير قاتل للخلايا الجرثومية الحرة إلا انه غير قادر على إزالة الغشاء الحيوي لهذه الجراثيم ومن ضمنها *S.aureus* وبذلك جاءت هذه النتيجة متفقة مع نتائج دراستنا الحالية، أما الباحث Lu *et al.*, (2014) فقد ذكروا أن عسل Manuka يمكنه الدخول الى طبقة الغشاء الحيوي للجرثومة *S.aureus* وقتل الخلايا الجرثومية وبذلك إزالة الغشاء الحيوي للجرثومة إلا انه في حالات اخرى قد يُحسن العسل نمو بعض سلالات جرثومة *S.aureus*

أما الباحث Kerekes *et al.*, (2019) فاستخدموا انواعاً مختلفة من الزيوت لإزالة الغشاء الحيوي المتكون بواسطة انواع مختلفة من الجراثيم ومن بينها *S.aureus* أظهرت نتائجهم أن تأثير زيت الزعتر كان الاقوى من بين بقية الزيوت في إزالة الغشاء الحيوي لهذه الجرثومة وبذلك لم تتفق نتائجنا في هذا المجال.

فيما يخص الحبة السوداء اشار الباحث Ghaieb *et al.*, (2011) الى امكانية استخدام هذه المادة لتثبيط النمو الجرثومي ومنع تكوين الغشاء الحيوي لبعض سلالات جرثومة *S.aureus* الا انه يتطلب المزيد من الدراسات لاستخدام هذه المادة كمضاد للمايكروبات ومنع تكوينها للأغشية الحيوية، لم تتفق نتائجنا مع نتائج الباحث Saleh *et al.*, (2018) الَّذين اشاروا الى التأثير العالي للحبة السوداء ضد الجراثيم فضلاً عن قدرتها على منع تكوين الاغشية الحيوية بواسطة الجراثيم الموجبة لصبغة كرام ومن بينها المكورات العنقودية.

فيما يتعلق بزيت الجزر بعض الدراسات ومنها دراسة الباحث Alves-silva *et al.*, (2016) اشاروا الى أن هذه المادة تقلل من فعالية بعض الجراثيم إلا ان قدرة هذه المادة على إزالة الغشاء الحيوي للجراثيم تحتاج الى المزيد من الدراسات، أما نتائج

الباحث Khalil *et al.*, (2018) قد بينت عدم فعالية زيت الجزر ضد انواع مختلفة من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام وبذلك عززت هذه النتائج نتائجنا في هذه المجال.

جاءت نتائجنا متفقة مع نتائج الباحث Vetas *et al.*, (2017) فيما يخص استخدام زيت النعناع حيث أكدوا أن هذه المادة لها القدرة على اختزال نمو جرثومة *S.aureus* إلا انه لم تبدِ فعاليتها في إزالة الغشاء الحيوي لهذه الجرثومة، فيما لم تتفق نتائجنا مع نتائج الباحث Kang *et al.*, (2019) الَّذين أشاروا الى القدرة العالية لزيت النعناع على إزالة الغشاء الحيوي لجرثومة *S.aureus* من خلال تحطيم غشاء الخلية.

أستخدم الباحثان Bawazir (2018) و Shantaram اربعة أنواع من زيت السمسم اثناء دراستهما وأظهرت نتائجهما أن جميعها لم تكن فعالة ضد جرثومة *S.aureus* وبذلك جاءت نتيجتهما معززة لنتائجنا.

ذكر الباحث Heidari-Soureshjani *et al.*, (2017) أن زيت الزيتون أو بعض المواد المستخرجة من شجرة الزيتون ابدت فعاليتها ضد بعض الجراثيم ومنها المكورات العنقودية وأضاف ان قدرة زيت الزيتون في إزالة الغشاء الحيوي للجراثيم لم تؤكد بعد وتتطلب المزيد من الدراسات.

نستنتج من النتائج أعلاه أن بعض المواد الطبيعية ابدت قدرتها العالية على إزالة الغشاء الحيوي للجرثومة *S.aureus* و ان اختلاف النتائج حول قدرة بعض المواد الطبيعية من عدمها على إزالة الغشاء الحيوي للجرثومة ربما يعود الى اختلاف منشأ هذه المواد والشركة المصنعة وتركيز المادة فضلاً عن طريقة الاختبار المستخدمة لإزالة الغشاء الحيوي.

التوصيات

استخلاص المركبات الفعالة من المواد التي ابدت فعاليتها في إزالة الغشاء الحيوي واستخدامها كمضادات للجراثيم أو معززات للمضادات.

المصادر العربية

العمري، عائشة وميض؛ الراوي، أميرة محمود محمد (2013). التحري عن تكوين الاغشية الحيوية في بعض الجراثيم المرضية باستخدام طريقتي الانبوب واكار احمر الكونغو. مجلة علوم الرافدين، **24**(6)،55-65.

المصادر الاجنبية

Alandejani, T.; Marsan, T. G.; Ferris, W.; Robert, S.; Chan, F. (2008). Effectiveness of honey on *S. aureus* and *P. aeruginosa* biofilms. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, **139**(2),107-111.

Al-Ani, W. N.; Al-Haliem, S. M.; Tawfik, N. O. (2010). Evaluation of the antibacterial activity of citrus juices: An in vitro study. *Al-Raf. Dent. J.*, **10**(2), 376-382

Algburi, A.; Comito, N.; Kashtanov, D.; Dicks, L. M.; Chikindas, M. L. (2016). Control of biofilm formation: Antibiotics and Beyond. *Appl. Environ. Microbiol*., **83**(1), e02508-16.

Ali, Z. M. (2018). Synergistic antibacterial interation between an Alum and antibiotics on some microorganism. *Sci. J. Med. Res*., **2**(5), 47- 51.

Al-Talib, H.; Nasir, N. I. S. M.; Yaziz, H.; Zulkzfli, N. F.; Adani, N. A.; Rashidi, A. I. N.; Murugaiah, C.; Shaari, S. A. (2016). Potassium Aluminium sulphate (Alum) Inhibits Growth of Human Axillary Malodor-producing skin flora in vitro. *J. Clin. Health Sci*., **1**(1), 59-63.

Alves-silva, M.; Zuzarte, M.; Goncalves, M. J.; Cavalerio, C.; Cruz, M.T.; Cardoso, S. M.; Salgueiro, L. (2016). New claim for wild carrot (Daucus carota subsp. carota) Essential oil. *Evidence-Based compl. Alternat Med.*

Badha, V.; Moore, R.; Heffernany, J.; Castaneda, P.; Mclaren, A.; Overstreet, D. (2019). Determination of Tabromycin and Vancomycin exposure required to eradicate biofilms on muscle and bone tissue in vitro. *J. Bone Joint Infect.*, **4**(1),1-9.

Bawazir, A. M. A.; Shantaram, M. (2018). Effect of Yemeni sesame oil against some pathogenic bacteria and fungi. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **9**(6), 1000-1006.

Birkenhauer, E.; Neethirajan, S.; Weese, J. S. (2014). Collagen and hyaluronan at wound sites influence early polymicrobial biofilm adhesive events. *BMC Microbiol*., **14**, 91.

Bnyan, I. A.; Altaee, A. H.; Kadhum, N. H. (2014). Antibacterial activity of Aluminum potassium sulfate and syzygium aromaticum extract against pathogenic microorganisms. *J. Nat. Sci. Res.*, **4**(1),11-15.

Burhan, S. T. (2018). Evaluation of inhibitory activity of some natural materials on biofilms formed on fresh fish cutting boards. *Raf. J. Sci.*, **27**(3), 26-34.

Cappuccino, J. G.; Welsh, C. (2018). "Microbiology A Laboratory Manual". Pearson Education limited, US.

Deka, N. (2014). Comparison of tissue culture plate method, Tube method and Congo Red Agar method for the detection of biofilm formation by Coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from non-clinical isolation. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **3**(10), 810-815.

Devaraj, C.; Sajjan, A. G. (2015). Comparison of Three different methods for the detection of biofilm in Gram positive cocci and Gram-negative Bacilli isolated from clinical specimens. *J. Pharm. Sci. Res.*, **7**(11), 952-955.

Dobay, O.; Laub, K.; Stercz, B.; Keri, A.; Balazs, B.; Tothpal, A.; Kardos, S.; Jaikampun, P.; Ruksakiet, K.; Quinton, P. M.; Zsembery, A. (2018). Bicarbonate inhibits bacterial growth and biofilm formation of prevalent cystic fibrosis pathogens. *Frontiers Microbiol.*, **9**, 2245.

Domenico, E. G. D.; Rimoldi, S. G.; Cavallo, I.; D'Agosto, G.; Trento, E.; Cagnoni, G.; Palazzin, A.; Pagani, C.; Romeri, F.; Vecchi, E. D.; Schiavini, M.; Secchi, D.; Antona, C.; Rizzardini, G.; Dichirico, R. B.; Tama, L.; Kovacs, D.; Cardinali, G.; Gallo, M. T.; Gismondo, M. R.; Ensoli, F. (2019). Microbial biofilm correlates with an increased antibiotic tolerance and poor therapeutic outcome in infective endocarditis. *BMC Microbiol.*, **19**, 228 .

Ghaieb, K.; Kouidhi, B.; Jrah, H.; Mahdouani, K.; Bathrouf, A. (2011). Antibacterial activites of Thymo quinone, an active principle of migella sativa and its potency to prevent bacterial biofilm formation. *BMC complementary and alternative Med.*, **11**(1), 29.

Glerup, R.; Svensson, M.; Jensen, J. D.; Christensen, J. H. (2019). *Staphylococcus aureus* bacteremia risk in Hemodialysis patients using the Buttaonhole cannulation technique: A prospective multicenter study. *Kidney Med.*, **1**(5), 263-270.

Halim, R.M.A.; Kassem, N.N.; Mahmoud, B.S. (2018). Detection of biofilm producing Staphylococi, among different clinical isolates and its relation to methicillin susceptibility. *Open Access Macedonian J. Med. Sci.*, **6**(8), 1335-1341.

Heidari-Soureshjani, R.H.; Obeidavi, Z.; Reisi-Vanani, V.; Dehkordi, S.E.; Fattahian, N.; Gholipour, A. (2017). Evaluation of antibacterial effect of sesame oil, olive oil and their synergism on *Staphylococcus aureus* in vitro. *Advan. Herbal Med.*, **3**(3), 13-19.

Iglesias, Y. D.; Eilms, T.; Vanbever, R.; Bambeka, F. V. (2019). Activity of antibiotic against *Staphylococcus aureus* in an in vitro model of biofilms in the context of cystic fibrosis: influence of the culture medium. Antimicrobiol. *Agents Chemoth.*, **63**(7), e00602- 19.

Jocker, D. (2018). 7 Natural Agents that disrupt biofilms. Available at: https://drjockers. com/7-natural-agents-disrupt-biofilms/

Kang, J.; Jin, W. Wang, J.; Sun, Y.; Wu, Y.; Liu, L. (2019). Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*. *LWT,* **101**(1), 639-645.

Kerekes, E. B.; Vidacs, A.; Tako, M.; Petkovits, T.; Vagvolgyi, L.; Horvath, G.; Balazs, V. L.; Krisch, J. (2019). Anti-Biofilm Effect of selected Essential oils and main components on mono- and polymicrobic bacterial cultures. *Microorg.,* **7**, 345.

Khalil, N.; Ashour, M.; Fikry, S.; Singals, A. N.; Salama, O. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of selected Apiaceous fruits. *Future J. Pharm. Sci.,* **4**(1), 88- 92.

Kirmusaogu, S. (2019). The methods for detection biofilm and screening antibiofilm of activity. In Exopolysaccharides method of preparation and Application, DOI: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen. 84411.

Kumari, A.; Bhattacharya, S. (2017). Effect of Betel Leaf and Lemon juice extracts on Staphylococcus *aureus* in vitro. *Int. Curr. Microbiol. App. Sci.,* **6**(12), 4329-4333.

Lu, J.; Turnbull, L.; Burke, C. M.; Liu, M.; Carter, D. A.; Schlothauer, R. C.; Whitchurch, C. B.; Harry, E. J. (2014). Manuka-type honeys can eradicate biofilms produced by *Staphylococcus aureus* strains with different biofilm-forming abilities. *Peer J.,* **2**, e326.

Nissenson, A. R.; Fine, R. N. (2017). "Hand Book of Dialysis Therapy". Elsevier, Inc., Canada.

Pelletier, F. Q.; Joarder, M.; Poutanen, S. M.; Lok, C. E. (2016). Evaluating Approaches for the diagnosis of hemodialysis catheter-related bloodstream infections. *Clin. J. American Soci. Nephrol.,* **11**(1), 847-854.

Piegerovă, A.; Koscovă, J.; Schusterovă, P.; Nemcovă, R.; Kryvatsovă, M. (2019). In vitro inhibition of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* under the action of selected plant extracts. *Foli A Veterinaria,* **63**(1), 48-53.

Post, V.; Wahl, P.; Richards, R. G.; Moriarty, F. (2016). Vancomycin displays time-dependent eradication of mature *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Orthropaedic Res.*, **35**(2), 381-388.

Roqaiya, M.; Begum, W. (2015). A Review on medicinal aspect of Alum in unani medicine and scientific studies. *World J. Pharm. Res*., **4**(6), 929-940.

Saleh, F.A.; El-Darra, N.; Raafat, K.; ElGhazzawi, I. (2018). Phytochemical Analysis of Nigella sativa L. utilizing GC-MS Exploring its antimicrobial effects against multidrug-resistant bacteria. *Pharmacogen J.,* **10**(1), 99-105.

Shrestha, L. B.; Bhattaria, N. R.; Khanal, B. (2018). Comparative evaluation of methods for the detection of biofilm formation in coagulase-negative staphylococci and correlation with antibiogram. *J. Infec. Drug Risest.,* **11**(1), 607 – 613.

Somma, A. D.; Moretta, A.; Cane, C.; Cirillo, A.; Duilio, A. (2020). Inhibition of bacterial biofilm formation. *Intech Open*, DOI: 10. 5772/ *Intech open*. 90614.

Sultan, A. M.; Nabiel, Y. (2019). Tube method and congo red agar versus tissue culture plate method for detection of biofilm production by pathogen isolated from midstream urine. *African J. Clin. Exper. Microbiol*., **20**(1), 60 – 66.

Tavernler, S.; Carbbe, A.; Hacloglu, M.; Stuer, L.; Henry, S.; Rigole, P.; Dhondt, I.; Coenye, T. (2017). Community composition determines activity of antibiotics against multispecies biofilms. *Antimicrob*. *Agent Chemoth.,* **61**(9), e00302-17

Vetas, D.; Dimitropoulu, E.; Mitropoulou, G.; Kourkoutas, Y.; Giaouris, E. (2017). Disinfection efficiencies of sage and spearmint essential oils against planktonic and biofilm with sodium hypochlorite. *Int. J. Food Microbiol.,* **257**(1), 19-25.

Yaseen, N. N.; Najm, S. S. (2016). Effect of honey and sodium bicarbonate on formation inhibition and removal of Staphylococcus *aureus* and *Klebsiella pneumoniae* biofilm in vitro. *World J. Exp. Biosci.*, **4**(2),154-159.

Investigation of the Ability of some Bacteria Isolated from Intravenous Catheters to form Biofilms and the Effectiveness Ability of some Substances in Removing them

***Raad M. Mahmmod**
Al-Hamdanyya General Hospital/ Directorate of Health Nineva/ Ministry of Health
Amera M. Al-Rawi
Department of Biology/ College of Sciences/ University of Mosul

ABSTRACT

The research included investigating some of the contaminated bacteria of the Cervical Vein Catheter (CVC) devices in patients with dialysis in Ibn Sina Teaching Hospital (alternative site), then testing the ability of the isolated bacteria to form the biofilms in two ways, the congo red agar and the tube method, as well as evaluating the effectiveness of some substances to remove the biofilms

The results showed that the contaminated bacteria of the cervical venous catheter apparatus included: *Staphylococcus aureus, Staphylococcus haemolyticus* and *Burkholderia cepacia*. The current study also showed that the ability of the pathogenic bacteria above to form the biofilms by Tube Method came at 3,2 and 0, bacteria respectively, and its ability to the composition of the biofilms by the Congo Red Agar Method came at 2,2 and 0, bacteria respectively. The results also showed the high ability of Vancomycin and Meropemen 10% for each one, and Alum 20% as well as natural lemon juice undiluted to remove the biofims formed by the *Staphylococcus aureus* bacterium. As for the other materials that were used, they did not show any ability to remove the biofilms.

Keywords: Cervical Vein Catheter, Biofilm, *Staphylococcus aureus,* Bi.