Isolation and Study some types of Bacteria which forms Biofilm for some cases of Burns

عزل ودراسة بعض انواع البكتريا المكونة للبيوفيلم المصاحبة لبعض حالات الحروق

زينب سالم جعفر
جامعة كربلاء – كلية العلوم – قسم علوم الحياة
Abbaszain2003@yahoo.com

الخلاصة

تم جمع و دارسة 25عينه (مسحات جلد) من مرضى الحروق (اناث و ذكور) تراوحت اعمارهم بين (4-25 سنه) حيث اخذت العينات من مستشفى الحسيني العام في كربلاء المقدسة قسم الحروق .خضعت جميع العينات للزرع البكتيري للتعرف على المزارع البكتيرية حيث تم عزل وتشخيص مجموعتين من الاحياء المجهرية البكتريا والخمائر وتم اهمال خمس عينات لتعرضها للتلوث واقتصرت الدراسة على الجانب البكتيري فقط. واجريت الفحوصات التشخيصية على جميع البكتريا المسببة لالتهاب الحروق حيث تم الكشف عن مجموعتين من البكتريا حسب صبغة غرام التي شملت البكتريا السالبة لصبغة غرام حيث ظهرت 5 عينات تعودان لجنس *Pseudomonas* وعينه واحدة لكل من جنس *Proteus* و *E. coli*على التوالي اما باقي العينات فقد كانت من مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة غرام والتي اظهرت 8 عينات تعود لجنس *Staphylococcus* و3 عينات تعود لجنس *Streptococcus* و عينه واحدة تعود لجنس *Bacillus* . واظهرت النتائج وجود البكتريا الهوائيه وتوفرها بكثره نتيجة التلوث الذي يتعرض له المرضى وغياب ظروف التعقيم المطلوبه .

كذلك تم اختبار حساسية البكتريا التي تم عزلها من الحروق وحساسيتها تجاه المضادات الحيوية المستخدمه محليا لعلاج مثل هذه الحالات .حيث تم اختيار مجموعه من المضادات الحيويه شملت Tetracycline، Gentamycin ، Trimethoprime، Vancomycin ، Ciprofloxacin .وتم العمل وفق طريقة الانتشار على الاكار باستخدام وسط المولر هنتون الصلب. لوحظ ان اغلب العزلات لكل من البكتريا الموجبة لصبغة غرام والسالبة لصبغة غرام اظهرت حساسية واضحة للمضاد الحيوي Ciprofloxacin . بينما ابدت مقاومه ملحوظه للمضاد الحيوي Trimethoprime ويمكن ان يكون تفسير هذه النتيجة يعود لقدرة البكتريا على تكوين البايوفيلم والذي يمكنها من تكوين الطفرات وقابليتها على انتاج انزيمات تحطم المضادات الحيوية وتحويلها الى مركبات غير فعاله.

واخيرا تم الكشف عن قدرة الاحياء المجهرية المعزولة على تكوين البايوفيلم (Biofilm) باعتماد طريقة الانبوب Tube (test) ، وكانت 7عينات من مجموع 20عينه لها القدرة على انتاج الغشاء الحياتي (Biofilm) بشكل قوي و 5 عينات كانت قدرتها متوسطة و 4 عينات ضعيفة ومثلها ليست لها القدرة على تكوين (Biofilm).

Abstract

25 samples (skin swap) from burned male and female (4-25 years old) have been collected from AL-Hussein Hospital and studied well. Samples isolation and diagnoses have been achieved on two groups (Bacteria and Yeast). Two groups of bacteria have been tested depending on the negative and positive gram stain. The results showed that the aerobic bacteria was existed because of the contamination and unsterilization sensitive test for bacteria against some antibiotics has been made. Diffusion method on agar using Muller Hinton solid media has been used. Most of negative and positive gram bacteria showed sensitivity against Ciprofloxacin while it showed resistance against Trimethoprime, this is because of the capability of the bacteria to form a biofilm that enable it to make a mutation and enzymes production have ability to destroy the antibiotics. Finally, Test tube technique has been used for all samples. The result was that 7 bacteria samples have a strong ability to produce biofilm and 5 bacteria samples have moderate ability to produce biofilm while 4 of them have week ability to produce biofilm and there were 4 samples have no ability to produce the biofilm.

المقدمة Introduction

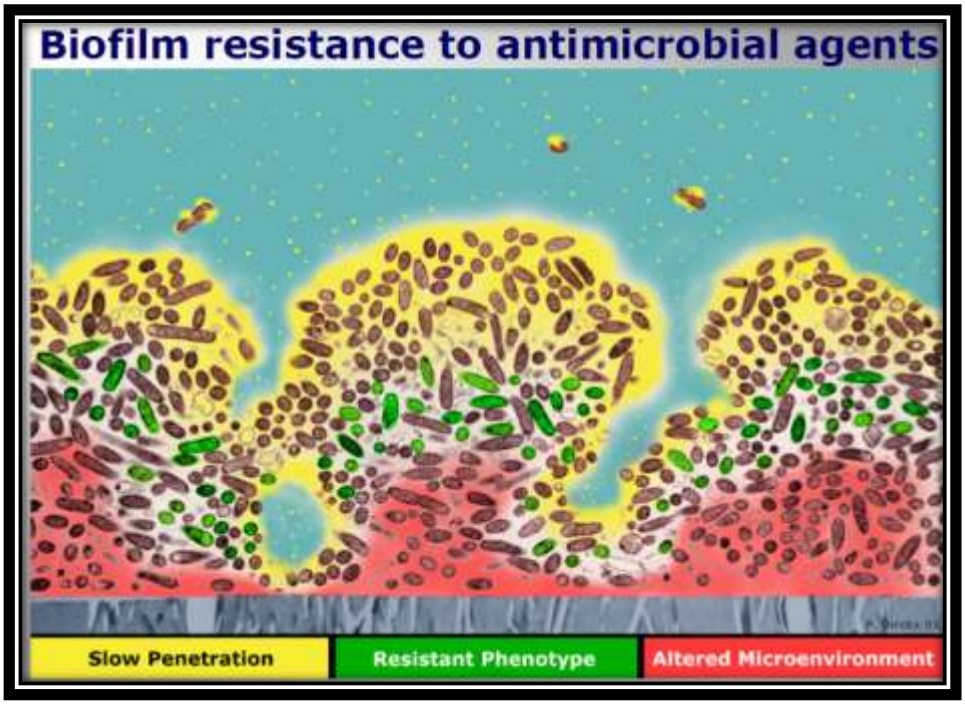
1- الحروق

تعتبر الحروق الأكثر شيوعًا وتخريبًا وتدميرًا لأنسجة الجسم ، والذي يؤدي إلى إحداث تثبيط مناعي لجسم المصاب مما يجعله عرضة للإصابة بمختلف المضاعفات المرضية (Pathological complications)المترتبة من الاصابة بانواع مختلفة من المسببات المرضية [1]. وقد لوحظ ارتفاع نسبة الوفيات في الحالات المصابة الناتجة من الحروق والإصابات البكتيرية المرافقة للحروق [2]. ولوحظ أن بكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas* والكلبسيلا *Klebsiela* من أهم المسببات البكتيرية السالبة الصبغة غرام الملوثة أو المرافقة لإصابات الحروق والتي تسبب أضرارا كبيرة للحالات المصابة قد تؤدي البعض منها إلى الوفاة ، في حين تشير الدراسات إن بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* والمكورات السبحية *Streptococcus* كذلك من المسببات البكتيرية الموجبة لصبغة غرام والمسؤولة أيضا عن الإصابات المرافقة للحروق والتي ذات تأثير اقل نوعًا ما من المسببات المذكورة أولا في شدة التأثير أو الأضرار[3]. وتتصف جرثومة *P. aeruginosa* بكونها عصيات سالبة لصبغة غرام مفردة او متجمعة بشكل سلاسل قصيرة غير مكونة للأبواغ ، لها القدرة على النمو في درجة حرارة 42 م ومحللة لخلايا الدم الحمر كليا (β- Hemolysis) [4] . ان ضراوة هذه الجرثومة تكمن في انتاج العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها على الغزو والاستيطان ،حيث تغزو مجرى الدم وتنتشر في مناطق الجسم المختلفة وتحدث الضرر النسيجي في هذه المناطق [5]. كما تتميز هذه الجرثومة بمقاومتها للمضادات الحيوية نتيجة امتلاكها انزيمات β-lactamases و وجود مضخات الدفق Efflux pumps) (وايضا تناقص نفاذية الغشاء الخارجي لها ، و هذه الصفات وغيرها تمكنها من احداث اصابات خطيرة [6] .

2- مفهوم البيوفيلم

البيوفيلم (Biofilm):- هو تكدّس معقّد للكائنات المجهريّة، يتّسم بإفراز نسيج خارج الخلية محصّن ولاصق. تتميّز البيوفيلمات بالارتكاز على السطح،ووجود التّغايريّة البنياويّة، والتّنوّع الوراثي، والتّفاعل المعقّد بين الخلايا،ويتصف نسيج خارج الخليّة بانه مكون من موادّ مبلمرة/متماثرة. ان الكائنات الحيّة الّتي تستطيع العيش كخلايا وحيدة تتواجد بشكلين مختلفين: الأوّل هو المعروف بالخلايا العائمة والحرّة (البلانكتونيّة) حيث أنّ الخلايا يمكن لها العوم والعيش في وسط سائل. أمّا الشّكل الثّاني فهو حالة الالتصاق أي تكون الخلايا مكوّمة بإحكام وملتصقة بشدّة ببعضها البعض وفي اغلب الأحيان تلتصق هذه الخلايا بسطح صلب . ان التّغيّر في السّلوك البكتيري يعود لعدّة عوامل مثل إدراك النّصاب (Quorum Sensing) إضافة إلى آليّات أخرى تختلف ما بين الفصائل.

ويعتبر البايوفيلم مادة لزجه يمكن ان يتشكل في اي وسط يحتوي على الماء، ان البكتيريا والطفيليات و الميكروبات تقوم بالاختباء بداخلها هروبا من المضادات البكتيريه antibiotics او العلاجات الاخرى المضاده لها ، ومن اكثر الأماكن التي يفضل البايوفيلم الاختباء بها هي الأمعاء ، كما يتواجد ايضا في تيار الدم وعلى الاسنان (تلك الطبقه التي نشعر بها عندما لا نقوم بتنظيف اسنانا لفتره من الزمن). وفي معظم الاحيان يقوم البايوفيلم بتخبأة نفسه بشكل جيد جدا بحيث لا يتأثر بأقوى واعلى جرعات المضادات الحيويه.كما في شكل رقم (1)[7]

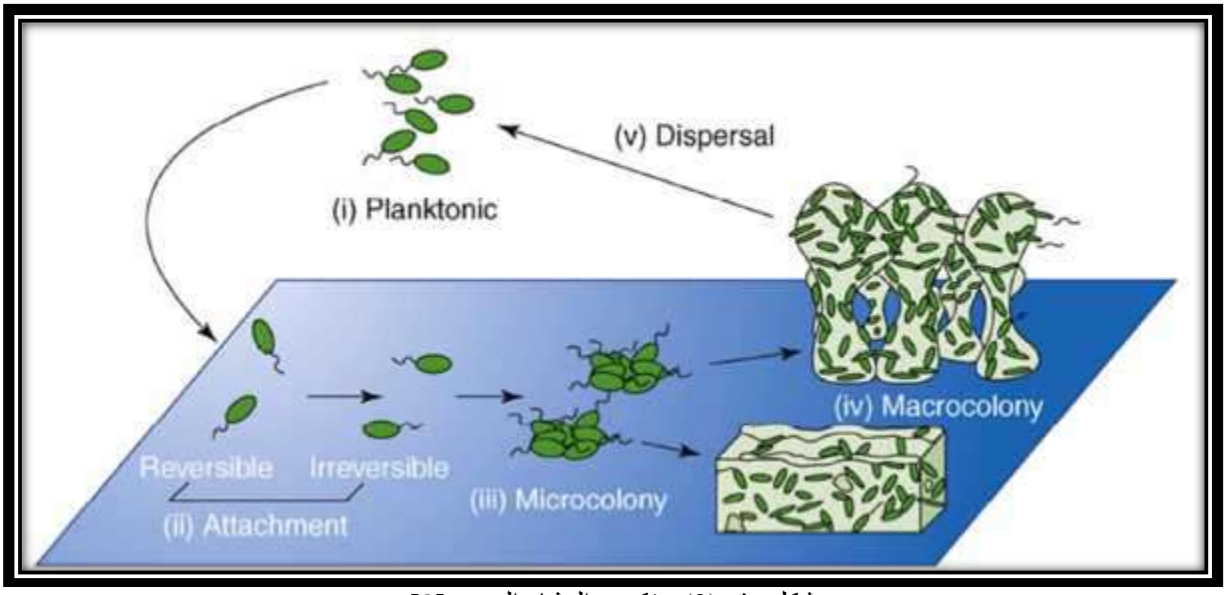


شكل رقم (1) يوضح مقاومة البيوفيلم للمضادات الحيوية[7]

يعتبر الجلد بالدرجة الاولى في مصدر البكتيريا المكونة للبيوفيلم وبعدها الـ mouth ثم الـ pharynx ثم الـ vaginal وهكذا ....وان مختلف الامراض المكتسبة من المستشفى تكون مرتبطة مع استعمال القسطرة الوريدية المركزية و القسطرة البولية والصمامات القلبية الصناعية واجهزة تقوية العظام تكون واضحة الارتباط مع البيوفيلم الذي يلتصق باسطح المواد الحيوية . .ان اهم الخصائص هي ان البكتريا بامتلاكها البيوفيلم تقاوم دفاعات المضيف لها والصمود ضد المضادات الميكروبية. حتى في الاشخاص الذين يمتلكون استجابات مناعية ذاتية ومتكيفة تكون الاصابات المرتبطة بالبيوفيلم نادرا ما يكون لها حل في الانسجة المجاورة للبيوفيلم والتي قد تتعرض للضرر بواسطة المتتممات المناعية وغزو النيتروفيل . اختبار الحساسية في المختبر لنماذج البيوفيلم اظهرت بقاء االبيوفيلم في البكتريا بعد المعالجة بالمضادات الحيوية بتركيزات مئات أو حتى آلاف المرات عن الحد الأدنى للتراكيز المثبطة للبكتريا والذي تم قياسه في الوسط المعلق لهذه البكتريا في الوسط المعلق في جسم الكائن الحي ان المضادات الحيوية قد تكبح اعراض الاصابة بواسطة قتل البكتريا الحرة الطافية التي تسقط من المجاميع المرتبطة لكنها تفشل في القضاء على تلك الخلايا البكتيرية لانها لا تزال جزءا من البيوفيلم عندما يكون العلاج الكيميائي بالمضادات المكروبية متوقف فان البيوفيلم يمثل شكلا يشبه العش لتكرار الاصابة .اصابات البيوفيلم عادة تستمر ريثما يتم جراحيا ازالة السطح المستعمر من الجسم.

2-1-مراحل تكوين البيوفيلم

تكوّن البيوفيلم يبدأ بارتكاز والتصاق كائنات مجهريّة عائمة بالسطح. في البداية تلتصق المستعمرات الأولى بالسّطح عن طريق قوى فان دير وولز الضّعيفة والانعكاسيّة.، إذا لم يتمّ نزع المستعمرات عن السّطح فورا فإنّه يمكن لها أن تتثبّت بشكل دائم عن طريق جزيئات الالتصاق الخلويّ مثل أشعار البكتيريا . تقوم المستعمرات الأولى بتسهيل عمليّة وصول الخلايا الأخرى بتوفير أشكال عديدة من أماكن الالتصاق وبناء نسيج خارج الخلية يربط البيوفيلم ببعضه. لا تستطيع بعض الفصائل الالتصاق بالسطح لوحدها غير أنّه يمكن أن تثبّت نفسها بالنّسيج خارج الخليّة أو مباشرة بالمستعمرات الأولى.، عند غزو هذا السّطح وتكوين البيوفيلم تقوم الخلايا بالتّواصل عن طريق إدراك النّصاب .(Quorum Sensing) عندما يحدث الغزو، ينمو البيوفيلم تدريجيّا عن طريق انقسام الخلايا وجلب خلايا جديدة.ان آخر مرحلة في تكوّن البيوفيلم تعرف بالتّطوّر وهي تمثّل المرحلة التّي يكون قد اكتمل فيها تأسيس البيوفيلم، حينها يمكن للبيوفيلم أن يتغيّر فقط من ناحية الشّكل والحجم. ان تطوّر البيوفيلم يسمح للخلايا أن تصبح أكثرمقاومة للمضادّات الحيويّة . [8] .كما في الشكل رقم (3)



شكل رقم (3) : تكوين الغشاء الحيوي[9]

2-2- فوائد البيوفيلم

أحد فوائد العيش في هذا المحيط بالنّسبة للبكتيريا هو ازدياد المقاومة ضدّ المنظّفات الكيميائيّة والمضادّات الحيويّة.أنّ النّسيج البيوخلوي الكثيف والطّبقة الخارجيّة للخلايا يحميان المجتمع الدّاخليّ (الخلايا المتواجدة في أغمار البيوفيلم). في بعض الأحيان يمكن لمقاومة المضادّات الحيويّة أن تتضاعف إلى مستوى الألف حيث ان لها القابلية على انتاج انزيمات تقاوم المضادات الحيوية .ان البكتريا التي تمتلك البيوفيلم لها القابلية على احداث طفرات [10].

2-3- المكونات الاساسية للبيوفيلم

مواد البوليمر خارج الخلية،

التي تُعرف أيضًا باسم عديد السكاريد الخارجي أو اختصارًا بالاسم (EPS (External polymer multi saccharide هي مركبات ذات وزن جزيئي عالٍ يتم إفرازها بواسطة كائنات حية دقيقة إلى البيئة الخاصة بها[11]. وتعمل مواد البوليمر خارج الخلية على إرساء السلامة الوظيفية والهيكلية لـ البيوفيلم، وتُعتبر المكون الأساسي الذي يحدد الخصائص الفيزيائية للبيوفيلم[12].

وتتألف مواد البوليمر خارج الخلية في معظمها من عديد السكاريد والبروتينات ولكنها تتضمن جزيئات كبيرة أخرى مثل الحمض الريبي النووي منزوع الأكسجين (DNA) والسوائل والمواد الدبالية . ومواد البوليمر خارج الخلية هي مادة البناء للمستوطنات البكتيرية وتظل معلقة بالسطح الخارجي للخلية أو يتم إفرازها إلى وسط النمو الخاص بها. وهذه المركبات مهمة في تشكيل البيوفيلم وتعلق الخلايا بالأسطح. وتشكل مواد البوليمر خارج الخلية من 50% إلى 90% من إجمالي المادة العضوية للبيوفيلم.[12][13][14]

2-4- خصائص البيوفيلم

تتواجد البيوفيلمات في العادة على سطوح صلبة مغمورة أو معرّضة لبعض السّوائل المائيّة رغم أنّه بإمكانها التّكوّن على أشياء عائمة، سطوح مبلّلة، سطوح الأوراق، خاصّة بالمناخات ذات الرّطوبة العالية., وعند توفّر الموارد الكافية للنّموّ، يمكن للبيوفيلم أن ينمو بسرعة ليصبح عيانيّا(واضحا للعين المجرّدة). يمكن للبيوفيلم أن يحتوي على عدّة أنواع من الكائنات المجهريّة مثل :البكتيريا، العتائق، الفطريات، الحيوانات الأوليّة، الطّحالب أو الأشنيات .كلّ مجموعة تقوم بعمليّات أيضيّة متخصّصة غير أنّ بعض الكائنات المجهريّة تقوم بتكوين بيوفيلمات أحاديّة الفصيلة في ظروف معيّنة. ويساهم النّسيج الخارجي في تماسك واتّحاد البيوفيلم. هذا النّسيج مكوّن من موادّ مبلمرة تدعى ال إ.ب.س(EPS) ، اختصارا للموادّ المبلمرة الخارجيّة (extracellular polymeric substance)أو عديد السّكاريد الخارجي. يحمي النّسيج الخلايا الموجودة به كما يسهّل عمليّة الإتّصال بين هذه الخلايا بواسطة إشارات بيوكيميائيّة .أوجدت الدّراسات أنّ بعض البيوفيلمات تحتوي على قنوات مائيّة تساعد على توزيع الأغذية وجزيئات الإشارة. هذا النّسيج قويّ جدّا إلى درجة انه في ظروف معيّنة تصبح البيوفيلمات يمكن أن تصبح متحجّرة . تتميّز البكتيريا الّتي تعيش بالبيوفيلم بخصائص مميّزة عن تلك الّتي تعيش حرّة عائمة. ذلك لأنّ المحيط الكثيف والمحمي داخل البيوفيلم يسمح للبكتيريا بالتّعاون والتّفاعل بطرق مختلفة..[1]

الهدف من الدراسة:

1- دراسة وعزل انواع مختلفة من البكتريا الموجودة في الحروق .
2- دراسة تكوين البيوفيلم للبكتريا المعزولة.

المواد وطرائق العمل

الاجهزة المستخدمة

استخدمت الاجهزة والمستلزمات المختبرية والمواد الكيميائية المدرجة في الجدولين أدناه إثناء مدة الدراسة

التسلسل	اسم الجهاز
1	ثلاجة Refrigerator
2	حاضنة كهربائية Incubator
3	المؤصدة Autoclave
4	ميزان حساس Sensitive balance
5	حجيرة تلقيح Hood
6	مجهر ضوئي Light Microscope

المواد الكيميائية المستخدمة

ت	اسم المادة
1	صبغة غرام
2	سفرانين
3	كريستال فايوليت
4	ايودين
5	كحول
6	بيروكسيد الهيدروجين
7	كاشف الاوكسيديز

الاوساط الزرعية الجاهزة

الأوساط الزرعية المستعملة في هذه الدراسة

ت	اسم الوسط
1	وسط الغراء المغذي Nutreint agar
2	وسط مولار هنتون Muller hinton agar
3	وسط غراء الماكونكي MacConkey agar
4	وسط المرق المغذي Nutrient broth
5	وسط غراء الدم Blood agar
6	وسط المانتول mannitol salt agar
7	Trypticase soya broth

طرائق العمل :

1- جمع العينات:-

تم جمع 20عينة من مرضى الحروق في مستشفى الحسيني العام /كربلاء التي تراوحت اعمارهم بين (4 – 25) سنة حيث نقلت هذه المسحات الى المختبر بواسطة الـ transport media. كما في شكل رقم (4).و زرعت العينات على الوسط المغذي الصلب nutrient agar وحضنت على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة لغرض التنقية والتشخيص.

2- **تشخيص البكتريا :-**

- **شكل النمو على وسط غراء الماكونكي**

زرعت العزلات على غراء الماكونكي بعدها حضنت الاطباق لمدة 24 ساعة بدرجة 37 م لدراسة الخصائص المزرعية من شكل ولون وحجم المستعمرات وقدرتها على تخمير سكر اللاكتوز.

- **الفحص المجهري**

صبغت اللطخات المحضرة من المستعمرات الفتية النامية على وسط الغراء المغذي بصبغة غرام ،لمعرفة استجابة العزلات لصبغة غرام بملاحظة شكل وترتيب ولون الخلايا.

- **اختبار فعالية انزيم السايتوكروم اوكسيديز(Oxidase Test)**

رطبت ورقة الترشيح بقطرات من الكاشف ،ثم نقلت عدة مستعمرات من وسط الغراء المغذي بأعواد خشبية نظيفة ومزجت جيدا مع الكاشف و بعد (20-30) ثانية لوحظ تلون المستعمرات باللون البنفسجي وهذا يعتبر نتيجة موجبة.

- **الكشف عن إنزيم الكاتاليز (Catalase Test)**

نقل جزء من العالق البكتيري الى سطح شريحة زجاجية نظيفة ثم اضيف إليها قطرة من الكاشف (محلول بيروكسيد الهيدروجين 5%) إن ظهور الفقاعات دلالة على نتيجة الموجبة، وهذا الكشف يستخدم للتحري عن قابلية الجرثومة على إنتاج انزيم الكاتاليز الذي يحلل H_2O_2 الى أوكسجين وماء.

شكل رقم (4):يوضح ال transport media

3-اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية بطريقة الاقراص :

اختبرت حساسية العزلات تجاه عدد من المضادات الحيوية والتي استعملت بشكل اقراص جاهزة (Gentamicin,Tetracycline،Ciprofloxacin,Vancomycin,Trimethoprim) اذا لقح 5mlمن الNutrient broth بمستعمرة واحدة من احدى العزلات باستعمال الناشر الزجاجي على اطباق من وسط Muller hinton agar ثم تركت الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لتجف ثم وضعت اقراص المضادات الحيوية على سطح الوسط وتحت ظروف معقمة حضنت الاطباق على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة.قيست اقطار مناطق التثبيط باستخدام المسطرة وسجلت النتائج وفق قطر الهالة (التي تعطي دلالة على منع النمو)اعتمادا على المسافات القياسية لقطر الهالة التي تتوافر في النشرات التي زودت من الشركة المنتجة لهذه المضادات وقورنت مع مناطق التثبيط القياسية المثبتة من قبل (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI,2014 .

4-الكشف عن تكوين الـ Bio film:

اتبعت طريقة الانبوبة Tube methodاذ تم تلقيح وسط Trypticase soya broth المزود ب 10%كلوكوز بمستعمرة بكتيرية منماة على الوسط المغذي الصلب بعمر24 ساعة .حضنت انابيب الاختبار على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24ساعة .فرغت انابيب الاختبار من الوسط الحاوي على البكتريا ثم غسلت بمحلول دارئ الفوسفات (pH7.3) ثم تركت لتجف وبعدها صبغت بواسطة صبغة Crystal violet بتركيز 0.1% ثم غسلت الصبغة بواسطة الماء المقطر وتركت الانابيب بالشكل المقلوب لتجف.النتيجة الموجبة لتكوين البيوفيلم تحدد من خلال ملاحظة ظهور الصبغة على جدار وقعر انابيب الاختبار وتكون قراءة النتائج على النحو الاتي (نمو قوي , نمو وسط , نمو ضعيف , لايوجد نمو).

النتائج والمناقشة

1. الفحوصات التشخيصية والبايو كيميائية

اجريت الفحوصات التشخيصية والتي شملت فحص شكل الخلية تحت المجهر، صبغة الكرام ,الكشف عن السبورات, النمو على وسط الماكونكي ,النمو على وسط المانتول كما في الشكل رقم (5). فحص تحلل الدم, فحص الاوكسيديز كما في الشكل رقم (6). وفحص الكاتليز كما في الشكل رقم (7).كما يوضح جدول رقم (1) نتائج الزرع الاولي لعينات مسحات الجلد المأخوذة من مناطق الجلدية المتعرضة للحرق لوحظ بعد استكمال تنقية العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها من اطباق الزرع الاولي وإجراء الفحوص المختبرية للعزل والتشخيص أن عدد العزلات الموجبة لصبغة غرام كان 12 (60%) اما عدد العزلات السالبة لصبغة كرام 7 (35%) وظهور عزلة من الخمائر ، وهذا يؤكد ما اشرنا إليه من ان البكتريا الهوائيه ذات قابلية عالية بإصابة وغزو الأنسجة المتعرضة للحروق[13].

احتلت بكتريا ال *staph.aureus* النسبة الاكبر بالاصابة 6 عينات (30%) وثم بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*. بعدد 5 عينات وبنسبة (25%) وبكتريا الـ *Streptococcus pyogenes بنسبة* (15%) وبقية العينات بنسب (5%). نسبة تكرار أو تواجد بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus Sp*. أكثر من المكورات السبحية.*Streptococcus Spp* وهذه النتائج تقريبًا تتفق ما وجده[16] من إن بكتريا المكورات العنقودية لا تزال واحدة من أكثر الأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة غرام الملوثة لبيئة المستشفيات والأكثر إصابة وغزو للأنسجة المصابة بالحروق مسببة إلى إحداث التقيحات الجلدية الشديدة الضرر. إما فيما يتعلق ببكتريا المكورات السبحية فغالبًا ما ترافق الإصابة بالمكورات العنقودية للحروق لتقاربهما بالاحتياجات البكتيرية للنمو والتكاثر والتي يعزى لها غالبًا 20 % من حالات التعفن الجلدي (Septic episode) للحروق الجلدية في المرضى المصابين [17].

جدول رقم (1): يوضح الفحوصات التشخيصية والبيوكيميائية

رقم العينة	صبغة كرام	شكل الخلية	النمو على وسط الماكونكي		النمو على وسط المانتول	النمو على وسط الدم (تحلل الدم)	فحص الاوكسيديز	فحص الكاتليز	نوع البكتريا
1	G+ve		Cocci	-	+	β+	-	+	stapylococcus aureus
2	G+ve		Cocci	-	+	β+	-	+	stapylococcus aureus
3	G-ve		Rod	+	-	-	+	-	Pseudomonas aeruginosa
4	G+ve		Cocci	-	-	β+	-	-	Streptococcus pyogenes
5	G-ve		Rod	+	-	-	-	-	proteus vulgaris
6	G+ve		Cocci	-	+	β+	-	+	Staph.aureus
7	G+ve		Cocci	-	+	β+	-	+	Staph.aureus
8	G+ve		Cocci	-	-	β+	-	-	Streptococcus pyogenes
9	G-ve		Rod	+	-	-	+	-	p. aeruginosa
10	/		/	/	/	/	/	/	candida albicans
11	G+ve		Cocci	-	+	β+	-	+	Staph.aureus
12	G+ve		Rod	-	-	α+	-	+	bacillus subtilis
13	G-ve		Rod	+	-	-	+	-	p. aeruginosa
14	G+ve		Cocci	-	+	β+	-	+	Staph.aureus
15	G+ve		Cocci	-	-	α+	-	+	Staph.epidermidis
16	G-ve		Rod	+	-	-	-	-	E.coli
17	G+ve		Cocci	-	+	β+	-	+	Staph.aureus
18	G-ve		Rod	+	-	-	+	-	p. aeruginosa
19	G-ve		Rod	+	-	-	+	-	p. aeruginosa
20	G+ve		Cocci	-	-	β+	-	-	Streptococcus pyogenes

2- اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

لغرض اختبار حساسية البكتريا التي تم عزلها من الاشخاص الذين اصيبوا بالحروق تجاه مجموعة من المضادات الحيوية المستخدمة محليا لعلاج العديد من الامراض المتسببة من البكتريا التي عزلت .وفي ضوء ذلك تم اختيارمجموعة من المضادات شملت (Vancomycin, Ciprofloxacin،Gentamicin, Trimethoprim Tetracyclin). حيث تم اتباع طريقة الانتشار في الاكار وقد اثبتت هذه الطريقة كفائتها العالية في التجربة حيث تم نشر البكتريا بشكل متجانس على الوسط الزرعي وبكثافة محددة لان زيادة النمو يؤدي الى صغر قطر منطقة التثبيط. واهم ما يمكن استنتاجه من الجدول (2)هو ان البكتريا الموجبة لصبغة الكرام والمتمثلة ب*Bacillus sabtilus* ,*Staph. aureus pyogenes* ,*Streptococcus spp* ,*Staphylococcus spp,Sterp.* تكون اكثر حساسية لعدد من المضادات الحيوية مقارنة مع البكتريا السالبة لصبغة الكرام المتمثلة ب*E.coli* و*Pseudomonas* ويعود سبب هذا الاختلاف الى اختلاف تركيب الغشاء الخارجي Outer membrane الذي يكون نفاذ لمعظم المضادات البكتيرية الحيوية في البكتريا الموجبة مقارنة بالبكتريا السالبة.[18] ومما تجدر اليه الاشارة انه قد تم اختيار وسط مولر هنتون الصلب في اختيار فحص الحساسية للمضادات الحيوية وذلك لسرعة نمو البكتريا الممرضة المستخدمة في الدراسة وبدون اضافة مغذيات الى الوسط اضافة الى ثبوتية الرقم الهيدروجيني الذي لا يتداخل مع فحص الحساسية [19]. وبالتالي يمكن ان نستنتج ان مشكلة ظهور سلالات بكتيرية مقاومة لفعل المضادات التقليدية سببها المعالجة الجزئية للامراض التي تسببها السلالات

فهذه المعالجة تستغرق وقت طويل دون ان يتلقى المرضى علاجا كاملا مما يسمح للجراثيم بالتحول بصورة جوهرية واكتساب مقاومة ضد العقاقير الطبية [20].
كما في الشكل (8).

جدول رقم (2) يبين فحص حساسية الاحياء المجهرية المعزولة للمضادات الحياتية

ciprofloxacine	vancomycine	trimethoprim	gentamycine	tetracycline	رقم العينة
S	S	S	S	I	1
I	I	I	S	I	2
R	R	R	R	R	3
S	R	R	R	I	4
S	I	R	S	R	5
S	I	I	S	I	6
S	I	R	R	I	7
R	I	R	R	I	8
R	I	R	R	I	9
/	/	/	/	/	10
S	S	R	R	I	11
S	R	R	I	R	12
R	R	R	R	I	13
R	I	R	R	R	14
R	I	R	R	R	15
R	I	R	R	R	16
R	S	R	R	S	17
R	R	R	I	I	18
S	I	R	I	S	19
S	R	R	R	I	20

R= resistant , S= sensitive , I= intermediate

3- قدرة البكتريا على انتاج الBio film:

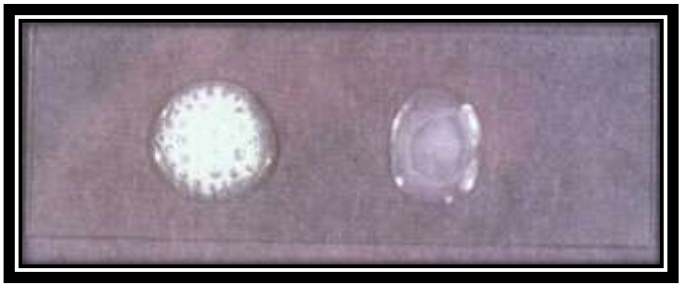
تم الكشف عن قدرة الاحياء المجهرية على تكوين البيو فيلم باتباع طريقة TubeMethod حيث اظهرت النتائج المبينة في الجدول رقم(3)ان 7عينات من مجموع 20عينة كانت قادرة على انتاج البيوفيلم بشكل قوي و5 عينات كانت قدرتها متوسطة و4 ضعيفة اما الباقي ليس لها القدرة على تكوين البيوفيلم .من جهة اخرى عند مقارنة هذه النتائج مع نتائج فحص الحساسية تجاه بعض المضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة لوحظ ان هناك علاقة بين انتاج البيوفيلم وحساسيتها تجاه هذه المضادات فلوحظ ان العينات التي اظهرت قوة في انتاج البيوفيلم كانت مقاومة للTrimethoprim بصورة عامة اما العينات التي اظهرت نتيجة متوسط تجاه المضادات ايضا ابدت مقاومة واضحة تجاه Trimethoprim وGentamicin ايضا اما العينات التي لم تنتج البيو فيلم فقد كانت حساسة لكل المضادات الحيوية المستخدمة تقريبا .ان العلاقة التي تربط انتاج البيو فيلم بالحساسية ضد المضادات الحيوية علاقة وثيقة حيث ترجع مقاومة البكتريا لاغلب المضادات الحيوية الى هذاالغشاء الحيوي التي تحيط نفسها به .[10]هناك عوامل تزيد من احتمال تكون البيو فيلم تشمل ارتفاع الرقم الهيدروجيني وارتفاع سكر الدم.كما في الشكل (9).

واظهرت الدراسه ان نسبة مقاومة البكتريا المعزولة للمضادات الحيويه كانت عاليه في معظمها الامر الذي يستوجب مراقبه دقيقه واعادة النظر في وصفات العلاج بناءا على بيانات الحساسية المحليه . بالاضافة الى تفعيل دور لجان مكافحة العدوى في المستشفيات المحلية والاهتمام بجانب التعقيم والنظافة العامه لكل من المرضى والعاملين .

توصي الدراسة بأهمية دراسة الجوانب الوبائية المرافقة لحالات الحروق كعوامل مساعدة للإصابة أو مسرعة في شفاء الحالات المصابة ، كما إن التشخيص البكتيري المبكر للحالات المصابة مهم جدا بالسيطرة على تعقيدات الإصابات الثانوية للبكتريا في حالات الحروق وبالتالي سهولة المعالجة الطبية العلمية الدقيقة.

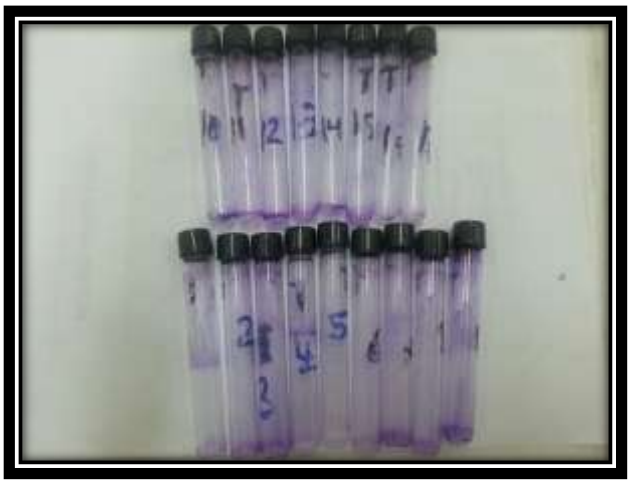
شكل رقم (5) :يوضح النمو على وسط المانتول

شكل رقم (6): يوضح فحص الاوكسيديز



شكل رقم (7):يوضح فحص الكاتاليز

شكل رقم (8):يوضح فحص الحساسية



شكل رقم (9) :يوضح الكشف عن البيوفيلم

جدول رقم (3) يوضح قدرة الاحياء المجهرية على تكوين البيوفيلم

رقم العينة	النتيجة
1	**متوسط**
2	**ضعيف**
3	**قوي**
4	**قوي**
5	**لايوجد**
6	**ضعيف**
7	**قوي**
8	**متوسط**
9	**قوي**
10	**لايوجد**
11	**ضعيف**
12	**لايوجد**
13	**قوي**
14	**متوسط**
15	**متوسط**
16	**لايوجد**
17	**ضعيف**
18	**قوي**
19	**قوي**
20	**متوسط**

References :

[1] Church, D.; Elsayed , S. ; Reid, O.; Winston, B. and Lindsay , R. Burn wound infections. Clinical microbiology Reviews . 19 (2): 403-404,2006.

[2] Wibbenmeyer, L.; Danks, R. and Faucher, L. Prospective analysis of nosocomial infection rates, antibiotic use, an patterns of resistance in a burn population . Burn care Res. 27 (2) : 152-160,2006.

[3] Gillespie, S. and Bamford, K. Medical microbiology and infection at a glance.Blackwel publishing ,2003.

[4] Todar , K. (2004) . *Pseudomonas aeruginosa* internet explorer . Todar's online text book of bacteriology.

[5] Westman , E.L. ; Matewish , J.M. and Lam , J. S. (2010) Pathogenesis of bacterial infections in animals. In: Edited by Gyles, C.L. ; Prescott , J. F. ; Songer , J.G. and Thoen , C.O. 4th ed. , John Wiley and sons,Inc. publication.

[6] Tokajian, S.; Timani, R.; Issa,N. and Araj,G. (2012). Molecular Characterization, Multiple Drug Resistance, and Virulence Determinants of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Lebanon . British Microbiology Research Journal. 2(4): 243-250 .

[7] Jason D. Cahmless; Stephan M. Hunt and Philip S. Stewart (2006). A Three – Dimensional Computer Model of Four Hypothetical Michanisms Protecting Biofilms from Antimicrobials. Journal of Applied and Environmental Microbiology, Vol. 72, No. 3.

[8]http://ar.wikipedia.org/wiki/%D8%A8%D9%8A%D9%88%D9%81%D9%8A%D9%84%D9%85

[9] Monds, R.D. and O'Toole, G.A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. Trends Microbiol. 17(2): 73-87.

[10] Niels H.; Thomas B.; Michael G.; Soren M. and Oana C. (2010). Antibiotic Resistance of Bacterial Biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents. 35(2010)322-332.

[11] Staudt C, Horn H, Hempel DC, Neu TR (2004). "Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms". *Biotechnol. Bioeng.* 88 (5): 585–92. doi:10.1002/bit.20241. PMID 15470707.

[12] Flemming ،Hans-Curt; Wingender ،Jost; Griebe ،Thomas; Mayer ،Christian (December 21, 2000), "Physico-Chemical Properties of Biofilms", in L. V. Evans, Biofilms: Recent Advances in their Study and Control,CRCPress,page20 Extra |pages= or |at= (help), ISBN 978-9058230935.

[13] Donlan RM (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces". *Emerging Infect. Dis.* 8 (9): 881–90. PMID 12194761.

[14] Donlan RM, Costerton JW (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms". *Clin. Microbiol. Rev.* 15 (2)167–93. doi:10.1128/CMR.15.2.167 193.2002.PMID 11932229.

[15] Gillespie, S. and Bamford, K. Medical microbiology and infection at a glance. Blackwel publishing ,2003

[16] Emmerson,M. Nosocomial Staphylococcal outbreak.Scandinavian. J. of infection diseases. Suppl. 93:47-54,1994

[17] De Macedo, J. L.S.; Rosa , S.C. and Castro, C. Sepsis in burned patients. Revista dasociedade Brasileria de Medicina Tropical. 36 (6) : 647-652,2003.

[18] Jawetz,E.;Melnick,j.L.and Adelberg,E.A. Review of medical micro biology.(1987) Appleton and lang.

[19] Barry A.L.The anti microbial susceptility tests :principle and practices (1976)Lea and febiger-philadelphia.

[20] Moor,R.A.;Bares,N.C. and Han cock,R.E.W. Interaction of polycataionic antibiotic with *pseudomonans aeruginosa*, lipopoly saccharide and studies by using dansly polymexin,(1986).Antimicro.Agents chemther.29(3):496-500.