



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء

كلية العلوم / قسم علوم الحياة

تحضير وتشخيص مضاد نانوي هجين من الليوفلوكساسين وتقييم كفاءته
التثبيطية ضد البكتريا المعزولة من قرحة القدم السكري

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة

من قبل

ساره محسن كاظم الحسيني

بكالوريوس علوم حياة- كلية العلوم / جامعة كربلاء 2015

إشراف

أ.د. علي عبد الكاظم الغانمي

كانون الأول 2017 م

ربيع الأول 1438 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

يرفع الله الذين آمنوا
منكم والذين أوتوا العلم
درجات والله بما تعملون
خبير

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

(سورة المجادلة - الآية 11)

إقرار المشرف

اشهد أن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء بوصفها جزءاً من متطلبات
نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيع:

الاسم: د . علي عبد الكاظم الغانمي

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ : 2017 / 12 / 13

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات أعلاه , أحيل هذه الدراسة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع :

الاسم: د . وفاء صادق الوزني

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : 2017 / 12 / 13

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أنني قومت رسالة الماجستير الموسومة بـ (تحضير وتشخيص مضاد نانوي هجين من الليفولوكساسين وتقييم كفاءته للتشبيطية ضد البكتريا المعزولة من قرحة القدم السكري) بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة إذ تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت للرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير .

التوقيع:

الاسم: د . محمد حسين المهداوي

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ: / /

الإهداء

إلى من كلله الله بالهبة والوقار .. إلى من علمني العطاء بدون انتظار .. إلى من أحمل أسمه بكل افتخار .. أرجو من الله أن يمد في عمرك لتزى ثماراً قد حان قطافها بعد طول انتظار وستبقى كلماتك نجوم أهتدي بها اليوم وفي الغد وإلى الأبد ..

والذي العزيز

إلى ملاكي في الحياة .. إلى معنى الحب وإلى معنى الحنان و التفاني .. إلى بسمة الحياة وسر الوجود إلى من كان دعائها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي

أمي الحبيبة

إلى أخوتي ورفاق دربي في هذه الحياة ، إلى من تحلو بالإخاء وتميزوا بالوفاء والعطاء إلى ينايع الصدق الصافي إلى من معهم سعدت ، إلى من أرى التفاضل بعينهم والسعادة في ضحكتهم .. في نهاية مشواري أريد أن أشكركم على مواقفكم النبيلة إلى من تطلعتم لنجاحي بنظرات الأمل

اخوتي واخواتي

أهدي هذا الجهد

ساره



شكر وثقافة

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ والصلاة والسلام على النبي محمد وآل بيته الطيبين الطاهرين

بعد رحلة بحث و جهد و اجتهاد تكلفت بإنجاز هذا البحث ، نحمد الله عز وجل على نعمه التي من بها علينا فهو العلي القدير ، كما لا يسعني إلا أن اخص بأسمى عبارات الشكر و التقدير استاذي الفاضل د. علي عبد الكاظم لما قدمه لي من جهد و نصح و معرفة طيلة انجاز هذا البحث .

كما اتقدم بالشكر الجزيل لكل من أسهم في تقديم يد العون لإنجاز هذا البحث، و اخص بالذكر عمادة كلية العلوم و رئاسة قسم علوم الحياة لإتاحة الفرصة لي لإكمال دراستي . ، كما لا انسى- أن اتقدم بأرقى و أثن عبارات الشكر و العرفان إلى منتسبي مختبر الصحة العامة ادارة ومنتسبين و اخص بالذكر السيدة أميرة محمد جبر الذين كانوا عوننا لنا في بحثنا هذا ونورا يضيء الظلمة التي كانت تقف أحيانا في طريقنا .

ولا يفوتني ان أتقدم بخالص أمتناني وتقديري للدكتور علاء عبد الحسين الدعيمي والدكتور عباس مطرود باشي/ كلية العلوم التطبيقية /جامعة كربلاء لتفضلهم بإنجاز التحليل الاحصائي الذي تطلبه البحث فضلا عن تفسير بعض نتائج الدراسة. كما يطيب لي ان اتقدم بخالص الشكر والتقدير للدكتور زيد حسن عبود /كلية العلوم /قسم الكيمياء ..

إلى من رافقتني و سارت الدرب معي خطوة بخطوة وما تزال ترافقتني حتى الآن الى صديقتي..... أمل

إلى من زرعوا التفاؤل في دربنا وقدموا لنا المساعدات والتسهيلات والمعلومات ، فلمهم منا كل الشكر.....

الباحثة



الخلاصة

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة عزل وتشخيص أهم أنواع البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري كما تضمنت أيضاً تحضير وتشخيص مركب نانوي هجين من المضاد ليفوفلوكساسين . تم تقييم الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي المحضر أعلاه ضد البكتريا المعزولة في هذه الدراسة كما تم تحديد الفعالية التأزيرية للمضاد النانوي مع المضادين الحرين Tieceoplanin و Cefixime وقد اظهرت النتائج ما يأتي :-

من مجموع 43 مُسحة مأخوذة من قرحة القدم لمرضى السكر الراقدين في مدينة الأمام الحسين (ع) الطبية في محافظة كربلاء المقدسة ، تم الحصول على 38 عزلة كثرية منها 10 عزلات (26.3) % من *Proteus mirabilis* و 9 عزلات (23.7) % *Staphylococcus aureus* و 4 عزلات (10.5) % *Escherichia coli* و 4 عزلات (10.5) % من *Pseudomonas* كانت 3 منها *Pseudomonas flouresence* وواحدة *Pseudomonas aeroginosa* وعزلتين (5.3) % من كل من *Enterococcus faecalis* و *Raoultella terrigena* و عزلة واحدة (2.6) % لكل من *Enterobacter cloacae* و *Acinetobacter baumannii* و *Providancia rettgeri* و *Burkholderia cepacia* و *Klebsiella pneumonia* و *Aeromonas salmonicida* و *Ochrobactrum anthropi* .

أُستخدم المضاد ليفوفلوكساسين في تحضير مركب نانوي هجين معد تحميله على طبقات ثنائية الهيدروكسيد Mg/Al layered double hydroxide (Mg/Al -LDH) وقد اوضحت نتائج الفحص مطيافية FTIR عن ظهور مجاميع كيميائية معينة واختفاء مجاميع اخرى كما اوضحت مطيافية الاشعة السينية (XRD) عن ظهور مستويات حيود جديدة في طيف المضاد النانوي الهجين Mg/Al -LEV-LDH مقارنة طيف الحامل Mg/Al -LDH مما يشير الى ان المركب المحضر قيد الدراسة مركب نانوي . وأظهرت نتائج الفحص مجهر القوة الذرية (AFM) أن أبعاد دقائق المضاد النانوي الهجين لغت 94.83 نانومتر .

دُرست الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH والمضاد الحر (Free LEV) وقد أوضحت نتائج هذه الدراسة ما يأتي :-

امتلاك المضاد النانوي الهجين أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلة 13b *P. mirabilis* قطر تثبيط مقداره 34.75 ملم ، بينما كان قطر تثبيط المضاد الحر 47 ملم ، ضد العزلة 17a .

أظهر المضاد النانوي الهجين أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلة 14b *E. coli* قطر تثبيط مقداره 13.75 ملم في حين كانت أعلى فعالية تثبيطية للمضاد الحر ضد العزلة ذاتها قطر تثبيط مقداره 26.5 ملم .

أدى المضاد النانوي الهجين أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلة 73 *P. aeruginosa* قطر تثبيط مقداره 41.5 ملم ، بينما كانت أعلى فعالية تثبيطية للمضاد الحر ضد العزلة ذاتها قطر تثبيط مقداره 47.5 ملم .

كانت أقصى فعالية تثبيطية لليوفولوكساسين النانوي ضد العزلتين 2 و 3 *S. aureus* قطر تثبيط مقداره 36 ملم لكل منهما ، فيما كانت أعلى فعالية تثبيطية لليوفولوكساسين الحر ضد العزلة 3 *S. aureus* قطر تثبيط مقداره 43 ملم .

أن التوليف بين المضاد النانوي الهجين LEV-LDH المحضر في هذه الدراسة والمضاد الحر Cefixime بيدي فعلاً تآزرياً ضد بعض عزلات *P. mirabilis* كثرها فيما بيدي فعلاً تضادياً ضد البعض الآخر .

أن التوليف بين المضاد النانوي الهجين LEV-LDH والمضاد الحر Teicoplanin في هذه الدراسة بيدي فعلاً تآزرياً ضد بعض عزلات *S. aureus* كثرها فيما بيدي فعلاً تضادياً ضد البعض الآخر .

قائمة المحتويات

الصفحة	المحتويات	التسلسل
1	المقدمة	
3	استعراض المراجع	-1
3	مضادات Quinolones و Fluoroquinolones	1-1
3	لمحة تاريخية	1-1-1
4	تصنيف مضادات Fluoroquinolones	2-1-1
4	المضاد ليفوفلوكساسين (Levofloxacin)	1-2-1-1
6	أخماج الجروح	2-1
6	قرحة القدم السكري (Diabetic foot ulcer)	3-1
7	تصنيف قرحة القدم السكري	1-3-1
8	الأحياء المجهرية المسببة لخمج قرحة القدم السكري	4-1
9	<i>Staphylococcus aureus</i>	1-4-1
10	<i>Proteus mirabilis</i>	2-4-1
11	<i>Pseudomonas spp.</i>	3-4-1
12	<i>Escherichia coli</i>	4-4-1
13	التقنية النانوية (Nanotechnology)	5-1
13	التطور التاريخي للتقنية النانوية	1-5-1
15	حوامل الأدوية (Drug carriers)	2-5-1
15	الحوامل الدقائقية (Particulate carriers) كأنظمة إيصال للأدوية	3-5-1
16	الدقائق النانوية (Nanoparticles)	4-5-1
16	تصنيف الدقائق النانوية	1-4-5-1
18	الدقائق النانوية أنظمة إيصال للأدوية المضادة للأحياء المجهرية	2-4-5-1
19	مركبات النانو (Nanocomposites)	5-5-1

19	الطبقات ثنائية الهيدروكسيد (Layered double hydroxide, LDH)	6-5-1
22	طرائق التشخيص في التقنية النانوية	7-5-1
26	المواد وطرائق العمل	-2
26	المواد والاجهزة المستخدمة	1-2
26	الاجهزة المستخدمة والشركات المصنعة لها	1-1-2
27	المواد الكيميائية والاسواط الزرعية المستخدمة والشركات المصنعة لها	2-1-2
28	طرائق العمل	2-2
28	جمع عينات قرحة القدم السكري	1-2-2
28	الاسواط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري	2-2-2
30	الكواشف والمحاليل المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري	3-2-2
32	عزل وتشخيص البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري	4-2-2
33	تمييز البكتريا الموجبة عن السالبة لصبغة غرام	1-4-2-2
33	عزل وتشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام	2-4-2-2
33	عزل وتشخيص بكتريا الـ <i>Proteus</i>	1-2-4-2-2
35	عزل وتشخيص الانواع الاخرى من البكتريا السالبة لصبغة غرام	2-2-4-2-2
35	عزل وتشخيص البكتريا الموجبة لصبغة غرام	3-4-2-2
35	عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية <i>Staphylococcus</i>	1-3-4-2-2
37	عزل وتشخيص بكتريا <i>Enterococcus</i>	2-3-4-2-2
38	اختبار حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية	5-2-2
39	حفظ وإدامة العزلات	6-2-2
39	تحضير المركب النانوي الهجين المستخدم في هذه الدراسة	7-2-2
39	تحضير المضيف او الحامل (Host or Carrier)	1-7-2-2
40	تحضير المضاد النانوي باستخدام الحامل طبقات ثنائية الهيدروكسيد	2-7-2-2
41	تشخيص المضاد النانوي الهجين	8-2-2
41	التشخيص باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR	1-8-2-2
42	التشخيص باستخدام طيف حيود الاشعة السينية XRD	2-8-2-2

42	التشخيص باستخدام مجهر القوة الذرية AFM	3-8-2-2
42	التحليل الدقيق للعناصر (CHN) في المضادات النانوية الهجينة	9-2-2
44	دراسة تحرر المضاد ليفوفلوكساسين من المضاد النانوي الهجين	10-2-2
45	تعيين منحنى المعايرة (Calibration Curve) للمضاد ليفوفلوكساسين	1-10-2-2
45	طريقة تحرر المضاد النانوي ليفوفلوكساسين الى المحاليل المنظمة	2-10-2-2
46	دراسة النسبة المئوية لتحرر المضاد ليفوفلوكساسين من بين طبقات المضاد النانوي الهجين	3-10-2-2
47	تقدير الفعالية التثبيطية للمضاد Levofloxacin بنوعيه الحر و النانوي ضد البكتريا المعزولة في هذه الدراسة	11-2-2
48	التحليل الاحصائي (Statistical Analysis)	12-2-2
49	النتائج والمناقشة	-3
49	عزل وتشخيص البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري	1-3
51	تشخيص البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري	2-3
51	تشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام	1-2-3
51	تشخيص بكتريا <i>Proteus mirabilis</i>	1-1-2-3
52	تشخيص بكتريا <i>Pseudomonas spp.</i>	2-1-2-3
55	تشخيص بكتريا <i>E. coli</i>	3-1-2-3
56	تشخيص بكتريا <i>Routella</i>	4-1-2-3
57	تشخيص بكتريا <i>A. baumannii</i>	5-1-2-3
59	تشخيص بكتريا <i>E. cloacae</i>	6-1-2-3
60	تشخيص بكتريا <i>K. pneumonia</i>	7-1-2-3
62	تشخيص بكتريا <i>B. cepacia</i>	8-1-2-3
63	تشخيص بكتريا <i>P. rettgeri</i>	9-1-2-3
64	تشخيص بكتريا <i>A. salmonicida</i>	10-1-2-3
66	تشخيص بكتريا <i>O. anthropic</i>	11-1-2-3
67	تشخيص البكتريا الموجبة لصبغة غرام	2-2-3
68	تشخيص بكتريا المكورات العنقودية <i>Staphylococcus</i>	1-2-2-3

68	تشخيص بكتريا <i>S. aureus</i>	2-1-2-2-3
69	تشخيص بكتريا <i>E. faecalis</i>	2-2-2-3
71	اختبار حساسية العزلات المسببة لتلوث قرحة القدم السكري للمضادات الحيوية	3-3
71	اختبار حساسية عزلات البكتريا السالبة لصبغة غرام للمضادات الحيوية	1-3-3
79	اختبار حساسية عزلات البكتريا الموجبة لصبغة غرام للمضادات الحيوية	2-3-3
81	تشخيص المضاد النانوي الهجين ليفوفلوكساسين بالطرائق الطيفية	4-3
81	طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR	1-4-3
81	طيف الأشعة تحت الحمراء لطبقات المغنيسيوم/الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد	1-1-4-3
82	طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد ليفوفلوكساسين الحر (LEV)	2-1-4-3
82	طيف الأشعة تحت الحمراء للليفوفلوكساسين النانوي الهجين Mg\Al – LEV –LDH	3-1-4-3
86	طيف حيود الأشعة السينية (XRD)	2-4-3
86	مجهر القوة الذرية - (AFM)	3-4-3
89	التحليل الدقيق للعناصر في المضاد Levofloxacin	5-3
90	دراسة تحرر المضاد Levofloxacin من المضاد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH	6-3
93	دراسة حركيات التحرر (Release Kinetics) للمضاد ليفوفلوكساسين	1-6-3
94	الفعالية التثبيطية للمضاد ليفوفلوكساسين (LEV) ضد البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري	7-3
94	الفعالية التثبيطية للليفوفلوكساسين ضد بكتريا <i>P. mirabilis</i>	1-7-3
99	الفعالية التثبيطية للليفوفلوكساسين ضد بكتريا <i>E. coli</i>	2-7-3
100	الفعالية التثبيطية للليفوفلوكساسين ضد بكتريا <i>Pseudomonas spp.</i>	3-7-3
101	الفعالية التثبيطية للليفوفلوكساسين ضد الانواع البكتيرية الأخرى	4-7-3
102	الفعالية التثبيطية للليفوفلوكساسين ضد بكتريا <i>S. aureus</i>	5-7-3
106	الفعل التثبيطي التآزري للمضادات الحيوية النانوية الهجينة ضد بكتريا <i>P. mirabilis</i> و <i>S. aureus</i>	6-7-3
110	الاستنتاجات والتوصيات	
111	المصادر	
133	الملاحق	

قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
6	التركيب الكيميائي لليوفلوكساسين	1
21	الطبقات ثنائية الهيدروكسيد (LDH)	2
45	منحنى المعايرة للمضاد ليوفلوكساسين	3
50	أنواع الأحياء المجهرية المعزولة من قرحة القدم السكري في محافظة كربلاء المقدسة	4
83	طيف الأشعة تحت الحمراء لطبقات المغنيسيوم الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد	5
84	طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد ليوفلوكساسين الحر LEV free	6
85	طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد ليوفلوكساسين النانوي الهجين LEV-LDH	7
87	طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لطبقة المغنيسيوم الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al-NO ₃ -LDH)	8
87	طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لليوفلوكساسين النانوي الهجين (Mg/Al-LEV-LDH)	9
88	صورة ثنائية الأبعاد (a) وثلاثية الأبعاد (b) للمضاد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH	10
91	النسبة المئوية لتحرر المضاد ليوفلوكساسين من المضاد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH الى محلول منظم الفوسفات (برقم هيدروجيني 7.4) بطريقة التبادل الأيوني المباشر	11
91	النسبة المئوية لتحرر المضاد ليوفلوكساسين من المضاد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH الى محلول منظم الخلات (برقم هيدروجيني 5.2) بطريقة التبادل الأيوني المباشر	12
92	النسبة المئوية لتحرر المضاد ليوفلوكساسين من المضاد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH الى المحلول المنظم ترس (برقم هيدروجيني 8.8) بطريقة التبادل الأيوني المباشر	13
95	موديل الرتبة الأولى و الثانية الكاذبتين لتحرر المضاد ليوفلوكساسين من المضاد النانوي Mg/Al-LEV-LDH الى محلول منظم الفوسفات (pH 7.4)	14
96	موديل الرتبة الأولى و الثانية الكاذبتين لتحرر المضاد ليوفلوكساسين من المضاد النانوي Mg/Al-LEV-LDH الى محلول منظم الترس (pH 8.8)	15

97	موديل الرتبة الأولى و الثانية الكاذبتين لتحرر المضاد ليفوفلوكساسين من المضاد النانوي Mg/Al-LEV-LDH الى محلول منظم الخلايا (pH 5.2)	16
----	--	----

قائمة الجداول

5	تصنيف مضادات Fluoroquinolones	1
8	تصنيف اخماج قرحة القدم السكري	2
14	تاريخ تطور التقنية النانوية	3
20	الأنواع المختلفة لمركبات النانو	4
52	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>P. mirabilis</i>	5
53	الاختبارات الشكلية و الكيموحيوية لبكتريا <i>Pseudomonas spp.</i>	6
56	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>E. coli</i>	7
57	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>R. terrigena</i>	8
58	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>A. baumannii</i>	9
59	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>E. cloacae</i>	10
61	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>K. pneumonia</i>	11
62	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>B. cepacia</i>	12
64	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>P. rettgeri</i>	13
65	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>A. salmonicida</i>	14

67	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>O. anthropi</i>	15
69	الاختبارات الشكلية و الكيموحيوية لبكتريا <i>S. aureus</i>	16
70	الاختبارات الشكلية و الكيموحيوية لبكتريا <i>E. faecalis</i>	17
72	اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>P. mirabilis</i> تجاه مضادات الحيوية	18
74	اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>Pseudomonas spp.</i> و <i>E. coli</i> تجاه المضادات الحيوية	19
76	اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>K. pneumonia</i> و <i>E. cloacae</i> و <i>R. terrigena</i> و <i>A. baumannii</i> تجاه مضادات الحيوية	20
78	اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>A. salmonicida</i> و <i>P. rettergi</i> و <i>O. anthropi</i> تجاه المضادات الحيوية	21
80	اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>S. aureus</i> تجاه المضادات الحيوية	22
81	اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>E. faecalis</i> تجاه المضادات الحيوية	23
88	اقطار واحجام وتجمعات جزيئات المركب النانوي Mg\Al-LEV-LDH بعد فحصه بمجهر القوة الذرية	24
89	التحليل الدقيق لعناصر الكربون و الهيدروجين و النيتروجين في المضاد Levofloxacin	25
93	قيم معامل الارتباط لتفسير سلوكيات حركيات التحرر للمضاد ليفوفلوكساسين من المضاد النانوي الهجين	26
98	الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي LEV-LDH والمضاد الحر LEV ضد البكتريا <i>P. mirabilis</i> المعزولة من قرحة القدم السكري	27
100	الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي LEV-LDH والمضادات الحرة LEV ضد البكتريا <i>E. coli</i> المعزولة من قرحة القدم السكري	28

101	الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي LEV-LDH والمضاد الحر LEV ضد البكتريا المعزولة من قرحة القدم السكري <i>Pseudomonas spp.</i>	29
103	الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي LEV-LDH والمضاد الحر LEV ضد البكتريا المعزولة من قرحة القدم السكري	30
104	الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي LEV-LDH والمضاد الحر LEV ضد البكتريا المعزولة من قرحة القدم السكري	31
105	الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي LEV-LDH و المضاد الحر LEV ضد البكتريا <i>S. aureus</i> المعزولة من قرحة القدم السكري	32
107	الفعالية التثبيطية التأزرية للمضاد النانوي LEV-LDH ضد البكتريا <i>P. mirabilis</i> المعزولة من قرحة القدم السكري	33
108	الفعالية التثبيطية التأزرية للمضاد النانوي LEV-LDH ضد البكتريا <i>S. aureus</i> المعزولة من قرحة القدم السكري	34

فائمة المخطاط

رقم المخطاط	العنوان	الصفحة
1	التداخلات بين العوامل الأيضية و التشريحية والبكتريولوجية في اخماج القدم السكري	7
2	انواع أنظمة اىصال الدواء الدفانقية	16
3	عزل وتشخيص البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري	32
4	عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية	36
5	تحضير المضاد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH بطريقة التبادل الايوني المباشر	43

فائمة الملاحق

الصفحة	العنوان	رقم الملحق
133	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا <i>P. mirabilis</i>	1
134	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا <i>Pseudomonas spp.</i>	2
135	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا <i>E. coli</i>	3
136	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا <i>R. terrigena</i>	4
137	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا <i>A. baumannii</i>	5
138	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا <i>E. cloacae</i>	6
139	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا <i>K. pneumonia</i>	7
140	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا <i>B. cepacia</i>	8
141	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا <i>P. rettgeri</i>	9
142	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا <i>A. salmonicida</i>	10
143	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا <i>O. anthropi</i>	11
144	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 Strep لتشخيص بكتريا <i>E. faecalis</i>	12

فائمة المختصرات

AFM	Atomic Force Microscope
APi	Analytical profile index
DFI	Diabetic foot infection
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDX	Energy Dispersive X-Ray Analysis
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
HRTEM	High Resolution Transmission Electron Microscopy
L.S.D	Least significant difference
LDH	Layered double hydroxide
LEV	Levofloxacin
MDR	Multidrug- resistant
Mg/Al- LEV -LDH	Mg/Al-Levofloxacin-Layered double hydroxide
MSA	Manitol salt agar
SE	<i>Staphylococcal</i> Enterotoxins
SEI	<i>Staphylococcal</i> Enterotoxins like protein
SEM	Scanning Election Microscope

STM	Scanning Tunneling Microscopy
TEM	Transmission Electron Microscopy
TSST	Toxic shock syndrome toxin
UTI	Urinary tract infection
UV-VIS	Ultraviolet-Visible Spectroscopy
XPS	X-Ray Photoelectron Spectroscopy
XRD	X-ray diffraction

المقدمة

المقدمة

تشير احدى الإحصائيات العالمية الى أن عدد المصابين بمرض السكر يبلغ حوالي 170 مليون شخص حاليا ومن المتوقع ان يتضاعف هذا العدد بحلول عام 2030 . وفي احصائية اخرى وجد ان 15% من المصابين بهذا المرض يتعرضون لقرحة القدم السكري (Diabetic foot ulcer) التي تتموضع في المنطقة الواقعة تحت كعب القدم وتنصف بكونها مصدرا للعديد من الاعتلالات المرضية التي تشتمل على التهاب كل من حنار الاظفر والانسجة والعضلات والمفاصل والاورتار ونقي العظم , وقد تتطور الأخماج لتغزو الانسجة العميقة مسببة بعض الاضطرابات المناعية , فضلا عن ان 84% من المصابين بهذه القرحة ينتهي بهم الامر الى بتر سيقانهم (Lipsky *et al.*, 2004 ; Prenyah *et al.*, 2014 ; Zubair *et al.*, 2015) .

تتشترك انواع مختلفة من الأحياء المجهرية في إحداث الخمج لقرحة القدم السكري , وتقف البكتريا في طليعتها عبر امتلاكها لعوامل ضراوة مختلفة أولا ومقاومتها للمضادات الحيوية ثانيا. فالأخماج الحادة تكاد تقتصر على نوع مفرد من البكتريا الكروية الموجبة لصبغة غرام , بينما تتميز الاخماج المزمنة بوجود (3-5) انواع بكتيرية فيما تقوم بكتريا *Staphylococcus* السالبة لإنزيم التجلط وانواع *Corynebacterium* باستعمار الأنسجة الرخوة , فضلا عن ذلك فقد تسمح قرحة القدم حتى بتواجد بعض انواع البكتريا اللاهوائية والفطريات (Lipsky *et al.*, 2004) .

استخدمت انواع مختلفة من المضادات الحيوية في تثبيط الاحياء المجهرية المتواجدة في قرحة القدم السكري , وتعد مضادات Fluoroquinolones واحدة من اهم تلك المضادات بالنظر لامتلاكها طيفا تثبيطيا واسعا ضد الممرضات المهمة سريريا المسؤولة عن الكثير من الأخماج الشائعة مثل أخماج المجاري البولية والأخماج المعوية وأخماج المجاري التنفسية والامراض المنقولة جنسيا فضلا عن أخماج الجلد والانسجة الرخوة وغيرها (; Blondeau, 1999 ; Abraham , 2003 ; Guneyssel *et al.*, 2009) .

وينتمي المضاد ليفوفلوكساسين (Levofloxacin) الى الجيل الثالث من مضادات Fluoroquinolones ويتميز بفعالته المضادة واسعة الطيف ضد البكتريا , اذ يطال تأثيره المثبط كلا من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام على حد سواء (Wimer *et al.*, 1998) .

ان استخدام المضادات الحيوية التقليدية في العقود الأخيرة بدأ يتسم بظهور العديد من المشاكل والسلبيات تتمثل بتطور مقاومة الأحياء المجهرية لها وانخفاض معاملها العلاجي (Therapeutic index) وسميتها الخلوية وأثارها الجانبية وآلية تأثيرها غير المخصصة (Non-specific mode of action) فضلا عن عوبة تجريعها لذا فقد جاءت التقنية النانوية الصيدلانية (Pharmaceutical Nanotechnology) لتقدم الحلول الناجحة للمشاكل والسلبيات المذكورة أعلاه اذ ان تصنيع المواد بأبعاد محصورة بين (1- 100) نانوميتر وما تمتلكه من فئات فيزيائية وكيميائية فريدة (غير حجمها وازدياد نسبة مساحة سطحها الى حجمها) يجعلها مؤهلة للعمل كعربات لحمل العوامل العلاجية المختلفة ويمكنها من عبور معظم الحواجز الفسيولوجية وولا الى اهدافها المحددة أولا ويهيئها بشكل أفضل للتفاعل مع الممرضات والأغشية ثانيا والسيطرة على تحرر الدواء (Drug release) ثالثا وتقليل تأثيراته على الأنسجة الحية رابعا فضلا عن تحجيم أضراره الجانبية الى أدنى حد ممكن خامسا (Sharma *et al.*, 2012 ; Wilszewska *et al.*, 2012).

وبالنظر لخطورة أحماج قرحة القدم السكري فقد هدفت هذه الدراسة الى الحصول على مضاد حيوي نانوي كفوء في تثبيط البكتريا التي تشترك في إحداث هذه الأحماج , عبر تحقيق المحاور الاتية :

- 1- عزل وتشخيص البكتريا المشتركة في إحداث أحماج قرحة القدم السكري .
- 2- تحضير مضاد نانوي هجين من المضادات شائعة الاستخدام في تثبيط البكتريا المعزولة أعلاه .
- 3- تشخيص المضاد النانوي بالطرائق الطيفية والفحوصات المجهرية .
- 4- تحديد كفاءة المضاد النانوي في تثبيط البكتريا قيد الدراسة .

الفصل الأول

استعراض المراجع

1- استعراض المراجع

1-1 مضادات Quinolones و Fluoroquinolones :

1-1-1 لمحة تاريخية :

تشكل مضادات Quinolones صنفا من المضادات المصنعة ذات الطيف التثبيطي الواسع ضد البكتريا . ويعد حامض Nalidixic أول مضاد تم اكتشافه من هذا الصنف وذلك في العام 1962 من قبل Lesher وجماعته بعد نجاح تصنيعه من مضاد الملاريا Chloquine وقد تميز هذا الحامض بفعاليته العالية ضد بعض أنواع البكتريا السالبة لصبغة غرام بيد أن فائدته كانت محدودة بالنظر لإرتباطه العالي بالبروتين وقصر نصف عمره فضلا عن تطور المقاومة البكتيرية له (Dollery ,1999 ; Appelbaum and Hunter , 2000 ; Pandey , 2003) .

وفي عام 1968 تمكن Kaminsky و Melfezer من اكتشاف حامض Oxolinic الذي لاقى قبولا جيدا من وزارة الغذاء والأدوية الأمريكية . وقد بذلت جهود حثيثة لتحويل هذا الحامض واستخدامه في تصنيع مشتقات عديدة ذات فعالية بايولوجية (Pandey , 2003) .

وفي الستينيات والسبعينيات من القرن الماضي أسفرت عمليات البحث المتواصلة على المركبات 4-quinolone-3-carboxylates عن اكتشاف عائلة 4-piperazinyl-6-fluoro-7-quinolones والتي عرفت فيما بعد بـ Fluoroquinolones التي حظيت بالعديد من المميزات يتصدرها اتساع طيفها المضاد للبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام كما انها سهلة التجريع (Ease of administration) وذات امتصاص فموي ممتاز (Excellent oral absorption) كما تميزت بقوة اختراقها للأنسجة وإمكانية إطالة أنصاف أعمارها (Prolonged half- lives) فضلا عن كونها أمينة وكفوءة (Nichols , 2000 ; Michael *et al.*, 2000 ; Soni , 2012) .

ويعد المضاد Flumequine أو مضاد تم تصنيعه من عائلة Fluoroquinolones وذلك في العام 1973 أعقب ذلك تصنيع العديد من المضادات العائدة للعائلة ذاتها مثل Norfloxacin و Pefloxacin عامي 1978 و 1979 , على التوالي . وفي عام 1980 حدثت ثورة كبيرة عندما تم تصنيع المضاد Enoxacin وهو أحد مشتقات حامض Nalidixic . تميز هذا المضاد بطيفه التثبيطي الواسع ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام . أما المضادان Fleroxacin و

Ciprofloxacin فقد تم تصنيعهما عام 1981 فيما تم تصنيع المضاد Ofloxacin عام 1982 (Appelbaum and Hunter , 2000 ; Patrick , 2003) .

ويعد المضاد Ciprofloxacin أكثر أنواع مضادات Fluoroquinolones استخداماً وتم تسويقه على المستوى التجاري عام 1986 . ومنذ ذلك الحين ازدادت قيمة مضادات Fluoroquinolones بالنظر لتحسين خصائصها الصيدلانية (Pharmacokinetic properties) فضلا عن اتساع خصائصها التثبيطية لتشمل *Mycobacteria* وأنواع مختلفة من الطفيليات فضلا عن البكتريا المقاومة للأدوية (De Almeida *et al.*, 2006 ; Anquetin *et al.*, 2007) .

تتضح آلية عمل مضادات Fluoroquinolones من خلال إيقافها لعملية تكرار الـ DNA (DNA replication) بتثبيطها لأنزيم DNA gyrase مما يؤدي الى توقف نمو الخلية البكتيرية فيما بعد (Soni , 2012) .

2-1-1 تصنيف مضادات Fluoroquinolones :

اعتمادا على الطيف التثبيطي والخصائص الصيدلانية يمكن تصنيف مضادات Fluoroquinolones على وفق ما هو موضح في الجدول 1 (Scholar , 2003) .

1-2-1-1 المضاد ليفوفلوكساسين (Levofloxacin) :

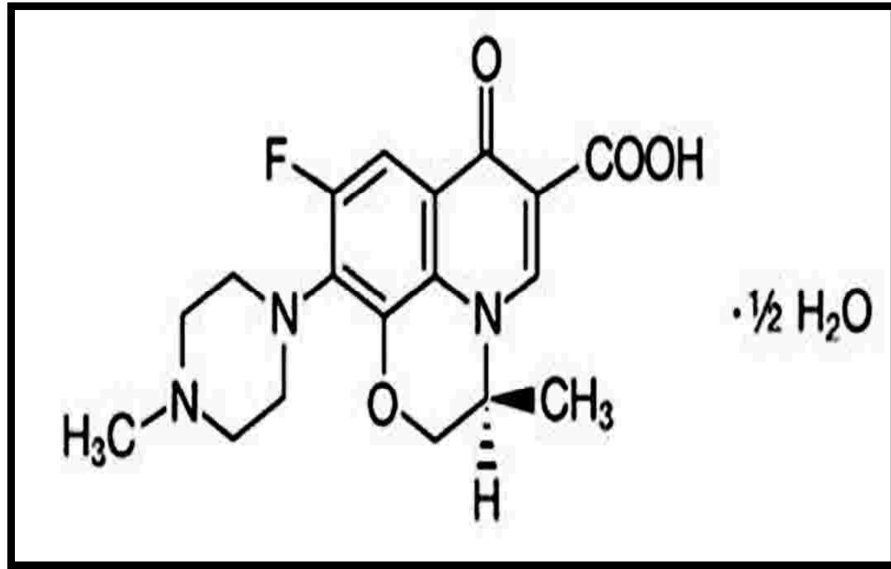
يصنف هذا المضاد ضمن عائلة Fluoroquinolones ويمتلك طيفا تثبيطيا واسعا ضد كل من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام وممرضات الجهاز التنفسي فضلا عن كونه فعالا ضد بكتريا *Streptococcus pneumonia* الحساسة والمقاومة للبنسلين بيد انه يبدي فعالية ضعيفة ضد معظم البكتريا اللاهوائية (Appelbaum ,1999 ; Hurst *et al.*, 2002 ; Credito *et al.*, 2003 ; Croom and Goa , 2003) . من الناحية الكيميائية فإن الليفوفلوكساسين هو مركب Carboxyquinolones مفلور كيرالي (Chiral fluorinated carboxy quinolone) الاسم الكيميائي لهذا المضاد هو (-)-(S)-9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl) - 7- oxo-7H-pyrido [1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-

الجدول 1 : تصنيف مضادات Fluoroquinolones (Scholar , 2003)

الجيل	الدواء	السمات المميزة
الأول	Nalidixic acid Oxolinic acid Pipemidic acid	فعالة □ د بعض أنواع البكتيريا السالبة لصبغة غرام . من الادوية المرتبطة بالبروتين بنسبة عالية . قصر نصف عمرها .
الثاني	Norfloxacin Enoxacin Ciprofloxacin Ofloxacin Lomefloxacin	نسبة ارتباطها بالبروتين (50) % . ذات نصف عمر أطول مقارنة بالعوامل السابقة . تحسين فعاليتها □ د البكتيريا السالبة لصبغة غرام .
الثالث	Levofloxacin Temafloxacin Sparafloxacin Grepafloxacin	نسبة ارتباطها 24 – 38 % . فعالة □ د البكتيريا السالبة لصبغة غرام . فعالة أيضا □ د البكتيريا الموجبة بصبغة غرام .
الرابع	Clinafloxacin Trovafoxacin Moxifloxacin Gatifloxacin	تبدى فعالية تثبيطية واسعة □ د كلا نوعي البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام . فعالة □ د البكتيريا اللاهوائية والبكتيريا غير النمطية (Atypical bacteria) .

carboxylic acid hemihydrates وهو مسحوق بلوري عديم الرائحة ذو لون أبيض الى أصفر يبلغ وزنه الجزيئي 361 أما درجة انصهاره فهي 228.6 م° . وهو مركب غير ذائب في الماء ولكنه يذوب في الأيثانول والكلوروفورم . وهو يتواجد بشكل Zwitterion عند قيم الرقم الهيدروجيني (pH) في الأمعاء , فضلا عن ذلك فإن الليفوفلوكساسين يمتلك مجموعتين و□ يفيتين متأينتين : مجموعة كاربوكسيل (Carboxylic group) ومجموعة Piperanyzl group

(Sarislitik and Teksin , 2007) ويوضح الشكل 1 التركيب الكيميائي لهذا المضاد . (Hurst *et al.*, 2002)



الشكل 1 : التركيب الكيميائي لليوفلوكساسين (Hurst *et al.*, 2002)

2-1 أخماج الجروح :

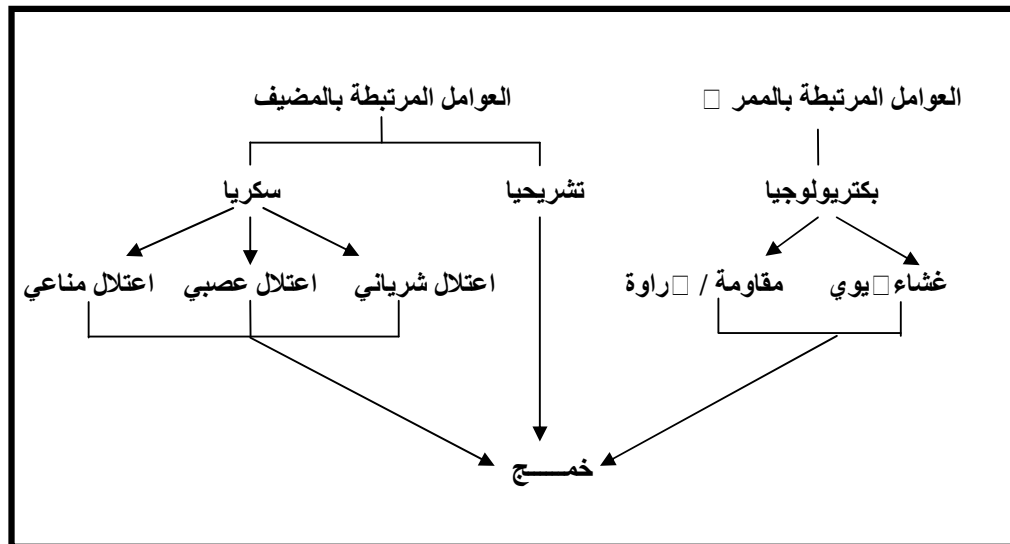
الجروح هي تمزيق الأجزاء الرخوة من تراكيب الجسم ويمكن أن تصنف إلى ثلاثة أقسام : عارضة (accidental) ومرضية (pathological) وما بعد العمليات الجراحية (post-operative). وأياً كانت طبيعة الجرح فإن الخمج (infection) يبدأ بارتباط الأحياء المجهرية بخلايا المضيف يعقبه تكاثرها واستعمارها وتموضعها بالشكل الذي يحدث تلفاً لأنسجة المضيف . (Singleton and Sainsbury, 1978 ; Collier , 2003 ; Torpy *et al.*, 2005)

3-1 قرحة القدم السكري (Diabetic foot ulcer) :

يتصف مرض السكر (Diabetic mellitus) بكونه اضطراباً في الغدد الصماء ينجم عنه فقدان القابلية على تنظيم مستوى الكلوكرز في الدم مما يؤدي إلى العديد من المضاعفات مثل المضاعفات العصبية واضطرابات الأوعية الدموية والأعتلا العصبية فضلاً عن اعتلا الكلية وبقية العين (Kengne *et al.*, 2006). تتظاهر العديد من العوامل ذات العلاقة بمرض السكر

في اضعاف عملية التئام جروح مرضى السكر تشتمل هذه العوامل على نقص الأوكسجين الواصل الى الجرح ونقص التغذية فضلا عن المر □ نفسه (Lavery *et al.*, 2007) . ان تذبذب كمية السكر في الدم ونقص الأوكسجين من خلا □ التدوير الضعيف للدم قد يضعف قابلية خلايا الدم البيضاء على تدمير البكتيريا والفطريات المرضية وبالتالي زيادة خطر الإصابة (Stadelmann *et al.*, 1998).

ان الفسلجة المرضية لإخماج قرحة القدم السكري (Diabetic foot infection , DFI) معقدة تماما , اذ ان انتشار الأخماج □ دنتها يعتمد على نوعين من العوامل هما : العوامل المرتبطة بالمضيف (Host- related factors) والعوامل المرتبطة بالممر □ (Pathogen-related factors) تشتمل الأولى منها على الاعتلا □ المناعي والعصبي وأمرا □ الشرايين فيما تشتمل الثانية على عوامل الضراوة ومقاومة الممر □ للمضادات الحيوية والتنظيم المايكروبي بحسب ما هو موضح في المخطط 1 (Lavery *et al.*, 2006 ; Spichler *et al.*, 2015).



المخطط 1 : التداخلات بين العوامل الأيضية و التشريحية والبكتريولوجية في اخماج القدم السكري (Lavery *et al.*, 2006 ; Spichler *et al.*, 2015)

1-3-1 تصنيف قرحة القدم السكري :

اعتمدت بعض الملامح السريرية (Clinical criteria) في تصنيف □ دة أخماج قرحة القدم بحسب ما هو موضح في الجدو □ 2 (Lipsky , 2004 ; Richard *et al.*, 2011) .

الجدول 2 : تصنيف اخماج قرحة القدم السكري (Lipsky , 2004 ; Richard *et al.*, 2011)

الدرجة	الأعرا □
الأولى	عدم وجود أي أعرا □ ، وعدم وجود أي علامات للخمج .
الثانية	تقتصر الآفة (Lesion) على الجلد (أذ يلاحظ وجود آفة تحت الجلد (subcutaneous) أو أي □ طرابات جهازية) مع وجود اثنتين من العلامات الاتية على الأقل : - حرارة مو □ عية - □ مرار < (2-0.5) سم □ ول القر □ ة - ألم مو □ عي أو الألم باللمس - تصلب أو انتفاخ مو □ عي - إفرازات قيحية (سميكة ، غامقة إلى بيضاء أو إفراز دموي)
الثالثة	- □ مرار < 2 سم و □ دة من الأعرا □ الموصوفة أعلاه أو - إصابة النسيج تحت الجلد مؤدية الى □ صول خراج عميق والتهاب الأوعية اللمفاوية والتهاب نقي العظم والتهاب المفاصل أو اللقافة (Fasciitis) .
الرابعة	وجود علامات جهازية مسؤولة على الأقل عن اثنتين من الخصائص الاتية : - درجة الحرارة < 39 م° أو > 36 م° - نبض < 90 نبضة في الدقيقة - الكريات البيض < 12000 أو > 4000 / ملم ³ - وجود 10% من الكريات البيض غير الناقية .

4-1 الأبياء المجهرية المسببة لخمج قرحة القدم السكري :

ان تنوع الأحياء المجهرية في قرحة القدم يتأثر بعوامل عدة تشتمل على عمق الجرح (wound depth) و Tissue perfusion والمناعة الخلطية المتغيرة (Altered host)

(humoral immunity) فضلا عن الموقع الجغرافي (Geographic location) (Martin *et al.*, 2010).

تتصف أخماج قرحة القدم السكري بكونها متعددة الأحياء المجهرية (poly microbial) وخليط من الأحياء الهوائية واللاهوائية (mixed aerobic - anaerobic) تتمثل البكتريا الهوائية الشائعة بأجناس *Staphylococcus* و *Streptococcus* وأنواع من عائلة *Enterobacteriaceae* بينما تتمثل البكتريا اللاهوائية الشائعة بجنسي *Peptostreptococcus* و *Bacteroides* (Hancevic *et al.*, 1994 ; Kahn and Weir, 2002). أما الفطريات الأكثر شيوعا في أخماج قرحة القدم السكري فتتمثل بجنس *Candida* (Missoni *et al.*, 2005).

ومن أهم أنواع البكتريا المسببة لخمج قرحة القدم السكري :

***Staphylococcus aureus* 1-4-1**

تتصف المكورات العنقودية الذهبية بكونها بكتريا كروية موجبة لصبغة غرام قطرها حوالي 1 مايكروميتر تقريبا تتجمع خلاياها بشكل يشبه عناقيد العنب بالنظر لحدوث انقسامها الخلوي في أكثر من مستو واحد . وكثيرا ما تكون متعايشة (Commensal) في الجلد ، والغدد الجلدية ، والأغشية المخاطية ، وخاصة في انوف الأخصاء (Crossley and Archer , 1997). وتشير التقديرات إلى أن حوالي (20-30) % من عامة السكان هم حاملين لبكتريا *S. aureus* (Heyman , 2004).

بكتريا *S. aureus* لاهوائية اختيارية لها القابلية على توليد الطاقة عن طريق التنفس الهوائي ، وعن طريق التخمر الذي ينتج حامض اللاكتيك (lactic acid) بشكل رئيس . تعطي نتيجة موجبة لفحص أنزيم Catalase واخرى سالبة لفحص أنزيم Oxidase (Crossley and Archer , 1997), أما على الأوساط الاغناثية فهي تشكل مستعمرات متوسطة الحجم ذهبية اللون كما أنها تسبب تحلل الدم من (نوع β) على الأطباق الحاوية على أكار الدم (Ryan and Ray , 2004).

تنتج بكتريا *S. aureus* انزيم Coagulase الذي يتفاعل مع البروثرومبين في الدم مؤديا الى تجلط البلازما عن طريق تحويل مولد الليفين (fibrinogen) إلى الليفين (fibrin) . يستخدم فحص التجلط المذكور لتمييز *S. aureus* عن بقية أعضاء جنس *Staphylococci* والتي تدعى coagulase-negative staphylococci (Ryan and Ray , 2004) .

أُبارت العديد من الدراسات الى سيادة بكتريا *S. aureus* في أخماج قرحة القدم السكري اذ تقوم المكونات السطحية لهذه البكتريا بالالتصاق بالمضيف ومن ثم افراز العديد من عوامل الضراوة التي تغزو الجهاز المناعي مثل α -hemolysin و phenol soluble modulins و Panton –Valentine leukocidin اذ تتمكن تلك العوامل من تحليل خلايا المضيف , فضلا عن افرازها لعوامل عدة تثبط وقيفة neutrophil مثل Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococci كما تمتلك هذه البكتريا العديد من المستضدات (التي تنشط خلايا T cell) مثل SE : enterotoxins و SEI: enterotoxin -like protein و TSST: toxic shock syndrome toxin (syndrome toxin) فضلا عن ذلك فإن سموم exfoliative toxins تسهل غزو البكتريا لجلد المضيف (Remy et al., 2016) .

2-4-1 : *Proteus mirabilis*

وهي بكتريا سالبة لصبغة غرام تنتمي لعائلة *Enterobacteriaceae* تتميز بحركة تؤدي الى العج (swarming motility) وتتصف بكونها ثنائية الشكل (Dimorphic) ولها القابلية على التمايز من عصيات صغيرة الى عصيات متطاولة , تكون خلاياها العاجة متعددة الأنوية (multinucleate swarm cells) تظهر آلاف الاسواط (flagella) فضلا عن كونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز وتنتج غاز كبريتيد الهيدروجين على وسط triple sugar iron (Armbruster and Mobley, 2012) .

توجد هذه البكتريا في التربة والماء والقناة المعوية للبانن بما فيها الإنسان كما أنها تسبب التهابات المجاري البولية (Urinary tract infection , UTI) والتهابات الجهاز التنفسي والتهابات الجروح وتجرثم الدم (Bacteremia) والتهابات أخرى (, Mobley and Belas , 1997 ; Rozalski et al., 1995) .

ويمكن أن تتواجد هذه البكتريا في الإلحاق خاصة الأصحاء كجزء من الغشاء المخاطي الطبيعي . فضلا عن أنها تمثل غالبا مشكلة كبيرة لدى الأهل خاصة الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي والذين يتعرضون لخطر انتقال عدوى المستشفيات (Farkosh , 2008) .

تعد بكتريا *P. mirabilis* واحدة من أكثر عوامل الإصابة يوعا في قرحة القدم السكري (Sekhar et al., 2014 ; Perim et al., 2015) , كما انها تظهر مقاومة واسعة وسريعة للعديد من المضادات الحيوية والتي تتسبب بتفاقم قرحة القدم السكري وتأخير العلاج (Tansarli et al., 2013) .

تمتلك هذه البكتريا عدداً من عوامل الضراوة مثل هياكل الالتصاق (adhesive fimbria) والاسواط (flagella) وحركة العج (swarming motility) ونتاج السموم مثل Haemolysin والانزيمات خارج الخلية (extracellular enzymes) مثل الـ protease والـ Urease (Jacobsen et al., 2008 ; Morgenstein et al., 2010 ; Armbruster and Mobley , 2012) . أما تكوين الغشاء الحيوي (biofilm) بواسطة هذه البكتريا فيشكل عقبة إضافية في العلاج بالمضادات الحيوية من الالتهابات (Jacobsen et al., 2008 ; Zhao and Hu , 2013) .

***Pseudomonas* spp. 3-4-1**

ينتمي جنس *Pseudomonas* الى عائلة *Pseudomonadaceae* ، وهي بكتريا هوائية متحركة سالبة لصبغة غرام ، تكون بشكل عصيات متطاولة يتراوح طولها من (2-4) مايكروميتر ، تمتلك سوطا قطبيا له دور مهم في الامراضية (Kayser et al., 2001; Willcox, 2007) . غير مكونة للأبواغ ويمكن أن تنتج أصباغ ، مثل pyocyanine (وتكون خضراء مزرققة) و pyorubin (وتكون صفراء مخضرة) (Enoch et al., 2004 ; Willcox,) (2007) .

يمكن أن تنتج *P. aeruginosa* مجموعة كبيرة ومتنوعة من السموم خارج الخلية (extracellular toxins) ، بما في ذلك السموم الخارجية A (exotoxin A) و السموم الداخلية (enterotoxin) (Liu , 1974) .

تشير العديد من الدراسات الى سيادة بكتريا *Pseudomonas spp.* في أخماج قرحة القدم السكري . ومن جانب اخر فهي غالبا ما تغزو أنسجة المضيف كمرضات انتهازية مسببة أخماج وتجرثم الدم (bacteremia) في الأخص ضعيفي المناعة (مثل فيروس نقص المناعة / الإيدز، والتليف التكييسي ، توسع القصبات ، ومر □ الانسداد الرئوي المزمن الشديد ، والحروق ، والامرا □ الخبيثة ، أو مر □ السكري) (Feldman *et al.*, 1998) .

يسبب وجود هذه البكتريا مشكلة في المستشفيات في جميع أنحاء العالم كما يمكن العثور عليها على المعدات ، مما يزيد من خطر الإصابة بعدوى المستشفيات (nosocomial infections) . تكون *Pseudomonas spp.* مقاومة للعديد من المضادات الحيوية ولكنها حساسة لمضادات اخرى مثل البنسلينات واسعة الطيف (مثل Ticarcillin و Azlocillin و Piperacillin) و Aminoglycosides و Cephalosporin و Fluroquinolones و Polymixins و Monobactams (Banerjee and Stableforth , 2000) .

***Escherichia coli* 4-4-1**

هي بكتريا عصوية سالبة لصبغة غرام تنتمي للعائلة المعوية *Enterobacteriaceae* غير مكونة للأبواغ . تتراوح ابعادها بين 0.5 مايكروميتر قطراً و (1-3) مايكروميتر طولاً (Welch , 2006) . تتصف معظم سلالات هذه البكتريا بإعطائها نتيجة موجبة لفحص الاندول □ (indol) وأحمر المثيل (methyl red) بينما تعطي نتيجة سالبة في فحوصات Oxidase و Urease و Citrate وكبريتيد الهيدروجين (Roesch *et al.*, 2003) .

معظم سلالات هذه البكتريا متعايشة طبيعيا في الأمعاء وخصوصا أمعاء الأطفال □ بينما تمكنت سلالات اخرى منها من اكتساب بعض عوامل الضراوة مما منحها القابلية على احداث بعض الامرا □ المقترنة بالعلامات السريرية الاتية : الإسهال □ المعوي ، وأخماج المسالك البولية والسحايا (Nataro and Kaper , 1998 ; Kaper *et al.*, 2004) .

وأُثارت العديد من الدراسات الى أن بكتريا *E. coli* تعد من الأنواع البكتيرية الشائعة التي تضطلع بدور مهم في احداث أخماج القدم السكري (Zubair , 2010 ; Hena and Growther , 2010 ; *et al.*, 2011).

5-1 التقنية النانوية (Nanotechnology) :

تعرف التقنية النانوية بأنها هندسة وتوصيف وتصنيع واستخدام المواد والادوات بمقياس 100 نانوميتر أو أقل (Wang *et al.*, 2012). يعود مصطلح النانو (Nano) الى الكلمة اليونانية " dwarf " والتي تعني القزم , وتنسب تسمية تقنية النانو الى النانوميتر بالنظر لكونه يمثل أدق وحدة قياس مترية اذ يبلغ طوله (1*10⁻⁹) متر (Ramsden , 2005).

□ مهت التقنية النانوية منذ عقود عدة وقطعت أواطاً مهمة في مجالات الألكترونيات والفيزياء والهندسة بيد أنها لازالت في طور التحري والاستكشاف في حقل الطب الحيوي والصيدلة . وتشير التوقعات الى أن التقنية النانوية الصيدلانية (Pharmaceutical nanotechnology) سوف تقوم بأحداث ثورة في الصناعة الصيدلانية بالنظر للأدوار المناطة بها في ايضاً الدواء (Drug delivery) والتشخيص (Diagnosis) والتصوير (Imaging) والمجسات الحيوية (Biosensors) (Shankar *et al.*, 2013).

1-5-1 التطور التاريخي للتقنية النانوية :

لأجل الوقوف على الأحداث الرئيسية التي أسهمت في تطور التقنية النانوية فيمكن تلخيص ذلك في الجدول □ 3 (Horikoshi and Serpone , 2013 ; Nikalje , 2015).

الجدول 3 : تاريخ تطور التقنية النانوية (Horikoshi and Serpone , 2013 ; Nikalje , 2015)

الأحداث	السنة
اقترح Feynman فكرة النانو	1959
استخدم مصطلح التقنية النانوية لأول مرة من قبل Taniguchi	1974
تصنيع الألياف النانوية للكربون (Carbon nanofiber)	1976
اختراع المجهر IBM Scanning Tunneling Microscope	1981
ظهور الـ "Bucky Ball"	1985
نشر أول كتاب عن التقنية النانوية من قبل Drexler اختراع مجهر القوة الذرية (Atomic Force Microscope)	1986
تم تصنيع IBM logo باستخدام ذرات مفردة	1989
اكتشاف أنابيب الكربون النانوية (Carbon nanotubes) لأول مرة	1991
ظهور الأختام النانوية (Nano- imprinting)	1995
ظهور الصفائح النانوية (Nano sheets)	1996
نشر أول كتاب عن الطب النانوي (Nano medicine) من قبل Freitas	1999
انطلاق National Nanotechnology initiative لأول مرة .	2000
منحت جائزة Feynman في التقنية النانوية لتطوير نظرية الادوات الالكترونية بالمقيا □ النانوي فضلا عن تصنيع وتشخيص أنابيب الكربون والاسلاك النانويتين .	2001
منحت جائزة Feynman في التقنية النانوية لاستخدام الـ DNA في المجال النانوي .	2002
اقامة اول مؤتمر (Policy conference) عن التقنية النانوية المتقدمة . تأسيس أول مركز للأنظمة الآلية النانوية . منحت جائزة Feynman في التقنية النانوية لتصميم تراكيب بروتينية ثابتة مع تصنيع أنزيم جديد بوظيفة متغيرة .	2004
تصنيع أنظمة نانوية ثلاثية الابعاد مثل Robotics	2010-2005
بدء تاريخ التقنية النانوية الجزيئية	2011

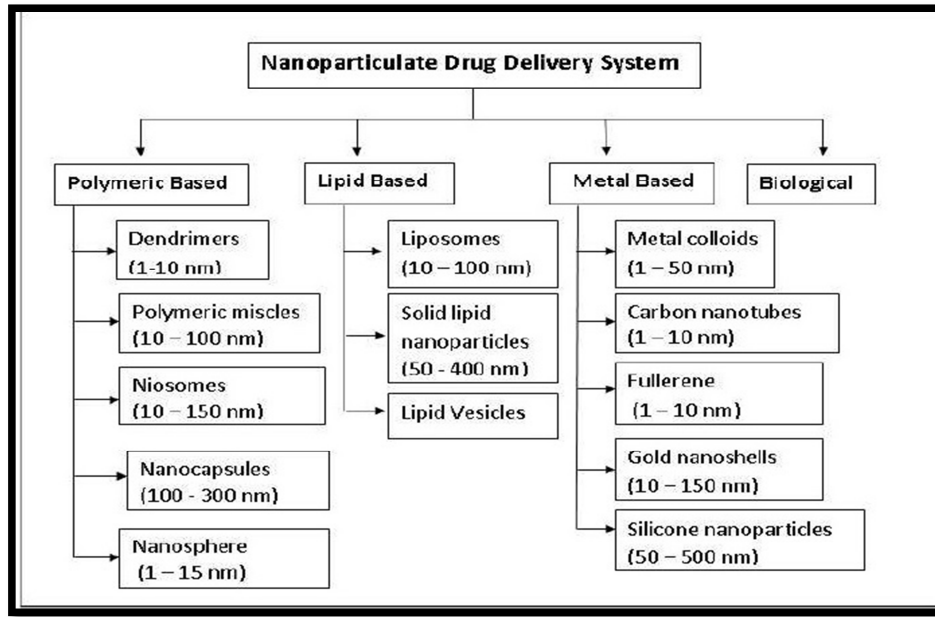
2-5-1 □ وامل الأدوية (Drug carriers) :

ان عملية تصنيع دواء جديد تعد مكلفة وتستغرق وقتا فضلا عن كونها غير مفضلة , لذا لجأ الباحثون الى العمل على الادوية نفسها من خلال □ تغيير طريقة تجريعها وتركيبها ونوع الجرعة فضلا عن تطوير نظام ايصال □ (Drug delivery) جديد للدواء (Ragan *et al.*, 2001;) (Tegeli *et al.*, 2010) . وتمثل حوامل الادوية احدى الاتجاهات المهمة ضمن الأنظمة الجديدة لأىصال □ الأدوية اذ دخلت هذه الحوامل الى المجال □ الدوائي لتحقيق أهداف عدة تشتمل على زيادة ثباتية الدواء وتوافره الحيوي (Bioavailability) ومنع التداخلات الدوائية . وقد تم في العقود الثلاثة الأخيرة تطوير أنواع مختلفة من حوامل الأدوية مثل الحوامل الخلوية (Cellular carriers) والحوامل الدقائقية (Particulate carriers) وحوامل الدهون (Lipoidal carriers) وغيرها . تختلف تلك الحوامل فيما بينها من حيث التركيب والخصائص وطريقة التصنيع (Singh *et al.*, 2011 ; Srikanth *et al.*, 2012) .

3-5-1 الحوامل الدقائقية (Particulate carriers) كأنظمة اىصال للأدوية :

يعد ايصال □ الجزيئات العلاجية والفعالة حيويًا واحدة من اكثر مجالات البحث اثارة مع تسارع التقدم الطبي . تعاني الأنظمة العلاجية التقليدية من التحرر السريع للدواء مع فقدان السيطرة على مستويات الدواء في مجرى الدم والأعضاء المستهدفة الأخرى والتحطم الأنزيمي وقلة الذوبان في الماء وضرورة استخدام جرعات عالية من الدواء التي قد تتسبب في العديد من التأثيرات العكسية , لذا فإن التركيز على تطوير أنظمة ايصال □ كفوءة للأدوية يقع اليوم في صلب اهتمامات البحوث الطبية (Yang *et al.*, 2006 ; Trikeriotis and Ghanotakis , 2007 ; Kumar *et al.*,) (2010) .

استخدمت الحوامل الدقائقية بنجاح كأنظمة ايصال □ للأدوية عبر مساهمتها في تقادي الكثير من المشاكل والسلبيات المشار اليها أعلاه . ويمكن تصنيف هذه الحوامل بحسب ما هو موضح في المخطط 2 (Ranghar *et al.*, 2014) .



المخطط 2 : أنواع أنظمة إيصال الدواء الدقائقية (Ranghar *et al.*, 2014)

4-5-1 الدقائق النانوية (Nanoparticles) :

تعرف الدقائق النانوية بأنها دقائق صلبة تتراوح أحجامها بين (1-100) نانوميتر، تمتلك خصائص فريدة ومهمة مثل زيادة نسبة مساحة سطحها إلى كتلتها مقارنة ببقية أنواع الدقائق والمواد الأخرى مما يتيح إمكانية تعزيز كفاءتها الحفزية (Catalytic) للتفاعلات فضلاً عن قابليتها على إدمصاص وحمل المركبات الأخرى (Borm and Kreyling, 2004 ; Buzea *et al.*, 2007).

1-4-5-1 تصنيف الدقائق النانوية :

هناك تصنيفان للدقائق النانوية هما :

التصنيف الأول : الذي يقسم الدقائق النانوية على نوعين هما :

1- الدقائق النانوية غير المهندسة (Non- engineered nanoparticles)

وهي الدقائق الموجودة في البيئة وتشتق من الحوادث الطبيعية مثل العواصف الترابية والتعرية (erosion) وانفجار البراكين وحرائق الغابات (Nowack and Bucheli, 2007).

2- الدقائق النانوية المهندسة (Engineered nanoparticles)

وهي التي يقوم بإنتاجها الإنسان عبر استعمال مواد عديدة مختلفة مثل الفلزات (metals) وأكاسيد الفلزات (metal oxides) واللافلزات (non metals) والبوليمرات والدهون (Subbenaik , 2016).

التصنيف الثاني : الذي يقسم الدقائق النانوية بحسب أبعادها (dimensions) (Hett , 2004) إلى:

1- الدقائق النانوية احادية البعد (One dimension nanoparticles)

استخدمت الأنظمة ذات البعد الواحد مثل الغشاء الرقيق (Thin film) والسطوح المصنعة (Manufactured surfaces) منذ عقود عدة في مجالات الألكترونيات والكيمياء والهندسة . يعد انتشار الأغشية الرقيقة (التي تتراوح احجامها بين 1-100 نانوميتر) أو الطبقة الأحادية (monolayer) مكانا انعا للخلايا الشمسية (Solar cells) أو الحفز (Catalysis) . تستخدم هذه الأغشية في تطبيقات تقنية مختلفة مثل أنظمة تخزين المعلومات , والمجسات الكيميائية والحيوية والأدوات البصرية .

2- الدقائق النانوية ثنائية البعد (Two dimension nanoparticles)

تعد أنابيب الكربون النانوية (Carbon nanotubes) بكة سداسية من ذرات الكربون ذات القطر 1 نانوميتر بطول 100 نانوميتر تشبه بكة من النقوش مطوية داخل اسطوانة . تقسم هذه الأنابيب على نوعين : أنابيب الكربون النانوية ذات الجدار المفرد , وأنابيب الكربون النانوية متعددة الجدران .

ان الأبعاد الصغيرة لهذه الأنابيب مضافا لها خواصها الفيزيائية والميكانيكية والكهربائية يجعلها موادا فريدة (Kohler and Fritzsche , 2004) اذ أنها تبدي صفاتاً فلزية أو به موصلة .

3- الدقائق النانوية ثلاثية الأبعاد (Three dimension nanoparticles)

تمثل الـ Fulerenes أفضاصا بيضوية تحتوي من 28 الى أكثر من 100 ذرة كربون بضمنها C_{60} , وبذلك تشكل كرة مجوفة تتألف من ذرات كربون خماسية وسداسية مكونة ما يشبه كرة القدم . تعد الـ Fulerenes صنفا من المواد ذات الخصائص الفيزيائية الفريدة اذ يمكن تعريضها لضغط اضافي ومن ثم استعادة □كلها بزوا□ هذا الضغط . كما يمكن استخدام هذه المواد كمواد مزيتة (Lubricants) فضلا عن استخدامها في مجا□ الألكترونيات بدءا من خزن البيانات الى انتاج الخلايا الشمسية . وبالنظر الى أن الـ Fulerenes تراكيب فارغة ذات أبعاد مشابهة للعديد من الجزيئات البايولوجية لذا يمكن ملئها بمواد مختلفة لاستخدامها في التطبيقات الطبية (, Tomalia 2004) .

1-2-4-5-2 الدقائق النانوية أنظمة إيصال للأدوية المضادة لل□إء المجهرية :

تتنمي الدقائق النانوية الى صنف الحوامل الدقائقية . يحقق استخدام هذه الدقائق فوائد جمة عند استخدامها أنظمة إيصال□ للأدوية تتلخص بالاتي :

1- السيطرة على تحرر الدواء (Drug release) واطالة مدة بقاءه في موقع الإصابة مما يزيد الكفاءة العلاجية للدواء وتقليل أضراره الجانبية وانخفا □ معد□ تجريعه .

2- امكانية ادخا□ الدواء في نظام الأيصال□ بدون أي تفاعل كيميائي مما يساعد في المحافظة على الدواء .

3- يمكن السيطرة على تحرر الدواء وتلفه (degradation) بسهولة من خلا□ تقليل حجم الدقائق النانوية الى حجم الدواء لتحقيق حركات الرتبة الصفرية (Zero order) أو الرتبة الأولى (First order) .

4- تعزيز التوافر الحيوي (Bioavailability) للدواء في موقع متخصص بنسبة جيدة لمدة طويلة .

5- تحسين ذائبية المصل (Serum solubility) للأدوية ضعيفة الذوبان في الماء فضلا عن أن الأدوية المتعددة (multiple drugs) يمكن ايصالها الى الخلية نفسها مما يحقق العلاج التآزري (Ranghar *et al.*, 2014).

5-5-1 مركبات النانو (Nanocomposites) :

تمثل مركبات النانو موادا هجينة لها أطوارا مختلفة يمتلك أحد أطوارها على الأقل بعدا واحدا على المستوى النانوي . تتشكل طبقات مركبات النانو (Layered nanocomposites) عن طريق غرس الأنيون الضيف (guest anion) في المنطقة الداخلية للطبقات اللاعضوية دون حصول تغيير في تركيب الطبقة وتدعى هذه العملية "اقحام" (Intercalation) . ان مركبات النانو العضوية – اللاعضوية (Organic – inorganic) توفر مجموعة غير محدودة من المركبات بالنظر لإمكانية التوليف بين المكونات العضوية واللاعضوية (Alberti and Constantino , 1996).

تؤدي الـ Nanocomposites الى تحسين صفات الكثير من المواد تشتمل على الصفات الميكانيكية (Mechanical properties) مثل القوة (Strength) ومعامل وثبات الأبعاد (Modulus and dimensional stability) والتوصيلية الكهربائية (Electrical conductivity) وتقليل نفاذية الغاز والماء والهيدروكربون والـ Flame retardancy والثبات الحراري (Thermal stability) فضلا عن المقاومة الكيميائية (Chemical resistance) (Okpala , 2013).

توجد ثلاثة أصناف رئيسة من مركبات النانو يمكن توضيحها في الجدو 4 (Tyagi and Tyagi , 2014).

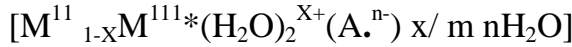
1-5-6 الطبقات ثنائية الهيدروكسيد (Layered double hydroxide, LDH) :

الطبقات ثنائية الهيدروكسيد والمعروفة بالأطيان الشبيهة بالهيدروتالساييت (hydrotalcite) أو أطيان الأيونات السالبة (anionic clay) تنتمي الى عائلة المواد الطبقيّة (Layered materials) (Cavani *et al.*, 1991). وقد تم تشخيص أوّل عضو في هذه العائلة

الجدول 4 : الأنواع المختلفة لمركبات النانو (Tyagi and Tyagi , 2014)

النوع	الأمثلة
1- الخزف (Ceramic)	Al_2O_3 / SiO_2 ; SiO_2 / Ni ; Al_2O_3 / TiO_2 ; Al_2O_3 / SiC
2- الفلز (Metal)	$Fe - Cr / Al_2O_3$; Co / Cr ; Fe / MgO ; Mg / CNT
3- البوليمر (Polymer)	$Polymer / Layered Silicates$; $Polymer / Layered double hydroxides$

الفلزية في السويد عام 1842 والذي عرف بالهيدروتالساييت ذي الصيغة التركيبية $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ (Rives , 2001 ; Arulraj , 2013) . يمكن ان توصف معظم مواد طبقات ثنائية الهيدروكسيد بالصيغة العامة



حيث : ($x=0.2 - 0.4$; $n=0.5 - 1$)

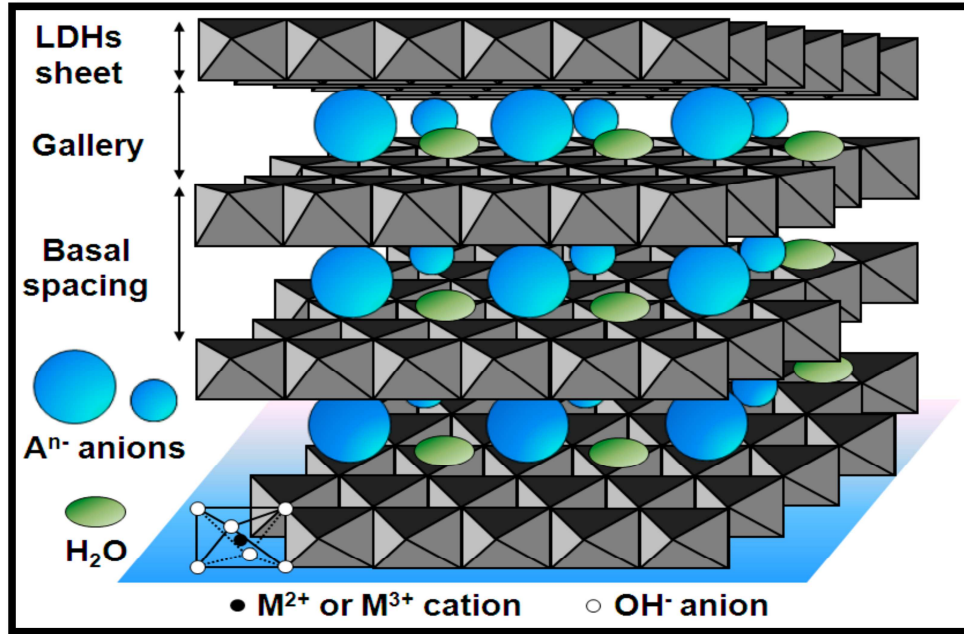
بينما تمثل M^{11} الأيون الموجب الفلزي ثنائي التكافؤ ,

و M^{111} الأيون الموجب الفلزي ثلاثي التكافؤ

فيما تمثل $A.^{n-}$ الأيون السالب (Ladewig *et al.*, 2009 ; Park *et al.*, 2013) .

من الناحية التركيبية فإن كل أيون موجب في طبقات ثنائية الهيدروكسيد يكون محاطا بستة أيونات من الهيدروكسيل OH^- مكونا وحدات ثمانية السطوح (Octahedral subunits) وكل اثنتين من الوحدات تتشارك الحواف (edges) مما يؤدي الى توسيع الطبقة ثنائية الأبعاد نظريا الى ما لا نهاية (Auerbach *et al.*, 2004) ان الأيون السالب $A.^{n-}$ المتموضع بين طبقتين يوازن الشحنة الموجبة للكاتيون الموجب بواسطة تداخل الكترولستاتيكي (electrostatic interaction)

وبمساهمة الروابط الهيدروجينية بين الطبقات فإن الطبقتين تحملان بعضهما معا مكونتين تركيباً ثلاثي الأبعاد (Three dimensional structure) (Zhang *et al.*, 2014) ويوضح الشكل 2 الطبقات ثنائية الهيدروكسيد .



الشكل 2 : الطبقات ثنائية الهيدروكسيد (LDH) (Zhang *et al.*, 2014)

• تشمل طرائق تصنيع الطبقات ثنائية الهيدروكسيد على (Barahuie *et al.*, 2014) :

1- طريقة الترسيب المشترك (Co-precipitation method)

2- طريقة التبادل الأيوني (Ion exchange method)

3- الطريقة الحرارية المائية (Hydrothermal method)

4- طريقة التحلل المائي لليوريا (Urea Hydrolysis method)

5- طريقة إعادة البناء / إعادة إضافة الماء (Reconstruction / Rehydration method)

حظيت الطبقات ثنائية الهيدروكسيد بالعديد من التطبيقات إذ بدأت تطبيقاتها الأولى باستخدامها كعوامل مضادة للحموضة (Antacid) ومضادة للقرحة الهضمية (Antipeptic) فيما اتسعت تطبيقاتها مؤخراً لتدخل في تشخيص الأمراض السريرية والصناعة الكيميائية وحوامل

أدوية مسؤولة عن إيصال الجزيئات العلاجية الفعالة حيويًا (مثل البيبتيدات ومضادات الالتهابات وحتى الأحماض النووية الصغيرة) إلى خلايا اللبائن من خلال عبورها أغشية الخلايا إلى السايوبلازم (Lin *et al.*, 1998 ; Francia *et al.*, 2005 ; Liu and Zhu , 2005 ;) (Chan *et al.*, 2008 ; Ladewig *et al.*, 2009).

1-5-7 طرائق التشخيص في التقنية النانوية:

يتم تشخيص المواد النانوية بمستويات مختلفة , إذ تعتمد بعض طرائق التشخيص على دراسة الأحجام والأشكال والمظهر للتراكيب النانوية بينما تعتمد طرائق أخرى على الحصول على معلومات تركيبية مفصلة . يمكن دراسة تراكيب المواد من نواحي عدة تشمل على التركيب البلوري (Crystal structure) والتركيب الدقيق (Microstructure) والتركيب على مستوى الذرة (Atom level structure) فضلا عن التركيب الإلكتروني (Electronic structure) وسوف نستعرض أهم التقنيات المستخدمة في تشخيص المواد النانوية (Joshi *et al.*, 2008) :

1- تشخيص المواد النانوية بالمجاهر :

أ- التشخيص باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (Scanning Electron Microscopy, SEM)

هو مجهر إلكتروني يمكن بواسطته تصوير سطح النموذج من خلال مسحه بحزمة الكترونات عالية الطاقة . تصل قوة تكبير هذا المجهر إلى 300,000 مقارنة بالمجهر الضوئي الذي تصل قوة تكبيره إلى 1000 .

ب- التشخيص باستخدام المجهر الإلكتروني النافذ (Transmission Electron Microscopy, TEM)

هو مجهر يتم فيه انتقال حزمة الإلكترونات عبر النموذج لذا فهو يقوم بتصوير النموذج أثناء مروره فيه .

ج- التشخيص باستخدام المجهر النافذ عالي الوضوح (High Resolution Transmission Electron Microscopy, HRTEM)

هو نوع مطور من مجهر TEM يسمح بتصوير التركيب البلوري (Crystallographic structure) للعينة على المستوى الذري (Atomic scale).

د- التشخيص باستخدام مجهر القوة الذرية (Atomic Force Microscope, AFM)

يسمح هذا المجهر بقياس أقطار وحجوم وتجمعات دقائق المواد النانوية فضلا عن تحديد قوام هذه المواد. ويتميز هذا المجهر بكونه غير متلف للنموذج ويوفر أيضا (resolution) قويا ثلاثي الأبعاد فراغي (Three dimensional spatial resolution).

هـ- التشخيص باستخدام (Scanning Tunneling Microscopy, STM)

يقدم هذا المجهر تصويرا جانبيا لسطح المادة النانوية على المقياس الذري.

2- تشخيص المواد النانوية بالطرائق الطيفية :

أ- التشخيص باستخدام مطيافية الأشعة فوق البنفسجية- المرئية "UV-VIS" (Ultraviolet-Visible Spectroscopy)

لمطيافية الأشعة فوق البنفسجية فائدة انتقائية إذ يمكن استخدامها من تشخيص المجاميع الخاصة في الجزيئات ذات التعقيدات المختلفة الواسعة , كما ان هذا الطيف يشير الى وجود او غياب التراكيب المتبادلة او الأروماتية (سلفر-تاين , 1981).

ب- التشخيص بمطيافية الأشعة تحت الحمراء (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)

من خلال تحليل المعلومات التي يتم الحصول عليها من مطيافية الأشعة تحت الحمراء يمكن التعرف على المجاميع الفعالة الموجودة في التركيب الكيميائي للمادة , إذ ان هور الحزم هو الذي يسمح بالحصول على معلومات تركيبية مفيدة بمجرد النظر والرجوع الى الجداول والرسوم البيانية العامة لترددات المجموعة المميزة , كما ان ربط قمة بقمة هو دليل ممتاز للتشخيص وانه من غير

المحتمل ان يعطي مركبان- ماعدا الندين البصريين- طيف الأية تحت الحمراء نفسه (سلفر-تاين , 1981) .

3- تشخيص المواد النانوية باستخدام الأية السينية (X-Ray)

أ- التشخيص باستخدام حيود الأية السينية واسع الزاوية (Wide Angle X-Ray Diffraction)

تمثل الأية السينية (X-Ray) نوعا من الأية الكهرومغناطيسي بطول موجي قصير . عند اصطدام حزمة من الأية السينية بسطح مادة بلورية (crystal surface) بزواية θ فإن قسما من هذه الأية يتشتت (scattered) بفعل طبقة الذرات الموجودة على السطح , أما الجزء غير المتشتت فهو ينفذ الى الطبقة الثانية من الذرات حيث قسم من الأية يتشتت فيما ينفذ القسم الاخر الى الطبقة الثالثة من الذرات . ان التأثير التراكمي للتشتت من مراكز الفراغ المنظمة للبلورة يمثل حيود (diffraction) الحزمة بنفس الطريقة التي يحدد بها الشعاع المرئي بواسطة حاجز الانعكاس (reflection grating) . وعموما فإن متطلبات حيود الأية السينية هي :

1- يجب أن يكون الفراغ بين طبقات الذرات مقارب للطول الموجي للإيعاع .

2- يجب أن تكون مراكز التشتت (Scattering centers) موزعة فراغيا بطريقة عالية التنظيم (Skoog *et al.*, 1998)

ب - التشخيص بتقنية (X-Ray Photoelectron Spectroscopy, XPS)

وهي طريقة طيفية للتحليل الكيميائي الكمي لسطح المواد النانوية اذ يمكن بواسطتها تحديد الصيغة الجزيئية للمادة أو تحديد عناصرها الكيميائية (Elemental composition) فضلا عن تحديد الحالة الكيميائية والإلكترونية لسطح المادة (لحد 10 نانوميتر) .

ج - التشخيص بتقنية (Energy Dispersive X-Ray Analysis, EDX)

تستخدم هذه التقنية لتحليل العناصر الموجودة قرب سطح المادة النانوية وتحديد نسبها بمواقع مختلفة مما يسمح بإعطاء صورة كاملة من النموذج .

4- التشخيص باستخدام محلل حجم الدقيقة (Particle Size Analyzer)

تتوافر تقنيات مختلفة لقياس حجم الدقيقة (particle) وتوزيعها مثل Sieve analysis و Sedimentation techniques و Laser diffraction methods و Dynamic light scattering method وتعد الأخيرة الأكثر استخداما في تحديد حجم وتوزيع الدقائق النانوية .

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

2- المواد وطرائق العمل

1-2 المواد والاجهزة المستخدمة :

1-1-2 الاجهزة والادوات المستخدمة والشركات المصنعة لها

الشركة المصنعة / المنشأ	اسم الجهاز	ت
AFM model ,AA3000 Advanced Angstrom Inc, USA	Scan prob microscope	1
Binder – Germany	حاضنة (Incubator)	2
Denver – Germany	ميزان حساس (Analytical Balance)	3
EuroEA 3000 - Italy	جهاز تحليل العناصر الدقيق	4
GFL-Germany	جهاز تقطير (Distiller)	5
Hettich – Germany	جهاز طرد مركزي (Centrifuge)	6
Human-Germany	ماصات دقيقة (Micropipettes)	7
Jeio-Tech-Korea	هود بايلوجي (Laminar flow cabinet)	8
Jenway-Germany	مصباح بنزن (Bunsen burner)	9
Labtech-Korea	جهاز مزج ذو الصفيحة الساخنة (Magnetic Stirrer with hot plate)	10
Labtech-Korea	حاضنة هزازة (Shaker incubator)	11
Labtech-Korea	مؤسسة (autoclave)	12
LG-Korea	ثلاجة (Refrigerator)	13
Mauritius-Germany	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني (pH-meter)	14
Motic-Germany	المجهر الضوئي (Light microscope)	15
Perkin-Elmer 1725x-Japan	مطياف الاشعة تحت الحمراء Fourier transform infrared spectrophotometer (FT-IR)	16
ROMA-Italy	مازج (Vortex)	17

Shimadzu XRD-6000 powder diffractometer Japan	مطياف حيود الاشعة السينية (X-Ray) diffraction	18
Shimadzu -1800 Japan	مطياف الاشعة المرئية - فوق البنفسجية	19
Tafesa - Germany	حمام مائي (Water path)	20

2-1-2 المواد الكيميائية والأوساط الزرعية المستخدمة والشركات المصنعة لها :

الشركة المصنعة / المنشأ	اسم المادة	ت
Analytical Rasayan - India	حامض الهيدروكلوريك (HCl)	1
BDH - England	كلوريد الباريوم (Barium chloride)	2
BDH - England	كليسيرول (Glycerol)	3
BDH - England	Aluminum (III) Nitrate nine hydrate	4
BDH - England	Magnesium (II) Nitrate hexa hydrate	5
BDH - England	رباعي مثيل بارافينيلين ثنائي امين ثنائي هيدروكلورايد Tetramethyl p-phenylene diamine dihydrochloride	6
Bioanalyse - Turkey	اقراص المضادات الحياتية	7
Biomerieux- France	عدة التشخيص (Api 20 E)	8
Biomerieux- France	عدة التشخيص (Api 20 strep)	9
Fluka - Switzerland	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH ₂ PO ₄)	10
Fluka - Switzerland	Tris-HCl	11
GCC-UK	حامض الخليك الثلجي (CH ₃ COOH)	12
Himedia - India	وسط (Nutrient Broth)	13
Himedia - India	وسط (Blood agar base)	14
Himedia - India	وسط (MacConkey agar)	15

Himedia - India	Muller- Hinton Agar وسط	16
Himedia - India	Brain – Heart infusion broth وسط	17
Loba Chemie - India	(DMSO) Dimethyl sulfoxide	18
Oxoid - England	Mannitol Salt Agar وسط	19
Schorlau- European Union	NaOH هيدروكسيد الصوديوم	20
SEARLE - USA	حامض الكبريتيك المركز (H ₂ SO ₄)	21
Thomas Baker –India	كلوريد الصوديوم (NaCl)	22
معهد المصول واللقاح العراقية (VSI)	بيروكسيد الهيدروجين H ₂ O ₂	23
معهد المصول واللقاح العراقية (VSI)	كاشف الاوكسيديز	24
معهد المصول واللقاح العراقية (VSI)	صبغة غرام (Gram Stain)	25

2-2 طرائق العمل:

1-2-2 جمع عينات قرحة القدم السكري :-

لغرض عزل الأحياء المجهرية المسببة لتلوث قرحة القدم السكري جُمعت 43 مسحة قطنية من مرضى السكر الراقدين في مدينة الأمام الحسين (ع) الطبية في محافظة كربلاء المقدسة .

2-2-2 الاوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم

السكري :

❖ وسط Blood Agar base :-

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بإذابة 40 غم في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة وبعد اكمال عملية التعقيم برد الى درجة (45-50) م° وأضيف إليه دم الإنسان بنسبة (3-5) % , استخدم هذا الوسط وسطاً إغنائياً في عزل وتشخيص البكتريا , فضلاً عن ملاحظة مناطق تحلل الدم (Hemolysis) للكشف عن إنتاج البكتريا للإيزيم حال الدم (Hemolysin).

❖ وسط MacConkey agar :-

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 51.5 غم في لتر من الماء المقطر و عقم بالمؤصدة ، استخدم هذا الوسط لعزل البكتريا السالبة لصبغة غرام وتشخيصها من حيث قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز .

❖ وسط Mannitol salt Agar :-

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 108 غم في لتر من الماء المقطر و عقم بالمؤصدة ، استخدم هذا الوسط لعزل المكورات العنقودية وتشخيصها من حيث قابليتها على تحمل ملوحة الوسط فضلا عن قابليتها على تخمير سكر المانيتول وتحويل لون الوسط الى الاصفر .

❖ وسط Nutrient Broth :-

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 13 غم من الوسط المغذي السائل في لتر من الماء المقطر ووزع في ١٠٠ انبب و عقم بالمؤصدة . وقد استخدم هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتريا .

❖ وسط Muller- Hinton Agar :-

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 38 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر . عقم الوسط باستخدام المؤصدة وبعد اكمال عملية التعقيم برد الى درجة (45-50)° م وتم صبه في أطباق بتري معقمة . وقد استخدمت الاطباق لتنمية العزلات البكتيرية لغرض اختبار فحص الحساسية للمضادات الحياتية .

❖ وسط Brain – Heart infusion broth :-

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 37 غم من الوسط المغذي السائل في لتر من الماء المقطر ووزع في ١٠٠ انبب و عقم بالمؤصدة . وقد استخدم هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتريا فضلا عن استخدامه لحفظ العزلات البكتيرية وذلك بإضافة 15% كليسيرول الى 85% من الوسط السائل بعد تعقيمه.

2-2-3 الكواشف والمحاليل المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري :-

• كاشف الكاتليز (Catalase reagent) :-

استخدمت مادة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% للتحري عن قابلية البكتريا على تاج زيم الكاتليز (Tille , 2014) .

• كاشف الاوكسيديز (Oxidase reagent) :-

حضر الكاشف ياباً بإذابة 1 غم من مادة رباعي مثيل بارافنيلين ثنائي امين ثنائي هيدروكلورايد (Tetramethyl P-phenylen diamine dihydrochloride) في 100 مل من الماء المقطر في قنينة معتمدة . استخدم هذا الكاشف في التحري عن قابلية البكتريا على تاج زيم الاوكسيديز (Macfaddin , 2000) .

• بغة غرام (Gram stain) :-

استخدم هذا الملون لدراسة الخصائص المظهرية للبكتريا المعزولة .

• المحلول الملحي الفسيولوجي (Normal saline) :-

حضر بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 50 مل ماء مقطر , وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ايضا .

• محلول ماكفرلاند (أنبوب رقم 0.5) Macfarland Solution :-

حضر هذا المحلول بحسب الطريقة الموصوفة من قبل (Tille , 2014) إذ يتكون من محلولين:

A- محلول كلوريد الباريوم (1.175%) : أذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الاذابة أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

B- محلول حامض الكبريتيك (1%) : أضيف 1 مل من حامض الكبريتيك المركز الى 99 مل من الماء المقطر .

حضر محلول مكفرلاند (أنبوب رقم 0.5) وذلك باضافة 0.5 مل من محلول A الى 99.5 مل من محلول B ومزج المحلول جيداً .

- محلول ماكفرلاند (أنبوب رقم 4) Macfarland Solution :-

حضر هذا المحلول (أنبوبة رقم 4) وذلك بإضافة 4 مل من محلول A الى 96 مل من محلول B ومزج المحلول جيداً .

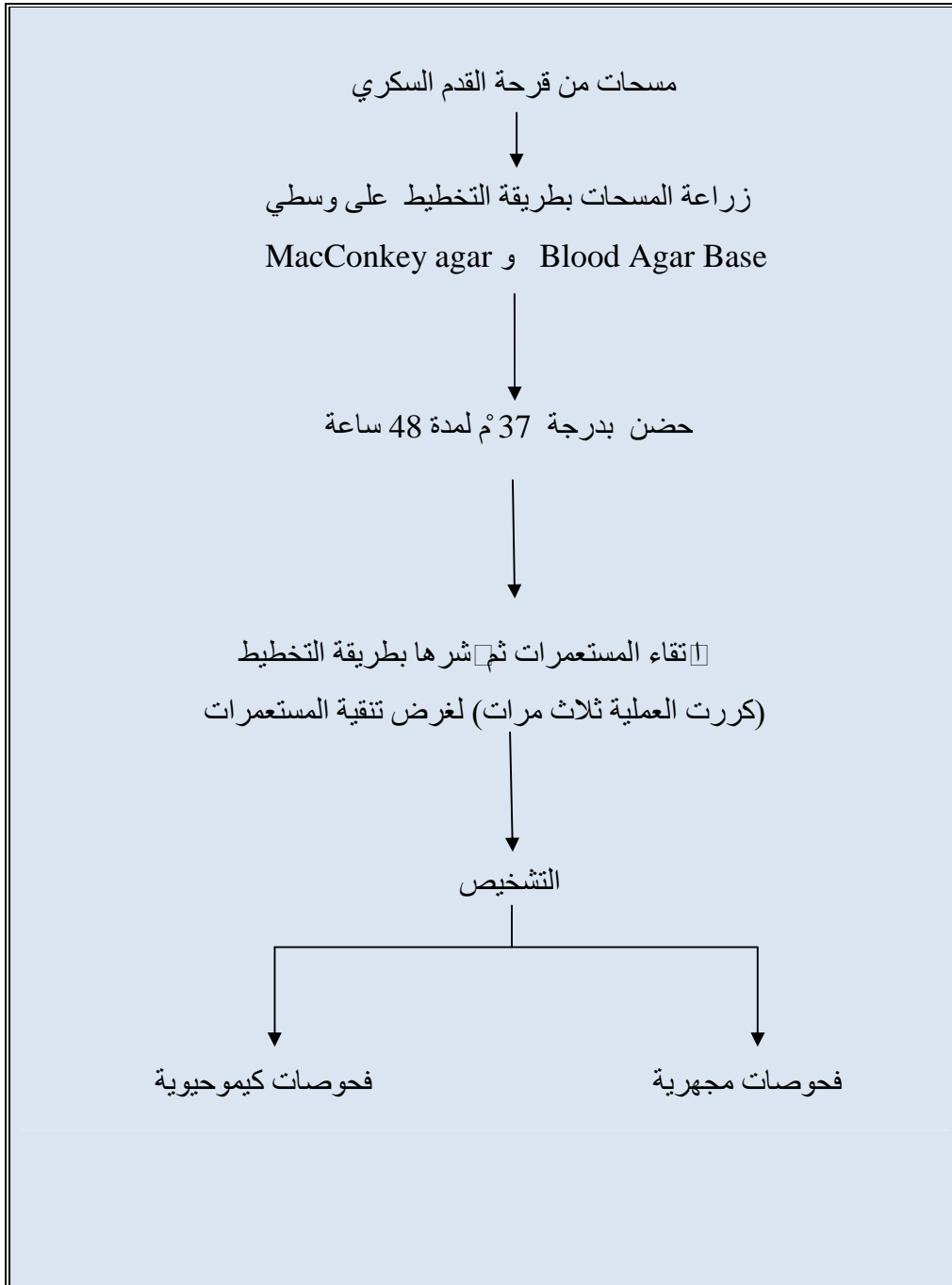
- المضادات الحيوية

استخدمت اقراص المضادات الحيوية المجهزة من شركة Bio-analyse والتي شملت:

ت	اسم المضاد	الرمز	التركيز mcg
1	Tetracycline	TE	30
2	Netilmicin	NET	30
3	Ceftriaxone	CRO	30
4	Trimethoprim-Sulfamethoxazole	TS	1.25/23.75
5	Clindamycin	CD	2
6	Imipenem	IPM	10
7	Ceftazidime	CAZ	30
8	Ofloxacin	OFX	5
9	Amikacin	AK	30
10	Chloramphenicol	C	30
11	Pencillin	P	10 unit
12	Tobramycin	TOB	10
13	Aztreonam	AT	30
14	Erythromycin	E	15
15	Azithromycin	AZM	15
16	Amoxicillin-Clavulanic Acid	AMC	20/10
17	Doxycycline	DO	100
18	Gentamycin	GEN	10
19	Ampicillin	AM	10

4-2-2 عزل وتشخيص البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري :

يمكن ايجاز عملية العزل والتشخيص وفق المخطط 3 :-



المخطط 3 : عزل وتشخيص البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري

2-2-4-1 تمييز البكتريا الموجبة عن السالبة لصبغة غرام**اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH test)**

أجري هذا الاختبار بمزج عروة كاملة من المستعمرات النامية على وسط Blood Agar الصلب مع كمية من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH بتركيز 3 % على شريحة زجاجية نظيفة . أن تكون مادة هلامية خلال 60 ثانية دليل على ايجابية الفحص و أن البكتريا تكون سالبة لصبغة غرام (Markey et al., 2013) .

2-2-4-2 عزل وتشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام**1-2-4-2-2 عزل وتشخيص بكتريا الـ *Proteus***

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *Proteus* اذ تم تشخيصها من خلال قابليتها على تكوين هرة العج swarming بعد تنميتها بدرجة 37 م° فضلاً عن الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية الآتية :-

❖ الفحوصات المجهرية (Microscopic tests) :**• تصبغ البكتريا :**

تم نقاء المستعمرات النامية على وسط MacConkey agar الصلب وتم تصبغها بصبغة غرام للتعرف على شكل الخلايا وتجمعاتها .

❖ الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :**• اختبار الكاتليز (Catalase test):**

اجري هذا الاختبار بمزج مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة مع قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين 3 % على شريحة زجاجية نظيفة . ان هور الفقاعات دليل على ايجابية الفحص (Tille , 2014) .

• اختبار الاوكسيديز (Oxidase test) :

تم قل مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة بواسطة عود خشبي معقم (stick) الى

ورقة ترشيح واضيف لها قطرة من كاشف الاوكسيديز , مع الاحتكام الى ان تحول لون المستعمرة الى اللون البنفسجي الغامق دليل على ايجابية الفحص (Tille , 2014) .

• **تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص API 20E :**

A- تحضير اللقاح :

حضر المزروع البكتيري بنقل 5 مستعمرات من العزلات النامية على وسط الماكوكي إلى 5 مليلتر من دارئ الفوسفات الملحي المحضر مسبقا في بوبة ظيفة ومعقمة , وتم رجها جيداً للحصول على عكورة ملائمة .

B- اجراء الفحص :

1- حضرت حاظفة الحضن (incubation box) وذلك بإضافة كمية قليلة من الماء المقطر في الحفر (Grooves) لجعل الظروف رطبة .

2- تم تعليم الحاظفة بكتابة اسم البكتريا او العزلة على جانب الحاظفة .

3- لقع الشريط باستخدام ماصة باستور ظيفة ومعقمة , إذ تم ملئ الجزء السفلي Tube والجزء العلوي Cupule بالعالق البكتيري في حالة الفحوصات | VP |، | GEL |، | CIT | بينما في حالة الفحوصات | ADH |، | H₂S |، | URE |، | LDC |، | ODC | تم ملئ الجزء السفلي بالعالق البكتيري في حين تم ملئ الجزء العلوي بزيت البارافين السائل المعقم لجعل الظروف لاهوائية فيما اقتصرت بقية الفحوصات على ملئ الجزء السفلي فقط بالعالق البكتيري , بعدها اغلقت الحاظفة بالغطاء الخاص بها .

4- تمت قراءة النتائج بعد مدة حضن (18-24) ساعة بدرجة حرارة 37 مئوي , وسجلت نتائج الاختبارات في الأبييب التي لا تحتاج إلى إضافة الكواشف مباشرة فيما أضيفت الكواشف للأبييب التي تحتاج للإضافة بحسب تعليمات الشركة المجهزة وتم تحديد ايجابية الاختبار من عدمه على وفق الجدول المحدد من قبل الشركة المذكورة .

2-2-4-2-2 عزل وتشخيص الانواع الاخرى من البكتريا السالبة لصبغة غرام

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *Pseudomonas* و *Escherichia* و *Burkholderia* و *Providance* و *Acinetobacter* و *Enterobacter* و *Raoultella* و *Klebsiella* و *Aeromonas* و *Ochrabactrum* اذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتريا *Proteus* .

2-2-4-2-3 عزل وتشخيص البكتريا الموجبة لصبغة غرام

2-2-4-2-1 عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus*

يمكن تلخيص عملية عزل وتشخيص بكتريا *Staphylococcus spp.* بالمخطط رقم 4 .
تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.* والتي
□ هرت على الأكار المغذي خلال 24 ساعة من الحضانة بدرجة 37 م° , اذ تم تشخيصها اعتمادا
على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية الآتية :-

❖ الفحوصات المجهرية (Microscopic tests) :

• تصبغ البكتريا :

تم □ تقاء المستعمرات النامية على وسط Blood Agar الصلب وتم تصبغها بصبغة
غرام للتعرف على شكل الخلايا وتجمعاتها .

❖ الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

• اختبار الكاتليز (Catalase test) و الاوكسيديز (Oxidase test)

اجري هذان الاختباران بحسب الطريقة الموصوفة في تشخيص بكتريا

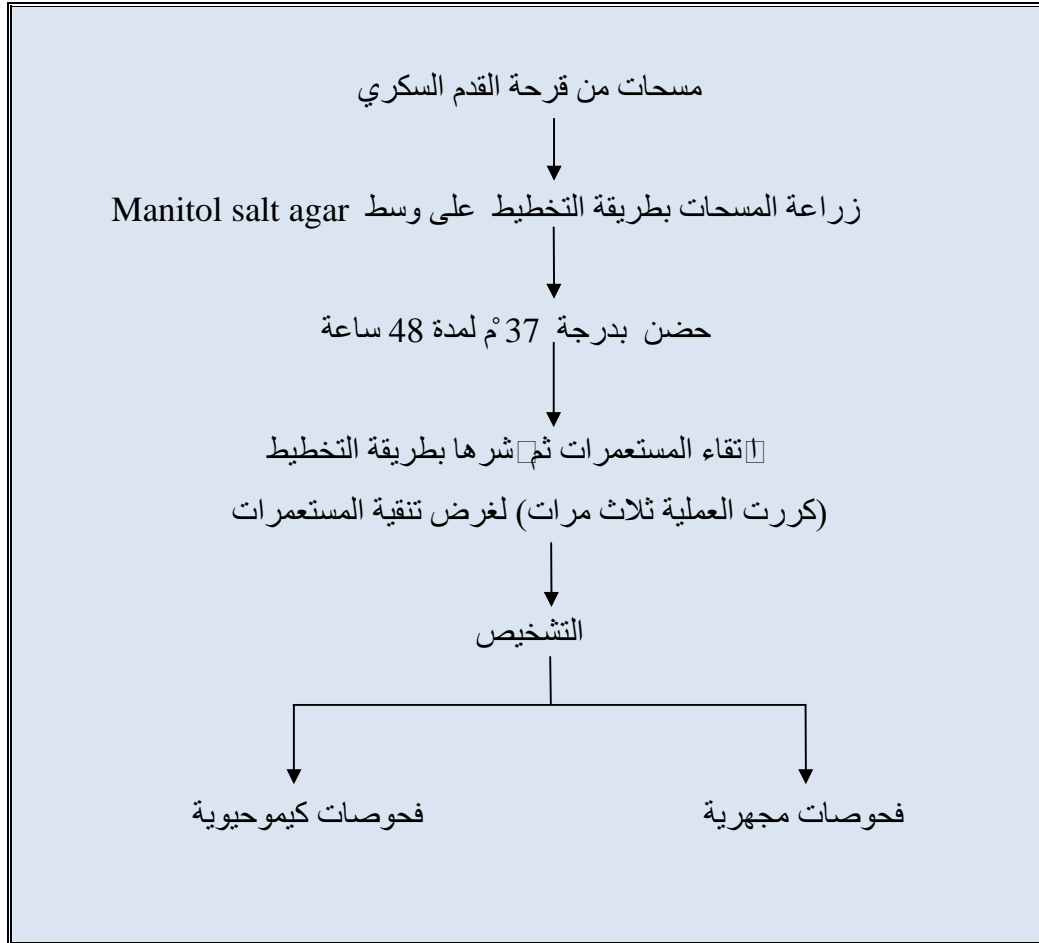
. *Proteus*

- **الزرع على وسط Mannitol salt Agar :**

استخدم هذا الوسط لعزل المكورات العنقودية الذهبية وتشخيصها من حيث قابليتها على تحمل ملوحة الوسط , فضلا عن قابليتها على تخمير سكر المانيتول وتحويل لون الوسط الى الاصفر (Tille , 2014) .

- **اختبار انزيم التجلط (Coagulase test) :**

تم اختبار العينات باستخدام بلازما الإسان إذ تم وضع 0.5 مل من البلازما في أنابيب معقمة ثم قلت مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة بواسطة عروة (loop) الى الأنابيب الحاوية على البلازما ومزجت جيدا ثم حضنت بدرجة حرارة (35-37) م لمدة 4 ساعات . ان حصول التجلط دلالة على ايجابية الفحص (Tille , 2014) .



2-3-4-2-2 عزل وتشخيص بكتريا *Enterococcus* :

تم تمييز مستعمرات *Enterococcus faecalis* والتي هرت على أكار الدم خلال 24 ساعة من الحضان بدرجة 37 م° , اذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية الآتية :-

❖ الفحوصات المجهرية (Microscopic tests) :

• تصبغ البكتريا :

تم تقاء المستعمرات النامية على وسط Blood Agar الصلب وتم تصبغها بصبغة غرام للتعرف على شكل الخلايا وتجمعاتها .

❖ الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

• اختبار الكاتليز (Catalase test) و الاوكسيديز (Oxidase test)

اجري هذان الاختباران بحسب الطريقة الموصوفة في تشخيص بكتريا *Proteus* .

• تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص *API 20 Strep* :

A- تحضير اللقاح :

حضر المزروع البكتيري بنقل 5 مستعمرات من العزلات النامية على وسط الدم إلى 2 مليلتر من دارئ الفوسفات الملحي المحضر مسبقا في بوبة نظيفة ومعقمة , وتم رجها جيدا للحصول على عكورة ملائمة .

B- اجراء الفحص :

1- حضرت حاظفة الحضان (incubation box) وذلك بإضافة كمية قليلة من الماء المقطر في الحفر (Grooves) لجعل الظروف رطبة .

2- تم تعليم الحاظفة بكتابة اسم البكتريا او العزلة على جانب الحاظفة .

3- لقم الشريط باستخدام ماصة باستور نظيفة ومعقمة , إذ تم ملئ الجزء السفلي Tube والجزء

العلوي Cupule بالعالق البكتيري في حالة الفحوصات VP ، HIP ، ESC ، RYRA ،

LAP , PAL , β GAL , β GAR , α GAL بينما في حالة الفحوصات ADH ، RIB ، ARA ، MAN ، SOR تم ملئ الجزء السفلي بالعالق البكتيري في حين تم ملئ الجزء العلوي بزيت البارافين السائل المعقم لجعل الظروف لاهوائية , بعدها اغلقت الحافظة بالغطاء الخاص بها.

4- تمت قراءة النتائج بعد مدة حضن (18-24) ساعة بدرجة حرارة 37 مئوي , وسجلت نتائج الاختبارات في الأبيب التي لا تحتاج إلى إضافة الكواشف مباشرة فيما أضيفت الكواشف للأبيب التي تحتاج للإضافة بحسب تعليمات الشركة المجهزة وتم تحديد ايجابية الاختبار من عدمه على وفق الجدول المحدد من قبل الشركة المذكورة .

2-2-5 اختبار حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية :-

استخدمت طريقة انتشار الأقراص (Disk diffusion test) لتحديد حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية على وفق ما جاء في (Morello *et al.*, 2006) بحسب الخطوات الآتية :-

- 1- حضنت الأبيب الحاوية على المزروع البكتيري السائل بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة .
- 2- قل جزء من المزروع السائل (0.1 مل) إلى أبيب تحوي المحلول الملحي الفسلجي , وقوربت عكورة النمو مع عكورة محلول ثابت العكورة القياسي (McFarland standard 0.5) والذي يعطي عدداً تقريبياً للخلايا 1.5×10^8 وحدة تكوين مستعمرة / مليلتر .
- 3- قل 100 مايكروليتر من العالق البكتيري بوساطة الماصة الدقيقة (Micropipette) , ثم شر بوساطة الناشر الزجاجي على سطح وسط مولر – هنتون أكار بصورة متجانسة , بعدها تركت الأطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة 10-15 دقيقة .
- 4- قلت أقراص المضادات الحيوية بوساطة ملقط معقم إلى الأطباق , ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .

5- تم قراءة النتائج بقياس قطر مناطق التثبيط بالمليمتر حول أقراص المضادات الحيوية .

6-2-2 حفظ وإدامة العزلات

تم حفظ العزلات لفترة قصيرة الامد و ذلك بزرعها في \square ابيب اختبار مائلة (Slants) حاوية على الوسط المغذي الصلب , و تحضن لمدة 18 ساعة لتنميتها في درجة حرارة 37 °م و بعدها حفظت بالثلاجة , اذ يتم تجديد المزارع كل شهر, كما تم حفظها لفترة طويلة الامد باستخدام الوسط المغذي السائل Brain heart infusion broth المدعم بـ 15% من الكليسيرون .

7-2-2 تحضير المركب النانوي الهجين المستخدم في هذه الدراسة

تم استخدام المضاد الحيوي Levofloxacin في تحضير المركب النانوي الهجين .

1-7-2-2 تحضير المضيف او الحامل (Host or Carrier)

• المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1): محلول نترات المغنسيوم $(0.5M) Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

حضر هذا المحلول بإذابة 32.05 غم من نترات المغنسيوم في كمية من الماء المقطر المزال منه الايونات ، وبعد إتمام عملية الإذابة أكمل الحجم إلى 250 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات أيضا .

محلول رقم (2): محلول نترات الالمنيوم $(0.125M) Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$

حضر هذا المحلول بإذابة 11.72 غم من نترات الالمنيوم في كمية من الماء المقطر المزال منه الايونات ، وبعد إتمام عملية الإذابة أكمل الحجم إلى 250 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات أيضا .

محلول رقم (3): محلول هيدروكسيد الصوديوم (2 M , NaOH)

حضر هذا المحلول بإذابة 4 غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية من الماء المقطر المزال منه الايونات ، وبعد إتمام عملية الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات أيضا .

• طريقة التحضير:

تحضير طبقات المغنسيوم / الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد Mg-Al-NO₃-LDH بواسطة

الترسيب المشترك (Co-precipitation) :

تم تحضير طبقات المغنسيوم / الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد بواسطة الترسيب المشترك على وفق الطريقة الموصوفة من قبل (Klemkaite et al., 2011) مع بعض التحوير وذلك بمزج محلول ترات المغنسيوم المائية مع محلول ترات الالمنيوم المائية ، إذ تم الترسيب عند الرقم الهيدروجيني 10.5 وذلك بإضافة قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 2 مولاري مع استمرار تحريك المزيج مغناطيسيا لمدة ساعتين أعقبه وضع المزيج في الحاضنة عند درجة حرارة 70 درجة مئوية لمدة 18 ساعة ثم فصل الراسب بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة ولمدة 20 دقيقة ومن ثم غسل بالماء المقطر المزال منه الايونات مرات عدة وبعدها جفف عند درجة حرارة 60 درجة مئوية ثم طحن جيدا للحصول على مسحوق ناعم تم خنقه في الثلاجة .

2-7-2-2 تحضير المضاد النانوي باستخدام الحامل طبقات ثنائية الهيدروكسيد :

A. تحضير محلول المضاد ليفوفلوكساسين الحر :

حضر هذا المحلول بإذابة 1.2 غم من المضاد ليفوفلوكساسين في كمية من المذيب Dimethyl sulfoxide (DMSO) ، وبعد إتمام عملية الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل باستخدام المذيب Dimethyl sulfoxide (DMSO) أيضا .

B. تحضير المضاد النانوي الهجين من طبقات المغنيسيوم / الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al-NO₃LDH) مع المضاد ليفوفلوكساسين بطريقة التبادل الأيوني المباشر :

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Bashi *et al.*, (2013) مع بعض التحوير في تحضير المضاد النانوي الهجين وذلك بإضافة 50 مل من المضاد ليفوفلوكساسين المحضر أعلاه إلى محلول الطبقات ثنائية الهيدروكسيد (الناتج عن إذابة 1 غم من راسب الطبقات ثنائية الهيدروكسيد في 50 مل من الماء المقطر المزال منه الأيونات) وحرك المزيج مغناطيسياً بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ثم وضع المزيج في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 37 م° لمدة 18 ساعة ثم وضع في الحاضنة عند درجة حرارة 40 م° لمدة 24 ساعة أعقبه فصل الراسب بوساطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة ومن ثم غسل بالماء المقطر المزال منه الأيونات مرات عدة وبعدها جفف الراسب عند درجة 40 درجة مئوية وتم طحنه بالهاون الخزفي واخيراً خزنه . ولا بد من الإشارة الى أن المضاد النانوي الهجين المحضر أعطي الرمز Mg/Al-LEV-LDH أو الرمز LEV-LDH كما هو موضح في المخطط 5 .

2-2-8 تشخيص المضاد النانوي الهجين :

تم استخدام ثلاث طرائق لتشخيص المضاد النانوي الهجين قيد الدراسة ، اشتملت هذه الطرائق على طيف الأشعة تحت الحمراء (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) وطيف حيود الأشعة السينية (X-ray diffraction , XRD) فضلا عن استخدام مجهر القوة الذرية (Atomic Force Microscope , AFM) .

2-2-8-1 التشخيص باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR :

تمت دراسة طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد النانوي الهجين قيد الدراسة وكذلك المضاد ليفوفلوكساسين بشكله الحر فضلا عن طبقات ثنائية الهيدروكسيد , إذ تم عمل قرص من المركب مع بروميد البوتاسيوم (KBr) بعد طحنها بصورة جيدة وتم قياس طيف الأشعة

تحت الحمراء في مدى من الاعداد الموجية (400-4000) سم⁻¹ وتم تثبيت جميع الحزم الظاهرة مع اعدادها الموجية كما تم تشخيص معظم الحزم الرئيسية .

2-2-2-2 التشخيص باستخدام طيف حيود الاشعة السينية XRD :

تم تشخيص المضاد التآوي الهجين باستخدام طيف حيود الاشعة السينية (X-Ray) والذي يوضح الاختلاف في سمك الطبقة قبل عملية الاقحام وبعدها للمضاد ليفولوكساسين وذلك باستخدام قانون براك $n\lambda=2d\sin\theta$ لاستخراج قيمة سمك الطبقة (d) قبل عملية الاقحام وبعدها.

إذ ان :

n : رتبة المستوى البلوري الذي يكون منه حيود للأشعة السينية .

λ : الطول الموجي للأشعة السينية المستخدمة (أبوبة حاس) .

θ : زاوية الحيود للأشعة السينية .

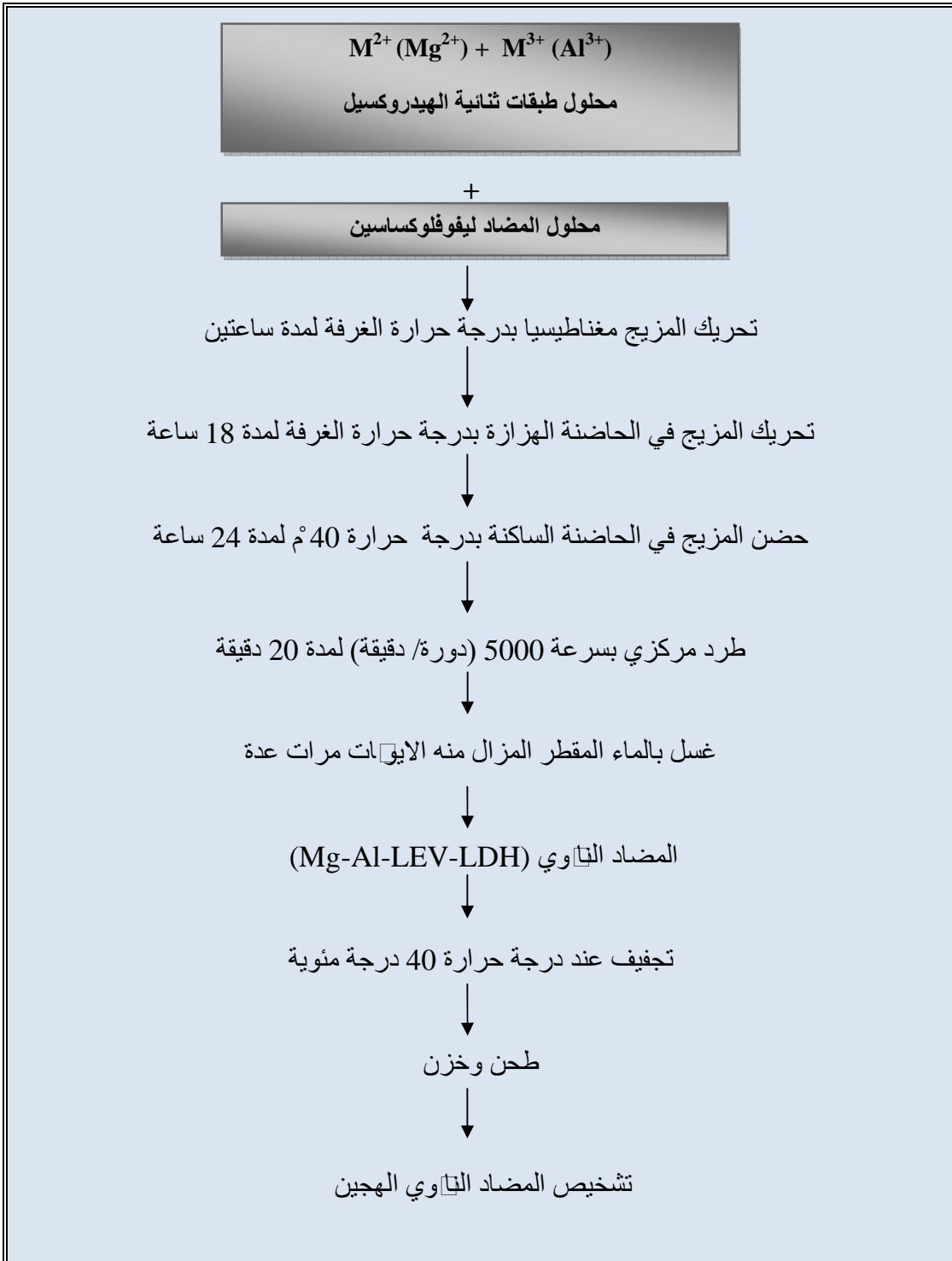
d : المسافة البلورية العمودية بين مستويين متوازيين .

2-2-2-3 التشخيص باستخدام مجهر القوة الذرية AFM :

استخدم مجهر القوة الذرية في فحص المضاد التآوي Mg/Al-LEV-LDH وقياس اقطار وحجوم وتجمعات الدقائق التآوية ، اذ تم ارسال النموذج الى د. عبد الكريم السامرائي / كلية العلوم / جامعة بغداد لغرض فحصه .

2-2-2-9 التحليل الدقيق للعنصر (CHN) في المضادات النانوية الهجينة :

تم تحديد نسب الكربون والهيدروجين والنيتروجين في كل من المضاد الحر و التآوي الهجين المحضر في هذه الدراسة .



المخطط 5 : تحضير المضاد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH بطريقة التبادل الايوني المباشر

10-2-2 دراسة تحرر المضاد ليفوفلوكساسين من المضاد النانوي الهجين :

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (Wang and Zhang (2012) مع بعض التحوير في دراسة تحرر هذا المضاد الى عدد من المحاليل المنظمة .

المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) : محلول منظم خلات الصوديوم (0.1M , pH=5.2)

حضر هذا المحلول بمزج 5.7 مل من حامض الخليك الثلجي مع كمية من الماء المقطر المزال منه الايونات وبعد اتمام عملية المزج تم تعديل الرقم الهيدروجيني الى 5.2 باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم (1M) ثم اكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا .

محلول رقم (2) : محلول حامض الهيدروكلوريك HCL (2M)

حضر هذا المحلول بمزج 4.2 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز مع كمية من الماء المقطر المزال من الايونات ومن ثم اكمل الحجم الى 50 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا .

محلول رقم (3) : محلول منظم الفوسفات (0.1M , pH=7.4)

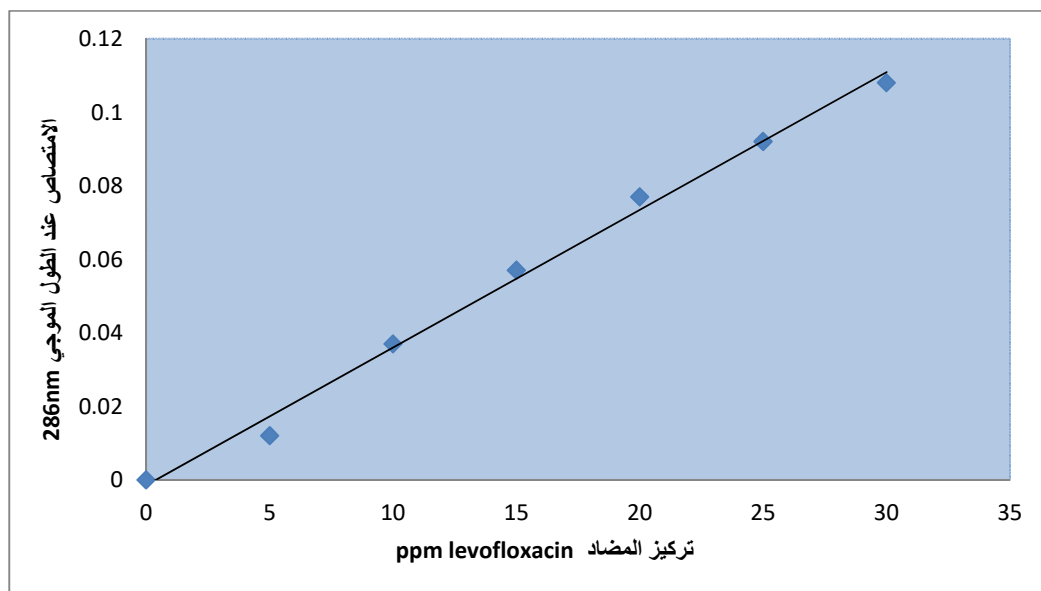
حضر هذا المحلول بإذابة 1.36 غم من مادة فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى 7.4 أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ذاته .

محلول رقم (4) : محلول منظم الترس (0.1M , pH=8.8)

حضر هذا المحلول بإذابة 1.21 غم من مادة الترس (Tris-HCL) في كمية معينة من الماء المقطر و بعد تعديل الرقم الهيدروجيني الى 8.8 أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

2-10-2-1 تعيين منحنى المعايرة (Calibration Curve) للمضاد ليفوفلوكساسين :

تم تعيين منحنى المعايرة الذي يمثل العلاقة بين الامتصاص والتركيز عن طريق تحضير ستة تراكيز متتابة ضمن المدى (5-30) جزء بالمليون (ppm) من محلول المضاد ليفوفلوكساسين المستخدم في الدراسة وتم قياس الامتصاص لهذه التراكيز عند الطول الموجي الأعظم (λ_{max}) 286 nm للمضاد وبعدها رسم المنحنى القياسي بين الامتصاص والتركيز كما مبين في الشكل 3 ومن معادلة الخط المستقيم التالية $Y = mx + b$ يتم تعيين منحنى المعايرة .



الشكل 3: منحنى المعايرة للمضاد ليفوفلوكساسين

2-10-2-2 طريقة تحرير المضاد النانوي ليفوفلوكساسين الى المحاليل المنظمة :

تم دراسة تحرير المضاد ليفوفلوكساسين من المضيف (طبقات ثنائية الهيدروكسيد) الى ثلاثة محاليل منظمة اشتملت على محلول منظم الخلات (pH 5.2) و محلول منظم الفوسفات (pH 7.4) و محلول منظم الترس (pH 8.8) .

تم استخدام مطياف الأشعة فوق البنفسجية – المرئية في هذه الدراسة إذ تم تعيين الطول الموجي الأعظم للمضاد قيد الدراسة وتم عمل منحنى المعايرة وتعيين معادلة الخط المستقيم .

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (Abdeen and salahuddin (2013) في دراسة تحرر المضاد قيد الدراسة الى المحاليل المنظمة المشار إليها أعلاه و ذلك بإضافة 30 ملغم من المضاد النانوي الهجين الى 150 مل من كل محلول من المحاليل المنظمة المستخدمة في الدراسة إذ تمت متابعة عملية التحرر خلال فترات زمنية (0.25 و 0.5 و 1 و 2 و 3 و 4 و 5 و 24 و 25 و 26) ساعة إذ يتم سحب 1.7 مل من المركب المتحرر ويعوض عنه بإضافة 1.7 مل من المحلول المنظم . ودرست عملية التحرر من خلال زيادة مقدار الامتصاص بدلالة الزمن استناداً الى قانون بير - لامبرت .

3-10-2-2 دراسة النسبة المئوية لتحرر المضاد ليفوفلووكساسين من بين طبقات المضاد النانوي الهجين :

تمت متابعة دراسة النسبة المئوية لتحرر المضاد ليفوفلووكساسين بواسطة مطياف الأشعة فوق البنفسجية وذلك بإضافة 5 ملغم من المركب النانوي الهجين الى 25 مل من محلول حامض الهيدروكلوريك (2 مولاري) و تم قياس الامتصاص له عند قيمة الامتصاص العظمى للمضاد لمعرفة التركيز الكلي للمضاد داخل الطبقة (CT) وبقسمة التركيز عند كل زمن (Ct) المستخرجة في الفقرة (1-10-2-2) على التركيز الكلي وحسب المعادلة الآتية يتم حساب النسبة المئوية للتحرر .

$$\text{Release \%} = \frac{Ct}{CT} \times 100 \dots\dots(1)$$

كما تمت دراسة مسار التحرر لتحديد الرتبة التي يسلكها هذا المسار . فاذا كان المسار المذكور يستند إلى موديل الرتبة الاولى الكاذبة فإنه يخضع للمعادلة الآتية :

$$\text{Log (1- Ct/ CT)} = K_1t/ 2.303 \dots\dots\dots(2)$$

بينما في حالة سلوكه الرتبة الثانية الكاذبة فإنه يخضع للمعادلة الآتية :

$$t/ Ct = 1/ K_2CT^2 + t/ CT \dots\dots\dots(3)$$

إذ أن :

t : زمن التحرر

Ct : تركيز المضاد المتحرر عند زمن t

CT : التركيز الكلي للمضاد المتحرر عند زمن ∞

K1 : ثابت السرعة للرتبة الاولى

K2 : ثابت السرعة للرتبة الثانية

11-2-2 تقدير الفعالية التثبيطية للمضاد Levofloxacin بنوعيه الحر و النانوي ضد البكتريا المعزولة في هذه الدراسة :

اشتملت هذه الدراسة على اختبار الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Mg/Al- Levofloxacin-Layered double hydroxide (Mg/Al-LEV-LDH) فضلا عن المضاد Levofloxacin الحر ضد العزلات المتحصل عليها في هذه الدراسة وبتراكيز (0.005 , 0.01 , 0.1 , 0.25 , 0.5 , 1 , 3) ملغم / مل على وفق طريقة الانتشار في الاكار بوساطة الحفر (Egorove .,1985) بحسب الآتي :

1 - سحب 0.1 مل من اللقاح المحضر , واضيف الى اطباق حاوية على وسط Muller Hinton agar الصلب وتم شربه جيدا على سطح الطبق بوساطة الناشر L-Shape و تركت الاطباق مدة ساعة في الثلاجة .

2- تم عمل حفر على سطح الاكار باستخدام الثاقب الفليني ذو قطر 7 ملم اذ كانت المسافة متساوية بين حفرة واخرى .

3- خفف المضاد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH باستخدام المذيب Dimethyl sulfoxide (DMSO) للحصول على تراكيز متدرجة تراوحت بين (0.005 - 3) ملغم/مل , كما خفف المضاد الحر لغرض المقارنة .

4- وضع 50 مايكروليتر من كل تركيز من تراكيز المضاد قيد الدراسة في كل حفرة و حضنت لمدة ساعة في الثلاجة ، ومن ثم حضنت في الحاضنة بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة .

5- تم قياس اقطار تثبيط □ مو البكتريا (ملم) باستعمال المسطرة بعد اكتمال مدّة الحضانة .

اشتملت الدراسة ايضا على اختبار الفعالية التثبيطية باستخدام توليفة من المضاد التياوي

الهجين و Cefixime ضد بكتريا *P. mirabilis* والمضاد التياوي الهجين و Teicoplanin ضد بكتريا *S. aureus* .

2-2-12 التحليل الاحصائي (Statistical Analysis) :

حللت النتائج إحصائياً بهدف معرفة الفروقات المعنوية بين معدل التثبيط للعوامل

المدروسة ضد عزلات بكتريا *P. mirabilis* و *S. aureus* و *E. coli* و *Pseudomonas* spp. و *E. faecalis* و *R. terrigena* و *E. cloacae* و *A. baumannii* و *P.*

rettgeri و *B. cepacia* و *K. pneumonia* و *A. salmonicida* و *O. anthropic*

المعزولة من قرحة القدم السكري تمثلت هذه العوامل بالمضاد : Levofloxacin بنوعيه الحر

والتياوي الهجين فضلاً عن المضادين Teicoplanin و Cefixime الحرين أولاً و العزلات

البكتيرية ثانياً فضلاً عن التراكيز المستخدمة من المضادات أعلاه ثالثاً , و قد حددت الفروق

المعنوية على مستوى احتمالية 0.01 إذ شمل التحليل الإحصائي تحليل تجارب العاملية

$7 \times 10 \times 2$ للجدول 27 , و $7 \times 9 \times 2$ للجدول 28 , و $7 \times 8 \times 2$ للجدولين 29 و 30 , و 7×10

للجدول 31 و 7×9 للجدول 32 و $7 \times 5 \times 2$ للجدول 33 و $7 \times 6 \times 2$ للجدول 34 وبمكررين ,

كما تم اختبار الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال اختبار أقل فرق معنوي LSD و على

مستوى احتمالية 0.01 (الإمام , 2007) .

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

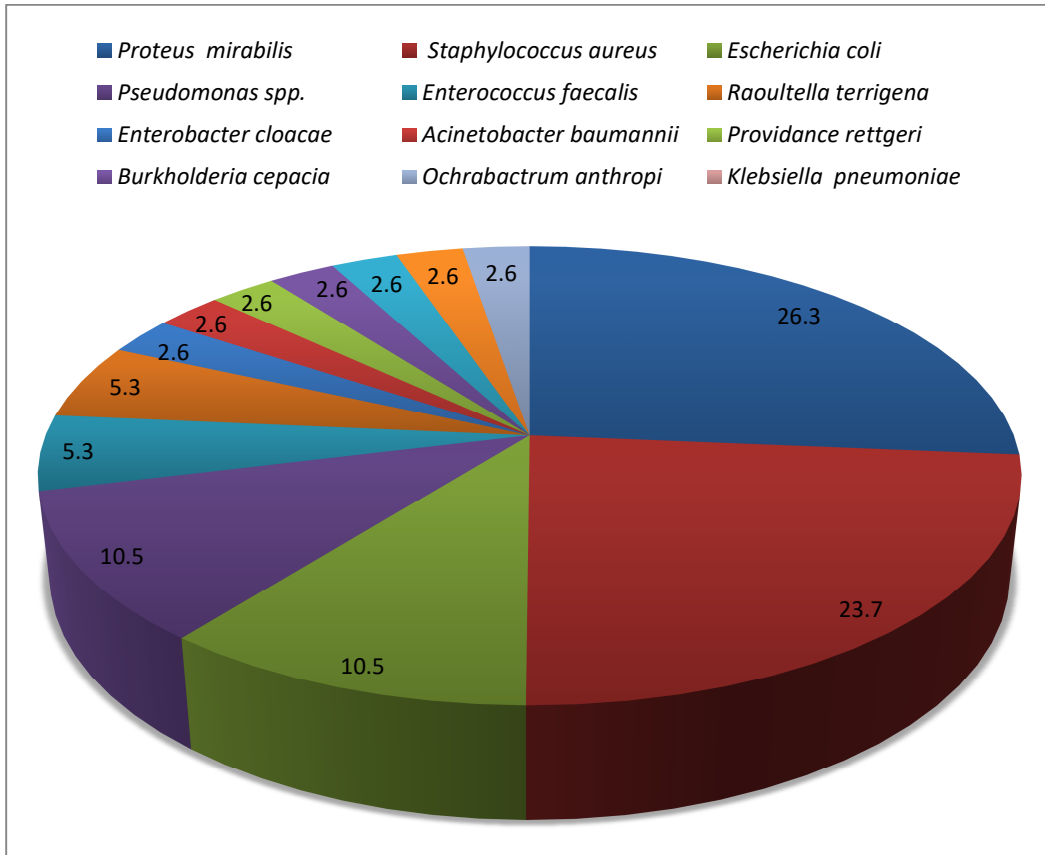
3- النتائج والمناقشة

1-3 عزل وتشخيص البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري

بعد زرع العينات المتحصل عليها من قرحة القدم السكري على وسطي أكار الدم والماكونكي تم الحصول على 38 عزلة بكتيرية . تمخضت عملية معالجة العزلات البكتيرية بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم (3 %) عن الحصول على 27 عزلة سالبة لصبغة غرام أي بنسبة (71) % من جموع البكتريا المعزولة فضلاً عن 11 عزلة وبنسبة لهذه الصبغة أي بنسبة (29) % من جموع البكتريا المعزولة في هذه الدراسة أيضا ، واعتماداً على نتائج التشخيص التي سيرد ذكرها لاحقاً ، أسفرت عملية العزل عن الحصول على 10 عزلات (26.3) % من بكتريا *Proteus mirabilis* و 9 عزلات (23.7) % *Staphylococcus aureus* و 4 عزلات (10.5) % *Escherichia coli* و 4 عزلات (10.5) % *Pseudomonas* كانت 3 منها *Pseudomonas flouresence* وواحدة *Pseudomonas aeroginosa* وعزلتين (5.3) % من كل من *Enterococcus faecalis* و *Raoultella terrigena* وعزلة واحدة (2.6) % لكل من *Enterobacter cloacae* و *Acinetobacter baumannii* و *Providancia rettgeri* و *Burkholderia cepacia* و *Klebsiella pneumoniae* و *Aeromonas salmonicida* و *Ochrobactrum anthropi* وحسب الشكل 4 .

تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما ورد في دراسات سابقة إذ أن الأنواع البكتيرية المعزولة في هذه الدراسة تماثل ما أشار إليه (Osariemen et al., 2013) الذي تمكن من عزل بكتريا *S. aureus* و *E. coli* و *Proteus spp.* و *Klebsiella spp.* و *P. aeruginosa* من قرحة القدم السكري في نيجيريا بنسب بلغت (38 و 24 و 20 و 10 و 8) % ، على التوالي . كما تمكن (Patil and Patil 2015) من عزل الأنواع المذكورة بنسب بلغت (25.4 و 6.9 و 21.3 و 8.6 و 10.65) % على التوالي , ايضاً .

بالرّوع الى الشكل 4 يتضح سيادة بكتريا *P. mirabilis* على بقية الأنواع البكتيرية المعزولة من أخماج قرحة القدم السكري في محافظة كربلاء المقدسة وقد جاءت هذه النتائج وافقة لما أشار اليه العديد من الباحثين إذ كان هذا النوع من البكتريا هو السائد في أخماج قرحة القدم السكري في كل من غانا وصر ويزيا أيضاً بنسب بلغت (31 و 16.8 و 22.2) % ، على التوالي (Brenyah et al., 2014 ; Dwedar et al., 2015 ; Wahab et al.,) (2015).



الشكل 4 : أنواع البكتريا المعزولة من قرحة القدم السكري في محافظة كربلاء المقدسة

سيادة بكتريا *P. mirabilis* في قرحة القدم السكري يمكن أن يُعزى الى قاروتها للعديد من العوامل المضادة للميكروبات ما يتسبب في تفاقم هذه القرحة وتأخير العلاج (Tansarli et al., 2013).

وإن مهمة أخرى ، لا تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما حصل عليه (Perim et al., 2015) إذ كانت بكتريا *Staphylococcus* هي السائدة بين البكتريا المعزولة من قرحة القدم السكري في إحدى المستشفيات في البرازيل . ويمكن أن يعزى هذا التباين جزئياً إلى الاختلافات في الأحياء المجهرية المسببة المتواجدة مع مرور الزمن والتباين الجغرافي أو نوع وشدة الإصابة التي تتضمنها الدراسات (Kavitha and Mohiddin , 2014) .

2-3 تشخيص البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري

1-2-3 تشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام

1-1-2-3 تشخيص بكتريا *P. mirabilis*

• الصفات الزرعية والمجهرية

(Cultural and Microscopical characteristic) :

بعد زرع سحات قرحة القدم السكري على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على عشر عزلات ذات استعمرات رادية يتميز نموها بكونه Swarming يُغطي سطح الطبق ويكون النمو بشكل واج (Waves) وتحول أكار الدم الى اللؤلؤ البني كما أنّ لها رائحة كريهة (Foul smell) على وسط الماكونكي فقد كانت المستعمرات شاحبة وذات حافات غير منتظمة , وأوج الفحص المجهرى أنّ العزلات كانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلات البكتيرية هي *P. mirabilis* (Markey et al., 2013) (الجدول 5) .

• الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

أظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموحدة في الجدول 5 أنّ بكتريا *P. mirabilis* كانت لاهوائية اختيارية ووجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسيدز وقد أعطت النتيجة + في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

الجدول 5: الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *P. mirabilis*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة غرام	-
2	المظهر الخلوي	خلايا عصوية الشكل
3	ظروف النمو	لاهوائية اختيارية
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الاوكسيديز	-
6	تخمير اللاكتوز	-
7	فحص KOH	+

(+): نتيجة موجبة, (-): نتيجة سالبة

• **تشخيص بكتريا *P. mirabilis* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :**

تم تشخيص بكتريا *P. mirabilis* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين أن خلال النتائج الموجبة في الملحق 1 البكتريا اعطت نتائج موجبة في اختبارات ODC و H₂S و URE و TDA و VP و GEL و GLU بينما اعطت نتائج سالبة في اختبارات ONPG و ADH و LDC و CIT و IND و MAN و INO و SOR و RHA و SAC و MEL و AMY و ARA . نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد أن البكتريا المعزولة هي *P. mirabilis*.

2-1-2-3 تشخيص بكتريا *Pseudomonas spp.*

• **الصفات الزرعية والمجهرية**

: (Cultural and Microscopical characteristics)

بعد زرع سحات قرحة القدم السكري على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على أربع عزلات بهيئة سـتـعـمـرات تنتشرة كانت ثلاثة منها صفراء

شفافة ناعمة أو خشنة ، و جهرياً كانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام لذا فأ □ هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى أ □ هذه العزلة هي *P. fluorescens* . □ العزلة الرابعة فقد كانت □ ستعمراتها □ سطحة وذات حافات □ سننة □ تموية النمو وتمتلك بريقاً □ عدنياً ذو لو □ أخضر ولها رائحة شبيهة برائحة العنب فضلاً عن ظهور □ ناطق شفافة حول المستعمرات بسبب إنتاج البكتريا للهيمولايسين الذي يحلل الدم المو □ ود في الوسط وغالباً □ يكون □ التحلل (نوع β) ، □ □ جهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام □ هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى □ العزلة البكتيرية هي *P. aeruginosa* (Tille , 2014) (الجدول 6) .

□ عند تنمية بكتريا *Pseudomonas* المعزولة في هذه الدراسة على وسط الماكونكي فقد ظهرت المستعمرات شاحبة على هذا الوسط بسبب عدم قابليتها على تخمير اللاكتوز (Tille , 2014) .

الجدول 6 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *Pseudomonas spp.*

الاستجابة		الاختبار	ت
بكتريا <i>P. fluorescens</i>	بكتريا <i>P. aeruginosa</i>		
-	-	صبغة غرام	1
خلايا عصوية الشكل	خلايا عصوية الشكل	المظهر الخلوي	2
هوائية	هوائية	ظروف النمو	3
+	+	اختبار الكاتليز	4
+	+	اختبار الاوكسيديز	5
-	-	تخمير اللاكتوز	6
+	+	فحص KOH	7

(+) : نتيجة موجبة ، (-) : نتيجة سالبة

يعد وسط الماكونكي وسطاً اختيارياً- تقريبياً , فهو اختياري من جهة لأنه يحتوي على صبغة Crystal violet المثبطة لنمو البكتريا الموجبة لصبغة غرام كما يحتوي ايضاً على ملح Bile salt المثبط لنمو البكتريا السالبة لصبغة غرام عدا مجموعة البكتريا المعوية (Enteric Bacteria) ومن جهة اخرى يعد هذا الوسط وسطاً تقريبياً كونه يميز بين الجراثيم المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز. يحتوي هذا الوسط على اللاكتوز والفينول الاحمر إذ يعد الاخير دليلاً للرقم الهيدروجيني (pH indicator) لذا فان المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز تنتج حامض الذي يعمل بدوره على تغيير لون الدليل الى اللون الاحمر (, Hart and Shears) 2004 ; Quinn et al., 2004 .

• الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموحدة في الجدول 6 □ كل □ ن بكتريا *P. aeruginosa* و *P. fluorescens* قد اعطتا نتيجة □ و □ بة في فحصي الكاتليز والأكسيدز بينما اعطى كلا النوعين النتيجة + في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

• تشخيص بكتريا *Pseudomonas spp.* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *P. aeruginosa* و *P. fluorescens* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين □ ن خلال النتائج الموحدة في الملحق 2 □ بكتريا *P. aeruginosa* اعطت نتائج □ و □ بة في اختبارات ADH و CIT و URE بينما أعطت نتائج سالبة في اختبارات ONPG و LDC و ODC و H₂S و TDA و IND و VP و MAN و INO و SOR و RHA و MEL و AMY ونتائج □ تغايرة في اختبارات GEL و GLU و SAC و ARA □ نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد □ البكتريا المعزولة هي *P. aeruginosa* . □ أ بكتريا *P. fluorescens* فقد أعطت نتيجة □ و □ بة في اختبار ADH و CIT و GEL و GLU و SOR و RHA و MEL و AMY و ARA SAC وأعطت نتائج سالبة في اختبارات ONPG و LDC و ODC و H₂S و TDA و IND و VP ونتيجة □ تغايرة في

أختبار URE و MAN و INO و نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد أن البكتريا المعزولة هي *P. fluorescens*.

3-1-2-3 تشخيص بكتريا *E. coli*

• الصفات الزرعية والمجهرية

: (Cultural and Microscopical characteristics)

بعد زرع سحات قرحة القدم السكري على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على اربع عزلات بهيئة مستعمرات رادية اللو ناعمة براقه (Shiny) عند تنميتها على وسط الماكونكي فكانت المستعمرات وردية افاة سطحه حاطة بمنطقة وردية غافة نتيجة ترسب أملاح الصفراء , ا جهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلات البكتيرية هي *E. coli* (Markey et al., 2013 ; Tille , 2014) (الجدول 7).

• الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموحدة في الجدول 7 أن بكتريا *E. coli* كانت هوائية اختيارية و ابة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسيديز كما أعطت النتيجة + في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

• تشخيص بكتريا *E. coli* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *E. coli* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين أن خلال النتائج الموحدة في الملحق 3 أن بكتريا *E. coli* اعطت نتائج ايجابية في اختبارات ONPG و LDC و ODC و IND و GLU و MAN و SOR و RHA و SAC و MEL و ARA بينما اعطت نتائج سالبة في اختبارات ADH و CIT و H₂S و URE و TDA و VP و GEL و INO و AMY . نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد أن البكتريا المعزولة هي *E.coli*.

الجدول 7 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *E. coli*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة غرام	-
2	المظهر الخلوي	خلايا عصوية الشكل
3	ظروف النمو	هوائية اختيارية
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الأوكسيديز	-
6	تخمير اللاكتوز	+
7	فحص KOH	+

(+) : نتيجة موجبة , (-) : نتيجة سالبة

4-1-2-3-1-2-3 تشخيص بكتريا *R. terrigena*

• الصفات الزرعية والمجهرية

: (Cultural and Microscopical characteristics)

بعد زرع سحات قرحة القدم السكري على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلتين بهيئة مستعمرات رادية اللو □□ خاطية (mucoid) بينما ظهرت المستعمرات على وسط الماكونكي كبيرة وردية فاتحة □ خاطية , □□ جهرياً فكانت بهيئة خلايا عصوية الشكل سالبة لصبغة غرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *R. terrigena* (Tille , 2014) (الجدول 8) .

• الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموجبة في الجدول 8 □ بكتريا *R. terrigena* كانت هوائية □□ و□□بة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسيديز كما أعطت النتيجة + في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

الجدول 8 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *R. terrigena*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة غرام	-
2	المظهر الخلوي	خلايا عصوية الشكل
3	ظروف النمو	هوائية
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الاوكسيديز	-
6	تخمير اللاكتوز	-
7	فحص KOH	+

(+): نتيجة موجبة, (-): نتيجة سالبة

• تشخيص بكتريا *R. terrigena* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *R. terrigena* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين أن خلال النتائج الموجبة في الملحق 4 □ بكتريا *R. terrigena* اعطت نتائج موجبة في اختبارات ONPG و LDC و VP و GLU و MEL و ARA بينما أعطت نتائج سالبة في اختبارات ADH و ODC و CIT و H₂S و URE و TDA و IND و MAN و INO و SOR و RHA و SAC و AMY ونتيجة موجبة في اختبار GEL . □ نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد □ البكتريا المعزولة هي *R. terrigena* .

5-1-2-3 تشخيص بكتريا *A. baumannii*

• الصفات الزرع والمجهرية

: (Cultural and Microscopical characteristics)

بعد زرع □ سحات قرحة القدم السكري على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلة واحدة بهيئة □ ستعمرات ناعمة غير شفافة (Opaque), □ رتفعة كريمة اللون □ بينما على وسط الماكونكي كانت المستعمرات أروانية

اللون □ ولكنها غير □ خمرة للاكتوز, □ □ جهرياً فكانت بهيئة Coccobacilli سالبة لصبغة غرام . ان هذه الصفات الزرعية و المجهرية تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *A. baumannii* (Tille , 2014) (الجدول 9) .

الجدول 9 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *A. baumannii*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة غرام	-
2	المظهر الخلوي	Coccobacilli
3	ظروف النمو	لاهوائية اختيارية
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الاوكسيديز	-
6	تخمير اللاكتوز	-
7	فحص KOH	+

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

• الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموجبة في الجدول 9 □ بكتريا *A. baumannii* كانت لاهوائية اختيارية □ □ و □ ل فحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسيديز كما أعطت النتيجة + في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

• تشخيص بكتريا *A. baumannii* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *A. baumannii* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين □ خلال النتائج الموجبة □ في الملحق 5 □ بكتريا *A. baumannii* اعطت نتائج □ □ و □ في اختبارات GLU و MEL و ARA بينما أعطت نتائج سالبة في اختبارات ONPG و ADH و LDC و ODC و CIT و H₂S و URE و TDA و IND و VP و MAN و INO و

SOR و RHA و SAC و AMY ونتيجة تغايرة في اختبار GEL . نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد □ البكتريا المعزولة هي *A. baumannii* .

6-1-2-3 تشخيص بكتريا *E. cloacae*

• الصفات الزرعية والمجهرية

(Cultural and Microscopical characteristics):

بعد زرع □ سحات قرحة القدم السكري على وسط أكار الدم وحضنها بدر□ة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلة واحدة بهيئة □ ستعمرات كبيرة ناعمة □ سطحة , حافاتنا ك□ا □ لة بينما على وسط الماكونكي كانت المستعمرات وردية اللو □ (خمرة للاكتوز) , □ خاطية □ا □ جهرياً فكانت بهيئة خلايا عصوية الشكل سالبة لصبغة غرام . □ هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى □ العزلة البكتيرية هي *E. cloacae* (Tille , 2014) (الجدول 10) .

الجدول 10 : الاختبارات الشكلية والكميوقوية لبكتريا *E. cloacae*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة غرام	-
2	المظهر الخلوي	عصوية الشكل
3	ظروف النمو	لاهوائية اختيارية
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الاوكسيديز	-
6	تخمير اللاكتوز	+
7	فحص KOH	+

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

• الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموافقة في الجدول 10 □
بكتريا *E. Cloacae* كانت لاهوائية اختيارية □ و□بة لفحص الكاتاليز وسالبة لفحص
الأوكسيدز كما أعطت النتيجة + في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

• تشخيص بكتريا *E. cloacae* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *E. cloacae* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين □ن خلال
النتائج الموافقة في الملحق 6 □ بكتريا *E. cloacae* اعطت نتائج □ و□بة في اختبارات
ONPG و ADH و ODC و CIT و TDA و VP و GLU و MAN و SOR و RHA و
SAC و MEL و ARA و AMY بينما أعطت نتائج سالبة في اختبارات LDC و H₂S و
URE و IND و GEL و INO □ نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد □ البكتريا المعزولة
هي *E. cloacae* .

7-1-2-3 تشخيص بكتريا *K. pneumonia*

• الصفات الزرعية والمجهرية

: (Cultural and Microscopical characteristics)

بعد زرع □سحات قرحة القدم السكري على وسط أكار الدم وحضنها بدر□ة حرارة 37 م°
لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلة واحدة بهيئة □ستعمرات ر□ادية اللو □□خاطية
(mucoid) بينما ظهرت المستعمرات على وسط الماكونكي كبيرة وردية فاتحة □خاطية , □ا
□جهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير
الى ان العزلة البكتيرية هي *K. pneumonia* (Markey et al., 2013)
(الجدول 11) .

• الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموحدة في الجدول 11 □ بكتريا *K. pneumonia* كانت لاهوائية اختيارية سالبة في فحصي الكاتليز والأوكسيدز وقد اعطت النتيجة + في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

الجدول 11 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *K. pneumonia*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة غرام	-
2	المظهر الخلوي	خلايا عصوية الشكل
3	ظروف النمو	لاهوائية اختيارية
4	اختبار الكاتليز	-
5	اختبار الاوكسيدز	-
6	تخمير اللاكتوز	+
7	فحص KOH	+

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

• تشخيص بكتريا *K. pneumonia* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *K. pneumonia* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين □ خلال النتائج الموحدة في الملحق 7 □ بكتريا *K. pneumonia* اعطت نتائج □ و □ في اختبارات ONPG و URE و GLU و MAN و INO و SOR و RHA و SAC و MEL و AMY و ARA بينما أعطت نتائج سالبة في اختبارات ADH و LDC و ODC و H₂S و TDA و IND و نتائج □ تغايرة في اختبارات CIT و VP و GEL . □ نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد □ البكتريا المعزولة هي *K. pneumonia* .

3-2-1-8 تشخيص بكتريا *B. cepacia*

• الصفات الزرعية والمجهرية

: (Cultural and Microscopical characteristics)

بعد زرع سحات قرحة القدم السكري على وسط أكار الدم وحضنها بدرقعة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلة واحدة ذات ستممرات ناعمة ورتفعة قليلا ذات رائحة تشبه الترا. على وسط الماكونكي فقد كانت المستعمرات وردية غافة الى حمراء , جهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *B. cepacia* (Tille , 2014) (الجدول 12).

الجدول 12 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *B. cepacia*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة غرام	-
2	المظهر الخلوي	خلايا عصوية الشكل
3	ظروف النمو	هوائية
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الأوكسيديز	+
6	تخمير اللاكتوز	-
7	فحص KOH	+

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

• الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموجبة في الجدول 12 بكتريا *B. cepacia* كانت هوائية ووجبة لفحص الكاتليز وفحص الأوكسيديز كما أعطت النتيجة + في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

• **تشخيص بكتريا *B. cepacia* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :**

تم تشخيص بكتريا *B. cepacia* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين أن خلال النتائج الموجبة في الملحق 8 □ هذه البكتريا اعطت نتائج موجبة في اختبارات ONPG و ADH و LDC و ODC و H₂S و URE و IND و GEL . بينما اعطت نتائج سالبة في اختبارات CIT و TDA و VP و GLU و MAN و INO و SOR و RHA و SAC و MEL و AMY و ARA و □ نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد □ البكتريا المعزولة هي *B. cepacia* .

9- 1-2-3 تشخيص بكتريا *P. rettgeri*

• **الصفات الزرعية والمجهرية**

:(Cultural and Microscopical characteristics)

بعد زرع □ سحات قرحة القدم السكري على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلة واحدة ذات □ مستعمرات □ لساء دائرية كبيرة لماعة ذات لوناً أصفر فاتح □ على وسط الماكونكي فقد كانت المستعمرات شاحبة , فيما كانت □ جهرياً بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *P. rettgeri* . (Tille , 2014) (الجدول 13) .

• **الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)**

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموجبة في الجدول 13 □ بكتريا *P. rettgeri* كانت لا هوائية اختيارية □ و □ لفة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسيديز و قد أعطت النتيجة + في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

الجدول 13 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *P. rettgeri*

الاستجابة	الاختبار	ت
-	صبغة غرام	1
خلايا عصوية الشكل	المظهر الخلوي	2
لا هوائية اختيارية	ظروف النمو	3
+	اختبار الكاتليز	4
-	اختبار الأوكسيديز	5
-	تخمير اللاكتوز	6
+	فحص KOH	7

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

• تشخيص بكتريا *P. rettgeri* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E:

تم تشخيص بكتريا *P. rettgeri* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين أن خلال النتائج الموجبة في الملحق 9 هذه البكتريا اعطت نتائج موجبة في اختبارات URE و TDA و GLU و IND بينما اعطت نتائج سالبة في اختبارات ONPG و ADH و LDC و ODC و INO و CIT و H₂S و VP و GEL و SOR و MAN و RHA و SAC و MEL و AMY و ARA . نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد أن البكتريا المعزولة هي *P. rettgeri*.

10-1-2-3 تشخيص بكتريا *A. salmonicida*

• الصفات الزرعية والمجهريّة

: (Cultural and Microscopical characteristics)

بعد زرع سحات قرحة القدم السكري على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلة واحدة ذات مستعمرات دائرية كبيرة رتفعة غير شفافة (Opaque) ، على وسط الماكونكي فقد كانت المستعمرات شاحبة ، فيما كانت جهرياً بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهريّة تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *A. salmonicida* (Tille , 2014) (الجدول 14) .

• الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموحدة في الجدول 14 بكتريا *A. salmonicida* كانت لاهوائية اختيارية و قابلة لفحصي الكاتليز و الأوكسيديز و قد أعطت النتيجة + في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

الجدول 14 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *A. salmonicida*

الاستجابة	الاختبار	ت
-	صبغة غرام	1
خلايا عصوية الشكل	المظهر الخلوي	2
لاهوائية اختيارية	ظروف النمو	3
+	اختبار الكاتليز	4
+	اختبار الأوكسيديز	5
-	تخمير اللاكتوز	6
+	فحص KOH	7

(+): نتيجة موجبة ، (-): نتيجة سالبة

• **تشخيص بكتريا *A. salmonicida* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :**

تم تشخيص بكتريا *A. salmonicida* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين أن خلال النتائج الموجبة في الملحق 10 هذه البكتريا اعطت نتائج موجبة في اختبارات ADH و LDC و GEL و GLU و MAN و ARA بينما اعطت نتائج سالبة في اختبارات ONPG و IND و ODC و CIT و H₂S و URE و TDA و VP و INO و SOR و RHA و SAC و MEL و AMY . نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد أن البكتريا المعزولة هي *A. salmonicida* .

11-1-2-3 تشخيص بكتريا *O. anthropi*

• **الصفات الزرعية والمجهريّة**

: (Cultural and Microscopical characteristics)

بعد زرع سحات قرحة القدم السكري على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلة واحدة بهيئة مستعمرات صغيرة لساء رادية اللو بينما ظهرت المستعمرات على وسط الماكونكي شاحبة اللو , اجهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهريّة تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *O. anthropi* (Markey et al., 2013) (الجدول 15) .

• **الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :**

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموجبة في الجدول 15 بكتريا *O. anthropi* كانت هوائية وموجبة لفحوص الكاتليز والأوكسيديز و قد اعطت النتيجة + في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

الجدول 15 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *O. anthropi*

الاستجابة	الاختبار	ت
-	صبغة غرام	1
خلايا عصوية الشكل	المظهر الخلوي	2
هوائية	ظروف النمو	3
+	اختبار الكاتليز	4
+	اختبار الاوكسيديز	5
-	تخمير اللاكتوز	6
+	فحص KOH	7

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

• **تشخيص بكتريا *O. anthropi* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :**

تم تشخيص بكتريا *O. anthropi* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين أن خلال النتائج الموجبة في الملحق 11 □ بكتريا *O. anthropi* اعطت نتائج □ و□ في اختبارات URE وGLU بينما أعطت نتائج سالبة في اختبارات ONPG و ADH و LDC و ODC و CIT و H₂S و TDA و IND و VP و GEL و INO و SOR و RHA و SAC و MEL و AMY و ARA ونتائج □تغايرة في اختبار MAN . □ نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد □ البكتريا المعزولة هي *O. anthropi* .

2-2-3 تشخيص البكتريا الموجبة لصبغة غرام

1- 2-2-3 تشخيص بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus*

• **الصفات الزرعية والمجهرية**

:(Cultural and Microscopical characteristics)

اسفرت نتائج الزرع الميكروبي على وسط اكار الدم بعد 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م° عن الحصول على مستعمرات دائرية ومحدبة وبراقة وذات لون أصفر-ذهبي ، ولم تتمكن هذه المستعمرات من النمو على اغلب تركيبات وسط الماكونكي . كما جهرياً فكانت بهيئة مكورات موجبة لصبغة غرام ومتجمعة بهيئة عناقيد (clusters) ما يدل على هذه البكتريا تعود لجنس المكورات العنقودية (*Staphylococcus*) وهذا يتفق مع ما وصفه (Quinn *et al.*, 2004) لذا فقد اسفرت عملية التشخيص عن الحصول على تسع عزلات من بكتريا المكورات العنقودية .

2-1-2-2-3 تشخيص بكتريا *S. aureus* :

لغرض تشخيص بكتريا *S. aureus* فقد تم تنميتها على وسط MSA فضلاً عن الفحوصات الكيموحيوية .

A- النمو على وسط (MSA) Mannitol salt agar :

تازت مستعمرات بكتريا *S. aureus* النائية على الوسط MSA بكونها مستعمرات غير شفافة (Opaque) وبراقة (Shiny) وذات لون أصفر . يستخدم وسط MSA لتمييز بكتريا *S. aureus* عن بقية المكورات الموجبة لصبغة غرام المنتجة للكاتاليز . يحتوي هذا الوسط على 7.5% من كلوريد الصوديوم الذي يثبط نمو الكثير من الأحياء المجهرية ، كما بكتريا *S. aureus* فتنمو عليه وتعمل على تخمير سكر المانيتول الموجود فيه . تؤدي الى انتاج حمض الذي يتسبب في تحول كاشف الفينول الأحمر من اللون الوردي الى الأصفر . (De La Maza *et al.*, 1997) .

B- الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

عند إجراء الفحوصات الكيموحيوية على العزلات التسعة من بكتريا المكورات العنقودية وادأكلها كانت نتيجة للكاتاليز من خلال قدرتها على تحطيم بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وتحويله الى ماء وغاز الأوكسجين اذ اتسمت النتيجة الموجبة بظهور فقاعات غازية .

وعندما خضعت العزلات التسعة لأختبار إنتاج انزيم جلط البلازما (Coagulase) فقد اعطت كل منها نتيجة موجبة، مما يدل على أن هذه العزلات تعود لبكتريا *S. aureus* وهذا يتفق مع ما وصفه (Quinn et al., 2004). ويوضح الجدول 16 الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *S. aureus*.

الجدول 16 : الاختبارات الشكلية و الكيموحيوية لبكتريا *S. aureus*

الاستجابة	الاختبار	ت
+	صبغة غرام	1
خلايا كروية بشكل عناقيد	المظهر الخلوي	2
لا هوائية اختيارية	ظروف النمو	3
+	اختبار الكاتليز	4
-	اختبار الاوكسيديز	5
+	تخمير المانيتول	6
+	اختبار تجلط الدم	7
+	الوسط الانتقائي Manitol-Salt Agar	8
-	فحص KOH	9

(+) : نتيجة موجبة , (-) : نتيجة سالبة

2-2-3-2- Enterococcus faecalis تشخيص

• الصفات الزرعية والمجهرية

:(Cultural and Microscopical characteristics)

بعد زرع سحات قرحة القدم السكري على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلتين ذات مستعمرات لساء صغيرة ذات لون أصفر شاحب او ابيض , فيما كانت جهرياً بهيئة خلايا كروية بشكل ازواج موجبة لصبغة غرام . ان

هذه الصفات الزرعية والمجهريّة تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *E. faecalis* (, Tille (2014) (الجدول 17) .

• الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموحدة في الجدول 17 □ بكتريا *E. faecalis* كانت لاهوائية اختيارية سالبة لفحص الكاتليز □ و□بة لفحص الأوكسيدز وقد اعطت النتيجة - في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

• التشخيص باستخدام العدة *Api 20 Strep* :

تم تشخيص بكتريا *E. faecalis* باستخدام عدة التشخيص *Api 20 Strep* وقد تبين □ن خلال النتائج الموحدة في الملحق 12 □ هذه البكتريا اعطت نتائج □ و□بة في اختبارات VP و HIP و ESC و PYRA و LAP و ADH و RIB و MAN و SOR و LAC و TRE و AMD بينما اعطت نتائج سالبة في اختبارات αGAL و βGUR و βGAL و ARA و RAF و INU و GLYG ونتائج □تغايرة في اختبار PAL . □ نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد □ البكتريا المعزولة هي *E. faecalis* .

الجدول 17 : الاختبارات الشكلية و الكيموحيوية لبكتريا *E. faecalis*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة غرام	+
2	المظهر الخلوي	خلايا كروية بشكل ازواج
3	ظروف النمو	لا هوائية اختيارية
4	اختبار الكاتليز	-
5	اختبار الأوكسيدز	+
6	فحص KOH	-

(+) نتيجة موجبة , (-) نتيجة سالبة

3-3 اختبار حساسية العزلات المسببة لتلوث قرحة القدم السكري للمضادات الحيوية

1-3-3 اختبار حساسية عزلات البكتريا السالبة لصبغة غرام للمضادات الحيوية :

تم اختبار حساسية عزلات بكتريا *P. mirabilis* تجاه عدد من المضادات الحيوية اشتملت على Tobramycin و Amoxicillin-Clavulanic acid و Tetracycline و Imipenem و Gentamicin و Ceftriaxone و Trimethoprim-Sulfamethoxazole و Aztreonam و Ampicillin و Chloramphenicol و Ceftazidime و Doxycycline و Amikacin و Netilmicin .

واظهرت النتائج الموحدة في الجدول 18 ميع عزلات بكتريا *P. mirabilis* كانت مقاومة بنسبة 100% لمضادات Tetracycline (TE) و Amoxicillin- (AMC) و Clavulanic acid و Ceftriaxone (CRO) و Ampicillin (AM) وبنسبة 90% لكل من Trimethoprim-Sulfamethoxazole (TS) و Doxycycline (DO) وبنسبة 50 % للمضاد Aztreonam (AT) و بنسبة 40 % لكل من المضادين (C) Chloramphenicol و Tobramycin (TOB) بينما كانت العزلات أكثر حساسية للمضادين Gentamicin و Amikacin بنسبة أقل بلغت 10 % .

تُصنف المضادات AMC و CRO و AM و IMP و CAZ و AT من مجموعة β -lactams ، ويمكن التحقق من مقاومة البكتريا لهذه المضادات بثلاث آليات الأولى تتمثل بافراز انزيمات Lactamases - β التي تعمل على تحلل حلقة البيتا لاكتام الموحدة في المضاد والثانية تقليل نفاذية البكتريا للمضادات وبالتالي تمنعها من الدخول الى داخل الخلية والثالثة فتعتمد على تغيير الهدف المحدد للمضاد الموحدة في الخلية ما يتعذر على المضاد الارتباط بالهدف المرسوم له ، وبالتالي عدم قتل البكتريا (Kumar and Varela , 2013) .

تتفق نتائج دراستنا الحالية في جزء منها مع ما حصل عليه Brenyah et al., (2014) إذ أن بكتريا *P.mirabilis* المعزولة من قرحة القدم السكري في غانا كانت مقاومة

لمضادات Ampicillin و Tetracyclin بنسب بلغت (100) % . كما تتفق نتائج دراستنا أيضاً مع ما حصل عليه (Perim et al., 2015) إذ أنّ بكتريا *Proteus spp.* المعزولة من قرحة القدم السكري في احد المستشفيات في البرازيل كانت مقاومة للمضادات - Amoxicillin - Clavulanic acid و Ampicillin و Aztreonam بنسبة (60 و 90 و 60) % ، على التوالي .

الجدول 18: اختبار حساسية عزلات بكتريا *P. mirabilis* تجاه مضادات الحيوية

<i>P. mirabilis</i>										اسم العزلة	
13b	13a	16a	15c	15b	16b	51a	53a	17b	17a	رقم العزلة	ت
										المضاد الحيوي	
S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	TOB	1
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	AMC	2
I	I	I	I	S	S	S	S	I	I	IPM	3
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	TE	4
R	R	R	S	S	S	I	R	S	S	C	5
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	CRO	6
R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	TS	7
R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	DO	8
I	I	R	R	S	R	I	I	R	R	AT	9
S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	GEN	10
S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	CAZ	11
S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	NET	12
S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	AK	13
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	AM	14

Intermediate (I) , Resist (R) , Sensitive (S)

تم اختبار حساسية عزلات بكتريا *E. coli* تجاه المضادات نفسها المستخدمة في اختبار حساسية بكتريا *P. mirabilis* وظهرت النتائج الموحدة في الجدول 19 ميع عزلات بكتريا *E. coli* كانت حساسة بنسبة 100 % للمضادين Amikacin و Imipnem وبنسبة 50 % لمضاد Doxycycline في حين كانت هذه العزلات مقاومة بنسبة 100 % للمضادات Tobramycin و Amoxicillin-Clavulanic acid و Ceftriaxone و Trimethoprim-Sulfamethoxazole و Aztreonam و Ceftazidime و Ampicillin. وقد جاءت هذه النتائج وافقة لما توصل اليه (Dwedat et al., 2015) إذ كانت عزلات بكتريا *E. coli* المعزولة من قرحة القدم السكري من أحد المستشفيات في صر حساسة بنسبة 100 % للمضاد Imipenim و مقاومة للمضاد Ampicillin بالنسبة ذاتها .

تتفق نتائج دراستنا الحالية ايضا في جزء منها مع ما حصل عليه (Hefni et al., 2013) الذي اشار الى أن بكتريا *E. coli* المعزولة من إحدى المستشفيات في صر كانت حساسة للمضادات Imipnem و Amikacin و Gentamicin و Netlimicin و Chloramphenicol بنسبة 100 % .

تم اختبار حساسية عزلات بكتريا *Pseudomonas* تجاه عدد من المضادات الحيوية وظهرت النتائج الموحدة في الجدول 19 بكتريا *P. fluorescens* (15a) كانت مقاومة بنسبة 100 % لكل المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة , في حين كانت العزلة 15c1 حساسة فقط للمضاد Ceftazidime , فيما كانت العزلة 6b حساسة للمضادات Imipnem و Amikacin و Gentamicin في حين اظهرت مقاومة توسطة للمضادات Ceftazidime و Netlimicin و Chloramphenicol , بينما كانت مقاومة لبقية المضادات المستخدمة في هذه الدراسة .

بكتريا *P. aueruginosa* فقد كانت حساسة للمضادات Tobramycin و Imipnem و Gentamicin و Ceftazidime و Netlimicin و Amikacin , بينما كانت مقاومة لبقية المضادات المستخدمة في هذه الدراسة .

الجدول 19 : اختبار حساسية عزلات بكتريا *Pseudomonas spp.* و *E. coli* تجاه المضادات الحيوية

<i>P. fluorescens</i>			<i>P. aueruginosa</i>	<i>E. coli</i>				اسم العزلة	
6b	15a	15c1	73	14b	14a	102	101	رقم العزلة / المضاد الحيوي	ت
R	R	R	S	R	R	R	R	TOB	1
R	R	R	R	R	R	R	R	AMC	2
S	R	R	S	S	S	S	S	IPM	3
R	R	R	R	S	S	R	S	TE	4
I	R	R	R	S	S	R	S	C	5
R	R	R	R	R	R	R	R	CTR	6
R	R	R	R	R	R	R	R	TS	7
R	R	R	R	S	S	R	R	DO	8
R	R	R	R	R	R	R	R	AT	9
S	R	R	S	S	S	S	I	GEN	10
I	R	S	S	R	R	R	R	CAZ	11
I	R	R	S	S	S	R	I	NET	12
S	R	R	S	S	S	S	S	AK	13
R	R	R	R	R	R	R	R	AM	14

Intermediate (I) , Resist (R) , Sensitive (S)

تتفق نتائج دراستنا الحالية في جزءها مع ما حصل عليه Turhan et al., (2013) الذي اشار الى أن بكتريا *Pseudomonas spp.* المعزولة من إحدى المستشفيات في تركيا كانت حساسة للمضادات Imipnem و Amikacin و Ceftazidime بنسبة (50 و 68 و 63) % على التوالي .

تقاوم البكتريا المضادين Tetracycline و Doxycyclin بآليتين هما الاخراج الفعال (Active efflux) للمضاد من البكتريا ما يؤدي الى تخفيف تركيز المضاد داخل الخلية فضلاً عن الآلية الأقل شيوعاً المتمثلة بإيقاف فعالية المضاد عن طريق عمليات الاكسدة و الاختزال (Redox process) (Kumar and Varela , 2013) .

من ملاحظة الجدول 20 يتضح ان عزلتي بكتريا *R. terrigena* كانتا حساستا بنسبة 100 % للمضادين Imipenim و Amikacin وبنسبة 50 % للمضاد Doxycycline , في حين اظهرت العزلتان مقاومةً لتوسطه للمضاد Tetracycline وكانتا مقاومةً بنسبة 100 % لبقية المضادات المستخدمة في هذه الدراسة .

يتضح ان الجدول ذاته ان بكتريا *E. cloacae* كانت حساسة للمضادات Tetracyclin و Chlromphinecol و Netlimicin , بينما اظهرت مقاومةً لتوسطه للمضادين Imipnem و Amikacin , في حين كانت مقاومةً لبقية المضادات المستخدمة في هذه الدراسة . تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما حصل عليه Hefni et al., (2013) الذي اشار الى ان بكتريا *E. cloacae* المعزولة من إحدى المستشفيات في مصر كانت حساسة للمضادات Tetracyclin و Netlimicin و Chloramphenicol بنسبة (60 و 91 و 85) % على التوالي .

بالرغم من ان الجدول 20 ذاته يتضح ان بكتريا *A. baumannii* كانت حساسة للمضادات Tetracyclin و Chlromphinecol و Doxycycline ومقاومةً لبقية المضادات المستخدمة في هذه الدراسة , بينما كانت بكتريا *K. pneumonia* حساسة للمضادات Trimethoprim – Sulfamethoxazole و Chlromphinecol و Doxycycline في حين كانت هذه العزلة مقاومةً لبقية المضادات المستخدمة في هذه الدراسة .

تنتمي مضادات Tobramycin و Gentamicin و Netilmicin و Amikacin الى مجموعة Aminoglycosides وتقاوم البكتريا هذه المضادات من خلال عدة آليات تتضمن : الأولى : تثبيط المضاد من خلال أنزيم يعمل على تغيير تركيب المضاد عن طريق نقل مجموعة

فعالة (Functional group) للمضاد مثل جليسير acyl و ribosyl و phosphoryl او Thiol عن طريق تغيير تركيب المضاد بفعل انزيم Nucleotide transferase والثانية : تتمثل بتحويل الهدف للمضاد الحيوي بواسطة عملية Methylation على الحماض النووي 16S rRNA , والثالثة : تقليل نفاذية دار البكتريا للمضادات الحيوية وبالتالي تمنعها من الدخول الى داخل الخلية البكتيرية (Kumar and Varela , 2013) .

الجدول 20 : اختبار حساسية عزلات بكتريا *K. pneumonia* و *E. cloacae* و *R. terrigena* و

A. baumannii تجاه مضادات الحيوية

<i>K.pneumoniae</i>	<i>A.bummani</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>R. terrigena</i>		اسم العزلة	
17a3	4	6a	22b	22a	رقم العزلة / المضاد الحيوي	ت
R	R	R	R	R	TOB	1
R	R	R	R	R	AMC	2
R	R	I	S	S	IPM	3
R	S	S	I	I	TE	4
S	S	S	R	I	C	5
R	R	R	R	R	CTR	6
S	R	R	R	R	TS	7
S	S	R	I	S	DO	8
R	R	R	R	R	AT	9
R	R	R	R	R	GEN	10
R	R	R	R	R	CAZ	11
R	R	S	R	R	NET	12
R	R	I	S	S	AK	13
R	R	R	R	R	AM	14

Intermediate (I) , Resist (R) , Sensitive (S)

تم اختبار حساسية بكتريا *A. salmonicida* تجاه عدد من المضادات الحيوية وظهرت النتائج الموحدة في الجدول 21 □ عزلة البكتريا كانت حساسة للمضادات Tobramycin و Imipenim و Gentamicin و Netilmicin و Amikacin , بينما اظهرت مقاومة بواسطة المضاد Chloramphenicol في حين كانت مقاومة لبقية المضادات المستخدمة في هذه الدراسة .

□ ما بكتريا *P. retergi* فقد كانت حساسة للمضادات Gentamicin و Ceftazidime و Amikacin , بينما اظهرت مقاومة بواسطة المضاد Aztreonam في حين كانت مقاومة لبقية المضادات المستخدمة في هذه الدراسة (الجدول 21) . وقد اءت هذه النتائج وافقة لما توصل اليه (Manisha et al., 2012) إذ كانت عزلات بكتريا *P. retergi* المعزولة من قرحة القدم السكري □ من أحد المستشفيات في كجرات حساسة بنسبة 100 % للمضادات Impinem و Gentamicin و Amikacin و مقاومة 100 % للمضاد Ceftriaxone و Chloramphenicol .

وبالر □ وع الى الجدول 21 ايضا يتضح □ بكتريا *O. anthropi* كانت حساسة للمضادين Gentamicin و Amikacin , بينما اظهرت مقاومة بواسطة المضاد Chloramphenicol في حين كانت مقاومة لبقية المضادات المستخدمة في هذه الدراسة.

تقاوم البكتريا Chloramphenicol عبر آليتين : الأولى : تثبيط المضاد □ ن خلال أنزيم يعمل على تغيير تركيب المضاد عن طريق نقل □ مجموعة فعالة (Functional group) للمضاد □ نل □ ج □ يع acyl و ribosyl و phosphoryl او Thiol عن طريق تغيير تركيب المضاد بفعل انزيم Acetyl transferase والثانية : تقليل نفاذية □ دار البكتريا للمضادات الحيوية وبالتالي تمنعها □ ن الدخول الى داخل الخلية البكتيرية (Kumar and Varela, 2013) .

الجدول 21: اختبار حساسية عزلات بكتريا *O. anthropi* و *P. rettergi* و *A. salmonicida*

تجاه المضادات الحيوية

<i>O. anthropic</i>	<i>P. rettergi</i>	<i>A. salmonicida</i>	اسم العزلة	
52	15c2	17ab2	رقم العزلة	ت
R	R	S	المضاد الحيوي	1
R	R	R	TOB	2
R	R	S	AMC	4
R	R	R	IPM	5
R	R	R	TE	6
I	R	I	C	7
R	R	R	CTR	8
R	R	R	TS	9
R	R	R	DO	10
R	I	R	AT	11
S	S	S	GEN	12
R	S	R	CAZ	13
R	R	S	NET	14
S	S	S	AK	15
R	R	R	AM	

Intermediate (I) , Resist (R) , Sensitive (S)

2-3-3 اختبار حساسية عزلات البكتريا المقاومة لصبغة غرام للمضادات الحيوية :

تم اختبار حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* و *E. faecalis* تجاه العديد من المضادات الحيوية اشتملت على Erythromycin و Clindamycin و Azithromycin و Netilmicin و Doxycycline و Tobramycin و Ofloxacin و Gentamicin و Chloramphenicol و Pencillin و Trimethoprim - Sulfamethoxazole و Amikacin .

واظهرت النتائج المقاومة في الجدول 22 □ □ ميع عزلات بكتريا *S. aureus* كانت مقاومة لل penicillin في هذه الدراسة و حساسة للمضاد Chloramphenicol ، وتميزت العزلات 2 و 3 بكونهما حساستين لجميع المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة باستثناء الـ penicillin .

تتفق نتائج دراستنا الحالية تقريباً مع ما توصل اليه Hefni et al., (2013) اذ كانت عزلات بكتريا *S. aureus* المعزولة من قرحة القدم لمرضى السكر في احدى مستشفيات مصر حساسة بنسبة 90 % لمضاد Chloamphenicol .

يتضح من الجدول ايضا □ بكتريا *S. aureus* قيد الدراسة كانت مقاومة للمضاد Ofloxacin بنسبة 66 % . يعود □ضاد Ofloxacin لمجموعة Fluoroquinolones وتتمكن البكتريا من مقاومة □ه □ن خلال تقليل نفاذية □دار البكتريا لمضادات الحيوية وبالتالي تمنعها □ن الدخول الى داخل الخلية البكتيرية (Kumar and Varela , 2013) .

ينتمي المضاد □ Erythromycin و Azithromycin لمجموعة Macrolide ويمكن تفسير □قاوية البكتريا لهما باليتين : الاولى : عن طريق افراز انزيم Estrase الذي يعمل على تحلل حلقة اللاكتون □ (Lactone ring) او يعمل الانزيم على تغيير تركيب المضاد عن طريق نقل □جموعة فعالة (Functional group) للمضاد □ن □ج □يع acyl و ribosyl و phosphoryl عن طريق تغيير تركيب المضاد بفعل انزيم Glycocyl transferase

والثانية: تتمثل بتحويل الهدف للمضاد الحيوي بواسطة عملية Methylation على الحائض النووي 23S rRNA (Kumar and Varela , 2013) .

الجدول 22 : اختبار حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* تجاه المضادات الحيوية

<i>S. aureus</i>									اسم العزلة	
21b	21a	20c	20b	20a	14c	12	3	2	رقم العزلة / المضاد الحيوي	ت
R	R	R	R	R	R	S	S	S	TOB	1
R	R	R	R	R	R	R	S	S	AZM	2
R	R	R	R	R	R	S	S	S	OFX	3
I	R	R	R	R	R	S	S	S	TS	4
S	S	S	S	S	S	S	S	S	C	5
R	R	R	R	R	R	S	S	S	CD	6
R	R	R	R	R	R	R	S	S	E	7
I	I	I	I	I	R	S	S	S	DO	8
R	R	R	R	R	R	R	R	R	P	9
R	R	R	R	R	R	S	S	S	GEN	10
R	R	R	R	R	R	S	S	S	NET	11
R	R	R	R	R	R	S	S	S	AK	12

Intermediate (I) , Resist (R) , Sensitive (S)

واظهرت النتائج الموحدة في الجدول 23 □ بكتريا *E. faecalis* كانت حساسة للمضادات Chloramphenicol و Clindamycin و Pencillin و Amikacin و Netilmicin , في حين كانت البكتريا مقاومة لبقية المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة .

الجدول 23 : اختبار حساسية عزلات بكتريا *E. faecalis* تجاه المضادات الحيوية

<i>E. faecalis</i>		اسم العزلة	
102	101	رقم العزلة المضاد الحيوي	ت
R	R	TOB	1
R	R	AZM	2
R	R	OFX	3
R	R	TS	4
S	S	C	5
S	S	CD	6
R	R	E	7
R	R	DO	8
S	S	P	9
R	R	GEN	10
S	S	NET	11
S	S	AK	12

Resist (R), Sensitive (S)

3-4 تشخيص المضاد النانوي الهجين ليفوفلوكساسين بالطرائق الطيفية

3-4-1 طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR :

3-4-1-1 طيف الأشعة تحت الحمراء لطبقات المغنيسيوم/الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد :

يتضح أن الشكل 5 □ طبقات المغنيسيوم / الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد أظهرت العديد □ □ الحزم المميزة عند ترددات □ عينة ، فالحزبة عند 3527 سم⁻¹ تعود الى اهتزاز المط □ □ الرابطة (O-H) ، وهي حزبة □ ستعر □ ل □ ود □ داخل □ □ أنواع □ ختلفة □ □

الهيدروكسيل \square ثل هيدروكسيل الطبقة الثنائية و هيدروكسيل الماء المتمز فيزيائيا (Cheng *et al.*, 2010 ; Parida *et al.*, 2010) \square الحزم \square المميزة عند 1383 سم^{-1} فتعزى الى مجموعة النترات (NO_3) الموضوعة بين الطبقات (Arizaga *et al.*,) \square بينما تعود الحزم الواقعة بين 400 - 600 سم^{-1} الى اهتزاز رابطة Mg-O و Al-O (Feng *et al.*, 2006).

3-1-4-3 طيف الاشعة تحت الحمراء للمضاد ليفوفلوكساسين الحر (LEV) :

\square من ملاحظة الشكل 6 يتضح ظهور العديد من الحزم المميزة لليفوفلوكساسين الحر، فالحزم \square عند الترددات (3275 و 3412) سم^{-1} تشير الى اهتزاز \square لمجموعة الهيدروكسيل (O-H)، كما يشير ظهور الحزم عند الترددات (2884 و 2885 و 2933) سم^{-1} الى وجود \square (C-H) اليفاتي. \square ظهور الحزم عند التردد 1724 سم^{-1} فيعود الى \square مجموعة الكربونيل (C=O) الحامضية القوية فيما يشير ظهور الحزم عند التردد 1620 سم^{-1} الى \square كيتو. كما يتضح وجود \square هيكلي للبنزين عند الترددات (1456 و 1446) سم^{-1} . واخيرا يلاحظ وجود حني (C-H) اروماتي عند التردد 802 سم^{-1} (Silverstein *et al.*, 2005).

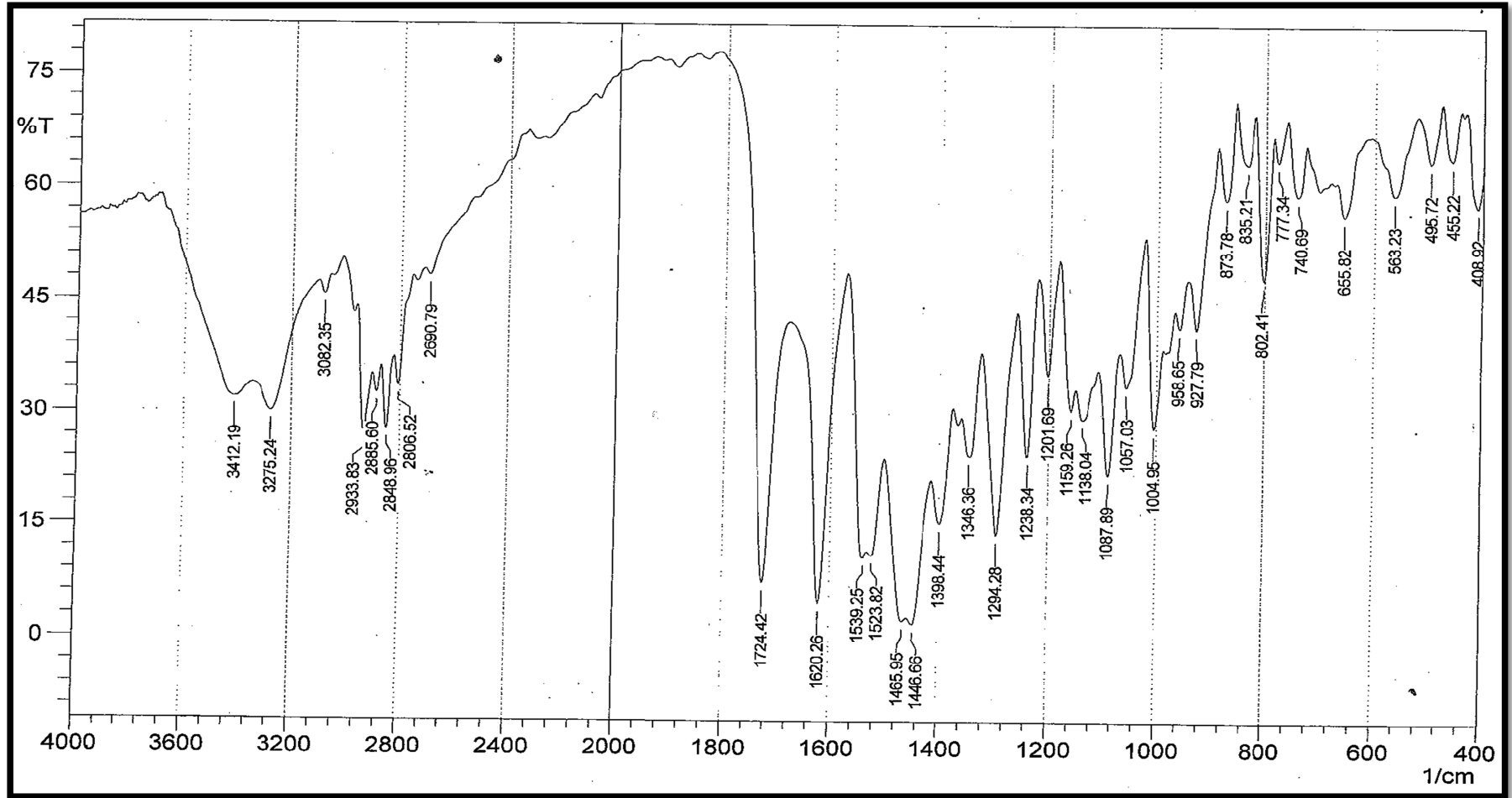
3-1-4-3 طيف الاشعة تحت الحمراء لليفوفلوكساسين النانوي الهجين - LEV - Mg|Al :

: LDH

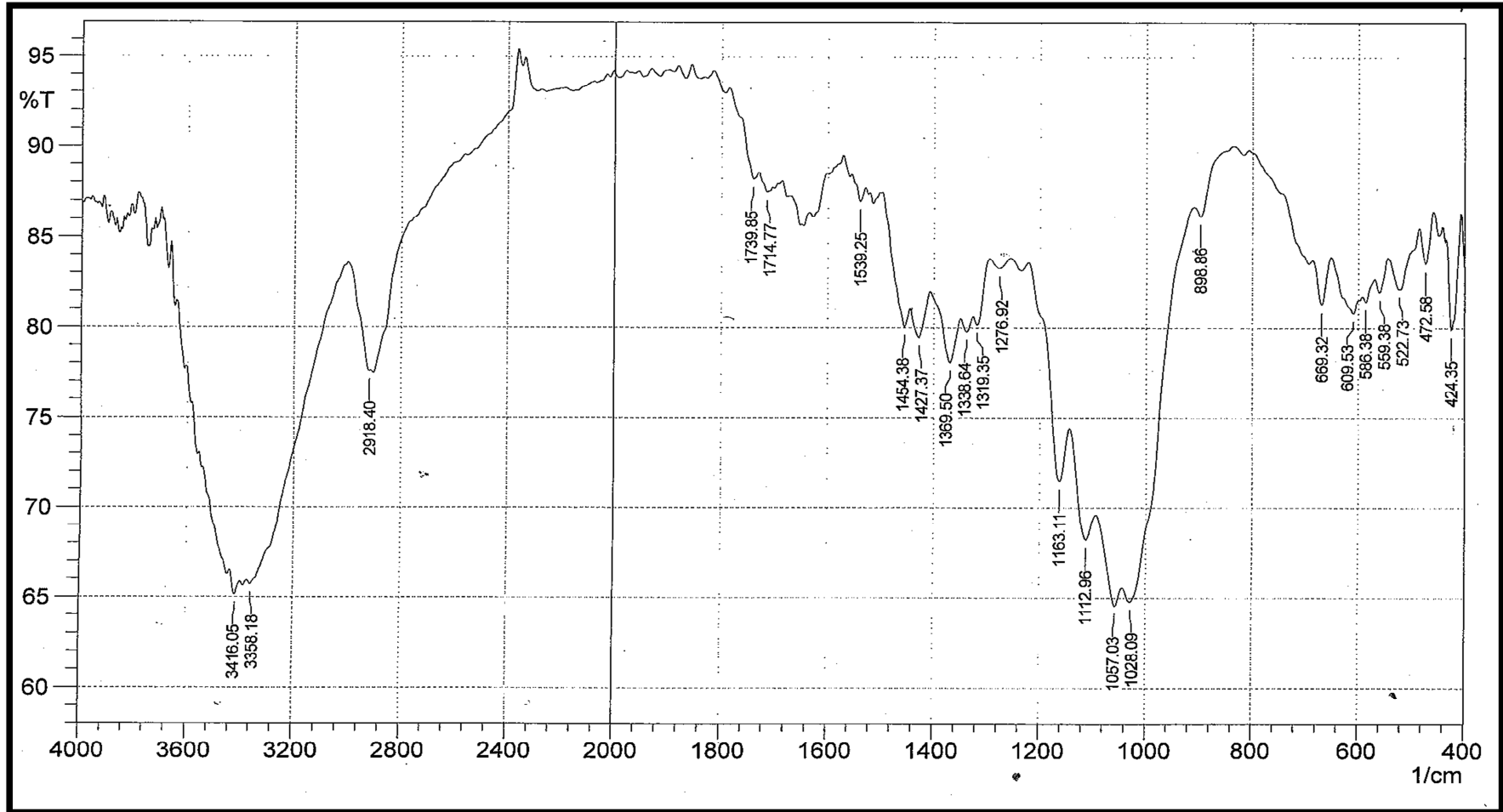
يتضح من الشكل 7 \square المضاد النانوي الهجين يظهر العديد من الحزم المميزة الجديدة التي تدل على نجاح اقحام المضاد ليفوفلوكساسين بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد. \square ظهور الحزم عند الترددات (3358 و 3416) سم^{-1} يشير الى \square مجموعة الهيدروكسيل (O-H) وقد حصل فيه انزياح نحو تردد أعلى. كما يشير ظهور الحزم عند التردد 2918 سم^{-1} الى وجود \square C-H الأليفاتي. \square ظهور الحزم عند التردد 1739 سم^{-1} فيعود الى \square مجموعة الكربونيل (C=O) وقد حصل فيه انزياح نحو التردد الاوطأ، بينما يلاحظ حصول انزياح \square لحزم الكيتو نحو تردد اوطأ \square خلال ظهور حزم عند التردد 1539 سم^{-1} . \square المط



الشكل 5 : طيف الأشعة تحت الحمراء لطبقات المغنيسيوم\الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد



الشكل 6 : طيف الأشعة تحت الحمراء للمباد ليفوفلوكساسين الحر LEV free



الشكل 7 : طيف الأشعة تحت الحمراء للمباد ليفوفلوكساسين النانوي الهجين LEV-LDH

الهيكلية للبنزين فيلاحظ ظهوره عند الترددات 1454 و 1427 سم⁻¹. ويمكن ان تعود الحزمة عند التردد 1369 سم⁻¹ الى مط مجموعة النترات NO₃ فيما يشير ظهور الحزمة عند التردد 868 سم⁻¹ الى حني (C-H) اروماتي (Silverstein *et al.*, 2005).

2-4-3 طيف حيود الاشعة السينية (XRD) :

تمت دراسة طيف حيود الاشعة السينية لكل من المباد ليفوفلوكساسين النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH فبالأ عن طبقات المغنيسيوم / الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al-NO₃-LDH) لمعرفة الاختلاف في سمك الطبقة قبل و بعد عملية اقل المباد Levofloxacin بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد باستخدام قانون براك .

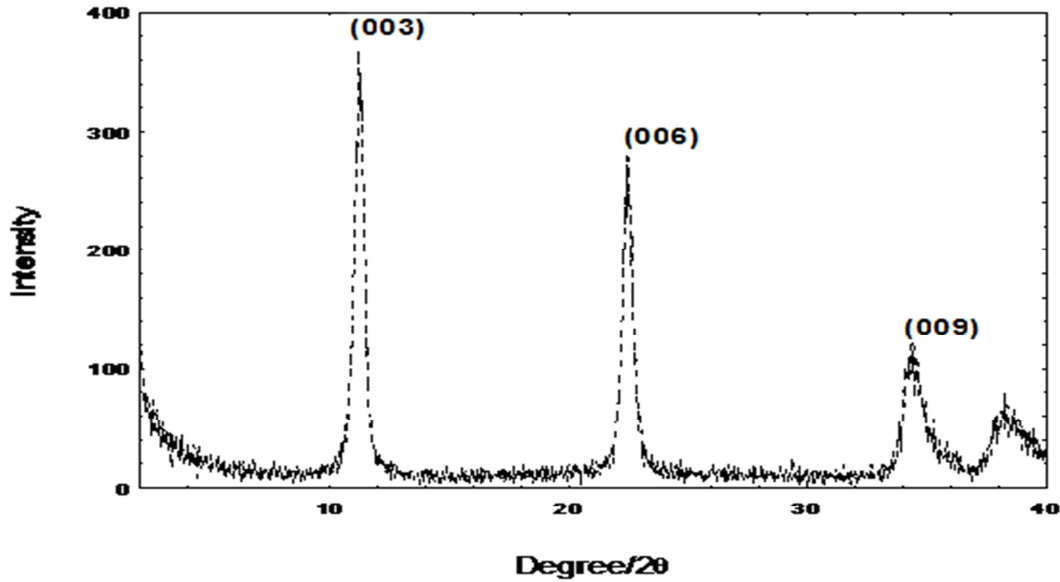
يبين الشكل 8 طيف حيود الاشعة السينية لطبقة المغنيسيوم / الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد Mg/Al-(NO₃-LDH) اذ تلاحظ المستويات البلورية (003) و (006) و (009) . فالمستوى (003) يظهر عند الزاوية 10.47° و بمسافة بلورية تساوي 0.84 nm اما المستوى (006) فيظهر عند الزاوية 22.03° و بمسافة بلورية تساوي 0.41 nm , بينما يظهر المستوى (009) عند الزاوية 34.44° و بمسافة بلورية تساوي 0.26 nm .

و من خلال ملاحظة طيف حيود الأشعة السينية للمباد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH في الشكل 9 يبدو أن عملية الأقل قد تمت بنجاح إذ يظهر المستوى (003) عند الزاوية 2° تقريباً بمسافة بلورية مقدارها 1.85 nm بينما يظهر المستوى (006) عند الزاوية 10.7° بمسافة بلورية 0.92 nm فيما يبدو ان المستوى (009) يتداخل مع المستوى (006) لطبقة ثنائية الهيدروكسيد بالنظر لتقاربهما في الموقع مما تعذر فصلهما بشكل واضح جداً .

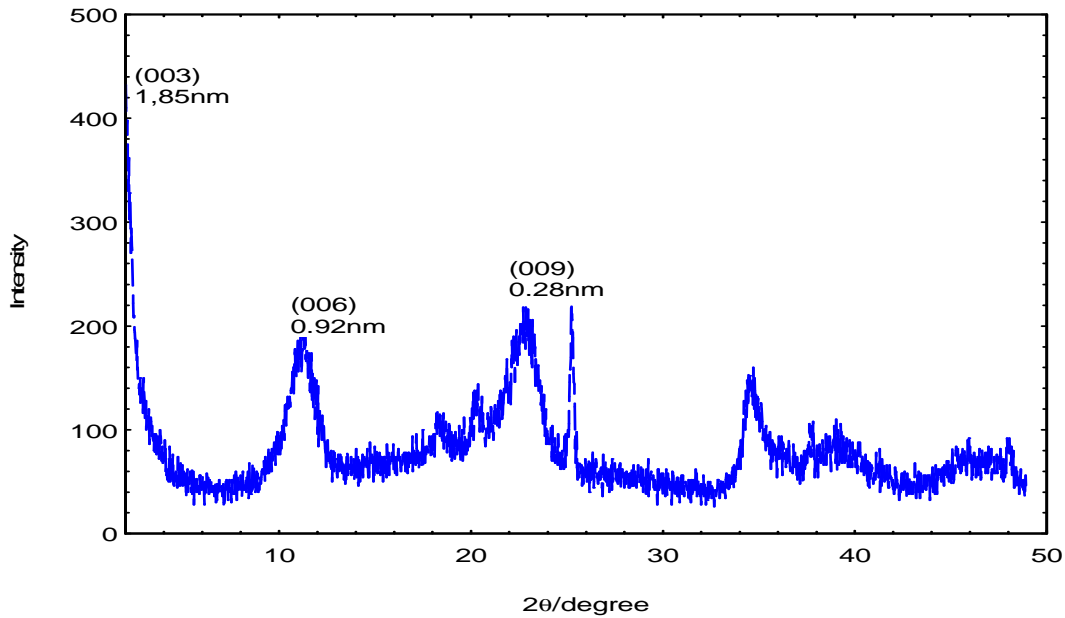
3-4-3 مجهر القوة الذرية - (AFM)

تم دراسة السطح الخارجي للمباد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH باستخدام مجهر القوة الذرية ويبين الشكل 10a صورة ثنائية الأبعاد للمباد النانوي تظهر فيها تجمعات دقائق ذات أشكال شبه كروية ، كما يظهر الشكل 10b صورة ثلاثية الأبعاد لمقطع من سطح المباد النانوي

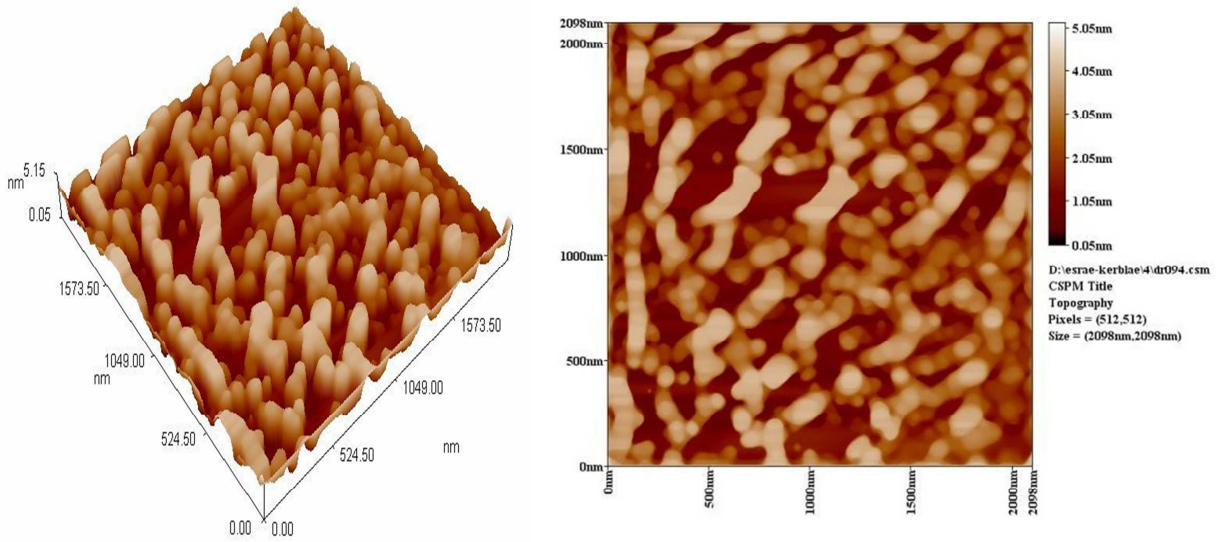
الهجين ويُلاحظ فيها ارتفاع التجمعات الدقائقية الذي يكون بحدود 5.15 نانومتر مما يشير الى تصنيع مباد نانوي هجين من المباد الحر وطبقات ثنائية الهيدروكسيد .



الشكل 8 : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لطبقة المغنيسيوم\الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد



الشكل 9 : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) للليفوفلوكساسين النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH



(b) (a)

الشكل 10 : صورة ثنائية الابعاد (a) وثلاثية الابعاد (b) للمباد النانوي الهجين Mg\Al-LEV-LDH

الجدول 24: اقطار و احجام وتجمعات دقائق المركب النانوي Mg\Al-LEV-LDH بعد فحصه بمجهر القوة الذرية

Avg. Diameter: 94.83 nm

Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)	Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)	Diameter (nm)<	Volume (%)	Cumulation (%)
60.00	1.11	1.11	85.00	11.11	31.11	110.00	12.22	77.78
65.00	5.56	6.67	90.00	10.00	41.11	115.00	8.89	86.67
70.00	2.22	8.89	95.00	7.78	48.89	120.00	6.67	93.33
75.00	7.78	16.67	100.00	7.78	56.67	125.00	2.22	95.56
80.00	3.33	20.00	105.00	8.89	65.56	130.00	4.44	100.00

ويذبح من الجدول 24 أن معدل أقطار الدقائق (Means of particle size) للمباد النانوي

Mg/Al-LEV-LDH هي بحدود 94.83 نانوميتر وقد ادت عملية تدبير هذا المباد

الهيبن الى الحصول على دقائق نانوية بنسبة 56.67 % من المجموع الكلي للدقائق بأقطار تراوحت بين (60-100) نانومتر . وان اعلى نسبة لتلك الدقائق النانوية بلغت 11.11 % للدقائق ذات القطر 85 نانومتر , فيما بلغت أوطأ نسبة للدقائق 1.11 % للدقائق ذات القطر 60 نانومتر .

تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما وجدته (Beherei *et al.*, 2011) إذ تم الحصول على دقائق نانوية هجينة مباداة للبكتريا بمعدل أقطار تتراوح بين (95.5-196) نانومتر، بينما لا تتفق نتائج دراستنا مع ما وجدته كل من الحمداني (2015) و الجبوري (2016) إذ أن معدل أقطار دقائق المبادين Oxytetracyclin و Vancomycin المحملين بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد بلغ 76.16 و 85.81 نانومتر، على التوالي .

5-3 التحليل الدقيق للعناصر في المباد Levofloxacin :

أوضحت نتائج التحليل الدقيق للعناصر الموضحة في الجدول 25 احتواء المباد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH والمباد الحر Levofloxacin على نسب من الكربون و الهيدروجين والنيتروجين بلغت (21.152 و 3.168 و 4.421) % و (48.141 و 5.882 و 8.985) % ، على التوالي . يتبع من هذه النتائج أن نسبة الليوفلوكساسين المحمل بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد بلغت 43.93 % .

الجدول 25 : التحليل الدقيق لعناصر الكربون و الهيدروجين و النيتروجين في المباد Levofloxacin

العينة	C%	H%	N%
Mg/Al-LEV-LDH	21.152	3.168	4.421
LEV Free	48.141	5.882	8.985

3-6 دراسة تحرر المباد Levofloxacin من المباد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH : LEV-LDH

تم دراسة تحرر المباد ليفوفلوكساسين من المباد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH الى LDH ثلاثة انواع من المحاليل المنظمة وبمدد زمنية تراوحت بين (0.25-26) ساعة باستخدام المعادلة الآتية :

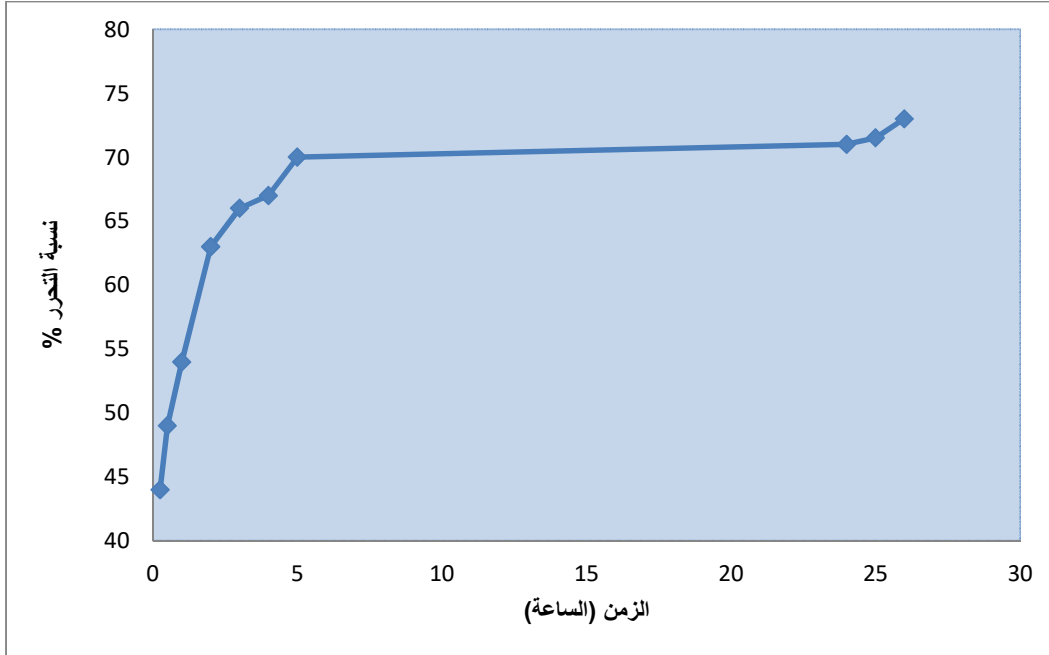
$$\text{Release \%} = \text{Ct} / \text{CT} * 100$$

يتبع من الشكل 11 أن نسبة تحرر الليفوفلوكساسين من المباد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH الى محلول منظم الفوسفات (pH 7.4) كانت سريعة خلال الساعات الاربع الاولى اذ انحصرت نسبة التحرر بين (44 - 67) % ثم تباطأت لتصل الى 73 % بعد مرور 26 ساعة لتستقر بعد ذلك عند هذه النسبة .

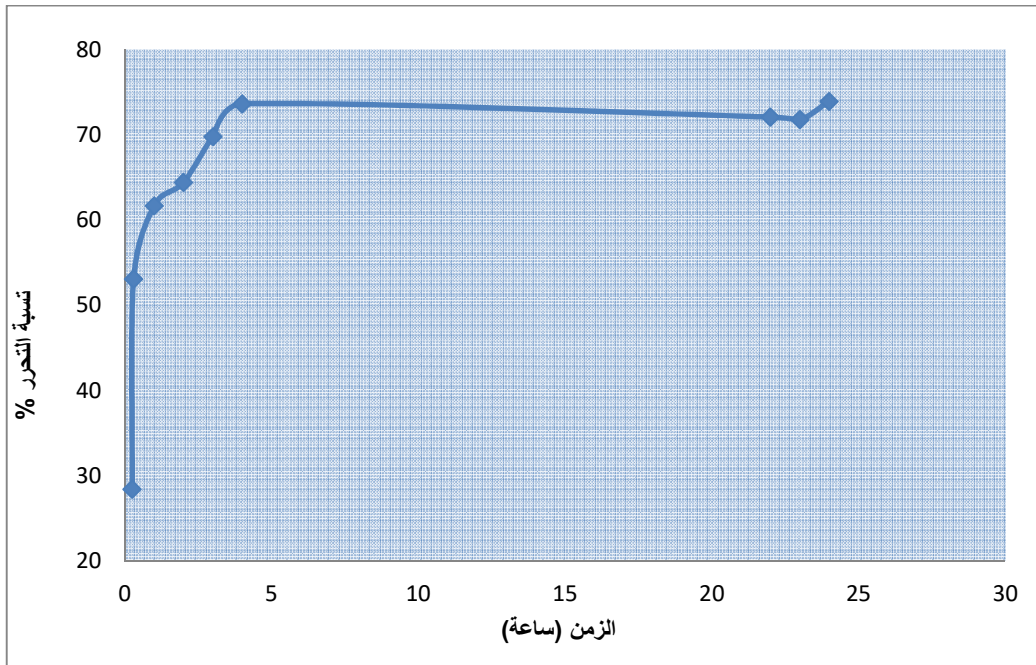
اما تحرر الليفوفلوكساسين الى المحلول المنظم الحامضي (منظم الخلات pH 5.2) , فيتبع من الشكل 12 ان تحرر المباد قيد الدراسة كان سريعاً خلال الساعات الثلاث الاولى اذ انحصرت نسبة التحرر بين (28.83-69.78) % ثم بدأت بالتباطؤ بعد ذلك لتصل الى 73.92% بعد مرور 24 ساعة لتستقر بعد ذلك عند هذه النسبة .

ويلاحظ من الشكل 13 ان تحرر الليفوفلوكساسين الى المحلول المنظم القاعدي (منظم الترس 8.8 pH) يكاد يسلك سلوكاً مماثلاً لتحرره من الوسط الحامضي اذ كان سريعاً ايضاً خلال الساعات الثلاث الاولى اذ انحصرت نسبة التحرر بين (7.36-28.68) % ثم بدأت بالتباطؤ بعد ذلك لتصل الى 30.98% بعد مرور 24 ساعة لتستقر بعد ذلك عند هذه النسبة .

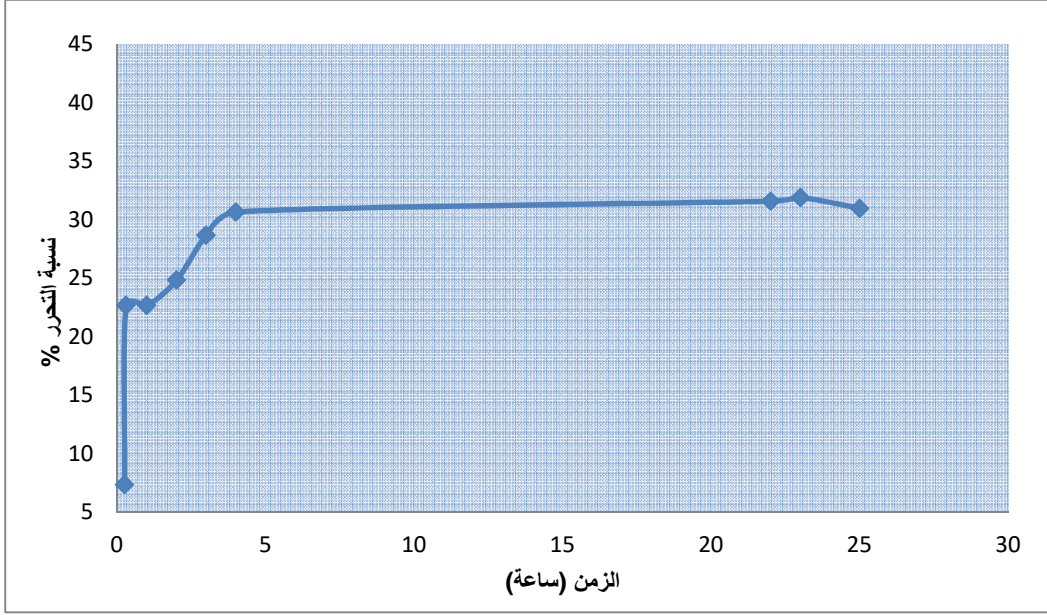
وبالرجوع الى الاشكال 11 و12 و13 يتبع ان تحرر الليفوفلوكساسين الى المحلولين المتعادل و الحامضي اقبل من تحرره الى المحلول القاعدي .



الشكل 11 : النسبة المئوية لتحرر المباد ليفوفلوكساسين من المباد النانوي الهجين Mg/AI-LEV-LDH الى محلول منظم الفوسفات (برقم هيدروجيني 7.4) بطريقة التبادل الأيوني المباشر



الشكل 12 : النسبة المئوية لتحرر المباد ليفوفلوكساسين من المباد النانوي الهجين Mg/AI-LEV-LDH الى محلول منظم الخلايا (برقم هيدروجيني 5.2) بطريقة التبادل الأيوني المباشر



الشكل 13 : النسبة المئوية لتحرر المباد ليفوفلوكساسين من المباد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH الى المحلول المنظم ترس (برقم هيدروجيني 8.8) بطريقة التبادل الأيوني المباشر

ان عملية التحرر تمر بثلاثة اطوار ففي الطور الاول الذي يمثل الساعات الأولى يشهد تحرراً سريعاً الذي يمكن أن يعزى الى سهولة أنتشار دقائق المباد النانوي الموجودة على سطح الحامل , أما التباطؤ في التحرر الذي يشهده الطور الثاني و الذي يمتد الى 24 ساعة فيمكن أن يعزى الى أنتشار المباد وفك ارتباطه بالحامل في حين يبدأ الطور الثالث بعد الأربع و عشرين ساعة و فيه يمكن تفسير ثبوت أو تباطؤ عملية التحرر بانتشار و تحرر المباد من الحامل أولاً فبلاً عن تحطم الحامل ثانياً (Jin-gou *et al.*, 2012) .

تتفق النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة مع ما وجدته (Ranjini *et al.*, 2017) إذ وصلت نسبة تحرر المباد لليفوفلوكساسين المحمل على Nano-Niosomes الى 74.62 % بعد مرور 24 ساعة . بينما لا تتفق مع ما أشار اليه (Guan *et al.*, 2012) إذ أن نسبة تحرر المباد Levofloxacin المحمل على الكيتوزان بلغت 85 % .

بشكل عام هناك نوعان من الآليات التي تتحكم بنظرنا التحرر من بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد هما انتشار الانيون من خلال جزيئات الطبقات ثنائية الهيدروكسيد وتفكك

(Dissolution) جزيئات هذه الطبقات (Latip *et al.*, 2013) .

1-6-3 دراسة حركيات التحرر (Release Kinetics) للمباد ليفوفلوكساسين

تمت دراسة حركيات التبادل الأيوني لتحرر المباد ليفوفلوكساسين الى ثلاثة أنواع من المحاليل المنظمة (محلول منظم الخلات pH 5.2 و محلول منظم الفوسفات pH 7.4 و محلول منظم الترس pH 8.8) من خلال تطبيق معادلتى الرتبتيين الأولى و الثانية الكاذبتين للانتشار.

يلاحظ من الأشكال 14a و 15a و 16a انحراف القيم عن الخط المستقيم مما يدل على عدم مطاوعة عملية التحرر لموديل الرتبة الأولى الكاذبة ولذلك تم تطبيق معادلة الرتبة الثانية الكاذبة و تم استخراج قيم معامل الارتباط (r^2) .

ويتضح من الأشكال 14a و 15a و 16a أن الموديل الرياضي للرتبة الثانية الكاذبة هو الأكثر انطباقاً لتفسير سلوكية تحرر المضاد ليفوفلوكساسين من بين طبقات المضاد النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH الى المحاليل المنظمة قيد الدراسة . و قد بلغت قيم معامل الارتباط r^2 (0.9996 و 0.9999 و 1) للمحاليل المنظمة الخلات والفوسفات والترس , على التوالي و كما هو موضح في الجدول 26 .

الجدول 26 : قيم معامل الارتباط لتفسير سلوكيات حركيات التحرر للمباد ليفوفلوكساسين من المباد النانوي

الهجين

قيم معامل الارتباط (r^2)		نوع المحلول المنظم	أسم المباد
الرتبة الثانية الكاذبة	الرتبة الأولى الكاذبة		
0.9996	0.9578	محلول منظم الخلات (pH 5.2)	ليفوفلوكساسين
0.9999	0.9117	محلول منظم الفوسفات (pH 7.4)	
1	0.7731	محلول منظم الترس (pH 8.8)	

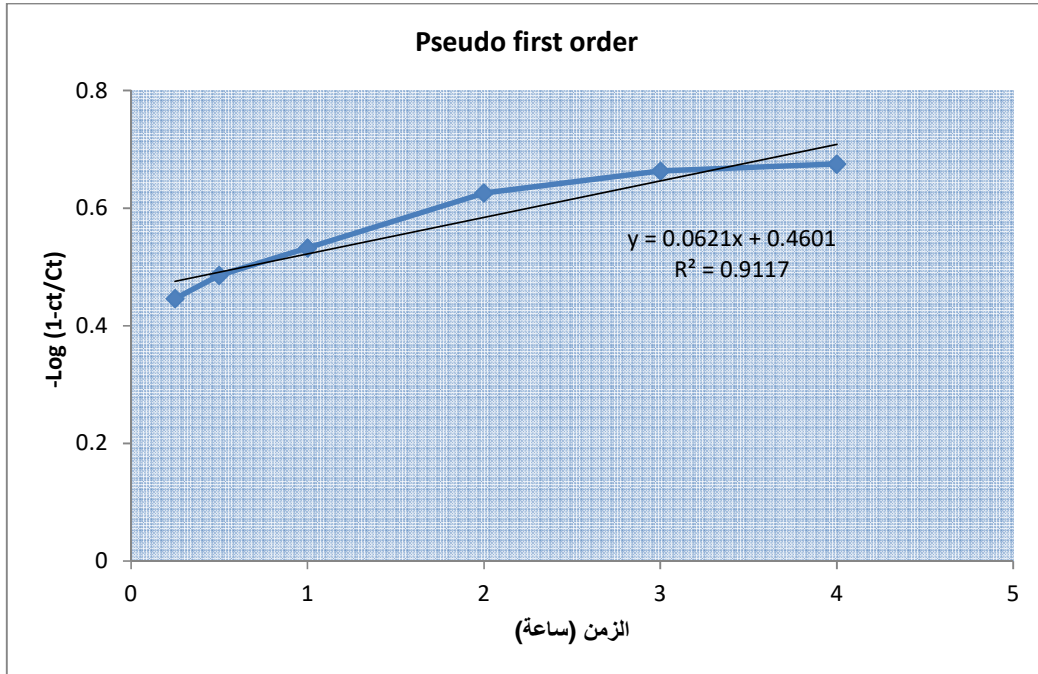
تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما وجدته الجبوري (2016) إذ كان موديل الرتبة الثانية الكاذبة هو الأكثر انطباقاً لتفسير سلوكية تحرر المضاد فانكوميسين المحمل على الطبقات ثنائية الهيدروكسيد , فقد بلغت قيم معامل الارتباط (1 و 0.9998 و 0.9998) في المحاليل المنظمة الخلات و الفوسفات و الترس , على التوالي .

وتتفق نتائج دراستنا الحالية أيضا مع ما توصلت اليه الخفاجي (2016) إذ كان الموديل الرياضي للرتبة الثانية الكاذبة هو الأكثر انطباقاً لتفسير سلوكية تحرر المطهر كلور هكسدين المحمل على طبقات ثنائية الهيدروكسيد إذ بلغت قيمة معامل الارتباط 0.994 . بينما لا تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما وجدته Guan et al., (2012) إذ كان موديل الرتبة الاولى الكاذبة هو الأكثر انطباقاً لتفسير سلوكية تحرر المضاد ليفوفلوكساسين المحمل على الكيتوزان, فقد بلغت قيمة معامل الارتباط (0.98694) .

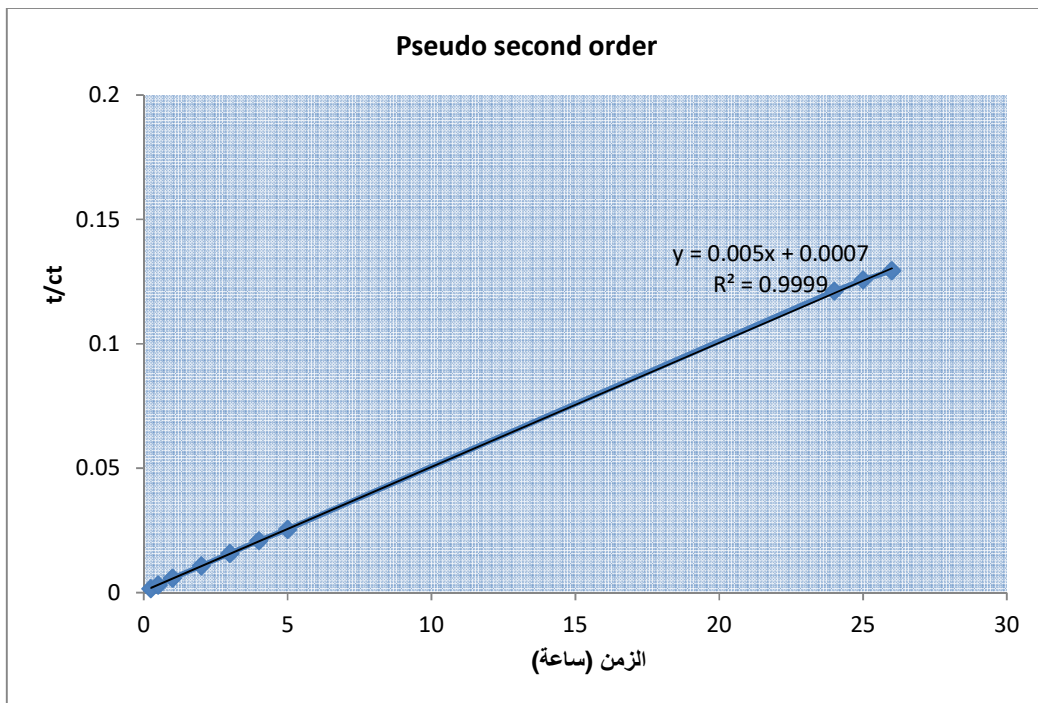
7-3 الفعالية التثبيطية للمباد ليفوفلوكساسين (LEV) ضد البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري :

1-7-3 الفعالية التثبيطية لليفوفلوكساسين ضد بكتريا *P. mirabilis*

اعتمادا على نتائج التحليل الدقيق للعناصر فإن التراكيز الفعلية للمباد ليفوفلوكساسين المحمل على طبقات ثنائية الهيدروكسيد المستخدمة في دراسة الفعالية التثبيطية ضد انواع البكتريا المعزولة في هذه الدراسة بلغت (1.29 , 0.43 , 0.21 , 0.10 , 0.04 , 0.004 , 0.002) ملغم/ مل .
تم دراسة الفعالية التثبيطية للمباد LEV بنوعيه الحر والنانوي الهجين ضد بكتريا *P. mirabilis* المسببة لتلوث قرحة القدم السكري والمعزولة في هذه الدراسة ويتبع من النتائج المبينة في الجدول 27 ان العزلات 17a و 17b و 15c هي الاكثر تأثرا بفعل المباد الحر بأقطار تثبيط (47 و 46.75 و 45.25) ملم باستخدام التركيز 3 ملغم/ مليلتر, فيما كانت العزلات 13b و 13a و 16b و 15c هي الاكثر تأثرا بفعل المباد النانوي الهجين بأقطار تثبيط بلغت (34.75 و 34.5 و 30.5 و 30.5) ملم , على التوالي باستخدام التركيز 1.29 ملغم/ مليلتر .

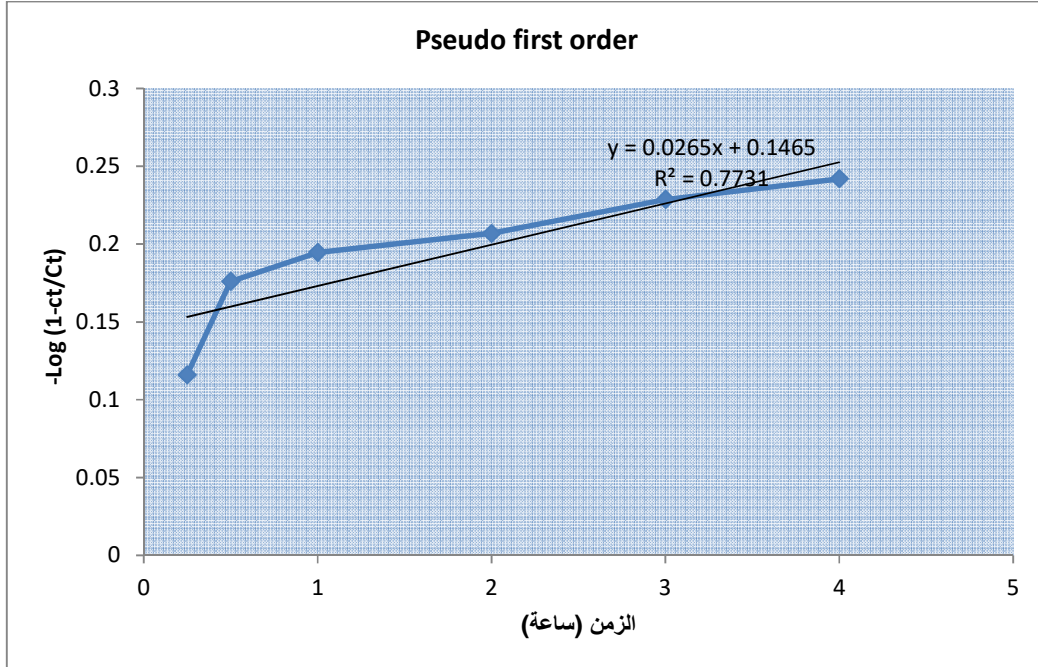


(a)

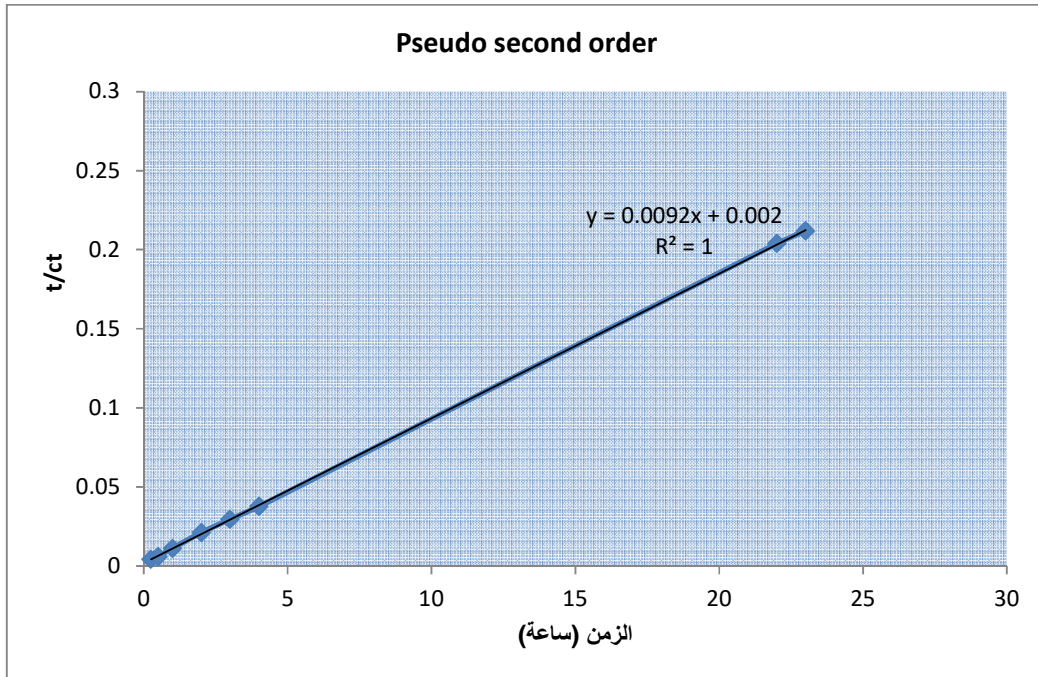


(b)

الشكل 14 : موديل الرتبة الأولى و الثانية الكاذبتين لتحرر المباد ليفوفلوكساسين من المباد النانوي Mg/Al-LEV-LDH الى محلول منظم الفوسفات (pH 7.4)

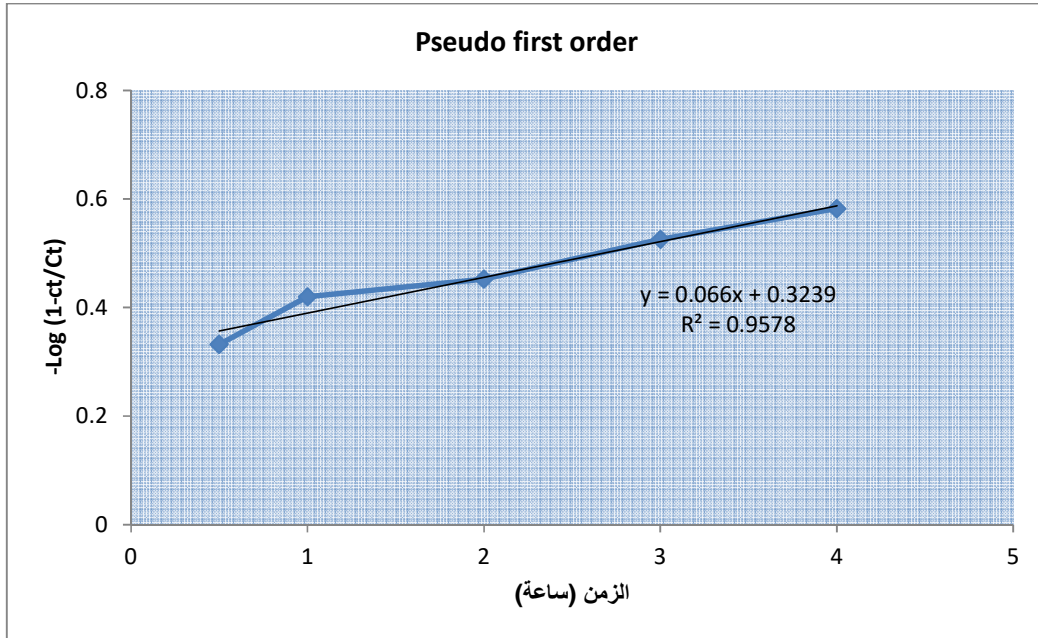


(a)

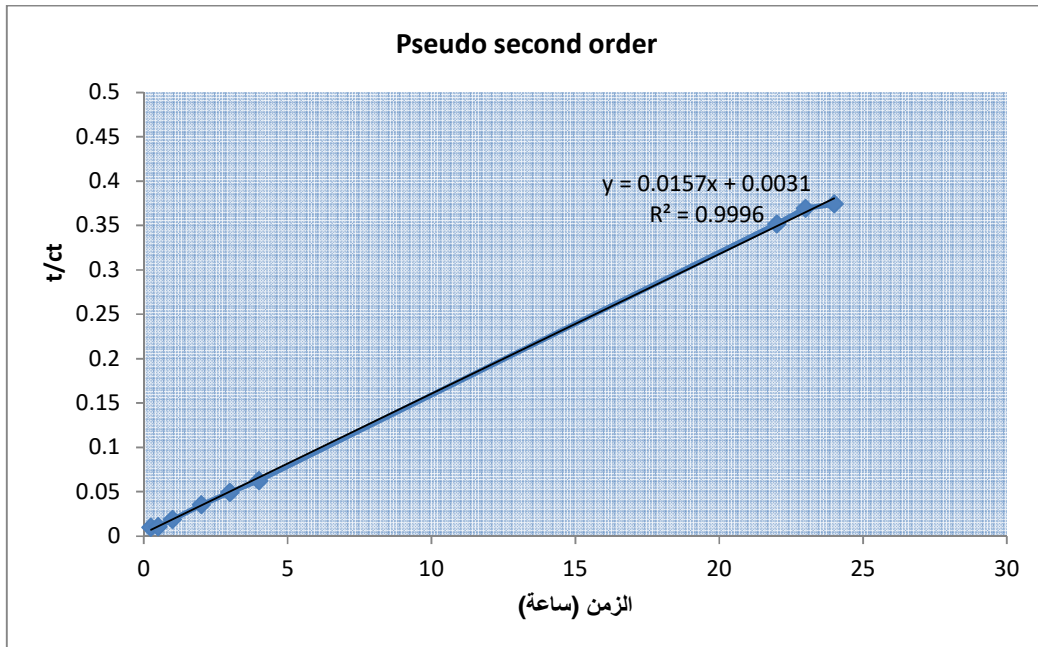


(b)

الشكل 15 : موديل الرتبة الأولى و الثانية الكاذبتين لتحرر المباد ليفوفلوكساسين من المباد النانوي Mg/Al-LEV-LDH الى محلول منظم الترسي (pH 8.8)



(a)



(b)

الشكل 16 : موديل الرتبة الأولى و الثانية الكاذبتين لتححر المباد ليغوفلوكساسين من المباد النانوي Mg/Al- LEV-LDH الى محلول منظم الخلايا (pH 5.2)

الجدول 27 : الفعالية التثبيطية للمبيد النانوي LEV-LDH و المبيد الحر LEV ضد بكتريا *P. mirabilis* المعزولة من قرحة القدم السكري

LSD _{0.01}	تركيز المبيد(ملغم/مل)							البكتيرية العزلة	المبيد		
	3	1	0.5	0.25	0.1	0.01	0.005				
تركيز المبيد	قطر التثبيط بالملم										
	47	45.5	42.5	40	38.5	37	33.25	17a	LEV- FREE		
	46.75	46	44.5	42.5	40	31	29.5	17b			
	31.5	25.75	20.5	18.5	0	0	0	16a			
	39	33	30	28.25	20.5	0	0	16b			
	30	24.5	21	15	13	12	0	15b			
	45.25	44	42.25	41.5	37.5	36	32	15c			
	40.5	35	33	32	29.5	25	15	13a			
	40	34.25	32.5	28	23.5	0	0	13b			
	32	24.5	20.25	17	16	15.25	0	51a			
37.75	34	32	29.5	21	0	0	53a				
0.278	تركيز المبيد(ملغم/مل)										
	1.29	0.43	0.21	0.10	0.04	0.004	0.002		LEV -LDH		
	قطر التثبيط بالملم										
	29	27.5	26	24.25	21	0	0	17a			
	30	28.5	27.25	25.5	21	0	0	17b			
	21	18.5	17	14.5	0	0	0	16a			
	30.5	29	28	27	21.5	0	0	16b			
	20.5	17.5	15.5	14	10.75	9.5	0	15b			
	30.5	28.5	27	25	22.25	0	0	15c			
	34.5	33.25	30.5	27.5	25	15.5	0	13a			
34.75	31	30	25.5	23	10	0	13b				
23	19.5	16	14.75	0	0	0	51a				
22	21	17.5	16	15	0	0	53a				
	0.148							LSD _{0.01} للمركبات			
LSD _{0.01} للعزلات	53 a	51 a	13 b	13 a	15 c	15 b	16 b	16 a	17 b	17 a	العزلة
0.332	22.035	17.857	22.607	30	39.785	16.5	21.535	13.75	40.035	40.535	المعدل للحر
	13.071	10.464	22.035	23.785	19.035	12.535	19.428	10.142	18.892	18.25	المعدل للتانوي

وقد جاءت نتائج التحليل الاحصائي تأكيداً لهذه النتائج اذ كانت العزلات المشار اليها اعلاه هي الاكثر حساسية للمبادات المدروسة بالنظر لإعطائها اعلى معدل تثبيط من بين عزلات *P. mirabilis*.

في دراسة قفا بها (Pandya and Chandak (2016) عن استخدام الليفوفلوكساسين ضد بكتريا *P. mirabilis* المعزولة من قرح القفا لمرضى السكر من احد المستشفيات في الهند ، تبين أن هذا المباد كان فعالاً ضد البكتريا قيد الدراسة بمعدل تثبيط مقداره 31 ملم .

تتلخص آلية عمل المباد ليفوفلوكساسين بتثبيطه للأنزيمين DNA-gyrase و DNA topoisomerase IV اذ يتألف الاول منهما من وحدتين (Subunits) ويكمن دوره في ادخال negative supercoils الى DNA مما يحفز فصل (Separation) الكروموسومات البنوية . بينما يتألف الأنزيم الثاني من أربع وحدات تكون مسؤولة عن إحداث decatenation للـ DNA وبالتالي انعزال الخلايا البنوية لذا فإن الليفوفلوكساسين يتداخل مع معقد الأنزيم- DNA مكونا Drug-Enzyme-DNA-Complex الذي يتمكن من ايقاف عملية التكرار (Replication) (Maxwell , 1992 ; Hooper , 2000) .

2-7-3 الفعالية التثبيطية لليفوفلوكساسين ضد بكتريا *E. coli*

يتبع من النتائج المبينة في الجدول 28 ان العزلة 14b هي الاكثر تأثراً بالفعل التثبيطي للمباد LEV بنوعيه الحر والنانوي الهجين بأقطار تثبيط بلغت (26.5 و 13.75) ملم عند التركيزين (3 و 1.29) ملغم/مليتر من المبادين , على التوالي .

اما نتائج التحليل الاحصائي فقد اظهرت هي الاخرى ان العزلة 14b هي الاكثر تأثراً بالفعل التثبيطي للمباد الحر بمعدل تثبيط بلغ 14.392 ملم , فيما كانت العزلتان 101 و 14a هما الاكثر تأثراً بالفعل التثبيطي للمباد النانوي الهجين بمعدل بلغ (7.678 و 7.392) ملم , على التوالي .

في دراسة قفا بها (Namasivayam and jams (2015) اتبع ان التراكيز المثبطة الدنيا للمباد LEV المحمل على CS-AgNp ضد بكتيريا *E. coli* بلغت 1.6 ملغم/ مل .

الجدول 28 : الفعالية التثبيطية للمبيد النانوي LEV-LDH والمبيدات الحرة LEV ضد بكتريا *E. coli*

المعزولة من قرحة القدم السكري

LSD _{0.01}	تركيز المبيد(ملغم/مل)							البكتيرية العزلة	المبيد	
	3	1	0.5	0.25	0.1	0.01	0.005			
	قطر التثبيط بالملم									
0.314	22	17.5	13	0	0	0	0	101	LEV- Free	
	23	19.5	14.5	13	11.75	11	0	102		
	25	22.75	19.5	16.5	13	0	0	14a		
	26.5	23	20	17.25	14	0	0	14b		
		تركيز المبيد(ملغم/مل)								
		1.29	0.43	0.21	0.10	0.04	0.004	0.002		LEV- LDH
		قطر التثبيط بالملم								
		13	12	11.25	10	7.5	0	0	101	
		12.75	11.5	0	0	0	0	0	102	
		15	13.5	12.25	11	0	0	0	14a	
		13.75	13	11	0	0	0	0	14b	
		0.168							LSD _{0.01} للمركبات	
	LSD _{0.01} للعزلات	14 b		14 a		102		101	العزلة	
	0.238	14.392		13.821		13.25		7.5	المعدل للحر	
5.392		7.392		3.464		7.678	المعدل للنانوي			

3-7-3 الفعالية التثبيطية لليوفولوكساسين ضد بكتريا *Pseudomonas spp.*

يتبع من الجدول 29 ان المركب النانوي الهجين Mg/Al-LEV-LDH يبدي أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلة 73 بقطر تثبيط مقداره 41.5 ملم عند التركيز 1.29 ملغم/ مليلتر بينما كانت أعلى فعالية تثبيطية للمبيد LEV الحر ضد العزلة ذاتها بقطر تثبيط مقداره 47.5 ملم عند التركيز 3 ملغم /مليلتر في حين كانت العزلة c15 الأقل تأثراً بكل من الليوفولوكساسين النانوي الهجين والحر بقطر تثبيط مقداره 15.75 ملم عند التركيزين المستخدمين من المبيادين المشار اليهما اعلاه . وقد جاءت نتائج التحليل الإحصائي دعماً لهذه النتائج اذ ان العزلة 73 كانت أكثر

حساسية تجاه المركبين المدروسين بمعدل تثبيط بلغ (34.25 و 32.714) ملم , لكل من المباديين الحر والنانوي الهجين , على التوالي .

الجدول 29: الفعالية التثبيطية للمباد النانوي LEV-LDH والمباد الحر LEV ضد بكتريا *Pseudomonas spp.* المعزولة من قرحة القدم السكري

LSD _{0.01}	تركيز المباد(ملغم/مل)							العزلة البكتيرية	المباد	
	3	1	0.5	0.25	0.1	0.01	0.005			
تركيز المباد	قطر التثبيط بالملم									
0.330	19.5	17.25	11.5	11	0	0	0	6b	LEV-Free	
	16.5	15.25	13.5	11	9.5	0	0	15a		
	15.75	13.5	0	0	0	0	0	15c		
	47.5	46	42	41.25	39	24	0	73		
		تركيز المباد(ملغم/مل)								
		1.29	0.43	0.21	0.10	0.04	0.004	0.002		LEV-LDH
		قطر التثبيط بالملم								
		19.5	17.5	17.25	16	12.5	0	0	6b	
		16.25	15.5	12.5	10.5	0	0	0	15a	
		15.75	14	12.5	11	10	0	0	15c	
		41.5	39	37	36	34.5	25.5	15.5	73	
		0.176							LSD _{0.01} للمبادات	

LSD _{0.01} للعزلات	73	15 c	15 a	6 b	العزلة
0.249	34.25	4.178	9.392	8.464	المعدل للحر
	32.714	9.035	7.821	11.821	المعدل للنانوي

4-7-3 الفعالية التثبيطية لليفوفلوكساسين ضد الانواع البكتيرية الاخرى

تم دراسة الفعالية التثبيطية للمباد LEV بنوعيه الحر والنانوي الهجين ضد كل من بكتريا *R. terrigena* و *P. rettgeri* و *B. cepacia* و *A. bummani* و *E. cloacae* و *O. anthropi* و *K. pneumonia* و *A. salmonicida* المسببة لتلوث قرحة القدم السكري

والمعزولة في هذه الدراسة ويتضح من النتائج المبينة في الجدولين 30 و 31 ان هناك تبايناً في تأثير المباد الحر و النانوي الهجين على الانواع البكتيرية المدروسة إذ كانت أعلى فعالية تثبيطية للمركب النانوي الهجين LEV-LDH والحر ضد العزلة البكتيرية *A. salmonicida* (17ab2) بأقطار تثبيط مقدارها (47.5 و 45.25) ملم عند التركيز 1.29 ملغم/مليتر, على التوالي . في حين كانت بكتريا *E. faecalis* هي الأقل تأثيراً من بين الأنواع البكتيرية المعزولة بقطر تثبيط مقداره 11.75 ملم عند التركيز 1.29 ملغم / مليتر للمباد النانوي الهجين بينما كانت البكتيريا *E. cloacae* الأقل تأثيراً بقطر تثبيط مقداره 19.5 ملم عند التركيز 3 ملغم / مليتر للمباد الحر .

جاءت نتائج التحليل الاحصائي مطابقة اذ بلغ معدل تثبيط العزلة 17ab2 (34.892 و 35.678) ملم , للمباد LEV الحر و النانوي الهجين , على التوالي .

تمكن (2016) Namasivayam *et al.*, من اختبار الفعالية التثبيطية لليوفلوكساسين المحمل نانويا على الفبة ضد عدد من عزلات بكتريا *P. aeruginosa* و *K. pneumonia* وقد بلغت أقطار التثبيط للعزلات المدروسة (14 - 13.4) ملم , على التوالي .

3-7-5 الفعالية التثبيطية لليوفلوكساسين ضد بكتريا *S. aureus*

يتضح من الجدول رقم 32 ان العزلتين البكتيريتين 3 و 12 هما الاكثر تأثيرا بالفعل التثبيطي للمباد LEV الحر بأقطار تثبيط مقدارها (43 و 40.5) ملم , على التوالي . فيما كانت العزلتان 2 و 3 هما الاكثر تأثيرا بالفعل التثبيطي للمباد النانوي الهجين بأقطار تثبيط مقدارها 36 ملم , لكل منهما . وقد جاءت نتائج التحليل الاحصائي تأكيدا لهذه النتائج اذ كانت العزلات المشار اليها اعلاه هي الاكثر حساسية للمبادين المدروسين بالنظر لإعطائها اعلى معدل تثبيط من بين عزلات *S. aureus* والذي بلغ (34.642 و 32.785) ملم , للمباد الحر, على التوالي . بينما بلغت (25.285 و 29.5) ملم , للمباد النانوي الهجين , على التوالي .

الجدول 30: الفعالية التثبيطية للمباد النانوي LEV-LDH والمباد الحر LEV ضد البكتريا المعزولة من قرحة القدم السكري

LSD _{0.01} لتركيز المبيد	تركيز المبيد (ملغم/مل)							العزلة البكتيرية	المبيد
	3	1	0.5	0.25	0.1	0.01	0.005		
	قطر التثبيت بالملم								
0.317	27.5	22.5	21.5	20	19	18	0	<i>A. bummani</i> 4	LEV Free
	19.5	17	16	15	14.75	0	0	<i>E. cloaca</i> 6a	
	35	31	28.5	24.5	23	22.5	0	<i>O. antropi</i> 52	
	28.5	23.5	19.25	15	13.5	11.5	0	<i>K. pneumonie</i> 17a3	
	47.5	46	45	43	33.5	18	16.75	<i>A. salmonicida</i> 17ab2	
	تركيز المبيد (ملغم/مل)							LEV - LDH	
	1.29	0.43	0.21	0.10	0.04	0.004	0.002		
	قطر التثبيت بالملم								
	18.5	17	14	13	10.75	10	0		<i>A. bummani</i> 4
	17.5	16.5	15	13.5	11	0	0		<i>E. cloaca</i> 6a
30	28	27	26	22.5	21	0	<i>O. antropi</i> 52		
19	18.25	15.5	14.5	13.5	0	0	<i>K. pneumonie</i> 17a3		
45.25	43.5	40.5	38.5	35.5	24.5	16.5	<i>A. salmonicida</i> 17ab2		
0.169							LSD _{0.01} للمبيدات		

LSD _{0.01} للعزلات	<i>A. salmonicida</i> 17ab2	<i>K. pneumonie</i> 17a3	<i>O. antropi</i> 52	<i>E. cloaca</i> 6a	<i>A. bummani</i> 4	العزلة
0.268	35.678	15.892	23.5	11.75	18.357	المعدل للحر
	34.892	11.535	22.071	10.5	11.892	المعدل للنانوي

الجدول 31 : الفعالية التثبيطية للمبيد النانوي LEV-LDH والمبيد الحر LEV ضد البكتريا المعزولة من قرحة القدم السكري

LSD _{0.01} لتركيز المبيد	تركيز المبيد (ملغم/مل)							العزلة البكتيرية	المبيد	
	3	1	0.5	0.25	0.1	0.01	0.005			
	قطر التثبيط بالملغم									
0.290	33.25	29.5	28	26	24.5	18.5	16	<i>R. terrigena</i> 22a	LEV Free	
	31.5	28	27	24.5	23.25	17.25	0	<i>R. terrigena</i> 22b		
	24.5	20	16.25	12	11.25	9.5	0	<i>E. faecalis</i> 111		
	23	18.75	16	10.5	9	0	0	<i>E. faecalis</i> 112		
	38	35.5	33	30	27.5	23.5	17.5	<i>P. rettgeri</i> 15c2		
	40.5	37.5	35.5	34	32.5	29.5	27	<i>B. cepacia</i> 16b		
	0.290	تركيز المبيد (ملغم/مل)							LEV-LDH	
		1.29	0.43	0.21	0.10	0.04	0.004	0.002		
		قطر التثبيط بالملغم								
		22	20.5	19.5	18	17.5	13.5	9		<i>R. terrigena</i> 22a
		23.25	22	20.5	18.5	16.5	15	10		<i>R. terrigena</i> 22b
		11.75	11	10.5	0	0	0	0		<i>E. faecalis</i> 111
		13	12	11.25	8	0	0	0		<i>E. faecalis</i> 112
		29.5	27	25.5	23.5	20.5	17.5	13.5		<i>P. rettgeri</i> 15c
39.5		38.25	37	35.5	35	30.5	18.5	<i>B. cepacia</i> 16b		
0.155							LSD _{0.01} للمبيدات			

LSD _{0.01} للحزلات	<i>B. cepacia</i> 16b	<i>P. rettgeri</i> 15c	<i>E. faecalis</i> 112	<i>E. faecalis</i> 111	<i>R. terrigena</i> 22b	<i>R. terrigena</i> 22a	العزلة
0.268	33.785	20.285	11.035	13.357	21.642	25.107	المعدل للحر
	33.464	22.428	6.321	4.75	18	17.142	المعدل للنانوي

الجدول 32 : الفعالية التثبيطية للمبيد النانوي LEV-LDH و المبيد الحر LEV ضد بكتريا *S. aureus* المعزولة من قرحة القدم السكري

LSD _{0.01} لتركيز المبيد	تركيز المبيد (ملغم/مل)							العزلة البكتيرية	المبيد
	3	1	0.5	0.25	0.1	0.01	0.005		
0.205	قطر التثبيط بالملم								
	37	35	34	31.25	26.5	17	15	2	LEV- Free
	43	40.25	38.5	37.25	35	26	22.5	3	
	40.5	38	37	34.5	33	26	20.5	12	
	29.5	22.5	17	0	0	0	0	14c	
	25	20.5	15.25	10	0	0	0	20a	
	28	26.75	25	22.5	17.5	0	0	20b	
	27.5	25	21	17.5	16	0	0	20c	
	27.5	22.5	17	12.25	0	0	0	21a	
	29	26.75	24	21.5	20	19.25	0	21b	
	تركيز المبيد (ملغم/مل)								
	1.29	0.43	0.21	0.10	0.04	0.004	0.002		LEV - LDH
	قطر التثبيط بالملم								
	36	34.5	29	26.5	24	14.5	12.5	2	
	36	35	34	31.5	30	21	19	3	
	20	18.5	17	15.5	0	0	0	12	
	14	12.25	0	0	0	0	0	14c	
	20	18.5	17	16.25	0	0	0	20a	
21	19	17.5	15	0	0	0	20b		
19.5	18	15.5	11	0	0	0	20c		
13.5	12	11	0	0	0	0	21a		
13	12	11.75	0	0	0	0	21b		
	0.109							LSD _{0.01} للمركبات	

LSD _{0.01} للعزلات	21 b	21 a	20 c	20 b	20 a	14 c	12	3	2	العزلة
0.232	20.071	11.321	15.285	17.107	10.107	9.857	32.785	34.642	27.964	المعدل للحر
	5.25	5.214	9.142	10.357	10.25	3.75	10.142	29.5	25.285	المعدل للناوي

قفا Bisht *et al.*, (2014) باختبار الفعالية التثبيطية للبيوفلوكساسين المحمل على مجموعة من البولييمرات ضد بكتريا *S. aureus* وأوضحت نتائج الدراسة أن المباد المحمل على البولييمر NF1 هو الأكثر فعالية ضد البكتريا المذكورة بقطر تثبيط مقداره 25.9 ملم .

وفي دراسة اخرى قفا Bagga *et al.*, (2016) بدراسة الفعالية التثبيطية للمباد Levofloxacin النانوي ضد بكتريا *S. aureus* واتبع ان التركيز المثبط الادنى لهذا المباد بلغ 0.128 مايكروغرام/مل .

6-7-3 الفعل التثبيطي التآزري للمبادات الحيوية النانوية الهجينة ضد بكتريا *P. mirabilis* و *S. aureus* :

بالنظر لسيادة نوعي بكتريا *P. mirabilis* و *S. aureus* على الانواع البكتيرية الاخرى المعزولة من قرحة القدم لمرضى السكر في محافظة كربلاء المقدسة لذا فقد تم اختيار عزلات كلا النوعين لاختبار الفعل التثبيطي التآزري للمبادات الحيوية النانوية الهجينة المدبرة في هذه الدراسة ضد العزلات البكتيرية الموصوفة أعلاه .

يلجأ عادة الى استخدام العلاج التوليفي ضد الاحياء المجهرية (Antimicrobial combination therapy) لغرض تقليص وقت العلاج ومنع ظهور مقاومة الاحياء المجهرية للأدوية فبالا عن توسيع الطيف العلاجي للأدوية (, Hopkins , 2006 ; Dancey and Chen , 2008 ; Fischbach and Walsh , 2009 ; Bush *et al.*, 2011 ; Worthington and Melander , 2013) .

درس الفعل التثبيطي التآزري بين المباد النانوي الهجين LEV-LDH والمباد Cefixime الحر ضد البكتريا *P. mirabilis* المعزولة في هذه الدراسة . يظهر من النتائج الموضحة في الجدول 33 ان العزلتين 51a و 16b هما الاكثر تأثرا بالفعل التثبيطي التآزري للمباد Levofloxacin النانوي المتآزر مع Cefixime الحر بأقطار تثبيط بلغت (39.5 و 37) ملم , على التوالي .

الجدول 33 : الفعالية التثبيطية التآزرية للمباد النانوي LEV-LDH ضد بكتريا *P. mirabilis* المعزولة من قرحة القدم السكري

LSD _{0.01} لتركيز المباد	LEV-LDH/Cefixime Free							المباد
	2.1	1.71	1.6	1.55	1.52	1.5002	1.501	تركيز المباد (ملغم/مل)
	قطر التثبيط بالملغم							العزلة البكتيرية
0.435	36	31.5	28.5	27	24.5	18.5	16.5	17a
	33.25	30.5	27.5	25.25	24.25	18	15	17b
	19.5	17.5	16	14.5	12	0	0	16a
	37	32.25	28.5	25.25	25	18.5	17	16b
	23.5	21	19.5	18	17	15.75	0	15b
	32.75	30.5	26.5	23	20	0	0	15c
	28.5	25	24	23	21	18.5	15.5	13a
	31.5	29.5	27.5	25.5	23	16	14	13b
	39.5	30.5	23.5	20.5	19	0	0	51a
	27.5	24.5	23.15	21	18	0	0	53b
	0.520							LSD _{0.01} للعزلات

أن التوليف بين المبادين النانوي والحر أبدى فعلاً تثبيطياً تآزرياً ضد بعض العزلات فيما أبدى فعلاً تبادياً ضد البعض الآخر , فقد كان التأثير تآزرياً ضد العزلات 17a و 17b و 15b و 15c و 16b و 51a و 53b بأقطار تثبيط مقدارها (36 و 33.25 و 23.5 و 32.75 و 37 و 39.5 و 27.5) ملم , على التوالي أي بآباً وباستخدام التركيز 2.1 ملغم / مل بينما كان التأثير تبادياً ضد العزلات 16a و 13a و 13b بأقطار تثبيط بلغت (19.5 و 28.5 و 31.5) ملم , على التوالي .

وجاءت نتائج التحليل الاحصائي مطابقة اذ أن العزلات المشار اليها اعلاه هي الاكثر حساسية للمبادات المدروسة نظرا لإعطائها اعلى معدل تثبيط من بين عزلات *P. mirabilis* .

يمتلك المباد Cefixime تأثيراً قاتلاً للبكتريا نتيجة تثبيط تصنيع جدار الخلية اذ يرتبط هذا المباد بواحد من البروتينات المثبطة للبنسلين (penicillin binding proteins, PBPs) مما يحول دون اكتمال الخطوة النهائية transpeptidation من تصنيع الببتيدوكلايكان في جدار الخلية البكتيرية ، فيتوقف التصنيع الحيوي لجدار الخلية مما يؤدي إلى موت الخلية البكتيرية (Raja and Rao , 2013).

الجدول 34 : الفعالية التثبيطية التآزرية للمباد النانوي LEV-LDH ضد بكتريا *S. aureus* المعزولة من قرحة القدم السكري

LSD _{0.01} لتركيز المباد	LEV-LDH/Teico Free							المباد
	2.1	1.71	1.6	1.55	1.52	1.5002	1.501	تركيز المباد (ملغم/مل)
	قطر التثبيط بالملغم							العزلة البكتيرية
0.515	27.5	25	22	20	18	0	0	2
	37.5	35.5	32.5	30	27	12.25	0	3
	28	26.5	21.5	13.25	0	0	0	12
	23.25	21	19.5	17	14	0	0	14c
	24.5	23	19	16.75	14.5	0	0	20a
	31	27.5	25.5	24	21	15	0	20b
	29	25.5	24	23.5	20.5	16.5	0	20c
	22.75	19.5	18	16	14	0	0	21a
	23	20	17.5	15.25	13.5	0	0	21b
	0.616							LSD _{0.01} للعزلات

درس الفعل التثبيطي التآزري بين المباد النانوي الهجين LEV-LDH والمباد Teicoplanin الحر ضد البكتريا *S. aureus* المعزولة في هذه الدراسة . و يظهر من النتائج الموضحة في الجدول 34 أن التوليف بين المبادين النانوي والحر أبدى فعلاً تثبيطياً تآزرياً ضد بعض العزلات فيما أبدى فعلاً تبادياً ضد البعض الآخر , فقد كان التأثير تآزرياً ضد العزلات 3 و 12 و 14c و

20a و 20b و 20c و 21a و 21b بأقطار تثبيط مقدارها (37.5 و 28 و 23.25 و 24.5 و 31 و 29 و 22.75 و 23) ملم , على التوالي أياً وباستخدام التركيز 2.1 ملغم / مل بينما كان التأثير تبادياً ضد العزلة 2 بقطر تثبيط بلغ 27.5 ملم .

وجاءت نتائج التحليل الاحصائي مطابقة للنتائج اعلاه اذ ان العزلات المشار اليها اعلاه هي الاكثر حساسية لتوليفة المباديين المدروسين .

في دراسة قفا بها (Xu et al., 2017) لمعرفة التأثير التآزري للمبادات الحيوية المحملة نانويا على الفبة ضد بكتيريا *S. aureus* امتلك المباد LEV النانوي اعلى فعل تثبيطي للحدود التثبيطية الدنيا اذ بلغ (8-16) مايكروغرام / مل .

تتبع آلية عمل المباد Teicoplanin من خلال تثبيطه لتصنيع الببتيدوكلايكان في جدار الخلية البكتيرية عبر الارتباط غير المتخصص وتشبع الطبقات الخارجية من الببتيدوكلايكان البكتيري , ثم يرتبط التيكوبلانين إلى النهايات D-Ala-D-Ala الطرفية لمولدات (precursors) الببتيدوكلايكان عن طريق شق (Cleft) موجود في جزيء التيكوبلانين (Reynolds , 1989) .

ان التأثير المثبط لتوليفات الأدوية يمكن أن يكون أكبر أو أصغر مما هو متوقع من آثارها الفردية طبقاً الى التفاعلات التآزرية أو التبادلية بين الأدوية على التوالي (Keith et al., 2005) .

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات :

1. سيادة البكتريا السالبة لصبغة غرام في تلوث قرحة القدم السكري في محافظة كربلاء المقدسة.
2. تميزت الأنواع البكتيرية المعزولة في هذه الدراسة بمقاومتها العالية للمضادات الحيوية مما يعكس الاستخدام غير المدروس للمضادات الحيوية في علاج المرضى في المحافظة .
3. إمكانية تحضير مضادات نانوية هجينة من المضادات المستخدمة في علاج قرحة القدم السكري .
- 4 . كفاءة المضاد Levofloxacin بنوعيه الحر و النانوي الهجين في تثبيط البكتريا المسببة لتلوث قرحة القدم السكري المعزولة في هذه الدراسة .

التوصيات :

1. تحضير مضادات نانوية هجينة أخرى و تقييم كفاءتها التثبيطية ضد البكتريا المعزولة من قرحة القدم السكري .
2. تحضير مطهر نانوي هجين (Nanohybrid Antiseptic) وتقييم كفاءته التثبيطية ضد البكتريا المعزولة من قرحة القدم السكري .
3. تقييم الفعل التثبيطي للمضاد النانوي الهجين LEV-LDH ضد أنواع بكتيرية أخرى مثل البكتريا المسببة لأخماج الحروق .

الملاحق

الملحق 1: اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *P. mirabilis*

<i>P. mirabilis</i>	الاختبارات	ت
-	ONPG	1
-	<u>ADH</u>	2
-	<u>LDC</u>	3
+	<u>ODC</u>	4
-	<u>[CIT]</u>	5
+	<u>H₂S</u>	6
+	<u>URE</u>	7
+	TDA	8
-	IND	9
+	<u>[VP]</u>	10
+	<u>[GEL]</u>	11
+	GLU	12
-	MAN	13
-	INO	14
-	SOR	15
-	RHA	16
-	SAC	17
-	MEL	18
-	AMY	19
-	ARA	20

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

الملحق 2 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *Pseudomonas spp.*

<i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i>	الاختبارات	ت
-	-	ONPG	1
+	+	ADH	2
-	-	LDC	3
-	-	ODC	4
+	+	CIT	5
-	-	H ₂ S	6
V	+	URE	7
-	-	TDA	8
-	-	IND	9
-	-	VP	10
+	V	GEL	11
+	V	GLU	12
V	-	MAN	13
V	-	INO	14
+	-	SOR	15
+	-	RHA	16
+	V	SAC	17
+	-	MEL	18
+	-	AMY	19
+	V	ARA	20

(+) نتيجة موجبة ، (-) نتيجة سالبة ، v (variable reaction)

الملاحق 3 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *E. coli*

<i>E. coli</i>	الاختبارات	ت
+	ONPG	1
-	<u>ADH</u>	2
+	<u>LDC</u>	3
+	<u>ODC</u>	4
-	<u>[CIT]</u>	5
-	<u>H₂S</u>	6
-	<u>URE</u>	7
-	TDA	8
+	IND	9
-	<u>[VP]</u>	10
-	<u>[GEL]</u>	11
+	GLU	12
+	MAN	13
-	INO	14
+	SOR	15
+	RHA	16
+	SAC	17
+	MEL	18
-	AMY	19
+	ARA	20

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

الملحق 4 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *R. terrigena*

<i>R. terrigena</i>	الاختبارات	ت
+	ONPG	1
-	<u>ADH</u>	2
+	<u>LDC</u>	3
-	<u>ODC</u>	4
-	<u>[CIT]</u>	5
-	<u>H₂S</u>	6
-	<u>URE</u>	7
-	TDA	8
-	IND	9
+	<u>[VP]</u>	10
v	<u>[GEL]</u>	11
+	GLU	12
-	MAN	13
-	INO	14
-	SOR	15
-	RHA	16
-	SAC	17
+	MEL	18
-	AMY	19
+	ARA	20

(+) نتيجة موجبة ، (-):نتيجة سالبة ، v (variable reaction)

الملحق 5 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *A. baumannii*

<i>A. baumannii</i>	الاختبارات	ت
-	ONPG	1
-	<u>ADH</u>	2
-	<u>LDC</u>	3
-	<u>ODC</u>	4
-	<u>[CIT]</u>	5
-	<u>H₂S</u>	6
-	<u>URE</u>	7
-	TDA	8
-	IND	9
-	<u>[VP]</u>	10
v	<u>[GEL]</u>	11
+	GLU	12
-	MAN	13
-	INO	14
-	SOR	15
-	RHA	16
-	SAC	17
+	MEL	18
-	AMY	19
+	ARA	20

(+) نتيجة موجبة ، (-) نتيجة سالبة ، v (variable reaction)

الملحق 6 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *E. cloacae*

<i>E. cloacae</i>	الاختبارات	ت
+	ONPG	1
+	<u>ADH</u>	2
-	<u>LDC</u>	3
+	<u>ODC</u>	4
+	<u>[CIT]</u>	5
-	<u>H₂S</u>	6
-	<u>URE</u>	7
+	TDA	8
-	IND	9
+	<u>[VP]</u>	10
-	<u>[GEL]</u>	11
+	GLU	12
+	MAN	13
-	INO	14
+	SOR	15
+	RHA	16
+	SAC	17
+	MEL	18
+	AMY	19
+	ARA	20

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

الملحق 7 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *K. pneumonia*

ت	الاختبارات	<i>K. pneumonia</i>
1	ONPG	+
2	<u>ADH</u>	-
3	<u>LDC</u>	-
4	<u>ODC</u>	-
5	<u>[CIT]</u>	v
6	<u>H₂S</u>	-
7	<u>URE</u>	+
8	TDA	-
9	IND	-
10	<u>[VP]</u>	v
11	<u>[GEL]</u>	v
12	GLU	+
13	MAN	+
14	INO	+
15	SOR	+
16	RHA	+
17	SAC	+
18	MEL	+
19	AMY	+
20	ARA	+

(+) نتيجة موجبة ، (-) نتيجة سالبة ، v (variable reaction)

الملحق 8 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *B. cepacia*

<i>B. cepacia</i>	الاختبارات	ت
+	ONPG	1
+	<u>ADH</u>	2
+	<u>LDC</u>	3
+	<u>ODC</u>	4
-	<u>[CIT]</u>	5
+	<u>H₂S</u>	6
+	<u>URE</u>	7
-	TDA	8
+	IND	9
-	<u>[VP]</u>	10
+	<u>[GEL]</u>	11
-	GLU	12
-	MAN	13
-	INO	14
-	SOR	15
-	RHA	16
-	SAC	17
-	MEL	18
-	AMY	19
-	ARA	20

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

الملحق 9 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *P. rettgeri*

<i>P. rettgeri</i>	الاختبارات	ت
-	ONPG	1
-	<u>ADH</u>	2
-	<u>LDC</u>	3
-	<u>ODC</u>	4
+	<u>[CIT]</u>	5
-	<u>H₂S</u>	6
v	<u>URE</u>	7
+	TDA	8
+	IND	9
-	<u>[VP]</u>	10
-	<u>[GEL]</u>	11
+	GLU	12
+	MAN	13
-	INO	14
-	SOR	15
-	RHA	16
-	SAC	17
-	MEL	18
-	AMY	19
-	ARA	20

(+): نتيجة موجبة ، (-): نتيجة سالبة، v (variable reaction)

الملحق 10 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *A. salmonicida*

<i>A. salmonicida</i>	الاختبارات	ت
-	ONPG	1
+	<u>ADH</u>	2
+	<u>LDC</u>	3
-	<u>ODC</u>	4
-	<u>CIT</u>	5
-	<u>H₂S</u>	6
-	<u>URE</u>	7
-	TDA	8
-	IND	9
-	<u>VP</u>	10
+	<u>GEL</u>	11
+	GLU	12
+	MAN	13
-	INO	14
-	SOR	15
-	RHA	16
-	SAC	17
-	MEL	18
-	AMY	19
+	ARA	20

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

الملحق 11 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *O. anthropi*

<i>O. anthropic</i>	الاختبارات	ت
-	ONPG	1
-	<u>ADH</u>	2
-	<u>LDC</u>	3
-	<u>ODC</u>	4
-	<u>[CIT]</u>	5
-	<u>H₂S</u>	6
+	<u>URE</u>	7
-	TDA	8
-	IND	9
-	<u>[VP]</u>	10
-	<u>[GEL]</u>	11
+	GLU	12
v	MAN	13
-	INO	14
-	SOR	15
-	RHA	16
-	SAC	17
-	MEL	18
-	AMY	19
-	ARA	20

(+) نتيجة وجبة ، (-):نتيجة سالبة ، v (variable reaction)

الملحق 12 : اختبارات العدة التشخيصية *Strep Api 20* لتشخيص بكتريا *E. faecalis*

<i>E. faecalis</i>	الاختبارات	ت
+	VP	1
+	HIP	2
+	ESC	3
+	PYRA	4
-	Agal	5
-	βGUR	6
-	βGAL	7
V	PAL	8
+	LAP	9
+	<u>ADH</u>	10
+	<u>RIB</u>	11
-	<u>ARA</u>	12
+	<u>MAN</u>	13
+	<u>SOR</u>	14
+	<u>LAC</u>	15
+	<u>TRE</u>	16
-	<u>INU</u>	17
-	<u>RAF</u>	18
+	<u>AMD</u>	19
-	<u>GLYG</u>	20

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

المصادر

المص-ادر العربيه :

الإمام ، محمد محمد الطاهر (2007) . تصميم و تحليل التجارب . دار المريخ للنشر . المملكة العربية السعودية .

الجبوري , نيران عدنان عبد الكاظم (2016) . تحضير و تشخيص مضادين نانويين هجينين من الفانكوميسين والسبروفلوكساسين و تقييم كفاءتهما التثبيطية □ د بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة محلياً . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء .

الحمداني ، ميساء صالح مهدي (2015) . تحديد الكفاءة التثبيطية لمضادي الأوكسي تتراسايكلين والتايلوسين المحضرين نانوياً □ د البكتريا المسببة لالتهاب الضرع في الأبقار في محافظة كربلاء المقدسة . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء .

الخفاجي ، نوره مجيد حميد (2015) . تحضير مركبين نانويين من الكلور هكسدين و حامض التانيك و تحديد فعلهما المضاد للأحياء المجهرية المعزولة من مر □ ي الحروق في محافظة كربلاء المقدسة . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء .

سلفرشتاين (1981) . التشخيص الطيفي للمركبات العضوية . ترجمة عوض , هادي كاظم , حسين , فهد علي , والعزاوي , صبحي صالح . مراجعة باسل هاشم / جامعة بغداد .

المص-ادر الانكليزية :

- Abdeen, R.** and Salahudeen, N. (2013). Modified Chitosan-Clay Nanocomposite as a Drug Delivery System Intercalation and *In Vitro* Release of Ibuprofen. Journal of Chemistry. 1-9.
- Abraham, D.J.** (2003). Quinolone, in Burger's Medicinal Chemistry Drug Discovery. John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey. 582-587.
- Alberti, G.** and Constantino, U. (1996). In: Comprehensive Supramolecular Chemistry: Solid-State Supramolecular Chemistry: Two- and Three-Dimensional Inorganic Networks. Pergamon-Elsever; Oxoid, UK. 7:1-23.
- Anquetin, G.;** Greiner, J.; Mahmoud, N.; Santillana H.; Gozalbes, R.; Farhati, K.; Derouin, F.; Aubry, A.; Cambau, E. and Vierling, P. (2006). Design, synthesis and activity against *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* spp., and *Mycobacterium tuberculosis* of new 6-fluoroquinolones. Eur J Med Chem. 41:1478–1493.
- Appelbaum, P.C.** (1999). Quinolone activity against anaerobes. Drugs. 58: 60-64.
- Appelbaum, P.C.** and Hunter, P.A. (2000). The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. Int J Antimicrob Agents.16(1):5-15.
- Arizaga, G.G.C.;** Gardolinski, J.E.F.d.C.; Schreiner, W.H.and Wypych, F. (2009) . Intercalation of an oxalatoxonioabate complex into

- layered double hydroxide and layered zinc hydroxide nitrate. Journal of Colloid and Interface Science. 330:352–358.
- Armbruster**, C.E. and Mobley, H.L. (2012). Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. Nat. Rev. Microbiol. 10(11):743-754.
- Arulraj**, J. (2013). Intercalation of Organic aniOns and Intracrystalline Reactions in Anionic Clays. Ph.D. Thesis, Manipal University, Manipal, India.
- Auerbach**, S.M.; Carrado, K.A. and Dutta, P.K. (2004). Handbook of Layered Materials: Chapter 8, Layered Double Hydroxides; Dekker, M., Ed.; CRC Press: New York, NY, USA.
- Bagga**, P.; Ansari, T.M.; Siddiqui, H.H.; Syed, A.; Bahkali, A.H.; Rahman, M.A. and Khan, M.S. (2016). Bromelain capped gold nanoparticles as the novel drug delivery carriers to aggrandize effect of the antibiotic levofloxacin. EXCLI Journal. 15:772-780.
- Banerjee**, D. and Stableforth, D. (2000). The treatment of respiratory *pseudomonas* infection in cystic fibrosis: what drug and which way? Drugs. 60(5): 1053-1064.
- Barahuie**, F.; Hussein, M.; Fakurazi, S. and Zainal, Z. (2014). Development of drug delivery systems based on layered hydroxides for nanomedicine. Int. J. Mol. Sci. 15: 7750-7786.
- Bashi**, A.M.; Haddawi, S.M. and Mezaal, M.A. (2013). Layered Double Hydroxide Nanohybrid Intercalation with Folic Acid Used as

Delivery System their Controlled Release Properties. *Arab J Sci Eng* . 38:1663-1680.

Beherei, H.H.; El-Magharby, A. and Abdel-Aal, M.S. (2011). Preparation and characterization of novel antibacterial nano-ceramic-composites for bone grafting. *Der Pharma Chemica*. 3(6):10-27.

Bisht, N.; Goswami, L. and Kothiyal, P. (2014). Preparation and evaluation of in-situ oral topical gel of levofloxacin by using combination of polymers. *Indian Journal of Drugs*. 2(4): 142-151.

Blondeau, J.M. (1999). Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clin. Ther*. 21(1):3-40.

Borm , P.J.A. and Kreyling, W. (2004). Toxicological hazards of inhaled nanoparticules-potential implications for drug delivery. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 4(6):1-11.

Brenyah, R.C.; Ephraim, R.K.D.; Jnr, B.A.E. and Asamoah, J. (2014). Bacterial Profile of Diabetic Foot Ulcers of Patients Visiting a Specialist Diabetic Clinic at Komfo Anokye Teaching Hospital, Kumasi, Ghana. *British Journal of Medicine and Medical Research*. 4(27): 4501-4510.

Bush, K.; Courvalin, P.; Dantas, G.; Davies, J.; Eisenstein, B.; Huovinen, P.; Jacoby, G.A.; Kishony, R.; Kreiswirth, B.N.; Kutter, E.; Lerner, S.A.; Levy, S.; Lewis, K.; Lomovskaya, O.;

- Miller, J.H.; Mobashery, S.; Piddock, L.J.; Projan, S.; Thomas, C.M. and Tomasz, A . (2011). Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 9: 894-896.
- Buzea, C.;** Pacheco, I. and Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases.*2:17-71.
- Cavani, F.;** Trifiro, F.; and Vaccari, A. (1991). Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. *Catal.* 11:173–301.
- Chai, H.;** Xu, X.; Lin, Y.; Evans, D.G. and Li, D. (2009). Synthesis and UV absorption properties of 2,3-dihydroxynaphthalene-6-sulfonate anion-intercalated Zn–Al layered double hydroxides. *Polymer Degradation and Stability.* 94:744–749.
- Chan, C.H.;** Chen, J.K. and Chang, F.C. (2008). Specific DNA extraction through fluid channels with immobilization of layered double hydroxides on polycarbonate surface. *Sens. Actuators B Chem.* 133: 327–332.
- Cheng, D.R. ;** Zhu, S. Y. ; Yin, Z. H.; Ding,W.W.; Mu, Z.X. ; Su, Z.R. and Sun, H.C. (2010) . Prevalence of bacterial infection responsible for bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 4(11): 1110-1116.
- Collier, M.** (2003). Understanding wound inflammation. *Nurs. times* 99(25): 63-64.

- Credito**, K.L.; Jacobbs, M.R. and Appelbaum, P.C. (2003). Time-kill studies of the antianaerobe activity of garenoxacin compared with those of nine other agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(4): 1399-1402.
- Croom**, K.F. and Goa, K.L. (2003). Levofloxacin: a review of its use in the treatment of bacterial infections in the United States. *Drugs.* 63(24): 2769-2802.
- Crossley**, K.B. and Archer, G.L. (1997). *The Staphylococci in human disease.* Churchill Livingstone.
- Dancey**, J.E. and Chen, H.X. (2006). Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nat Rev Drug Discovery.* 5: 649 – 659.
- De Almeida**, M.V.; Saraiva, M.F.; De Souza, M.V.; Da Costa, C.F.; Vincente, F.R. and Lourenco, M.C. (2007). Synthesis and antitubercular activity of lipophilic moxifloxacin and gatifloxacin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 17:5661–5664.
- De La Maza**, L.M.; Pezzlo, M.T. and Baron, E.J. (1997). *Color Atlas of Diagnostic Microbiology.* Mosby-year book, Inc. USA.
- Dollery**, C. (1999). Norfloxacin, in *Therapeutic Drugs*, Churchill Livingstone, , Harcourt Brace and Co. Ltd., London. N137-N140.

- Dwedat, R.;** Ismail, D.K. and Abdalbaky, A. (2015). Diabetic foot Infection: Microbiological Causes with Special Reference to their Antibiotic Resistance Pattern. Egyptian Journal of Medical Microbiology. (3): 95-102.
- Egorove, N.S.** (1985). Antibiotics a scientific approach. Mir Publishers, Moscow.
- Enoch, D. A.;** Simpson. A. J.; and Kibbler, C. C. (2004). Predictive value of isolating *Pseudomonas aeruginosa* from aerobic and anaerobic blood culture bottles. Journal of Medical Microbiology, 53(11): 1151-1154.
- Farkosh, S. M.** (2008).Extended-Spectrum, beta-lactamase producing Gram negative Bacilli. JHH HEIC.
- Feldman, M.;** Bryan, R.; Rajan, S.; Scheffler, L.; Brunnert, S.; Tang, H. and Prince, A. (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. Infection and Immunity. 66(1): 43-51.
- Feng, Y.;** Li, D.; Wang, Y.; Evans, D.G. and Duan, X. (2006) . Synthesis and characterization of a UV absorbent-intercalated Zn–Al layered double hydroxide. Polymer Degradation and Stability. 91:789–794.
- Fischbach, M.A.** and Walsh, C.T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. Science. 325: 1089 – 1093.

- Francia, D.G.; Ferrara, L.V.; Manzo, S. and Chiavarini, S. (2005).**
Towards a label-free optical porous silicon DNA sensor. *Biosens. Bioelectron.* 21: 661–665.
- Guan, J.; Cheng, P.; Huang, S.; Li, Z.; Wu, J.; Geo, P. and Zhang, H. (2012).** Mathematic simulating of levofloxacin release from chitosan nano/ microparticles. *Przeglad elektrotechniczny.* 2033-2039.
- Guneyssel, O.; Onur, O.; Erdede, M. and Dehizbasi, A. (2009).** Trimethoprim/sulfa methoxazole resistance in urinary tract infections. *J. Emerg. Med.* 36: 338.
- Hancevic, J.; Goce, F.; Bozicovv. (2002).** Diabetic foot. Zagreb: Medicinska naklada.
- Hart, T and Shears, P. (2004).** Color atlas of medical microbiology. 2nd edn. Mosby, an imprint of Elsevier Limited .
- Hefni, A.A.; Ibrahim, A.R.; Attia, K.M.; Moawad, M.M.; El-ramah, A.F.; Shahin, M.M.; Al-Molla, M. and Abd Al-Satar, L. (2013).** Bacteriological study of diabetic foot infection in Egypt. *Journal of the Arab Society for Medical Research.* 8:26–32.
- Hena, J.V. and Growther, L. (2010).** Studies on bacterial infections of diabetic foot ulcer. *AFR. J. CLN. EXPER. MICROBIOL.* 11(3): 146-149.
- Hett, A. (2004).** Nanotechnology: small matters, many unknown. Swiss Reinsurance Company, Switzerland. 3-55.

- Heyman, D.** (2004). Control of Communicable Diseases Manual. 18th edn. American Public Health Association, Washington DC.
- Hooper, D.C.** (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. Clin. Infect. Dis. 31: 24-28.
- Hopkins, A.L.** (2008). Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. Nat Chem Biol. 4: 682 – 690.
- Horikoshi, S.** and Serpon, N. (2013). Introduction to Nanoparticles. Microwaves in Nanoparticle Synthesis, First Edition.
- Hurst, M.; Lamb, H.M. and Scott, L.J.** (2002). Levofloxacin: an update review of its use in the treatment of bacterial infections. Drugs. 62(14): 2127-2167.
- Jacobsen, S.M.; Stickler, D.J.; Mobley, H.L. and Shirliff, M.E.** (2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clin. Microbiol. Rev. 21:26-59.
- Jin-gou, J.; Jing-Fen, Z.; Shi-Lei, H.; Dan-Jun, W. and Yi, X.** (2012). Preparation, Characterization of Hydrophobic drug in Combine loaded Chitosan/ Cyclodextrin/ Trisodium Citrate Nanoparticles and *in vitro* release study. Chem RES Chinese University. 28(1): 166-170.
- Joshi, M.; Bhattacharyya, A. and Ali, S.** (2008). Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles. Indian Journal of Fibre and Textile Research. 33: 304-317.
- Kahn, C.R. and Weir, G.C.** (1994). Joslin's diabetes mellitus, 13th ed. Media: Williams and Wilkins.

- Kaper, J. B.;** Nataro, J. P. and Mobley H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:123–140.
- Kavitha, Y. and Mohiddin, S.K.** (2014). Bacteriological profile of diabetic foot infections in a tertiary care teaching hospital. *Indian Journal of Basic and Applied Medical Research.* 3(4): 260-266.
- Kayser, F. H.;** Bienz, K. A.; Eckert, J. and Zingernagel, R. M. (2001). *Medical Microbiology* (10th ed.). Stuttgart, Germany: Georg Thieme Verlag.
- Keith, C.T.;** Borisy, A.A. and Stockwell, B.R. (2005). Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nat Rev Drug Discov.* 4: 71–78.
- Kengne, A.P.;** Choukem, S.P.; Dehayem, Y.M.; Simo, N.L.; Fezeu, L.L. and Mbanya, J.C. (2006). Diabetic foot ulcers in Cameroon: can microflora prevalence inform probabilistic antibiotic treatment? *J Wound Care.* 15(8): 363-366.
- Klemkaite, K.;** Prosycevas, I.; Taraskevicius, R.; Khinsky, A. and Kareiva, A. (2011). Synthesis and characterization of layered double hydroxides with different cations (Mg, Co, Ni, Al), decomposition and reformation of mixed metal oxides to layered structures. *Cent. Eur. J. Chem.* 9(2) : 275- 282.
- Kohler, M. and Fritzsche, W.** (2004). *Nanotechnology, an introduction to nanostructuring techniques.* Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim. 1-3.

- Kumar, S.K.**; Bhowmik, D.; Chiranjib, B.; Chandria, M. and Tripathi, K.K. (2010). Innovations in sustained release drug delivery system and its market opportunities. *J. Chem. Pharm. Res.*(2) : 349-360.
- Kumar, S.** and Varela, M.F. (2013). Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.).
- Ladewig, K.**; Xu, Z.P. and Lu, G.Q. (2009). Layered double hydroxide nanoparticles in gene and drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6:907–922.
- Latip, A.F.A.**; Hussein, M.Z.; Stansals, J.; Wong, C.C. and Adenan, R. (2013). Release behavior and toxicity profiles towards A549 cell lines of Ciprofloxacin from its layered zinc hydroxide interaction compound. *Chemistry Central Journal.* (7): 119.
- Lavery, L.A.**; Reinkhart, Y.M.; Dulph, L.B. and Gohensen, M.Y. (2007). Preventing diabetic foot ulcer recurrence in high-risk patients. *Diabetes care.* 30: 14-20.
- Lavery, L.A.**; Armstrong, D.G. ; Wunderlich, R.P. ; Mohler, M.J.; Wendel, C.S. and Lipsky, B.A. (2006). Risk factors for foot infections in individuals with diabetes . *diabetes care.* 29: 1288-1293.

- Lin, M.S.; Sun, P. and Yu, H.Y. (1998).** Evaluation of buffering capacity and acid neutralizing-pH time profile of antacids. *J. Formos. Med. Assoc.* 97: 704–710.
- Lipsky, B.A. (2004).** International consensus group on diagnosing and treating the infected diabetic foot. A report from the international consensus on diagnosing and treating the infected diabetic foot. *Diabetes Metab. Res. Rev.* (20):68–77.
- Lipsky, B.A.; Berendt, A.R.; Deery, H.G.; Embil, J.M.; Joseph, W.S.; Karchmer, A.W.; Lefrock, J.L.; Lew, D.P.; Marder, J.T.; Norden, C.; and Tan, J.S. (2004).** Diagnosis and treatment of diabetic foot infection. *Clinical Infectious Diseases.* 39(1): 885-910.
- Liu, P. V. (1974).** Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Infectious Diseases.* 130 (0): 94-9.
- Liu, W.T. and Zhu, L. (2005).** Environmental microbiology-on-a-chip and its future impacts. *Trends Biotechnol.* (23): 174–179.
- Macfaddin, J.F. (2000).** Biochemical tests for identification of medical Bacteria .1sted., the Williams and Wilkins Baltimore, USA.
- Manisha, J.; Mitesh, P.H.; Nidhi, S.K.; Dhara, M.J. and Vegad, M.M. (2012).** Spectrum of microbial flora in diabetic foot ulcer and its antibiotic sensitivity pattern in tertiary care hospital in Ahmedabad, Gujarat. *National Journal of Medical Research.* 2(3): 354-357.

- Markey, B.;** Leonard, F.; Archambault, M.; Cullinane, A. and Maguire, D. (2013). Clinical veterinary microbiology. 2nd ed. Mosby Elsevier.
- Martin, J. M.;** Zenilman, J. M. and Lazarus, G. S. (2010). Molecular microbiology: new dimensions for cutaneous biology and wound healing. J Invest Dermatol. 130: 8–48.
- Maxwell, A.** (1992). The molecular basis of quinolone action. J. Antimicrob. Chemother. 30: 409-414.
- Michael, R.;** Franklin.; Donald, N. and Franz. (2000). Drug Absorption, Action and Disposition. Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th ed. Alfonso, R.G. Philadelphia College of Pharmacy and Science. 858-893.
- Missioni, E.;** Kalenic, S.; Vukelic, M.; Syo, D.D.; Belicza, M. and Vazic-Babic, V. (2005). Candida infections of diabetic foot ulcers. Original Scientific Paper. 29-35.
- Mobley, H.L.** and Belas, R. (1995). Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. Trends in Microbiology. 3(7): 280-284.
- Morello, J.A.;** Mizer, H.E. and Granato. (2006). Laboratory manual and workbook in microbiology applications to patient care. 18th.ed. the McGraw-Hill Companies, Inc., New York: 95-99.
- Morgenstein, R.M.;** Szostek, B.; Rather, P.N. (2010). Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. FEMS Microbiol. Rev. 34(5):753-763.

- Namasivayam, S.K.** and Jams, J. (2015). Biocompatible polymer chitosan stabilized silver nanoparticles-Azithromycin (CS-AgNp-AZ) and levofloxacin (CS-AgNp-LF) drug nano conjugate fabricated wound dressing for the improved antibacterial activity against human pyogenic bacteria. Scholar Research Library. 7 (2):100-111.
- Namasivayam, S.K.;** Flora, A.M.; Nandhini, S.; Hussain, S.N. and Gnanaraj, S. (2016). Starch Based Coating Influence on Antibacterial Activity and *in-vitro* Drug Release Profile of Silver Nanoparticles Loaded Levofloxacin Nano Drug Conjugate (AgNp-LF). Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 7(5): 2242.
- Nataro, J. P.** and Kaper, J. B. (1998).a. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11:142–201.
- Nichols, W. K.**(2000). Oral Solid Dosage Form. In: Remington: The Science and Practice of Pharmacy.20th ed. Alfonso, R.G. Philadelphia College of Pharmacy and Science. 1507-89.
- Nikalje, A. P.** (2015). Nanotechnology and its Applications in Medicine. Medicinal chemistry. 5(2): 081-089.
- Nowack, B.** and Bucheli, T.D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environ Pollut. 150:5–22.
- Okpala, C. C.** (2013) . Nanocomposites – An Overview.International Journal of Engineering Research and Development. (8) :17-23.

- Osariemen, I.J.;** Olowu, S.S.; Adevbo, E.; Omon, E.E.; Victoria, O.; Imuetinyan, E.J. and Adesuwa, E. (2013). Aerobic Bacteria Associated With Diabetic Wounds In Patients Attending Clinic In A Rural Community In Nigeria. *Global Research Journal of Microbiology*. 3(1): 8 –12.
- Pandaya, H. and Chandak, N.** (2016). Biosynthesis, Characterization and Study of Antimicrobial Activity of Copper and Silver Nanoparticles. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 11(6): 01-12.
- Pandey, S.N.** (2003). Antimicrobial Agents-Sulphonamides and Quinolones, in *A Text Book of Medicinal Chemistry (Synthetic and Biochemical Approach)*. Bhelpur: Mahavir Press. 547-585.
- Parida, K.M. ; Sahoo, M. and Singha, S.** (2010) . Synthesis and characterization of a Fe (III)- Schiff base complex in a Zn-Al LDH host for cyclohexane oxidation . *Journal of Molecular Catalysis A : Chemical*. 329 : 7-12 .
- Park, D.H.;** Hwang, S.J.; Oh, J.M.; Yang, J.H. and Choy, J.H. (2013). Polymer-inorganic supramolecular nanohybrids for red, white, green, and blue applications. *Prog. Polym. Sci.*, (38) 1442–1486.
- Patil, P. and Patil, B.** (2015). Pattern of aerobic bacterial infection of diabetic foot. *Journal of Evolution of Medical and Dent Science*. 4(70): 12164-12168.

- Patrick, G.L.** (2003). Antibacterial agents, in *An Introduction to Medicinal Chemistry*. Oxford: Oxford University Press. 379-435.
- Perim, M.C.; Borges, J.D.C.; Celeste, S.R.C.; Orsolin, E.D.F.; Mendes, R.R.; Mendes, G.O.; Ferreira, R.L.; Carreiro, S.C. and Pranchevicius, M.C.D.S.** (2015). Aerobic bacterial profile and antibiotic resistance in patients with diabetic foot infections. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48(5):546-554.
- Quinn, P. J.; Carter, M. E.; Markey, B. and Carter, G. R.** (2004). *Clinical veterinary microbiology*, Elsevier limited.
- Raja, B. and Rao, A.** (2013). Development and validation of novel HPLC method for simultaneous estimation of cefixime and moxifloxacin in combined tablet dosage form. *International journal of pharmacy*. 3(3): 621-627.
- Rajan, K. ; Verma, and Garg, S.** (2001). Current Status of drug delivery Technologies and future directions. *Pharmaceutical Technology on-Line*. 25 (2):1-14.
- Ramsden, J.J.** (2005). What is the nanotechnology ?. *Nanotechnology perceptions* .1: 3-17.
- Ranghar, S.; Sirohi, P.; Verma, P. and Agarwal, V.** (2014). Nanoparticle-based drug delivery systems: promising approaches against infections. *brazilian archives of biology and technology*. 57(2): 209-222.

- Ranjini, D.S;** Parthiban, S.; Kumar, G.P; and Mani, T.T. (2017). Development of levofloxacin loaded nano-niosomes as nanoscale drug delivery for effective treatment of tuberculosis. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. 6(4): 1819-1828.
- Remy, C.;** Essebe N.C.; Sotto, A. and Lavigne, J.P. (2016). *Staphylococcus aureus* Toxins and Diabetic Foot Ulcers: Role in Pathogenesis and Interest in Diagnosis. Toxins (Basel). 8(7): 1-20.
- Reynolds, P.E.** (1989). Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 8:943-50.
- Richard, J.L.;** Sotto, A. and Lavigne, J.P. (2011).New insights in diabetic foot infection. World J. Diabetes. 15:24–32.
- Rives, V.** (2001). Layered Double Hydroxides: Present and Future; Nova Science Publishers: Huntington, NY, USA.
- Roesch, P. L.;** Redford, P.; Batchelet, S. ; Moritz, R. L.; Pellett, S.; Haugen, B. J.; Blattner, F. R. and Welch, R. A. (2003). Uropathogenic *Escherichia coli* use d-serine deaminase to modulate infection of the murine urinary tract. Molec. Microbiol. 49:55–67.
- Rózalski, A.;** Sidorczyk, Z.; Kotelko, K. (1997). Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61(1):65-89.

- Ryan, K.J.** and Ray, C.G. (2004). Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases. 4th edn. McGraw Hill Publishers.
- Sarisaltik, D.;** Teksin, Z.S. (2007). Bioavailability File: Levofloxacin. FABAD J. Pharm. Sci. (32) : 197-208.
- Scholar, E.M.** (2003). Fluoroquinolones: Past, present and future of a novel group of antibacterial agents. Am. J. Pharm. Educ. 66:164-172.
- Sekhar, S.;** Vyas, N.; Unnikrishnan, M.; Rodrigues, G. and Mukhopadhyay, C. (2014). Antimicrobial susceptibility pattern in diabetic foot ulcer: a pilot study. Ann. Med. Health Sci. Res. 4(5):742-745.
- Shankar, M.;** Lavakumar, V.; NiranjaBabu, M.; Rajasekhar, R.V.; Nafees, S. and Lakshmiteja, T. (2013). Review – importance of nano technology in pharmaceutical preparation. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2(6): 4573-4581.
- Sharma, A.;** Kumar, A.D.; Dua, M.; Chhatwal, G.S. and Johri, A.K. (2012). Nano-technology for targeted drug delivery to combat antibiotic resistance. Expert Opin Drug Deliv. 9(11):1325-32.
- Silverstein, R.M. ;** Webster, F.X. and Kiemle, D.J.(2005). “Spectrometric Identification of organic compounds “ 7th Ed. John Wiley and Sons . INC. Printed in the United States of America .
- Singh, P.;** Prakash, D.; Ramesh, B.; Singh, N. and Manit, T. (2011). Biodegradable polymeric Microspheres as Drug Carriers – A Review. Indian Journal of noval drug delivery. 3 (2):70-82.

- Singleton, P.** and **Sainsbury, D.** (1978). Dictionary of medical microbiology. Churchill Livingstone Edinburgh. 26-30.
- Skoog, D.A.;** **Holler, E.J.** and **Nieman, T.A.** (1998) . Principles of instrumental analysis . Brooks Cole. 5th edition .
- Soni, K.** (2012). Fluoroquinolones: Chemistry and Action – A Review. Indo Global Journal of Pharmaceutical Science. 2(1): 43-53.
- Spichler, A.;** **Hurwitz, B.L.;** **Armstronge, D.G.** and **Lipsky, B.A.** (2015). Microbiology of diabetic foot infections : from Louis Pasteur to crime scene investigation . BMC Med . 13: 209.
- Srikanth, K.;** **Rama, V.M.G.;** **Manvi, S.R.** and **Devanna, N.** (2012). Particulate carrier systems : a review . Intrenational research journal of pharmacy. 3(11): 2230-8407.
- Stadelmann, W.K.;** **Digenis, A.G.** and **Tobin, G.R.** (1998). Impediments to wound healing. Am. J. Surg. 176 (2): 395-475.
- Subbenaik, S.C.** (2016). Physical and Chemical Nature of Nanoparticles. Springer International Publishing Switzerland. 15-27.
- Tansarli, G.S.;** **Athanasiou, S.** and **Falagas, M.E.** (2013). Evaluation of Antimicrobial Susceptibility of *Enterobacteriaceae* Causing Urinary Tract Infections in Africa. Antimicrob Agents Chemother. 57(8):3628- 2639.
- Tegeli, V.S. ;** **Torat ,Y.S. ;** **Chougule, G.K. ;** **Shivsharan, U .S. ;** **Gajeli, G.B.** and **Kumbhar, S.T.** (2010).Review on concepts and advances

- in prodrug .International journal of drug formulation research 1 (3):32-57.
- Tille**, P.M. (2014).Bailey and Scott's diagnostic microbiology.13th Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc.
- Tomalia**, D.A. (2004). Birth of a new macromolecular architecture: Dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry. Aldrichimica Acta. 37(2):39-57.
- Torpy**, J.M.; Alison, B. and Richard, M.G. (2005). Surgical wound infections. J A M A 294: 21-22.
- Trikeriotis**, M. and Ghanotakis, D.F. (2007). Intercalation of hydrophilic and hydrophobic antibiotics in layered double hydroxides. Int.J. Pharm. 332:176-184.
- Turhan**, V.; Mutluoglu, M.; Acar, A.; Hatipoğlu, M.; Önem, Y.; Uzun, G.; Ay, H.; Öncül, O. and Görenek, L. (2013). Increasing incidence of Gram-negative organisms in bacterial agents isolated from diabetic foot ulcers. J Infect Dev Ctries. 7(10):707-712.
- Tyagi**, M. and Tyagi, D. (2014). Polymer Nanocomposites and their Applications in Electronics Industry. International Journal of Electronic and Electrical Engineering.6: 603-608.
- Wahab**, N.H.H.; Samsudin, I.N.; Nordin, S.A.; Ahmad, Z.; Noor, L.A.M. and Devnani, A.S. (2015). Clinical presentation and microorganisms sensitivity profile for diabetic foot ulcers: a pilot study. Medical Journal Malaysia. 70(3): 182-187.

- Wang, A. Z.;** Langer, R. and Farokhzad, O. C. (2012) . Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annu. Rev. Med.*; 63:185–198
- Wang, Y. and Zhang, D. (2012) .** Synthesis, characterization, and controlled release antibacterial behavior of antibiotic intercalated Mg –Al layered double hydroxides. *Materials Research Bulletin.* 47: 3185–3194.
- Welch, R.A. (2006) .** The Genus *Escherichia*. *Prokaryotes.* 6:60–71.
- Wilczewska, A.Z. ;** Niemirowicz, K. ; Markiewicz, K.H. and Car, H. (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports.* 64: 1020-1037.
- Willcox, M. D. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* infection and inflammation during contact lens wear: a review. *Optometry and Vision Science : Official Publication of the American Academy of Optometry.* 84(4): 273-278.
- Wimer, S.M.;** Schoonover, L. and Garrison, M.W. (1998). Levofloxacin: a therapeutic review. *Clin Ther.* 20: 1049-1070.
- Worthington, R.J. and Melander, C. (2013).** Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends Biotechnol.* 31: 177 – 184.
- Xu, N.;** Cheng, H.; Xu, J.; Li, F.; Gao, B.; Li, Z.; Gao, C.; Huo, K.; Fu, J. and Xiong, W. (2017). Silver-loaded nanotubular structures enhanced bactericidal efficiency of antibiotics with synergistic effect *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Nanomedicine.* 12 (1): 731-743.

- Yang, Q.Z.;** Yang, J. and Zhang, C.K. (2006). Synthesis and properties of cordycepin intercalates of Mg-Al-nitrate layered double hydroxides. *IntJ.Pharm.* 326: 148-152.
- Zhang, K.;** Xu, Z.P.; Lu, J.; Tang, Z.Y.; Zhao, H.J.; Good, D.A. and Wei M.Q. (2014). Potential for Layered Double Hydroxides-Based, Innovate Drug Delivery Systems. *Int. J. Mol. Sci.* 15(5): 7409-7428.
- Zhao, W.H.;** Hu, Z.Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 39(1):79-101.
- Zubair, M .;** Malik, A.; Ahmad, J.; Rizvi, M.; Farooqui, K.J. and Rizvi, M.W. (2011). A study of biofilm production by gram-negative organisms isolated from diabetic foot ulcer patients. *3 (2):* 147-157.
- Zubair, M. ;** Malik , A. and Ahmad , J. (2015). Microbiology of diabetic foot ulcer with special reference to ESBL infections. *American Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 3(1): 6-23.

Summary

This study included the isolation and diagnosis of the most important species of bacteria responsible for the infection of diabetic foot ulcer . It also included the preparation and detection of hybrid nano compound , from the antibiotic levofloxacin .The inhibitory activity of the nano antibiotic was assessed against the isolated bacteria in this study also , the combination activity of the hybrid nano levofloxacin with free antibiotics Tieceoplanin and Cefixime was identified and the results showed the following :

As a total 43 samples were taken from diabetic foot ulcer patients hospitalized in Imam Al-Hussein Medical City in Sacred Kerbala Province, It had been obtained 10 isolates (26.3) % were *Proteus mirabilis* , , 9 isolates (23.7) % were *Staphylococcus aureus*, 4 isolates (10.5) % were *Escherichia coli*, 4 isolates (10.5) % was obtained from *Pseudomonas* spp. , 3 of them were *Pseudomonas flouresence* and one was *Pseudomonas aeruginosa* and two isolates (5.3) % of *Enterococcus faecalis* , *Raoultella terrigena* and one isolate (2.6) % of *Enterobacter cloacae* , *Acinetobacter baumannii* , *Providancia rettgeri* , *Burkholderia cepacia* , *Klebsiella pneumonia* , *Aeromonas salmonicida* , *Ochrobactrum anthropie* .

Levofloxacin antibiotic was used in preparation of the hybrid nano compound after intercalating on layers of double hydroxide (Mg/Al-LDH) . FT-IR spectrum studies has shown the appearance of specific chemical groups and the disappearance of others while the spectrum of x-

ray (XRD) has shown the appearance of new levels of diffraction in the spectrum of the hybrid nano antibiotic Mg/Al-LEV-LDH as compared to the spectrum of the Mg/Al-LDH, which indicate that the prepared compound under study is a nano hybrid compound . Results of the Atomic Force Microscope (AFM), has shown that the diameter of the particles of hybrid nano antibiotic was 94.83 nm.

The inhibitory activity of the hybrid nano antibiotic Mg/Al-LEV-LDH and the free antibiotic (Free LEV) has been studied and the results revealed followings:

The hybrid nano antibiotic has the highest inhibitory activity against the bacterial isolate *P. mirabilis* 13b with an inhibition diameter of 34.75 mm , while the inhibition diameter for the free antibiotic was 47 mm against the isolate 17a .

The hybrid nano antibiotic showed the highest inhibitory activity against the isolate *E. coli* 14b with an inhibition diameter of 13.75 mm , while the highest inhibition activity for the free antibiotic was against the same isolate with an inhibition diameter of 26.5 mm .

The hybrid nano antibiotic showed the highest inhibitory activity against the isolate *P. aeruginosa* 73 with an inhibition diameter of 41.5 mm , while the highest inhibition activity for the free antibiotic was against the same isolate with an inhibition diameter of 47.5 mm .

The highest inhibition activity for the hybrid nano levofloxacin was against the two isolates *S. aureus* 2 and 3 with an inhibition diameter of

36 mm, for each, while the highest inhibition activity for the free levofloxacin was against the isolate *S. aureus* 3 with an inhibition diameter of 43 mm .

The combination between the hybrid nano antibiotic LEV-LDH prepared in this study and free antibiotic Cefixime exhibited synergistic effect against some *P. mirabilis* isolates while antagonistic effect has shown against the other isolates .

The combination between the hybrid nano antibiotic LEV-LDH prepared in this study and free antibiotic Teicoplanin exhibited synergistic effect against some *S. aureus* isolates while antagonistic effect has shown against the other isolates .

**Ministry of Higher Education
& Scientific Research
University of Kerbala/College of Science
Department of Biology**



**Preparation and Characterization of Nanohybrid Antibiotic
from Levofloxacin and Evaluation its Inhibitory Efficiency
against Bacteria Isolated from Diabetic Foot Ulcer**

A thesis

Submitted to the council of the

College of Science – University of Kerbala

In partial of fulfillment of requirements for degree of Master of Science in Biology

By

Sara Mohsen Kadhim AL-Hussaini

B.Sc. College of Science / Kerbala University 2015

Supervised by

Prof.

Dr. Ali Abdul Kadhim Al-Ghanimi

2017 AD

1438 AH