



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء

كلية العلوم / قسم علوم الحياة

عزل وتشخيص بعض انواع البكتريا المسببة لإصابات المسالك
التنفسية وتقييم كفاءة تثبيطها بأستخدام المضادين أزيثرومايسين
وسبروفلوكساسين المحضرين نانويّاً

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة

من قبل

نوره غانم جبر الفتلاوي

بكالوريوس علوم حياة- جامعة كربلاء 2015

إشراف

أ.د. علي عبد الكاظم الغانمي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا
إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

سورة «البقرة» الآية (32)

إقرار المشرف

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

التوقيع:

الاسم: د. علي عبد الكاظم جاسم

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ: / /

توصية رئيس قسم علوم الحياة

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

التوقيع :

الاسم: د. خالد علي حسين

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ: / /

اقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة ,نشهد باننا قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ (عزل وتشخيص بعض انواع البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية وتقييم كفاءة تثبيطها باستخدام المضادين أزيثرومايسين وسبروفلوكساسين المحضرين نانويًا) وقد ناقشنا الطالبة (نوره غانم جبر) في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 2021/9/6 ونرى انها جديرة لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة بتقدير (امتياز).

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع :

الاسم : د. حيدر صباح كاظم

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : كلية الطب / جامعة النهرين

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. عادل عطيه عبد علي

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

مكان العمل : كلية الطب البيطري / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. وفاء صادق محسن

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2021

عضو اللجنة (مشرف)

التوقيع :

الاسم : د. علي عبد الكاظم جاسم

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : كلية العلوم / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2021

مصادقة عميد كلية العلوم / جامعة كربلاء

التوقيع :

الاسم : د. جاسم حنون هاشم العوادي

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ : / / 2021

شكر و تقدير

الحمد لله رب العالمين و الصلاة والسلام على أشرف الأنبياء و المرسلين سيدنا محمد وعلى آله و صحبه و من تبعهم باحسان الى يوم الدين ... و بعد :

فاتي أحمد الله تعالى وأسجد له شكراً على ماغمرني به من سداد و توفيق حتى تم إكمال هذه الرسالة فله سبحانه الفضل و المنة ...

يطيب لي بعد ان من الله عليّ بإنجاز هذه الدراسة أن أتقدم بجزيل الشكر و العرفان الى أستاذي الفاضل الدكتور علي عبد الكاظم الغانمي لأقترحه موضوع الرسالة و الذي لم يخل عليّ يوماً بوقته و مجده و فكره و آرائه النيرة و ملاحظاته و توجيهاته السديدة و نصائحه القيمة التي كان لها - بعد الله - أكبر الأثر في إتمام هذا البحث وإخراجه بهذه الصورة ، فجزاه الله عني خير الجزاء و متعهُ بوافر الصحة و العافية .

و يطيب لي أن اتقدم بمزيد من الشكر و التقدير إلى عمادة كلية العلوم و رئاسة قسم علوم الحياة لأتاحة الفرصة لي لأكمال دراستي.

كما أتقدم بالشكر و الامتنان إلى منتسبي مختبر الصحة العامة إدارة و منتسبين و اخص بالذكر السيدة أميرة محمد جبر و السيد علي محمد سلمان ، جعل الله ثمرة ذلك في ميزان حسناتهم .

ولا يفوتني أن أتقدم بخالص أمتناني و تقديري للدكتور علاء عبد الحسين الدعيمي لتفضله بمساعدته في التحليل الاحصائي الذي تطلبه البحث . كما يطيب لي أن اتقدم بخالص الشكر و التقدير للدكتور زيد حسن عبود / كلية العلوم / قسم الكيمياء لمساعدته لي في تفسير بعض الفحوصات الطيفية في هذه الدراسة .

ولا يسعني في هذا المقام إلا أن اتقدم بكل معاني الشكر و العرفان بالجميل لمن لا أستطيع أن أوفي حقهم ألى و الذي زوجني على كل ما أسهها به من المعاونة و التشجيع حتى أكمل هذا العمل ، داعيةً من الله العلي القدير أن يطيل في عمرهم و يديم عليهم نعمة الصحة و العافية .

و أخيراً بالغ تقديري لكل من ساعدني و أعانني في انجاز هذه الرسالة ، فلهم في النفس منزلة و ان لم يسعف المقام ذكرهم ، فهم أهل للفضل و الخير و الشكر .

الباحثة

الإهداء

الى منبع العلم وحامل رسالة السماء ، النور الذي أهتدى الخلق به محمد المصطفى صلى الله عليه وعلى آل بيته الطاهرين وأصحابه
المنتجبين ...

إلى من كللّه الله بالهبة والوقار .. إلى من علمني العطاء بدون إنتظار .. إلى من أحمل أسمه بكل إفتخار ..

والدي العزيز

إلى من تحت قدمها تكمن الجنة .. إلى معنى الحب وإلى معنى الحنان والتفاني ..

أمي الحبيبة

إلى من جعل ربي بيني وبينه مودةً ورحمة .. إلى أسمى رموز الإخلاص والوفاء .. إلى رفيق الدرب .. إلى من ساندني وخطى

معي خطواتي

زوجي العزيز

إلى من رافقوني في السراء والضراء .. وبهم أستمد القوة والعزيمة ..

إخوتي وأخواتي

إلى زينتني في الحياة الدنيا .. إلى قرة عيني .. إلى من أرى التفاؤل بعينهم والسعادة في ضحكهم ..

أولادي

نوره

الخلاصة

Summary

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة عزل وتشخيص أهم أنواع البكتيريا المسببة لأصابات المسالك التنفسية وتم تشخيص البكتيريا المعزولة بالطرائق التقليدية والجزيئية كما تضمنت أيضا تحضير وتشخيص مركبين نانويين هجينين من المضادين أزيثرومايسين و سيبروفلوكساسين . تم تقييم الفعالية التثبيطية للمضادين النانويين المحضرين اعلاه ضد البكتيريا المعزولة في هذه الدراسة وقد أظهرت النتائج ما يأتي :

من مجموع 60 عينة مأخوذة من إصابات المسالك التنفسية لمرضى الجهاز التنفسي الراقدين في مستشفى الإمام الحسين (عليه السلام) في محافظة كربلاء المقدسة للفترة من 2019 /11/1 ولغاية 2020/3/ 1 ، تم الحصول على 52 عزلة منها 48 عزلة بكتيرية و 4 عزلات خمائر ، أشتملت على 12 عزلة (23 %) من بكتيريا *Klebsiella Pneumoniae* و 14 عزلة (26.9%) من جنس *Streptococcus* كانت 4 منها (7.7%) لكل من *Streptococcus agalactiae* و *Streptococcus pneumoniae* و 3 (5.7%) من *Streptococcus pyogenes* و 2 (3.8%) من *Streptococcus salivereus* و واحدة منها (1.9%) من *Streptococcus viridans* و 7 عزلات (13.4%) من بكتيريا *Sphingomonas sp.* و 4 عزلات (7.7%) لكل من بكتيريا *Staphylococcus aureus* و *E.coli* وخميرة *candida albicans* و 3 عزلات (5.7%) من *Pseudomonas aeruginosa* وعزلتين (3.8%) من كل من *Entreococcus faecium* و *Enterobacter aerogenes* .

أستخدم المضاد أزيثرومايسين في تحضير مركب نانوي هجين بعد تحميل المضاد على أكسيد الزنك. وقد أوضحت نتائج الفحص بمطيافية الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) حصول إنزياح في ترددات بعض المجاميع الكيميائية نحو ترددات عالية وأخرى واطئة . كما كشفت مطيافية الأشعة السينية (XRD) عن ظهور مستويات حيود جديدة في طيف المضاد النانوي الهجين Azi-ZnO مقارنة بطيف الحامل أكسيد الزنك مما يشير إلى أن المضاد المحضر قيد الدراسة مضاد نانوي هجين . وأتضح من نتائج الفحص بمجهر القوة الذرية (AFM) ان معدل أبعاد أقطار دقائق المضاد النانوي الهجين Azi-ZnO بلغت 51.58 نانوميتر . اما الفحص باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) فقد كشف عن ظهور أشكال هندسية منتظمة فضلا عن تكون تراكيب

ذات مسامية عالية عند تكون المضاد النانوي الهجين Azi- ZnO الناتج عن التفاعل المباشر لطبقات أكسيد الزنك مع المضاد Azithromycin الحر مما يدل على نجاح اقحام المضاد بين طبقات أكسيد الزنك . أما التحليل بمطيافية (EDS) فقد اثبت وجود عناصر الزنك والاكسجين والكربون في تركيب المضاد النانوي الهجين Azi-ZnO مما يدل على نجاح اقحام المضاد الحر بين طبقات أكسيد الزنك وبالتالي تكوين مضاد نانوي هجين جديد .

أستخدم المضاد سيبروفلوكساسين أيضاً في تحضير مركب نانوي هجين بعد تحميل المضاد على أكسيد المغنيسيوم . وقد أوضحت نتائج الفحص بمطيافية الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) و مطيافية الأشعة السينية (XRD) أن المضاد المحضر قيد الدراسة مضاد نانوي هجين . وأتضح من نتائج الفحص بمجهر القوة الذرية (AFM) ان معدل أبعاد أقطار دقائق المضاد النانوي الهجين Cip-MgO بلغت 77.35 نانوميتر . اما الفحص باستخدام المجهر الالكتروني الماسح (SEM) فقد كشف عن ظهور أشكال شبيهة بقطع الإسفنج الرقيقة فضلا عن تكون تراكيب ذات مسامية عالية عند تكون المضاد النانوي الهجين Cip- MgO الناتج عن التفاعل المباشر لطبقات أكسيد المغنيسيوم مع المضاد Ciprofloxacin الحر مما يدل على نجاح اقحام المضاد بين طبقات أكسيد المغنيسيوم . أما التحليل بمطيافية EDS فقد اثبت وجود عناصر المغنيسيوم والاكسجين والكربون في تركيب المضاد النانوي الهجين Cip-MgO مما يدل على نجاح اقحام المضاد الحر بين طبقات أكسيد المغنيسيوم وبالتالي تكوين مضاد نانوي هجين جديد .

دُرست الفعالية التثبيطية للمضادين النانويين المحضرين في هذه الدراسة ضد عزلات بكتريا *K.pneumonia* المعزولة في هذه الدراسة أيضاً . وقد أظهرت النتائج ما يأتي :

أمتلك المضاد النانوي الهجين Azi-ZnO أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلتين *K.p5* و *K.p11* بمعدلات أقطار تثبيط بلغت (29.25 و 28.25) ملم ، بينما كانت العزلات *K.p 4* و *K.p7* و *K.p10* و *K.p11* و *K.p12* هي الأكثر تأثراً بالفعل التثبيطي للمضاد Azi-Free بأقطار تثبيط بلغت (31.5 و 31.5 و 32 و 32.5 و 31.5) ملم ، على التوالي .

أبدى المضاد النانوي الهجين Cip-MgO أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلات *K.p 3* و *K.p 7* و *K.p 9* و *K.p 10* و *K.p 11* و *K.p 12* بأقطار تثبيط بلغت (32.5 و 32.5 و 32.5 و 33 و 33.25 و 34) ملم ، على التوالي ، فيما كانت أعلى فعالية تثبيطية للمضاد سيبروفلوكساسين الحر ضد العزلات البكتيرية (*K.p10* و *K.p11* و *K.p12*) بأقطار تثبيط (34.5 و 35 و 35) ملم ، على التوالي .

دُرست الفعالية التثبيطية للمضادين النانويين المحضرين في هذه الدراسة ضد عزلات بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام المعزولة في هذه الدراسة أيضاً . وقد أظهرت النتائج ما يأتي :

أبدى المضاد النانوي الهجين Azi-ZnO أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلة البكتيرية *S . pneumonia 1* بقطر تثبيط بلغ 29.75 ملم في حين كانت أعلى فعالية للمضاد الحر ضد العزلات البكتيرية *E . faecium 1* و *S . pneumonia 1* و *S . pneumonia 4* بأقطار تثبيط بلغت (30.5 و 31.5 و 30.5) ملم ، على التوالي . بينما أبدى المضاد سيبروفلوكساسين بنوعيه الحر والنانوي أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلة البكتيرية *S . agalactia 4* بقطري تثبيط (30 و 29) ملم ، على التوالي .

قائمة المحتويات

| الصفحة | المحتويات | التسلسل |
|--------|--|-----------|
| 1 | المقدمة | |
| | استعراض المراجع | -1 |
| 4 | الجهاز التنفسي (Respiratory system). | 1-1 |
| 5 | إصابات المسالك التنفسية الحادة , (Acute Respiratory Tract Infections , ARTIs). | 2-1 |
| 6 | أهم الأنواع البكتيرية المسببة لأصابات المسالك التنفسية | 3-1 |
| 6 | بكتريا <i>Klebsiella pneumoniae</i> . | 1-3-1 |
| 6 | الصفات العامة لبكتريا <i>K. pneumoniae</i> . | 1-1-3-1 |
| 7 | عوامل ضراوة بكتريا <i>K. pneumoniae</i> . | 2-1-3-1 |
| 8 | جنس <i>Streptococcus</i> . | 2-3-1 |
| 9 | تصنيف بكتريا <i>Streptococcus</i> | 1-2-3-1 |
| 10 | المضادات الحيوية " ماکروليدات " (Macrolides) . | 4-1 |
| 13 | المضاد أزيثرومايسين (Azithromycin) . | 1-4-1 |
| 14 | المضادات " فلوروكوينولونات " (Fluoroquinolones). | 5-1 |
| 15 | المضاد سبروفلوكساسين (Ciprofloxacin). | 1-5-1 |
| 17 | التقنية النانوية (Nanotechnology) . | 6-1 |
| 18 | الدقائق النانوية (Nanoparticles) . | 1-6-1 |
| 18 | تصنيع الدقائق النانوية . | 1-1-6-1 |
| 18 | الدقائق النانوية الفلزية (Metal Oxides Nanoparticles). | 2-1-6-1 |
| 19 | أوكسيد المغنيسيوم (Magnesium Oxide , MgO) | 1-2-1-6-1 |
| 21 | أوكسيد الزنك (Zinc Oxide , ZnO) | 2-2-1-6-1 |
| 21 | الدقائق النانوية كعوامل مضادة للأحياء المجهرية | 3-1-6-1 |

| | | |
|----|---|------------|
| 22 | التقنيات والأجهزة المستخدمة في تشخيص الدقائق النانوية | 4-1-6-1 |
| | المواد وطرائق العمل | -2 |
| 26 | المواد والأجهزة المستخدمة | 1-2 |
| 26 | الأجهزة المستخدمة والشركات المصنعة لها . | 1-1-2 |
| 27 | المواد الكيميائية والأوساط الزرعية المستخدمة والشركات المصنعة لها | 2-1-2 |
| 28 | العدد (Kits). | 3-1-2 |
| 29 | المواد التي يتم التخلص منها بعد الأستعمال والشركات المصنعة لها . | 4-1-2 |
| 29 | طرائق العمل | 2-2 |
| 29 | جمع عينات المسالك التنفسية . | 1-2-2 |
| 29 | الأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية | 2-2-2 |
| 31 | الكواشف والمحاليل المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية . | 3-2-2 |
| 33 | عزل وتشخيص البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية . | 4-2-2 |
| 33 | تمييز البكتريا الموجبة عن السالبة لصبغة غرام . | 1-4-2-2 |
| 35 | عزل وتشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام . | 2-4-2-2 |
| 35 | عزل وتشخيص بكتريا الـ <i>Klebsiella</i> | 1-2-4-2-2 |
| 36 | تشخيص البكتريا المعزولة بأستعمال جهاز الفايترك | 2-2-4-2-2 |
| 36 | عزل وتشخيص الأنواع الأخرى من البكتريا السالبة لصبغة غرام | 3-2-4-2-2 |
| 37 | عزل وتشخيص الأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة غرام . | 3-4-2-2 |
| 37 | عزل وتشخيص بكتريا <i>Streptococcus</i> | 1-3-4-2-2 |
| 37 | عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية <i>Staphylococcus</i> | 2-3-4-2-2 |
| 40 | عزل وتشخيص بكتريا <i>Enterococcus</i> . | 3-3-4-2-2 |
| 40 | اختبار حساسية البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية للمضادات الحيوية بأستعمال التركيز المثبط الأدنى MIC . | 5-2-2 |
| 41 | التشخيص الجزيئي لبكتريا <i>K. pneumoniae</i> . | 6-2-2 |

| | | |
|----|--|-----------|
| 41 | استخلاص الحامض الرابيوزي منقوص الأوكسجين (DNA) من يكتريا K. pneumoniae المعزولة . | 1-6-2-2 |
| 41 | الأستخلاص بإستخدام عدة الأستخلاص . | 1-1-6-2-2 |
| 42 | تشخيص البكتريا المعزولة بأستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction ,PCR) . | 2-6-2-2 |
| 44 | الترحيل الكهربائي في الهلام (Gel electrophoresis) . | 1-2-6-2-2 |
| 46 | الكشف عن نواتج التضاعف . | 2-2-6-2-2 |
| 46 | حفظ وإدامة العزلات . | 7-2-2 |
| 46 | تحضير المضادات النانوية الهجينة . | 8-2-2 |
| 46 | تحضير الحوامل (Carriers) | 1-8-2-2 |
| 47 | تحضير المضاد النانوي الهجين بأستخدام الحامل أوكسيد الزنك (Zinc Oxide) | 2-8-2-2 |
| 47 | تحضير المضاد النانوي الهجين بأستخدام الحامل أوكسيد المغنيسيوم (Magnesium Oxide) | 3-8-2-2 |
| 48 | تشخيص المضاد النانوي الهجين . | 9-2-2 |
| 48 | التشخيص بإستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) . | 1-9-2-2 |
| 51 | التشخيص بإستخدام طيف حيود الأشعة السينية (XRD) . | 2-9-2-2 |
| 51 | فحص المضاد النانوي الهجين بإستخدام مجهر القوة الذرية (AFM) . | 3-9-2-2 |
| 51 | فحص المضاد النانوي الهجين بإستخدام المجهر الألكتروني الماسح (SEM) . | 4-9-2-2 |
| 51 | فحص المضاد النانوي الهجين بإستخدام مطيافية التشتت (EDS) . | 5-9-2-2 |
| 52 | التحليل الدقيق للعناصر (CHN) في المضاد النانوي الهجين والحر | 6-9-2-2 |
| 52 | المضادات الحيوية المستخدمة في تثبيط البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية . | 10-2-2 |
| 52 | طريقة تقدير الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين قيد الدراسة . | 1-10-2-2 |
| 53 | التحليل الإحصائي | 11-2-2 |
| | النتائج والمناقشة | -3 |
| 54 | عزل وتشخيص البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية | 1-3 |

| | | |
|----|--|-----------|
| 56 | تشخيص البكتريا المسببة لأصابات المسالك التنفسية | 2-3 |
| 56 | تشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام | 1-2-3 |
| 56 | تشخيص بكتريا <i>K. pneumonia</i> | 1-1-2-3 |
| 58 | تشخيص بكتريا <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2-1-2-3 |
| 60 | تشخيص بكتريا <i>Sphingomonas paucimobilis</i> | 3-1-2-3 |
| 60 | تشخيص بكتريا <i>E.coli</i> | 4-1-2-3 |
| 61 | تشخيص بكتريا <i>Enterobacter aerogenes</i> | 5-1-2-3 |
| 62 | تشخيص البكتريا الموجبة لصبغة غرام | 2-2-3 |
| 62 | تشخيص بكتريا المكورات العنقودية <i>Staphylococcus</i> | 1-2-2-3 |
| 62 | تشخيص بكتريا <i>S.aureus</i> | 1-1-2-2-3 |
| 64 | تشخيص بكتريا المكورات السبحية (<i>Streptococcus</i>) | 2-2-2-3 |
| 64 | اختبار حساسية العزلات البكتيرية المسببة لأصابات المسالك التنفسية للمضادات الحيوية | 3-3 |
| 64 | اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>K.pneumonia</i> للمضادات الحيوية . | 1-3-3 |
| 67 | اختبار حساسية عزلات البكتريا الموجبة لصبغة غرام المعزولة من إصابات المسالك التنفسية للمضادات الحيوية | 2-3-3 |
| 70 | تشخيص بكتريا <i>K.pneumoniae</i> بالطرائق الجزيئية . | 4-3 |
| 70 | تشخيص المركبات النانوية المحضرة بالطرائق الطيفية | 5-3 |
| 71 | طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) . | 1-5-3 |
| 71 | طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد Azithromycin الحر | 1-1-5-3 |
| 72 | طيف الأشعة تحت الحمراء لأوكسيد الزنك . | 2-1-5-3 |
| 72 | طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد أزيثرومايسين النانوي الهجين . Azi-ZnO | 3-1-5-3 |
| 76 | طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد Ciprofloxacin الحر | 4-1-5-3 |
| 76 | طيف الأشعة تحت الحمراء لأوكسيد المغنيسيوم | 5-1-5-3 |

| | | |
|-----|--|---------|
| 76 | طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد Ciprofloxacin النانوي الهجين Cip-MgO | 6-1-5-3 |
| 80 | طيف حيود الأشعة السينية (XRD) | 2-5-3 |
| 83 | الفحص باستخدام مجهر القوة الذرية | 3-5-3 |
| 87 | الفحص باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح | 4-5-3 |
| 90 | التحليل بمطيافية Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) | 5-5-3 |
| 90 | التحليل الدقيق للعناصر في المضادين أزيثرومايسين وسبروفلوكساسين | 6-5-3 |
| 90 | الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO ضد البكتريا المعزولة من إصابات المسالك التنفسية | 6-3 |
| 90 | الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي Azi-ZnO ضد بكتريا <i>K.pneumoniae</i> | 1-6-3 |
| 95 | الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام | 2-6-3 |
| 95 | الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO ضد البكتريا المعزولة من إصابات المسالك التنفسية | 7-3 |
| 95 | الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي Cip-MgO ضد بكتريا <i>K.pneumoniae</i> | 1-7-3 |
| 98 | الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي Cip-MgO ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام | 2-7-3 |
| 104 | الاستنتاجات والتوصيات | |
| 105 | المصادر | |

قائمة الأخطاء

| الصفحة | العنوان | رقم الخطأ |
|--------|--|-----------|
| 5 | الوصف التشريحي للجهاز التنفسي. | 1 |
| 14 | التركيب الكيميائي لللازيثرومايسين | 2 |
| 15 | التركيب الكيميائي للفلوروكوينولونات | 3 |
| 17 | التركيب الكيميائي للمضاد سبروفلوكساسين | 4 |
| 19 | التطبيقات المختلفة للدقائق النانوية. | 5 |

| | | |
|----|--|----|
| 55 | انواع البكتريا المعزولة من إصابات المسالك التنفسية في محافظة كربلاء المقدسة | 6 |
| 66 | النسب المئوية لمقاومة بكتريا <i>K.pneumoniae</i> للمضادات الحيوية | 7 |
| 71 | الترحيل الكهربائي لنتاج تفاعل PCR لبكتريا <i>K.pneumoniae</i> بإستعمال البادئ النوعي لجين 16s rRNA (130bp) , بتركيز هلام 1.5% ، و فولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.. | 8 |
| 73 | طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد Azithromycin الحر | 9 |
| 74 | طيف الأشعة تحت الحمراء لأكسيد الزنك | 10 |
| 75 | طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد أزيثرومايسين النانوي الهجين Azi-ZnO | 11 |
| 77 | طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد سيبروفلوكساسين الحر Cip- free | 12 |
| 78 | طيف الأشعة تحت الحمراء لأكسيد المغنيسيوم | 13 |
| 79 | طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد سيبروفلوكساسين النانوي الهجين Cip-MgO | 14 |
| 81 | طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لطبقات أكسيد الزنك | 15 |
| 81 | طيف حيود الأشعة السينية (XRD) للأزيثرومايسين النانوي الهجين Azi-ZnO | 16 |
| 82 | طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لطبقات أكسيد المغنيسيوم | 17 |
| 82 | طيف حيود الأشعة السينية (XRD) للسيبروفلوكساسين النانوي الهجين Cip-MgO. | 18 |
| 84 | صورة ثنائية الأبعاد (a) وثلاثية الأبعاد (b) للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO | 19 |
| 86 | صورة ثنائية الأبعاد (a) وثلاثية الأبعاد (b) للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO | 20 |
| 88 | صورة بالمجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لطبقات أكسيد الزنك | 21 |
| 88 | صورة بالمجهر الإلكتروني الماسح للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO | 22 |
| 89 | صورة بالمجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لطبقات أكسيد المغنيسيوم | 23 |
| 89 | صورة بالمجهر الإلكتروني الماسح للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO | 24 |
| 91 | طيف تحليل EDS للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO | 25 |
| 91 | طيف تحليل EDS للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO | 26 |

قائمة الجداول

| رقم الجدول | العنوان | الصفحة |
|------------|--|--------|
| 1 | المفتاح التصنيفي لبكتريا <i>K. pneumonia</i> | 7 |
| 2 | تصنيف بكتريا <i>Streptococcus</i> . | 11 |
| 3 | تصنيف الماكروليدات. | 12 |
| 4 | التصنيف الحيوي للفلوروكوينولونات | 16 |
| 5 | آلية تأثير الدقائق النانوية ضد الأحياء المجهرية المرضية | 23 |
| 6 | أهم التقنيات والأجهزة المستخدمة في توصيف الدقائق النانوية | 24 |
| 7 | المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة | 32 |
| 8 | البوادئ المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم في الدراسة | 43 |
| 9 | مكونات المزيج Master Mix المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل. | 43 |
| 10 | المواد المضافة إلى أنابيب Master Mix المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل | 44 |
| 11 | برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم في هذه الدراسة | 45 |
| 12 | الأختبارات الشكلية والكيموحيوية لبعض انواع البكتريا السالبة لصبغة غرام المعزولة من إصابات المسالك التنفسية في محافظة كربلاء المقدسة. | 57 |
| 13 | تشخيص البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام المعزولة من إصابات المسالك التنفسية باستخدام نظام VITEK-2 Compact System. | 59 |
| 14 | الأختبارات الشكلية والكيموحيوية لبعض انواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام المعزولة من إصابات المسالك التنفسية | 63 |
| 15 | اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>K.pneumoniae</i> تجاه المضادات الحيوية | 65 |
| 16 | أختبار حساسية بعض انواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام للمضادات الحيوية . | 69 |

| | | |
|-----|--|----|
| 85 | أقطار وحجوم وتجمعات دقائق المضاد النانوي الهجين Azi-ZnO بعد فحصه بمجهر القوة الذرية. | 17 |
| 85 | أقطار وحجوم وتجمعات دقائق المضاد النانوي الهجين Cip-MgO بعد فحصه بمجهر القوة الذرية | 18 |
| 92 | التحليل الدقيق لعناصر الكربون والهيدروجين والنيتروجين في المضاد Azithromycin والمضاد Ciprofloxacin | 19 |
| 93 | الفعالية التثبيطية للمضاد Azithromycin الحر ضد بكتريا <i>K.pneumoniae</i> | 20 |
| 94 | الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين AZI-ZnO ضد بكتريا <i>K.pneumoniae</i> | 21 |
| 96 | الفعالية التثبيطية للمضاد Azihtromycin الحر ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام | 22 |
| 97 | الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام | 23 |
| 99 | الفعالية التثبيطية للمضاد Ciprofloxacin الحر ضد بكتريا <i>K.pneumoniae</i> | 24 |
| 100 | الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO ضد بكتريا <i>K.pneumoniae</i> | 25 |
| 101 | الفعالية التثبيطية للمضاد Ciprofloxacin الحر ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام | 26 |
| 102 | الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام | 27 |

قائمة المخططات

| الصفحة | العنوان | رقم المخطط |
|--------|--|------------|
| 20 | الطرائق المختلفة لتصنيع الدقائق النانوية. | 1 |
| 34 | عزل وتشخيص البكتريا المسببة لأصابات المسالك التنفسية | 2 |
| 38 | عزل وتشخيص بكتريا <i>Streptococcus</i> | 3 |

| | | |
|----|--|---|
| 39 | عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية | 4 |
| 49 | تحضير المضاد النانوي الهجين Azi-ZnO بطريقة التبادل الأيوني | 5 |
| 50 | تحضير المضاد النانوي الهجين Cip-MgO بطريقة التبادل الأيوني | 6 |

قائمة المختصوات

| | |
|-----------|---|
| AFM | Atomic Force Microscope |
| ALRIs | Acute Lower Respiratory Infections |
| APi | Analytical profile index |
| ARTs | Acute Respiratory Tract Infections |
| AURIs | Acute Upper Respiratory Infections |
| Azi-ZnO | Azithromycin -Zinc Oxide |
| Cip –free | Ciprofloxacin free |
| Cip –MgO | Ciprofloxacin –Magnesium Oxide |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| EDS | Energy Dispersive spectroscopy |
| ESBLs | Extended spectrum beta lactamases |
| FT-IR | Fourier transform infrared spectroscopy |
| GN –ID | Gram negative identifier |
| GRAs | Generally recognized as safe |
| IR | Infrared spectroscopy |
| MDR | Muti-drug resistance |
| MgO | Magnesium oxide |

| | |
|------------------|-------------------------------------|
| MIC | Minimum inhibitory concentration |
| MS | Mass spectroscopy |
| MSA | Manitol salt agar |
| NMR | Nuclear magnetic resonance |
| PCR | polymerase Chain Reaction |
| PDR | Pan-drug resistance |
| pKa | Acid dissociation constant |
| RBCs | Red blood cells |
| SEM | Scaning electron microscope |
| TEM | Transmission electron microscope |
| TSI | Triple Sugar Iron |
| VITEK-2 AST Card | VITEK-2 antibiotic sensitivity card |
| VITEK-2 GN Card | VITEK -2 gram negative card |
| VITEK-2 GP Card | VITEK-2 gram positive card |
| XRD | X-ray diffraction |
| ZnO | Zinc Oxide |

المقدمة

Introduction

المقدمة

تعد إصابات المسالك التنفسية الحادة (Acute Respiratory Tract Infections , ARTIs) السبب الرئيس للوفيات في البلدان منخفضة الدخل ، كما انها تأتي بالمرتبة الخامسة من بين مسببات الوفيات في العالم ، إذ تشير إحدى الإحصائيات العالمية الى ان حوالي ثلاثة ملايين بالغ وثلاثة ملايين طفل يموتون سنوياً بسبب هذا النوع من الإصابات (Jansen , 2014 ; Savitha & Gopalakishnan , 2018).

تصنف إصابات المسالك التنفسية الى عليا حادة وأخرى سفلى حادة . وعلى الرغم من ان الأولى منها لاتعد مهددة للحياة الا أن الإصابات السفلى منها تكون مسؤولة عن العديد من الحالات المرضية الشديدة المتمثلة بذات الرئة (Pneumonia) والتدرن الرئوي (Tuberculosis) وإلتهاب القصيبات (Bronchiolitis) وبالتالي يقترن بها نسب الوفيات العالية (Scott et al ., 2008).

تلعب البكتريا الدور الأكبر في إحداث إصابات المسالك التنفسية الحادة مقارنة بالفيروسات والفطريات . وقد إتفقت معظم الدراسات السابقة على ان بعض أنواع جنس *Streptococcus* هي الأكثر شيوعاً في إحداث الإصابات المذكورة أعلاه وخصوصاً بكتريا *S. pneumoniae* بالنظر لكونها المسبب الأول لمرض ذات الرئة . ولم تغفل تلك الدراسات دور الأجناس والأنواع البكتيرية الأخرى وخصوصاً بكتريا *Klebsiella pneumoniae* التي تعد مسببا مهماً لتلك الإصابات بالنظر لأمتلاكها عوامل ضراوة متعددة تسهل عملية تضاعفها داخل المضيف والأستيطان فيه وإحداث الإصابة الخمجية ; (Gray & Stevevs ,2009 ; Ashurst & Dowson , 2018) .

تتوفر حالياً أنواع مختلفة من المضادات الحيوية المستخدمة في علاج إصابات المسالك التنفسية الحادة . وتقف الماكروليديات (Macrolides) في مقدمتها إذ تتصف بكونها مضادات أمينة وقد تحقق استخدامها أما بصورة خط علاجي أول (First line therapy) أو بديلاً للبنسلينات المثيرة للحساسية (Allergic) عند المرضى (Carbon ,1998) . وينتمي المضاد أزيثرومايسين (Azithromycin) الى الماكروليديات

ويتصف بكونه المضاد الأكثر استخداماً ومبيحاً في العالم فهو يتميز بسرعة واتساع إختراقه للأنسجة وكلفته الواطئة كما أنه يعد فعالاً ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام الحساسة للأريثروميسين وبعض أنواع البكتريا السالبة لهذه الصبغة المهمة سريرياً فضلاً عن فعاليته المضادة للفيروسات وإمكانية استخدامه في مراحل علاج فايروس Covid-19 الجائحة العالمية التي فتكت ولا زالت تفتك بملايين الأرواح من البشر (Echeverría et al ., 2020 ; Adeli , 2016 ; McCarty ,1996).

ومن جانب آخر فقد حظيت مضادات الفلوروكوينولونات (Fluoroquinolones) بالعديد من المميزات التي تؤهلها لعلاج تلك الإصابات إذ انها سهلة التجريع (Ease of administration) وذات إمتصاص فموي ممتاز (Excellent oral absorption) كما تميزت بقوة إختراقها للأنسجة وإمكانية إطالة أنصاف أعمارها (Prolonged half lives) فضلاً عن كونها آمنة وكفوءة (Soni, 2012). ويعد السبروفلوكساسين (Ciprofloxacin) من أهم مضادات الفلوروكوينولونات ويمتلك فعالية تثبيطية عالية ضد مدى واسع من البكتريا السالبة لصبغة غرام وأنواع معينة من البكتريا الموجبة لهذه الصبغة بما فيها معظم السلالات البكتيرية المرضية المسؤولة عن الإصابات التنفسية وإصابات القناة البولية والإصابات المعوية والبطنية فضلاً عن إصابات الجلد والأنسجة الرخوة (Kupczik et al ., 2009 ; Huneault et al ., 2004).

أحدثت التقنية النانوية (Nanotechnology) مؤخراً ثورة تقنية عالمية عبر تصنيع مواد نانوية جديدة بصفات فيزيائية وكيميائية وبايولوجية مطورة . وتعد المضادات الحيوية النانوية (Nanoantibiotics) واحدة من تلك المواد التي إستأثرت بإهتمام الباحثين بالنظر لإختزال سميتها وإمكانية إستخدامها في تثبيط الأحياء المجهرية المقاومة للأدوية فضلاً عن كلفتها الواطئة مقارنةً بالمضادات الحيوية التقليدية (Conventional antibiotics) (Tang & Bin-Feng , 2014 ; Huh and Kwon , 2011).

وبالنظر لخطورة إصابات المسالك التنفسية الحادة فقد هدفت هذه الدراسة الى تحديد الأنواع البكتيرية الأكثر شيوعاً في إحداث هذه الإصابات فضلاً عن تحديد المضاد الحيوي المناسب لتثبيط تلك البكتريا عبر تحقيق المحاور الآتية :-

- 1- عزل الأنواع البكتيرية المسببة لإصابات المسالك التنفسية في محافظة كربلاء المقدسة.
- 2- تشخيص الأنواع البكتيرية المعزولة بالطرائق الكيموحيوية فضلاً عن الطرائق الجزيئية .
- 3- تحضير مضاد حيوي نانوي هجين من المضادات الموصوفة في علاج الإصابات المشار إليها أعلاه.
- 4- توصيف المضاد المحضر بالطرائق المتاحة .
- 5- تقييم الكفاءة التثبيطية للمضاد الحيوي النانوي الهجين ضد العزلات البكتيرية المسببة لإصابات المسالك التنفسية الحادة قيد الدراسة خارج الجسم الحي (in vitro) .

الفصل الأول

استعراض المراجع

Literatures Review

1- استعراض المراجع

1-1 : الجهاز التنفسي (Respiratory system) :

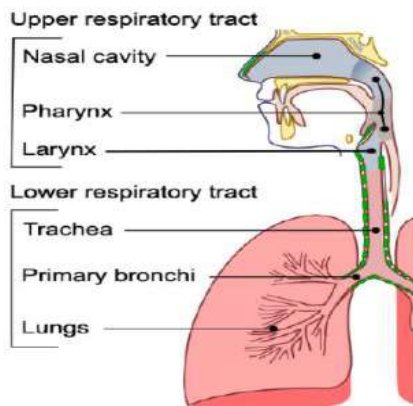
أن وظيفة الجهاز التنفسي الأساسية هي الحصول على الأوكسجين وطرح ثاني أوكسيد الكربون CO₂ (تبادل الغازات) الناتج عن العمليات الأيضية التي تقوم بها خلايا الجسم المختلفة (Wakim & Grwel, 2020). وهناك وظائف ثانوية لهذا الجهاز تتمثل بترشيح وتدفئة وترطيب الهواء المستنشق وهذا يشمل الحبال الصوتية في الحنجرة لإنتاج الصوت والرتتين للتحكم بمستويات الرقم الهيدروجيني في الجسم والبصيلات الشمية في الأنف لغرض الشم (Tu et al., 2013). يمكن تقسيم الجهاز التنفسي وظيفيا على جزئين : الأول يشمل المناطق الموصلة (الأنف إلى الشعبات) التي تشكل مسارا لتوصيل الغازات المستنشقة والثاني المنطقة التنفسية (القناة السنخية إلى الحويصلات الهوائية) إذ يحدث تبادل الغازات (Patwa & Shah., 2015)، لذا فإن للتنفس عن طريق الجهاز التنفسي عمليتين فرعيتين ، الأولى تعرف بعملية التهوية (Ventilation) التي تشير إلى مجموعة العمليات الفيزيائية لأبصال الهواء من وإلى الرئتين ، والثانية هي تبادل الغازات إذ ينتشر فيها الأوكسجين من الهواء إلى الدم بينما ينتشر غاز ثاني أوكسيد الكربون من الدم إلى الهواء (Wakim & Grwel, 2020)، أما من الناحية التشريحية فيقسم الجهاز التنفسي إلى :

أ- القناة التنفسية العليا (Upper respiratory tract) :

جميع أعضاء وتراكيب القناة التنفسية العليا تشترك في توصيل أو حركة الهواء داخل وخارج الجسم ، إذ توفر هذه القناة طريقا للهواء للتنقل بين الغلاف الجوي الخارجي والرئتين كما إنها تقوم بتنظيف الهواء القادم وترطيبه وتدفئته ومع ذلك لا يحدث تبادل الغازات في هذه الأعضاء. وتتألف هذه القناة من : الأنف والتجويف الأنفي (Nose and Nasal cavity) والبلعوم (Pharynx) و الحنجرة (Larynx) (Wakim & Grwel., 2020) وحسب ما هو موضح في الشكل 1 .

ب- القناة التنفسية السفلى (Lower respiratory tract) :

تتألف هذه القناة من : القصبة الهوائية (Trachea) و الشعب الهوائية وتفرعاتها (Bronchi and Bronchioles) والرئتين (Lungs) كما موضح في الشكل 1 .



الشكل 1 : الوصف التشريحي للجهاز التنفسي (Wakim & Grwel., 2020)

2-1 : إصابات المسالك التنفسية الحادة (Acute Respiratory Tract Infections , ARTIs) :

تعرف بأنها تلك الإصابات التي تحدث في أي منطقة من القناة التنفسية للإنسان وتبقى لمدة تقل عن 30 يوماً . هناك تصنيفان رئيسان لإصابات المسالك التنفسية الحادة هما :

1- التصنيف حسب العضو الذي يؤثر فيه :

أ- إصابات مسالك تنفسية عليا حادة (Acute Upper Respiratory Infections , AURIs) :

تحدث هذه الإصابات في الأنف والجيوب الأنفية والأذن الوسطى والحنجرة والبلعوم ، ويمكن ان تحدث باستمرار ونادراً ماتكون مهددة للحياة (Simoes *et al* ., 2006) .

ب- إصابات مسالك تنفسية سفلى حادة (Acute Lower Respiratory Infections , ALRIs) :

يمكن أن تحدث هذه الإصابات في القصبة الهوائية والشعب الهوائية والرئتين وتكون مسؤولة عن العديد من الحالات المرضية الشديدة التي تتمثل بالأنفلونزا وذات الرئة والتدرن الرئوي والتهاب القصبيات وتعد مهددة للحياة إذ يمكن ان تتسبب بعض أنواعها بنسب عالية من الوفيات (Scott *et al* ., 2008) .

2- التصنيف حسب حاجة المصابين الى المواد المضادة للأحياء المجهرية (Antimicrobials) ومكان رعايتهم

(Who ,1991)

أ- الإصابة بذات الرئة الحادة (Sever pneumonia)

يتطلب استخدام المواد المضادة للأحياء المجهرية في علاج هذه الأصابة فضلاً عن ضرورة رعاية المصابين داخل المستشفيات .

ب- الإصابة بذات الرئة غير الحادة (Non severe pneumonia) :

تتطلب كسابقتها استخدام المواد المضادة للأحياء المجهرية في علاجها بيد أنه يمكن الأكتفاء برعاية المصابين داخل البيت .

ت- الأصابات الأخرى غير المنسوبة لذات الرئة (Non pneumonia)

وتشتمل على إضطرابات عسر التنفس (Wheezing disorders) والأصابات التنفسية العليا (التي تتضمن إتهاب الأذن الوسطى الحاد و إتهاب البلعوم والسعال المزمن (Chronic cough) والسعال البسيط (Simple coaghs) فضلاً عن الزكام (Cold) (Who ,1991) .

3-1 : أهم الأنواع البكتيرية المسببة لأصابات المسالك التنفسية

1-3-1 : بكتريا *Klebsiella pneumoniae*

1-1-3-1 : الصفات العامة لبكتريا *K. pneumoniae*

في عام 1882 ، وصف كارل فريدلاندر بكتريا *Klebsiella pneumoniae* لأول مرة ، لذلك كانت تسمى سابقاً عصية فريدلاندر، وبقيت هذه التسمية حتى عام 1886 إذ اكتسبت اسم *Klebsiella* بعد ذلك (Ashurst & Dawson , 2018). تنتمي *K. pneumoniae* إلى عائلة *Enterobacteriaceae* وتوصف بأنها عصيات سالبة لصبغة غرام تتراوح أقطارها بين (0.3 - 1) مايكروميتر بينما يتراوح طولها بين (0.6-6) مايكروميتر، غير متحركة (باستثناء النوع *Klebsiella mobilis*) ومخمرة لسكر اللاكتوز سالبة لأختبار الأوكسيديز وموجبة لأختبار الكاتليز، وتنتج أنزيم Urease وبعضها منتجا للبكتريوسين ويسمى Klebsin ،لا تنتج غاز كبريتيد الهيدروجين (H_2S) في وسط TSI الصلب أو الجيلاتين المسال ، درجة الحرارة المثلى للنمو هي 37 م° ، محاطة بكبسولة بارزة تتكون من متعدد السكريد (polysaccharide) هذه الكبسولة تغلف

الخلية بأكملها وتعطي المستعمرات مظهرها اللامع والمخاطي على سطوح الأكار. وتعد بكتريا غير محللة للدم (نوع التحلل هو gamma-haemolysis) على اكار الدم ، وهي بكتريا لاهوائية اختيارية وتتميز مستعمراتها عند تنميتها على الوسط الصلب مثل وسط ماكونكي الصلب بكونها كبيرة ومخاطية (تعتمد درجة الغشاء المخاطي على كمية الكاربوهيدرات في الوسط الزرعى فضلاً عن انها تتفاوت من سلالة الى اخرى) ، كما انها تبدو ملساء وذات لون وردي بسبب قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز ونتاج الحامض ، تنتظم خلاياها بشكل منفرد اوفي ازواج اوسلاسل قصيرة (Chiu et al ., 2013 ; Dubey et al ., 2013 ; Wang et al ., 2012). وبعد تطور الطرائق التشخيصية تم وضع المفتاح التصنيفي لبكتريا *K. pneumoniae* بحسب ماهو موضح بالجدول 1 .

الجدول 1 : المفتاح التصنيفي لبكتريا *K. pneumoniae*

| التصنيف | الاسم العلمي |
|-------------------|----------------------------|
| المملكة (Kingdom) | <i>Bacteria</i> |
| الشعبة (Phylum) | <i>Proteobacteria</i> |
| الصف (Class) | <i>Gammaproteobacteria</i> |
| الرتبة (Order) | <i>Enterobacteriales</i> |
| العائلة (Family) | <i>Enterobacteriaceae</i> |
| الجنس (Genus) | <i>Klebsiella</i> |
| النوع (Species) | <i>K.pneumoniae</i> |

2-1-3-1 : عوامل ضراوة بكتريا *K. pneumoniae*

تمتاز هذه البكتيريا بامتلاكها عوامل ضراوة متعددة تمكنها من التضاعف داخل جسم المضيف ومن ثم الاستيطان فيه والتسبب بإصابة خمجية. واهم هذه العوامل هي المحفظة التي تمكنها من الافلات من البلعمة مما يجعلها اكثر انتشاراً واشد ضراوة وأكثر مقاومة للمضادات الحيوية من تلك الانواع التي لا تحتوي على كبسولة. ويعد متعدد السكريد الدهني (Lipopolysaccharides) عامل ضراوة آخر يساعد على تكوين الغشاء الحيوي إذ يؤدي الاستشعار به عند الاصابة إلى إطلاق سلسلة التهابية في الكائن الحي المضيف، وقد ثبت أنه السبب

الرئيس في تعفن الدم (sepsis) والصدمة الإنتانية (septic shock). وتلعب الاهلاب (fimbriae) دوراً مهماً إذ إنها تسمح للبكتريا بالألتصاق بخلايا المضيف ، فيما تقوم ساحبات الحديد (Siderophores) التي تمتلكها هذه البكتريا بتوفير احد متطلباتها الغذائية إذ تسمح بأكتساب الحديد من الخلية المضيفة اثناء استعمارها داخل الجسم الحي وفضلاً عما سبق تتميز هذه البكتريا بمقاومتها للمضادات الحيوية وخصوصاً Cephalosporins (Ashurst & Dawson , 2018 ; Drawz & Bonomo ,2010) .

2-3-1 : جنس *Streptococcus*

يشكل جنس *Streptococcus* مجموعة كبيرة من البكتريا ذات الشكل الكروي الموجبة لصبغة غرام وغير المتحركة وغير المكونة للأبواغ يتراوح قطرها من (0.5 – 2) مايكروميتر وتنمو في أزواج أو سلاسل . تظهر على وسط أكار الدم بشكل مستعمرات بيضاء رمادية ناعمة لامعة وذلك بعد حضنها على درجة حرارة (35 – 37) م لمدة (18 – 24) ساعة . تقوم بعض أنواعها بتحليل الدم من نوع α أو β فيما لاتبدي أنواع اخرى اي تحلل . يتصف تحلل α بكونه جزئياً لخلايا الدم الحمراء (RBCs) في الوسط يقترن بظهور هالة خضراء تحيط بالمستعمرة البكتيرية تعزى الى أكسدة الحديد في جزيئات الهيموغلوبين وأختزال الأخير الى methemoglobin وليس الى تحلل خلايا الدم الحمراء (Hossain ,2014) .

تعد بعض أنواع بكتريا *Streptococcus* من أهم العوامل المسببة للأمراض التي تصيب الإنسان والحيوان بينما تمثل أنواع أخرى جزءاً من النبيت الطبيعي (Normal flora) في الإنسان فيما تؤدي بعض الأنواع دوراً مهماً في صناعة الألبان (Gray & Stevens ,2009) .

❖ اعتماداً على نسب الأعتلال والوفيات فضلاً عن الكلف الاقتصادية يمكن تقسيم أنواع بكتريا

Streptococcus الممرضة للإنسان الى خمس مجاميع (Gray & Stevens ,2009) :

- المجموعة الأولى *group A Streptococcus* تتمثل ببكتريا *S. pyogenes* التي تقوم بأحداث مدى واسعاً من الأصابات بدءاً من إلتهاب البلعوم و impetigo و puerperal sepsis و erysipelas و necrotizing fasciitis فضلاً عن متلازمة الصدمة السمية (Toxic shock syndrome).

- المجموعة الثانية *group B Streptococcus* تتمثل ببكتريا *S.agalactiae* التي تعد المسبب الرئيس لتعفن الدم في الأطفال حديثي الولادة وإصابات ما بعد الولادة في الأمهات .
- المجموعة الثالثة : *Pneumococcus* وتتمثل ببكتريا *S.pneumoniae* المسببة لذات الرئة في كل المجاميع العمرية كما تسبب التهاب الأذن الوسطى و تجرثم الدم و التهاب السحايا .
- المجموعة الرابعة : مجموعة *Streptococcus* الفموية : وتأتي في مقدمتها بكتريا *S. mutans* المسببة لتسوس الأسنان .
- المجموعة الخامسة *Enterococcus* : التي تعد جزءاً من النبيت الطبيعي للأمعاء كما تعد ممرضات إنتهازية خصوصاً في عدوى المستشفيات . تعد بكتريا *Enterococcus* جنساً منفصلاً الآن الا أنها وضعت ضمن مجاميع بكتريا *Streptococcus* لتشابهها مع بكتريا *Streptococcus* المعوية .
(Gray & Stevens ,2009) .

1-2-3-1 : تصنيف بكتريا *Streptococcus* :

تم وصفها لأول مرة في عام 1874 من قبل Bellaroth ، الذي استخدم مصطلح *Streptococci* . في البداية كانت العقديات تصنف حسب المرض الذي تسببه ، وبفضل التقدم في التشخيص ومع توافر التقنيات الجزيئية الحديثة ، تم إجراء العديد من التغييرات في تصنيف جنس *Streptococcus* . في العقد الماضي كانت السمة المميزة المفيدة في تصنيف *Streptococcus* هو التفاعل الذي تظهره على وسط أكار الدم ، الناجم عن تحلل كريات الدم الحمراء بواسطة الإنزيمات التي تفرزها العقديات ، وهي ظاهرة تعرف باسم انحلال الدم ، بناءً على هذه الخاصية ، تم تصنيفها إلى مجموعات الحالة للدم وغير الحالة . في عام 1919 استعمل Brown مصطلح beta لوصف العقديات التي أنتجت انحلال دم كامل ، اما Alpha فاطلق على العقديات التي تنتج انحلال دم غير مكتمل ، مخضر . في عام 1934 قدم لانسفيلد Lancefield طرائقاً للتصنيف بناءً على التفاعلات المناعية مع المكونات الخلوية ، أذ تبين أن العديد من اجناس *Streptococci* تمتلك معقد Polysaccharide في جدارها الخارجي ويعرف باسم (C-Carbohydrate) والذي يُعد مستضداً سطحياً من السهل استحصاله بواسطة حامض مخفف . صنفت *Streptococci* ذات التحلل الدموي نوع بيتا إلى مجاميع تبدأ من A إلى U ، وتعد المجاميع نوع A و B ذات التحلل الدموي نوع بيتا من اهم المجاميع طبيا

(Chhatwal & Graham , 2017) ، اما التصنيف الأكثر شيوعاً لبكتريا *Streptococcus* فهو تصنيف Sherman (1937) اذ استخدم Lancefield group antigen بالإضافة الى عشر مميزات اخرى لتصنيف جنس *Streptococcus* الى اربعة اقسام أولية وهي *Pyogenic* و *Viridians* و *Lactic* و *Enterococci* بينما يتضمن التصنيف الأحدث 40 نوعاً لجنس *Streptococcus* تتوزع على 6 مجاميع والذي يعتمد على تحليل التسلسل المقارن لـ 16s rDNA (Comparative sequence analysis) (Hardie and Whiley ,1997) وفق ما هو موضح في الجدول 2 .

4-1 : المضادات الحيوية " ماكروليديات " (Macrolides) :

تعد الماكروليديات من المضادات المهمة سريريّاً والتي شاع استخدامها بشكل واسع في مجالي الطب البشري والبيطري . كيميائياً ، تتكون هذه المضادات من حلقات لاكتون كبيرة (Large lactone rings) ترتبط بها جزيئة سكر واحدة أو أكثر غالباً ماتكون Desosamine و Cladinose . وقد تحتوي أحياناً على جزيئة سكر أخرى حاوية على مجموعة dimethylamine تلعب دوراً في تغيير بعض صفات هذه المضادات (Keskar & Jugade , 2015) .

تستخدم هذه المضادات في علاج الكثير من الأصابات التي تشتمل على ذات الرئة و إلتهاب الجيوب الأنفية و إلتهاب البلعوم و إلتهاب اللوزتين وتفاعلات الحساسية (Allergic reactions) والأضطرابات المعوية والأصابات المنقولة جنسياً فضلاً عن إصابات الجلد والأنسجة الرخوة ; (Patel & Hashmi ,2020 ; Carbon ,1998) .

إعتماداً على عدد الذرات في حلقة اللاكتون يمكن تصنيف الماكروليديات الى خمس مجاميع هي 12-membered ring و 14-membered ring و 15-membered ring و 16-membered ring و 17-membered ring بيد أن المجاميع المهمة سريريّاً منها تقتصر على 16-membered ring و 15-membered ring و 14-membered ring (Kumar , 2019 ; Carbon ,1998) وفق ما هو موضح في الجدول 3 .

ويعد الأريثرومايسين (Erythromycin) أول مضاد ماكروليدي تم الحصول عليه عام 1949 في الفلبين

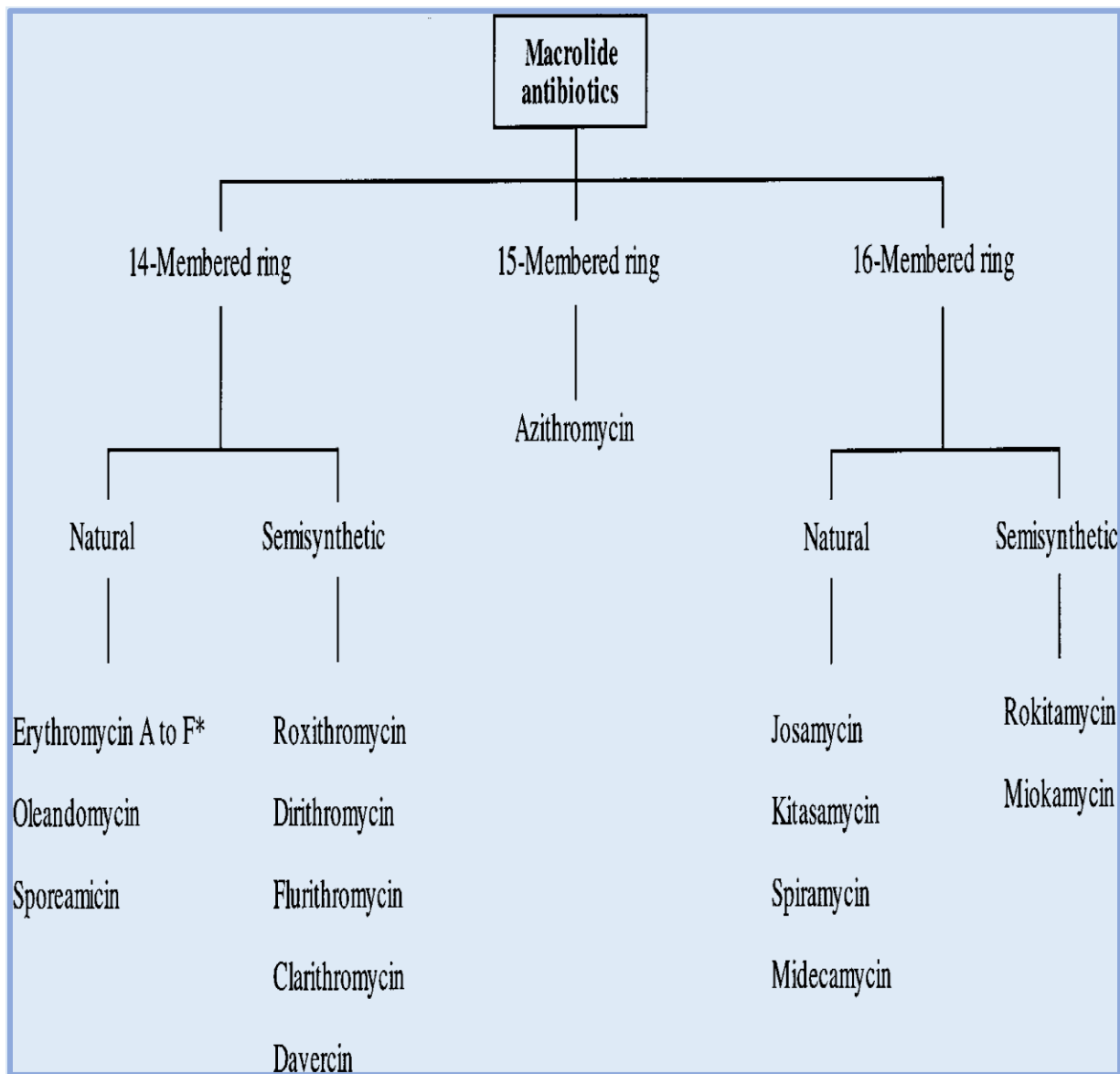
الجدول 2 : تصنيف بكتريا *Streptococcus* وفقا الى Kawamura et al .,1995 و Hardie and Whiley 1997

| التصنيف البديل ** | الأنواع | المجموعة * |
|--|---|------------|
| Pyogenic | <i>Strep.pyogenes</i> <i>Strep.agalactiae</i> <i>Strep.canis</i> <i>Strep.dysgalactiae</i> <i>Strep.equi</i> <i>Strep.hyointestinalis</i> <i>Strep.iniae</i> <i>Strep.parauberis</i> <i>Strep.porcinus</i> <i>Strep.uberis</i> | Pyogenic |
| Oral (<i>Strep.sanguis/oralis</i>) group | <i>Strep.gordonii</i> <i>Strep.mitis</i> <i>Strep.oralis</i> <i>Strep.parasanguis</i> <i>Strep.pneumoniae</i> <i>Strep.sanguis</i> | Mitis |
| Oral (<i>Strep.salivarius</i>) group | <i>Strep.salivarius</i> <i>Strep.thermophilus</i> <i>Strep.vestibularis</i> | Salivarius |
| Oral (<i>Strep.milleri</i> group) | <i>Strep. Anginosus</i> <i>Strep.constellatus</i> <i>Strep.intermedius</i> | Anginosus |
| Oral (<i>Strep.mutans</i> group) | <i>Strep mutans</i> <i>Strep. cricetus</i> <i>Strep. downei</i> <i>Strep. macacae</i> <i>Strep. rattus</i> <i>Strep. Sobrinus</i> | Mutans |
| Other <i>Streptococcus</i> | <i>Strep. Bovis</i> <i>Strep. alactolyticus</i> <i>Strep. Equinus</i> | Bovis |

Hardie and Whiley 1997 **

Kawamura et al .,1995 *

الجدول 3 : تصنيف الماكروليديات (Carbon ,1998)



أثر انتاجه من بكتريا *Streptomyces erythrus* المعزولة من التربة ، وينتمي الى مجموعة 14-membered ring .

وفي عام 1970 تمكن باحثون يابانيون يعملون في شركة Taisho اليابانية للأدوية من اكتشاف المضاد Clarithromycin الذي أُجيز استخدامه عام 1980 ، بينما تمكنت شركة Hoechst Uclaf الألمانية للأدوية

عام 1987 من إنتاج المضاد Roxithromycin وهو مضاد شبه مصنع مشتق من الأريثرومايسين (Keskar & Jugade, 2015)

وقامت شركة Pliva الكرواتية باكتشاف المضاد Azithromycin في عام 1980 وينتمي هذا المضاد لمجموعة 15 - membered ring ، فيما يعد المضاد Josamycin المنتج من بكتريا *Streptomyces narbonensis var josamiceticas* مثلاً للمضادات التي تنتمي لمجموعة 16- membered ring . (Keskar & Jugade, 2015)

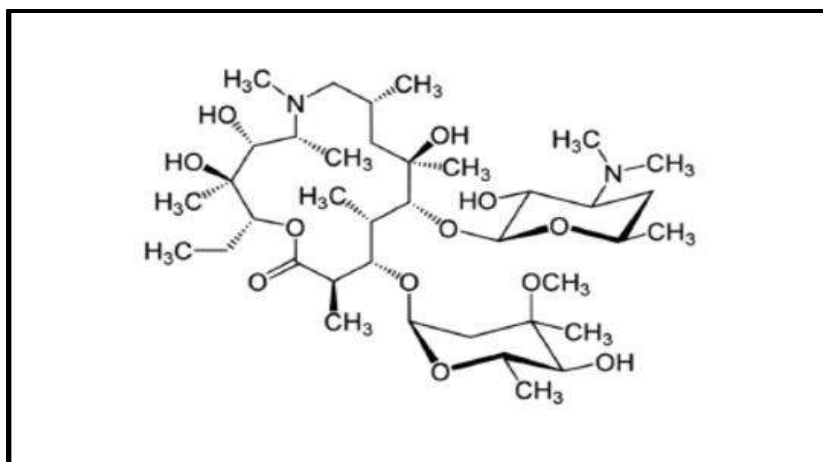
تتلخص آلية عمل الماكروليدات بالأرتباط الى الوحدة الرايبوسومية 50s مما يؤدي الى تثبيط تصنيع البروتين. تعد هذه المضادات موقفة لنمو البكتريا (Bacteriostatic) في التراكيز الواطنة بيد ان تأثيرها يصبح قاتلاً عند التراكيز العالية أو يعتمد على نوع الكائن المجهرى (Tomisic , 2011) .

تتشابه الماكروليدات مع البنسلينات (Penicillins) في طيفها المضاد للأحياء المجهرية وتتفوق عليها ايضاً في تثبيطها بكتريا *Legionella pneumophila* و *Mycoplasma pneumoniae* وبعض أنواع الركتيسيا (Rickettsias) والكلاميديا (Chlamydias) (William et al . , 2008) .

1-4-1 : المضاد أزيثرومايسين (Azithromycin) :

وهو مضاد ماکروليدي (Macrolide antibiotic) أكتُشف عام 1980 من قبل شركة Pliva الدوائية في كرواتيا . يمتلك التسمية النظامية 9-deoxo-9a-aza-9a-methyl-9a-homoerythromycin ، وهو مضاد شبه مصنع (Semi-synthetic) مشتق من المضاد أريثرومايسين بأستبدال مجموعة مثيل بذرة نيتروجين في حلقة اللاكتون مما يجعل أستخداماته شبيهة بأستخدامات الأريثرومايسين ، ينتمي هذا المضاد لمجموعة 15-membered ring وتتصف الصورة المائية (Dihydrate) له بكونها مسحوقاً ابيضاً بلورياً ويمتلك الصيغة الجزيئية $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot 2H_2O$ ويبلغ وزنه الجزيئي 748.984 غم/مول . أما درجة غليانه فهي (113-115) م° وله ثابت تفكك (Pka= 8.74) . يذوب هذا المضاد في الايثانول والميثانول والأستونايتريل والأسيتون (Carbon ,1998 ; Adeli ,2016) . ويوضح الشكل 2 التركيب الكيميائي للأزيثرومايسين .

يعد الأزيثرومايسين فعالاً جداً ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام الحساسة للأريثرومايسين مثل *S. pneumoniae* و *S. pyogenes* و *S. agalactiae* و *Staphylococcus aureus* الحساسة للمثيسيلين ، كما يعد هذا المضاد فعالاً ضد بعض أنواع البكتريا السالبة لصبغة غرام المهمة سريرياً مثل *Haemophilus influenzae* و *Moraxella catarrhalis* فضلاً عن *Mycoplasma pneumoniae* .



الشكل 2 : التركيب الكيميائي للأزيثرومايسين .

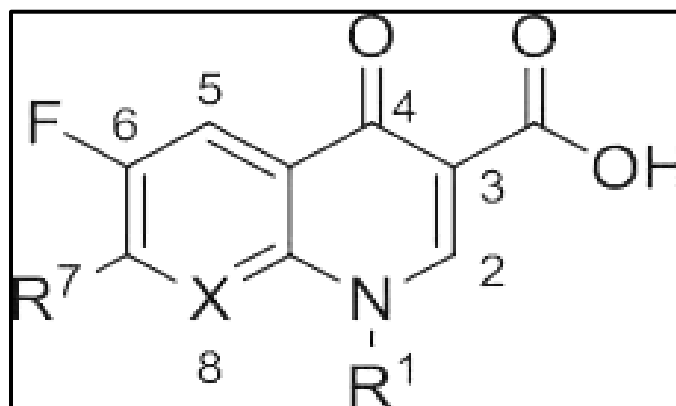
وأشارت بعض الدراسات الى ان كل من الأزيثرومايسين والأريثرومايسين يمتلكان فعالية متقاربة ضد *Chlamydia trachomatis* إذ تتراوح التراكيز المثبطة الدنيا من (0.03 – 0.5) مايكروغرام /مل ، ومن (0.03- 1) مايكروغرام /مل لهذين المضادين ، على التوالي (McCarty , 1996) .

يتميز هذا المضاد عن بقية انواع مضادات الماكروليدات بسعة وسرعة أختراقه للخلايا والأنسجة وقصر فترة بقائه في الجسم فضلاً عن كلفته الواطئة (McCarty , 1996) .

5-1 : المضادات " فلوروكوينولونات " (Fluoroquinolones) :

تعد الفلوروكوينولونات من المضادات الحيوية الصناعية واسعة الطيف إذ تتميز بتأثيرها الواضح في تثبيط كل من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام . تتمكن هذه المضادات من دخول الخلايا عن طريق البورينات (Porins) مما يسمح باستخدامها في علاج الممرضات داخل الخلايا . وتتلخص آلية عملها من خلال

إيقافها لعملية تكرار الـ DNA (DNA replication) بتثبيطها لأنزيم DNA gyrase مما يؤدي الى توقف نمو الخلية البكتيرية فيما بعد (Fedorowicz & Sączewski , 2018 ; Sharma *et al.*, 2010) .
يوضح الشكل 3 التركيب الكيميائي للفلوروكوينولون . وقد أسفرت عمليات البحث المتواصلة على هذا المركب عن اكتشاف وتطوير مايزيد عن عشرة آلاف مشابه (analogous) لهذا المركب ذات الطيف التثبيطي الواسع والخصائص العلاجية المتنوعة وخصوصاً في علاج إصابات القنوات التنفسية العليا والسفلى والأصابات المعوية وإصابات الجلد والأنسجة الرخوة فضلاً عن إصابات المجاري البولية المعقدة وغير المعقدة منها (Fedorowicz & Sączewski , 2018 ; Michael *et al.* , 2000 ; Nichols ,2000) .



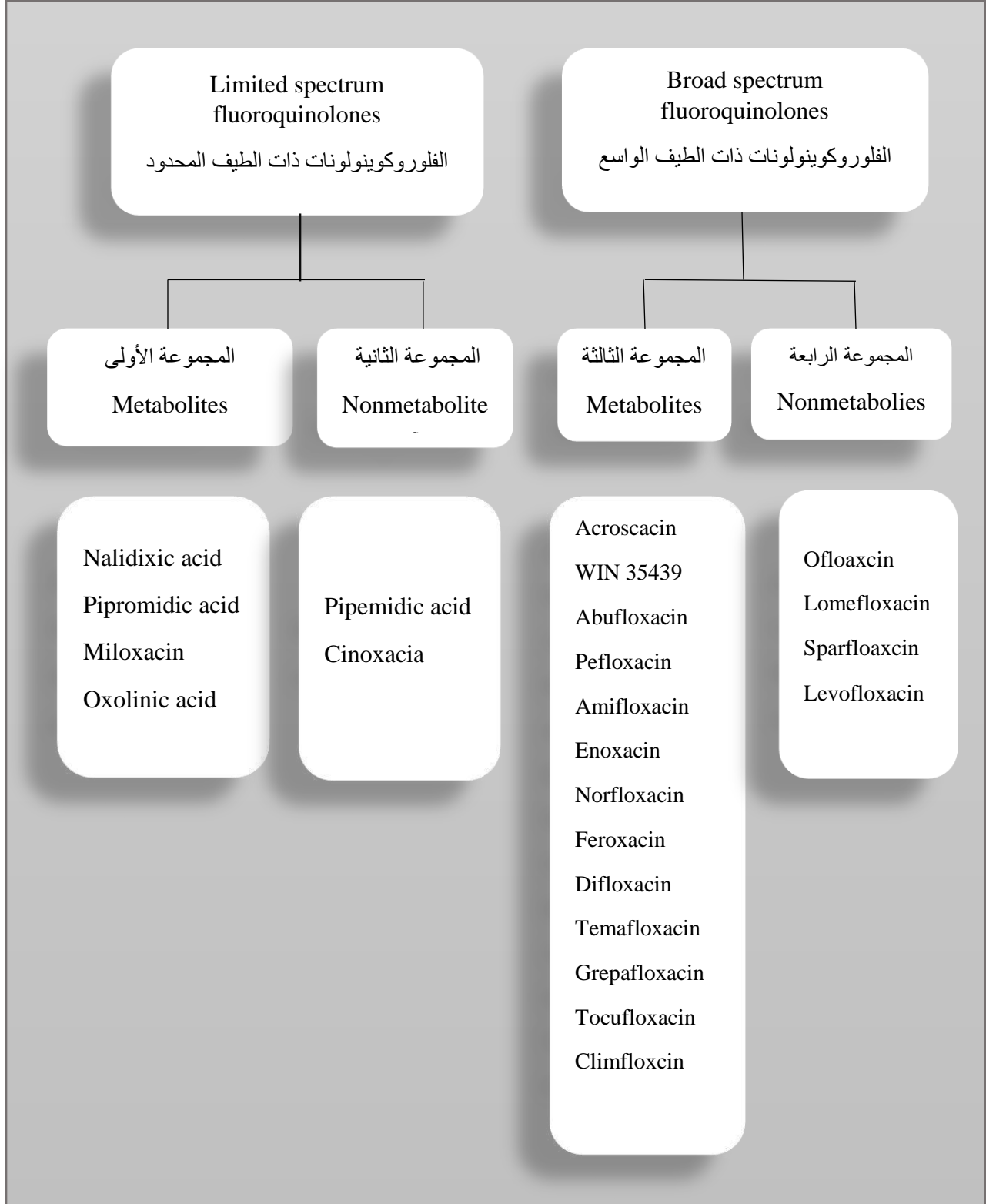
الشكل 3 : التركيب الكيميائي للفلوروكوينولونات

على الرغم من توافر عدة تصنيفات للفلوروكوينولونات الا ان التصنيف الحيوي يعد من أهمها إذ يتضمن هذا التصنيف وجود قسمين رئيسيين من الفلوروكوينولونات الأول : المضادات ذات الطيف المحدود (Limited spectrum) والثاني : المضادات ذات الطيف الواسع (Broad spectrum) (Gupta and Kapoor , 2014) ، بحسب ماهو موضح في الجدول 4 .

1-5-1 : المضاد سبروفلوكساسين (Ciprofloxacin) :

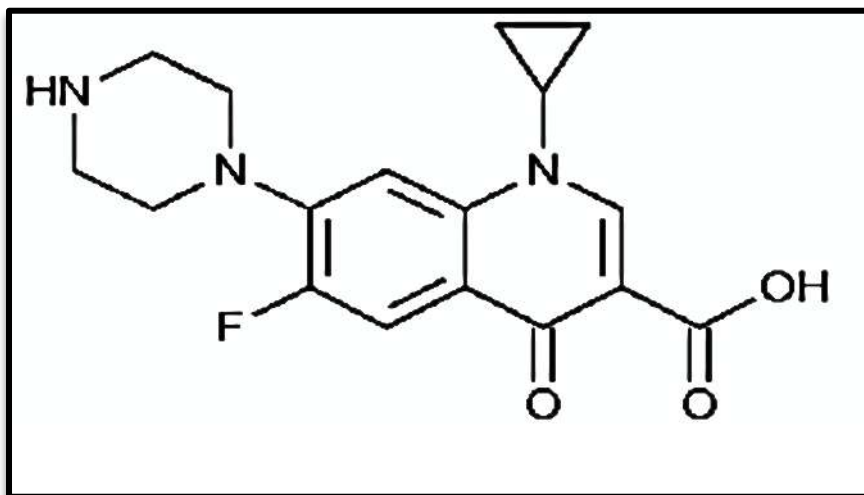
يصنف هذا المضاد ضمن عائلة Fluoroquinolone وقد تم تصنيجه لأول مرة عام 1981 وهو من الجيل الثاني لهذه المضادات وقد اتضح مؤخراً بأنه المضاد الأكثر استهلاكاً في العالم (Acar and Goldstein , 1997) ، بيد أن الاستخدام المتكرر لهذا المضاد و الخاطى أحياناً أدى الى تطور المقاومة البكتيرية له

الجدول 4 : التصنيف الحيوي للفلوروكوينولونات (Gupta and Kapoor , 2014)



(Hart and Kariuki , 1998) . إن السبروفلوكساسين 1-cyclpropyl-6-fluro-1,4dihydro-4-oxo-7-(1-piperaziny)-3-quionlin carboxylic acid يمتلك الصيغة الجزيئية $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ ذو وزن جزيئي 331.4 وهو ذائب في الماء ويبدو كمادة بلورية يتراوح لونها من الأصفر الباهت الى الأصفر البراق ويوضح الشكل 4 التركيب الكيميائي لهذا المضاد (Rang *et al.* , 2003 ; Acar) . (and Goldstein , 1997;)

يمتلك السبروفلوكساسين فعالية تثبيطية عالية ضد مدى واسع من البكتريا السالبة لصبغة غرام وأنواع معينة من البكتريا الموجبة لهذه الصبغة بما فيها معظم السلالات البكتيرية المرضية المسؤولة عن الإصابات التنفسية وإصابات القناة البولية والإصابات المعوية والبطنية. كما يبدي هذا المضاد كفاءة وأمان عاليين في علاج المرضى البالغين من إصابات الجلد والأنسجة الرخوة (Huneault *et al.*, 2004 ; Fass , 1986 ; Dan) . (Kupczik *et al.*, 1990;)



الشكل 4: التركيب الكيميائي للمضاد سبروفلوكساسين .

6-1 : التقنية النانوية (Nanotechnology) :

أشتقت كلمة نانو من Nanos اليونانية التي تعني " القزم " والتي تشير للأشياء ذات الأحجام الصغيرة . وأستعمل مصطلح Nanotechnology لأول مرة من قبل Norio Taniguchi في عام 1974 لوصف المواد التي تتراوح أبعادها بين (1-100) نانوميتر (Boholm ,2016) .

1-6-1 : الدقائق النانوية (Nanoparticles) :

هي دقائق يكون أحد أبعادها على الأقل محصوراً بين (1-100) نانوميتر وهي ليست جزيئات بسيطة في حد ذاتها لذا فهي تتكون من ثلاث طبقات : أ) الطبقة السطحية (Surface layer) والتي يمكن ان تكون فعالة وظيفياً مع مجاميع مختلفة من الجزيئات الصغيرة والأيونات الفلزية (Metal ions) والمواد الخافضة للشد السطحي (Surfactant) والبوليمرات . ب) طبقة الغلاف (Shell layer) وهي مادة مختلفة كيميائياً عن اللب (Core) في جميع الجوانب . ج) اللب ، وهو الجزء المركزي ويشير الى الدقيقة النانوية نفسها (Khan et al. , 2019) .

حظيت الدقائق النانوية بتطبيقات واسعة خصوصاً في مجال الطب الحيوي وأجهزة الاستشعار وكمضادات للأحياء المجهرية وكمحفزات ، وفي الألكترونيات والألياف الضوئية والزراعة ووضع العلامات الحيوية (Bio-labeling) فضلاً عن المجالات الأخرى والتي يمكن تلخيصها في الشكل 5 (Kavitha et al. , 2013) .

1-1-6-1 : تصنيع الدقائق النانوية :

تقسم الدقائق النانوية الى :

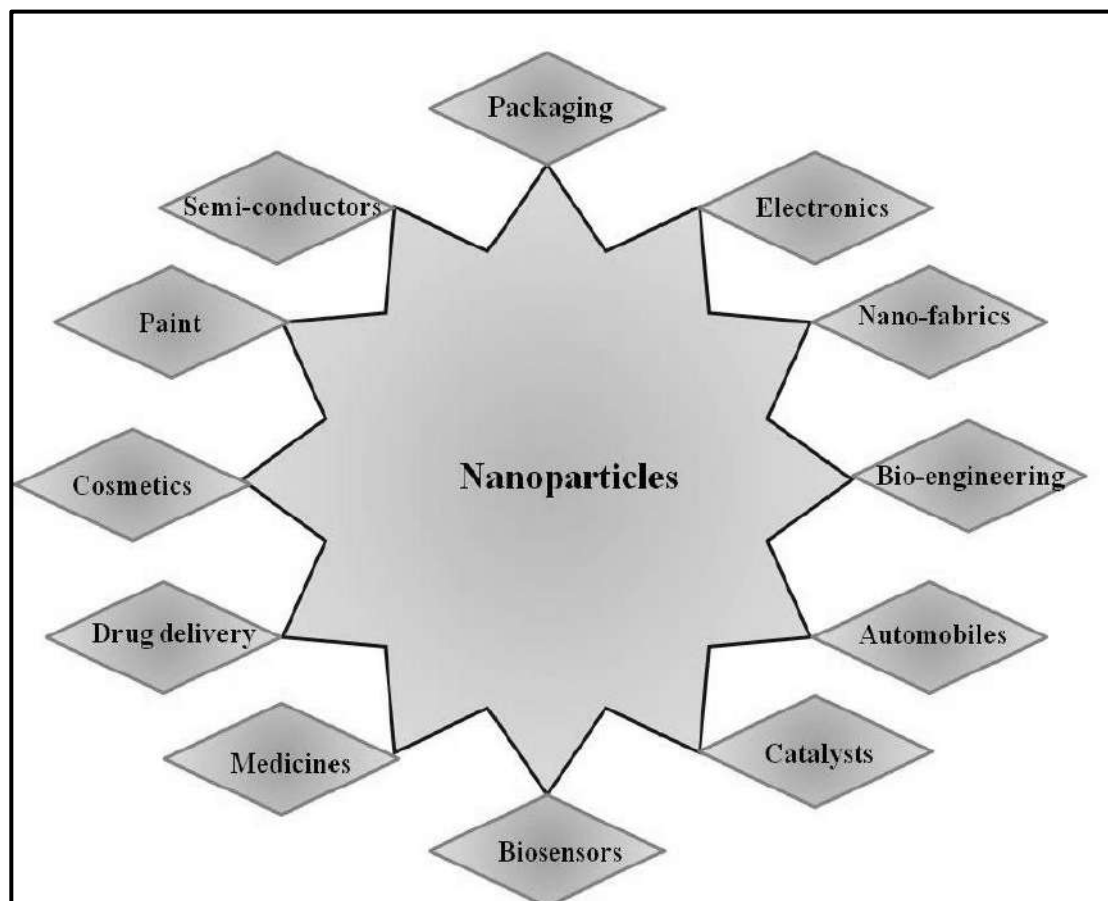
أ- دقائق نانوية غير عضوية (Inorganic nanoparticales)

ب- دقائق نانوية عضوية (Organic nanoparticales)

يتوافر عدد كبير من التقنيات المتاحة لتصنيع أنواع مختلفة من المواد النانوية تشتمل على الطرائق الفيزيائية والكيميائية والبايولوجية بحسب ماهو موضح في المخطط 1 (Rudramurthy et al. , 2016) .

2-1-6-1 : الدقائق النانوية الفلزية (Metal Oxides Nanoparticales) :

إستقطبت الدقائق النانوية الفلزية إهتماماً كبيراً في السنوات الأخيرة بالنظر لتحوير صفاتها من حيث الحجم والتوزيع والشكل مما انعكس على تغيير صفاتها الحفزية والألكترونية والضوئية (Bahrami et al. , 2016) .

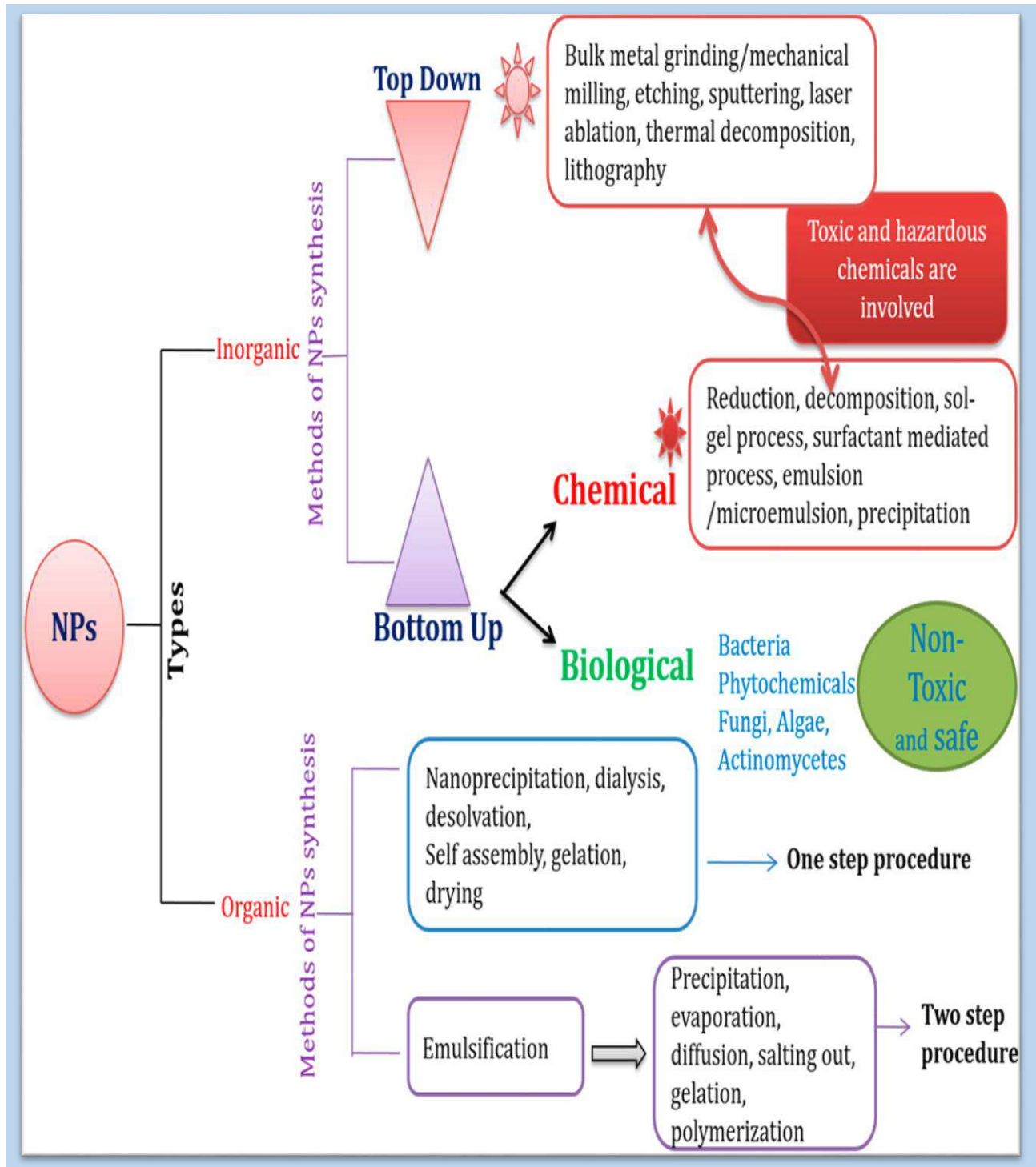


الشكل 5 : التطبيقات المختلفة للدقائق النانوية (Kavitha et al ., 2013) .

1-2-1-6-1 : أوكسيد المغنيسيوم (Magnesium Oxide , MgO) :

يعد من الأكاسيد الفلزية المهمة بالنظر لأتملاكه خصائص فريدة وممتازة تشتمل على الخصائص الضوئية والكهربائية والحرارية والميكانيكية والكيميائية فضلاً عن خصائصه الأيونية (Fakhri & Adami , 2014).

يبيد أوكسيد المغنيسيوم على المستوى النانوي فعالية عالية بالنظر لإحتوائه على عدد كبير من الحواف (edges) ذات الفعالية العالية وطبيعة تركيب سطحه ومستوياته المتشابكة غير الطبيعية (Unusual lattice planes) فضلاً عن سعة مساحة سطحه الى حجمه (Nagappa & Chandrappa ,2007) .



المخطط 1 : الطرائق المختلفة لتصنيع الدقائق النانوية (Rudramurthy et al ., 2016)

يملك أكسيد المغنيسيوم نقطة إنصهار عالية جداً وسعة حرارية منخفضة مما جعله مناسباً لإستخدامه كعازل . يستخدم هذا الأوكسيد بتطبيقات كثيرة في حقول مختلفة تشمل على أستخدامه كمحفز (catalyst) وفي المنتجات الزراعية (Agricultural products) والأصبغ (Paints) وفي الأدوات الضوئية الألكترونية وكمجس ومادة مدمصة (Wang *et al.* , 2007 ; Selvam *et al.* , 2011 ; Mohandes *et al.* , 2010 ; Al-Gaashani *et al.* , 2012) . أما في الجانب السريري فقد أستخدم هذا الأوكسيد في تقنية إيصال الدواء (Drug delivery) والجراحة النانوية وزيادة مستويات كريات الدم الحمراء والبيضاء في الدم فضلاً عن مساهمته في علاج الجروح (Fernandes *et al.* , 2020) .

2-2-1-6-1 : أوكسيد الزنك (Zinc Oxide , ZnO) :

يعد هذا الأوكسيد مركباً لا عضوياً صيغته الجزيئية ZnO ، ويبدو مسحوقاً أبيضاً غير ذائب بالماء تقريباً . وقد حظي هذا المركب بالعديد من التطبيقات أهمها مادة مضافة (additive) لبعض المواد والمنتجات مثل السيراميك (Ceramics) والزجاج والأسمت والمطاط ومواد التشحيم والمواد اللاصقة والبلاستيك والأصبغ والبطاريات (Sabir *et al.* , 2014) . ونظراً لكون أوكسيد الزنك من المواد المعروفة عموماً بكونها آمنة (Generally recognized as safe ,GRAS) وفق مقاييس منظمة الغذاء والدواء الأمريكية لذا فقد تم أستخدامه كمادة مضافة للأغذية فضلاً عن أستخدامه كمادة تدمج مع المواد المغلفة للأغذية (Packaging material) مما يقلل الحاجة الى أستخدام تراكيز عالية من مضادات الأحياء المجهريّة المضافة بشكل مباشر الى المنتجات الغذائية (Espitia *et al.* , 2012) . كما تم أستخدام هذا الأوكسيد كحامل للأدوية (Drug carrier) كمادة مضادة للأحياء المجهريّة وفي بعض المنتجات الصيدلانية (Ashe ,2011) .

3-1-6-1 : الدقائق النانوية كعوامل مضادة للأحياء المجهريّة :

تعمل الدقائق النانوية على تثبيط الأحياء المجهريّة بطرائق مختلفة كما أن آلية عمل هذه الدقائق تختلف حسب أنواعها . تمتلك هذه الدقائق حجماً أقل من 100 نانوميتر مما ينعكس على زيادة مساحتها السطحية نسبة الى حجمها وبالتالي تسمح بزيادة إرتباطها مع جدار الخلية مما يزيد من كفاءتها التثبيطية (Mohanty *et al.* , 2011) .

تمتلك العديد من السلالات البكتيرية القابلية على الألتصاق بأي سطح طبيعي أو صناعي وتكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) على السطوح . وهناك العديد من العوامل المسؤولة عن الألتصاق تشتمل على المواد الشبيهة باللعبالزج ، والتأثرات الألكتروستاتيكية (Electrostatic interactions) وأواصر dipole-dipole والهيدروجينية والتأثرات الكارهة للماء (Hydrophobic interactions) وقوى فاندرفال (Vander waals) لذا فإن المواد النانوية تعمل كعوامل مضادة للأحياء المجهرية عبر تقليل كل من التصاق البكتريا وتكوين الغشاء الحيوي . ويوضح الجدول 5 آلية تأثير الدقائق النانوية ضد الأحياء المجهرية المرضية (Rudramurthy *et al.* , 2016) .

4-1-6-1 : التقنيات والأجهزة المستخدمة في تشخيص الدقائق النانوية :

أستُخدمت العديد من التقنيات في تشخيص الدقائق النانوية والتي يمكن تلخيصها في الجدول 6

وسوف نستعرض أهم تلك التقنيات (Lin *et al.* , 2013) :-

1- التقنيات المجهرية (Microscopical techniques)

تتضمن أستخدام المجاهر الآتية :

a. المجهر الألكتروني الماسح (Scanning Electron Microscope , SEM)

يمكن أستخدام هذا المجهر من تحديد حجم ونوع وشكل وتجمع الدقائق النانوية . أما محددات أستخدامه فتتمثل بأقتصاره على تحليل العينات الجافة فقط فضلاً عن إجراء التحليل تحت الظروف الفسيولوجية (Bernier *et al.* , 2012) .

b. المجهر الألكتروني النافذ (Transmission Electron Microscope , TEM)

يستخدم هذا المجهر في تحديد حجم وعدم تجانس شكل (Shape heterogenicity) الدقائق النانوية فضلاً عن تحديد تجمعها وإنتشارها . يعد أستخدام هذا المجهر مثلاً للنموذج فضلاً عن كلفته العالية (Pan *et al.* , 2013) .

c. مجهر القوة الذرية (Atomic Force Microscope , AFM)

الجدول 5 : آلية تأثير الدقائق النانوية ضد الأحياء المجهرية المرضية وفقاً لـ (Rudramurthy et al ., 2016) .

| نوع الدقائق النانوية | آلية العمل | الأحياء المجهرية الحساسة |
|---|--|---|
| دقائق الفضة النانوية | تتداخل مع سلسلة نقل الإلكترون ونقل الطاقة عبر الغشاء. تمنع تضاعف DNA والسلسلة التنفسية في البكتيريا والفطريات . | الحساسية للميثيسيلين <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> المقاومة للفاونومايسين <i>Enterococcus faecium</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> |
| دقائق أكسيد المغنيسيوم النانوية (MgO) | تكوين أنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS) ، أكسدة الدهون ، والتأثيرات الألكتروستاتيكية ، التأثير القلوي . | <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus subtilis</i> |
| دقائق أكسيد التيتانيوم النانوية (TiO ₂) | تكوين جذور الأوكسيد الفائق (superoxide) ، ROS ، تلف DNA بالموقع المتخصص | <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> وأيضاً ضد الفطريات |
| دقائق أكسيد الزنك النانوية (ZnO) | يخترق بيروكسيد الهيدروجين المتولد على سطح أكسيد الزنك الخلايا البكتيرية ويثبط نموها بشكل فعال . تتسبب أيونات Zn ²⁺ المتحررة من هذه الجسيمات النانوية في تلف غشاء الخلية وتتفاعل مع المكونات داخل الخلايا . | <i>E.coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>salmonella</i> , and <i>S. aureus</i> |
| دقائق الذهب النانوية (AuO) | خلق ثقب في جدار الخلية . يرتبط بالحمض النووي ويمنع عملية الأستنساخ . | الحساسية للميثيسيلين <i>Staphylococcus aureus</i> |
| دقائق النحاس النانوية (CuO) | تقليل البكتيريا الموجودة عبر تفاعلها مع جدار الخلية . يعطل العمليات الكيموحيوية داخل الخلايا البكتيرية . | <i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> |
| الجزئيات النانوية المحتوية على الحديد | من خلال الإجهاد التأكسدي الناتج عن ROS. ROS ، جذور الأوكسيد الفائق (O ⁻²) ، الأوكسجين الذري (O ₂ ¹) ، جذور الهيدروكسيل (OH ⁻) ، وبيروكسيد الهيدروجين (H ₂ O ₂) . | <i>S. aureus</i> , <i>E.coli</i> , <i>S. epidermidis</i> |
| دقائق الألمنيوم النانوية | تحطيم جدار الخلية عن طريق ROS | <i>E.coli</i> |
| جزئيات الكربون النانوية | تحطيم شديد في الغشاء البكتيري ، التأثير الفيزيائي ، تثبيط أيض الطاقة ، ضعف في السلسلة التنفسية . | <i>E.coli</i> , <i>Salmonella enteric</i> , <i>E.faecium</i> , <i>streptococcus spp</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , and <i>K.pneumoniae</i> |

الجدول 6 : أهم التقنيات والأجهزة المستخدمة في توصيف الدقائق النانوية .

| ت | الصفة التشخيصية | التقنيات المستخدمة |
|---|---|---|
| 1 | الحجم وتوزيع الحجم (Size/Size distribution) | DLS, FCS, RS, NSOM, SEM, TEM, STM, AFM, NMR, TOF-MS, XRD, SAXS, FS, UV-visible, AUC, GE, CE, FFF |
| 2 | شحنة السطح (Surface charge) | Zeta potential (ELS), ATR-FTIR, GE, CE |
| 3 | الشكل (Shape) | NSOM, SEM, TEM, STM, AFM, XRD, SAXS, AUC |
| 4 | التركيب (Structure) | TERS, CD, MS, IR, STM, AFM, RS, NMR, XRD, SAXS, FS, DSC, AUC |
| 5 | المكونات (Composition) | MS, NMR |
| 6 | النقاوة (Purity) | MS, NMR, HPLC, HDC |
| 7 | الثبات (Stability) | Zeta potential measurement, CD, TGA, DSC, ITC, thermophoresis, HPLC, HDC |
| 8 | التشتت (Dispersion) | ESEM, TEM, STM, AFM |
| 9 | الخصائص السطحية (surface properties) | CD coupled with an enzyme-linked immunosorbent assay, time-of-flight secondary ion MS, ATR—FTIR, modified AFM, X-ray photoelectron spectroscopy |

يمكن استخدام هذا المجهر للحصول على صورة ثلاثية الأبعاد لسطح الدقائق النانوية كما يمكن تحليل النماذج بصورتها الجافة والمائية ، بيد أنه يستهلك وقتاً طويلاً في التحليل (Gmoshinski *et al.* , 2013).

2- التقنيات الطيفية (Spectrescopical techniques)

وتشتمل على التقنيات الآتية :-

- (a) مطيافية الأشعة تحت الحمراء (Infrared spectroscopy ,IR) تساعد هذه المطيافية في إعطاء صورة مناسبة عن تركيب الدقائق النانوية وتعد تقنية سريعة وغير مكلفة فضلاً عن سهولة تحضير النموذج فيها (Johal & Johnson , 2011) .
- (b) مطيافية حيود الأشعة السينية (X-ray diffraction , XRD) تساعد هذه المطيافية في تحديد حجم وشكل وتركيب المواد البلورية وتتميز بإعطاء فصل واضح للنواتج إلا ان ابرز محدداتها تتمثل بأقتصار استخدامها على المواد البلورية فضلاً عن ضعف شدتها (Low intensity) مقارنةً باستخدام تقنية حيود الألكترون (Electron diffraction) (Zhou *et al.* , 2012) .
- (c) مطيافية الرنين النووي المغناطيسي (Nuclear Magnetic Resonance , NMR) تحدد هذه المطيافية تركيب ونقاوة وتغيرات هيئة المركب كما تعد غير متلفة للنموذج وتتميز بسهولة تحضير النموذج فيها ، الا ان ابرز مساوئها تنحصر بإنخفاض شدتها وتتطلب وقتاً طويلاً للتحليل فضلاً عن حاجتها لكمية كبيرة من النموذج (Sapsford *et al.* , 2011) .
- (d) مطيافية الكتلة (Mass spectroscopy , MS) يمكن من خلال هذه المطيافية تحديد الوزن الجزيئي للمركب وخصائصه السطحية وتتميز بدقة وضبط عاليين في القياس فضلاً عن حساسيتها العالية وحاجتها لكمية صغيرة من النموذج، أما أهم محدداتها فتتمثل بكونها مكلفة (Gmshinski *et al.* , 2013) .

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods

2- المواد وطرائق العمل

1-2 المواد والأجهزة المستخدمة :

1-1-2 الأجهزة المستخدمة والشركات المصنعة لها:

| الشركة المصنعة المنشأ | اسم الجهاز | ت |
|--|---|----|
| Binder – Germany | حاضنة (Incubator) | 1 |
| Denver – Germany | ميزان حساس (Sensitive Balance) | 2 |
| GFL – Germany | جهاز تقطير (Distiller) | 3 |
| Hettich – Germany | جهاز طرد مركزي (Centrifuge) | 4 |
| Human – Germany | ماصات دقيقة (Micropipettes) | 5 |
| Jeio - Tech – Korea | هود بايولوجي (Laminar flow cabinet) | 6 |
| Jenway – Germany | مصباح بنزن (Bunsen burner) | 7 |
| Labtech – Korea | جهاز مزج ذو الصفيحة الساخنة (Magnetic Stirrer with hot plate) | 8 |
| Labtech – Korea | حاضنة هزازة (Shaker incubator) | 9 |
| Labtech – Korea | مؤصدة (Autoclave) | 10 |
| LG – Korea | ثلاجة (Refrigerator) | 11 |
| Motic – Germany | المجهر الضوئي (Light microscope) | 12 |
| Perkin-Elmer 1725x-Japan | مطياف الأشعة تحت الحمراء Fourier transform infrared spectrophotometer (FT-IR) | 13 |
| Shimadzu XRD-6000 powder diffractometer – Japan | مطياف حيود الأشعة السينية (X-Ray diffraction) | 14 |
| Tafesa – Germany | حمام مائي (Water bath) | 15 |
| ROMA – Italy | مازج (Vortex) | 16 |
| Biomeriux (USA) | جهاز الفايترك Vitek-2 Compact System | 17 |
| Euro EA 3000 | جهاز تحليل العناصر الدقيقة (Elemental Analyzer) | 18 |
| Clever-England | وحدة الترحيل الكهربائي (Gel electrophoresis) | 19 |

| | | |
|---|--|----|
| Lab net-USA | PCR Thermo cycler apparatus | 20 |
| AFM model ,AA3000 Advanced Angstrom Inc- USA | Atomic Force Microscope | 21 |
| SIGMA-Germany | جهاز الطرد المركزي المبرد (Cooling) (centrifuge) | 22 |

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

| الشركة المصنعة المنشأ | اسم المادة | ت |
|-----------------------------|---|----|
| BDH – England | كليسيرول (Glycerol) | 1 |
| BDH – England | كلوريد الباريوم (Barium chloride) | 2 |
| BDH – England | حامض الكبريتيك المركز (H ₂ SO ₄) | 3 |
| Himedia – India | وسط (Blood agar base) | 4 |
| Himedia – India | وسط (MacConkey agar) | 5 |
| Himedia – India | وسط Brain – Heart infusion broth | 6 |
| Himedia – India | وسط Muller- Hinton Agar | 7 |
| Intron Biotechnology- Korea | DNA Ladder (100-1500 bp) | 8 |
| Biomerieux – France | عدة التشخيص (API 20 E) | 9 |
| Fluka – Switzerland | اوكسيد الزنك (ZnO) | 10 |
| Fluka – Switzerland | اوكسيد المغنيسيوم (MgO) | 11 |
| Loba Chemie – India | (DMSO) Dimethyl sulfoxide | 12 |
| Scientific researcher-Iraq | Primers | 13 |

| | | |
|---|---|----|
| Pioneer – Iraq | المحلول الملحي الفسلجي (Normal saline) | 14 |
| Promega – USA | الاكاروز (Agarose) | 15 |
| Promega – USA | صبغة بروميد الأثيديوم (Ethidium bromide dye) | 16 |
| Promega – USA | Nuclease free water | 17 |
| Scharlau - European Union | ايتانول مطلق (C ₂ H ₅ OH) | 18 |
| معهد المصول واللقاحات العراقية (VSI) | كاشف الاوكسيديز | 19 |
| معهد المصول واللقاحات العراقية (VSI) | عدة صبغة غرام (Gram Stain) | 20 |
| معهد المصول واللقاحات العراقية (VSI) | بيروكسيد الهيدروجين H ₂ O ₂ | 21 |

3-1-2 العدد (Kits) :

| الشركة المصنعة | نوع الاستعمال | اسم عدة التشخيص | ت |
|-----------------------|---------------------------------------|--|---|
| BioMerieux- France | لتشخيص البكتريا السالبة لصبغة كرام | VITEK-2 GN card | 1 |
| BioMerieux- France | لتشخيص البكتريا الموجبة لصبغة كرام | VITEK-2 GP card | 2 |
| BioMerieux- France | اختبار الحساسية للمضادات الحيوية | VITEK-2 AST card | 3 |
| Promega – USA | عدة استخلاص DNA | عدة استخلاص DNA الجينومي Genomic Extraction kit | 4 |

4-1-2 المواد التي يتم التخلص منها بعد الأستعمال والشركات المصنعة لها :

| الشركة المصنعة | اسم المادة | ت |
|-------------------------|---|----|
| Afco-Dipo – Jordan | أنابيب مختبرية (tubes) حجم 10ml | 1 |
| Afco-Dipo – Jordan | مسحات قطنية معقمة (Sterilized cotton swabs) | 2 |
| Afco-Dipo – Jordan | إبر معقمة (Sterilized needles) | 3 |
| Afco-Dipo – Jordan | اطباق بتري (Petri dish) | 4 |
| BDH – England | Para film | 5 |
| Broche – Malaysia | قفازات مطاطية (Latex Gloves) | 6 |
| HDA- China | قطن طبي (Cotton) | 7 |
| Sartorius – Germany | ورق ترشيح (Filter paper) | 8 |
| Sigma – England | أنابيب ابندروف (Eppendorf tube) | 9 |
| Sterellin Ltd – England | Tips | 10 |

2-2 طرائق العمل :

1-2-2 جمع عينات المسالك التنفسية :

جمعت 60 عينة (مسحة قطنية + عينة قشع) من مرضى الجهاز التنفسي الراقدين في مستشفى الإمام الحسين (ع) في محافظة كربلاء المقدسة لغرض عزل الاحياء المجهرية المسببة لأصابات المسالك التنفسية ، و زرعت العينات على أوساط تفريقية وانتخابية متمثلة بوسطي أكار الدم و أكار الماكونكي لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م° وبعد ظهور المستعمرات تم تنقيتها للحصول على مستعمرات نقية وبعدها أجريت لل عزلات النامية الأختبارات التشخيصية والفحوصات الكيموحيوية فضلاً عن التشخيص بجهاز الفايترك .

2-2-2 الأوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية :

❖ وسط Blood Agar base :-

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بأذبة 40 غم في لتر من الماء المقطر و عقم بعدها بجهاز (autoclave) ، وبعد إكمال عملية التعقيم برد الى درجة (45 – 50) م° وأضيف اليه دم الانسان بنسبة (3 - 5) % . تم استخدام هذا الوسط وسطاً إغنائياً في عزل وتشخيص البكتريا .

❖ وسط MacConkey agar :-

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بإذابة 51.5 غم في لتر من الماء المقطر و عقم بجهاز المؤصدة ، تم استخدام هذا الوسط الزرعي لتنمية وعزل البكتريا السالبة لصبغة غرام وتشخيصها عن طريق تخمير اللاكتوز.

❖ وسط Manitol 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 الأصفر.

❖ وسط Muller- Hinton Agar :-

حُضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة ، وذلك بإذابة 38 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر . عُمق الوسط باستخدام المؤصدة وبعد اكمال عملية التعقيم يُرد إلى درجة (45- 50) م° وتم صبه في أطباق بتري معقمة. وقد أُستخدمت الاطباق لتنمية العزلات البكتيرية لغرض اختبار فحصي الحساسية والفعالية التثبيطية للمضادات الحياتية.

❖ وسط Chocolate agar :-

حضر هذا الوسط بتسخين أكار الدم (blood agar) الى درجة 80 م° لضمان تحلل كريات الدم الحمراء بالتسخين، وقد استخدم هذا الوسط لعزل البكتريا المرضية الحساسة .

❖ وسط Brain – Heart infusion broth :-

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بإذابة 37غم من الوسط في لتر من الماء المقطر ووزع في أنابيب وبعدها عقم بالمؤصدة ، وقد أستخدم هذا الوسط لغرض نمو وتنشيط البكتريا المعزولة و أستخدم ايضاً لحفظ العزلات البكتيرية على المدى الطويل وذلك بأضافة 15 % كليسيروول الى 85 % من الوسط بعد تعقيمه .

2-2-3 الكواشف والمحاليل المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية :-

• كاشف الكاتليز (Catalase reagent) :-

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

• كاشف الاوكسيديز (Oxidase reagent) :-

حضر الكاشف آنياً 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 معتمة . استخدم هذا الكاشف في التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الاوكسيديز , (Macfaddin (2000) .

• صبغة 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 المقطر ، وبعد إتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر أيضاً.

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

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

A. محلول كلوريد الباريوم (1.175%) : أُذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم في كمية من الماء المقطر وبعد إتمام الإذابة أُكْمِل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

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

حُضِر محلول مكفر لاند (انبوبة رقم 0.5) وذلك باضافة 0.5 مل من محلول A الى 99.5 مل من محلول B ومزج المحلول جيداً .

● المضادات الحيوية:-

أُستعملت مضادات حيوية مجهزة من شركة BioMerieux الفرنسية في هذه الدراسة كما مبين في الجدول 7 :

الجدول 7 : المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة

| الرمز | اسم المضاد | ت |
|-------|-------------------------|----|
| AMS | Ampicillin/Sulbactam | 1 |
| PIT | Piperacillin/Tazobactam | 2 |
| CFZ | Cefazolin | 3 |
| CTX | Cefotaxime | 4 |
| CAZ | Ceftazidime | 5 |
| CRO | Ceftriaxone | 6 |
| FEP | Cefepime | 7 |
| AZT | Aztreonam | 8 |
| ERT | Ertapenem | 9 |
| EPM | Imipenem | 10 |
| MPM | Meropenem | 11 |
| AMI | Amikacin | 12 |

| | | |
|-----|-------------------------------|----|
| GEN | Gentamicin | 13 |
| TOB | Tobramycin | 14 |
| CIP | Ciprofloxacin | 15 |
| LEV | Levofloxacin | 16 |
| TIG | Tigecycline | 17 |
| TS | Trimethoprim/Sulfamethoxazole | 18 |
| BPC | Benzylopenicillin | 19 |
| AMP | Ampicillin | 20 |
| MOX | Moxifloxacin | 21 |
| ERY | Erythromycin | 22 |
| CLI | Clindamycin | 23 |
| LIN | Linezolid | 24 |
| VAN | Vancomycin | 25 |
| TET | Tetracycline | 26 |
| C | Chloramphenicol | 27 |
| RIF | Rifampicin | 28 |

4-2-2 عزل وتشخيص البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية :

يمكن إيجاز عملية العزل والتشخيص وفق المخطط 2 :-

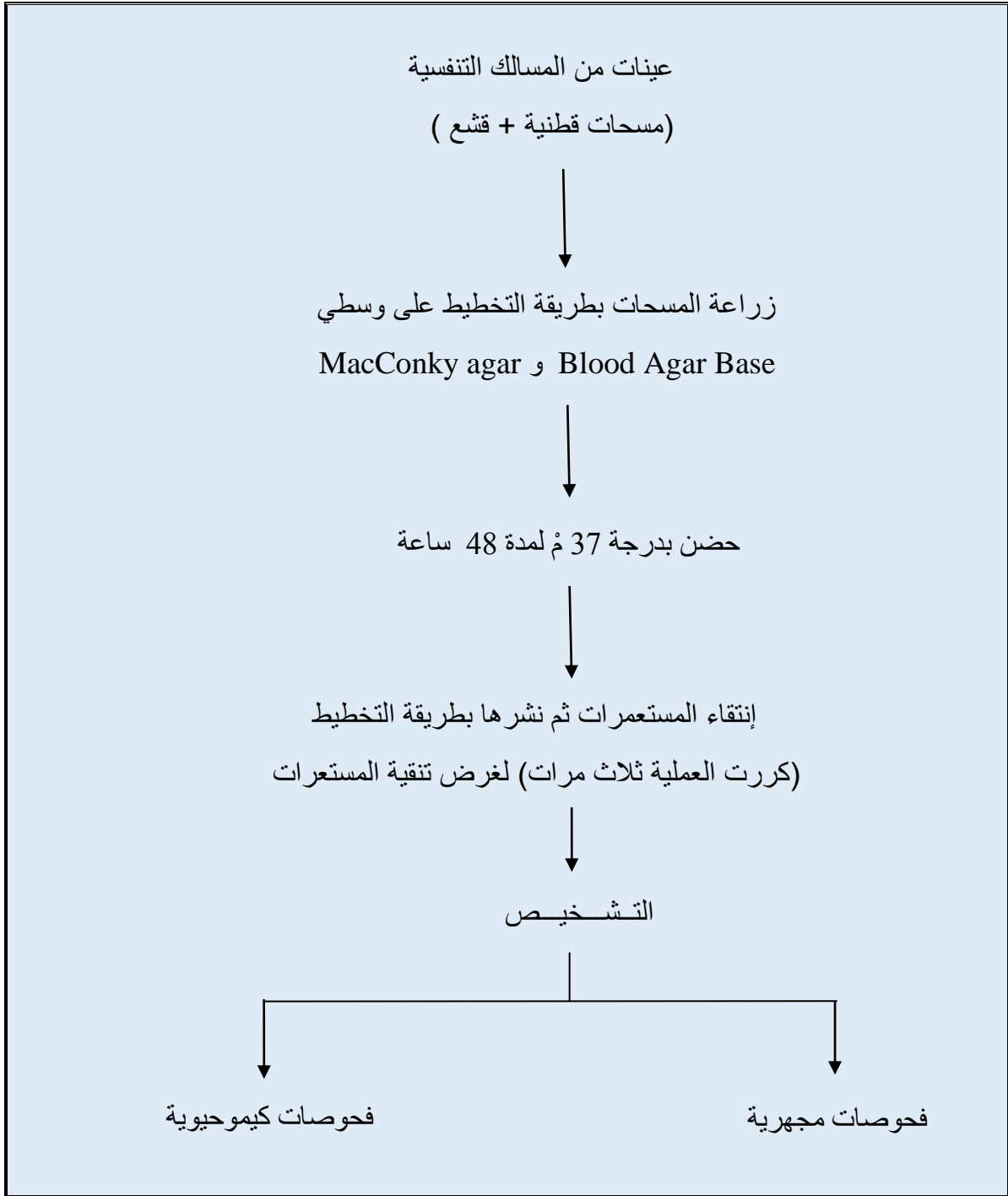
1-4-2-2 تمييز البكتريا الموجبة عن السالبة لصبغة غرام

أختبار 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 إيجابية الفحص وان البكتريا تكون سالبة لصبغة غرام (Markey *et al.*, 2013) .



المخطط 2: عزل وتشخيص البكتريا المسببة لأصابات المسالك التنفسية.

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

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *Klebsiella* إذ تم تشخيصها من خلال الفحوصات المجهرية والكيموحيوية .

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

تم انتقاء المستعمرات النامية على وسط Blood agar الصلب وتم تصبغها بصبغه 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 ظهور الفقاعات دليل على ايجابية الفحص , (Tille , 2014) .

• اختبار الاوكسيديز (Oxidase test) :

تم نقل 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 العالق البكتيري :**

حضر المزروع البكتيري بنقل 5 مستعمرات من العزلات النامية على وسط الماكونكي الى 5 مليلتر من دارئ الفوسفات الملحي المحضر مسبقا في أنبوبة نظيفة ومعقمة ، وتم رجها جيداً للحصول على عكورة ملائمة.

B - اجراء الفحص:

1. حضرت حاظمة الحضن (incubation box) وذلك بإضافة كمية قليلة من الماء المقطر في الحفر (Grooves) لجعل الظروف رطبة.
2. تم تعليم الحاظمة بكتابة اسم البكتريا او العزلة على جانب الحاظمة.
3. لقع الشريط باستخدام ماصة باستور نظيفة ومعقمة ، إذ تم ملئ الجزء السفلي Tube والجزء العلوي Cupule بالعالق البكتيري في حالة الفحوصات VP ، GEL ، بينما في حالة الفحوصات ADH و H2S و URE و LDS و ODC تم ملئ الجزء السفلي بالعالق البكتيري في حين ملئ الجزء العلوي بزيت البارافين السائل المعقم لجعل الظروف لا هوائية فيما اقتصرت بقية الفحوصات على ملئ الجزء السفلي فقط بالعالق البكتيري ،بعدها أغلقت الحاظمة بالغطاء الخاص بها.
4. تمت قراءة النتائج بعد مدة حضن (18- 24) ساعة بدرجة حرارة 37 م° ، وسجلت نتائج الاختبارات في الأنابيب التي لا تحتاج إلى إضافة الكواشف مباشرة فيما أضيفت الكواشف للأنابيب التي تحتاج للإضافة بحسب تعليمات الشركة المجهزة وتم تحديد إيجابية الاختبار من عدمة على وفق الجدول المحدد من قبل الشركة المذكورة.

2-2-4-2-2 تشخيص البكتريا المعزولة باستعمال جهاز الفايترك Vitek-2 Compact System :-

تم تحضير المعلق البكتيري على وفق توصيات الشركة المصنعة ، إذ تم نقل كمية من المستعمرات البكتيرية من مزرعة نقية تم تنقيتها مسبقاً بعمر (18- 24) ساعة الى 3.0 مل من محلول ملحي (sterile saline) معقم في انبوبة معقمة ، وتم ضبط العكورة الى 0.5 ماكفرلاند باستخدام جهاز قياس العكورة (Densi -Chek) وتم استخدام نفس المعلق مع (GN-ID) Gram negative identifier الخاصة بالتشخيص . وأخيراً تم وضع كاسيت GN-ID مع الأنابيب الحاوية على المعلق في حجرة جهاز vitek-2 (Karagoz et al., 2015) .

3-2-4-2-2 عزل وتشخيص الأنواع الأخرى من البكتريا السالبة لصبغة غرام

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتيريا *pseudomonas* و *Escherichia* و *Enterobacter* إذ تم تشخيصها اعتماداً على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتيريا *Klebsiella* .

2-2-4-3 عزل وتشخيص الأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة غرام

2-2-4-3-1 عزل وتشخيص بكتيريا *Streptococcus* :-

يمكن تلخيص عملية عزل وتشخيص بكتيريا *Streptococcus* بالمخطط 3 .

شخصت عزلات بكتيريا *Streptococcus* وفق ماجاء في (Whiley and Hardi,2009) إذ تم

الاعتماد على الصفات المظهرية والفحوصات الكيموحيوية في التشخيص .

❖ الفحوصات المجهرية :

• تصبغ البكتيريا

تم انتقاء المستعمرات النامية على وسط Blood agar الصلب وتم تصبيغها بصبغة غرام للتعرف على شكل الخلايا وتجمعاتها .

❖ الفحوصات الكيموحيوية :-

• اختباري الكاتاليز و الاوكسيديز :-

أجري هذان الأختباران بحسب الطريقة الموصوفة في تشخيص بكتيريا *Klebsiella* المذكورة سابقاً .

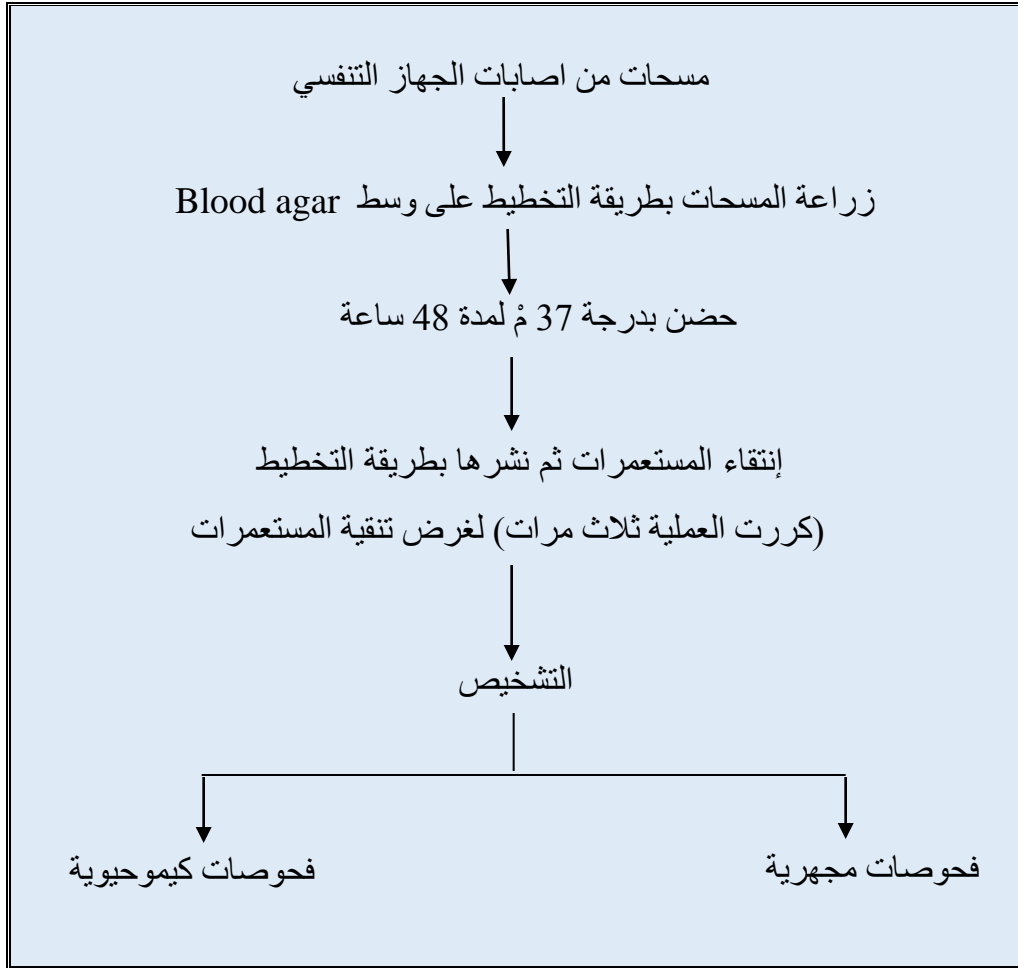
2-2-4-3-2 عزل وتشخيص بكتيريا المكورات العنقودية *Staphylococcus*

يمكن تلخيص عملية عزل وتشخيص بكتيريا *Staphylococcus spp.* بالمخطط 4 .

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.* والتي ظهرت

على الاكار المغذي خلال 24 ساعة من الحضان بدرجة 37 م°، إذ تم تشخيصها اعتماداً على الفحوصات

المجهرية والاختبارات الكيموحيوية الآتية :-

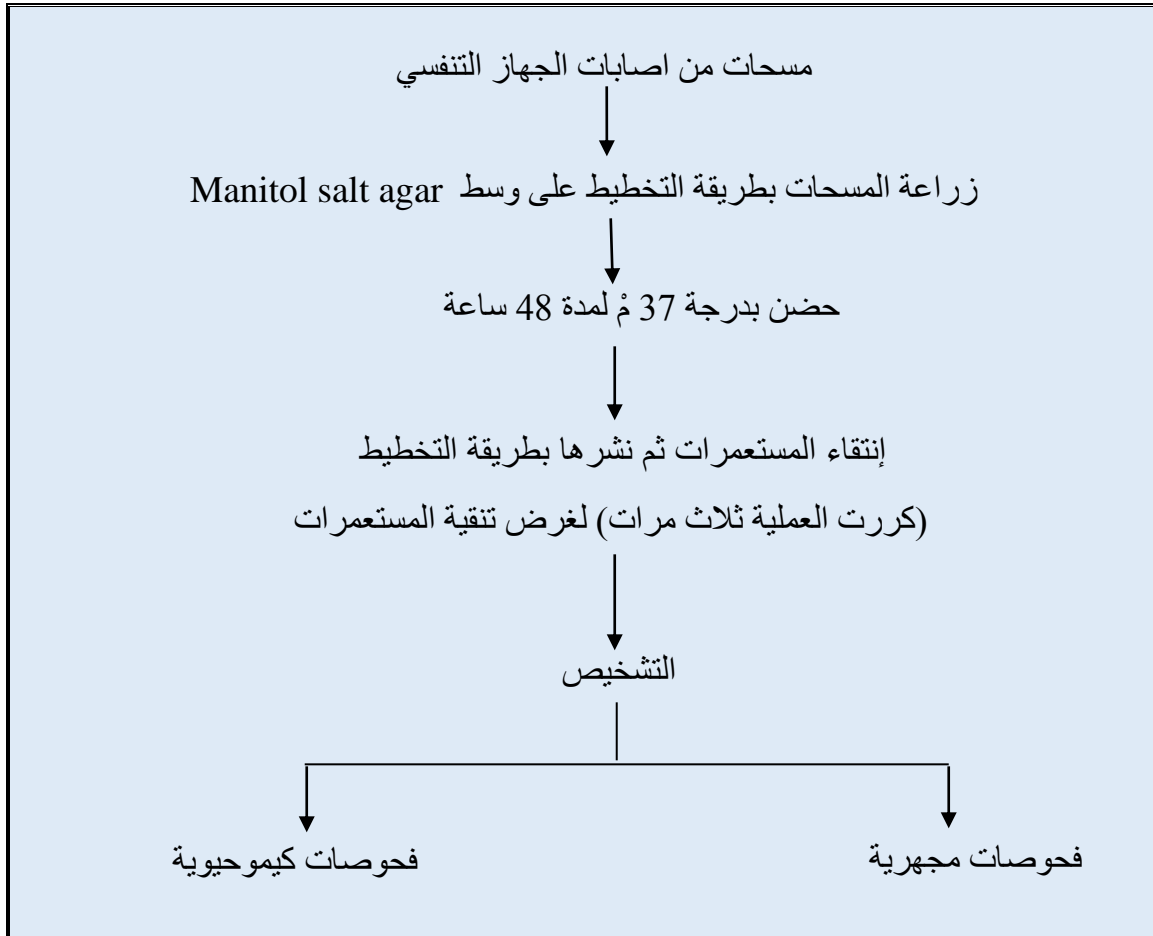


المخطط 3 : عزل وتشخيص بكتريا *Streptococcus*

❖ الفحوصات المجهرية :

• تصبغ البكتريا:

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



المخطط 4 : عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية

❖ الفحوصات الكيموحيوية :

• اختباري الكاتليز والاكسيديز

اجري هذان الاختباران بحسب الطريقة الموصوفة في تشخيص بكتريا *Klebsiella* المذكورة سابقاً.

- **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 الأصفر (Tille , 2014) .

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

تم اختبار العينات باستخدام بلازما الانسان إذ تم وضع 0.5 مل من البلازما في انابيب معقمة ثم نقلت مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة بواسطة عروة (Loop) الى الانابيب الحاوية على بلازما ومزجت جيدا ثم حضنت بدرجة حرارة (35-37) م ولمدة 4 ساعات . ان حصول التجلط دلالة على إيجابية الفحص (Tille , 2014) .

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

تم تمييز مستعمرات بكتريا *Enterococcus* والتي ظهرت على أكار الدم خلال 24 ساعة من الحضان بدرجة 37 م ، أذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية الآتية : -

❖ الفحوصات المجهرية :

- **تصبغ البكتريا:**

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

❖ الفحوصات الكيموحيوية :

- **اختباري الكاتليز والاكسيديز**

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

2-2-5 اختبار حساسية البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية للمضادات الحيوية باستعمال التركيز

المثبط الأدنى MIC:

أجري هذا الاختبار بحسب تعليمات الشركة المجهزة .

6-2-2 التشخيص الجزيئي لبكتريا *K. pneumoniae* :

1-6-2-2 استخلاص الحامض الرايبوزي منقوص الاوكسجين (DNA) من بكتريا *K. pneumoniae* المعزولة :

1-1-6-2-2 الاستخلاص باستخدام عدة الاستخلاص :

أستخدمت عدة التشخيص المجهزة من شركة Promega

والتي تتكون من المحاليل والمواد التالية :

- FATG buffer
- FABG buffer
- buffer W
- Wash buffer
- Elution buffer
- FABG Column
- 2ml Collection tube

طريقة الاستخلاص :

1. تم تنمية عزلات بكتريا *K. pneumoniae* في وسط brain heart infusion broth لمدة 20 ساعة بدرجة حرارة 37 م° ثم سحب 1.5 مل من المزروع البكتيري النامي ووزع في أنابيب ابندروف .

2. أُجريت عملية طرد مركزي للمزروع البكتيري بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لمدة 10 دقائق لترسيب الخلايا إذ أُزيل الجزء الرائق منها ، ثم عُلقَت الخلايا بعدها في 200 µl من محلول FATG ثم مُزجت جيداً و تُركت لمدة خمس دقائق بدرجة حرارة الغرفة .

3. أُضيف 200 µl من محلول FABG إلى معلق الخلايا ثم مُزجت جيداً أعقب ذلك حضان المزيج بدرجة حرارة 70 م° لمدة عشر دقائق من أجل تحلل الخلايا .
4. أُضيف 200µl من الايثانول المطلق الى معلق الخلايا ثم مُزجت جيداً ، من جهة أخرى تم وضع انبوبة الحاوية على الفلتر FABG Column داخل انبوبة جمع (Collection tube) إذ تم سكب العالق البكتيري مع الاضافات السابقة داخل انبوبة الفلتر و أُجريت عملية طرد مركزي لمعلق الخلايا بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لمدة 4 دقائق إذ أُزيل الرائق المتجمع في انبوبة الغسل فيما بقي DNA الخلايا البكتيرية مع رواسب اخرى عالقة في الفلتر .
5. أُضيف 400 µl من محلول الغسل W1 ثم أُجريت عملية طرد مركزي لمدة دقيقة واحدة وتم التخلص من الراشح.
6. أُضيف 600 µl من محلول الغسل الثاني Wash buffer المضاف له الايثانول المطلق، أعقب ذلك إجراء طرد مركزي للمزيج بسرعة 13000 (دورة/ دقيقة) لمدة 5 دقائق .
7. تم وضع انبوبة الفلتر داخل انبوبة إبندروف جديدة وتم التخلص من انبوبة الغسل ثم أُضيف محلول Elution المسخن سابقا في الحمام المائي بدرجة 70 م لعدة دقائق الى انبوبة الفلتر وتركت لعدة دقائق من أجل اعطاء الوقت اللازم لفك ارتباط DNA الخلية البكتيرية من الفلتر.
8. أُجريت عملية طرد مركزي لعدة دقائق اذ تم التخلص من انبوبة الفلتر وتم الاحتفاظ بأنبوبة الابندروف الحاوية على DNA وخزن بعدها بدرجة حرارة -20 م° لحين الاستخدام .

2-6-2-2 تشخيص البكتريا المعزولة باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction , PCR)

• البوادئ المستخدمة في التشخيص:

تم استخدام البوادئ الموضحة صفاتها في الجدول 8 .

المحاليل المستخدمة :

A. تحضير محلول البادئ الخزين (Stock Primers) :

حُضِرَ محلول البوادئ بحسب تعليمات الشركة المجهزة للحصول على تركيز نهائي 100 picomoles/ μ l . ثم حفظ بدرجة حرارة - 20 م° لحين الاستخدام .

B. مزيج Master Mix :

أُسْتُخِدمَ المزيج (Master Mix) المجهز من شركة Intron Biotechnology الموضحة مكوناته في الجدول 9 .

الجدول 8 : البوادئ المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم في الدراسة

| المصدر | Amplicon size (bp) | تتابع البادئ 5`—3` | اسم البادئ | الجين المستخدم |
|----------------------------|--------------------|--|-------------|----------------|
| (Liu <i>et al.</i> , 2008) | 130 | F ATT TGA AGA GGT TGC AAA CGA T R TTC ACT CTG AAG TTT TCT TGT GTT C | 16S rRNA | 16S rRNA |

الجدول 9 : مكونات المزيج Master Mix المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل

| Component | 25 μ l reaction |
|--|---------------------|
| Taq DNA Polymerase | 2.5 U/ ml |
| Each: dNTP (dATP , dCTP , dGTP , dTTP) | 2.5 Mm |
| Reaction Buffer(10x) | 1x |
| Gel Loading buffer | 1x |

C. اجراء تفاعل البلمرة (PCR Assay):

تم تحضير محلول كل بادئ وبشكل منفصل بتركيز 10 بيكو مول\مايكرو ليتر، وذلك بإضافة 10 مايكرو ليتر من المحلول الخزين لكل بادئ كلا على إنفراد إلى 90 مايكروليتر من الماء المقطر اللا أيوني ، ومُزج جيداً وحُفظ في الثلج لحين الاستخدام في حين حُفظت المحاليل الخزينة للبادئ في درجة 20- م°.

تم اضافة المواد الاتية لكل انبوبة من انابيب Master Mix حسب الجدول 10 .

الجدول 10 :المواد المضافة إلى أنابيب Master Mix المستخدم في تفاعل البلمرة المتسلسل

| Component | Concentration | Amount (µl) |
|---------------------|---------------|-------------|
| DNA sample | - | 2 |
| Primer (F) | 10µM/µl | 1 |
| Primer(R) | 10µM/µl | 1 |
| Nuclease free water | - | 16 |
| Master Mix tube | - | 5 |
| Total volume | - | 25 |

تم برمجة جهاز ال- Thermocycler كما في الجدول 11 .

1-2-6-2-2 الترحيل الكهربائي في الهلام (Gel Electrophoresis) :

A- المحاليل المستخدمة:

- صبغة بروميد الأثيديوم (Ethidium bromide) استخدمت بالهيئة المجهزة بها من شركة promega.
- تحضير 0.5 X TBE buffer :

الجدول 11 : برمجة جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل المستخدم في هذه الدراسة

| الخطوة | العملية |
|---|--|
| 1 | دورة واحدة لمدة 2 دقيقة عند درجة حرارة 94 °م للمسح الأولي لـ DNA القالب . |
| 2 | 30 دورة تضمنت : |
| | A 20 ثانية عند درجة حرارة 94 °م لمسح DNA القالب . |
| | B 20 ثانية عند درجة حرارة 55 °م لارتباط البادئ لـ DNA القالب . |
| C 20 ثانية عند درجة حرارة 72 °م لاستطالة البادئ المرتبط . | |
| 3 | دورة واحدة لمدة (2- 5) دقائق عند درجة حرارة 72 °م للاستطالة النهائية لشريط لـ DNA المتضاعف . |

تمت اضافة 500 مليلتر من الماء المقطر الى قنينة واحدة من TBE buffer بتركيز (1X) بحسب تعليمات الشركة المجهزة.

• تحضير هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % :

حُضِر هلام الاكاروز وفق الطريقة الموصوفة من قبل (Sambrook & Russell 2001) مع بعض التحوير وذلك بإذابة 0.75 غم من الاكاروز في 50 مليلتر من محلول 0.5 X TBE buffer ، اذ تم تسخين الاكاروز الى درجة الغليان ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة (45- 50) م° ثم أُضيفت إليه 10µl من صبغة بروميد الأنثيديوم ومُزج الاكاروز جيداً . تم إعداد صفيحة لإسناد الأكاروز (Tray) ثم نُبِت المشط (Comb) لتكوين الحفر (Wells) المُعدة لتحميل العينات ثم صُبَّ الأكاروز بشكل هادئ

ومستمر لتجنب حدوث فقاعات هوائية ، بعدها تُرك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ثم رُفِع المشط بهدوء. بعدها نُقِل الهلام مع القالب إلى حوض الترحيل لإجراء عملية الترحيل الكهربائي .

2-2-6-2-2 الكشف عن نواتج التضاعف :

تم الكشف عن نواتج التضاعف بترحيل العينات على هلام الأكاروز المحضر بتركيز 1.5 % ، اذ تم تحميل 5 مايكرو ليتر من العينات فضلاً عن تحميل 5 مايكرو ليتر من الدليل الحجمي (DNA Ladder) . تم ترحيل النواتج والدليل الحجمي كهربائياً بفرق جهد 70 فولت لمدة 50 دقيقة ، وفُحص الهلام بعد الانتهاء من عملية الترحيل من خلال تعريضه لمصدر للأشعة فوق البنفسجية وتم تقدير الأحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة بالمقارنة مع مواقع الحزم للدليل الحجمي المستخدم والمُرحل مع نواتج التضاعف .

7-2-2 حفظ وإدامة العزلات:

تم حفظ العزلات لفترة قصيرة الأمد وذلك بزرعها في انابيب اختبار مائلة (Slants) حاوية على الوسط المغذي الصلب ، وتحضن لمدة 18 ساعة لتنميتها في درجة حرارة 37 م° وبعدها حفظت بالثلاجة ، إذ يتم تجديد المزارع كل شهر ، كما تم حفظها لمدة طويلة الأمد باستخدام الوسط المغذي السائل Brain heart infusion broth المدعم بـ 15 % من الكليسيرونول بدرجة -20 م° .

8-2-2 تحضير المضادات النانوية الهجينة :

تم استخدام المضادين أزيثرومايسين (Azithromycin) وسيبروفلوكساسين (Ciprofloxacin) في تحضير المضادات النانوية الهجينة .

1-8-2-2 تحضير الحوامل (Carriers) :

محلول رقم (1) محلول أوكسيد الزنك (Zinc Oxide) :

حضر بإذابة 1 غم من أوكسيد الزنك في 50 مل من 50 % كحول الإيثانول

محلول رقم (2) محلول أوكسيد المغنيسيوم (Magnesium Oxide) :

حضر بإذابة 1 غم من أوكسيد المغنيسيوم في 50 مل من 50 % كحول الإيثانول

2-8-2-2 تحضير المضاد النانوي الهجين باستخدام الحامل أوكسيد الزنك

A - تحضير محلول المضاد أزيثرومايسين الحر

حضر هذا المحلول بإذابة 1.2 غم من المضاد أزيثرومايسين في كمية من محلول 50 % كحول الإيثانول وبعد إتمام عملية الإذابة أكمل الحجم الى 50 مل باستخدام 50 % كحول الإيثانول ايضاً .

B - تحضير المضاد النانوي الهجين باستخدام الحامل اوكسيد الزنك (Zinc Oxide) مع المضاد أزيثرومايسين بطريقة التبادل الأيوني :

أُتبعَت الطريقة الموصوفة من قبل (Kolekar et.al. (2011 مع بعض التحوير في تحضير المضاد النانوي الهجين وذلك بإضافة 50 مل من المضاد المحضر أعلاه قطرة قطرة إلى أوكسيد الزنك وحرك المزيج مغناطيسياً بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ثم وُضِع المزيج في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 37 م° لمدة 18 ساعة ثم وضع في الحاضنة عند درجة حرارة 40 م° لمدة 24 ساعة اعقبه فصل الراسب بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة ولمدة 20 دقيقة ومن ثم غُسل بالماء المقطر المُزال منه الايونات مرات عدة وبعدها جفف الراسب عند درجة 40 م° وتم طحنة بالهاون الخزفي واخيراً خزنه . ولا بد من الإشارة إلى أن المضاد النانوي الهجين المحضر بهذه الطريقة أُعطي الرمز Azi-ZnO كما هو موضح في المخطط 5 .

3-8-2-2 تحضير المضاد النانوي الهجين باستخدام الحامل أوكسيد المغنيسيوم

A - تحضير محلول المضاد سيبروفلوكساسين الحر

حضر هذا المحلول بإذابة 1.2 غم من المضاد سيبروفلوكساسين في كمية من محلول 50 % كحول الإيثانول وبعد إتمام عملية الإذابة أكمل الحجم الى 50 مل باستخدام 50 % كحول الإيثانول ايضاً .

B - تحضير المضاد النانوي الهجين باستخدام الحامل أوكسيد المغنيسيوم (Magnesium Oxide) مع المضاد سيبروفلوكساسين بطريقة التبادل الأيوني

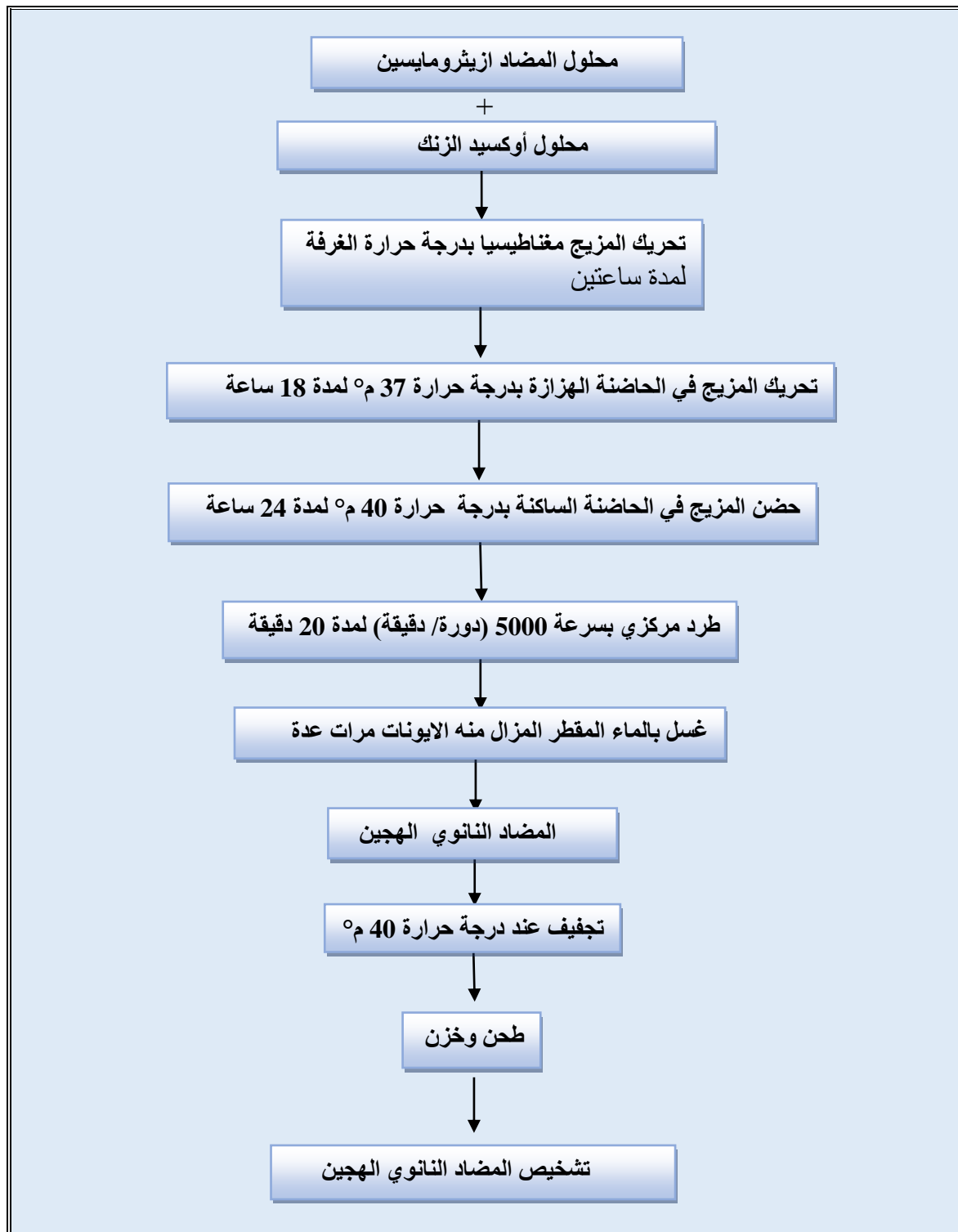
أُتبعَت الطريقة الموصوفة من قبل (Kolekar *et.al.* (2011) مع بعض التحوير في تحضير المضاد النانوي الهجين وذلك بإضافة 50 مل من المضاد المحضر أعلاه قطرة فقطرة إلى أكسيد المغنيسيوم وحرك المزيج مغناطيسياً بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ثم وُضِعَ المزيج في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 37 م° لمدة 18 ساعة ثم وضع في الحاضنة عند درجة حرارة 40 م° لمدة 24 ساعة اعقبه فصل الراسب بوساطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة ولمدة 20 دقيقة ومن ثم غُسل بالماء المقطر المُزال منه الايونات مرات عدة وبعدها جفف الراسب عند درجة 40 م° وتم طحنة بالهاون الخزفي واخيراً خزنه . ولا بد من الإشارة إلى أن المضاد النانوي الهجين المحضر بهذه الطريقة أُعطي الرمز Cip-MgO كما هو موضح في المخطط 6 .

9-2-2 تشخيص المضاد النانوي الهجين :

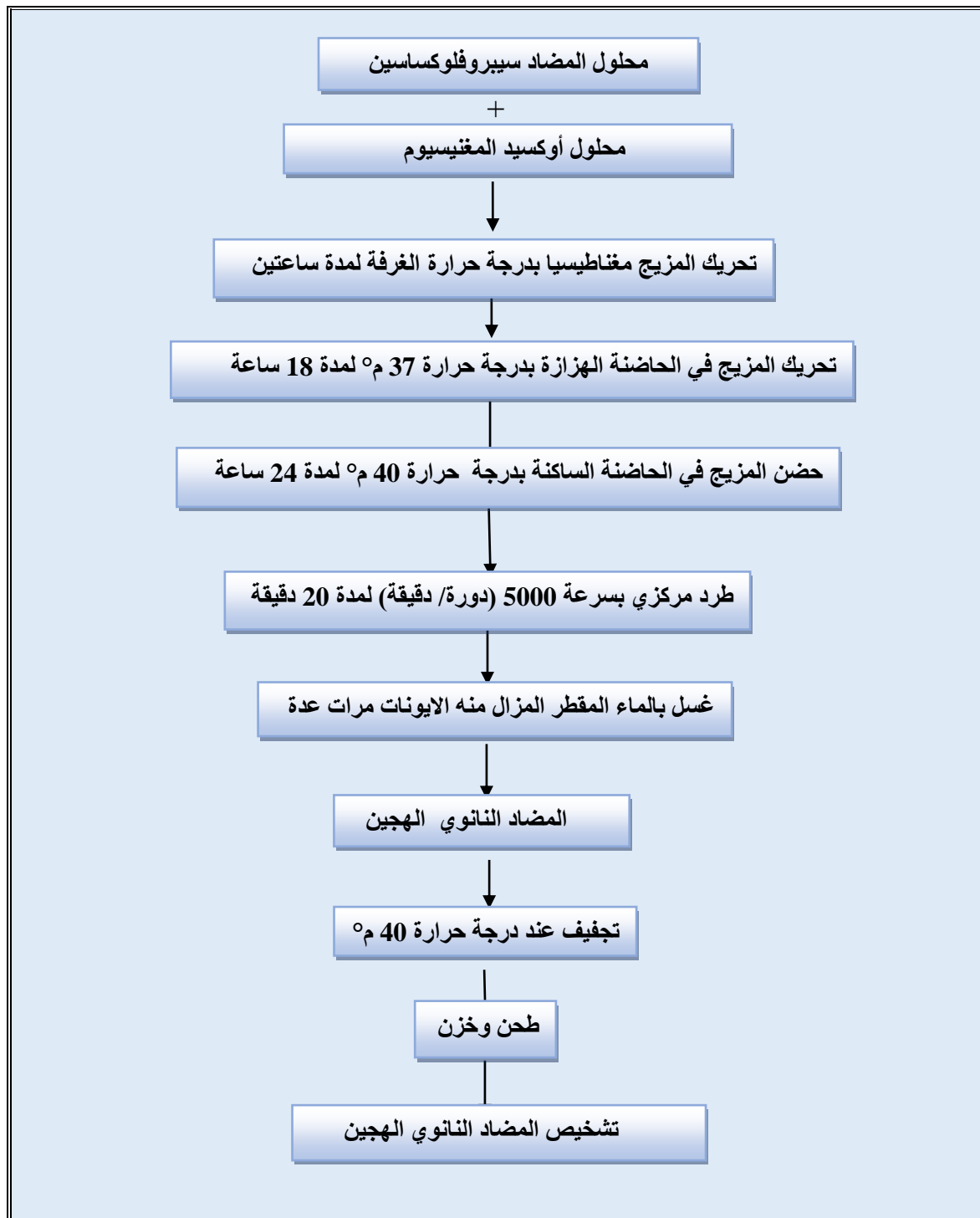
تم استخدام العديد من الطرائق لتشخيص المضاد النانوي الهجين قيد الدراسة ، إشملت على طيف الأشعة تحت الحمراء (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) وطيف حيود الأشعة السينية (X-ray diffraction , XRD) واستخدام مجهر القوة الذرية Atomic Force (Microscope , AFM) فضلاً عن المجهر الإلكتروني الماسح (Scanning Electron Microscope , SEM) .

1-9-2-2 التشخيص باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR):

تمت دراسة طيف الأشعة تحت الحمراء لكل من المضاد النانوي الهجين قيد الدراسة وكذلك المضاد ازيثرومايسين بشكله الحر فضلاً عن أكسيد الزنك ، اذ تم عمل قرص من كل مركب من هذه المركبات مع بروميد البوتاسيوم (KBr) بعد طحنهما 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 .



المخطط 5 : تحضير المضاد النانوي الهجين Azi-ZnO بطريقة التبادل الأيوني



المخطط 6 : تحضير المضاد النانوي الهجين Cip-MgO بطريقة التبادل الأيوني

2-9-2-2 التشخيص باستخدام طيف حيود الأشعة السينية XRD :

تم تشخيص المضاد النانوي الهجين باستخدام طيف حيود الأشعة السينية (XRD) والذي يوضح الاختلاف في سمك الطبقة قبل عملية الاقحام وبعدها لكل من المضادين ازيثرومايسين وسيبيروفلوكساسين وذلك باستخدام قانون براك $n\lambda = 2d\sin\theta$ لإستخراج قيمة سمك الطبقة (d) قبل عملية الاقحام وبعدها. إذن :

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

λ : الطول الموجي للأشعة السينية المستخدمة (أنبوبة نحاس) .

θ : زاوية الحيود للأشعة السينية .

d : المسافة البلورية العمودية بين مستويين متوازيين .

3-9-2-2 فحص المضاد النانوي الهجين باستخدام مجهر القوة الذرية (AFM) :

أُستخدِمَ مجهر القوة الذرية في فحص المضاد النانوي الهجين وقياس اقطار وحجوم وتجمعات الدقائق النانوية ، إذ تم اجراء الاختبار في قسم الكيمياء/ كلية العلوم/ جامعة بغداد .

4-9-2-2 فحص المضاد النانوي الهجين باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM):

تم فحص المضاد النانوي الهجين بالمجهر الإلكتروني الماسح لغرض معرفة شكل السطح للمركب النانوي. إذ يمكن تقييم خشونة السطح ، المسامية ، التجانس ، التوزيع والانتشار المعدني (Palmqvist 2017) .

5-9-2-2 فحص المضاد النانوي الهجين باستخدام مطيافية التشتت (EDS) :

أُستخدِمَت هذه التقنية من أجل تحليل العناصر المكونة للمضاد النانوي الهجين (Caroling et al., 2013) .

6-9-2-2 التحليل الدقيق للعناصر (CHN) في المضاد النانوي الهجين والحر :

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

10-2-2 المضادات الحيوية المستخدمة في تثبيط البكتريا المسببة لأصابات المسالك التنفسية:

• المضاد أزيثرومايسين النانوي الهجين Azithromycin-ZnO

• المضاد أزيثرومايسين الحر Azithromycin -Free

• المضاد سيبروفلوكساسين النانوي الهجين Ciprofloxacin-MgO

• المضاد سيبروفلوكساسين الحر Ciprofloxacin-Free

1-10-2-2 طريقة تقدير الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين قيد الدراسة :

اشتملت هذه الدراسة على اختبار الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين (Azi-ZnO) والمضاد أزيثرومايسين الحر (Azi-Free) والمضاد النانوي الهجين (Cip-MgO) والمضاد سيبروفلوكساسين الحر (Cip-Free) ضد العزلات المتحصل عليها في هذه الدراسة وبتراكيز (512 و 256 و 128 و 64 و 32 و 16) مايكروغرام/ مل على وفق طريقة الانتشار في الاكار بواسطة الحفر (Egorove .,1985) بحسب الآتي :

1 . سُحِب 0.1 مل من اللقاح المحضر و أُضيف الى اطباق حاوية على وسط Muller Hinton agar الصلب وتم نشره جيداً على سطح الطبق بواسطة الناشر L-Shape و تركت الاطباق مدة ساعة في الثلاجة .

2. تم عمل حفر على سطح الاكار باستخدام الثاقب الفليني ذو قطر 5 ملم اذ كانت المسافة متساوية بين حفرة و اخرى .

3. خُفّف المضادان النانويان الهجينان Azi-ZnO و Cip-MgO باستعمال المذيب DMSO للحصول على تراكيز متدرجة تراوحت بين (16-512) مايكروغرام/ مل ، كما خفف المضاد الحر والمضادات الاخرى المذكورة سابقاً لغرض المقارنة .
4. وُضِع 50 مايكرو لىتر من كل تركيز من تراكيز المضادات قيد الدراسة في كل حفرة و حُضنت لمدة ساعة في الثلجة ، ومن ثم حُضنت في الحاضنة بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة.
5. تم قياس اقطار تثبيط نمو البكتريا (ملم) باستعمال المسطرة بعد اكتمال مدّة الحضانة .

2-2- 11 التحليل الاحصائي (Statistical Analysis) :

حللت النتائج إحصائياً بهدف معرفة الفروقات المعنوية بين معدل التثبيط للعوامل المدروسة ضد العزلات البكتيرية المسببة لأصابات المسالك التنفسية المعزولة في هذه الدراسة . تمثلت هذه العوامل بـ : العزلات البكتيرية أولاً ؛ والتراكيز المستخدمة من المضادات الحيوية ثانياً. وقد حددت الفروق المعنوية على مستوى إحصائية 0.05 إذ شمل التحليل الاحصائي تحليل تجارب العاملية (12 * 6) للجداول 20 و 21 و 24 و 25 بينما كانت (10 * 6) للجداول 22 و 23 و 26 و 27 وبمكررين كما تم إختبار الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال إختبار أقل فرق معنوي LSD وعلى مستوى إحصائية

0.05 (الأمام ، 2007) .

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Results & Discussion

3- النتائج والمناقشة

1-3 عزل وتشخيص البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية

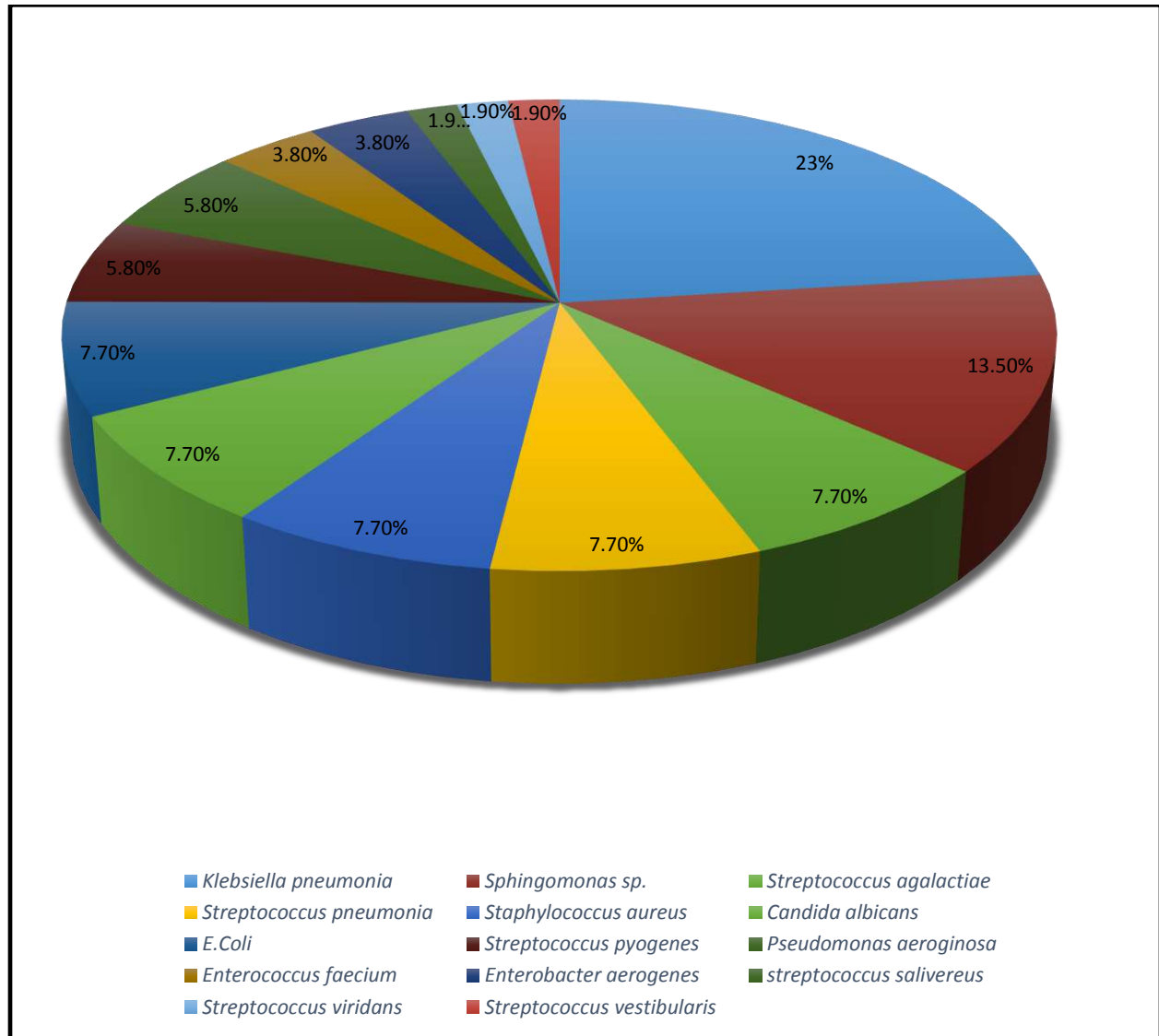
بعد زرع العينات المتحصل عليها من إصابات المسالك التنفسية على وسطي أكار الدم والماكونكي تم الحصول على 52 عزلة منها 48 عزلة بكتيرية و4 عزلات خمائر . تمخضت عملية معاملة العزلات البكتيرية بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم (3%) عن الحصول على 28 عزلة سالبة لصبغة غرام اي بنسبة 53.8 % من مجموع البكتريا والخمائر المعزولة ، فضلا عن 20 عزلة موجبة لهذه الصبغة أي بنسبة 38.4 % من مجموع البكتريا والخمائر المعزولة في هذه الدراسة ايضا . وأعتادا على نتائج التشخيص التي سيرد ذكرها لاحقا ، أسفرت عملية العزل عن الحصول على 12 عزلة (23 %) من بكتريا *Klebsiella Pneumoniae* و 14 عزلة (26.9 %) من جنس *Streptococcus* كانت 4 منها (7.7 %) لكل من *Streptococcus agalactiae* و *Streptococcus pneumoniae* و 3 (5.7 %) و *Streptococcus pyogenes* و 2 (3.8%) من *Streptococcus salivereus* وواحدة منها (1.9%) من *Streptococcus viridans* و 7 عزلات (13.4%) من بكتريا *Sphingomonas sp.* و 4 عزلات (7.7 %) لكل من بكتريا *Staphylococcus aureus* و *E.coli* وخميرة *candida albicans* و 3 عزلات (5.7%) من *Pseudomonas aeruginosa* و عزلتين (3.8%) من كل من *Entreococcus faecium* و *Enterobacter aerogenes* وحسب ما موضح بالشكل 6 .

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ماورد في دراسات سابقة إذ أن النوع البكتيري السائد في هذه الدراسة يماثل ماأشار اليه (Shilpa et al. (2016) الذي تمكن من عزل بكتريا *K.pneumoniae* من عينات القشع من المسالك التنفسية بنسبة 23% .

تمكن (Azzab et al. (2016) أيضا من عزل بكتريا *K.pneumoniae* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas* و *E.coli* و *Streptococcus pneumoniae* من المسالك التنفسية بنسب بلغت (43 و 17.4 و 15.1 و 4.7 و 2.3) % ، على التوالي .

بالرجوع الى الشكل 6 يتضح سيادة بكتريا *K.pneumoniae* على بقية الانواع البكتيرية المعزولة من المسالك التنفسية في محافظة كربلاء المقدسة وقد جاءت هذه النتائج موافقة لما اشار اليه العديد من الباحثين إذ كان هذا النوع من البكتريا هو السائد في إصابات المسالك التنفسية في كل من الهند والنيبال ونيجيريا بنسب بلغت (48.6 و 40 و 30.16) % ، على التوالي (Egbe *et al.*, 2011 ; Nepal *et al.*, 2018 ;

. Vishwanath *et al.*, 2013)



الشكل 6 : انواع البكتريا المعزولة من إصابات المسالك التنفسية في محافظة كربلاء المقدسة

ان سيادة بكتريا *K.pneumoniae* في إصابات المسالك التنفسية يمكن أن يعزى الى مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية عبر قابليتها على إنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف (Extended spectrum beta lactamases , ESBLs) ، وتزايد ظهور السلالات المنتجة لأنزيم Carbapenemase أولاً ، فضلاً عن قابلية هذه البكتريا على تكوين الأغشية الحيوية (Biofilms) التي تساهم في تقليل تعرض البكتريا للقتل بواسطة اليات الدفاع الذاتي للمضيف ثانياً (Chung, 2016) .

ومن جهة اخرى لاتنقق نتائج دراستنا الحالية مع ما حصل عليه (Khan et al . (2015) إذ كانت العزلات البكتيرية *Pseudomonas aerogenosa* و *Streptococcus pneumonia* هي السائدة بين البكتريا المعزولة من إصابات المسالك التنفسية في احدى المستشفيات في النيبال .

2-3 تشخيص البكتريا المسببة لأصابات المسالك التنفسية

1-2-3 تشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام

1-1-2-3 تشخيص بكتريا *K. pneumonia*

• الصفات الزرعية والمجهريّة (Cultural and Microscopical characteristics) :

بعد زرع مسحات المسالك التنفسية على وسطي اكار الدم و اكار الماكونكي و حضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على اثنتي عشرة عزلة بهيئة مستعمرات رمادية اللون مخاطية (mucoid) بينما ظهرت المستعمرات على وسط الماكونكي كبيرة وردية فاتحة مخاطية . أما مجهريا فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام . إن هذه الصفات الزرعية والمجهريّة تشير الى أن العزلات البكتيرية هي *K.pneumonia* (Markey et al.,2013) (الجدول 12) .

يعد وسط الماكونكي وسطاً اختيارياً- تفريقياً ، فهو اختياري من جهة لأنه يحتوي على صبغة Crystal violet المثبّطة لنمو البكتريا الموجبة لصبغة غرام كما يحتوي ايضا على ملح Bile salt المثبّط لنمو البكتريا السالبة لصبغة غرام عدا مجموعة البكتريا المعوية (Enteric Bacteria) ومن جهة اخرى يعد هذا الوسط وسطاً تفريقياً كونه يميز بين الجراثيم المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز . يحتوي هذا الوسط على اللاكتوز والفينول

الأحمر إذ يعد الأخير دليلاً للرقم الهيدروجيني (pH indicator) لذا فإن المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز تنتج حامضاً يعمل بدوره على تغيير لون الدليل إلى اللون الأحمر (Hart and Shears , 2004 ;Quinn *et al.*,2004).

• الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests):

أظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة بالجدول 12 ان بكتريا *K.pneumonia* كانت لاهوائية اختيارية سالبة في فحصي الكاتليز و الأوكسيديز وقد اعطت نتيجة موجبة في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم.

الجدول 12 : الأختبارات الشكلية والكيموحيوية لبعض انواع البكتريا السالبة لصبغة غرام المعزولة من إصابات المسالك التنفسية في محافظة كربلاء المقدسة .

| إستجابة البكتريا | | | | | الأختبار | ت |
|-------------------------------|-------------------|------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------|---|
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | <i>E.coli</i> | <i>Sphingomonas sp</i> | <i>Psudomonas aeruginosa</i> | <i>Klebsilla pneumonia</i> | | |
| - | - | - | - | - | صبغة غرام | 1 |
| خلايا عصوية الشكل | خلايا عصوية الشكل | خلايا عصوية الشكل | خلايا عصوية الشكل | خلايا عصوية الشكل | المظهر الخلوي | 2 |
| لاهوائية اختيارية | هوائية اختيارية | هوائية إجبارية | هوائية | لاهوائية اختيارية | ظروف النمو | 3 |
| + | + | + | + | - | اختبار الكاتليز | 4 |
| - | - | + | + | - | اختبار الأوكسيديز | 5 |
| + | + | - | - | + | تخمير اللاكتوز | 6 |
| + | + | + | + | + | فحص KOH | 7 |

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

تم تشخيص بكتريا *K.pneumonia* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين من خلال النتائج الموضحة في الملحق 1 ان بكتريا *K.pneumonia* أعطت نتائج موجبة في اختبارات ONPG و URE و GLU و MAN

وINO وSOR وRHA وSAC وMEL وAMY وARA بينما أعطت نتائج سالبة في اختبارات ADH وLDC وODC وH₂S وTDA وIND ونتائج متغايرة في اختبارات CIT وVP وGEL . ان نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد ان البكتريا المعزولة هي *K.pneumonia* .

• التشخيص باستخدام جهاز الفايتهك VITEK 2 system:

تم استخدام هذا النظام لتأكيد التشخيص النهائي لبكتريا *K.pneumonia* إذ تم الكشف عن البكتيريا بشكل أسرع وبعيداً عن التلوث الذي قد يمنع اكتشاف العامل الممرض ، وأكدت نتائج الاختبارات المستخدمة في هذا النظام (الملحق 2) النتائج التي تم الحصول عليها من الأختبارات الكيموحيوية وعدة التشخيص API 20E ، لذا فإن جميع العزلات الأثننا عشرة هي بكتريا *K.pneumonia* . يوفر نظام VITEK 2 الأختبارات الكيموحيوية والحساسية للمضادات الحيوية إذ تم استخدام هذا النظام في تشخيص البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام المعزولة من هذه الدراسة بالنظر لسهولة ودقة تشخيص هذه التقنية اذ انحصرت احتمالية التشخيص بين (99-94) % للعزلات المستخدمة في هذه الدراسة على وفق ما موضح في الجدول 13 .

3-2-1-2 تشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* :

• الصفات الزرعية والمجهرية:

بعد زرع مسحات المسالك التنفسية على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على 3 عزلات كانت مستعمراتها مسطحة وذات حافات مسننة متموجة النمو وتمتلك بريقاً معدنياً ذولون أخضر ولها رائحة شبيهة برائحة العنب فضلاً عن ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات بسبب أنتاج البكتريا للهيمولايسين الذي يحلل الدم الموجود في الوسط وغالباً ما يكون التحلل (نوع β)، أما مجهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلات البكتيرية هي *P. aeruginosa* (Tille , 2014) .

أما 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 13 : تشخيص البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام المعزولة من إصابات المسالك التنفسية باستخدام نظام

VITEK-2 Compact System

| احتمالية التشخيص | رقم العزلة |
|------------------|---|
| | <i>K. pneumonia</i> |
| %99 | العزلات K.p2 و K.p3 و K.p4 و K.p5 و K.p6 و K.p9 و K.p10 و K.p11 و K.p12 |
| %98 | العزلات k.p1 و K.p7 و K.p8 |
| | <i>Enterococcus faecium</i> |
| %97 | العزلتان E.f 1 و E.f 2 |
| | <i>Streptococcus pneumonia</i> |
| %95 | العزلات S.p1 و S.p 3 و S.p4 |
| %94 | العزلة S.p2 |
| | <i>Streptococcus agalactia</i> |
| %95 | العزلات S.a 1 و S.a 3 و S.a 4 |
| %99 | العزلة S.a 2 |

● الفحوصات الكيموحيوية :

أظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة بالجدول 12 ان بكتريا *P.aeruginosa* قد أعطت نتيجة موجبة في فحصي الكاتليز والأوكسيديز فضلاً عن اختبار هيدروكسيد الصوديوم .

● تشخيص بكتريا *Pseudomonas* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *P. aeruginosa* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين من خلال النتائج الموضحة في الملحق 3 ان بكتريا *P. aeruginosa* اعطت نتائج موجبة 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 و نتائج متغايرة في اختبارات GLU و SAC و ARA . ان نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد ان البكتريا المعزولة هي *P. aeruginosa* .

3-1-2-3 تشخيص بكتريا *Sphingomonas paucimobilis*

• الصفات الزرعية والمجهرية :

بعد زرع مسحات إصابات المسالك التنفسية على وسط أكار الدم و حضنها بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة تم الحصول على مستعمرات صغيرة صفراء محدبة مرتفعة وغير محللة للدم ، ومجهرية كانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة غرام لذا فإن هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان هذه العزلة هي *Sphingomonas paucimobilis* . من ناحية اخرى لم يلاحظ ظهور نمو على أكار الماكونكي عند تنمية بكتريا *Sphingomonas paucimobilis* على هذا الوسط (Nandy et al., 2013) .

• الفحوصات الكيموحيوية:

أظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 12 ان بكتريا *S. paucimobilis* قد أعطت نتيجة موجبة في فحصي الكاتليز والأوكسيديز فضلاً عن اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

4-1-2-3 تشخيص بكتريا *E.coli*

• الصفات الزرعية والمجهرية :

بعد زرع مسحات إصابات المسالك التنفسية على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على أربع عزلات بهيئة مستعمرات رمادية اللون ناعمة براقعة (Shiny) اما عند تنميتها على وسط الماكونكي فكانت المستعمرات وردية جافة مسطحة محاطة بمنطقة وردية غامقة نتيجة ترسب أملاح الصفراء ، اما مجهرياً 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 12 .

• الفحوصات الكيموحيوية:

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموية الموضحة في الجدول 12 ان بكتريا *E. coli* كانت هوائية اختيارية موجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسيديز كما اعطت نتيجة موجبة 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 من خلال النتائج الموضحة في الملحق 4 ان بكتريا *E. coli* اعطت نتائج موجبة 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. ان نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد ان البكتريا المعزولة هي *E. coli*.

5-1-2-3 تشخيص بكتريا *Enterobacter aerogenes*

• **الصفات الزرعية والمجهرية :**

بعد زرع مسحات المسالك التنفسية على وسط اكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلتين بهيئة مستعمرات كبيرة ناعمة مسطحة حافاتها كاملة بينما على وسط الماكونكي كانت المستعمرات وردية اللون (مخمرة للاكتوز) ومخاطية ، أما مجهريا فكانت بهيئة خلايا عصوية الشكل سالبة لصبغة غرام ، ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلة هي *E. aerogenes* (Tille , 2014) الجدول 12 .

• **الفحوصات الكيمويوية:**

أظهرت نتائج الفحوصات الكيمويوية الموضحة في الجدول 12 ان بكتريا *Enterobacter aerogenes* كانت لاهوائية اختيارية موجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسيديز فيما أعطت نتيجة موجبة في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

• **تشخيص بكتريا *E. aerogenes* بأستخدام عدة التشخيص Api 20 E:**

تم تشخيص بكتريا *E. aerogenes* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين من خلال النتائج الموضحة في الملحق 5 ان بكتريا *E. aerogenes* أعطت نتائج موجبة في اختبارات ONPG و LDC و ODC و CIT و VP 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 H2S و URE و TDA و IND و GEL . أن نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد ان البكتريا المعزولة هي *E. aerogenes*.

2-2-3 تشخيص البكتريا الموجبة لصبغة غرام

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

• الصفات الزرعية والمجهرية :

بعد زرع مسحات المسالك التنفسية على وسط اكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على مستعمرات دائرية كبيرة ومحدبة وبراقة وذات لون أصفر ذهبي ، ولم تتمكن من النمو على اغلب تركيبات وسط الماكونكي ، من ناحية اخرى ظهرت بكتريا المكورات العنقودية (*Staphylococci*) من خلال الفحص المجهرى بشكل خلايا موجبة لصبغة غرام ذات شكل كروي (Spherical cells) متجمعة بشكل عناقيد (Clusters) مما يدل على ان البكتريا تعود لجنس *Staphylococcus* وهذا يتفق مع ما وصفه (Matar , 2014) .

2-1-2-2-3 تشخيص بكتريا *S.aureus* :

تم استخدام الأوساط الزرعية الأغنائية والتفريقية منها وسط اكار الدم ووسط MSA لغرض تشخيص بكتريا *S.aureus* فضلا عن الفحوصات الكيموحيوية .

A- النمو على وسط اكار الدم :

ظهرت بكتريا *S.aureus* عند تنميتها على هذا الوسط بشكل مستعمرات دائرية كبيرة نسبيا ، مرتفعه قليلا ، وذات لون اصفر ذهبي (Yellow-Golden) تحيطها منطقة شفافة نتيجة لتحليلها الكامل للدم من نوع بيتا (-β) (hemolysis) (Benson , 2001) .

B- النمو على وسط اكار المانيتول الملحي (Mannitol salt agar , MSA) :

ان وسط اكار المانيتول الملحي هو وسط تفريري وإختياري بسبب احتوائه على نسبة عالية من ملح كلوريد الصوديوم (7.5 - 10 %) الذي يثبط نمو الكثير من الأحياء المجهرية والتي بالإمكان تحملها من قبل بكتريا *S.aureus* كذلك يحتوي على سكر المانيتول وكاشف الفينول الأحمر إذ ظهرت بكتريا *S.aureus* بشكل مستعمرات صفراء قادرة على تخمير سكر المانيتول مؤدية الى انتاج حامض يتسبب في تحويل الكاشف من اللون الوردي الى الأصفر بحسب ماهو موضح في الجدول 14 (Leboffe & Pierce , 2010) .

C- الفحوصات الكيموحيوية :

أظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 14 ان بكتريا *S.aureus* كانت لاهوائية اختيارية وموجبة لاختبار الكاتليز وسالبة لاختبار الأوكسيديز ومخمرة للمانيتول وأعطت نتيجة سالبة في اختبار هيدروكسيد البوتاسيوم .

الجدول 14 : الأختبارات الشكلية والكيموحيوية لبعض انواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام المعزولة من إصابات المسالك التنفسية

| إستجابة البكتريا | | الأختبار | ت |
|---|------------------------------|--------------------------------------|---|
| <i>Streptococcus spp</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | | |
| + | + | صبغة غرام | 1 |
| خلايا بيضوية وكروية بشكل سلاسل او ازواج | خلايا كروية بشكل عناقيد | المظهر الخلوي | 2 |
| لاهوائية اختيارية | لاهوائية اختيارية | ظروف النمو | 3 |
| - | + | اختبار الكاتليز | 4 |
| - | - | اختبار الأوكسيديز | 5 |
| - | - | فحص KOH | 6 |
| - | + | الوسط الأنتقائي Manitol salt agar | 7 |

2-2-2-3 تشخيص بكتريا المكورات السبحية (*Streptococcus*):

• الصفات الزرعية والمجهريّة :

بعد زرع مسحات المسالك التنفسية على وسط اكار الدم وحقنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على أربع عشرة عزلة بيضاء رمادية ناعمة . تميزت بعض العزلات بقابليتها على تحلل الدم جزئياً (α - hemolysis) فيما تميز البعض الآخر بالتحلل الكامل (β -hemolysis).

• الفحوصات الكيموحيوية:

عند اجراء الفحوصات الكيموحيوية على عزلات *Streptococcus* وجد ان العزلات جميعها سالبة لأختبار الكاتليز والأوكسيديز و فحص هيدروكسيد البوتاسيوم (الجدول 14) .

• التشخيص باستخدام جهاز الفايترك (*VITEK 2 system*):

تم استخدام هذا النظام لتأكيد التشخيص النهائي لبكتريا *Streptococcus* ، إذ أن نتائج الاختبارات المستخدمة في هذا النظام جاءت تأكيداً للنتائج التي تم الحصول عليها من الأختبارات الكيموحيوية إذ انحصرت إحصائية التشخيص بين (94 – 99) % ، وبالتالي فإن تلك العزلات كانت *Streptococcus* (الجدول 13) .

3-3 اختبار حساسية العزلات البكتيرية المسببة لأصابات المسالك التنفسية للمضادات الحيوية

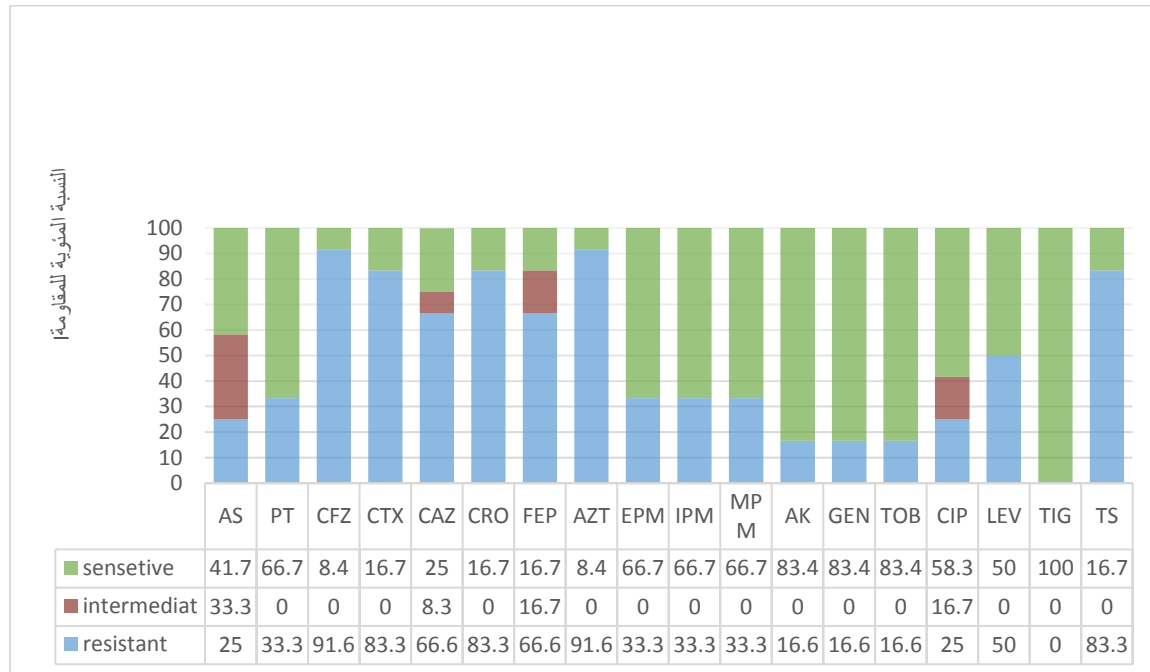
1-3-3 اختبار حساسية عزلات بكتريا *K.pneumonia* للمضادات الحيوية :

أستخدم نظام الفايترك (*Vitek 2*) لتحديد حساسية عزلات بكتريا *K.pneumonia* تجاه عدد من المضادات الحيوية وقيست حساسية العزلات البكتيرية للمضادات بأستعمال التركيز المثبط الأدنى (Minimum inhibitory concentration, MIC) للمضاد.

بينت النتائج الموضحة في الجدول 15 والشكل 7 ان جميع العزلات كانت حساسة بنسبة 100% للمضاد Tigecycline بينما تفاوتت تلك العزلات في مقاومتها للمضادات قيد الدراسة ، إذ بلغت نسبة المقاومة 91.6 % لكل من المضادين Cefazolin(CFZ) و Aztreonam(AZT) و 83.3 % لكل من

الجدول 15: اختبار حساسية عزلات بكتريا *K.pneumoniae* تجاه المضادات الحيوية .

| رمز العزلة | | | | | | | | | | | | المضاد الحيوي | ت |
|------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|----|
| k.p 12 | k.p 11 | k.p 10 | k.p 9 | k.p 8 | k.p 7 | k.p 6 | k.p 5 | k.p 4 | k.p 3 | k.p 2 | k.p 1 | | |
| I | S | S | I | R | S | R | S | S | I | I | R | AS | 1 |
| S | R | S | S | R | S | R | S | S | S | S | R | PT | 2 |
| R | R | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | CFZ | 3 |
| R | R | S | S | R | R | R | R | R | R | R | R | CTX | 4 |
| S | R | S | R | R | I | R | R | S | R | R | R | CAZ | 5 |
| R | R | S | R | R | R | R | R | S | R | R | R | CRO | 6 |
| S | R | S | R | R | I | R | R | I | R | R | R | FEP | 7 |
| R | R | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | AZT | 8 |
| S | R | S | S | R | S | R | S | S | S | S | R | EPM | 9 |
| S | R | S | S | R | S | R | S | S | S | S | R | IPM | 10 |
| S | R | S | S | R | S | R | S | S | S | S | R | MPM | 11 |
| S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | R | AK | 12 |
| S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | R | GEN | 13 |
| S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | R | TOB | 14 |
| S | R | S | S | R | I | S | S | S | S | I | R | CIP | 15 |
| S | R | S | S | R | R | R | S | S | S | R | R | LEV | 16 |
| S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | TIG | 17 |
| S | R | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | TS | 18 |



الشكل 7 : النسب المئوية لمقاومة بكتريا *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية

Ceftriaxone(CRO) و Cefotaxime(CTX) و Trimethoprim/Sulfamethoxazole(TS) و 66.6 و % لكل من المضادين Cefepime(FEP) و Ceftazidime(CAZ) و 50 % للمضاد Levofloxacin(LEV) .

تتفق نتائج دراستنا الحالية في جزء منها مع ما حصل عليه Kumar (2013) إذ أن البكتريا المعزولة من اصابات المسالك التنفسية كانت مقاومة للمضاد Cefotaxime(CTX) والمضاد Cefipime(FEP) بنسبة (66.8 و 88.8) % ، على التوالي.

واتضح إنها تتفق أيضا مع ما حصل عليه Amin et al . (2009) إذ بلغت نسبة المقاومة للمضادين Cefotaxime و Ceftriaxone (82.5 و 85) % ، على التوالي في دراسة أجريت في الباكستان .

يمكن تفسير حساسية جميع عزلات بكتريا *K.pneumonia* للمضاد Tigecycline عبر إرتباط هذا المضاد بالوحدة الرايبوسومية الصغيرة 30s ومنع دخول جزيئات Aminoacyl-tRNA الى الموقع A في الرايبوسوم (Cercenado ,2007) .

يتضح من النتائج مقاومة جميع العزلات البكتيرية قيد الدراسة للسيفالوسبورينات ويمكن ان يعزى ذلك الى أملاكها لأنزيمات cephalosporinase التي تقوم بتحليل حلقة البييتالاكتام (β -lactam) الموجودة في هذه المضادات (Nasehi et al., 2010) .

أشارت احدى الدراسات الى ان مقاومة عزلات بكتريا *K.pneumonia* بلغت 77.5 % لمجموعة السلفوناميد Trimethoprim/Sulfamethoxazole (Al-Obadi , 2014) وبذلك جاءت نتائج دراستنا مقارنة لماأشارت اليه تلك الدراسة .

2-3-3 اختبار حساسية بعض عزلات البكتريا الموجبة لصبغة غرام المعزولة من إصابات المسالك التنفسية للمضادات الحيوية :

تم استخدام نظام الفايتهك (Vitek 2) في اختبار حساسية بكتريا *S.pneumoniae* تجاه عدد من المضادات الحيوية اشتملت على Benzylpenicillin و Ampicillin و Cefotaxime (CTX) و Ceftriaxone(CRO) و Gentamicin(GEN) و Levofloxacin(LEV) و Moxifloxacin و Erythromycin (E) و Clindamycin(DA) و Linezolid و Vancomycin(VA) و (TE) و Tetracycline و Tigecycline (TIG) و Chloramphenicol (C) و Rifampicin (RA) و (Trimethoprim/Sulfamethoxazole(TS)) .

واظهرت النتائج الموضحة في الجدول 16 ان عزلات بكتريا *S. pneumoniae* كانت مقاومة للمضادات Ampicillin و Cefotaxime و Ceftriaxone و Gentamicin و Benzylpenicillin و Erythromycin و Tetracycline بنسبة 100 % في حين كانت هذه العزلات مقاومة للمضادات Levofloxacin و Moxifloxacin و Clindamycin بنسبة 75 % ، بينما بلغت نسبة مقاومتها 50 %

للمضاد Vancomycin , ومن جانب اخر فقد كانت جميع العزلات المذكورة حساسة للمضادين Rifampicin و Linezolid بنسبة 100% فيما كانت حساسة بنسبة 75% للمضاد Chloramphenicol.

أوضحت نتائج الدراسة الحالية ارتفاع نسب المقاومة تجاه مضادات البييتالاكتام وهي Ampicillin و Cefotaxime و Ceftriaxone وقد جاءت تلك النتائج موافقة لما وجدته Kumar & Singh (2019) إذ كانت بكتريا *S.pneumoniae* مقاومة بنسبة 100% للمضاد Ampicillin .

ان وجود المقاومة العالية لمضادات البييتالاكتام من قبل هذه البكتريا قد يعزى الى انزيمات البييتالاكتاميز التي تقوم بتحليل الأصرة الأميدية في حلقة البييتالاكتام الرباعية (Tooke et al.,2019) .

لقد جاءت نتائج الدراسة الحالية موافقة أيضا لما وجدته Motaweq & Naher (2017) إذ كانت بكتريا *S.pneumoniae* مقاومة للمضاد الحيوي Erythromycin بنسبة 100% .

تم اختبار حساسية عزلات بكتريا *S.agalactiae* تجاه المضادات نفسها المستخدمة في اختبار حساسية بكتريا *S.pneumoniae* وظهرت النتائج الموضحة في الجدول 16 ان جميع عزلات بكتريا *S.agalactiae* كانت حساسة بنسبة 100% للمضادات Benzylpenicillin و Cefotaxime و Ceftriaxone و Levofloxacin و Moxifloxacin و Erythromycin و Tigecycline و (Trimethoprim/ Sulfamethoxazole, TS) في حين كانت هذه العزلات مقاومة بنسبة 100% للمضادات Gentamicin و Tetracycline و Rifampicin و بنسبة 50% للمضادان Linezolid و Chloramphenicol.

تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما توصل اليه Melo et al . (2016) الذي اشار الى ان بكتريا *S.agalactiae* المعزولة من احدى المستشفيات في البرازيل كانت حساسة للمضادين Cefotaxime و Levofloxacin بنسبة (100 و 99.3) % ، على التوالي .

وعند ملاحظة الجدول 16 ذاته يتضح ان عزلتي بكتريا *E .faecium* كانتا حساستين بنسبة 100% للمضادات Linezolid و Vancomycin و Tigecycline و Chloramphenicol و Trimethoprim/Sulfamethoxazole (TS) في حين كانتا مقاومتين بنسبة 100% لبقية المضادات

الجدول 16: اختبار حساسية بعض انواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام للمضادات الحيوية

| <i>E. faecium</i> | | <i>S. agalactiae</i> | | | | <i>S. pneumoniae</i> | | | | اسم العزلة | |
|-------------------|------|----------------------|------|------|------|----------------------|------|------|------|------------|----|
| E.f2 | E.f1 | S.a4 | S.a3 | S.a2 | S.a1 | S.p4 | S.p3 | S.p2 | S.p1 | رقم العزلة | ت |
| R | R | S | S | S | S | R | R | R | R | BPC | 1 |
| R | R | S | R | S | S | R | R | R | R | AMP | 2 |
| R | R | S | S | S | S | R | R | R | R | CTX | 3 |
| R | R | S | S | S | S | R | R | R | R | CRO | 4 |
| R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | GEN | 5 |
| R | R | S | S | S | S | R | S | R | R | LEV | 6 |
| R | R | S | S | S | S | R | S | R | R | MOX | 7 |
| R | R | S | S | S | S | R | R | R | R | ERY | 8 |
| S | R | S | R | S | S | R | R | R | I | CLI | 9 |
| S | S | S | R | R | S | S | S | S | S | LIN | 10 |
| S | S | S | R | S | S | I | I | S | S | VAN | 11 |
| R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | TET | 12 |
| S | S | S | S | S | S | I | S | S | S | TIG | 13 |
| S | S | S | R | R | S | R | S | S | S | C | 14 |
| R | R | R | R | R | R | S | S | S | S | RIF | 15 |
| S | S | S | S | S | S | I | I | I | I | T/S | 16 |

المستخدمة في هذه الدراسة .

3-4 تشخيص بكتريا *K.pneumoniae* بالطرائق الجزيئية :

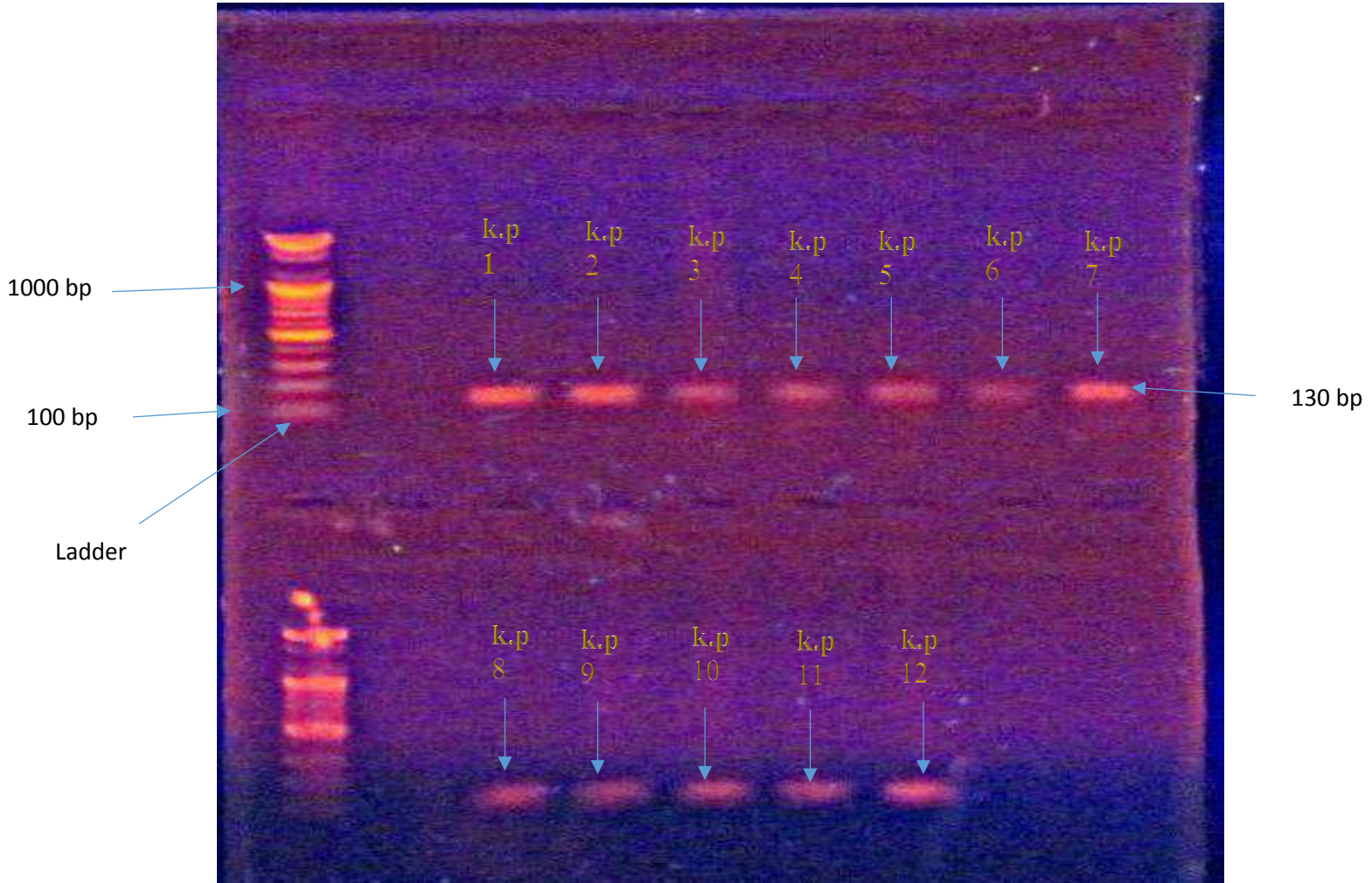
تظل تقنيات التشخيص التقليدية هي الطرائق الأساسية المستخدمة لتشخيص العزلات البكتيرية ، بيد انها تستغرق وقتا طويلا ويمكن ان تتضمن اختبارات كيميائية حيوية متعددة فضلا عن كونها مكلفة احيانا (خاصة عند استعمالها في تشخيص Fastidious organisms ، لذا فإن التوجه نحو استخدام الطرائق الجزيئية بأستخدام تقنية Polymerase Chain Reaction هو الحل البديل اذ تتميز هذه التقنية بكونها سريعة وذات حساسية وتخصص عاليين على الرغم من انها مكلفة (Clifford et al., 2012).

لقد تم استخدام جين 16s rRNA في تشخيص بكتريا *K.pneumoniae* وذلك عن طريق استخدام البوادي النوعية والمتخصصة لهذا الجين ، إذ يتميز هذا الجين بكونه عالي الثبات وغير قابل للتغير بمرور الزمن لذا فإنه يعد معيارا ذهبيا في التشخيص (Janda & Abbott, 2007) وقد استعمل منذ فترات طويلة في دراسة العلاقات التطورية في البكتريا (Patel, 2001) . فضلا عن ثباته العالي فإن جين 16s rRNA يحتوي على مناطق عالية التباير بين الأنواع البكتيرية وبذلك فإنه يوفر تسلسلا خاصا بكل نوع من أنواع البكتيريا ويساعد في تشخيص تلك الأنواع (Elgaml et al ., 2013) .

يوضح الشكل 8 الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي يتبين من خلالها أن البادئ الخاص بالجين 16s rRNA كان ناحجا في تضخيم هذا الجين عبر ظهور ناتج PCR يبلغ حجمه 130 bp .

أشارت العديد من الدراسات الى أستخدام هذا الجين في تشخيص بكتريا *K.pneumoniae* فقد استخدم AI-Obadi (2014) هذا الجين في تشخيص 40 عزلة من هذا النوع ، كما استخدم (Aurna 2017) الجين نفسه في تشخيص 11 عزلة من بكتريا *K.pneumoniae* وأشار الأخير الى ان هذا الجين يوفر وقتاً كبيراً مقارنةً بالطرائق التقليدية القائمة على النمط الظاهري ويمكن أن يكون أداة مفيدة للكشف السريع عن *K. pneumoniae* قبل أن تتطور العدوى الى المرحلة الحادة .

3-5 تشخيص المركبات النانوية المحضرة بالطرائق الطيفية :



الشكل 8 : الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لبكتريا *K.pneumoniae* باستعمال البادئ النوعي لجين 16s rRNA (130bp) , بتركيز هلام 1.5% ، و فولتية 70 فولت لمدة 50 دقيقة.

1-5-3 طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) :

1-1-5-3 طيف الاشعة تحت الحمراء للمضاد Azithromycin الحر :

يتضح من الشكل 9 ان المضاد Azithromycin بحالته الحرة يظهر العديد من الحزم المميزة عند ترددات معينة إذ أن ظهور حزم الأمتصاص عند الترددات (3238 و 3416 و 3493 و 3560) سم⁻¹ يشير الى أهتزاز مط مجموعة الهيدروكسيل O-H . كما أن ظهور الحزمتين عند الترددتين (2937 و 2976) سم⁻¹ تشيران الى

أهتزاز مط مجموعة CH الأليفاتية . ويلاحظ من الشكل 9 أيضا ظهور حزمة قوية ومميزة عند التردد 1722 سم⁻¹ تعود لمط مجموعة الكربونيل الأسترية . أما الحزمتان عند الترددين (1658 و 1467) سم⁻¹ فيمكن أن تعودان لمط مجاميع C-N ، بينما يمكن أن تعود الحزمة الظاهرة عند التردد 1377 سم⁻¹ لحني مجموعة CH الأليفاتية فيما تعود الحزمة الظاهرة عند التردد 1192 سم⁻¹ لمط أوامر C-O المنفردة (Silverstein *et al.* , 2005) .

2-1-5-3 طيف الأشعة تحت الحمراء لأوكسيد الزنك :

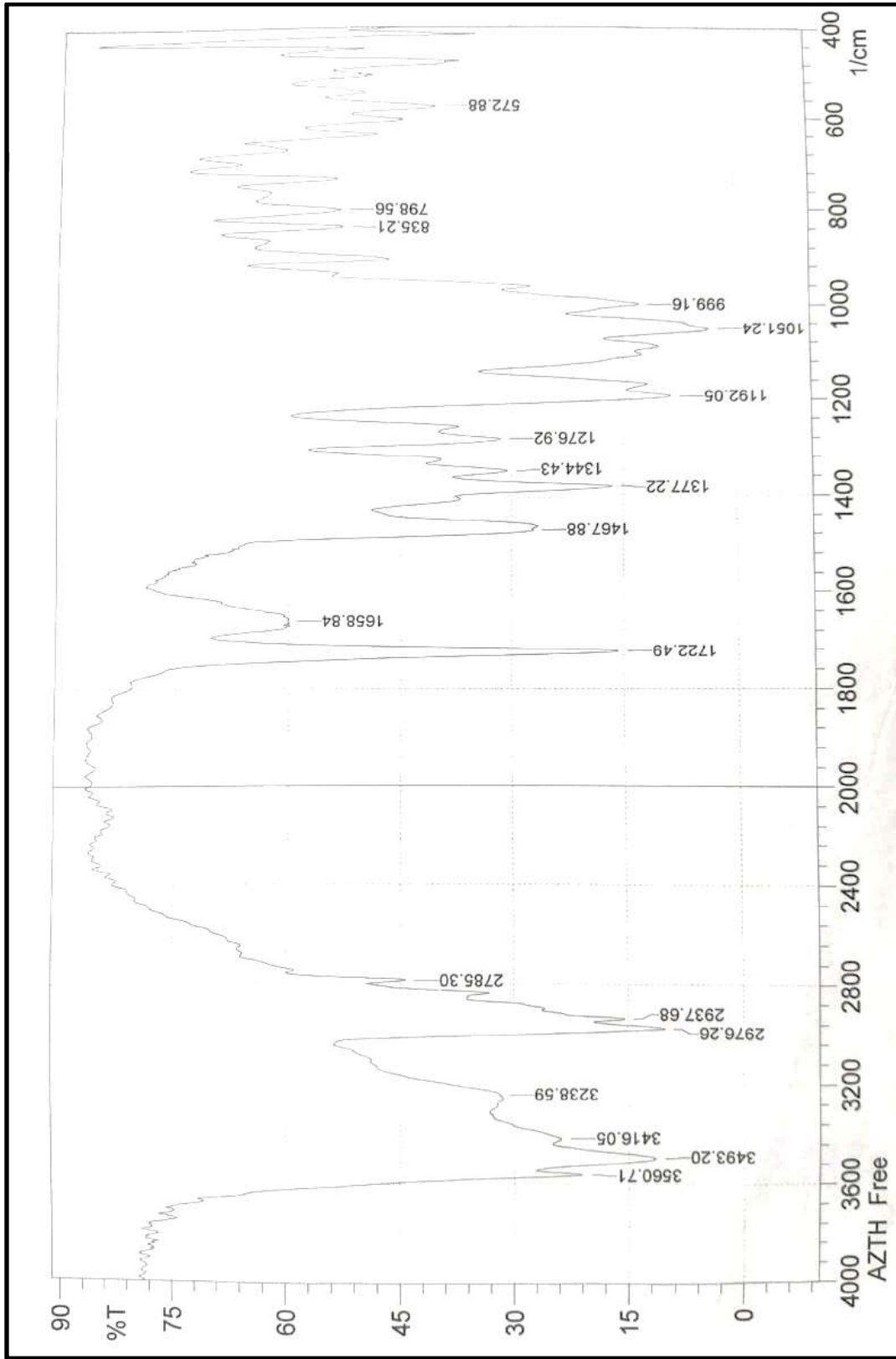
أظهرت طبقات أوكسيد الزنك حزمة غير واضحة واقعة عند التردد (400 – 500) سم⁻¹ والتي تعزى إلى اهتزاز رابطة المعدن Zn-O (Voicu *et al.*, 2013) كما هو موضح في الشكل 10 .

3-1-5-3 طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد أزيثرومايسين النانوي الهجين Azi-ZnO :

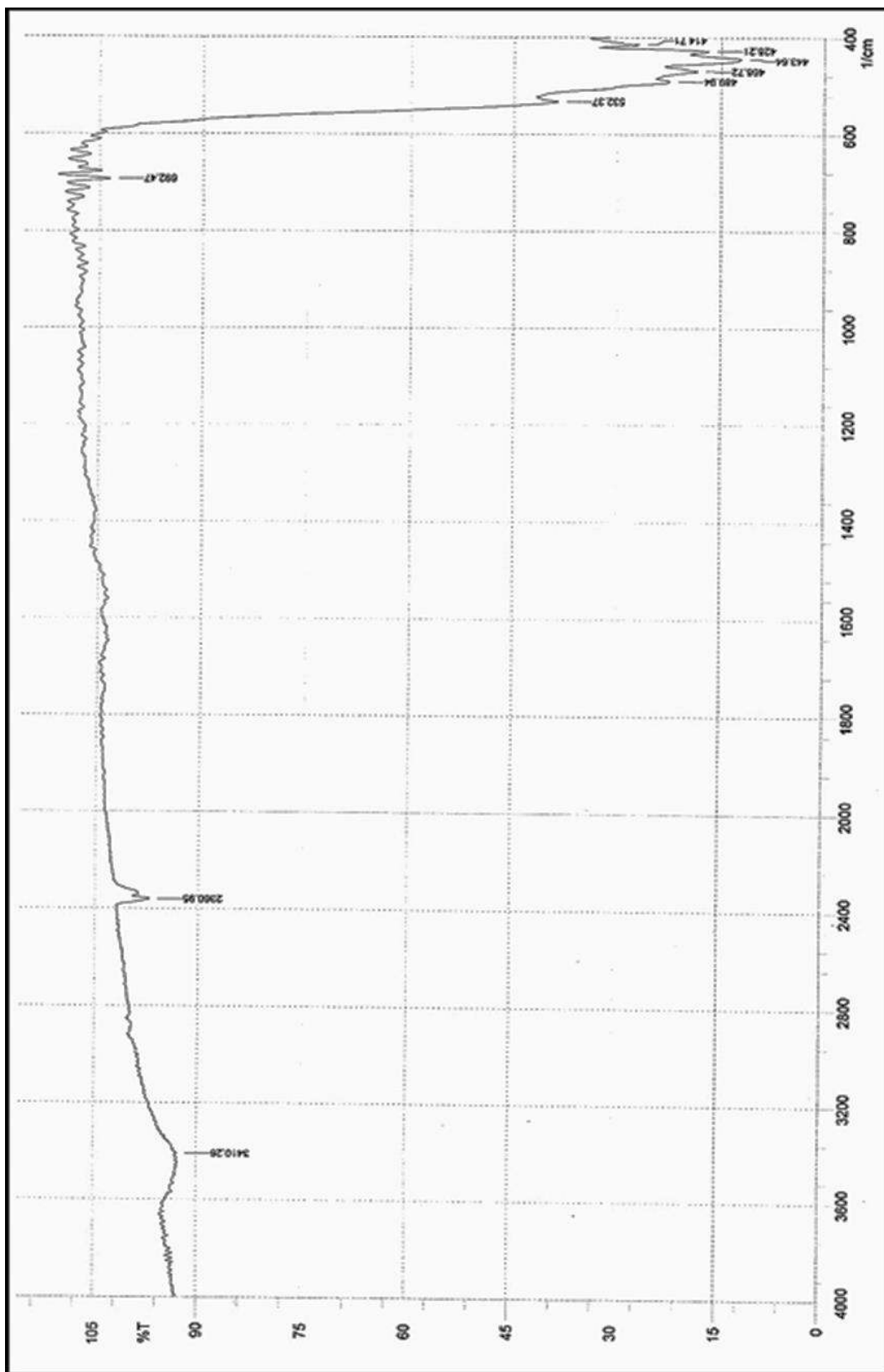
عند التمعن بالشكل 11 يتضح حصول تغير في طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO إذ يلاحظ ظهور حزمتي إمتصاص عند الترددين (3547 و 3417) سم⁻¹ العائدتين لمط أوامر OH الكحولية مع تغير شكل الحزم إذ أصبحت عريضة بعد ان كانت حادة في طيف المضاد Azithromycin الحر . كما يلاحظ حصول إنزياح لأوامر مط CH الأليفاتية ، إذ أصبحت عند الترددين (2970 و 2835) سم⁻¹ بعد إن كانتا على الترددين (2976 و 2937) سم⁻¹ [أي حصول إنزياح نحو تردد أوطأ] .

وظهرت حزمة عند التردد (1730) سم⁻¹ عائدة لمط الكربونيل C=O الأسترية بتردد أعلى بعد أن كانت ظاهرة عند التردد 1722 سم⁻¹ مع إنخفاض في شدة الحزمة .

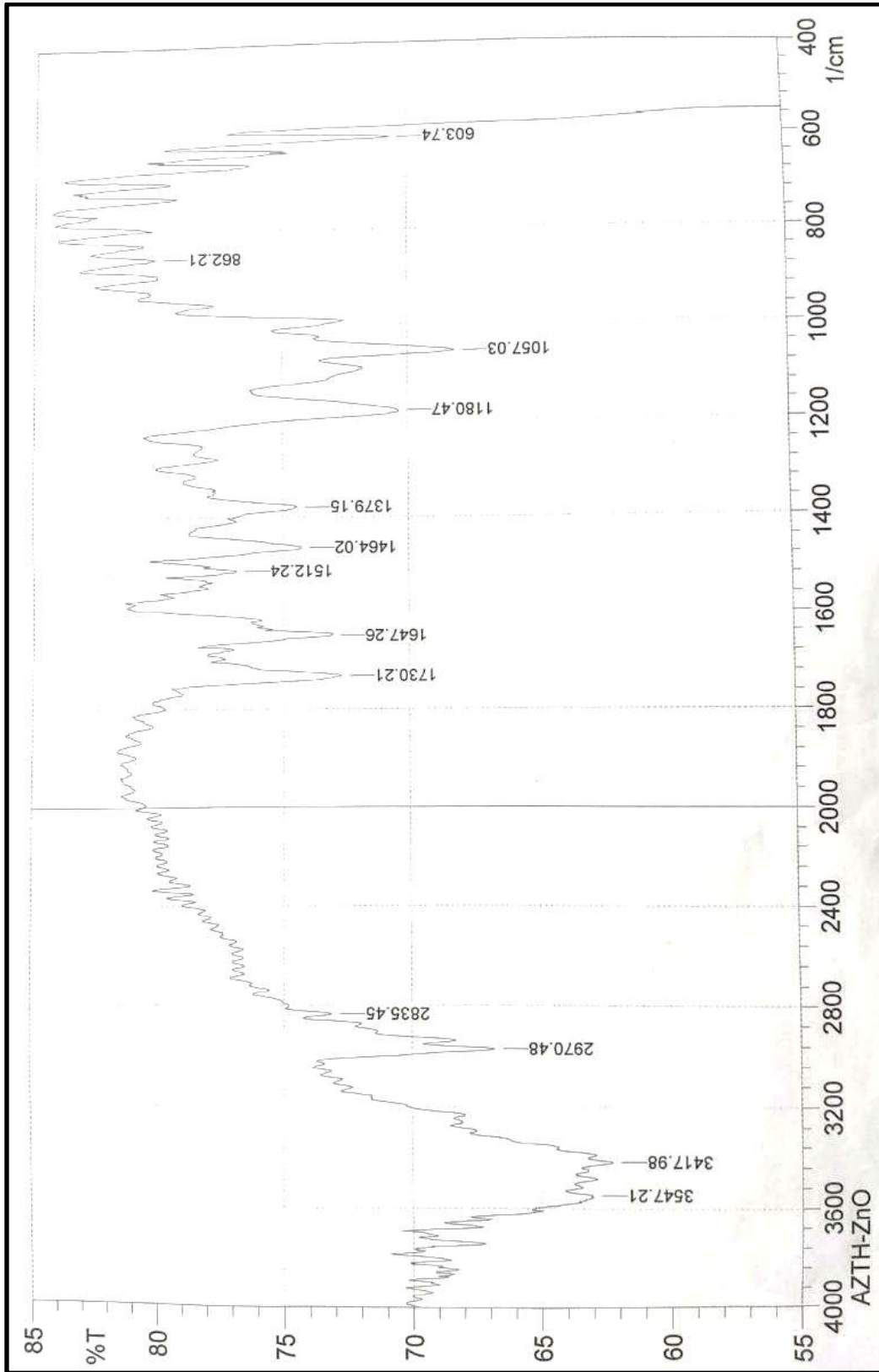
وعانت الحزمتان العائدتان لمط أوامر C-N المنفردة من إنزياح نحو تردد أوطأ إذ ظهرت عند الترددين (1647 و 1464) سم⁻¹ بعد أن كانتا عند الترددين (1658 و 1467) سم⁻¹ . كما عانت الحزمة الظاهرة عند التردد 1379 سم⁻¹ والعائدة لحني CH الأليفاتية من حصول إنزياح نحو تردد أعلى . وأخيرا فإن الحزمة العائدة لمط أوامر C-O المنفردة قد ظهرت بتردد أوطأ (1180 سم⁻¹) بعد أن كانت ظاهرة عند التردد 1192 سم⁻¹ في طيف المضاد الحر (Silverstein *et al.* , 2005) .



الشكل 9 : طيف الاشعة تحت الحمراء للمضاد Azithromycin الحر



الشكل 10 : طيف الاشعة تحت الحمراء لأوكسيد الزنك



الشكل 11 : طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد أزيثروميسين الثانوي الهجين AZH-ZnO

3-5-1-4 طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد Ciprofloxacin الحر :

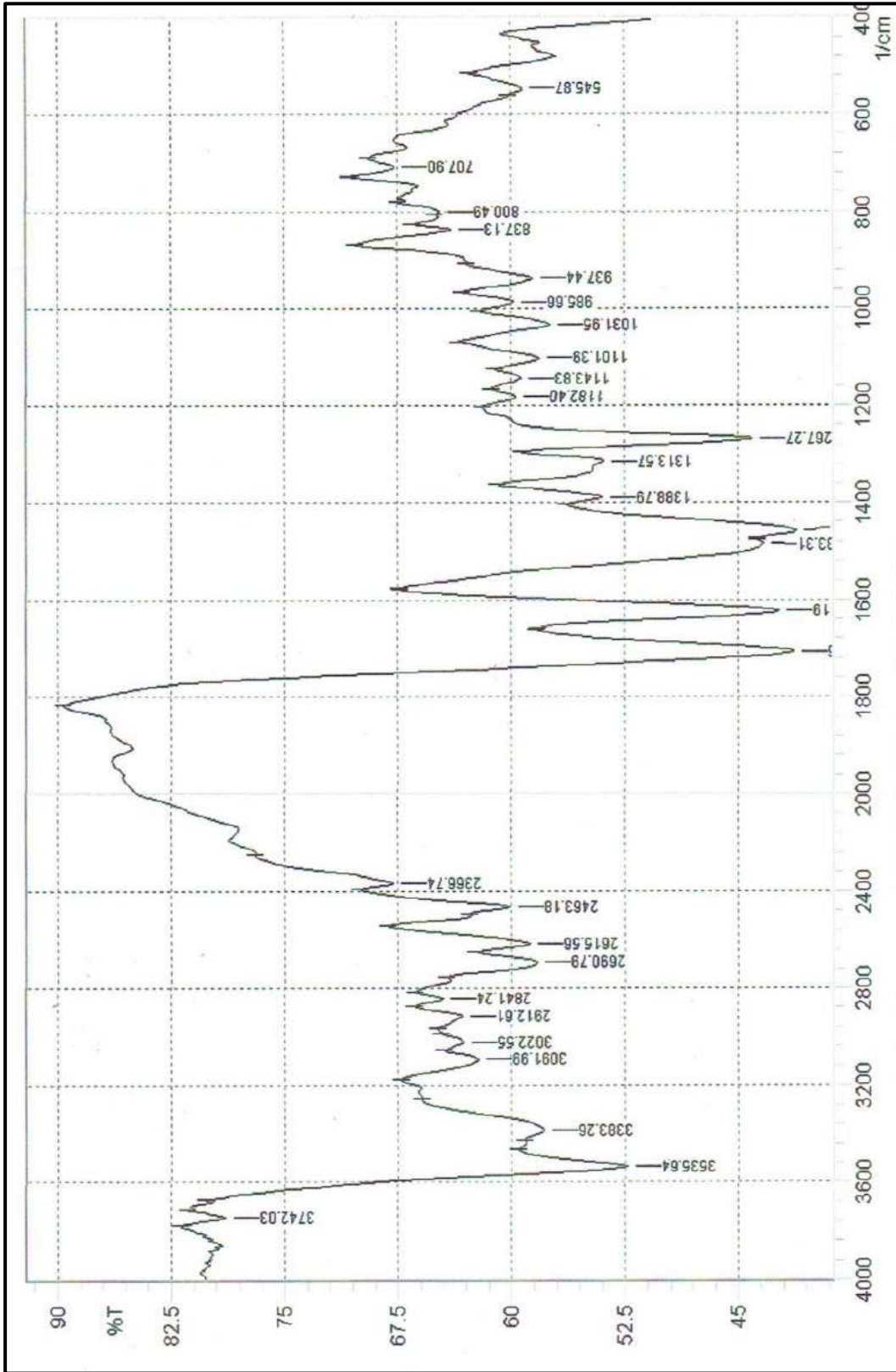
يتضح من الشكل 12 أن السبروفلوكساسين بحالته الحرة يظهر العديد من الحزم المميزة عند ترددات معينة إذ أن ظهور الحزمة عند التردد 3535 سم⁻¹ يشير إلى إهتزاز مط لرابطة الهيدروكسيل O-H للحامض والتي تبدو حادة (Sharp) ، كما أن ظهور الحزمة عند التردد 3383 سم⁻¹ يُعزى إلى N-H الأمينية، في حين ان الحزمة عند الترددين (3091 و 3022) سم⁻¹ تعزى إلى إهتزاز مط CH₂ بسبب صغر حجم حلقة cyclopropan ووجود التوتر الزاوي. أما ظهور الحزمتين عند الترددين (2841 و 2912) سم⁻¹ فتشيران إلى إهتزاز مط لمجموعة CH₃ المتماثل وغير المتماثل ، على التوالي. و تعزى الحزمة عند التردد 1707 سم⁻¹ إلى وجود مط لمجموعة C=O للحامض و الكيتون ، فيما تشير الحزمة عند التردد 1622 سم⁻¹ إلى مط C=C الأوليفينية . فيما يشير ظهور الحزمتين عند الترددين (1483 و 1458) سم⁻¹ إلى اهتزاز مط هيكلي لحلقة البنزين (C=C) أما ظهور الحزمة عند التردد 707 سم⁻¹ فتشير إلى إهتزاز إنحناء اواصر (C-H) الاروماتية خارج المستوي (Silverstein et al., 2005).

3-5-1-5 طيف الأشعة تحت الحمراء لأوكسيد المغنيسيوم:

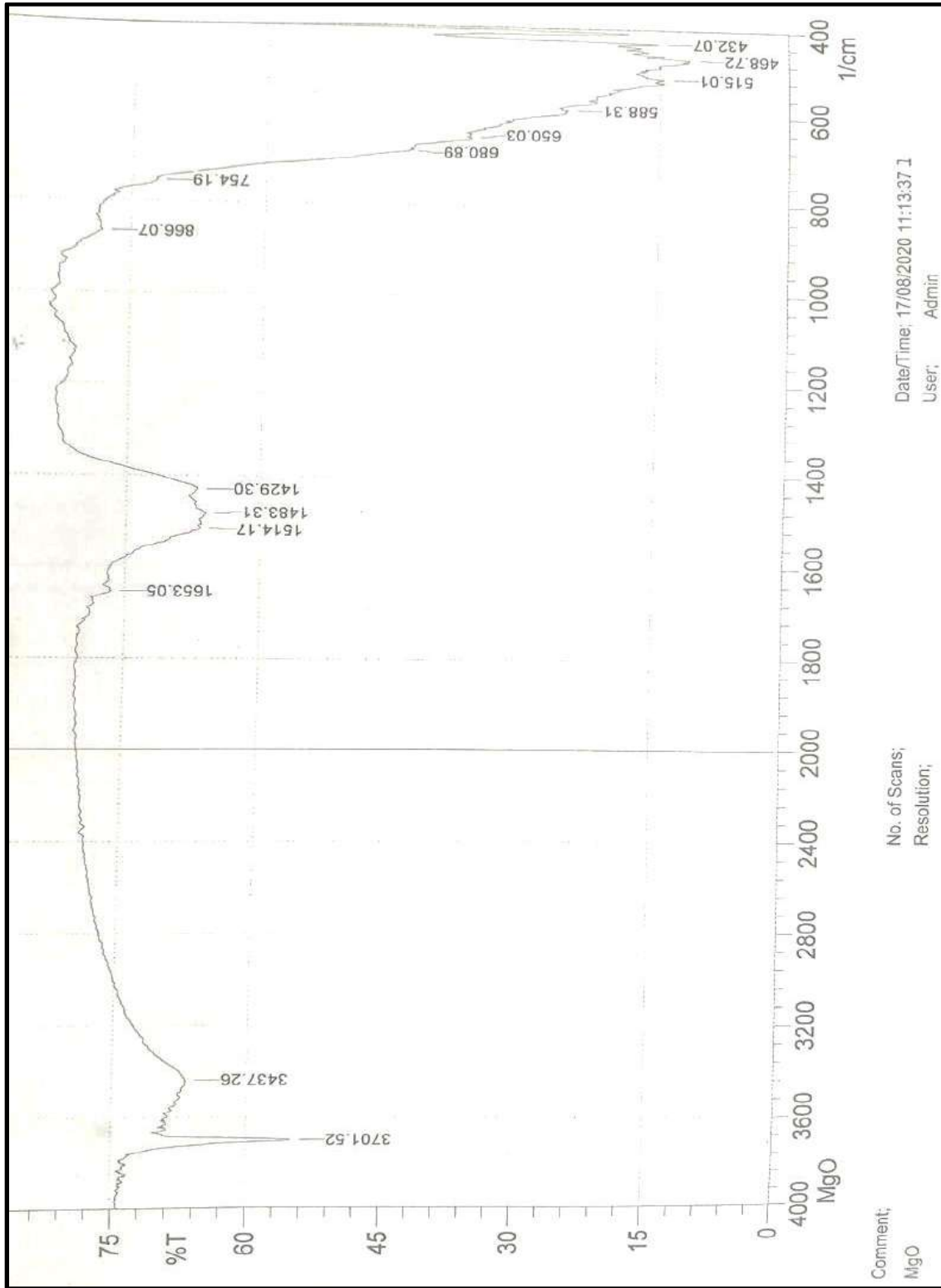
يتضح من الشكل 13 ظهور حزم إمتصاص قليلة في طيف الأشعة تحت الحمراء لأوكسيد المغنيسيوم فالحزمة الضاهرة عند التردد 3437 سم⁻¹ تعزى لأهتزاز مط مجموعة O-H العائدة للماء المدمص فيزيائيا . أما الحزمة الظاهرة عند التردد 1514 سم⁻¹ فتعزى لحني الماء المدمص فضلا عن مجاميع (OH-) السطحية ، بينما تعود الحزمة عند التردد 1429 سم⁻¹ إلى المط غير المتماثل لأنواع ايون الكربونيت (CO₃⁻²) ، فيما يعزى ظهور الحزمة الممتدة بين (580-680) سم⁻¹ إلى إهتزاز مط أصرة المعدن (Mg-O-Mg) (Fardood et al., 2018).

3-5-1-6 طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد Ciprofloxacin النانوي الهجين Cip-MgO :

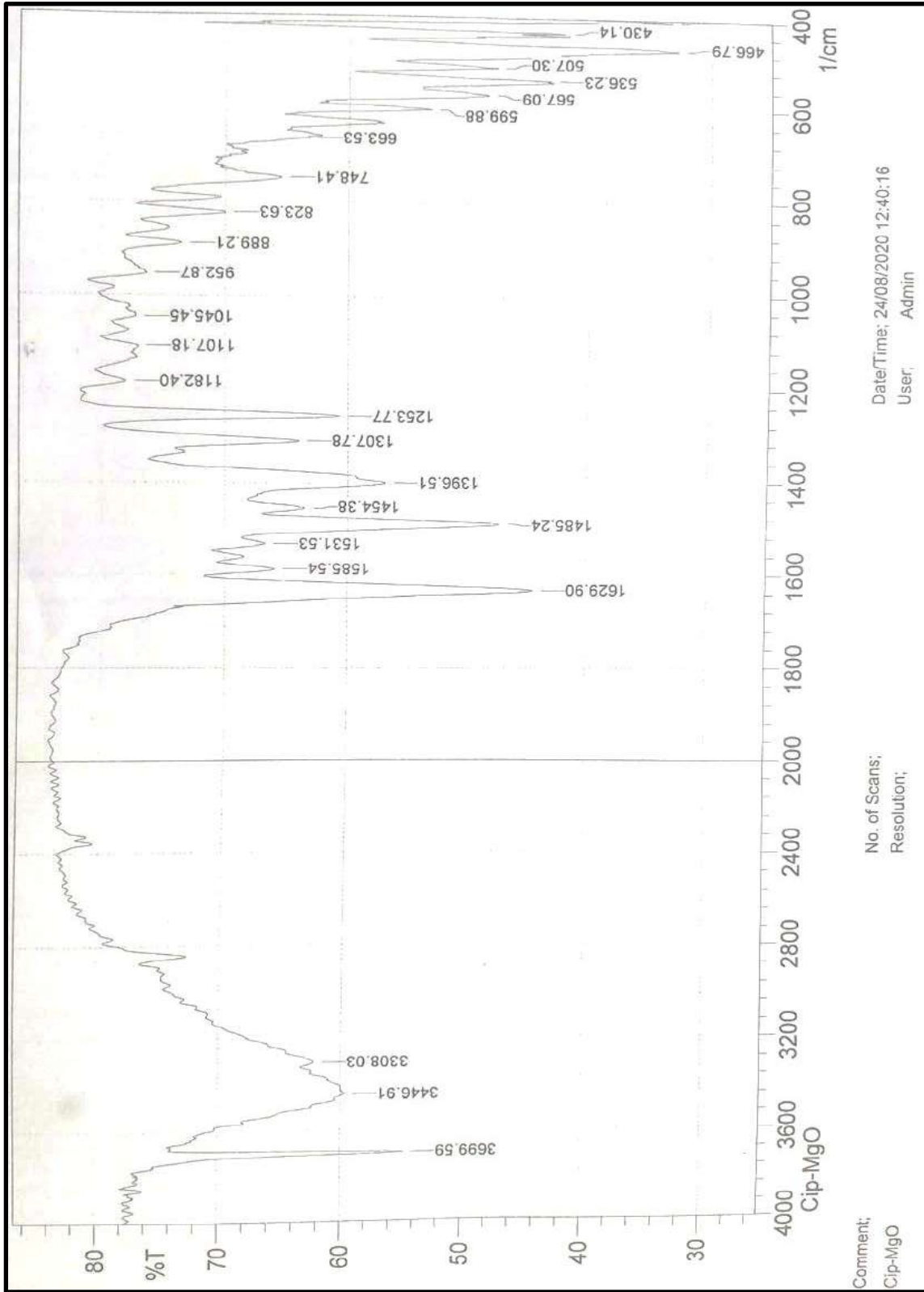
من ملاحظة الشكل 14 يتضح أن المضاد النانوي الهجين يظهر العديد من الحزم المميزة الجديدة التي تدل على نجاح عملية إقحام المضاد سيروفلوكساسين بين طبقات أوكسد المغنيسيوم ، إذ أظهرت النتائج حصول إنزياح لحزمة مط (O-H) نحو تردد أوطأ (3446 سم⁻¹) بعد أن كانت ظاهرة عند التردد 3535 سم⁻¹ فضلا عن تغير



الشكل 12 : طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد سيروفلوكساسين الحر CIP free



الشكل 13 : طيف الاشعة تحت الحمراء لأوكسيد المقيسيوم



الشكل 14: طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد سيبروفلوكساسين الناتوي الهجين Cip-MgO

شكل الحزمة إذ أصبحت عريضة بعد أن كانت حادة ، بينما تعزى الحزمة عند التردد 2850 سم⁻¹ الى اهتزاز مط مجموعة CH₃ . وعانت الحزمة العائدة لمط مجموعة الكربونيل (C=O) أنزياحاً نحو تردد أوطأ إذ ظهرت عند التردد 1629 سم⁻¹ . ويشير ظهور الحزمتين عند الترددين (1585 و 1485) سم⁻¹ إلى اهتزاز المط الهيكلي لحلقة البنزين (C=C) وأخيراً فإن الانزياح نحو التردد الأعلى قد شمل إنحناء أو اصفر (C-H) الأروماتية خارج المستوي إذ ظهرت عند التردد 784 سم⁻¹ بعد أن كانت عند التردد 707 سم⁻¹ (Silverstein *et al.* ,2005) .

3-5-2 طيف حيود الأشعة السينية (XRD) :

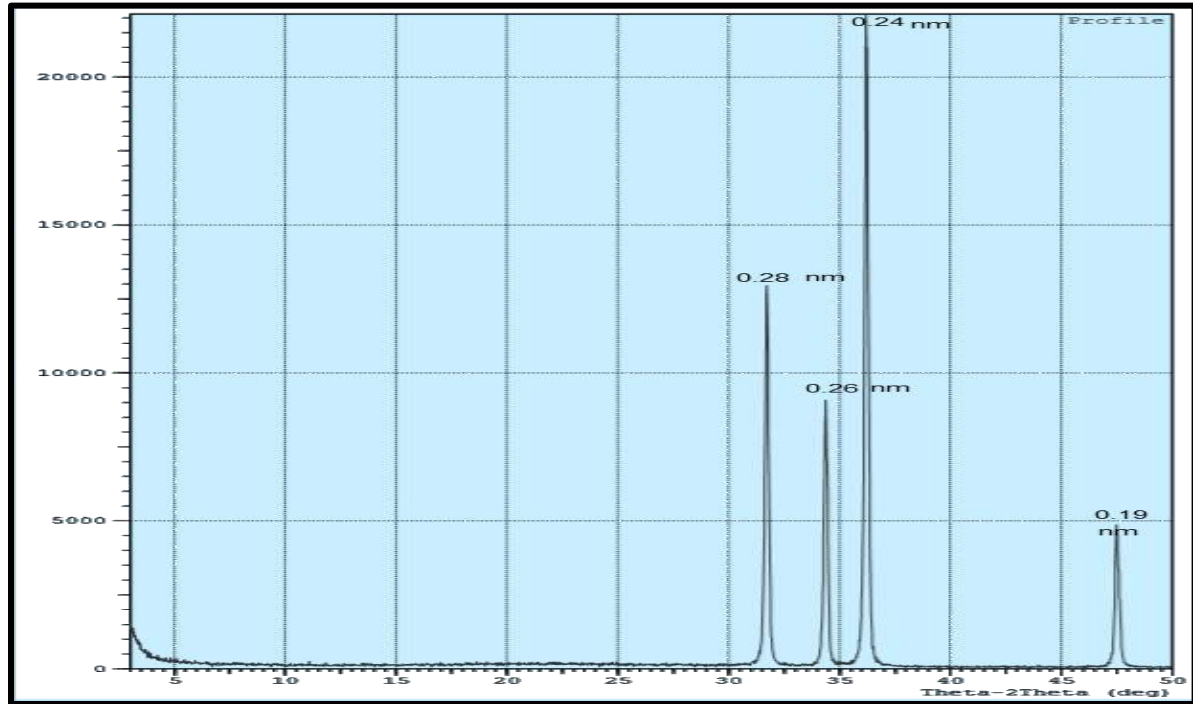
تمت دراسة طيف حيود الأشعة السينية لكل من المضاد أزيثرومايسين النانوي الهجين Azi-ZnO وطبقات أكسيد الزنك لمعرفة الاختلاف في سمك الطبقة قبل وبعد عملية اقحام المضاد أزيثرومايسين بين طبقات أكسيد الزنك باستخدام قانون براك .

يبين الشكل 15 طيف حيود الأشعة السينية لأوكسيد الزنك ويظهر فيه حيود المستويات (100) عند الزاوية 31.29° وبمسافة بلورية (d) تساوي 0.281nm والمستوي (002) عند زاوية 34.82° بمسافة بلورية تساوي 0.259nm أما المستوي (101) فقد ظهر عند الزاوية 36.29° وله مسافة بلورية تساوي 0.247nm (Voicu *et al.* , 2013) .

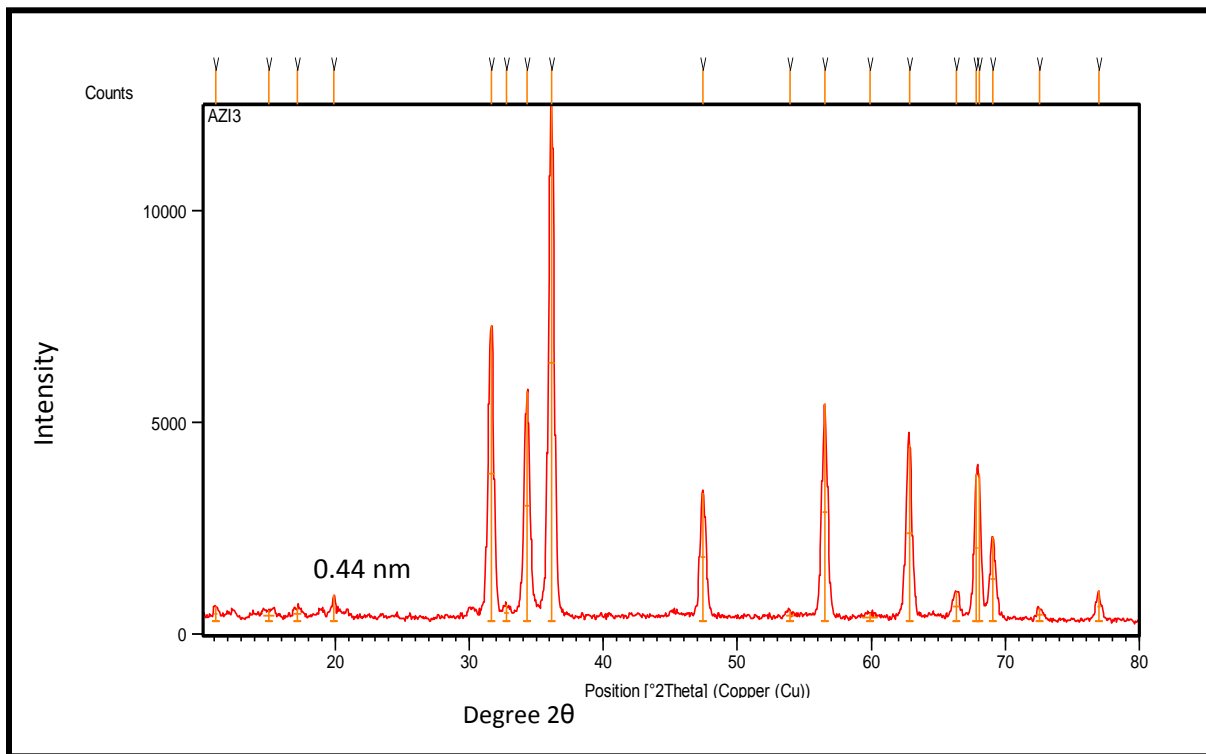
وعند إجراء عملية التبادل الأيوني بين طبقات أكسيد الزنك والمضاد أزيثرومايسين ظهر حيود للمستوي (003) عند الزاوية 19.92° بمسافة بلورية مقدارها 0.44 nm مما يشير الى نجاح الاقحام وتكوين مضاد نانوي هجين كما موضح في الشكل 16 .

تمت أيضاً دراسة طيف حيود الأشعة السينية لكل من المضاد Ciprofloxacin النانوي الهجين Cip-MgO وطبقات أكسيد المغنيسيوم لمعرفة الاختلاف في سمك الطبقة قبل وبعد عملية اقحام المضاد Ciprofloxacin بين طبقات أكسيد المغنيسيوم باستخدام قانون براك .

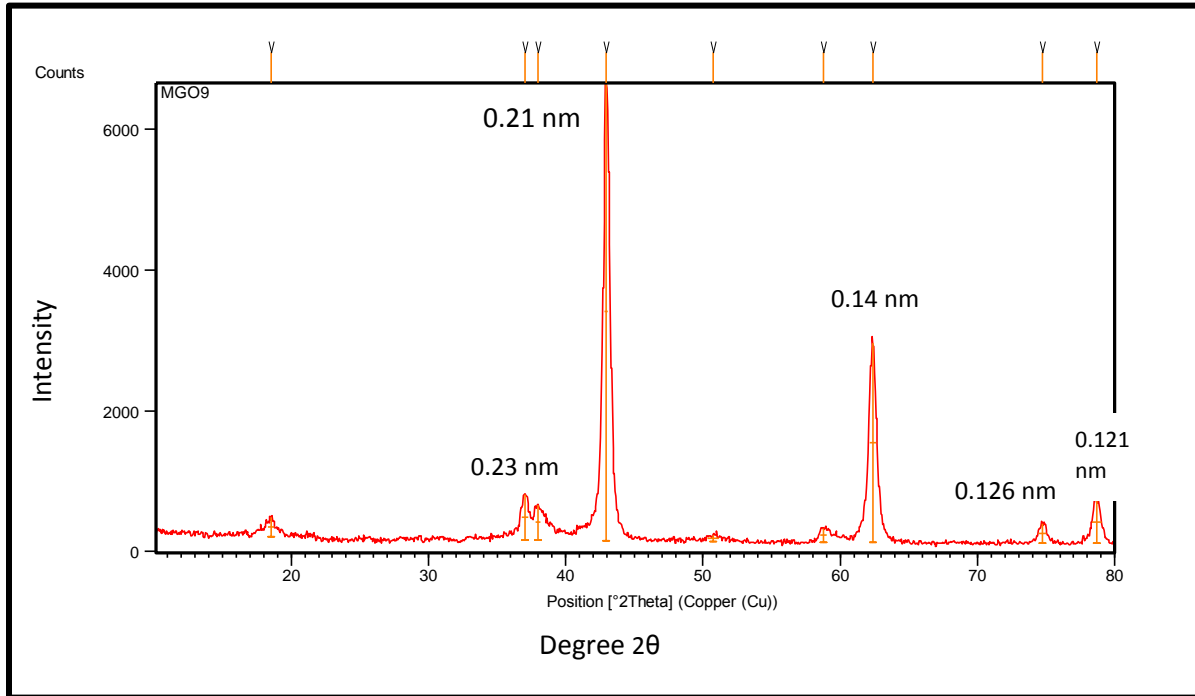
يبين الشكل 17 طيف حيود الأشعة السينية لأوكسيد المغنيسيوم ويظهر فيه حيود المستويات (111) عند الزاوية 37.95° وبمسافة بلورية (d) تساوي 0.23 nm والمستوي (200) عند الزاوية 42.95° بمسافة



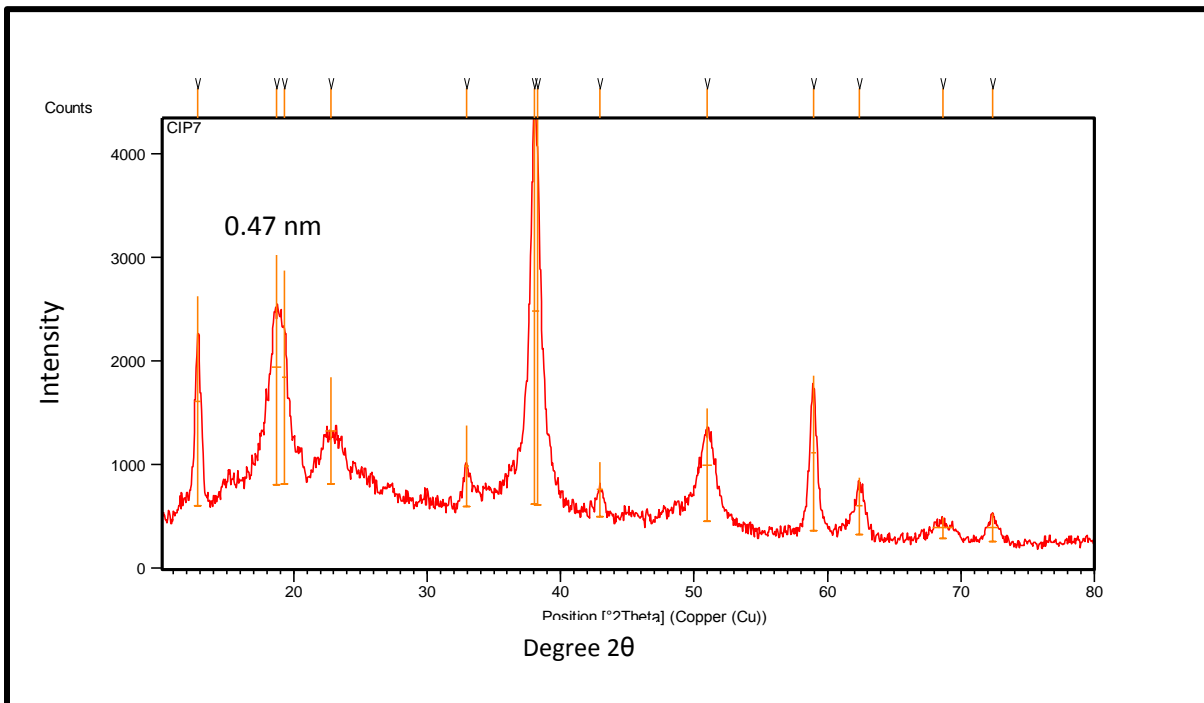
الشكل 15 : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لطبقات أكسيد الزنك



الشكل 16 : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) للأزيترومايسين النانوي الهجين Azi-ZnO



الشكل 17 : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لطبقات أكسيد المغنيسيوم



الشكل 18 : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) للسيبروفلوكساسين النانوي الهجين Cip-MgO

بلورية تساوي 0.21 nm والمستوي (220) عند الزاوية 62.37° بمسافة بلورية 0.14 nm والمستوي (311) عند الزاوية 74.75° بمسافة بلورية 0.126 nm فضلا عن المستوي (222) عند الزاوية 78.66° وله مسافة بلورية تساوي 0.121 nm (Fardood et al., 2018).

وعند اجراء عملية التبادل الايوني بين طبقات أوكسيد المغنيسيوم والمضاد Ciprofloxacin ظهر حيود للمستوى (003) عند الزاوية 18.73° بمسافة بلورية مقدارها 0.47 nm فيما يمكن ان يكون المستوي 006 متداخلا مع المستوي (200) الخاص بأوكسيد المغنيسيوم عند الزاوية 37.95° كما موضح في الشكل 18.

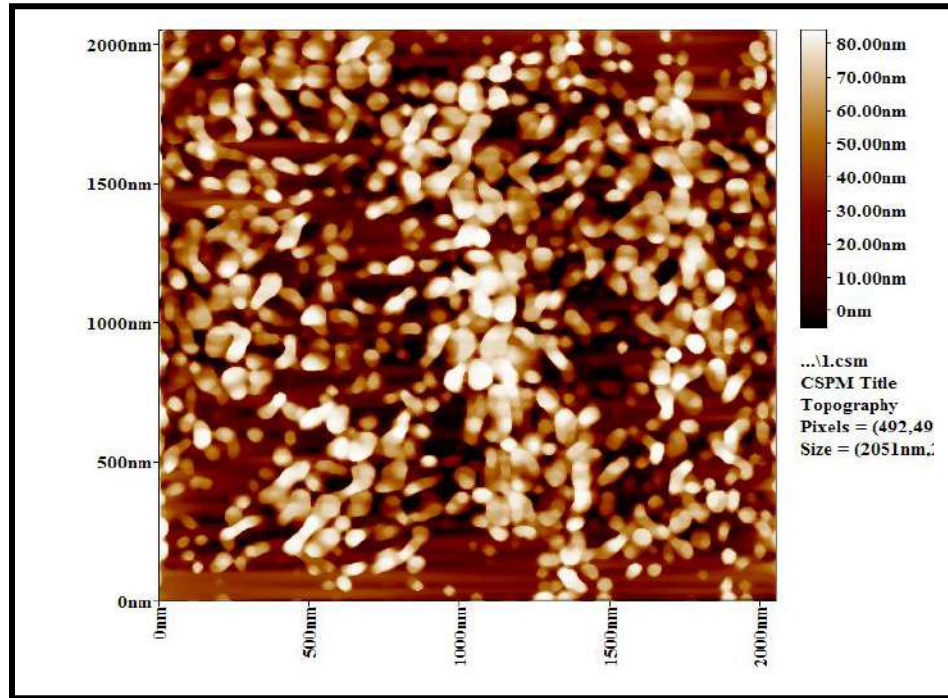
3-5-3 الفحص باستخدام مجهر القوة الذرية (AFM) :

تمت دراسة السطح الخارجي للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO ويبين الشكل 19 a صورة ثنائية الابعاد للمضاد تظهر منها تجمعات دقائق ذات أشكال شبه كروية وأخرى قضيبية. كما يظهر من الشكل 19 b صورة ثلاثية الابعاد لمقطع من سطح المضاد النانوي يتضح من خلالها أن ارتفاع التجمعات الدقائقية كان بحدود 83.89 نانوميتر مما يشير الى تصنيع مضاد نانوي هجين من المضاد أزيثرومايسين الحر وأوكسيد الزنك.

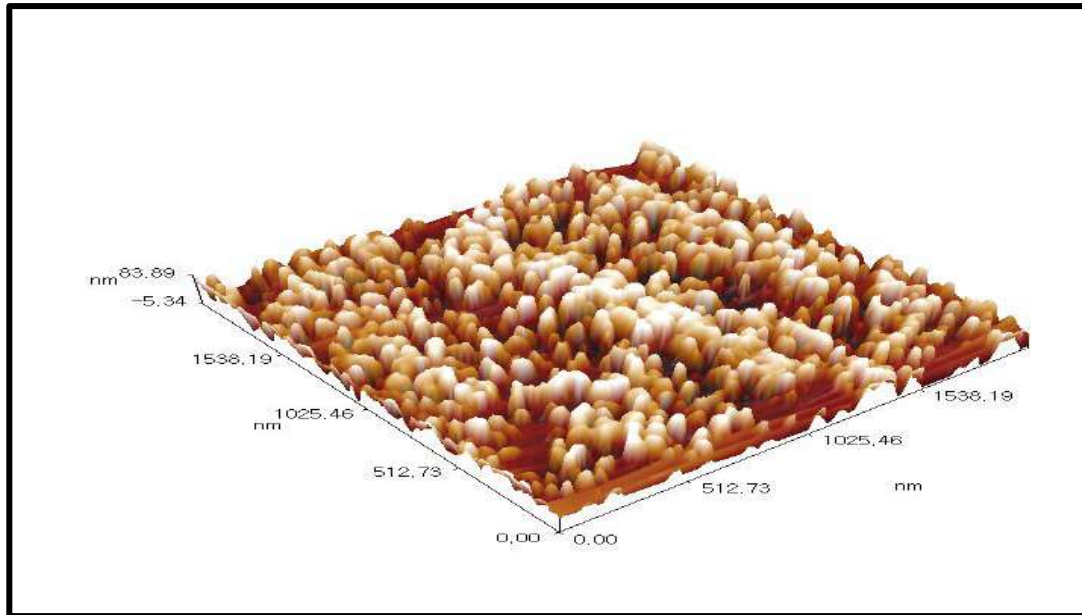
ويتضح من الجدول 17 أن معدل أقطار دقائق المضاد النانوي Azi-ZnO بلغ 51.58 نانوميتر. وقد أدت عملية تحضير المضاد النانوي الى الحصول على دقائق نانوية بأقطار محصورة بين (45 – 100) نانوميتر وأن أعلى نسبة لتلك الدقائق النانوية بلغت 9.35% للدقائق ذات القطر 55 نانوميتر فيما بلغت أوطاً نسبة للدقائق 0.84% للدقائق ذات القطر 100 نانوميتر (الشكل 19).

لا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما حصلت عليه كل من الحمداي (2015) و البارودي (2019) اذ ان معدل أقطار دقائق المضادين النانويين الهجينين Oxytetracycline و Doxycycline المحضرين في تلك الدراستين بلغا (76.16 و 76.24) نانوميتر ،على التوالي .

تمت ايضا دراسة السطح الخارجي للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO ويبين الشكل 20 a صورة ثنائية الابعاد للمضاد تظهر منها تجمعات دقائق ذات أشكال قضيبية مبرومة. كما يظهر من الشكل 20 b صورة ثلاثية الابعاد لمقطع من سطح المضاد النانوي يتضح من خلالها أن ارتفاع التجمعات الدقائقية كان بحدود 41.61 نانوميتر مما يشير الى تصنيع مضاد نانوي هجين من المضاد سيبروفلوكساسين الحر وأوكسيد المغنيسيوم.



(a)



(b)

الشكل 19 : صورة ثنائية الأبعاد (a) وثلاثية الأبعاد (b) للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO

الجدول 17 : أقطار وحجوم وتجمعات دقائق المضاد النانوي الهجين Azi-ZnO بعد فحصه بمجهر القوة الذرية

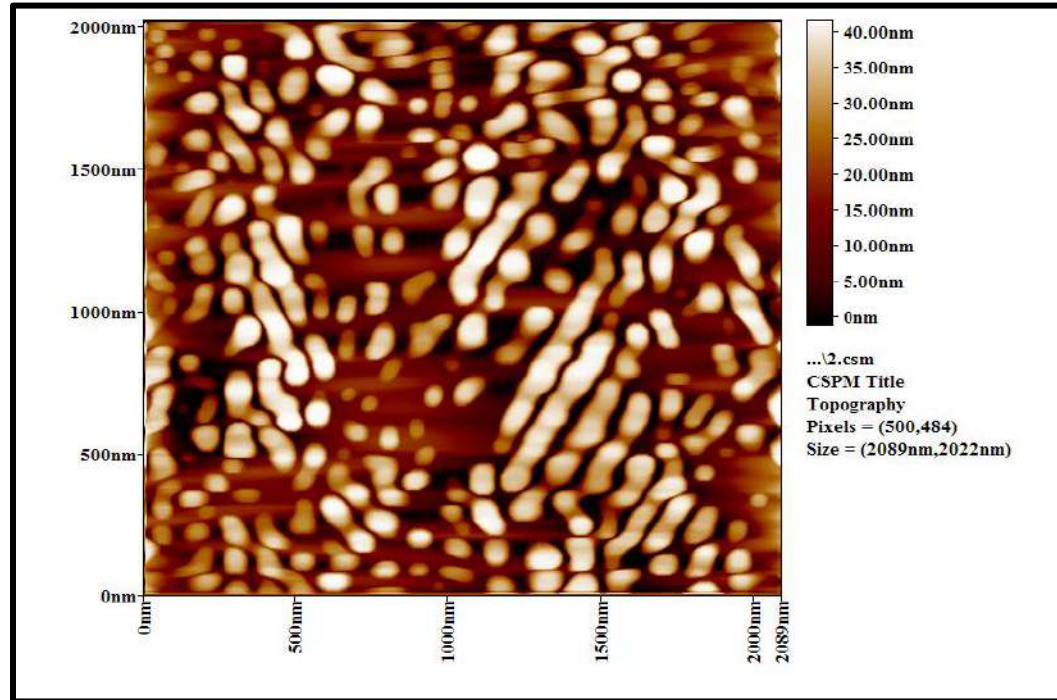
| | |
|-------------------------|-------------------------|
| Avg. Diameter:51.58 nm | <=10% Diameter:20.00 nm |
| <=50% Diameter:50.00 nm | <=90% Diameter:80.00 nm |

| Diameter(nm)< | Volume(%) | Cumulation(%) | Diameter(nm)< | Volume(%) | Cumulation(%) | Diameter(nm)< | Volume(%) | Cumulation(%) |
|---------------|-----------|---------------|---------------|-----------|---------------|---------------|-----------|---------------|
| 45.00 | 8.63 | 41.49 | 75.00 | 4.20 | 84.53 | 105.00 | 1.20 | 98.80 |
| 50.00 | 7.79 | 49.28 | 80.00 | 4.08 | 88.61 | 110.00 | 0.60 | 99.40 |
| 55.00 | 9.35 | 58.63 | 85.00 | 4.08 | 92.69 | 115.00 | 0.12 | 99.52 |
| 60.00 | 7.55 | 66.19 | 90.00 | 2.88 | 95.56 | 120.00 | 0.36 | 99.88 |
| 65.00 | 7.07 | 73.26 | 95.00 | 1.20 | 96.76 | 135.00 | 0.12 | 100.00 |
| 70.00 | 7.07 | 80.34 | 100.00 | 0.84 | 97.60 | | | |

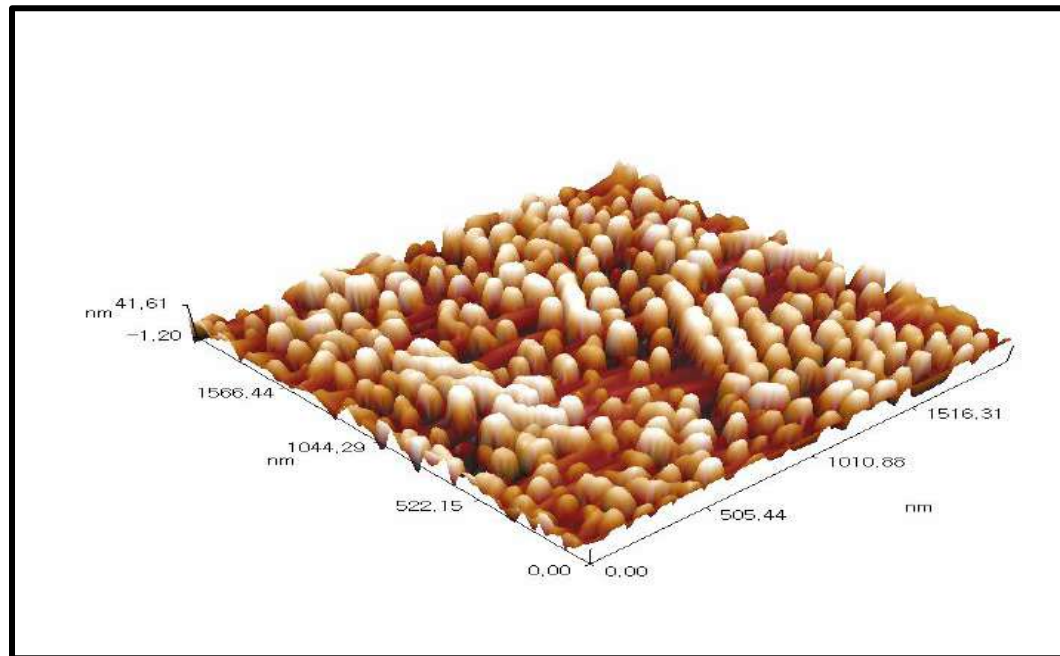
الجدول 18 : أقطار وحجوم وتجمعات دقائق المضاد النانوي الهجين Cip-MgO بعد فحصه بمجهر القوة الذرية

| | |
|-------------------------|--------------------------|
| Avg. Diameter:77.35 nm | <=10% Diameter:45.00 nm |
| <=50% Diameter:75.00 nm | <=90% Diameter:105.00 nm |

| Diameter(nm)< | Volume(%) | Cumulation(%) | Diameter(nm)< | Volume(%) | Cumulation(%) | Diameter(nm)< | Volume(%) | Cumulation(%) |
|---------------|-----------|---------------|---------------|-----------|---------------|---------------|-----------|---------------|
| 45.00 | 5.42 | 6.78 | 75.00 | 10.17 | 47.12 | 105.00 | 2.37 | 87.80 |
| 50.00 | 3.39 | 10.17 | 80.00 | 11.53 | 58.64 | 110.00 | 4.07 | 91.86 |
| 55.00 | 5.76 | 15.93 | 85.00 | 6.78 | 65.42 | 115.00 | 4.41 | 96.27 |
| 60.00 | 4.07 | 20.00 | 90.00 | 7.12 | 72.54 | 120.00 | 1.36 | 97.63 |
| 65.00 | 9.83 | 29.83 | 95.00 | 8.81 | 81.36 | 125.00 | 1.69 | 99.32 |
| 70.00 | 7.12 | 36.95 | 100.00 | 4.07 | 85.42 | 130.00 | 0.34 | 99.66 |
| | | | | | | 145.00 | 0.34 | 100.00 |



(a)



(b)

الشكل 20 : صورة ثنائية الابعاد (a) وثلاثية الابعاد (b) للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO

ويتضح من الجدول 18 أن معدل أقطار دقائق المضاد النانوي Cip-MgO بلغ 77.35 نانوميتر. وقد أدت عملية تحضير المضاد النانوي الى الحصول على دقائق نانوية بأقطار محصورة بين (45 – 100) نانوميتر وأن أعلى نسبة لتلك الدقائق النانوية بلغت 11.53% للدقائق ذات القطر 80 نانوميتر فيما بلغت أوطأ نسبة للدقائق 3.39% للدقائق ذات القطر 50 نانوميتر (الشكل 20).

لا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وجدته الجبوري (2016) إذ بلغ معدل أقطار دقائق المضاد سيبروفلوكساسين النانوي الهجين 87.57 نانوميتر.

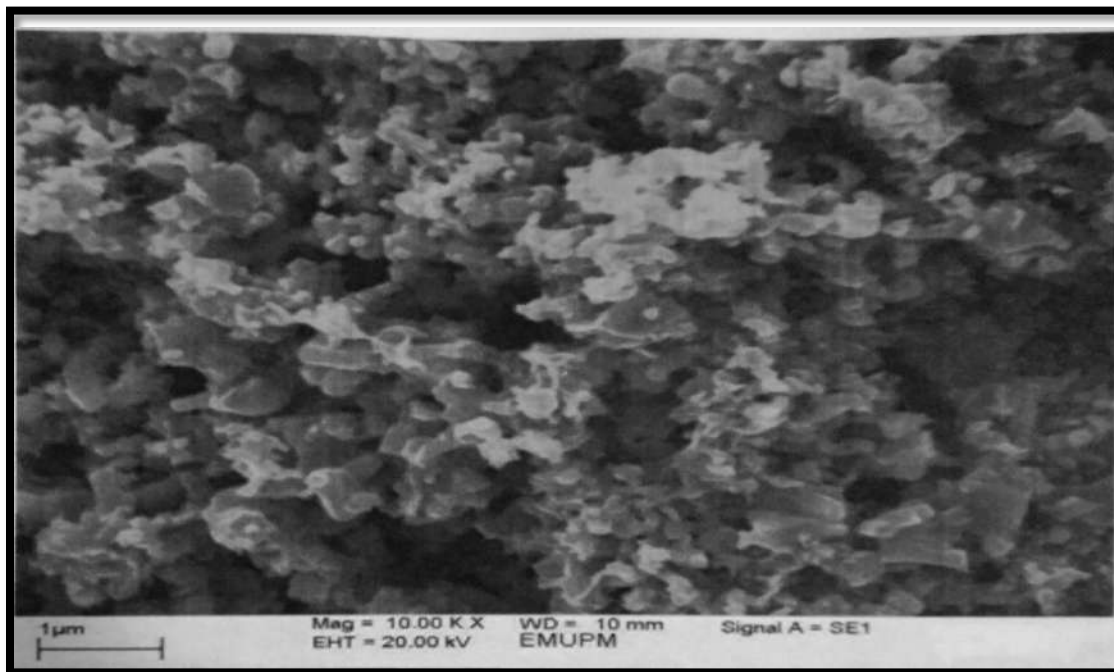
3-4-5 الفحص باستخدام المجهر الالكتروني الماسح (SEM) :

تم دراسة السطح الخارجي للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO وكذلك سطح طبقات اوكسيد الزنك باستخدام المجهر الالكتروني الماسح .

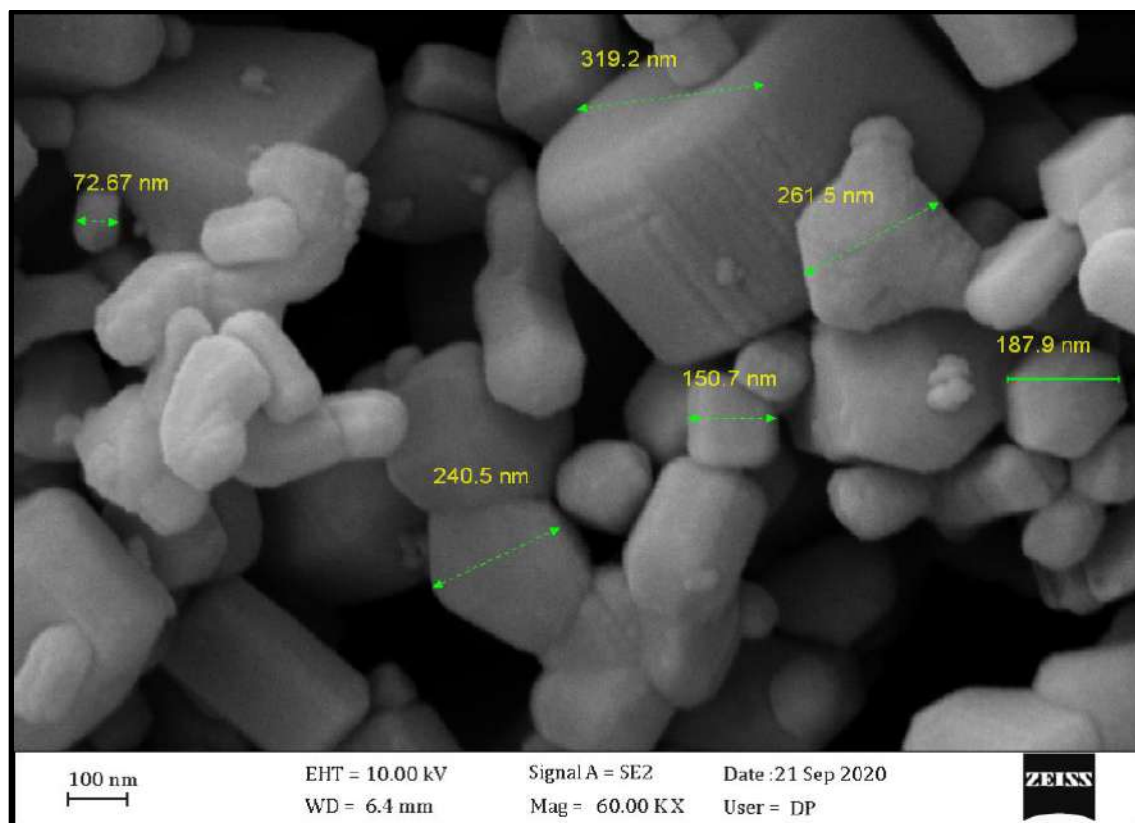
يبين الشكل 21 صورة المجهر الالكتروني الماسح لطبقات أوكسيد الزنك اذ تشاهد الأشكال السداسية واضحة المعالم والتي تظهر فيها وريقات الأوكسيد مترابكة فوق بعضها البعض بأشكال وأحجام غير منتظمة (Bashi *et al.* , 2013) . ان قسما من هذه الأشكال تتحول الى أشكال هندسية منتظمة فضلا عن تكون تراكيب ذات مسامية عالية عند تكون المضاد النانوي الهجين Azi- ZnO الناتج عن التفاعل المباشر لطبقات أوكسيد الزنك مع المضاد Azithromycin الحر مما يدل على نجاح اقحام المضاد الى طبقات أوكسيد الزنك كما في الشكل 22 .

كما تم دراسة السطح الخارجي للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO وكذلك سطح طبقات المغنيسيوم باستخدام المجهر الالكتروني الماسح .

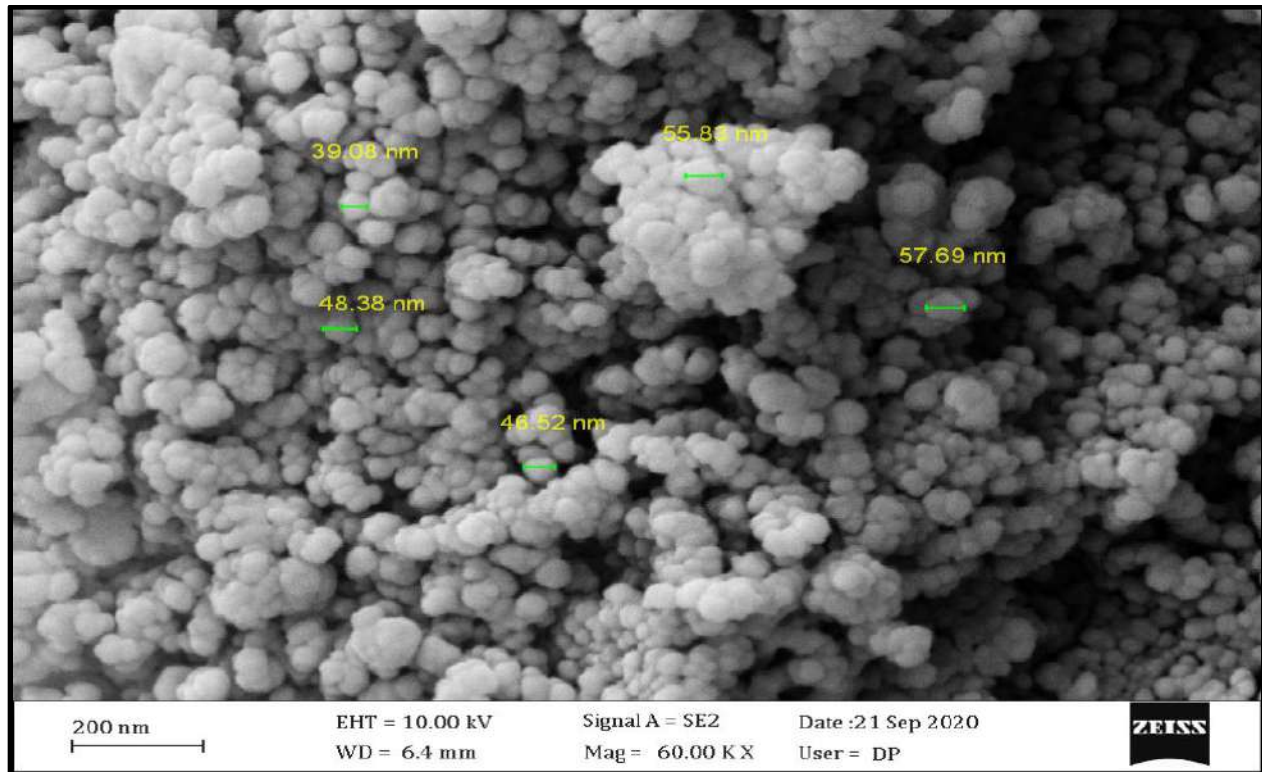
يبين الشكل 23 صورة المجهر الالكتروني الماسح لطبقات أوكسيد المغنيسيوم اذ تشاهد فيها دقائق الأوكسيد شبيهة بحبيبات الفلين . ان قسما من هذه الأشكال تتحول الى أشكال شبيهة بقطع الإسفنج الرقيقة فضلا عن تكون تراكيب ذات مسامية عالية عند تكون المضاد النانوي الهجين Cip- MgO الناتج عن التفاعل المباشر لطبقات أوكسيد المغنيسيوم مع المضاد Ciprofloxacin الحر مما يدل على نجاح اقحام المضاد الى طبقات أوكسيد المغنيسيوم كما في الشكل 24 .



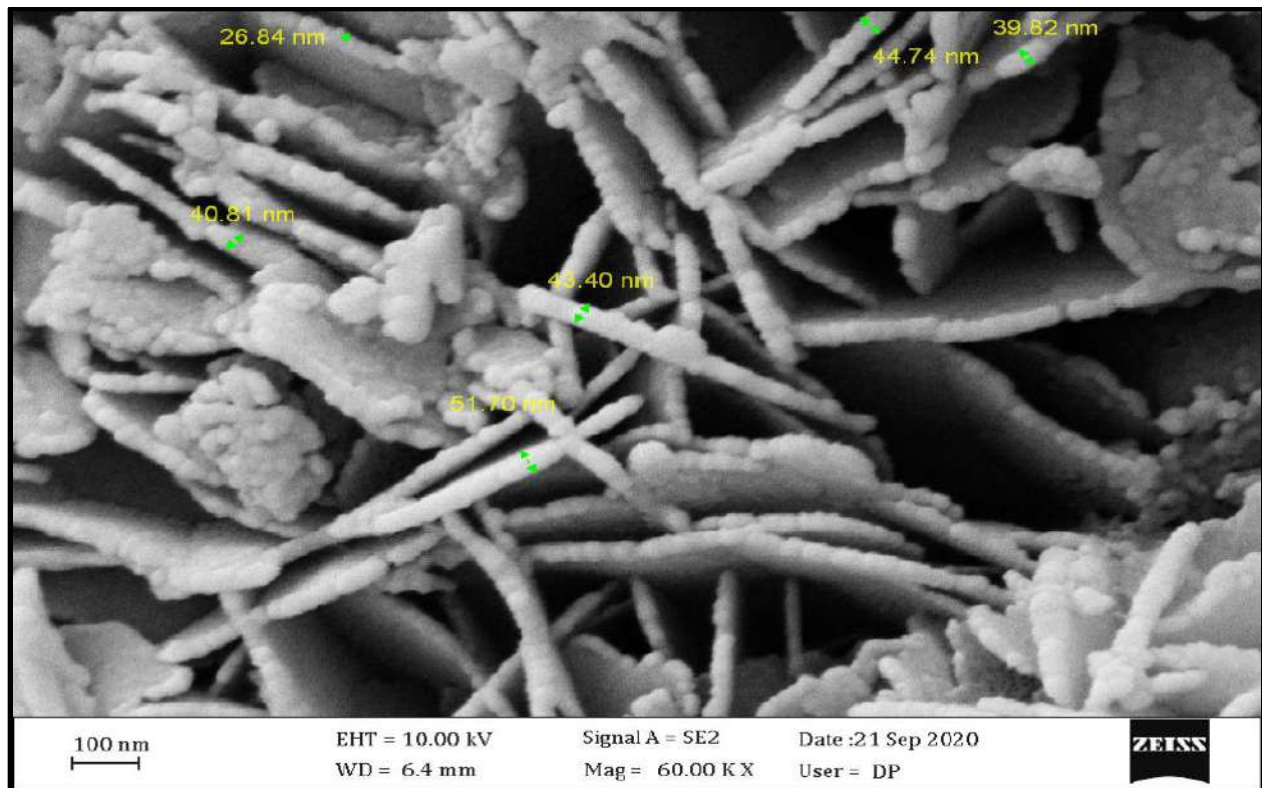
الشكل 21 : صورة بالمجهر الالكتروني الماسح (SEM) لطبقات أكسيد الزنك



الشكل 22 : صورة بالمجهر الالكتروني الماسح للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO



الشكل 23 : صورة بالمجهر الالكتروني الماسح (SEM) لطبقات أكسيد المغنيسيوم



الشكل 24 : صورة بالمجهر الالكتروني الماسح للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO

3-5-5 التحليل بمطيافية التشتت (EDS) Energy Dispersive Spectroscopy :

اثبت التحليل بمطيافية EDS وجود عناصر الزنك والاكسجين والكربون في تركيب المضاد النانوي الهجين Azi-ZnO كما موضح في الشكل 25 مما يدل على نجاح اقحام المضاد الحر بين طبقات أكسيد الزنك وبالتالي تكوين مضاد نانوي هجين جديد .

و اثبت التحليل بالمطيافية ذاتها وجود عناصر المغنيسيوم والاكسجين والكربون في تركيب المضاد النانوي الهجين Cip-MgO كما موضح في الشكل 26 مما يدل على نجاح اقحام المضاد الحر بين طبقات أكسيد المغنيسيوم وبالتالي تكوين مضاد نانوي هجين جديد .

3-5-6 التحليل الدقيق للعناصر في المضادين أزيثرومايسين وسبروفلوكساسين :

أوضحت نتائج التحليل الدقيق للعناصر الموضحة في الجدول 19 احتواء المضاد النانوي الهجين Azi-ZnO والمضاد الحر Azithromycin على نسب من الكربون والهيدروجين والنيتروجين بلغت (20.05 و 3.50 و 0.85) % و (58.23 و 9.84 و 2.65) % , على التوالي . يتضح من هذه النتائج أن نسبة الأزيثرومايسين المحمل بين طبقات أكسيد الزنك بلغت 34.43 %.

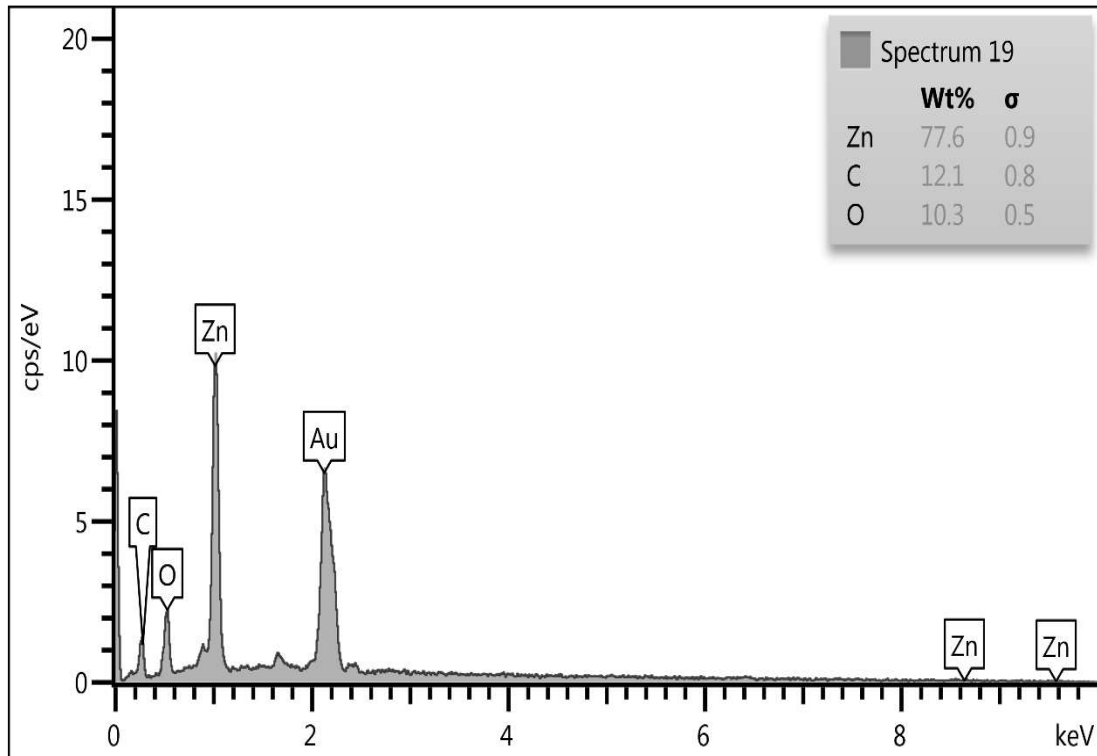
كما يتضح من الجدول نفسه احتواء المضاد النانوي الهجين Cip-MgO والمضاد سيبروفلوكساسين الحر على نسب من الكربون والهيدروجين والنتروجين بلغت (23.33 و 4.80 و 2.73) % و (50.37 و 5.82 و 7.42) % على التوالي مما يشير الى ان نسبة السيبروفلوكساسين المحمل بين طبقات اوكسيد المغنيسيوم بلغت 46.25 % .

3-6-3 الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO ضد البكتريا المعزولة من إصابات المسالك

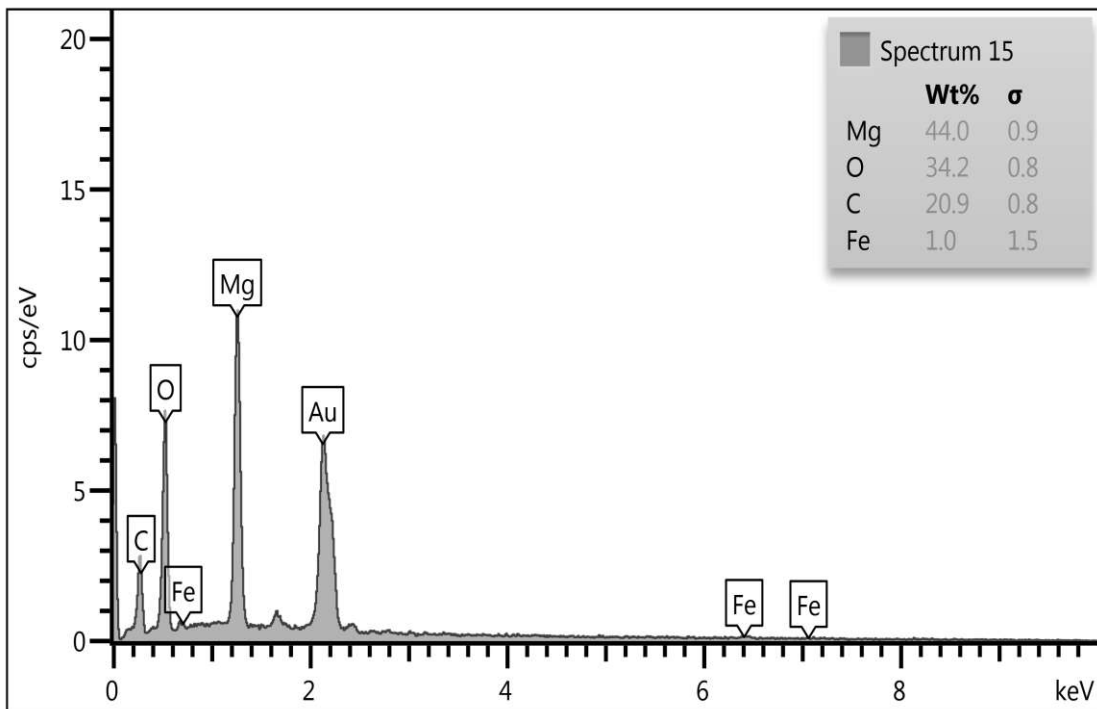
التنفسية:

3-6-1 الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي Azi-ZnO ضد بكتريا *K.pneumoniae* :

تم دراسة الفعل التثبيطي للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO ضد 12 عزلة من بكتريا *K.pneumoniae* المعزولة من إصابات المسالك التنفسية .



الشكل 25 : طيف تحليل EDS للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO



الشكل 26 : طيف تحليل EDS للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO

الجدول 19: التحليل الدقيق لعناصر الكربون والهيدروجين والنيتروجين في المضاد Azithromycin والمضاد

Ciprofloxacin

| المضاد | C % | H % | N % |
|----------|-------|------|------|
| Azi-ZnO | 20.05 | 3.50 | 0.85 |
| Azi-Free | 58.23 | 9.84 | 2.65 |
| Cip-MgO | 23.30 | 4.80 | 2.73 |
| Cip-Free | 50.37 | 5.82 | 7.42 |

ويتضح من النتائج المبينة في الجدولين 20 و 21 أن هناك تباينا في تأثير كل من الأزيثرومايسين الحر والنانوي الهجين في عزلات بكتريا *K. pneumoniae* قيد الدراسة ، اذ كانت العزلات *K.p 4* و *K.p 7* و *K.p 10* و *K.p 11* و *K.p 12* هي الأكثر تأثرا بالفعل التثبيطي للمضاد Azi-Free بأقطار تثبيط بلغت (31.5 و 31.5 و 32 و 32.5 و 31.5) ملم ، على التوالي ، بينما كانت العزلتان *K.p 5* و *K.p 11* هما الأكثر تأثرا بالفعل التثبيطي للمضاد Azi-ZnO بمعدلات أقطار تثبيط بلغت (29.25 و 28.25) ملم ، على التوالي باستخدام التركيز 512 مايكروغرام/مل.

ومن جهة أخرى يتضح من الجدولين أعلاه أن العزلة *K.p 1* هي الأقل تحسسا للفعل التثبيطي للمضاد أزيثرومايسين الحر بقطر تثبيط 17.25 ملم ، فيما كانت العزلتان *K.p 1* و *K.p 8* هما الأقل تحسسا للفعل التثبيطي للمضاد بصورته النانوية بقطري تثبيط بلغا (15.5 و 14.5) ملم ، على التوالي باستخدام تركيز المضاد ذاته . وقد جاءت نتائج التحليل الأحصائي تأكيدا للنتائج المتحصل عليها إذ لوحظ وجود فروقات معنوية ($P>0.05$) بين عزلات بكتريا *K. pneumoniae* الأكثر تحسسا للمضاد بصورتيه الحرة والنانوية وبقية العزلات المستخدمة في الدراسة فضلا عن وجود فروقات معنوية ($P>0.05$) بين العزلات البكتيرية الأقل تحسسا للمضاد وبقية العزلات قيد الدراسة .

الجدول 20 : الفعالية التثبيطية للمضاد Azithromycin الحر ضد بكتريا *K.pneumoniae*

| LSD 0.05 | قطر التثبيط (مم) | | | | | | تركيز المضاد µg /ml رمز العزلة | اسم المضاد |
|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|--|---------------|
| | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | | |
| 1.55 | c 0 I | c 0 GA | c 0 H | b 13.5 D | b 15 F | a 17.25 G | <i>K.p1</i> | AZI- Free |
| 0.90 | f 18.5 E | e 20.5 D | d 24.25 C | c 25.25 B | b 27.5 C | a 30 C | <i>K.p2</i> | |
| 1.34 | e 17.5 F | d 20.5 D | c 22.5 E | c 23.75 C | b 25.25 E | a 27 E | <i>K.p3</i> | |
| 0.79 | f 22 B | e 23.25 BC | d 24.75 BC | c 26.5 A | b 28.25 AB | a 31.5 AB | <i>K.p4</i> | |
| 0.83 | f 19.25 DE | e 21.25 D | d 23.5 D | c 25.25 B | b 26.75 D | a 30.5 B | <i>K.p5</i> | |
| 1.47 | e 19.25 DE | d 23.25 BC | c 25 AB | bc 26.25 A | b 27.25 BC | a 31.25 B | <i>K.p6</i> | |
| 1.02 | f 19.5 CD | e 22.5 C | d 24.5 C | c 26.25 A | b 27.75 BC | a 31.5 AB | <i>K.p7</i> | |
| 0.96 | f 10 H | e 11 F | d 13 G | c 14 D | b 16 F | a 19 F | <i>K.p8</i> | |
| 0.86 | f 16.5 G | e 20 E | d 21.5 F | c 24 C | b 25.5 E | a 28.25 D | <i>K.p9</i> | |
| 0.75 | f 20.25 C | e 22.5 C | d 25.25 AB | c 26.5 A | b 28 ABC | a 32 AB | <i>K.p10</i> | |
| 0.76 | f 23 A | e 24.5 A | d 25.75 A | c 26.75 A | b 28.5 A | a 32.5 A | <i>K.p11</i> | |
| 0.99 | f 21.5 B | e 23.5 B | d 25 ABC | c 26.5 A | b 27.75 BC | a 31.5 AB | <i>K.p12</i> | |
| | 0.89 | 0.96 | 0.83 | 0.79 | 0.63 | 1.06 | LSD 0.05 | |

الحروف الكبيرة المختلفة عموديا تشير الى وجود فروقات معنوية بين عزلات البكتريا ($P < 0.05$) لكل تركيز. الحروف الكبيرة المتشابهة عموديا تشير الى عدم وجود فروقات معنوية بين عزلات البكتريا ($P > 0.05$) لكل تركيز.

الحروف الصغيرة المختلفة افقيا تشير الى وجود فروقات معنوية بين التراكيز المستعملة ($P < 0.05$) لكل عذلة بكتيرية. الحروف الصغيرة المتشابهة افقيا تشير الى عدم وجود فروقات معنوية بين التراكيز المستعملة ($P > 0.05$) لكل عذلة بكتيرية.

الجدول 21 : الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين AZI-ZnO ضد بكتريا *K.pneumoniae*

| LSD 0.05 | قطر التثبيط $\mu\text{g/ml}$ | | | | | | تركيز المضاد $\mu\text{g/ml}$ رمز العزلة | أسم المضاد |
|-------------|------------------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|--|---------------|
| | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | | |
| 0.48 | d 0 | d 0 F | d 0 F | c 10 E | b 14 H | a 15.5 F | <i>K.p</i> 1 | AZI- ZnO |
| 1.16 | f 15.5 BC | e 16.75 DE | d 18.25 E | c 19.5 D | b 23.75 DEF | a 26.5 CD | <i>K.p</i> 2 | |
| 0.99 | f 14.5 C | e 16.75 DE | d 17.75 E | c 20.75 C | b 22.25 G | a 24.75 E | <i>K.p</i> 3 | |
| 1.05 | f 14.5 C | e 16.25 E | d 18 E | c 20.25 CD | b 22.25 G | a 24.5 E | <i>K.p</i> 4 | |
| 0.93 | f 16 AB | e 18.25 ABC | d 20.25 C | c 22 B | b 24.5 BCD | a 29.25 A | <i>K.p</i> 5 | |
| 1.02 | e 16.25 AB | e 17.25 CDE | d 18.5 | c 20.5 C | b 23.5 EF | a 26.5 CD | <i>K.p</i> 6 | |
| 1.13 | f 16 AB | e 18.25 ABC | d 19.75 CD | c 23 A | b 25 ABC | a 26.5 CD | <i>K.p</i> 7 | |
| 0.48 | c 0 D | c 0 F | c 0 F | c 0 F | b 13 I | a 14.5 F | <i>K.p</i> 8 | |
| 0.72 | f 15.5 B | e 17.5 BCD | d 19.25 D | c 21 C | b 23 FG | a 24 E | <i>K.p</i> 9 | |
| 1.41 | f 16 AB | e 18.5 AB | d 20.5 BC | c 22.25 AB | b 24.25 CDE | a 26 D | <i>K.p</i> 10 | |
| 0.48 | f 17.25 A | e 19 A | d 21.25 AB | c 23 A | b 25.25 AB | a 28.25 AB | <i>K.p</i> 11 | |
| 0.90 | f 16.5 AB | e 18.5 AB | d 22 A | c 22.75 AB | b 25.75 A | a 27.5 BC | <i>K.p</i> 12 | |
| | 1.32 | 1.07 | 0.78 | 0.98 | 0.79 | 1.26 | LSD 0.05 | |

تناولت العديد من الدراسات الفعل التثبيطي للمضادات النانوية الهجينة ضد أنواع مختلفة من البكتريا ، فقد أوضح (Kumar *et al.*, 2016) ان المضاد دوكسي سايكلين المحمل على دقائق الفضة النانوية كان أكفاً من الدوكسي سايكلين الحر في تثبيط بكتريا *K. pneumoniae* .

تتمثل الية عمل المضاد أزيثرومايسين في تثبيط تخليق البروتين البكتيري عن طريق ارتباطه بالجزء 23s من الوحدة الفرعية الرايبوسومية 50s ويمنع بذلك تخليق البروتين البكتيري (Sandman & Iqbal 2020).

3-6-2 الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Azi-ZnO ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام:

تم دراسة الفعل التثبيطي للمضاد الحر و النانوي الهجين Azi-ZnO ضد 10 عزلات من البكتريا الموجبة لصبغة غرام المعزولة من إصابات المسالك التنفسية.

تشير النتائج الموضحة في الجدول 22 الى أن العزلات البكتيرية *E. faecium* 1 و *S. pneumonia* 1 و *S. pneumonia* 4 هي الأكثر تحسناً للفعل التثبيطي للمضاد أزيثرومايسين الحر بأقطار تثبيط بلغت (30.5 و 31.5 و 30.5) ملم ، على التوالي بينما كانت العزلات *S. pneumonia* 2 و *S. agalactia* 1 و *S. pneumonia* 2 هي الأقل تحسناً للفعل التثبيطي للمضاد ذاته بأقطار تثبيط بلغت (28.5 و 28.25 و 28) ملم على التوالي . وقد جاءت نتائج التحليل الأحصائي تأكيداً للنتائج المتحصل عليها إذ يلاحظ وجود فروقات معنوية ($P>0.05$) بين العزلات البكتيرية .

ويتضح من نتائج التحليل الأحصائي في الجدول 23 أن العزلة البكتيرية *S. pneumonia* 1 هي الأكثر تحسناً للفعل التثبيطي للمضاد النانوي Azi-ZnO بقطر تثبيط بلغ 29.75 ملم ، فيما كانت *S. pneumonia* 2 و *S. pneumonia* 1 و *S. agalactia* 2 هي الأقل تحسناً لتأثير المضاد بقطر تثبيط بلغ 25.25 ملم للعزلات الثلاث.

3-7 الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO ضد البكتريا المعزولة من إصابات المسالك التنفسية:

3-7-1 الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي Cip-MgO ضد بكتريا *K.pneumoniae* :

تم دراسة الفعالية التثبيطية للمضاد سبروفلوكساسين بنوعيه الحر و النانوي الهجين Cip-MgO ضد عزلات بكتريا *K.pneumoniae* المعزولة من إصابات المسالك التنفسية و من خلال النتائج الموضحة في

الجدول 22 : الفعالية التثبيطية للمضاد Azithromycin الحر ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام :

| LSD 0.05 | قطر التثبيط (مم) | | | | | | تركيز المضاد µg /ml | رمز العزلة | أسم المضاد |
|-------------|------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|------------|---------------------------|---------------|---------------|
| | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | | | |
| 0.63 | 19.25 AB | 21 BC | 23.75 AB | 26 AB | 28.75 A | 30.5 AB | <i>E. Faecium</i> 1 | AZI- Free | |
| 0.96 | 19.5 AB | 21.5 AB | 23 C | 25.5 BC | 27 C | 29.5 BC | <i>E. Faecium</i> 2 | | |
| 0.75 | 19.5 A | 21.5 AB | 24.25 A | 26 AB | 28.25 AB | 31.5 A | <i>S.pneumonia</i> 1 | | |
| 0.58 | 18 B | 19.75 D | 22 DE | 24.25 E | 26 D | 28.5 CD | <i>S.pneumonia</i> 2 | | |
| 0.24 | 19 AB | 21 BC | 23 C | 25 D | 27.75 B | 30 B | <i>S.pneumonia</i> 3 | | |
| 0.63 | 19.75 A | 22 A | 24.25 A | 26.25 A | 28 B | 30.5 AB | <i>S.pneumonia</i> 4 | | |
| 0.58 | 19 AB | 20 D | 22.25 D | 24 E | 25.5 D | 28.25 D | <i>S. agalactia</i> 1 | | |
| 0.76 | 18.5 AB | 20.25 CD | 21.5 E | 24 E | 25.75 D | 28 D | <i>S. agalactia</i> 2 | | |
| 1.02 | 18.75 AB | 20.5 CD | 23 C | 25.25 CD | 27 C | 29.5 BC | <i>S. agalactia</i> 3 | | |
| 0.79 | 18.5 AB | 21 BC | 23.5 BC | 25.75 ABC | 27.75 B | 30.25 B | <i>S. agalactia</i> 4 | | |
| | 1.57 | 0.81 | 0.70 | 0.55 | 0.58 | 1.06 | LSD 0.05 | | |

الجدول 23 : الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين AZI-ZnO ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام :

| LSD 0.05 | قطر التثبيط (مم) | | | | | | تركيز المضاد µg /ml | اسم المضاد |
|-------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|---------------|
| | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | رمز العزلة | |
| 1.10 | e 17 BC | d 20 C | c 22 C | b 25.25 B | b 26 C | a 28.5 B | <i>E. Faecium</i> 1 | AZI- ZnO |
| 0.34 | f 16 D | e 17.75 E | d 19 E | c 23.25 EF | b 25 D | a 27 C | <i>E. Faecium</i> 2 | |
| 0.63 | f 19 A | e 21 AB | d 24.25 A | c 26.25 A | b 28.5 A | a 29.75 A | <i>S.pneumonia</i> 1 | |
| 0.93 | f 16 D | e 18 E | d 19.5 DE | c 22.75 FG | b 24.25 E | a 25.25 D | <i>S.pneumonia</i> 2 | |
| 0.76 | f 17.5 B | d 20.5 BC | d 22 C | b 24.25 CD | a 26.25 C | a 27 C | <i>S.pneumonia</i> 3 | |
| 0.53 | f 19 A | e 21.5 A | d 23.25 AB | c 25 BC | b 27 B | a 28 B | <i>S.pneumonia</i> 4 | |
| 0.76 | f 17.5 B | e 19 D | d 20.5 D | c 22.25 GH | b 24 EF | a 25.25 D | <i>S. agalactia</i> 1 | |
| 0.90 | f 16.5 CD | e 18.5 DE | d 20 DE | c 21.75 H | b 23.5 F | a 25.25 D | <i>S. agalactia</i> 2 | |
| 0.63 | e 18.75 A | e 20 C | d 22.5 BC | c 24 DE | b 25.75 C | a 27.25 C | <i>S. agalactia</i> 3 | |
| 0.58 | f 19 A | e 21.5 A | d 23.75 A | c 24.25 CD | b 27 B | a 28 B | <i>S. agalactia</i> 4 | |
| | 0.70 | 0.80 | 1.08 | 0.77 | 0.63 | 0.56 | LSD 0,05 | |

الجدولين 24 و 25 يظهر أن العزلات البكتيرية (*K.p10* و *K.p11* و *K.p12*) هي الأكثر حساسية للمضاد سبروفلوكساسين الحر بأقطار تثبيط (34.5 و 35 و 35) ملم، على التوالي عند التركيز 512 مايكروغرام / مل بينما كانت العزلات *K.p 3* و *K.p 7* و *K.p 9* و *K.p 10* و *K.p 11* و *K.p 12* هي الأكثر تحسناً للمضاد سبروفلوكساسين النانوي عند التركيز نفسه بأقطار تثبيط بلغت (32.5 و 32.5 و 32.5 و 33 و 33.25 و 34) ملم، على التوالي .

من جانب آخر كانت العزلة *K.p 1* هي الأقل تحسناً لفعل المضاد سبروفلوكساسين بنوعيه الحر والنانوي بقطري تثبيط بلغا (25 و 27) ملم، على التوالي .

أستخدمت المضادات الحيوية النانوية في علاج العديد من الحالات المرضية التي تسببها بكتريا *K.pneumoniae* المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية ومنها استخدام مضاد الكوليستين المحمل على دقائق الكيتوسان (chitosan) لمعالجة مقاومة هذه البكتريا للكوليستين (Elnaggar et al.,2020) واستخدام مضاد الليفوفلوكساسين المحمل على طبقات ثنائية الهيدروكسيل لتثبيط بكتريا *K.pneumoniae* المسببة لإلتهاب القدم السكري إذ بلغ معدلي التثبيط (15.89 و 11.5) ملم لكل من مضاد الليفوفلوكساسين الحر والنانوي، على التوالي (الحسيني، 2017).

3-7-2 الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي Cip-MgO ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام :

تم دراسة الفعل التثبيطي للمضاد النانوي الهجين Cip-MgO ضد 10 عزلات من البكتريا الموجبة لصبغة غرام المعزولة من إصابات المسالك التنفسية .

يتضح من النتائج المبينة في الجدولين 26 و 27 ان العزلة البكتيرية *S. agalactia 4* هي الأكثر حساسية للمضاد سبروفلوكساسين الحر والنانوي الهجين بقطري تثبيط (30 و 29) ملم، على التوالي عند التركيز 512 مايكروغرام / مل ، بينما كانت العزلة *S. agalactia 1* الأقل تحسناً لفعل المضاد بصورتيه الحرة والنانوية بقطري تثبيط بلغا (26 و 23.5) ملم، على التوالي .

الجدول 24 : الفعالية التثبيطية للمضاد Ciprofloxacin الحر ضد بكتريا *K.pneumoniae*

| LSD 0.05 | قطر التثبيط (ملم) | | | | | | تركيز المضاد µg /ml | رمز العزلة | أسم المضاد |
|-------------|-------------------|-------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|---------------------------|---------------|---------------|
| | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | | | |
| 0.53 | f 18 F | e 19.5 H | d 22.25 H | c 23 H | b 25 G | a 27 H | <i>K.p1</i> | CIP- Free | |
| 0.41 | f 23.75 D | e 25 F | d 26.25 F | c 27 F | b 28.25 E | a 31 F | <i>K.p2</i> | | |
| 0.41 | f 26 A | e 27 C | d 29.75 AB | c 31.25 B | b 32 C | a 33.75 CD | <i>K.p3</i> | | |
| 0.68 | f 24.5 CD | e 26.25 EF | d 28 E | c 29.25 | b 30.25 D | a 32.75 E | <i>K.p4</i> | | |
| 0.53 | f 25 BC | e 27 CDE | d 28.5 D | c 31 BC | b 33.25 A | a 34 BCD | <i>K.p5</i> | | |
| 0.76 | f 24.5 CD | e 26.5 DE | d 28.75 CD | c 30 E | b 31.75 C | a 33.5 D | <i>K.p6</i> | | |
| 0.53 | f 25.5 AB | e 28 AB | d 29 CD | c 30.25 D | b 32 C | a 34 BCD | <i>K.p7</i> | | |
| 0.84 | f 20 E | e 22.5 G | d 24 G | c 25.5 G | b 27 F | a 28.5 G | <i>K.p8</i> | | |
| 0.58 | f 26 A | e 27.25 BC | d 29.25 BC | c 30.5 CD | b 33 AB | a 34 BCD | <i>K.p9</i> | | |
| 0.76 | f 25.5 AB | e 27.25 BCD | d 29 CD | c 31 BC | b 33.25 AC | a 34.5 AB | <i>K.p10</i> | | |
| 0.99 | e 25.5 AB | d 28.5 A | c 30.25 A | b 32 A | b 32.5 BC | a 35 A | <i>K.p11</i> | | |
| 0.86 | f 25 BC | e 27.5 BC | d 29.5 BC | c 31.5 AB | b 33.25 A | a 35 A | <i>K.p12</i> | | |
| | 0.78 | 0.82 | 0.63 | 0.74 | 0.53 | 0.63 | LSD 0.05 | | |

الجدول 25 : الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين CIP-MgO ضد بكتريا *K.pneumoniae*

| LSD 0.05 | تركيز المضاد (ملم) | | | | | | تركيز المضاد µg /ml رمز العزلة | اسم المضاد |
|-------------|--------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|--|---------------|
| | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | | |
| 0.83 | f 16.5 H | e 18 G | d 19 F | c 20.5 F | b 23.5 F | a 25 E | K.p1 | CIP- MgO |
| 1.63 | e 18.5 F | d 21 F | c 24.25 E | bc 25.5 E | b 27 E | a 31.5 BC | K.p2 | |
| 1.10 | e 23 CD | d 25 D | c 28 BC | b 30 A | b 30.75 B | a 32.5 ABC | K.p3 | |
| 1.14 | f 22.5 | e 24.25 E | d 26 D | c 27.75 C | b 29 D | a 31 C | K.p4 | |
| 0.83 | f 23.5 BC | e 25 D | d 27.5 BC | c 29 B | b 31 B | a 32.5 ABC | K.p5 | |
| 0.58 | f 23 CD | e 25.25 D | d 27.25 C | c 29 B | b 30 C | a 31.5 BC | K.p6 | |
| 0.86 | f 22 E | e 23.5 E | d 26 D | c 28.25 C | b 30.5 BC | a 32.5 ABC | K.p7 | |
| 0.75 | f 17.25 G | e 21.5 F | d 24.5 E | c 26 D | b 27 E | a 27.75 D | K.p8 | |
| 0.76 | f 22.5 DE | e 24 E | d 25.75 D | c 28.25 C | b 31 B | a 32.5 ABC | K.p9 | |
| 0.34 | f 23 CD | e 26.25 C | d 27.75 BC | c 29 B | b 32 A | a 33 AB | K.p10 | |
| 0.63 | f 24 B | e 27 B | d 28.25 AB | c 29.5 AB | b 32.25 A | a 33.25 A | K.p11 | |
| 0.59 | e 26 A | d 28.25 A | c 29 A | c 29.5 AB | b 31.75 A | a 34 A | K.p12 | |
| | 0.78 | 0.59 | 0.92 | 0.74 | 0.56 | 1.53 | LSD 0.05 | |

الجدول 26 : الفعالية التثبيطية للمضاد Ciprofloxacin الحر ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام

| LSD 0.05 | قطر التثبيط (مم) | | | | | | تركيز المضاد µg/ml رمز العزلة | اسم المضاد |
|-------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|---|---------------|
| | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | | |
| 0.58 | f 18 CD | e 19.5 CDE | d 22 B | c 24.25 AB | b 26 BC | a 28.25 C | <i>E. Faecium</i> 1 | CIP- Free |
| 0.75 | f 17.25 E | e 19 DEF | d 22 B | c 23.5 BC | b 26.25 BC | a 28.5 BC | <i>E. Faecium</i> 2 | |
| 0.48 | f 19 AB | e 20.25 ABC | d 22 B | c 23.75 BC | b 25.25 DE | a 27.25 E | <i>S.pneumonia</i> 1 | |
| 0.76 | f 18.5 BC | e 20.75 A | d 22 B | c 23.5 BC | b 26.5 B | a 28.25 C | <i>S.pneumonia</i> 2 | |
| 0.58 | f 18 CD | e 19.75 BCD | d 21.5 C | c 23 CD | b 25.75 CD | a 28 CD | <i>S.pneumonia</i> 3 | |
| 0.58 | f 16.25 F | e 18.5 F | d 20 D | c 23.5 BC | b 25.25 DE | a 27 E | <i>S.pneumonia</i> 4 | |
| 0.72 | f 16 F | e 18.5 F | d 20.25 D | c 21.5 E | b 24 F | a 26 F | <i>S. agalactia</i> 1 | |
| 0.71 | f 17 E | e 18.75 EF | d 20 D | c 22.5 D | b 25 E | a 27.5 DE | <i>S. agalactia</i> 2 | |
| 0.75 | f 17.5 DE | e 20.75 A | d 23.25 A | c 25 A | b 27.5 A | a 29 B | <i>S. agalactia</i> 3 | |
| 0.63 | f 19.25 A | e 20.5 AB | d 23.25 A | c 25 A | b 27.75 A | a 30 A | <i>S. agalactia</i> 4 | |
| | 0.65 | 0.86 | 0.50 | 0.98 | 0.57 | 0.64 | LSD 0.05 | |

الجدول 27 : الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين CIP-MgO ضد بعض أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام :

| LSD 0.05 | قطر التثبيط (مم) | | | | | | تركيز المضاد µg /ml | رمز العزلة | أسم المضاد |
|-------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------------|---------------|---------------|
| | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 | | | |
| 0.63 | f 16.5 BC | e 18 D | d 20.25 E | c 23.25 C | b 25.25 C | a 27 C | <i>E. Faecium</i> 1 | CIP- MgO | |
| 0.53 | f 16 CD | e 18 D | d 21.25 CD | c 23.5 C | b 25 C | a 26.5 C | <i>E. Faecium</i> 2 | | |
| 1.02 | f 15 E | e 17.5 E | d 20.25 E | c 22.75 C | b 24 D | a 25.5 DE | <i>S.pneumonia</i> 1 | | |
| 0.34 | f 17 B | e 19 C | d 21 D | c 22.75 C | b 25.25 C | a 27 C | <i>S.pneumonia</i> 2 | | |
| 0.34 | f 18.25 A | e 20 B | d 21.5 C | c 23 C | b 25 C | a 26.75 C | <i>S.pneumonia</i> 3 | | |
| 0.76 | f 15.75 D | e 17 E | d 18.75 G | c 20.5 E | b 22.5 E | a 25 E | <i>S.pneumonia</i> 4 | | |
| 0.76 | f 14.5 E | e 17 E | d 18.75 G | c 20 E | b 21.75 E | a 23.5 F | <i>S. agalactia</i> 1 | | |
| 0.96 | f 15.75 D | e 17 E | d 19.25 F | c 21.75 D | b 24.5 CD | a 26.25 CD | <i>S. agalactia</i> 2 | | |
| 0.48 | f 17 B | e 19.75 B | d 22.25 B | c 24.75 B | b 26.25 B | a 28 B | <i>S. agalactia</i> 3 | | |
| 0.75 | f 17 B | e 21.25 A | d 24 A | c 26.25 A | b 27.5 A | a 29.5 A | <i>S. agalactia</i> 4 | | |
| | 0.64 | 0.46 | 0.49 | 0.81 | 0.76 | 1.00 | LSD 0.05 | | |

يصنف المضاد Ciprofloxacin ضمن مجموعة مضادات Fluoroquinolones و تتلخص فعاليته التثبيطية ضد البكتريا من خلال تثبيط أنزيم gyrase الذي يلعب دوراً في عملية التضاعف (DNA replication) و الإصلاح (DNA repair) فضلاً عن عملية Recombination , لذا فإن التداخل بين المضاد و الأنزيم أعلاه يؤدي الى كبح نمو الخلية البكتيرية (De Sarro and De Sarro , 2001) .

وبالرجوع الى جداول الفعالية التثبيطية السابقة يتضح عموماً ان الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي اوطأ منها للمضاد الحر . وعلى الرغم من ذلك فإن المضاد النانوي يعد اكفاً من المضاد الحر في تثبيط البكتريا لأسباب عدة أهمها أن المضاد النانوي مكون من جزئين (المضاد + الحامل) وإذا ما أخذنا بنظر الإعتبار كلفة كل من المضاد والحامل كلاً على انفراد فهذا يعني ان المضاد النانوي أقل كلفة من المضاد الحر اولاً ؛ كما ان المضاد النانوي يقلل الجرعة المعطاة من الدواء مما ينعكس بالتالي على تأخير تطور مقاومة البكتريا ضد الأدوية ثانياً ؛ ويكون المضاد النانوي أكثر فعالية من الحر فيما إذا تمت المقارنة بينهما بأستخدام التركيز نفسه ثالثاً ؛ وتعمل المضادات النانوية على تحسين الحركيات الصيدلانية للدواء (Pharmacokinetics) التي تشتمل على إمتصاص الدواء (Absorption) وتوزيعه (Distribution) وأيضه (Metabolism) وافراده (Excretion) رابعاً ؛ كما يعمل هذا النوع من المضادات على تحسين المعامل العلاجي (Therapeutic index) للدواء وزيادة ذائبته في المصل وإطالة مدة تدويره في الدم خامساً ؛ فضلاً عن عملية السيطرة على تحرره (Release) الى الانسجة والخلايا سادساً (Zhang et al ., 2010) .

الإستنتاجات والتوصيات

Conclusions

&

Recommendations

الاستنتاجات :

1. إرتفاع نسب إصابات المسالك التنفسية ببكتريا *K.pneumoniae* في محافظة كربلاء المقدسة .
2. كفاءة المضادين النانويين الهجينين المحضرين في هذه الدراسة في تثبيط بعض الأنواع البكتيرية المعزولة من إصابات المسالك التنفسية .

التوصيات :

1. تحضير وتشخيص مضادات نانوية هجينة أخرى وتقييم كفاءتها التثبيطية ضد البكتريا المعزولة من إصابات المسالك التنفسية .
2. تقييم كفاءة المضادين النانويين الهجينين قيد الدراسة ضد بعض الأنواع البكتيرية المعزولة من إصابات مختلفة .
3. إجراء دراسة على الحيوانات المختبرية لمعرفة تأثيرات المضادات النانوية داخل الجسم الحي (*in vivo*)
4. إجراء دراسات تتناول الربط بين تأثير المضادات الحيوية وبين عوامل الضراوة في البكتريا المسببة لأصابات المسالك التنفسية وعلاقة ذلك بصحة الإنسان .

المصادر

References

المصادر العربية :

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

البارودي ، هدى ناجح حسن (2019). تحضير وتشخيص مضاد نانوي حيوي هجين من الدوكسي سايكلين وتقييم كفاءته التثبيطية ضد بكتريا *Acinetobacter baumannii* المعزولة محلياً . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء.

الجبوري ، نيران عدنان عبد الكاظم (2016) . تحضير وتشخيص مضادين نانويين هجينين من الفانكوميسين والسبروفلوكساسين وتقييم كفاءتهما التثبيطية ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة محليا . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء .

الحسيني ، سارة محسن كاظم (2017) . تحضير وتشخيص مضاد نانوي هجين من الليفوفلوكساسين وتقييم كفاءته التثبيطية ضد البكتريا المعزولة من قرحة القدم السكري . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء.

الحمداني ، ميساء صالح مهدي (2015). تحديد الكفاءة التثبيطية لمضادي الأوكسي تتراسينيكين والتايلوسين المحضرين نانويا ضد البكتريا المسببة لألتهاب الضرع في الأبقار في محافظة كربلاء المقدسة . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء.

المصادر الأنكليزية :

- Acar**, J. F. and Goldstein, F.W.(1997) “Trends in bacterial resistance to ciprofloxacin,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 18.
- Adeli** , **E.** (2016) .Preparation and evaluation of azithromycin binary solid dispersions using various polyethylene glycols for the improvement of the drug solubility and dissolution rate *Braz. J. Pharm. Sci.* vol.52 no.1
- Al-Gaashani**, R.; Radiman, S.; Al-Douri, Y.; Tabet, N. & Daud, A. R. (2012). Investigation of the optical properties of Mg (OH) 2 and MgO nanostructures obtained by microwave-assisted methods. *Journal of Alloys and Compounds*, 521, 71-76.
- Al-Obadi** , T. H. (2014). Molecular Identification of *Klebsiella pneumoniae* Using Capsule Genes (Doctoral dissertation, M. Sc. Thesis. College of Science, Al-Nahrain University, Baghdad, Iraq).
- Amin** , A.; Ghumro, P. B. ; Hussain, S. & Hameed, A. (2009). Prevalence of antibiotic resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Tertiary Care Hospital in Pakistan. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5(2), 81-86.
- Ashe**, B. (2011). A Detail investigation to observe the effect of zinc oxide and Silver nanoparticles in biological system (Doctoral dissertation).
- Ashurst** J.V.& Dawson A. (2018). *Klebsiella Pneumonia* In: StatPearls publishing .

- Aurna** , S. T. (2017). Rapid identification of *Klebsiella pneumoniae* using PCR based method targeting 16S rRNA gene (Doctoral dissertation, BRAC University).
- Azzab** , M. M.; El Sokkary, R. H.; Tawfeek, M. M. & Gebriel, M. G. (2016). Multidrug-resistant bacteria among patients with ventilator-associated pneumonia in an emergency intensive care unit, Egypt. *EMHJ-Eastern Mediterranean Health Journal*, 22(12), 894-903.
- Bahrami**, M.; Ramazani, A.; Hanifehpour, Y.; Fattahi, N.; Taghavi Fardood, S.; Azimzadeh, P. & Joo, S. W. (2016). In situ generated stabilized phosphorus ylides mediated a mild and efficient method for the preparation of some new sterically congested electron-poor N-vinylated heterocycles. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 191(10), 1368-1374
- Bashi** , A. M.; Hussein, M. Z.; Zainal, Z. & Tichit, D. (2013). Synthesis and controlled release properties of 2, 4-dichlorophenoxy acetate–zinc layered hydroxide nanohybrid. *Journal of Solid State Chemistry*, 203, 19-24.
- Benson** , J. H. (2001). *Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology*. 8th ed. McGraw-Hill Higher Education. New York.
- Bernier** , M. C. ; Besse , M. ; Vayssade , M. ; Morandat , S. & El Kirat , K. (2012) . Titanium dioxide nanoparticles disturb the fibronectin - mediated

adhesion and spreading of pre - osteoblastic cells . *Langmuir* , 28 (38) , 13660-13667 .

Boholm, M. (2016). The use and meaning of nano in American English: Towards a systematic description. *Ampersand*, 3, 163-173.

Carbon, C. (1998). Pharmacodynamics of macrolides, azalides, and streptogramins: effect on extracellular pathogens. *Clinical infectious diseases*, 27(1), 28-32.

Caroling, G.; Tiwari, S. K.; Ranjitham, A. M. & Suja, R. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous broccoli extract-characterization and study of antimicrobial, cytotoxic effects. *Asian J Pharm Clin Res*, 6(4)165-172.

Cercenado, E. (2007). Tigecycline: a new antimicrobial agent against multiresistant bacteria. *Clinical Practice*, 4(3), 255

Chhatwal, G. S.& Graham, R. (2017) .Streptococcal Diseases. Editor(s): Stella R. Quah, *Int Encyclopedia of Public Health (Second Edition)*, *Acad Press*, , Pages 87-97

Chiu, S.; Wu, T.; Chuang, Y.; Lin, J.; Fung, C.; Lu, P.; Wang, J.; Wang, L.; Siu, K. and Yeh, K. (2013). National surveillance study on carbapenem Non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in taiwan: the emergence and rapid dissemination of kpc-2 carbapenemase. *Plos One*, 8(7): 1-7.

Chung, P. Y. (2016). The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS microbiology letters*, 363(20).

- Clifford, R. J.;** Milillo, M.; Prestwood, J.; Quintero, R.; Zurawski, D. V.; Kwak, Y. I. & Mc Gann, P. (2012). Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. *PloS one*, 7(11), e48558.
- Dan, M.;** Siegman-Igra, Y.; Pitlik, S. and Raz, R.(1990) “Oral ciprofloxacin treatment of *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 34, no. 5, pp. 849–852.
- De Sarro , A . & De Sarro, G .** (2001). Adverse reactions to fluoroquinolones. An overview on mechanistic aspects. *Current medicinal chemistry*, 8(4), 371-384.
- Drawz, S. M. & Bonomo, R. A.** (2010). Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin.Micr .oreviews*, 23(1), 160–201.
- Dubey, d.;** Raza, F.; Sawhney, A. and Pandey, A. (2013). *Klebsiella pneumoniae* renal abscess syndrome: a rare case with metastatic involvement of lungs, eye, and brain. *Case Reports in Infect. Dis.:* 1-3
- Echeverría , D.;** Martin-Ontiyuelo, C.; Navarrete-Rouco, M. E.; De-Antonio Cuscó, M.; Ferrández, O.; Horcajada, J. P. & Grau, S. (2020). Azithromycin in the treatment of COVID-19: a review. *Expert review of anti-infective therapy*, 19(2), 147-163.
- Egbe, C. A.;** Ndiokwere, C. & Omoregie, R. (2011). Microbiology of lower respiratory tract infections in Benin City, Nigeria. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, 18(2), 27.

- Egorove** , N.S.(1985).Antibiotics a scientific approach. Mir Publishers, Moscow
- Elgaml**, A.; Hassan, R.; Barwa, R.; Shokralla, S. & El-Naggar, W. (2013). Analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of Gram negative pathogenic bacteria isolated from urinary tract infections. African Journal of Microbiology Research, 7(23), 2862-2869.
- Elnaggar**, Y. S.; Elwakil, B. H.; Elshewemi, S. S.; El-Naggar, M. Y.; Bekhit, A. A. & Olama, Z. A. (2020). Novel Siwa propolis and colistin-integrated chitosan nanoparticles: elaboration; in vitro and in vivo appraisal. Nanomedicine, 15(13), 1269-1284.
- Espitia**, P. J. ; Soares, N. D. ; dos Reis Coimbra, J. S.; de Andrade, N. J.; Cruz, R. S. & Medeiros, E. A. A. (2012). Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food and bioprocess technology*, 5(5), 1447-1464.
- Fakhri**, A. & Adami, S. (2014). Adsorption and thermodynamic study of Cephalosporins antibiotics from aqueous solution onto MgO nanoparticles. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 45(3), 1001-1006.
- Fardood**, S.; Ramazani, A. & Woo Joo, S. (2018). Eco-friendly synthesis of magnesium oxide nanoparticles using arabic Gum. Journal of Applied Chemical Research, 12(1), 8-15.

- Fass** , J. R.(1986). "Treatment of skin and soft tissue infections with oral Ciprofloxacin " journal of Antimicrobial Chemotheraby. Vol.18, supplement, pp. 153-157.
- Fedorowicz**, J., & Sączewski, J. (2018). Modifications of quinolones and fluoroquinolones: hybrid compounds and dual-action molecules. Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, 149(7), 1199-1245.
- Fernandes** ,M. ; Singh ,K. ; Sarkar,T.; Singh,P. & Singh,R.P.(2020). resent applications of magnesium oxide nanoparticles in various domains .Advanced Materials Letters,11(8),20081543.
- Gmshinski**, I. V.; Khotimchenko, S. A. ; Popov, V. O.; Dzantiev, B. B.; Zherdev, A. V.; Demin, V. F. & Buzulukov, Y. P. (2013). Nanomaterials and nanotechnologies: methods of analysis and control. Russian Chemical Reviews, 82(1), 48.
- Gray** B.M. & Stevens D.L. (2009) Streptococcal Infections. In Bacterial Infections of Humans (pp. 743 – 782) Springer, Boston, MA.
- Gupta**, Y. & Kapoor, S. (2014). Fluoroquinolones: a Pharmaceutical Review. Int. J. Pharm. Sci. Invention, 3(9), 66-71.
- Hardie**,J.M. and Whiely,R.A.(1997).The genus Streptococcus.In the genera of lactic acid bacteria ed .Wood,B.J.B.and Holzapfel, W.H.vol2,pp:55-124.Blackie Academic and Professional.
- Hart**, C. A. and Kariuki, S.(1998). "Antimicrobial resistance in developing countries," British Medical Journal, vol. 317, no. 7159, pp. 647–650.

- Hart**, T. and Shears, P. (2004).Color atlas of medical microbiology. 2nd edn. Mosby, an imprint of Elsevier Limited .
- Hossain**, Z.(2014).Bacteria: *Streptococcus*, Editor(s): Yasmine Motarjemi, Encyclopedia of Food Safety, *Academic Press*, , Pages 535-545, ISBN 9780123786135
- Huh**, A. J. & Kwon, Y. J. (2011). “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of controlled release*, 156(2), 128-145.
- Huneault** , L. M.; Lussier, B.; Dubreuil, P.; Chouinard, L. and D’és’évaux C.(2004). “Prevention and treatment of experimental osteomyelitis in dogs with ciprofloxacin-loaded crosslinked high amylose starch implants,” *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 22, no. 6, pp. 1351–1357.
- Janda**, J. M. & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Jansen**, R. R. (2014). Molecular detection of respiratory pathogens: Towards clinical interpretation (Doctoral dissertation, Universiteit van Amsterdam [Host]).
- Johal**, M. S. & Johnson, L. E. (2011). *Understanding nanomaterials* (pp.195 - 196). Boca Raton , FL , USA : CRC Press.

- Karagöz, A.;** Acar, S. & Körkoca, H. (2015). Characterization of Klebsiella isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and determination of antimicrobial resistance with VITEK 2 advanced expert system (AES). Turkish journal of medical sciences, 45(6), 1335-1344.
- Kavitha, K. S.;** Baker, S.; Rakshith, D.; Kavitha, H. U.; Yashwantha Rao, H. C.; Harini, B. P. & Satish, S. (2013). Plants as green source towards synthesis of nanoparticles. Int Res J Biol Sci, 2(6), 66-76.
- Kawamura, Y.;** Hou, X. G.; Sultana, F.; Miura, H. & Ezaki, T. (1995). Determination of 16S rRNA sequences of Streptococcus mitis and Streptococcus gordonii and phylogenetic relationships among members of the genus Streptococcus. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 45(2), 406-408.
- Keskar, M. R. & Jugade, R. M.** (2015). Spectrophotometric investigations of macrolide antibiotics: a brief review. Analytical chemistry insights, 10, ACI-S31857.
- Khan, I.;** Saeed, K. & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian journal of chemistry, 12(7), 908-931.
- Khan, S.;** Priti, S. & Ankit, S. (2015). Bacteria etiological agents causing lower respiratory tract infections and their resistance patterns. Iranian biomedical journal, 19(4), 240.

- Kolekar** , T.V. ; Yadav, H.M. ; Bandgar, S.S. and Deshmukh, P.Y.(2011). Synthesis By Sol-gel Method And Characterization Of Zno Nanoparticles. *Indian Streams Research Journal*, Vol. I, Issue. I, DOI : 10.9780/22307850.
- Kumar**, A. R. (2013). Antimicrobial sensitivity pattern of Klebsiella pneumonia isolated from pus from tertiary care hospital and issues related to the rational selection of antimicrobials. *Journal of chemical and pharmaceutical research*, 5(11), 326-331.
- Kumar**, C. N. (2019). Total Synthesis of Macrolides. In *Organic Synthesis-A Nascent Relook*. IntechOpen.
- Kumar**, N. I. ; Das, S. A. ; Jyoti, A. N. & Kaushik, S. A. (2016). Synergistic effect of silver nanoparticles with doxycycline against Klebsiella pneumoniae. *Int J Pharm Pharm Sci*, 8(7), 183-186.
- Kumar**, R. & Singh, G. (2019) Study of Bacterial Pathogens and Antibiotic Sensitivity Pattern of Ear Infections in Patients with Chronic Suppurative Otitis Media Attending a Tertiary Care Hospital in Panipat, India.
- Kupczik** , F.; Vialle, L.R.G.; Nobre, L. O.; Vieira, L. A. and Fernandes, A. E. O.(2009). “Influência da ciprofloxacina na consolidação óssea de fraturas de fêmur em ratos,” *Acta Ortopédica Brasileira*, vol. 17, no. 4, pp. 228–231.
- Leboffe** , M. J. & Pierce , B. E. (2010). *Microbiology: Laboratory Theory and Application*. 3d ed. Morton Publishing Company. Englewood, CO .

- Lin** , W. F. ; Li , J. R. & Liu , G. Y. (2012) . Near - field scanning optical microscopy enables direct observation of moiré effects at the nanometer scale . ACS nano , 6 (10) , 9141-9149 .
- Liu**, Y. ; Liu, C. ; Zheng, W. ; Zhang, X. ; Yu, J. ; Gao, Q. & Huang, X. (2008). PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S–23S internal transcribed spacer. International journal of food microbiology, 125(3), 230-235.
- Macfaddin**, J.F. (2000). Biochemical tests for identification of medical Bacteria .1sted.,the Williams and Wilkins Baltimore, USA.
- Markey**, B.; Leonard, F.; Archambault, M.; Cullinane, A. and Maguire, D. (2013).Clinical veterinary microbiology. 2nd ed. Mosby Elsevier.
- Matar** , S. (2014). Characterization of *Staphylococcus* Small Colony Variant and their Pathogenic Role in Biomaterial Related Infection with Special Reference to *Staphylococcus epidermidis*.:187-192
- McCarty**, J. M. (1996). Azithromycin (Zithromax®). Infectious diseases in obstetrics and gynecology, 4(4), 215-220.
- MELO**, S. C. ; SANTOS, N. C. ; OLIVEIRA, M. D. ; SCODRO, R. B. ; Cardoso, R. F.; Pádua, R. A.; ... & Pelloso, S. M. (2016). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 58. Microbiol., 59: 541-547.

- Michael** . R. ; Franklin,M.R. ; Donald , N. and Franz , D.N. (2000) .Drug absorption ,action and disposition .Remington .The science and practice of pharmacy . 20th ed. Alfonso , R.G. philadeiphia College of pharmacy and science .Pp.858-93.
- Mohandes**, F.; Davar, F. & Salavati-Niasari, M. (2010). Magnesium oxide nanocrystals via thermal decomposition of magnesium oxalate. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 71(12), 1623-1628.
- Mohanty** , A. ; Garg , N. and Jin , R. A. (2011) . uneversal approach to the synthesis of noble metal nanoparticales and their catalytic properties , *Angew. Chem . Int . Ed . Engl.* 49,4962 – 4966.
- Motaweq**, Z. Y. & Naher, H. S. (2017). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing LRTI in Najaf, Iraq. *Environmental & Socio-economic Studies*, 5(2), 10-18.
- Nagappa**, B. & Chandrappa, G. T. (2007). Mesoporous nanocrystalline magnesium oxide for environmental remediation. *Microporous and Mesoporous Materials*, 106(1-3), 212-218.
- Nandy**, S.; Dudeja, M.; Das, A. K. & Tiwari, R. (2013). Community Acquired Bacteremia by *Sphingomonas paucimobilis*: Two Rare Case Reports. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 7(12), 2947.
- Nasehi**, L.; shahcheraghi, F.; Nikbin, V. and Nematzadeh, S. (2010). PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in clinical isolates Tahrn, Iran. *Iranian J. of Bisc Med. sci.*, 13(3): 111-118.

- Nepal, R.;** Shrestha, B.; Joshi, D. M.; Joshi, R. D.; Shrestha, S. & Singh, A. (2018). Antibiotic Susceptibility Pattern of Gram-negative Isolates of Lower Respiratory Tract Infection. *Journal of Nepal Health Research Council*, 16(1), 22-26.
- Nichols, W. K.** (2000). Oral Solid Dosage Form. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th ed. Alfonso, RG Philadelphia College of Pharmacy and Science*, 1(4), 1538-39.
- Palmqvist, M.** (2017). Nanoparticles :Case studies of their synthesis ,properties and biological interaction. Doctoral thesis , Swedish University of Agricultural sciences .
- Pan, G. H.;** Barras, A.; Boussekey, L.; Qu, X.; Addad, A. & Boukherroub, R. (2013). Preparation and characterization of decyl-terminated silicon nanoparticles encapsulated in lipid nanocapsules. *Langmuir*, 29(41), 12688-12696.
- Patel, J. B.** (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular diagnosis*, 6(4), 313-321.
- Patel, P. H., & Hashmi, M. F.** (2020). Macrolides. StatPearls [Internet].
- Patwa A. & Shah A.**(2015). Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Ind J Anaesth*;59:533-41
- Quinn, P. J.;** Carter, M. E.; Markey, B. and Carter, G. R. (2004). *Clinical veterinary microbiology* ,Elsevier limited.

- Rang** , H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. and Moore,P.K.(2003) . Drugs Used In The Treatment of Infections and Cancer Pharmacology,5th ed. Churchill Livingston.
- Rudramurthy**, G. R.; Swamy, M. K.; Sinniah, U. R. & Ghasemzadeh, A. (2016). Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. *Molecules* Basel, Switzerland.21(7), 836.
- Sabir**, S.; Arshad, M. & Chaudhari, S. K. (2014). Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: synthesis and applications. *The Scientific World Journal*, .Article ID 925494 , 8 pages.
- Sambrook** ,J. and Russell , D. (2001) . *Molecular Cloning : A laboratory Manual* , 3rd ed. , Cold Spring Harbor Laboratory press , New York.
- Sandman**, Z. & Iqbal, O. A. (2020). Azithromycin. *StatPearls* [Internet].
- Sapsford** , K. E. ; Tyner , K. M. ; Dair , B. J. ; Deschamps , J. R. & Medintz , I. L. (2011) . Analyzing nanomaterial bioconjugates : a review of current and emerging purification and characterization techniques . *Analytical chemistry* , 83 (12) , 4453-4488 .
- Savitha**, A. K. & Gopalakrishnan, S. (2018). Determinants of acute respiratory infections among under five children in a rural area of Tamil Nadu, India. *Journal of family medicine and primary care*, 7(6), 1268.
- Scott**, J.A.; Brooks, W.A.; Peiris, J.S.; Holtzman, D. and Mulhollan, E.K. (2008). Pneumonia research to reduce childhood mortality in the developing world. *J Clin Invest*,118, 1291-300.

- Selvam**, N. C. ; Kumar, R. T.; Kennedy, L. J. & Vijaya, J. J. (2011). Comparative study of microwave and conventional methods for the preparation and optical properties of novel MgO-micro and nano-structures. *Journal of Alloys and Compounds*, 509(41), 9809-9815.
- Sharma**, P. C.; Jain, A.; Jain, S.; Pahwa, R. & Yar, M. S. (2010). Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 25(4), 577-589.
- Shilpa**, K.; Thomas, R. & Ramyashree, A. (2016). Isolation and Antimicrobial sensitivity pattern of *Klebsiella pneumoniae* from sputum samples in a tertiary care hospital. *Int J Biomed Adv Res*, 7(2), 53-57.
- Silverstein**, R. M. ;Webster, F.X. and Kiemle, D.J. (2005). "Spectrometric identification of organic compounds. " 7 Ed. John Wily & Sons. INC. Printed in the United States of America.
- Simo**s, A.F.; Cherian, T.; Chow, J.; Shahid-Salles, S.; Laxminarayan, R. and John, T.J. (2006). *Acute Respiratory Infections in Children. In Disease Control Priorities in Developing Countries. second edition. Washington: Oxford University Press.*
- Soni**, K. (2012). Fluoroquinolones: chemistry & action—a review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 43-53.
- Tang**, Z. X. & Bin-feng, Lv. (2014). MgO nanoparticles as antibacterial agent: preparation and activity. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(3), 591-601.

- Tille** , P.M.(2014). Bailey & Scott's diagnostic microbiology. 13th Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc.
- Tomisic**, Z. B. (2011). The story of azithromycin. J Chem Chem Eng, 60, 603-617.
- Tooke**, C. L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E. C.; Colenso, C. K.; Hirvonen, V.; Takebayashi, Y. & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. j. Molbiology, 431(18), 3472–3500.
- Tu**, J. ; Inthavong, K. & Ahmadi, G. (2013). The Human Respiratory System. 10.1007/978-94-007-4488-2_2.
- Vishwanath**, S.; Chawla, K. & Gopinathan, A. (2013). Multidrug resistant Gram-negative bacilli in lower respiratory tract infections. Iranian journal of microbiology, 5(4), 323.
- Voicu**, G.; Oprea, O.; Vasile, B. S. & Andronescu, E. (2013). Antibacterial Activity Of Zinc Oxide-Gentamicin Hybrid Material. Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB), 8(3).
- Wakim**, S.& Grwel, M. (2020) .Structure and Function of the Respiratory System. book:human biology . Biology. LIBretext.
- Wang**, L.; Gu, H. and Lu, X. (2012). A rapid low-cost real-time pcr for the detection of Klebsiella pneumoniae carbapenemase genes. Annals of Clin. Microbiol. and Antimicrob., 11(9): 1-6.

- Wang, W.;** Qiao, X.; Chen, J. & Li, H. (2007). Facile synthesis of magnesium oxide nanoplates via chemical precipitation. *Materials Letters*, 61(14-15), 3218-3220.
- Whiley, R.A. and Hardi, J.M.** (2009):In *Bergey`s manual of determinative bacteriology*,2thed.;Wilkins:Baltimore MA,USA
- William F.O.;** Lemke T.L. and William DA. (2008) *Foye's Principle of Medicinal Chemistry*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- World Health Organization.** (1991). Technical bases for the WHO recommendations on the management of pneumonia in children at first-level health facilities (No. WHO/ARI/91.20. Unpublished). World Health Organization.
- Zhang, L.,** Pornpattananankul, D., Hu, C. M., & Huang, C. M. (2010). Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Current medicinal chemistry*, 17(6), 585-594.
- Zhou, C.;** Liu, Z.; Du, X.; Mitchell, D. R. ; Mai, Y. W.; Yan, Y. & Ringer, S. (2012). Hollow nitrogen-containing core/shell fibrous carbon nanomaterials as support to platinum nanocatalysts and their TEM tomography study. *Nanoscale research letters*, 7(1), 1-11.

الملحق 1 اختبارات العدة التشخيصية Api- 20 E لتشخيص بكتريا *K. pneumoniae*

| <i>K. pneumoniae</i> | الاختبارات | ت |
|----------------------|-----------------------|----|
| + | ONPG | 1 |
| - | <u>ADH</u> | 2 |
| - | <u>LDC</u> | 3 |
| - | <u>ODC</u> | 4 |
| V | <u>[CIT]</u> | 5 |
| - | <u>H₂S</u> | 6 |
| + | <u>URE</u> | 7 |
| - | TDA | 8 |
| - | IND | 9 |
| V | <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

الملحق 2 الأختبارات المستخدمة في جهاز الفايترك

| No. | Test | <i>K. pneumonia</i> |
|-----|------------------|---------------------|
| 1 | APPA | — |
| 2 | ADO | + |
| 3 | PyrA | V |
| 4 | IARL | + |
| 5 | dCEL | + |
| 6 | BGAL | + |
| 7 | H ₂ S | — |
| 8 | BNAG | — |
| 9 | AGLTp | — |
| 10 | dGLU | + |
| 11 | GGT | — |
| 12 | OFF | + |
| 13 | BGLU | + |
| 14 | dMAL | + |
| 15 | dMAN | + |
| 16 | dMNE | + |
| 17 | BXYL | + |
| 18 | BAlap | + |
| 19 | ProA | — |
| 20 | LIP | — |
| 21 | PLE | + |
| 22 | TyrA | + |
| 23 | URE | + |

| | | |
|----|-------|---|
| 24 | dSOR | + |
| 25 | SAC | + |
| 26 | dTAG | — |
| 27 | dTRE | + |
| 28 | CIT | + |
| 29 | MNT | + |
| 30 | 5KG | — |
| 31 | ILATK | + |
| 32 | AGLU | — |
| 33 | SUCT | + |
| 34 | NAGA | — |
| 35 | AGAL | + |
| 36 | PHOS | + |
| 37 | GlyA | — |
| 38 | ODC | + |
| 39 | LDC | + |
| 40 | IHISa | — |
| 41 | CMT | + |
| 42 | BGLUR | + |
| 43 | O129R | + |
| 44 | GGAA | — |
| 45 | IMLTa | — |
| 46 | ELLM | — |
| 47 | ILATa | — |

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

الملحق 3 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*.

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

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

الملحق 4 : 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 |
| - | VP | 10 |
| - | GEL | 11 |
| + | GLU | 12 |
| + | MAN | 13 |
| - | INO | 14 |
| + | SOR | 15 |
| + | RHA | 16 |
| + | SAC | 17 |
| + | MEL | 18 |
| - | AMY | 19 |
| + | ARA | 20 |

(+) : نتيجة موجبة ، (-) : نتيجة سالبة

الملحق 5 اختبارات العدة التشخيصية Api 20 E لتشخيص بكتريا *E.aerogenes*

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

(+) : نتيجة موجبة ، (-) : نتيجة سالبة

Summary

This study included the isolation and identification of the most important types of bacteria that cause respiratory tract infections. The isolated bacteria were identified by conventional and molecular methods. It also included the preparation and identification of two hybrid nanocomposites of the antibiotic azithromycin and ciprofloxacin. The inhibitory effect of the two nanoparticles prepared above against the isolated bacteria was evaluated in this study, and the results were shown as follows:

From a total of 60 samples taken from respiratory tract infections patients attended to AL-Hussein Medical City in the Holy Karbala Governorate , 48 isolates and four yeasts isolates were obtained , which included 12 isolates (23%) of *Klebsiella Pneumoniae* and 14 isolates 26.9 % Of *Streptococcus* that divided into 4 (7.7%) of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus pneumoniae*, 3 (5.7%) *Streptococcus pyogenes*, 2 (3.8%) of *Streptococcus salivereus* and one of them (1.9%) of *Streptococcus viridans* and 7% (of 13.4 isolates) *Sphingomonas sp.*, 4 isolates (7.7%) of *Staphylococcus aureus*, *E.coli* and *Candida albicans*, 3 isolates (5.7%) of *Pseudomonas aeruginosa*, and two isolates (3.8%) each of *Entreococcus faecium* and *Enterobacter aerogenes*.

The antibiotic azithromycin was used in the preparation of a hybrid nanocomposite after loading the antibiotic with zinc oxide. The results of characterization by infrared spectroscopy (FT-IR) showed that the frequencies of some chemical groups were shifted towards high and low frequencies. X-ray diffraction (XRD) also

revealed the appearance of new diffraction planes in the spectrum of the Azi-Zno hybrid antibiotic compared to the spectrum of the zinc oxide carrier, indicating that the prepared antibiotic under study was a nanohybrid antibiotic . The results of Atomic Force Microscope (AFM) revealed that the average dimensions of the Azi-Zno nano hybrid antibiotic were 51.58 nanometers. Results of scanning electron microscope (SEM), revealed the appearance of regular geometric shapes as well as the formation of structures with high porosity when the Azi-ZnO nano hybrid antibiotic was formed by the direct intercalation of the zinc oxide layers with the free Azithromycin antibiotic , which indicates the success of the antibiotic insertion into layers of Zinc oxide. The analysis by (EDS) spectroscopy confirmed the presence of zinc, oxygen and carbon elements in the composition of the Azi-ZnO nano hybrid antibiotic , which indicates the success of the free antibiotic intercalation between the zinc oxide layers and thus the formation of a new nano hybrid antibiotic .

Ciprofloxacin was also used in the preparation of a hybrid nanocomposite after loading the antibiotic with magnesium oxide. Results of infrared spectroscopy (FT-IR) and X-ray diffraction (XRD) indicated that the prepared antibiotic under study was a nanohybrid antibiotic. Results of atomic force microscope (AFM) revealed that the average dimensions of the Cip-MgO nano hybrid antibiotic reached 77.35 nanometers.

Scanning electron microscope (SEM) image revealed the appearance of shapes similar to thin sponge pieces as well as the formation of structures with high porosity when the Cip-MgO nano hybrid antibiotic was formed by the direct intercalation of

magnesium oxide layers with the free Ciprofloxacin antibiotic, indicating the success of the antibiotic intercalation into layers of magnesium oxide. As for the analysis with EDS spectroscopy, the presence of magnesium, oxygen and carbon elements in the composition of the Cip-MgO nano hybrid antibiotic indicates the success of the free insertion of the free antibiotic between the magnesium oxide layers and thus the formation of a new nano hybrid antibiotic.

The inhibitory activity of nanohybrid antibiotic prepared in this study was evaluated against *K.pneumonia* isolates. The results showed the following:

The Azi-ZnO nano hybrid antibiotic had the highest inhibitory activity against *K.p5* and *K.p11* isolates with rates of inhibition diameters of (29.25 and 28.25) mm, while the isolates *K.p 4*, *K.p7*, *K.p10*, *K.p11* and *K.p12* were the most affected by the inhibitory effect of Azi-Free antibiotic with inhibition diameters (31.5, 31.5, 32, 32.5 and 31.5) mm, respectively.

The nano hybrid antibiotic Cip-MgO showed the highest inhibitory activity against isolates *K.p 3*, *K.p 7*, *K.p 9*, *K.p 10*, *K.p 11* and *K.p 12* with inhibition diameters of (32.5, 32.5, 32.5, 33, 33.25 and 34 mm), respectively. , While the highest inhibitory activity of the free ciprofloxacin was against the bacterial isolates (*K.p10*, *K.p11* and *K.p12*) with inhibition diameters (34.5, 35 and 35) mm, respectively.

The inhibitory activity of the two nano hybrid antibiotics prepared in this study was also evaluated against some Gram positive bacterial isolates .

The results showed the following:

Azi-ZnO nano hybrid antibiotic showed the highest inhibitory activity against *S.pneumonia* 1 bacterial isolate with an inhibition diameter of 29.75 mm, while the highest activity of free antibiotic against bacterial isolates *E .faecium* 1, *S .pneumonia* 1 and *S .pneumonia* 4 with inhibition diameters of (30.5, 31.5, and 30.5) mm, respectively. Whereas, the free and nano hybrid ciprofloxacin antibiotic showed the highest inhibitory efficacy against *S. agalactia* 4 bacterial isolate with inhibition diameter (30 and 29) mm, respectively.

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



**Isolation and Identification of some bacterial species
causing respiratory tract infections and evaluation
their inhibitory efficiency using nanoprepared
azithromycin and ciprofloxacin .**

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

Nora Ghanim Jabur

B.Sc. Kerbala University 2015

Supervised by

Prof.

Dr. Ali Abdul Kadhim Al-Ghanimi

2021 AD

1442 AH