جامعة بغداد
كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم
قسم علوم الحياة

دراسة وراثية جزيئية لبكتريا المكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* المعزولة من جذور الاسنان الملتهبة للإنسان في بغداد

رسالة تقدمت بها

سوزان علي كاظم

(بكالوريوس علوم الحياة ٢٠٠٦ م)

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم – جامعة بغداد
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير
في علوم ألحياة علم الوراثة الجزيئية

بأشراف

ا. م. د. عذراء حميد حسون

رجب ١٤٣٦هـ   نيسان ٢٠١٥ م

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ فَتَعَٰلَى ٱللَّهُ ٱلۡمَلِكُ ٱلۡحَقُّۗ وَلَا تَعۡجَلۡ
بِٱلۡقُرۡءَانِ مِن قَبۡلِ أَن يُقۡضَىٰٓ إِلَيۡكَ وَحۡيُهُۥۖ
وَقُل رَّبِّ زِدۡنِي عِلۡمٗا ١١٤ ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة طه الاية(١١٤)

www.manaraa.com

إقرار المشرف

أشهد بأن إعداد هذه الرسالة تم تحت إشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة – ابن الهيثم / جامعة بغداد، وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم ألحياة علم الوراثة الجزيئية

التوقيع:

اسم المشرف: د. عذراء حميد حسون

المرتبة ألعلمية استاذ مساعد

العنوان: قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلم الصرفة/ ابن الهيثم

التاريخ:

توصية رئيس قسم علوم الحياة

استناداً إلى التوصية أعلاه من قبل المشرفة الأستاذ الدكتورة عذراء حميد حسون أرشح هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: د. نهلة عبد الرضا البكري

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة/ ابن الهيثم – جامعة بغداد

التاريخ:

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها، وفيما له علاقة بها ووجدنا بأنها جديرة بالقبول لنيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة/ علم الوراثة الجزيئية .

التوقيع :

الاسم : د. الهام سعيد عبد الكريم
اللقب العلمي : استاذ مساعد
(عضــو)

التوقيع :

الاسم : د. شروق ريس كاظم
اللقب العلمي : استاذ مساعد
(عضــو)

التوقيع :

الاسم: د. عذراء حميد حسون
اللقب العلمي : استاذ مساعد
(عضو / المشرف)

التوقيع :

الاسم: د. محمد ابراهيم نادر
اللقب العلمي: استاذ
(رئيس اللجنة)

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم

التوقيع:

الاسم: د. خالد فهد علي
اللقب العلمي: أستاذ مساعد

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الاهداء

ألـهي لا يطيب الـلـيل الا بـشكرك....

ولا يـطيب الـنـهار الا بطاعتك.....

ولا تـطيب الـلحظات الا بـذكرك...

(الله جل جلالـه)

الـى فـيض الـمحبة والـحنين ..الـى سبب نـجاحي ..الـى من دعواتـهما انـارة لـي طريـقي ..

قـرة عيـني والـدي ووالـدتي .

الـى من اعانـني على مصاعب الـحياة .. ومـنحنـي الـحب فـي كل الـظروف ..سـنـدي ورفـيق دربـي

زوجـي الـغالـي .

الـى سـندي وذخري فـي الـحيـاة ... اخوتـي و أختـي.

الـى نـور قـلـبـي وثـمـرة فـؤادي .... اولادي .

الـى من علمـني حرفـاً فملكـني عبداً

اساتـذتـي فـي

مسيـرة حيـاتـي .

✍سوزان

www.manaraa.com

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين محمد الأمين وعلى آله الغر الميامين وأصحابه المنتجبين أسعد مخلوقات الله اجمعين، يعجز لساني عن تقديم وافر الشكر والتقدير لكل من مد لي يد العون والمساعدة لإتمام رسالتي.

أتقدم بوافر امتناني الى استاذتي الفاضلة **الدكتورة عذراء حميد حسون** على موضوع البحث. فقد كانت خير عون لي بتوجيهاتها السديدة ومتابعتها العلمية خلال مرحلة البحث والكتابة جزاها الله خير جزاء. كما أتقدم بجزيل شكري وامتناني و تقديري لرئاسة قسم علوم الحياة , والى عمادة كلية التربية ابن الهيثم .

وببالغ الشكر والتقدير للدكتور **رضا حزام**/ جامعة بغداد/ كلية التربية ابن الهيثم، اود ان اعبر عن امتناني لما ابداه لي من مساعدة ومشورة علمية طوال مدة البحث.

ومن الوفاء أتقدم بشكري لأستاذي **الدكتور احسان عرفان حسين/ جامعة بغداد/ كلية التربية ابن الهيثم** لفتح أبواب مختبره لإكمال بحثي وقدم لي النصح والمشورة العلمية وعلمني طريقة التفكير العلمي في الدراسة، كما اشكر **الاستاذ زيد/ جامعة النهرين/ كلية العلوم**، لما ابداه لي من مشورة ونصح طوال البحث، **ومن الجدير بالذكر ان اتقدم بشكري لأطباء الاسنان في مركز اسنان النور وبالخصوص الدكتورة فليحة المالكي، والى كادر المختبر الداخلي (البكتريولوجي)** في مستشفى الكاظمية التعليمي، ومستشفى الشهيد محمد باقر الحكيم لمساعدتهم لي طوال فترة البحث، وأتقدم بشكري وامتناني الى الست شيماء محسن مطلك / دائرة صحة بغداد، لمساعدتها لي لإتمام البحث، وأخيرا اعبر عن الود والمحبة والتقدير لاهلي ولعائلة محيي لبجة ولزوجي العزيز لدعمهم المتواصل لي خلال مدة البحث.

سوزان

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

الخلاصة

تم التحري عن نسبة وجود بكتريا المكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* في (100) عينة معزولة من اشخاص مصابين بالتهاب قناة جذر السن , اذ تم جمع (70) عينة من الاصابات الابتدائية لقناة الجذر، و (30) عينة من الاصابات الثانوية لقناة الجذر (اعادة العلاج) ومن مختلف الفئات العمرية ، شخصت العزلات بوساطة الفحوصات الزرعية والكيموحيوية، كما شخصت باستعمال جهاز Vitek2، ثم شخصت العزلات بالاعتماد على الطراز الجيني بالتشخيص الجزيئي باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction PCR).

تم الحصول على 45 عزلة تعود لبكتريا المكورات المعوية البرازية *E. faecalis* وذلك بالاعتماد على الفحوصات المزرعية الاولية التي أجري عليها جميع الفحوصات ومن ضمنها التشخيص الجزيئي (16SrRNA) .

تم الحصول على 24 فقط من العزلات تعود لنوع *E. faecalis* بأجراء الفحوصات الكيموحيوية، كما تم الحصول على 20 عينة تعود لنوع *E. faecalis* فقط عند تشخيصها بنظام الـ Vitek2، وبعد اجراء الفحص الجزيئي عليها تم الحصول على 32 عينة تعود لنوع *E. faecalis* .

اجري فحص مقاومة المضادات الحيوية لعزلات *E. faecalis* المشخصة جزيئيا (٣٢) عزلة باستعمال (14) مضاداً حيوياً، اظهرت (5) عزلات مقاومتها لجميع المضادات الحيوية المستخدمة وقد اظهرت العزلات مقاومة متعددة لبعض المضادات الحيوية، كما كانت جميع العزلات مقاومة وبنسبة (100%) لخمسة من المضادات الحيوية وهي (Cephalothin , Streptomycin , Tetracyclin , Cilndamycin, Trimethoprime) .

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اظهرت نتائج الكشف عن قابلية العزلات على انتاج عوامل الضراوة ان (24 عزلة) وبنسبة (75 %) كانت منتجة للبروتييز، و(8عزلات) (25 %) للانواع منتجة لللاييبز، و(16عزلة) وبنسبة (50 %) كانت منتجة لانزيم الهيمولايسين، و(5) عزلات اي نسبة (15.6%) كانت منتجة لانتزيم الجيلاتينيز.

تم التحري عن وجود الجين المشفر لإنتاج مستضد التهاب شغاف القلب لبكتريا المكورات المعوية البرازية (*E. faecalis* endocarditis antigen efaA) في (٣٢) عزلة المشخصة جزيئيا باستعمال بوادئ متخصصة لهذا الجين وكانت جميع العزلات حاملة لهذا الجين.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
	الفصل الأول: المقدمة واستعراض المراجع	
1-1	المقدمة	1
2-1	استعراض المراجع	3
1-2-1	اكتشاف جنس المكورات المعوية	3
2-2-1	التسمية والتصنيف	4
3-2-1	المحتوى الوراثي لبكتريا المكورات المعوية البرازية	6
4-2-1	مصادر تواجد بكتريا المكورات المعوية البرازية	11
5-2-1	امراضية بكتريا المكورات المعوية البرازية	11
6-2-1	مقاومة المضادات الحيوية	12
7-2-1	عوامل الضراوة للمكورات المعوية البرازية	14
1-7-2-1	مواد التجمع Aggregation substances	14
2-7-2-1	اللواصق السطحية Surface adhesions	15
1-2-7-2-1	الكربوهيدرات السطحية Surface carbohydrate	15
2-2-7-2-1	البروتين السطحي للمكورات المعوية Enterococcal surface protein (Esp)	15
3-2-7-2-1	مستضد التهاب شغاف القلب لبكتريا المكورات المعوية البرازية *E. faecalis endocarditis* antigen (efaA)	16
4-2-7-2-1	اللاصق السطحي المرتبط بالكولاجين Adhesion tocollagen of *E. faecalis* (Ace)	18
3-7-2-1	فرمون الجنس	19
4-7-2-1	حامض الليبوتيكويك	20
5-7-2-1	سوبر اوكسيد خارج خلوي	20
6-7-2-1	انزيم البروتييز	21
7-7-2-1	الهايلورنديز	21
8-7-2-1	السايتولايسين	22
9-7-2-1	انزيم اللايبيز وعوامل التلازن	23

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

قائمة المحتويات

1-2-8	تكوين الغشاء الحيوي	23
1-2-9	الاصابات السريرية لبكتريا المكورات المعوية البرازية	25
1-2-9-1	الاصابات غير الفموية المتسببة عن المكورات المعوية البرازية	25
1-2-9-1-1	اخماج القناة البولية	25
1-2-9-1-2	التهاب شغاف القلب الخمجي	25
1-2-9-1-3	تجرثم الدم	26
1-2-9-1-4	اصابات الجهاز العصبي المركزي	26
1-2-9-2	الاصابات الفموية المتسببة عن المكورات المعوية البرازية	27
1-2-9-2-1	المكورات المعوية في الاحياء الطبيعية للتجويف الفمي	27
1-2-9-2-2	التهاب حواف دواعم السن	27
1-2-9-2-3	الاصابة الابتدائية لقناة جذر السن	29
1-2-9-2-4	الاصابة الثانوية لقناة جذر السن	30
1-2-10	طرق تشخيص بكتريا المكورات المعوية البرازية	32
1-2-10-1	التشخيص المعتمد على الصفات المظهرية والزرعية	32
1-2-10-2	التشخيص باستعمال جهاز Vitek2	34
1-2-10-3	التشخيص الجزيئي	35
1-2-10-3-1	طريقة التفاعل التسلسلي لانزيم بلمرة DNA	35
1-2-10-3-1-1	التشخيص الجزيئي لبكتريا المكورات المعوية البرازية باستعمال جين (16Sr RNA)	39
1-2-10-3-1-2	التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا المكورات المعوية البرازية باستعمال تقنية PCR	41
	الفصل الثاني: المواد وطرائق العمل	
2-1	المواد	45
2-1-1	الاجهزة والمعدات المختبرية المستعملة	45
2-1-2	المواد الكيماوية والحيوية	46
2-1-3	الاوساط الزرعية الجاهزة	48
2-1-4	الاوساط الزرعية التركيبية	49
2-1-4-1	وسط (2xyt)	49

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

قائمة المحتويات

2-4-1-2	وسط ازايد الدم الاساس الصلب	49
3-4-1-2	وسط اكار نقيع القلب والدماغ المضاف اليه (5%) دم انسان	49
4-4-1-2	وسط ملح كلوريد الصوديوم	49
5-4-1-2	وسط نقيع القلب والدماغ السائل ذي الرقم الهيدروجيني (9.6)	50
6-4-1-2	وسط اكار – تولريت البوتاسيوم	50
7-4-1-2	اكار نقيع القلب والدماغ المضاف اليه NaN_3 0.04	50
8-4-1-2	وسط اختبار تحمل الحرارة	51
9-4-1-2	وسط تخمر السكريات	51
10-4-1-2	وسط تمئ الجلاتين	51
11-4-1-2	وسط الكازائين الصلب	52
12-4-1-2	وسط ران	52
5-1-2	الكواشف والصبغات	53
1-5-1-2	كاشف الكاتليز	53
6-1-2	الصبغات	53
1-6-1-2	محلول صبغة غرام	53
7-1-2	المحاليل والدوارئ	53
1-7-1-2	محلول خزين تولريت البوتاسيوم	53
2-7-1-2	المحلول الملحي الفسلجي	54
3-7-1-2	المحاليل المستخدمة في استخلاص DNA	54
4-7-1-2	المحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي وتصوير DNA المستخلص	54
5-7-1-2	العدة الجاهزة لاستخلاص DNA	55
8-1-2	المضادات الحيوية	56
2-2	طرائق العمل	56
1-2-2	جمع العينات	56
2-2-2	عزل المكورات المعوية البرازية	57
3-2-2	تشخيص المكورات المعوية البرازية	58
1-3-2-2	تشخيص المستعمرات	58

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

قائمة المحتويات

2-3-2-2	الفحص المجهري	58
3-3-2-2	الفحوصات الكيموحيوية	58
1-3-3-2-2	فحص الكاتاليز	58
2-3-3-2-2	فحص النمو في درجة حرارة (10 و45 مْ)	59
3-3-3-2-2	فحص النمو بوجود (6.5%) كلوريد الصوديوم	59
4-3-3-2-2	فحص قابلية البكتريا على النمو في الرقم الهيدروجيني (PH 9.6)	59
5-3-3-2-2	فحص النمو بتركيز (0.04%) تولريت البوتاسيوم	59
6-3-3-2-2	فحص تخمر السكريات والكليسيرول	60
4-3-2-2	التشخيص المصلي بطريقة لانسفيلد	60
5-3-2-2	تشخيص المكورات المعوية البرازية باستعمال Vitek2	61
1-5-2-2	خطوات تلقيح GP+ Card	61
2-5-3-2-2	التشخيص بقواعد البيانات GP+Card	62
6-3-2-2	التشخيص الجزيئي لبكتريا المكورات المعوية البرازية	63
1-6-3-2-2	عملية استخلاص وقياس تركيز ونقاوة DNA	63
2-6-3-2-2	الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز	65
3-6-3-2-2	تشخيص بكتريا المكورات المعوية البرازية باستعمال تقنية PCR	66
1-3-6-3-2-2	تخفيف البادئ	66
2-3-6-3-2-2	ظروف التفاعل	67
3-3-6-3-2-2	التحري عن نواتج PCR باستعمال الترحيل الكهربائي	67
4-2-2	اوساط حفظ وادامة العزلات البكتيرية	68
1-4-2-2	الحفظ قصير الامد (1-4) اسابيع	68
2-4-2-2	الحفظ متوسط الامد (1-3) شهرا	68
3-4-2-2	الحفظ طويل الامد	68
5-2-2	اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية	69
6-2-2	اختبارات الكشف عن عوامل الضراوة	70
1-6-2-2	الكشف عن انتاج الهيمولايسين	70
2-6-2-2	اختبار تميؤ الجلاتين	71
3-6-2-2	الكشف عن انتاج البروتييز	71

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

قائمة المحتويات

3-6-2-2	الكشف عن انتاج اللايبيز	71
7-2-2	التحري عن الجين المشفر لانتاج شغاف مستضد التهاب القلب في بكتريا المكورات المعوية البرازية	72
1-7-2-2	تخفيف البادئ	72
2-7-2-2	ظروف التفاعل	73
3-7-2-2	الكشف عن نواتج PCR باستعمال الترحيل الكهربائي	73
	الفصل الثالث: النتائج والمناقشة	
1-3	عزل بكتريا المكورات المعوية البرازية وتشخيصها	74
1-1-3	التشخيص الزرعي	74
2-1-3	التشخيص المجهري	77
3-1-3	الفحوصات الكيموحيوية	78
4-1-3	تشخيص بكتريا المكورات المعوية البرازية باستعمال جهاز Vitek2	80
5-1-3	التشخيص المصلي بطريقة لانسفيلد	81
6-1-3	التشخيص الجزيئي لبكتريا المكورات المعوية البرازية	82
1-6-1-3	استخلاص Chromosomal DNA	82
2-6-1-3	التشخيص الجزيئي لبكتريا المكورات المعوية البرازية باستعمال تقنية PCR	84
2-3	حساسية عزلات بكتريا *E. faecalis* للمضادات الحيوية	90
3-3	الكشف عن عوامل الضراوة	99
1-3-3	الكشف عن انتاج الانزيم الحال للبروتين	100
2-3-3	الكشف عن انتاج الانزيم الحال للدهون	102
3-3-3	الكشف عن انتاج الانزيم الحال للدم	103
4-3-3	الكشف عن انتاج الانزيم الحال للهلام	104
4-3	التحري عن وجود الجين المشفر لانتاج مستضد efaA في عزلات بكتريا *E. faecalis*	107
	الاستنتاجات	112
	التوصيات	113
	المصادر العربية	114

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

قـائـمـة الـمـحـتـويـات

	المصادر الانكليزية	115
	الملاحق	A-O

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

قائمة المحتويات

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
2-1	المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية للعزلات	56
2-2	تتابع النيوكليوتيدي للبادئ المستخدم للكشف عن جين 16 S Ribosomal RNA	66
3-2	ظروف تفاعل الPCR لبوادئ جيني e.f F, e.f R	66
4-2	اقطار مناطق التثبيط للمضادات الحيوية بالمليلتر	69
5-2	تسلسل البوادئ المستعملة للبحث الجين المشفر لانتاج efaA	71
6-2	ظروف تفاعل الـ PCR لبوادئ جيني efaA F, efaA R	72
1-3	نتائج العزل الاولي لبكتريا المكورات البرازية المعتمدة على التشخيص الزرعي	76
2-3	الاختبارات التشخيصية والكيموحيوية للعزلات المحلية لبكتريا *E. faecalis*	80
3-3	الاختلافات في اعداد عزلات بكتريا *E. faecalis* عند تشخيصها بالطرائق الزرعية والطرائق الكيموحيوية والتشخيص بنظام Vitek2 والتشخيص الجزيئي	85
4-3	اعداد ونسب عزلات المكورات المعوية البرازية المعزولة من اصابات جذور الأسنان وفقا لنتائج التشخيص الجزيئي	86
5-3	اعداد بكتريا المكورات المعوية البرازية المقاومة للمضادات الحيوية والنسبة المئوية للمقاومة	98
6-3	بعض عوامل الضراوة لبكتريا *E. faecalis* (32) عزلة	100

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

قائمة المحتويات

قائمة الاشكال

رقم الصورة	العنوان	رقم الصفحة
1-1	الخارطة الجينية لبكتريا المكورات المعوية البرازية	10
2-1	اساسيات تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)	39
1-3	نمو بكتريا *E. faecalis* على وسط Pfizer selective enterococci .	77
2-3	صورة مجهرية لبكتريا المكورت المعوية في مسحة من الوسط الزرعي Pfizer selective enterococcus مصبوغة بصبغة غرام	77
3-3	الترحيل الكهربائي للـ DNA المستخلص من بكتريا *E. faecalis* لفحص النقاوة والتركيز	84
4-3	الترحيل الكهربائي لنواتج التشخيص الجزيئي بالـ PCR في هلام الاكاروز تركيز 2%	90
5-3	النسب المئوية لمقاومة عزلات *E. faecalis* للمضادات الحيوية المختبرية	99
6-3	النسب المئوية لعوامل الضراوة لعزلات *E.faecalis*	107
7-3	الترحيل الكهربائي لنواتج التحري عن جين efaA في بكتريا *E. faecalis* باستخدام الـ PCR في هلام الاكاروز 2%	112

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المقدمة واستعراض المراجع

Introduction and Literature Review

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

1-المقدمة واستعراض المراجع Introduction & Literature Review

1-1 المقدمة Introduction

تتواجد المكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* كنبيت طبيعي في امعاء الانسان والحيوان، فضلاً عن وجودها في الجهاز التناسلي الانثوي وفي تجويف الفم واحياناً في الجهاز التنفسي، كما توجد في التربة والمياه (Hayes *et al.*, 2003).

ازدادت الاهمية السريرية لهذا النوع من البكتريا خلال عقد التسعينيات بسبب تنوع الاخماج التي تسببها، اذ وجد انها المسؤولة عن حوالي (90%) من الاصابات المتسببة عن المكورات المعوية التي تصيب الانسان، وان امراضيتها مرتبطة بقدرتها على انتاج العديد من عوامل الضراوة والتي تشمل السايتولايسين والإنزيم الحال للدم وفرمون الجنس وعوامل الالتصاق واللايبيز والبروتييز والبكتريوسين وغيرها، فضلاً عن مقاومتها العالية والمتعددة للمضادات الحيوية والمطهرات مما جعلها واحدة من الممرضات الرئيسية المسببة للاخماج المكتسبة بالمستشفيات (Treitman *et al.*, 2005; De-Marques and Suzart , 2004) .

عرفت بكتريا المكورات المعوية البرازية بأهميتها في طب الاسنان بسبب ارتباطها بإصابات قنوات جذور الاسنان الابتدائية، والثانوية (فشل العلاج) (Kayaoglu & Orstavik , 2004; Love, 2001) وقد عزلت بكتريا *E. faecalis* في احيان قليلة من الاصابات الابتدائية لقنوات الجذور حيث كانت متواجدة جنبا لجنب مع البكتريا اللاهوائية، بالمقابل كانت بكتريا *E. faecalis* اكثر الانواع المعزولة تكراراً من الاصابات الثانوية لقنوات الجذور (Peciuline *et al.*, 2001).

استعملت الطرائق الزرعية التقليدية للتحري عن الكائنات الحية الدقيقة التي تسبب اخماج قنوات جذور الاسنان، وأكدت ان بكتريا المكورات المعوية البرازية هي اكثر الانواع

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الموجودة تكراراً لاسيما في اصابات قنوات جذور الاسنان الثانوية والمتسببة عن فشل العلاج (Molander *et al.*, 1998).

ان استعمال الطرائق الزرعية والطرائق الكيموحيوية التقليدية المستعملة في التشخيص محدود جدا في تشخيص الكائنات المسببة لإصابات جذور الاسنان بسبب صعوبة عزل وتشخيص هذه البكتريا ، لذلك فقد استعملت مؤخرا الطرائق الوراثية الجزيئية للتحري عن الانواع البكتيرية المسببة لاخماج قنوات الجذور و فضلا عن ذلك فأنها تكون قادرة على تشخيص الانواع البكتيرية غير القابلة للعزل بالطرائق الزرعية (Siqueira and Rôças, 2005) وقد اكدت الطرائق الجزيئية ايضا على ان بكتريا *E.faecalis* هي اكثر الانواع الموجودة في اخماج قنوات جذور الاسنان والمتسببة في فشل علاج القنوات الجذرية (Rôças *et al.*, 2004; Siqueira & Rôças, 2005).

نظراً لقابلية بكتريا *E. faecalis* على تحمل الظروف البيئية القاسية لقنوات جذور الاسنان والقدرة على البقاء حية في جذور الاسنان، وكذلك مقاومتها العالية للمضادات الحيوية وطرق العلاج المستعملة لعلاج جذور الاسنان، وقلة الدراسات التي تناولت عزل هذه البكتريا من اصابات جذور الاسنان وتشخيصها بالطرائق الوراثية الجزيئية في العراق، جاءت هذه الدراسة تهدف الى ما يأتي :

1- تشخيص بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من جذور الاسنان للانسان باستخدام تقنية PCR .

2- التحري عن بعض عوامل الضراوة بالطرائق الكيموحيوية، واستعمال تقنية ال PCR في التحري عن الجين المشفر لانتاج (عامل الضراوة) مستضد التهاب شغاف القلب *E. faecalis* endocarditis antigene (efaA) في العزلات.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

1-2 استعراض المراجع Literature Review

1-2-1 إكتشاف جنس المكورات المعوية *Enterococcus*

يعد الباحث Thiercelin اول من اطلق تسمية *Enterococcus* على مكورات موجبة لصبغة كرام في بحث نشر في فرنسا عام1899، وهي مشتقة من الكلمة الفرنسية Enteroque التي تشير إلى المنشأ المعوي لهذه المكورات اذ وصفها بشكل ازواج أو سلاسل قصيرة موجودة في البراز كما عزل الباحث هذه المكورات الجديدة من مرضى التهاب الامعاء (Enteritis)، والتهاب الزائدة الدودية (Appendicitis)، والتهاب السحايا (Meningitis) (Murray,1990; Athanassiadou *et al*., 2008) . وفي السنة نفسها عزل الباحثان MacCallum and Hastings (1899) نوعاً من البكتريا من مرضى التهاب شغاف القلب (Endocarditis) واطلقا عليها اذيفان *Micrococcus zymogenes*، ولكن الدراسات اللاحقة لهما اكدت ان هذه البكتريا هي في الحقيقة مكورات معوية تمتلك فعاليات حالة للدم والجلاتين وقاتلة للفئران البيضاء عند حقنها داخل البريتون (Intraperitoneal)، وتمتلك القدرة على احداث التهاب شغاف القلب في الكلاب، وتتصف بقابليتها على تحمل درجة حرارة (60 م°) ومقاومة الكلوروفورم (Chloroform) وحامض الكاربونيك (Carbonic acid) ومقاومة العديد من المطهرات، واوضحت الدراسات المعتمدة على الصفات الانزيمية بأنها مكورات معوية حالة للدم (Hemolytic Enterococci) (; Murray ,1990; Jett *et al*.,1994; Hancock & Gilmore , 2000).

تظهر بكتريا المكورات المعوية بشكل سلاسل قصيرة او ازواج او خلايا مفردة في عينات البراز، كروية الشكل، موجبة لصبغة غرام، سالبة لفحص الكتاليز لذلك عدت المكورات المعوية من المسبحيات Streptococci (Hardie & Whiley, 1997; Yother *et al*., 2002).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اطلق الباحثان Andrewes and Horder (1906) تسمية *Streptococcus faecalis* على بكتريا Enterococci ، واطلقا عليها الاسم نسبة الى البراز، اذ ظهرت في عينات البراز وتميزت بقدرتها على تخمر سكر المانيتول واللاكتوز وليس لها القدرة على تخمر سكر الرافينوز والارابينوز، وتمكن هذان الباحثان من عزل هذه البكتريا من مريض مصاب بالتهاب شغاف القلب فضلاً عن عزلها من حالات اخماج القناة البولية ، واوضحا في دراستهما ان منشأ هذه البكتريا هو امعاء الإنسان كما اكتشف الباحث Orla-Jensen (1919) نوعاً اخر من المسبحيات واطلق عليه اذيفان *Streptococcus faecium* الذي عزل من البراز ايضاً، ويختلف هذا النوع عن النوع الاول في تفاعلاته التخميرية للسكريات وفي بعض التفاعلات الاخرى ، ثم تتابعت فيما بعد اكتشافات الانواع الاخرى التابعة لهذا النوع من البكتريا (Holt *et al.*,1994; Murray, 1990).

توالت الابحاث في اضافة معلومات مختلفة لإعطاء تسمية جديدة وشاملة تمثلت باسم *Enterococcus*، وعرض الباحث Sherman (1937) مقالة تضمنت ما توصلت اليه الابحاث في تلك المدة عن ظهور اصابات جديدة بهذه البكتريا في الانسان، وبين ان مصطلح *Enterococcus* يشمل انواعاً مختلفة (Facklam & Teixeira , 1997).

2-2-1 التسمية والتصنيف

اقترح الباحث Sherman (1937) نظاماً تصنيفياً قسم فيه المكورات المسبحية Streptococci الى اربعة اقسام هي: Enterococci و Lactate و Viridans و Pyogenic ، اذ تتصف المكورات المعوية بقدرتها على تحمل درجات حرارية ما بين (10-45 م°) والعيش في تركيز (6.5%) من كلوريد الصوديوم وفي وسط قاعدي يصل فيه الرقم الهيدروجيني الى (pH=9.6)، ولها قابلية تحمل درجة حرارة (60 م°) لمدة (30) دقيقة، ولها القدرة على شطر الاسكيولين (Aesculin)، واستعملت هذه الصفات للتمييز ما بين and

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Enterocococci non-Enterococci مثل *Streptococcus equins* and *Streptococcus bovis*، (Murray, 1990; Farrow *et al.*, 1983).

ارتبط تصنيف Sherman مع نظام تصنيف لانسفيلد Lancefield التي استندت في دراستها الى البنية الكيميائية للكربوهيدرات الموجودة في جدار البكتريا (Murray, 1990). اذ صنفت بكتريا المكورات المعوية ضمن مجموعة المكورات المسبحية نوع group D-Streptococci في مجموعة لانسفيلد (Lancefield group) عام (1930) لاحتواء جدارها على المستضد النوعي (Intracellular Glycerol-Teichoic Acid Antigen)، (Rollins & Joseph, 2000 ; Forbes *et al.*, 2002) .

جاء الباحث Kalina (1970) ليقترح فصل المكورات المعوية عن جنس المسبحيات ووضعها في جنس منفصل وهو جنس المكورات المعوية *Enterococcus* معتمداً بذلك على الاختلافات الوراثية المتوفرة من دراسة الاحماض النووية في السنين السابقة، دُعَم اقتراح الباحث Kalina بالدراسات الوراثية المتعددة التي قام بها كل من الباحثين Kilpper- & Schleifer Balz (1984) على المستوى الجيني التي شملت تهجين الاحماض النووية DNA-DNA (DNA-RNA hybridization and hybridization) وتتابع الحامض النووي الرايبوزي 16s ribosomal RNA (16s-rRNA)، وبذلك تم فصل هذه البكتريا عن جنس المسبحيات نهائياً ووضعت في جنس جديد اعتماداً على تلك الدراسات فضلا عن الدراسات التصنيفية الاخرى لمجموعة من الباحثين التي تضمنت الاختبارات الكيموحيوية والمصلية ليصبح عدد الانواع التابعة لهذا الجنس (28) نوعاً (Manero and Blanch, 1999; Facklam *et al.*, 1999; Macfaddin, 2000; Klein, 2003).

لذا يصنف جنس المكورات المعوية الى:

Domin : Bacteria

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Volume : Lowgk Gram Positive Bacteria

Phylum : Firmicutes

Class : Bacilli

Order : Lactobacillales

Family : Enterococcaceae

Genus : *Enterococcus*

Species : *Enterococcus faecalis*

1-2-3 المحتوى الوراثي لبكتريا المكورات المعوية البرازية

تحتوي بكتريا المكورات المعوية البرازية على كروموسوم دائري مفرد طوله 3218031 وتشكل الجينات المتنقلة ربعه. كما تمتلك ثلاثة بلازميدات هي : PTEF1 Plasmid الذي يكون دائريا طوله 66320 ، و PTEF2 Plasmid والذي كان دائريا وطوله 57660، و PTEF2 وهو دائري ايضا وطوله 17963. ووجد عند العودة الى قاعدة البيانات لمعرفة المحتوى الوراثي لبكتريا المكورات المعوية البرازية ان هناك عزلة واحدة من المكورات المعوية يوجد شرح كامل لمحتواها الوراثي في قاعدة البيانات وهي بكتريا المكورات المعوية البرازية سلالة V583 ATCC ويكون محتواها الوراثي (الجينوم) صغير عادة (Paulsen *et al.*, 2003).

يبلغ عدد النيوكليوتيدات في جينوم المكورات المعوية البرازية 3359974، وعدد جينات البروتينات فيه هو 3264 اما عدد جينات RNA فيه فهو 80. وتشكل العناصر الوراثية المتنقلة (mobile genetic elements) ربع المحتوى الوراثي لبكتريا المكورات المعوية البرازية شكل (1-1) والمتضمنة: بلازميدات المقاومة للمضادات الحيوية، و Transposons، ومجموعة كبيرة من الجزر الامراضية (Pathogenisity Island) (Paulsen *et al.*, 2003) .

تعد بكتريا المكورات المعوية من اكثر الانواع البكتيرية الممرضة مقاومة للمضادات الحيوية وهي تمتلك قابلية عالية على اكتساب عوامل المقاومة للمضادات الحيوية، ونشر هذه العوامل الى الانواع البكتيرية الاخرى . لذلك اجريت العديد من الدراسات التي حاولت فهم قدرة هذه

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

البكتريا على الاكتساب السريع للمقاومة للمضادات الحيوية ، وأشارت الدراسات ان السبب الرئيسي في اكتساب بكتريا المكورات المعوية المقاومة لمختلف المضادات الحيوية يعود بشكل اساسية الى العناصر الوراثية المتنقلة (Paulsen *et al.* , 2003 ; Kim *et al.* 2012) .

اكدت العديد من الدراسات ان سلالات المكورات المعوية المرضية التي تكون مقاومة للعديد من المضادات الحيوية تختلف في محتواها الوراثي عن السلالات المتواجدة بشكل تعايشية في الاشخاص الاصحاء، وذلك يؤكد امكانية التغير الوراثي بين سلالات بكتريا المكورات المعوية (Paulsen *et al.*, 2003) .

تقع جينات المقاومة للمضادات الحيوية عادة اما على بلازميدات او على الجينات القافزة Transposons، والجينات القافزة قد تكون اقترانية او غير اقترانية، كما تم تشخيص عدد كبير من الجينات القافزة المسؤولة عن المقاومة المتعددة للمضادات الحياتية مثل :

(Tn`1545, aphA-3, ermAM , tetM, Tn917 and Tn916 (Paulsen *et al.*,2003).

اشارت الدراسات ان وجود عوامل المقاومة للفانكومايسين على الجينات القافزة Transposons يجعل عملية انتقالها من سلالة الى اخرى سهلة وسريعة (Rosato *et al.*,1995) وان اكثر انواع المكورات المعوية المسببة للاخماج في المستشفيات والتي تمتلك قدرة عالية على تحمل الظروف البيئية القاسية هي المكورات المعوية المقاومة للفانكومايسين Vancomycin Resistant Enterococci – (VRE) من النوعين *E. feacalis* and *E. faecium* والتي تحمل جينات المقاومة المكتسبة للفانكومايسين (Wood ford *et al.*, 1998).

وجد Rippered *et al.* (1998) ان الجينات القافزة في المكورات المعوية تكون مسؤولة عن مقاومتها للفانكومايسين إذ عزلت هذه الجينات من بكتريا المكورات المعوية البرازية المقاومة للكلايكوببتيدات من النمط الظاهري Van A، وقد وجد بأنها تحتوي على مجموعة من الجينات

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

التي يطلق عليها جينات *Van A gene* وهي سبعة جينات محمولة على الجين القافز (Tn1546) وقد ظهرت في الآونة الاخيرة سلالات من بكتريا المكورات المعوية تكون مقاومة للخط الاخير للمضادات الحيوية وهو الفانكومايسيين.

ووجد ان سبب استمرار بقاء بكتريا المكورات المعوية البرازية في قناة جذر السن هو كونها شديدة المقاومة للمضادات الحيوية التي تحصل عليها نتيجة حدوث طفرات تلقائية او نتيجة اكتساب جينات المقاومة من كائنات اخرى التي تجعلها مقاومة للعلاج المستعمل عادة في جذور الاسنان (Rocas *et al.*, 2000).

اما البلازميدات فهي عبارة عن عناصر وراثية تقع داخل الخلية البكتيرية خارج الكروموسوم وتتكاثر بشكل مستقلة عنه كما قد توجد في بعض الاحيان مندمجة مع الكروموسوم وقد تكون البلازميدات اقترانية او متحركة (Conjugative or Mobilized) اذ تكون لها القدرة على الانتقال بنفسها لاحتوائها على جينات الانتقال او قد تكون البلازميدات غير انتقالية (Non – Cojugative)، اذ يتم تحركها بين الخلايا المقترنة بواسطة بلازميدات اقترانية أخرى، ان عمليات انتقال البلازميدات في المكورات المعوية تحدث بطرائق واليات متعددة اكثرها شيوعا هو الاقتران البكتيري الذي يتوسطه انتاج مادة فرمون الجنس (Sex-phermones) والتي تم اكتشافها اولا في المكورات المعوية البرازية (Dale & Park , 2004).

اظهرت دراسات الترحيل الكهربائي اهمية المحتوى الوراثي البلازميدي للبكتريا ومدى علاقته بانتشار الاوبئة وكذلك انتقال المقاومة للمضادات الحياتية وفي عدد من الدراسات التي اجريت على بعض السلالات من المكورات المعوية، اذ تم عزل العديد من البلازميدات في بكتريا *E. faecalis* كانت المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحياتية وإنتاج البكتريوسين Bacteriocin والهيمولايسين Hemolysin، وقد كانت عملية تحليل البلازميدات Plasmid profile من اول

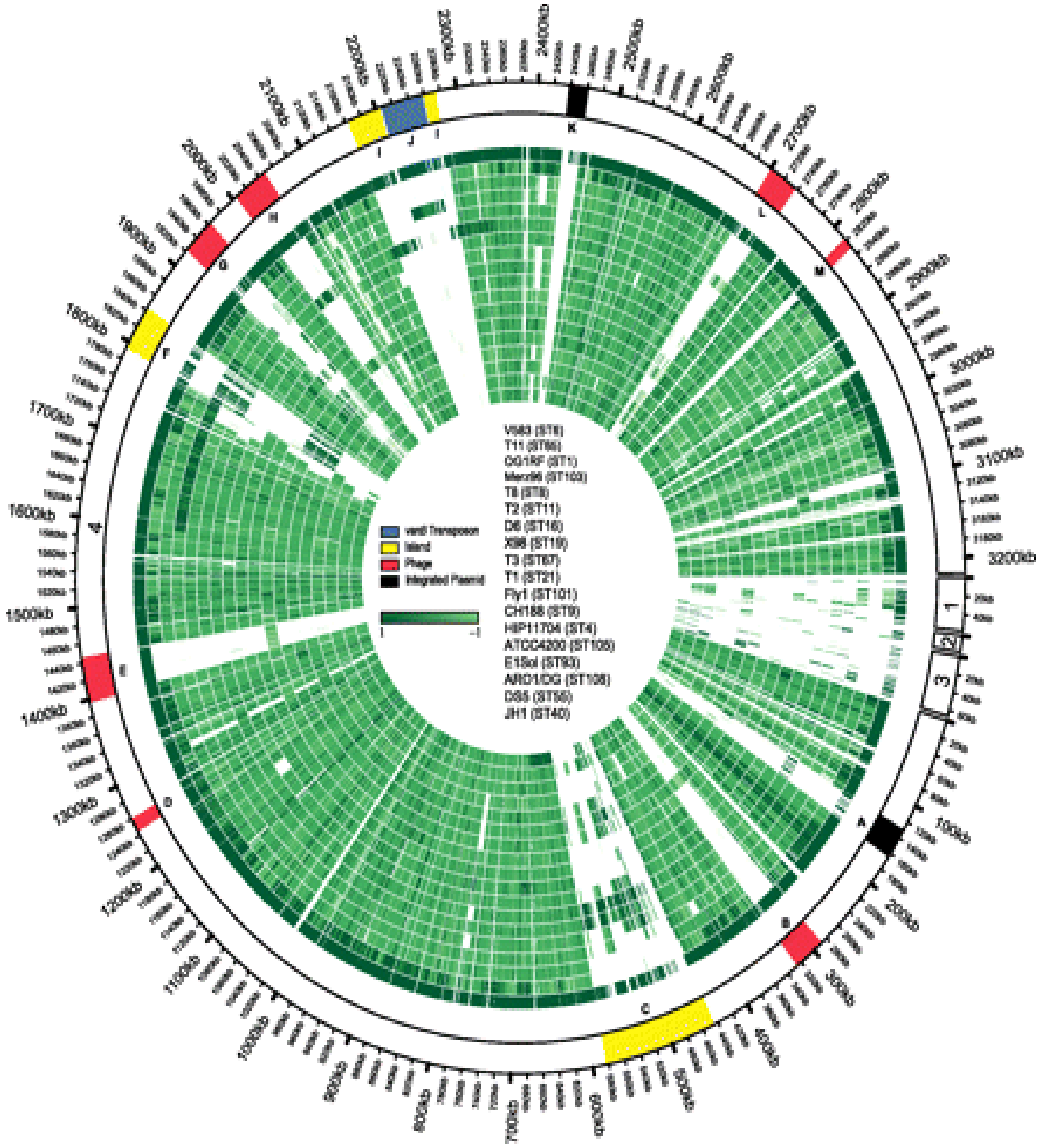
المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

التقنيات المستعملة في تشخيص المكورات المعوية على المستوى الجزيئي، وقد تم عزل العديد من البلازميدات في بكتريا المكورات المعوية البرازية كانت مسؤولة عن اكساب البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية وإنتاج عوامل الضراوة للبكتريا (Clark *et al.*, 1993; Woodford *et al.*,1994; Dale & Park , 2004).

اشارت دراسات متعددة الى عزل البلازميدات بشكل شائعة من البكتريا المهمة من الناحية الطبية والبكتريا المعزولة من الغذاء، كما وجد ان اغلب عزلات بكتريا المكورات المعوية المعزولة من اصابات جذور الاسنان كانت تحتوي على 1-4 بلازميدات، حيث ان هذه البلازميدات زادت من قابلية هذه البكتريا على تحمل الظروف البيئية القاسية في جذور الأسنان مثل ظروف قلة توفر المواد الغذائية كما جعلت البكتريا اكثر قدرة على مقاومة المضادات لحيوية المستخدمة في العلاج (Sedgley *et al.*,2005; Dahlen *et al.*, 2012).

كما اثبتت الدراسات الحديثة ان بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من اصابات الفم في الغالب تحتوي على البلازميدات والتي تجعل البكتريا اكثر قدرة على احداث الإصابة، إذ وجد في احد الدراسات ان 37% من بكتريا المكورات المعوية المعزولة من اصابات الفم كانت تحتوي على 1-4 بلازميدا (Dahlen *et al.*, 2012).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



شكل (1-1) الخارطة الجينية لبكتريا المكورات المعوية البرازية

(http: // blast .ncbi.nlm.nih.gov / Blast.cgi)

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

1-2-4 مصادر تواجد المكورات المعوية البرازية

توجد المكورات المعوية البرازية في الماء ومياه المجاري اذ تعد هذه البكتريا من ادلة التلوث البرازي للماء بسبب تواجدها بأعداد كبيرة في البراز ومقاومتها للظروف البيئية وقابليتها على البقاء حية لمدة طويلة (Iversen *et al.*, 2002 ;Rollins & Joseph, 2000). ويمكن عزلها من التربة والنبات فضلا عن امكانية عزلها من اللحوم بأنواعها و منتجات الالبان والحليب الخام (Hickey *et al.*, 2003). كما تتواجد ايضاً في امعاء الحيوانات كاللبائن والطيور والحشرات (Hayes *et al.*, 2003). وتعد جزءاً من النبيت الطبيعي (Normal Flora)، للانسان اذ توجد بشكل تعايشية (Commensal) في تجويف الفم (Oral cavity) والجزء المعوي من القناة الهضمية والقناة البولية التناسلية الانثوية (Female genitourinary tract) (Tomita and Ike,2004 ;De- Marques & Suzart, 2004 ;Dupre *et al.*,2003).

1-2-5 امراضية بكتريا المكورات المعوية البرازية

تعد بكتريا *E. faecalis* من الممرضات الانتهازية المتسببة للاخماج المكتسبة في المستشفيات (Nosocomial infections) (Baron *et al.*,1994)، إذ تصيب هذه البكتريا المرضى الراقدين في المستشفيات لمدة طويلة والمرضى الذين يعانون من امراض صحية خطيرة ومزمنة، والمرضى الذين يتلقون العلاج الطويل بالمضادات الحيوية مثل مرضى وحدة العناية المركزة، والمرضى الذين يعانون من ضعف المناعة (Immunocompromised patients) ولاسيما المرضى الذين لديهم عجز كلوي، والمصابين بالأورام السرطانية، والمرضى الذين اجريت لهم عمليات زرع الاعضاء (الكبد والطحال) (Mundy *et al.*, 2000). وسجلت اصابات اخرى بهذه البكتريا لكن بنسبة اقل كما في اصابات القناة التنفسية، والجهاز العصبي

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المركزي، والتهابات القناة الصفراوية فضلا عن عزلها من تقرحات الاقدام عند مرضى السكري (Diabetic foot ulcers) (Waar *et al.*, 2002).

اشار الباحثون الى ان السبب الرئيس في قابلية المكورات المعوية البرازية على احداث الاخماج المكتسبة في المستشفيات هو قدرتها على مقاومة التراكيز العالية للمضادات الحيوية وكذلك قدرتها على العيش في بيئة المستشفيات فضلا عن امتلاكها العديد من عوامل الضراوة (Iversen *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2003; De-Marques & Suzart, 2004).

وأكد الباحثون على دور هذه البكتريا في احداث التهابات مختلفة في الجسم ومن اهمها التهاب المجرى البولي والتهاب شغاف القلب والتجرثم الدموي وإصابات الجروح وتلوثها بعد العمليات، والتقيحات الناتجة عن الجروح الحاصلة في منطقة الحوض ومنطقة البطن (Treitman *et al.*,2005 ;Udo *et al.*,2003 ;Qin *et al.*,2000). وتعد هذه البكتريا هي المسؤولة عن التهاب السحايا في الاطفال حديثي الولادة (Neonata sepsis)، والإصابات القيحية في الفم اذ تؤدي دوراً مهماً في احداث التهابات القناة الجذرية للأسنان ولا سيما الالتهابات المزمنة للمنطقة المحيطة بقمم جذور الاسنان (De-Marques & Suzar ,2004; Kayaoglu & Qrstavik, 2004).

1-2-6 مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic resistance

اثارت بكتريا المكورات المعوية ولاسيما النوعين *E. faecalis* و *E. faecium* اهتمام العديد من الباحثين والأطباء وذلك لزيادة مقاومتها في السنين الاخيرة لمدى واسع من المضادات الحيوية (ذات التأثير القاتل او المثبط) وهذا التطور والانتشار ناتج عن اكتساب المقاومة اتجاه المضادات التي تستعمل بشكل متزايد وعشوائي سواء في علاج البشر او الحيوانات (Murray,1990; Jeliaszewicz *et al.*, 2000). وكذلك لزيادة نسبة الاصابة بها سنوياً

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ولاسيما بين مرضى المستشفيات الراقدين لفترات طويلة الذين يتلقون العلاج بأنواع مختلفة من المضادات الحيوية، وتؤدي احياناً زيادة نسبة السلالات المقاومة لأعداد كبيرة من المضادات الى حدوث اصابات مميتة (Dupre *et al.*, 2003).

تمتلك المكورات المعوية نوعين من المقاومة للمضادات الحيوية وهي:

المقاومة الطبيعية (الذاتية) Intrinsic resistance : وتعرف بالمقاومة للمستويات الواطئة (Low level resistance) وهي عبارة عن صفة موروثة الاصل ومشفرة كروموسومياً لمجموعة المضادات الحيوية، وهي غير منتقلة مثل مقاومة البكتريا لمضادات البيتا لاكتاميز Synthetic Penicillinase-resistant- and Cephalosporins and Monobactams) Lincosamids and Co-trimoxazole (nafcillin & oxacillin) and penicillins (Lincomycin, Clindamycin) ومضادات Aminoglycosides فضلاً عن حساسيتها المتوسطة او مقاومتها لمضادات Fluoroquinolones (Brooks *et al.*, 2001; Donskey *et al.*,2003).

المقاومة المكتسبة Acquired Resistance: تعرف بالمقاومة للمستويات العالية (High level risistance) وهي عبارة عن اكتساب جينات تشفر لمقاومة العديد من المضادات الحيوية نتيجة حدوث طفرة في الدنا DNA الموجود او لاكتساب DNA جديد او بلازميد جديد او جينات قافزة (Transposon)، وهي قابلة للانتقال من بكتريا الى خرى وتشمل مضادات Erythromycin, Rifampin, Chloramphenicol، Tetracycline، Vancomycin Lincosamids, Fluoroquinolones، Penicillinase-susceptible-penicillin (Johnston and Jaykus, 2004).

7-2-1 عوامل الضراوة للمكورات المعوية البرازية Virulence factors

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

هناك عدد من العوامل يجب توفرها في البكتريا كي تكون ممرضة فهي يجب ان تكون قادرة على الالتصاق بأنسجة العائل، واختراقها، والنمو فيها، وغزوها وهذه العوامل تدعى بعوامل الضراوة، تمتلك بكتريا المكورات المعوية البرازية عدد من عوامل الضراوة والتي كان لها دور في تحسين القدرة على احداث الاصابة بطرائق مختلفة، اذ انها تسهم في التصاق البكتريا بأنسجة المضيف، واختراقها، والاستيطان فيها، والالتصاق، كما تسهم في تحوير الاستجابة المناعية للمضيف (Armstrong and Cohe, 1999) . جعلت هذه العوامل من بكتريا *E. faecalis* البكتريا السائدة لمجموعة المكورات المعوية في احداث الاصابات مقارنة ببقية انواع المجموعة (Drahovska *et al.*, 2004 ;Elsuer *et al.*, 2000).

ومن هذه العوامل:

1-7-2-1 مواد التجمع (AS) Aggregation substances

هي بروتينات تقع على سطح الخلية تتكون استجابة للبلازميدات الحساسة لفرمون الجنس وتسهل عمليه الاقتران اذ تحفز عملية التقابل والالتصاق بين خلايا البكتريا الواهبة والمستلمة، ويعمل هذا البروتين على تثبيط نمو وتحليل مدى واسع من البكتريا السالبة والموجبة لملون كرام من ضمنها بكتريا *Enterococci*، وتظهر عوامل التجمع في المجهر الالكتروني على شكل تراكيب تشبه الشعرة منغرسة في الغشاء الخلوي ومرتبطة ببروتينات الجدار الخلوي للبكتريا و تتوزع على كل سطح الخلية (Jett *et al.*,1994) .

بينت الدراسات ان مواد التجمع تلاحظ في العزلات المرضية ونادراً ما تلاحظ في العزلات المتعايشة، والعزلات المعزولة من براز الاشخاص الاصحاء (Rakita *et al.*, 1999).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

تغطي مواد التجمع سطح الخلية البكتيرية الواهبة وتحفزها على الالتصاق بالخلية البكتيرية المستلمة بكفاءة لتسهيل انتقال البلازميدات التي تحمل عوامل الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية (Dupre *et al*., 2003 ;Wells *et al*., 2000).

2-7-2-1 اللواصق السطحية Surface adhesions

1-2-7-2-1 الكربوهيدرات السطحية Surface carbohydrate

تعد دراسة الباحثين Guzman *et al.* (1989) اولى الدراسات التي دلت على وجود نوعين من اللواصق الكربوهيدراتية الموجودة على سطح خلية بكتريا *E. faecalis* هما كما يأتي:
النوع الاول هي اللواصق الحاوية على D-mannose-D-glucose التي تساعد على التصاق هذه البكتريا بالخلايا الطلائية للقناة البولية والخلايا الكلوية الجنينية البشرية ، والنوع الثاني اللواصق الحاوية على D-galactose التي تعمل على التصاق البكتريا بالخلايا القلبية والمواد البينية خارج خلوية، واكدت العديد من الدراسات على وجود هذه المواد الكربوهيدراتية ودورها في احداث التهابات القناة البولية، والتهاب شغاف القلب، والتهاب قنوات جذور الاسنان (Jett *et al*.,1994; Eaton & gasson ,2001 ;Shiono & Ike,1999).

2-2-7-2-1 البروتين السطحي للمكورات المعوية

Enterococcal surface protein (Esp)

وهو بروتين سطحي خارج خلوي ذي وزن جزيئي عال يشفر له جين محمول على كروموسوم خلية بكتريا المكورات المعوية ، وعزل هذا البروتين من الانواع البكترية المسببة لالتهاب شغاف القلب والتجرثم الدموي ونادراً ما يتواجد في الانواع المعزولة من براز اشخاص اصحاء اذ لا تتجاوز نسبة (3 %) (Archimbaud *et al*., 2002, Mundy *et al*., 2000). ويتميز هذا البروتين بدوره الكبير في عملية الالتصاق وتكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) على السطوح غير الحية (Tendolkar *et al*., 2005)، وقد لوحظ تكوين الغشاء الحيوي بوساطة بكتريا المكورات

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المعوية البرازية على الانسجة المحيطة بالأسنان المصابة بهذه البكتريا، وهذا ما جعل تلك البكتريا قادرة على مقاومة التأثير القاتل لمادة هيدروكسيد الصوديوم المستخدم كعلاج لإصابات جذور الاسنان (Distel *et al.*, 2002).

1-2-7-2-3 مستضد التهاب شغاف القلب لبكتريا المكورات المعوية البرازية

***E. faecalis endocarditis* antigen (efaA)**

يعد مستضد التهاب شغاف القلب لبكتريا المكورات المعوية البرازية من المستضدات السائدة لبكتريا المكورات المعوية البرازية واكتشف هذا المستضد لأول مرة في مصل شخص مصاب بالتهاب شغاف القلب ببكتريا المكورات المعوية البرازية (Lowe *et al.*, 1995).

وقد استعمل مصل الشخص ذلك المصاب بالتهاب شغاف القلب ببكتريا المكورات المعوية البرازية للكشف عن الجين الذي يشفر لإنتاج هذا المستضد الذي يكون محمولا على المادة الوراثية الكروموسومية للبكتريا(Lowe *et al.*, 1995).

وتم تحليل التسلسل النيوكليوتيدي للجين المشفر للمستضد عن طريق كلونة بكتريا *Escherichia coli* بواسطة العاثي Lambda Zapill حيث وجد ان طول الجين يبلغ 924 bp. اشارت الدراسات التي اجريت على الحيوانات الى اهمية وجود الجين المشفر لإنتاج مستضد التهاب شغاف القلب في امراضية البكتريا إذ وجد ان البكتريا الحاملة لهذا الجين كانت اطول عمرا و اكثر قابلية على البقاء حية مقارنة مع البكتريا التي لا تحمل الجين (Singh *et al.*, 1998).

ومستضد التهاب شغاف القلب لبكتريا المكورات المعوية البرازية يكون عبارة عن بروتين يبلغ وزنه الجزيئي حوالي KD37 ويكون تسلسل الاحماض الامينية له تماثل بنسبة 55-60 % لمجموعة من بروتينات الـ Streptococcal وهي:

FimA from *Streptococcus parasanguis* , SsaB from *Streptococcus sanguis* , ScaA from *Streptococcus gordonii*, and PsaA from *Streptococcus*

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

pneumonia والتي تدعى باللواصق adhesions، كما وجد مؤخرا بأنها تؤدي دورا هاما في نقل المنغنيز (MN^{+})، ويكون انتاج هذا البروتين شائعاً جداً بين عزلات بكتريا المكورات المعوية البرازية، إذ اكدت الدراسات الجزيئية التي تحرت عن وجود الجين المشفر لإنتاج هذا البروتين، وجود ذلك الجين في جميع العزلات الطبية المعزولة من الدم، والإدرار وبيئة المستشفيات، وفي اغلب العزلات المعزولة من الاغذية مثل الحليب، والجبن، واللحم حيث كانت موجودة بنسبة (89%) (Eaton & Gasson , 2001).

وأكد Creti *et al.* (2004) في دراسته التي اجراها على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر مختلفة ان الجين المشفر لإنتاج مستضد التهاب شغاف القلب لبكتريا المكورات المعوية البرازية كان موجودا في جميع العزلات المرضية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة.

اشارت العديد من الدراسات ان هذا المستضد يؤدي دورا هاما في امراضية بكتريا المكورات المعوية البرازية، حيث يزيد من قدرة البكتريا على اصابة شغاف القلب وقنوات جذور الاسنان اذ يعد هذا المستضد من عوامل الالتصاق السطحية في البكتريا الذي يسهل التصاق البكتريا مع الكولاجين والمواد الخارج خلوية، ويسهل عملية تكوين الاغشية الحية (Biofilm) في البكتريا والذي يجعلها اكثر قدرة على مقاومة الظروف البيئية القاسية (Creti *et al.*, 2004; Sedgley *et al.*, 2005; Stuart *et al.*,2006).

اشارت العديد من الدراسات ان جميع عزلات بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من الاشخاص المصابين بأمراض الفم المختلفة مثل التهاب دواعم السن، والتهاب اللثة والالتهابات المصاحبة بتقرحات مزمنة، والتهاب جذور الاسنان بنوعيها (الاصابات الابتدائية والاصابات

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الثانوية) كانت لها القدرة على انتاج بروتين مستضد التهاب شغاف القلب، اذ وجد ان الجين المشفر لإنتاج هذا البروتين كان موجوداً في جميع العزلات البكتيرية (Salah *et al.*, 2008; Preethee *et al.*, 2012).

بينما اشارت احدى الدراسات المحلية التي اجريت على بكتريا المكورات المعوية البرازية معزولة من مصادر سريرية مختلفة ان الجين المشفر لإنتاج المستضد لم يكن موجودا في جميع العزلات، حيث وجدت ان الجين المشفر لإنتاج المستضد كان موجود في خمس عزلات من اصل سبعة أي بنسبة (72.4%) في بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة ثلاث عزلات معزولة من الادرار و عزلتان معزولة من الحروق (Mahdi *et al.*, 2012).

1-2-7-2-4 اللاصق السطحي المرتبط بالكولاجين

Adhesion to collagen of *E. faecalis* (Ace)

تمتلك بكتريا المكورات المعوية البرازية مكونات سطحية تتعرف من خلالها الى المواد الخارج خلوية (Extra - Cellular- Matrixes) (ECM) التي تلتصق بها لبدء الاصابة وتوجد المواد الخارج خلوية في انسجة الكائنات حقيقية النواة وتقع تحت الخلايا الطلائية والبطانية وتتألف من جزيئات كبيرة ومتنوعة تتضمن بروتينات سكرية التركيب (Glycoproteins) (الكولاجين – لامينين– فايبرونكتين– الفايبرونوجين – اللاكتوفيرون) و (Proteoglycan) (Tomita & Ike,2004 ;Nallapareddy *et al.*, 2000).

اشار الباحثون الى ان طبيعة هذه المكونات السطحية التي تمتلكها بكتريا المكورات المعوية البرازية تكون عبارة عن مواد بروتينية، وان معظم العزلات تحتوي على الجين الذي يشفر لإنتاج تلك المكونات التي تساعد البكتريا على الارتباط ببروتينات المواد الخارج خلوية نوع Collagen type (1)، كما اثبتت التجارب قدرة هذا البروتين على الارتباط بـ

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

(Laminin ,Collagen type (IV)، وانه يعود الى عائلة بروتينية لها القدرة على التداخل مع بروتينات انسجة المضيف (Sillanpää *et al*., 2004; Nallapareddy *et al*.,2000).

3-7-2-1 فرمون الجنس Sex pheromone

هو عبارة عن ببتيد صغير كاره للماء مكون من (7-8) احماض امينية ويشفر له من قبل جين محمول على الكرموسوم (Jett *et al*., 1994). تنتج بكتريا *E. faecalis* عدة فرمونات في ان واحد وقد اكد الباحثون على ان بعض هذه الفرمونات لها دور في عملية الجذب الكيماوي (Chemotactic attraction) للعزلات وبذلك تساعد في زيادة الاستجابة الالتهابية (Wirth, 2000; Johnson,1994).

يؤدي فرمون الجنس دوراً مهماً في تحفيز عملية الاقتران ومضاعفة حدوثها عدة مرات عما هو عليه الاقتران الاعتيادي، اذ يفرز فرمون الجنس من قبل العزلة المستلمة الى الوسط الذي يحفز العزلة الواهبة على انتاج مواد الالتصاق (AS) الذي يسهل حدوث الالتقاء بين العزلة الواهبة والمستلمة مما يسهل عملية اقتران وانتقال البلازميد، وبعد الانتهاء من انتقال البلازميد تنفصل الخليتان لتعود خلية مستلمة اخرى غير حاوية على بلازميد بإفراز فرمون الجنس لتحفز انتقال البلازميد من الخلية الواهبة اليها (Shiono & Ike,1999; Kayaoglu & Qrstavik, 2004).

اشارت الابحاث الى ان وجود نظام فرمون الجنس وعوامل الالتصاق يساعد في تسهيل عملية تبادل وانتقال البلازميدات التي تحمل جينات صفة الضراوة مثل انتاج Cytolysin او جينات مقاومة للمضادات الحيوية اثناء عملية الاقتران (Waar, 2004).

4-7-2-1 حامض الليبوتيكويك Lipoteichoic Acid (LTA)

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ترتبط بكتريا المكورات المعوية بمستضد يعرف بحامض الليبوتيكويك وهو خاص بمجموعة D من مجاميع لانسفيلد، وأشار الباحثون ومنهم دراسة Hogg *et al.* (1997) الى اهمية هذا المستضد اذ يعمل على مساعدة البكتريا في الالتصاق بالخلايا حقيقة النواة مثل الصفائح الدموية (Plateletes) وكريات الدم الحمر والخلايا اللمفاوية والخلايا الطلائية وكريات الدم البيض متعددة الانوية (PMNs) وتظهر اهمية هذا المستضد عن طريق مشاركته في تغيير الاستجابة المناعية للمضيف وتوسطه في التصاق البكتريا بخلايا المضيف (Hancock & Gilmore, 2000). ومن خصائص حامض اللايبوتيكوك انه يحفز البكتريا على تكوين مستعمرات من البكتريا على سطوح الاسنان، ووجد ان لهذا الحامض دور مهم في زيادة قابلية بكتريا المكورات المعوية البرازية على الاصابة بالعديد من الامراض منها امراض الفم، والإصابات القيحية للثة، كما يؤدي حامض اللايبوتيكوك دوراً مهماً في منع تحلل جدار الخلايا بالأجسام المضادة المحفزة بالجسم ، ويزيد من ضراوة البكتريا اذ يساعد في عملية التصاق الخلية الواهبة مع الخلية المستلمة والفارزة لمادة التجمع وبذلك يزيد من قابلية الخلايا على التجمع وانتقال البلازميدات (Kayaoglu & Qrstavik , 2004).

1-2-7-5 سوبر اوكسيد خارج الخلوي Extracellular superoxide

اكتشف الباحثون في السنوات الاخيرة ان لبكتريا المكورات المعوية البرازية القابلية على انتاج السوبر اوكسيد خارج خلوي، واكدت الابحاث على ان كل سلالات نوع *E. faecalis* وعدد قليل فقط من سلالات النوع *E. faecium* تمتلك هذه الصفة وان نسبة وجود هذا العامل في الانواع المعزولة من اصابات تجرثم الدم تزيد عن (60%) مقارنة بالأنواع المتعايشة في الامعاء والمعزولة من الخروج (Huycke *et al.*, 1998).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ويعد هذا العامل من العوامل التي تزيد من امراضية هذه البكتريا اذ لوحظ ان السلالات المنتجة له تتكيف فسيولوجياً لاستخدام المصادر الغذائية المحدودة في البيئة المعوية مما ادى الى النمو المفرط فيها، كما انه يؤدي الى تلف الاغشية مما يساعد هذه البكتريا على الانتقال عبر الحواجز الطلائية الضعيفة الى باقي اجهزة الجسم (Hancock & Gilmore, 2000) .

واشارت الدراسات الى ان هذا العامل له دور في هدم وتحطيم الجزيئات الحيوية بالخلية مثل البروتينات واللبيدات والأحماض النووية وهذا يسبب تلفا للأنسجة في موقع الاصابة وبذلك فأنها تؤدي الى تلف اللثة وفقدان في العظم في الاصابات المزمنة للأنسجة المحيطة بقمة السن (Kayaoglu & Qrstavik , 2004).

1-2-7-6 انزيم البروتييز Protease

هو من الانزيمات الخارج خلوية المحللة للبروتينات (Extracellular proteolytic enzyme)، وينتمي الى البروتييزات المعدنية Zn-metalloprotease، وأشار الباحثون الى دور هذا الانزيم في امراضية بكتريا المكورات المعوية البرازية لقدرته على تحليل العديد من المواد بضمنها (الكازائين، الجيلاتين، الهيموغلوبين، الكولاجين، الفايبروجين، الانسولين) والببتيدات المشابهة لفرمون الجنس وكذلك يؤدي دورا هاما في اصابات قنوات جذور الاسنان والتهاب اللثة (Waters *et al.*, 2003 ; Dupont *et al.*,1998). وأكدت الدراسات الحديثة على الدور الكبير الذي يساهم به هذا الانزيم في حث البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) على السطوح غير الحية (Waar, 2004 ;Kristich *et al.*, 2004).

1-2-7-7 الهايلورنديز Hyaluronidase

يعد هذا الانزيم من الانزيمات التي تعمل على Hyaluronic acid وتكمن فعاليته في تحطيم الانسجة في حالة اصابتها بالبكتريا المنتجة له، اذ يعمل على ازالة القطبية من جزيئة

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

عديد السكرايد بالانسجة الرابطة مما يزيد من القوة الغازية للبكتريا في اختراق النسيج (Kostyukova *et al.*, 1995)، وأشار الباحثون الى امتلاك بكتريا *E. faecalis* المعزولة من منطقة قناة جذر الاسنان فضلا عن المنطقة المحيطة بالقمة الجذرية في الاسنان على هذا الانزيم ، وقد يعزى السبب في تواجدها في تلك الاصابات الى امتلاكها هذا الانزيم الذي يعد عامل انتشار اذ يسهل انتشار البكتريا مع الذيفانوم المنتجة منها في انسجة المضيف (Sunde *et al.*, 2002; Abou-Rass & Bogen, 1998) .

1-2-7-8 السايتولايسين Cytolysin

عبارة عن ذيفان بكتيري غالبا يتم لتشفير لهذا الذيفان عن طريق البلازميد، ولكن قد يتم التشفير له احيانا عن طريق جين محمول على الكروموسوم (Ike & Clewell, 1992).

يعد السايتولايسين احد عوامل الضراوة الرئيسية في بكتريا *E.faecalis* اذ يعمل على تحليل غشاء الخلية الهدف والتي تتضمن خلايا بكتيرية وكريات الدم الحمر Erethrocyte وخلايا اللبائن الاخرى (Coburn *et al.*, 2004; Huycke *et al.*, 1998)، وقد اكدت الابحاث على وجود علاقة بين عوامل الامراضية لبكتريا المكورات المعوية البرازية والبلازميدات الحاملة لصفات الضراوة اذ وجد ان اكثر من (90%) من عزلات بكتريا *E. faecalis* التي تكون قادرة على انتاج السايتولايسين تمتلك البلازميد الاقتراني PAD_1 الحامل للجينات المشفرة لإنتاج Bacterocin (Cyl, Cytolysin) ، B-hemolysin، والاستجابة لعامل فرمون الجنس، في حين قد يحمل بعضها الاخر الصفة على الكروموسوم (Shiono & Ike,1999; Tomita & Ike, 2004)

وجد ان هذا الذيفان يزيد من شدة الاصابة في قناة جذر السن حيث تتوفر الظروف اللاهوائية (Distal *et al.*, 2002). إذ ان هناك بعض الفرضيات حول انتاج السايتولايسين التي تلاحظ ان الجينات التركيبية المشفرة لبناء وحدات السايتولايسين تنظم استجابة الى الظروف البيئية

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

كالاوكسجين اذ تنشط هذه البكتريا في انتاج الذيفان في الظروف اللاهوائية، حيث تزداد كمية السايتولايسين المنتجة في الظروف اللاهوائية (Day *et al.*, 2003) .

1-2-7-9 انزيم اللايبيز

Lipase enzyme

اكدت الدراسات الحديثة ان بعض سلالات بكتريا المكورات المعوية البرازية تكون لها القابلية على انتاج الانزيم المحلل للدهون (Lipase) ويسهم هذا العامل في زيادة ضراوة وامراضية هذه البكتريا اذ عزلت العديد من السلالات المرضية التي تكون لها القدرة على انتاج الانزيم (Elnser *et al.*, 2000).

يعد انزيم اللايبيز من الانزيمات الخارج خلوية التي تعمل على هضم الدهون الخلوية للمضيف للحصول على المواد الغذائية التي تحتاجها البكتريا في نموها مما يسبب لزوجة في انسجة المضيف والتصاقها مع الخلايا المجاورة، وأشار الباحثون الى دور هذا الانزيم في حث البكتريا على الالتصاق بالجزيئات السطحية لأنسجة المضيف المتحطمة (Furumura *et al.*, 2006) .

1-2-8 تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

تعد بكتريا المكورات المعوية البرازية من الممرضات الانتهازية التي عرفت بقابليتها على تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) على السطوح غير الحية (Abiotic surface) اما نتيجة لامتلاكها بعض عوامل الضراوة التي تساعد على الالتصاق بتلك السطوح او نتيجة تحسسها للظروف البيئية المحيطة بها، والغشاء الحيوي عبارة عن تجمعات بكتيرية لنوع واحد او عدة انواع تكون ملتصقة على السطح ومغطاة بمواد خارج خلوية متماثلة تتألف من الكاربوهيدرات، وتألف هذه المواد 85% من حجم الغشاء الحيوي. ويساهم هذا النوع من النمو في حماية البكتريا الملتصقة من الاجهزة الدفاعية للمضيف كما يزيد من مقاومة البكتريا للعديد من المضادات الحيوية، اذ وجد انه

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

يشارك في احداث العديد من الاصابات المزمنة والتي تتضمن التهابات شغاف القلب والقناة البولية والقناة الصفراوية فضلا عن الالتهابات الرئوية (Seno *et al.*, 2005; Tendolkar *et al.*, 2005).

ان وجود البكتريا في هذا النوع من النمو يساعد في تفسير علاقة الارتباط لهذه البكتريا مع وجود المواد الحيوية المزروعة او المضافة الى جسم الانسان والتي تشمل القثاطر البولية (Urinary catheters)، القثاطر الوريدية (Intravasculer catheters)، مرشحات القناة الصفراوية (Bile drains)، والصمامات القلبية الصناعية (Prosthetic heart valves)، اذ ثبت ان لهذه البكتريا القدرة على تكوين الغشاء الحيوي على سطوح تلك المواد مما يساعد على بقاء البكتريا حية ومتواجدة داخل المضيف (Erlandsen *et al.*, 2004; Kristich *et al.*, 2004; Tendolkar *et al.*,2006).

ووجد ان لبكتريا المكورات لمعوية البرازية القدرة على تكوين الاغشية الحيوية داخل قناة جذر السن، وفي قمم دواعم السن وذلك ما يجعل هذه البكتريا قادرة على تحمل الظروف البيية القاسية في قناة جذر السن في اصابات قناة جذر السن والمنطقة المحيطة بقمة الجذر، في الاصابات الابتدائية لجذور الاسنان، كما يزيد من قدرتها على مقاومة المضادات الحيوية المستخدمة في العلاج، ويكون احد اسباب بقاؤها في القناة بعد العلاج مما يؤدي الى فشل العلاج وحدوث الاصابات الثانوية لجذور الاسنان (Preethee *et al.*, 2012).

1-2-9 الاصابات السريرية لبكتريا المكورات المعوية البرازية

1-2-9-1 الاصابات غير الفموية المتسببة عن المكورات المعوية البرازية

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Non oral infections caused by *E. faecalis*

1-2-9-1-1 اخماج القناة البولية Urinary Tract Infection

تسبب بكتريا *E. faecalis* حوالي 5–15% من اخماج القناة البولية المكتسبة في المستشفيات اذ تعتبر ثاني مسبب رئيسي بعد *E. coli*، والتي تشمل الاخماج المرتبطة بوجود القثاطر (Catheters)، والتركيب غير الطبيعي للقناة البولية، والاستعمال المسبق للمضادات الحيوية وخصوصا مجموعة Cephalosporins، واكدت الابحاث على صعوبة تشخيص هذا النوع من الاخماج في بعض الاحيان لان هذه البكتريا هي من الممرضات الانتهازية ولذلك تستطيع ان تصبح مستعمرة للقناة البولية او تسبب التهابات بدون علامات مرضية (Asymptomatic bacteriuria) (Shankar *et* , *al*., 2001; Facklam *et al*.,1999).

وتسبب هذه البكتريا التهاب المثانة (Cystitis) والتهاب حوض الكلية (Pyelonephritis) بشكل شائعة، واحياناً قد تسبب التهاب البروستات (Prostatitis) والتهاب حول الكليتين (Perinephritis)، وقد لوحظ انها تسبب (5%) من اخماج القناة البولية في الاناث الشابات السليمات (Donskey *et al*., 2003).

1-2-9-1-2 التهاب شغاف القلب الخمجي Infective Endocarditis

تعد بكتريا المكورات المعوية البرازية احدى الانواع البكتيرية التي تسبب التهاب شغاف القلب المتسبب عند الادمان على الادوية (Desai *et al*., 2001).

كما وجد بأنها تشكل نسبة (6–7 %) من حالات التهاب شغاف القلب الخمجي غير الطبيعي (بعد زراعة صمامات قلبية بديلة) (Waar, 2004). كما اشارت الابحاث الى ان بكتريا المكورات المعوية يمكن لها ان تسبب التهاب شغاف القلب الخمجي الطبيعي، إذ تم عزلها بنسبة (5-20) % من تلك الإصابات (Nallapareddy & Murray, 2006; Nallapareddy *et al*., 2006).

1-2-9-1-3 تجرثم الدم Bacteremia

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

تعد بكتريا المكورات المعوية احد الانواع المسؤولة بشكل كبيرة عن حدوث مرض تجرثم الدم، ويدعى تجرثم الدم الناتج عن المكورات المعوية (Enterococcemia) ويكون اكثر حدوثا من التهاب شغاف القلب (Murray, 1990)، إذ تعد هذه البكتريا المسبب الثالث لإصابات تجرثم الدم المكتسبة (Jett *et al.*, 1994) . وتكون حدة الاصابات المتسببة عن المكورات المعوية مترافقة مع المقاومة للعديد من المضادات الحيوية، اذ اشترك ظهور مكورات معوية مقاومة للفانكومايسين في مجرى الدم مع زيادة نسبة الوفيات (Hancock and Gilmore , 2000) .

4-1-9-2-1 اصابات الجهاز العصبي المركزي Central nervous system

تعد بكتريا المكورات المعوية احد المسببات لإصابات الجهاز العصبي المركزي، حيث وجد انها تكون مسؤولة عن حدوث الاصابة بمرض السحايا لحديثي ألولادة اذ بلغ معدل حالات الاصابة حالة لكل 1000 سليم في وحدات العناية المركزة لحديثي الولادة، كما قد تم تسجيل اصابات في المسنين (Desai *et al.* 2001) .

2-9-2-1 الاصابات الفموية المتسببة عن المكورات المعوية البرازية

Oral *E. faecalis* infections

1-2-9-2-1 المكورات المعوية في الاحياء الطبيعية للتجويف الفمي

Enterococci in the normal flora of the oral cavity

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

اشارت الابحاث الى تواجد بكتريا المكورات المعوية في تسوس الاسنان (Dental plaque) بنسبة تتراوح (5-20 %) اذ كانت بكتريا *E. faecalis* هي اكثر الانواع شيوعا متبوعة ببكتريا *E. liqefaciens* (Smyth *et al.*, 1987).

كما وتعد المكورات المعوية البرازية جزءا من النبيت الطبيعي في التجويف الفمي (Oral cavity) اذ عزلت من اللعاب في دراسة اجراها William *et al.* (1980) لـ 206 شخص وكانت نسبة تواجدها 21.8% . واشار (1994) Jett *et al.* الى ان بكتريا المكورات المعوية توجد في التجويف الفمي بشكل تعايشية.

وأشارت الدراسات الحديثة الى ان نسبة وجود المكورات المعوية وبالأخص بكتريا المكورات المعوية البرازية في عزلات الفم تكون اعلى في الاشخاص الذين يعانون من اصابات جذور الاسنان، إذ وجدت المكورات المعوية في عينات الفم بنسبة 11% في الاشخاص الذين سبق وان خضعوا لعلاج قناة جذر السن وبنسبة 1% في الاشخاص الذين لم يسبق لهم الخضوع للعلاج، وكانت جميع هذه العزلات تابعة لنوع المكورات المعوية البرازية (Sedgley *et al.*, 2005).

1-2-9-2-2 التهاب حواف دواعم السن Marginal periodontitis

تعد بكتريا المكورات المعوية وبالأخص بكتريا المكورات المعوية البرازية احدى المسببات لإصابات اللثة والانسجة المحيطة بالسن، والتهاب دواعم السن، اشارت الدراسات الى ان نسبة تواجد بكتريا المكورات المعوية البرازية في اصابات الانسجة المحيطة بالسن ممكن ان تعتمد على عمر المريض، إذ وجد بأنها توجد بنسبة 1% في اصابات الاعمار المبكرة، وبنسبة 5% في اصابات البالغين ، ووجد ان نسبة تواجد بكتريا المكورات المعوية البرازية تزداد بشكل كبير في الاصابات المزمنة لدواعم السن (Chronic periodontitis) (Rams *et al.*, 1992).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

والتهاب دواعم السن هو مجموعة من الأمراض الالتهابية التي تؤثر على دواعم الأنسجة التي تحيط وتدعم الأسنان(اللثة) ، كما تشمل الفقدان التدريجي للعظم السنخي حول الأسنان إذا تركت دون علاج ، شكل (1−2) http://ar.wikipedia.org . ويتسبب التهاب اللثة احيانا عن الكائنات الحية الدقيقة التي تنمو على أسطح الأسنان . ان الدور لذي تلعبه بكتريا المكورات المعوية في احداث الاصابة للأنسجة المحيطة بالسن غير واضح لحد الان، ولكن تزايد تواجدها في مواقع الاصابة يثبت الدور المهم الذي تلعبه هذه البكتريا في الامراضية (Portenier *et al.*, 2003).

شكل (1−2) مراحل تطور التهاب السن

http://ar.wikipedia.org

1-9-2-3 الاصابة الابتدائية لقناة جذر السن Primary Root canal infection

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

تعد المكورات المعوية احد المسببات الرئيسية لالتهاب قنوات جذور الاسنان، على الرغم من انها تشكل نسبة صغيرة فقط في الانواع المعزولة من الاصابات الابتدائية لقنوات جذور الأسنان وفي دراسات اجريت على الحيوانات، عندما حقنت مستعمرات نقية لأنواع مختلفة من البكتريا بشكل منفصلة الى قناة جذر السن، استطاعت بكتريا المكورات المعوية البرازية – دون الانواع البكتيرية الاخرى – تشكيل مستعمرات في معظم الحالات واستطاعت البقاء حية بدون دعم الانواع البكتيرية الاخرى (Sobrinho *et al.*, 1998).

ان القدرة العالية لبكتريا المكورات المعوية البرازية على التكيف للظروف البيئية القاسية زادت من قابليتها على اصابة قناة جذر السن، حيث انها تستطيع تحمل الظروف البيئية القاسية في قنوات الجذور والمتمثلة بقلة المواد الغذائية المتوفرة، والظروف اللاهوائية (Lieo *et al.*, 2001).

وجدت الابحاث التي اجريت للتحري عن الانواع البكتيرية المسببة لإصابات جذور الاسنان والمعتمدة على الطرق الزرعية في التشخيص وذلك عن طريق عمل مزارع للقيح المستخرج من قناة جذر السن اثناء العلاج ان بكتريا المكورات المعوية البرازية كانت احدى الانواع البكتيرية المعزولة من قنوات جذور الاسنان ، حيث وجدت تلك البكتريا في23% في الاصابات الابتدائية و 70% في الاصابات الثانوية من المزارع الموجبة وكانت عادة متواجدة بهيئة مستعمرات نقية (Sunde *et al.*, 2002 ;Hancok *et al.*, 2000) كما وجدت احدى الدراسات المحلية انها تشكل نسبة 9% فقط من الانواع المعزولة من الاصابات الابتدائية لجذور الاسنان في العراق (الدركزلي، 2003).

واشارت الدراسات التي اجريت للتحري عن الانواع البكتيرية المتواجدة في الاصابات الابتدائية لجذور الاسنان وذلك باستخدام الطرق الجزيئية في التشخيص الى وجود انواع كثيرة من البكتريا اللاهوائية واللاهوائية الاختيارية المسببة للإصابة، واكدت تلك الدراسات ايضاً على ان

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

بكتريا المكورات المعوية البرازية كانت احدى الانواع البكتيرية المسببة للإصابات الابتدائية لجذور الاسنان على الرغم من تواجدها بنسب صغيرة (Portenier *et al.*, 2003).

1-2-9-2-4 الاصابة الثانوية لقناة جذر السن (بعد العلاج)

Root canal infection (post treatment) Secondary

تعد بكتريا المكورات المعوية واحدة من اهم البكتريا اللاهوائية الاختيارية المسببة للإصابات الثانوية لجذور الاسنان، والإصابة الثانوية لجذور الاسنان تعني الجذور التي تتعرض للإصابة البكتيرية مرة ثانية بعد علاج الاصابة الاولية (فشل العلاج)، وبالأخص بكتريا *E. faecalis* حيث انها تعد اكثر الانواع المعزولة شيوعاً (Portenier *et al.*, 2003).

وجدت الدراسات ان وجود بكتريا المكورات المعوية وبالأخص بكتريا المكورات المعوية البرازية في اصابات قنوات جذور الاسنان لا يشترط فيه ظهور الاعراض الحادة في الاسنان (Pinheiro *et al.*, 2003).

وجد Siqueira *et al.* (2002) انها غالبا تكون متواجدة في الاصابات التي تكون غير مصاحبة بظهور اعراض حادة على الاسنان. ووجدت البحوث التي اجريت للتحري عن الانواع البكتيرية المسببة للإصابات الثانوية لجذور الاسنان في عينات قنوات الجذور المأخوذة من المرضى اثناء خضوعهم لفتح قناة جذر السن للمرة الثانية لإعادة علاجها، وباستخدام الطرق الزرعية والجزيئية انها تشكل نسبة تتراوح بين (45-77%) (Pinheiro *et al.*, 2003; Siqueira & Rocas , 2004).

أن الهدف الرئيسي في علاج امراض داخل السن (Endodontic diseases) هي الإزالة التامة للعوامل المسببة للإصابة والمتمثلة بالجراثيم ومنتجاتها المتواجدة داخل قناة الجذر إذ أن جميع الجهود تنصب في اختزال أعداد الجراثيم إلى أقصى حد ممكن، ومنع اعادة تلوث قناة جذر

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

السن، وبهذا يكون السبب لرئيسي في فشل العلاج هو بقاء الكائنات الحية الدقيقة في منطقة دواعم السن، وقناة جذر السن (Portenier *et al.*, 2003).

تتحدى بكتريا المكورات المعوية البرازية وبشكل واضح طرق علاج قناة جذر السن، وبذلك فأنها تبقى متواجدة في قناة جذر السن والمنطقة المحيطة بقمة السن بعد العلاج وتكون من اهم الاسباب المؤدية الى فشل علاج قناة جذر السن (Liu *et al.*, 2010). ويعزى سبب قدرة تلك البكتريا على البقاء في الاصابات الثانوية لجذور الأسنان هي قدرتها العالية على تحمل الظروف البيئية القاسية حيث انها تستطيع النمو في درجات حرارية 10 – 45 مْ، وتستطيع البقاء حية لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة 60 مْ، كما انها تكون مقاومة للقاعدية حيث انها تستطيع النمو في 9.6 pH، وان سبب مقاومة البكتريا للقاعدية هو احتوائها على مضخة البروتون في جدارها الخلوي وذلك يمكنها من مقاومة هيدروكسيد الكالسيوم المستخدم عادة في علاج جذور الاسنان، ويمكنها النمو في وسط زرعي يحتوي على 6.5% NaCl، كما انها تكون لها قدرة عالية على مقاومة مدى واسع من المضادات الحيوية المستخدمة في العلاج وامتلاكها لعوامل الضراوة التي تمكنها من الالتصاق، والتراكم، وتكوين تجمعات منتظمة بهيئة غشاء حيوي (Biofilm) والتي تجعل مقاومة البكتريا اكبر 1000 مرة لخلايا البلعمية (phagocyte)، والأجسام المضادة (Antibody) والمضادات الحيوية (Liu *et al.*, 2010).

1-2-10 طرق تشخيص بكتريا المكورات المعوية البرازية

1-2-10-1 التشخيص المعتمد على الصفات المظهرية والزرعية

تتصف خلايا المكورات المعوية البرازية *E. faecalis* بالشكل الكروي إلى البيضي وذات قطر (0.5 - 1) مايكروميتر، موجبة لصبغة غرام إذ تظهر بشكل منفردة وازواجاً وبشكل سلاسل قصيرة في الاوساط السائلة والعينات المرضية وأحياناً تبدو بشكل مكورات عصوية في المسحات

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المصبغة بصبغة غرام وفي مزارع الاوساط الزرعية الصلبة، غير مكونة للابواغ وغير متحركة، وغير منتجة للصبغات على الوسط الصلب (Facklam & Teixeira, 1997; Macfaddin, 2000; Forbes *et al* ., 2002).

لاهوائية اختيارية، سالبة لفحص الكاتاليز، لها القدرة على النمو بدرجات حرارة مختلفة تتراوح ما بين 10–45 مْ، والبقاء حية بدرجة حرارة 60 مْ لمدة نصف ساعة، والنمو بسهولة في وسط حاوٍ على تركيز 6.5% من كلوريد الصوديوم، والنمو بتركيز عالٍ 40% من أملاح الصفراء، والنمو في وسط ذي رقم هيدروجيني pH عالٍ يصل إلى 9.6 (Murray, 1990; Huycke *et al.*, 1998).

ان لجميع أنواع المكورات المعوية القدرة على تحلل الاسكيولين (Esculin) وتخمر الكثير من الكاربوهيدرات منتجة حامض اللاكتيك فقط، ولا تنتج غاز أو كبريتيد الهيدروجين، وتكمن اهمية هذه البكتريا في قابليتها على تحمل الظروف البيئية القاسية اذ انها تنمو في اوساط زرعية لا تستطيع الانواع البكتيرية الاخرى من النمو فيها، فهي تستطيع ان تعيش في بيئات حامضية مختلفة وقاعدية ناقصة التوتر (Hypotonic) او زائدة التوتر (Hypertonic)، وعلى سبيل المثال تعد مادة ازايد الصوديوم (Sodium azide) من المواد المثبطة او القاتلة لمعظم الاحياء المجهرية ولكن هذه البكتريا تتميز بقدرتها على تحمل تلك المادة مما ساعد الباحثون على استخدامها كعوامل انتخابية (Selective agents) تدخل ضمن مكونات الاوساط الزرعية المستخدمة في عزل هذه البكتريا (Huycke *et al.*, 1998). تمتلك بكتريا *E. faecalis* صفات تفريقية مهمة تميزه من الأنواع الأخرى، إذ لها القدرة على النمو في وسط يحتوي على تركيز 0.04 % من أملاح تلوريت البوتاسيوم (Potassium tellurite) ، وله القابلية على تخمر

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الكليسرول لا هوائياً، وبهذا نستطيع أن نميز بشكل واضحة هذا النوع من بقية الأنواع التابعة لجنس المكورات المعوية (Manero & Blanch, 1999).

تتصف بعض انواع بكتريا *E. faecalis* بقدرتها على تحليل الدم في وسط حاوي على دم الانسان والارانب والحصان اذ تظهر بعضها تحللاً كاملاً (β–Hemolysis) او جزئياً (α–Hemolysis) ويعد قذيفان كبير منها غير محللة للدم (γ–Hemolysis)، في حين لا تظهر هذه البكتريا تحللاً عند تنميتها في وسط حاوي على دم الأغنام (Facklam *et al*., 1999;

Rollins & Joseph, 2000)، بينما اشارت الدراسات الحديثة الى قدرة هذه البكتريا على تحليل دم الاغنام بعد تنميتها في وسط مرق نقيع القلب والدماغ المضاف له (1%) من الكلوكوز و(0.03%) من الارجنين (Furumura *et al*., 2006) .

1-2-10-2 التشخيص باستخدام جهاز Vitek2 System

يمثل نظام Vitek 2 تقنية اوتوماتيكية كاملة لإنجاز عدد من التجارب الخاصة بتشخيص الاحياء المجهرية من بكتريا وخمائر فضلاً عن إمكانيته اجراء فحص الحساسية Susceptibility test للبكتريا غير المتطلبة non-fastidious بمتطلباتها الغذائية والجهاز مزود ببرمجيات تعمل على تحليل النتائج وطبعها. يعمل نظام الجهاز باستخدام بطاقات Cards مختلفة معدة كل واحدة منها لتشخيص مجموعة ميكروبية معينة (سعيد، 2007).

ونظام Vitek2عبارة عن نظام نموذجي متكامل يتكون من وحدة التعبئة، السدادة، قارئ الحاضنة، وحدة التحكم في الكمبيوتر، محطة البيانات، وطابعة multicopy. يقوم النظام بالكشف عن نمو البكتيريا والتغيرات الأيضية في microwells بطاقات بلاستيكية رقيقة. تحتوي البطاقات على المضادات الحيوية ومواد الاختبارات الكيموحيوية المختلفة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

تستخدم بطاقة ID-GPC من Vitek2 نظاماً لتشخيص هوية البكتريا، وبطاقة ID-GPC هي بطاقة بلاستيكية تحتوي على 64 حفرة ، 18 حفرة تكون فارغة و46 بئراً مملوءة بمواد الاختبارات الكيموحيوية وعلى النحو التالي: 22 للاختبارات الأنزيمية، و16 لاختبارات التخمير (السكريات والكليسرول) 2 اختبارات كربوكسيل و 6 اختبارات متنوعة (اليوريا، البيروفيت، optochin، نوفوبيوسين، سلفات بوليميكسين B ، و6.5٪ كلوريد الصوديوم) (Garcia-Garrote *et al.*, 2000).

3-10-2-1 التشخيص الجزيئي Molecular Identification

ان طرائق التعرف على الانماط الظاهرية للبكتريا وتشخيصها باستخدام الفحوصات الكيموحيوية والصفات المظهرية والزرعية قد استخدمت منذ القدم في تشخيص الانواع البكتيرية والتعرف عليها، ولكن التشابه الكبير في سلوك بكتريا المكورات المعوية في تخمر الكاربوهيدرات واختلافها في نوع او نوعين من التخمرات الكيموحيوية جعل من هذه الطرائق غير كافية في تشخيصها على مستوى النوع (Donabedian *et al.*,1995) كما ان التشخيص الكيموحيوي قد يتأثر جزئيا بالتعرض للعلاج بالمضادات الحيوية وحالة المريض وقوة الإصابة، لذلك كان لابد من اللجوء الى تقنيات اكثر دقة في تشخيص الانواع. وقد استطاعت طرائق التشخيص المعتمدة على الطرز الجينية ان تحل مشكلة التغايرات في الطرز المظهرية، لتزودنا بتشخيص اكثر دقة للأنواع (Cogulu *et al.*, 2007).

ان طرق التشخيص المعتمدة على الطراز الجيني المستعملة في تشخيص المكورات المعوية البرازية كثيرة ومنها تحليل البروتينات المرتبطة بالبنسلين (Pencillin Binding Proteins analysis)، والتشخيص باستعمال المجسات (Probes)، وتحليل النسق البلازميدي

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

(Analysis of Plasmid profile)، وطريقة التفاعل السلسلي لانزيم بلمرة الـ DNA (DNA Polymerase Chain Reaction).

1-2-10-3-1 طريقة التفاعل التسلسلي لإنزيم بلمرة الـ DNA

DNA Polymerase Chain Reaction (PCR)

يعد تفاعل البلمرة المتسلسل PCR إحدى تقنيات علم الأحياء الجزيئي Molecular Biology والتي يمكن تعريفها على انها تضخيم Amplification اجزاء معينة من جزيئه DNA (جين أو جزء من جين أو تتابع معين من DNA) لملايين ومليارات المرات في ساعات محدودة (2- 4 ساعات) خارج الانظمة الحية بمقياس لوغاريتمي او تزايدي ، اي ان الجزيئة الواحدة تنتج اثنين، والاثنان تنتج اربعة وهكذا بشكل تزايدي. وبذا يمكن وضع تعريف اخر للعملية على انها تفاعل انزيمي بسيط نوعاً ما يحدث خارج جسم الكائن الحي *in vitro* محاكيا في ذلك التكرار الطبيعي لجزئ DNA داخل الخلية الحية *in vivo* مع بعض الأختلافات (Dale & Park, 2004).

وفى الواقع فإن تقنية PCR استخدمت على مدى السنوات اللاحقة في تشخيص الأمراض الوراثية والأمراض الطفيلية.

تعد طريقة التشخيص بالـ PCR من الطرائق الحديثة والمهمة المستعملة في تشخيص الانواع البكتيرية المختلفة وخاصة الانواع البكتيرية التي تكون غير قابلة للزرع او التي تكون صعبة العزل، وتعتمد هذه الطريقة على تمييز مواقع بداية سلسلة القواعد النايتروجينية الموجودة على شريط الحامض النووي DNA ومنه ابتداء يتم تحضير جزيئات مضخمة من DNA المستهدف (Amplified target DNA) (Sambrook and Russel 2001).

بعد استعمال هذه الطريقة بدأت معايير جديدة في تشخيص البكتريا بالتطور، إذ اوضحت العلاقات التطورية بين البكتريا وذلك بمقارنة جزء ثابت من الشفرة الوراثية (Woese, 1977).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ولإنجاح عملية البلمرة لابد من اختيار بادئ فريد من توالياته المقابلة لتواليات DNA المراد تضخيمه. ويفضل في البوادئ زيادة محتواها من G و C ، حيث يحدد البادئ المنطقة (الجين) التي سيتم بناؤها باستعمال PCR وتتطلب التجربة الواحدة وجود زوج من البوادئ أحدهما أمامي Forward يحدد بداية المنطقة الجين وآخر خلفي Reverse يحدد نهاية المنطقة (الخفاجي وابو المعالي، 2013).

هذه الشفرة (الجين) حددت في البكتريا في المنطقة الجينية الواقعة على الكروموسوم والمتضمنة 5S,16S, and 23S rRNA، وفي الوقت الحاضر الجزء الاكثر استعمالا في تشخيص البكتريا هو جين (16S rRNA 16S ribosomal RNA) (James, 2010) .

استطاعت تقنية PCR التفريق بين بكتريا المكورات المعوية البرازية والانواع الاخرى للمكورات المعوية وذلك باستعمال هذا الجين المتخصص وهو جين (16S rRNA).

وتتفاعل هذه المكونات ضمن نسق حراري محدد في درجات حرارية متعاقبة ففي البداية يتم تسخين الخليط الى درجة حرارية عالية بمدى 90- 95 مْ لغرض فصل الاشرطة المزدوجة لجزيئات DNA الخاصة بالنموذج اي حصول المسخ Denaturation عن طريق تكسير الاواصر الهيدروجينية التي تربط شريطي جزيئة DNA ببعضها التي توصل بين القواعد النتروجينية المكونة لهما. بعد ذلك تخفض درجة الحرارة الى درجة حرارية ضمن مدى 50 – 68 مْ لمدة لا تقل عن 30 ثانية لغرض اتاحة فرصة كافية للبوادئ المستعملة للارتباط مع اشرطة الهدف اعتمادا على تكامل القواعد النتروجينية وتذيفانى مرحلة الالتحام Annealing step ومن ثم ذلك رفع درجة الحرارة الى حوالي 68 –72 مْ اعتماداً على نوع انزيم البلمرة المستعمل وطول الهدف وامور اخرى. واثناء هذه المرحلة يتم اضافة النيوكليوتيدات (dNTPs) على الشريط الناشئ من اطالة البادئ استنادا الى ما يكملها من القواعد على الشريط القالب او الهدف، اي حدوث عملية الاطالة

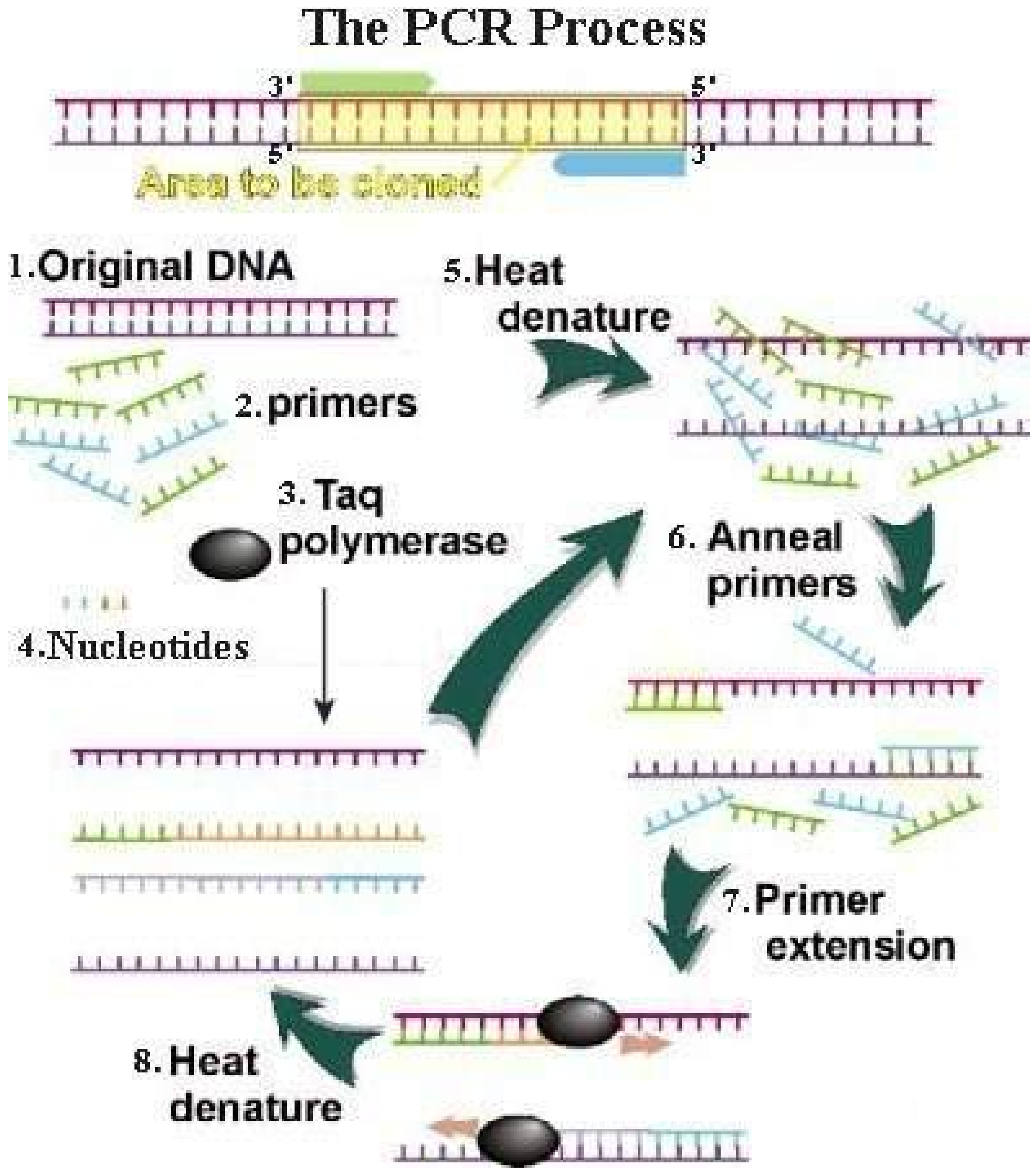
المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Extension step. تعاد العمليات المذكورة (الدورة) لمرات عديدة لحين الوصول الى كمية من DNA (الهدف) كافية لعمليات الكشف والدراسة (Dale & Park, 2004).

وتستغرق كل دورة حوالي 5 دقائق بما فيها المدة اللازمة لكل من عمليات رفع الحرارة وتخفيضها (الخفاجي و ابو المعالي، 2013).

ثم يصار الى الكشف عن نواتج التفاعل باستعمال اكثر من طريقة ومن اهمها واوسعها استعمالاً الترحيل الهلامي Gel electrophoresis للكشف عن القطع المستهدفة ومعرفة حجومها بالمقارنة مع قطع من DNA معروفة الحجم والوزن وتذيفانى الواذيفانات او المعلمات (DNA ladder) وتكون عملية الكشف والإظهار باستعمال صبغات او مواد مثل الاثيديوم بروومايد Ethidium bromide الذي يعطي تألقاً عند تعريضه للضوء فوق البنفسجي (Ultra violet light) (الخفاجي و أبو المعالي، 2013) الشكل (2−1) .

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



Kem-En –Tec NordicA/S PCR

الشكل (1-2) اساسيات تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

واستعملت تقنية PCR في دراستنا الحالية في:

1-2-10-3-1-1 التشخيص الجزيئي لبكتريا المكورات المعوية البرازية باستعمال جين (16srRNA)

يتم تشخيص الانواع البكتيرية بالطرائق الجزيئية وذلك باستعمال جين 16S r DNA، يطلق على جين 16S r RNA أيضا باسم 16S r DNA واستعملت المصطلحات بالتبادل

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وأتاحت السياسة الحالية استعمال مصطلح الـ 16S r RNA، وجين (16S r RNA) هو جين متخصص للتفريق بين جميع الانواع البكتيرية، وكذلك archeobacteria، وبذلك اصبح تسلسل جين الـ 16S r RNA سائدا في علم الإحياء الدقيقة الطبية كبديل رخيص وسريع في تشخيص البكتريا مقارنة بالطرائق المظهرية والكيموحيوية التقليدية (Kolbert & Persing, 1999).

كما يستعمل جين (18S rRNA) للتفريق بين الكائنات حقيقية النواة (eukaryotes).

جين الـ 16S rRNA هو احد مكونات الوحدة الثانوية الصغيرة في الكائنات بدائية النواة (إذ تتكون من 30s: 16s rRNA +20 protein) وقد تم استخدام جين 16s rRNA في اعادة تصنيف البكتريا الى انواع جديدة تماما او حتى اجناس (Kindworth *et al.*, 2013).

ومن الاستعمالات المهمة لهذا الجين ايضا هو تشخيص الجنس والنوع للعزلات والتي يكون تشخيصها بالطرائق الكيموحيوية التقليدية صعبا او غير دقيق، ولا سيما الانواع المهمة من الناحية الطبية، إذ يتم تصميم بادئ خاص لكل نوع بكتيري يتكامل مع جين الـ (16S rRNA) ليتم تشخيص البكتريا بتقنية الـ PCR وهي تقنية سهلة وسريعة واكثر دقة في التشخيص، إذ استعمل جين 16s rRNA في الدراسات الحديثة للكشف عن وجود وتشخيص انواع الكائنات الحية الدقيقة المسببة لإصابات قناة جذر السن والمنطقة المحيطة بقمة الجذر باستعمال تقنية الـ PCR إذ انها تكون اكثر دقة وسهولة عند مقارنتها مع التشخيص المعتمد على الطرائق الزرعية، إذ استطاعت العديد من الدراسات ان تثبت وجود بكتريا المكورات المعوية البرازية بشكل متكررة في اصابات قنوات جذور الاسنان الابتدائية وكذلك في اصابات فشل العلاج اي الاصابات الثانوية وذلك عن طريق تشخيصها بالطرائق الجزيئية باستعمال جين 16S rRNA (Siqueira *et al.*,2002; Portenier *et al.*, 2003; Cogulu *et al.*, 2007). كما استطاعت تقنية PCR ان تكشف عن وجود الكائنات الحية الدقيقة التي تسبب فشل علاج قناة جذر السن التي تكون عادة

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

كائنات لاهوائية ولاهوائية اختيارية صعبة الزرع او غير قابلة للزرع وذلك باستعمال ذلك الجين (Liu *et al.*, 2010).

وكذلك استعمل جين 16s rRNA في معرفة واعادة ترتيب العلاقات التطورية وذلك بسبب بطء معدلات التطور في هذا الجين حيث كان (1977) Woese & Georg من الرائدين في استعمال جين 16S rRNA في العلاقات التطورية بين الأنواع، وقد استعمل جين (16S rRNA) في تشخيص البكتريا وذلك بسبب ان مواقع ارتباطه بالبادئ تكون عالية الثبات، فضلا عن ان تسلسل الجين يحتوي على مناطق شديدة التغاير بين الانواع موفرة بذلك تسلسل خاص لكل نوع من الانواع البكتيرية ويمكن الاستفادة منها في تشخيص الانواع (Pereira *et al.*, 2010).

2-1-3-10-2-1 التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا المكورات المعوية البرازية بأستعمال تقنية PCR

توجد المكورات المعوية كنبيت طبيعي في الفم كما انها توجد بشكل تعايشية في القناة الهضمية للانسان والحيوان. وظهرت في العقود الاخيرة كمسبب رئيس للعدوى في المستشفيات وقد اجريت العديد من الدراسات التي حاولت فهم الية اكتساب هذه البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية وانتشارها بشكل جيد في بيئة المستشفيات (Glimore, 2002) .

كما تعد المسبب الثالث الاكثر شيوعا في التهاب المسالك البولية (Moro *et al.*, 2001) وتكون بكتريا المكورات المعوية البرازية قادرة على استعمار تجويف الفم ولا سيما في الاشخاص الذين يعانون من التهاب اللثة والتهاب قناة جذر السن (Pinheiro *et al.*, 2006) . ووجد بأن استمرار اصابة هذه البكتريا لقناة جذر السن تجعلها قادرة على مقاومة التعرض للعلاج بهيدروكسيد لكالسيوم في قناة جذر السن (Nakajo *et al.*, 2006).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وقد اثبتت العديد من الدراسات وجود بكتريا المكورت المعوية البرازية في الاشخاص الذين يعانون من امراض الفم مثل: التهاب اللثة، والتهاب دواعم السن، وإصابات قناة جذر السن الأولية، واصابات قناة جذر السن الثانوية (فشل العلاج) (Salah *et al.*, 2006).

وبقيت عوامل الضراوة لبكتريا المكورات المعوية البرازية وآلية تسببها في الاصابة بالإمراض مجهولة الى حد كبير، لذلك استعملت طرائق التشخيص الجزيئي ولاسيما تقنية PCR للتحري عن عوامل الضراوة المعروفة والمحتملة في بكتريا المكورات المعوية حيث انها تكون اكثر سهولة وسرعة ودقة في تشخيص عوامل الضراوة من الطرائق الزرعية والتقليدية المتبعة في التحري عن وجود عوامل الضراوة في البكتريا (Cogulu *et al.*, 2007).

وقد قامت دراسات متعددة باستعمال تقنية PCR للتحري عن عوامل الضراوة في بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر مختلفة، واشارت تلك الدراسات بان ضراوة بكتريا المكورات المعوية البرازية تختلف باختلاف مصادر عزل البكتريا حيث تم اكتشاف وجود جينات خاصة ترتبط بإنتاج عوامل الضراوة في البكتريا التي تعزز من قدرتها على الاصابة بالأمراض، ويتم الكشف عن هذه الجينات عن طريق تصميم بوادئ متخصصة لكل جين (Creti *et al.*, 2004) .

وقد استخدمت تقنية PCR وفي دراسات متعددة للكشف عن وجود عوامل الضراوة المختلفة في بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من أصابات الفم مثل ace (collagen binding antigen gene) , asa (aggregation substance gene) , cyl A (cytolysin activator gene) , efaA and esp (surface adhesin gene)، وذلك عن طريق التحري عن وجود الجين المشفر لإنتاج هذه العوامل، واشارت تلك الدراسات الى ان الجينين المشفرين لعاملي الالتصاق السطحية efaA, ace كانت موجودة في اغلب العزلات البكتيرية (Salah *et al.*, 2006). كما اشارت العديد من الدراسات الى ان البكتريا الحاملة لجين efaA

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

تكون ذات قابلية اكبر على اصابة شغاف القلب والأنسجة السنية، إذ ان هذا الجين يعتبر من عوامل الالتصاق السطحية في البكتريا الذي يسهل التصاق البكتريا بالكولاجين والمواد خارج خلوية ويذيفانح للبكتريا بتكوين مستعمرات، وكذلك انه يساعد البكتريا في تكوين الاغشية الحيوية (Biofilm) (Stuart *et al.*, 2006 ;Creti *et al.*, 2006 ;Sedgley *et al.*, 2005).

واكدت العديد من الدراسات ان مستضد التهاب شغاف القلب للمكورات المعوية البرازية efaA يعد من اهم عوامل الضراوة في العزلات المرضية، إذ انه كان موجودا في جميع عزلات المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر طبية، في حين تكون العزلات المعزولة من الاطعمة حاوية على جين efaA بنسبة اقل، واثبتت هذه الدراسات ارتباط هذ الجين بعوامل ضرواة بكتريا المكورات المعوية البرازية وتعزيز قدرتها على اصابة الانسان بامراض متعددة وخاصة اصابات قناة جذر السن، كما وجدت تلك الدراسات ان هذا الجين يزيد من قابلية بكتريا المكورات المعوية البرازية على مقاومة العلاج بالمضادات الحيوية (Salah *et al.*, 2006) .

أكد Cosentino *et al.* (2010) في دراسة اجراها على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة وجود هذا المستضد في جميع العزلات المعزولة من العزلات المرضية بينما كان موجودا بنسبة ما يقارب 80 % من العينات المعزولة من المصادر الاخرى.

بينما اشارت دراسات اخرى الى وجوده بنسب مرتفعة في اصابات الفم، إذ وجد Dahlen *et al.* (2012) في دراسة له على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من الانسجة المخاطية والإصابات العميقة للفم ان مستضد التهاب شغاف القلب للمكورات المعوية البرازية efaA كان موجودا في العزلات بنسبة 93.3%.

ووجد Mahdi *et al.* (2012) في دراسته التحري عن عوامل الضراوة في بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة باستخدام تقنية الـ PCR التي

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اجريت في العراق حيث وجد ان جين الـ efaA كان موجودا في 5 عزلات من اصل 7عزلات (72.4%) (3 عزلات معزولة من الادرار و2 عزلة معزولة من الحروق).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المواد وطرائق العمـــــــــل

Materials & Methods

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

2-المواد وطرائق العمل Material & Mathods

1-2 المواد Materials

1-1-2 الأجهزة والمعدات المختبرية المستعملة

Laboratory equipments & apparatus

استعملت في هذه الدراسة الاجهزة والادوات المدونة في ادناه:

الجهاز او الاداة	الشركة المصنعة والمنشأ
PCR tubes	Sartorius (Germany)
Millipore filter point أوراق ترشيح دقيقة	Sartorius (Germany)
Distillator جهاز التقطير	Gallen Kamp (England)
Vitek 2 جهاز الفايتك	Gallen Kamp (England)
Centrifuge جهاز النبذ المركزي	Gallen Kamp (England)
Incubator حاضنة	Gallen Kamp (England)
Water bath حمام مائي	Gallen Kamp (England)
صفيحة تسخين مع محرك مغناطيسي Hot plate with magnetic stirrer	Gallen Kamp (England)
Hood cabinet غرفة العزل	Memmert (Germany)
Electric oven فرن كهربائي	Memmert (Germany)
Vortex mixer مازج دوار	BBL (USA)
Micropipettes ماصات دقيقة	Appendrof
Deep freez مجمدة	Aucma
Light microscope مجهر ضوئي	Olympus (Japan)
pH- meter مقياس الرقم الهيدروجيني	Gallen Kamp (England)
Cooling centrifuge منبذة مبردة	Beckman (Germany)
Autoclave موصدة	Arnold &Sons (USA)
Sensitive balance ميزان حساس	Gallen Kamp (England)
Nano drop نانو دروب	Philips (Holland)

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

2-1-2 المواد الكيمياوية

Chemical Materials

استعملت لهذه الدراسة المواد الكيمياوية الاتية:

اسم المادة		الشركة المصنعة والمنشأ
Agar	اكار	BDH (England)
Agarose	اكاروز	Promega (USA)
Arabinose	ارابينوز	BDH(England)
Bromophenol blue	صبغة البروموفينول الزرقاء	Promega(USA)
$CaCl_2.6H_2O$	كلوريد الكالسيوم المائي	Merck (Germany)
Casien	كازائين	BDH (England)
Ethel alcohol	كحول اثيلي	BDH (England)
Ethidium bromide	صبغة الاثيديوم برومايد	Promega (USA)
Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA)		Promega (USA)
$FeCl_3.H_2O$	كلوريد الحديد المائي	BDH (England)
Furctose	فركتوز	BDH(England)
Gatalase reagent	كاشف الكتاليز	Promega (USA)
Gelatin	جلاتين	Oxoid (England)
Glucose	كلوكوز	BDH (England)
Glycerol	كليسرول	BDH (England)
Gram stain	مجوعة ملون غرام	BDH (England)
Gulcose	كلوكوز	BDH(England)
H_2SO_4	حامض الكبريتيك المركز	Oxoid (England)
HCl	حامض الهيدروكلوريك المركز	BDH (England)
Iodin crystals	بلورات اليود	BDH (England)
isopropano	ايزوبروبانول	BDH(England)
K_2HPO_4	فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين	Fluka(Switzerland)
KH_2PO_4	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	Merck (Germany)
Lactose	لاكتوز	BDH(England)

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Promega (USA)	Loading buffer (6x)	
Promega (USA)	Loopo DNA ladder	واسم الدنا
Sigma (USA)	Lysozyme	اللايسوزايم
BDH(England)	Maltose	مالتوز
BDH (England)	Mannitol	مانيتول
BDH(England)	Mannitol	مانيتول
Promega (USA)	Master mix	
Oxoid (UK)	Meat extract	مستخلص اللحم
BDH (England)	$MgSO_4.7H_2O$	كبريتات المغنسيوم المائية
Fluka (Switzerland)	Na_2HPO_4	فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين اللامائية
Oxoid (England)	NaCl	كلوريد الصوديوم
Merck (Germany)	NaN_3	ازايد الصوديوم
Oxoid (England)	NaOH	هيدروكسيد الصوديوم
Merck (Germany)	Peptone	ببتون
Fluka (Switzerland)	Seder oil	زيت العدسات
Bio-Meriux (France)	Slidex Strepto-Kit	
BDH (England)	Sodium citrate	سترات الصوديوم
BDH (England)	Sodium citrate	سترات الصوديوم
BDH(England)	Sorbitol	سوربيتول
BDH (England)	Sucrose	سكروز
Promega (USA)	TBE buffer (10x)	
Merck (Germany)	Trypton	تربتون
BDH(England)	Xylose	زايلوز
BDH (England)	Yeast extract	مستخلص الخميرة
Fluka (Switzerland)	Bromo cresole purple	صبغة بروموكريزول الارجوانية
Promega (USA)	Genomic DNA purification Kit	العدة الجاهزة لاستخلاص الدنا
Fluka (Switzerland)	NaH_2PO_4	فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

كبريتات الامونيوم الحديدوز Ferric ammonium sulfate	Fluka (Switzerland)

2-1-3 الاوساط الزرعية الجاهزة Culture Media

الوسط	الشركة المصنعة والمنشأ
وسط المغذي السائل Nutrient broth	Difco (USA)
وسط المكونكي الصلب MacConkey agar NO_2	Rashmi (India)
وسط Pfizer selective Enterococci agar	Himedia (India)
وسط مولر هنتون الصلب Mueller Hinton agar	Rashmi (India)
وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain Heart Infusion broth	Rashmi (India)
وسط نقيع القلب والدماغ الصلب Brain Heart Infusion agar	Rashmi (India)
وسط الدم الاساس الصلب blood Agar base	Rashmi (India)

حضرت الأوساط الزرعية الجاهزة المبينة في الجدول اعلاه حسب تعليمات الشركة المنتجة المثبتة على العبوة وعقمت بالموصدة، وتركت الأوساط لتبرد حتى درجة حرارة 50 مْ ثم صبت في الاطباق او وزعت في الأنابيب حسب نوع التجربة. عقمت جميع الاوساط الزرعية بالموصدة بدرجة حرارة 121 مْ ولمدة 15 دقيقة.

2-1-4الأوساط الزرعية التركيبية Synthetic culture media

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

2-1-4-1 وسط (2xyt) (Mahmoudpour *et al*., 2007)

الوزن (غم / لتر)	المادة
16	تربتون Trypton
10	مستخلص الخميرة Yeast extact
5	كلوريد الصوديوم NaCl

أذيبت هذه المكونات في 1000 مليلتر من الماء المقطر، وزع الوسط على انابيب بمقدار 5 مليلتر/انبوبة، عقم الوسط بالموصدة، ثم حفظ في درجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال واستعمل الوسط كوسط انتقالي .

2-1-4-2 وسط ازايد الدم الاساس الصلب

Azide Blood Agar Base medium

حضر باضافة 0.04 غم من مادة ازايد الصوديوم الى وسط الدم الاساس الصلب، ثم عقم بالموصدة، وبرد الى درجة حرارة (50 م°) واضيف له دم الانسان بنسبة (5%) ثم صب في اطباق معقمة وترك ليتصلب (سعيد ، 2007).

2-1-4-3 وسط اكار نقيع القلب و الدماغ المضاف اليه 5% دم انسان

Blood-Brain Heart infusion agar medium

حضر باضافة دم الانسان بنسبة (5%) الى وسط نقيع القلب والدماغ الصلب المعقم والمبرد الى درجة حرارة (50 م°) وصب في اطباق معقمة وترك ليتصلب. استعمل هذا الوسط في الكشف عن قابلية العزلات على انتاج انزيم الهيمولايسين (Elnser *et al*., 2000) .

2-1-4-4 وسط ملح كلوريد الصوديوم NaCl medium (6.5 %)

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اضيف (6.5) غم من كلوريد الصوديوم الى (100) مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل، ثم وزع في انابيب اختبار بواقع (5) مل لكل انبوبة وعقم بالموصدة. استخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية العزلات على النمو بتراكيز ملحية عالية (Facklam & Elliott, 1995; Collee *et al*., 1996).

2-1-4-5 وسط نقيع القلب والدماغ السائل ذي الرقم الهيدروجيني (9.6)

Brain heart infusion broth medium in (pH=9.6)

حضر وسط نقيع القلب والدماغ السائل وعدل الرقم الهيدروجيني له الى (pH=9.6) بأستعمال (1) مولار من هيدروكسيد الصوديوم ووزع في انابيب اختبار بواقع (5) مل لكل انبوبة وعقم بالموصدة. استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية العزلات على النمو في وسط عالي القاعدية (Forbes *et al.,* 2002).

2-1-4-6 وسط اكار الدم–تولريت البوتاسيوم

Potassium tellurite blood agar medium

حضر هذا الوسط من اضافة تولريت البوتاسيوم المحضر في الفقرة (2-1-7-1) بتركيز نهائي (0.04 %) الى وسط الدم الاساس الصلب المبردالمحضر في الفقرة (2-1-3)، ثم اضيف له دم الانسان بنسبة (5%)، ثم صب في اطباق معقمة وترك ليتصلب. استعمل هذا الوسط في تحديد قابلية العزلات على اختزال املاح تولريت البوتاسيوم (Macfaddin, 2000).

2-1-4-7 اكار نقيع القلب والدماغ المضاف اليه 0.04 % NaN_3

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

حضر 100 مليلترا من اكار نقيع القلب والدماغ على وفق الفقرة (1-2-3) مع اضافة 0.04% من ازايد الصوديوم، برد الوسط الى درجة حرارة 45 مْ، ثم صب في اطباق معقمة (Macfaddin, 2000).

2-1-4-8 وسط اختبار تحمل الحرارة

حضر وسط نقيع القلب والدماغ الصلب حسب الفقرة (1-2-3) وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.0، وعقم بالموصدة وترك ليبرد الى درجة حرارة 50 مْ ثم صب في اطباق وترك ليتصلب. ثم لقح بالعزلة البكتيرية المنتخبة وبعمر 24 ساعة. وحظنت الاطباق الملقحة بدرجات حرارة مختلفة وتشمل :10 مْ و45 مْ كلا على حدة. استعمل هذا الوسط في اختبار قابلية العزلات على تحمل درجات حرارة مختلفة (Facklam & Elliott, 1995).

2-1-4-9 وسط تخمر السكريات

حضر الوسط باذابة 1 غرام من الببتون و0.5 من كلوريد الصوديوم و 0.0008 من صبغة احمر الفينول في 90 مليلترا من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.0 واكمل الحجم الى 100 مليلترا بالماء المقطر، وزع الوسط على انابيب ذات سدادات محكمة الغلق بواقع 4.5 مل لكل انبوبة وعقم بالموصدة، تركت الانابيب لتبرد ثم اضيف لكل منها 0.5 مليلتر من المحلول الخزين للسكر المختار حسب نوع التجربة (حضرت محاليل السكريات مسبقا بتركيز 10% لكل من السكريات الاتية: (مانيتول، وسوربيول، رافينوز، وارابينوز، وكلوكوز، ولاكتوز، وسكروز، وفركتوز، ومالتوز) من اذابة 1 غم من كل سكر على حدة في 10 مليلترات من الماء المقطر ثم عقمت باستعمال مرشحات غشائية معقمة ذات قطر ثقوب 0.45 مايكرومتر، وحفظت بدرجة حرارة 4 مْ تحت ظروف معقمة). حفظت الانابيب بدرجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال (Macfaddin, 2000).

2-1-4-10 وسط تمئ الجلاتين

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

حضر 100 مليلتر من المرق المغذي على وفق الفقرة (2-1-3) ثم اضيف اليه 12 غم جلاتين، وزع الوسط على انابيب بمقدار 5 مليلترات / انبوبة وعقم بالموصدة ثم حفظ بدرجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال (Collee *et al.*, 1996).يستعمل هذا الوسط لغرض الكشف عن تمئ الجلاتين .

2-1-4-11 وسط الكازائين الصلب

Modified solid casein medium

المادة		الوزن (غم/ 100 مليلتر)
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	K_2HPO_4	0.1
كبريتات المغنيسيوم المائية	$MgSO_4.7H_2O$	0.02
كازائين	Casien	0.5
كلوكوز	Glucose	0.1
كلوريد الحديديك المائية	$FeCl_3.6H_2O$	0.0003
اكار – اكار	Agar-Agar	1.5

أذيبت هذه المكونات في 80 مليلترا من الماء المقطر، ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7 واكمل الحجم ال 100 مليلتر بالماء المقطر وعقم بالموصدة، ثم صب في اطباق معقمة (Atlas *et al.*, 1995).يستعمل الوسط لغرض الكشف عن انتاج البروتييز .

2-1-4-12 وسط ران (Rhan medium)

المادة		الوزن (غم / 100 مليلتر)
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	K2HPO4	0.5
فوسفات الامونيوم	NH4HPO4	0.5
كبريتات المغنيسيوم المائية	MgSO4.7H2O	0.1
كلوريد الكالسيوم المائي	Cacl2.6H2O	0.1
كلوريد الحديديك المائية	Fecl3.6H2O	0.003

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اكار – اكار Agar-Agar	1.5

اذيبت هذه المكونات في 80 مليلترا من الماء المقطر، عدل الرقم الهيدروجيني الى 7.2 واكمل الحجم ال 99 مليلتر بالماء المقطر وعقم بالموصدة، برد الى درجة حرارة50 مْ، ثم اضيف 1 مليلتر من زيت زيتون المعقم مسبقا لمدة 10 دقائق، ثم صب في اطباق معقمة Rodina, (1972). يستعمل الوسط لغرض الكشف عن انتاج اللايبيز.

2 -1-5 المحاليل والصبغات

حضرت المحاليل والكواشف كافة حسب ما جاء في (Macfaddin, 2000; Forbes *et al*., 2002).

2-1-5-1 محلول بيروكسيد الهيدروجين H2O2

استعمل محلول بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen Peroxide (H_2O_2) والجاهز بتركيز (3%) المجهز من قبل الشركة التخصصية (العراق). استعمل للكشف عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الكاتليز.

2-1-6 الصبغات

2-1-6-1 محلول ملون غرام Gram stain

تم استعمال المحاليل الخاصة بتقنية ملون غرام لغرض التشخيص الاولي للبكتريا والتي تتكون من صبغة الكرستال البنفسجية (Crystal Violet) ومحلول اليود (Iodin Solution) والكحول الاثيلي 95% وصبغة السفرانين الحمراء الجاهز والمصنع من قبل معهد المصول واللقاحات واستعمل في التشخيص المجهري لبكتريا *Enterococcus* (Macfaddin 2000) .

2-1-7المحاليل و الدوارئ

2-1-7-1 محلول خزين تولريت البوتاسيوم Potassium tellurite stock solution

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

حضر هذا المحلول من اذابة (0.4) غم من مادة تولريت البوتاسيوم في (10) مل من الماء المقطر وعقمت في مرشح غشائي دقيق بقطر (0.22) مايكروميتر وحفظ في قنينة معقمة ومعتمة في درجة حرارة (4 م°) لحين الاستعمال. استعمل هذا المحلول في تحضير وسط (Potassium tellurite Blood agar).

2-7-1-2 المحلول الملحي الفسلجي Physiological saline solution

حضر باذابة (8.5) غم من كلوريد الصوديوم في لتر واحد من الماء المقطر وعقم بالموصدة ثم حفظ بدرجة حرارة (4 م°) لحين الاستعمال .

3-7-1-2 المحاليل المستخدمة في استخلاص DNA

*** دارئ الانزيم الحال Lysozyme buffer**

حضر باذابة 20 ملغم من دارئ Lysozyme في 1 مل من الماء المقطر وحفظ في درجة حرارة 20 م لحين الاستعمال (Conn and Stumpf, 1976) .

*** Ethanol 70%**

حضر باضافة 70 مليلترا من الكحول الاثيلي واكمل الحجم الى 100 مليلتر بأضافة الماء المقطر وحفظ في درجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال.

*** Ethanol 95 %**

حضر بأضافة 95 مليلترا من الكحول الاثيلي واكمل الحجم الى 100 مليلتر بأضافة الماء المقطر وحفظ في درجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال.

*** EDTA buffer 50 Mm**

استخدم محلول EDTA الجاهز والمصنع من قبل شركة Promega (USA).

4-7-1-2 المحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي وتصوير DNA المستخلص

*** Tris-Borate- EDTA buffer (TBE)**

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

حضر كالاتي: 100مليلتر من TBE (X10) + 900 مليلترا من الماء المقطر لنحصل على تركيز (1X) (Sambrook *et al.*, 1989).

Ethidium bromide dye *

حضرت صبغة الـ Ethidium bromide بتركيز 10 ملغم/مليلتر، وذلك بإذابة 1 غم من مسحوق الـ Ethidium bromide في 100 مليلتر من الماء المقطر ثم تحفظ بعيدا عن الضوء لحين الاستعمال (Maniaitis *et al.*, 1982).

Lodding dye buffer *

أذيب 0.25 غم من صبغة Bromophenol blue في 50 مليلترا من الماء المقطر المعقم ثم أضيف 30 مليلترا من الكليسرول واكمل حجم الماء المقطر الى 100 مليلتر (Sambrook *et al.,* 1989).

2-1-7-5 العدة الجاهزة لاستخلاص DNA (شركة Promega USA)

DNA Extraction Kit *

تحتوي العدة على المكونات التالية:

-Cell lysis solution
- Protein precipitation solution
- RNase A solution
- Nuclelysis solution
- DNA Rehydration solution

فضلا عن مكونات العدة استعملت المكونات الاتية:

- Ethanol 70%
- EDTA 50% Mm
- Isopropanol
- Lysozym 20 mg/ ml

2-1- 8 المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية لعزلات *E.faecalis* المعزولة من جذور الاسنان

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المضادات الحيوية	الرمز	التركيز (مايكروغرام/ قرص)	الشركة المصنعة والمنشأ
Augmentin	AMC	10	Bioanalyse (Turkey)
Cephalothin	KF	30	Bioanalyse (Turkey)
Ciprofloxacin	CF	5	Himedia (India)
Clindamycin	CM	2	Bioanalyse (Turkey)
Co-Trimoxazole	SXT	25	Bioanalyse (Turkey)
Gentamycin	G	10	Himedia (India)
Nitrofurantoin	F	300	Bioanalyse (Turkey)
Penicillin-G	P	10*	Bioanalyse (Turkey)
Rifampicin	RA	5	Bioanalyse (Turkey)
Streptomycin	S	10	Bioanalyse (Turkey)
Tetracycline	TE	30	Bioanalyse (Turkey)
Trimethoprim	Tr	5	Himedia (India)
Vancomycin	VA	30	Bioanalyse (Turkey)

* يعبر عن تركيز البنسلين بوحدة دولية (Unit/disc)

2-2 طرائق العمل Methods

1-2-2 جمع العينات Collection of samples

جمعت (100) عينة من المرضى المصابين بأخماج قناة جذر السن في اصابات ابتدائية لقناة الجذر واصابات ثانوية لقناة جذر السن ، المراجعين الى مركز اسنان النور، والكرامة، واليرموك، وكلية طب الاسنان/ جامعة بغداد، في بغداد، وللمدة ما بين (15-9-2013) الى (15-2-2014) ولأعمار تتراوح (10-50) سنة.

اثناء خضوع الاشخاص المصابين للعلاج يتم فتح قناة جذرالسن وبعد فتح وتنظيف قناة جذر السن تم ادخال الورقة الدقيقة عبر القناة المفتوحة لغرض امتصاص القيح الموجود في موضع

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الالتهاب، وتركت لمدة دقيقة كاملة داخل قناة جذر السن وقد تم جمع العينات عن طريق اخذ الورقة الدقيقة المستعملة لتجفيف القيح الموجود في مكان الخمج وزرعها مباشرة في الاوساط الزرعية المنتخبة.

2-2-2 عزل المكورات المعوية البرازية Isolation of *E. faecalis*

زرعت جميع العينات المأخوذة من الاشخاص المصابين بالتهاب جذر السن عن طريق نقل الورقة الدقيقة المستعملة لتجفيف القيح الموجود في مكان الخمج الى انبوبة معقمة سعة 10 مليلتر حاوية على 5 مليلترات من وسط (2xyt) المحضر حسب الفقرة (2-1-4-1) وتم ادخالها في الوسط باستعمال ناقل معقم قرب اللهب. ثم حضنت في درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة، ثم نقل جزء من النمو الى وسط (Azid Blood base Agar) الصلب المحضر تبعاً للفقرة (2-1-4) وحضنت الاطباق في درجة حرارة (37 مْ) لمدة (24-48) ساعة، وانتخبت المستعمرات المفردة وزرعت على وسط(Pfizer selective enterococci) المحضر وفق الفقرة (2-1-3) وحضنت الاطباق في درجة حرارة (37 مْ) لمدة (24-48) ساعة ، ثم نقلت هذه المستعمرات النامية الى وسط (MacConkey agar No.2) والمحضر تبعاً للفقرة (2-1-3) بطريقة التخطيط وحضنت في درجة حرارة (37 مْ) لمدة (24) ساعة.

3-2-2 تشخيص المكورات المعوية البرازية Diagnosis of *E. faecalis* :

1-3-2-2 تشخيص المستعمرات

شخص النمو مبدئيا على وسط (2xyt) وذلك عن طريق ظهور العكورة ، وظهور مستعمرات رصاصية مرتفعة قليلا ومكورة على وسط (Azid Blood base Agar) الصلب، وتحول لون وسط (Pfizer selective enterococci) من اللون الذهبي الى اللون الاسود

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وظهور مستعمرات لماعة مكورة ومرتفعة قليلا على الوسط ، كما ان ظهور مستعمرات وردية نقية على وسط (Macconkey agar No.2) يعد تشخيصاً مبدئياً.

2-2-3-2 الفحص المجهري Microscopic examination

عملت مسحات من المستعمرات النقية النامية على وسط (Pfizer selective enterococci) وذلك باخذ جزء صغير من المستعمرات النامية بوساطة ناقل معقم الى شريحة زجاجية وفرشت بشكل متجانس، وتركت لتجف ثم ثبتت وصبغت بصبغة غرام لملاحظة الشكل الخلوي وطبيعة اصطباغ البكتريا اتجاه صبغة غرام (Collee *et al*., 1996) .

2-2-3-3 الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

لغرض تشخيص العزلات البكتيرية على مستوى النوع اجريت الاختبارات الكيموحيوية المعتمدة وكالاتي:

2-2-3-3-1 فحص الكاتاليز Catalase test:

نقل جزء من النمو (بالناقل) من كل عزلة على شريحة زجاجية نظيفة واضيف لها قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين (3 %). ان ملاحظة تكون الفقاعات دلالة على ايجابية الفحص (Macfaddin, 2000).

2-2-3-3-2 فحص النمو في درجة حرارة (10 و45 م°)

Growth test in (10 &45 ºC) temperature

لقحت انابيب حاوية على وسط نقيع القلب والدماغ السائل (الفقرة 2-1-3) بواقع انبوبتين لكل عزلة بالمزارع السائلة للعزلات البكتيرية بعمر (24) ساعة بحجم لقاح (1 %) ثم حضنت

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

احداهما في درجة حرارة (10 م°) والاخرى في درجة حرارة (45 مْ) لمدة (24) ساعة ولوحظ النمو من خلال تكون العكرة (Holt *et al.,* 1994) .

2-2-3-3-3 فحص النمو بوجود (6.5 %) كلوريد الصوديوم

Growth in (6.5 %) sodium chloride

لقحت انابيب حاوية على وسط نقيع القلب والدماغ السائل والحاوي على (6.5%) كلوريد الصوديوم (2-1-4-4) بالمزارع السائلة للعزلات البكتيرية بعمر (24) ساعة وبحجم لقاح (1%)، ثم حضنت بدرجة حرارة (45 م°) لمدة (18-24) ساعة. لوحظ النمو من خلال تكون العكرة دلالة على ايجابية الفحص (Facklam & Wilkinson, 1981).

2-2-3-3-4 فحص قابلية البكتريا على النمو في الرقم الهيدروجيني (pH= 9.6)

The bacterial ability on growth in (pH= 9.6)

لقحت الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي الخاص بهذا الفحص (2-1-4-5) بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة (37 م°) لمدة (24) ساعة. ظهور النمو من خلال تكون العكرة دلالة على الفحص الموجب (Facklam *et al.*, 1999).

2-2-3-3- 5 فحص النمو بتركيز (0.04%) تولريت البوتاسيوم

لقح وسط الدم الصلب المضاف له مادة تولريت البوتاسيوم (2-1-4-6) بلقاح البكتريا المأخوذة من مزروع نقي بعمر (24) ساعة وحضنت بدرجة حرارة (37 م°) ولمدة (24) ساعة. يعد ظهور المستعمرات بلون اسود دلالة على قابلية العزلات على اختزال مادة التولريت الى (Tellurium) (Holt *et al.*, 1994) .

2-2-3-3-6 فحص تخمر السكريات والكليسيرول

Sugars and Glycerol fermentation test

لقحت الانابيب الحاوية على وسط التخمير (2-1-4-9) بالمزارع السائلة للعزلات البكتيرية

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وبحجم لقاح (1%) وحضنت الانابيب بدرجة حرارة (37 م°) لمدة(24) ساعة. تغير لون الوسط من الارجواني الى الاصفر دلالة على قابلية البكتريا على التخمر وانتاج الحامض (Atlas *et al.*, 1995).

2-2-3-4 التشخيص المصلي بطريقة لانسفيلد

Serological Identification Lancefield

استعملت العدة (Slidex Strepto –Kit) واجري الفحص حسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك بنقل (0.4) مل من انزيم الاستخلاص (Extraction enzyme) الى انبوب اختبار معقم ثم اضيف له (2-3) مستعمرة للسلالات المدروسة وبعمر (18-24) ساعة ومزجت ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة (37 م°) لمدة (10) دقائق، ثم اضيفت قطرة من المستخلص بعد الحضن بجانب قطرة اللاتكس (Latex D)(وهي عبارة عن جزيئات المطاط الأزرق المغلفة بالأجسام المضادة لأرانب مضاف اليها دارئ الفوسفات المعلق في 0.1٪ أزيد الصوديوم) في المكان المخصص للتفاعل على القطعة البلاستيكية ومزجت القطرتان بصورة جيدة وحركت القطعة البلاستيكية دائرياً. ان ظهور التلازن (Agglutination) بعد دقيقة واحدة يعد نتيجة موجبة (Collee *et al.*,1996).

2-2-3-5 تشخيص المكورات المعوية البرازية باستعمال Vitek 2

2-2-3-5- 1 خطوات تلقيح GP+ Card

– خطط وسط اكار نقيع القلب والدماغ والمضاف اليه 0.04 غم ازايد الصوديوم بعزلة البكتريا المراد تشخيصها، وحضن بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة.

– انتخبت احدى عزلات الطبق واخضعت لاختبار انتاج الكتاليز (توضع علامة سوداء على البطاقة في حالة ايجابية العزلة لهذه البكتريا).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- استعملت عزلات متشابهة مظهريا لتحضير لقاح يمثل العكرة القياسي مكفرلاند رقم (1) وهذا مايعادل المنطقة الزرقاء Blue zone الخاص بجهاز Vitek 2 وتم ذلك كالتالي:

أ- علم انبوب معقم بحجم 75 ×12 ملم برقم العزلة ونقل الى حامل الانابيب الخاص بالجهاز Vitek filling stand .

ب- بعد ازالة غطاء انبوبة الاختبار تم نقل 0.9 مل من محلول الملح الفسلجي المعقم ، وتخفيفه بما يعادل حجمه (اي 0.9 مل مرة اخرى) ماء مقطر معقم فأصبح الحجم الكلي آنذاك 1.8 مل وبتركيز 0.45% .

ج- لتحضير عالق من البكتريا قيد الدراسة نقل جزء من المستعمرات المتشابهة مظهريا والمشخصة تشخيص كيموحيوي والنامية في الاطباق وبأ ستعمال مسحات معقمة الى الانبوبة مع التحريك بشكل دوامة .

د- رفعت بعدها الانبوبة من حامل الانابيب الخاص بالجهاز وأعيد وضع الغطاء ورجت باستعمال المازج الدوار Vortex للحصول على عالق متجانس .

هـ- تم التأكد من ان العالق مماثل تماما لثابت العكرة القياسي، وللحصول على التركيز المطلوب اضيف حجم اضافي من اللقاح اومن محلول التخفيف (حسب الحاجة).

و- أعيدت الانبوبة الى حامل الانابيب

ز- نقلت البطاقة المتصلة بوحدة انبوب النقل (Card / transfer tube unit) المحمولة على حامل الانابيب والمرتبط بها أنبوبة النقل بجزئها الطويل مغمور في انبوبة الاختبار .

ح- نقل الحامل داخل الجزء المخصص لتلقيح البطاقات الذي يصطلح تسميته Filler داخل الجهاز حيث لقحت البطاقة فيه وتم التحري عن تلقيحها بصورة صحيحة وهي بداخله ، ثم اغلقت

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

البطاقة بازالة انبوبة النقل يدويا بأستعمال السداد بعدها نقلت البطاقات الى داخل Vitek reader incubator، لغرض التحضين وقراءة النتيجة فيما بعد .

عمل الجهاز خلال فترة التحضين على تحليل وخزن الانماط الكيموحيوية بصورة ذاتية، وبعد مدة التحضين حللت برمجيات الجهاز هذه الانماط وطبع تقرير التشخيص لكل بطاقة موجودة داخل Reader / Incubator .

2-2-3-5-2 التشخيص بقواعد البيانات GP+Card

يوفر مصممو البطاقة GP+Card قواعد بيانات خاصة، وبتحويل نسق ايض البكتريا تحت الاختبار الى رقم حيوي bionumber مكون من 10 ارقام (digital number10) تعمل الحاسبة المرتبطة بالجهاز على مقارنته معطية التشخيص السريع .

2-2-3-6 التشخيص الجزيئي لبكتريا المكورات المعوية البرازية

2-2-3-6-1 عملية استخلاص وقياس تركيز ونقاوة الـ DNA

استعملت العدة الجاهزة لاستخلاص الـ DNA الكلي والمصنعة في شركة (Promega USA) وتمت عملية الاستخلاص حسب تعليمات الشركة.

(Gram Posotive bacteria Protocol)

خطوات عملية استخلاص الـ DNA حسب تعليمات شركة(Promega) مع اجراء بعض التحويرات عليها:

1- اضيف 200 مليلتر من مزرعة بكتيرية منماة على وسط نقيع القلب والدماغ السائل ومحضونة لمدة 24 ساعة في انبوبة سعة 10 مليلتر وثم وضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقائق وبمعدل 16000 دورة / دقيقة. وذلك لترسيب الخلايا، ثم ازيل الراشح.

2- علقت الخلايا باضافة 480 ul من EDTA 50Mm .

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3- اضيف 120 ul من دارئ اللايسوزايم للعالق البكتيري، ومزجت جيدا باستعمال الماصة الدقيقة. الغرض من هذه الخطوة هو لتكسير الجدار الخلوي لتسهيل عملية تحليل الخلايا.

4- تم حضن الخلايا في درجة حرارة 37 مْ لمدة 90 دقيقة في الحمام المائي ، وبعد الحضن وضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقائق وبمعدل 16000 دورة/ دقيقة، وبعدها تم ازالة الراشح .

5- اضيف 600 ul من (Neuclei lysis solution) ومزج بلطف باستعمال الماصة الدقيقة حتى تصبح الخلايا بشكل عالق.

6 – حضن العالق في درجة حرارة 80 م لمدة 10 دقائق في الحمام المائي ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة الغرفة.

7- اضيف 3 ul من RNase A (محلول هضم الـ RNA) وحرك 2-5 مرات بلطف ليمتزج .

8- حضن المزيج في درجة حرارة 37 مْ لمدة ساعة. ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة الغرفة.

9- اضيف 200 ul من (Protein precipitation) للخلايا المنحلة المعاملة بـRNase A ومزج باستعمال المازج الدوار (Vortex) بأعلى سرعة ولمدة 20 ثانية.

10- حضن في الثلج لمدة 10 دقائق.

11- وضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقائق وبمعدل 16000 دورة / دقيقة .

12- نقل الراشح الى انبوبة جديدة ومعقمة سعة 1.5 ul حاوية على 600 ul من Isopropanol بدرجة حرارة 4 مْ.

13- مزج بعناية بوساطة التقليب حتى ظهرت شبكة DNA .

14- ثم وضع الخليط المتكون في جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقائق وبمعدل 16000 دورة / دقيقة لغرض ترسيب DNA.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

15- ازيل الراشح بعناية ونشف باستعمال ورقة تتشيف نظيفة ثم اضيف له 600 ul من الايثانول

70% بدرجة حرارة 4 م لغرض غسل DNA ومزج بعناية عدة مرات.

16- ثم وضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقائق وبمعدل 16000 دورة / دقيقة .

17- ازيل الراشح ونشف باستعمال ورق تنشيف وترك في الهواء ليجف لمدة 10 – 15 دقيقة.

18- اضيف 100 ul من (DNA Rehydration solution) للانبوبة لاعادة تميعDNA ، وحضن لمدة 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة.

19- خزن DNA في درجة حرارة -20 مْ.

* تم قياس تركيز ونقاوة الـ DNA باستخدام جهاز Nanodrop وذلك عن طريق اضافة قطرة من (DNA Rehydration solution) لتصفير الجهاز ثم اضافة قطرة من DNA فيقوم الجهاز بقياس تركيز ونقاوة الـDNA .

2-2-3-6-2 الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز Gel electrophoresis

تحضير الجل

*حضر جل الاكاروز بتركيز 1% وذلك لقياس تركيز ونقاوة الـ DNA المستخلص من البكتريا لإجراء تفاعل PCR. وحضر جل الاكاروز بتركيز 2% لكشف نواتج الـ PCR (Maniatis *et al.* ,1982) .

*حضر جل الاكاروز بوساطة اضافة 50 ملغم من الاكاروز في 50 مليلترا من TE buffer بتركيز 1x واذيب في (Microwave oven) لمدة دقيقة واحدة وترك ليبرد حتى درجة حرارة 50مْ.

* اضيف 0.5ul (10ملغم / مليلتر) من صبغة الاثيديوم بروميد Ethidum bromide للجل، ومزج جيدا ثم صب في القالب الحاوي على مشط وترك الوسط ليتصلب تماماً لمدة نصف ساعة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

* ثبت الصحن في المكان المخصص له في وحدة الترحيل الكهربائي. ثم ملئت وحدة الترحيل الكهربائي بال TE buffer بتركيز (1x)، على ارتفاع بحوالي 1 مليلتر.

* وضعت العينات في حفر الجل بعد مزج 7 ul من DNA المستخلص من العينات مع 3 ul من صبغة Loding dey.

* غطيت وحدة الترحيل الكهربائي وتم الترحيل الكهربائي في فولتية مقداره 50 Volt/ cm لمدة 30 دقيقة عند الكشف عن تركيز ونقاوة الدنا ، وتم الترحيل في فولتية مقدارها 60 Volt /cm عند الترحيل للكشف عن نواتج PCR وثم تم الكشف عن حزم الـ DNA تحت اشعة U.V في جهاز Wave length 302 nanometer .

2-2-3-6-3 تشخيص بكتريا المكورات المعوية البرازية بأ ستعمال تقنية PCR

استعملت تقنية الPCR لتشخيص بكتريا المكورات المعوية وذلك عن طريق استعمال بادئات ذات تسلسل متخصص موجود ضمن المادة الوراثية للبكتريا ، الذي يطابق جين 16 S Ribosomal RNA جدول (2-2) .

2-2-3-6-3-1 تخفيف البادئ

خفف البادئ اولا في 1مليلتر من TE buffer (pH 8.0) او (deionized dd H_2O sterile distilled water)، وحفظ كخزين (Stock) في درجة حرارة -20 مْ. ثم اخذ 100 ul من هذا الـ Stock وخفف في 1 مليلتر من dd H2O للحصول على10 Mm. مزج12.5ul (Master mix) الجاهز للـ PCR (Promega USA) مع3ul (50 ng) من DNA البكتريا و1 ul (10 Mm) من كلا من البادئ المختار (Forward and Reverse)، تم اختيار البادئ تبعاً لـ Cogulu *et al.* (2007) الجدول (2-3) ثم اكمل الحجم الى 25 ul بال dd H_2O الخالي من nuclease تبعاً لتعليمات الشركة.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

جدول (2-2) تتابع النيوكليوتيدي للبادئ المستخدم للكشف عن جين 16 S Ribosomal RNA.

Primer's name	Sequence (5\-3\)	Size (pb)
Enterococcus faecalis Forward (e.f F)	GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG	310
Enterococcus faecalis Reverse (e,f R)	CCG TCA GGG GAC GTT CAG	

.(Cogulu *et al.,* 2007)

+ 2-2-3-6-3-2 ظروف التفاعل

اجري التفاعل في جهاز Thermal cycler بعد اجراء تجارب عديدة لتحديد الظروف المثلى للتفاعل. وتم تطبيق البرنامج المذكور في الجدول (2-3).

جدول (2-3) ظروف تفاعل الـ PCR لبوادئ جيني e.f F, e.f R

Loop's steps	Tempretare	Time	Number of cycl
Initial denaturation	94 c°	3 min	1
Denaturation	94 c°	30 sec	35
Annealing	58 c°	1 min	
Extension	72 c°	40 sec	
Final extension	72 c°	5 min	1

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

2-2-3-6-3-3 التحري عن نواتج PCR باستعمال الترحيل الكهربائي

حللت عشرة ulات من النواتج المتضاعفة بوسطة الترحيل الكهربائي في 2% من جل الاكاروز الذي صبغ بأستعمال 0.5ul من صبغة الـ Ethidium promide في فولتية مقدارها 60 فولت ولمدة 30 دقيقة في 0.5 ul من TE buffer. ثم شوهد تحت ضوء الاشعة فوق البنفسجية. واستعمل DNA ladder (100-1000 pb) كمعلم (marker). ثم صور بوساطة الكاميرا الرقمية (Digital camera). عدت نتيجة التفاعل موجبة وذلك عند ظهور قطع من DNA في الجل ذات طول 310bp .

2-2-4 اوساط حفظ وادامة العزلات البكتيرية Maintenance media

2-2-4-1 الحفظ قصير الامد (1-4 اسابيع)

نميت العزلات على اكار نقيع القلب والدماغ المضاف اليه 0.04 غم ازايد الصوديوم والمحضر تبعا للفقرة (2-1-4-8) بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة. ثم حفظت بدرجة حرارة 4 م بعد ان لفت جيداً بالـ Parafilm و Aluminium foil لحين الاستعمال (Lopardo *et al.*, 1990) .

2-2-4-2 الحفظ متوسط الامد (1-3 شهراً)

نميت عزلات بكتريا *E. faecalis* على وسط نقيع القلب والدماغ المائل الصلب المضاف اليه 0.04 ازايد الصوديوم المحضر في (2-1-4-8)، وحضنت بدرجة حرارة (37 م°) لمدة (24) ساعة وحفظت بعدها في درجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال بعد ان لفت جيدا بـ Parafilm و Aluminium foil وكان يراعى تجديد هذه المزارع شهرياً (Lopardo *et al.*, 1990).

2-2-4-3 الحفظ طويل الامد Long period stock culture

لضمان الحفاظ على عزلات بكتريا *E. faecalis* لمدة طويلة نميت العزلات على انابيب حاوية على 5 مل من مرق نقيع القلب والدماغ المحضر تبعا للفقرة (2-1-3) بدرجة حرارة 37مْ

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

لمدة 24 ساعة. ثم وضع في انبوبة سعة 1.5 مل معقمة 0.5 مل من المرق الحاوي على العزلات واضيف له 0.5 مل من الكليسرول، وحفظت بدرجة حرارة -20مْ بعد ان لفت جيدا بالـ Parafilm لحين الاستعمال (Lopardo *et al.*, 1990) .

5-2-2 اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

Bacterial Antibiotic Sensitivity Test

استعملت طريقة (NCCL, 2002) لاختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية وعلى النحو الاتي:

1- لقحت انبوبة لكل عزلة تحوي 5 مل من مرق نقيع القلب والدماغ، حضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 4 ساعات للحصول على عكورة قياسية مساوية لعكورة انبوب ماكفرلاند رقم 5 الجاهز التي تعطي لقاحا" بكتيريا مقداره (1.5×10^{8}) خلية /مل.

غمرت مسحة قطنية معقمة ونظيفة (swab) بالوسط ثم ضغطت على الحافة الداخلية للأنبوبة للتقليل من العالق البكتيري، بعدها نشر بصورة متجانسة على سطح اطباق سعة (9ملم) حاوية على وسط مولر هنتون الصلب المحضر كما في الفقرة (2-1-3)، طبقين لكل عزلة.

تركت الاطباق لمدة 10 دقائق، ثم وزعت اقراص المضادات الحيوية على سطح الاكار وبواقع (7) اقراص لكل طبق واحد في الوسط وستة حوله (المسافة بين قرص وآخر حوالي 5 ملم) بوساطة ملقط معقم على سطح الوسط وضغط كلاً منها قليلاً لغرض التثبيت. حضنت الاطباق بعد ذلك في درجة حرارة (37 م°) لمدة (24) ساعة.

سجلت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر حول كل قرص وبالرجوع الى الجدول (2-4) تم تسجيل مقاومة او حساسية العزلات.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

جدول (2- 4) اقطار مناطق التثبيط للمضادات الحيوية بالمليلتر

المضاد	الرمز	قطر منطقة التثبيط بالمليلتر		
		حساسة	معتدلة	مقاومة
Augmentin	AMC	18≤	14-17	13≥
Cephalothin	KF	18≤	15-17	14≥
Chloromphenicol	C	18≤	14-17	12≥
Ciprofloxacin	CF	21≤	16-20	15≥
Clindamycin	CM	17≤	15-16	14≥
Co-Trimoxazole	SXT	19≤	17-18	16≥
Gentamycin	G	15≤	13-14	12≥
Nitrofurantoin	F	17≤	15-16	14≥
Penicillin-G	P	22≤	12-21	11≥
Rifampicin	RA	16≤		15≥
Streptomycin	S	15≤	13-14	12≥
Tetracycline	TE	19≤	15-18	14≥
Trimethoprim	Tr	18≤	13-17	12≥
Vancomycin	VA	12≤	10-11	9≥

(NCCL, 2002)

2-2-6 اختبارات الكشف عن عوامل الضرواة

Detection of Virulence Factors Tests

2-2-6-1 الكشف عن انتاج الهيمولايسين **Detection of Hemolysin Production**

لقح الوسط المحضر وفقا" للفقرة (2-1-4-3) بمستعمرة مفردة بطريقة التخطيط، حضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 18-24 ساعة، ثم سجل نوع التحلل وهي:

- تحلل نوع الفا: ظهور منطقة خضراء حول النمو (تحلل جزئي)
- تحلل نوع بيتا: ظهور منطقة شفافة حول النمو
- تحلل نوع كاما: عدم ظهور منطقة تحلل حول النمو (Cruickshank *et al*., 1975).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

2-2-6-2 اختبار تميؤ الجلاتين

لقح الوسط المحضر تبعاً للفقرة (2-1-4-10) بطريقة الطعن، وتركت انبوبة بدون تلقيح كسيطرة، ثم حضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة (18-72) ساعة، يعد تميؤ الجلاتين حتى بعد تركه لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4 مْ نتيجة موجبة مقارنة بالسيطرة التي تبقى متصلبة، (Collee *et al*., 1996).

2-2-6-3 الكشف عن انتاج البروتييز **Detection of Protease Production**

تم تنشيط العزلات على اكار نقيع القلب والدماغ بطريقة التخطيط، ثم حضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة. ثم نقل جزء من النمو على الوسط المحضر وفقا" للفقرة (2-1-4-11) بطريقة التخطيط، ثم حضنت الاطباق في درجة حرارة (37 مْ) لمدة (24) ساعة. ان تكون مناطق تحلل حول المستعمرات النامية دلالة على ايجابية الاختبار (Atlas *et al*., 1995).

2-2-6-4 الكشف عن انتاج اللايبيز **Detection of Lipase Production**

بعد تنشيط العزلات على وسط اكار نقيع القلب والدماغ وذلك بزرعها بطريقة التخطيط وحضنها بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة، نقل جزء من النمو على الوسط المحضر وفقاً للفقرة (2-1-4-12)، وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة، يعد ظهور منطقة ترسيب بيضاء حول النمو نتيجة موجبة (Rodina, 1972).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

2-2-7 التحري عن الجين المشفر لانتاج مستضد التهاب شغاف القلب في بكتريا المكورات المعوية البرازية باستخدام تقنية الـ PCR

2-2-7-1 تخفيف البادئ

خفف البادئ اولا في 1 مليلتر من (TE buffer (pH 8.0 او (deionized dd H_2O sterile distilled water)، وحفظ كخزين (Stock) في درجة حرارة -20 مْ. ثم اخذ 100 ul من هذا الـ Stock وخفف في 1 مليلتر من dd H_2O للحصول على البادئ بتركيز 10Mm .

تم استعمال 12.5 ul من العدة الجاهزة لتفاعل البلمرة والتي يطلق عليها (Master mix) (Promega USA) وتم مزجه مع 3 ul (50 ng) من DNA البكتريا و(10 Mm) 1ul من البوادئ المختارة تبعا لـ Forward & Reverse (Prethee *et al.*, 2012)، الجدول (2-5)، ثم اكمل الحجم الى 25 ul ddH_2O الخالي من nuclease تبعاً لتعليمات الشركة.

جدول (2-5) تسلسل البوادئ المستعملة للكشف عن الجين المشفر لانتاج efaA

Primer's name	Sequence (5'-3')	SIZE
efa A Forward (efa A F)	CCA ATT GGG ACA GAC CCT	688 bp
efa A Revers (efa A R)	CGC CTT CTG TCC TTC TTT GGC	

.(Prethee *et al.*, 2012)

2-2-7-2 ظروف التفاعل

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اجري التفاعل في جهاز Thermal cycler بعد اجراء تجارب عديدة لتحديد الظروف المثلى للتفاعل. وتم تطبيق البرنامج كما في الجدول (2-6):

جدول (2-6) ظروف تفاعل الـ PCR لبوادئ جيني efaA F, efaA R

Loop's steps	Tempretare	Time	Number of cycl
Initial denaturation	94 c°	3 min	1
Denaturation	94 c°	30 sec	35
Annealing	60 c°	1 min	
Extension	72 c°	40 sec	
Final extension	72 c°	5 min	1

3-7-2-2 الكشف عن نواتج الـ PCR بأ ستعمال الترحيل الكهربائي

حللت 10 ul من نواتج التفاعل بالترحيل الكهربائي في جل الاكاروز بتركيز (2%) الذي صبغ بأ ستعمال 0.5 ul من صبغة Ethidium promide في فولتية مقدارها 60 فولت ولمدة 45 دقيقة، في (0.5 x) TE buffer. ثم شوهدت النواتج تحت ضوء الاشعة فوق البنفسجية (U.V light). واستعمل DNA lader (50 bp) كمعلم(marker)، ثم صورت النتائج باستخدام الكاميرا الرقمية (Digital Camera).

عدت العينة ذات تفاعل موجب (اي حاوية على الجين) عند ظهور قطع DNA في الجل بطول 688 pb.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

النتائج و المناقشة

Result & Discussion

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

3- النتائج والمناقشة Results & Discussion

1-3 عزل بكتريا المكورات المعوية البرازية وتشخيصها

Isolation and diagnosis of *E. faecalis*

تم التحري عن بكتريا المكورات المعوية البرازية *E. faecalis* في (100) عينة جذر سن مأخوذة من مرضى مصابين بالتهاب قناة جذر السن، إذ تم اخذ (70) عينة من الاصابات الابتدائية لقناة الجذر، و (30) عينة من الاصابات الثانوية لقناة الجذر (اعادة العلاج). واجريت الدراسة لعينات معزولة من اناث وذكور وكان عدد الاناث المشمولات بالدراسة (76) ، اما عدد الذكور فكان (24)، ومن فئات عمرية مختلفة تتراوح بين (10-50 سنة) ومن المرضى المراجعين للمراكز الصحية المشمولة بالدراسة ملحق (1)، وامكن الحصول خلال الدراسة على (32) عزلة بكتيرية تعود الى النوع *E. faecalis*.

1-1-3 التشخيص الزرعي Cultural diagnosis

شخصت بكتريا المكورات المعوية البرازية زرعياً اعتماداً على صفات المستعمرات من شكل وحجم ولون وقوام المستعمرات، إذ يعد تحول لون وسط (2xyt) الى اللون الابيض وظهور العكورة دلالة على وجود نمو بكتيري في الوسط ويعد هذا الوسط جيدا لنمو البكتريا بسبب احتوائه على مستخلص الخميرة التي توفر المواد الغذائية الضرورية لنمو البكتريا مثل الكاربون، والكبريت، وفيتامين B، وظهرت مستعمرات هذه البكتريا على وسط Azide blood base الصلب ذات شكل دائري محدب قليلاً وذي حافة ملساء بيضاء او كريمية اللون، اذ يعد هذا الوسط جيداً للعزل الاولي للبكتريا وهو ذو كفاءة عالية في عزل بكتريا المكورات المعوية من العينات المرضية لاحتوائه على مادة ازايد الصوديوم (Sodium azide) التي تثبط نمو الانواع

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المختلفة من البكتريا السالبة لصبغة غرام والسماح للبكتريا الموجبة لصبغة غرام بالنمو عليه (Facklam & Teixeira, 1997)، بينما ظهرت المستعمرات على وسط Pfizer selective enterococcus الصلب لماعة وحولت لون الوسط الى اللون الاسود بسبب قابليتها على تحليل الاسكولين بوجود املاح الصفراء وشطره الى الكلوكوز واسكيولتين (Esculetin)، وان انتشار الاخير في الاكار واتحاده مع الحديد في مركب Ferric ammonium citrate يكون معقداً يعطي اللون الاسود للوسط (الشكل 3-1)، وان احتواء هذا الوسط على املاح الصفراء ومادة ازايد الصوديوم قد ساعد على تثبيط نمو المسبحيات المحللة للاسكولين التي تعود للمجموعة المستضدية (D) والانواع المختلفة من البكتريا السالبة لصبغة غرام مما يميز هذا الوسط ويجعله من الاوساط الاساسية في تشخيص المكورات المعوية عن الانواع الاخرى من غير المكورات المعوية التابعة للمجموعة المستضدية نفسها (Himedialalabs.com/TD/M787.pdf). في حين ظهرت المستعمرات صغيرة الحجم، ملساء، دائرية الشكل ووردية اللون على وسط المكونكي الصلب (NO.2) وذلك لقدرتها على تخمير سكر اللاكتوز، واكد نتائج العزل الاولي لهذه البكتريا كونه من الاوساط الانتخابية اذ يثبط نمو البكتريا الموجبة لصبغة غرام باستثناء المكورات المعوية لمقاومتها لأملاح الصفراء وصبغة البلورات البنفسجية (Murray *et al.*, 1999; Huycke *et al.*, 1998). واظهرت النتائج الحصول على (45) عزلة تعود لبكتريا المكورات المعوية (19) عزلة من الاصابات الابتدائية لقنوات جذر السن و (26) عزلة من الاصابات الثانوية لقنوات الجذور، وبالعودة الى الملحق رقم (1) يلاحظ ان العزلات المعزولة من الاصابات الابتدائية لقنوات الجذور توزعت الى (14 عزلة من الاناث وهي العزلات (5 ، 8، 14، 15، 17، 18، 31 ، 47 ، 55 ، 61 ، 66 ، 69 ، 73 ، 74) و 5 عزلات من الذكور وهي العزلات (10 ، 27 ، 48 ، 50 ، 72) الجدول (1-3)).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وتوزعت العزلات المعزولة من الاصابات الثانوية لقنوات الجذور الى (18 عزلة من الاناث وهي العزلات (1 ، 13 ، 22 ، 23 ، 26 ، 33 ، 35 ، 38 ، 52 ، 53 ، 57 ، 58 ، 68 ، 75 ،79 ، 82 ، 90 ، 91) و 8 عزلات من الذكور وهي العزلات (19 ، 30 ، 40 ، 41 ، 43 ، 51 ، 65 ، 87)) وشخصت تلك العزلات على انها تعود لبكتريا المكورات المعوية اعتماداً على الصفات المظهرية والزرعية. ويلاحظ من نتائج الدراسة الحالية ان نسبة الاصابة في الاناث كانت اعلى وقد يكون السبب ان نسبة الاناث المشمولات بالدراسة كانت اعلى من نسبة الذكور، وبفئات عمرية متفاوتة. كما يلاحظ من الجدول (3-1) ان نسبة العزلات كانت اعلى في الاصابات الثانوية لقنوات الجذور ولاسيما في الاعمار التي تتراوح ما بين (25–50) سنة، على الرغم من ان نسبة العينات المأخوذة من الاشخاص المصابين بالتهاب جذور الاسنان بعد فشل العلاج كانت اقل من العينات المأخوذة من الاشخاص المصابين بالتهاب قنوات الجذور الابتدائية، وذلك بسبب صعوبة الحصول على تلك العينات. كما يلاحظ عند العودة الى الملحق رقم (1) ان نسبة الاصابة في الاسنان الخلفية كانت اعلى من نسبة الاصابة في الاسنان الامامية وقد يعود السبب في ذلك الى ان الاسنان الخلفية تكون مساحتها السطحية اكبر وبذلك فانها تكون عرضة للاصابات البكتيرية اكثر من الاسنان الامامية.

جدول (3–1) نتائج العزل الاولي لبكتريا المكورات البرازية المعتمدة على التشخيص الزرعي

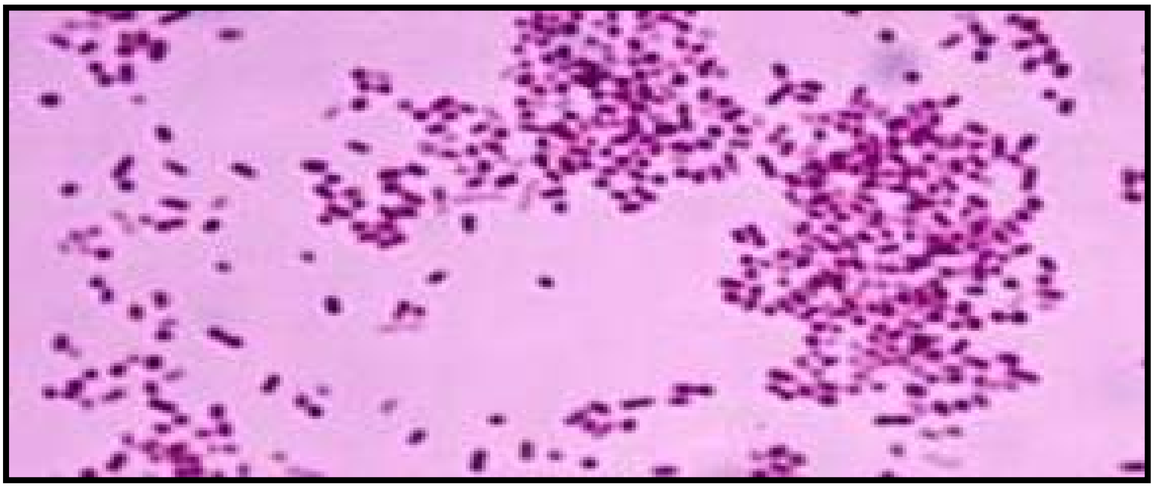
نوع الاصابة	عدد العزلات	النسبة المئوية
الاصابات الابتدائية	19	% 42.2
الاصابات الثانوية	26	% 57.7

3-1-2 التشخيص المجهري Microscopic diagnosis

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اظهر الفحص المجهري لمسحات محضرة من المزروع البكتيري للمستعمرات النامية على وسط (Pfizer selective enterococci) الصلب والمصبوغة بصبغة غرام بانها خلايا كروية مفردة او بيضوية متطاولة احياناً او على شكل ازواج في احيان اخرى او تظهر بشكل سلاسل قصيرة وموجبة لصبغة غرام وغير مكونة للسبورات (شكل3-2).(Forbes *et al*., 2002).

شكل (3-1) نمو بكتريا *E. faecalis* على وسط Pfizer selective enterococci



شكل (3-2) شكل مجهرية لبكتريا المكورت المعوية ماخوذة من الوسط الزرعي Pfizer selective enterococcus مصبوغة بملون غرام.

3-1-3 الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اجريت الفحوصات الكيموحيوية للعزلات النامية على الاوساط الانتقائية استناداً الى الفحوصات الكيموحيوية المعتمدة والواردة في (Murry, 1999;Holt *et al.* ,1994; Forbes *et al*., 2002 ;Macfaddin ,2000) وذلك لتشخيص المكورات المعوية الى مستوى النوع واستبعاد الانواع البكتيرية الاخرى التي تتشابه معها في بعض الصفات.

اظهرت (24) عزلة من العزلات عدم قدرتها على انتاج انزيم الكاتاليز الذي يعمل على تحرير غاز الاوكسجين من بيروكسيد الهيدروجين بشكل فقاعات غازية، الا ان لها القدرة على النمو بدرجات حرارية تتراوح ما بين (10-45 م°)، والنمو في وسط ذي رقم هيدروجيني قاعدي يصل الى (pH=9.6)، والنمو في وسط سائل ذي تركيز ملحي (6.5%) من كلوريد الصوديوم، وتعد هذه التفاعلات الكيموحيوية المفتاح التشخيصي لجنس المكورات المعوية التي تميزها عن بقية المسبحيات التابعة للمجموعة المستضدية (D) التي ليس لها القدرة على النمو في مثل هذه الظروف (Macfaddin, 2000).

شخصت عزلات المكورات المعوية الى مستوى النوع اذ اظهرت نتائج الدراسة الحالية كما مبين في الجدول (3-2) و(ملحق 2) عائدية (24) عزلة بكتيرية الى النوع *E. faecalis* (6 عزلات من الاصابات الابتدائية لقنوات الجذور و18 عزلة من الاصابات الثانوية لقنوات الجذور.

اظهرت جميع العزلات الـ (24) فحصاً موجباً لاختبار النمو في وسط توليرت البوتاسيوم حيث كانت جميع العزلات مقاومة لـ (K2Teo3 0.04) واعطاء مستعمرات سوداء اللون لاختزل الK2Teo3 الى Tellurium اما الانواع الاخرى فتنمو بشكل بطئ بشكل مستعمرات رمادية او بيضاء او لا تتمكن من النمو(Cown ,1974)، وتميزت جميع العزلات بعدم قدرتها على انتاج كبريتيد الهيدروجين وغير متحركة (Facklam *et al*.,1999).

اظهرت العزلات تبايناً في قابليتها على تخمير السكريات المختلفة والكليسيرول، ففي الوقت الذي اظهرت فيه جميع عزلات المكورات المعوية البرازية القدرة على تخمير سكر المانيتول،

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

السوربيتول، الرايبوز، والسكروز، والكليسيرول، وكانت غير مخمرة للارابينوز، الرافينوز، والانيولين، وتعد قدرة بكتريا المكورات المعوية البرازية على تخمير سكر السوربيتول والكليسيرول وعدم قدرتها على تخمير سكر الارابينوز من الصفات التشخيصية والتفريقية لهذا النوع عن الانواع الاخرى ولاسيما النوع *E. faecium*، (Manero & Blanch,1999; Facklam & Collins,1989).

يلاحظ من نتائج التشخيص الكيموحيوي للدراسة الحالية ان نسبة عزلات بكتريا المكورات المعوية البرازية كانت عالية في اصابات جذور الاسنان حيث وجدت بنسبة (24 %).

وجاءت نتائج الدراسة الحالية متفقة مع نتائج دراسة Cogulu *et al.* (2007) إذ وجد في دراسته عن البحث عن وجود بكتريا المكورات المعوية البرازية في قنوات الجذور الملتهبة بالطرائق الزرعية ومقارنتها مع التشخيص الجزيئي حيث وجد انها كانت موجودة بنسبة (26 %) وذلك باستعمال طرائق التشخيص الزرعية والكيموحيوية التقليدية.

كما كان من الملاحظ ان نسب العزلات في الاصابات الثانوية لقنوات الجذور كانت اعلى من نسبة العزلات في الاصابات الابتدائية حيث كانت النسبة في الاصابات الابتدائية (6 %) اما النسبة في الاصابات الثانوية فكانت (18%).

اتفقت هذه النتائج جزئيا مع نتائج دراسة Gomes *et al.* (2006) حول التحري عن تواجد بكتريا *E. faecalis* في قنوات الجذور الاسنان بالطرائق الزرعية وطريقة PCR حيث وجد انها تشكل نسبة (4 %) من الاصابات الابتدائية لقنوات الجذور، ونسبة (42%) من الاصابات الثانوية لقنوات الجذور وذلك عند تشخيصها بالطرائق الكيموحيوية التقليدية.

بينما وجدت الدركزلي (2003) عند دراستها للأحياء المجهرية الملوثة لجذور الاسنان ان بكتريا المكورات المعوية البرازية كانت تشكل نسبة (9 %) من تلك الاحياء.

جدول (3-2) الاختبارات التشخيصية والكيموحيوية للعزلات المحلية لبكتريا *E. faecalis*

الاختبارات	(24) Isolates *E. faecalis*

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الكاتاليز	−
الحركة وانتاج H_2S	−
النمو بدرجة حرارة (10-45 م°)	+
النموفي تركيز ملحي NaCl(6.5%)	+
النمو في الرقم الهيدروجيني القاعدي (pH=9.6)	+
النمو بوجود املاح التولريت(0.04%)	+
انتاج الحامض من السوربتول	+
المانيتول	+
الارابينوز	−
الانيولين	−
الرافينوز	−
السكروز	+
الرايبوز	+
الكلسيرول	+

+ الاختبار موجب ، − الاختبار سالب

3-1-4 تشخيص بكتريا المكورات المعوية بأستعمال جهاز Vitek 2

Identification of *Enterococcus* species by Vitek 2

خضعت جميع العزلات المشخصة زرعيا (45) التي شخصت بالطرائق الزرعية والكيموحيوية للتشخيص باستعمال جهاز Vitek 2, وذلك لتأكيد التشخيص الكيموحيوي للعزلات، وقد اظهرت النتائج الحصول على (20) تعود لنوع المكورات المعوية البرازية.

تطابقت نتائج التشخيص باستعمال جهاز Vitek 2 مع نتائج التشخيص الكيموحيوي في 20 عزلة، بينما لم تتفق النتائج في 4 عزلات (16.6%) اذ تم الحصول على (20) عزلة تعود لنوع *E. faecalis* (وهي العزلات (17، 27 ، 31 ، 47، 55) المعزولة من الاصابات

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الابتدائية لجذور الاسنان ، والعزلات (1، 13، 19 ، 26، 38 ، 53، 52 ، 57، 58 ، 67، 68، 75، 82 ،90 ، 91) المعزولة من الاصابات الثانوية لجذور الانسان كما وردت في الملحق (1).

وجاءت نتائج الدراسة الحالية متقاربة مع نتائج دراسة Garcia-Garrote *et al.*(2000) إذ وجد ان نتائج تشخيص المكورات المعوية باستعمال جهاز Vitek2 قد اختلفت مع نتائج التشخيص الكيموحيوي بنسبة (13%) واتفقت معها بنسبة (87%) من العزلات.

وبشكل عامة يعد نظام Vitek2 نظام سهل وسريع لتشخيص الانواع الاكثر شيوعا لبكتريا المكورات المعوية وبدقة معقولة، إذ يتم الحصول على النتائج خلال (4-15) ساعة، وكذلك الكشف عن مقاومتها للمضادات الحيوية، ولكنه يحتاج الى مزيد من التحسين في دقته في التشخيص، وتفسير النتائج. ومن اهم مزايا هذا النظام هو اختصار الوقت الذي سيكون له اثر ايجابي على سير العمل في مختبرات علم الاحياء المجهرية السريرية.

3-1-5 التشخيص المصلي بطريقة لانسفيلد

Serological identification Lancefield

يعد التشخيص المصلي بطريقة لانسفيلد من الفحوصات المهمة في تشخيص بكتريا *Enterococcus* على الرغم من عدم احتواء بعض انواعها على المستضد (D) ولا سيما نوع المكورات المعوية البرازية التي قد تخلو بعض سلالاتها من هذا المستضد (Manero & Blanch,1999).

يمتاز هذا الفحص بكونه حساساً وسهلاً ويعتمد مبدأ الاختبار على امكانية التصاق المستضد الكربوهيدراتي المستخلص من الجدار الخلوي للبكتريا مع الاجسام المضادة النوعية (Collee *et al.*, 1996)، وأظهرت جميع عزلات المكورات المعوية البرازية المشخصة كيموحيويا (24) قيد الدراسة استجابة موجبة لهذا الفحص، اذ اعطت جميعها تفاعلاً موجباً مع مجموعة (D) من العدة التشخيصية لفحص لانسفيلد المناعي عن طريق ظهور التلازن.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3-1-6 التشخيص الجزيئي لبكتريا المكورات المعوية البرازية

3-1-6-1 استخلاص الـ Chromosomal DNA

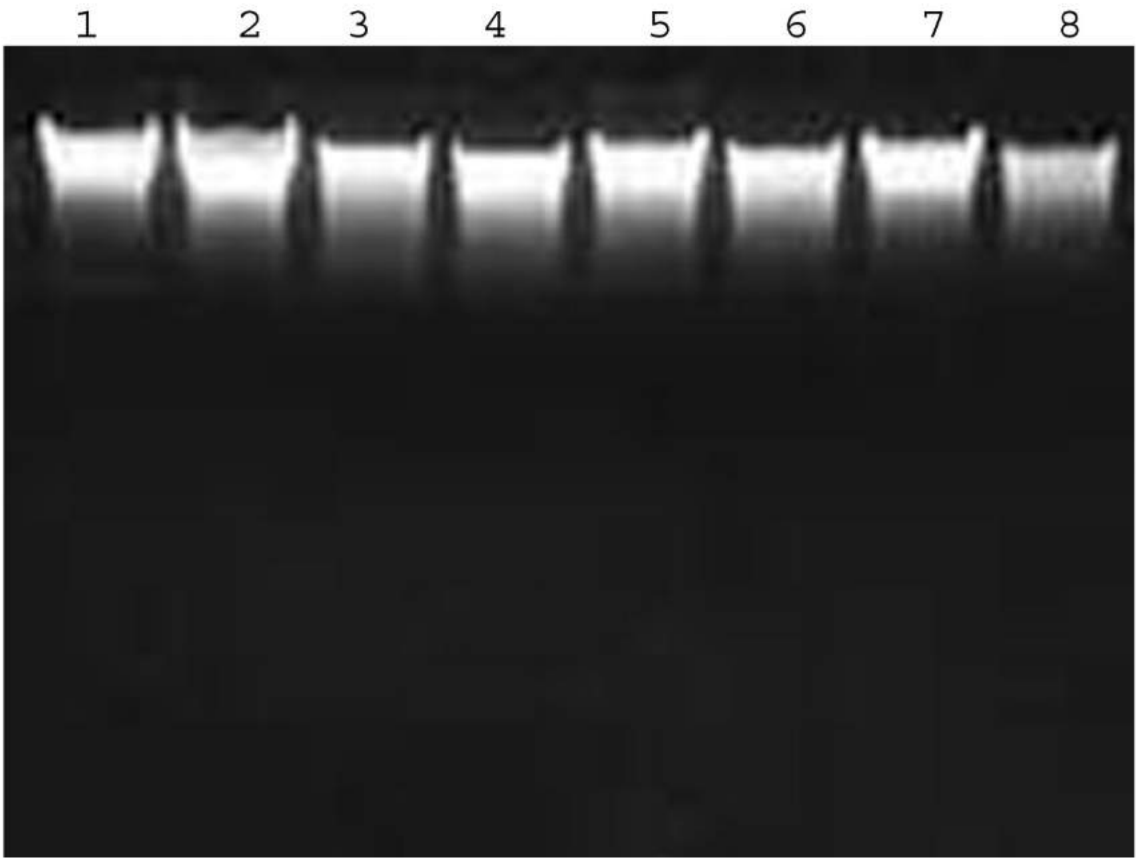
لقد تم استخلاص ال DNA لجميع العزلات النامية على الاوساط التفريقية، لغرض التحري عن وجود بعض الجينات (16sr RNA, efaA) بأستعمال تقنية PCR. وقد استعمل Genomic DNA Extraction kit (Promega USA) في استخلاص الـ Total DNA (كل التفاصيل ذكرت في الفقرة 2-2-3-7-1) وذلك بسبب سهولة استعماله، وتوفره، وكفاءته في الاستخلاص (2012) Mahdi *et al.*. لقد تم استعمال وسط مرق نقيع القلب والدماغ (brain heart infution broth) في تنمية البكتريا المراد استخلاص الـ DNA منها حيث وجد انه من افضل الاوساط المستعملة في تنمية البكتريا للحصول على كثافة نمو كبيرة مقارنة مع بقية الاوساط ومن ثم الحصول على كمية جيدة من DNA عند الاستخلاص (Woodford & Alan, 1998).

يعد تركيز اللايسوزايم وطول مدة الحضن من الخطوات المهمة في عملية الاستخلاص، إذ تم تجربة تراكيز مختلفة من اللايسوزايم (20 , 15 , 10) ملغم / لتر ومدة حضن من (60- 120) دقيقة في درجة حرارة 37 مْ، وكانت افضل النتائج عند استعمال اللايسوزايم بتركيز 20 ملغم/مللتر، ومدة حضن 90 دقيقة (Conn & Stumpf, 1979).

ان وجود السكروز في المحلول يوفر ضغطاً ازموزيا عاليا من الخارج ويمنع طبقة السفيروبلاست من الانفجار. ثم بعد ذلك تم قياس نقاوة وتركيز الـ DNA باستعمال جهاز النانو دروب، وكان تركيز الـ DNA للعزلات (300-1000ngl/ul) والنقاوة (1.7-1.8). كما تم ترحيل DNA المستخلص على هلام الاكاروز (1%) والشكل (3-3) توضح نقاوة وتركيز الـ DNA حيث تظهر ان الـ DNA المرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1% لتأكيد قياس نقاوة

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وتركيز DNA المستخلص حيث ان زيادة تألق الصبغة تحت الاشعة فوق البنفسجية يشير الى ان DNA المستخلص كان عالي النقاوة والتركيز.



الشكل (3-3) الترحيل الكهربائي للDNA المستخلص من بكتريا *E. faecalis* لفحص النقاوة والتركيز.

تركيز هلام الاكاروز 1%

فرق الجهد:50 فولت، المدة : 30 دقيقة .

3-1-6-2 التشخيص الجزيئي لبكتريا المكورات المعوية البرازية باستعمال تقنية PCR

Molecular Identification of *E. faecalis* by PCR technique

لقد تم استعمال تقنية PCR assay لتشخيص جميع العزلات (45) التي نمت على الاوساط التفريقية والمعزولة من الاصابات الابتدائية والثانوية لجذور الاسنان، والتي تم تشخيصها مسبقا بالاعتماد على الطراز المظهري للبكتريا بالطرائق الزرعية والطرائق الكيموحيوية التقليدية، وباستعمال جهاز Vitek 2.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

إذ تم تشخيص (24) عزلة تعود لنوع المكورات المعوية البرازية وذلك بالاعتماد على الطرائق الكيموحيوية بالتشخيص، وشخصت 20 عزلة تعود لبكتريا *E. faecalis* وذلك عند تشخيصها بجهاز Vitek2 الذي استعمل لغرض مقارنة النتائج وتأكيد التشخيص، وأظهرت نتائج التشخيص الجزيئي المعتمدة على الطراز الوراثي للبكتريا ان (32) عزلة من العينات المشخصة تعود لنوع المكورات المعوية البرازية الجدول (3-3) .

الجدول (3-3) الاختلافات في اعداد عزلات بكتريا *E. faecalis* عند تشخيصها بالطرائق الزرعية والطرائق الكيموحيوية والتشخيص بنظام Vitek2 والتشخيص الجزيئي.

التشخيص / اعداد العزلات	التشخيص الزرعي	التشخيص الكيموحيوي	التشخيص بجهاز الـ Vitek2	التشخيص الجزيئي بال PCR
الاصابات الابتدائية لقنوات الجذور	19	6	5	13
الإصابات الثانوية لقنوات الجذور	26	18	15	19
المجموع	45	24	20	32

وأستعمل بادي‌ءالجين التشخيصي للبكتريا 16srRNA لتشخيصها بتقنية الـ PCR assay لتأكيد التشخيص . يعمل البادئ على الارتباط بقالب الـ DNA وتضخيم القطعة المطلوبة منه. وقد تم الحصول على (32) عزلة تعود لنوع *E. faecalis*، (13) عزلة (18.5%) من الاصابات الابتدائية لقناة جذر السن Primary root canal infection و (19) عزلة (63.3 %)من الاصابات الثانوية لقناة جذر السن Secondary root canal infection الجدول (3-4). يلاحظ من النتائج وجود المكورات المعوية البرازية بنسبة مرتفعة (32 %) في اصابات جذور الاسنان، واظهرت نتائج التشخيص الجزيئي اختلافاً واضحاً عن النتائج التي تم الحصول عليها

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

باستعمال الطرائق الكيموحيوية في التشخيص. إذ تم العثور على نسبة اعلى من العزلات وذلك يؤكد اهمية الاعتماد على الطرائق الجزيئية في التحري عن الاحياء المجهرية في اصابات الفم (Siqueira & Rôças, 2005).

الجدول (3-4) اعداد ونسب عزلات المكورات المعوية البرازية المعزولة من اصابات جذور الأسنان وفقاً لنتائج التشخيص الجزيئي.

نوع اصابة جذر السن	عدد العزلات	النسبة المئوية
الاصابة الابتدائية للجذر	13 عزلة من 70 عينة	(%18.5)
الاصابة الثانوية للجذر	19عزلة من 30 عينة	(%63.3)

يلاحظ من الجدول ان هناك اختلاف واضح بين اعداد ونسب عزلات المكورات المعوية المعزولة من الاصابات الابتدائية والإصابات الثانوية لجذور الاسنان، حيث تم جمع عينات اكبر من الاصابات الابتدائية مع ذلك تم الحصول على اعداد اقل من العزلات المشخصة بانها تعود لنوع المكورات المعوية البرازية، وكان السبب في ان اعداد العينات التي جمعت من الاصابات الثانوية كانت اقل هي كون هذه الاصابات تكون اقل حدوثاً لذلك كان من الصعب الحصول عليها بعض الشيء، وعلى الرغم من ذلك كانت اعداد العزلات التي تم الحصول عليها من الاصابات الثانوية اعلى، وذلك يشير الى ان بكتريا المكورات المعوية البرازية واحدة من اهم الانواع البكتيرية اللاهوائية الاختيارية المسببة لإصابات جذور الاسنان.

كما يلاحظ من نتائج الدراسة الحالية ان هناك اختلافات في اعداد البكتريا التي شخصت بعائديتها لنوع المكورات المعوية البرازية عند تشخيصها بطرائق التشخيص التي تعتمد على الطرز المظهرية وطرائق التشخيص التي تعتمد على الطرز الجينية، إذ ان نتائج التشخيص الكيموحيوي

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وجدت ان 24 عزلة من اصل من 100 تعود لنوع المكورات المعوية البرازية، بينما اشارت نتائج التشخيص باستعمال نظام Vitek2 الى ان هناك 20 عزلة فقط تعود لنوع المكورات المعوية البرازية، بينما وجدت نتائج التشخيص المعتمدة على الطرز الجينية ان 32 عزلة من الـ (100) المعزولة من جذور الاسنان تعود لنوع المكورات المعوية البرازية، واكدت جميع الطرائق المستعملة في تشخيص بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من جذور الاسنان في الدراسة الحالية الى ان نسبة وجود تلك البكتريا كانت اعلى في الاصابات الثانوية لجذور الاسنان.

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه Cogulu *et al.* (2007) في دراسته عن التحري عن نسبة تواجد بكتريا المكورات المعوية البرازية في قنوات الجذور الأسنان الملتهبة وذلك عن طريق تشخيصها باستعمال طرائق التشخيص الزرعية والكيموحيوية التقليدية وباستعمال تقنية الـ PCR إذ وجد بانها كانت متواجدة بنسبة (26%) عند تشخيصها بالطرائق الزرعية في حين وجد عند تشخيصها بطريقة الـ PCR انها تشكل نسبة (35%).

كما اتفقت هذه النتائج جزئيا مع نتائج دراسة Gomes *et al.* (2006) حول التحري تواجد بكتريا *E. faecalis* في قنوات الجذور الاسنان بالطرائق الزرعية وطريقة الـ PCR إذ وجد انها تشكل نسبة (4%) و (82%) في الاصابات الابتدائية لقنوات الجذور و(42%) و(76%) في الاصابات الثانوية لقنوات الجذور عند استعمال الطرائق الزرعية والكيموحيوية التقليدية وتقنية الـ PCR في التشخيص على التوالي.

وجاءت هذه النتيجة متفقة مع نتائج Selcuk *et al.* (2009) إذ اوضح في دراسته حول التحقق من وجود بكتريا *E. faecalis* في الإصابات الابتدائية والثانوية لقنوات جذور الاسنان باستعمال real time PCR في تركيا إذ اثبت ان هذه البكتريا توجد بنسبة اعلى في الاصابات الثانوية لقنوات الجذور وكانت تشكل نسبة (74.4%) في الاصابات الثانوية لقناة جذر السن وبنسبة (25%) في الاصابات الابتدائية لقناة جذر السن.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة Wang *et al.* (2011) إذ اثبت تواجد بكتريا *E. faecalis* بنسبة (19 %) في اللعاب ونسبة (38 %) في جذور الاسنان لاشخاص يحتاجون لاعادة العلاج لقناة الجذر المصابة بالتهاب دواعم السن.

واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة Tennert *et al.* (2014) حيث وجد ان بكتريا *E. faecalis* تشكل نسبة (33%) من الاصابات الثانوية لقنوات الجذور وذلك عند دراسته في التحري عن الانواع البكترية الموجودة في الاصابات الابتدائية والثانوية لجذور الاسنان.

كما اتفقت نوعا ما مع Zoletti *et al.* (2006) إذ اثبتوا ان بكتريا *E. faecalis* توجد بنسبة (80%) في الاصابات الثانوية لجذور الاسنان. كما اثبتوا Fouad *et al.* (2004) في دراسته حول التحري عن وجود المكورات المعوية في قنوات الجذور المقاومة للعلاج ان بكتريا *E. faecalis* هو النوع الوحيد الذي يكون متواجدا في قناة جذر السن، وكانت تشكل نسبة (22%).

في حين لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما جاء به Gomes *et al.* (2006) إذ اثبتوا في دراستهم عن تشخيص بكتريا *E. faecalis* المعزولة من جذور الاسنان باستعمال الطرائق الزرعية، وطريقة الـ PCR حيث وجد انها كانت تشكل نسبة (82%) في الاصابات الابتدائية لقناة جذر السن و(76%) في الاصابات الثانوية لقناة جذر السن. وأشار Dumani *et al.* (2012) في احدى دراساته الى وجود بكتريا المكورات المعوية البرازية بنسبة (16%) في الاصابات الابتدائية لقناة جذر السن، وبنسبة (10%) في الاصابات الثانوية لقناة الجذر.

كانت تقنية الـ PCR اسهل الطرائق، واقل استهلاكا للوقت (إذ يتطلب الاستخلاص حوالي 6 ساعات والتشخيص بالجهاز 3 ساعات والترحيل 30 دقيقة)، وأكثر كفاءة في التشخيص مقارنة بالتشخيص بالطرائق الكيموحيوية وجهاز Vitek2 التي تعتمد على الطرز المظهرية في التشخيص.

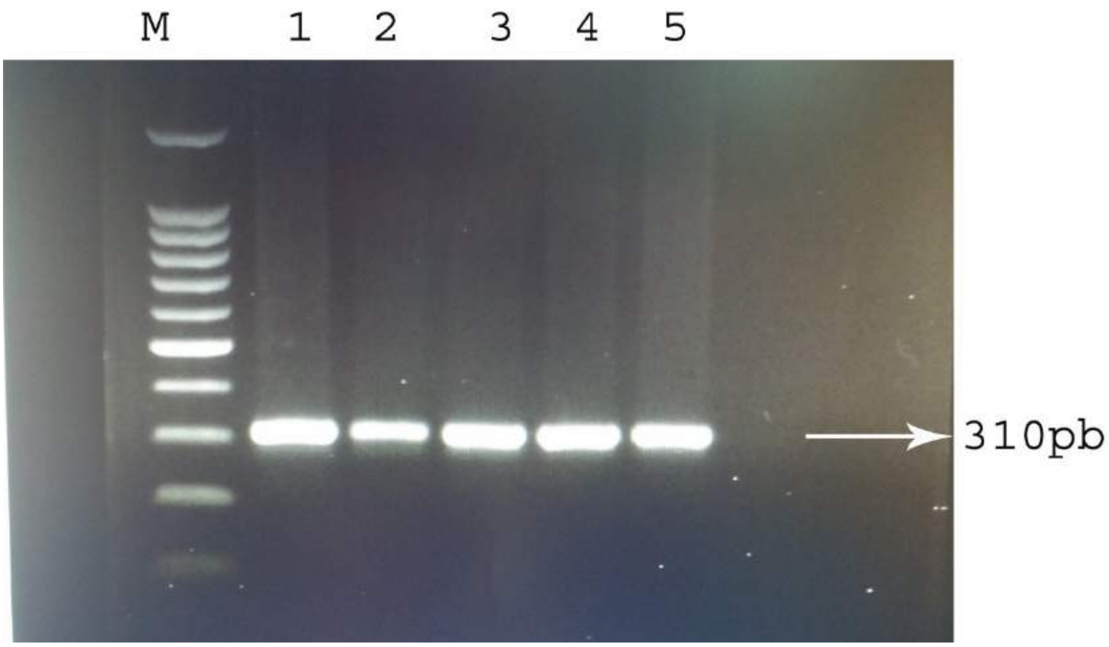
المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

لقد تم استعمال جين 16srRNA المتخصص في تشخيص البكتريا، وذلك عن طريق استخدام البواديء المتخصصة لهذا الجين والتي تم اختيارها تبعا لـ Cogulu *et al.* (2007) فلقد استعمل تسلسل محدد من الحمض النووي البكتيري والذي يسمى جين الـ 16sr RNA في تشخيص البكتريا وذلك لكونه عالي الثبات وغير قابل للتغير مع مرور الزمن لذلك فأنه يعد معياراً ذهبياً في التصنيف حيث انه استعمل ومنذ فترات طويلة في دراسة العلاقات التطورية في البكتريا (Wose *et al.*, 1977). وفضلاً عن ثباته العالي فان جين الـ 16sr RNA يحتوي على مناطق عالية التغاير بين الانواع البكتيرية وبذلك فانه يوفر تسلسلاً خاصاً بكل نوع من الانواع البكتيرية التي يستفاد منها في تشخيص الانواع البكتيرية (Kolbert & Persing , 1999).

ونتيجة لذلك اصبح تسلسل جين الـ 16sr RNA البديل الاسرع والأرخص في تشخيص الانواع البكتيرية بالمقارنة مع الطرائق المعتمدة على الطرز المظهرية في تشخيص البكتريا (Pereira *et al.,* 2010).

تم التحري عن القطع التي تم تضخيمها بالـ PCR وذلك بالترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بتركيز 2%، المصبوغ ببرومايد الاثيديوم، بفرق جهد مقداره 60 فولت لمدة 30 دقيقة حيث ظهرت القطع المضخمة من DNA بشكل حزم في الجل بطول 310 pb وصورت تحت ضوء الاشعة فوق البنفسجية الشكل (3-4).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



الشكل (3-4) الترحيل الكهربائي لنواتج التشخيص الجزيئي بالـ PCR في هلام الاكاروز تركيز %2 فرق الجهد : 60 فولت، الوقت : 30 دقيقة

من 1-5 هي عينات موجبة للتشخيص بالـ PCR

Ladder (100 pb) : M

3-2 حساسية عزلات بكتريا *E. faecalis* للمضادات الحيوية

Sensitivity of *E. faecalis* isolates to antibiotics

اختبرت حساسية (32) عزلة محلية من بكتريا *E. faecalis* المشخصة وراثياً بوساطة PCR اتجاه (14) نوعاً من المضادات الحيوية المختلفة، وحددت حساسية أو مقاومة العزلات لتلك

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المضادات بالاعتماد على قياس قطر منطقة تثبيط النمو (ملم) حول أقراص المضادات المستعملة وقورنت النتائج مع ما ورد في (NCCLs, 2002).

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (3-1) و(الملحق 3) والجدول (3-4) ان هناك تبايناً في مقاومة العزلات قيد الدراسة اتجاه المضادات المستخدمة، جاءت نتائج مقاومة البكتريا لمجوعة البيتالاكتام متباينة ، اذ كانت نسبة مقاومة العزلات لمضاد Pencillin G (%15.6) وهذه العزلات هي (13، 16، 19، 20، 27) الملحق (3) وبالعودة الى الملحق (1) نلاحظ إن تلك العزلات جميعها معزولة من إصابات ثانويةً ، كما نلاحظ إن جميع تلك العزلات أخذت من إصابات الأسنان الخلفية. وكانت جميع العزلات مقاومة لمضاد Cephalothin اي نسبة المقاومة (%100) وكانت نسبة العزلات المقاومة لمضاد (%81.25) Augmentin .

تمتلك بكتريا الكورات المعوية مقاومة ذاتية لمضادات البيتالاكتام وان هذه المقاومة تمنح البكتريا مستويات تحمل غير اعتيادية لهذه المضادات (Donskey *et al*., 2003; Brooks *et al*., 2004). وان المقاومة الذاتية لبكتريا *Enterococcus* اتجاه مضادات البيتالاكتام تحدث نتيجة لامتلاك العزلات المقاومة لبعض البروتينات الرابطة للبنسلين Pencillin (Binding Proteins PBPs) ولاسيما ذات الوزن الجزيئي الواطئ التي تكون ذات الفة واطئة للارتباط بهذه المضادات، او حدوث طفرات وراثية تؤدي الى تغيير في الفعالية الوظيفية لهذه البروتينات، اذ وجد ان النوع *E. faecium* ذات انتاجية عالية لمثل هذه (PBPs) ولاسيما النوع (PBP_5) وتكون ذات مقاومة عالية لجميع مضادات البيتالاكتام (Williams *et al*.,1998).

جاءت هذه النتائج مقاربة لنتائج العديد من الدراسات التي اشارت الى ارتفاع نسبة المقاومة لهذه المجموعة نتيجة الاستعمال المتزايد والعشوائي ولاسيما للجيلين الثاني والثالث لهذه المجموعة من المضادات في علاج الاصابات المتسببة عن المكورات المعوية وغيرها من البكتريا فضلا عن

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

استعمالـها كمحفزات نمو في اغذية الحيوانات الحقلية (JeliasZewics *et al.*, 2000; Brooks *et al.*, 2001).

في حين لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة الطائي (2007) إذ وجدت الباحثة ان جميع عزلات *E. faecalis* كانت حساسة للمضاد Pencillin G، في حين كانت نتائج مقاومة البكتريا لمضاد Cephalothin بنسبة (81 %) ومضادAugmentin بنسبة (66%) وهذه النتائج تتفق مع نتائج الدراسة الحالية وقد يرجع سبب الاختلاف في النسب الى اختلاف مصادر العزل واختلاف البيئات التي تم عزل البكتريا منها.

كما اظهرت عزلات المكورات المعوية مقاومة عالية اتجاه مجموعة الامينوكلايكوسايد اذ كانت جميع عزلات *E. faecalis* مقاومة لمضاد Streptomycin (100%) ونسبة المقاومة (90.6%) لمضاد Gentamicin، تمتلك المكورات المعوية مقاومة ذاتية واطئة اتجاه الامينوكلايكوسايد والناتجة عن فقدان البكتريا لانزيمات السايتوكروم الضرورية لتوليد الطاقة التي تعمل على نقل المضاد الى داخل الخلية، الا ان الالية الاكثر شيوعا هي تحوير مضادات الامينوكلايكوسايد بوساطة انزيمات خاصة، ان مقاومة المكورات المعوية ولاسيما النوع *E. faecalis* لمضادات Aminoglycosides قد اخذت بالتزايد في الآونة الاخيرة، وقد يعزى السبب الى وجود عدد من البلازميدات الاقترانية التي لها القابلية على التشفير لمقاومة عدد من المضادات الحيوية مثلاً البلازميد (pMQ252) الذي يوفر المقاومة لمضادات Gentamycin وQuinolones وStreptomycin وChloramphenicol) (Martinez *et al.*, 1998)، فضلا عن امتلاكها لانزيمات محورة لمضادات الامينوكلايكوسيدات (Aminoglycosides modyfing enzymes) التي تحدث تغييراً في تركيب هذه المضادات مما يفقد المضاد فاعليته، وتتوسط هذه الانزيمات بلازميدات اقترانية، وقد تحدث المقاومة بسبب حصول طفرات وراثية مؤدية الى تغيير بسيط في نفاذية الاغشية (Cetinkaya *et al.*,2000; Brooks *et al.*, 2001).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وجاءت نتائج الدراسة الحالية متطابقة جزئيا مع دراسة الطائي (2007) حيث وجدت الباحثة ان جميع العزلات المحلية لبكتريا *E. faecalis* كنت مقاومة للـ Streptomycin في حين كانت نسبة المقاومة للـ (90 %) Gentamycin. كما اوضح Arias *et al.* (2003) امتلاك المكورات المعوية مقاومة عالية ضد Streptomycin مقارنة بمضاد Gentamicin.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية مقاومة عزلات المكورات المعوية لمضادVancomycin بنسبة (15.6%) العائد لمجموعة الكلايكوببتيدات وكانت العزلات المقاومة لهذا المضاد هي العزلات ذاتها التي قاومت Pencillin G وهي العزلات (13، 16، 19، 20، 27) إذ اظهرت هذه العزلات مقاومتها لجميع المضادات الحيوية التي استعملت في الدراسة الحالية، وتقاوم المكورات المعوية مجموعة الكلايكوببتيدات بوساطة تصنيع بادئات كلايكان مغايرة ومن ثم اختزال الفة الربط (Shephard & Gilmore, 2002; Jelajaszewicz *et al.*, 2000).

اتفقت نتائج الدراسة الحالية نسبيا مع ما توصلت اليه الخفاجي (2005) إذ اشارت ان عزلات بكتريا المكورات المعوية البرازية قد قاومت مضاد Vancomycin بنسبة (9 %) . في حين وجد Lins *et al.* (2013) ان 9 عزلات من اصل 20عزلة لبكتريا المكورات المعوية البرازية كانت مقاومة لمضاد Vancomycin .

ولم تتفق الدراسة الحالية مع ما توصلت اليه بعض الدراسات المحلية والتي أوضحت ان بكتريا المكورات المعوية كانت حساسة بنسبة (100%) لمضاد Vancomycin (السعدي، 2007؛ الطائي 2007).

لوحظ انتشار المقاومة لمضاد Vancomycin في كل من اوربا وأمريكا نتيجة شيوع استخدام هذا المضاد في العديد من الحالات، فضلا عن استعمالها كمحفزات للنمو في اغذية الحيوانات الحقلية فقد تم عزل العديد من السلالات المقاومة من خروج الحيوانات لاسيما الخنازير والدواجن (Brooks *et al.*, 2001).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اما بالنسبة لمقاومة بكتريا *E. faecalis* لمضاد ciprofloxacin الذي ينتمي لمجموعة الكوينولون فكانت (62.5%). تكتسب *E. faecalis* المقاومة لمجموعة كوينولونز بوساطة حدوث طفرات في جين *gyrA* المسؤول عن انتاج وحدة Gyrase وفي الجين *Cpar* المسؤول عن انتاج وحدة Topoisomerase C (Muranaka & Greenwood, 1988) .

وكانت نتائج الدراسة الحالية متقاربة مع دراسة الباحثة الرماحي (2003) التي بينت ان عزلات*E. faecalis* المعزولة من حالات الاسهال كانت مقاومة لمضاد Ciprofloxacin إذ بلغت (70%). كما جاءت هذه النتيجة متقاربة مع نتائج دراسة محلية اجريت من قبل السعدي (2007) حيث حصلت على عزلات مقاومة بنسبة 81% لمضاد ciprofloxacin، وحصلت الطائي (2007) على عزلات مقاومة للمضاد بنسبة 90% وقد يعود هذا التزايد في المقاومة الى الاستعمال المتزايد لمضادات هذه المجموعة في علاج العديد من الاصابات المتسببة عن عائلة Enterobacteriaceae او البكتريا غير الهوائية او اتجاه المكورات المعوية التي تمتلك مقاومة طبيعية او حساسية واطئة، ممكن ان يقود الى تزايد المكورات المعوية المسببة للإصابات الحادة ذات المقاومة المتعددة من المضادات (Huycke *et al.*, 1998).

وقد اظهرت عزلات بكتريا المكورات المعوية مقاومة لمضاد Tetracycline العائد لمجموعة التتراسايكلين بنسبة (100%). تقاوم بكتريا المكورات المعوية مجموعة التتراسايكلين بآليتين: هما الية ضخ المضاد خارج الخلية، وبوساطة حماية الرايبوسوم بتغيير الهيأة ومن ثم منع ارتباط المضاد (Murray, 1990).

جاءت هذه النتيجة متفقة مع نتائج مع بعض الدراسات المحلية والعالمية حيث حصل Hayes *et al.*, (2003) على عزلات مقاومة بنسبة 94 % وجاءت هذه النتائج متفقة لما توصل اليه الباحثون السعدي (2007) إذ حصلت على عزلات مقاومة بنسبة 89%، في حين اشارت دراسة الباحث Dupre *et al.* (2003) الى ان نسبة المقاومة لعزلات هذه البكتريا المعزولة من

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

حالات سريرية مختلفة لمضادات Tetracycline قد بلغت (73%) وجاءت هذه النتائج متفقة جزئياً مع ما توصلنا اليه في الدراسة الحالية وقد تعود اسباب الاختلاف الى اختلاف مصدر العزل وكذلك اختلاف الموقع الجغرافي .

كما وقد اظهرت بكتريا المكورات المعوية مقاومة واطئة لمضاد Chloramphenicol بنسبة (21.8%) وكانت العزلات المقاومة هي (13، 16، 19، 20، 24، 27، 32) وجميع العزلات المقاومة قد عزلت من اشخاص يعانون من الاصابة الثانوية لقناة الجذور وباعمار مختلفة. تقاوم المكورات المعوية مضاد Chloramphenicol بوساطة انتاج انزيم acetyl transferase CMP الذي يعمل على مجموعة الهيدروكسيل لـ CMP مع الية ضخ المضاد الى خارج الخلية. (Huycke *et al.*, 1998; Murray, 1990). كانت هذه النتيجة متقاربة مع ما حصلت عليه الطائي (2007) اذ حصلت على عزلات مقاومة لمضاد Chloramphenicol بنسبة (15%)، كما قد حصلت الطائي على نسبة مقاومة (44 %).وممكن ان تعزى قلة المقاومة لهذا المضاد الى قلة استعماله في علاج الاصابات والمزارع.

كما اظهرت جميع عزلات المكورات المعوية مقاومة لكل من مضادي Clindamycin و Trimethoprim بنسبة (100 %) ونسبة مقاومة (90.6 %) لمضاد Co-trimoxazole، بينما كانت نسبة مقاومة العزلات لمضاد Nitrofuranitoin هي (25 %).

تكتسب المكورات المعوية عوامل خارجية (Exo gene) التي تساعد البكتريا على المقاومة لمضاد Trimethoprim (Brooks *et al.*, 2001; Murray, 1990) . كانت نتائج هذه الدراسة متطابقة جزئيا مع دراسة السعدي (2007) اذ حصلت الباحثة على عزلات كانت مقاومة بنسبة (100 %) لكل من مضادات Clindamycin و Trimethoprim و Co-trimoxazole وكانت جميع العزلات حساسة بنسبة (100 %) لمضاد Nitrofuranitoin، كما قد تطابقت جزئيا ايضا مع نتائج دراسة الطائي (2007) إذ كانت جميع العزلات في دراسة الباحثة مقاومة لمضادي

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Cephalothin و Trimethoprim وبنسبة مقاومة (91%) لمضاد Co-trimoxazole، وكانت المقاومة لمضاد (17 %) Nitrofuranitoin .

اظهرت عزلات المكورات المعوية في الدراسة الحالية مقاومة لمضاد Rifampicin بنسبة (87.5%)، وتحصل المقاومة نتيجة لحدوث طفرة تؤدي الى تغيير في تركيب انزيم RNA polymerase ومن ثم تقل الفة الارتباط (Brooks *et al.*, 2004). وكانت هذه النتيجة مقاربة لنتائج السعدي (2007)، اذ كانت جميع عزلات المكورات المعوية التي حصلت عليها الباحثة مقاومة لهذا المضاد الحيوي اي بنسبة مقاومة (100%). وحصلت الطائي (2007) على نسبة مقاومة (68 %). يلاحظ من الملحق (3) ان جميع عزلات المكورات المعوية بشكل عامة ذات مقاومة للعديد من المضادات، اذ ان بعض العزلات مقاومة لجميع المضادات الحيوية وهي العزلات (13، 16، 19، 20، 27) التي جمعت جميعها من اشخاص مصابين بالتهاب قناة جذر السن بعد العلاج (الاصابة الثانوية لقناة جذر السن وباعمار تنحصر بين (25– 43) سنة، وبعض العزلات مقاومة لـ 12 مضاداً من اصل 14 مضاداً وهي العزلة (32) وهي معزولة من ايضا من شخص مصاب بالتهاب قناة الجذر بعد العلاج، وهذا يتفق مع نتائج العديد من الدراسات المحلية والعالمية، إذ حصلت الطائي (2007) على عزلات كانت مقاومة لـ 14 مضاداً من اصل 16 مضاد،اشارت دراسة Hayes *et al.* (2004) الى امتلاك بكتريا المكورات المعوية صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ولاسيما النوعين *E. faecalis* و *E. faecium*، اذ انتشرت المقاومة المتعددة بشكل كبير بين عزلات النوع *E. faecalis* لمضادات Tetracycline و Erythromycin، في حين كانت المقاومة المتعددة بين عزلات *E. faecium* اتجاه مضادات Penicillins و Quinolones .

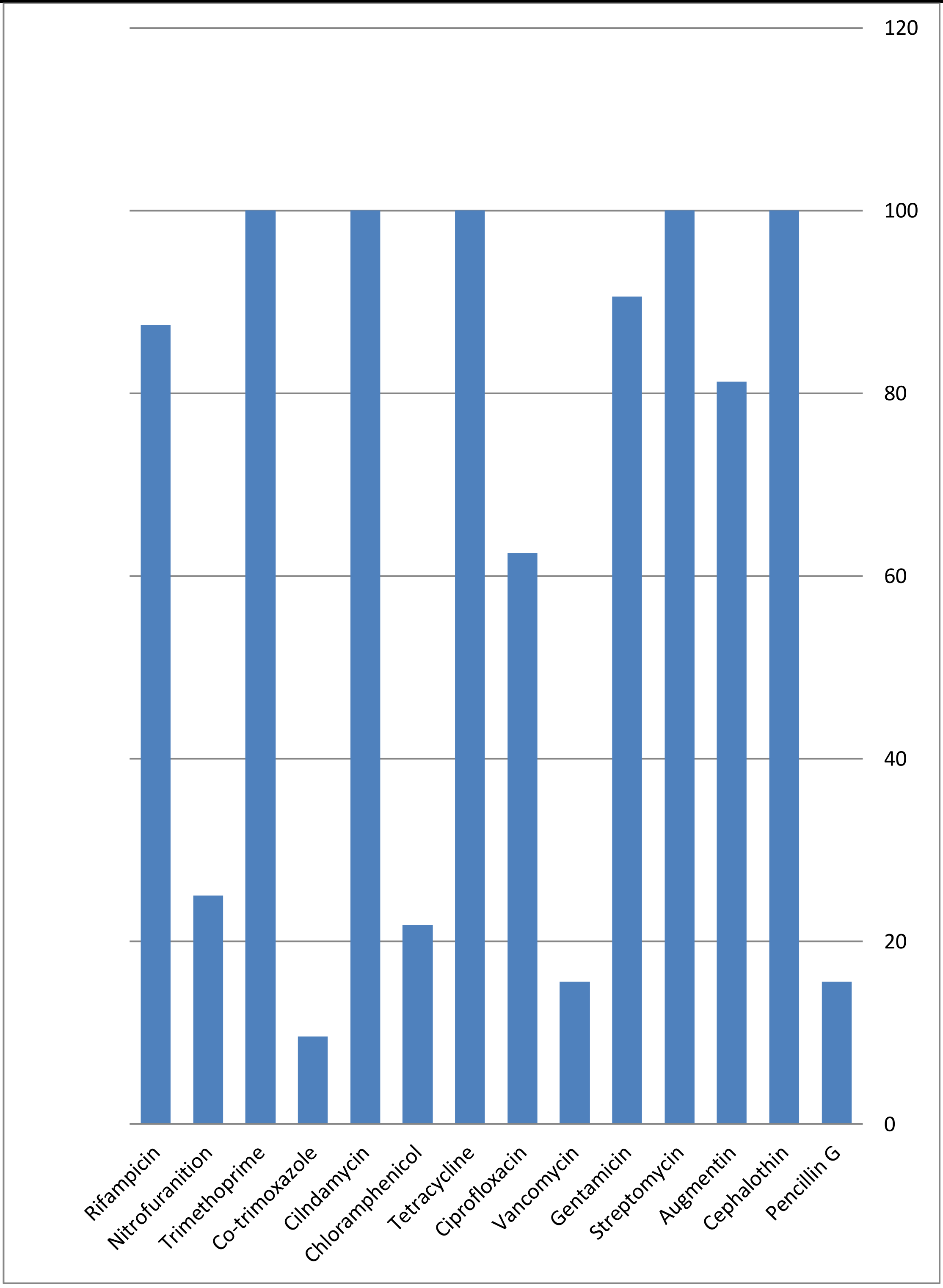
المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

جدول (3-5) اعداد بكتريا المكورات المعوية البرازية المقاومة للمضادات الحيوية والنسبة المئوية للمقاومة.

نوع المضاد الحيوي	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية لمقاومة العزلات
Augmentin	26	%81.25
Cephalothin	32	% 100
Chloramphenicol	7	% 21.8
Cilndamycin	32	% 100
Ciprofloxacin	20	% 62.5
Co-trimoxazole	29	% 90.6
Gentamycin	29	% 90.6
Nitrofuranitoin	8	% 25
Pencillin G	5	% 15.6
Rifampicin	28	% 87.5
Streptomycin	32	% 100
Tetracyclin	32	% 100

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Trimethoprime	32	% 100
Vancomycin	5	% 15.6



شكل (3-5) النسب المئوية لمقاومة عزلات *E. faecalis* للمضادات الحيوية المختبرية

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

3-3 الكشف عن عوامل الضراوة Detection of Virulence Factors

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان بكتريا المكورات المعوية البرازية تمتلك بعض عوامل الضراوة، كما موضح في الجدول (3-6).

عوامل الضراوة	عدد العزلات الموجبة	النسبة المئوية (%)
انزيم البروتييز	24	75
انزيم اللاييز	8	25
انزيم الهيمولايسين	16	50
انتاج الانزيم الحال للهلام	5	15.6

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

1-3-3 الكشف عن انتاج الانزيم الحال للبروتين

Detection of protease production

اعطت (24) عزلة من(32) عزلة (75%) لنوع المكورات المعوية البرازية نتيجة موجبة لهذا الفحص، حيث لاحظنا من الجدول (3-4) ان اغلب العزلات كانت قادرة على انتاج الانزيم وهذه العزلات هي (حسب ورودها في الملحق 1) (1، 5 ، 10، 13، 14، 15، 17، 18، 19، 23، 30 ، 38 ، 47، 52، 53 ، 65، 67، 68 ، 73 ، 74، 75، 82، 87، 91) وهذه العزلات كما يلاحظ من الملحق (1) انها تعود لأشخاص من اعمار مختلفة لكلا الجنسين ومن اصابات ابتدائية وثانوية، اما العزلات الاربعة التي اعطت نتيجة سالبة لهذا الفحص فهي (حسب ورودها في الملحق(1)) (31، 50 ، 55، 66) فكانت جميعها معزولة من الاصابات الابتدائية لجذور الاسنان . وتم قراءة النتيجة بتكون مناطق شفافة حول المستعمرات.

تطابقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة Furumura *et al.* (2006) التي بينت مدى مقدرة العزلات على الانتاج اذ بلغت (24) عزلة (75%) من (32) عزلة لهذه البكتريا كانت منتجة للبروتييز. واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه Kobayashi *et al.* (1986) ، الذي اشار الى ان (24) عزلة (96%) من عزلات *E. faecalis* و(175) عزلة (88%) من مجموع (25) و(200) عزلة التي عزلت من حالات التجرثم الدموي، والتهاب المجاري البولية منتجة للبروتييز على التوالي.

كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع بعض الدراسات المحلية حيث وجدت الباحثة الطائي (2007) في دراستها على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة ان (34) عزلة من (47) عزلة (72.3%) من العزلات كانت قادرة على انتاج الانزيم. واتفقت نتائج الدراسة الحالية نسبيا مع ما توصلت اليه السعدي (2007) حيث وجدت الباحثة في دراستها على

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من الادرار ان (96.3%) من العزلات ابدت قدرتها على انتاج انزيم البروتييز.

اشار الباحث Coque *et al.* (1995) الى اهمية هذا الانزيم في احداث بعض الاخماج وعدّهُ احد عوامل الضراوة في هذا النوع البكتيري، اذ عزلت سلالات منتجة له بنسبة (68%) من مرضى يعانون من التجرثم الدموي، كما بينت دراسة الباحث Verges *et al.* (2002) ان (141) عزلة (64%) من مجموع (219) عزلة للنوع *E. faecalis* كانت منتجة للبروتييز، وأوضحت نتائج دراسة Sedgley *et al.* (2005) بأن (69%) من عزلات هذا النوع منتجة للإنزيم، وجاءت هذه النتائج مقاربة الى نتائج الدراسة الحالية.

تشير اغلب الدراسات والأبحاث الى ان جميع الانواع التابعة لجنس المكورات المعوية هي غير منتجة لإنزيم البروتييز، الا ان بعض سلالات المكورات المعوية البرازية تستطيع ان تنتج هذا الانزيم، وهو صفة مميزة لهذا النوع تميزه عن الانواع الأخرى التابعة لهذا الجنس (Pillai *et al.*, 2000; Eaton & Gasso, 2000).

وأشارت دراسة Jett *et al.* (1995) الى الاهمية الطبية لهذه الانزيمات في البكتريا التي تمتلكها، اذ بينت دراسة لكلونة الجينات ان العزلات الفاقدة لهذا الانزيم وغير الممرضة اصبحت ممرضة بعد الكلونة، كما اكدت الدراسات الحديثة ل Archimbaud *et al.*(2002) على ان انتاج انزيم البروتييز يعد صفة شائعة بين عزلات *E. faecalis* المرضية والمعزولة بنسبة (86-75)% مقارنة بالأنواع المتعايشة والمعزولة من البراز التي بلغت نسبة الانتاج فيها (40%) .

3-5-2 الكشف عن انتاج الانزيم الحال للدهون Detection of lipase production

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اظهرت النتائج ان (8) عزلات (25%) من النوع *E.faecalis* كانت ايجابية لهذا الاختبار وهي العزلات (1، 35، 41، 50، 53، 66، 68، 91) (كما وردت في الملحق رقم 1) ونلاحظ عند العودة الى الملحق رقم (1) ان اغلب العزلات التي اعطت نتيجة موجبة للاختبار كانت معزولة من الاصابات الثانوية لقنوات جذر السن ولكلا الجنسين ومن اعمار مختلفة، وتم قراءة النتيجة بتكون مناطق معتمة او مضببة حول المستعمرات النامية على وسط ران الصلب.

لوحظ هذا الانزيم لأول مرة بين عزلات المكورات المعوية البرازية المعزولة من التربة من قبل الباحث Kar *et al.* (1996) ، ولوحظ ايضاً بين عزلات هذه البكتريا المعزولة من مرضى يعانون من حالات التهاب التجرثم الدموي من قبل الباحث Elsner *et al.* (2000) ، الذي وجد ان (31) عزلة (35%) من مجموع (89)عزلة للنوع *E. faecalis* كانت منتجة لإنزيم اللايبيز، كما اشار الباحث Hallgren *et al.* (2001) الى ان بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من الجلد والأنسجة الرطبة لها القدرة على انتاج الانزيم بنسبة واطئة، وجاءت هذه النتائج مقاربة الى نتائج الدراسة الحالية، بينما اشارت دراسة Furumura *et al.* (2006) الى النسبة العالية لإنتاج هذه الانزيم بين عزلات هذه البكتريا المعزولة من حالات سريرية مختلفة التي بلغت (23) عزلة (71.9%) من مجموع (35) عزلة من بكتريا *E. faecalis*، وبينت هذه الدراسة الاهمية الكبيرة لهذه الانزيمات في احداث الاصابات المختلفة والناتجة عن هذا النوع من البكتريا.

واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع الدراسة المحلية التي قامت بها السعدي (2007) على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من الادرار حيث حصلت على 7 عزلات من 24 عزلة (26%) قادرة على انتاج الانزيم.

بينما لم تحصل الباحثة الطائي (2007) في دراستها المحلية على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة على اي عزلة منتجة لهذا الانزيم.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وأشار الخفاجي (2005) (بوساطة الطائي، 2007) ان نسبة عزل هذا الانزيم واطئة جداً في العراق بين عزلات بكتريا *E. faecalis*، وان هذا الإنزيم كشف عنه لأول مرة من بين عزلات هذا النوع في العراق، اذ تم الحصول عليه من عزلتين (6%) احداهما عزلت من حب الشباب والأخرى من الاذن الوسطى .

3-3-3 الكشف عن انتاج الانزيم الحال للدم

Detection of haemolysin production

تؤكد نتائج الدراسة الحالية الموضحة في الجدول (3-4) ان عدد العزلات التي اظهرت تحللاً للدم على وسط الدم الاسس (Blood base agar) الصلب كانت (16) عزلة من (32) عزلة من المكورات المعوية البرازية اي بنسبة (50%)، منها (7) عزلات (21.87) اظهرت تحللاً كاملاً للدم من نوع بيتا (β-haemolysis)) وهي العزلات (10، 40، 52، 53، 65، 68، 87) كما وردت في الملحق رقم 1) و(9) عزلات (28.12) اظهرت تحللا جزئيا للدم (α-haemolysis) (وهي العزلات (1، 15، 35، 38، 41، 56، 59، 67، 91) حسب ورودها في الملحق رقم 1) .

جاءت نتائج الدراسة الحالية متقاربة مع نتائج دراسة الباحثة الطائي (2007) في دراستها المحلية على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة حيث اشارت الى ان (20) عزلة (42.55) من العزلات السريرية لبكتريا المكورات المعوية البرازية كانت لها القدرة على انتاج هذا الانزيم منها (25 %) اظهرت تحللاً كاملاً للدم بنسبة و(17 %) منها اظهرت تحللا جزيئاً للدم. كما وجدت دراسة كل من Ike *et al.* (1987) و Furumura *et al.* (2006) ان نسبة العزلات المنتجة لهذا الانزيم والمعزولة من حالات سريرية مختلفة هي (75, 60)% على التوالي.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

اشارت دراسة Elnser *et al.* (2000a) الى ان (16%) من عزلات *E. faecalis* المعزولة من دم اشخاص مصابين بالتجرثم الدموي كانت منتجة لانزيم الهيمولايسين، كما بينت دراسة Vergis *et al.* (2002) ان نسبة (11%) من عزلات هذه البكتريا المعزولة من حالات التجرثم الدموي كانت منتجة لهذا الانزيم، وجاءت هذه النتائج متفقة مع نتائج الدراسة الحالية، يعزى انتاج الهيمولايسين في بعض الاحيان وعدم انتاجه في احيان اخرى الى اكتساب البكتريا البلازميدات، او ان الجينات المشفرة لهذا الانزيم في عزلات *E. faecalis* قد تكون من نوع الجينات الصامتة (Silent genes) التي تشفر لانزيم الهيمولايسين في بعض الاحيان مما يجعل تلك البكتريا من الممرضات الانتهازية (Semedo *et al*., 2003).

4-3-3 الكشف عن انتاج الانزيم الحال للهلام

Detection of Gelatinase production

تم الحصول على (5)عزلات (15.6 %) منتجة لهذا الانزيم (وهي العزلات (35، 41، 52، 53، 68) كما وردت في الملحق رقم 1) ويلاحظ ان جميع هذه العزلات كانت معزولة من الاصابات الثانوية لقناة جذر السن ولأعمار تتراوح ما بين 25–43 سنة، وعند مقارنة هذه النتائج مع نتائج اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية حيث نلاحظ ان هذه العزلات ابدت مقاومتها لجميع المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة الحالية (لاحظ الملحق رقم 3) اي ان تلك العزلات كانت من اخطر العزلات. جاءت هذه النتيجة مقاربة لنتائج دراسات محلية حيث اوضح الخفاجي(2005) (نقلا عن الطائي (2007)) في دراسته ان نسبة انتاج هذا الانزيم في عزلات المكورات المعوية البرازية تكون واطئة حيث حصل على (5) عزلات (9%)، كما حصلت الطائي (2007) في دراستها على (4) عزلات (8.51%)*E. faecalis* منتجة لهذا الانزيم.

تشير غالبية الدراسات الى قدرة بكتريا المكورات المعوية البرازية على انتاج هذا لانزيم مقارنة مع بقية الانواع العائدة لهذا الجنس (Dworniczek *et al.*,2005;Elsner *et al.*,2000)

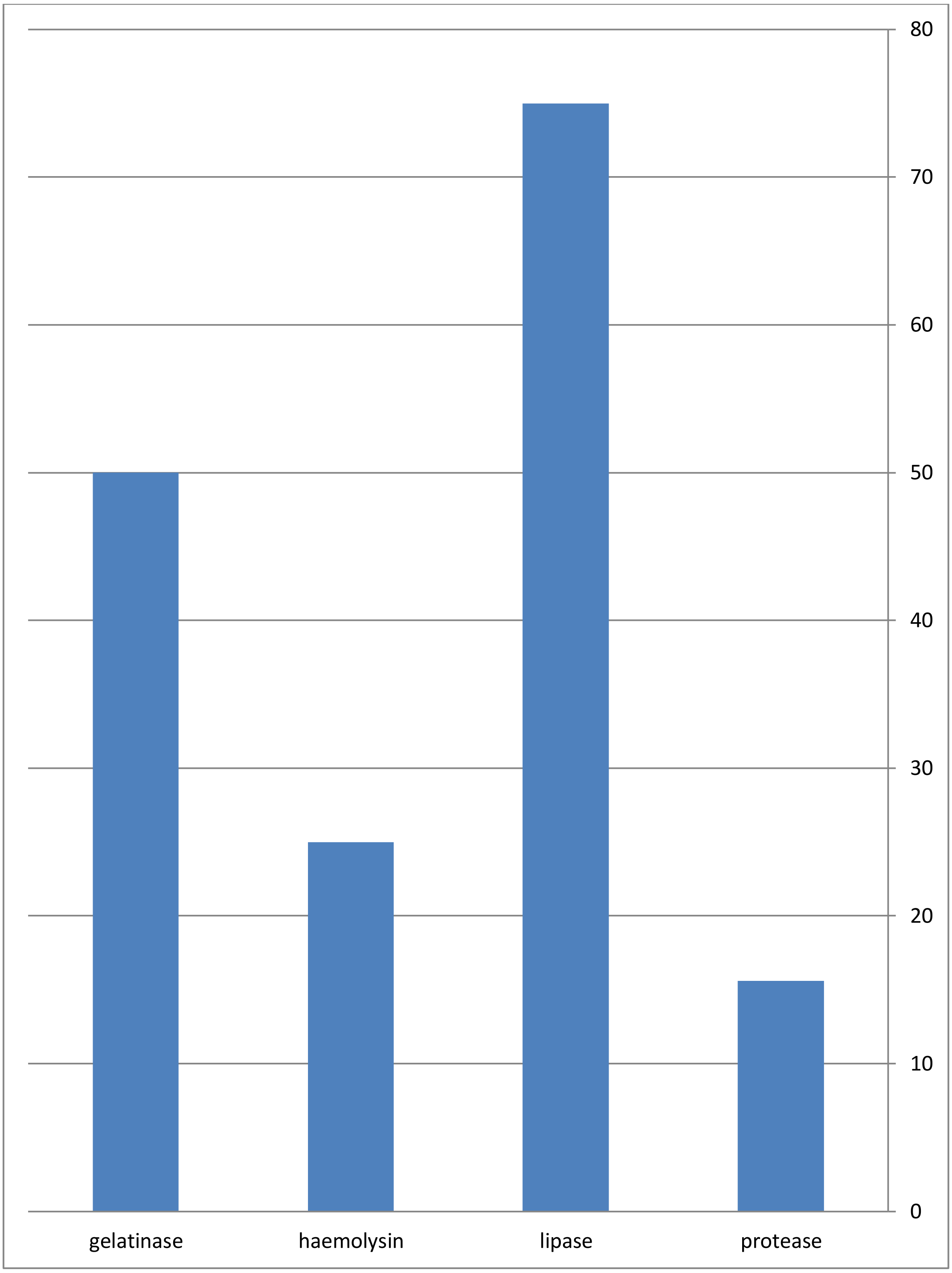
المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الا انه تم الحصول حديثا على عزلتين من اصل 12عزلة لبكتريا *E. faecium* منتجة لهذا الانزيم (Drhaovska *et al.*, 2004).

وقد اوضح Creti *et al.* (2004) انتشار السلالات المنتجة لهذا الانزيم في كل من عزلات الاغذية والعزلات السريرية وقد يحدث التعبير فقط في داخل الكائن الحي.

لوحظ ان جميع عزلات المكورات المعوية المنتجة لانزيم Gelatinase تكون منتجة لانزيم Serine Protease، وأوضح كل من Hancok & Perego (2004) ان الجينات المسؤولة عن انتاج انزيم Gelatinase تكون مسؤولة ايضا عن انتاج Serine Protease .

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com



الشكل (3-6) النسب المئوية لعوامل الضراوة لعزلات ***E. faecalis***

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

4-3 التحري عن وجود الجين المشفر لانتاج مستضد efaA في عزلات بكتريا *E. faecalis*

تم التحري عن وجود الجين المشفر لإنتاج مستضد التهاب شغاف القلب لبكتريا المكورات المعوية البرازية efaA في 32 عينة التي عزلت من جذور الاسنان الملتهبة وشخصت اعتمادا على الطرز الجينية باستعمال تقنية PCR، حيث تم استعمال الطرائق الجزيئية والمعتمدة على الطرز الجينية في التحري عن ذلك الجين عن طريق استعمال البوادئ المتخصصة للارتباط بهذا الجين .

اختيرت هذه البوادئ تبعا لـ Prethee *et al.* (2012) وبالمقارنة مع قاعدة بيانات بنك الجينات المتبعة من قبل برنامج Blast (http: // blast .ncbi.nlm.nih.gov / Blast.cgi) .

تعد بكتريا المكورات المعوية البرازية من الانواع البكتيرية التي تمتلك قدرة عالية على اصابة الانسان بأمراض متعددة ومن هذه الامراض هي التهاب جذور الاسنان (Creti *et al.*, 2004). تعزى قابلية هذه البكتريا على اصابة جذور الاسنان بالدرجة الاساس الى قدرتها العالية على تحمل الظروف البيئية القاسية مثل ظروف قلة المواد الغذائية، فضلا عن امتلاكها عوامل الضراوة والتي تزيد من قابليتها على احداث الاصابة وتحمل العلاج، ومن اهم عوامل الضراوة التي تزيد من قابلية بكتريا المكورات المعوية على اصابة جذور الاسنان هو امتلاكها الجين المشفر لإنتاج مستضد التهاب شغاف القلب لبكتريا المكورات المعوية البرازية efaA (Creti *et al.*, 2004).

وبسبب اهمية هذا الجين في امراضية البكتريا فقد استعملت طرائق التشخيص الجزيئية للتحري عنه والتي تكون اكثر دقة من الطرق المعتمدة على الطرز المظهرية، إذ انها تكون اكثر سهولة وسرعة ودقة في تشخيص عوامل الضراوة من الطرائق الزرعية والتقليدية المتبعة في التحري عن وجود عوامل الضراوة في البكتريا (Cogulu *et al.*, 2007).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

يعد ظهور حزمة ذات طول bp688 عند فصل القطع التي تم تضخيمها بتفاعل البلمرة المتسلسل PCR دليل على ان العزلة حاوية على جين المشفر لمستضد efaA اي تكون ذات اختبار موجب.

وهذا يتطابق مع ما جاء به Creti *et al.*(2004) حيث اشار ان العزلات البكتيرية تكون حاوية على الجين الذي يكون مسؤولا عن التشفير لمستضد التهاب شغاف القلب لبكتريا المكورات المعوية البرازية efaA عند ظهور حزمة ذات طول bp688 عند ترحيل القطع المضخمة باستعمال PCR في هلام الاكاروز وذلك في دراسته على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة.

كما تطابق ذلك مع ما جاء به Prethee *et al.* (2012) الذي اشار في دراسته على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة ان العزلات تكون حاوية على الجين الذي يشفر لإنتاج مستضد efaA وذلك عند ظهور حزمة ذات طول bp688 عند ترحيل القطع المضخمة المعزولة منها بال PCR على هلام الاكاروز.

بينما لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسة المحلية التي قام بها Mahdi *et al.* (2012) إذ اشار ان العزلات تكون حاوية على الجين المشفر لإنتاج efaA عند ظهور حزمة ذات طول bp702 عند ترحيل القطع المضخمة االمعزولة منها بال PCR على هلام الاكاروز وذلك بسبب اختلاف البادئ المستخدم في الدراسة.

وأظهرت الدراسة الحالية ان جميع عزلات المكورات المعوية البرازية كانت حاوية على الجين المشفر لإنتاج efaA اي بنسبة 100%. إذ فصلت القطع التي تم تضخيمها بال PCR بالترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز 2% المصبوغ بالاثيديومبرومايد في فرق جهد 60 فولت لمدة 45 دقيقة وظهرت بشكل حزم ذات طول 688pb الشكل (3-5).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وتؤكد هذه النتيجة على اهمية وجود الجين المشفر لإنتاج مستضد التهاب شغاف القلب في البكتريا التي تسبب اصابات جذور السن حيث اشارت العديد من الدراسات الى ان البكتريا التي تكون حاملة للجين الذي يكون مسؤولا عن انتاج مستضد التهاب شغاف القلب لبكتريا المكورات المعوية البرازية تكون ذات قابلية اكبر على اصابة شغاف القلب والأنسجة السنية، إذ ان هذا الجين يعد من عوامل الالتصاق السطحي في البكتريا والذي يسهل التصاق البكتريا بالكولاجين والمواد خارج خلوية ويسمح للبكتريا بتكوين مستعمرات، وكذلك يساعد البكتريا في تكوين الاغشية الحيوية (biofilm) (Sedgley *et al.*, 2005; Creti *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2006)

كما اشارت الدراسات الى ان الجين المشفر لإنتاج مستضد التهاب شغاف القلب لبكتريا المكورات المعوية البرازية (efaA) يكون موجودا دائما في جميع عزلات المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر طبية، في حين تكون العزلات المعزولة من الاطعمة حاوية على الجين المشفر لإنتاج efaA بنسبة (89%) (Eaton & Gasson. 2001).

كما اكد (2010) Cosontino *et al.* في دراسته على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر مختلفة، على وجود ذلك الجين بنسبة 80 % في العينات المعزولة من المصادر غير المرضية.

وأشار (1998) Singh *et al.* الى ان حدوث الطفرات في الجين المشفر لإنتاج مستضد efaA يقلل من قدرة بكتريا المكورات المعوية البرازية على الاصابة بالأمراض، إذ وجد الباحث ان الفئران التي يتم حقنها ببكتريا المكورات المعوية البرازية المتعرضة للتطفير في الجين المشفر لإنتاج مستضد التهاب شغاف القلب تكون اكثر قدرة على البقاء حية من الفئران التي يتم حقنها بالبكتريا الحاوية على الجين غير المتعرض للطفرات.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

وجاءت نتائج الدراسة الحالية متطابقة مع نتائج دراسة Creti *et al.* (2004) التي اجراها على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة حيث وجد ان جميع العزلات بنسبة (100%) كانت حاملة لهذا الجين.

وكذلك تطابقت نتائج الدراسة الحالية مع ما جاء Salah *et al.* (2006) في دراسة اجراها على بكتريا المكورات المعوية المعزولة من فم الاشخاص المصابين بأمراض الفم المختلفة (التهاب دواعم السن، والإصابات القيحية للثة، والإصابات الابتدائية والثانوية لجذور الاسنان)، إذ وجد ان الجين الذي يشفر لانتاج مستضد efaA كان موجودا في جميع العزلات.

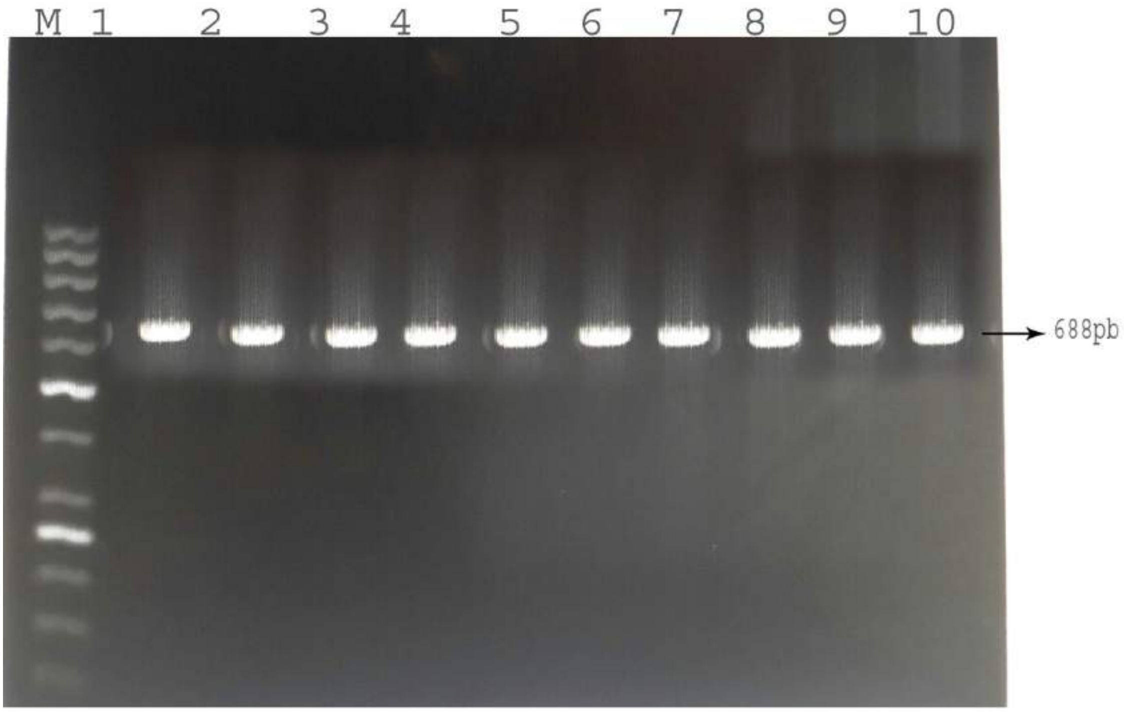
وتطابقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة Cosontino *et al.* (2010) على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر مختلفة، إذ وجد ان الجين المشفر لإنتاج مستضد التهاب شغاف القلب لبكتريا المكورات المعوية البرازية (efaA) كان موجودا في جميع العينات المعزولة من الادرار.

كما وجد Prethee *et al.* (2012) في دراسته على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من اصابات جذور الاسنان المقاومة للعلاج ان 11عزلة من اصل 15 عزلة المعزولة من جذور الاسنان شخصت بأنها تعود لبكتريا المكورات المعوية البرازية وان جميع تلك العزلات الـ 11 كانت حاوية على الجين المشفر لإنتاج efaA .

في حين وجد في احدى الدراسات المحلية التي قام بها Mahdi *et al.* (2012) على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة ان الجين الذي يشفر لإنتاج مستضد التهاب شغاف القلب (efaA) كان موجودا في 5 عزلات من اصل 7 عزلات (72.4%) شخصت بعائديتها لنوع المكورات المعوية البرازية (ثلاث عزلات معزولة من الادرار وعزلتان معزولة من الحروق).

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

كما وجد Dahlen *et al.* (2012) في دراسة له على بكتريا المكورات المعوية البرازية المعزولة من الانسجة المخاطية والإصابات العميقة للفم ان الجين المشفر لإنتاج efaA كان موجوداً في العزلات بنسبة 93.3 %. وكانت هذه النتائج متفقة نوعا ما مع نتائج الدراسة الحالية.



الشكل (3-6) الترحيل الكهربائي لنواتج التحري عن جين efaA في بكتريا *E. faecalis* باستخدام الـ PCR في هلام الاكاروز 2%

فرق الجهد 60 فولت، الوقت 45 دقيقة

من 1-10 هي عينات موجبة

M : ladder (50bp)

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الاستنتاجات

والتوصيات

Conclusions &

Recommendations

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Conclusions & Recommendations الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

1- تشكل بكتريا المكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* نسبة (18.5%) من الاصابات الابتدائية لقناة جذر السن و (63.3 %) من الاصابات الثانوية لقناة جذر السن في الدراسة.

2- يعد التشخيص الجزيئي باستعمال تقنية الـ PCR من اسهل واسرع واكثر الطرائق كفاءة في التشخيص.

3- شيوع المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية بين جميع العزلات المحلية قيد الدراسة، وكان نسق المقاومة (12-14) مضاداً حيوياً هو السائد بنسبة (62%) من العزلات الكلية.

4- بينت الدراسة امتلاك جميع العزلات البكتيرية قيد الدراسةعلى الجين المشفر لعامل الضراوة A efa مما يدل على خطورة الجين في زيادة قابلية هذه البكتريا على اصابة قنوات جذور الاسنان، والذي قد ينتقل الى المجرى الدموي واصابة المريض بالتهاب شغاف القلب.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

التوصيات

1- اجراء دراسة شاملة لعزل اكبر عدد ممكن من انواع المكورات المعوية في العينات المرضية الاخرى والمعزولة من الانسان كما في حالات التهاب شغاف القلب وتجرثم الدم وتشخيصها باستخدام الطرائق الوراثية الجزيئية.

2- اجراء دراسة وراثية تشخيصية للبلازميدات باستخدام تقنية الـ PCR للتعرف الى الاختلافات الموجودة بين السلالات المتعددة للبكتريا، ومعرفة ماذا كانت الجينات المشفرة لصفة مقاومة المضادات الحيوية او الجينات المرضية تكون محمولة على بلازميد او كروموسوم .

3- اجراء دراسات تجريبية عن امكانية استعمال مواد مختلفة (المستخلصات النباتية) تثبط عملية تجمع بكتريا *E. faecalis* والتصاقها بانسجة الانسان وذلك عن طريق منع انتاج مواد التجمع واللواصق السطحية بالتأثير على الجينات المسؤولة عن انتاج هذه المواد مثل جين efa A وجين esp وغيرها ومن ثم تجربتها للاستفادة التطبيقية في العلاج والوقاية.

4- دراسة التتابع النيوكليوتيدي لكلا الجينين المدروسين لمعرفة اذا كانت هنالك طفرات فيهما ومقارنتها مع مثيلاتها في الدراسات العالمية.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المصادر

References

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

المصادر References

المصادر العربية

- الخفاجي، جواد كاظم طراد (2005). دراسة بكتريولوجية ووراثية لبعض عزلات *Enterococcus faecalis* المعزولة من مصادر سريرية وبيئية في محافظة بابل. اطروحة دكتوراه. كليةالعلوم. الجامعة المستنصرية.
- الخفاجي، زهرة محمود وابو المعالي، حسن محمود (2013). تفاعلات الكوثرة وتصميم البوادئ. جامعة بغداد، معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الحيوية.
- الدركزلي ، هند حميد خضير (2003) . تاثير الليزر واطئ القدرة على الاحياء المجهرية الملوثة لجذور الاسنان باستخدام المتحسسات الضوئية . رسالة ماجستير. كلية العلوم . جامعة بغداد.
- الرماحي، انتصار جواد كاظم (2003). دراسة وراثية عن العلاقة بين الغذاء ونشوء المقاومة للمضادات الحيوية في المكورات المعوية . رسالة ماجستير. كليةالعلوم. جامعة بغداد.
- السعدي ، فاطمة صبيح علي (2007) . دراسة مقاومة بكتريا *Enterococcus faecalis* المسببة لالتهابات المجاري البولية لبعض المضادات الحيوية وانتاجها لانزيمات β –Lactamase . رسالة ماجستير . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية.
- الطائي، خمائل لطفي شاكر (2007). دور حامض اللايبوتكوك المنقى جزئيا من بكتريا *E. faecalis* المعزولة محلياً من مصادر سريرية مختلفة في الالتصاق. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المصادر الاجنبية

A

- Aakra, A. ; VebØ, H. ; Snipen, L. ; Hirt, H. ; Aastveit, A. ; Kapur, V.; Dunny, G. ; Mummay, B. & Nes, I. F. (2005). Transcriptional response of *Enterococcus faecalis* V583 to Erythromycin. Antimicrob.Agents.Chemother.,49(6): 2246-59.
- Abou-Rass, M. & Bogen, G. (1998) Microorganisms in closed periapical lesions. Int. Endod. J., 31: 39-47.
- Andrewes, F. W. & Horder, T. J. (1906) A study of the streptococci Pathogenic for man .In : Murray, B. E. (1990) The life & times of the Enterococci. Clin. Microbiol. Rev., 3(1):46-65.
- Archimbaud, C.; Shankar, N.; Forestier, C.; Baghdayan, A. ; Gilmore, M.; Charbonne, F. & Joly, B. (2002) In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. Res. Microbiol., 153: 75-80.
- Arias, C. A. & Murray, B. E. (2012). The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. Nat. Rev. Microbiol., 10: 266–278.
-Arias,C. A. ; Reyee, J. ; Zuniga, M. ; Cortes, L. ; Rico, C. & Panesso, D. (2003). Multicenters surveillance of antimicrobial resistancein Enterococcus and Staphylococcus from Columbiae hospital, 2000-2001. J. Antimicrob. Chemother., 51: 59-68.
- Armstrong, D. & Cohen, J. (1999). Infectious Diseases. Volume Two. London. Mosby.
- Athanassiadou, F., Kourti, M., Tragiannidis, A., Makadou, A. & Papageorgiou, T. (2008). *Enterococcus faecalis*: an anusual cause of meningitis in a child with non-hodgkin lymphpma. Turk. J. Pediat., 50: 86-88.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

-Atlas, R. M.; Brown, A. E. & Parks, L. C.(1995). Laboratory Manual Experimental Microbiology. 1st ed. Mosby.

B

- Baron, E. J.; Peterson, L. R. & Finegold, S. M. (1994). "Baily & Scott`sDiagnostic Microbiology". 9th edition. Mosby-Year Book, Inc.

-Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. & Yolken, R. H. (Eds). "Manual of Clinical Microbiology." 7th edition.ASM Press, Washington D.C.: 297-307.

-Brooks, G. F.; Butel, J. S. & Morse, S. A. (2001) "Jawetz Melinick & Adelberges". Medical Microbiology. 22th edition. McGraw-Hill Companies. NewYork.

- Brooks,G.F. ; Butel,J.S. & Morse,S.A. (2004) " Jawetz Melinick & Adelberges". Medical Microbiology.23rd edition .McGraw-Hill Companies. NewYork.

- Buu- Hoi, A.; Bieth, G. & Horaud, T. (1984). Antimicrob. Agents Chemother., 25: 289.

C

- Cetinkaya, Y.; Falk, P. & Mayhall, C. G. (2000). Vancomycin- resistant Enterococci. Clin. Microbiol. Rev., 13(4): 686-707.

- Clark, N. C.; Cooksey, R. C.; Hill, B. C.; Swenson, J. M. & Tenover, F. C. (1993). Characterization of glycopeptides – resistant *Enterococci* from US hospitals. Antimicrob Agents chemother, 37: 2311-17.

- Clewell, D. B. & Weaver, K. E. (1989). Sex phermones plasmid transfe in *Enterococcus faecalis*. Plasmid, 21:175-84.

- Coburn, P. S.; Pillar, C. M.; Jeh, B. D.; Hass, W. & Gilmore, M. S. (2004) *Enterococcus faecalis* senses target cells & in response expresses cytolysin. Science, 306 (5705) :2270-2.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Cogulu, D.; Uzel, A. & Eronat, C. (2007). Detectio of *Enterococcus faecalis* in Necrotic Teeth Root Canals by Culture and Polymerase Chain Reaction Method .Eur J. Dent.,:216-221.

- Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. & Simmons, A. (1996). "Mackie & McCartney". "Practical Medical Microbiology".14th edition. Churchill Living Stone, U.K.

- Conn & Stump, F.P.K. (1976). Outlines of biochemistry. John Wiley And sons, New York, 247-278.

- Coque,T. M.; Patterson, J. E.; Steckelberg, J. M. & Murray, B. E. (1995). Incidence of hemolysin, gelatinase & aggregation substance among Enterococci isolated from patients with endocarditis & other infection & from feces of hospitalized & community- based persons.J.Infect.Dis., 171: 1223-9.

- Cosentino, S.; Podda, G. S.; Corda, A.; Fadda, M. E.; Deplano, M. & Pisano. M. B. (2010). Molecular detection of virulence factors and antibiotic resistance pattern in clinical *Enterococcus faecalis* strains in Sardinia. J. Prev. Med Hyg., 51: 31-36.

- Cown, S. T. (1974). "Manual for the identification of medical bacteria" .2nd edition. Churchill Livings, Edinburg, London & NewYork.

- Creti, R.; Imperi, M.; Bertuccini, L.; Fabretti, F.; Orefici, G.; Rosa, R. D. & Baldassarri, L. (2004) Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. J. Med. Microbiol., 53:13-20.

- Cruickshank, R; Dujuid, J. P.; Marmoin, B. P. & Swain, R. H. A. (1975). "Medical Microbiology". 12th edition.Vol.2. Churchill Livingstone, Edinburg, London and New York.

D

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Dahlén, G.; Blomqvist, S.; Almståhl, A. & Carlén, A. (2012). Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. J. Oral Microbiol. 4.

- Dale, S. W. & Park, S. F. (2004). Molecular genetics of bacteria. 4th edition. John Wiley & Sons, Ltd, England.

- Day, A. M.; Gover, J. H. & Philips-Jones, M. K. (2003). Cytolysin gene expression in *Enterococcus faecalis* is regulated in response to aerobiosis conditions. Mol. Genet. Genomics., 269:31-39.

- De-Marques, E. B. & Suzart, S. (2004) Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. J. Med. Microbiol., 53:1069-73.

- Desai, P. T.; Pandit, D.; Mathur, M. & Gogate, A. (2001). Prevalence, Identification and Distribution of Various Species of *Enterococci* Isolated from Clinical Specimens with Special Reference to Urinary Tract Infection in Catheterized Patients. (Internet).

-Distel, J. W.; Hatton, J. F. & Gillespie, M. J. (2002). Biofilm formation in medicated root canals. J. Endod., 28: 689 –93.

- Domani, A.; Yoldas, O.; Yilmaz, S.; Koksal, F.; Kayar, B.; Akcimen, B. & Seydaglu, G. (2012). Polymerase chain reaction of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in apical periodontitis from Turkish patients. J Clin Exp Dent. 4(1):e34-9.

- Donabedian, S. M.; Show, J. W.; Shlaes, D. M.; Green, M. & Zervos, J. (1995). DNA Hybridization and Contour – Clamped Homogeneous Electric Field electrophoresis for Identification of Enterococci to the Species Level. J. Clin. Microbiol, 33:141-145.

- Donskey, C. J.; Salata, R. A.; Shepp, D. H.; Talavera, F.; Greenfield, R. A.; Mylonakis, E. & Cunlna, B. A. (2003). Enterococcal infections. Medicine.

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

- Drahovska, H.; Slobodnikova, L.; Kocincova, D.; Seman, M.; Koncekova, R.; Trupl, J. & Turna, J. (2004). Antibiotic Resistant and Virulence Factors Among Clinical and Food Enterococci Isolated in Slovakia. Folia. Microbiol. (Praha)., 49(6): 763-768.

- Dworniczek , E. ; Wojciech , L. ; Sobieszczanska , B. and Seniuk , A. (2005). Virulence of Enterococcus isolates collected in lower Silesia(Poland) . J.Infect.Dis. *37*(9):630-636.

- Dupont, H.; Montravers, P.; Mohler, J. & Carbon, C. (1998). Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse & rat models of peritonitis. Infect. Immun., 66(6): 2570-2575.

- Dupre, I.; Zanetti, S.; Schito, A. M.; Fadda, G. & Sechi, L. A. (2003). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* & *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). J. Med. Microbiol., 52: 491-498.

E

- Eaton, T. J. & Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants & potential for genetic exchange between food & medical isolates. Appl. Environ. Microbiol., 67(4): 1628-1635.

- Elnser, H. A.; Sobottka, I.; Mack, D.; Laufs, R.; Claussen, M. & Wirth, R. (2000a). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* & *Enterococcus faecium* blood culture isolates. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 19(1): 39-42 (Abstract).

- Elnser, H. A.; Sobottka, I.; Feucht, H.; Claussen, M.; Kaulfers, P.; Laufs, R. & Mack, D. (2000b). *In vitro* susceptibilities of enterococcal Blood culture isolates from Hamburg area to ten antibiotics. Chemother., 46: 104-10.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Erlandsen, S. L.; Kristich, C. J. & Dunny, G. M. (2004) Ultrastructure of *Enterococcus faecalis* biofilms. Biofilm, 1: 131-137.

F

- Facklam, R. R. (1972). Recognition of Group D Streptococcal Species of Human Origin by Biochemical and Physiological Tests. Appl. Microbiol., 23(6).
- Facklam, R. R. & Collins, M. D. (1989). Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test sheme. J. Clin. Microbiol., 27(4) :731-734.
- Facklam, R. & Elliott, J. A. (1995). Identification, classification, & clinical relevance of catalase negative, Gram-positive cocci, excluding the Streptococci & Enterococci. Clin. Microbiol. Rev., 8(4):479-95.
- Facklm, R. R. & Teixeira, L. M. (1997). Enterococcus. In: Collier, A.; Balow, S. & Sussman, M. (Eds.). "Microbiology & Microbial Infections". Topiey & Wilson. 9th edition. Edward Arnold, London. :669-682.
- Facklam, R. R. & Wilkinson, H. W. (1981). The Prokaryotes. A Handbook on Habbitats, Isolation and Identification of Bacteria. The Family Streptococcaceae (Medical Aspect).Volume Two. Chapter, 127:1572-1597. Spring-Verlag. Berlin Heidelberg, New York.
- Facklam, R. R.; Sahm, D. F. & Teixeira, L. M. (1999) Enterococcus . In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. & Yolken, R. H. (Eds). "Manual of Clinical Microbiology".7th edition. ASM Press, Washington D.C.: 297-307.
- Farrow, J. A. E.; Jones, D. ; Phillips, B .A . & Collins, M.D. (1983). Taxonomic Studies on Some Group D Streptococci. J. Gen. Microbiol., 129: 1423-1432 .

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Fouad A. F.; Zerella, J.; Barry, J. & Spanberg, L. S. (2005). Molecular detection of Enterococcus species in root canals of therapy-resistant Endodontic infections. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., 99: 112-8.

- Forbes, B. A.; Sahm, D. F. & Weissfeld, A. S. (2002). "Baily & Scott`s". Diagnostic Microbiology.11th edition. Mosby, Company Baltimore. USA.

- Furumura, M. T.; Figueiredo, P. M.; Carbonella, G. V.; Darini, A. L. & Yano, T. (2006). Virulence-associated characteristics of *E. faecalis* strains isolated from clinical sources. Braz. J. Microbiol., 37: 230-6.

G

- Garcia- Garrote, F.; Cercenado, E. & Bouza, E. (2000). Evaluation of a New System, VITEK 2, for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Enterococci*. J. Clin. Microbiol., 38(6): 2108–2111.

- Gentry- Weeks, C.; Estay, M.; Loui, C. & Baker,D. (2003). Intravenous Mouse Infection Model for Studying the Pathology of *Enterococcus faecalis* Infections. Infect. Immun.*71*(3): 1434-1441.

- Gilmore, M. S. (editor) (2002). The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance. Washington, DC: American Society for Microbiology.

-Gilmore, M. S.; Segarra, R. A.; Booth, M. C.; Bogre, C. P.; Hall, I. R. & Clewell, D. B. (1994) Genetic structure of the *E. faecalis* plasmid pAD1, encoded cytolytic toxin system & its relationship to Lantibiotic determinant. J. Bacteriol.,176:7335-7344.

- Gomes, P. B.; Pinhiero, T. E.; Sousa, L. R. E.; Jacinto, C. R.; Zaia, A. A. (2006). *Enterococcus faecalis* in dental root canal detected by culture and bypolymerase chain reaction analysis. Oral Surgery,

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Oral Pathology andendodontics. Volume102, Issue2, Pages 247-253.

- Gülhan, T.; Aksakal, A.; Ekin, I. H.; Savasan, S. & Boynukara, B. (2006). Virulence factors of *E. faecium* & *E. faecalis* strains isolated from humans & pets. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 30: 477-482

- Guzman,C.A. ; Pruzzo,C. ; Lipira,G. & Calegari,L. (1989) Role of adherence in pathogenesis of *E. faecalis* urinary tract infection & endocarditis. Infect. Immun., 57(6): 1834-8.

H

- Hallgren, A.; Abednazari, H.; Ekdahl, C.; Hanberger, H.; Nilsson, M.; Samuelsson, A.; Sevensson, E. & Nilsson, L. (2001). The Swedish Intensive Care Unit (ICU) study group (2001) Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in ICU in Sweden evaluated by different MIC breakpoint systems. J. Antimicrob. Chemother., 48: 53-62.

- Hancock, L. E. & Gilmore, M. S. (2000). Pathogenicity of *Enterococci.* In: Fischetti, V.; Novick, R.; Ferretti, J.; Portnoy, D. & Rood, J. (Eds.). Gram-positive pathogens. ASM Publications,Oklahoma.,:1-11.

- Hancock, L. E. & Perego, M. (2004). The *Enterococcus faecalis fsr* Two-Component System Controls Biofilm Development Through Production of Gelatinase. J. Bacteriol., 186(17): 5629-5639.

- Hardie, J. M. & Whiley, R. A. (1997). Classification & overview of the genera Streptococci & Enterococci. J. Appl. Microbiol. Symposium supplement, 83: 1-11.

- Hayes,J. R.; English, L. L.; Carter, P. J.; Proescholdt, T.; Lee, K. Y.; Wagner, D. D. & White, D. G. (2003) Prevalence & antimicrobial resistance of Enterococcus species isolated from retail meats. Appl. Environ. Microbiol., 69(12): 7153-60.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Hayes, J. R.; English, L. L.; Carr, L. E., Wagner, D. D. & Joseph, S. W. (2004). Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments. Appl. Environ. Microbiol., 70(10):6005-6011.
- Hickey, R. M.; Twomey, D. P.; Ross, R. P. & Hill, C. (2003). Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. Microbiol., 149:655- 64.
- Himedialalabs.com/TD/M787.pdf.
- Hogg, S. D.; Whiley, R. A. & De-Soet, J. J. (1997). Occurrence of Lipotechoic acid in oral streptococci. Int. J. Syst. Bacteriol., 47:62-66.
- Holt, J. G.; Kreieg, N. R.; Sneath, P. H.; Staley, J. T. & Williams, S. T. (1994). "Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. 9th edition. Williams & Wilkins: 1063.
- http://blast.ncbi.n/m.nih.gov/Blast.Cgi.
- Huycke, M. M.; Sahm, D. F. & Gilmore, M. S. (1998). Multiple-Drug resistant Enterococci: the nature of the problem & an agenda for the future. Emerg. Infect. Dis., 4(2).

I

- Ike, Y.; Hashimoto, H. & Clewell, D. (1987). High incidence of haemolysin production by *Enterococcus faecalis* strains associated with human parenteral infection. J. Clin. Microbiol.,25: 1524-1528.
- Ike, Y. & Clewell, D. B. (1992). Evidence that the Hemolycin / Bacteriocin Phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *Zymogenes* Can Be Determined by Plasmid in Different Incompatibility Groups as Well as by the chromosome. J. Bacteriol. 174(24):8172-8177.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Iversen, A.; Kühn, I.; Franklin, A. & Mollby, R. (2002). High prevalence of Vancomycin-resistant enterococci in swedish sewage. Appl. Environ. Microbiol., 68(6):2838-42.

J

- James, G. (2010). Universal Bacterial Identification by PCR and DNA Sequencing of 16S rRNA Gene .PCR for Clinical Microbiology,: 209-214.
- Jeljaszewicz, J.; Mlynarczyk, G. & Mlynarczyk, A. (2000). Antibioti Resistance in Gram –Positive Cocci. Int. J. Antimicrob. Agents. 16: 473-478.
- Jett, B. D.; Huycke, M. M. & Gilmore, M. S. (1994). Virulence of Enterococci. Clin. Microbiol. Rev., 7(4): 462-78.
- Johnson, A. P. (1994). The pathogenicity of enterococci. J. Antimicrob. Chemother., 33: 1083-1089.
- Johnston, L. M. & Jaykus, L. A. (2004). Antimicrobial resistance of Enterococcus species isolated. Appl. Environ. Microbiol., 70(5): 3133- 7.

K

- Kalina, A. P. (1970). The taxonomy and nomenclature of enterococci. In: Facklam, R. R.; Sahm, D. F. & Teixeira, L. M. (1999). Enterococcus. In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. &Yolken, R. H. (Eds). "Manual of Clinical Microbiology". 7th edition. ASM Press, Washington D. C.: 297-307.
- Kar, M. K.; Ray, L. & Chattopadhyay, P. (1996). Isolation & identification of alkaline thermostable lipase producing microorganisms & some properties of crude enzyme. Indian. J. Experimental. Biol., 34: 535-8.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Kayaoglu, G. & Qrstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 15(5): 308-20.

- Kim, E. B.; Kopit, L. M.; Harris, L. J. & Marco, M. L. (2012). Draft Genome sequence of the quality control strain *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. J. Bacteriol. Vol.194.no.21.

- Kindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Hom, M. & Glockner, F. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next generation sequencing-based diversity studies Nucleic Acid Res., 41(1).

- Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology & antibiotics resistance of enterococci isolated from food & the gastro-intestinal tract. Int. J. Food. Microbiol., 88:123-31.

- Kobayashi, I.; Miyazaki, S. & Nishida, M. (1986). Haemolytic & protease activities & drug susceptibility of *Enterococcus faecalis* & other D group Streptococci from clinical specimens & normal intestinal flora. Chemother., 34(12): 1238-45.

- Kolbert, C. P.; Persing, D. H. (1999). "Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens". Current Opinion in Microbiology, 2 (3):299–305. doi: 10.1016/S1369-5274(99)80052-6. PMID .

- Kostyukova, N. N.; Volkova, M. O.; Ivanova, V. V. & Kvetnaya, A. S. (1995). A study of pathogenic factors of Streptococcus pneumoniae strains causing meningitis. FEMS. Immunol. Med. Microbiol., 10: 133-7.

- Kristich, C. J.; Li, Y. H.; Cvitkovitch, D. G. & Dunny, G. M. (2004). Esp-Independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol., 186(1): 154-63.

L

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Lieo, M. M.; Bonato, B.; Tafi, M. C.; Signoretto, C.; Boaretti, M. & Canepari, P. (2001). Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. J. Appl. Microbiol., 91:1095–1102.

- Lins, R. X.; Andrade, A. O.; Junior, R. H.; Wilson, M. J.; Lewis, M. A. O.; Williams, D. W. & Fidel, R. A. S. (2013). Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. J. Dent. Volume 41.Issue9:779-786.

-Liu, H.; Wei, X. & Ling, J. (2010). Biofilm formation capability− of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. J. Endod., 36(4): 630–635.

Love, R. M. (2001). *Enterococcus faecalis* a mechanism for its role in− Endodontic failure. IntEndod; 34(5): 340.ArticlePubMed.

- Lopardo, J. C.; Casimir, L.; Hernandez, C. & Rubeglio, E. A. (1990). Isolation of Three Strains of β Lactamase Producing *E. faecalis* in Argentina. Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.9 : 402-405.

- Lowe, A. M.; Lambert, P. A. & Smith, A. W. (1995). Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: Homology with adhesions from some oral streptococci. Infect. Immun., 63:703-706.

M

- MacCallum, W. G. & Hastings, T. W. (1899). A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov.spec.), with adescription of the microorganism. In: Jett, B. D.; Huycke, M. M. & Gilmore, M. S. (1994) Virulence of Enterococci. Clin. Microbiol. Rev., 7(4):462-78.

- Macfaddin, J. F. (2000). Biochemical test for identification of medical Bacteria.3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Co. London.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Mahdi, M. S.; Lateef, L. A.; Al-Saedi, I. A. & Abdul-Razzaq, M. S. (2012). Genetic Method for Detection Four Virulence Factors Associated with *Enterococcus Faecalis*. Med. J. Babylon-Vol. 9- No. 4 .

- Manero, A. & Blanch, A. R. (1999). Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. Appl. Eviron. Microbiol., 65(10):4425-4430.

-Maniatis, T.; Fritschand, E. F. & Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A laboratory Manual cold spring Harber Laboratory. New York.

- Martinez, L.; Pascual, A. & Jacoby, G. (1998) Quinolone resistance for a transferable plasmid. Lancet., 351: 797-9.

- Mhmoudpour, A.; Rahimi, S.; Sina, M.; Soroush, H. M. Shahisa, S. & Aminabadi, N. (2007). Isolation and identification of *Enterococcus faecalis* from necroticroot canal using multiplex PCR. J. Oral Sci., Vol.49, No3: 221-227.

- Molander, A.; Reit, C.; Dahlen, G. & Kvist, T. (1998). Microbiological status of root- filled teeth with apical periodontitis. Int. Endod. J.; 31:17.

- Moro, M. L.; Gandin, C.; Bella, A.; Siepi, G. & Petrosillo, N. (2001). A national survey on the surveillance and control of nosocomial infections in public hospitals in Italy (Rapporti ISTISAN 01/4). Rome: Istituto Superiore di Sanita` (in Italian).

- Mundy,L. M.; Sahm, D. F. & Gilmore, M. (2000). Relationships between Enteroccccal virulence & antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev., 13 (4):513-22.

- Muranaka, K. & Greenwood (1988). The Response of *Streptococcus faecalis* to Ciprofloxacin and Enoxacin. J. Antimicrob. Chemother.

- Murray, B. E. (1990). The life & times of the Enterococci. Clin. Microbiol. Rev., 3(1):46-65.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Murray, B. E.; Baron, E. J.; Paller, M. A.; Tenover, F. C. & Yolken, R. H. (1999) "Manual of Clinical Microbiology".7th edition.ASM Press.Washington.D.C.:297-305.

N

- Nakajo, K.; Komori, R.; Ishikawa, S.; Ueno, T.; Suzuki, Y.; Iwami, Y. and Takahashi, N. (2006). Resistance to acidic and alkaline environment in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. Oral Microbiol Immunol., 21:283-288. PubMed Abstract
- Nallapareddy, S. R.; Qin, X.; Weinstock, G. M.; Höök, M. & Murray, B.E. (2000). *Enterococcus faecalis* adhesion, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen Type IV & laminin as well as collagen Type I. Infect. Immun., 68(9):5218-24.
- Nallapareddy, S. R.; Wenxiang, H.; Weinstock, G. M. & Murray, B. E. (2005). Molecular characterization of a widespread, pathogenic & antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage & dissemination of its putative pathogenicity island .J. Bacteriol., 187(16): 5709-18.
- Nallapareddy, S. R. & Murray, B. E. (2006) Ligand-signaled upregulation of *Enterococcus faecalis* ace transcription, a mechanism for modulating host- *E. faecalis* interaction. Infect.Immun., 74(9):4982-4989.
- Nallapareddy, S. R.; Sing, K. V.; Sillanapää, J.; Garsin, D. A.; Höök, M.; Erlandsen, S. L. & Murray, B. E. (2006). Endocarditis & biofilm-associated pilli of *Enterococcus faecalis*. J. Clin. Invest., 116:2799-2807.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLs) (2002). Preformance standards for antimicrobial susceptibility testing. Villanova, PA,USA.

O

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Orla-Jensen, S. (1919). The Lactic acid bacteria. In: Murray, B. E. (1990). The life & times of the Enterococci. Clin. Microbiol. Rev., 3(1):46-65.

P

- Paulsen, I. T.; Banerjei, L.; Myers, G. S.; Nelson, K. E.; Seshadri, R.; Read, T.D.; Fouts, D. E.; Eisen, J. A.; Gill, S. R.; Heidelberg, J. F.; Tettelin, H.; Dodson, R. J.; Umayam, L.; Brinkac, L.; Beanan, M.; Daugherty, S.; DeBoy, R. T.; Durkin, S.; Kolonay, J.; Madupu, R.; Nelson, W.; Vamathevan, J.; Tran, B.; Upton, J.; Hansen, T.; Shetty, J.; Khouri, H.; Utterback, T.; Radune, D.; Ketchum, K. A.; Dougherty, B. A. & Fraser, C. M. (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Science, 299:2071–2074.
- Peciuline, V.; Reynauld, A. H.; Balciuniene, I. & Haapasalo, M. (2001). Isolation of yeasts and enteric bacteria in root filled teeth with chronic apical periodontitis. Int Endod;34: 429-34.
- Pereira, F.; Carneiro, J.; Matthiesen, R.; van Asch, B.; Pinto, N.; Gusmao L.; Amorim, A. (2010).Identification of Species by multiplex analysis of variable – lenghth Sequences. Nucleic Acids Research 38 (22): e203–e203.
- Pillai, S. K. ; Sakooulas, G. ; Gold, H. S. ; Wennersten, C. & Eliopoulos, G. M. (2002). Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. J. Clin. Microbiol., 40(7):2651-2.
- Pinheiro, E. T.; Gomes, B. P. F. A.; Ferraz, C. C. R.; Teixeira, F. B.; Zaia, A. A. & Souza-Filho, F. J. (2003). Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. Oral Microbiol. Immunol., 18:100-103.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

-Portenier, I; Tuomos, M.T. & Haapasalo, M. (2003). Enterococcus faecalis– the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. Endodontic Topics. Volume 6, Issue 1, pages 135-159.

- Preethee, T.; Kandaswamy, D. & Hannah, R. (2012). Molecular identification of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen efaA in root canals of therapy-resistant endodontic infections. J. Conserv. Dent., 15: 319-22.

Q

- Qin, X.; Singh, V.; Weinstock, G. M. & Murray, B. E. (2000). Effects of *Enterococcus faecalis fsr* genes on production of gelatinase & a serine protease & virulence.Infect.Immun.,68(5):2579-86.

R

- Rakita, R. M.; Vanek, N. N.; Jacques-Palaz, K.; Mee, M.; Michele Mariscalco, M.; Dunny, G. M.; Snuggs, M.; Barry Van; Winkle, W. & Simon, S. I. (1999) *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis & neutrophil activation.Infect.Immun., 67(11): 6067-6065.

- Rams, T. E.; Feik, D.; Young, V.; Hammond, B. F. & Slots, J. (1992). Enterococci in human periodontitis. Oral Microbiol. Immunol., 7:249-52.

- Rippered, R. ; Uhl, J.R. ; et al. (1998). DNA sequence resembling Van A And Van B in the vancomycin – resistant *Bacillu*. Popilliae *J. Infect.Dis :* 178:584-8.

- Rôças, I. N. & Siqueira J. F. (2004). Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J. Endodontics, 30: 315–320.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Rôças, I. N.; Siqueira J. F.; Aboim, M. C. & Rosado, A. S.(2014). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., 98:741–749.

- Rodina, A. G. (1972). Method in Aquatic Microbiology. University Perk press. Baltimore Butter Wortts, London.

- Rodriguez, L. J. P.; Garcia-Cortes, J. P.; Martinez-Martinez, R. E.; Patiño- Marin, N.; Martinez-Castañon, G. A.; Zavala-Alonso, N. V. & Amano, A. (2013). Molecular identification and antibiotic resistant bacteria isolated from primary dentition infections. Original Article.

-Rollins, D. M. & Joseph, S. W. (2000) Enterococcus summary. Path. Microbiol.

- Rosato, A.; Billot-Klein, D.; Buu-Hoi, A.; & Gutmann, L. (1995). Inducible and Constitutive expression of risistance to glycopeptides and vancomycin dependence in glycopeptides resistance *Enterococci*. Antimicrob. Agents Chemother., 39 : 830 -833.

-Rudy, M.; Nowakowska, M.; Wiechula, B.; Zientara, M. & Rodosz-Komoniewska, H. (2004) Antibiotic susceptibility analysis of *Enterococcus* spp. Isolated from urine.Pazegl.Lek., 61(5): 473-476.

S

- Salah, R. N.; Dar-Odeh, N.; Abu Hammad, O. & Shahabi, A. (2006). Prevalence of putative virulence factors and Antimicrobial susceptibility of enterococcus faecalis isolates from patients with dental diseases. Biomedical Oral Health, 8:1-7.

- Sambrook,A.B. and Russel,D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-879-69576-5. Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction

-Sambrook, D. F.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold Spring Habor Laboratory, Cold spring Harbor. New York.

- Schleifer, K. H. & Kilpper-Balz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus Enterococcus now. rev. as *Enterococcus faecalis* comb.nov. and *Enterococcus faecium* com.nov. In: Facklam, R. R.; Sahm, D. F. & Teixeira, L. M. (1999) Enterococcus. In: Murray,P.R. ;

- Sedgley, C. M.; Molander, A.; Flanngan, S. E.; Nagel, A. C.; Appelbe, O. K.; Clewell, D. B. & Dahlen, G. (2005). Virulence, phenotype & genotype characteristics of endodontic Enterococcus species. Oral. Microbiol. Immunol., 20(1) :117-37.

- Selcuk, M.; Ozbek, A. & Erdorgan, A.S. (2009). Analysis of *Enterococcus faecalis*in Samples from Turkish Patients with Primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real –time PCR SYBR green method .J. Appl. Oral Sci., Vol. 17 no 5.

- Semedo,T. ; Santos,N.A. ; Martins,P. ; Lopes,M.F. ; Marques,J.F. ; Tenrevo,R. and Crespo,T.B. (2003) Comparative study using type strains & clinical & food isolate to examine hemolytic activity & occurrence of the cy 1 operon in enterococci. J.Clin.Microbiol.,41(6):1-37.

- Seno, Y.; Kariyama, R.; Mitsuhata, R.; Moden, K. & Kumon, H. (2005). Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. Acta. Med. Okayama., 59(3): 79-87 (Medline).

- Shankar, V.; Virginia Lockatella, C.; Baghdayan, A. S.; Drachenberg, C.; Gilmore, M. S. & Johnson, D. E. (2001) Role of *Enterococcus*

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

faecalis suface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Infect. Immun.,69(7): 4366-4372.

-Shepard, B. D. & Gilmore, M. S. (2002). Antibiotic – Resistance Enterococci: The Mechanisms and Dynamics of Drug Introduction and Resistance. Microb. Infect., 4: 215-224.

- Sherman, J. M. (1937). The streptococci. In: Facklm, R. R. & Teixeira, L. M. (1997). Enterococcus. In: Collier, A. Infections".; Balow, S. & Sussman, M. (Eds.). "Microbiology & Microbial Topiey & Wilson. 9th edition.Edward Arnold, London.pp:669-682.

- Shiono, A. & Ike, Y. (1999). Isolation of *Enterococcus faecalis* clinical isolates that efficiently adhere to human bladder carcinoma T24 cells & inhibition of adhesion by fibronectin & trypsin treatment.Infect.Immun., 67(4): 1585-92.

- Sillanpää, J.; Xu, Y.; Nallapareddy, S. R.; Murray, B. E. & Höök, M. (2004). A family of putative MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. Microbiol., 150: 2069-2078.

-Singh, K. V.; Coque, T. M.; Weinstock, G. M. & Murray, B. E. (1998). *In vivo* testing of an Enterococcus faecalis efaA mutant and use of homologs for species identification. FEMS Immunol Med Microbiol., 21(4): 323-331.

- Siqueira, J. F. & Rôças, I. N. (2004). Polymerase chain reaction-based Analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 97: 85-94.

- Siqueira,J.F. ; Rocas, I.N. ; Souto , R. ; De Uzeda, M. & Colombo, A. P. (2002). Actinomyces species, streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infecation. J. Endod., 28: 168-172.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

- Siqueira, J. F. & Rôças, I. N. (2005). Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. J. Clin. Microbiol.; 43: 3314.

- Smyth, C. J.; Matthews, H.; Halpenny, M. K.; Brandis, H. & Colman, G. (1987). Biotyping, serotyping dfsband phage typing of *Streptococcus faecalis* isolated from dental plaque in the.

- Sobrinho, A. P.; Barros, M. H.; Nicoli, J. R.; Carvalho, M. A.; Farias, L. M. & Bambirra, E. A. (1998). Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. J. Endod**.** 24:405-408.

- Stuart, C. H.; Schwartz, S.A.; Beeson, T. J. & Owatz, C. B. (2006). *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J. Endod., 32:93-98.

- Sunde, P. T.; Olsen, I.; Debelian, G. J. & Tronstad, L. (2002). Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. J. Endod., 28:304-310.

T

- Tendolkar, P. M.; Baghdayan, A. S. & Shankar, N. (2005). The N-Terminal domain of Enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol., 187(17): 6213-6222.

- Tendolkar, P. M.; Baghdayan, A. S. & Shankar, N. (2006). Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis* .J. Bacteriol., 188(6): 2063- 72.

- Tennert, C.; Fuhrmann, M.; Wittmer, A.; Karygianni, L.; Altenburger, M. J.; Palz, K.; Hellwig, E. & Al-Ahmad, A. (2014). American Association of Endodontists. Volume 40, Number 5.

- Tomita, H. & Ike, Y. (2004). Tissue-specific adherent *Enterococcus faecalis* strains that show highly efficient adhesion to human

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

bladders carcinoma T24 cells also adhere to extracellular matrix proteins.Infect.Immun.,72(10): 5877-5885.

- Treitman, A. N.; Yarnold, P. R.; Warren. J. & Noskin, G.A. (2005). Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002). J. Clin. Microbiol., 43(1):462-3.

U

- Udo, E. E.; Al-Sweih, N.; Pillips, O. A. & Chugh, T. D. (2003). Species prevalence & antibacterial resistance of enterococci isolatedin Kuwait hospitals. J. Med. Microbiol., 52:163-8.

V

- Vergis, E. N.; Shankar, N.; Chow, J. W.; Hayden, M. K.; Snydman, D. R.; Zervos, M. J.; Linden, P. K.; Wagener, M. M. & Muder, R. R. (2002). Association between the presence of Enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin & Enterococcal surface protein & mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. Clin. Infect. Dis., 35: 570-575.

W

- Waar, K.; Muscholl-Silberhorn, A. B.; Willems, R. J.; Slooff, M. J.; Harmsen, H. J. & Degener, J. E. (2002). Genegrouping & incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture & fecal isolates. J. Infect. Dis., 185: 1121-1127.
- Waar, K. (2004). Pathogenesis of *Enterococcus faecalis* infections review of the literature. Ph.D. Thesis, University of Groningen, Dutch.
- Wang, Q. Q.; Zhange, C. F.; Chu, C. H. & Zuh, X. F. (2011). Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filledroot canals of teeth associated with apical periodontitis. Internat. J. Oral Sci.: 19–23.
- Waters, C. M.; Antiporta, M. H.; Murray, B. E. & Dunny, G. M. (2003). Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

of cellular chain length, supernatant pheromone levels, & degradation of fibrin & misfolded surface proteins. J. Bacteriol., 185(12): 3613-3623.

- Wells, C. L.; Moore, E. A.; Hoag, J. A.; Hirt, H.; Dunny, G. M. & Erlandsen, S. L. (2000). Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. Infect. Immun., 68(12): 7190-7194.
- William, J.; Martone, M. D.; James, E.; Alan, L. & Bison, M. D. (1998). Enterococcal resistance. Infect. Dis, 4(3).
- Wirth, R. (2000). Sex phermones & gene transfer in *Enterococcus faecalis* .Res.Microbiol., 151: 493-6.
- Woodford, N.; Debiyi, A. M.; Palepou, M. F. & Cookson, B. D. (1998) .Diversity of VanA glycopeptides resistance elements in *Enterococci* from humans and non human sources. Antimicrob. Agents Chemother., 42 : 502 -508.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms". PNAS 74(11): 5088–5090

Y

- Yother, J.; Trieu-Cuot, P.; Klaenhammer, T. R. & Devos, W. (2002). Genetic of Streptococci, Lactobacilli & enterococci: review of the sixth international conference. J. Bacteriol., 184(22):6085-92.

Z

- Zoletti, G. O.; Siqueira, J. F. & Santos, K. R. N. (2006). Identification of *Enterococcus faecalis* in root filled teeth with or without periradicular lesions by culture dependent and independent approaches. J. Endod., 8:722-26.

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المواقع الالكترونية

-Kem-En –Tec Nordic . com.

- **http://ar.wikipedia.org**

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

الملاحق

Appendixes

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ملحق (1) تفاصيل العينات المعزولة من جذور الاسنان ونتائج العزل الاولي لبكتريا *E.faecalis*

رقم العزلة	العمر	الجنس	رقم السن	نوع الإصابة	التشخيص
1	18	F	30	2	+
2	28	F	17	1	-
3	10	F	19	1	-
4	48	F	19	1	-
5	17	F	26	1	+
6	19	M	23	1	-
7	30	F	18	1	-
8	50	F	12	1	+
9	21	F	25	1	-
10	17	M	29	1	+
11	11	F	9	1	-
12	48	M	19	1	-
13	43	F	30	2	+
14	13	F	30	1	+
15	11	F	30	1	+
16	29	F	20	1	-
17	25	F	17	1	+
18	9	F	31	1	+
19	15	M	25	2	+
20	19	F	19	1	-
21	24	F	30	1	-
22	16	F	29	2	+
23	22	F	22	2	+
24	48	M	30	1	-
25	30	F	30	1	-
26	25	F	29	2	+

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

+	1	19	M	11	27
-	1	31	F	13	28
-	1	25	F	32	29
+	2	25	M	20	30
+	1	22	F	18	31
-	1	16	F	38	32
+	2	31	F	29	33
-	1	26	M	50	34
+	2	30	F	40	35
-	1	19	F	18	36
-	1	25	F	30	37
+	2	30	F	22	38
-	1	20	F	11	39
+	2	29	M	25	40
+	2	30	M	40	41
-	1	21	F	48	42
+	2	29	M	35	43
-	1	19	M	20	44
-	1	20	F	25	45
-	1	23	F	22	46
+	1	30	F	23	47
+	1	32	M	15	48
-	1	19	F	32	49
+	1	29	M	12	50
+	2	30	M	30	51
+	2	30	F	25	52
+	2	26	F	40	53
-	1	18	F	43	54

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

+	1	32	F	31	55
-	1	21	M	26	56
+	2	31	F	22	57
+	2	29	F	29	58
-	1	30	F	26	59
-	1	19	F	30	60
+	1	26	F	15	61
-	2	30	F	25	62
-	1	30	F	19	63
-	1	30	F	15	64
+	2	26	M	40	65
+	1	21	F	36	66
-	2	31	F	18	67
+	2	29	F	43	68
+	1	19	F	32	69
-	1	30	F	29	70
-	2	29	F	18	71
+	1	31	M	50	72
+	1	20	F	41	73
+	1	30	F	15	74
+	2	20	F	30	75
-	1	29	F	38	76
-	2	26	F	12	77
-	1	30	F	24	78
+	2	31	F	18	79
-	1	30	F	29	80
-	1	21	M	30	81
+	2	30	F	22	82

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

-	1	19	F	27	83
-	1	25	F	19	84
-	1	17	M	11	85
-	1	10	F	30	86
+	2	30	M	25	87
-	1	29	F	18	88
-	1	30	F	20	89
+	2	31	F	18	90
+	2	30	F	25	91
-	1	21	F	15	92
-	1	12	F	50	93
-	1	19	F	13	94
-	1	30	M	23	95
-	1	27	F	19	96
-	1	30	F	29	97
-	1	20	F	32	98
-	1	19	M	44	99
-	1	31	F	35	100

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ملحق (2) الاختبارات التشخيصية والكيموحيوية للعزلات المحلية لبكتريا *E.faecalis*

الاختبار / العزلات	الكاتاليز	النمو بدرجة حرارة 45-10 م°	النمو في تركيز ملحي (%6.5) NaCl	النمو في pH=9.6)	النمو بوجود املاح التولريت (% 0.04)	تخمر سكر السوربيتول	تخمر سكر المانيتول	تخمر سكر الرافينوز	تخمر سكر الارابينوز	تخمر سكر الرايبوز	تخمر سكر الانيولين	تخمر سكر السكروز	استهلاك الكليسرول
1	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
2	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
3	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
4	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
5	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
6	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
7	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
8	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
9	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
10	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
11	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
12	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
13	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+

www.manaraa.com

14	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
15	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
16	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
17	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
18	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
19	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
20	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
21	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
22	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
23	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+
24	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+

+ الاختبار موجب ، – الاختبار سالب

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

ملحق (4) نمط مقاومة عزلات ***E.faecalis*** للمضادات الحيوية المختلفة

Nitrfuranition	**Rifampicin**	**Co-trimoxazole**	**Trimethoprim**	**Clindamycin**	**Chloramphenicol**	**Tetracycline**	**Ciprofloxacin**	**Vancomycin**	**Gentamicin**	**Streptomycin**	**Cephalothin**	**Augmentin**	**Penicillin-G**	المضادات / العزلات
R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	1
S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	2
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	3
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	4
S	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	5
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	6
S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	7
S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	8
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	9
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	10
S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	11
S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	12
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	13
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	14
S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	15
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	17
S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	18
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	19
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	20
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	21
S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	22
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	23
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	24
S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	25
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	26
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	27
S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	28
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	29
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	30
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	31
R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	32

S: العزلات الحساسة للمضادات الحيوية

R: العزلات المقاومة للمضادات الحيوية

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

+ الاختبار موجب ، − الاختبار سالب ، EF : *E.faecalis* ، EFa :*E.faecium*

العزلات البكتيرية	استهلاك السكريات والكليسيرول وانتاج حامض										
	Sorbose	**Adonitol**	**Sucrose**	**Glycerol**	**Inulin**	**Rhaffinose**	**Trehalose**	**Mannitol**	**Sorbitol**	**Arabinose**	**Ribose**
EF 1	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 2	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 3	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 4	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 5	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 6	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 7	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 8	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 9	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 10	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 11	−	−	−	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 12	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 13	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 14	−	−	−	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 15	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

العزلات البكتيرية	استهلاك السكريات والكليسيرول وانتاج حامض										
	Sorbose	Adonitol	Sucrose	Glycerol	Inulin	Rhaffinose	Trehalose	Mannitol	Sorbitol	Arabinose	Ribose
EF 16	−	−	−	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 17	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 18	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 19	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 20	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 21	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 22	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 23	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 24	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 25	−	−	−	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 26	−	−	−	+	−	−	+	+	+	−	+
EF 27	−	−	−	+	−	−	+	+	+	−	+
EFa 28	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+
EFa 29	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+
EFa 30	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+

ملحق (3) الفحوصات الكيموحيوية الـ (20) التي يحويها نظام (API-20 Strept)

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

<table>
<tr><th rowspan="2">Tests</th><th rowspan="2">Active Ingredients</th><th rowspan="2">QTY (mg/cup.)</th><th rowspan="2">Reactions/Enzymes</th><th colspan="4">Results</th></tr>
<tr><th colspan="2">Negative</th><th colspan="2">Positive</th></tr>
<tr><td rowspan="2">VP</td><td rowspan="2">sodium pyruvate</td><td rowspan="2">1.9</td><td rowspan="2">acetoin production
(Voges Proskauer)</td><td colspan="4">VP1+VP2/ wait 10 min (3)</td></tr>
<tr><td colspan="2">Colorless</td><td colspan="2">Pink-Red</td></tr>
<tr><td rowspan="2">HIP</td><td rowspan="2">hippuric acid</td><td rowspan="2">0.4</td><td rowspan="2">Hydrolysis (HIP puric acid)</td><td colspan="4">NIN/ wait 10 min</td></tr>
<tr><td colspan="2">Colorless/
Pale blue</td><td colspan="2">Dark blue/
Violet</td></tr>
<tr><td rowspan="2">ESC</td><td rowspan="2">esculin
ferric citrate</td><td rowspan="2">1.16
0.152</td><td rowspan="2">B-glucosidase hydrolysis (ESCulin)</td><td>4 hrs.</td><td>24 hrs.</td><td>4 hrs.</td><td>24 hrs.</td></tr>
<tr><td>Colorless Pale yellow</td><td>Colorless Pale yellow light grey</td><td>Black grey</td><td>Black</td></tr>
<tr><td rowspan="2">PYRA</td><td rowspan="2">Pyroglutamic acid-
β-naphthylamide</td><td rowspan="2">0.0256</td><td rowspan="2">PYRrolidonyl Arylamidase</td><td colspan="4">ZYM A+ ZYM B / 10min(PYRA to LAP) if necessary,decolorize with intense light</td></tr>
<tr><td colspan="2">Colorless or very pale orange</td><td colspan="2">Orange</td></tr>
<tr><td>α GAL</td><td>6-Bromo-2-naphthyl-αD-galactopyranoside</td><td>0.0376</td><td>α-GaLactosidase</td><td colspan="2">Colorless</td><td colspan="2">Violet</td></tr>
<tr><td>β GUR</td><td>naphthol ASBI-glucuronic acid</td><td>0.0537</td><td>β-GLUcuRonidase</td><td colspan="2">Colorless</td><td colspan="2">Blue</td></tr>
<tr><td>β GAL</td><td>2-naphthyl-βD-galactopyranoside</td><td>0.0306</td><td>β-Galactosidase</td><td colspan="2">Colorless or
Very pale violet</td><td colspan="2">Violet</td></tr>
<tr><td>PAL</td><td>2-naphthyl phosphate</td><td>0.0244</td><td>Alkaline Phosphatase</td><td colspan="2">Colorless or
Very pale violet</td><td colspan="2">Violet</td></tr>
<tr><td>LAP</td><td>L-leucine-
β-naphthylamide</td><td>0.0256</td><td>Leucine AminoPeptidase</td><td colspan="2">Colorless</td><td colspan="2">Orange</td></tr>
<tr><td>ADH</td><td>L-arginine</td><td>1.9</td><td>Arginine DiHydrolase</td><td colspan="2">Yellow</td><td colspan="2">Red</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td></td><td></td><td>4 hrs.</td><td>24 hrs.</td><td>4 hrs.</td><td>24 hrs.</td></tr>
</table>

المنارة للاستشارات
www.manaraa.com

RIP ARA MAN SOR LAC TRE INU RAF AMD	D-ribose L-arabinose D-mannito D-sorbitol D-lactose (bovine origin) D-trehalose Inulin D-raffinose starch (2)	1.4 1.4 1.36 1.36 1.4 1.32 5.12 3.12 2.56	acidification (RIBose) acidification(ARAbinose) acidification(MANnitol) acidification(SORbitol) acidification(LACtose) acidification(TREhalose) acidification(INUlin) acidification(RAFfinose) acidification(AMiDon)	Red Red Red Red Red Red Red Red Red	Orange/Red Orange/Red Orange/Red Orange/Red Orange/Red Orange/Red Orange/Red Orange/Red Orange/Red	Orange /Yellow Orange /Yellow Orange /Yellow Orange /Yellow Orange /Yellow Orange /Yellow Orange /Yellow Orange /Yellow Orange /Yellow	Yellow Yellow Yellow Yellow Yellow Yellow Yellow Yellow Yellow
GLYG	glycogen	1.28	acidification(GLYcoGen)	Red or Orange		Bright Yellow	

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

ملحق (4) نمط مقاومة عزلات *E.faecalis* للمضادات الحيوية المختلفة

ارقام العزلات	المضادات / ارقام العزلات بعد التشخيص بالPCR	Penicillin-G	Augmentin	Cephalothin	Streptomycin	Gentamicin	Vancomycin	Ciprofloxacin	Tetracycline	Chloramphenicol	Clindamycin	Trimethoprim	Co-trimoxazole	Rifampicin	Nitrfuranition
1	EF 1	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R
6	EF 2	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S
10	EF 3	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S
13	EF 4	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S
14	EF 5	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S
15	EF 6	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S
17	EF 7	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S
18	EF 8	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S
19	EF 9	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S
23	EF 10	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S
30	EF 11	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S
31	EF 12	S	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S
35	EF 13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
38	EF 14	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S
40	EF 15	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S
41	EF16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
47	EF17	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S
50	EF18	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	EF19	52
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	EF20	53
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	EF21	55
S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	EF22	56
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	EF23	59
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	EF24	65
S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	EF25	66
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	EF26	67
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	EF27	68
S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	EF28	74
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	EF29	75
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	EF30	82
S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	EF31	87
R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	EF32	91

Rifampicin	Vancomycin	Nitrofurantoin	Erythromycin	Tetracycline	Chloramphenicol	Ciprofloxacine	Nalidixic acid	Trimethoprime	Co-trimoxazole	Amikacin	Tobramycin	Gentamycin	Aztreonam	Imipenem	Cefepime	Ceftriaxone	Ceftizoxime	Cephradine	Cephalexin	Cephalothin	Amoxicillin	Ampicillin	Penicillin-G	المضادات / العزلات
R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	EF 16
R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	EF 17
R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	EF 18
R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	EF 19
R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	EF 20
R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	EF 21
R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	EF 22
R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	EF 23

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	EF 24
R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	EF 25
R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	EF 26
R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	EF 27

S : العزلات الحساسة للمضادات الحيوية

R: العزلات المقاومة للمضادات الحيوية

E.faecalis :EF

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

Summary

To detection *Enterococcus faecalis* in (100) root canal sample were collected from primary and secondary root canal infection patient`s from all the ages (10-50) during the period of (August 2013) till (January 2014). Detection depending on cultural & microscobial characteristics of bacterial cell was done to find (45) 0f *E. faecalis* species & Biochemical tests & Serological diagnosis by Lancefield method done to find (24) isolates of this species & Diagnosis by Vitek2 was done to find (20) isolates of *E. faecalis*. When the Molecular genetics Diagnosis was done the result showed find (32) isolates belong to *E. faecalis* .

The antibiotic sensitivity test was done by using (14) antibiotics, (5) isolates showed resistant against all antibiotics & the isolates showed multiresistant against for some antibiotics. All the isolates were resistant by (100 %) against (5) antibiotics.

To detection of the isolates ability of production of protease enzyme, lipase enzyme, hemolysin enzyme & gelatinase enzyme .The results showed that (24 isolate) (75 %) were protease producer, & (8 isolates) (25 %) were lipase producer, & (16 isolate) (50 %) were hemolysin producer, & (5 isolates) (15.6 %) were gelatin producer.

To detection the presence efa A gene of the isolates by used specific primer to this gene, and all isolates were have this gene .

المنارة للاستشارات

www.manaraa.com

University of Baghdad
College of Education for Pure Science
(Ibn Al-Haitham)
Department of Biology

Molecular Genetics Study of *Enterococcus faecalis* Isolated from Root canal Infection of Human in Bagdad

A thesis

Submitted to the College of Education for Pure Sciences / Ibn Al-Haitham of the University of Baghdad in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Master of Science

In

Biology / Molecular Genetics

By

Susan Ali Kadhem

Supervised By

As. Prof. Dr. Athraa Hamid Hasson

2015 A.G 1436 A.H.

www.manaraa.com