جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم

تأثير بكتريا العصيات اللبنية على نمو الأشريشيا القولونية المعزولة من أصابات الزحار الاميبي في الاطفال الرضع.

رسالة

مقدمة إلى مجلس كلية العلوم – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

دعاء محمود مهدي

إشراف

أ.م.د. كريم أبراهيم مبارك

1438هـ **2017 م**

بِسْمِ اللهِ الرَّحْمـَنِ الرَّحِيمِ

قَالُواْ سُبْحَانَكَ لاَ عِلْمَ لَنَا إِلاَّ مَا عَلَّمْتَنَا
إِنَّكَ أَنتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

صَدَق اللهُ العَظِيمْ
سورة البقرة الآية :32

ألاهداء

الى بؤرة النور التي عبرت بي نحو الأمل والامان الجميلة وأتسع قلبه ليحتوي حلمي حين ضاقت الدنيا فروض الصعاب من أجلي وسار في حلكة الدرب ليغرس معنى النور والصفاء في قلبي ...الى أبي الغالي.

والى من تتسابق الكلمات لتخرج معبرة عن مكنون ذاتها الى التي تمتهن الحب وتغزل الامل في قلبي عصفوراً يرفرف فوق ناصية الاحلام فتبقى روحي متلئلئة ومشرقة لطالما كانت دعواتها عنوان دربي ... الى أمي رحمها الله.

الى رفيق دربي ... والى من سار معي نحو العلم خطوة بخطوة وشجعني على مواصلة مسيرتي العلمية ... الى زوجي الغالي

الى طفلي وحبيب قلبي مصطفى

الى من أشد بهم أزري وبهم أقوى وعليهم أعتمد .... الى أخوتي وأخواتي .

الى شمس العلم المضيئة على مر الزمان.... الى أساتذتي

الى كل قلب خفق حباً ووفاءً لي ... والى كل من يتمنى لي الخير

أهدي ثمرة جهدي عرفاناً بالجميل

شكروتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمدُ لله مالك الملك ومدبر الامر لا إله إلا هو العليم الخبير والشكرُ له وحده رب العالمين , والصلاة والسلام على سيد الخلق محمد الرسول الامين البشير النذير ونور الهداية وعلى اله واصحابه الكرام الذين نهجوا منهجه وماتجاوزوا حده ... وبعد

لقد منّ الله عليّ بأكمال هذه الرسالة , لذا فمن دواعي الاعتراف بالجميل أن أتقدم بالشكر الى أستاذيّ الفاضل **أ.م.د. كريم أبراهيم مبارك** لأقتراحه موضوع البحث ومتابعته المتواصلة وتوجيهاته السديدة لي طوال مدة البحث معلم مقتدر, ومشرف كريم أدامه الله شمعةً تضيئ طريق طلبة العلم والمعرفة .

كما أتقدم بالشكر الى عمادة كلية العلوم / جامعة ديالى ورئاسة قسم علوم الحياة لإتاحتهم الفرصة لي لإكمال دراستي العليا.

كما اتوجه بالشكر والتقدير الى مختبرات مستشفى البتول وأخص بالذكر **الدكتور امين حسن صوفي والدكتور مازن اللهيبي** ومنتسبي شعبة البكتريولجي **(البكتريولجي حسام ثائر , التقني الطبي مسلم ثابت يحيى والبكتريولجي سلمان داوود)** لما قدموه لي من عون ومساعدة .

كما اتوجه بالشكر والتقدير الى مدير مختبر الصحة العامة **السيد هادي علي حمودي** , والى منتسبي شعبة البكتريولوجي لتقديمهم المساعدة لي واخيراً اتقدم بخالص شكري وإمتناني الى كل الذين وقفوا الى جانبي يشدون من أزري بحسن تشجيعهم وصائبُ اَرائهم وصادق نصائحهم مما كان لهم اطيب الاثر لإتمام هذه الرسالة والتمس العذر ممن فاتني أن أشكرهم جزاهم الله عني خير الجزاء ومن الله التوفيق.

اقرار المقوم العلمي

اشهد ان هذه الرسالة الموسومة ب (تأثير بكتريا العصيات اللبنية على نمو الأشريشيا القولونية المعزولة من أصابات الزحار الأميبي للأطفال الرضع) التي قدمتها طالبة الماجستير (دعاء محمود مهدي) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك اصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة .

التوقيع :

الاسم :

اللقب العلمي : أ . م . د .

التاريخ : / / 2017

اقرار المقوم اللغوي

اشهد ان هذه الرسالة الموسومة ب (تأثير بكتريا العصيات اللبنية على نمو الأشريشيا القولونية المعزولة من أصابات الزحار الأميبي للأطفال الرضع) التي قدمتها طالبة الماجستير (دعاء محمود مهدي) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصحح ماورد فيها من اخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك اصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الامر بسلامة الاسلوب وصحة التعبير .

التوقيع :

الأسم :

اللقب العلمي : أ . م . د .

التاريخ : / / 2017

الخلاصة

أُجريت هذه الدراسة في مستشفى البتول التعليمي وإبتداءً من تاريخ 9/25 /2016 ولغاية 1/ 2 / 2017 , تضمنت الدراسة جمع 200 عينة براز من أطفال بعمر سنتين فما دون مصابين بأسهال الزحار الأميبي , وزُرعت النماذج المرضية على وسط الماكونكي الصلب ولوحظت الصفات المظهرية للمستعمرات , وأُجريت الفحوصات الكيموحيوية القياسية لتشخيص العزلات البكتيرية , إذ تضمنت فحص الاوكسيديز والكتاليز و إختبارات IMViC , وبعدها شخصت ب ApiE20 وتمَّ تأكيد التشخيص بإستخدام جهاز VITEK 2.

تمّ عزل 50 عزلة بكتيرية من كلا الجنسين ومن مختلف الأعمار, أذ جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على تأثير عدة عوامل في نسبة وجود بكتريا أشريشيا القولون منها الجنس , العمر, السكن ونوع الرضاعة حيث تواجدت هذه البكتريا بنسبة أكبر في الاطفال المعتمدين على الرضاعة الصناعية فبلغت نسبة تواجدها 76% وبفارق أحصائي معنوي عالي جداً (P =0.001) , وتفاوتت نسبة الأصابة أيضاً فيما يتعلق بالعمر والجنس , وبلغت نسبة تشخيص عزلات بكتريا أشريشيا القولون بإستخدام جهاز VITEK2 100% .

أُجري إختبار الحساسية لخمسة عشرة مضاداً حيوياً بإستخدام طريقة Kerby- Bauer و أظهرت العزلات مقاومتها لمضادات مجموعة السيفالوسبورينات بشكل متفاوت حيث بلغت نسبة المقاومة للمضادات Cefixime , Cefuroxime , Ceftriaxone و Cefoxitin 88% , 90% ,84% و12% على التوالي أما مضاد Meropenem فقد بلغت نسبة الحساسية له 92%.

حُدد التركيز المثبط الادنى MIC للمضادات التالية Cefixime , Cefuroxime , Ceftriaxone و Tetracyclin بطريقة التراكيز المتسلسلة المتضاعفة اذ تبين إنّ قيم التراكيز المثبطة الدنيا لمضاد Cefixime تراوحت بين 32 _512 مايكروغرام/مل , Cefuroxime 32_1024 مايكروغرام/مل , Ceftriaxone 32_1024 مايكروغرام/مل أما مضاد Tetracyclin فقد تراوحت قيم MIC له من 16_512 مايكروغرام/مل.

كما أُجري الكشف عن إنتاج العزلات البكتيرية لعوامل الضراوة التي شَمِلت أنتاج الهيمولايسين والبكتريوسين حيث أنتجت البكتريا المعزولة من براز الأطفال الرضع الهيمولايسين بنسبة 96% والبكتريوسين بنسبة 4% وبفارق أحصائي معنوي عالي جداً (P=0.001)

.

كما تناولت دراستنا تأثير مستخلصات قشور الرمان وأوراق الزعتر على بكتريا أشريشيا القولون أذ أبدت العزلات البكتيرية حساسية عالية للمستخلص الكحولي لقشور نبات الرمان يليها المستخلص المائي الحار والبارد حيث بلغ معدل أقطار منطقة التثبيط عند تركيز 100 ملغم / مل 21.92 , 18.02 و 14.02 ملم على التوالي وتبين وجود فروق معنوية بين فعالية المستخلصات النباتية وبين التراكيز الأخرى المستخدمة في الدراسة .

أما مستخلص أوراق نبات الزعتر فبلغت الفعالية التثبيطية له عند تركيز 100 ملغم/مل للمستخلص الكحولي والمائي الحار والبارد 11.3 , 9.8 و3.22 ملم على التوالي وتبين وجود فروق معنوية بين فعالية المستخلصات النباتية وبين التراكيز الأخرى المستخدمة في الدراسة .

واخيراً , تمَّ عزل بكتريا *Lactobacillus* من براز أطفال بعمر عدة أيام ومعتمدين على الرضاعة الطبيعية بنسبة 15% وتمَّ عزلها أيضاً من جدار المهبل بنسبة 11.4% وشخصت بالاعتماد على الصفات المظهرية والأختبارات الكيموحيوية وأختبار تخمر السكريات , وتمّ أختبار تأثير عدة عوامل على نموها حيث تضمنت هذه العوامل (pH , NaCL , أملاح الصفراء و 0.4% phenol) وأستخدمت العزلة التي لها قابلية على تحمل مدى وأسع من pH وأملاح الصفراء كمعزز حيوي لمعرفة تأثيرها التثبيطي على بكتريا أشريشيا القولون حيث بلغ معدل قطر منطقة التثبيط لبكتريا *Lactobacillus* على50 عزلة من بكتريا أشريشيا القولون 22.82 ملم.

ونستنتج من هذه الدراسة أن بكتريا *Lactobacillus* تمتلك فعالية تثبيطية للأشريشيا القولونية أعلى من مستخلصات النباتين الرمان والزعتر.

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة

الخلاصة		
الفصل الاول: المقدمة		
1	المقدمة Introduction	2
1	اهداف البحث	4
الفصل الثاني: استعراض المراجع Leterature Review		
1-2	ألاسهال diarrhea	6
2-2	أنواع الاسهال Type of diarrhea	7
1-2-2	ألاسهال المائي الحاد Acute Watery Diarrhea	7
2 -2- 2	ألاسهال الحاد المصحوب بوجود الدم Acute Bloody Diarrhea (dysentery)	7
3-2-2	ألاسهال المستمر Persistent diarrhea	7
4 -2 -2	ألاسهال الحاد االمصحوب بسوء التغذية Diarrhea with severe malnutrition	7
3-2	طفيلي الزحار ألاميبي *Entamoeba histolytica*	8
4-2	العائلة المعوية Enterobacteriaceae	9
5-2	بكتريا أيشيريشا القولون *Escherichia coli*	10
6-2	تصنيف بكتريا أشيريشيا القولون Classification of *Escherichia coli*	11
7 -2	مجاميع بكتريا أشريشيا القولون المسببة للأسهال	11
1 -7 -2	أشريشيا القولون الممرضة للأمعاء *Enteropathogenic E.coli*	11
2 -7 -2	أشريشيا القولون السامة للأمعاء *Entero toxigenic E.coli*	11
3 -7 -2	أشريشيا القولون الغازية للأمعاء *Entero invase E.coli*	12
4 -7 -2	أشريشيا القولون الأمعائية التكتلية *Entero Aggregative E.coli*	12
5 -7 -2	أشريشيا القولون النزفية للأمعاء *Enterohemorrhage E.coli*	12
6 -7 -2	أشريشيا القولون ذات الألتصاق المنتشر *Entero adherence E. coli*	12

2- 8	التراكيب المستضدية Antigenic Structures	13
2- 8- 1	المستضدات الجسمية (O)	13
2- 8- 2	المستضدات المحفظية (k)	13
2- 8- 3	المستضدات السوطية (H)	13
2- 9	عوامل الضراوة Virulance factors	13
2- 9- 1	عوامل الالتصاق Adhesive factors	14
2- 9- 2	أنتاج الهيمولايسين Heamolysin production	14
2- 9- 3	البكتريوسين Bacteriocin	15
2- 9- 4	حاملات الحديد Siderophores	15
2- 9- 5	السموم الداخلية Entero toxins	15
2- 9- 6	تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Production	16
2- 10	أمراضية بكتريا أيشيريشا القولون Pathogenicity of *Escherichia coli*	16
2-11	وبائية الأسهال لبكتريا أيشيريشا القولون Epidimiology of *Escherichia coli*	17
2- 12	المضادات الحيوية Antibiotics	18
2- 13	آلية عمل المضادات Mechanisms of action of antibiotic	19
2- 14	آليات مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية Mechanisms of Resistance for antibiotic	20
2- 15	المستخلصات النباتية Plant Extracts	21
2- 16	نبات الرمان *Punica granatum*	22
2- 16- 1	الاستخدامات الطبية Medical Uses	22
2- 17	نبات الزعتر *Thymus vulgaris*	23
2- 17- 1	الاستخدامات الطبية Medical Uses	24
2- 18	المعززات الحيوية Probiotics	25
2- 19	صفات البكتريا المستخدمة كمعززات حيوية Charecters of bacteria uses as Probiotics	26
2- 20	آلية عمل المعززات الحيوية Mechanisms of action of Probiotics	27

2- 21	بكتريا حامض اللاكتيك lactic acid Bacteria (LAB)	28
2- 22	جنس *Lactobacillus*	28
2- 23	الفعالية التثبيطية لبكتريا حامض اللاكتيك The inhibition effect of lactic acid bacteria	29
2- 24	التأثير التثبيطي لبكتريا حامض اللاكتيك على بكتريا ألاشريشيا القولون The inhibition effect of *Lactobacillus* on *E.coli*	30
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل		
3- 1	الاجهزة والمواد المستعملة	33
3- 1- 1	الاجهزة المستعملة	33
3- 1- 2	المواد الكيميائية والبايولوجية	34
3- 1- 3	الاوساط الزرعية	35
3- 1- 4	الكواشف والمحاليل	36
3- 1- 5	اقراص المضادات الحيوية	37
3- 1- 6	مساحيق المضادات الحيوية	38
3- 1 - 7	مواد أخرى	38
3- 2	طرائق العمل	38
3- 2- 1	تحضير المحاليل والكواشف	38
3- 2- 1- 1	محلول ثابت العكورة القياسي Macfarland Standard	38
3- 2- 1- 2	محاليل صبغة كرام	38
3- 2- 2	الكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا	39
3- 2- 2- 1	كاشف إنزيم الكاتاليز	39
3- 2- 2- 2	كاشف الاوكسيديز	39
3- 2- 2- 3	كاشف كوفاك	39
3- 2- 2- 4	كاشف احمر المثيل	40
3- 2- 2- 5	كاشف فوكس بروسكاور	40
3- 3	تحضير الاوساط الزرعية	40
3- 3- 1	وسط اكار الدم	40

3- 3- 2	وسط اكار المكونكي	41
3- 3- 3	وسط مثيل الايوسين الازرق	41
3- 3- 4	وسط اكار سايمون ستريت	41
3- 3- 5	وسط اكار اليوريا	41
3- 3- 6	وسط ماء الببتون	41
3- 3 - 7	وسط الصويا الصلب	42
3- 3- 8	وسط أكار الكلغلر	42
3- 3- 9	وسط نقيع القلب والدماغ السائل	42
3- 3- 10	وسط نقيع القلب والدماغ الصلب	42
3- 3- 11	وسط اكار مولر هنتون	42
3- 4	جمع العينات Collection of Sample	42
3- 5	فحص البراز العام Generial stool examination	43
3- 6	تشخيص البكتيريا Bacterial Identification	43
3- 6- 1	زرع العينات Samples culture	43
3- 6- 2	الفحص المجهري Microscopic Examination	44
3- 6- 3	الفحوصات الكيموحيوية Biochemical test	44
3- 6- 4	تشخيص البكتريا بأستخدام عدة التشخيص Api 20E Kit	45
3- 6- 5	تشخيص البكتريا بأستخدام VITEK2	47
3- 7	حفظ وإدامة العزلات الجرثومية	48
3- 8	عوامل الضراوة لبكتريا أشريشيا القولون	48
3- 8- 1	أنتاج الهيمولايسين	48
3- 8- 2	أنتاج البكتريوسين	49
3- 9	فحص الحساسية للمضادات الحياتية Antibiotic test suscepittibility	49
3- 10	تحديد التركيز المثبط الادنى Determination Minimal Inhibitory Concentration (MIC)	50
3- 11	طرائق تحضير المستخلصات النباتية	51
3- 11- 5	تحديد الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية	51
3- 12	بكتريا *Lactobacillus*	53
3- 12- 1	تحضير الاوساط الخاصة بعزل وتشخيص البكتريا	53

3- 12- 1- 1	وسط MRS Agar	53
3- 12- 1- 2	وسط MRS broth	53
3- 12- 1- 3	وسط تميع الجلاتين	53
3–12–1–4	وسط أختبار الحركة	53
3– 12– 1– 5	وسط تخمير السكريات	53
3- 13	جمع العينات Collection of sample	54
3- 14	زرع العينات Samples culture	54
3- 15	تشخيص العزلات البكتيرية Bacterial Identification	55
3- 15- 1	الفحص المجهري	55
3- 15- 2	الفحوصات الكيموحيوية	55
3- 15- 2- 1	أختبار تميع الجلاتين	55
3- 15- 2- 2	أختبار الحركة	55
3- 15- 2- 3	أختبار تخمر السكريات (الكربوهيدرات)	55
3- 15- 2- 4	أختبار النمو في مستويات مختلفة من الرقم الهيدروجيني pH	56
3- 15- 2- 5	أختبار تحمل كلوريد الصوديوم	56
3- 15- 2- 6	أختبار تحمل الفينول	56
3– 15– 2– 7	أختبار تحمل أملاح الصفراء	56
3- 16	تأثير بكتريا *Lactobacillus* على بكتريا *Escherichia coli*	57
4	النتائج والمناقشة Result & Discussion	58
4- 1	عينة الدراسة	59
4 – 2	توزيع حالات الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون حسب نوع الرضاعة	61
4 – 3	توزيع حالات الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون وحسب الجنس	62
4 – 4	توزيع حالات الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون وحسب العمر	62
4 – 5	توزيع حالات الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون وحسب نوع السكن	63
4 – 6	تشخيص بكتريا أشريشيا القولون	64
4- 6- 1	الصفات الزرعية	64
4- 6- 2	الفحص المجهري	64
4- 6- 3	الفحوصات الكيموحيوية	64
4- 6- 4	الفحوصات الكيموحيوية بإستخدام جهاز VITEK 2 Compact GN	65

4 – 7	عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus*	66
4 – 8	التشخيص البكتيري	67
4- 8 -1	الصفات الزرعية	68
4- 8 -2	الفحص المجهري	68
4 – 8- 3	الفحوصات الكيموحيوية	68
4 -8 -4	أختبار تخمر السكريات	69
4- 8 -5	تأثير ألاس الهيدروجيني pH على نمو بكتريا *lactobacillus*	69
4 – 8 -6	أختبار تحمل كلوريد الصوديوم	70
4- 8 -7	أختبار تحمل الفينول	70
4- 8 -8	أختبار تحمل أملاح الصفراء	70
4- 9	عوامل الضراوة لبكتريا أشريشيا القولون	71
4 – 10	إختبار حساسية بكتريا أشريشيا القولون للمضادات الحيوية	72
4 – 11	تحديد التركيز المثبط الأدنى	76
4–12	الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية Inhibition Activity of Plant Extract	79
4–12– 1	مستخلص نبات الرمان *Punica granatum* extracts	79
4–12–2	مستخلص نبات الزعتر *Thymus vulgaris* extract	81
4 –13	تأثير بكتريا *Lactobacillus* على بكتريا أشريشيا القولون	85
4 – 14	مقارنة بين التأثير التثبيطي للمستخلصات النباتية المستخدمة في الدراسة وبكتريا *Lactobacillus*	85
5- 1	الاستنتاجات	88
5- 2	التوصيات	89
	المصادر العربية	90
	المصادر الأجنبية	96
	الملاحق	111

قائمة الجداول

التسلسل	اسم الجدول	رقم الصفحة
3-1	الأجهزة المستخدمة في الدراسة	33
3-2	المواد الكيميائية والبايولوجية المستخدمة في الدراسة	34
3-3	الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة	35
3-4	الكواشف والمحاليل المستخدمة في الدراسة	36
3- 5	اقراص مضادات الحياة المستخدمة في الدراسة	37
3- 6	مساحيق مضادات الحياة المستخدمة في الدراسة	38
4- 1	توزيع حالات الأصابة بطفيلي الزحار الأميبي حسب الجنس والعمر	59
4- 2	نسبة البكتريا المسببة لأسهال الأطفال الرضع والمصاحبة لحالات الزحار الاميبي.	60
4- 3	نسبة بكتريا أشريشيا القولون المسببة للأسهال في الأطفال الرضع والمصاحبة لحالات الزحار الأميبي.	60
4- 4	نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون المسببة للأسهال وحسب نوع الرضاعة.	61
4- 5	نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الأطفال الرضع وحسب الجنس.	62
4-6	نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الأطفال الرضع وحسب العمر.	63
4-7	نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الأطفال الرضع وحسب نوع السكن	63
4-8	الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا *Escherichia coli*	64
4- 9	نتائج الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص عزلات بكتريا أشريشيا القولون في جهاز ViTEK2.	66
4- 10	لأعداد والنسب المئوية لبكتريا *Lactobacillus* المعزولة من	67

	براز الاطفال الرضع.	
4 –11	يوضع الأعداد والنسب المئوية لبكتريا *Lactobacillus* المعزولة من جدار المهبل	67
4 –12	الفحوصات الكيموحيوية لعزلات بكتريا *Lactobacillus*	68
4– 14	النسبة المئوية لعزلات بكتريا أشريشيا القولون المنتجة للهيمولايسين والبكتريوسين	72
4– 15	حساسية بكتريا أشريشيا القولون للمضادات الحيوية قيد الدراسة.	76
4– 16	قيم التركيز المثبط الادنى لمضادات Cefixime , Tetracycline , Ceftriaxone, Cefuroxime.	78
4– 17	معدل أقطار منطقة التثبيط للتراكيز المستخدمة في الدراسة لمستخلص نبات الرمان.	80
4 – 18	معدل أقطار منطقة التثبيط للتراكيز المستخدمة في الدراسة لمستخلص نبات الرمان.	81
4 – 19	مقارنة بين فعالية مستخلصات نبات الرمان والزعتر من حيث الفعالية التثبيطية	83
4 – 20	المقارنة بين التأثير التثبيطي لبكتريا *Lactobacillus* والمستخلصات النباتية المستخدمة في الدراسة	86

قائمة الاشكال

التسلسل	اسم الشكل	رقم الصفحة
4–1	مظهر بكتريا *Lactobacillus* على وسط MRS Agar	68

2 – 4	التأثير التثبيطي لمستخلص نبات الرمان على بكتريا أشريشيا القولون المسببة للأسهال في الأطفال الرضع.	80
3 –4	التأثير التثبيطي لمستخلص نبات الزعتر على بكتريا أشريشيا القولون .	82
4 – 4	التأثير التثبيطي لبكتريا *Lactobacillus* على بكتريا أشريشيا القولون.	85

الفصل الاول

المقدمة Introduction

الفصل الأول

المقدمة Introduction

ألاسهال هو حالة مرضية ناتجة من خلل وظيفي في الجهاز الهضمي اوأنه التغير عن النمط الطبيعي للبراز من حيث عدد مرات التبرز اذ يكون التبرز اكثر من خمسة مرات خلال 24 ساعة بقوام سائل او شبه سائل مما يؤدي الى فقدان السوائل (Davidson *et al*., 2002).

يحدث الاسهال نتيجة تعرض أمعاء الانسان الى أنواع عديدة من الأحياء المجهرية المرضية كالفايروسات مثل *Rotaviruse* , الطفيليات مثل *Entamoeba histrolytica* , فطريات مثل *Candia albican* فضلاً عن الاصابات البكتيرية مثل ال *Escherichia coli* , *Salmonella* و *Shigella* وغيرها كل نوع من هذه ألاحياء المجهرية المرضية يسبب المرض بألية مختلفة وأعتماداً على عوامل الضراوة التي يمتلكها (Palmer *et al*., 2003).

تعتبر بكتريا *Escherichia coli* من الفلورا الطبيعية حيث تتواجد في أمعاء الانسان والثديات ومع ذلك بعض سلالاتها تمتلك سمات الفوعة فتسبب العديد من الأمراض حيث وصفت كعامل مسبب للاسهال في الأطفال , فعند تمزيق الجدار الجنيني Fetal membranes وبعد ساعات قليلة من الولادة تبدأ هذه البكتريا بأستعمار أمعاء الرضيع (Fanaro *et al*., 2003).

كما أن قسم من السلالات التابعة لهذا النوع تكون ممرضة وتسبب أمراضاً خطيرة وقاتلة للبشر, وتعد سلالة (EPEC) *Enteropathogenic E.coli* من الممرضات المسببة للأسهال خاصة في الاطفال تحت عمر 5 سنوات لاسيما في البلدان النامية, كما تعد بكتريا أنتهازية في حالة الاصابة بنقص المناعة المكتسبة وتكون الاصابة بها مترافقة مع واحدة او اكثر من المسببات الطفيلية والفايروسية لألتهاب المعدة والامعاء كالأصابة بطفيلي *Entamoeba histolytica* و*Balantidium coli* (Belanger *et al*.,2011) .

وهناك عدد من الممرضات المعوية البكتيرية التي تسبب أصابة مشابهة لحالة ألاصابة بالزحار الأميبي مثل *Shigella , Salmonella ,E.coli (O157:H7) Campylobacter spp* (Hegazi *et al*., 2013).

ونظراً لتباين المسببات المرضية المايكروبية للأصابات المعوية ولكون التشخيص لا يكفي بالأعتماد على العلامات السريرية للمرض فقط عليه من المهم تشخيص المسبب المرضي المسؤول عن ألاسهال مما يساعد في تطوير وسائل السيطرة والوقاية من المرض وقد وأجهت هذه المحاولات في البداية مصاعب تتمثل بعدم توفر ألاختبارات التشخيصية من حيث نوعيتها ودقتها وخاصة في بلدان العالم الثالث, وفي عصرنا الحالي حصل تطور في وسائل التشخيص المختلفة وأهمها وأحدثها التشخيصات الجزيئية على الرغم من كونها محدودة ألاستخدام في تلك البلدان (الاحمر , 2000).

وقد أثبتت دراسات قامت بها منظمة الصحة العالمية WHO بأن مرض الاسهال والالتهاب في الامعاء يأتي في المرتبة الرابعة من أسباب الوفيات في العالم في البلدان النامية , وفي المرتبة العاشرة في البلدان المتقدمة صحياً (الشبيب, 2005).

ومن البرامج المهمة للسيطرة على الاسهال لدى الاطفال والرضع خاصة هي محلول الارواء الفموي Oral rehydration وتناول الاغذية الغنية بالنشويات كالذرة والبطاطا والرز, وقد أدى التطور في العلوم الطبية في القرن العشرين الى أنتاج الادوية المضادة للجراثيم واستعمالها في تقليل أعداد الوفيات الناجمة عن الأصابات البكتيرية ولاسيما تلك المسببة للأسهال الا أن الاستعمال المفرط والمتكرر لها أدى الى ظهور سلالات مقاومة (الكبيسي واخرون., 2013).

أنتشر في ألآونة ألاخيرة أستخدام الاعشاب والنباتات الطبية بشكل واسع كعلاج وذلك بسبب قلة تأثيراتها الجانبية , فالتراكيز القليلة منها يتقبلها الجسم بصورتها الطبيعية كما تتميز بأن لها فعالية عالية ضد الممرضات وأمتلاكها لمجموعة من المركبات التي تتميز بأستقراريتها العالية وفعاليتها البايولوجية الممتازة على العكس من المركبات الصناعية ذات التأثيرات الجانبية الضارة (الحاج, 2003).

ان ظهور سلالات مقاومة للمضادات الحياتية أدى الى المخاوف من عدم امكانية مصانع الادوية على أنتاج مضادات فعالة بالنوعية المناسبة لمقاومة ظهور تلك السلالات لذا دعت الحاجة الى التفكير باستخدام اساليب علاجية اخرى لا سيما المعززات الحياتية (Probiotic) التي تعمل على تعزيز واستيطان الفلورا الطبيعية (Normal flora) في الامعاء ومن ثم الحماية من حدوث الاسهال والامراض الاخرى (أحمد, 2008).

وقد أشارت الدراسات بأمكان أستخدام بكتريا حامض اللاكتيك *Lactobacillus* في علاج حالات الاسهال الناتج عن ألاصابات المعوية المختلفة حيث أثبت أستخدام هذا النوع من البكتريا تأتيرات وقائية اتجاه الاصابات المعوية (سلمان, 2014) ومن هنا جاءت دراستنا لتهدف الى:

1 _ أجراء تحليل البراز العام للأطفال الرضع المصابين بأسهال الزحار الأميبي.

2_ عزل بكتريا أشريشيا القولون *Escherichia coli* من أطفال رضع بعمر سنتين فما دون مصابين بالزحار الاميبي.

3_ دراسة حساسية العزلات للمضادات الحيوية.

4 _ عزل وتشخيص بكتريا ال *Lactobacillus* ومعرفة تأثيرها التثبيطي على بكتريا الاشريشيا القولونية .

5_ دراسة التأثير التثبيطي لنوعين من المستخلصات النباتية على بكتريا ألاشريشيا القولونية المسببة للأسهال .

الفصل الثاني

إستعراض المراجع Leterature Review

الفصل الثاني

2- إستعراض المراجع Leterature Review

2-1 - ألاسهال diarrhea

يعد الاسهال من الامراض الخطيرة والواسعة الأنتشار في العراق والعالم فيعرف بأنه زيادة في كمية وليونة البراز ويتمثل بزيادة عدد مرات التغوط حيث يكون أكثر من خمسة مرات يومياً, تكون معظم نوبات الاسهال خفيفة الا إنِّ ألاسهال الحاد يتسبب في فقدان كميات كبيرة من السوائل مما يؤدي الى الجفاف لذلك يجب تعويض هذه السوائل المفقودة من بداية حدوث حالات الأسهال (WHO, 2009).

تشير التقارير الى إنِّ متوسط عدد حالات الاسهال سنوياً دون سن الخامسة في المناطق النامية 3.2 _ 4.8 مليون حالة تحدث خلال السنة الاولى من العمر , وتتناقص تدريجياً في عمر 4 سنوات الأ أن الاهتمام في مجال الصرف الصحي والتغذية والتعليم والمعالجة المبكرة للجفاف عن طريق الفم أدى الى أنخفاض أعداد الاصابة , وإنِّ أنتشار الجراثيم المعوية تختلف من منطقة الى أخرى معتمدة على الضروف الاجتماعية والاقتصادية والصحية لتلك المناطق , وأن بعض حالات الاسهال سببها أنخفاض مستوى الخدمات الصحية في المستشفيات (Black *et al*.,2010).

بدأت دراسة الاحياء المجهرية بشكل وأسع بعد الحرب العالمية الثانية حيث أزداد أنتشار هذه الاحياء الى أماكن متعددة ومتباعدة من العالم نتيجة التطور في المجال الصناعي والتجاري مما ينتج عن ذلك أزدياد مستوى التلوث البيئي , وقد أثبتت دراسة قامت بها منظمة الصحة العالمية بأن مرض الأسهال والألتهاب في الامعاء يأتي في المرتبة الرابعة من أسباب الوفيات في البلدان النامية وفي المرتبة العاشرة في البلدان المتقدمة صحياً (الشبيب, 2005).

هناك العديد من العوامل التي تزيد من معدلات أصابة الفرد بالممرضات المعوية والتي أشارو اليها الباحثين من خلال دراستهم منها العمر , قلة المناعة , سوء التغذية , غياب الرضاعة الطبيعية وتدني المستوى التعليمي للأم وتردي مستويات الصرف الصحي والتخلص من الفضلات (Al-Saady *et al* ., 2006).

ومما تجدر الاشارة اليه أن البكتريا التي تسبب التهاب المعدة والامعاء تقوم بمهاجمة الجهاز الهضمي من خلال أنتاج السموم Toxins التي تعمل على زيادة أفرازات الأمعاء مما يسبب أسهال مائي شديد, وغزو البكتريا لخلايا الأمعاء مما يسبب خللاً بوظيفتها الأساسية وهي الأمتصاص مما يؤدي الى حدوث الأسهال (WHO, 2006) .

2-2 أنواع الاسهال Type of diarrhea

2 – 2 – 1 ألاسهال المائي الحاد Acute Watery Diarrhea

يحدث نتيجة مهاجمة الامعاء الدقيقة من قبل الاحياء المجهرية المرضية كبكتريا الاشريشيا القولونية والكوليرا أو نتيجة الاصابة بفيروس الروتا (Rota virus) ويستمر هذا النوع لعدة ساعات أو أيام, حيث يتميز الخروج بأحتوائه على كمية كبيرة من السوائل والاملاح ممايؤدي الى حدوث الجفاف , فقدان الوزن , الغثيان والألم في البطن .

2 -2- 2 ألاسهال الحاد المصحوب بوجود الدم Acute Bloody Diarrhea (dysentery)

يحدث هذا النوع من الاسهال نتيجة أصابة الامعاء الدقيقة ببعض الجراثيم مثل السالمونيلا والشكيلا وطفيلي Entamoeba histolytica , ويتم التعرف عليه من خلال ملاحظة وجود الدم والمخاط في الخروج , من المخاطر التي يسببها هذا النوع من الاسهال هو الضرر بالغشاء المخاطي للأمعاء والجفاف وسوء التغذية وتعفن الدم .

2 -2 – 3 ألاسهال المستمر Persistent diarrhea

يستمر هذا النوع من الاسهال لمدة 14 يوم أو أكثر وقد يسبب سوء التغذية والاصابات الخطيرة ألاخرى بألاضافة الى الجفاف.

2 -2 – 4 ألاسهال الحاد االمصحوب بسوء التغذية Diarrhea with severe malnutrition

يعتبر من الحالات الخطيرة والتي تستحق الكثير من الاهتمام لتجنب ألاصابات الجهازية الشديدة , الجفاف, فشل القلب ونقص الفيتامينات والمعادن (Gupte,2002).

2-3 طفيلي الزحار ألاميبي Entamoeba histolytica

يعد طفيلي Entamoeba histolytica من الابتدائيات المعوية التي تصيب الانسان وتسبب له مرض الزحار الاميبي Amoebic dysentery ويقدر عدد المصابين به في جميع أنحاء العالم 480 مليون أصابة ويتسبب في وفاة (40_ 110) حالة سنوياً حيث يعتبر أحد مشاكل الصحة العامة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية (Tan *et al*.,2010).

كما يعد مرض الزحار الاميبي من أخطر الامراض المعدية وخاصة في الدول النامية حيث يعد واحد من المشاكل الصحية العالمية , يأتي في المرتبة الثالثة بعد الملاريا والبلهارزيا في حالات الوفاة (Bhaun *et al*., 2011).

أكتشف هذا الطفيلي عام 1859 من قبل Lambi وشخص لأول مرة عام 1903 من قبل Firiz schaudin (Adagu *et al*.,2002) وإنّ أول من أشار الى أن الطور المتكيس هو الطور المعدي هو Walker and Sellards وذلك في عام 1913 (Al-Bayatti,2002).

كما يعد طفيلي Entamoeba histolytica من مسببات الاسهال عند الاطفال ويكون واسع الانتشار في العالم خاصة في الدول النامية , وقد ينتج الاسهال أيضاً من تناول الغذاء أو يكون مصاحب لبعض الادوية والأمراض العامة أونتيجة الاصابة بمسببات الأسهال البكتيرية والطفيلية المختلفة (Caccio *et al*., 2003).

يمر هذا الطفيلي خلال دورة حياته بطورين هما الطور المتغذي Trophozoite والطور المتكيس Cyst حيث يكون الطور المتكيس هو الطور المعدي لهذا الطفيلي (Linford *et al*.,2009).

تحدث الاصابة بهذا الطفيلي عن طريق تناول الطعام والشراب الملوثين بالأكياس المعدية لهذا الطفيلي (Bhaun *et al*., 2011). لهذه الاكياس القابلية على البقاء حية لمدة أسابيع أو أشهر في البيئة وبذالك تكون مصدر للعدوى (Clark and Diamond, 2002).

تحدث الاصابة من خلال أنتقال هذه الاكياس عبر الطعام والشراب الملوثين الى ألامعاء الغليضة فيبدأ الطور المتغذي Trophozoite ويسبب أعراض مرضية حيث أنه يهاجم جدار المعي ليتغذى على الغشاء المخاطي للامعاء وكريات الدم الحمر مكونة القرح ومسببة حدوث الزحار الاميبي dysentery (Fotedar *et al*., 2007).

يعتمد أنتشار هذا الطفيلي على الظروف البيئية فينتشر في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية حيث تكون الظروف المناخية فيها ملائمة لوجود هذا الطفيلي كالحرارة والرطوبة والتربة الرخوة (Adagu *et al*.,2002).

أجريت عدة دراسات وبائية في مناطق مختلفة من العالم فوجد أن نسبة الاصابة بطفيلي الزحار الاميبي منتشرة عالمياً وتصل الى 50% في بعض مناطق العالم (Achers and Mirelman,2006).

إنّ مرض الزحار الاميبي مستوطن في العراق خاصة في المناطق التي يكون فيها مستوى المعيشة منخفض ففي ديالى وجد الباحثان القيسي وسلطان عام 2008 أن طفيلي الزحار ألاميبي منتشر في المناطق الريفية بنسبة أعلى من المدينة وأنه يصيب فئة الذكور بنسبة أعلى من ألاناث (القيسي وسلطان, 2008) , بالأضافة الى الدراسة التي أجريت في الديوانية حيث وجد أن طفيلي الزحار ألاميبي يصيب الذكور والانات بنسبة متقاربة 53.16% , 50.55% على التوالي ويصيب الفئة العمرية (1_6) أشهر بنسبة % 36.17 أما الفئة العمرية (6_1) بلغت نسبة ألاصابة به حوالي% 61.76 (الخالدي, 2016).

وقد أجريت دراسات عديدة في مناطق أخرى من العراق لمعرفة مدى أنتشار هذا الطفيلي حيث وجد إنّ نسبة وجود هذا الطفيلي في بغداد 23% بينما سجل أخرون نسبة أنتشار بلغت 38%, أما في صلاح الدين فقد بلغت نسبة أنتشاره % 24.2 , في الموصل بلغت نسبة أنتشاره 20.7% وبلغت نسبة أنتشاره في أربيل 26.7% , وفي الرمادي بلغت نسبة أنتشاره 35.66% هذ بالاضافة الى العشرات من الدراسات حول أنتشار هذا الطفيلي في مناطق أخرى من العراق (الجنابي والتكريتي, 2012).

4-2 العائلة المعوية Enterobacteriaceae

تتصف البكتريا التي تنتمي لهذه العائلة بأنها واسعة الأنتشار في الطبيعة فهي توجد في التربة والماء وعلى النباتات , ويتضح من اسم هذه العائلة أنها تعيش في القناة الهضمية للأنسان والحيوان وتسبب أصابات مرضية لأجزاء مختلفة من جسم الانسان حيث تم عزلها من الجروح, الحروق, القشع , الادرار والخروج (Todar,2008).

تتميز بكتريا العائلة المعوية بأنها عصوية الشكل سالبة لصبغة كرام , متحركة باسواط محيطية او غير متحركة , غير مكونة للسبورات , البعض منها يحتوي على العلب (Capsule)

, هوائية اولا هوائية أختيارية وتخمر سكر الكلكوز مع اوبدون انتاج الغاز, غير منتجة لأنزيم الاوكسديز ومنتجة لأنزيم الكاتليز العديد منها ممرضات معوية (intestinalpathogen) او قد تكون تعايشية (commensals) في حين تكون أنواع أخرى منها رمية (Saprophytic))Maulood, 2008.(

تحتوي البكتريا على تراكيب مستضدية معقدة وتمتلك عوامل الضراوة عديدة كأنتاج السموم وغيرها وتضم العديد من الاجناس اهمها هي بكتريا ال *Escherichia coli* .(Brooks *et al*., 2007)

2 – 5 بكتريا أيشيريشا القولون *Escherichia coli*

تنتمي هذه البكتريا الى العائلة المعوية Enterobacteriaceae التي تضم أجناس أخرى , مثل *Klebsiella Proteus, Salmonella* و *Shigella* وغيرها من الاجناس .(Reddy,2010)

وصفت هذه البكتريا لاول مرة من قبل Theoder Echerich عام 1885 في المانيا وسميت انذاك ب *Bacterium coil* وهي معروفة الان بال *Escherichi coli* اذ عزلت من براز اطفال اصحاء لذلك تم أعتبارها بكتريا غير مرضية انذاك (رؤوف, 2013).

تمتاز هذه البكتريا بكونها عصيات صغيرة الحجم (0.5_1.3 مايكرون) سالبة لصبغة كرام تتحرك بواسطة اسواط محيطية , وقد تمتلك بعض سلالاتها محفظة, غير مكونة للابواغ , هوائية (Aerobe) اولاهوائية اختيارية (Facultative anaerobe) ولها درجة حرارة مثلى لنموها هي 37 ˚م لكنها تستطيع النمو في مديات حرارة واسعة من15_45˚ م .(Jawetz *et al*.,2004)

توجد هذه البكتريا بصورة طبيعية في أمعاء الانسان ولكن عند أنتقالها الى أماكن أخرى من الجسم تصبح أنتهازية مسببة العديد من الامراض كالتهاب المجاري البولية والسحايا كما تصيب الانسجة الرخوة لذلك تعد بكتريا انتهازية (sharma *et al*., 2007).

تنمو على الاوساط التفريقية كوسط Eosin methylene blue(EMB) فتعطي بريق معدني لماع (الجلبي, 2008). و تنمو على الاوساط الزرعية الاعتيادية حيث أنها لا تتطلب أضافة الدم أو المصل الى الوسط , وتنمو على وسط أكار المكونكي فتظهر مستعمراتها على

هذا الوسط وردية نتيجة تخميرها لسكر اللاكتوز , محدبة وملساء تخمر اللاكتوز مع أنتاج غاز في درجة حرارة 35°م سالبة لأختبار Oxidase, اليوريا Urea , الستريت Citrate و VPوغير محللة للجلاتين , وموجبة لأختبار الاندول Indole وال Catales والمثيل الاحمر Methel red (احمد, 2008; Maulood, 2008).

2 – 6 تصنيف بكتريا أشيريشيا القولون Classification of *Escherichia coli*

صنفت بكتريا *Escherichia coli* من قبل الباحث George واخرون (George *et al*., 2007) كما في الجدول الاتي :

Kingdom	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Gammaproteobacteria
Order	Enterobacteriales
Family	Enterobacteriaceae
Genus	Escherichia

2– 7 مجاميع بكتريا أشريشيا القولون المسببة للأسهال:

تعد بكتريا ال *Escherichia coli* التي تسبب الاسهال شائعة في جميع انحاء العالم وتصنف بالاعتماد على عوامل الضراوة , تضم عدة مجاميع بكتيرية كل مجموعة تسبب المرض بآليات مختلفة عن الأخرى , والمجاميع البكترية المسببة للأسهال في الاطفال الرضع والبالغين هي :

2– 7–1 أشريشيا القولون الممرضة للأمعاء *Enteropathogenic E.coli* (EPEC)

تسبب الاسهال المائي الشديد خصوصاً في الاطفال الرضع حيث تمتلك أهداب تساعدها على التجمع وبروتينات(Intimin) وبذلك تسمح للبكتريا بالألتصاق على الخلايا الظهارية في الجزء العلوي من الامعاء الدقيقة , وتستقر في بقع أمعائية ممايؤدي الى تحطيم الزغابات الدقيقة ويؤثر ذلك على عملية الامتصاص في الامعاء وحدوث الاسهال وغالباً ما يكون الاسهال مصحوب بحمى (Nguyen *et al*., 2006).

2– 7– 2 أشريشيا القولون السامة *Entero toxigenic E.coli* (ETEC)

تسبب الاسهال المائي الحاد المؤدي الى الجفاف في الاطفال الرضع في الدول النامية والفقيرة , تلتصق هذه البكتريا بالامعاء الدقيقة بواسطة الأهداب الموجودة على سطحها كما أنها تنتج نوعين من السموم الاول heat labile الذي يكون مشابه من الناحية التركيبية والوظيفية ل Cholera toxin , والثاني heat stable الذي يحفز تكوين السوائل والالكتروليتات في تجويف الامعاء (Rivera *et al*., 2010).

2- 7- 3 أشريشيا القولون الغازية للأمعاء *Entero invase E.coli* (EIEC)

تغزو البكتريا المسببة لهذا النوع من الأسهال الخلايا الطلائية المبطنة للأمعاء الغليضة وأصابتها مشابهة لحالة الزحار البكتيري الذي تسببه ال *Shiglla* وهي فاقدة للاسواط وغير متحركة وغير مخمرة للاكتوز.

2- 7- 4 أشريشيا القولون الأمعائية التكتلية *Entero Aggregative E.coli* (EAEC)

تسبب هذه البكتريا حالات الاسهال المستمر عند الاطفال وأسهال المسافرين ويطلق عليها تسمية أشيريشيا القولون الملتصقة لقدرتها على الالتصاق على سطوح الخلايا المبطنة للامعاء بهيئة مجاميع , لا تنتج سموم heat labile و heat stable وتسبب الأسهال الحاد والمزمن لاكثر من 14 يوم في البلدان النامية وتسبب أمراض الأسهال الناتجة من تلف الغذاء في البلدان الصناعية (Jawetz *et al* ., 2004).

2- 7- 5 أشريشيا القولون النزفية للأمعاء *Enterohemorrhage E.coli* (EHEC)

يتميز هذا النوع بأنه يسبب حالتين مرضيتين وهي التهاب القولون النزفي والمتلازمة اليورمية الحالة للدم وأسهال حاد وفشل كلوي حاد , فقر الدم الانحلالي ونقص الصفيحات الدموية , وهي احدى سلالات ال *Escherichia coli* من النمط O157:H7 , وقد يتطور الأسهال الدموي ليسبب امراض الجهاز البولي منها متلازمة حال الدم اليوريمي والتي تعد سبب الفشل الكلوي الحاد عند الاطفال (Sharma *et al*., 2007).

2- 7- 6 أشريشا القولون الملتصقة *Entero adherence E. coli* (EAEC)

هذه المجموعة غير معروفة تمام المعرفة ويبدو أنها تسبب الاسهال المتوسط عند الاطفال من دون دم , وتزداد حالات الاصابة بين الاطفال الذين تتراوح اعمارهم بين (1- 5) سنوات , وأشتق أسمها من قابليتها على الالتصاق (Jawetz *et al*., 2004) .

2-8 التراكيب المستضدية Antigenic Structures

تمتلك بكتريا ال *E.coli* تراكيب مستضدية معقدة بعظها يكون مقاوم للحرارة مثل Lipopolysaccharide (LPS) حيث يسمى بالمستضد الجسمي (O), بالأضافة الى المستضدات السوطية أو المستضدات السطحية والمستضدات المحفظية (Jawetz *et al*., 2004) وهذه المستضدات تشمل :

2- 8 -1 المستضدات الجسمية (O): يعتبر هذا المستضد من عوامل الضراوة المهمة لبكتريا *E.coli* , حيث يكون مقاوم للحرارة Heat Stable ويشكل الجزء الخارجي للجدار الخلوي حيث يتكون من وحدات مكررة لمتعدد السكريد الشحمي (LPS) ,الجسم المضاد لهذا الانتجين هو IgM (Brook *et al*., 2010).

2 - 8-2 المستضدات المحفظية (k): يقع الى الخارج من المستضدات الجسمية أي يكون الغلاف الخارجي للمستضد الجسمي, ويكون حساس للحرارة Heat labile, في بكتريا الاشريشيا القولونية يتكون من متعدد السكريد الشحمي وفي الأنواع الاخرى يتكون من البروتينات , يقوم هذا المستضد بتثبيط تفعيل المتمم ومنعه من الوصول الى جدار الخلية البكتيرية وتثبيط عملية البلعمة الخلوية (أحمد, 2008).

2- 8- 3 المستضدات السوطية (H): يقع هذا المستضد على سطوح الاسواط Flagella المسؤولة عن الحركة , ويكون حساس للحرارة Heat labile ويزال بالحرارة او الكحول, يتكون هذا المستضد من سلسلة من الاحماض الامينية التي تتألف من البروتينات السوطية Flagellin . (Brook *et al*., 2010)

2- 9 عوامل الضراوة Virulance factors

تعرف الضراوة على أنها قدرة الكائن الممرض على غزو أنسجة المضيف واحداث الاصابة أو الضراوة هي المقياس الكمي لقدرة الكائن على أن يسبب المرض , وإنّ أهم عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا أشريشيا القولون هي الهيمولايسين , البكتريوسين , تكوين الغشاء الحيوي , أمتلاكها لمستضدات المحفظة والاهلاب وغيرها , تشفر عوامل الضراوة هذه من قبل جينات معينة التي تمكن البكتريا من أستعمار المضيف وبالتالي حدوث المرض (Sava *et al* ., 2010).

تشترك هذه العوامل في جعل البكتريا المرضية قادرة على الألتصاق والغزو للمضيف وتجاوز الخطوط الدفاعية الاساسية في الجسم وبالنتيجة حدوث الأصابة وأستعمار النسيج وأحتمال تحطيمه كأحد المضاعفات المرضية (الزنكنة, 2012).

وتشمل عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا أشريشيا القولون ما يلي :

2- 9-1 عوامل الالتصاق Adhesive factors

تحتاج الكائنات الممرضة الى العديد من الميكانكيات لأتمام عملية الالتصاق , حيث تعمل الخمل أو الاهداب (Pili or Fimbriae) المتكونة من مواد بروتينية ذات التراكيب الخيطية والموجودة على سطح الخلايا الجرثومية على تسهيل عملية الالتصاق بالخلايا الطلائية للأمعاء والتي ترتبط بمستقبلات نوعية على سطح تلك الخلايا (Tortora *et al* ., 2010; Kau *et al.*, 2007) .

2- 9 -2 أنتاج الهيمولايسين Heamolysin production

تتميز بكتريا ال *Escherichia coli* بقدرتها على أنتاج الهيمولايسين الذي يعد أحد ألانزيمات الحالة للخلايا والذي يلعب دور مهم في أمراضيتها, وظيفته الرئيسية هي توفير الحديد الذي يكون ذا أهمية كبيرة في أيض الخلية البكتيرية, ويطلق على هذا التحلل بالتحلل الدموي Haemolysis حيث يعمل هذا الانزيم على أحداث ثقوب في أغشية الخلايا التي يرتبط بها مسبب بذالك خروج ال ATP (Adenosine tri phosphate) منها وبالتالي موت الخلية (أحمد, 2008) .

ويعد الهيمولايسين ذو طبيعة بروتينية يفرز من قبل أنواع عديدة من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام , ويصنف الهيمولايسين الى ثلاث انواع اعتماداً على قابليته لتحلل كريات الدم الحمر واحداث المرض , النوع الاول يحلل الاغشية ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع بيتا , اما النوع الثاني فيكون ثقب بالغشاء الخلوي , وتظهر منطقة ذات لون اخضر حول المستعمرة ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع الفا , اما النوع الثالث فيحطم جدار الخلية ويطلق عليه بالتحلل الدموي من نوع كاما وهناك بعض الانواع لايظهر فيها تحلل يطلق عليها البكتريا غير محللة للدم (Han *et al*., 2010).

ان آلية عمل الهيمولايسين في احداث الأمراضية اما بصورة مباشرة عن طريق تحلل كريات الدم الحمر وتحرر الهيموكلوبين الذي يعتبر عاملاً مهما للنمو وتكاثر البكتريا او عن طريق التداخل مع الوظائف الدفاعية داخل الجسم فهو يهاجم الخلايا الدفاعية للمضيف ولكن لايحللها , وانما يمنعها من اداء وظيفتها , تنتج بكتريا ال *Escherichia coli* العديد من انواع الهيمولايسين منها الفا _هيمولايسين (بروتينات خارج خلوية) وبيتا _هيمولايسين (بروتينات مرتبطة بالخلية (Jawetz *et al* ., 2004).

3- 9-3 البكتريوسين Bacteriocin

تكون هذة المواد ذات طبيعة بروتينية خارج خلوية Extracellular ذات وزن جزيئي عالي لها القدرة على تثبيط وقتل الاجناس والانواع القريبة منها . احياناً تمتلك هذه البكتريوسينات فعالية واسعة الطيف ضد الانواع المختلفة من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام, حيث تمكن السلالات المنتجة لها من التنافس مع السلالات غير المنتجة لها في نفس البيئة , وتنتج عند نهاية الطور اللوغارتمي لنمو البكتريا , تختلف تسمية البكتريوسين تبعاً للبكتريا المنتجة لها البكتريوسين الذي تنتجه ال الاشريشيا القولونية يسمى بال Colicin (Sarika *et al*., 2010; Hammami *et al.,* 2010).

تشفر لانتاج البكتريسين ثلاث جينات محمولة بلازميدياً أولها جين انتاج البكتريسين (Bacteriocin gene) ثم يشفر لبروتين المناعة (Immunity gene) لمنع تأثير البكتريسين بالبروتين المنتج من قبلها فضلاً عن جين التحلل (lysis gene) الذي يشفر لبروتين محلل يساعد في عملية تحلل البكتريسين من الخلية المنتجة , وتتشابه آلية عمل البكتريوسين مع آلية عمل المضادات الحيوية (Hammami *et al*., 2010).

2 – 9 – 4 حاملات الحديد Siderophores

تمتلك بكتريا أشريشيا القولون نظام النقل المتخصص الذي يسمح لها بأستخدام الهيموكلوبين كمصدر للحديد حيث يقوم بتحفيز نمو البكتريا (الزبيدي, 2012).

2 – 9 – 5 السموم الداخلية Entero toxins

تمتلك بكتريا أشريشيا القولون طبقة عديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide (LPS) في غشائها الخارجي (outer membrane) يطلق عليه الذيفان الداخلي ينتج من قبل مجموعة كبيرة من سلالات *Enteropathogenic E.coli* ويكون على نوعين Heat Stable تتصف

هذه الذيفانات بثباتيتها بالغليان لمدة 15 دقيقة وقابليتها للذوبان بالماء ومقاومتها لأنزيمات التحلل البروتيني والحموضة ولكن حساسة في الوسط القاعدي , كما تتصف بأنها ذات وزن جزيئي واطئ وبذلك فانها غير ممنعة ولا تتعادل بوجود المصل المضاد , يصنف الذيفان المعوي ال ST الى نوعين (STa وSTb) حيث يكون ال STa مسببا للأسهال عند البشر اما ال STb فهو المسبب للأسهال عند الخنزير البري , وتنتج *Escherichia coli* هذا السم الذي ويؤثر على التوازن الايوني اذ يتم طرح كميات كبيرة من الماء وايونات الكلورايد والبيكاربونات من خلايا الامعاء المخاطية الى تجويف الامعاء ومن جانب اخر يعيق امتصاص ايونات الصوديوم الى الدم كذلك يسبب طرح كميات كبيرة من السوائل مما يؤدي الى حدوث الاسهال , يدخل السم عن طريق الطعام والماء حيث تنتج هذه البكتريا سمومها المعوية في الامعاء الدقيقة (Chart, 2002).

2- 9 -6 تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Production

تعرف الأغشية الحيوية بأنها تجمعات لأحياء مجهرية أحادية الخلية لتكوين تراكيب متعددة الخلايا تلتصق بالسطوح وتتكون نتيجة لأسباب بيئية منها الكثافة العالية للخلايا , نقص المغذيات , والتعرض لضغوط بيئية فيزيائية , ويتكون الغشاء الحيوي من خلال ألتصاق خلية بكتيرية مفردة بالسطح لبناء ركيزة لنموها الى مستعمرات صغيرة متكونة من عدة مئات من الخلايا المتزايدة وتعمل هذه المستعمرات على أفراز مادة تعرف بالسكريات المتعددة الخارجية وهي مادة بينية تحيط بالمستعمرات لتكوين تنظيم معقد متعدد الطبقات من الاغشية الحيوية (العزاوي, 2008; Jawetz *et al* ., 2004).

2 - 10 أمراضية بكتريا أيشيريشا القولون Pathogenicity of *Escherichia coli*

تنشأ البكتريا المعوية في القناة الهضمية بصورة طبيعية بعد عدة أيام من الولادة مؤلفة النبت الطبيعي في الامعاء وتعد أيشريشا القولون *Escherichia coli* الجزء الرئيس منها, عندما تغادر هذه البكتريا الموضع الاصلي (الامعاء) وتنتقل الى أعضاء اخرى مثل القناة البولية وقناة الصفراء او أي عضو في التجويف البطني تصبح أنتهازية وخاصة عند توفر الظروف المناسبة مثل ضعف المناعة (العتبي, 2013).

كما تعد بكتريا ال *E.coli* وأحدة من أهم المسببات المرضية لأحداث الوفيات في الاطفال الذين يعانون من الاسهال في مختلف بلدان العالم (Enayat *et al*., 2011).

تسبب التهابات المسالك البولية والسحايا لدى الاطفال حديثي الولادة والاصابات المكتسبة عند تواجد المرضى في المستشفيات في حالة تدني الخدمات الصحية (Brook *et al*., 2010).

تسبب بكتريا ال *E.coli* التهاب المجاري البولية في الأنسان حيث تكون الأصابة في النساء أكثر من الرجال (Toder, 2007) , وتعزى الامراضية العالية لهذه البكتريا الى أمتلاكها عوامل ضراوة التي تمت الأشارة اليها في الفقرة (2_9) ومنها المخملات او الاهلاب pili or fimbriae حيث تسمى بالمستضد (F) الذي يساعدها في عملية الالتصاق بالنسيج الطلائي للأمعاء وتبدأ بأنتاج سمومها الداخلية , والمستضد المحفظي (k) الذي يقاوم عملية البلعمة, والمستضد (H) أو ما يسمى بالاسواط المحيطية Peritrichous flagellae ومسؤول عن عملية الأتصاق وعن الأمراضية وأحداث الاصابة تكون هذه المستضدات الثلاثة غير ثابتة بالحرارة Heat labile أما المستضد الجسمي (O) فيكون ثابت بالحرارة Heat Stable, وتفرز هذه البكتريا السموم الداخلية Enterotoxin ايضاً (العتبي, 2013).

وهناك عوامل تزيد من نسبة الاصابة بها منها ضعف المناعة فعندما تكون دفاعات المضيف ضعيفة تصل هذه البكتريا الى مجرى الدم وتسبب التسمم الدموي Septicemia (AL_Goshaah, 2005).

2- 11 وبائية بكتريا أيشيريشا القولون *Escherichia coli* Epidimiology of

إنّ أصابة الاطفال الرضع ببكتريا ال *Escherichia coli* تؤدي الى التهاب المعدة والامعاء (Gastroenteritis) , والتهاب الغشاء المساريقي (peritonitis), والتهاب القناة الصفراوية (Cholecystitis) (الحائك, 2004).

وتعد الاصابة المعوية الحادة أحدى الاصابات الرئيسة للوفيات في العالم ولاتزال تمثل تهديداً كبيراً للصحة لاسيما في البلدان النامية , اذ تسبب الهلاك لما يقارب 1.4 مليون في كل سنة للاطفال دون سن الخامسة (الكبيسي واخرون., 2013) , كما تشير معظم الدراسات الى أرتفاع نسبة ألاصابة ببكتريا أشريشيا القولون المسببة للأسهال في الأطفال الرضع ففي كركوك أشار الباحث علي وزملاؤه عام 2009 إنّ بكتريا أشريشيا القولون تصيب الذكور بنسبة أعلى من الاناث 59.55% , 40.45% على التوالي (Ali *et al*., 2009) , وفي كربلاء أجرى الباحث الكبيسي وزملاؤه عام 2013 حول مسببات ألاسهال الطفيلية والبكتيرية في مستشفى

الحسيني العام حيث كانت نسبة الاصابة ببكتريا الاشريشيا القولونية المرافقة للأصابات الطفيلية للفئة العمرية من (1_ 10) سنة هي (28.2%) وللفئة العمرية من (20 _30) سنة هي 4%.

وفي ديالى أجرى الباحث Noman عام 2013 في مستشفى البتول في محافظة ديالى دراسة حول الاسهال الحاد والمزمن في ألاطفال الرضع وبينت نتائج دراسته إنّ نسبة أصابة الذكور أعلى من ألاناث ويصيب الفئة العمرية (1_ 6) أشهر والمعتمدين على الرضاعة الأصطناعية (Noman, 2013).

وفي عام 2015 أجرى الباحثان محسن ونصري حول مسببات الاسهال المختلفة في مستشفى الامامين الكاظميين عليهما السلام في بغداد حيث بينت نتائج الدراسة أن أعلى نسبة لمسببات ألاسهال المرضية هي ألاصابات الطفيلية بنسبة 48.545% , تليها ألاصابات الفايروسية بنسبة 39.80% أما الاصابات البكتيرية المرافقة للأصابات الطفيلية والفايروسية فسجلت أقل نسبة وهي 2.91% (محسن ونصري, 2015).

وفي الهند أجرى الباحث Foster وزملاؤه عام 2015 دراسة حول مسببات ألاسهال في الاطفال الرضع حيث وجدوا من خلال دراستهم أن بكتريا ال *Enteropathogenic E.coli* تتواجد بنسبة أعلى من بكتريا *Enteroaggregative E.coli* (Foster *et al*.,2015).

2- 12 المضادات الحيوية Antibiotics

تعرف المضادات الحيوية بأنها النواتج ألايضية الثانوية الخاصة أو المحورة والتي تنتج من قبل مجاميع مختلفة من الاحياة المجهرية وتمتلك فعالية ضد أحياء مجهرية أخرى وكذلك تعرف بأنها مواد كيميائية عضوية تنتج من قبل مجموعة من الأحياء المجهرية والتي لها فعالية تثبيطية ضد أحياء مجهرية أخرى دون التأثير على خلايا الجسم , وتشمل المضادات المنتجة بواسطة التحوير الكيميائي للمضادات الطبيعية أو بواسطة التحوير الاحيائي للمواد المصنعة (الشويخ, 2016).

كان لأكتشاف المضادات الحيوية الأثر الكبير في أنخفاض معدل ألاصابات البكتيرية ولكن التوسع في أستخدام مضاد حيوي معين أدى الى ظهور سلالات جديدة مقاومة له بآليات مختلفة (Normark, 2002).

2 - 13 آلية عمل المضادات Mechanisms of action of antibiotic

تمتلك المضادات الحيوية المستخدمة في علاج الكثير من الامراض خاصية السمية ألاختيارية Selective toxicity أي إنّ العلاج يعمل على الخلية الجرثومية من دون ان يسبب ضرر للمضيف.

وهناك أربع آليات لعمل المضادات الحيوية في تثبيط نمو البكتريا وذلك من خلال تثبيط تكوين الجدار الخلوي Inhibition of cell well synthesis فترتبط بمستقبلات خاصة موجودة على سطح الخلية البكتيرية (Penicillin-binding proteins) أذ تقوم بتثبيط عمل الانزيم الناقل للببتيد Transpeptidase الذي له دور فعال في تكوين الروابط الببتيدية في طبقة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan وبذلك تؤدي الى تثبيط بناء طبقة الببتيدوكلايكان الذي يعد احد مكونات جدار الخلية البكتيرية كما في مضادات Beta_ lactam (Zervosen *et al.*, 2012).

بعض المضادات تعمل على تثبيط وظيفة الغشاء الخلوي Inhibition of cell membrane function فيكون تأثيره على هذا الغشاء أما من خلال تداخلها مع مكونات الغشاء السايتوبلازمي أو التأثير على الإنزيمات الناقلة عبر الأغشية وتثبيطها أو من خلال تأثيرها في عملية التبادل الايوني بين المواد الداخلة والخارجة مثل Polymyxin . (Jawetz *et al* ., 2004)

وهناك مجموعة من المضادات الحيوية تسبب تثبيط بناء الحامض النووي Inhibition of nucleic acid synthesis حيث تحتوي هذه المجموعة من المضادات على حلقة الكينولون quinolone –4 فتعمل على تثبيط تخليق DNA البكتيري وذلك من خلال أعاقة أنزيم DNA gyrase مما يؤدي الى موت الخلية البكتيرية , كما في مضادات الكوينولينات Quinolones (Tortora *et al*., 2010) .

ومن الآليات الأخرى التي تثبط بها المضادات نمو البكتريا هي وجود مجموعة من المضادات كل منها يعمل على تثبيط بناء البروتين Inhibition of protein synthesis بطريقة مختلفة كمضادات الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides وهي مجموعة من المضادات التي تكون ذات تأثير قاتل Bacteriocidal كمضاد , Gentamicin , Tetracyclines Amikacin , Tobramycin و Streptomycin تعمل هذه المضادات على تثبيط عملية تصنيع البروتين من خلال أرتباطها بالوحدة الرايبوسومية الصغيرة 30S ومضاد أخر يعمل

على تثبيط بناء البروتين داخل الخلية البكتيرية من خلال أرتباطه بالوحدة الرايبوسومية 50S كمضاد Chloramphenicol (Brooks *et al*., 2010).

2-14 -1 آليات مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية Mechanisms of Resistance for antibiotic

تمتلك البكتريا المعوية بشكل عام وبكتريا أشريشيا القولون بشكل خاص آليات مختلفة لمقاومة الفعل التثبيطي للمضادات الحيوية منها:

1_ تعمل على تحطيم العقار من خلال أنتاج أنزيم Beta_ lactamases_ الذي يعمل على تحطيم حلقة البيتالاكتام وبذالك يصبح العقار غير فعال (Brook *et al*., 2007).

2 _تغير موقع الهدف الذي يعمل عليه المضاد الحيوي نتيجة حدوث طفرة وراثية في موقع أرتباط المضاد الحيوي مع المكان الخاص به في الخلية البكتيرية وبذلك يفقد المضاد ألفته للارتباط مع موقع الهدف (Jawetz *et al* ., 2004).

3_ تعتبر المقاومة بواسطة تغير حاجز النفاذية من أهم وسائل المقاومة , حيث تتميز البكتريا السالبة لصبغة كرام بأمتلاكها لمتعدد السكريد الشحمي (LPS) وبروتينات الغشاء (Porins) التي تمر من خلالها المضادات الحيوية حيث تكون هذه الثقوب ذات طبيعة محبة للماء Hydrophilic , أن حدوث الطفرات يؤدي الى أختزال عدد الثقوب في الغشاء الخارجي لبعض أنواع البكتريا فيؤدي الى التقليل من تدفق المضاد عبر الاغشية وبالتالي تصبح البكتريا مقاومة لمضادات البيتالاكتام (السعدي, 2011).

4_المقاومة بواسطة مضخات الدفق , توجد هذه الانظمة في العديد من الانواع البكتيرية منها بكتريا الزائفة الزنجارية وبكتريا ألاشريشيا القولونية حيث تعمل على ضخ المواد ألايضية والسمية ومنها المضادات الحيوية الى خارج الخلية البكتيرية (piddock *et al*., 2006) , وتعمل مضخات الدفق أيضاً على تحويل مسار المضاد وطرحه الى خارج الخلية الجرثومية بسرعة أكبر من سرعة دخوله للخلية وتتم هذه الآلية التي تعرف بالضخ الخارجي بالتعاون مع الغشاء الخارجي (kriengkauykiat *et al*., 2005).

5 _كما تقاوم البكتريا المضاد من خلال تغير مسارها الكيموحيوي كما هو الحال في مقاومة مضادات السلفانومايد حيث تأخذ الجراثيم حامض الفوليك الذي يعتبر البادئ في بناء الاحماض

النووية من الخلايا المجاورة بدلاً من تصنيعه , وتعمل على زيادة أنتاج المركبات التنافسية التي تدخل المسار وتنافس المضاد وبذالك تقاوم تأثيره التثبيطي (Tenover *et al*., 2006) .

تختلف نسبة مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية فقد أشار الباحث Ochoa وزملاؤه عام 2009 إنّ بكتريا أشريشيا القولون المعزولة من براز ألاطفال الرضع مقاومة بنسبة عالية للمضادين ampicillin و tetracycline حيث بلغت نسبة المقاومة 85% , 65% على التوالي (Ochoa *et al*., 2009), بالأضافة الى دراسة أخرى أجريت في عام 2009 من قبل عبد الكريم وموسى حيث وجدا من خلال دراستهم إنّ لبكتريا أشريشيا القولون المعزولة مقاومة عالية لل Amoxicillin و Ampicillin وتباينت مقاومتها وحساسيتها لباقي المضادات (عبد الكريم وموسى, 2009) , كما أشار الباحث الامريكي Amaya وزملاؤه عام 2011 إنّ بكتريا أشريشيا القولون المعزولة من براز ألاطفال الرضع لم تصل الى مستوى عال من المقاومة لمعظم المضادات الشائعة في علاج حالات الاسهال مقارنة مع الدول ألاخرى (Amaya *et al*., 2011) .

ووجد الباحث تركي وزملاؤه عام 2012 أن بكتريا أشريشيا القولون مقاومة بنسبة 100% لمجموعة من المضادات هي, Cefixime , Cefotaxime, Ceftriaxone وغير مقاومة للمضادين Amikacin , Imipenem (تركي وأخرون., 2012), بالأضافة الى دراسة للباحث Langendorf وزملاؤه عام 2015 حيث تبين من خلال دراسته أن بكتريا أشريشيا القولون مقاومة للمضادين amoxicillin ,co_trimoxazole (Langendorf *et al*., 2015).

2 – 15 المستخلصات النباتية Plant Extracts

تعتبر النباتات الطبية مصدراً مهماً للعديد من المواد الداخلة في صناعة الادوية , وأستخدمت منذ القدم من قبل الانسان وحتى يومنا هذا في علاج العديد من الامراض لأحتوائها على العديد من المركبات ذات الفعالية الحيوية , بالاضافة الى قلة تأثيراتها الجانبية حيث أمتازت هذه المواد بأستقراريتها العالية وفعاليتها البيولجية الممتازة على العكس من استخدام العلاجات التي تؤدي الى تأثيرات جانبية كبيرة (Vanisree *et al*., 2004).

إنّ غالبية المضادات المستخدمة في علاج الكثير من الامراض لها تأثيرات جانبية كبيرة بالاضافة الى أسعارها الباهضة , حيث يؤدي الاستمرار في أستخدامها الى ظهور العديد من

السلالات المقاومة لها وانخفاض فعاليتها ضد الممرضات , مما دفع الباحثين الى أيجاد حلول لهذه المشاكل وذلك من خلال أيجاد بديل لهذه المضادات من خلال التداوي بالاعشاب التي لاقت اهتماماً كبيراً في السنوات الاخيرة وأستخدمت من قبل شركات الادوية كماد اولية في صناعتها (Russo *et al*., 2002).

2 – 16 نبات الرمان *Punica granatum*

الرمان هو ثمار شجرة *Punica granatum* يعود الى العائلة الرمانية Pinnicaceae ويسمى Pomegranate , حيث تحتوي ثمار نبات الرمان على نسبة عالية من الماء تقدر بحوالي 81 % , بالاضافة الى العديد من المواد الاخرى منها السكريات بنسبة 10% , البروتينات بنسبة 3% , الدهون بنسبة 3.9% حامض الليمون بنسبة 10% و الالياف بنسبة 2.91 % كما تحتوي على فيتامين C وكميات قليلة من الكالسيوم, الفسفور, الحديد, بالاضافة الى المواد البكتينية مثل (Protopectin ,Pectin, pectic acid , pectinic acid) (امان, 2000).

أما القشرة الخارجية فتحتوي على حامض العفص Tannic acid الذي يعتبر مادة قابضة تستخدم في علاج حالات الاسهال , كما تحتوي قشرة نبات الرمان على العديد من المواد القلويدية مثل Pelletierine ,Ethy Pelletierine , Isopelletrine, pelletierine pseudo والذي يسمىMethylgrantanine (الحسيني,1997).

2- 16- 1 الاستخدامات الطبية Medical Uses

أشارت العديد من الدراسات الى أهمية نبات الرمان في علاج الكثير من الامراض حيث وجد إنّ لهذا النبات العديد من الفوائد الطبية وكل جزء من أجزائه له خواص علاجية مختلفة , حيث تستخدم قشوره في علاج أمراض البطن والاسهال والدزنتري لأحتوائه على مواد قابضة Tannic acid وكذلك يعمل هذا الحامض على خفض مستوى الكولسترول في الدم, اضافة الى ما ذكر تعتبر قشور الرمان من أشد الادوية قتلاً للديدان الشريطية (Prashanth *et al*.,2001).

كما تستخدم ثماره في علاج القلب , مقوية للمعدة وبذوره تستخدم أيضاً في علاج المعدة أما عصير الثمرة فهو مرطب ومبرد , كما بينت العديد من الدراسات أن نبات الرمان يحتوي في جميع أجزائه على مواد كربوهيدراتية ذات وزن جزيئي عالي لها أهمية كبيرة من الناحية البايولجية وتعتبر مواد مضادة للأكسدة (Seeram *et al*., 2005).

أشارت العديد من الدراسات المحلية والعالمية إنّ لنبات الرمان فعالية عالية ضد المايكروبات ففي الموصل وجد الباحث الجميلي عام 2000 أن المستخلص المائي لقشور الرمان فعالية تثبيط أعلى من المستخلص الكحولي ضد بكتريا *Escherichia coli* وفي البصرة أشار الباحثان مجيد والشطي عام 2002 أن مستخلص قشور الرمان فعالية تثبيطية عالية ضد بكتريا أشريشيا القولون بالأضافة الى الانواع الاخرى من البكتريا (مجيد والشطي, 2002).

وفي كوردستان العراق أشار الباحث Hama وزملاؤه عام 2014 أن لعصير ثمرة هذا النبات فعالية تثبيط عالية ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام من ضمنها بكتريا أشريشيا القولون المسببة للأسهال (Hama *et al*., 2014).

بالأضافة الى الدراسة التركية للباحث Duman وزملاؤه عام 2009 حيث تبين من خلال دراسته إنّ لمستخلص نبات الرمان فعالية تثبيط عالية ضد بكتريا أشريشيا القولون بقطر تثبيط يقدر بحوالي (13_26mm) (Duman *et al*., 2009) , كما أشار الباحث Nuamsetti وزملاؤه عام 2012 أن لقشرة نبات الرمان فعالية ضد بكتريا أشريشيا القولون بأستخدام محاليل أستخلاص هي الاسيتون , الماء الحار وكحول ألايثانول بتركيز 95% حيث أظهرت جميع محاليل ألاستخلاص فعالية عالية ضد البكتريا (Nuamsetti *et al*., 2012), ووجد الباحث Fawole وزملاؤه عام 2012 أن لمستخلص قشرة نبات الرمان فعالية ضد بكتريا أشريشيا القولون ويمكن أستخدامه كمصدر للعوامل المضادة للأكسدة والمضادة للمايكروبات مثل tyrosinase inhibitors (Fawole *et al*., 2012) , بالأضافة الى دراسة للباحث Al-zoreky عام 2017 حيث ثبط المستخلص الكحولي لقشرة نبات الرمان بكتريا أشريشيا القولون بنسبة 80% (Al-zoreky, 2017).

2- 17 نبات الزعتر *Thymus vulgaris*

يعد نبات الزعتر من النباتات العشبية المعمرة الذي ينتمي الى العائلة الشفوية Labiatae ويكون بشكل شجيرات صغيرة معمرة يصل طولها 40 cm, أوراقه بيضوية الى مستطيلة الشكل وتكون مغطاة بشعيرات وأزهارها زرقاء اللون تستخدم لأنتاج الزيوت الطيارة Volatile oil من خلال مبدأ التقطير بالبخار (البياتي, 2001).

ويعد نبات الزعتر من النباتات الفعالة دوائياً وذات أهمية طبية والجزء الفعال والمستخدم طبياً هو الاوراق والقمم النامية الزهرية حيث تحتوي على الزيوت الطيارة Volatile oils بنسبة 5 _25 % ويحتوي هذا الزيت على حوالي 55% من المواد الفينولية كما يحتوي على الفلافونات, التانينات , الصابونينات , وزيوت أساسية غنية ب Monoterpene , الثايمول Thymol والكارفكول Carvacrol التي تعزى لها الفائدة الطبية (Queiroz *et al*., 2012; Walentowska and Flaczyk, 2013).

وكذلك يحتوي على مواد صمغية راتنجية Resins , والتانين Tannin, وحامض اللينوليك linoleic acid , كما يعد زيت الزعتر من المواد المضادة للأكسدة لأحتوئه على نسبة عالية من Thymol و Carvacrol لذلك يضاف الزعتر الى الدهون كمادة مضادة للاكسدة (Hashmi *et al*.,2013).

2 – 17 – 1 الاستخدامات الطبية Medical uses

يعد نبات الزعتر من النباتات ذات ألاهمية الطبية حيث يدخل في صناعة الادوية , ويستخدم كمطهر ومعقم حيث له فعالية عالية ضد المايكروبات ويكون فعال في علاج الاصابات المعوية فيعتبر طارد للديدان وفعال ضد بعض أنواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام والفطريات والخمائر *Candida albicans* (Al_Bayati, 2008) .

يعمل كطارد للبلغم ,علاج للربو, حالات البرد, طارد للغازات , التهاب الجهاز التنفسي كألتهاب القصبات , اللوزتين , اللثة, تسوس الاسنان , السعال الديكي , الصداع والتبول الليلي عند الاطفال وفي علاج التهابات المجاري البولية وكذلك تحركات الحصى في المثانة , كما يعتبر نبات شديد الفعالية بأعتباره مهدئاً ومسكن لألام الروماتزم والنقرس والتهاب المفاصل وعرق النسا (Barnes *et al*., 2002).

تشير العديد من الدراسات الى الدور الفعال لنبات الزعتر ضد الممرضات المعوية ففي دهوك أشار الباحث Saimary عام 2006 الى فعالية هذا النبات في تثبيط بكتريا أشريشيا القولون بقطر تثبيط يقدر بحوالي (35mm) (Saimary, 2006) , ووجد الباحث Kadhim وزملاؤه عام 2011 أن لمستخلص نبات الزعتر فعالية عالية ضد البكتريا المدروسة من ضمنها بكتريا أشريشيا القولون (Kadhim *et al*., 2011).

وفي أيران أشار الباحثان Hassanshahian و Mohsenipour عام 2012 أن الفعالية التثبيطية للمستخلص ضد بكتريا أشريشيا القولون واطئة بينما له فعالية عالية ضد الانواع الاخرى من البكتريا المدروسة . كما تبين إنّ مستخلص نبات الزعتر يمتلك كمية عالية من من الفلافونات المسوؤلة عن الفعالية المضادة للأكسدة والفعالية التثبيطية أتجاه البكتريا فكانت فعاليته التثبيطية ضد بكتريا ألاشريشيا القولونية عالية (Zeghad and merghem, 2013).

في الهند أشار الباحث Reddy وزملاؤه عام 2014 الى أهمية نبات الزعتر وأستخدامته الصيدلانية فأوراقه تحتوي على الزيوت المتكونة من Monoterpenes المسوؤل عن الفعالية المضادة للأكسدة , الفعالية المضادة للمايكروبات , مضاد للتشنج , ومخفف للسعال (Reddy *et al*., 2014).

2- 18 المعززات الحيوية Probiotics

إنّ مصطلح Probiotics يعني المعزز الحيوي وأقترح لأول مرة من قبل Vergio عام 1954 وذلك من خلال مقارنته بالتأثيرات الجانبية الناتجة عن أستخدم المضادات الحياتية والكثير من المواد المثبطة الاخرى اتجاه الاحياء المجهرية المتواجدة في القناة الهضمية (الدليمي, 2005).

تعد بكتريا حامض اللاكتيك من أكثر الأنواع أهمية وإنّ أول من أشار الى الاستخدام العلاجي لبكتريا حامض اللاكتيك ودورها في علاج الكثير من الممرضات هو Elie Metchnikoff وذلك عندما أثبت في عام 1908 أن هناك العديد من التأثيرات المفيدة على صحة الانسان مترافقة مع وجود هذه البكتريا في الاغذية المتخمرة , حيث كان البلغار المعمرين مستهلكين للمنتجات الحاوية على بكتريا حامض اللاكتيك كالحليب المتخمر وكما أشارت الدراسات إنّ أستهلاك بكتريا حامض اللاكتيك يؤدي الى تحسين التوازن المايكروبي المعوي (Khalid, 2011).

وفي عام 1965 عرفت المعززات الحيوية لأول مرة من قبل Lilly و Stillwell بأنها مواد تنتج من قبل مجموعة من الاحياء المجهرية غير المرضية والتي لها القابلية على أفراز مواد تعمل على تحفيز نمو أحياء مجهرية اخرى (Holzapfel and Schillinger, 2002) .

وعرفت المعززات الحيوية في عام 1992 من قبل Veld و Havennar بأنها مجموعة من الاحياء المجهرية التي تمتلك تأثيرات مفيدة على صحة الأنسان من خلال الدور الذي تقوم به في تحسين صفات الاحياء المجهرية المعوية , وعرفت أيضا بأنها مكونات اومستحضرات الخلايا البكتيرية التي لها تأثيرات مفيدة على الصحة (سلمان, 2014).

وهناك العديد من المجاميع البكتيرية التي تستخدم كمعززات حيوية حيث تأتي بكتريا حامض اللاكتيك في المقدمة لأنتاج اللبن الرائب (yogurt) , وفيما يلي العديد من الاجناس البكتيرية العائدة لبكتريا حامض اللاكتيك والتي يتم أستخدامها كمعززات حيوية منها :
Lactobacillus , Lactococcus , Streptococcus ,Leuconostoc , Enterococcus , Bifodobacterium , Aerococcus (ابراهيم, 2008).

إنّ تناول المعززات الحيوية المتواجدة في الاغذية له الكثير من التأثيرات المفيدة على المضيف فيعمل على تحسين التوازن المايكروبي المعوي وتقليل الاصابة بأمراض المعدة والامعاء وذلك من خلال خفض الاس الهيدروجيني للأمعاء والتنافس على المغذيات وأنتاج البكتريوسينات , خفض كولسترول الدم ,علاج حالات الامساك والاسهال , الحماية من السرطان وأختزال الامراض الالتهابية والحماية من أصابات المجاري البولية والتناسلية (Chiang, 2012).
ولها دور في علاج سوء هضم اللاكتوز من خلال زيادة فعالية أنزيم galactosidase الذي يخفف من سوء هضم اللاكتوز (عبد الحسن, 2009).

أشارات دراسات عديدة بأمكانية أستخدام بكتريا حامض اللاكتيك في علاج حالات الاسهال الناتج عن بكتريا ال *E.coli* حيث تبدي بكتريا حامض اللاكتيك تأتيرات وقائية اتجاه الاصابات المعوية وذلك من خلال تحفيز افراز الكلوبيولينات المناعية المتخصصة نوع IgA, حيث لوحظ إنّ أعطاء الاطفال بعمر 13 شهر الراقدين في المستشفى والذين يعانون من حالات الاسهال بكتريا *Lactobacillus* أدى الى أنخفاض خطورة أعراض الاسهال مقارنة مع المجموعة التي لم تعالج بها ويوصف اللبن الرائب بكونه الأختيار الامثل لعلاج حالات الاسهال المتواصل عند أعطائه لاطفال رضع بعمر (3_36) شهر اذ بدى تأثيره واضحاً بعد يومين فقط من أعطائه للمصابين (سلمان, 2014).

2_19 صفات البكتريا المستخدمة كمعززات حيوية Charecters of bacteria uses as Probiotics

إنّ البكتريا المستخدمة كمعززات حيوية يجب إنّ تمتلك سمات عامة (مصدر عزلها وتشخيصها ومقاومتها للعوامل التي تؤدي الى تثبيطها في القناة الهضمية وبقائها حية أثناء النقل والخزن) بالاضافة الى السمات الوظيفية والتأثيرات المفيدة (Holzapfel and Schillinger, 2002).

كما ويجب إنّ تكون البكتريا المستخدمة كمعززات حيوية أمينة ولا تسبب مخاطر صحية للمستهلك وصنفت بكتريا حامض اللاكتيك بكونها أمينة من الناحية الصحية وسمح بأستخدامها عالمياً حيث تستخدم في التطبيقات الطبية والبيطرية (عبد الحسن, 2009).

وكما ويشترط فيها إنّ تبقى حية عند مرورها في القناة الهضمية من خلال مقاومتها لحموضة المعدة وأملاح الصفراء وقدرتها على الالتصاق بأغشية الامعاء المخاطية ويفضل إنّ يكون مصدرها الانسان حيث تتمكن من التداخل المتخصص مع المضيف , تستخدم المعززات الحيوية المعزولة من الانسان في تدعيم منتجات الالبان لقدرتها على التطبع في الامعاء ومع ذلك هناك بعض المعززات الحيوية مصدر عزلها هو اللبن الرائب (سلمان,2014).

2- 20 آلية عمل المعززات الحيوية Mechanisms of action of Probiotics

وهناك العديد من آلاليات التي تقوم بها بكتريا حامض اللاكتيك المستخدمة كمعززات حيوية للحفاظ على صحة الانسان من خلال الفعاليات الايضية التي تقوم بها والنواتج التي تفرزها (Flynn *et al.*, 2002) يمكن تلخيصها بما يلي :

_ تثبيط الاحياء المجهرية المرضية الموجودة في القناة الهضمية وذلك من خلال أنتاجها للعديد من المواد منها حامض اللاكتيك والخليك التي تعمل على جعل الاس الهيدروجيني للامعاء منخفض وبالتالي تؤدي الى تثبيط نمو الاحياء المجهرية المرضية التي تفضل البيئة القاعدية , او من خلال أنتاجها لمواد مثبطة اخرى مثل CO_2 الناتج من تخمر السكريات , بيروكسيد , ومركب الاستيالديهايد الناتج من تخمر السكريات والمسؤول عن أعطاء الالبان الطعم والنكهة المميزة (العبيدي, 2006).

_ الابعاد التنافسي من خلال منافسة الاحياء المجهرية المرضية على المواد الغذائية وعلى المستقبلات الموجودة على سطح الخلايا الطلائية للامعاء (السعدي, 2010)

_ تغير الفعالية الايضية للأحياء المجهرية المتواجدة في القناة الهضمية من خلال زيادة فعالية الانزيمات المفيدة التي تعمل على تخفيف سوء هضم اللاكتوز كأنزيم galactosidase كما وتعمل على تحطيم السموم المنتجة من قبل البكتريا المرضية في الامعاء (سلمان, 2014).

_ كما وتشير الدراسات الى إنّ تناول البكتريا المفيدة يساهم في تحفيز الجهاز المناعي وذلك من خلال تحفيز افراز الاجسام المضادة (Antibodies) وزيادة مستويات الانترفيرون فضلاً عن زيادة الخلايا الملتهمة (Macrophages) وعدد الخلايا القاتلة (Natural killer cell) .(Agrawal, 2005)

2 – 21 بكتريا حامض اللاكتيك lactic acid Bacteria (LAB)

تعد بكتريا حامض اللاكتيك ذات أهمية كبيرة كما انها واسعة والانشار في الطبيعة لكونها بكتريا مفيدة وتكون ذات أهمية طبية حيث تشكل نسبة مهمة من الاحياء المجهرية الطبية للأنسان وتكثر في براز الاطفال في الايام الاولى من الولادة , كما تتميز بقدرتها على تخمير السكريات الى حامض اللاكتيك ولها دور في صناعة الالبان وبعض المخللات , تضم هذه المجموعة عدة اجناس منها هي , *Lactobacillus* , *Streptococcus* , *Leuconostoc* *Enterococcus* , *Lactococcus* , كما أن بكتريا حامض اللاكتيك تقع في عائلتين هي Streptococcacceae, Lactobacillacceae حيث تكون ذات شكل عصوي (Rod) او كروي (cocci) (ابراهيم, 2008) .

2– 22 جنس *Lactobacillus*

يعد هذا الجنس أحد أجناس بكتريا حامض اللاكتيك حيث توصف خلاياها بأنها عصوية , موجبة لصبغة كرام , أشكالها واحجامها مختلفة , بعظها طويلة جداً وبعظها بشكل مكورات عصوية , تكون مفردة أو بهيئة سلاسل طويلة أو قصيرة , غير مكونة للسبورات , وغير متحركة , وسالبة لأختبار الكاتليز , كما أنها تحتاج الى متطلبات معقدة لنموها ويستعمل العديد من الانواع التابعة لهذا الجنس كمعززات حيوية مثل , *Lactobacillus.acidophilus* *Lactobacillus.reuteri, Lactobacillus.casei* حيث تتميز بأنها بكتريا منتجة للعديد من البكتريوسينات التي تستخدم في مجال حفظ الاغذية (الدليمي, 2005).

تكون بكتريا *Lactobacillus* محبة للهواء القليل Microaerophilic أوختيارية لاهوائية Facultative anaerobic تعيش هذه البكتريا في مدى PH من (7-4) أي أنها تعيش في بيئة حامضية الى متعادلة ولكن pH الامثل لنموها هو (6) كما أن درجة الحرارة المثلى لنموها هي 37˚م (Barrow and feltham, 2003) .

تناولت العديد من الدراسات في وقتنا الحاظر التأثير النافع لسلالات بكتريا *Lactobacillus* والتي أصبحت مهمة لتلبية حاجة السوق لمنتجات غذائية صحية فهي تستخدم في مجال صناعة الاغذية على نطاق واسع كبوادئ , وكذلك تستخدم في مجال حفظ الاغذية , كما أنها تمنع نمو الاحياء المجهرية المرضية في القناة الهضمية وبذلك تحافظ على التوازن المايكروبي المعوي , المحافظة على صحة قناة الصفراء ومقاومة حموضة المعدة (Hoque, 2010) .

وتعد هذه البكتريا من الاحياء المجهرية البشرية حيث أنها تعيش في جسم ألانسان في الجهاز الهضمي, المهبل , الادرار وأماكن أخرى في الجسم , وتوجد كذلك في النباتات كالخضراوات (Holzapfel *et al*.,2001; Amin *et al*.,2009) , وتعزل هذه البكتريا من منتجات الالبان , ومن براز الاطفال حديثي الولادة وكذلك من المهبل (Mirlohi *et al*.,2008).

2- 23 الفعالية التثبيطية لبكتريا حامض اللاكتيك The inhibition effect of lactic acid bacteria

تستخدم المعززات الحيوية (بكتريا حامض اللاكتيك LAB) كعلاج بكتري فموي للعديد من حالات الاسهال كالاسهال الحاد (Acute diarrhea) الذي يسببه فايروس Rotavirus وأسهال المسافرين والاسهال المرتبط مع أستخدام المضادات الحيوية , حيث يؤدي تناول بكتريا حامض اللاكتيك الى العديد من التأثيرات العلاجية لحالات الاسهال كأسهال الاطفال والخدج والكبار , حيث لوحظ إنّ أعطاء مستحضرات بكتريا حامض اللاكتيك للأطفال بعمر 8 أشهر لمدة يومين بجرعتين في اليوم الى تقليل مدة الاسهال بالمقارنة مع الاطفال الذين لم يعطوا بكتريا *Lactobacillus* (سلمان, 2014).

تعود الفعالية التثبيطية لبكتريا *Lactobacillus* الى أنتاجها لمادة البكتريوسين وتعرف البكتريوسينات مواد مثبطة بروتينية (معقدات ببتيدية) خارج خلوية يتم تصنيعها بالرايبوسومات

تنتج من قبل بعض الانواع البكتيرية في نهاية الطور اللوغارتمي لها ويكون لها فعالية مثبطة للانواع القريبة منها , اوأنواع البكتريا المشتركة معها في نفس البيئة (June *et al.*,2001).

تسمى البكتريوسينات بأسم البكتريا المنتجة لها حيث تنتج بكتريا حامض اللاكتيك (LAB) جنس *Lactobacillus* العديد من أنواع البكتريوسينات التي تكون لها فعالية تثبيطية للعديد من الانواع البكتيرية المرضية, حيث تكون هذه البكتريوسينات ذات أوزان جزيئية تتراوح مابين (3–4) كيلو دالتون وتتراوح أحماضها الامينية بين (30 – 50) حامض أميني (Magnusson, 2003).

2 – 24 التأثير التثبيطي لبكتريا حامض اللاكتيك على بكتريا أشريشيا القولون
The Inhibition Effect of Lactobacillus on *E.coli*

إنّ أعتلالات الجهاز الهضمي كثيرة فالأسهال يكون في مقدمة هذه الأمراض, ومسببات الاسهال كثيرة منها الناتجة عن الاصابات البكتيرية حيث يصاب الجهاز الهضمي بأنواع مختلفة من البكتريا السالبة لصبغة كرام منها ال *salmonella , shigella* و بكتريا ال *E.coli* وغيرها , إنّ تناول البروبايوتيك مع الغذاء يساهم في أعادة التوازن المايكروبي في القناة الهضمية وهذا مهم لأن القناة الهضمية تعتبر أطول عضو مناعي في جسم الانسان . (Abd_Elsalam *et al*., 2004)

وهناك آليات تعمل بها الاحياء العلاجية لمنع حدوث الأسهال فعند تناول هذه البكتريا تؤدي الى تغير النظام البيئي المايكروبي فمثلاً تعمل بكتريا ال *Lactobacillus acidophilus* ذات الاصل البشري في علاج الاسهال الناتج عن بكتريا ال *E.coli* حيث تعبر حموضة المعدة وتصل الى الامعاء وتلتصق بخلاياها وبذلك تعمل على غلق المستلمات فتمنعها من الالتصاق بخلايا الامعاء , تنتج البكتريوسينات التي تقضي على البكتريا المرضية بالأضافة الى ذلك تعمل على خفض الاس الهيدروجيني من خلال أنتاجها حامض الخليك واللاكتيك وغيرها من الحوامض العضوية حيث أن أنخفاض الاس الهيدروجيني دليل على صحة المضيف (الخفاجي, 2008).

تشير معظم الدراسات المحلية والعالمية إنّ لبكتريا *Lactobacillus* فعالية تثبيطية عالية ضد الممرضات المعوية فقد أشار الباحثان مجيد وأحمد في عام 2013 إنّ لبكتريا حامض اللاكتيك المعزولة من براز الأطفال الرضع فعالية ثبيطية ضد الممرضات المعوية وإنّ أفضل نمو لهذه البكتريا يكون عند PH (5–6) كما إنّ درجة الحرارة الملائمة لنموها تتراوح بين (30_ 37°م) (مجيد وأحمد, 2013), في صلاح الدين وجد الباحثان نصيف وميرزة عام 2013 أن عزلات بكتريا حامض اللاكتيك المقاومة للحموضة ولأملاح الصفراء لها فعالية تثبيطية عالية ضد بكتريا أشريشيا القولون مقارنة مع العزلات الاخرى الغير مقاومة (نصيف وميرزة, 2013) , كما وجد الباحثان Hindal وAli عام 2015 إنّ بكتريا حامض اللاكتيك المعزولة من المهبل لها فعالية تثبيطية عالية ضد الانواع البكتيرية الممرضة.

في أيران أجرى الباحث Mirlohi عام 2008 دراسة حول عزل بكتريا *Lactobacillus spp* من براز ألاطفال الرضع فتبين من خلال دراسته إنّ بكتريا حامض اللاكتيك السائدة المعزولة من البراز هي *Lactobacillus Acidophilus* (Mirlohi, 2008) , وفي الهند وجد إنّ لبكتريا حامض اللاكتيك فعالية تثبيطية عالية ضد البكتريا المعوية بأقطار تثبيط تراوحت بين (30-37) ملم (Asha and Gayathri, 2012) .

الفصل الثالث
المواد وطرائق العمل
Materials and methods

الفصل الثالث

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3 - 1 الأجهزة والمواد المستعملة

3 -1- 1 الأجهزة المستعملة

أُستخدمت ألاجهزة المبينة في الجدول (3_1) في الدراسة الحالية.

جدول 3- 1 الأجهزة المستخدمة في الدراسة

الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ
الموصدة Autoclave	Hirayama (Japan)
مرشحات دقيقة Millipore filter	Gallenkamp
جهاز التقطير Distillatar	Russian
جهاز طرد مركزي Centrifuge	Gallenkamp (England)
جهاز تشخيص البكتريا Vitek 2	Biomeriex (France)
ثلاجة Refrige rater	Qean (Egypt)
كاميرا رقمية Digital camera	Sony(Japan)
جهاز مازج Vortex	Lab.Tech (Korea)
حاضنة Incubater	U.S.A
حمام مائي Water bath	Biomeriex (France)
فرن كهربائي Oven	Memmert(Germany)

Dragon-med (Spain)	Micropipettes ماصات دقيقية بأحجام مختلفة
Nikon (Japan)	Light microscope مجهر ضوئي
Radiometer (Denemark)	pH-meter مقياس الأس الهيدروجيني
TAFESA (Germany)	Sensitive balance ميزان حساس

3- 1- 2 المواد الكيميائية والبايولوجية Biological and chemical material

أُستخدمت المواد البايولجية والكيميائية المبينة في الجدول (3- 2) في الدراسة الحالية

جدول 3 - 2 : المواد الكيميائية والبايولوجية المستخدمة في الدراسة

المادة	الشركة المصنعة والمنشأ
بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide	Oxoid **(**England**)**
صبغة احمر المثيل Methyl Red	BDH(England)
باراثنائي أمين بنزالديهايد P-dimethyl aminobenzaldehyde	BDH
ببتون Peptone	Oxoid (England)
حامض الكبريتيك H2SO4	BDH (England)
جيلاتين Gelatine	BDH (England)
صبغة البلور البنفسجي Crystal violet stain	Himedia
ايودين Gram's Iodine	Himedia
سفرانين Safranin	Himedia
خلاصة الخميرة Yeast extract	Fluka (Switzer land)
الفا – نفثول α-Naphthol	BDH(England)
كحول اثيلي 95% Ethanol	BDH(England)

كلوريد الباريوم المائي	$Bacl_2..H_2O$	Oxoid (England)
كليسيرول	Glycerol	BDH (England)
حامض الهيدروكلوريك	HCL	BDH (England)
هيدروكسيد الصوديوم	NaOH	BDH (England)
كلوريد الصوديوم	NaCL	Fluka (Switzerland)
أملاح الصفراء	bile salt	BDH (England)
فينول	Phenol	BDH (England)
هيدروكسيد البوتاسيوم	Potassium Hydroxide	BDH(England)
كلوكوز	Glucose	BDH(England)
مالتوز	Maltose	BDH(England)
لاكتوز	Lactose	BDH(England)
سكروز	Sucrose	BDH(England)
أرابينوز	Arabinose	BDH(England)
سوربتول	Sorbitole	BDH(England)

3 -1- 3 - الاوساط الزرعية **Culture media**

أُستخدمت الاوساط الزرعية المبينة في الجدول (3_3) في الدراسة الحالية .

جدول 3 - 3 : الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة

الوسط		الشركة المصنعة والمنشأ
وسط احمر المثيل الصلب	Methyl Red agar	Oxoid (England)
وسط الدم الصلب	Blood agar	Himedia (India)
وسط مولر هنتون الصلب	Muller-Hinton agar	Oxoid (England)

Himedia(India)	Trypticase Soy Agar	وسط الصويا الصلب
Himeda(India)	MacConkey agar	وسط الماكونكي الصلب
Oxoid (England)	Nutrient broth	وسط المرق المغذي
Oxoid(England)	Nutrient agar	الوسط المغذي
Himedia(India)	Simmon Citrate agar	ووسط سايمون ستريت الصلب
Oxoid (England)	Brain-heart infusion agar	وسط أكار نقيع القلب والدماغ
Oxoid (England)	Brain-heart infusion broth	وسط مرق نقيع القلب والدماغ
Himedia (India)	Urea agar base	أكار اليوريا الاساس
Himedia (India)	Eosin Methylene Blue	وسط الايوسين مثلين الازرق
Oxoid (England)	pepton water	وسط ماء الببتون
Himedia (India)	kligler Iron agar	وسط أكار الكلغلر
Difco (USA)	Agar _Agar	أكار_أكار
Himedia (India)	phenol red broth base medium	مرق الفينول الاحمر الاساس
Oxoid (England)	DeMan,Regosa,Sharp Agar	أكار MRS
Himedia (India)	DeMan,Regosa,Sharp broth	مرق MRS

3 -1- 4 المحاليل والكواشف **Reagent & Soulution**

أُستخدمت المحاليل والكواشف المبينة في الجدول (3 -4) في الدراسة الحالية .

جدول 3 - 4 الكواشف والمحاليل المستخدمة في الدراسة

الشركة المجهزة والمنشأ	اسم الكاشف أو المحلول
Himedia (India)	Kovac's Indole Reagent كاشف الاندول
B.B.H(England)	Hydrogen peroxide محلول بيروكسيد الهيدروجين
Syrbio (S.A.R)	Gram stain Solution محاليل صبغة غرام

3 – 1– 5 اقراص المضادات الحيوية المستخدمة

أُستخدمت اقراص مضادات الحياة المبينة في الجدول (3 – 5) في الدراسة الحالية .

جدول 3 – 5 : اقراص مضادات الحياة المستخدمة في الدراسة

مضاد الحياة	الرمز	تركيز القرص µg/ml	S	I	R	الشركة المصنعة
Chloramphenicol	C	30	≥18	17_13	≤12	Bioanalyse (Turkey)
Amikacin	Ak	30	≥ 17	16_15	≤ 14	Bioanalyse (Turkey)
Cefixime	CFM	5	≥ 19	18_16	≤ 15	Bioanalyse (Turkey)
Cefuroxime	CXM	30	≥ 23	22_15	≤ 14	Bioanalyse (Turkey)
Ceftriaxone	CRO	30	≥ 23	22_20	≤ 19	Bioanalyse (Turkey)
Cefoxitin	Fox	30	≥ 18	17_15	≤ 14	Bioanalyse
Ciprofloxacin	Cip	5	≥ 21	20_16	≤ 15	Bioanalyse (Turkey)
Gentamycin	GM	10	≥ 15	14_13	≤ 12	Bioanalyse (Turkey)
Augmentin	AUG	20_10	≥ 18	17_14	≤ 13	Bioanalyse Bioanalyse (Turkey)
Piperacillin	PiP	100	≥ 21	20_18	≤ 17	Bioanalyse (Turkey)
Ticarcillin	TIC	75	≥ 20	19_15	≤ 14	Bioanalyse (Turkey)
Meropenem	MEM	10	≥ 23	22_20	≤ 19	Bioanalyse (Turkey)
Ampicillin_ Sulbactam	SAM	10_10	≥15	14_12	≤ 11	Bioanalyse (Turkey)
Doxycycline	DXT	30	≥14	13_11	≤ 10	Bioanalyse

(Turkey)						
Bioanalyse (Turkey)	≤ 11	14_12	≥ 15	30	T	Tetracycline

3 – 1- 6 - مساحيق المضادات الحيوية

أُستخدمت مساحيق المضادات الحيوية المبينة في الجدول (3 – 6) في الدراسة الحالية.

جدول 3 – 6 : مساحيق مضادات الحياة المستخدمة في الدراسة

مضاد الحياة	الشركة المصنعة والمنشأ
Ceftriaxon	Julphar (U.A.E)
Cefuroxime	Julphar (U.A.E)
Cefixime	أردني
Tetracyclin	سامراء

3 – 1 –7– مواد أخرى:

1_ عدة تشخيص Vitek 2 kit مجهزة من قبل شركة Biomeriex/ France.

2_ عدة تشخيص API 20E Kit مجهزة من قبل شركة Biomeriex/ France.

3_ دم بشري صنف AB مجهز من مصرف الدم / ديالى.

3 –2 طرائق العمل:

3 – 2 – 1 تحضير المحاليل والكواشف:

حُضرت المحاليل والكواشف والصبغات التي أُستخدمتْ في الدراسة وبعدها عُقمت المواد التي تحتاج الى تعقيم باستخدام جهاز الموصدة (Autoclave) عند درجة حرارة 121° م ولمدة 15 دقيقة وتحت ضغط (15 باوند/ إنج^2) بينما عقمت بقية المواد الاخرى التي تتعرض للتلف عند درجات الحرارة المرتفعة مثل اليوريا والمضادات الحيوية بالترشيح بمرشحات دقيقة

Millipore filter بقطر 0.22 مايكرميتر. اما المواد الزجاجية فقد تم تعقيمها بالفرن عند درجة حرارة 180°م ولمدة ساعتين.

3 – 2 –1–1 محلول ثابت العسرة القياسي (Macfarland standard)

حُضر المحلول وفق ما جاء في (Bauer *et al*.,1996):

محلول (A): أُذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم المائي Bacl2.H2O في 90 مل من الماء المقطر، وأُكمل الحجم الى 100 مل.

محلول (B): حُضر بإضافة 1 مل من حامض الكبريتيك المركز (H2SO4) الى 99 مليلتر من الماء المقطر المعقم ثمَّ أُكمل الحجم إلى 100 مليلتر. أُضيف 0.5 مل من محلول (A) الى 99.5 مليلتر محلول (B) رُجّ المحلول بقوة ووضع في أنابيب زجاجية معتمة محكمة الغطاء لمنع التبخر وحُفظت في الظلام لحين الإستعمال وتمزج محتويات الأنبوبة جيداً قبل كل إستخدام.

3– 2– 1– 2 محاليل صبغة كرام Gram stain solution

أُستخدمت محاليل صبغة كرام الجاهزة (صبغة البلور البنفسجي , ايودين , سفرانين) في الدراسة الحالية .

3 –2 – 2 الكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا

3 –2 – 2–1 كاشف إنزيم الكاتاليز Catalase Reagent

حُضر من خلال أضافة 1 مل من بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 30% الى 9 مل من الماء المقطر المعقم , أُستخدم للكشف عن قابلية البكتريا على أنتاج أنزيم الكاتليز (Benson,2002).

3 – 2 – 2 – 2 كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent

حُضر الكاشف انياً عند الإستخدام و ذلك من خلال إذابة 0.1 غرام من مادة Tetra methyl para phenylene diamine dihydro chloride في 10 مليلتر من الماء المقطر ووضع في قنينة غامقة ومعتمة ، إستُعمل للكشف عن إنتاج أنزيم الاوكسيديز من قبل البكتريا (Brown، 2005) .

3 –2 – 2 – 3 كاشف كوفاك Kovac's Reagent

حُضر الكاشف بإذابة 10 غم من باراثنائي مثيل امين بنزالدهايد P-dimethyl aminobenzaldehyde في 150 مل كحول ايزواميلي ثم اضيف 50 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز ببطء حتى يكون الكاشف بلون اصفر شاحب, وحفظ الكاشف في قنينة معتمة, واستخدم للكشف عن أنتاج الاندول من قبل البكتريا (Koneman *et al*., 1992).

3 -2 -2 – 4 كاشف احمر المثيل Methyl red test

حُضر كاشف احمر المثيل بإذابة 0.1 غرام من صبغة أحمر المثيل في 300 مل من كحول اثيلي تركيزه 95% وأُكمل الحجم إلى 500 مليلتر بإستخدام الماء المقطر ، وقد إستُعمل في أختبار المثيل ألاحمر للكشف عن قدرة البكتريا على التحلل الكلي لسكر الكلوكوز (Brown, 2005).

3 -2 - 2 – 5 كاشف فوكس بروسكاور Voges-Proskauer reagent

أُستخدم الكاشف للكشف عن التحلل الجزئي للسكريات ، وحُضر من جزئين :

A_ كاشف ألفا – نفثول α- naphthol : حُضر بأذابة 6 غرام من المادة α- naphthol في 90 مليلتر كحول اثيلي 95 % ومزج جيداً، ثمَّ أُكمل الحجم إلى 100 مل .

B_ كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم . حُضر بإذابة 16 غرام من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في 100 مليلتر الماء المقطر، حُفظت الكواشف في درجة حرارة 4 م° لحين الإستخدام (Brown, 2005).

3 - 3 تحضير الاوساط الزرعية Preperation of Cultur media

حُضرت الاوساط الزرعية وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوات وتم بعدها ضبط الاس الهيدروجيني الى 7 وعُقمت بالموصدة بدرجة حرارة 121°م وضغط (15 باوند/ إنج^2) لمدة 15 دقيقة وتم توزيعها في أطباق بتري معقمة وتُركت ألاطباق لعدة دقائق لتتصلب , وحُضنت الاطباق لمدة 24 ساعة وفي درجة حرارة 37 °م للتأكد من كفاءة التعقيم بعدها حُفظت في الثلاجة عند درجة حرارة 4°م لحين الاستعمال. وحُضرت بقية الاوساط كما يلي :

3- 3- 1 وسط اكار الدم Blood agar

حُضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة , ثم عُقم بالموصدة وبُرد الى 45 °م وأُضيف صنف من الدم البشري نوع AB بنسبة 5% ومُزج جيداً و صُبَّ

في اطباق معقمة و وتُرك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام, أُستخدم للكشف عن قدرة البكتريا على أنتاج الهيمولايسين الحال لكريات الدم الحمر.

3 – 3– 2 وسط اكار المكونكي Mac Conkey Agar

حُضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة وعُقم بالموصدة وتم تبريده الى درجة حرارة 45°م و صُبَّ في أطباق معقمة , أُستخدم للعزل التفريقي للبكتريا السالبة لصبغة كرام وتشخيصها من حيث قابليتها على انتاج سكر اللاكتوز (Collee *et al.*,1996).

3 – 3 – 3 وسط مثيل الايوسين الازرق Eosin methylene blue medium (EMB)

حُضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة وعُقم بالموصدة وتم تبريده الى درجة حرارة 45 °م وصُبَّ في أطباق معقمة لحين الاستعمال . أُستخدم كوسط تفريقي لبكتريا *E.coli* (forbes *et al.*,2007) .

3– 3– 4 وسط اكار سايمون ستريت Simon citrate agar

حُضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة , وبعدها صُبَّ هذا الوسط في انابيب اختبار معقمة بشكل مائل وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

3– 3– 5 وسط اكار اليوريا Urea base agar

حُضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة وعقم بالموصدة وتبريده الى درجة حرارة 45°م , وأُضيف الية كمية من محلول 40% يوريا معقمة بالترشيح باستخدام مرشحات دقيقة , وثم وضع بصورة مائلة في انابيب معقمة ذات اغطية محكمة , وأُستخدم هذا الوسط لغرض الكشف على قابلية البكتريا على أنتاج أنزيم اليوريز (Li *et al.*,2004).

3– 3– 6 وسط ماء الببتون Pepton water medium

حُضر هذا الوسط من خلال أضافة 10 غرام من الببتون 5 غرام من كلوريد الصوديوم في لتر من الماء المقطر وعُقم بعدها بالموصدة وتم ضبط الاس الهيدروجيني له الى 7 , أُستخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على أنتاج الاندول (Koneman *et al.*,1992).

3- 3- 7 وسط الصويا الصلب Trypticase Soy Agar

حُضر هذا الوسط بأذابة 19 غرام من TSA في 500 مل من الماء المقطر وأُضيف اليه 1 % من خلاصة الخميرة وعُقم بالموصدة , أُستخدم للتحري عن قابلية البكترية على أنتاج البكتريوسين (القصاب والخفاجي, 1992).

3- 3- 8 وسط أكار الكلغلر kligler Iron agar

حُضر هذا الوسط بأذابة 5.75 غرام من هذا الوسط في 500 مل من الماء المقطر ووضع بشكل مائل في أنابيب الاختبار المعقمة أُستخدم هذا الوسط للتحري على قابلية البكتريا على أنتاج ال H2S (Macfaddin,2000) .

3- 3- 9 وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain _heart infusion Broth

حُضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة وعُقم بالموصدة وتم تبريده و صُبَّ في أطباق معقمة و حُفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

3- 3- 10 وسط نقيع القلب والدماغ الصلب Brain _heart infusion agar

حُضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة وعُقم بالموصدة و صُبَّ في أطباق معقمة و حُفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

3- 3- 11 وسط اكار مولر هنتون Muller hintone agar

حُضر وسط اكار مولر هنتون بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة , وعُقم بالموصدة وبُرد و صُبَّ في أطباق معقمة و حُفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.

3 - 4 جمع العينات Collection of Samples

جُمعت 200 عينة خروج من أطفال مصابين بالاسهال بعمر سنتين فما دون بعد تشخيص حالة المريض من قبل الطبيب الاخصائي في مستشفى البتول التعليمي , وجُمعت العينات من تاريخ 25 / 9 / 2016 ولغاية 1 / 2 / 2017 في حاويات نظيفة ومعقمة وسجلت المعلومات الخاصة بالمريض والتي تتضمن الاسم ,العمر, الجنس , نوع الرضاعة , منطقة السكن وفق الاستمارة أدناه :

إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى

اسم المريض :

العمر :

الجنس :

السكن :

نوع الرضاعة :

3 -5 فحص البراز العام **Generial stool examination**

3- 5- 1 الفحص العياني **Gross examination**

تم فحص عينات الخروج عيانيا قبل فحصها بالمجهر من حيث الفحص القوام Consistency, اللون Color ووجود الدم Blood أو المخاط Mucous (الكبيسي, 2007).

3- 5- 2 الفحص المجهري **Microscopic examination**

أُستخدمت طريقة المسحة المباشرة وذلك من خلال وضع قطرة من المحلول الملحي الفسلجي على أحد جانبي شريحة نظيفة وجافة وقطرة أخرى من محلول اليود على الجانب الاخر, وأخذت كمية صغيرة من الغائط بواسطة عود خشبي ومزجت جيداً مع المحلول الملحي الفسلجي ومحلول اليود ثم وضع غطاء الشريحة (عبد الحسين, 2008).

3- 6 تشخيص البكتيريا **Bacterial Identification**

3- 6- 1 زرع العينات **Samples culture**

زُرعت عينات (الخروج) للأطفال الرضع المصابين بالزحار الأميبي بشكل مباشر على وسط أكار المكونكي وحُضنت الاطباق بدرجة 37°م لمدة 24 وتم تنقية عزلات بكتريا أشريشيا القولون بطريقة التخطيط Streaking على وسط أكار المكونكي للتأكد من نقاوة المستعمرات المعزولة, بعد أنهاء التشخيص الاولى لهذه البكتريا على وسط أكار المكونكي من

خلال الصفات الزرعية للبكتريا على هذا الوسط تم زرع البكتريا على وسط تفريقي أخر يعرف ب ألايوسين مثلين الازرق (EMB) أذا تظهر مستعمرات هذه البكتريا المخمرة للاكتوز بريقاً لماعاً معدنياً أخضر Metalic_sheen colony على هذا الوسط (Winn *et al*.,2006).

3- 6- 2 الفحص المجهري Microscopic Examination

حُضرت المسحات الجافة من المستعمرات النامية على ألاوساط المذكورة في بأستخدام شرائح زجاجية نظيفة وتم تلوينها بصبغة كرام وفحصت بواسطة المجهر الضوئي Light microscope وبأستعمال العدسة الزيتية تمَّ ملاحظة شكل ولون الخلايا البكتيرية .

3 - 6- 3 الفحوصات الكيموحيوية Biochemical test

3 - 6- 3-1 إختبار إنزيم الكتاليز Catalase test

أُستخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على أنتاج أنزيم الكاتليز حيث نُقل جزء من المزروع البكتيري الى شريحة زجاجية نظيفة بواسطة عيدان خشبية وأُضيف اليها بضع قطرات من كاشف بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) ، إنّ ظهور فقاعات غاز الاوكسجين دليل على إيجابية الفحص (Tadesse and Alem,2006).

3 - 6- 3- 2 إختبار إنزيم الاوكسيديز Oxidase test

أُستخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على أنتاج أنزيم (Cytochrome oxidase) من خلال وضع قطرات من كاشف الاوكسديز Tetra methyl para phenylene diamine dihydro chloride على ورقة ترشيح, وبوساطة أعواد خشبية معقمة يتم نقل مستعمرة من العزلة المراد الكشف عن قابليتها على أنتاج ألانزيم الى ورقة الترشيح, ويعد الفحص موجباً من خلال ظهور اللون البنفسجي خلال 10 ثوان من ملامسة خلايا البكتريا لكاشف الاوكسديز (Tadesse and Alem,2006).

3- 6- 3- 3 إختبار الأندول Indole test

أُستخدم للكشف عن أنتاج الاندول , حيث يعد الاندول أحد نواتج أيض الحامض الاميني التربتوفان نتيجة لامتلاك البكتريا لأنزيم Tryptophanase, إذ لُقح وسط ماء الببتون السائل Pepton water medium بمزروع العزلة قيد الدراسة , وحُضن الوسط بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة , ثم أُضيف خمس قطرات من كاشف كوفاكس على السطح الداخلي لأنبوبة

الاختبار, يتم التعرف على أيجابية الفحص من خلال ظهور حلقة حمراء خلال بضع ثوان من أضافة الكاشف (Koneman *et al*., 1992).

3 – 6– 3– 4 إختبار إستهلاك السترات Citrate Utilization test

زُرعت العزلات على مائل وسط سايمون– ستريت Simon cirate agar ، وحُضنت بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة ، تعدُّ النتيجة موجبة عند تحول لون الوسط من الاخضر الى الازرق لإستهلاك السترات(Benson, 2002).

3– 6– 3– 5 فحص المثيل الاحمر Methyl – Red test

لُقحت الأنابيب الحاوية على وسط MR-VP Broth بمستعمرات مفردة من بكتريا أشريشيا القولون منماة على وسط مانكوكي وحُضنت بدرجة حرارة 37 مْ مدة 24 ساعة , ثم أُضيفت 5 قطرات من كاشف المثيل الأحمر الى كل انبوبة ورجت بهدوء, يعدُّ ظهور اللون الأحمر الغامق دلالة على النتيجة الموجبة (Koneman *et al*., 1992).

3– 6– 3– 6 إختبار فوكس بروسكاور Voges-Proskauer test

لُقحت الأنابيب الحاوية على وسط MR-VP Broth بمستعمرات مفردة منماة على وسط أكار الماكونكي و حضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24–48 ساعة ، وبعد إنتهاء مدة الحضانة أُضيف 6 قطرات من كاشف (A) الفا_ نفثول وقطرتين من كاشف (B) هيدروكسيد البوتاسيوم ومزج الخليط جيداً ، دلَّ ظهور اللون الوردي مباشرة او بعد ترك الانابيب لمدة 20 دقيقة على إيجابية الإختبار(Koneman *et al*., 1992).

3– 6– 4 تشخيص البكتريا بأستخدام عدة التشخيص Api 20E Kit :

أُستخدمت عدة التشخيص Api 20E Kit الجاهزة وبحسب تعليمات الشركة المصنعة Bio Merieux للتأكد من عملية تشخيص العزلات والتي تتضمن 20 اختباراً كيموحيوياً بحسب ما ورد في (Brown, 2007) وكالاتي :

3- 6- 4- 1 طريقة العمل

3- 6- 4 -1- 1 تحضير الشريط Preparation of the strip

وضع 5 مليلترات من الماء المقطر في الحفر (wells) الموجودة في حاوية الشريط (Tray) لكي تصبح الظروف رطبة ثم يتم وضع الشريط داخل الحاوية .

3- 6- 4-2 -2 تحضير اللقاح البكتيري Preparation of bacterial inoculum

نُقلت مستعمرات فردية نامية على وسط اكار المكونكي الى انبوبة اختبار حاوية على 5 مليلتر من المحلول الفسلجي وبعدها مزجت جيداً بواسطة المازج وتم مقارنة عكورته بعكورة انبوبة ماكفرلاند 0.5 المحظر في الفقرة (3_ 2 _1 _1).

3- 6- 4- 1- 3 تلقيح الشرائط Inoculation of the strips

أُستخدمت ماصة باستور المعقمة في أضافة العالق البكتيري على حافة الانبوب المتوافر على الشريط وملئها مع تجنب حدوث فقاعات في اثناء الاضافة الجزء السفلي (Tube) والجزء العلوي (Cupule) منه , بالنسبة لاختبارات السترات والفوكس بروسكور والجلاتين (GEL,VP,CIT) أما بقية الانابيب فملئ الجزء السفلي (الانبوب فقط) وأضيف الزيت (Mineral oil) في الجزء العلوي بالنسبة للاختبارات الأرجنين واللايسين والاورنثين وانتاج كبريتيد الهيدروجين واليوريا (ADH, LDC, ODC,H2S,URE) اغلقت الحاوية بالغطاء (lid) الخاصة بها وحُضنت بدرجة 37˚ م ولمدة 18 _ 24 ساعة .

3- 6- 4- 1- 4 قراءة النتائج :

بعد أنتهاء مدة الحضن أُضيفت الكواشف المجهزة مع العدة التشخيصية وكما يلي :

1_ قطرة من كاشف الاندول (JAMES) الى أنبوب الاندول (IND) وقرأت النتيجة مباشرة .

2_ قطرة من كاشف 10% كلوريد الحديديك الى انبوب التربتوفان ذي امتياز TDA وقرأت النتيجة مباشرة .

3_ قطرة من كاشف (VP1) من (40 % هيدروكسيد البوتاسيوم) ثم قطرة من كاشف VP2 (6 % ألفا _نفثول) الى انبوب (VP) وقرأت النتيجة خلال دقائق.

3- 6- 5 تشخيص البكتريا بأستخدام VITEK2

يعتمد أستخدام هذا الجهاز في مختبرات البكتريولوجي لتشخيص البكتريا بدقة كبيرة لكونه يتضمن 64 أختباراً من الاختبارات الكيمو حيوية اللازمة لتشخيص البكتريا بحيث تصل دقة التشخيص بهذا الجهاز الى 98% .

3- 6- 5 - 1 طريقة العمل

3- 6- 5 – 1-1 العالق الجرثومي Suspension preparation

1_ زُرِعت البكتريا المراد فحصها على وسط اكار المكونكي وحُضنت مدة 24 ساعة وبدرجة 37 °م وبطريقة التخطيط .

2_ أُجري فحص ملون كرام لغرض أختيار بطاقة ال VITEK2 المناسبة .

3- 6- 5 -1- 2 تلقيح البطاقة Inoculation of the card

1_ تم أنتقاء مستعمرة مفردة نقية من البكتريا وتخفيفها في 3 مليلتر من المحلول الملحي الموضوع في أنبوبة معقمة والمحمولة بحامل خاص.

2_قيست عكورة المستعمرة بجهاز VITEK 2 DENSICHEK بحيث تكون العكورة من 0.5_ 0.63.

3_ وضع العالق الموجود في الانبوبة ف Cassette VITEK 2 الخاص بالبكتريا السالبة لصبغة كرام

4_ ثم نقل Cassette VITEK 2 الى الجهاز في حُجرة مفرغة من الهواء Vacuum chamber إذ إنّ عملية تفريغ الهواء تعمل على نقل المايكروبات الى البطاقة بواسطة الأُنبوب الناقل فضلاً عن توزيعها في الحفر الموجودة فيها لغرض تشخيصها عن طريق 64 فحصاً كيموحيوياً .

3- 6- 5 -1- 3 ختم البطاقة وحضنها Card Sealing and Incubation

يُقطع الأُنبوب الناقل الياً من قبل الجهاز خلال مدة 15 دقيقة وبعدها يتمُّ ختم البطاقة أي أحكام أغلاق منفذ الانبوب الناقل لمنع أي تسّرب ثُمّ تنقل الى الحاظنة .

3- 6- 5 -1- 4 نظام التشخيص البصري Optical System

يعمل هذا النظام في الجهاز على تسقيط عدد من الحزم الضوئية تجاه البطاقة للتعرف على الاطوال الموجية للتفاعلات وترجمتها من خلال التغيرات اللونية والعكورة فضلاً عن النواتج الايضية .

3- 6- 5 -1- 5 نتائج ألاختبار وتقنيات التحليل Test Reaction Results and Analytical Techniques:

يعمل الجهاز على حساب النتائج ومقارنتها بالنتائج المخزونة بالجهاز والتي تضم العديد من قياسات الاختبارات, ولعدد كبير من السلالات المختلفة والمعزولة من أماكن مختلفة حيث تظهر النتائج بشكل موجب +, أو سالب - , ويتمُ تحديد مستوى تشخيص الجراثيم من خلال خارطة أختبارات وتقارن بالصفات التصنيفية للجهاز فيعطي الجهاز نسبة أحتمالية ومستوى الثقة , فعندما تكون نسبة الاحتمالية عالية (96_99 %) فهي عند مستوى ثقة ممتاز .(Pincus, 2011)

3- 7 حفظ وإدامة العزلات الجرثومية

حُفظت العزلات البكتيرية المشخصة على وسط ألاكار المغذي الصلب بصورة مائلة بدرجة حرارة 4˚م ويعاد تنشيطها شهرياً . وأُستخدم وسط مرق نقيع القلب والدماغ المضاف اليه نسبة 15% كليسيرول لحفظ العزلات لمدة طويلة وفي درجة حرارة - 20˚م لحين الاستعمال .(Fugelsang and Edwards, 2007)

3 -8 عوامل الضراوة لبكتريا أشريشيا القولون Virulance factors of *Escherichia coli*

تمتلك بكتريا أشريشيا القولون العديد من عوامل الضراوة التي تسبب الأصابات العديدة للأنسان منها حالات الأسهال ومن العوامل التي تم التحري عنها هي:

3-8 -1 أنتاج الهيمولايسين Haemolysin production

تم الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على أنتاج الهيمولايسين البكتيري من خلال زرع هذه العزلات على وسط Blood agar , وتحضن ألاطباق بدرجة حرارة 37˚م ولمدة 24 ساعة (Atlas *et al.*,1995).

3- 8- 2 أنتاج البكتريوسين Bacteriocin production

زُرِعت البكتريا المنماة مسبقاً في وسط نقيع القلب والدماغ وبعمر 24 ساعة بطريقة النشر على وسط أكار TSA المحضر مسبقاً وحُضنت ألاطباق بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة , بعد الحضن عملت أقراص بواسطة الثاقب الفليني في هذا الوسط ووضعت على سطح ألاكار المغذي والمنشور علية بالناشر مقدار 0.1 مل من المزروع البكتيري لعزلات الاختبار بعد مقارنتها مع محلول ماكفرلاند القياسي بعدها تم حضن الاطباق في درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة , ويتم التحري عن أنتاج البكتريوسين من خلال ظهور مناطق تثبيط حول قطعة الاكار الحاوي على السلالة المنتجة (القصاب والخفاجي, 1992).

3- 9 فحص الحساسية للمضادات الحياتية Antibiotic suscepittibility test

أُجري إختبار حساسية عزلات بكتريا أشريشيا القولون التي تم تشخيصها من النماذج المرضية للأطفال المصابين بالأسهال لخمسة عشر مضاداً حيوياً و المذكورة في الجدول (3_ 5) بالإعتماد على طريقة Kerby- Bauer method وحسب الخطوات التالية :

1_ حُضر عالق بكتيري من العزلات البكتيرية قيد الدراسة بنقل مستعمرة مفردة بعمر 24 ساعة منماة على وسط الماكونكي الصلب الى 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسلجي ثمّ قُورنتْ عكورته مع عكورة محلول ثابت العكرة القياسي الذي يُعطي عدداً تقريبياً للخلايا مقداره 1.5×10^8 خلية / مليلتر.

2 _ نشر بوساطة مسحة قطنية معقمة مقدار 0.1 مليلتر من العالق البكتيري على سطح أطباق وسط مولر–هنتون الصلب , ثمّ تُركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.

3 _ نُقلت أقراص مضادات الحياة Antibiotic disk بواسطة ملقط معقم الى الأطباق بواقع 5 _6 أقراص للطبق الواحد ، وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 18 _24 ساعة.

4 _ قُرئت النتائج بقياس مناطق التثبيط المتكونة حول أقراص المضادات الحيوية وفسرت النتائج على أن العزلة حساسة , او متوسطة , او مقاومة حسب المواصفات القياسية الواردة في (CLSI ,2014).

3-10 تحديد التركيز المثبط الادنى Determination Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

3- 10- 1 المحاليل الخزنية للمضادات الحيوية Antibiotic stock Solutions

حُضرت المحاليل الخزنية للمضادات الحيوية بتركيز 10% لكل من مضادات الحياة Cefixime , Cefuroxime , Ceftriaxon و Tetracyclin وبحسب ما ورد (CLSI,2012) في بإذابة 1 غم من المضاد في 90 مليلتر من الماء المقطر ثمَّ أُكمل الحجم الى 100 مليلتر ، عُقمت هذه المحاليل بالترشيح بوساطة مرشحات دقيقة ذات ثقوب بقطر 0.22 مايكرومتر وحُفظت في الثلاجة لحين الإستخدام.

3- 10- 2 طريقة العمل:

أُستخدمت طريقة التخافيف المتسلسلة المتضاعفة في وسط مولر _ هنتون الصلب بحسب ما ورد في (Morello *et al* ., 2003) وكما يلي :

1 _حُضرت تراكيز متسلسلة متضاعفة تراوحت بين 1024 _0.5 مايكروغرام/ مل للمضادات الحيوية بإضافة نسب مختلفة من المحاليل الخزنية لكل من المضادات الحيوية Cefixime , Cefuroxime , Ceftriaxon و Tetracyclin الى وسط مولر- هنتون المعقم والمبرد الى 45°م.

2_ حُضر العالق البكتيري لكل عزلة بكتيرية ثمّ قُورنتْ عكورته مع عكورة المحلول القياسي Mc Farland.

3_ سُحب 5 مايكرولتر من العالق البكتيري المحضر أعلاه بوساطة ماصة دقيقة Micropipet ، ولُقحت بطريقة التقطير Spotted على شكل قطرة واحدة على أوساط المضادات .

4_ كُررت العملية للعزلات بالتسلسل مكررين للتركيز الواحد، وتُركت الاطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لحين جفاف القطرات قبل قلب الاطباق ، حُضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة وتم حساب التركيز المثبط الادنى (MIC) على أنه أقل تركيز من المضاد يمكن أن يثبط البكتريا بعد الحضن.

5_ تمَّ مقارنة النتائج مع نقطة التوقف Break point والتي تمثل أقل تركيز يمكن أن يصله المضاد في المصل ليعطي أعلى فعالية وبعده يصبح مقاوماً (CLSI,2014).

3 -11 طرائق تحضير المستخلصات النباتية :

حُضرت ثلاث مستخلصات لكل من نباتي الزعتر(أوراق الزعتر) والرمان (قشور الرمان) وهي المستخلص المائي البارد , والمستخلص المائي الحار , والمستخلص الكحولي للكشف عن التأثير التثبيطي لهذه المستخلصات على بكتريا أشريشيا القولون المعزولة من حالات الأسهال للأطفال الرضع.

3 - 11-1 المستخلص المائي البارد Cold water extract

حُضر هذا المستخلص من خلال وزن 10 غرام من المسحوق النباتي ووضع في بيكر زجاجي نظيف ومعقم , وأُضيف له 100 مل من الماء المقطر , وترك لمدة لمدة 24 ساعة , بعدها تم ترشيح المزيج بالشاش ووضع في أنابيب زجاجية ونبذ بجهاز النبذ المركزي (Centrifuge) بسرع 5000 دورة / دقيقة في مدة زمنية قدرها 10 دقائق , ورشح الرائق بأستعمال ورق ترشيح , ووضع في الفرن لتبخير الراشح في درجة حرارة قدرها 40 °م الى أن تم تبخير الماء كلياً و الحصول على المسحوق الجاف (Parikh and Chanda, 2007) .

3- 11 -2 المستخلص المائي الحار Hot water extract

حُضر هذا المستخلص من خلال وزن 10 غرام من المسحوق النباتي ووضع في بيكر زجاجي معقم وأُضيف له 100 مل من الماء المقطر المغلي وترك المزيج لمدة 30 دقيقة . ورشح المزيج بأستعمال الشاش الطبي ووضع في أنابيب ونبذت الانابيب مركزياً وبسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق , ووضع الراشح في الفرن بدرجة حرارة 40°م الى أن تبخر الماء كلياً وتم الحصول على المسحوق الجاف , وتكرر العملية عدة مرات لغرض الحصول على كمية كافية من المستخلص المائي الحار ووضع في أنبوبة زجاجية محكمة الغلق وتم تعليمه وحُفظ في الثلاجة لحين الاستعمال (El_fallal and EI_kattan,1997).

3 -11- 3 المستخلص الكحولي AL coholic extract

حُضر هذا المستخلص من خلال وزن 10 غرام من المسحوق النباتي ووضع في دورق زجاجي وأُضيف له 100 مل من الكحول الاثيلي تركيزه 70 % وترك المزيج لمدة 24 ساعة وبعدها تم ترشيحه بأستخدام الشاش ووزع في أنابيب ونبذ مركزياً بسرعة 3000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقايق , ثم ووزع الراشح في أطباق ذات مساحة سطحية كبيرة ووضع في الفرن بدرجة 40 °م لغرض الحصول على المسحوق الجاف حيث تم وضع هذا المسحوق في أنابيب زجاجية محكمة الغلق وحُفظ في الثلاجة لحين الاستعمال
(Rhajaoui *et al.*,2001.)

3 - 11 - 4 تحضير المحلول الخزين Preparation of stock solution

حُضر هذا المحلول بأذابة 1 غرام من المستخلص النباتي في 10 مل من الماء المقطر ليصبح تركيز المحلول 100 ملغم / مل وعُقمت المحاليل الخزنية بأستخدام المرشحات الدقيقة ذات (Millipore Filter) ذات ثقوب (0.22) مايكروميتر, و حُضر من المحلول المركز التراكيز المطلوبة (20, 40, 60 , 80) ملغم / مل (العوادي, 1993).

3 – 11-5 تحديد الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية
Determination inhibition activity of plant extract

أُستخدمت طريقة الانتشار في الحفر وفقاً ل (Perez *et al.*,1990) وحسب الخطوات التالية:

1 _ حُضر العالق البكتيري بأستخدام المحلول الملحي الفسلجي ثمّ قُورنتْ عكورته مع عكورة المحلول القياسي Mc Farland , ولُقح به وسط مولر هنتون الصلب بنشر 0.1 مل من العالق البكتيري بواسطة الناشر المعقم ثُمّ تُركت الاطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة ولمدة عشر دقائق .
2_ أُستخدم الثاقب الفليني (Sterile cork borer) لعمل حفر بقطر 5 ملم .
3- أُضيف 0.2 ml من التراكيز المتدرجة للمستخلصات النباتية بأستخدام ماصة دقيقة معقمة وعملت حفر سيطرة أيضا وأُضيف اليها ماء مقطر.
4_ حُضنت الاطباق بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة .
5_ حُددت فعالية التراكيز المتدرجة المستخدمة من خلال قياس منطقة التثبيط Inhibition zone (المنطقة الخالية من النمو البكتيري) .

3 – 12 بكتريا *Lactobacillus*

3 – 12 – 1 تحضير الاوساط الخاصة بعزل وتشخيص البكتريا

3- 12-1-1 وسط MRS Agar (DeMan,Regosa,Sharp Agar)

حُضر هذا الوسط بأذابة 62 غرام من مسحوق الوسط في 1000 مل من الماء المقطر وعُقم بالموصدة وبعدها تم تبريده الى درجة حرارة 45˚م في الحمام المائي وصُبَّ في أطباق بتري وترك ليتصلب , أُستخدم هذا الوسط لعزل بكتريا *Lactobacillus* (Hassan *et al.*, 2011) .

3- 12- 1- 2 وسط MRS broth (DeMan,Regosa,Sharp broth)

حُضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة بأذابة 55 غرام في 1000 مل من الماء المقطر وعُقم بالموصدة وبعدها تم تبريده الى درجة حرارة 45˚م في الحمام المائي ووزع في أنابيب الأختبار بواقع 9 مل في كل أنبوبة وحفظ في الثلاجة لحين ألاستعمال (Hassan *et al.*, 2011).

3- 12-1- 3 وسط تميع الجلاتين Gelatine Liquification medium

حُضر هذا الوسط بأذابة 10 غرام من الجلاتين و2 غرام من Nutrient broth في 100 مل من الماء المقطر وعُقم بالموصدة وبعدها تم تبريده الى درجة حرارة 45˚م في الحمام المائي ووزع في أنابيب الأختبار , أُستخدم هذا الوسط للكشف عن تميع الوسط بفعل انزيم الجلاتينيز (Barrow and Feltham, 2003).

3- 12- 1- 4 وسط أختبار الحركة Motility test medium

حُضر هذا الوسط بأذابة 1 غرام من ألاكار_اكار و5 غرام من مسحوق Nutrient agar في 250 مل من الماء المقطر وعُقم بالموصدة وبعدها تم تبريده الى درجة حرارة 45˚م في الحمام المائي ووزع في أنابيب الأختبار, أُستخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتريا على الحركة (Hadi, 2011).

3- 12-1-5 وسط تخمير السكريات Carbohydrate fermentation Medium

حُضر هذا الوسط بأضافة 0.1 غرام من السكريات المراد معرفة قدرة البكتريا على تخميرها و 100 مل من وسط مرق الفينول الاحمر الاساس phenol red broth base medium (Pyar and peh, 2014), و حُضر وسط مرق الفينول الاحمر الاساس حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة من 10 غرام proteose peptone , 1 غرام من Beef extract , 5 غرام من كلوريد الصوديوم و 0.018 غرام من Phenol red في لتر من الماء المقطر وعُقم بالموصدة .

أما وسط ماء الببتون Pepton water medium , وسط اكار سايمون ستريت Simon citrate agar ووسط اكار اليوريا Urea base agar فذكرت طريقة تحضيرها في الفقرات (3- 3- 3- 6 , 3- 3- 3- 4 , 3- 3- 3- 5).

3- 13 جمع العينات Collection of sample

جُمعت 20 عينة من براز أطفال بعمر أيام ورضاعتهم طبيعية ووضعت العينات في حاويات نظيفة ومعقمة , كما جُمعت 35 مسحة مهبلية من نساء بأعمار مختلفة , تمَّ جمع العينات من مستشفى البتول التعليمي وزُرِعت النماذج مباشرة على الأوساط الغذائية الملائمة لغرض التشخيص.

3- 14 زرع العينات Samples culture

زُرِعت عينات البراز من خلال أخذ كمية من النموذج ووضعه في وسط Man, Rogosa Sharpe broth (MRS broth) , , وحُضنت في درجة حرارة 37˚م لمدة 48 ساعة تحت ظروف لاهوائية بعدها زُرِعت على وسط MRS Agar وحُضنت في درجة حرارة 37˚م لمدة 48 ساعة وفي ظروف لاهوائية ونقيت بطريقة التخطيط على هذا الوسط لعدة مرات للحصول على مستعمرات بكتيرية نقية (Schillinger and Lucke, 1987).

المسحات المهبلية المأخوذة من جدار المهبل زُرِعت على وسط MRS Agar وحُضنت تحت ظروف لا هوائية وفي درجة حرارة 37˚م لمدة 48 ساعة ونقيت بطريقة التخطيط على وسط MRS Agar لعدة مرات (Hindal and Ali., 2015).

3 – 15 تشخيص العزلات البكتيرية Bacterial Identification

3 – 15 –1 الفحص المجهري Microscopic Examination

حُضرت مسحة جافة من مستعمرة فتية بعمر 24 ساعة بواسطة loop وصبغت بمحلول صبغة كرام لملاحظة شكل ولون الخلايا.

3– 15 – 2 الفحوصات الكيموحيوية Biochemical test

أُجريت العديد من الفحوصات الكيموحيوية لغرض تشخيص بكتريا حامض اللاكتيك منها: إختبار إنزيم الكتاليز Catalase test , إختبار إنزيم الاوكسيديز Oxidase test , أختبار استهلاك السترات Citrate Utilization, أختبار اليوريز Urease test وإختبار الأندول Indole test كما ورد في الفقرات (3 – 6– 3– 1 , 3 – 6 –3– 2 , 3 – 6– 3– 3 , 3 – 6– 3– 4 (.

3– 15– 2– 1 أختبار تميع الجلاتين Gelatine Liquification test

طعنت مستعمرة بكتيرية فتية بعمر 24 ساعة في هذا الوسط وحظنت في درجة حرارة 37˚م لمدة 24 ساعة , وبعد انتهاء مدة الحضن وضع الوسط في حمام ثلجي لمدة 30 دقيقة فاذا تصلب الوسط دليل على سلبية ألاختبار وأذا لم يتصلب دليل على ايجابية ألاختبار (جليل, 2015) .

3– 15– 2– 2 أختبار الحركة Motility test

طعنت مستعمرة بكتيرية فتية بعمر 24 ساعة في هذا الوسط للكشف عن قدرة بكتريا *Lactobacillus* على الحركة وحظنت لمدة 24 ساعة وفي درجة حرارة 37˚م (الطائي, 2011).

3– 15– 2– 3 أختبار تخمر السكريات (الكربوهيدرات) Carbohydrate fermentation

أُخذ 5 مل من وسط أحمر الفينول الأساس الحاوي على نوع معين من السكريات و زُرِعت فيه مستعمرة بكتيرية فتية بعمر 24 ساعة وبعد (24_48) ساعة لوحظ قدرة البكتريا على تخمير السكريات من خلال تغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي (Pyar and peh, 2014).

3- 15- 2- 4 أختبار النمو في مستويات مختلفة من الرقم الهيدروجيني pH

حُضنت مستعمرة بكتيرية فتية بعمر 24 ساعة في وسط MRS Agar المحضر مسبقاً بمستويات مختلفة من pH (4 _8) في درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة ولغرض زيادة الحامضية يتم أضافة HCL , ولزيادة القاعدية يتم أضافة NaOH , ولوحظ قدرة بكتريا *lactobacillus* على النمو في مستويات مختلفة من PH (Sharma *et al*., 2014).

3- 15- 2- 5 أختبار تحمل كلوريد الصوديوم NaCL tolerance test

حُضنت مستعمرة بكترية فتية بعمر 24 ساعة في وسط MRS broth المحضر مسبقاً بتراكيز مختلفة من NaCL (1_10%) في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة , لملاحظة وجود النمو لعزلات بكتريا *lactobacillus* من خلال ظهور العكورة turbidity في الوسط دلالة على نمو العزلة (Chakraborty and Bhowal, 2015).

3- 15- 2- 6 أختبار تحمل الفينول phenol tolerance test

حُضنت مستعمرة بكترية فتية بعمر 24 ساعة في وسط MRS broth المحضر مسبقاً بتركيز 0.4% فينول (الفينول من المواد المثبطة لنمو البكتريا) في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة , ولملاحظة وجود النمو لعزلات بكتريا *lactobacillus* من خلال ظهور العكورة turbidity في الوسط دلالة على نمو العزلة (Chakraborty and Bhowal, 2015).

3- 15- 2- 7 أختبار تحمل أملاح الصفراء bile salts Tolerance test

أُقح وسط MRS broth المحضر مسبقاً بتركيزين من أملاح الصفراء (0.4%_ 0.2%) بمستعمرات من بكتريا *Lactobacillus* حتى تظهر العكورة turbidity في الوسط بحيث تكون العكورة 0.5 ماكفرلاند وحُضن الوسط في درجة حرارة 37°م لمدة 4 ساعات, يؤخذ 1 مل من المزروع البكتيري ويصب على سطح وسط MRS Agar ويحضن في درجة حرارة 37° م لمدة 24 ساعة ويلاحظ النمو البكتيري لمعرفة قابلية البكتريا على مقاومة أملاح الصفراء (Niño *et al*., 2016).

3- 16 تأثير بكتريا *Lactobacillus* على بكتريا *Escherichia coli*.

3- 16 -1 تحضير راشح بكتريا حامض اللاكتيك

لُقحت أنابيب أختبار حاوية على 10 مل من وسط MRS broth ببكتريا *Lactobacillus* بنسبة لقاح 2% وحُضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة , ونبذت مركزياً لمدة عشر دقائق للحصول على الراشح .

3 -16- 2 تحضير عالق بكتريا أشريشيا القولون

حُضر عالق بكتريا أشريشيا القولون بنقل مستعمرة مفردة بعمر 24 ساعة منماة على وسط الماكونكي الصلب الى 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسلجي ثمّ قُورنتْ عكورة العالق مع عكورة محلول ثابت العكرة القياسي الذي يُعطي عدداً تقريبياً للخلايا مقداره $10^8 \times 1.5$ خلية / مليلتر.

أُجريت المعالجة الحيوية لبكتريا *Escherichia coli* بأستخدام طريقة الانتشار في الحفر كما في الخطوات التالية :

1 _ زُرِعت ألاطباق الحاوية على وسط مولر_ هنتون من خلال نشر 0.1 مل من عالق بكتريا *Escherichia coli* بوساطة مسحة قطنية معقمة ثمّ تُركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق وأستعمل الثاقب الفليني لعمل ثقوب بقطر 5 ملم على سطح هذا الوسط بواقع (3-4).

2_ ملئت كل حفرة ب 50 مايكروليتر من راشح بكتريا *Lactobacillus* وحُضنت ألاطباق في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.

3_ قيست مناطق التثبيط حول الحفر بوساطة المسطرة (ملم) وقُورنتْ مع مجموعة السيطرة الحاوية على وسط MRS broth بدون لقاح بكتيري. (Devi *et al*., 2013).

3-17 التحليل الإحصائي Statiatical analysis

أُجري التحليل الأحصائي بإستخدام برنامج SPSS ذي الأصدار 21 , فيما يتعلق بالمتغيرات ذات الصيغة الوصفية فقد تمَّ وصفها بصيغة العدد والنسبة المئوية وتمت المقارنة بين البيانات الوصفية بإستخدام إختبار Chi-Square كما تمَّ إستخدام t-test للمقارنة بين البيانات العددية , وأستخدم Duncan test للمقارنة بين المتوسطات وأُعتبرت كل قيمة *P* value أقل من 0.05 > معنوية إحصائياً (Levesque,2007).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة Results and Discussion

الفصل الرابع

4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1 عينة الدراسة

تمَّ جمع 200 عينة براز لأطفال رضع بعمر سنتين فما دون مصابين بأسهال الزحار الأميبي بعد أجراء فحص البراز العام لهؤلاء الأطفال حيث جُمعت العينات من مستشفى البتول التعليمي للفترة من 25/ 9 / 2016 ولغاية 1/ 2 / 2017.

جدول (4-1) توزيع حالات الأصابة بطفيلي الزحار الأميبي حسب الجنس والعمر.

الفئة العمرية	العدد	النسبة المئوية %	الجنس	العدد	النسبة المئوية %
(6 -1) شهر	60	30	ذكور	135	67.5
(12 - 7) شهر	85	42.5	أناث	65	32.5
(24- 13) شهر	55	27.5	المجموع	200	100
المجموع	200	100			

وتبيّن من خلال هذه الدراسة أن طفيلي الزحار الاميبي يصيب الذكور بنسبة أعلى من الأناث حيث بلغت النسبة 67.5% و 32.5% على التوالي , كما يصيب الفئات العمرية (6_1) أشهر , (12_7) أشهر و (24_13) شهر بنسب متقاربة 30% , 42.5% و 27.5% على التوالي.

زُرعت عينات البراز على وسط أكار المكونكي وأظهرت النتائج أن 125 عينة أعطت نمو موجب للزرع البكتيري أي بنسبة 62.5% كما في الجدول (4-2) وهذه النتيجة تقاربت مع نتيجة الباحثين عبد الكريم وموسى عام 2009 حيث بلغت نسبة العينات التي أظهرت نمو موجب للزرع البكتيري 68% (عبد الكريم وموسى, 2009) , ولم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة الباحث Foster وزملاؤه عام 2015 حيث بلغت نسبة النمو البكتيري 38% (Foster *et al.*, 2015) , كما بينت النتائج أن 75 عينة لم تظهر نمو موجب للزرع البكتيري أي بنسبة 37.5% ويفسر ذلك بوجود مسببات أسهال أخرى غير بكتيرية كالفطريات , الفايروسات والتي لها تقنيات خاصة لعزلها وتشخيصها تختلف عن تلك المعتمدة في دراستنا.

جدول (4–2) نسبة البكتريا المسببة لأسهال الأطفال الرضع والمصاحبة لحالات الزحار الاميبي.

ألاطفال المصابين بالأسهال	اعداد العينات	النسبة المئوية %
وجود نمو بكتيري	125	62.50
عدم وجود نمو بكتيري	75	37.50
المجموع	200	100
X^2	**12.55**	
P	**0.004 [NS]**	

وتبيّن من خلال هذه الدراسة أن نسبة بكتريا أشريشيا القولون المعزولة من عينات الدراسة هي 40% كما في الجدول(4_3) , أتفقت هذه النتيجة مع نتيجة (Bessimbaye *et al.*, 2013) حيث بلغت نسبة بكتريا أشريشيا القولون المعزولة 36.73%, وأتفقت ايضاً مع نتيجة (AL–Dulaimi *et al.*, 2015) حيث بلغت نسبة بكتريا أشريشيا القولون المعزولة 44.8% ولم تتفق مع نتيجة الباحثة (ريا, 2015) حيث بلغت نسبة بكتريا أشريشيا القولون المعزولة 72% أما بقية العينات التي أعطت نمو موجب للزرع البكتيري لا تعود لجنس بكتريا أشريشيا القولون وبالتالي تم أهمالها.

ويعود الأختلاف في نسب بكتريا أشريشيا القولون المعزولة في العديد من الدراسات الى عدد العينات المجموعة , موسم أخذ العينات , الموقع الجغرافي , الوعي الصحي لدى الأفراد و الحالة الأجتماعية والثقافية (أحمد, 2008).

جدول(4–3) نسبة بكتريا أشريشيا القولون المسببة للأسهال في الأطفال الرضع والمصاحبة لحالات الزحار الأميبي.

نوع البكتريا	العدد	النسبة المئوية %
بكتريا أشريشيا القولون	50	40
الأنواع الأخرى	75	60
المجموع	125	100
X^2	**0.87**	
P	**0.02[NS]**	

4 -2 توزيع حالات الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون حسب نوع الرضاعة .

أشارت العديد من الدراسات الى أهمية الرضاعة الطبيعية للحماية من أمراض الأسهال للأطفال في سن الرضاعة حيث يؤدي الى تقليل الاعتلالات والوفيات في الأطفال الرضع , أن تناول حليب الأم فقط بدون سوائل او أطعمة توفر حد أقصى من الحماية ضد الأسهال للأطفال الذين تقل أعمارهم عن ستة أشهر في حين توفر الرضاعة الطبيعية الجزئية حماية وسطية مقارنة بعدم الرضاعة (Morrow and Rangel, 2004).

تبيّن من خلال هذه الدراسة أن نسبة الاصابة ببكتريا أشريشا القولون للأطفال المعتمدين على الرضاعة الطبيعية هي 12%, الأصطناعية 76% والمختلطة 12% وبفارق أحصائي معنوي عالي جداً $P = 0.001$ كما في الجدول (4-4) , أتفقت هذه النتيجة مع Ali وزملاؤه في عام 2009 حيث وجدو من خلال دراستهم أن نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون للأطفال المعتمدين على الرضاعة الطبيعية أقل مقارنة بالرضاعة الصناعية والمختلطة, وتقاربت مع نتيجة تركي وزملاؤه عام 2012 أن نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الأطفال رضاعتهم طبيعية 20.5% , الأصطناعية 70.5% و المختلطة 9% , ولم تتفق مع نتيجة Noaman عام 2013 حيث بينت نتيجة دراسته أن نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الاطفال رضاعتهم طبيعية , صناعية , مختلطة هي 40.9% , 43.2% و 15.9% على التوالي ,

يفسر أنخفاض نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الأطفال المعتمدين على الرضاعة الطبيعية الى كون حليب الأم غني بالعناصر الغذائية اللازمة لنمو الطفل فضلاً عن أحتوائه على الأجسام المضادة التي توفر المناعة للطفل وتحميه من الأمراض.

جدول(4 - 4) نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون المسببة للأسهال وحسب نوع الرضاعة.

نوع الرضاعة	العدد	النسبة المئوية %
طبيعية	6	12
أصطناعية	38	76
مختلطة	6	12
المجموع	50	100
X^2	**45.47**	
P	**0.001 [S]**	

4 –3 توزيع حالات الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون وحسب الجنس.

تبيّن من خلال هذه الدراسة أن نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الذكور والأناث هي 60% , 40% على التوالي ولم يكن هناك فارق أحصائي معنوي وكما في الجدول (4_5) , أتفقت هذه النتيجة مع نتيجة الباحث (Nweze, 2009) وأتفقت أيضاً مع نتيجة (Behiry *et al.*, 2011) حيث أشارت نتيجة دراستهم أن نسبة الأصابة بالذكور أعلى من الأناث , ولم تتفق مع ما توصل اليه(Mitra *et al* ., 2011) حيث أشارت نتيجة دراستهم أن بكتريا أشريشيا القولون تصيب الأناث بنسبة أعلى من الذكور.

جدول(4_ 5) نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الأطفال الرضع وحسب الجنس.

الجنس	العدد	النسبة المئوية %
ذكور	30	60
اناث	20	40
المجموع	50	100
X^2	**2.13**	
P	**0.15 [NS]**	

4– 4 توزيع حالات الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون وحسب العمر.

تبيّن من خلال هذه الدراسة أن بكتريا أشريشا القولون تصيب الفئة العمرية (1–6) أشهر بنسبة 40% وتصيب الفئة العمرية (7 –12) و(12– 24) شهر بنسبة 36% , 24% على التوالي ولم يكن هناك فارق أحصائي معنوي وكما في الجدول (4 –6) , وهذه النتيجة أتفقت مع نتيجة (Gomes *et al.*, 1991) حيث أشارت نتيجة دراستهم أن بكتريا أشريشيا القولون تصيب الاطفال الذين أعمارهم ستة أشهر فما دون بنسبة أكثر من ألاطفال الذين أعمارهم من ستة أشهر الى سنة والاطفال الذين أعمارهم لا تتجاوز السنتين وأتتفقت مع نتيجة (Noaman,2013) حيث أشارت نتيجة دراسته أن بكتريا أشريشا القولون تصيب الفئة العمرية (1–6) أشهر بنسبة أعلى من الفئة العمرية (7– 12) أشهر والفئة العمرية (24 12–) أشهر.

جدول(4–6) نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الأطفال الرضع وحسب العمر.

الفئة العمرية	العدد	النسبة المئوية %
أشهر (1_6)	20	40
أشهر (7_12)	18	36
أشهر (13_24)	12	24
المجموع	50	100
X^2	**9.72**	
P	**0.007 [NS]**	

4 –5 توزيع حالات الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون وحسب نوع السكن.

تبيّن من خلال هذه الدراسة أن نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الريف كانت أعلى من المدينة حيث بلغت النسبة 54% و46% على التوالي ولم يكن هناك فارق أحصائي معنوي وكما في الجدول (4–7) , أتفقت هذه النتيجة مع نتيجة (Al_Saady *et al.*, 2006) حيث بلغت نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الريف 81.8% و المدينة 18.8% ويعزى السبب في ذلك الى قلة الخدمات الصحية كعدم توفر المياه الصالحة للأستهلاك البشري فضلاً عن أنخفاض الوعي الصحي وأنتشار بعض الحشرات والنواقل الأخرى التي لها دور في نقل المسببات المرضية كالبكتريا والطفيليات وغيرها.

جدول (4 – 7) نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الأطفال الرضع وحسب نوع السكن.

نوع السكن	العدد	النسبة المئوية %
ريف	27	54
مدينة	23	46
المجموع	50	100
X^2	**0.32**	
P	**0.57 [NS]**	

4- 6 تشخيص بكتريا أشريشيا القولون Identification of *Escherichia coli*

6 -4-1 الصفات الزرعية Colonies Morphology

أظهرت العزلات قيد الدراسة عند تنميتها على وسط الماكونكي الصلب مستعمرات دائرية محدبة وجافة ذات لون وردي لكونها بكتريا مخمرة لسكر اللاكتوز , ولتأكيد التشخيص زُرعت البكتريا على وسط تفريقي أخر يعرف ب ألايوسين مثلين الازرق (EMB) أذ ظهرت مستعمرات هذه البكتريا المخمرة للاكتوز بريقاً لماعاً معدنياً أخضر Metalic_sheen colony على هذا الوسط.

4- 6- 2 الفحص المجهري Microscopic Examination

عند فحص هذه البكتريا تحت المجهر الضوئي لوحظ أنها عصوية الشكل وسالبة لصبغة كرام.

4 – 6 – 3 الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests

تبيّن نتائج الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا أشريشيا القولون والتي أجريت بالاعتماد على (Macfaddin,2000) أن جميع العزلات النامية والبالغ عددها 50 عزلة أعطت نتائج موجبة لكل من فحص الكتاليز Catalase , احمر المثيل methyl red (MR) وفحص انتاج الاندول Indol , في حين اعطت نتائج سالبة مع فحص فوكس بروسكاور Voges-Proskauer (VP) , اختبار استهلاك الستريت Citrate Utilization وفحص الاوكسديز Oxidase وكما في الجدول (4- 8).

جدول (4-8) الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا *Escherichia coli*

عزلات بكتريا *Escherichia coli*	Biochemical tests					
	Oxidase	Catalase	Indol	MR	VP	Citrate
	–	+	+	+	–	–

+ = الاختبار موجب – = الاختبار سالب

بعدها تم أستخدام طريقة API_20E التي تعتبر واحدة من الطرق الحديثة في تشخيص البكتريا وكانت متطابقة مع طريقة الأختبارات الكيموحيوية وتم التأكد من أن جميع العزلات تعود الى بكتريا أشريشيا القولون كما في الملحق رقم 1 والملحق رقم 2.

4- 6- 4 الفحوصات الكيموحيوية بإستخدام جهاز VITEK 2 Compact GN

أُجري الفحص التأكيدي للعزلات الجرثومية بأستخدام جهاز VITEK2 Compact GN من شركة Biomeriux الفرنسية والموجود في مستشفى البتول التعليمي (شعبة البكتريولجي) الذي يعطي نتائج تشخيصية بحيث تصل نسبة دقة التشخيص بهذا الجهاز إلى 99% نظراً لكون النظام يتضمن أجراء العديد من الفحوصات الكيموحيوية التأكيدية لتشخيص البكتريا كما تُعد طريقة التشخيص في جهاز VITEK 2 سريعة واقل جهد من الاختبارات الكيموحيوية الشائعة (Alhasan,2012; Pincus, 2011) , و تبيّن أن جميع العزلات تعود الى بكتريا أشريشيا القولون , وكما في جدول (4- 9) والملحق رقم 3 والملحق رقم 4.

جدول (4- 9) نتائج الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص عزلات بكتريا أشريشيا القولون في جهاز ViTEK2.

نوع الأختبار	النتيجة	نوع الأختبار	النتيجة	نوع الأختبار	النتيجة
APPA	-	BXYL	_	SUCT	+
ADO	-	BALap	_	NAGA	_
PyrA	-	ProA	_	AGAL	+
IARL	-	LIP	_	PHOS	_
Dcel	-	PLE	_	GLYA	_
BGAL	+	TYrA	_	ODC	+
H2S	-	URE	_	LDC	+
BNAG	-	Dsor	+	IHISa	_
AGLTp	-	SAC	+	CMT	+
Dglu	+	Dtag	_	BGUR	+

+	O129R	+	Dtre	-	GGT
_	GGAA	_	CIT	+	OFF
_	IMLTa	_	MNT	-	BGLU
_	ELLM	+	5KG	+	Dmal
_	ILATa	+	ILATK	+	Dman
		_	AGLU	+	Dmne

+ الاختبار موجب - الاختبار سالب

4 -7 عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus*

Isolation and Identification of *Lactobacillus*

جُمعت 20 عينة براز لأطفال بعمر أيام ورضاعتهم طبيعية و35 مسحة مهبلية من مستشفى البتول التعليمي , تمَّ عزل 3 عزلات بكتيرية (15%) من مجموع عينات البراز و4 عزلات بكتيرية (11.4%) من مجموع المسحات المهبلية , وزرعت على وسط MRS agar حيث لوحظ نمو لأنواع مختلفة من الأحياء المجهرية فضلاً عن وجود الخمائر لذا تم تنقية المستعمرات لعدة مرات للحصول على عزلات بكتيرية نقية .

أظهرت النتائج أن نسبة عزل بكتريا *Lactobacillus* من براز الأطفال الرضع هي 15% وبفارق أحصائي معنوي عالي جداً P=0.001 وكما في الجدول (4-10) , أتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحثين (Gayathri and Asha ,2012) حيث بلغت نسبة عزل هذه البكتريا 14% , وأتفقت أيضا مع ما توصل (حسن وأخرون., 2008) حيث بلغت نسبة عزلها 13.4% في حين لم تتفق مع ماتوصل اليه الباحثان(حكمت وعيسى, 2013) اذ بلغت نسبة عزلها % 52.

جدول (4−10) الأعداد والنسب المئوية لبكتريا *Lactobacillus* المعزولة من براز الاطفال الرضع.

أنواع البكتريا	العدد	النسبة المئوية
Lactobacillus	3	15
الانواع الأخرى	17	85
المجموع	20	100
X^2	**9.88**	
P	**0.001[S]**	

كما أظهرت النتائج أن نسبة عزل بكتريا *Lactobacillus* من المسحات المهبلية المأخوذة من جدار المهبل هي 11.4% وبفارق أحصائي معنوي عالي جداً P=0.001 وكما في الجدول (4_11), أتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحثين (Ali and Hindal, 2015) حيث بلغت نسبة عزلها 12 % , ولم تتفق مع ما توصل اليه (Amin *et al.*, 2011) , ولم تتفق ايضاً مع ماتوصل اليه (العاني, 2000) حيث بلغت نسبة عزلها 49.51% , 52% على التوالي.

جدول (4_11) يوضع الأعداد والنسب المئوية لبكتريا *Lactobacillus* المعزولة من جدار المهبل

أنواع البكتريا	العدد	النسبة المئوية
Lactobacillus	4	11.40
الانواع الأخرى	31	88.60
المجموع	35	100
X^2	**20.82**	
P	**0.001[S]**	

4 – 8 التشخيص البكتيري Bacterial Identification

4 – 8 – 1 الصفات الزرعية Colonies Morphology

اظهرت العزلات قيد الدراسة عند تنميتها على وسط MRS agar مستعمرات دائرية رمادية اللون لماعة وتميل للزوجة وتكون المستعمرات ضمن حدود التخطيط فقط بالنظر لكون البكتريا غير متحركة.

شكل (4_1) مستعمرات بكتريا *Lactobacillus* على وسط MRS Agar

4_8_2 الفحص المجهري Microscopic Examination

عند فحص هذه البكتريا تحت المجهر الضوئي لوحظ أنها عصوية الشكل ، موجبة لصبغة غرام ، تكون بهيئة عصيات مفردة او بشكل سلاسل قصيرة وهذا يتفق مع مااكد عليه كل من الباحثين (السعدي ،2010 ; الطائي،2011).

4 –8 – 3 الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests

أجريت الأختبارات الكيموحيوية على العزلات النقية التي تم عزلها على وسط MRS agar بأعتباره وسط أنتقائي لعزل بكتريا *Lactobacillus* وبعد أجراء الأختبارات الكيموحيوية التشخيصية لهذه البكتريا لوحظ أنها موجبة لصبغة كرام , سالبة لأختبار الكتاليز , الأوكسديز , الاندول , أستهلاك السترات واليوريز, غير متحركة وغير محللة للجلاتين وكما في الجدول (4–12) وهذه النتائج توافقت مع نتائج الباحثين (العبدلي، 2005) و(احمد، 2008).

جدول (4_12) الفحوصات الكيموحيوية لعزلات بكتريا *Lactobacillus*

Biochemical tests							
Gelatine Liquification test	Motility	Citrate	Urea	Indol	Catalase	Oxidase	***Lactobacillus***
-	-	-	-	-	-	-	النتيجة

4 -8 -4 أختبار تخمر السكريات Carbohydrate fermentation

أجري أختبار تخمر السكريات للعزلات البكترية النامية على وسط MRS Agar لمعرفة قدرة البكتريا على تخميرها .

الجدول(4_ 13) أختبار تخمر السكريات الخاصة ببكتريا *Lactobacillus*

نوع السكر	نتيجة الاختبار
Maltose	+
Lactose	+
Sucrose	+
Glucose	+
Arabinose	-
Sorbitole	-

+ الاختبار موجب , - الاختبار سالب

4 – 8 -5 تأثير ألاس الهيدروجيني pH على نمو بكتريا *lactobacillus*

يعد الرقم الهيدروجيني من العوامل المهمة والمؤثرة على نمو هذه البكتريا حيث لوحظ من خلال هذه الدراسة ان لهذه البكتريا قابلية على النمو في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني pH حيث يتراوح بين (7-4) ولكن الرقم الهيدروجيني الامثل لنمو هذه البكتريا يكون عند pH=6.5 ولم تنمو هذه البكتريا عند أرتفاع الأس الهيدروجيني الى 8 , وهذه النتيجة جاءت متفقة مع نتائج (Dumbrepatil *et al.*, 2008) وأتفقت أيضا مع نتيجة(Pyar and Peh, 2014).

قد أشار الباحث Walter وزملاؤه عام 2004 أن مدى الأس الهيدروجيني لهذه البكتريا يتراوح بين (4.3_6.4) وهذا يعني أن لهذه البكتريا القدرة على النمو في الظروف الحامضية ولكن قيم الأس الهيدروجيني المرتفعة تؤثر في نموها (Walter *et al.*, 2004).

4 -8 - 6 أختبار تحمل كلوريد الصوديوم NaCL tolerance test

تبيّن من خلال هذه الدراسة أن عزلات بكتريا *Lactobacillus* القابلية على النمو في تراكيز مختلفة من محلول كلوريد الصوديوم , ولكن عندما أرتفع التركيز لوحظ أنخفاض كبير في نموها حيث أنها لم تنمو في التركيزين 9% ,8% , أتفقت هذه النتيجة مع الباحثين (Elizete and Carlos, 2005) حيث وجد أن لها القدرة على النمو في التراكيز (2_7%) ولم تتفق مع نتائج الباحث (العمري، 2008) حيث وجد من خلال دراسته أن التركيز 4.5-5.5) من كلوريد الصوديوم يثبط نمو بكتريا *Lactobacillus* .

4-8 - 7 أختبار تحمل الفينول phenol tolerance test

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن بكتريا *Lactobacillus* قابلية على النمو في تركيز 0.4% من الفينول حيث أظهرت خمسة عزلات من أصل سبعة قابلية على النمو في وجود الفينول الذي يعد من المواد المثبطة لنمو البكتريا , وهذه النتيجة أتفقت مع (Elizete and Carlos, 2005) و(Chakraborty and Bhowal, 2015) .

4- 8-8 أختبار تحمل أملاح الصفراء Bile salts Tolerance test

تعد المقاومة لأملاح الصفراء من المعايير المهمة في أختيار الأحياء المجهرية المستخدمة كمعززات الحيوية , حيث يحفز وصول الطعام الى الأثني عشري أفراز هرمون cholecystokinin المسؤول عن أفراز أملاح الصفراء من المرارة وبالتالي تعرض النبيت الطبيعي في القناة المعوية لأملاح الصفراء مما يؤدي الى قتل الأحياء المجهرية الحساسة وبقاء المقاومة (sanders, 1999).

تبيّن من خلال هذه الدراسة أن لعزلات بكتريا *Lactobacillus* القابلية على المحافظة على نموها بشكل جيد في التركيزين (0.2%,4%) من أملاح الصفراء وخاصة العزلات LB1, LB2, (LA7) بينما أظهرت العزلات الأخرى أنخفاض ملحوظ في نموها عند زيادة التركيز الى 0.4%

وهذه النتيجة توافقت مع (Pyar and Peh, 2014) , وتوافقت أيضا مع نتيجة Sahadeva (*et al.*, 2011) حيث لوحظ نمو جيد لبكتريا *Lactobacillus* في تركيز 0.2%, 0.1%) (0.3%,ولكن عند زيادة التركيز الى 2% لوحظ أنخفاض كبير في نمو هذه البكتريا, ولم تتفق مع نتيجة الباحثين (نصيف وميرزة, 2013) حيث لوحظ أنخفاض ملحوظ في نمو هذه البكتريا خاصة عند زيادة التركيز الى (0.4%, 0.3%).

4 – 9 عوامل الضراوة لبكتريا أشريشيا القولون Virulance factors of *E.coli*

للبكتريوسين أهمية كبيرة من الناحية الطبية حيث ينتج من قبل البكتريا غير المرضية التي تستوطن جسم الانسان بصورة طبيعية , وأن فقدان هذه البكتريا يسمح للبكتريا الأنتهازية من غزو جسم الانسان وأحداث الأصابة (Farkas and Himsley, 1985).

وعلاوة على ذلك هناك أدلة متزايدة تشير الى أن البكتريوسين يعتبر من العناصر الهامة في البيئة البكتيرية حيث تبيّن أن له تأثير على البكتريا المرضية فيعمل كمعزز حيوي (Crusinol *et al*., 2006).

وتبيّن من خلال هذه الدراسة أن لبكتريا أشريشيا القولون المعزولة من براز الأطفال الرضع منتجة للبكتريوسين بنسبة 4% وهذه النسبة قليلة جداً لكون البكتريا المعزولة مرضية والبكتريوسين ينتج من قبل البكتريا غير المرضية , تختلف تسمية البكتريوسين تبعا للبكتريا المنتجة له حيث يسمى البكتريوسين الذي تنتجه بكتريا أشريشيا القولون بالColicin (Sarika *et al.*,2010).

أن أختلاف نسبة العزلات المنتجة للبكتريوسين بين دراسة وأخرى يعتمد على عزلات الأختبار بصورة أساسية فقد تكون عزلات الأختبار متحسسة لنوع معين من البكتريوسين لكن أظهار الفعالية القاتلة له يعزى الى أفتقارها للمستقبلات الخاصة بنقله أو ينتج بكميات قليلة لا تمكنه من قتل الخلايا الحساسة , كما وتمتلك البكتريا المنتجة للبكتريوسين مناعة ضد البكتريوسين المنتج من قبلها(Cursino *et al*., 2002).

ويرتبط أنتاج الهيمولايسين مع أمراضية بكتريا أشريشيا القولون وخاصة في حالات الأصابات الشديدة (Sharma *et al*., 2007) , حيث لوحظ من خلال هذه الدراسة أن بكتريا أشريشيا القولون منتجة للهيمولايسين بنسبة 96% وبفارق احصائي معنوي عالي جداً (P=0.001) وكما في الجدول (4_14), حيث تظهر منطقة ذات لون اخضر حول المستعمرة ويطلق على هذا

النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع الفا , يعمل هذا النوع من التحلل على أحداث ثقب بالغشاء الخلوي لخلايا الدم الحمر(Han *et al*., 2010).

أتفقت هذه النتيجة مع نتيجة (HAQUE *et al*.,1994) حيث بلغت نسبة العزلات المنتجة للهيمولايسين 85% وأتفقت هذه النتيجة أيضاً مع نتيجة (SHERMAN *et al*.,1909) حيث بلغت نسبة العزلات المنتجة للهيمولايسين 90% .

جدول (4 – 14) يوضح النسبة المئوية لعزلات بكتريا أشريشيا القولون المنتجة للهيمولايسين والبكتريوسين.

عامل الضراوة	عدد عزلات بكتريا E.coli المنتجة	النسبة المئوية للعزلات المنتجة
أنتاج الهيمولايسين	48	96%
أنتاج البكتريوسين	2	4%
العدد الكلي	50	100%
X^2	**42.33**	
P	**0.001[S]**	

4-10 حساسية بكتريا أشريشيا القولون للمضادات الحيوية
Sensitivity Test of E.coli to Antibiotics

أُستخدمت طريقة الاقراص Kirby – Bauer لجميع العزلات قيد الدراسة لخمسة عشر مضاداً حيوياً معظمها من الانواع الشائعة الاستخدام لعلاج حالات الأسهال لدى الاطفال الرضع ومعرفة نوع الاستجابة من خلال قياس قطر منطقة التثبيط حول قرص المضاد الحيوي المستخدم و قورنت النتائج حسب ماورد في (CLSI ,2014) .

بلغت نسبة مقاومة عزلات بكتريا أشريشيا القولون لمضاد Chloramphenicol 18%, وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد بلغت 20% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 62% أتفقت هذه النتيجة مع (Amaya *et al*., 2011) في نيجيريا حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 17.5% , ولم تتفق مع نتيجة (Chellapandi *et al*., 2017) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 48.3%.

اظهرت نتائج إختبار حساسية عزلات بكتريا أشريشيا القولون لمضاد Amikacin مقاومة لهذا المضاد بنسبة 12%, وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد بلغت 18% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 70% , تقاربت هذه النتيجة مع نتيجة الباحث تركي وزملاؤه عام 2012 حيث بلغت نسبة الحساسية لهذا المضاد 80% (تركي واخرون., 2012), أتفقت هذه النتيجة مع (Rajeshwari *et al.*, 2015) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 12.5%.

بلغت نسبة مقاومة عزلات بكتريا أشريشيا القولون لمضاد Cefixime 88%, وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد بلغت 6% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 6% , تقاربت هذه النتيجة مع نتيجة الباحث تركي وزملاؤه عام 2012 حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 100% (تركي واخرون., 2012) وأتفقت مع نتيجة (Chellapandi *et al.*, 2017) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 80%.

بينت نتائج إختبار الحساسية لمضاد Cefuroxime أن نسبة مقاومة عزلات بكتريا أشريشيا القولون لهذا المضاد 90% , وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد Cefuroxime 4%, اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها Cefuroxime 6% لم تتفق هذه النتيجة مع (Nguyen *et al.*, 2005) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 29.6% .

كانت نتائج اختبار حساسية العزلات لمضاد Ceftriaxone هي مقاومة بكتريا أشريشيا القولون لهذا المضاد بنسبة 84%, وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد بلغت 10% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 6% , لم تتفق مع نتيجة الباحث (Rajeshwari*et al.*, 2015) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد70% ولم تتفق أيضا مع نتيجة (Roy *et al.*, 2013) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 10.7%.

بلغت نسبة مقاومة عزلات بكتريا أشريشيا القولون لمضاد Cefoxitin 12% , وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 10% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 78% , لم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة (Zeng *et al.*, 2016) في الصين حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 57.7% وأتفقت مع نتيجة (Aslani *et al.*, 2011) حيث بلغت نسبة العزلات الحساسة لهذا المضاد78.6%.

بينت نتائج إختبار الحساسية لمضاد Gentamycin أن عزلات بكتريا أشريشيا القولون مقاومة لهذا المضاد بنسبة 26% , وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 10% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 64% , وأتفقت هذه النتيجة مع نتيجة الباحث (Rajeshwari *et al.*, 2015) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 25.5% , ولم تتفق مع نتيجة (Roy *et al.*, 2013) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 85.7%.

بلغت نسبة مقاومة عزلات بكتريا أشريشيا القولون لمضاد Augmentin 20%, وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 26% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 54%, أتفقت هذه النتيجة مع (Cho *et al.*, 2011) حيث بلغت نسبة المقاومة 22.3% , ولم تتفق مع نتيجة (AL_Dulaimi *et al.*,2015) حيث بلغت نسبة المقاومة 70%.

اظهرت نتائج إختبار حساسية عزلات بكتريا أشريشيا القولون لمضاد Piperacillin مقاومة بنسبة 16%, وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 14% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 70% , لم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة Garcia وزملاؤه عام2011 حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 0% (Garcia *et al.*, 2011) , ولم تتفق أيضا مع (Cho *et al.*, 2011) حيث بلغت نسبة المقاومة 0.9%.

بلغت نسبة مقاومة عزلات بكتريا أشريشيا القولون لمضاد Ticarcillin 98%, وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 0% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 2% أتفقت هذه النتيجة مع نتيجة (BARRY *et al.*, 1993) أذ بلغت نسبة حساسية عزلات بكتريا *Escherichia coli* لهذا المضاد 3%.

بينت نتائج إختبار الحساسية لمضاد Meropenem عدم ظهور أي عزلة من عزلات بكتريا أشريشيا القولون مقاومة لهذا المضاد , وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 8% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 92% , أتفقت هذه النتيجة مع نتيجة الباحث تركي وزملاؤه عام 2012 حيث بلغت نسبة الحساسية لهذا المضاد 100% (تركي واخرون., 2012).

بلغت نسبة مقاومة عزلات بكتريا أشريشيا القولون لمضاد Ampicillin_ Sulbactam 24%, وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 20% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 56% لم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة (Ochoa *et al.*, 2009) حيث بلغت

نسبة المقاومة لهذا المضاد 85% , ولم تتفق مع (Amaya *et al.*, 2011) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد60%.

بلغت نسبة مقاومة عزلات بكتريا أشريشيا القولون لمضاد Doxycycline 30% , وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 12% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 58% , لم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة (Chellapandi *et al.*, 2017) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 41.4% .

بينت نتائج إختبار الحساسية لمضاد Tetracycline أن بكتريا أشريشيا القولون مقاومة لهذا المضاد بنسبة 56% , وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 0% , اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 44% , حيث تقاربت هذه النتيجة مع نتيجة الباحث Ochoa عام 2009 فبلغت نسبة مقاومة بكتريا أشريشيا القولون لهذا المضاد 65% (Ochoa *et al.*, 2009) , أتفقت هذه النتيجة مع نتيجة (Zeng *et al.*, 2016) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 56.8%.

بلغت نسبة مقاومة عزلات بكتريا أشريشيا القولون لمضاد Ciprofloxacin 20% , وأن نسبة العزلات متوسطة الحساسية بلغت 24% , أما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 56% , لم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة (Rajeshwari *et al.*, 2015) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 72.5%, ولم تتفق أيضا مع نتيجة (Aslani *et al.*, 2011) حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 42.9%.

جدول (4_ 15) حساسية بكتريا أشريشيا القولون للمضادات الحيوية قيد الدراسة.

	عدد العزلات (%)		
المضاد	مقاومة	متوسطة الحساسية	حساسة
Chloramphenicol	(18) 9	(20) 10	(62) 31
Amikacin	(12) 6	(18) 9	(70) 35
Cefixime	(88) 44	(6) 3	(6) 3
Cefuroxime	(90) 45	(4) 2	(6) 3
Ceftriaxone	(84) 42	(10) 5	(6) 3
Cefoxitin	(12) 6	(10) 5	(78) 39
Ciprofloxacin	(20) 10	(24) 12	(56) 28
Gentamycin	(26) 13	(10) 5	(64) 32
Augmentin	(20) 10	(26) 13	(54) 27
Piperacillin	(16) 8	(14) 7	(70) 35
Ticarcillin	(98) 49	(0) 0	(2) 1
Meropenem	(0)0	(8) 4	(92) 46
Ampicillin_ Sulbactam	(24) 12	(20) 10	(56) 28
Doxycycline	(30) 15	(12) 6	(58) 29
Tetracycline	(56) 28	(0)0	(44) 22
X^2	**402.46**	**74.67**	**247.47**
P	**0.001[S]**	**0.001[S]**	**0.001[S]**

4_11 تحديد التركيز المثبط الأدنى Determination of Minimal Inhibitory Concentration

خضعت 15 عزلة لإختبار تحديد التركيز المثبط الادنى Minimal inhibitory concentration للمضادات الحيوية التالية Cefixime , Cefuroxime , Ceftriaxone و Tetracyclineوحُددَ MIC بطريقة التراكيز المتسلسلة المتضاعفة في وسط مولر هنتون الصلب لإجراء هذا الإختبار، كون مكونات الوسط المستعمل تعد من العوامل المؤثرة على نتائج قيم MIC المحسوبة , لذلك يفضل إستخدام وسط مولر هنتون الصلب لإحتوائه على كمية قليلة من كلوريد الصوديوم، ونسب قليلة من أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم (Stocks & Ridgway,1987) ، كذلك حُددت نتائج هذهِ العزلات كونها حساسة او مقاومة إعتماداً على

نقطة التوقف Break Point المُثبتة في (CLSI,2014) كأساس لحساب الإستجابة وتعرف بإنها التركيز الامثل الذي يمكن أن يصلهُ المضاد في المصل بحيث يوفر أعلى حد للمعالجة.

أظهرت النتائج المبينة في جدول (4_16) الى إنّ قيم التراكيز المثبطة الدنيا لمضاد Cefixime تراوحت بين 32 _512 مايكروغرام/مل وبفارق أحصائي معنوي عالي جداً 0.001 , حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 88% لم تتفق هذه النتيجة مع (Javadian *et al*., 2014) إذ تراوحت قيم MIC لهذا المضاد (4_256) مايكروغرام/مل.

أما بالنسبة لمضاد Cefuroxime فقد تراوحت قيم MIC له من 32_1024 مايكروغرام/مل ولم يكن هناك فارق أحصائي معنوي , حيث بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 90% لم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة (Bookstaver *et al*., 2014) إذ تراوحت قيم MIC لهذا المضاد (4_32) مايكروغرام/مل.

أما بالنسبة لمضاد Ceftriaxone فقد تراوحت قيم MIC له من 32_ 1024 مايكروغرام/مل وبفارق أحصائي معنوي عالي جداً P=0.001 , لم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة (Sharma and Ul Haq, 2012) إذ تراوحت قيم MIC (4_8) مايكروغرام/مل.

ومضاد Tetracycline فقد تراوحت قيم MIC له من 16_512 مايكروغرام/مل وبفارق أحصائي معنوي عالي 0.01 , لم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة (Migliore *et al*., 2013) إذ بلغت قيم MIC لهذا المضاد 4 مايكروغرام/مل , وتقاربت هذه النتيجة مع نتيجة (Wang *et al*., 2014) إذ تراوحت قيم MIC من 32_512 مايكروغرام/مل.

جدول (4_16) قيم التركيز المثبط الادنى لمضادات Cefixime , Cefuroxime , Tetracycline , Ceftriaxone.

المضاد الحيوي / نقطة التوقف (مايكروغرام / مل)				
T	CRO	CXM	CFM	ت/ نقطة التوقف
≥ 16	**≥ 4**	**≥ 32**	**≥ 4**	
64	256	1024	512	1
64	512	32	256	2
32	64	256	512	3
32	256	32	512	4
64	256	32	512	5
64	256	32	256	6
64	256	128	64	7
512	1024	128	64	8
512	32	512	128	9
32	512	512	32	10
32	512	512	256	11
16	512	256	512	12
512	512	128	128	13
64	512	512	128	14
128	64	1024	512	15
146.13 ±191.13	369.06 ± 336.19	341.33± 336.19	292.26 ±197.58	mean ± SD
2.99	**5.62**	**3.77**	**5.33**	**T test**
0.01[S]	**0.001[S]**	**0.002[NS]**	**0.001[S]**	**P**

4_12 الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية Inhibition Activity of Plant Extract

4_ 12_1 مستخلص نبات الرمان *Punica granatum* extracts

تبيّن من خلال هذه الدراسة تفوق المستخلص الكحولي لقشرة نبات الرمان على المستخلصات المائية بنوعيها (المستخلص المائي الحار والمستخلص المائي البارد) في تثبيط نمو بكتريا أشريشيا القولون حيث بلغت أعلى فعالية تثبيطية للمستخلص الكحولي 21.92 ملم عند تركيز 100 ملغم/مل وأقل فعالية تثبيطية 4.86 ملم عند تركيز 20 ملغم/مل أما بالنسبة للمستخلصات المائية (المستخلص المائي الحار والبارد) فبلغت الفعالية التثبيطية 18.02 و 14.02 ملم على التوالي عند تركيز 100 ملغم /مل وأقل فعالية تثبيطية عند تركيز 20 ملغم/مل حيث بلغت الفعالية التثبيطية المستخلصات المائية (المستخلص المائي الحار والبارد) عند هذا التركيز 2.11 و0 ملم على التوالي , ولوحظ وجود فروق معنوية في قيم أقطار التثبيط للمستخلصات الكحولية والمائية عند التراكيز (20 , 40, 60, 80 ,100) ملغم /مل لهذا المستخلص وتبيّن من خلال هذه الدراسة أن العلاقة طردية بين تركيز المستخلص النباتي والفعل التثبيطي له فبزيادة تركيز المستخلص تزداد حساسية البكتريا له وكما في الجدول (4 _17).

أتفقت هذه النتيجة مع نتيجة (Nuamsetti *et al.*, 2012) حيث بينت نتائج دراستهم تفوق المستخلص الكحولي لقشرة نبات الرمان على المستخلصات المائية بنوعيها (المستخلص المائي الحار والبارد) من حيث الفعالية التثبيطية ضد بكتريا أشريشيا القولون, وأتفقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه (Odunbaku and Askidi, 2012) حيث درس الفعالية التثبيطية لقشور نبات الرمان ضد أربعة عزلات بكتيرية اذ أظهرت نتائجه ان مستخلصات نبات الرمان أبدت فعالية تثبيطبية عالية تجاه بكتريا *Escherichia coli* وان المستخلص الكحولي عند تركيز 100ملغم/ مل تفوق على المستخلصات المائية من حيث فعاليته التثبيطية.

ولم تتفق هذه النتيجة مع نتيجة الباحث الجميلي عام 2000 أشارت نتيجة دراسته أن أعلى فعالية تثبيطية كانت للمستخلصات المائية ضد بكتريا أشريشيا مفسراً ذلك الى تأثير المذيب الكحولي على المركبات الكيمياوية لقشرة نبات الرمان مما يؤدي الى فقدان الفعالية في التأثير التثبيطي ضد البكتريا (الجميلي, 2000).

ويعود سبب الفعالية التثبيطية لهذا المستخلص على نمو بكتريا أشريشيا القولون الى المكونات الكيميائية التي يحتويها هذا النبات اذ تحتوي قشور نبات الرمان على المواد العفصية Tannine

التي تؤثر على طبيعة البروتينات في البكتريا أو ربما تؤثر على الغشاء البلازمي فتغير خواصه الوظيفية فتؤدي الى تثبيط نمو البكتريا (Seeram *et al*., 2005).

جدول(4_ 17) معدل أقطار منطقة التثبيط للتراكيز المستخدمة في الدراسة لمستخلص نبات الرمان.

التركيز ملغم / مل					
مستخلص نبات الرمان	**20**	**40**	**60**	**80**	**100**
الكحولي	4.86	8.78	13.26	16.32	21.92
مائي حار	2.11	6.96	11.78	14.96	18.02
مائي بارد	0	1.12	5.66	10.54	14.02

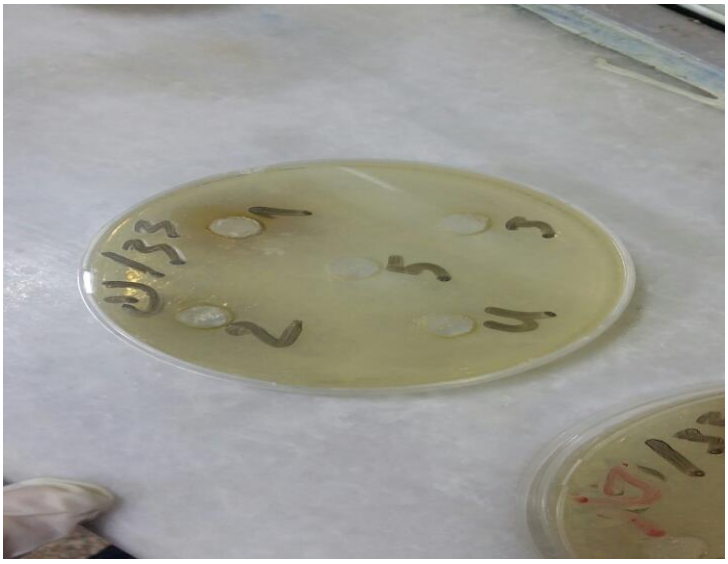
شكل (4-2) التأثير التثبيطي لمستخلص نبات الرمان على بكتريا أشريشيا القولون المسببة للأسهال في الأطفال الرضع.

4_12_2 مستخلص نبات الزعتر *Thymus vulgaris* extract

تبيّن من خلال هذه الدراسة أن المستخلص الكحولي لنبات الزعتر له فعالية تثبيطية أعلى من المستخلصات المائية بنوعيها (المستخلص المائي الحار والمستخلص المائي البارد) في تثبيط نمو البكتريا خصوصاًعند تركيز 100 ملغم/مل حيث بلغت الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي عند هذا التركيز 11.3 ملم , أما المستخلصات المائية (المستخلص المائي الحار والبارد) فبلغت الفعالية التثبيطية عند هذا التركيز 9.8 و3.22 ملم على التوالي , ولوحظ عدم وجود فعالية تثبيطية للمستخلصات الكحولية والمائية عند تركيز 20 ملغم/ مل, وتبيّن عدم وجود فروق معنوية للمستخلصات المائية والكحولية في تثبيط نمو البكتريا عند التراكيز (20 , 40 , 60 , 80 , 100) ملغم/ مل وكما في الجدول (4_18) , أتفقت هذه النتيجة مع نتيجة الباحثان Hassanshahian وMohsenipour عام 2012 في أيران حيث تبيّن من خلال دراسته أن الفعالية التثبيطية للمستخلص ضد بكتريا أشريشيا القولون واطئة بينما له فعالية عالية ضد الانواع الاخرى من البكتريا المدروسة (Mohsenipour and Hassanshahian, 2012), ولم تتفق مع (Al-Muhna, 2010) أظهر المستخلص المائي أعلى فعالية مثبطة لنمو البكتريا مقارنة بالمستخلص الكحولي , إذ أعطى نطاق تثبّيط تراوحت أقطاره بين 16_24 ملم.

جدول(4 – 18) معدل أقطار منطقة التثبيط للتراكيز المستخدمة في الدراسة لمستخلص نبات الرمان.

التركيز ملغم/ مل					
مستخلص نبات الزعتر	**20**	**40**	**60**	**80**	**100**
الكحولي	0	0	2.74	7.1	11.3
مائي حار	0	0	0	4	9.8
مائي بارد	0	0	0	0	3.22



شكل (4_3) التأثير التثبيطي لمستخلص نبات الزعتر على بكتريا أشريشيا القولون .

ومن مقارنة نتائج التأثير التثبيطي للمستخلصات النباتية الرمان والزعتر أوضحت النتائج تفوق الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات الرمان في تثبيط نمو بكتريا أشريشيا القولون على الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات الزعتر كما في الجدول (4_ 23) , حيث بلغت الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات الرمان عند تركيز 100 ملغم / مل 21.92 ملم والفعالية التثبيطية لمستخلص نبات الزعتر عند هذا التركيز 11.3 ملم , أما عند تركيز 20 ملغم/ مل فبلغت الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات الرمان والزعتر 4.86 , 0 على التوالي حيث لوحظ وجود فروق معنوية بين التراكيز (20 , 40 , 60 , 80 , 100) ملغم/ مل من حيث قابليتها على تثبيط نمو بكتريا أشريشيا القولون.

كما بينت النتائج أن للمستخلص المائي الحار لنبات الرمان له فعالية تثبيطية أعلى من المستخلص المائي الحار لنبات الزعتر حيث بلغت الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات الرمان والزعتر عند تركيز 100 ملغم / مل 18.02 و 9.8 ملم على التوالي , أما عند تركيز 20 ملغم / مل فبلغت الفعالية التثبيطية لمستخلصي الرمان والزعتر 2.11 و 0 ملم على التوالي حيث لوحظ وجود فروق معنوية بين الفعالية التثبيطية لهذين النباتين وبين التراكيز المختلفة لهما.

ولوحظ من خلال هذه الدراسة أن المستخلص المائي البارد لنبات الرمان له فعالية تثبيطة أعلى من المستخلص المائي البارد لنبات الزعتر حيث بلغت الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات الرمان عند تركيز 100 ملغم / مل 14.02 ملم , ومستخلص نبات الزعتر عند هذا التركيز 3.22 ملم , أما في تركيز 20 ملغم / مل لم يظهر أي فعل تثبيطي لهذين النباتين ولوحظ وجود فروق

معنوية للتراكيز المختلفة للمستخلص المائي لنبات الرمان , أما نبات الزعتر فلم يوجد فرق معنوي بين تراكيزه المستخدمة في هذه الدراسة .

جدول (4–19) مقارنة بين فعالية مستخلصات نبات الرمان والزعتر من حيث الفعالية التثبيطية

		التركيز ملغم / مل					
المستخلص	النبات	20	40	60	80	100
الكحولي	الرمان	4.86^{d}	8.78^{c}	13.26^{b} A	16.32^{b} A	21.92^{a} A
	الزعتر	0	0	2.74^{c} B	7.1^{b} B	11.3^{a} B
ماء حار	الرمان	2.11^{d}	6.96^{c}	11.78^{b}	14.96^{a} A	18.02^{a} A
	الزعتر	0	0	0	4^{b} B	9.8^{a} B
ماء بارد	الرمان	0	1.12^{d}	5.66^{c}	10.54^{b}	14.02^{a} A
	الزعتر	0	0	0	0	3.22 B

*الحروف الصغيرة تستخدم للمقارنة بصورة افقية بين المتغيرات.
*الحروف الكبيرة تستخدم للمقارنة بصورة عمودية بين المتغيرات.
*الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية بين المتغيرات.
*استخدم اختبار دنكن للمقارنة بين المتوسطات .

13_4 تأثير بكتريا *Lactobacillus* على بكتريا *Escherichia Coli*

أشارت العديد من الدراسات أن لبكتريا *Lactobacillus* المعزولة من البراز قابلية على تحمل العصارة المعدية والظروف البيئية المعوية التي تمكنها من عبور القناة الهضمية والوصول الى الأمعاء حيث أكتسبت صفة التحمل من البيئة التي تعيش فيها هذه البكتريا (Naida *et al.*,1999).

في هذه الدراسة تم أختبار قابلية تحمل بكتريا *Lactobacillus* لعدة عوامل وتبين أن عزلة LA7 المعزولة من براز الأطفال الرضع قابلية على تحمل مدى وأسع من pH كما أن لها قابلية على تحمل تراكيز مختلفة من أملاح الصفراء لذا أستخدمت كمعزز حيوي لمعرفة تأثيرها التثبيطي على بكتريا أشريشيا القولون.

فتبيّن من خلال هذه الدراسة أن بكتريا *Lactobacillus* لها فعالية تثبيطية عالية على بكتريا أشريشا القولون حيث بلغ أعلى قطر تثبيطي 26 ملم واقل قطر تثبيطي 16 ملم, أما معدل قطر منطقة التثبيط لبكتريا *Lactobacillus* على50 عزلة من بكتريا أشريشيا القولون بلغ 22.82 ملم.

تعود الفعالية التثبيطية لبكتريا *Lactobacillus* الى أنتاجها لمادة البكتريوسين الذي يعمل بمثابة مضاد حيوي (June *et al*.,2001). وفضلاً عن ذلك ان بكتريا *L.acidophilus* تنتج حامض عضوي الذي هو حامض اللاكتيك والذي يعمل بدوره على خفض الرقم الهيدروجيني في بيئة التفاعل مؤدياً في النهاية الى تثبيط نمو بكتريا المرضية (Mercenie *et al*., 2000)، ومن العوامل الاخرى التي تزيد من القابلية التثبيطية لبكتريا *L.acidophilus* عدم امتلاك هذه البكتريا لانزيم Catalase وبالتالي يتجمع بيروكسيد الهيدروجين في وسط التفاعل مؤدياً في النهاية الى تثبيط نمو البكتريا ، فضلاً عن غاز ثنائي اوكسيد الكاربون الذي تنتجه بكتريا حامض اللاكتيك من خلال تخمرها للسكريات والذي يسهم بدوره في تثبط نمو البكتريا المرضية (العبيدي، 2006).

أتفقت نتيجة هذه الدراسة مع نتيجة (نصيف وميرزة, 2013) حيث بلغ مدى قطر منطقة التثبيط لبكتريا *Lactobacillus* على بكتريا أشريشيا القولون (14_ 25) ملم , ولم تتفق مع (Asha and Gayathria, 2012) حيث بلغ مدى قطر منطقة التثبيط (30_37) ملم.
كما أكدت دراسة (القصاب, 1992) أن لبكتريا *Lactobacillus* المعزلة من براز الأطفال الرضع فعالية تثبيطية ضد بكتريا *Escherichia coli* المسببة للأسهال بدرجات مختلفة وأظهرت النتائج تفوق بكتريا حامض اللاكتيك على بكتريا *Escherichia coli* .

شكل (4_4) التأثير التثبيطي لبكتريا *Lactobacillus* على بكتريا أشريشيا القولون.

4_ 14 مقارنة بين التأثير التثبيطي للمستخلصات النباتية المستخدمة في الدراسة وبكتريا Lactobacillus

تبيّن من خلال هذه الدراسة تفوق بكتريا *Lactobacillus* على المستخلصات النباتية من حيث قابليتها على تثبيط بكتريا أشريشيا القولون المعزولة من براز الأطفال الرضع حيث بلغ معدل قطر منطقة التثبيط لبكتريا *Lactobacillus* 22.82 ملم مقارنة بالتأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي والمائي الحار والبارد لنبات الرمان عند تركيز 100 ملغم / مل حيث بلغ معدل قطر منطقة التثبيط عند هذا التركيز 21.92 , 18.02 , 14.02 ملم على التوالي , كما لوحظ وجود فروقات معنوية بين التأثير التثبيطي لبكتريا *Lactobacillus* والتراكيز الأخرى لمستخلص قشور الرمان بانواعها (المستخلص الكحولي, المائي الحار والبارد).

كما تبيّن من خلال هذه الدراسة تفوق التأثير التثبيطي لبكتريا *Lactobacillus* على مستخلص أوراق نبات الزعتر من حيث الفعالية التثبيطية حيث بلغ معدل قطر منطقة التثبيط لبكتريا *Lactobacillus* 22.82 ملم مقارنة بالتأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي , المائي الحار والبارد لنبات الزعتر عند تركيز 100 ملغم / مل حيث بلغت معدل أقطار منطقة التثبيط 11.3, 9.8 و3.22 ملم على التوالي كما لوحظ وجود فروقات معنوية عالية بين تأثير بكتريا

Lactobacillus ومستخلص نبات الزعتر عند تركيز 100 ملغم / مل والتراكيز الأخرى لهذا المستخلص على بكتريا أشريشيا القولون.

جدول (4_20) المقارنة بين التأثير التثبيطي لبكتريا *Lactobacillus* والمستخلصات النباتية المستخدمة في الدراسة.

	التركيز ملغم / مل						
النبات	المستخلص	20	40	60	80	100	Lacto
الرمان	الكحولي	4.86^{d} A	8.78^{c} A	13.26^{b} A	16.32^{b} A	21.92^{a} A	22.82^{a}
	مائي حار	2.11^{e} B	6.96^{d} A	11.78^{c} A	14.96^{b} A	18.02^{b} B	
	مائي بارد	0	1.12^{e} B	5.66^{d} B	10.54^{c} B	14.02^{b} C	
الزعتر	الكحولي	0	0	2.74^{d}	7.12^{c} A	11.3^{b} A	22.82^{a}
	مائي حار	0	0	0	4^{c} B	9.8^{b} A	
	مائي بارد	0	0	0	0	3.22^{b} B	

*الحروف الصغيرة تستخدم للمقارنة بصورة افقية بين المتغيرات.
*الحروف الكبيرة تستخدم للمقارنة بصورة عمودية بين المتغيرات.
*الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية بين المتغيرات.
*استخدم اختبار دنكن للمقارنة بين المتوسطات .

الإستنتاجات Conclusions
و التوصيات
Recommendations

الإستنتاجات Conclusions

1 _ تبيّن وجود نسبة عالية من بكتريا أشريشيا القولون مصاحبة لحالات الزحار الأميبي في الأطفال الرضع .

2_ كان لبعض العوامل تأثير في زيادة نسبة الأصابة ببكتريا أشريشيا القولون في الأطفال الرضع كمنطقة السكن ونوع الرضاعة وتفاوت نسبة الأصابة أيضاً فيما يتعلق بالعمر والجنس للمريض.

3_تباينت حساسية العزلات البكتيرية المسببة للأسهال للمضادات الحيوية حيث أبدت العزلات مقاومة بنسبة عالية لعدد من المضادات منها (Cefixime , Cefuroxime و Ceftriaxone) بينما كانت حساسيتها عالية لمضاد Meropenem (MEM).

4_ تبيّن عزلات بكتريا أشريشيا القولون أنّها منتجة للهيمولايسين بنسبة عالية (96%) , ومنتجة للبكتريوسين بنسبة قليلة جداً حيث بلغت النسبة 4%.

5 _ كان لمستخلصات قشرة نبات الرمان الكحولية تأثير تثبيطي عالي ضد العزلات المسببة للأسهال وقد تفوق تأثيره على مستخلصات نبات الزعتر.

6 _ تبيّن إنّ لبكتريا *Lactobacilli* تأثير تثبيطي ضد بكتريا أشريشيا القولون المسببة للأسهال .

التوصيات Recommendations

1_ ظرورة عزل وتشخيص البكتريا المرضية المرافقة لحالات الأصابة بالأسهال للأطفال الرضع الناجم عن طفيلي الزحار الأميبي لأحتمال تواجد أنواع بكتيرية مرضية أخرى بالأضافة الى أشريشيا القولون.

2_ الأهتمام بالجانب الوبائي لما له تأثير كبير في أنتشار مرض الأسهال وتحديد العوامل المؤثرة منها المستوى الصحي, التغذية, المستوى الأقتصادي , ونوع الرضاعة وغيرها للحد من أنتشار المرض.

3 _الأعتماد على أنظمة التشخيص الحديثة في تشخيص البكتريا منها Vitik2 و تفاعل البلمرة PCR فضلاً عن الطرائق السيرولجية لتحديد النمط السيرولجي للعزلات البكتيرية .

4_ التركيز على التوعية في المجتمع من خلال الأعلام وأقامة الندوات في المدارس والجامعات عن ظرورة عدم أستخدام المضادات الحيوية بصورة عشوائية وبدون أستشارة الطبيب والأعتماد على الزرع البكتيري لتحديد نوع البكتريا والمصدر المؤثر.

5_ أمكانية الأستفادة من المستخلص النباتي للرمان في علاج حالات الأسهال وظرورة أجراء الدراسات عن المركبات الموجودة فيه بأستخدام الأجهزة المتخصصة بهذا الصدد.

6_ أستخدام المعزز الحيوي لبكتريا Lactobacilli في علاج حالات الأسهال في الأطفال الرضع وذلك نظراً لتأثيرها التثبيطي العالي للبكتريا المسببة للأسهال مقارنة مع المضادات الحيوية فضلاً عن قلة تأثيراتها الجانبية.

المصادر العربية والأجنبية

المصادر العربية

ابراهيم، وسن جعفر .(2008) . دراسة تاثير استهلاك منتوج علاجي متخمر مصنع من عزلة محلية من *Lactobacillus salivarius* في بعض المعايير الفسلجية في الجرذان المختبرية . اطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة / جامعة البصرة .

احمد, الاء ميسر.(2008). تأثير بكتريا ال *Lactobacillus acidophilus* على بكتريا *E.coli* المسببة لخمج المجاري البولية داخل وخارج الجسم الحي. رسالة ماجستير, كلية العلوم , جامعة بغداد.

امان , محمد البسطويس (2000). تركيب وحفظ الاغذية مكتبة المعارف الحديثة.

الاحمر, سيف داوود. (2000). دراسة وراثية وكيمو حيوية لبكتريا ال *Shigella* وعلاقتها بصبغة الكونغو . رسالة ماجستير , كلية العلوم _ جامعة بغداد.

البياتي, ميسون خضر عباس. (2001). دراسة تصنيفية مقارنة لأنواع الاجناس و *Thymus Ziziphora L.L Micromevia Benth* العائدة للعائلة الشفوية في العراق . أطروحة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة _ نبات , تصنيف نباتات طبية _ جامعة بغداد.

الجلبي, عامر يحيى حميد . (2008) . دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص زيت الزعتر على جراثيم *Staphylococcus aures, Streptococcus bovis , Salmonella and E.coil* مختبريا . كلية الطب البيطري ,جامعة الموصل .مجلة تكريت للعلوم الصرفة ,المجلد 14 ,ص 219_225 .

الجميلي, عبير عبد الغني محمد.(2000).تأثير مستخلص قشور الرمان على نمو بعض الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام.قسم التحليلات المرضية , المعهد التقني_ الموصل.

الجنابي, مروان عبد الهادي حسين والتكريتي, الهام عائد أسعد.(2012).أنتشار الخمج بالأميبا الحالة للنسيج بين الأطفال المراجعين لمستشفى الطفل المركزي في مدينة بغداد. المجلة العراقية للعلوم .55:(33).

الحاج, يحيى توفيق.(2003). النبات والطب البديل . الدار العربية للعلوم , بيروت, لبنان.

الحائك , منال فوزي محمد عبد الرحمن . (2004) . تأثير الخل في بعض انواع الجراثيم الملوثة للحروق . رسالة ماجستير, كلية التربية ,جامعة الموصل.

الحايك, ميشال(2003). موسوعة النباتات الطبية .مكتبة لبنان ناشرون, بيروت. ص 97_ 100.

الحسيني , ايمن. (1997) . مختصرة داود ,مختصرة التذكرة وراي العلم الحديث 0مكتبة ابن سينا للطباعـــــة والنشر والتوزيع 0القاهرة.

الخالدي, خديجة عبيس حمود.(2016). التحري عن طفيلي الزحار الأميبي عند الأطفال الرضع المصابين بالأسهال والراقدين في مستشفى الولادة والأطفال بالطرق الكلاسيكية وتقنية تفاعل سلسلة انزيم البلمرة في الوقت الحقيقي RT_PCR. مجلة القادسية للعلوم الصرفة.المجلد 21, العدد 2.

الخفاجي , زهرة محمود (2008). الأحياء العلاجية . دار الكتب والوثائق ببغداد.

الدليمي, جيهان عبد الستار.(2005). أستخدام بكتريا حامض اللاكتيك المعزولة من الانسان والمصادر الغذائية في تثبيط نمو البكتريا المسببة للأسهال. أطروحة دكتورا / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية .

الزبيدي , محمد ميدي عبد المحسن . (2012) . دور البلازميدات في انتاج البكتيرسين من بكتريا ال *Klebsiellaspp* المعزولة من عينات سريرية. رسالة ماجستير, معهدالهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية , جامعة بغداد.

الزنكنة, أيمان علي نور الله. (2012). دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا ال *klebsiella spp* المعزولة من أصابات مرضية مختلفة . رسالة ماجستير , كلية التربية للعلوم الصرفة , جامعة ديالى.

السعدي، زينب نشات شكر محمود .(2010). دراسة قابلية بكتريا *Lactobacillus acidophilus* و *Bifidobacterium bifidum* في الوقاية والعلاج من التهاب الامعاء المحدث بال *Salmonella typhimurium* في الجرذان .اطروحة دكتوراه ، كلية التربية / جامعة تكريت .

السعدي, لينا عبد الأمير.(2011). دراسة بكتريولوجية لبكتريا الزائفة الزنجارية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في مدينة بعقوبة وضواحيها. رسالة ماجستير, كلية التربية للعلوم الصرفة , جامعة ديالى.

الشبيب , اسفار شهاب.(2005) .البكتريا المرضية المعوية. مطبعة التعليم العالي, بغداد: 136 صفحة.

الشويخ , رنا مجاهد عبدالله , (2016), المضادات الحيوية واستعمالاتها، الطبعة الاولى , عمان ـ دار دجلة للنشر والتوزيع . 39-13.

الطائي ، سهاد رضا متعب . (2011) . انتاج وتنقية حامض اللاكتيك من خلايا مقيدة لبكتريا *Lactobacillus* المعزولة محليا . رسالة ماجستير ، كلية العلوم / جامعة كربلاء .

العاني, لمياء يعقوب.(2000). تضاد العصيات اللبنية المهبلية مع الجراثيم المسببة للأصابات المهبلية . المؤتمر العلمي السابع لبحوث التعليم التقني.

العبدلي ، معزز عبد الرضا مجيد . (2005). فعالية البكتريوسين المنتج من عزلتين من جنس *Lactobacillus* في تثبيط النمو المايكروبي في الاوساط الزرعية وبعض الاغذية . اطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل .

العبيدي ، نبراس نزار محمود . (2006) . دراسة تاثير بعض العوامل البيئية والمطفرات على فعالية بكتريا حامض اللاكتيك في انتاج المثبطات ضد البكتريا المرضية والبكتريا المتلفة للاغذية . اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

العتبي, دعاء عدنان كاظم.(2013). دراسة بكتريولوجية لبعض أنواع العائلة المعوية المعزولة من صالات مستشفى الولادة في مدينة بعقوبة . رسالة ماجستير,كلية التربية , جامعة ديالى.

العزاوي, زينب حسين مهدي. (2008). دراسة عوامل الفوعة والاستجابة للمضادات الجرثومية في المكورات المعوية المعزولة من المرضى . رسالة ماجستير, كلية التربية , جامعة ديالى.

العمري, أسعد جاسم عبد.(2008). دراسة تأثير إستخدام المعزز الحيوي (Probiotic) كمحفز مناعي مع لقاح البروسيلا Rev-1 في الحملان. رسالة ماجستير. كلية الطب البيطري. جامعة بغداد.

العوادي, سلوى صابر.(1993). دراسة الفعالية المضادة لنمو الجراثيم. رسالة ماجستير, كلية الطب البيطري, جامعة بغداد.

القصاب ، عبد الجبارعمر و الخفاجي ، زهرة محمود , (1992) , تأثير الظروف المختلفة على الفعالية التثبيطية للعصيات اللبنية المعوية أتجاه البكتريا المعوية المسببة للأسهال . كلية العلوم الزراعية . مجلد (123) . العدد (7):18-26 .

القيسي, غسان حمدان و سلطان, عمار أحمد. (2008). العوامل المؤثرة على وبائية طفيلي histolytica Entamoeba و طفيلي lamblia Giardia بيه سكان قضائي الخالص وبلذروز. مجلة التربية للعلوم الصرفة .27.

الكاتب , يوسف منصور(2000). تصنيف النباتات البذرية 0 كلية الزراعة 0جامعة بغداد- الطبعة الثانية .

الكبيسي, علي حسين مكي , الراجحي, ستار محمد حتروش ,شناوة, اسراء كاظم .(2013) . دراسة وبائية لمسببات الاسهال الطفيلية والبكتيرية في محافظة كربلاء. مجلة جامعة كربلاء – المجلد الحادي عشر– العدد الثاني.

الكبيسي, علي حسين مكي . (2007). تأثير المستخلصات المائية لبعض النباتات في تثبيط المسببات البكتيرية والطفيلية للأسهال في محافظة كربلاء. أطروحة دكتورا, جامعة بغداد.

تركي, أحمد محمد, عبد الرحمن, أبراهيم عبد الكريم و عبد, جنان جميل.(2012). مجلة الأنبار للعلوم البيطرية. المجلد5 , العدد2.

جليل ، ادريس صالح . (2015) . عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus thuringiensis* ودراسة تاثيرها في بعض المقاييس الحياتية لذبابة ثمار القرعيات (Diptera : Tephritidae *Dacus ciliate*) . رسالة ماجستير . جامعة ديالى ، كلية التربية للعلوم الصرفة .

حسن, غانم محمود, محمد, حامد صالح ,محمد, نزار فخري.(2008). أستخدام عزلات محلية مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك في مقاومة أملاح الصفراء وخفض الكولسترول. مجلة زراعة الرافدين. المجلد 36, العدد 3.

حكمت, احمد طلال, عيسى, محسن أيوب.(2013). قابلية تحمل البكتريا العلاجية *Lactobacillus spp* لظروف المعدة والامعاء وحساسيتها لبعض المضادات. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية .1:1646_1813.

رؤوف, علي محمد نجاتي. (2013). التحري عن قدرة بعض الانواع البكتيرية على أنتاج المادة المخاطية . مجلة علوم الرافدين. 24 (1): 36_49 .

ريا, خليل أبراهيم القيسي.(2015). دراسة بكتريولجية لبعض مسببات الأسهال لدى الأطفال. رسالة ماجستير, كلية التربية للعلوم الصرفة , جامعة ديالى.

سلمان, جيهان عبد الستار.(2014). المجاميع البكتيرية المهمة في الأغذية. قسم علوم الحياة / كلية العلوم / الجامعة المستنصرية.

عبد الحسن ، خالد حسك . (2009).دراسة تاثير التغليف الدقيق Microencapsulation في عيوشية بكتريا *Lactobacillus casei* المستعملة في تصنيع بعض منتجات الالبان . رسالة ماجستير ،كلية الزراعة / جامعة الموصل .

عبد الحسين, غصون عادل.(2008). دراسة تأثير المستخلصات النباتية في طفيلي الزحار الأميبي داخل الجسم الحي. رسالة ماجستير, كلية العلوم , جامعة بغداد.

عبد الكريم, رائد خماس وموسى, أمل حسين.(2009). تشخيص بعض مسببات الأسهال في الاطفال الرضع وتأثير بكتريا حامض اللاكتيك عليها. مجلة علوم المستنصرية , المجلد 20, العدد 1.

مجيد, قيثار رشيد, الشطي, صباح مالك حبيب.(2002). تأثير الفعالية التضادية لبعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الأحياء المجهرية . قسم الصناعات الغذائية , كلية الزراعة, جامعة البصرة .

مجيد, معزز عبد الرضا و أحمد, موفق محمود.(2013). دراسة بعض العوامل المؤثرة في نمو بكتريا حامض اللاكتيك وانتاج البكتريوسينات. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية . عدد خاص بوقائع المؤتمر الاول لقسم علوم الاغذية .

محسن, سلوى صبر ونصري, مروة محمد.(2015). الممرضات الداخلية المرافقة لحالات الأسهال لدى اطفال من عمر (1_15) سنة في بغداد. مجلة العلوم التطبيقة والصرفة , المجلد 3, العدد 28.

نصيف, زينب محمد, ميرزة, ريباز أسود.(2013). دراسة الخواص الفسيولجية كمعزز حيوي لعصيات بكتريا حامض اللبنيك المعزولة من منتجات الالبان المحلية في مدينة أربيل. مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية. العدد6 , المجلد 21.

المصادر الأجنبية

Abd-Elsalam,B.A.; Nagwa,E.; Sultan,O.; Fayed and Zedan,M.A . (2004).Studies on probiotic criteria of *lactobacilli*. Egyption J.of Dairy Sci.32:17_29.

Achers,J.P. and Mirelman,D.(2006).Progress in research on pathogenesis .J.Microb 9(4):367-373.

Adagu,l.S.; Nolder,D. ; Warhurst,D.C and Rossignol.J.F.(2002).In vitro activity of nitazoxanide and related compound against isolated of Entamoeba histolytica. J. Antimicrob. Chemother.,49:103-111.

Agrawal,R.(2005).probiotics :an Emerging Food Supplement With Health Benefits Food Biotechnology ,19:227-246.

Ahanjan,M.; Mohana, D.C.; Raveesha,K.A. (2008). Antibacterial activity of asperugo procumbens L.against some human pathogenic bacteria, African Journal of microbiology Research 2,pp.138-140.

AL_Bayati, F.A.(2008). Synergistic antibacterial activity btween Thymus vulgaris and pimpinella anisum essential oils and methanol extracts. Journal of Ethnopharmacology 166(3), pp.403_406.

AL_Bayatti, S.M.(2002). Etiology of chronic diarrhea. Saudi med. J.,23:675_679.

AL_Dulaimi,T.H.; Aziz,H.W.; AL_marzoqi,A.H.;AL_aziz,S.A.; Mohsin,S.A.(2015).Molecular characterization and antibiotic susceptibility of diarrhea E.coli from children. Medical journal of Babylon.12:2.

Al_Gosha'ah ,F .A . (2005). Studing the effect of inhibitory substance produce by Saccharomyces boularon virulence factors of some enteric bacteria . Degree of Doctore college of science council ,AL_Mustansiriyah.i.

AL_Saimary,S.; Baker, S.; Khudaier,B.; Abass,Y.(2006).Efficiency of antibacterial agent extracted from Thymusv ulgaris L.The internet Journal of nutrition and Wellness.4(1).

AL_Zoreky, N.S.(2009).Antimicrobial activity of pomegranate (punica grantum L.).134(3):244_248.

Al-Hasan,R.(2012).Astudy of carbapenem resistance in *Acinetobacter bumanii* isolates from Kuwait.Phd.Thesis.University of Edinburgh.

Ali, C.I.; Mahmood, A.R.; Jafer,N.A,; Korsheed,M.S.(2009). Prevalence of enteropathogenic diarrhea in children up to 2 year in kirkuk. Tikrit Medical Journal.15(2):124_131.

Al-Muhna, B. M.(2010). Study of the Inhibitory Effect of Thymus vulgaris and Eucalyptus camaldulensis on In vitro Growth of Listeria monocytogenes. Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences.1(1).

Al-Saady , l.k.; AL-ALwany ,H.M.; Nsheit ,A.(2006). IRAQI J_MED.

Amaya, E**.;** Reyes, D.; Vilchez, S.; Paniagua, M.; Mollby, R.; Nord, C.E.;Weintraub.(2011). Antibiotic resistance patterns of intestinal E.coli isolated from Nicaraguan children.Journal of medical microbiology. 60:216_222.

Amin, M.; Goodarzi,H.; Orang,Z.;Farsi,S.; Jorfi,M.(2011).Isolation and identification of lactobacillus species from the vagina and their antimicrobial properties.African journal of microbiology research .5(20):3300_3304.

Amin,M.; Jorfin ,M.; Khosravi ,A. ; Samarbafzadeh ,A.D.and Sheikh ,A. (2009).Isolation and Identification of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* from plants by PCR and Detection of their Antibacterial Activity . *Biological .J*.(15) :810-814.

Arshad,H.M.; Mohiuddin,O.A.; Azmi,M.B.(2012). Comparative in vitro antibacterial analysis of different brands of cefixime against clinical isolates of Staphylococcus aureus and Escherichia coli.

Asha and Gayathri,D.(2012). Antagonistic potential of lactobacillus Spp against Enteropathogenic bacteria purification and characterization of their bacteriocins.

Aslani, M.M.; Alikhani, M.Y.; Zavari,A.;Yousefi,R.;Zamani,A.R.(2010).

Atlas, R. M**. ;** Brown, A. E. and Parks, L. C. (1995) . Laboratory Manual Experimental Microbiology. 1st. ed. Yearbook , Mosby Inc. 148: 884-8 .

Barnes, J; Anderson,L.and phillipson,J.D. (2002) .herbal medicines:AGuid for health care professionals.2nd ed.pharma ecutical press:London.

Barrow,G.I. , G.I.& Feltham , R.K.A.(2003).COWAN AND STEEL Manual for the identification of medical bacteria.chapter (6):76-78

BARRY, A. L.; FUCHS, P. C.; GERLACH, E. H.; . HARDY, D. J.; McLAUGHLIN, J. C.; PFALLER6, M. A.(1993). Ticarcillin and Ticarcillin-Clavulanic Acid Susceptibility Tests: Error Rates for Disk Tests with Consecutively Isolated Members of the Family Enterobacteriaceae. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY .36(1): 137-143.

Baser, K.H.C. (2002).Aromatic Biodiversity Among the flowering plant taxa of turkey. Journal of Herbs, Spies and medicinal plant. 10:49-61.

Bauer, S.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C. and Truck, M.D. (1996) . Antibiotic susceptibility testing by standardized single dose method. American J. clin. path.

Behiry,I.K.; Abada,E.A.; Ahmed, Entsar,A. and labeeb, R.S.(2011). Enteropathogenic E.coli associated with diarrhea in children in cario, Egypt.J. The scientific world. 11:2613-2619.

Belanger,L.; Garenaux,A.; Haral,J.; Boulianne,M.; Nadean,E. and Dozois,C.M.(2011). *Escherichia coli from animal reservoirs as potential source of human extraintestinal pathogenic E.coli FEM.S Immunol med Microbiol.62: 1_10.*

Benson , H.G.(2002) . Microbiological Applications (Laboratory Manual in General Microbiology) . 8th. ed. published by McGraw – Hill , New York.

Bessimbaye, N.; Tidjani,A.; Moussa,A.M.; Brahim,B.O.; Mbanga,D.; Ndoutammia,G,Sangare,L.; Barro,N.;Traore,A.S.(2013). Gastroenteritis with E.coli in pediatric hospital in N,Djamena-chad.Journal of applied Biology and Biotechnology.1(2):13_17.

Bhaun, S.;Vandana,S. and Archana,S.(2011). In vitro study of causative agent of amoebiasis with lemon juice at different concentration showed antiamoebie properties .Internat.Res.J.pharm.,2(9):88-90.

Black,R.E.; Cousens,S.; Johnson,H.L.; Lawn,J.E.;Rudan,I.;Bassani,D.G.; jha,p.; Campbell, H.; Walker,C.F.; Cibulskis,R.; Eisele,T.; Liu,L.and mather,C.(2010).Global regional,and national causes of child mortality in 2008:asystematic analysis.Lancet 375 : 1969-1987.

Bookstaver, D.A.; Bland, C.M.; Woodberry, M.W.; Mansell, k.B.(2014). Correlation of cefpodoxime susceptibility with cephalothin and cefuroxime for urinary tract isolates. Journal of Medical Microbiology. 63 : 218–221.

Brook, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. (2010). Medical Microbiology. 25th.ed. McGraw-Hill Companies, new york. P: 240.

Brooks, G.F.; Butel,J.S. ; Carroll, K.C. and Morse ,S.A. (2007) . Jawetz ,melinick ,J.L. and Adlebergs medical microbiol , 24th ed . ALange medical book.

Brown, A. E. (2005). Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology.McGraw-Hill. New York. companies, Inc., 1221 Avenue of the Americas, New York. 144-6.

Brown, A. E. (2007). Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology 10th ed .McGraw-Hill comp. Inc.,USA.,P.102-263.

Chakraborty, A. and Bhowal, J.(2015). Isolation, Identification and analysis of probiotic properties of lactobacillus Spp. From selected Regional Dairy product. International journal of current Microbiology and applied sciences,4(6):621_628.

Chart ,H.; Daud ,G.W.; Richard ,S.and John, F.P . (2002). Medical microbiol AGuid to microbial Infection : pathogenesis, Immunity, laborat ory diagnosis and control.

Chellapandi, K.; Dutta, T.K.; Sharma,I.; Mandal,S.D.; Kumar,N.S.; Ralte,L.(2017).Prevalence of multi drug resistant enteropathogenic and enteroinvase E.coli isolated from chidren with and without diarrhea in indian population.Annals of clinical microbiology and antimicrobials.16:49.

Chiang ,P.(2012).Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* Subsp.*Paracase*i NTV 101 and its fermented products .Appl.Microbiol.Biotecnol.93:903-916.

Cho, S.H.; Lim, Y.S.; Park, M.S.; Kim, S.H.; Kang, Y.H.(2011). Prevalence of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Fecal Isolates From Healthy Persons and Patients With Diarrhea. Public Health Res Perspect. 2(1):41_45.

Christopher,B.(2008). RHS A-Z encyclopedia of garden plant.Dorling Kindersley. United kingdom.

Clark, C.G. and Diamiond, l.S.(2002).Methods for cultivation .Microbial .Rev.,15:329-341.

Cursino,L.; Smarda,J.;Chartone,E. and Nascimento,A. (2002). Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae Braz.*J. Microbiol*. 33 : 196-217.

Cursinol, M.(2006).Exproducts of the E.coli strain H22 inhibiting some enteric pathogens .J.Appl.Microbiol. 100:821_829.

CLSI. (2012) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-second informational supplement . Clinical Laboratory Standards Institute . 31(1): 124-8 .

CLSI. (2014) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-second informational supplement . M100-S24.Clinical Laboratory Standards Institute . 34 (1): 58-172.

Coccia, S.M.; De Gracomo,M.; Aulicinga,F.M. and pozio,E.(2003).cysts in waste water treatment plant in Italy. Applied environment microbiology .Vol.69,pp.3393-3398.

Collee , J. G. ; Fraser , A. G. ; Marmion , B. P. and Simmons , A**.** (1996) . Mackie and McCartney practical medical microbiology . p.173-4 . 14th ed. Churchill Livingston .

Davidson, G.; Barnes, G.; Bass, D. & Cohen.(2002) . Infection Diarrhea in children: working group report of the first word congress of pediatric gastroenterology, and Nutrition. J. Pediatric Gastroenterol., 35:143_150.

Devi, M.; Rebecaa, L.J. and Sumathy, S.(2013).Characterization of bacteriocin produced by lactobacillus acidophilus isolated from yougert. Research Journal of pharmaceutical, Biological and chemical sciences ,4(2):1429.

Duman,A.D.; Ozgen,M.; Dayisoylu, K.S.; Erbil,N.; Durgac, C.(2009). Antimicrobial activity of six pomegranate varieties and their Relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics.w ww. mdpi. Com/journal/ molecules.1420_3049.

Dumbrepatil , A. ; Adsul, M.; Chaudhari , S. ; Khire, J. and Gokhale ,D. (2008). Utilization Of Molasses Sugar For Lactic acid Production By *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *delbrueckii* Mutant UC-3 Batch

Fermentation . *Applied and Environmental Microbiology*. 74(1).p. 333-335 .

El-fallal ,A.A. and El- Kattan , M .H .(1997) . Effect of plant extracts on the mycelial growth of some cultivated *mushrooms* .Egypt .J. microbial .32(1):41-48.

Elizete, D.F. and Carlos, R.S**.**(2005). Biochemical characterization and identification of probiotic lactobacillus for swine.B.CEPPA, Curitiba, 23:299_310.

Enayat ,K; Sohili ,F; Salimi ,H; Soltan,D. and mohammad , M .(2011) . Frequency antimicrobial susceptibitity and plasmid profiles of E.coil pathotype obtained from chiledrinwiyh acute diarrhea .J.M . 1: 23_2.

Fanaro, S; Chierici, R; Guerrini, P. & Vigi, V.(2003). Intestinal microflora in early infancy. Composition and development . Acta Paediatr Suppl., 91: 48-55.

Farkas_Himsley,H.(1990).Purified colicin as cytotoxic agent of neoplasia: comparative study with crud colicin. Cytobios 42:193_207.

Fawole, O.A.; Makunga, N.P.; Opara, U.L.(2012). Antibacterial, antioxidant and tyrosinase_ inhibition activities of pomegranate fruit peel methanolic extract. Journal BMC complementary and alternative medicine.12:200_212.

Flynn , S.; Sinderen , D.V. ; Thornton , G.M.; Holo , H. and Collins , J.K. (2002) . Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP –118 , a novel bacteriocin Produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* sub *sp. Salivarius* UCC118 . Microbiology ., 148:973 – 984.

Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2007). Baily and scott's: Diagnostic microbiology. 12th ed. Mosby, Inc. Baltimore. USA. :266-277.

Foster, M.A.; Iqbal,J.; Zhang, C.; Mchenary, R.; Cleveland, B.E,; Herazo, Y.R.; Fonnesbeck,C.; Payne,D.C.; Chappell,J.D.; Halasa,N.; Duarte,O.G.(2015).Enteropathogenic E.coli in stool of children with acute gasteroenteritis in Davidson countery. Diagn microbial infect Dis.83(3):319_324.

Fotedar,R.; Stark,D.; Beebe,N.; Marriott,D.; Ellis,J. and Harkness,J. (2007) . Laboratory diagnostic techniques for Entamoeba histolytica .Clin. Microbiol.Rev.,20(3):511-532.

Fugelsang, K.C. and Edwards, C.G. (2007) . Wine microbiology practical applications and procedures . 2nd. ed. Springer . New York .

Garcia, P.G.; Silva,V.L.; Diniz,C.G.(2011).Occurrence and Antimicrobial drug Susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic E.coli in fecal microbiota from children with and without Acute diarrhea. The Journal of microbiology.10_2102_3213.

George,M.; Garrity,D.J.; Brenner,S.A.;Noel,R.E. and James,R.S.(2007). Bergeys manual of systemataic Bacteriology.Vol.2.

Gomes, TAT., Rassi, U., Mac Donald, KL., Ramos, SRTS., Trabulsi, LR., Vieira, MAM., Guth, BEC., Candeias, JAN., Toledo, MRF., Blake, PA. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. J Infect Dis , 1991;164: 331–337.

Gupte ,S.(2002).The short textbook of Medical Microbiology .5th ed.pp.227_230.New Delhi .India .

Hadi ,Oday Mitib .(2011).Molecular and phenotypic characters For diagnosis of *Helicobacter pylori* in different clinical specimens .A Thesis ,College of Science / University of Kufa .

Hama, D.A.; Taha,A.; Qadir,S.A.(2014). The antimicrobial activity of pomegranate juice. International Journal of scientific and engineering research.5 (10).

Hammami,R; Zouhir,A; Lay,ch.le,; Hamida,J.B. and Flis,I .(2010) . Bactibase second relase; database and tool platform for bactericine characterization .BMC microbiology.

Han,B; Yu,Z ; liu,B ; Ma,Q. and zahang ,R.M. (2010) .Optimization of bacteriocin production by Lactobacillus plantarum YJG ,ISOLATED From mucosaof the gut of healthy chikens. J. Microbiol Res ; 5:1147_1155.

HAQUE,M.A.; OHKI,K.; KIKUCHI,M. and KOHASHI,O. (1994). Contact Hemolysin Production by Strains of Enteroaggregative Escherichia coli Isolated from Children with Diarrhea. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.32(4): 1109-1111.

Hashmi,L.S.A; Hossain,H.A.; Weli,A.M.; AL_Riyami,Q., AL_ Sabahi,J.N.(2013). Gas chromatography _Mass spectrometry analysis of different organic crude extracts from the local medicinal plant of Thymus vulgaris L.Asian pac.J.Trop. Biomed.3 :69_73.

Hassan,H .; pyar, A**.** ;Pazilah,I. and Liong,Min –Tze .(2011).Isolation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* from commericial yoghurt *.Alandalus for social and Applied Sciences* 4 (7):5-15.

Hegazi, M.A.; Patel, T.A.; EL_Deek.B.S.(2013).Prevalence and character of Entamoeba histolytica infection in saudi infants and children admitted with diarrhea at 2 main hospitals at south jeddah : are_ emerging serious infection with unusual presentation.Brazilian journal of infectious diseases .17(1).

Hindal, A.S and Ali,S.A.(2015). Estimating the inhibitory effect of lactobacillus acidophilus isolated from vagina against some pathogens of genital infection in group of women.Iraqi journal of science,2: 1588_1593

Holzapfer,W.H.P.; Habere,R.J.; Geisen,Bjorkroth and Schillinger,U.(2001).Taxonomy and important features of probiotic microorganisims in food nutrition .*AM.J.Clin.Nutr*.,73:365-373.

Hoque,M.Z.*Akter,F.*Hossain,K.M.*Rahman,M.S.M.*Billah,M.M. and K.M.D.(2010).Isolation,Identification and Analysis of probiotic properties of *Lactobacillus* Spp.From selective Regional Yoghurts.*World Journal of Dairy and Food Sciences* 5(1):39-46.

Jawetz,M.; Adelber,K.; Geo,F.; Brook.;A.; Janet,S.; Butel and Stephen, A.M.(2004).Medical immunology,23 ed.International Edition.McGraw-Hill comp.Inc,USA.

June ,C.; Oscariz,J.C;Antonio,G. and Pisabarro,A.G.(2001). Classification and mode of action of membrane- active bacteriocin produced by gram -positive bacteria .*Int.Microbiol*..4,13,19.

Kadhim, T.A.; Khayoon, H.A.; Juma'a,A.H.(2011). Antibacterial efficiency for alcoholic of thymus vulgaris and negilla sativa .Medical Journal of Babylon.8(3).

Kau, A.L.; Martin, S.M.; lyon ,W.; Hayes,E.; Caparin ,M.G. and Hultgren ,S.J. (2005) . Enterococcus faecalis tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J Mice. Infect . Immun.,73(4): 2461_2468.

Khalid, K .(2011). An overview of lactic acid bacteria. International Journal of Biosciences., 1(3): 1-13.

Koneman, E.W; Allen, S.D; Janda, W.M; Schreckenberger, P.C and Winn, W.C.J.(1992). Color Atlas and Textbook Of Diagnostic Microbiology. 4th ed. J.B.Lippincott Company. Philadelphia.

Kriengkauykiat, J.; porter,E.; Lomovskaya,O. and Wong-Beringer,A . (2005).Use of an efflux pump in hibitor to determine the prevalence of efflux pump mediated flouroquinolone resistance and multidrug resistance in pseudomonas aeruginosa. Antimicrob.Agents .Chemother. 49(2):565_570.

Langendorf, C.; Hello, S.L.; Moumouni, A.; Gouali,M.; M.; Mamatry, A.A.; Grais.R.F; Well, F.X.; Page, A.L.(2015).Enteric bacterial pathogen in children with diarrhea in niger diversity and antimicrobial resistance . Journal of clinical microbiology.10(3).

Li, X.; Lockatel, C.V.; Johnson, D.E.; Lane, M.C.;Warren, J.W. and Mobley, H.L.T. (2004).Development of intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by proteus mirabilis. Infect. Immun. Jan.vol.72,No.1:pp.66_75.

Linford, A.S.; Heriberto,M.; kafelyn, R.G.; Hanbang, Z.; Singh,V.; Willian,A.and petri,J.R.(2009). Short hairpin RNA mediated knoch down of protein expression.J. Microb.pp:1035-1037.

Macfaddin, J.F.(2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. 3rd.ed. The Williams and Wilkins . Baltimore, USA.

Magnusson,J.(2003).Antifungal activity of lactic acid bacteria .Depatment of Microbiology,Sweden.p:35-54.

Maulood, k.k.(2008).Construction of *Escherichia coli k-12 MG1655ASMPA SSr Astrian by PCR-Based mutagenesis. M.SC. Thesis. Science Education College. University of salahddin.*

Mercenier,A.; Pavans,S.; and Pot, B.(2002).Probiotics as biotherapeutic a gents.Present knowledge and future prospects current pharmaceutical design.*Food sci.J.*8:99-110.

Migliore,L.; Rotini,A.; Thaller,M.C.(2013). LOW DOSES OF TETRACYCLINE TRIGGER THE E. COLI GROWTH: A CASE OF HORMETIC RESPONSE. Dose-Response. 11:550–557.

Mirlohi,M**. ;**Zad,Sabihe Soleimanian ;Zeinodin,Mahmoud Sheikh.(2008).Identification of lactobacilli from Fecal Flora of some Iranian Infants.*Iran J.pediatr.*. 8(4)pp:357-363.

Mitra,M.;Ahmad,P.;Mehdi,R.;Hosein,A.andAhmad,k.(2011).Afr.J. Microbiol . Res .,5:3305-3309.

Moerllo , J.A. ; Granto , P.A. and Mizer , H.E. (2003). Laboratory Manual and workbook in Microbiology : Applications to patient Care. 7thed. The Mc Graw – Hill Companies : 97 – 99 .

Mohsenipour,z. and Hassanshahian,M.(2012).The inhibitory effect of Thymus vulgaris extract on the planktonic form and biofilm structure of six human pathogenic bacteria. Medicinal and Aromatic plants.3(5).
Morrow AL, Rangel JM. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. Semin Pediatr Infect Dis. 2004;15:221–8.

Morrow, A.L. ; Rangel, J.M.(2004). Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. Semin Pediatr Infect Dis. .15:221-228.

Naidu, A.S.; Bidlack, W.R.; and Clemens, R.A.(1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria, Crit.Rev.Food Sci.Technol. 38:13-126.

Nguyen,R.N; Taylor,l.S and tauschek,M.(2006). Atypical enteropathogenic E.coil Infection and prolonged diarrhea in children .Emerg infect .12: 597_603.

Nguyen,T.V.; Le,P.V.;Le,C.H.;Weintraub,A.(2005).Antibiotic Resistance in diarrheagenic E.coli and shigella strain isolated from children in Hanoi, Vietnam.Journal of antimicrobial agent and chemotherapy.49(2)_816_819.

Noman, A.A.(2013).Acute and chronic diarrhea among Hospitalized infant aged (1_12) month. Diyala journal for pure sciences. 10(1).

Normark, B.H.and Normark,S.(2002).Evolution and spread of antibiotic resistance.J.Intern.Med.252:91_106.

Nuamsetti, T.; Dechayuenyong,P.; Tantipaibulvut, S.(2012). Antibacterial activity of pomegranate fruit peels and arils.Journal of science Asia.38:319_322.

Niño,S.J. ; Pacheco, J.R,; Padilla,J.A.; Gareia,A.; Cavazos,A.; Reynoso,O; Uscanga.B.R.(2016).Isolation and identification of lactic acid bacteria from human milk with potential probiotic Role.170_177.doi:10.1269 jfnr.4(3).

Nweze,E.I**.** (2009).Virulance properties of diarrheagenic E.coli and etiology of diarrhea in infant young children and other age groups southeast Nigeria. Amer.J.Sci.,4:173-179.

O'choa, T.J.; Ruiz,J.; Molina, M.; Luis, J.V, Vargas, M.; Gill, A.I.; Ecker,L.; Barletta,F.; Hall, E.and Lanata,F.(2009).High frequency of Antimicrobial durg resistance of diarrheagenic E.coli in infant. Am.J. Trop.Med.Hyg.81(2):296-301.

Odunbaku . O. A. and Askidi, J .S.(2012).Antimicrobial effect of ethanol leaf extract of selected medical plaint on some human pathogenic microbes .international journal of science and Advanced technology .volume 2 No 4 :39-42.

Palmer, K. R ; Penman, I. D. & Paterson-Brown, S. (2002). Alimentary tract and pancreatic disease. Colledge , N. R. and Hunter, A. A. Davidson's principles and practice of edicine, 19th ed. Churchill Livingston, Edinburgh.

Parikh ,J. and chanda ,S.(2007).in vitro antimicrobial activity and photochemical analysis of some Indian medicinal plant.Turk ,J.Bio.13:53-58.

Perez, l., pauli ,M. and Bazequre.P.(1990).Antibiotic assay by the agar – well diffusion method .Journal of Actabiology . 15: 113-115.

Piaddock,L.J.V.(2006). Multi durg efflux pumps_not just for resistance . Nature Rev.Microbiol.4:629_636.

Pincus, **D. H.** (2011) . Microbial Identification Using The Biomérieux Vitek® 2 System . bioMérieux, Inc. Hazelwood, MO, USA . 1: 1-32.
Prashanth,D.; Asha,M.K. and Amit,A.(2001).Antibacterial activity of punica granatum.71(2):171-173.Bangalore.India .

PYAR,H. and PEH, K.K.(2014). Characterization and identification of *lactobacillus acidophilus* using biology rapid identification system. International journal of pharamaceutical sciences. 6(1) :189_193.

Queiroz,F.C.F; Kummer,R.; Silva,C.F.E.; Carvalho,M.D.B.; Cunha,J.M.; Grespan,R.; Amado,C.A.B.; Kenji,R.; Cuman,N.(2012).Effect of thymol and carvacrol constituents of Thymus vulgarisL.essential oil on inflammatory response. Evid.Based complement.Altern.Med.2012,1_10.

Rajeshwari,K.; Uppal,B.; Singh,R.; Tiwari,G.;Mahato,A.K .(2015) . Multidrug resistant Enteropathogenic E.coli Diaarhea in children.American journal of research communication.3(9).

Reddy,K.R**.**(2010).Microbiology and parasitology. 4th ed.paras medical puplishlhier .New Delh.

Reddy,P.V.; Kandisa, R.V.; Varsha, P.V.; Satyam,S.(2014).Review on Thymus vulgaris traditional uses and pharmacological properties. Medicinal and Aromatic plants.3(4).

Rhajaoui,M.; Oumzil,H.; Faid,M.; Lyagoubi,M.; Elyachioui, M. and Benjouad, A.(2001).Antibacterial activity of Moroccan propolis extract, Science letters, vol.3, NO.3.(Research artical).

Rivera,F.P.; Ochoa,T.J.; Maves, R.C.; Bernal,M.; Medina,A.; Meza,R.; Barletta,F.; Mercado,E.; Ecker,L.;Gill,A.L.; Hill,E.R.; Huicho,L. and lanata,C.F.(2010).Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic E.coli isolated from Peruvian children. Journal of clinical microbiology,In press.

Roy,S.; Shamsuzzaman,S.M.; Mamum,K.Z.(2013). Antimicrobial Resistance Pattern Of Diarrheagenic Escherichia Coli Isolated From Acute Diarrhea Patients. International Journal of Pharmaceutical Science.2(6): 43-46.

Russo,A.; Longo,R.; Vanella,A.(2002).Antioxidant activity of propolis :role of caffeic acid phenethyl ester and galangin, fitoterapia .3(1): 9-21.

Sahadeva,R.P.K.; Leong,S.F.; Chua,k.h.; Tan,C.H.; Chan, H.Y.; Tong,E.V.; Wong,S.Y.W. and Chan,H.K.(2011).International food research Journal.18(4):1515-1522.

Sander,M.E.(1999).Probiotic scientific status summary. Apublication of the institute of food and technology, expert panel on food safety and nutrition.

Sarika ,A.S ; lipton ,A,P and Aishwarya,M.S. (2010). Bacteriocin production by anew isolate of lactobacillus rhamnosus GP1 under different culture condition.J. Food science and technology.5: 291_297.

Sava,I.G; Heikens,E ; kropec, A ; Theilacker,C ;Willems ,R. and Huebner,J.(2010). Enterococcal surface protein contributes to persistence in host but is not a target of opsonic and protective antibodies in Enterococcus faecium infection .J. Med .microbiol . 59: 1001_1004.

Schillinger, U. and Lucke,F.K.(1987). Identification of lactobacillus from meat and meat product. Food Microbiol, 4(3):199-208.
SCI, 5 :50-60.

Seeram,N.P., L;L. S.Adams,S.S. M.Henning , Y.Niu. Y.Zharg. M ;G,Nair and Herler,D.(2005). Invitro ant proliferation apoptioc and antioxidant activates of puni elegiac acid and a total pomegranate tannin extract are inn anted in combination with other polpenols as found in pomegranate juice.J.nutr. Biocne.16(6):360-367.

Sharma ,S.; Bhat ,G.K. ; and shenoy ,S. (2007). Virulence factor and durg resistance in E.coil isolated from extraintestinal infection . Indian J. Med .microbial .25:369_373.

Sharma,Pradeep Kumar ; Roy,Rajdeep ;Sathiavelu,Mythili ; and Arunachalam,Sathiavelu.(2014).Study of probiotic and Antioxidant activity of *Lactobacillus*SSP .*ResearchJournalof pharmaceutical,Biological and chemical Sciences*. 4(4),pp:809-819.

Sharma,S.K.; Ul Haq, S.A.(2012). The pharmacokinetics of ceftazidime in he pharmacokinetics of ceftazidime in E. colilipopolysaccharide lipopolysaccharide induced febrile buffalo calves. VETERINARSKI ARHIV 82(6) : 555-565.

SHERMAN, p.; DRUMM, B.; KARMALI, M. and CUTZ ,E.(1909). Adherence of Bacteria to the Intestine in Sporadic Cases of Enteropathogenic Escherichia co&Associated Diarrhea in Infants and Young Children: A Prospective Study . American Gastroenterological Association. 96:86-94.

Souman,L.(2001). Therapeutic uses of herbs and medicinal plant in traditional Arab medicine .j. the Arab board medical specialization. 3(2):53_56. STEEL Manual for the identification of medical bacteria.chapter (6):76-78.

Stocks, E.J. and Ridgway, G. (1987). Handling clinical speciment for microbiology studies; 5th. ed. Churchill living stone Edinburgh .173-201.
Tadesse, A. and Alem, M. (2006) . Medical Bacteriology . EPHTI . Gondar University .

Tan,Z.N.; Wong,w.k.; Nik Zariri,Z.; Abdullah,B.; Rahmah,N.; Zeehaida,M.; Rumaizi,S.; Lalitha,P.; Tan,G.C.; olivos-Garcia,A. and Lim,B.H.(2010). . Identification of Entamoeba histolytica trophozoites in fresh stool sample: comparison of three staining techniques and study on the viability period of the trophozoites. Tropical Biomedicine 27(1):79-88.

Tenover, F.C**.**(2006).Mechanisms of Antimicrobial Resistance in bacteria.American Journal of Infection Control.34:3_10.

Toder ,K .(2007). The mechanism of bacterial pathogenicity "Klebsiella" Todar textbook of bacteriology . Wisconin_Madison Inc.USA.

Toder,k.(2008). Pathogenic E.coli.In:Toders online textbook on Bacteriology. University of Wisconsin,Madison,Dept. of Bacteriology.

Tortora,G.J.; Funke,D.R.and Case,C.l.(2007).Microbiology.3rd ed. Pearson Education Inc.USA.

Tortora,G.J.; Funke,D.R.and Case,C.l.(2010).Microbiology An introduction. 10rd ed.; Pearson Benjamin Cummings USA. Pp:355_402.

Vanisree,M.; Lee, C.Y.; Lo,S.F.; Nalawade,S.M.; Lin,C and Tsay,H.S . (2004).Studies on the production of some important secondary metabolites from medical plant by plant tissue culture .Bol. Bull.Acad.Sin. 45:1_22.

Walentowska,J.; Flaczyk,J.F.(2013). Thyme essential oil for antimicrobial protection of natural textiles .Int. Biodeterior . Biodegr . 84 : 407_411.

Walter,P.; Hammes,H.; Weiss,N. Holzaptel,w.(2004).The prokaryotes lactobacillus and carnobacterium, springer- vertag. New york, thesis.

Wang,w.; Guo,Q.; Xu,X.; Sheng,Z.; Ye,X.; Wang,M.(2014). High-level tetracycline resistance mediated by efflux pumps Tet(A) and Tet(A)-1 with two start codons. Journal of Medical Microbiology. 63: 1454–1459.

Winn, w.; Allen,S.;Koneman,W.; Procop,G.; Schreckenberger,P.and wood,G. (2006). Koneman's color Atls and textbook of Diagnostic microbiology. 6th ed .lippincott, Williams and wilkins. Pp: 277_285.

WHO.(2006).Diarrhoeal diseasesreference CD_rom., WHO,http: //www .who.int/1_26.

WHO.(2009).Diarrhea: why children are still dying what can be done.1_68.

Zeghad,N.; merghem,R.(2013). Antioxidant and Antibacterial activities of Thymus vulgaris L.Rom.J.BIOL,58(1):27-36.

Zeng, S.; Yu, F.; Chen, x.; cui,D.;Cheng,Y.,Xie,G.; Han, D.; Wang,Y.(2016). Enteropathogens in children less than 2 years of age with acute diarrhea: a5_ year surveillance study in the southeast coast of china.free PMC article.16(1):434.

Zervosen, A. ; Sauvage, E. ; Frere, J. ;Charlier, P. and Luxen, A. (2012) . Development of new drugs for an old target – the penicillin binding prpteins . J. Molecules . 17: 12478-12505 .

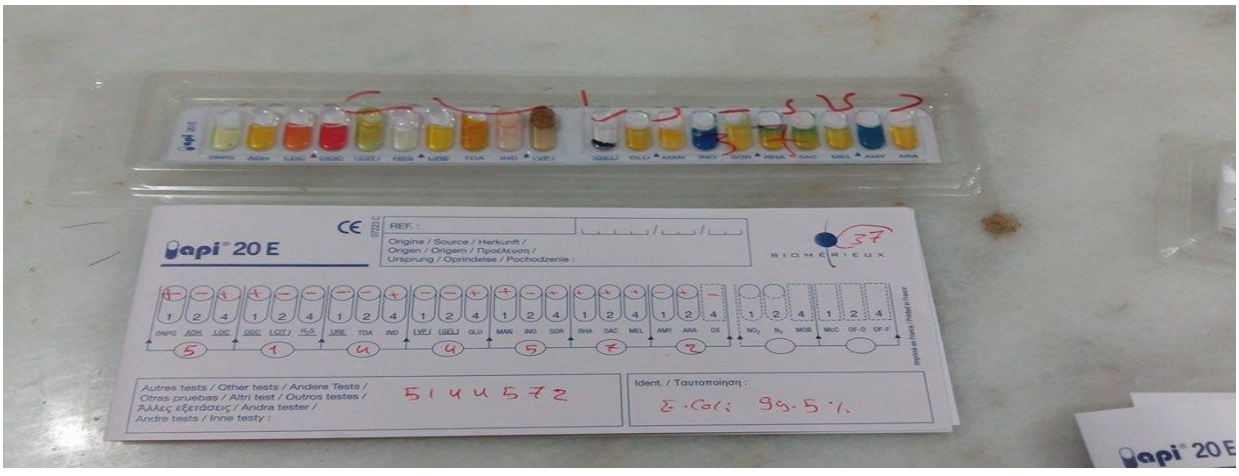
Appendices الملاحق

الملاحق

ملحق 1: الأختبارات الكيموحيوية لتشخيص عزلات بكتريا أشريشيا القولون بأستخدام نظام Api20 E

ت	ألاختبار	الرمز	النتيجة السالبة	النتيجة الموجبة
1	أنتاج أنزيم بيتا الكتوسايديز	ONPG	عديم اللون	أصفر
2	تحلل الارجنين	ADH	أصفر	احمر / برتقالي
3	تحلل اللايسين	LDC	أصفر	أحمر / برتقالي
4	ألاورنيثين	ODC	أصفر	أحمر / برتقالي
5	أستهلاك السترات	CIT	أصفر	أخضر / أزرق
6	أنتاج غازكبريتيد الهيدروجين	H2S	عديم اللون	راسب اسود
7	أنتاج أنزيم اليوريز	URE	أصفر	أحمر برتقالي
8	أنتاج أنزيم تربتوفانديامنيز	TDA	أصفر	بني غامق
9	أنتاج الاندول	IND	حلقة صفراء	حلقة حمراء
10	أنتاج الاسيتون	VP	عديم اللون	وردي /أحمر

11	أنتاج أنزيم محلل الجلاتين	GEL	عدم أنتشار الصبغة	أنتشار صبغة سوداء
12	تخمر سكر الكلكوز	GLU	أزرق	أصفر
13	تخمر المانيتول	MAN	أزرق	أصفر
14	تخمر الاينوسيتول	INO	أزرق	أصفر
15	تخمر السوربيتول	SOR	أزرق	أصفر
16	تخمر الرامينوز	RHA	أزرق	أصفر
17	تخمر السكروز	SAC	أزرق	أصفر
18	ميليبايوز	MEL	أزرق	أصفر
19	أمكدالين	AMY	أزرق	أصفر
20	ألارابينوز	ARA	أزرق	أصفر



ملحق 2: نتائج الأختبارات لتشخيص عزلات بكتريا أشريشيا القولون بأستخدام نظام Api20 E

ملحق 3: الفحوصات الكيموحيوية التي يقوم بها جهاز VITEK 2

رقم الحفرة	اسم الاختبار	المختصر	تركيز المركب
2	Ala –Phe-Pro-ARYLAMIDASE	APPA	0.0384 mg
3	ADONITOL	ADO	0.1875 mg
4	L-Pyrrolydonyl –ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
5	L-ARABITOL	IARL	0.3 mg
7	D-CELLOBIOSE	dCEL	0.3 mg
9	BETA –GALACTOSIDASE	BGAL	0.036 mg
10	H2S PRODUCTION	H2S	0.0024 mg
11	BETA -N –ACETYL -GLUCOSAMINDASE	BNAG	0.0408 mg
12	Glutamyl Arylamidase Pna	AGLTp	0.0324 mg
13	D-GLUCOSE	Dglu	0.3 mg
14	GAMMA -GLUTAMYL -TRANSFERASE	GGT	0.0223 mg
15	FERMENTATION /GLUCOSE	OFF	0.45 mg
17	BETA -GLUCOSIDASE	BGLU	0.036 mg
18	D –MALTOSE	dMAL	0.3 mg
19	D-MANNITOL	Dman	0.1875 mg
20	D-MANNOSE	Dmne	0.3 mg
21	BETA –XYLOSIDASE	BXYL	0.0324 mg
22	BETA-Alanine aryamidase Pna	BAlap	0.0174 mg
23	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0.0234 mg
26	LIPASE	LIP	0.0192 mg

0.3 mg	PLE	PALATINOSE	27
0.0276 mg	TyrA	Tyrosine ARYLAMIDASE	29
0.15 mg	URE	UREASE	31
0.1875 mg	dSOR	D-SORBITOL	32
0.3 mg	SAC	SACCHAROSE /SUCROSE	33
0.3 mg	dTAG	D-TAGATOSE	34
0.3 mg	Dtre	D-TREHALOSE	35
0.054 mg	GIT	CITRATE (SODIUM)	36
0.15 mg	MNT	MALONATE	37
0.3 mg	5RG	5-KETO –D –GLUCONATE	39
0.15 mg	ILATK	L-LACTATE alkalipisation	40
0.036 mg	AGLU	ALPHA –GLUCOSIDASE	41
0.15 mg	SUCT	SUCCINATE alkalipisation	42
0.0306 mg	NAGA	Beta –N-ACETYL –GALACTOSAMINIDASE	43
0.036 mg	AGAL	ALPHA-GALACTOSIDASE	44
0.0504 mg	PHOS	PHOSPHATASE	45
0.012 mg	GlyA	Glycine ARYLAMIDASE	46
0.3 mg	ODC	ORNITHINE DECARBOXYLASE	47
0.15 mg	LDC	LYSINE DECARBOXYLASE	48
NA	ODEC	DECARBOXYLASE BASE	52
0.087 mg	IHISa	L-HISTIDINE assimilation	53
0.126 mg	CMT	COURMARATE	56
0.0378 mg	BGUR	BETA –GLUCORONIDASE	579
0.0105 mg	O129 R	O/129 RESISTANCE (comp. vibrio.)	58
0.0576 mg	GGAA	GLU-GLY-Arg-ARYLAMIDASE	59
0.042 mg	IMLTa	L-MALATE assimilation	61
0.03 mg	ELLM	ELLMAN	62
0.186 mg	ILATa	L-LACTATE assimilation	64

ملحق 4: نتيجة التشخيص الجرثومي بواسطة جهاز VITEK 2

bioMerieux Customer

System#:11612 Printed
Jan 14,2016

Patient Name: Printed by Lab
Admin

Isolate Group:178-1 Patient
ID:44

Card Type GN Testing Instrument:0000148FF4B8(10140)

Bionumber:0043053003500240

Organism Quantity:

Comments:			
Identification Information	Card: GN	Lot Number: 241330940	Expires:Aug8,2017 12:00 CDT
	Completed:Jan 3,2016 6: 19 CST	Status: Final	Analysis Time: 4.75 hours
Slected Organism	99% Probability Escherichia coli Bionumber: 0405610454526610		Confidence:Excellent Identification
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern (s)			

Biochemical Details																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	Dcel	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	Dtag	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39 ¤	5KG	+
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTA	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Summary

This study was conducted in Al Batoul Teaching Hospital for the period starting from 25/ 9/2016 to 1/2/2017 ,Two hundred stool samples was collected from infant with two-year-olds or less suffer from Amoebic dysentery diarrhea , All stool specimens were initially cultured on MacConkey agar , The colony morphology was thoroughly investigated , Others biochemical tests were done according to standard procedures which include catalase, oxidase and IMViC tests and then diagnosed by ApiE20 , Final diagnosis and confirmation of the isolated was achieved by using the VITEK 2 (Biomeriex- France).

Fifty isolates of *Escherichia coli* were recovered from males and female of different ages, This study was conducted to highlight the effect of several factors in the percentage of the presence of *Escherichia coli* such as sex , age, housing and the type of breastfeeding, where these bacteria were found in a larger proportion in children dependent on artificial breastfeeding with a prevalence rate of 76% and with a very high significantly statistical difference (P = 0.001), The rate of infection also disparity with age and sex , The bacterial diagnosis of all these isolates (100%) were confirmed by VITEK2.

The antibiotic susceptibility patterns for 15 antibiotics were carried out using the Kerby-Bauer technique , The antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates to cephalosporines was appeared to be variable, so that the resistant rate to Cefixime , Cefuroxime , Ceftriaxone and Cefoxitin were 88% , 90% , 84% , 12% respectively, The resistant ratio of all isolate to Meropenem antibiotic was 0%.

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the Cefixime , Cefuroxime , Ceftriaxone and Tetracyclin were determined by serial double dilutions technique , The values of the minimum inhibitory concentrations of Cefixime ranged between 32 _512 µg / ml, Cefuroxime,

MIC values of 32_1024 µg / mL, Ceftriaxone MIC values of 32_1024 µg / mL and Tetracyclin MIC values of 16_512 µg / ml.

Additionally, all *Escherichia coli* isolates were investigated for the production of virulence factors which include production of Hemolysin and bacteriocin , 96% of isolates from the infant's stool were appeared to have the ability to produce hemolysin , whereas 4% of isolates produce bacteriocin with a very high significantly statistical difference (P = 0.001).

The effect of pomegranate peel extract and Thyme leaf extract On *Escherichia coli* bacteria was observed ,The bacterial isolates showed a high sensitivity to Alcoholic extracts of pomegranate peel followed by the hot and cold water extract , Where the rate of diameters of the inhibition zone at the concentration 100 mg / ml 21.92, 18.02 and 14.02 mm respectively. Significant differences were observed between the efficacy of plant extracts and the other concentrations used in the study

The inhibitory activity of Thyme leaf extract at a concentration of 100 mg / ml for Alcoholic , hot and cold water extract 11.3, 9.8 and 3.22 mm respectively, There were significant differences between the extracts.

Finally, *Lactobacillus* bacteria were isolated from the stools of day-old children and were dependent on breastfeeding by 15% , and were also isolated from the vaginal wall by 11.4% , The colony morphology was thoroughly investigated , and others biochemical tests and sugar fermentation testing were done , The effect of several factors on their growth was examined and These factors included pH, NaCL, bile salts and 0.4% phenol , The isolated that have ability to tolerate a wide range of pH and bile salts, was used as probiotic to determine the inhibitory effect on *E. coli* bacteria. The diameter of the *Lactobacillus* inhibition zone on 50 isolates of *Escherichia coli* 22.82 mm.

We conclude from this study that inhibitory effect of *Lactobacillus* bacteria on *Escherichia coli* was higher than antibiotics and extracts of pomegranate and thyme plants

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Research
Diyala University
College of Science

The effect of *Lactobacillus* on *Escherichia coli* associated with *Entamobia histolytica* that causes diarrhea in infant.

Submitted to the Department of Biology, College of Science, Diyala University, in Partial Fulfillment of Requirements for the Degree of Master of Science in Biology

By

Doaa Mahmood Mahdy

Supervised By

Assist.Prof.Dr.Kareem Ibrahim Mubarak