عزل وتشخيص البكتريا الهوائية من مرضى التهابات القناة التنفسية مع وصف جزئي لمحتواها البلازميدي

خالد دحام احمد
رواء ججي سالم
قسم علوم الحياة ، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة الموصل

استلم في: 3 ايلول 2015 ،قبل في: 12 حزيران 2016

الخلاصة

تم في هذه الدراسة عزل بكتريا من قشع المرضى المصابين بالتهابات القناة التنفسية في مستشفى ابن سينا التعليمي في مدينة الموصل- العراق اخضعت البكتريا للفحوصات المظهرية والزرعية و الكيموحيوية اللازمة لتشخيصها إذ تم الحصول على 25 عزلة والتي ضمت ستة انواع بكتيرية مختلفة وهي *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus pneumonia*، *Moraxella cattarhalis*، *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumonia* و *Pseudomonas aeruginosa* بالنسب التالية (64%،12%،8%،8%،4%،4%) على التوالي. ودرست حساسية ومقاومة هذه العزلات لـ 12 مضادا حيويا إذ كان مضاد الجنتامايسين هو الاكثر تأثيرا على غالبية العزلات بينما قاومت جميع العزلات حامض النالدكسيك بنسبة 100%. و ايضا تم الكشف عن محتوى الDNA البلازميدي اربعة انواع منها وتبين ان هناك احجام مختلفة من البلازميدات فيها.

الكلمات المفتاحية: البكتريا، التهابات القناة التنفسية، المحتوى البلازميدي.

المقدمة

تعد التهابات القناة التنفسية Respiratory tract infections من بين اكثر الامراض الشائعة التي تصيب البشر في جميع انحاء العالم ومن المشاكل الصحية العامة الرئيسة وعاملا مسببا للأمراض والوفيات في العديد من البلدان النامية [1،2]. القناة التنفسية هي موقع متكرر للعدوى لأنها باتصال مباشر مع البيئة الطبيعية وهي معرضة للكائنات المجهرية المحمولة جوا بضمنها الفيروسات، البكتريا، الفطريات والطفيليات [3]. إن الفهم الافضل للممرضات التي تسبب هذه الاصابات يمكن تمييزه كشرط يسمح بإيجاد طريقة منطقية للعلاج و هنالك حاجة لاسيما في الدول النامية للتشخيص المناسب للمسببات الميكروبية الرئيسة للالتهابات التنفسية في المجتمع و ايجاد العلاج المناسب المبني على اختبار الحساسية للمضادات الحيوية للعامل المسبب لغرض منع مزيد من الانتشار للكائن الممرض الذي بطريقة او اخرى يؤدي الى مضاعفات [4،5].

القناة التنفسية في الانسان لاسيما العليا هي مفتوحة طبيعيا للتلوث بوساطة الكائنات المختلفة لاسيما اللاهوائية بنسبة تصل 1:100 هوائية الى لاهوائية، الكائنات اللاهوائية عادة تشمل spp *Peptostreptococcus*، spp *Actinomyces*و spp. *Fusobacterium*. من جهة اخرى فإن الكائنات الهوائية المتواجدة كمتعايشات Commensilesغير مؤذية تشمل: spp *Streptococcus*(Viridans group) ،spp *Staphylococcus*، spp Enteriobacteriacea، spp *Corynobacterium* و spp. *Niesseria* [6].

والبكتريا الاكثر شيوعا كعوامل مسببة لالتهابات القناة التنفسية هي .spp *Streptococcus*،spp *Staphylococcus* ،.spp *Pseudomonas*،.spp *Proteus*،.spp *Klebsiella*،.spp *Enterobacter*،.spp *Acinetobacter* و *Haemophilus influenza*[7،8،9].

اوجدت في العقود الثلاثة الاخيرة الكثير من التقارير العلمية في الاستعمال غير المناسب للأدوية وانتشار المقاومة البكتيرية بين الكائنات المسببة لالتهابات القناة التنفسية [10،11]. واشار [12] ان المقاومة للمضادات الحيوية سوف تجعل الخيارات العلاجية لعلاج العدوى صعبة جدا و يكاد يكون مستحيلا في بعض الحالات، في حين بين [13] ان المقاومـة المنتقلة بالبلازميدات لها الـدور الأكبـر فالبلازميد قد يحوي عدداً من الجينات فيشفر للمقاومة المتعددة للمضادات وكذلك فـإن العناصر القافزة لها القدرة على حمل جينات المقاومـة وبإمكانها أن تقتحـم بلازميد اقتراني وأن تنتقل من بكتريا لأخـرى.

في دراسة اخرى وجد ان ست عزلات طبية وهي (.spp *Bacillus*، *Acinetobacter*

.spp، *E. coli*،*Klebsiella pneumonia*، .spp *Staphylococcus*،.spp *Pseudomonas*) امتلكت بلازميد المقاومة R- Plasmid المكتسب عن طريق نقل العناصر الوراثية المتنقلة والجينات المشفرة لمقاومة المضادات الحيوية كانت تقع على البلازميد بينما 3 عزلات التي هي (.spp *Proteus*، .spp *Enterococcus*، spp *Streptococcus*.) لم يظهر فيها البلازميد بالرغم من ابدائها مقاومة متعددة للمضادات ويعود السبب الى احتمال وقوع الجينات المشفرة للمقاومة على الكروموسوم [14].

اظهرت النتائج التي حصل عليها الباحثان [15] في دراسة على بكتريا *S.aureus* المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب الاذن الوسطى بمدينة البصرة بأن جميع عزلات بكتريا *S.aureus* التي تم الحصول عليها التي كان عددها 24 عزلة امتلكت بلازميدات ذات اوزان جزيئية كبيرة تراوحت من Kpb (22-21). اما الدراسة الاخرى للباحث [16] على بكتريا *S.aureus* والمكورات العنقودية السالبة لأنزيم التخثر Coagulase negative Staphylococci (CoNS)

المعزولة من نماذج طبية من مستشفى في نيجيريا، تبين انها تمتلك بلازميدات تراوحت احجامها من Kpb (23.13-2.03).

يهدف هذا البحث الى معرفة اهم الانواع البكتيرية المعزولة من الالتهابات التنفسية وتشخيصها ودراسة حساسيتها لبعض المضادات الحيوية مع دراسة جزيئية لأنماطها البلازميدية.

المواد وطرائق العمل

عزل البكتريا وتشخيصها: عزلت البكتريا من 25 عينة من القشع Sputum للمرضى المصابين بالتهابات القناة التنفسية وباعمار مختلفة من شهر اب لغاية تشرين الاول من عام 2013 وتم زرع العينات على وسط اكار الدم وحضنت الأطباق بدرجة (37) °م لمدة 24 ساعة من أجل تنميتها ثم نقلت الى وسط اكار الماكونكي Macconkey Agar Medium بطريقة التخطيط Streaking لغرض تنقيتها والتأكد من قابلية البكتريا المعزولة على تخمير سكر اللاكتوز من عدمه وايضا تم تنمية العزلات على وسط المانيتول الملحي Mannitol Salt Agar Medium ووسط اكار الدم المطبوخ Chocolate agar و ثم اجريت عليها الاختبارات الشكلية والكيموحيوية حسب [17،18،19،20،21] .

اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية : تم اختبار مقاومة العزلات لـ 12 مضادا حيويا حسب طريقة [22] والجدول (1) يبين التراكيز المستعملة لهذه المضادات.

عزل الـ DNA البلازميدي وتوصيفه جزئيا : استعملت طريقة التحلل القاعدي Alkaline Lysis في عزل محتوى الـ DNA البلازميدي للعزلات قيد الدراسة حسب طريقة [23] ثم رحل محتوى الـ DNA البلازميدي المعزول كهربائيا في جهاز الترحيل الكهربائي وباستعمال هلام الاكاروز بتركيز 0.7% واستعمل فرق جهد 45 فولت لمدة 15 دقيقة بعد ذلك تم رفع الفولتية الى 70 فولت ولمدة 3 ساعات. صبغت قطعة الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم بتركيز نهائي 50 مايكروغرام/مل ولمدة 15 دقيقة. نقلت قطعة الهلام الى جهاز التألق الاشعاعي UV-Transilluminatorعند طول موجي (320 نانوميتر) داخل غرفة مظلمة للكشف عن حزم الأحماض النووية في العينات المختبرة ثم صورت قطعة الهلام باستعمال الكاميرا الرقمية [24].

النتائج والمناقشة

عزل البكتريا وتشخيصها

عزلت 25 عزلة بكتيرية من عينات القشع وشخصت مختبرياً وذلك بإجراء الفحوصات التشخيصية التي تتضمن الاختبارات المظهرية والكيموحيوية، الجدول (2) يوضح نتائج الاختبارات الكيموحيوية للعزلات قيد الدراسة. إذ تم الحصول على ستة انواع بكتيرية مختلفة وكانت البكتريا الاكثر شيوعا هي البكتريا الموجبة لصبغة كرام إذ حصلنا على نوعين هما بكتريا *Staphylococcus aureus* بنسبة 64% إذ كان مجموع العزلات هي (16) عزلة تلتها (3) عزلات من *Streptococcus pneumonia*بنسبة 12% ،اما البكتريا السالبة لصبغة كرام فضمت 4 انواع بكتيرية وهي (2) عزلة من كل من *Moraxella cattarhalis* و *Escherichia coli* بنسبة 8% لكل منهما و عزلة واحدة من كل من *Klebsiella pnuemoniae* و*Pseudomonas aeruginosa* بنسبة 4 % . جاءت نتائج العزل متقاربة مع [25،26] وكانت متوافقة مع [27] اذ ان بكتريا *S.aureus* هي الاكثر انتشارا بحالات التهاب القناة التنفسية بينما لم تتوافق مع [28،29] اذ ان بكتريا *Haemophilus influenza* و*P.aeruginosa* هي الاكثر انتشارا على التوالي وان عدم ظهور

الانواع الاخرى من البكتريا الممرضة ربما بسبب كون الدراسة الحالية اقتصرت على عدد محدود من العينات بينما شملت الدراسات الوبائية المذكورة عددا اكبر منها .

اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية

تم الكشف عن قابلية مقاومة العزلات البكتيرية المعزولة من التهابات القناة التنفسية لـ (12) نوعا من المضادات الحيوية والجدول (3) يوضح مقاومة العزلات للمضادات الحيوية معبراً عنها بالعدد والنسب المئوية إذ نجد ان اعلى مقاومة للعزلات البكتيرية للمضادات الحيوية المستعملة في الدراسة الحالية كانت لحامض النالديكسيك (Nx) بنسبة 100% تلتها مقاومة الامبسلين (AP) بنسبة 88.2% ثم الارثرومايسين (Er) بنسبة 83% و الريفامبين (Rf) 61.8% والترايمثبريم (Tri) 61.4% و السيفالكسين (Cf)54.9 % و التتراسايكلين (Tc) بنسبة 29.9% و الستربتومايسين (Sm) 29.1% والكلورامفنيكول (Cm) 13.6% واقل مقاومة كانت للجنتامايسين (Gen) بنسبة 8.3%.

نجد ايضا ان اكثر العزلات مقاومة للمضادات كانت عزلات بكتريا *E. coli* إذ بلغت نسبة مقاومتها 70% لجميع المضادات تلتها عزلة بكتريا *P.aeruginosa* بنسبة 60% ثم عزلات بكتريا *M.cattarhalis* بنسبة 55% و *St. pneumonia* بنسبة 50% و عزلات بكتريا *S. aureus* بنسبة 43.2% واخيرا عزلة النوع البكتيري *K. pnuemoniae* بنسبة 40% .توافقت هذه النتائج مع دراسة [30] الذي ذكر بأن بكتريا *S. aureus* كان لها معدل مقاومة اقل نسبيا من البكتريا السالبة لصبغة كرام والسبب ربما يعود الى انتاج انزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف extended spectrum beta-lactamase من قبل البكتريا السالبة[31].

يظهر لنا بأن العزلات قيد الدراسة من بكتريا *S.aureus* كانت مقاومة للمضاد Methicillin وبنسبة (75%) وهذه النتيجة اتفقت مع دراسة[32] الذين اشاروا على قدرة بكتريا *S. aureus* العالية على مقاومةMethicillin. ان معظم المكورات الذهبية المقاومة للمثيسيلين تكون ذات مقاومة متعددة للادوية Multidrug resistant فتمتلك مقاومة عالية للمضادات الحيوية المضادة للمكورات Antistaphylococcal Antimicrobials كالبنسيلينات المقاومة للبنسلين والارثرومايسين والجنتاميسين والكلورامفينكول والـ Fluroquinolones وحتى الفانكومايسين وان سبب ذلك يعود الى الاستعمال غير العقلاني والعشوائي دون استشارة طبية لهذه المضادات [33].

توافقت نتائج [9،34] مع نتائج دراستنا اذ ان العزلات التنفسية تظهر حساسية كبيرة اتجاه(Gen) و حساسية معتدلة اتجاه الكلورامفنيكول (Cm) وتتباين مع دراسة [8] التي تبين ان العزلات مقاومة لـ (Gen)و(Sm) بينما نتائج دراستنا تبين مقاومة معتدلة لـ(Sm) وحساسية لـ(Gen)وهذه التباينات في النتائج ربما تعود الى اختلاف تركيز المضاد المستعمل .

عزل الـ DNA البلازميدي وتوصيفه جزئيا

بعد استخلاص محتوى الـ DNA البلازميدي من العزلات البكتيرية قيد الدراسة، جرى توصيف نماذج الـDNA المحضرة و الشكل (1) يوضح النتائج إذ نلاحظ فيه إن بكتريا *S. aureus* المتمثلة بالاعمدة من 2-16 اظهرت حزمة واحدة من الـDNA البلازميدي في الاعمدة (2،3،5،6،9،14،15،16) وبحجم اكبر بقليل من 23 kbp بدلالة الدليل الحجمي للمدا DNA المهضوم بالانزيم القاطع Hind III وكانت جميعها باحجام واحدة لقطعها مسافات متساوية في الهلام وهي حزم واضحة ومنفصلة خارجة من القطب السالب باتجاه القطب الموجب. كذلك نلاحظ في الاعمدة (7،8،10،11،12،13) عدم ظهور حزم من الـDNA البلازميدي وظهور حزم الـRNA فقط وهذا يعني بأن نماذج الـDNA خالية من حزم البلازميدات بينما في العمود(4) المتمثل بالعزلة رقم (3) نلاحظ عدم ظهور اي نوع من الاحماض النووية وربما يعود السبب الى فقدان المادة النووية اثناء التحضير . اما العزلة رقم (16) من بكتريا *S. aureus*

المكررة في الاعمدة (18،19) نلاحظ وجود عدة حزم من الDNA البلازميدي وباحجام مختلفة إذ إن الحجم الاول اكبر من 23 kbp بينما الحجم الثاني يقع بين 6kbp و 7 kbp . أما الحزمتين الاخيرتين فاحجامها اصغر من 5kbp. لكونها قطعت مسافة اطول من الحزم الاخرى في هلام الاكاروز(بدلالة الدليل الحجمي لمدى الDNA المهضوم بالانزيم القاطع BamH I) ، ظهور عدة حزم من الDNA في هذه العزلة ربما يعود بسبب كونها حاوية على بلازميدات مختلفة الاحجام مما قد يجعلها ذات مقاومة عالية للمضادات الحيوية.

كذلك من الشكل (1) نلاحظ ان الانواع البكتيرية السالبة لصبغة كرام اظهرت حزما من الDNA البلازميدي إذ ان الاعمدة 21 و22 التي تمثل الDNA البلازميدي المعزول من عزلتي بكتريا *E.coli* إذ اظهرت العزلة الاولى حزمة واحدة واضحة ومنفصلة من الDNA البلازميدي وبحجم مساو تقريبا لـ 23 kbp . بينما العزلة الثانية اظهرت حزمتين من الDNA البلازميدي باحجام صغيرة لقطعها مسافة اطول في الهلام. الاعمدة 23 و24 المتمثلة بعزلات بكتريا *P.aeruginosa* و*K. pneumonia* على التوالي فقد ظهر فيها حزمة واحدة وواضحة من الDNA البلازميدي لكل من العزلات وبحجم مساو لحجم حزمة الDNA البلازميدي التي اظهرتها العزلة الاولى لبكتريا*E.coli* اي بحجم 23 kbp.

من نتائج دراسة توصيف محتوى الـ DNA البلازميدي للعزلات البكتيرية قيد الدراسة نجد أن دراسة[35،36]تتطابق مع نتائج دراستنا كون ان بعض عزلات بكتريا *S. aureus* اظهرت بلازميدات باحجام مساوية او اكبر من 23 kp وبعض العزلات لم تظهر اي بلازميدات وهذا ربما يعود لمصادر العزل والاصابات المختلفة، وكذلك تطابقت مع نتائج الباحث [37] اذ ان احدى عزلات بكتريا *S. aureus* اظهرت 4 حزم من البلازميدات وباحجام مختلفة. كذلك تطابقت نتائج عزلتي بكتريا *E. coli* قيد الدراسة مع نتائج الباحثة [38] نظرا لكون احدى العزلتين اظهرت بلازميدا واحدا بينما الاخرى اظهرت بلازميدين باحجام صغيرة. بينما لم تتفق نتائج دراستنا بالنسبة لعزلة بكتريا *K. pneumonia* كثيرا مع نتائج [39] لكون عزلة الدراسة الحالية انتجت حزمة واحدة فقط من البلازميدات بينما نتائج البحث المذكور اظهرت حزمتين وربما يعود السبب لكون دراستنا اقتصرت على عزلة واحدة بينما الدراسة الاخرى شملت عددا اكبر من العزلات.

المصادر

1. Carroll,K.C. (2002), Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections:Controversy and conundrums. *J ClinMicrobiol*., 40(9):3115-20.
2. Jacobs, E.; Dalhoff, A. and Korfmann, G.(2009),Susceptibility patterns of bacterial isolates from hospitalised patients with respiratory tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*., 33: 52–57.
3. Imani, R. ; Rouhi, H. and Ganji, F.,(2007), Prevalence of antibiotic resistance among bacteria isolates of lower respiratory tract infections in COPD Shahrekord, Iran. Pakistan. *J. Med. Sci*., 23(3): 438-440.
4. Gauchan, P. ; Lekhak, B. and Sherchand, JB.,(2006), The Prevalence of lower respiratory tract infection in adults visiting Tribhuvan University Teaching Hospital.*Journal of Institute of Medicine*., 28(2):10-14.

5. Veloo,A.C. ; Seme, K. ; Raangs, E. ; Rurenga, P. ; Singadji, Z. ; Wekema-Mulder,G. and vanWinkelhoff, A.J.(2012), Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *Int J Antimicrob Agents. Nov*., 40(5):450-4.
6. Murrray, P. R. ; Rosenthal, K. S. ; Kobayashi, G. S. and Pfaller, M. A.(1998),Microbial Flora in health and disease: In Medical Microbiology 3rd ed. Section1pp 70. Mosby, Inc. St Louis Missouri.
7. Rudan, I. ; Boschi-Pinto, C. ; Biloglav, Z. ; Mulholland, K. and Campbell, H. (2008) ,Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bulletin of the World Health*., org86: 408-416
8. El-Mahmood, A. M. ; Isa, H. ; Mohammed, A. and Tirmidhi, A.B. (2010), Antimicrobial susceptibility of some respiratory tract pathogens to commonly used antibiotics at the Specialist Hospital, Yola, Adamawa State, Nigeria. *Journal of Clinical Medicine and Research*., 2(8): 135-142.
9. Taura, D.W. ; Hassan, A. ; Yayo, A.M. and Takalmawa, H. (2013), Bacterial isolates of the respiratory tract infection and their current sensitivity pattern among patients attending Aminu Kano Teaching Hospital Kano-Nigeria. *International Research Journal of Microbiology*., 4(9): 226-231.
10. Imani, R. ; Rouchi, H. and Ganji, F.(2007), Prevalence of antibiotic resistance among bacteria isolates of lower respiratory tract infection in COPD Shahrekord – Iran, 2005. *Pak. J. Med. Sc*., 23(3): 438-440.
11. Tenever, F.C. and McGowan, J.E Jr. (1996), Reasons for the emergence of antibiotic resistance. *Am. J. Med. Sci*., 311(1): 9-16.
12. Grenet, K.D. ; Guillemot, V. ; Jadier, B. ; Moteau, S. ; Dubourdier, R. ; Ruiny, B. ; Armand, B.P.; Bau, B. and Andremont, A. (2004), Antibacterial resistance, Wagen, Amerindians, French Guyana. *Emerg. Infect. Dis*., 10(6):1150-1153.
13. Kapil, A., (2005),The challenge of antibiotic resistance: need to contemplate. *Indian J. Med. Res*., 121(2): 83-91.
14. Ajao, A. T. and Yakubu, S. E. (2014), Identification, Characterization and Plasmid Profiling of Multi Drug Resistant Nocomial Pathogens Isolated from Selected Hospitals in Ilorin Metropolis.*British Microbiology Research Journal* . 5(1): 33- 43.
15. Al-Hamdani, M. H. I.(2012), Study of plasmid profile, susceptibility patterns of clinical *Staphylococcus aureus* isolated from patients with otitis media in Basrah. *Journal of Basrah Researches ((Sciences))*., 38(1): 79-89.

16. Tula, M.Y. ; Azih, A.V. and Okojie, R.O. (2013), Antimicrobial susceptibility pattern and plasmid-mediated antibacterial resistance in Staphylococcus aureus and Coagulase-negative Staphylococci (CoNS). American Journal of Research Communication., 1(9).

17. Baron, E. J. ; Pezzlo, M. T. and Delamaza, L. M. (1997),Color Atlas of Diagnostic Microbiology. Mosby-Year Book, United States of America, PP(25-92).

18. Koneman, E. W. ; Allen, S. D. ; Janda, W. M. ; Schreckenberge, P. C. and Winn, W. C., (1997), Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology.5th ed., J. B. Lippincott Company, Philadelphia, U.S. A.

19. Harley, J. P. and Prescott, L. M., (2002), Laboratory Exercises in Microbiology.5thed., WCB/ McGraw-Hill Companies, Inc.

20. Atlas, R.M. (1995), Principles of Microbiology. 1st ed., Mosby-Year Book, Inc., St-Louis, USA.

21. Benson, H. J. (2002), Microbiological, 8thed, McGraw Hill Companies, Inc; PP(130-155).

22. Timmis, K. N. and Puhler, A. (1979), Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance. Developments in Genetics, 1, Elsevier / North- Holland Biomedical press, Amsterdam, Netherlands.

23. Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979), A rapid alkaline extraction procedure for screening recombination plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*., 7(6): 1513-1523.

24. Timmis, N. K. and Puhler, A. (1984), Advanced in Molecular Genetics. Springer-Verlarg, New York, U. S. A.

25. Watanabe, A. ; Oizumi, K. ; Matsuno, K. ; Nishino, T. ; Motomiya, M. and Nukiwa, T., (1995), Antibiotic susceptibility of the sputum pathogens and throat swab pathogens isolated from the patients undergoing treatment in twenty-one private clinics in Japan. *Tohoku J Exp Med*., 175(4):235-247

26. Manikandan, C. and Amsath, A. (2013), Antibiotic Susceptibility of bacterial strains isolated from patients with respiratory tract infections. *Int. J. Pure Appl. Zool*., 1(1): 61-69.

27. Kousalya, K. ; Thirumuruqu, S. ; Arumainayaqam, D.C. ; Manavalan, R. ; Vasantha, J. and Reddy, C.U. (2010), Antimicrobial resistance of bacterial agents of the upper respiratory tract in South Indian population. *J Adv Pharm Technol Res.*, 1(2):207-215.

28. Ozylimaz, E. ; Akan, O.A. ; Gulhan, M. ; Ahmed, K. and Nagatake, T. (2005), Major bacteria of community- acquired respiratory tract infections in Turkey. *Jpn. J. Infect. Dis*., 58(1):50- 52.

29. Srifuengfung, S. ; Tribuddharat, C. ; Yung Yuen, T. and Wensentia, T. (2005), Respiratory tract infection caused by bacteria (Non-Mycobacterium) and their antibiogram in HIV- positive patients. *South east Asian J. Trop.Med. Public Health*. 36(3): 709-712.

30. Mohiuddin, M.D. ; AshrafulHaq, J. ; MozammelHoq, M.D. and Farida, H.,(2010),Microbiology of nosocomial infection in Tertiary Hospitals of Dhaka city and its impact. *Bangladesh.J. Med Microbiol*.,4(2):32-38.

31. Pitout, J.D.D. ; Thomson, K.S. ; Hanson, N.D. ; Ehrhardt, A.F.; Moland, E.S. and Sanders, C.C.(1998), Beta Lactamase responsible for resistant to expanded-spectrum cephalosporium in *Klebsiella pneumoniae, E. coli* and *Proteus mirabilis* isolates recovered in south Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.,42(6):1350-54.

32. Liu, C. and Chambers, H. F. (2003), *Staphylococcus aureus* with heterogenonus resistance to vancomycin epidemiology, clinical significant and critical assessment of diagnostic methods. *J. Antimicrobchemother*. 47 (10) : 3040 – 3045.

33. Qureshi, A. ; Rafi, S. ; Qureshi, S. M. and Ali, A. M. (2004), The current susceptibility patterns of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to conventional antistaphylococcus antimicrobials at rawalpindi. Pak. *J. Med. Sci*., 20 (4) : 361 – 464.

34. Ndip, R. N. ; Ntiege, E. A. ; Ndip, L. M. ; Nkwelang, G. ; Akoachere, J-F. T.K. and NkuoAkenji, T.(2008), Antimicrobial Resistance of Bacterial Agents of the Upper Respiratory Tract of School Children in Buea, Cameroon. *J Health Populnutr*., 26(4): 397-404.

35. Jayaraman, S. ; Manoharan, M. ; Illanchezian, S. ; Sekher, R. and Sathyamurthi, P.,(2008), Plasmid Analysis and Prevalence of Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus* Reservoirs in Chennai City, India. *The Internet Journal of Microbiology*., 7(1): p23.

36. Daini, O. A. and Akano, S. A. (2009),Plasmid-mediated antibiotic resistance *Staphylococcus aureus* from patients and non patients. *Scientific Research and Essay*., 4(4):346-350.

37. Ugbogu, O.C. ; Akinsade, A. K. ; Nwokocha, K. O. and Ahuama, O.C. (2011), Plasmid Profile of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from University Students. *Nigerian of Journal of Microbiology*.. 25: 2363 – 2368.

38. Jan, N. ; Meshram, S.U. and Kulkarni, A. (2009), Plasmid profile analysis of multidrug resistant *E. coli* isolated from UTI patients of Nagpur City, India. *Romanian Biotechnological Letters*., 14(5): 4635-4640.

39. Al-Muhanna, A. and Jasim, M., (2012), Detection of Plasmid Profile coding Antibiotic Resistance of *Klebsiella* spp. Isolated From Different Infection. *Al-Kufa Journal for Biology*., 4 (1):275-281.

جدول (1) تراكيز المحاليل الخزينة والنهائية والسوائل المذيبة للمضادات الحيوية

ت	المضادات الحيوية	الرمز	التركيز الخزين mg/ml	التركيز النهائي µg/ml	المذيب
1	Ampicillin	Ap	5	50	ايثانول 70%
2	Cephalexin	Cf	5	60	ماء مقطر معقم
3	Chloramphenicol	Cm	5	30	ايثانول مطلق
4	Erythromycin	Er	5	50	ايثانول 70%
5	Gentamycin	Gen	40	60	سائل
6	Methicillin	Met		10	disc
7	Nalidixic acid	Nx	5	100	0.1N NaOH
8	Novobiocin	Nov		30	disc
9	Rifampicin	Rf	5	50	ميثانول
10	Streptomycin	Sm	5	100	ماء مقطر معقم
11	Tetracycline	Tc	5	10	ايثانول50%
12	Trimethprim	Tri	5	50	ايثانول 70%

جدول (2) الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة لتشخيص الانواع البكتيرية المعزولة قيد الدراسة

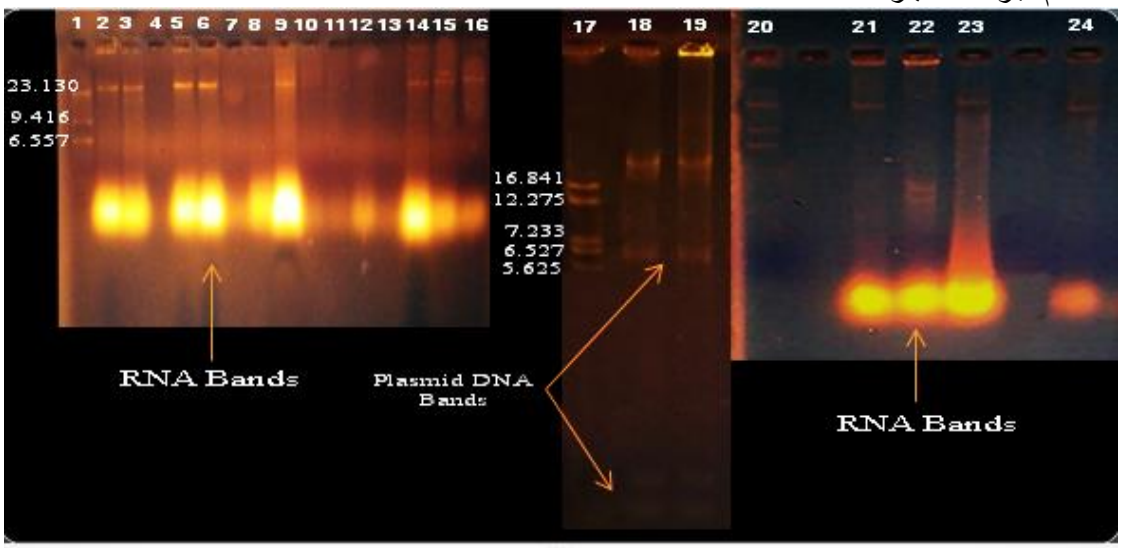
العزلات البكتيرية	العدد	اختبارات IMViC				اختبار الكاتاليز	اختبار الاوكسيديز	اختبار التخلط	اختبار تحلل الدم	اختبار الحركة	اختبار الهيبرز	اختبار تميع الجيلاتين	اختبار الفينايل الانين	تخمير السكريات			
		الاندول	المثيل الاحمر	الفوكس بروسكر	استهلاك السترات									مانيتول	مالتوز	ارابينوز	كلوكوز
S.aureus	16	ND	ND	ND	ND	+	-	+	β	-	V	V	-	+	+	+	+
St. pneumonia	3	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	α	-	-	-	-	-	+	-	+
M. cattarhalis	2	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	γ	-	-	-	-	-	-	-	-
E. coli	2	+	+	-	-	+	-	ND	γ	+	-	-	-	+	-	+	+
K. pnuemoniae	1	-	-	+	+	+	-	ND	γ	-	+	-	-	+	+	+	+
P. aeruginosa	1	-	-	-	+	+	+	ND	α	+	-	+	-	-	-	-	+

+ النتيجة الموجبة للاختبار - النتيجة السالبة للاختبار V متباينة في نتيجة الاختبار ND عدم اجراء الاختبار
α التحلل الجزئي للدم β التحلل الكامل للدم γ عدم وجود تحلل للدم

جدول (3) مقاومة البكتريا المعزولة من التهابات القناة التنفسية للمضادات الحيوية معبراً عنها بالعدد والنسبة المئوية (%)

Tri العدد (%)	Tc العدد (%)	Sm العدد (%)	Rf العدد (%)	Nov العدد (%)	Nx العدد (%)	Met العدد (%)	Gen العدد (%)	Er العدد (%)	Cmالعدد (%)	Cf العدد (%)	Ap العدد (%)	عدد	العزلة
3 (18.8)	10 (62.5)	4 (25)	6 (37.5)	3 (18.8)	16 (100)	12 (75)	0 (0)	13 (81.3)	5 (31.3)	2 (12.5)	10 (62.5)	16	*S.aureus*
3 (100)	2 (66.7)	0 (0)	1 (33.3)	-	3 (100)	-	0 (0)	2 (66.7)	0 (0)	2 (66.7)	2 (66.7)	3	*St. pneumonia*
2 (100)	0 (0)	2 (100)	1 (50)	-	2 (100)	-	0 (0)	1 (50)	0 (0)	1 (50)	2 (100)	2	*M. cattarhalis*
1 (50)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	-	2 (100)	-	1 (50)	2 (100)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2	*E. coli*
0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	-	1 (100)	-	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1	*K. pnuemoniae*
1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)	-	1 (100)	-	0 (0)	1 (100)	0 (0)	1 (100)	1 (100)	1	*P. aeruginosa*

- عدم اجراء الاختبار



شكل (1) الترحيل الكهربائي لمحتوى الـDNA البلازميدي في هلام الاكاروز (0.7%) للعزلات البكتيرية قيد الدراسة.
اذ يشير العمود 1و 20: λDNA مهضومة بالانزيم القاطع Hind III
2-16: محتوى الDNA البلازميدي لـ 15 عزلة من بكتريا S. aureus
17: λDNA مهضومة بالانزيم القاطع BamH I
18 و 19: محتوى الDNA البلازميدي مكرر لعزلة بكتريا S. aureus رقم (16)
21-22: محتوى الDNA البلازميدي لعزلات بكتريا E.coli
23: محتوى الDNA البلازميدي لعزلة بكتريا P.aeruginosa
24: محتوى الDNA البلازميدي لعزلة بكتريا K. pneumonia

Isolation and Diagnosis of Aerobic Bacteria from Patients with Respiratory Tract Infection and Partial Characterization of Their Plasmid Profile

Khalid Daham Ahmed
Rawaa Jaji Salim
Dept. of Biology, College of Education for Pure Science ,
University of Mosul

Received in :3 September 2016 ,Accepted in: 12 June 2016

Abstract

In this study, the bacteria from sputum specimens of patients with respiratory tract infections were isolated in IbnSina Teaching Hospital, Mosul city, Iraq. The bacteria were subjected to phenotypic and biochemical tests necessary for identification. Twenty five isolates of six different bacterial species were obtained, they are : *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Moraxella cattarhalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pnuemoniae* and *Pseudomona saeruginosa* with ratios (64%, 12%, 8%, 8%, 4% and 4%) respectively. The sensitivity and resistance of these isolates to 12 antibiotic were studied, where the Gentamycin appear to be more effective on most of the isolates while all the isolates showed resistance to Nalidixic acid with 100% percent . Also, Plasmid DNA content showed different sizes of DNA bands in four types of these isolates.

Keywords: Bacteria, Respiratory tract infection and Plasmid profile