Egypt. J. Exp. Biol. (Zool.), 8(1): 89 – 98 (2012)
© The Egyptian Society of Experimental Biology

RESEARCH ARTICLE

ظافر فخري عبد القادر الراوي*
سليم عبيد المولى**
ضياء عفتان الحياني*

عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus cereus* من مستشفيات مدينة الرمادي ودراسة بعض التغيرات النسيجية المرضية الناتجة في الأرانب المصابة بها .

المستخلص:

جمعت 351 عينة من مستشفيات مدينة الرمادي وتم زرعها مُختبرياً بهدف التحري عن وجود بعض أنواع بكتريا *Bacillus spp.* شملت الدراسة جمع العينات من مصادر مختلفة من هذه المستشفيات، تضمنت ردهات المرضى وصالات العمليات وصالات الولادة وردهات الطوارئ وصالات الأطفال الخدج وصالات الكسور والحروق وصالات الإستقبال في مستشفيات الرمادي ، جمعت العينات من الأرضيات والجدران والأسرة ومن أجسام المرضى والكادر الطبي والزوار بإستعمال القطيلات القطنية (Cotton swabs). تم الحصول على 140 عزلة بكتيرية شملت *B. cereus* بنسبة 57.8% , *B .subtilis* بنسبة 25.67% و*B.megaterium* بنسبة 16.42% ، وكانت أعلى نسبة عزل من مستشفى الرمادي التعليمي للنسائية والأطفال بنسبة 43.1% تليها مستشفى الرمادي التعليمي العام بنسبة 38.5% ، في حين سجل مستشفى الرشيد الأهلي أقل نسبة وهي 32.6% . أظهرت جميع العزلات مقاومة لمضادات البيتا لاكتيميزβ-Lactamase بنسبة 100% والتي شملت البنسلينات والسيفالوسبورينات، في حين أظهرت حساسية بنسب مختلفة للمضادات الحيوية الجنتامايسين Gentamycin والفانكومايسين Vancomycin والكلورامفينيكول Chloramphenicol وبنسبة 100% و90% و80% على التوالي وسجل المضاد الحيوي إريثرومايسين Erythromycin أقل تأثيراً في البكتريا وبنسبة 60%. أظهرت معظم العزلات قابلية في إنتاج أنزيم البيتا لاكتيميز β-Lactamase ، حيث سجلت عزلات *B. cereus* أعلى نسبة لإنتاج هذا الإنزيم بنسبة 92.60% تلتها *B.subtilis* بنسبة 83.33% ثم *B. megaterium* بنسبة 82.60% . حُدد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للعزلات البكتيرية ولوحظ أن أعلى معدل لتثبيط العزلات كان للمضاد الحيوي الجنتامايسين Gentamycin بنسبة71.72% يليه المضاد الحيوي الكلورامفينيكول Chloramphinecol بنسبة 66.65% والمضاد الحيوي الفانكومايسين Vancomycin بنسبة 65.08% ، وقد سجل المضاد الحيوي أميكاسين Amikacin أقل معدل تثبيط بنسبة 54.16% . أظهرت بعض عزلات *B.cereus* المنتخبة والمعزولة من مستشفيات الرمادي تأثيراتها النسيجية في الأرانب النيوزلندية المنتخبة كموديل حيواني للدراسة بعد 72 ساعة من حقنها وذلك من خلال ظهور إحمرار في منطقة الحقن ووجود تقرحات في الجلد. أظهرت المقاطع النسيجية وجود تنخرات Necrosis في نسيجي الكبد والأمعاء ، فضلاً عن وجود نزف Bleeding في الخلايا الطلائية المبطنة للأمعاء وتحطم خلايا النسيج الظهاري المبطن للأمعاء الدقيقة ، وحدوث تغيرات دهنية (Fatty changes) في أنسجة الكبد وإرتشاح الخلايا الإلتهابية في نسيجي الكبد والأمعاء ، مما يعطي هذه العزلات البكتيرية أهمية أكثر لكونها ممرضة.

الباحث الرئيسي:
ظافر فخري عبد القادر الراوي*
*جامعة الانبار –كلية التربية للعلوم الصرفة

سليم عبيد المولى**
ضياء عفتان الحياني*
*جامعة الانبار –كلية التربية للعلوم الصرفة
**وزارة الصحة –دائرة صحة الانبار-العراق

CODE ARTICLE: 12.01.12

المقدمة:

تلعب عدوى المستشفيات أهمية بالغة في انتشار المسببات المرضية الخاصة بالمستشفيات ، إذ تنتشر المسببات المرضية في بيئة المستشفى ، وكذلك بين موظفي المستشفى. ومن أهم المسببات المرضية التي تسبب عدوى المستشفيات هي البكتريا ، ومن أهم الأنواع المكورات الموجبة لصبغة غرام مثل *Staphylococcus spp.* و*Streptococcus spp.* والعصيات الموجبة لصبغة غرام فضلاً عن العصيات *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* السالبة لصبغة غرام مثل *E. coli* وبكتريا *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* وبكتريا *Pseudomonas* (Chikere *et al.*, 2008).

تعد عصيات *Bacillus spp.* أحد المسببات المرضية الهامة في عدوى المستشفيات، إن النوع المرضي من هذه العصيات تتمثل بعصيات الجمرة الخبيثة *Bacillus anthracis* التي تسبب مرض الجمرة الخبيثة في الحيوانات بصورةٍ رئيسية كالماعز والأبقار وتصيب الإنسان أثناء تماسهِ المباشر مع هذه الحيوانات ، أما بالنسبة لبكتريا *B. cereus* فإنها تشكل أهمية بالغة في عدوى المستشفيات لأنها تسبب التسمم الغذائي Food poisoning (السماك, 1983) .

وتم التحري عن وجود عصيات *Bacillus cereus* كانت إحداها قاتلة (Fetal) إذ تسبب في أغلب الأحيان التهاب السحايا لدى الأطفال حديثي الولادة . (Neonates) (Christenson *et al.*,1999) .

وصف بكتريا *Bacillus cereus*:

هي عصيات موجبة لصبغة غرام ، هوائية ولاهوائية اختيارية ،مكونة للسبورات وتنمو بدرجة حرارة 10-42 درجة مئوية ونموها الأمثل عند درجة حرارة 38 درجة مئوية ،ولهذا فهي من البكتريا المحبة لدرجات الحرارة المعتدلة Mesophilic ، تعيش على المخلفات النباتية والحيوانية وبشكل واسع على الألبان (Graunum and Baird-Parker,2000) معظم أجناسها متحركة من خلال الأسواط المحيطية وتنمو على الأوساط الصلبة بشكل مستعمرات غير منتظمة ،تستعمل الجلوكوز مصدر للكربون وغير مخمرة للمانيتول والزايلوز و الأرابينوز(Mannitol, Xylose, Arabinose) تحلل النشأ والجيلاتين وتكون محللة للدم من نوع بيتا β -haemolytic أي تحلل كريات الدم الحمراء تحليلاً

كاملاً ، ومقاومة للأمبيسيلين وتظهر فعالية Licethilinase إذ إن بكتريا *B.cereus* منتجة لإنزيم اللسيثينيز و تكون موجبة لاختبار الكاتاليز ، ومقاومة للبوليمكسين Polymyxin (Claus and Berkeley, 1986) .

عوامل الضراوة Virulence factors:

تفرز سلالات *Bacillus cereus* أنواع مختلفة من السموم و الأنزيمات الخارج خلوية التي تعد عوامل مهمة للإمراضية ،هنالك أربعة أنواع من السموم المعوية المختلفة Enterotoxins والتي تعد من العوامل المسببة للتسمم الغذائي الأسهالي Dearrheal food poisoning ، وهي السم الحال (BL) (HBL Hemolysin) (Beecher *et al.*,1995) ، والسم المعوي المحلل للدم BL (Enterotoxin HBL) معقد متكون من ارتباط مركب B ومركبين محللين هما L2,L1 هذه المركبات الثلاثة مهمة جداً لإعطاء أكبر فعالية لإحداث المرض (Kotiranta *et al.*, 2000) .تنتج هذه البكتريا السموم في الأمعاء بعد تناول الغذاء الذي يحتوي على الأبواغ spores والجرعة التي تؤدي إلى حدوث الإسهال هي 10^4 خلية لكل 105-107 جم من الغذاء المتناول (Wijnands *et al.*, 2006) . والسم الخلوي K) K Cytotoxin) سم خلوي أحادي البروتين يشابه β -toxin

أما النوع الرابع فهو السم المعوي T (Enterotoxin T –) حيث وُصف من قبل عن طريق Agata *et al.* (1995) ، وسُمي هذا المركب استناداً إلى تجارب الاستنساخ (Cloning) والوسم المناعي (Immunoblot) حيث نفذت تجارب الكشف عن نشاط هذا السم بإستخدام منتج مُصنّع من جين (*bce – T*) ، ومع كل ذلك وحتى الآن لا يوجد رابط بين السم المعوي و تفشي الأمراض المنقولة عن طريق الغذاء (Agata *et al.*, 1995

إنزيمات البيتالاكتميز β – Lactamase:

هي عبارة عن إنزيمات حماية تنتج بوساطة البكتريا ، وتحفز على التحلل المائي لحلقة البيتالاكتام لمضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات ، ويُعد إنتاجها الأساس في مقاومة البكتيريا لمضادات البيتالاكتام (Livermore, 1995) . تتواجد هذه الإنزيمات في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام ، وتُشفر بواسطة جينات تحمل على البلازميدات أو الترانسبوزونات (Transposons) أو على الكروموسوم البكتيري(Bacterial chromosome) (Medeiros, 1997) .

الأمراض التي تسببها بكتريا *Bacillus cereus:*

على الرغم من تسبب هذه البكتريا في كثير من الأمراض مثل التسمم الدموي (Septicemia) ، التهاب باطن العين (Endopthalmitis) ، التهاب باطن القلب (Endocarditis) ، التهاب الجهاز البولي (Urinary tract infection)، التهابات الجروح (Wound infection)، تجرثم الدم (Bacteremia) والتهاب السحايا في الاطفال حديثي الولادة وعدد آخر من الأخماج ، إلاّ أن ارتباطها الأساسي يكون مع حالات التسمم الغذائي البكتيري (Lund *et al.*, 2000) ، الذي يحدث عن طريق تناول الاغذية الملوثة بالاحياء المجهرية او ذيفاناتها وتعد بكتريا *B.cereus* عامل ممرض انتهازي .

التغيرات النسجية المرضية Histopathological changes:

الأنواع الأربعة من السموم المعوية التي تفرزها سلالات بكتريا *Bacillus cereus* مقدمة العوامل المسببة للتسمم الغذائي تحدث ضررا في أنسجة العوائل المصابة (Beecher *et al.*, 1995).

إن الإصابات المتسببة ببكتريا *B. cereus* للأمعاء الدقيقة هي حدوث نزف في بطانة الأمعاء نتيجة وجود السموم المعوية التي تسبب التسمم الغذائي . كما وصف التي تفرزه بكتريا *Clostridium perfringens* (Lund *et al.*, 2000) ،وهو محلل للدم ذو نفاذية عالية وله فعالية في تنخر الجلد وتجمع السوائل في الأرانب المختبرية التي أجريت عليها التجارب وهذه مرتبطة بالسموم المعوية الموضحة للزرع المرشح لسلالات *B. cereus* المكونة للسموم المعوية (Enterotoxins)، وقد تم توصيفه حديثا. ويُعد Cytotoxin-K سماً معوياً يحتوي على جزء بروتيني منفرد يُظهر نشاطاً مُنخّراً ومحللاً، وهو عالي السميّة في الخلايا الطلائية للإنسان (Hardy *et al.*, 2003) . أما المركب الآخر هو السم المعوي الغير محلل للدم (NHE Enterotoxin) ، له تشابه مع مركب (HBL Enterotoxin) (Kotiranta *et al.*, 2000) تم تمييز السموم الغير محللة للدم (NHE) مؤخراً، على انها سموم مشابهة للسموم المحللة للدم (HBL) تتألف من وحدات بروتينية فرعية (nheA و nheB و nheC) اثنتان منها عوامل محللة أي أن A,B محلل والثالثة Cعامل رابط ، وعلى الرجم من أن الارتباطات الثنائية للوحدات الفرعية قد تُظهر بعض التأثير الحيوي ، لكن أعظم نشاط يتحقق عندما تكون جميع المكونات الثلاثة موجودة (Granum, 1997; Ryan *et al.*, 1997).

Todar (2004) أن السم المعوي يسبب تنخر الجلد وتجمع السوائل في اللفائفي للأرانب المختبرية المحقونة ببكتريا *B. cereus* . كما يؤدي إلى ترشح خلايا الدم البيضاء ويسبب النزف في الغشاء المخاطي للأمعاء .

وقد وصف Singh *et al.* (1992) أن التغيرات النسيجية التي تحدث في نسيج الكبد للأرانب المختبرية المحقونة ببكتريا *B. cereus* متمثلة بإحتقان في الوريد البابي Congestion of portal vein والجيبانيات Sinusoids كذلك وجود فرط التنسج Hyperplasia في قناة الصفراء Bile duct ، ويعتقد أن السم المعوي يؤثر موضعياً على الشعيرات الدموية Capillaries والأوعية الدموية Blood vessels .

الهدف من الدراسة Aim of study:

- عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus cereus* من بيئة ومرضى وكادر مستشفيات مدينة الرمادي ودراسة دور هذه البكتريا في عدوى المستشفيات (Nosocomial infection).

تشخيص البكتيريا .

- اختبار قابلية عزلات البكتريا على إنتاج أنزيم البيتالاكتيميز (**β**_Lactamase).

- إختبار حساسية عزلات البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية (Antibiotics (sensitivity .

- دراسة أمراضية البكتريا وذلك بحقنها في الأرانب النيوزلندية (New zaeland rabbits) ودراسة بعض التغيرات النسجية التي تحدثها هذه البكتريا في نسيجي الكبد والأمعاء الدقيقة.

المواد والطرق :

جمع العينات Specimens collection:

1- **بيئة المستشفى** Hospital environment:

تم في هذه الدراسة الحصول على مسحات من مصادر مختلفة من بيئة ومرضى مستشفى الرمادي التعليمي العام والمستشفى النسائية والأطفال التعليمي في مدينة الرمادي ومستشفى الرشيد الأهلي ، جمعت العينات من خلال أخذ مسحات معقمة (قطيلات Swabs) من 1\10\2009 إلى 1\1\2010 .

2- **المرضى** Patients:

جمعت العينات من المرضى المتواجدين في المستشفى ، وكذلك أخذت عينات دم من الأشخاص المتوقع إصابتهم بهذه البكتريا من خلال ظهور أعراض

التسمم الغذائي وتسمم الدم، ومن قيء المرضى والبراز من خلال وضعها بعلب معقمة، وأخذت عينات من الجروح والحروق من المرضى المتواجدين في قسم الحروق والعمليات ومن الطوارئ، فضلاً عن العينات التي أخذت من الأطفال المصابين بالتهاب السحايا ومن أجسام الأطفال الخدج .

- **زرع العينات**:

جلبت العينات إلى مختبر مستشفى الرمادي التعليمي للنسائية والأطفال وزرعت كالأتي:

تم زرع النماذج بطريقة التخطيط Streaking المأخوذة من بيئة ومرضى المستشفيات على الأوساط الزرعية Nutrient agar, Blood agar وحضنت في الحاضنة لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 °م .

تشخيص البكتريا:

شخصت البكتريا المعزولة حسب طريقة (Collee *et al*. (1996 و Holt *et al*. (1994) .

قياس التركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية:

Determination of minimum inhibitory concentration:

استعملت طريقة التخفيف المتسلسل المضاعف (Tow fold dilution method) لمحاليل المضادات الحيوية على الوسط الزرعي الصلب (Mullar Hinton agar) وذلك لحساب التركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية على البكتريا (MICS) لمساحيق المضادات الحيوية المبينة في جدول (1) إعتماداً على ما ذكره Collee *et al*. (1996).

جدول (1) مساحيق المضادات الحيوية المستعملة

ت	اسم المضاد الحيوي	الشركة المجهزة والمنشأ
1	Gentamycin	Troge Medical GMBH- Germany
2	Chloramphinecol	Troge Medical GMBH- Germany
3	Amikacin	Kontam pharmaceutical - China
4	Vancomycin	Troge Medical GMBH- Germany

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotics sensitivity test:

إختُيرت حساسية العزلات تجاه عدد من المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال طبياً والتي استعملت بشكل أقراص جاهزة، إذ أستعملت طريقة الإنتشار والمعروفة باسم Modified Kirby - Bauer Method على وسط مولر هنتون الصلب (Mullar Hinton agar) حسب طريقة (Bauer *et al*. (1966 والمعدلة من قبل منظمة الصحة العالمية (Vandepitte *et al*., 1991).

الدراسة النسجية المرضية Histopathological study:

أستعمل في هذه الدراسة 30 من ذكور الأرانب النيوزلندية البيضاء White New Zealand rabbits .

طرق حقن البكتريا Bacterial Injection Methods:

إستخدمت لهذا الغرض بكتريا *Bacillus cereus* وذلك لكونها من الأنواع الممرضة من جنس *Bacillus spp.* تم إستعمال ثلاث مجاميع لحقن البكتريا وذلك بأستعمال الأرانب النيوزلندية، وتم الحقن عن طريق الحقن تحت الجلد Subcutaneous، وكانت كمية الحقن 10 مللتر وقسمت التجربة إلى ثلاث مجاميع، إستعمل المزروع البكتيري بتركيزي ($10^5 \times 1$ و $10^7 \times 1$) وحدة تكوين مستعمرة/مللتر.

المجموعة الأولى:

مجموعة السيطرة Control group (وحقنت بالمحلول الملحي الفسيولوجي0.9%) وشملت 10 أرانب.

المجموعة الثانية:

مجموعة المعالجة الأولى Treated group وشملت 10 أرانب. تم حقن كل أرانب من العشرة أرانب النيوزلندية بالعالق البكتيري لبكتريا *Bacillus cereus* بتركيز $10^5 \times 1$ وحدة تكوين مستعمرة / مللتر من المحلول الملحي الفسيولوجي بتركيز 0.9 %.

المجموعة الثالثة:

مجموعة المعالجة الثانية Treated group وشملت 10 أرانب. تم حقن 10 أرانب نيوزلندية بالعالق البكتيري لبكتريا *Bacillus cereus* بتركيز $10^7 \times 1$ وحدة تكوين مستعمرة / مللتر من المحلول الملحي الفسيولوجي بتركيز 0.9 %.

جمع العينات من الحيوانات المصابة

جمعت العينات من نسيجي الكبد Liver والأمعاء الدقيقة Small Intestine، حيث تم تشريح الأرانب بعد مدة 72 ساعة بعد الحقن ، وذلك للحصول على الفرق في حدوث الإصابة ، وضعت العينات في مادة الفورمالين بتركيز 10% لمدة 24 ساعة .

تحضير الشرائح النسيجية Tissues Preparation

حضرت المقاطع النسيجية بأخذ 0.5 سم من نسيج الكبد Liver ومن نسيج الأمعاء الدقيقة Small Intestine ، ووضعت النماذج في 10% من محلول الفورمالين ولمدة 24 ساعة . حضرت شرائح البرافين تبعاً لطريقة Bancroft and stevens, (1982).

التحليل الإحصائي Statistical analysis

لقد حللت النتائج إحصائياً بإستعمال التحليل الإحصائي المتمثل بالقطاعات العشوائية الكاملة Complete Randomized Block test ، وإستعمل مربع كاي لإيجاد الفروق المعنوية بين نسب الإنتشار والعزلات البكتيرية المشاهدة وحسب مكان العزل تحت حسن المطابقة ($P<0.05$)، كذلك أستعمل إختبار L.S.D (Least Significant Design) (Danial,1983).

النتائج والمناقشة:

تواجد وإنتشار بكتريا *Bacillus spp.* في مستشفيات الرمادي:

أظهر إختبار مربع كاي (χ^2) عند مستوى إحتمال ($P<0.05$) لحسن المطابقة بين نسب الإنتشار في العينات المشاهدة والمتوقعة حسب نوع المستشفى عدم إرتباط نسب الإصابة بنوع المستشفى ،إذ تراوحت نسب الإصابة في المستشفيات بين 32.6 % و43.1 % إذ كانت أعلى نسبة عزل من مستشفى الرمادي للنسائية والأطفال بنسبة 43.1 % ، وتليها مستشفى الرمادي التعليمي العام بنسبة 38.5 % ، ومن ثم مستشفى الرشيد الأهلي بنسبة 32.6 % كما هو موضح في جدول (2) .

جدول (2) توزيع نتائج العزلة من ثلاث مستشفيات

ت	المستشفى	عدد النماذج	نتيجة الزرع عدد (%)		نوع البكتريا (%)					
					B. cereus		*B. subtilis*		*B. megaterium*	
			موجب	سالب	موجب	سالب	موجب	سالب	موجب	سالب
1	مستشفى الرمادي العام التعليمي	122	(47) 38.5%	75	25	25	15	40	7	10
2	مستشفى الرمادي التعليمي للنسائية والأطفال	177	(76) 42.9%	101	46	35	17	25	13	41
3	مستشفى الرشيد الأهلي	52	(17) 32.6%	35	10	15	4	10	3	10
4	المجموع الكلي	351	140	211	81 51.9 %	75	36 32.4%	75	23 27.3%	61

χ^2 tab df 2 (P>0.05) =5.991

χ^2 tab df2 (P>0.05) =5.991

χ^2 Cal =14.05

χ^2 Cal =2.39

لوحظ إن تلوث المستشفيات ببكتريا *Bacillus spp.* يعود لسبب أن البكتريا مقاومة للظروف غير الإعتيادية وتكثر في الهواء والغبار، لذلك تكون متواجدة في بيئة المستشفى وبصورة كثيفة (Dohmae *et al*., 2007) وكانت نسبة عزل بكتريا *B. cereus* هي 51.9 % تتقارب هذه النتيجة مع ماجاء به Young *et al*. (2005) إذ حصل على نسبة 46.6% من بكتريا *Bacillus cereus* من مستشفى في الولايات المتحدة الأميركية في عام 2005 .

تواجد وانتشار بكتريا *Bacillus spp.* **في مستشفى الرمادي التعليمي العام**:

أظهر مربع كاي (χ^2) عند مستوى معنوية ($P<0.05$) لحسن المطابقة بين نسب الإنتشار في العينات المشاهدة والمتوقعة في مستشفى الرمادي التعليمي العام وحسب مكان العزل إن نسبة الإنتشار لاترتبط بموقع العزل عند مستوى ($P<0.05$) وتراوحت نسب الإنتشار بين 62 % في المرضى تليه صالة العمليات والطوارئ بنسبة 50 % ثم صالات الكسور والحروق بنسبة 41 % كما هو موضح في جدول (3) ، لوحظ أن أعلى نسبة عزل هي للمرضى المتواجدين في المستشفى ويعود السبب إلى تواجد أعداد كبيرة جدا من المرضى في المستشفى،إذ يعد المريض المستودع الكبير لكثير من الأحياء المجهرية الممرضة (Matsumoto *et al*., 2000) .

جدول (3) نتائج عزل البكتريا من مستشفى الرمادي العام التعليمي

مكان العزل	%	نوع البكتريا وعدد العينات					
		Bacillus megaterium		*Bacillus subtilis*		*Bacillus cereus*	
		موجب	سالب	موجب	سالب	موجب	سالب
صالة العمليات	%50	1	3	3	10	5	5
الطوارئ	%50	3	5	8	15	10	10
صالات الكسور والحروق	%41	2	1	2	10	5	7
المرضى	%62	1	1	2	5	5	3
المجموع الكلي		7 (%41.1)	10	15 (%27.2)	40	25 (%50)	25

χ^2 tab df2 ($P<0.05$) =5.991

χ^2 tab df2 ($P>0.05$)= 7.815

χ^2 Cal =14.05

χ^2 Cal=4.1

تواجد وانتشار بكتريا *Bacillus spp.* **في مستشفى الرمادي التعليمي للنسائية والأطفال**:

نتائج فحص العينات وحسب مربع كاي (χ^2) لحسن المطابقة بين نسب الإنتشار في العينات المشاهدة والمتوقعة لمستشفى الرمادي التعليمي للنسائية والأطفال، وحسب مكان العزل أظهرت وجود فروق معنوية ($P<0.05$) لنسب الإصابة بين أماكن العزل وارتباط نسبة الإصابة بمكان العزل ارتباطا معنويا ،حيث بلغت أعلى نسبة عزل مسجلة 55 % في الأطفال الخدج تليها بيئة صالات الولادة بنسبة 50 % ثم المرضى والطوارئ بنسبة 40%,39% على التوالي وصالة العمليات بنسبة 34 % وبلغت أدنى نسبة مع الكادر الطبي إذ بلغت نسبة العزل 28 %. كما هو موضح في جدول (4).

توضح النتائج أعلاه أن أعلى نسبة عزل كانت في ردهة الأطفال الخدج ويعود السبب إلى الإخفاق في عمليات التطهير والتعقيم من قبل الكادر الطبي ، كذلك تلوث أقنعة التنفس الأوكسجينية Oxygen Masks للأطفال الخدج ، فضلا عن تواجد الزوار الذين يزورون الصالة بعدد كبير،كذلك انتقال الطفل الخديج من حاضنة إلى أخرى يعرض الطفل للتلوث الميكروبي ولاسيما بالأحياء المتطايرة الهوائية (Van derZwet *et al*.,2000) .

ولقد أشار Christenson *et al*. (1999) إلى أن أعداد كبيرة من البكتريا قد عزلت من قسم الطوارئ والسبب يعود لتحضير العينات وكثرة المرضى المراجعين إلى الطوارئ مما يؤدي إلى حدوث إرباك في عمل الكادر الطبي،كذلك يعود السبب إلى أن صالة الطوارئ تعد المكان الوحيد الذي يستقبل المرضى وبصورة مباشرة من الأماكن الخارجية إلى داخل المستشفى ، لذا قد تنتقل الميكروبات من البيئة الخارجية مباشرةً إلى البيئة الداخلية للمستشفى (Orji *et al*., 2005) .

جدول (4) نتائج عزل البكتريا من مستشفى الرمادي العام التعليمي للنسائية والأطفال

مكان العزل	%	نوع البكتريا وعدد العينات					
		Bacillus megaterium		*Bacillus subtilis*		*Bacillus cereus*	
		موجب	سالب	موجب	سالب	موجب	سالب
صالة العمليات	%34	4	9	3	3	5	10
الطوارئ	%39	5	14	7	7	15	10
صالة الولادة	%50	2	4	4	4	7	5
المرضى	%40	2	2	6	2	6	7
الكادر الطبي	%28	_	5	2	_	4	3
حاضنات الخدج	%55	1	2	3	1	9	5
المجموع الكلي		14 %28	36 %72	25 %59.52	17 %40.4	46 %53.4	40 %46.6

χ^2 tab df 5 ($P<0.05$)=11.070

χ^2 tabdf2 ($P<0.05$)=5.991

χ^2 Cal=40.22

χ^2 Cal =9.138

تواجد وانتشار بكتريا *Bacillus spp.* **في مستشفى الرشيد الأهلي**:

أظهر مربع كاي ($P<0.05$) لحسن المطابقة بين نسب الإنتشار في العينات المشاهدة والمتوقعة لمستشفى الرشيد الأهلي وحسب مكان العزل وجود فروق معنوية بين أماكن العزل مع نسبة الإصابة ويوجد إرتباط معنوي بين نسبة الإصابة ومكان العزل ،إذ سجلت أعلى نسبة إصابة في صالة العمليات بنسبة 47.05% تليها صالة الاستقبال بنسبة 28.02% والمرضى بنسبة 26.6% ثم الكادر الطبي بنسبة 23.02% (جدول 5).

جدول (5) نتائج عزل البكتريا من مستشفى الرشيد الأهلي

مكان العزل	%	نوع البكتريا وعدد العينات					
		Bacillus megaterium		*Bacillus subtilis*		*Bacillus cereus*	
		مصاب	سليم	مصاب	سليم	مصاب	سليم
صالة العمليات	47.05	3	1	2	4	3	4
المرضى	26.6	2	5	2	3	-	5
الكادر الطبي	23.02	2	3	1	2	-	3
صالات الاستقبال	28.02	-	1	2	1	3	1
المجموع الكلي		7 %31.8	10 %76.9	7 %41.17	10 %58.8	3 %23.07	15 %68

χ^2 tab df2 ($P<0.05$)=5.991

χ^2 tab df 3 ($P<0.05$)=7.81

χ^2 Cal=8.08

χ^2 Cal=14.92

التشخيص المختبري للبكتريا Identification of Bacteria :

إستهدفت الدراسة الحالية عزل بكتريا *Bacillus cereus* من مسحات متعددة من مصادر مختلفة من المستشفيات الثلاث وإستعملت الأختبارات الكيموحيوية للتأكد من نقاوة العزلات والجدول (6) يوضح الإختبارات الحيوية لبكتريا *Bacillus cereus* .

جدول رقم (6) الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا Bacillus cereus

	Type of test نوع الإختبار	*Bacillus cereus*
1	shape	Rod
2	Spore site	Central
3	Gram stain	+
4	Catalase	+
5	Oxidase	–
6	Urease	–
7	Citrate utilization	+
8	Indole test	–
9	Haemolysis of blood	+
10	Growth in MacConkey agar	–
11	Nitrate reduction	+
12	Methyl-red	+
13	Voges- proskaur	+
14	H2S production	–
15	Gas from glucose	+
16	Acid from glucose	+
17	Motility test	+
18	Anaerobic growth	+
19	Gelatin hydrolysis	+
20	β- Lactamase production	+
21	Licithinase production	+

حساسية بكتريا *Bacillus spp* **للمضادات الحيوية** :Antibiotics

اختبرت حساسية العزلات البكتيرية تُجاه 10 مضادات حيوية واستعملت طريقة الإنتشار والمعروفة بـ Modified Kirby-Bauer Method على الوسط الصلب حسب طريقة (Bauer *et al*., 1966) والمعدلة من قبل منظمة الصحة العالمية (Vandepitte *et al*., 1991) ،وحُددت مقاومتها للمضادات الحيوية إعتماداً على قياس قطر منطقة التثبيط (بالمليمتر) وفقاً لما ورد في (NCCLS, 2002) ، وأظهرت النتائج أن جميع العينات امنتمية لجنس *Bacillus* مقاومة بنسبة 100% لمجموعة البنسلينات ، والتي تضم البنسلين Pencillin، ومجموعة السيفالوسبورينات Cephalosporins والتي تشمل Cefotaxime لأنها تعمل على إنتاج البيتالاكتميز β -Lactamase ، وهذا يتفق مع ما توصل إليه Weber *et al*.,(1988); والكعبي (2005) .

تتميز بكتريا *Bacillus spp* بمقاومتها العالية لمجموعة البيتالاكتام والتي تضم البنسلينات والسيفالوسبورينات ، إذ إنها تنتج ثلاث أشكال مختلفة من إنزيمات البيتالاكتميز (Navarro *et al*., 2004). وأكد Madigan *et al*. (2009) أن المضادات Pencillin وCephalosporing يعدان من المضادات الحاوية على حلقة بيتا لاكتام β - Lactam التي تقاومها البكتريا بوساطة إمتلاكها للبلازميدات المسؤولة عن تصنيع أنزيمات البيتالاكتميز β-Lactamase، مما يؤدي إلى تحوير في تركيب المضاد من خلال كسر حلقة بيتا لاكتام من قبل هذه الأنزيمات التي تجعلها غير فعالة.

أوضح Drobnicwski (1993) أن بكتريا *B.cereus* تنتج β-lactamase ، وهذا يجعلها مقاومة لأدوية البيتالاكتام مثل المضاد Amoxicillin المشابه لطبيعة عمل Penicillins الذي يعمل على تثبيط عملية تصنيع الجدار الخلوي من خلال عملية تثبيط مادة الببتيدوجلايكان، أما المضاد Cefotaxime فهو من مجموعة Cephalosporins التي تعمل ضد بناء الجدار الخلوي للبكتريا .

بينت النتائج أن بكتريا *B.cereus* حساسة للمضاد الحيوي Vancomycin بنسبة 90% وللمضاد الحيوي Gentamycin بنسبة 80% وللمضادات الحيوية Chloramphinecol وAmikacin وLincomycin وTrimotheprim بنسبة 70% وسجل المضادان الحيويان Azithromycin وErythromycin أقل نسبة بلغت 50%. كما هو مبين في جدول (7).

جدول (7) نتائج تحسس بكتريا *B. cereus* للمضادات الحيوية Antibiotics

ت	اسم المضاد الحيوي	الرمز	العدد الكلي	No (%) Sensitive	Resistance
1	Pencillin	P	81	%0 (0)	%100(81)
2	Trimothprim	TIM	81	%70(57)	%30(24)
3	Azithromycin	AZM	81	%50(41)	%50(40)
4	Vancomycin	VA	81	%90(73)	%10 (8)
5	Lincomycin	L	81	%70(57)	%30(24)
6	Gentamycin	CN	81	%80(65)	%20(16)
7	Chloramphenicol	CRO	81	%70(57)	%30(24)
8	Erythromycin	E	81	%50(41)	%50(40)
9	Amikacin	AK	81	%70(57)	%30(24)
10	Cefotaxime	CTX	81	%0 (0)	%100(81)

وهذه النتائج تتوافق مع الكعبي (2005) إذ أشارت أن بكتريا *B.cereus* حساسة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات بنسبة 90% ومنها Vancomycin وGentamycin . وحساسة للمضاد الحيوي Erythromycin بنسبة 60% .

تعزى مقاومة البكتريا إلى الانتشار الواسع لها في البيئة كالهواء والماء والتربة ، إذ تعد من الجراثيم الإنتهازية التي تحتاج إلى مغذيات قليلة في نموها لامتلاكها البوغيات الداخلية Endospores ، فضلاً عن الإستعمال العشوائي الواسع للمضادات الحيوية الذي ساعد على ظهور سلالات مقاومة Resistance strains فقد لوحظ تحول البكتريا المرضية من بكتريا حساسة للمضادات إلى بكتريا مقاومة لها ، كما يعزى ظهور السلالات المقاومة إلى حدوث الطفرات Mutation التي تزداد عندما يؤثر المضاد على واحد من الأهداف الحيوية في الخلية البكتيرية مثل عملية تثبيط عمل الجدار الخلوي أو تثبيط تصنيع البروتين وغيرها، والتي تزداد عن طريق البلازميد Plasmid الذي يحمل صفة المقاومة المتعددة لمجموعة من المضادات الحيوية. (Drobniewski, 1993 ; القوطجي, 2001) .

إنتاج إنزيم البيتالاكتميز β-Lactamase :production

أظهرت النتائج المدونة في جدول (8) مقاومة العزلات لمضادات البيتالاكتام وكانت موجبة لفحص إنتاج إنزيم البيتالاكتميز بإستعمال طريقة اليود القياسية Rapid Iodine Method، حيث أظهرت النتائج أن بكتريا *B. cereus* منتجة لأنزيم البيتالاكتميز بنسبة 92.60% بواقع 75 عزلة من أصل 81 عزلة ، وقد أظهر مربع كاي لحسن المطابقة بين إنتاج أنزيم البيتالاكتيميز للعزلات المشاهدة والمتوقعة عدم وجود ارتباط معنوي لإنتاج الأنزيم بإختلاف نوع العزلات وعدم وجود فروق معنوية (P>0.05) ، وتراوحت النتائج بين (92.60%) لبكتريا *B. cereus* . كانت هذه النتائج متوقعة مع كثير من الدراسات التي أشارت إلى مقدرة الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة غرام على أنتاج البيتالاكتاميز البلازميدية والكرموسومية المنشأ (Gold and Moellering, 1996) .

جدول (8) العزلات البكتيرية المنتجة لأنزيم البيتالاكتيميز

ت	نوع البكتريا	عدد العزلات	منتجة للأنزيم No (%)	غير منتجة للأنزيم No (%)
1	*Bacillus cereus*	81	75(92.60%)	6(7.40%)

χ^2 tab df3 (P<0.05) =7.81

χ^2 Cal=5.554

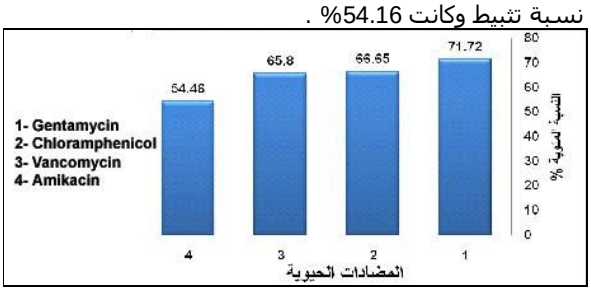
تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمضادات الحيوية :Antibiotics

إستعملت أربع مضادات حيوية شائعة الإستعمال في المستشفيات وهي الفانكومايسين Vancomycin والكلورامفينيكول Chloramphenicol والأميكاسين

Amikacin والجنتاميسين Gentamycin لأجل تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) ، وحضرت التراكيز الآتية (2-4-8-16-32-64-128-256-512-1024 مايكروغرام/ مللتر حسب طريقة التخفيف المتسلسل المضاعف (Tow fold dilution method) إعتماداً على ما ذكره (Collee *et al*., 1996) .

يبين الشكل (1) معدل نسب العزلات الحساسة للمضادات الحيوية ،إذ تبين من الشكل وجود فروق معنوية عند مستوى (L.S.D P<0.05) بين العزلات الحساسة للمضادات الحيوية وكانت أعلى نسبة للتثبيط هي لبكتريا *B.cereus* بنسبة 67.94%. كانت نسبة عزلات *B.cereus*الحساسة للمضادات الحيوية بنسبة 67.94% وهذه النتائج تتقارب مع نتائج(2005) . Hong *et al* و Coonrod *et al.* (1971) إذ حصل كليهما على نسبة 65%و70% على التوالي.

يوضح الشكل (1) معدل تأثير المضاد الحيوي في العزلات المثبطة ، فقد لوحظ أن هنالك فروق معنوية عند مستوى(L.S.D P<0.05) بين تأثير المضادات في العزلات المثبطة ، إذ بلغت أعلى نسبة تثبيط هي للمضاد الحيوي Gentamycin بنسبة 71.72% يليه المضاد الحيوي Chloramphenicol بنسبة 66.65% والمضاد Vancomycin بنسبة 65.08% وسجل المضاد الحيوي Amikacin أقل نسبة تثبيط وكانت 54.16% .



L.S.D P<0.05 Antibiotic=2.397

شكل (1) معدل تأثير المضادات الحيوية في العزلات البكتيرية المثبطة

ويتبين من الجدول (9) نسب وأعداد العزلات المثبطة وحسب التراكيز المستعملة. بلغت أعلى نسبة لتثبيط بكتريا *B.cereus* من قبل المضاد الحيوي Amikacin 100% للتركيز 64 مايكروغرام / مللتر واقل نسبة للتركيز 16 بنسبة 26.72% . وسجلت أعلى حساسية لبكتريا *B.cereus* تجاه المضاد الحيوي Chloramphenicol وبنسبة 100% للتركيز 512 مايكروغرام / مللتر، واقل نسبة هي 20.93% للتركيز 64 مايكروجرام / مللتر. في حين تسبب المضاد الحيوي Gentamycin في أعلى نسبة تثبيط لبكتريا *B.cereus* وبنسبة 100% للتركيز 32 مايكروجرام / مللتر، واقل نسبة هي 48.10% للتركيز 8 مايكروجرام / مللتر. بينما سجلت أعلى نسبة تثبيط لبكتريا *B.cereus* تجاه المضاد الحيوي Vancomycin بنسبة 100% للتركيز 64 مايكروجرام / مللتر واقل نسبة هي 48.1% للتركيز 16 مايكروجرام / مللتر.

بلغ التركيز القاتل لعزلات *B. cereus* (MBC) للمضاد Gentamycin 32 مايكروجرام / مللتر والمضاد Chloramphenicol 512 مايكروجرام /مللتر و 64 مايكروجرام /مللتر للمضاد الحيوي Vancomycin ، تتوافق هذه النتائج مع Turnbull *et al.* (2004) ، وكذلك تتوافق مع Coonrod *et al*. (1971) لبكتريا *B. cereus*.

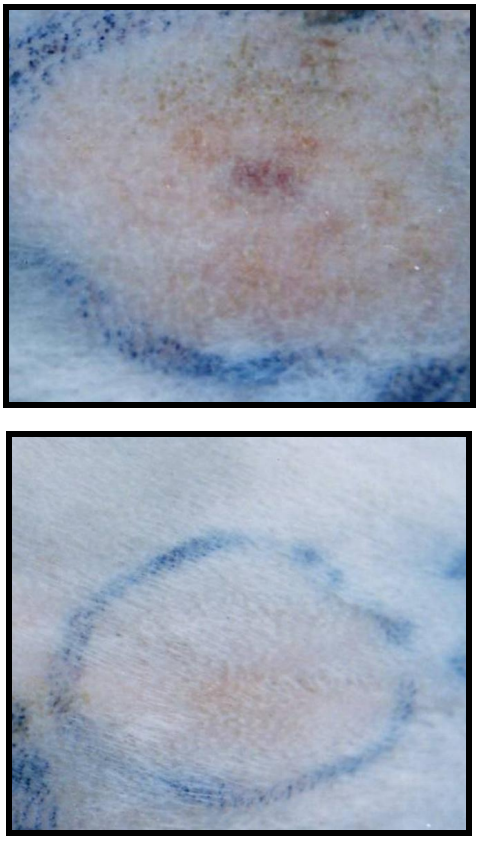
تشير الدراسات السابقة إلى أن المضاد الحيوي Amikacin يعتبر قاتلاً للبكتريا لأنه يرتبط بالوحدة الرايبوسومية 30S ، ويعمل على حجب أو منع عملية بدء الترجمة Translation للشفرات الوراثية ،وعدم قراءة الـ mRNA ، ويؤثر في البكتيريا الهوائية والاختيارية ،إذ أن مجموعة Aminoglycosides و Lincosamides تصبح أقوى عند إضافة مضادات حاوية على β-lactam ، لأن الأخير يعيق بناء الجدار الخلوي للبكتيريا ،ويسهل دخول Aminoglycoside إلى الخلية ، ويمنع المقاومة للمضادات الحيوية (McManus *et al*., 1980). المضاد الحيوي Gentamicin يعتبر من المضادات المؤثرة أيضاً في تصنيع البروتين لأنه يرتبط بالوحدة الرايبوسومية 30S ، ويعمل على حجب بدء عملية الترجمة ، ومنع قراءة mRNA ، وهو من مجموعة الأمينوكلايكوسيدات Aminoglycosides. (Jensen *et al*., 2001). في حين يعمل المضاد Vancomycin ككابح لنمو وتكاثر البكتريا الموجبة الجرام إذ يرتبط بسلسلة الببتيد للـ N-acetylmuramic acid ، ويعيق بناء الجدار الخلوي للبكتريا (Koneman *et al*., 1997)، المضاد الحيوي Chloramphenicol فهو من مجموعة المضادات المؤثرة في تصنيع بروتين الخلية وهو كابح للخلية وذو مدى واسع ، ويرتبط بالوحدة الرايبوسومية 50S ويمنع الروابط الببتيدية من التكوين. (McManus *et al*., 1980).

جدول (9) تأثير المضادات الحيوية وتراكيزاتها المستعملة في نسب العزلات البكتيرية (نسب وعدد العزلات)

Vancomycin			Gentamycin			Chloramphenicol			Amikacin			نوع العزلة
64	32	16	32	16	8	512	128	64	64	32	16	
%												
100 (81)	72.8 (59)	48.10 (39)	100 (81)	74.03 (60)	48.10 (39)	100 (81)	79.83 (64)	20.93 (17)	100 (81)	44.8 (35)	26.72 (21)	*Bacillus cereus*

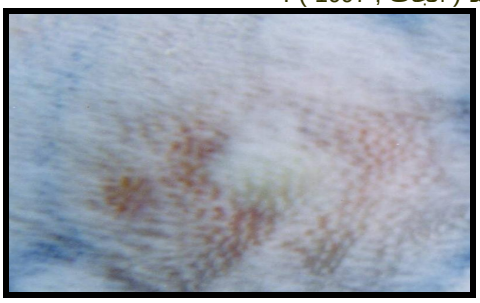
التغيرات المظهرية Morphological changes:

أظهرت نتائج إصابة الأرانب النيوزلندية ببكتريا *B. cereus*حدوث نقصان بالوزن لجميع الأرانب المصابة ، وظهور بعض التغيرات في الجلد ، مثل ظهور إحمرار في جلد بعض الأرانب حيث أوضحت المشاهدات أن بعض عزلات البكتريا أظهرت إحمراراً وتقرحات في جلد الأرنب (شكل 2)، حيث أشار مهدي (2001) إلى إحتمالية وجود علاقة بين إنتاج إنزيم Phospholipase C من بكتريا *B. cereus* وإيجابية إحمرار الجلد وهذا ما اكده الكعبي (2005).



شكل (2) احمرار الجلد للأرانب النيوزيلندية بعد الاصابة ببكتريا *B. cereus*

أوضحت الدراسة حدوث تضخم في حجم الكبد hepatomegaly عن حجمه الطبيعي ، كذلك حدوث تغيرات في لون الكبد وظهور بقع بيضاء في أطراف الكبد (شكل 3) . ولوحظ تقرح الجلد بعد مرور 24-48 ساعة بعد الحقن ، وهذا يشير إلى احتمالية وجود عامل مسؤول عن احمرار الجلد غير العامل المسؤول عن قرحة الجلد ، كما إنه ليس هناك علاقة بين إنتاج إنزيم Phospholipase C وشدة تقرح الجلد (الجاف , 1997) .



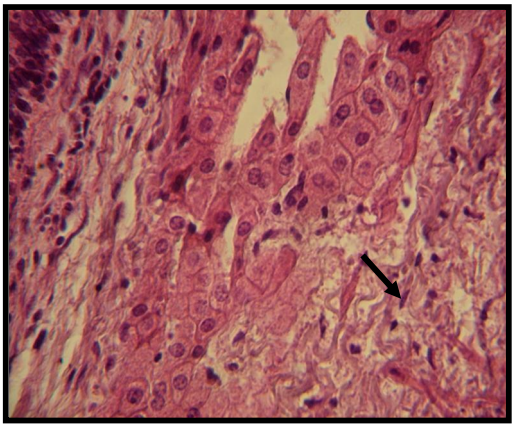
شكل (3) تقرح الجلد للأرانب النيوزيلندية بعد الاصابة ببكتيريا *B. cereus*

التغيرات النسيجية Histopathological changes:

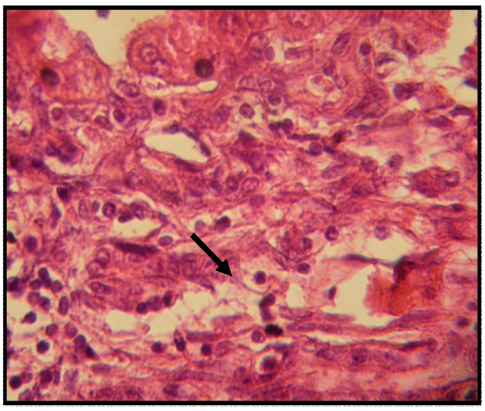
التغيرات النسيجية للكبد Liver:

أظهرت التغيرات في نسيج الكبد Liver tissue الناتجة عن الحقن بالبكتريا، وبتركيز 1×10^5 وحدة تكوين مستعمرة/مللتر، وجود إحتقان Congestion في الجيوب Sinusoids ، وهنالك تليف Fibrosis واضح في النسيج الكبدي ووجود أورمات ليفية Fibroblast واضحة نتيجة الإلتهاب المتسبب من جراء بكتريا *B. cereus* كما هو مبين في شكل رقم (4) ، أيضا يوضح الشكل وجود ارتشاح Infiltration واضح للخلايا الالتهابية وخاصة في النسيج الكبدي المحيط بالوريد البوابي Portal vein.ووجود تنخر Necrosis واضح في الخلايا الكبدية Hepatocytes ووجود تغير دهني واضح Fatty change في الخلية الكبدية ، ويظهر تواجد فجوات Vacuoles داخل سيتوبلازم الخلايا الكبدية نتيجة التغيرات الدهنية الناتجة في الخلايا الكبدية جراء الإلتهاب الناتج عن الإصابة ببكتريا *B. cereus* ، إذ يعمل سُم القيء Emetic toxin المفرز من قبل بكتريا *B. cereus* بالتأثير في وظيفة الميتوكوندريا في داخل خلايا الكبد مؤدياً إلى إنتفاخ الميتوكوندريا ، ويُلاحظ أولاً تكوّن فجوات أو حويصلات متميزة وواضحة المعالم . تبدأ بالتوسع إلى أن تصل إلى مرحلة متقدمة من الإصابة (Post Vaculation) وبعد ذلك تتكون حبيبات سيتوبلازمية سوداء تحل تماماً محل الفجوات المتأخرة والتي تؤدي إلى انهيار الميتوكوندريا أو إصابتها بضعف شديد، وبالتالي فقدان الميتوكوندريا وظيفة الأكسدة (β- oxidation) وهي عملية تكوين الطاقة بواسطة سلسلة انتقال الإلكترونات Electron transport ، مما يؤدي إلى التأثير السلبي في الاستجابة الأيضية وهذه تتوافق مع الدراسات التي أشار إليها الباحثون Finlay *et al.* (1999) .

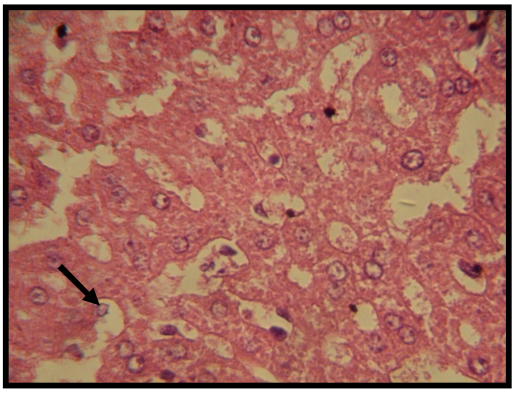
أظهرت نتائج حقن البكتريا بتركيز 1×107 وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر وجود إحتقان (Congestion) واضح في الأوعية الدموية (Blood vessels) وتنخر (Necrosis) الخلايا الكبدية وتغير دهني (Fatty change) واضح بين الخلايا الكبدية كما هو مبين في شكل رقم (5) ، كذلك يوضح الشكل إرتشاح المادة الدهنية داخل الخلايا الكبدية . كذلك وجود تحطم (Destruction) واضح لبعض الخلايا الكبدية وإرتشاح الخلايا الإلتهابية Infiltration ووجود إحتقان في الجيوب بين خلايا الكبد (Sinusoids)، كذلك وجود نزف (Bleeding) بين الخلايا الكبدية وتنخر (necrosis) واضح للخلايا الكبدية كما مبين في الشكل رقم (6) كذلك إرتشاح الخلايا الإلتهابية ،يعتقد أن التحطم الناتج في الخلايا الكبدية سببه السم الخلوي K (Cytotoxin K) الذي تفرزه بكتريا *B. cereus* والذي يتسبب في تحطيم الخلايا النسيجية .



شكل (4) قطاع في كبد الأرانب بعد الإصابة ببكتيريا *B. cereus*
يوضح وجود الأورمات الليفية Fibroblasts وإرتشاح الخلايا الإلتهابية (←). صبغة الهيماتوكسيلين والأيوسين × 400



شكل (5) قطاع في كبد الأرانب بعد الإصابة ببكتيريا *B. cereus*
يوضح وجود تنخر في خلايا نسيج الكبد بالتركيز 1×107 صبغة الهيماتوكسيلين والأيوسين ×400



شكل (6) قطاع في كبد الأرانب بعد الإصابة ببكتيريا *B. cereus*
يوضح الفجوات في الخلايا الكبدية أدى إلى دفع النواة إلى جدار الخلية (←) مما يعطي شكل للخلية يشبه الحلقة Ring وهذا يدعى التغير الدهني Fatty change بالتركيز1×107 صبغة الهيماتوكسيلين والأيوسين ×400

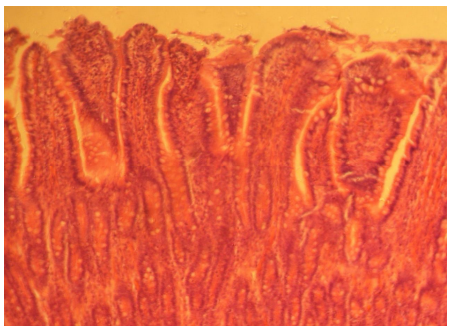
التغيرات النسيجية لنسيج الأمعاء الدقيقة Small Intestine:

أظهرت نتائج الحقن ببكتريا *B.cereus* بتركيز 1×10^5 وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر وجود تحطم (Destruction) في النسيج العمودي المبطن للأمعاء ، وهو عبارة عن نسيج طلائي عمودي غير مهدب بسيط non-Ciliated columnar

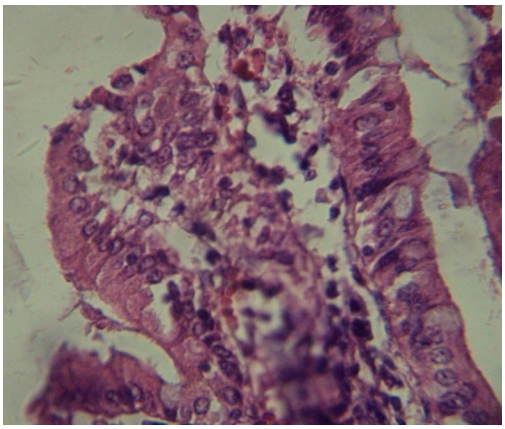
(Simple epithelial tissue) نتيجة الالتهاب الحاد (Acute inflammatory) الناتج من إفرازات بكتريا *B. cereus* للسموم المعوية Enterotoxins مما أدى إلى حدوث تحطم في الزغابات Villi الموجودة في النسيج العمودي للأمعاء، أشار Wazny *et al*., (1990) أن أنزيم Phospholipase C له دور كبير وواضح في تحطم الأنسجة الطلائية من خلال تحطيم المادة الأساس (Ground substance) ووجود ارتشاح (Infiltration) واضح في الخلايا الالتهابية خلال طبقة النسيج الضام (Connective tissue) ، فضلاً عن ارتشاحها داخل الطبقة العضلية Muscularis mucosae نتيجة الالتهاب الحاد واحتقان حاد في الأوعية الدموية (Blood vessels) الموجودة في الأمعاء، ووجود نزف Bleeding للخلايا الطلائية المبطنة للأمعاء الدقيقة نتيجة الالتهاب الحاد من قبل البكتريا نتيجة إفراز السموم المحللة للدم Haemolycins، التي تعمل على تحلل الدم ووجود تنخر Necrosis واضح للخلايا المعوية Intestinal cells الموجودة في نسيج الأمعاء واحتقان الأوردة الدموية Congested of blood vessels، إذ يعمل الذيفان الخلوي (Cytotoxin K) (K) على تنخر الجلد Necrosis of skin والأنسجة الطلائية (Hardy *et al*., 2003) .

كما وأظهرت نتائج حقن بكتريا *B. cereus* في الأرانب المختبرية بتركيز 1×10^7 وحدة تكوين مستعمرة/ مللتر التغايرات النسيجية لنسيج الأمعاء الدقيقة وجود تحطم قوي Destruction للخلايا الطلائية المكونة للنسيج ، مما أدى إلى تحطم الزغابات الموجودة في الخلايا وذلك بسبب الإلتهاب الحاد ببكتريا *B . cereus* ، إذ تعمل على إفراز السموم المعوية Enterotoxins التي تؤدي إلى حدوث التحطم للخلايا الطلائية المبطنة للأمعاء .ولقد أشار Beleva *et al*.,(1996) إلى أن التحطم الناتج هو بسبب السموم المعوية المتحررة من بكتريا *B . cereus* التي تسبب تنخر للغشاء المخاطي في الأمعاء الدقيقة وإحتقان في الأوعية الدموية Blood vessels وإرتشاح الخلايا الإلتهابية وفي الأخص الخلايا العدلة Neutrophiles، وإرتشاح الخلايا الإلتهابية في الطبقة العضلية للأمعاء (الأشكال 7،8،9).

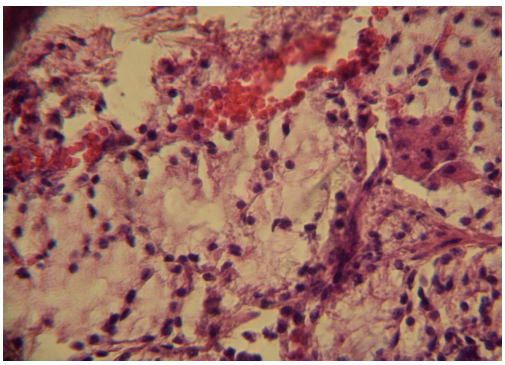
تتمثل الإصابات الخطرة الحادة والسريعة المتسببة عن عصيات *B. cereus* بحدوث الصدمة السمية القاتلة Toxic shock التي ظهرت في طفلين بعد تناولهم لكلى الأغنام ، إذ تبين بعد فحص الجثث وجود حالة نزف Bleeding وتعري وتنخرNecrosis للغشاء المخاطي للمعدة Stomach والقولون Colon والجزء العلوي من الأمعاء الدقيقة Small Intestine مما أدى إلى حدوث تنخر في هذه الأعضاء ، أشار (السماك، 1983 ; Beleva *et al*. 1996) حقن الفئران المختبرية بالجراثيم المعزولة من الأجزاء المعوية للمرضى لوحظت أيضاً حالة النزف والتنخر والتعري نتيجة الفعالية العالية للسم ، وربما تعود الحالة إلى التعاون بين الجراثيم اللاهوائية *Peptostreptococcus* مع بكتريا *Bacillus cereus* . كذلك تسبب إصابة سريعة بالتهاب الرئة القاتل إذ لوحظ وجود العصيات في عينات الدم والقشع والتي غالباً ما كانت تعتبر كملوثات ولا تحظى بالإهتمام من قبل الباحثين .



شكل (7) مقطع نسيجي للأمعاء الدقيقة الأرانب بعد الإصابة ببكتيريا *B. cereus* يوضح وجود الزغابات V والغدد المعوية IG صبغة الهيماتوكسيلين والأيوسين × 400



شكل (8) مقطع في نسيج الأمعاء الأرانب بعد الإصابة بالتركيز 10^7 × 1 من بكتيريا *B. cereus* يوضح تحطم خلايا الظهارية المبطنة للأمعاء نتيجة الإلتهاب الحاد بالتركيز 1×107 .صبغة الهيماتوكسيلين والايوسين × 400



شكل (9) مقطع في نسيج الأمعاء الأرانب بعد الإصابة بالتركيز 10^7 × 1 من بكتيريا *B. cereus* يوضح نزف Bleeding مع إحتقان الأوعية الدموية بالتركيز 1×107 . صبغة الهيماتوكسيلين والأيوسين × 400

المصادر العربية:

الجاف ، بهروز محمود أمين (1997) . دراسة مايكروبايولوجية ووراثية على عزلات محلية لبكتريا *Bacillus cereus* . أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة بغداد. جمهورية العراق.

السماك، مهدي (1983).الأحياء المجهرية الطبية ،الهيئة العامة للتعليم والتدريب الصحي، وزارة الصحة ، جمهورية العراق، ص (96-95).

الطائي، أنمار احمد داود(2002). دراسة بكتريولوجية للحروق، العمليات الجراحية والعمليات الطارئة في مدينة الموصل وإمكانية علاجها بالملتقم البكتيري، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل. جمهورية العراق.

القوطجي، حنان سامي فوزي محمد (2001). عزل وتشخيص البكتريا الملوثة لصالات العمليات ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية والمطهرات الكيماوية .رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل ،العراق.

الكعبي، ذكرى عبد العالي (2005). دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا *Bacillus cereus* المعزولة من بعض الأغذية.رسالة ماجستير. كلية العلوم، جامعة بابل، جمهورية العراق.

مهدي، معتز عبد الواحد عبد المنعم (2001) . دور بعض أنواع البكتريا الهوائية المكونة للأبواغ في فساد الحليب. أطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد، جمهورية العراق .

Hardy, S.P., Lund, T. and Granum, P.E. (2003). Cytk toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. FEMS Microbiol. Lett. 197: 47 – 51.

Holt JG, Kreig NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. "9th ed. Williams and Wilkins. Co. Baltimore, London.

Hong HA, Duc LH, Cutting SM. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiol. Rev., 29: 813-835.

Jensen LB, Baloda S, Boye M, Aarestrup FM. 2001. Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. Environ. Int., 26(7-8): 581–587.

Koneman EW, Allen SD, Junda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Lippincott-raven publishers, Philadelphia, pp.171-844.

Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. 2000. Epidemiology and pathogensis of *Bacillus cereus* infections. Microb. infect., 2(2): 189-198.

Livermore DM. 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev., 8(4): 557-584.

Lund T, De Buyser ML, Granum PE. 2000. A New cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Mol. Microbiol., 38(2): 254-261.

Madigan MT, Martink JM, Dunlap PV, Clark DP. 2009. Brock Biology of Microorganisms. 12th ed., Pearson Benjamin Cummings, USA.

Matsumoto S, Suenaga H, Naito K, Sawazaki M, Hiramatsu T, Agata N. 2000. Management of suspected nosocomial infection: an audit of 19 hospitalized patients with septicemia caused by Bacillus species. Jpn J. Infect. Dis., 53(5): 196-202.

McManus WF, Mason AD Jr, Pruitt BA Jr. 1980. Subeschar antibiotic infusion in the treatment of burn wound infection. J. Trauma, 20(12): 1021-1023.

Medeiros AA. 1997. Evolution and dissemination of beta – lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. Clin. Infect. Dis., 24(Suppl 1): 19-45.

Navarro PG, Osso BQ, Ortiz RG, Martínez De Las Parras PJ, Martínez Puentedura MI, Cabeza González MC. 2004. Inhibition of β-lactamase II of *Bacillus cereus* by Penamaldic derivatives of penicillins. Antimicrob. Agents Chemother., 48(3): 1058-1060.

NCCLS. 2002. National Committee for clinical laboratory standards performance for antimicrobic susceptibility testing approved standard M 100-S13. NCCLS, Wayne, Pa.

Orji MU, Mbata TI, Kalu OU. 2005. Isolation of pathogenic bacteria from hospital staff apperal in Nigeria. Malawi Med. J., 17(4):128-130.

Ryan, P.A., MacMillan, J.D. and Zilinskas, B.A. (1997). Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L_1 and L_2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. J. Bacteriol. 179: 2551-2556.

Singh DK, Narayan KG, Gupta MK. 1992. Mechanisms of *Bacillus cereus* enteropathy. Indian J. Exp. Biol., 30(4): 324-326.

REFERENCES:

Agata N, Ohta M, Arakawa Y, Mori M. 1995. The *becT* gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. Microbiol., 141(4): 983-988.

Bancroft JD, Steven A. 1982.Theory and practice of histological techniques Churchill Livingston. 2nd ed., pp. 90-371.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45(4): 493-496.

Beecher DJ, Schoeni JL, Wong AC. 1995. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Infect. Immun., 63(11): 4423-4428.

Beleva S, Enikova R, Vachkov P. 1996. The detection of *Peptostreptococcus asaccharolyticus* and *Bacillus cereus* in clinical materials from a child who died of sepsis with a fulminant clinical course. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol., 6: 16-20.

Chikere CB, Omoni VT, Chikere BO. 2008. Distribution of potential nosocomial pathogens in a hospital environment. Afr. J. Biotechnol., 7(20): 3535-3539.

Christenson JC, Byington C, Korgenski EK, Adderson EE, Bruggers C, Adams RH, Jenkins E, Hohmann S, Carroll K, Daly JA, Pavia AT. 1999. *Bacillus cereus* infections among on at a children's hospital. Am. J. Infect. Control, 27(6): 543-546.

Claus D, Berkeley RCW. 1986. Genus *Bacillus*. Cohn 1872, In: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Sneath PA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. eds.)". Williams and Wilkins, Baltimore, PP. 1105-1139.

Collee JG, Faser AG, Marmion BP, Simmons A. 1996. Mackie and McCartney practical Medical Microbiology. 14th ed., Churchill Livingston.

Coonrod JD, Leadley PJ, Eickhoff TC. 1971. Antibiotic susceptibility of *Bacillus* species. J. Infect. Dis., 123: 102-105.

Danial WW. 1983. Hypothesis testing in Biostatistics: a foundation for analysis in the health science. London, Churchill Livingstone ,1st ed., 915-916.

Dohmae S, Okubo T, Higuchi W, Takano H, Isobe T, Baranovich, T, Kobayashi S, Uchiyama M, Tanabe Y, Itoh M, Yamamoto T. 2007. *Bacillus cereus* nosocomial infection from reused towels in Japan. J. Hospital Infect., 69(4): 361-367.

Drobnicwski FA. 1993. *Bacillus cereus* and related species. Clinical. Microbial Rev., 6(4): 324-338.

Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD. 1999. Semi automated metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. Appl. Environ. Microbiol., 65(4): 1811-1812.

Gold HS, Moellering RC. Jr. 1996. Antimicrobial drug Resistance. N. Engl. J. Med., 335(19): 1445-1453.

Granum PE, Baird-Parker TC. 2000. *Bacillus* species. In: "The microbiological safety and quality of food. (Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW. Eds)", Aspen Publishers, pp. 1029-1056.

Granum PE, Lund T. 1997. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol. Lett., 157: 223-228.

Vandepitte J, Engback K, Point P, Heuk C. 1991. Basic laboratory procedure in clinical bacteriology. WHO, Journal for Parasitology 1991, Geneva.

Wazny, T.K., Mummaw, N. and Styrt, B. 1990. Degranulation of human neutrophils after exposure to bacterial phospholipase C. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 9(11): 830-832.

Wijnands LM, Dufrenne JB, Zwietering MH, van Leusden FM. 2006. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. Int. J. Food Microbiol., 112(2): 120-128.

Young JM, Naqvi M, Richards L. 2005. The microbial contamination of hospital bed handsets. AJIC: Am. J. Infect. Control, 33(3): 170-174.

Todar K. 2004. Antimicrobial agents in the treatment of infectious disease.Todars Online Text Book of Bacteriology.

Turnbull PC, Sirianni NM, LeBron CI, Samaan MN, Sutton FN, Reyes AE, Peruski LF Jr. 2004. MICs of selected antibiotics *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis, and Bacillus mycoides* from a range of clinical and environmental sources as determined by the Etest. J. Clin. Microbiol., 42(8): 3626-3634.

Van Der Zwet WC, Parlevliet GA, Savelkoul PH, Stoof J, Kaiser AM, Van Furth AM, Vandenbroucke-Grauls CM. 2000. Outbreak of *Bacillus cereus* infection in neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation. J. Clin. Microbiol., 38(11): 4131-4136.

ISOLATION AND IDENTIFICATION *BACILLUS CEREUS* FROM RAMADI HOSPITALS AND STUDYING SOME HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN INFECTED RABBITS

Dhafer F. Abdulkader Alrawi*, Slim A. Almoula, Diaa A. Alhaiany***

*Anbar University, College of Education for pure sciences

**Ministry of Health

Three hundred fifty one samples were collected from Al-Ramadi hospitals. The samples were cultured in Lab. to investigate the presence of *Bacillus spp*. bacteria. This study was included the collection of samples from different routes in the Al-Ramadi city hospitals, Including patients wards, operation wards, labour wards, emergency wards, pederastic wards, burn and fractures wards, and reception wards. In the hospitals the samples was collected from grounds, walls, beds, patients bodies, medical staff, and visitors by using swabs. One hundred forty bacterial Isolates was *Bacillus cereus*; 57.8% (81 Isolates) was obtained, *Bacillus subtilise*; 25.67% (36 Isolates) was obtained, and *Bacillus megaterium*; 16.42% (23 Isolates). It was the higher percents of isolation from Al-Ramadi hospitals from maternity and childbed in percent 43.1%, followed by General Ramadi hospital in percent 38.5%, while Al-Rasheed local hospital in percent 32.6%. All Isolates showed the β-Lactamase resistance (100%) which were included pencillins and cephalosporins. They were sensitive for the following antibiotics; Gentamycin, Vancomycin and Chloramphinecol (100%, 90%, and 80%, respectively) on frequently, Erythromycin were recorded less effect in these bacteria in percent 60%. All Isolates were showed the Capability on the production of β-Lactamase enzymes, *Bacillus cereus* was recorded the higher percent in production of this enzyme in percent 92.60%, followed by *Bacillus subtilise*; 83.33%, then Bacillus *megaterium*; 82.60%. A minimum inhibitory concentration (MICs) of Bacteria Isolates was detrimented, It was showed that high (MICs) of Isolates was to the Gentamycin antibiotic in average 71.72%, followed by Chloramphenicol 66.65% ,then Vancomycin antibiotic 65.08%, and Amikacin antibiotic was recorded the less average 54.16%. Some *Bacillus cereus* Isolates were showed histopathologic changes on selected Newzaeland rabbits as model animal for studying after their inoculation of 72 hours by appearance of redness and ulcerations in the area of injection. Histopathologic sections were showed necrosis of hepatic and bowel tissues, also present of bleeding in the bowel epithelial tissues with destruction of epithelial tissue cells. Fatty changes were happened in the hepatic tissue and migration of inflammatory cells of hepatic and bowel cells, as significant of bacterial Isolates as they were pathogenic.

المحكمون:

أ.د. صابر عبد الرحمن صقر قسم علم الحيوان، علوم المنوفية

أ.د. محمد السيد عثمان قسم النبات، علوم حلوان