دراسة خلوية وبكتريولوجية لسوائل تنظير القصبات لمصابي سرطان الرئة

سوسن ساجد الجبوري* محسن عبدعلي ** آمنة محمدعلي*

استلام البحث 20، حزيران، 2010
قبول النشر 26، تشرين الاول، 2010

الخلاصة:

تضمنت الدراسة جمع 75عينة من سوائل تنظير القصبات لمرضى مشكوك بأصابتهم بسرطان الرئة.اجريت على العينات دراسة تشخيصية خلوية لمحاولة التعرف على نوع سرطان الرئة السائد اذ تبين وجود33مصاب بسرطان الرئة من مجموع 75(44%) توزعت ما بين 19اصابة (57.6%) لسرطان الرئة الحرشفي ,7 اصابات (21.21%) للنوع الغدي , 6 اصابات (18.18%) لسرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة وحالة واحدة (3.03%) لسرطان الرئة ذو الخلايا الكبيرة ارتبطت معظم الحالات (70%) مع المدخنين . امكن عزل 53 عزلة بكتيرية ارتبطت 33 منها بحالات السرطان فيما عزلت 20 عزلة من غير المصابين. بأجراء عدد من الفحوص المورفولوجية والكيموحيوية المتبوع بالتشخيص بعدة api2.مكن تشخيص العزلات المتزامنة مع السرطان وكانت بواقع 12 عزلة (36.36%) لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و6 عزلات (18.18%) لكلا من بكتريا *Pseudomonas fluorescence, Klebsiella pneumoniae* و *Escherichia coli*مقابل3 عزلات (9.09%) الى *Acinetobacter baumannii* .حددت بعض من عوامل الضراوة المنتجة من قبل الانواع البكتيرية المعزولة اذ لوحظ قابلية 24 عزلة (72.7%) على تلزين كريات الدم الحمراء, فيما استطاعت 16 عزلة (48.5%) من الالتصاق بالخلايا الطلائية ,وامتلكت 15 عزلة (45.5%) للمحفضة فيما اعطت 24 عزلة (72.7%) فحصا موجبا للهيمولايسين.كما انتجت 25عزلة(75.8%) انزيم البيتالاكتاميز. أتسمت العزلات بمقاومتها العالية سيما لمضادات Ampicillin ,Amoxacillin ,Cefotaxime في الوقت الذي ثبطت بتراكيز قليلة من Ciprofloxacinوال Cefepim وهو من سيفالوسبورينات الجيل الرابع .

الكلمات المفتاحية: Type of Lung cancer, Bronchial wash of lung cancer patients, virulence factors produced by gram-ve bacteria.

المقدمة :

يمثل سرطان الرئة واحدا من أهم أنواع من السرطانات الشائعة في إنحاء العالم كافة، ويتضح ذلك من خلال نسبة حدوثه المتزايدة وبشكل سريع خلال القرن العشرين [1]. في العراق وحسب إحصائيات عام 2000، فقد وصلت نسبة سرطان الرئة إلى 7.9% وجاء في ألمرتبة الثانية من حيث الخطورة بعد سرطان الثدي[2]. إما بالنسبة للإحصائيات الأخيرة لمنظمة الصحة العالمية فقد سجل سرطان الرئة ثاني أهم أنواع السرطان في العالم بعد كلا من سرطان الثدي في النساء وسرطان البروستات في الرجال[3,1] . تنشأ اغلب أنواع سرطان الرئة من الخلايا القاعدية (Basel cell) الموجودة في الطبقة الطلائية المبطنة للقصبات , تبدأ بعدها الخلايا بالتشكل واتخاذ مظاهر متنوعة واعتمادا عليها قسم سرطان الرئة إلى أنواع فهنالك السرطان ذو الخلايا غير الصغيرة والذي يضم سرطان الخلايا من النوع الحرشفي (Squamous cell Carcinoma) وهو الأكثر شيوعا، يليه النوع الغدي(Adenocarcinoma) ومن ثم سرطان الرئة ذو الخلايا الكبيرة (Large cell Carcinoma) وهو الأقل انتشارا [5،4]. إما النوع الأخر من سرطان الرئة فهو سرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة ٍ (Small-cell lung cancer) ويعتبر الأخطر لقدرته على النمو والانتشار بوقت قصير جدا قد يصل الى شهرين ويخترق فيها الورم الطبقة تحت المخاطية لأنسجة الرئة والأنسجة ألمجاورة [6] .لغرض تشخيص أنواع سرطان الرئة يعتمد الفحص الخلوي لسوائل الرئة للتعرف على نوعية الخلايا الموجودة فضلا عن استخدام ناظور القصبات (Bronchoscope) لغرض تحديد الموقع الأولي للورم وللحصول على عينات للفحص الخلوي [5،4] كما ويتم إجراء الفحص المقطعي للصدر بواسطة الكومبيوتر(Tomography for chest) [5].

غالبا ما تتزامن الإصابات الثانوية سيما بالبكتريا مع مرضى سرطان الرئة بكلأ نوعيها ألموجبة والسالبة لصبغة كرام مما تزيد من حدة الإصابة للمريض، وتمتاز هذه العزلات بشدة أمراضيتها

*قسم علوم الحياة –كلية العلوم /الجامعة المستنصرية مستل من رسالة ماجستير للباحثة امنة محمد علي
**مستشفى الجراحات التخصصية/وزارة الصحة

وإنتاجها العديد من عوامل الفياعة فضلا عن مقاومتها العديد من مضادات الحياة [7،8] .لقد هدفت الدراسة إلى جمع عينات من سوائل تنظير القصبات لمرضى مشكوك بإصابتهم بسرطان الرئة لإجراء الفحص الخلوي الشامل لها للتعرف على أكثر أنواع سرطان الرئة انتشارا في بغداد فضلا عن عزل وتشخيص البكتريا المتزامنة مع سرطان الرئة , والتحري عند عدد من عوامل ضراوتها المنتجة مع دراسة مقاومتها لعدد من مضادات الحياة المستخدمة في العلاج.

المواد وطرائق العمل:

جمع العينات :جمعت سوائل تنظير القصبات البالغ عددها 75 عينة من قبل طبيب مختص للفترة مابين الشهر العاشر عام 2002 إلى الشهر الخامس 2004 من المرضى الراقدين في مستشفى الجراحات التخصصية ومراجعي مستشفى بغداد التعليمي ممن تظهر عليهم أعراض أولية لسرطان الرئة كالسعال المزمن، وضيق التنفس، وإفرازهم القشع المختلط بالدم. دونت البيانات الخاصة بالمريض المتضمنة العمر,الجنس,التدخين ،إصابات أخرى.اخذ مقدار 10مللتر من السائل المجموع ,ووزع على عبوتين معقمتين محكمة الغلق خصصت الأولى للفحص الخلوي فيما أخذت الثانية للفحص البكتريولوجي . أخذت مسحات سيطرة وبشكل دوري كل أسبوع من جهاز ناظور القصبات ومن الأنبوب الخاص بالجمع للتأكد من عدم تلوثها .

الفحص الخلوي: حضرت شرائح من راسب العينات بعد نبذها بسرعة 500 دورة/دقيقة لمدة خمس دقائق.مررت المسحات بتراكيز متسلسلة من الكحول الاثيلي بدأ من التركيز العالي للواطئ(95 %,80 %, 70%, 50%) بمعدل 10 غطسات لكل تركيز .مررت المسحات بعدة بمراحل من التصبيغ شملت صبغة Harris Heamatoxcilline وصبغةG-6 Orange وأخيرا صبغة Eaosin-65 والتي بمجموعها يطلق عليها صبغة Popanicolaou stain يفصل بينها تغطيس بالكحول الاثيلي ثم مرحلة أخيرة بالزايلول [9].شخصت الشرائح وفحصت من قبل مختصين في مستشفى الجراحات التخصصية / وزارة الصحة.

الفحص البكتريولوجي : زرعت العينات مبدئيا على وسطي أكار الدم والماكونكي وحضنت هوائيا درجة 37° م لمدة 24 ساعة . شخصت العزلات اعتمادا على ماورد في [10،11] المتبوع بالتشخيص بعدة api 20E التي تم الحصول عليها من مختبر الصحة المركزي.تم التركيز في هذه الدراسة على البكتريا السالبة لصبغة كرام.

فحص التحري عن عوامل الضراوة المنتجة من البكتريا :

- **التحري عن قابلية تلزين كريات الدم الحمراء(Heamaglutination test):**أجري الاختبار بمزج قطرة واحده من مزروع بكتريا بعمر 24 ساعة على شريحة نظيفة مع قطرة من عالق كريات دم حمراء للانسان. عدت النتيجة موجبة عند حدوث تلازن لكريات الدم الحمر وظهورها بشكل مجموعات مرتبة بشكل حصيرة [12].

- **قابلية الالتصاق بالخلايا الطلائية (Adhesion with epithelial cells):**أجري الاختبار بمزج 0.5 ملليتر من عالق بكتيري مع حجم مماثل من عالق الخلايا الطلائية مصدرها ادرار لنساء غير مصابات بالتهاب المجاري البولية بعد حضانة لمدة ساعة بدرجة 37مْ.حضرت شرائح نظيفة من المزيج وصبغت بصبغة كرام وفحصت بالمجهر .حسبت النتائج بتعداد 50 خلية طلائية وملاحظة البكتريا الملتصقة بها [11].

- **التحري عن إنتاج المحفظة(Capsule production test):**استخدمت طريقة التصبيغ السلبي (negative stain) بالحبرالهندي لتحري عن انتاج المحفظة.فحصت الشرائح تحت المجهر الضوئي .

- **التحري عن انتاج الانزيم الحال للدم (Heamolysin detection test):**استخدم دم بشري صنف AB للتحري عن انتاج الانزيم الحال للدم وحسب ماورد [13] .أجري الاختبار بعد تحضير وسط اكار الدم ومن ثم تخطيطه بالبكتريا المراد الكشف عنها .أعطت النتيجة الموجبه عند ظهور مناطق هالات شفافة حول المستعمرات النامية .

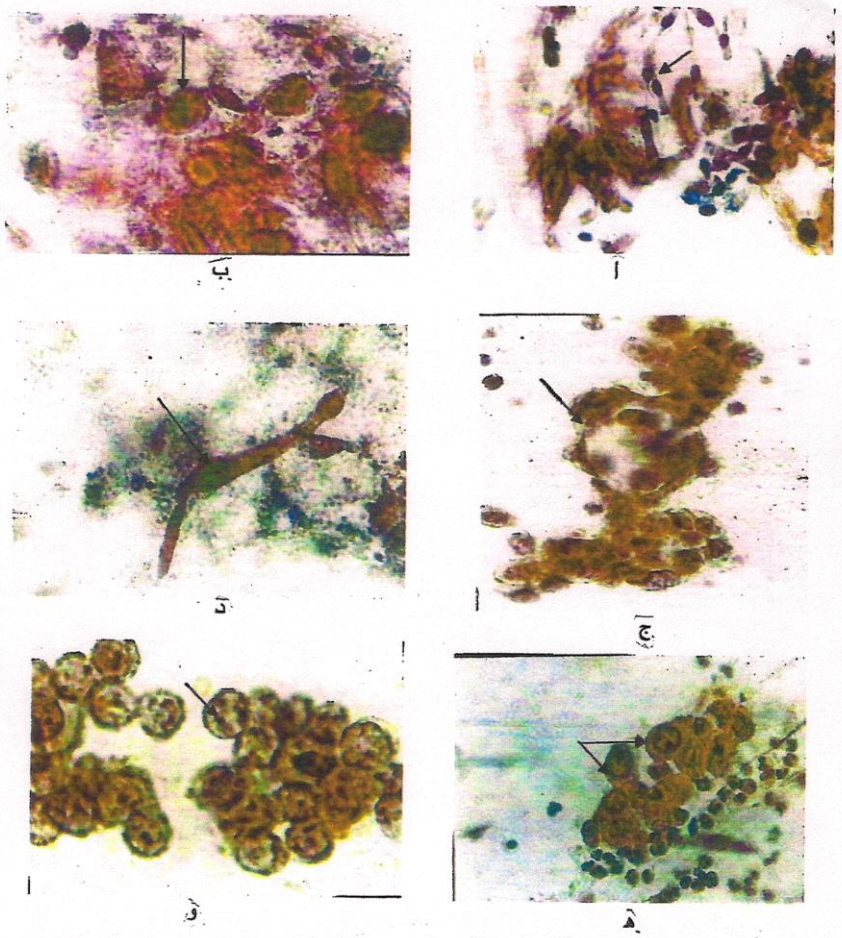
- **التحري عن إنتاج انزيم البيتالاكتاميز (ß.Lactamase production test):**استخدمت طريقة اليود القياسية السريعة للتحري عن انتاج انزيم البيتالاكتاميز عدت النتيجة موجبة عند تغير اللون من البنفسجي الى الابيض بعد أقل من دقيقة من إضافة كاشفي النشا واليود .دو نت بمقارنة النتائج مع السيطرة السالبة متمثلة بالسلالة القياسية *E.coli* ATCC25922[14].

- **أختبار حساسية البكتريا لبعض مضادات الحياة بطريقة ال MIC:**استخدمت طريقة التخافيف المتضاعفة المتسلسلة (Two fold dilution method) لحساب التركيز المثبط الادنى (minimal inhibitory concentration)بتحضير تراكيز متسلسلة من المضادات تراوحت ماز بين 0.25- 1024مايكروغرام/ملليتر .استخدم وسط اكار ميلليرهنتون لإجراء الاختبار, وقورنت النتائج مع ما ورد في[14].استعملت للدراسة مضادات الحياة التالية :

Ampicillin,Amoxacillin,Piperacillin,Cefazolin,Cefotaxime,Ceftazidim,
Cefepim,Gentamicin,Ciprofloxacin

النتائج والمناقشة:

جمعت أثناء الدراسة 75 عينة من سوائل تنظير القصبات لمرضى مشكوك بإصابتهم بسرطان الرئة من خلال الفحص العياني للعينة لوحظ إن بعض العينات كانت شفافة إلى وردية رائقة في الوقت الذي كانت بعض العينات وقد اتصفت بكثافتها ولونها الداكن .اتضح من خلال الفحص ألمجهري لاحقا إن العينات التي كانت تتزامن مع مصابي السرطان هي ذات القوام الكثيف وهذا دليل على احتوائها على خلايا متنوعة[5]. أما كونها حمراء اللون فيعود لاحتوائها لكريات الدم الحمراء التي غالبا ماتنتج نتيجة لتخدش الأنسجة الطلائية من جراء إدخال القضيب المعدني الخاص بجهاز تنظير القصبات .استعمل خلال الفحص الخلوي صبغة البابانوكولاس والمتضمنه مجموعة من الصبغات المتعاقبة كان أولها صبغة الهيماتوكسلين وفائدتها إعطاء تفاصيل دقيقه للنواة إما صبغتي البرتقالي جي 6 والايوسين 65 فأنها تتفاعل مع مكونات السايتوبلازم لتظهره غاية في ألدقة والوضوح. كما ان هذه ألصبغة تميزت بثباتها وبقاء الوانها لفترات طويلة يمكن معها فحص الخلايا بعد مرور فترة من الزمن دون تغير في تفاصيلها [16] .من خلال الدراسة تم ملاحظة خلايا غير طبيعية ملفته للنظر كان منها 33 عينة من أصل 75 (44%) وقد اتصفت بإحجامها وإشكالها غير المنتظمة التي فاقت احجام خلايا القصبات المهدبة الطبيعية التي تتصف بشكلها المغزلي وتظهر نواتها دائرية الى بيضوية الشكل بنفسجية اللون (شكل 1- أ). لقد ظهرت بعض الخلايا بشكل دائري الى بيضوي غير منتظم وكانت نواتها دائرية كبيرة تشغل معظم سطح الخليه (شكل 1- ب), وأمتازت المادة الكروماتينية فيها بعد انتظامها ، وكثافتها العالية ولم تظهر النوية بشكل واضح في هذا النوع. لقد كان حجم النواة كبير نسبة للسايتوبلازم الذي اتسم بلونه البرتقالي ومظهره الكثيف المحبب في الوقت الذي اتخذت فيه بعض الخلايا شكلا طوليا مغزليا (شكل1-ج) وكانت نواتها طولية بيضوية غير مركزية الموقع برتقالية اللون , اما السايتوبلازم فكان محبب ذا لون برتقالي مائل الى الوردي . بعد مقارنة ماورد في وصف الخلايا وتشخيصها مع ماذكره [5] , وجد ان غالباً مايظهر هذا النوع من الخلايا في سرطان الرئة الحرشفي .من خلال الفحص الخلوي لبعض العينات لوحظ انواع اخرى من الخلايا اتسمت بكونها خلايا مفردة كبيرة او بشكل تجمعات في الخلايا فاقده للتنظيم الشكلي (شكل 1- د) فضلا عن أحتواء المسحة على الكثير من الألياف المخاطية وخلايا القصبات الطبيعية . أمتلكت هذه الخلايا نواة دائرية الى بيضوية بعيده قليلا عن المركز فقاعية او مفصصة المظهر محاطة بغلاف نووي بشكل غير منتظم اما كروماتنيها فيتوزع بشكل حبيبات صغيرة والسايتوبلازم فكان برتقالي اللون فقاعي المظهر (fomay) تعتبر الفقاعات أو الفجوات الإفرازية الموجودة في السايتوبلازم من الصفات التشخيصية الدقيقة لخلايا سرطان الرئة من النوع الغدي [17].امتاز النوع الاخر من الخلايا الذي ظهر اثناء الفحص الخلوي لبعض العينات بظهورها بشكل تجمعات من الخلايا مرتبه بشكل عناقيد مفككة او بشكل خلايا مفردة تمتلك شكلا دائريا الى بيضويا (شكل 1-هـ).امتلك هذا النوع من الخلايا نواة دائرية إلى غير منتظمة الشكل يتوزع الكروماتين فيها بشكل كثيف غير واضح المعالم وقد تحتوي على نوية نقطية مركزية الموقع تقريبا اما السايتوبلازم فقد امتاز برقته ولونه البرتقالي الفاتح. من الملاحظات المهمة في هذا النوع من تجمعات الخلايا هي ظهورها بنفس الحجم والشكل وتمتلك صفة التبرعم والالتصاق مع بعضها.ان هذه الصفات تنطبق مع خلايا سرطان الرئة ذي الخلايا الصغيرة متفقين بذلك مع ما ذكره عدد من الباحثين [6,18] تم الحصول على نوع مغاير اخر من الخلايا الذي ظهر بشكلين أما بشكل خلايا مفردة او بمجاميع متراصة .النواة هنا دائرية الى مفصصة غير منتظمة ,ذات كثافة كروماتينية عالية وفي الوسط تقريبا تحتوي على نوية كبيرة مختلفة الحجم من خلية الى أخرى أما السايتوبلازم فيتصف بشكله الحبيبي فقاعي المظهر (شكل 1- و). بعد مقارنة ماورد من وصف خلايا ماذكر مع (16) وجد ان هذه الصفات متطابقة مع خلايا سرطان الرئة ذو الخلايا الكبيرة.



شكل (١): اشكال واحجام الخلايا السرطانية المشخصة من سوائل تنظير القصبات في شرائح مصبوغة بصبغه البابانوكولاس (قوة تكبير (40X)
أ-خلايا القصبات المهدبة الطبيعية ذات نواة دائرية الى بيضوية بنفسجية اللون .
ب-خلايا سرطانية حرشفية دائرية الى بيضوية ذات نواة كبيرة وسايتوبلازم براق .
ج- خلايا سرطانية حرشفية مغزلية ذات نواة طولية غلمقة وسايتوبلازم برتقالي .
د- خلايا سرطانية غدية متجمعة ذات نواة دائرية وسايتوبلازم فقاعي .
هـ- خلايا سرطانية من النوع الصغير خلاياها دائرية ونواتها شبه مركزية وسايتوبلازم رقيق برتقالي.
و- خلايا سرطانية كبيرة الحجم ذات نواة دائرية نويتها غير منتظمة وسايتوبلازم محبب.

استنادا إلى ماتم تدوينه من ملاحظات حول اشكال الخلايا وتزامنها مع انواع سرطان الرئة فقد تم التاكد من تشخيص 33 جاء سرطان الرئة الحرشفي اولا اذ سجل 19 حالة من اصل 33 مصاب بسرطان الرئة(57.6%)يليه سرطان الرئة الغدي بواقع 7 اصابات من مجموع 33 (21.21%) فيما سجل سرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة 6 حالات وبنسبة(18.18%) ليأتي سرطان الرئة ذو الخلايا الكبيرة أخيرا بواقع حالة واحدة (3.03%).اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة اجريت عام 1997 في العراق اذ بلغت انواع سرطان الرئة 50% و17.9% و13% و8% لكلا من سرطان الرئة الحرشفي والغدي وسرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة وسرطان الرئة ذو الخلايا الكبيرة على التوالي[19]. في السياق نفسه اشار[3] الى تفوق النوع الحرشفي وسيادته على باقي الانواع حاليا في الوقت الذي كان النوع الغدي هو السائد قبل عام 1980 .كما اشار الباحث انه تقريبا تم تشخيص 213,380حالة جديدة من سرطان الرئة عام 2007 وقد بلغت مجمل الوفيات 160,390 حالة.

من خلال محاولة ربط عامل التدخين مع مصابي سرطان الرئة فقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية ارتباط التدخين مع 23 حال من أصل 33(96.7%) جدول(1)ويلاحظ من الجدول ارتباط التدخين مع سرطان الرئة الحرشفي بنسبة (42.42%) في حين بلغت النسبة (12.12%)مع سرطان الرئة الغدي وذي الخلايا الصغيرة , ولم يسجل سوى نسبة (3.30%)لسرطان الرئة ذو الخلايا الكبيرة.

جدول (1): توزيع مصابي سرطان الرئة حسب انواع السرطان وعلاقته بالتدخين.

انواع سرطان الرئة	اعداد المصابين المدخنين	%	اعداد المصابين غير المدخنين	%	المجموع
سرطان الرئة الحرشفي	14	42.42	5	15.15	19
سرطان الرئة الغدي	4	12.12	3	9.09	7
سرطان الرئة ذي الخلايا الصغيرة	4	12.12	2	6.06	6
سرطان الرئة ذي الخلايا الكبيره	1	3.03	0	0	1
المجموع الكلي	23	69.7	10	30.3	33

حسب أخر إحصائيات المعهد القومي للسرطان في امريكا فقد سجل حوالي 219,440 أصابة جديدة بسرطان الرئة في عام 2009 نجم عنها 159,390 حالة وفاة وكان 90% منها ملازم للتدخين مقابل 12% نتيجة غاز الرادون [1].فيما يخص توزيع المرضى المشمولين بالدراسة حسب الفئة العمرية والجنس فقد اوضحت النتائج ارتباط سرطان الرئة بانواعه الاربعة مع اربع فئات عمرية تراوحت بين (35-75) سنة جدول (2), ووجد ان اعلاها نسبة كانت ممن اعمارهم من 55 سنة فما فوق بواقع 20 حالة موزعة على 18ذكرو2 اناث متبعة بتسجيل 10 مصابين بعمر مابين (45-55) سنة توزعت على 6 ذكور و4 إناث وأخيرا ثلاث حالات بعمر مابين (35-45) سنة كانت جميعها من الذكور. كما أوضحت نتائج الدراسة أن متوسط عمر الأشخاص المصابين هو 57 سنة وان سرطان الرئة الحرشفي هو الاكثر ترددا مع الذكور ممن أعمارهم أكثر من 55 سنة بواقع 11 حالة.

جدول(2):توزيع مرضى سرطان الرئة بأنواعه المختلفة حسب الفئات العمرية والجنس.

أنواع السرطان	35-45		45-55		55فما فوق		النسبة للذكور	النسبة للإناث	المجموع
	ذكور	إناث	ذكور	إناث	ذكور	إناث			
سرطان الرئة الحرشفي	2	-	3	1	11	2	48.5	9.09	19
سرطان الرئة الغدي	1	-	2	2	2	-	15.15	6.06	7
سرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة	-	-	1	1	4	-	15	3.03	6
سرطان الرئة ذو الخلايا الكبيرة	-	-	-	-	1	-	3.03	-	1
المجموع	3		10		20		81.83	18.17	33

كما يلاحظ من الجدول ارتفاع نسبة الإصابة من الرجال عن النساء لجميع أنواع سرطان الرئة وهذا طبيعي لزيادة نسبة المدخنين من الذكور مقارنة مع الاناث وغالبا ما تتفاقم الحالة عند كبار السن ممن يزيد أعمارهم عن 65 سنة فما فوق وتقل عند من هم اقل من 45 سنة [1].لقد جاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لدراسة اجريت في هولندا اذ وجد ان نسبة الاصابة بسرطان الرئة الحرشفي هي 50% للرجال, و12% للنساء تلاه سرطان الرئة الغدي [19].

فيما يخص نتائج الجانب البكتريولوجي فلقد زرعت جميع العينات المسحوبة من المرضى المشكوك بأصابتهم بسرطان الرئة بعد معاينة الاعراض البادية عليهم ومنهم أمكن الحصول على 53 عزلة بكتيرية من مجموع 75 عينه (70.66%) منها 33 عزلة تعود لمرضى السرطان بعد التأكد من

اصابتهم باجراء الفحص الخلوي والسريري (الذي اجري مسبقا) لتصبح نسبة عزل البكتريا من هؤلاء المرضى المصابين هي 100% وهذا ليس بالمستبعد كون المرضى ادخلوا المستشفى وهم يعانون من مشاكل تنفسية وإصابات رئوية حادة تزامنت مع إصابتهم الاساسية بالسرطان الرئوي. لقد ذكر الباحثون [7] ان نسبة عزلهم قد وصلت 95% .اما الـ20 عزلة المتبقية في الدراسة الحالية فقد اتضح انها تعود الى اشخاص مصابين بأمراض رئوية حاده أو مزمنة أذ لم يثبت الفحص الخلوي إصابتهم بالسرطان وإنما كانت أغلب الإصابات هي لالتهابات الجهاز التنفس العلوي او السفلي الذي قد ينجم عن اصابة ببكترية او فطرية واحيانا فيروسات وتتم المعالجة حسب نوع الكائن الممرض وشدة الحالة المرضية[20] . أما مايخص نتائج عزل الاحياء المجهرية من ادوات جمع العينات فقد ظهر انها سالبة الزرع بعدم ظهور اي نمو على اوساط العزل الاولي.تم التاكيد في هذه الدراسة على البكتريا لسالبة لكرام كونها اكثر انشارا وخطورة مقارنة بالموجبة منها سيما في بيئة المستشفيات وبين المرضى الراقدين فيها فضلا عن امتلاكها لصفة المقاومة المتعددة لمضادات الحياة وعوامل ضراوة مختلفة مما تهدد حياة المصابين بها . أمكن في هذه الدراسه عزل خمسة انواع من البكتريا السالبه لصبغة كرام وجاءت اولا *Pseudomonas areuginoss* بواقع 12 عزله من مجموع 33(36.36%) و6 عزلات (18.18%) لكلا من الانواع *Escherchia coli* ,*Klebsiella Ps. fluorescence,pneumoniae* مقابل 3 عزلات (99.9%) للنوع *Acinetobacter baumanni* كما ولوحظ ورود عدد من الاصابات المختلطة مع هذه العزلات الرئيسية وغالبا ماتكون من مجموعة viridians group وهي من البكتريا الموجبة لصبغة كرام . تمكن عدد من الباحثين من عزل الأنواع نفسها سيما *Pseudomonas,Acietobacter* بنسبة 6.45% و3.43% على التوالي الى جانب كلا من بكتريا *Haemophilus influenzae,* *Staphylococcus aureus* فضلا عن عزل فطريات سيما النوع *Candida albicans* كأصابة مختلطة وبنسبة 77.63%[8]. فيما اشار الباحثون[21]في دراسة اجروها للفترة مابين 2006-2007 وشملت 34 مصابا من الذكور و10 من الاناث اذ تمكنوا فيها من عزل البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام من 26حالة من اصل 44(59.1%) وكانت السيادة للنوع *Streptococcus pneumoniae* ثم *H.influenzae* .

في دراسة اخرى اجراها الباحثون [22] شملت فحص 72 عينة من سوائل التصريف الرئوي لمرضى يعانون من سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة اشاروا الى تمكنهم من عزل البكتريا بنسبة 83.34% بانواعها المختلفة وضم قسم منها انواع لاهوائية فضلا عن وجود اصابات مختلطة مابين Methicillin resistant *S.aureus*والعصيات السالبة لصبغة كرام غير المخمره للاكتوز.

يوضح جدول (3) نتائج التحري عن بعض من عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا ويلاحظ فيه ان 24 عزلة من أصل 33(72.7%) كانت قد أعطيت النتيجة الموجبة بأختبار تلزين كريات الدم الحمراء وجاءت بكتريا *Ps.aeruginosa* بالمقدمة بواقع 9 عزلات مقارنة بباقي الانواع وحلت بكتريا *K.pneumoniae* ثانيا بواقع 6عزلات في حين الاخيرة جاءت اولا في اختباري الالتصاق بالخلايا الطلائية وانتاج المحفظة اذ اعطت العزلات جميعها(6عزلات) النتيجة الموجبة ليكون مجمل النسبة النهائية للعزلات التي اعطت فحصا موجبا في فحص الالتصاق وانتاج المحفظة هي 16 (48.5%)و 15 (45.5%) على التوالي من اصل 33 عزلة فيما تفوقت بكتريا *Ps.aeruginosa* في اختباري أنتاج الانزيم الحال للدم وانتاج أنزيم البيتالاكتاميز بواقع 9,11 عزلات موجبة من مجموع 24 وبنسبة (72.7%) و 25(75.8%) على التوالي كانت قد اعطت نتيجه موجبه بالاختبارين المذكورة. يمكن القول وفق هذه النتائج تميز الانواع المعزولة بشدة ضراوتها والتي غالبا ماتكون منتجة لاكثر من عامل فياعة مما يزيد من أمراضيتها سيما في المرضى الذي يعانون من أمراض اساسية مسببة لهم مضاعفات ثانوية [23]. لقد حددت عدد من عوامل الضراوة في دراسات اخرى ذكر فيها ان وجود مثل هكذا عوامل يزيد من قابلية البكتريا على انتشار الاصابة المتزامنه مع سرطان الرئة وهذا يؤثر بدوره على تطور الحالة المرضية[2].

جدول (3) نتائج فحص التحري عن بعض عوامل الضراوة المنتجة من الانواع البكتيرية المعزولة عن مرضى سرطان الرئة.

الانواع البكتيريه / العدد	تلزين كريات الدم الحمراء		الالتصاق في الخلايا الطلائية		انتاج المحفظة		انتاج الانزيم الحال للدم		انتاج انزيم البيتالاكتاميز	
	موجبه	سالبه	موجبه	سالبه	موجبه	سالبه	موجبه	سالبه	موجبه	سالبه
Ps.aeruginasa (12)	9	3	3	6	-	12	11	1	9	3
Ps.flurescence (6)	4	2	2	4	-	12	3	3	3	3
k.pneumoniae (6)	6	-	6	-	6	-	4	2	5	1
E.coli (6)	4	2	5	1	6	-	4	2	5	1
A.boumanni (3)	1	2	-	3	3	-	2	1	3	-
مجموع العزلات الموجبة ونسبتها من أصل 33	(%72.7)24		(%48.5)16		(%45.5)15		(%72.7)24		(%75.8)25	

شملت التجربة الاخيرة إخضاع جميع العزلات قيد الدراسة لاختبار تحديد التراكيز المثبطة الدنيا(MIC) لعدد من مضادات الحياة استخدمت فيها مجموعه من المضادات شائعة الاستعمال في مثل هذه الحالات (جدول4) اذ اشارت نتائج الدراسة الحالية الى ورود مقاومة عالية جدا من قبل جميع العزلات قيد الدراسة لمجموعة البنسلينات سيما مضادي Amoxacillin و Ampicillin وصلت فيها مقادير MIC لأعلى من 512 مايكروغرام/ملليتر ولغاية 1024 مايكروغرام/ملليتر وبنسبة أقل للـPiperacillin الذي يعد من المضادات قليلة الاستخدام اذ تراوحت قيم MIC له بين 256 مايكروغرام/ملليتر لبعض عزلات *Ps.aeruginosa* الى مقدار 4 مايكروغرام /ملليتر للعزله E.coli2 وهي قيمه قليله جدا. فيما يخص السيفالوسبورينات فقد استعمل مضاد Cefazolin وهو من سيفالوسبورينات الجيل الاول ومضادي Cefotaximeو Ceftazidime من الجيل الثالث ومضاد Cefepim وهو من سيفالسبورينات الجيل الرابع حديثة الاستعمال سريريا. من خلال مقارنة النتائج بين هذه المضادات الاربع يلاحظ ان جميع العزلات تقريبا قاومت Cefazolin بالمقابل لم يسجل سوى عزلتين مقاومه للـ Cefepim واحده من *Ps.aeruginosa* واخرى من *A.boumanni* فيما اختلفت نتائج مضادي Cefotaxime و Ceftazidime فقد تراوحت قيم MIC للمضاد الاول مابين 8 مايكروغرام /ملليتر للعزلة*E.coli*1 لتصل الى أقصى حد مقاومة(512مايكروغرام /ملليتر) للعزلات *Ps.aeruginasa* و *Ps.flurescnce* في حين كانت مقادير MIC لمضادCeftozidime قليلة جدا لبعض العزلات كما في *Ecoli*1 اذ كان 2 مايكروغرام /ملليتر في حين سجلت العزله 10 *Ps.aeruginosa* اعلى حد من المقاومه وهو 1024 مايكروغرام/ ملليتر فضلا عن مقاومة باقي عزلات هذا النوع للمضاد المذكور مشتركة بذلك مع عزلات *A.baumanni* التي قاومت عزلاتها الثلاث للمضادين المذكورة .غالبا ماتكون مقاومة الاجيال ألحديثه في السيفالوسبورينات نتيجة إنتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs(Extended Spectrum β-lactamases) كما اشار عدد من الباحثين [8]الذين اوردوا ان معظم عزلات العائلة المعوية الى جانب بكتريا *Pseudomonas* و *Acinetobacter* كانت منتجه ESBLs واتسمت هذه العزلات بمقاومتها الشديده لمضادات الحياة لم تكن استجابة العزلات لمضاد الجنتاميسين مختلفة عن باقي المضادات اذ سجلت أغلب الانواع المعزولة مقاومة شديده جدا الا مع عزلات *E.coli* التي كانت اقلها مقاومة .من الملاحظات التي سجلت في هذه الدراسه ,تثبيط العزلات بتراكيز قليلة جدا من المضاد الجرثومي Ciprofloxacin اذ كانت قيم MIC المحسوبة قليله جدا مقارنة مع باقي المضادات حاليا يعد هذا المضاد من العلاجات الناجحة جدا ضد اغلب افراد العائله المعويه وحتى *Pseudomonas* فضلا عن كونه من المضادات الامينة لقلة تأثيراته الجانبية (20) . من المؤمل اجراء دراسة تكميلية للتركيز على البكتريا الموجبة لصبغة كرام والفطريات ألملازمة للاصابة بسرطان الرئة.

جدول (4) :التراكيز المثبطة الدنيا لبعض المضادات المستخدمة ضد العزلات قيد الدراسة

اسم المضاد / رقم العزلة	AMP ≥32	AMO ≥16	PIP ≥128	CF ≥32	CTX ≥64	CEFT ≥32	CEF ≥32	GM ≥16	CI ≥4
PS.1	1024	1024	32	128	64	128	4	128	1
PS.2	1024	1024	64	256	128	128	4	128	1
PS.3	1024	1024	64	128	128	128	4	256	1
PS.4	1024	1024	128	128	128	128	2	256	2
PS.5	1024	1024	64	128	128	128	4	256	1
PS.6	512	512	64	128	256	128	4	128	1
PS.7	512	512	256	1024	512	512	16	1024	8
PS.8	1024	512	128	1024	512	512	16	1024	8
PS.9	1024	1024	64	512	128	128	1	256	2
PS.10	1024	256	32	512	128	1024	1	256	1
PS.11	1024	1024	32	128	64	128	64	128	1
PS.12	512	512	256	128	256	512	64	1024	4
PS.F1	1024	1024	128	128	128	128	2	256	1
PS.F2	1024	512	256	1024	512	512	16	1024	8
PS.F3	1024	1024	128	512	256	512	16	1024	4
PS.F4	1024	1024	32	256	128	128	4	256	0.5
PS.F5	1024	1024	64	256	64	32	2	256	0.5
PS.F6	1024	1024	32	128	64	128	2	128	1
K.1	1024	256	128	64	128	32	0.25	16	1
K.2	1024	256	256	128	128	32	0.5	16	2
K.3	512	512	256	128	64	32	0.5	32	2
K.4	512	512	128	64	64	32	2	16	0.25
K.5	1024	1024	128	128	128	32	2	16	0.5
K.6	256	1024	256	128	128	32	2	16	1
E.1	1024	128	32	16	8	2	1	2	0.5
E.2	1024	128	4	64	64	4	0.5	4	0.5
E.3	512	512	32	8	64	8	0.25	16	1
E.4	512	512	16	16	32	16	0.5	1	1
E.5	512	1024	128	32	32	32	1	1	0.5
E.6	1024	256	64	8	64	32	1	0.5	0.5
A.1	1024	1024	128	128	256	128	64	16	16
A.2	1024	1024	64	128	128	128	16	16	4
A.3	1024	1024	256	128	128	128	8	32	2

Amp:A mpicillin, AMO:Amoxicillin,PIP:Pipracillin, CF:Cefazolin, CTX:Ceftaxime , CFF:Cefepim CEFT:Ceftazidim, GM:Gentamicin , CI:Ciprofloxacin, PS:*Ps.aerugienosa* , PS.F*:Ps.flurescence* K*:K.pneumoniae* , E:*E.coli, A:A.baumanni*

المصادر:

1-National cancer institute. 2010. lung cancer .Medicine. USA.

2-Ahmad, J. A. 2004. Primary carcinoma of the lung .Am.Rev .Tuberc.21:51-56.

3-Mazzone P.J. 2009. Lung cancer .Disease management project .The medical publication.Cleveland clinic .USA.

4-Ginsberg, J.R. 1994. Clinical oncology. 2nd Ed Mosby.USA. p:243-261.

5-Niab, M.Z 1989. The respiratory tract. In: Exfoliative cytopathology .3rd Ed.Little Brown and Company .Boston.Tornto p: 276-296.

6-Robbins, S.L.; Cotran,R.S and Kumar ,V.E 1994. The respiratory System in:Pathologic bases of disease.3rd Ed. W.B Saunders company .Philadelphia. p:705-766.

7-Zieba,M.;Baronow,A; krowezyk,M.; Noweta, k.; Grzelewsk,I. and Kwiat kkowska,S. 2003. pneumonia as acause of death in patients with lung cancer .RdioL-OncoL57(3):167-174.

8-Szymankiewicz, M.; krowaleuski, J.and Dancewcz, M. 2006. Bacteriological and mycological analysis of material taken from lower respiratory tract in patients with malignancy . Pol.Merkur. Lekarski.21 (123):218-222.

9-Al-Hashmi, A. M. 2005. Bacteriological and cytological studies for bronchial wash samples from lung cancer patients' .Msc thesis. Al-Mustansirya University.

10- Holt,j.j; krieg,N.R; Seneath ,B.H.;Staley, 1.T and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual determinative bacteriology 9th. Williams wilken.Baltimore.

11-Forber, B.A; Weir,M.and Plaisance, I.K.1998.Bailey and Scotts diagnostic microbiology.10th Ed.mosby .USA.Pi509.

12-Iwahi, T;Ane ,R;Nako,M.and Imado,A. 1983. Role of type 1fimberiae in the pathogenesis of ascending UII by *E.coli* in mice. Infes. And Immn.39:1307-1315.

13-Senior,B. w. and Hughes. 1987. Production and properties of hemolysin from clinical isolate of *Proteus*.J.Med.Microb.24:17-25

14-World Health Organization 1978.Technique for the β-lactamase Production from *Nesseria gonorrheae*. 616:137-134.

15-NCCls 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Twelfth information supplement.

16-klebleer, C.M. 1995.Education co-coordinator and laboratory manger .9th Ed. Churchill Livingston .london.UK.

17-Stevens, A. 1996. Human histology 2nd Ed. Mosby. USA.

18-Bibbo, M. 1995.Comprehensive Cytopathologt.2nd Ed.W.B.Sanders Company Philadelphia London.

19- Thune,M.;lalley,C.A.;Flanders ,W. and Heath ,C.A.1999. Excess mortality among cigarette smokers .Am.J.public health.85:122-1230.

20-Green wood, D.; Finch,R.; Davey, P.and Wilcox, M. 2007. Antimicrobial chemotherapy.5th Ed Oxford university press .UK.

21-Dancewwicz, M.; Szy Mankiewicz, M.;Swinarska,J.and Kowalewski ,J. 2009.Bronchial bacterial colonization in patients with lung cancer .Pneumonal Alerg of .Pol .77(13):242-247.

22-Korona-glowniak, R.;Rybojad, R.; Saw; ch ,M. and Malm, A. 2010. Bacterial colonization of pleural drain in patients with lung cancer: an analysis of risk factors Med. Sci. Monit. 16(2):84-91.

23-Jawetz,E.M;elnick,JL. and Adelbry, E.A. 2005. Enteric gram negative rods. In:Review of medical microbiology. 25th Ed.Appleton and large. USA.

Bacteriological and Cytological study

For bronchial washes from lung cancer patients

*Sawsan S.AL-Jubori** *Mohsn A.Ali*** *Amna M.Ali**

*Department of Biology –College of Science /AL- Mustnsiriyah University
**Surgical Specialists' hospital /Ministry of Health

Abstract:

The study included the collection of 75 bronchial wash samples from patients suspected to have lung cancer. These samples were subjected to a diagnostic cytological study to detect the dominant type of lung cancer. It was noticed that 33 patients proved to have a lung cancer out of 75 (44%) of these, 19 cases (57.6%)were diagnosed having Squamus cell carcinoma,7cases (21.21%) showed Adenocarcinoma ,6 cases (18.18%) were having small cell carcinoma while only one case (3.03%)was large cell carcinoma .Nearly 70% of cases were correlated with smokers .Bacteria were isolated from 53 patients in which 33 isolates were associated with the cancer cases while 20 of them from non infected patients. By using different morphological ,biochemical tests followed by api20 ,the bacterial isolates correlated with cancer were diagnosed and were characterized as 12 isolates (36.36%) of *Pseudomonas aeruginosa* ,6 isolates (18.18%) were *Klebsiella pneumoniae* ,*Pseudomonas fluorescence* and *Esherichia coli* for each while only 3 isolates (9.09%)of *Acinetobacter baumannii* were isolated. Some of bacterial virulence factors were determined in which,24 isolates (72.7%) were capable of agglutinating red blood cells, 16 isolates (48.5%) had the ability to adhere to epithelial cells , in addition ,15 isolates (45.5%) proved to have capsule and 24 isolates(72.7%) gave a positive results in heamolysin test beside ,25 isolates (75.8%) were ß –Lactamase producers. The isolates were highly resisted Ampicillin, Amoxicillin and Cefotaxime while they were inhibited by low concentrations of Ciprofloxacin and Cefepime the 4th generation cephalosporins.