Methods for evaluating some antibiotics activity against some virulence factors of bacterial septicemia in Karbala province

طرائق في تقييم فعالية بعض المضادات الحيوية ضد بعض عوامل الضراوة للبكتيريا الإنتانية في محافظة كربلاء

آيات علاءالدين عبدالعزيز آل طعمة أ.م.د. ذكرى عدنان جواد المسلماوي
جاكعة كربلاء- كلية العلوم- قسم علوم الحياة

البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول
الكلمات المفتاحية : انتان الدم ، المكورات العنقودية ، تركيز المثبط الادنى ،عوامل الضراوة

المستخلص:-

استهدفت الدراسة عزل البكتيريا الاكثر شيوعا في احداث الانتان في مستشفى الحسين (ع) في محافظة كربلاء المقدسة في الفترة من شهر تشرين الثاني 2014 الى مايس 2015 و كذلك دراسة تأثير بعض المضادات على عوامل الضراوة. فمن بين (60) عينة دم ، 20 عينة (33.33%) كانت نتيجة موجبة و 40 عينة (66.67%) أعطت نتيجة سالبة للنمو وأن نسبة البكتيريا الموجبة لملون غرام (70%) تفوقت على نسبة البكتيريا السالبة لملون غرام (30%) . و تبين أن اغلب البكتيريا المعزولة هي المكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus* (*S.aureus* (35%) و المكورات العنقودية السالبة لانزيم مخثر البلازما (CoNS) Coagulase negative staphylococcus (35%) و راكدة بومانية *Acinetobacter buamanii* (*A.buamanii*) (20%) و ايشريشيا القولون (*Escherichia coli* (*E.coli* (10%). تبين من خلال فحص الحساسية للمضادات الحيوية بأن (85.71%) من بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية مقاومة للمضادين Ceftriaxone وAmpicillin كذلك البكتيريا (CoNS) ابدت مقاومة لهذين المضادين بنسبة (71.42%). اما بالنسبة للمضادين Erythromycin و Gentamicin فكانت نسبة مقاومة عزلات المكورات العنقودية لهما (71.42%) و(42.8%) على التوالي .اعتبرت بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية حساسة تماما للمضادات Amikacin و Carbapenem و Ciprofloxacin و Oxacillin و Vancomycin. أما بالنسبة للبكتيريا السالبة لملون غرام ، فاظهرت النتائج أنّ الـ *E.coli* كانت مقاومة بنسبة (100%) لمضادي الـ Ampicillin و الـ Ceftriaxone و حساسة للمضادات Amikacin و Ciprofloxacin و الـ Carbapenem. في حين كانت بكتيريا *A.buamanii* ذات مقاومة (100%) لجميع المضادات المستخدمة .تم رصد انتاج عوامل الضراوة لبكتيريا *S.aureus* كالسم حال الدم (Hemolysin) و الـ Protease و انزيم مخثر البلازما (Coagulase) . اذ كانت الفعالية التحللية للهيمولايسين (640) وحدة تحلل / ملليلتر و الفعالية الانزيمية للبروتييز (44) وحدة / ملليلتر و قطر الهالة المتكونه نتيجة انزيم مخثر البلازما هي (3.8) ملليمتر. استخدم تركيز الـ MIC ½ و MIC ¼ للمضادات Amikacin و Ciprofloxacin و Oxacillin لدراسة تأثيرها على عوامل الضراوة .وجد ان انتاج سم حال الدم ينخفض عند وجود تراكيز الـ Sub-MIC للمضادين الـ Amikacin و الـ Ciprofoxacin بينما يزداد انتاج السم الى ضعفين عند استخدام تراكيز الـ Sub-MIC للمضاد Oxacillin. أما انتـاج البروتييـز فقد انخفض عند استخـدام جميع المضـادات و كذلك الحـال بالنسبة لانتـاج انزيم مخثـر البلازما.

Summary

This study aimed to isolate the most common cause of bacterial sepsis at Al-Hussein Hospital in the holy Karbala province from November 2014 to May 2015 and also studied the effect of some antibiotics on the virulence factors of the bacterial isolates. Out of the 60 samples of blood culture, 20 samples (33.33%) was positive and 40 samples (66.67%) gave negative growth . Gram positive to gram negative bacteria ratio was (70%) to (30%), respectively . It was found the most of isolates was *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) (35%) , Coagulase negative staphylococcus (CoNS) (35%) , *Acinetobacter buamanii* (*A.buamanii*) (20%) and the *Escherichia coli* (*E.coli*) (10%).

The antibiogram has been showed that (85.71%) of the *Staphylococcus aureus* was resistant to Ampicillin and Ceftriaxone as well as (CoNS) also had resistance to both antibiotics as (71.42%).The strains of *S.aureus* was resistant to Erythromycin and Gentamicin as (71.42%) and (42.8%), respectively . On the other hand these strains was quite sensitive to antibiotics Amikacin, Ciprofloxacin, Carbapenem, Vancomycin and Oxacillin.In gram negative bacteria ,

the results showed that *E.coli* was 100% resistant to Ampicillin and Ceftriaxone but sensitive to Amikacin , Ciprofloxacin , Carbapenem and Oxacillin. *Acinetobacter buamanii* was multidrugs resistance. The production of virulence factors of *S.aureus* has been monitored such as hemolysin, protease and coagulase. The hemolytic activity of hemolysin was (640) unit / ml and the enzymatic activity of protease was (44) units / ml and the diameter of zone formed by coagulase was 3.8 millimeters. The concentration of ½ MIC and ¼ MIC of Amikacin , Ciprofloxacin and Oxacillin was used to demonstrate the effect on certain virulence factors. It was found that hemolysin production decreased at a Sub-MIC concentrations of Amikacin and Ciprofoxacin while increased to double when they using with Oxacillin antibiotic. Protease production was dropped at the presence of Sub-MIC of all antibiotics as well as in the case of coagulase production .

المقدمة :-

يعرف الإنتان بأنه مرض جهازي ناتج عن إنتشار الاحياء المجهرية و سمومها ضمن مجرى الدم [1] و تعتبر الصدمة الإنتانية (Septic shock) من الاسباب المؤدية للوفاة في وحدات العناية المركزة في الولايات المتحدة الامريكية[2].تعتبر البكتيريا العنقودية الذهبية بأنها المسبب للخمج الجلدي و خمج الانسجة الرخوة و الامراض الغازية (Invasive disease) وتجرثم الدم [3]. يؤدي تجرثم الدم الناتج عن هذه البكتيريا الى التهاب شغاف القلب (Endocarditis) والإنتان (Sepsis) [4]. وكما اشار[5] بان البكتيريا المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* هي الاكثر انتشاراً للإنتان الذي يؤدي الى نسب وفيات عالية. توصل الباحثون في دراسة اخرى الى أن اكثر من نصف العزلات المسببة لتجرثم الدم في حديثي الولادة هي سببها المكورات العنقودية السالبة لانزيم مختر البلازما (CoNS) [6]. إن بكتيريا الراكدة البومانية *Acinetobacter buamanii* هي إحدى الممرضات المكتسبة من المستشفى. بالرغم من أن اغلبها ترتبط بذات الرئة المكتسب من المستشفى لكن اصابات مجرى الدم مشكلة مهمة في كثير من المؤسسات [7].تدخل هذه البكتيريا الجسم من خلال الجروح المفتوحة، القسطرات و انابيب التنفس[23]. كذلك بكتيريا ايشريشيا القولون *Escherichia coli* هي أحد العوامل الرئيسية لاخماج مجرى الدم الناتجة من البكتيريا السالبة لملون غرام [8].

تمتلك بكتيريا *S.aureus* عوامل ضراوة مختلفة قد تكون ضمن تركيبها (Structural) أو نواتجها الافرازية التي تشارك في الامراضيتها كما لها القدرة على مقاومة الاستجابة المناعية للمضيف لذا فهو العامل الرئيسي الذي جعل بكتيريا *S.aureus* صامدة في مجرى الدم و الانسجة العميقة و تكوين بؤر ثانوية للاصابة [9]. تشمل عوامل الضراوة البروتينات السطحية التي تمكنها من استعمار انسجة المضيف و الاجتياح الذي يساعدها على الانتشار في الانسجة بواسطة افراز الـ Hyaluronidaseو Leukocidin و عوامل سطحية اخرى تثبط بلعمتها من الخلايا البلعمية كالمحفظة (Capsule) و اسموم المحطمة للاغشية (Membrane damaging toxins) و الهيمولاسين و الليكوسيدين المحلل لجدران خلايا حقيقية النواة Hemolysins & (Leukotoxin)[10] . ان السم حال الدم هو عامل مهم لذات الرئة ،الإنتان ، التهاب المفاصل الإنتاني ، خراج الدماغ و التهابات القرنية [11]. يفرز هذا السم من غالبية العزلات السريرية لـ *S.aureus* وهو فعال ضد مجموعة واسعة من الخلايا اللبائن ، بالاخص كريات الدم الحمراء للارانب [12]. البروتييز يعتبر احد اليات المقاومة في البكتيريا و ذلك عن طريق حماية البكتيريا من الببتيدات السامة [13]. ان Cysteine protease للمكورات العنقودية الذهبية يحطم الـ Elastin ، الفايبرينوجين والكولاجين مؤدياً بذلك الى تدمير الانسجة و اختراقها [14]. علميا يمكن وصف إستخدام المضادات الحيوية واسعة الطيف في الإنتان الحاد و الصدمة الإنتانية [15].بالرغم من وجود أعداد كبيرة من المضادات الحيوية ضد خمج *S.aureus* كالمضادات β-Lactam للـ Methicillin-sensitive *staphylococcus aureus* (*MSSA*) و الفانكومايسين للـ Methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (*MRSA*) ذات التأثير الموقف أو المبطل للجدار الخلوي لكنها لاتناسب البروتينات الخارجية للبكتيريا أو غير قادرة على إزالة السموم المؤثرة على خلايا المضيف. بل إن مضادات الـ β-Lactam قد تحفز انتاج السم الحال للخلايا (Cytolysins) و البروتينات الخارجية ، وذلك عند استخدامها بصورة غير دقيقة و التي تؤدي الى سوء حال الحالة السريرية [16]. استهدفت الدراسة الى التعرف على البكتيريا الاكثر شيوعا في إحداث انتان الدموي في محافظة كربلاء ومعرفة تاثير بعض تراكيز المختلفة من المضادات الحيوية ضد بعض عوامل الضراوة لها.

المواد و طرائق العمل :-

جمع العينات (Specimens Collection)

تم جمع (60) عينة دم من المرضى المشخصين بإنتان الدموي و البالغين من كلا الجنسين لمدة (7) أشهر ابتداءا من شهر تشرين الثاني (2014) الى مايس (2015) في مستشفى مدينة الحسين (ع) الطبية محافظة كربلاء المقدسة و حقنت في قنينة الخاصه بزرع الدم و تم وضعها في الجهاز (BacT/Alert 3D, Biomerieux/France) لمدة (1-5) ايام . تم إخراج القناني عند ظهور الأشاره من الجهاز كما و شخصت كل البكتيريا بواسطة الاختبارات البايوكيميائية و نظام Analytical profile index(Api) و جهاز الفايتك (Vitik, Biomerieux/France).

تم التحري عن عوامل الضراوة المميزة ، لكل منهما طريقتان النوعية و الكمية أهمها :
الطريقة النوعية للتحري عن السم الحال للدم (Hemolysin) و ذلك بتنمية العزلات البكتيرية قيد الفحص على وسط غـراء الدم Blood agar بطريقة التخطيط وحضنت الأطباق بدرجة حرارة (37) م لمدة 24 ساعة ، ثم تمت ملاحظة وجود التحلل فـــي كل طبق وشكله ونوعه. وضعت بعدها الأطباق بدرجة حرارة (4) م مدة (16) ســاعة لأستكمال تشخيص نوع التحلل [17] . أما الطريقة الكمية حيث تمت بعد الحصول على الراشح البكتيري للعزلات السريرية في الوسط الكيميائي ثم وضعت في الحاضنة الهزازة لمدة (24) ساعة و بعد اجراء الطرد المركزي المبرد تم ترشيحه باستخدام ورق ترشيح بقطر (0.22) مايكروميتر [18]. تم اختبار الفعالية التحللية للهيمولايسين بطريقة وصفت من قبل [19] باستخدام اطباق المعايرة الدقيقة (Micrititer Plate) . وضع بحدود (100) مايكروليتر لكل تركيز من الراشح الخام للعزلة البكتيرية مع الخليط المكون من (100) مايكرولتر محلول (2%) عالق كريات الدم و (50) مايكروليتر محلول الملح الفسيولوجي في حفر الصفيحة الدقيقة، إستخدم محلول سيطرة المكون من دارئ الفوسفات الملحي. حضنت الصفيحة في درجة (37) م لمدة ساعة واحدة و وضعت بعدها في الثلاجة بدرجة (4) م. بعد ترسيب كريات الدم تم قياس الامتصاصية و تحديد تحلل الدموي إذ تعتمد هذه الطريقة على أخذ مقلوب اعلى تخفيف للراشح سبب تحلل 50% من كريات الدم الحمراء . تم التحري على عامل الضراوة لانزيم البروتييز (Protease) و ذلك بالطريقة النوعية بتلقيح وسط الـ Skim milk بالعزلات المراد فحصها بطريقة التخطيط و حضنها في (37) م لمدة 48 ساعة إذ يؤكد تكون المنطقة الشفافة على ايجابية الفحص و هي قابلية العزلات على انتاج انزيم البروتييز [20]. أما الطريقة الكمية فقد تم استخدام وسط Tryptic soya broth كما وصف من قبل [21] من خلال وضع (20) مليلتر من مرق التربتيك Tryptic soy broth في دورق و عقم بالمؤصدة و ترك ليبرد و لقح بـ (0.2) مليلتر من عزلة فتية بعمر (18) ساعة و حضنت في الحاضنة الهزازة بواقع (130) دورة في الدقيقة في درجة (35) م لمدة (24) ساعة . بعد استخلاص الانزيم الخام من وسط الزرعي السائل بواسطة النبذ المركزي المبرد تم اضافة (0.2) مليلتر منه الى الكازائين (مادة الاساس) و حضن لمدة (20) دقيقة ، بعد ذلك تم ايقاف التفاعل بأضافة (3) مليلتر(Trichloro acetic acid (TCA (5%)، وتم تحضير محلول الـBlank باستخدام نفس المكونات ماعدا اضافة الـ TCA قبل إضافة الانزيم الخام ، ثم تم نبذ المحلولين بالنابذة بسرعة (5000 دورة / دقيقة)لمدة (20) دقيقة ، بعدها تم قياس الامتصاصية للراشح باستخدام جهاز المقياس الضوئي الطيفي Spectrophotometerعلى الطول الموجي (280) نانوميتر، و من ثم تم تحديد الفعاليـــة . الطريقة النوعية للتحري عن عامل الضراوة النوع الثالث هو أنزيم مخثرالبلازما (Coagulase) باستخدام اختبار الانبوب و ذلك باضافة (0.2) مل من وسط Brain heart infusion broth الملقح بالعزلات البكتيرية النامية بعمر (18-24) ساعة الى (0.8) مل من بلازما الارانب في انابيب صغيرة و حضنت بدرجة حرارة (37) م ولمدة (4) ساعات تم خلالها مراقبة حدوث التخثر الذي يدل على ايجابية الفحص في حين تركت الانابيب التي لم يظهر فيها التخثر في درجة حرارة الغرفة الى اليوم التالي [22]. أما بالنسبة الى الطريقة الكمية حيث اتبعت طريقة [46] للكشف عن انزيم مخثر البلازما (Coagulase) المفرز من قبل المكورات العنقودية (Coagulase Positive Staphylococcus) إستخدم وسط Brain Heart Infusion Agar المضاف اليه بلازما الارانب بتركيز (15%- 12 حجم /حجم) صب الوسط على شرائح زجاجية نظيفة بعد لصق جانبي كل شريحة بلاصق شفاف ، ثم عمل حفر بالثاقب الفليني في الوسط بمعدل حفرتين لكل شريحة بعدها ملئت الحفر بالراشح البكتيري الذي تم الحصول عليه بعملية النبذ المركزي بسرعة (2000 دورة /الدقيقة) و لمدة (5) دقائق للمزارع الفتية بعمر (18-24) ساعة و المنماة على وســـط Brain heart infusion broth. إن ظـــهور هـــالات حول الحفر دلاله على إيجابية الإختبار و تم بعدها قيـــاس قطر الهالات المتـــكونة. و فـــي هذه الدراســـة كُشِفَ عن حساسية العزلات للمضادات الحيوية كما جاء في [24] و قورنت النتائج مع الاقطار القياسية لالشركة المجهزة لها [25] و تم قياس التركيز المثبط الادنى(Minimum inhibitory concentration (MIC للمضادات (Amikacin , Ciprofloxacin , Oxacillin) اعتمادا على [25] حيث تم تحضير المحلول الخزين باذابة (0.1) غرام من المضاد في كمية قليلة من الماء المقطر و اكمل الحجم الى (100) مليلتر وبهذا اصبح التركيز (1000) مايكروغرام / مليلتر. حضرت التراكيز الباقية من المحلول الخزين . تم الحصول على التراكيز (0.02 ، 0.04 ، 0.06 ، 0.08 ، 0.1 ، 0.2 ، 0.4 ، 0.6 ، 0.8 ، 1) مايكروغرام / ملليلتر بالنسبة لمضادي (Ciprofloxacin , Oxacillin) و التراكيز (0.1 ، 0.2 ، 0.4 ، 0.6 ، 0.8 ، 1 ، 2 ، 4 ، 6 ، 8) مايكروغرام / ملليلتر للمضاد (Amikacin) بواسطة مزجها مع المولر هنتون و صبها في اطباق بتري نظيفة .لقحت الاطباق بطريقة Spot من البكتيريا المنشطة في مرق مولر هنتون و حضنت في (37) م لمدة (24) ساعة و اعتبر الطبق الخالي تماما من النمو او حاوي على نمو قليل جدا ، هو التركيز المثبط الادنى.اما التراكيز الذي تلى التركيز المثبط الادنى هي تراكيز الـ Sub-MICs .
تم تحليل النتائج إحصائيا بالعتماد على احد الانظمة الاحصائية وفقا للنموذج الاحصائي [26] و مربع كاي (X^2) عند مستوى احتمالية (0.01).

النتائج و المناقشة Results and Disscusion

أظهرت النتائج أن هنالك فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.01) بين نسب اصابة الذكور و الاناث بانتان الدم حيث من بين (60) نموذج دم كانت نسبة الذكور المصابين بالإنتان هي (70%) مقارنة بالاناث والتي كانت نسبتهن (30%) كما هو موضح في الجدول (1). و قد وجد [27] ان نسبة الاصابة بالانتان في الاناث هي (61.4%) و في الذكور (49.4%) و هذا الاختلاف قد يرجع الى إحتكاك أو ملازمة الذكور للظروف البيئية و ملوثاتها أكثر مما هو عليه، في الاناث بما فيها المحن و الاعمال الشاقة. كذلك أظهرت الدراسة أن للعمر تأثير معنوي على الاصابة عند مستوى احتمالية (0.01) فالاشخاص اللذين أعمارهم فوق (50) سنة أكثر اصابة بالانتان كما هو موضح في جدول (2) و قد يكون ذلك بسبب ضعف المناعة لديهم .

بلغت عدد العينات الموجبة باستخدام جهاز BacT/Alert 3D ، و باستخدام قناني الزرع BacT/Alert FAN ، (20) عينة بنسبة (33.33%) في حين كان عدد العينات السالبة لزرع الدم (40) عينة بنسبة (66.67%). ففي دراسة [28] حصل على (18.2%) نتيجة موجبة لزرع الدم باستخدام الطرق التقليدية لزرع الدم دون إستخدم جهاز BacT/Alert.

لوحظ في بعض الاحيان أن هناك تأثيرا في بعض نتائج الزرع الجرثومي طيلة مدة الدراسة كون المريض قد باشر بأخذ المضاد الحيوي مسبقا. هنالك دراسة [29] قارنت بين القناني BacT/Alert FAN و القناني BACTEC Plus الزرعية بمحتوى الوسط اذ إحتوت BACTEC Plus على مادة تشبة الراتنج (Resin) التي تؤدي دورا مهما في ازالة المضادات الحيوية مقارنتا بالوسط الحاوي على مادة الـ Charcoal الموجودة في القناني BacT/Alert FAN. فصصمت هذه القناني للمرضي الذين لم تنخفض حرارتهم بعد اخذ المضاد و وجد بأن نظام BacT/Alert FAN اعطى نتيجة موجبة بنسبة (21%) لزرع الدم بوجود المضاد الحيوي Vancomycin و نسبة (86%) لزرع الدم في غياب المضاد بينما نظام BACTEC Plus اعطى نتيجة موجبة بنسبة (95%).

الجدول (1) : يوضح اعداد الذكور و الاناث المصابة بإنتان الدم

الجنس	العدد	النسبة المئوية
الذكور	14	%70
الاناث	6	%30

الجدول (2) : يوضح تأثير العمر على الاصابة بإنتان الدم

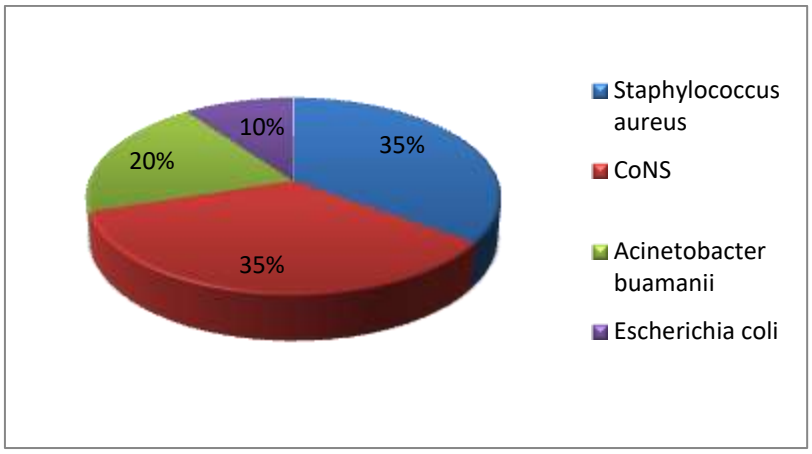
العمر	العدد	النسبة المئوية
20-10	2	%10
30-20	1	%5
40-30	3	%15
50-40	4	%20
فوق 50 سنة	10	%50

لوحظ من خلال الزرع المختبري للعينات الموجبة بأن عدد العزلات البكتيرية الموجبة لملون غرام هو (14) عزلة شكلت نسبة (70%) بينما عدد العزلات البكتيرية سالبة لملون غرام هو (6) عزلات شكلت نسبة (30%). اشار [30]الى ان نسبة البكتيريا الموجبة لملون غرام المعزولة من زرع الدم هي (68%) بينما نسبة البكتيريا السالبة لملون غرام هي (32%). كذلك وجد [28]ان نسبة البكتيريا الموجبة لملون غرام المعزولة من زرع الدم هي (69%). في حين هناك دراسة اخري اجريت في نيجيريا [31] تشيد أن البكتيريا السالبة لملون غرام هي السائدة في احداث إنتان الدم إذ وجد بان نسبة البكتيريا السالبة لملون غرام تشكل (69.3%) بينما الموجبة (30.7%). ان التفسير المحتمل لهذه الاختلافات قد يكمن في اختلاف نظام زرع الدم ، نوعية الدراسة ، الموقع الجغرافي ، طبيعة افراد المرضى و التغيرات الفصلية.

شخصت العزلات بعد ظهور النمو على الاوساط الزرعية بواسطة الفحوصات الكيميائية حسب الطرق الموصوفة من قبل [32]و اكّدت باستخدام نظام Api Staph و Api20E حسب تعليمات الشركة المصنعة و كذلك نظام Vitek .

لوحظ من خلال نتائج الدراسة بان جميع العزلات الموجبة لملون غرام التي تم الحصول عليها تعود الى المكورات العنقودية بنسبة (70%) و هي المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* بنسبة (35%) والمكورات العنقودية السالبة لانزيم مخثر البلازما Coagulase negative Staphylococcus (CoNS) بنسبة (35%) ايضاً و التي شملت (42.8%) من *Staphylococcus lugdunesis* و (28.57%) من *Staphylococcus haemolytics* و (14.2%) من *Staphylococcus epidermidis* و (14.2%) من *Staphylococcus chromogene* اما بالنسبة للعزلات السالبة لملون غرام فقد تم الحصول على (4) منها بنسبة (20%) من بكتيريا *Acinetobacter baumanii* و عزلتان بنسبة (10%) من بكتيريا الايشريشيا القولون *E.coli* ، كما موضح في الشكل (1).

اشارت بعض الدراسات ان بكتيريا المكورات العنقودية هي السائدة في نسبة العزل من زرعات الدم كما جاء في [33] والذي تم عزلها بنسبة (48.3%) من عيناته ، منها نسبة (27.6%) المكورات العنقودية الذهبية و نسبة (20.7%) المكورات العنقودية السالبة لانزيم مخثر البلازما، كذلك وجد [34]ان الكائن المجهري السائد المعزول من زرع الدم هي المكورات العنقودية السالبة لانزيم مخثر البلازما و التي كانت نسبتها (15.87%) تليها بكتيريا الايشريشيا القولون بنسبة (13.0%) و المكورات العنقودية الذهبية بنسبة (11.7%). كما جائت دراسة اخرى [28]تؤكد بأن بكتيريا المكورات العنقودية السالبة لانزيم مخثر البلازما هي السائدة حيث شكلت نسبة (42.3%) تتبعها مكورات العنقودية الذهبية بنسبة (23.9%). كذلك وجد [33]بان نسبة بكتيريا *Acinetobacter baumanii* المعزوله من مرضى الانتان في ردهات الحروق هي (12.1%) و اشار [28]الى ان نسبة بكتيريا ايشريشيا القولون المعزولة من الدم كانت (7%) و هي مقاربة للنسبة التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة .



شكل (1) :نسبة عزل البكتيريا من مرضى الانتان

فحص حساسية العزلات للمضادات الحيوية Antibiogram

في هذه الدراسة تم اختيار فعالية (9) مضادات حيوية ضد البكتيريا المعزولة في دم مرضى الإنتان و كانت حوالي (85.71%) من بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية مقاومة للمضادين Ceftriaxone وAmpicillin كذلك البكتيريا CoNS ابدت مقاومة لهذين المضادين بنسبة (71.42%). قد تختلف نسبة مقاومة المكورات العنقودية بين الدراسات المختلفة [35 و 36] بأن نسبة MSSA الحساسة للمثيسيلين و المقاومة للمضاد Ceftriaxone كانت 60% و 87% .اما بالنسبة للمضادين Erythromycin و Gentamicin فكانت نسبة مقاومة عزلات المكورات العنقودية (71.42%) و(42.8%) على التوالي .اعتبرت بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية حساسة تماما للمضادات Amikacin و Ciprofloxacin و Carbapenem و Oxacillin و Vancomycin حيث كانت الدراسة مقاربة لما جاء في [37]والذي وجد نسبة المقاومة لمضاد الـ Amoxicillin هي (85.56%) و Gentamicin (45%) و Vancomycin (5%) كما في جدول (3). إن بكتيريا CoNS ابدت مقاومة قليلة بالنسبة للمضاد Carbapenem وهي (14.28%). و في الدراسة اخرى وجد [33]ان نسبة مقاومة الـ CoNS للمضاد Imipenem والذي هو نفس صنف الـ Carbapenem ، هي (50%) .

أما بالنسبة للبكتيريا السالبة لملون غرام،فاظهرت النتائج بان الـ*E.coli* كانت مقاومة بنسبة (100%) لمضادي الـ Ampicillin و الـ Ceftriaxone و حساسة للمضادات Amikacin و Ciprofloxacin و الـ Carbapenem . في حين وجد [37]ان عزلات الـ *E.coli* ابدت مقاومة عالية للمضاد Ciprofloxacin بنسبة (76.4%) لكن مقاومة قليلة بالنسبة للمضاد Ceftriaxone بنسبة (32.5%). و وجد [28]بان الـ *E.coli* كانت حساسة بنسبة (80%) للمضاد Gentamicin بدوره يشبه عمل الـ Amikacin في تثبيط تخليق البروتين .

أما بكتيريا الـ *Acinetobacter baumanii* وجدت بانها ذات مقاومة عالية (100%) لجميع المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة.حيث اشار [38]بان نسبة الوفاة بواسطة هذه البكتيريا تتراوح من (26-68%) في مرضى وحدات العناية المركزة و ذلك بسبب مقاومتها لعديد من المضادات الحيوية.

من الجدير بالذكر ارتفاع نسبة الاصابة بالنتان الدموي قد تفاقم في دول المتقدمة و لعل ذلك يعود الى ازدياد مقاومة الطبيعية أو المكتسبة للبكتيريا اتجاه مدى واسع من المضادات الحيوية و من أهمها قنوات Porin و بروتينات الغلاف الخارجي و مضخات efflux و أنزيم المحطم لحلقة البيتالاكتام β-lactamase [39].

تاكد الدراسة بعد متابعة حالة السريرية للمرضى بان (60%) منهم حصلوا على المضاد Ceftriaxone لوحده او مع المضاد Piperacillin او خليط من Amoxicillin و Cloxaciliin اوVancomycin. كذلك تم وصف المضاد Cefotaxime لوحده او مع خليط الـ Amoxicillin و Cloxaciliin لـ (20%) من المرضى. كما وصف المضاد Ciprofloxacin لـ (10%) من المرضى، و البقية (10%) فقط من المرضى تم وصف الـ Carbapenem لهم. اعطيت هذه المضادات قبل ظهورنتائج فحص الحساسية للمضادات الحيوية و استمرت لحين ظهور النتائج و بعدها تم تغيير المضادات حسب المضاد المناسب للبكتيريا الذي ظهر في الفحص. ان اختيار المضادات التجريبية من قبل الاطباء كان اعتماداً على مصدر الاصابة . توفي جميع الاشخاص من الذين تلقوا المضاد Cefotaxime أو Ceftriaxone فقط و نصف الاشخاص الذين تلقوا هذين المضادين مع مضادات اخرى بغض النظر عن نوع البكتيريا. كذلك توفي جميع الاشخاص المصابين ببكتيريا *Acinetobacter baumanii* و السبب يعود الى مقاومتها العالية للمضادات في حين تحسنت حالة المرضى الذين تلقوا المضاد Carbapenem منذ بداية تشخيص المرض و كذلك (66.6%) من الذين تلقوا الـ Carbapenem بعد ظهور نتائج فحص الحساسية للمضادات الحيوية .

جدول (3): يوضح مقاومة عزلات قيد الدراسة اتجاه عدد من مضادات الحيوية المستخدمة

العزلات البكتيرية	المضادات الحيوية								
	AK	AMP	CRO	CIP	E	GEM	MEM	OX	VA
*S.aureus*1	S	R	R	S	R	R	S	S	S
*S.aureus*2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
*S.aureus*3	S	R	R	S	S	S	S	S	S
*S.aureus*4	S	R	R	S	R	S	S	S	S
*S.aureus*5	S	R	R	S	R	R	S	S	S
*S.aureus*6	S	R	R	S	R	S	S	S	S
*S.aureus*7	S	R	R	S	R	R	S	S	S
*S.lugdunesis*1	S	R	R	S	R	R	S	S	S
*S.lugdunesis*2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
*S.lugdunesis*3	S	R	R	S	S	S	S	S	S
S.hamoluticus1	S	R	R	S	R	S	S	S	S
S.hamoluticus2	S	R	R	R	R	R	R	R	S
S.epidermidis	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S.chromogenes	S	R	R	S	R	S	S	S	S
*A.baumanii*1	R	R	R	R	-	R	R	-	-
*A.baumanii*2	R	R	R	R	-	R	R	-	-
*A.baumanii*3	R	R	R	R	-	R	R	-	-
*A.baumanii*4	R	R	R	R	-	R	R	-	-
E.coli 1	S	R	R	S	-	S	S	-	-
E.coli 2	S	R	R	S	-	S	S	-	-

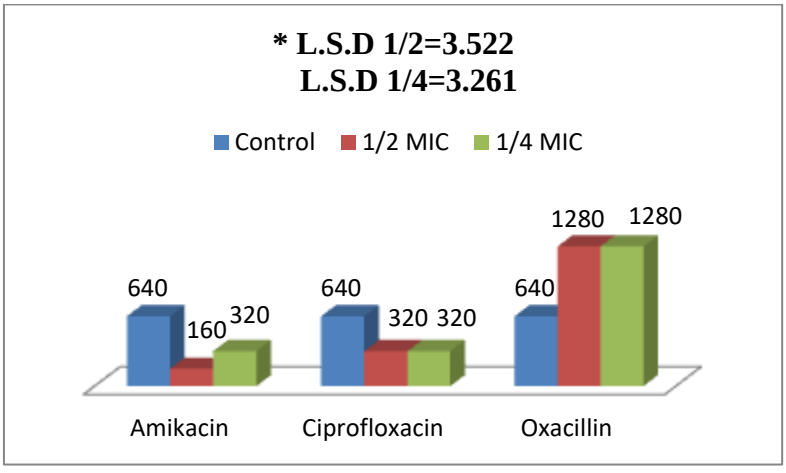
اظهرت النتائج بان (85.71%) من عزلات المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* منتجة لتحلل بيتا (السم حال للدم) و تم التحري عنه بمشاهدة منطقة شفافة حول المستعمرات . اشار[40] بان (90%) من عزلاته للمكورات العنقودية الذهبيـــة من الانسان كانت منتجة للسم حال الدم.عند قياسه بالطريقة الكمية كانت عيارية السم حال الدم (Hemolysin titer) في هذه الدراسة (640 وحده تحللية / مليلتر) بينما في دراسة [41]كانت (320 وحدة تحللية/مليلتر) . قد يكون سبب هذه الاختلافات ناتجة عن اختلاف بكتيريا المدروسة و شدة ضراوتها و المكان الذي عزلت منه.

ان المنطقة الشفافة حول مستعمرات بكتيريا *S.aureus* المزروعة على وسط Skim milk تشير الى قابلية العزلات على انتاج البروتييز. أن هذا الانزيم يكسر الاواصر الببتيـــدية في الببتيدات و البروتينـــات [42]. اظهرت النتائج الى أن جميع عزلات المكورات العنقودية الذهبية قادرة على انتاج البروتييز .كذلك اكد [43]بان جميع العزلات المعزولة من خمج السبيل البولي كانت منتجة لهذا الانزيم في حين اشار [44] الى أن (38%) فقط من عزلات المكورات العنقودية المعزولة من بيئات ردهات الاطفال الخدج قادرة على انتـــاج البروتييز.و في طريقة التعداد الكمي وجد بان الفعالية الانزيمية كانت (44) وحدة / مليلتر. في حين وجد[21] بان الفعالية للبروتييز القاعدي الناتج من المكورات العنقودية المعزولة من الادرار هي (57) وحدة / مليلتر و هذا قد يكون بسبب موقع الخمج . فالبكتيريا تحتاج الى انزيم البروتييز في منطقة القناة البولية لمهاجمة الانسجة و ذلك من خلال دور الانزيم في مقاومة الامينوكلوبيولين المناعي من شطر الـ IgG و تحطيم الانترفيرون كاما (Gamma interferon) للخلايا اللمفاوية و تثبيط عمل العدلات (Neutrophils) للخلايا البلعمية [45].

اظهرت النتائج بان (50%) من عزلات المكورات العنقودية كانت قادرة على انتاج انزيم مخثر البلازما Coagulase Positive Staphylococcus (CoPS) بينما (50%) منها غير قادرة على انتاجه سواء بطريقة الشريحة او طريقة الانبوب

Coagulase negative Staphylococcus (CoNS)، ففي الطريقة النوعية يعد ظهور الخثرة في الانبوب دليل على قدرة البكتيريا على انتاج انزيم مخثر البلازما (Coagulase). ان فترة الحضن لها دور في سرعة ظهور الخثرة ، فبعض العزلات اعطت نتيجة موجبة بعد ساعتين من الحضن و بعضها بعد (4) ساعات في حين لم تظهر الخثرة إلا بعد (24) ساعة من حضنها . ربما يعود ذلك لاختلاف السلالات و شدة امراضيتها .كذلك تم التحري على انتاج انزيم مخثر البلازما بالطريقة الكمية و ذلك بقياس قطر الهالة المتكونة و كان اكبر قطر لعزلات المكورات العنقودية الذهبية هو (3.8) ملم . بينما اشار [46] ان اكبر انتاجية لانزيم مخثر البلازما كانت بقطر (4.8) ملم و قد يكون سبب الاختلاف يعود الى الوسط المستخدم اذ تم استخدام وسط مرق نقيع القلب و الدماغ في هذه الدراسة بينما الوسط المستخدم من قبله كان الوسط المعرف كيميائيا (Chemical defined medium (CDM)) اذ يساعد هذا الوسط البكتيريا لتسلك مسارات ايض ثانوية (Secondary metabolite) كانتاج الانزيمات و ذلك لعدم توفر المواد الاغنائية في الوسط[47]. أما فيما يخص نتائج فحوصات ذات التراكيز المثبطة الادنى و التراكيز Sub-MIC فقد تم تحديد التركيز المثبط الادنى لكل من المضادات Amikacin ، Ciprofloxcin و Oxacillin بالنسبة لعزلة المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من الدم و التي وجدت بانها ذات ضراوة عالية بانتاجها للسم حال الدم و البروتييز و انزيم مخثر البلازما و كانت (4مايكروغرام/مليلتر) لـ Amikacin و (0.25 مايكروغرام/مليلتر) لـ Ciprofloxacin و (1 مايكروغرام/مليلتر) لـ Oxacillin على التوالي. و تم اختيار التركيز MIC ½ و MIC ¼ كتراكيز الـ Sub-MIC.

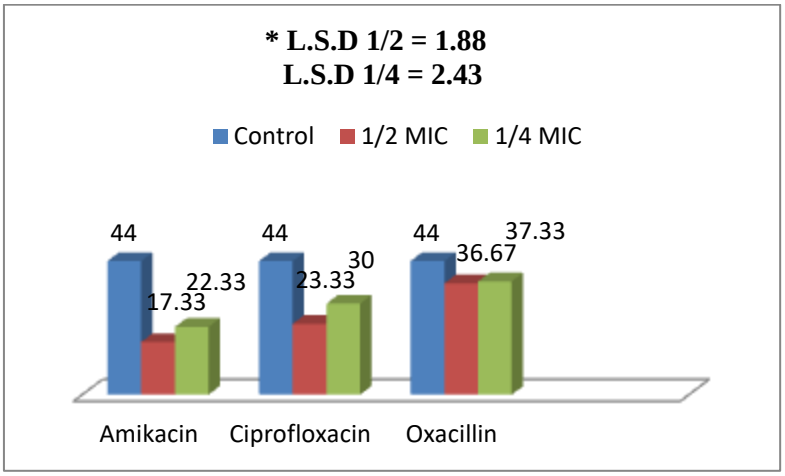
تمت دراسة عوامل الضراوة بوجود تراكيز الـ Sub-MIC للمضادات الحيوية الثلاثة و مقارنتها عند عدم وجود المضادات الحيوية حيث تم اختيار العزلة التي اعطت اعلى نسبة من الفعالية التحللية و التي كانت (640) وحدة /مليلتر وحضنت مع تركيز ½ MIC و ¼ MIC للمضادات Amikacin وCiprofloxacin و Oxacillin دراسة تاثير تراكيز Sub-MIC على انتاج ذيفان حال الدم فاظهرت النتائج بان هنالك فرق معنوي واضح عند استخدام تراكيز الـ Sub-MIC للمضاد Oxacillin إذ تضاعفت الفعالية التحللية لتصل الى (1280) وحدة/مليلترلكن لا يوجد فرق معنوي بين التركيز MIC ½ و التركيز MIC ¼. اشار [48] بان تراكيزالـ Sub-MIC لمضادات مختلفة تنظم تعبير الجين *hal* ، الذي يشفر للسم حال الدم للمكورات العنقوديه . فوجد بان الاصناف المختلفة من مضادات مجموعة بيتا لاكتم (β-lactam) تزيد بشدة في التعبير الجيني للسم حال الدم. في حين استخدام المضاد Amikacin بتركيز MIC ½ قلل انتاج السم ليصل الى (160) وحدة /مليلتر وفي تركيز MIC ¼ قل انتاج السم ايضا لكن بتاثير اقل مقارنة بـ MIC ½ لتصل الفعالية التحللية الى (320) وحدة/مليلتر . اما بالنسبة للمضاد Ciprofloxacin فهنالك فرق معنوي عند وجود تراكيز الـ Sub-MIC و عدم وجودها مع السيطرة اذ انخفضت الفعالية التحللية الى (320) وحدة/مليلتر لكن لا يوجد فرق معنوي بين استخدام تركيز MIC ½ و تركيز MIC ¼ كما موضح في شكل (2). يعتقد بان مضادات المجموعة المثبطة لبناء البروتين تقلل انتاج السم بسبب تأثيرها المثبط و الموقف على نمو البكتيريا و بالرغم من هذا اكد [48]بان هنالك الية اخرى غير معروفه قد تؤدي الى التثبيط الكامل لانتاج السم اذ ان التراكيز ما تحت MIC¼ للمضاد Clindamycin و التي تكون غيرمؤثرة على النمو ادت الى التثبيط الكامل لانتاج السم .



* L.S.D: Least Significant Difference

شكل (2) : يوضح تأثير Sub-MIC لمضادات الـ Amikacin ، Ciprofloxacin و Oxacillin على الوحدة التحللية للسم حال الدم (وحدة تحللية/مليلتر)

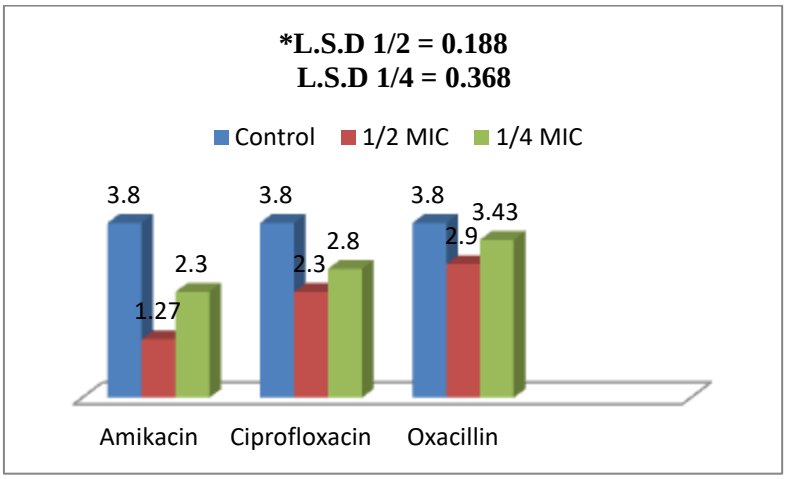
أما فيما يخص قياس الفعالية الانزيمية لعامل الضراوة البروتييز حيث تم تنمية العزلة المدروسة لقياس الفعالية الانزيمية للبروتييز في وسط مرق التربتيك سويا (Tryptic soya broth) و ذلك بوجود تركيز ½ MIC و ¼ MIC للمضادات Amikacin و Ciprofloxacin و Oxacillin لدراسة تاثير تراكيز Sub-MIC على فعالية البروتييز و مقارنتها عند عدم وجود المضادات و التي كانت (44) وحدة / مليلتر. فاظهرت النتائج بان هنالك فرق معنوي عند استخدام المضاد Amikacin إذ قلت الفعالية الانزيمية بشكل كبير و اصبحت (17.33) وحده / مليلتر عند تركيز ½ MIC . ان التركيز ½ MIC له تأثيراً أعلى تثبيطاً مقارنة بالتركيز ¼ MIC إذ اصبحت الفعالية عند تركيز ¼ MIC (22.33) وحدة / مليلتر. المضاد Ciprofloxacin قلل الفعالية الانزيمية ايضا لكن بنسبة اقل مقارنة بالمضاد Amikacin في حين ان المضاد Oxacillin بتركيز ½ MIC و ¼ MIC قلل الفعالية الانزيمية بشكل قليل جدا و لا يوجد فرق معنوي بين التركيز ½ MIC و التركيز ¼ MIC كما موضح في شكل (3) .



* L.S.D: Least Significant Differenece

شكل (3):يوضح تأثير Sub-MIC لمضادات الـ Amikacin ، Ciprofloxacin و Oxacillin على الفعالية انزيم الـ Protease (وحدة تحللية/مل)

اظهرت النتائج بان هنالك فرق معنوي واضح في انتاج انزيم مخثر البلازما عند استخدام المضاد الحيوي Amikacin إذ انخفض الى اقل من النصف مقارنة بانتاج انزيم مخثر البلازما عند عدم وجود المضاد. ففي غياب المضاد كان قطر الهالة حول الحفر (3.8) ملم و عند تركيز الـ ½ MIC اصبح (1.27) ملم و عند تركيز الـ ¼ MIC اصبح (2.3) ملم. أصبح من الواضح ان تركيز ½ MIC هو اعلى من تركيز ¼ MIC أثناء التخفيف من المحلول الخزين و بهذا فأن العدد البكتيري اصبح اقل مما في التركيز ¼ MIC و بالتالي أدى الى انتاج اقل لانزيم مخثر البلازما. كما هو الحال بالنسبة للمضاد Ciprofloxacin فقد أظهر فرقاً معنوياً عند استخدام التركيز ½ MIC إذ قل تركيز الانزيم و اصبح القطر (2.3) ملم و عند تركيز ¼ MIC اصبح القطر (2.8) ملم . بينما المضاد Oxacillin قلل انتاج أنزيم مخثر البلازما لكن بشكل اقل مقارنة بالمضادين الآخرين كما موضح في شكل (4) .



*** L.S.D:Least Significant Difference**

شكل (4) يوضح تأثير Sub-MIC لمضادات الـ Amikacin ، Ciprofloxacin و Oxacillin على انتاج انزيم مخثر البلازما (مليمتر)

ان التعبير عن عوامل الضراوة في البكتيريا ، يتأثر بعوامل مختلفة منها الحرارة ، دالة الحامضية، الحالة الغذائية ، الايونات ،جذور الاوكسيجين و غيرها. فمن الطبيعي أن الكثير من المضادات عند تراكيز الـ Sub-MIC (بالاخص مثبطات بناء البروتين) تغير نمط التعبيرلجينات الضراوة . اعتمادا على صنف المضاد و النوع البكتيري ، تنتج هذه التغييرات ، اما زيادة او نقصان في التعبير الجيني لعوامل الضراوة و غالبا ما يكون من الصعب تشخيص الالية الفسيولوجية الكامنه لهذه التغييرات [49]. بالرغم من وجود عدد كبير من المضادات الحياة التي تمتلك صفة منع أو قتل الاحياء المجهرية لكنها تناسب أو لا تناسب عوامل الضراوة التي لها تأثير بتراكيز قليلة أو واطئة نسبياً [50].

تبين من الاحصائية التي اجريت في هذه الدراسة بأن مضادات مجموعة البيتا لاكتام (β-Lactam) هي المفضلة لاستخدامها من قبل الاطباء في علاج الاخماج الناتجة عن المكورات العنقودية ، في حين يتضح بان التراكيز الـ Sub-MIC لهذه المجموعة من المضادات قد تزيد في انتاج عوامل ضراوة للمكورات العنقودية كما في السم حال الدم.

المصادر Reference:-

1. Vincent, J. L. and Abraham, E. (2006). The last 100 years of sepsis. *J. Respir. Crit. Care Med*., 173, 256–263
2. Stephen, J. ; Fich, M. ; James, R. ; Gossage, J. (2002). Optimal management of septic shock , rapid recognition and institution of therapy are crucial. Post. Grad. Med. 111(3):53-66
3. Von , E. C. ; Becker, K. ; Machka, K. ; Stammer, H. ; Peters, G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *England J Med*; 344(1):11-6
4. Klevens , R. M. ; Morrison , M. A. ; Nadle , J. (2007) . Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Journal of the American Medical Association*; 298:1763-71
5. McAdow , M. ; Kim , H . K. ; Dedent , A. C. ; Hendrickx , A. P. ; Schneewind ,O. ; Missiakas, D. M., (2011). Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. PLoS Pathog. 7(10):1-12
6. Bizzarro , M. J. ; Raskind , C. ; Baltimore , R . S . ; Gallagher , P . G . (2005). Seventy-five years of neonatal sepsis at Yale: 1928– 2003, Pediatrics 116 :595–602.
7. Villegas , M. V. ; Hartstein , A. I. (2003). *Acinetobacter* outbreaks 1977-2000. Infect Control Hosp Epidemiol; 24:284-95.
8. Koga , V. L. ; Tomazetto , G. ; Cyoia , P. S. ; Neves , M. S. ; Vidotto , M. C. (2014). Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. BioMed Research International.
9. Naber , C. K. (2009). *Staphylococcus aureus* Bacteremia : Epidemiology, Pathophysiology, and Mangement Strategies. *Clinical Infectious Diseases*; 48:231-7.
10. Dingesm, M. M. ; Orwin, P. M. and Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinica Microbiology Reviews 13[1], 16-34.
11. Wardenburg, J. B. ; Patel, R. J. ; Schneewind, O. (2007). Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infection and Immunity* 75: 1040–1044.
12. Husmann, M. ; Beckmann, E. ; Boller, K. ; Kloft, N. ; Tenzer, S. (2009). Elimination of a bacterial pore-forming toxin by sequential endocytosis and exocytosis. Federation of European Biochemical Societies Letters 583: 337–344.
13. Ulvatne, H. ; Haukland, H. H. ; Samuelsen, O. ; Krämer, M. and Vorland, L. H. (2002). Proteases in Escherichia coli and *Staphylococcus aureus* confer reduced susceptibility to lactoferricin B. *Journal of Antimi. Chem.*, 50:461-467.
14. Ohbayashi, T. ; Irie, A. ; Murakami, Y. ; Nowak, M. ; Potempa, J. ; Nishimura, Y. ; Shinohara, M. ; Imamura, T. (2011). Degradation of fibrinogen and collagen by staphopains, cysteine proteases released from *staphylococcus aureus*. Microbiology;157:786-792.
15. Marik, P. E. (2014). Early Management of Severe Sepsis .Chest. 145(6):1407-18
16. Stevens, D. L.; Ma, Y. ; Salmi, D. B. ; McIndoo, E. ; Wallace, R. J. ; Bryant, A. E. (2007). Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis*. 195(2), 202–211

17. Mathai , J. ; Sindhu , P. N. ; Sulochana , P. V. & Sathyabhama , S. (2003). Haemolysin test for characterization of immune ABO antibodies. *Indian J. Med. Res.* 118 : 125-128.

18. مسلم، ساهرة نصيف (2005). دراسة وراثية وكيموحيوية على الهيمولايسين المنتج من بكتيريا الـ *Aeromonas hydrophila* والمعزولة من المياه السطحية والمصابين بالأسهال ، رسالة دكتوراه ، كلية العلوم – الجامعة المستنصرية.

19. Saito, K . F . ; Thein, W . B . ; Sakurai, N . and Fukuyasu, T . (2006). Prevalence of virulence factors in Staphylococcus intermedius isolates from dogs and pigeons. BioMed Central Veterinary Research. 2:4

20. Al-Khafaji, M. H. ; Flayyih, M. T. and Sabah, M. A. (2013). Isolation, Identification and Detection of Some Virulence Factors of Staphylococci in milk and cheese in Baghdad. *Iraqi Journal of Science*. 54, Supplement.4:1057-1067

21. Sind, S. O. and Hamid, G. H. (2013). Qualitative and Quantitative screening of alkaline protease production from some pathogenic bacteria. *Journal of Kerbala University* , 11,3.

22. Quinn, P . J . ; Carter, M . E . ; Markey, B . ; Carter, G . R . (2004). Clinical Veterinary Microbiology. Mosby Publishing, London, UK

23. Smolyakov, R. ; Borer, A. ; Riesenberg, K. ; Schlaeffer, F. ;Alkan, M. ; Porath, A. ; Rimar, D. ; Almog, Y. ; Gilard, J. (2003). Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. *J. Hosp. Infect.* 54:32-8

24. Turutoglu, H. ; Ercelik, S. and Ozturk, D. (2006). Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine Mastitis. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 50, 41-45.

25. Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI),(2012).Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;Twentysecond informational supplement,32(3).Wayne, USA

26. Levesque, R. (2007). SPSS Programming and Data Management: A Guide for SPSS and SAS User. Fourth Edition. SPSS Inc. Chicago.

27. Couto, D. O. ; Jùnior, A. A. P. ; Farias, J. L. M. ; Sales, D. B. ; Lima, J. P. A. ; Rodrigues, R. S. and Meneses, F. A. (2011). Gender and mortality in sepsis: do sex hormones impact the outcome? Rev. Bras. Ter. Intensiva.23(3):297-303.

28. Dagnew, M. ; Yismaw, G. ; Gizachew, M. ; Gadisa, A. ; Abebe, T. ; Tadesse, T. ; Alemu, A. and Mathewos, B. (2013). Bacterial profile and antimicrobial susceptibility pattern in septicemia suspected patients attending Gondar University Hospital, Northwest Ethiopia. BioMed Central, 6:283.

29. Flayhart, D. ; Borek, A. ; Wakifield, T. ; Dick, J. and Carroll, K. (2005). Ability of BD BACTEC Plus Blood Culture Bottles versus BacT/Alert FAN Blood Culture Bottles to Detect Bacterial Pathogens in Samples Containing Vancomycin. As presented at the General Meeting of the American Society for Microbiology.

30. Naher, H.S.; Hasson, S.O. and Al-Mrzoq, J.M., (2013). Gram-Positive Bacteremia in Febrile Children under two years of Age. International Research *Journal of Medical Sciences*. 1(4): 6-10.

31. Nwadioha, I. ; Nwokedi, E. O. P. ; Kashibu, E. ; Odimayo, M. S. ; Okwori, E. E. (2010). A review of bacterial isolates in blood cultures of children with suspected septicemia in a Nigerian. African J. Microbiol. Res. 4:222-225.

32. Baron , E. J. and Finegold , S. M. (1995). Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology . 8th ed . C . V . Mosby Company.

33. Macedo, J.L.S.; Rosa, s.c. and Castro, C., (2003). Sepsis in burned patients. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 36(6):647-652

34. Vendemiato, A.V.R.; Nowakonski, A.; Marson, F.A.L. and Levy, C.E., (2015). Microbiological characteristics of sepsis in a University hospital. BioMed Central Infectious Diseases, 15:58.

35. Ampel, N. M. (2014). MSSA Resistance to Ceftriaxone.Reviewing Pickering, A. *Clin. Infect. Dis.*44:21-23

36. Pickering, A. ; Hariri, R. ; Harrison, L. H. ; Marsh, J. W. ; Tasneem, A. ; Freedy, H. ; Wilson, L. ; Bonilla, H. (2014). The common occurrence of ceftriaxone-resistant methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* at a community teaching hospital. *Clin. Infect. Dis*. 44:21-23
37. Desai, K. J.; Malek, S. S. ; Parikh, A. (2011). Neonatal septicemia: Bacterial isolates & their antibiotics susceptibility patterns. *Gujarat Medical Journal*.66:1.
38. Sunenshine, R. H. ; Wright, M. O. ; Maragakis, L. L. (2007). Multidrug-resistant Acinetobacter infection mortality rate and length of hospitalization. *Emerg. Infect. Dis*.; 13:97–103.
39. Bonomo, R. A. and Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in Acinetobacter species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis*. ;43:49-56.
40. Moraveji, Z. ; Tabatabaei, M. ; Shirzad Aski, H. and Khoshbakht, R. (2014). Characterization of hemolysins of Staphylococcus strains isolated from human and bovine, southern Iran. Iranian *Journal of Veterinary Research*, Shiraz University. 15(4) Ser(49):326-330
41. Al-Shammary, A. H. ; Al-Hasani, H. S. ; Nadir, M. I. (2012).Extraction and Studying The Effect of Ph And Temperature on Hemolysin Production by A Local Isolates of *Staphylococcus aureus*. Karbala J. Med.5,1
42. Barrett, A. J. ; Rawlings, N. D. ; Woessner, J. F. (2004). Handbook of Proteolytic Enzymes. 2e ed. London, Academic Press
43. Choong, S. K. S. ; Wood, S. ; Fry, C. H. and Whitfield, H. N. (2001). Catheter associated urinary tract infection and encrustation. Int. *J. Antimicrobial Agents*. 17:305-310.
44. الحسيني ، رغد عبد اللطيف و اقبال خضر الجوفي (2009). دراسة انتاجية بعض عوامل الضراوة لبعض البكتيريا المعزولة من ردهات الاطفال الخدج.مجلة علوم المستنصرية .مجلد 20، العدد 2
45. Rooijakkers, S. H. ; Van Kessel, K. P. ; Van Strijp, J. A. (2005). Staphylococcus innate immune envasion. Trends Microbiology 13:596-601.
46. السالمي، براك ثامر شبيب (2015). عزل و تشخيص بكتيريا المكورات العنقودية المنتجة لانزيم مخثر البلازما من عينات سريرية و غذائية مختلفة و دراسة بعض العوامل المؤثرة في إنتاجه. مجلة جامعة كربلاء العلمية. المجلد الثالث عشر، العدد الاول.
47. Summers , M . C. & Biggers , J. D. (2003). Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. Human Reproduction Update, 9 (6) : 557-582.
48. Ohlsen, K. ; Ziebuhr, W. ; Koller, K. P. ; Hell, W. ; Wichelhaus, T. A. ; Hacker, J. (1998). Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on α-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrob. Agents. Chemother. 42(11), 2817–2823
49. Andersson, D. I. and Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. Nature Reviews Microbiology. 12, 465–478
50. Micek, S. T. ; Dunne, M. ; Kollef, M. H. (2005). Pleuropulmonary complications of Panton-Valentine leukocidin-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: importance of treatment with antimicrobials inhibiting exotoxin production. *J. Chest.* 128(4):2732-2738