تأثير الانتروسين المنتج من بكتريا *Enterococcus faecalis* على البكتريا المسببة للإسهال عند الأطفال و صغار الاغنام

حسام سامي عويد خليل مصطفى خماس
كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية

الخلاصة

جمعت300عينة (100عينة من براز اشخاص اصحاء ومصابين باسهال و100عينة من براز اطفال اصحاء ومصابين باسهال و100 عينة من براز صغار الاغنام مصابة باسهال) من مستشفيات مختلفة في مدينة بغداد ، للمدة من كانون الثاني ولغاية نيسان 2012واخضعت جميع العزلات للفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية بأستخدام جهاز Vitek 2 بغية تشخيصها لحد النوع ، واظهرت النتائج ان 40 عزلة تعود لبكتريا المكورات المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* بضمنها 25 عزلة حالات اسهال و15 عزلات من اشخاص اصحاء و31 عزلة توزعت مابين(18) عزلة لبكتريا *E.coli* و(5) عزلات لبكتريا *E.coli* O157:H7 و(8)عزلات *Salmonella spp.* وتم اخضاع جميع العزلات للفحوصات الزرعية والمجهرية والكيموحيوية و باستخدام اشرطة (API 20- E). و أختبرت حساسية هذه العزلات (31) للمضادات الحيوية وقد اظهرت العزلات مقاومة متعددة تجاه المضادات الحيوية تراوحت بين(9 – 11) مضادا حيويا كانت جميع العزلات لبكتريا *E.coli* و *E.coli* O157:H7 و *Salmonella spp.* مقاومة لبعض للمضادات الحيوية الخاصة بالبكتريا السالبة والعائدة لمجموعةEnterobacteriaceae .و تم الكشف عن انتاج الانتروسين عن طريق اختبار الفعالية التثبيطية للعزلات المحلية من بكتريا *E.faecalis*في الاوساط الصلبة والسائلة تضمنت وسطي MRS و وسط نقيع القلب والدماغ وبطريقتين تجاه البكتريا المسببة لحالات الاسهال وقد اظهرت العزلات تأثيرها الواضح على البكتريا السالبة لملون غرام المسببة لحالات اسهال عند الاطفال وصغار الاغنام وباقطار تثبيط مابين (12-20) ملم وكان وسط MRS الصلب والسائل افضل من وسط نقيع القلب والدماغ .

المقدمة

تنتمي بكتريا *Enterococcus faecalis*الى عائلة *Enterococcaceae* وشعبة Firmicutes التي تعد ضمن بكتريا حامض اللبنيك Lactic Acid Bacteria (LAB)، وإن السلالات التابعة لهذه البكتريا تملك فعالية الضد مايكروبية غالبا ما تكون محمولة على بلازميد تستخدمه لغرض قتل او تثبيط الانواع القريبة منها وراثيا وحتى المختلفة من نفس النوع وهذه الخاصية تشابه عمل المضادات الحيوية الا انها اكثر تخصصا في عملها بكثير تعرف بالبكتريوسين نشأت من حاجتها للبقاء على قيد الحياة في بيئة مأهولة بالعديد من المايكروبات وبالتالي امتلكت القدرة على تدمير الخلايا البكتيرية المحيطة بها دون الحاجة الى هذا البلازميد (1). أشارت الدراسات الى إستخدام البكتريوسينات المنتجة من بكتريا حامض اللاكتيك كبدائل كفوءة لمضادات الحيوية في حالات وقائية لمنع الإصابة او علاجية للإصابة وبما يقلل من إستخدام مضادات الحيوية والمشاكل المتعلقة لمقاومة هذه المضادات(2). تضاعفت الجهود في السنوات الاخيرة باتجاه استخدام الببتيدات المايكروبية موجبة الشحنة كبدائل اومشتقات تضاف للمضادات الحيوية التقليدية نظرا لانتشار السلالات المقاومة والمتسببة عن الاستخدام الواسع والعشوائي للدواء في علاج الاخماج المتسببة عن البكتريا والطفيليات والفطريات فضلا عن امتلاكه الية تثبيط تختلف عن الآلية التي تعمل بها الأنزيمات(3). تتواجد المكورات المعوية البرازية *E. faecalis* كنبيت طبيعي في امعاء الانسان والحيوان(الاغنام،الابقار،الماعز،الخنازير،الخيول) ، فضلاً عن وجودها في الجهاز التناسلي الانثوي وفي تجويف الفم واحياناً في الجهاز التنفسي ، كما توجد في التربة والميـاه(4).كما أشار(5) الى كفاءة البكتريوسين المنتج من بكترياحامض اللبنيك Lactic Acid Bacteria (LAB) في تثبيط العديد من البكتريا المرضية . فقد تم إستعمال البكتريوسين المنتج من بعض أنواع بكتريا حامض اللاكتيك كمعززات حيوية (probiotic) (6). تشير العديد من الادبيات الى اعتبار الانتروسين المنتج من *E . faecalis* (هو البكتريوسين المنتج من هذا الجنس تحديدا) المعزولة من مصادر سريرية وتلك المعزولة من النبيت الطبيعي ومصادر بيئية من عوامل الضراوة خاصة اذا ماأرتبطت انتاجيته بانتاج عوامل ضراوة اخرى مثل انتاج الانزيم الحال للدم والاستجابة لفرمون الجنس خصوصا اذا ماكانت محمولة على بلازميد اقتراني له القدرة على نقل هذه الصفات الى عزلات اخرى غير منتجة لتصبح هذه العزلات من الممرضات الانتهازية التي لها القدرة على احداث الاخماج الشديدة مقارنة بالعزلات المنتجة فقط للانتروسين او الهيمولايسين (7). ونظرا للأهمية التطبيقية للبكتريوسين ولاستمرار الحاجة الى الحصول على انواع من المضادات ذات الانتاج الطبيعي وغير المخلق صناعيا لذا اقتضت الحاجة للتحري عن عزلات بكتيرية منتجة لمركبات ذات فعالية ضد مايكروبيـة واسعة الطيف ولتقليل الخطر الناجم عن الاستخدام الواسع والعشوائي للمضادات الحياتية من قبل الانسان والحيوان الذي ينجم عنه مشكلة صحية خطيرة ولندرة الدراسات المحلية التي تتطرق الى تأثير الانتروسين المنتج من بكتريا *E.faecalis* و تأثيره

على البكتريا المسببة للإسهال عند الاطفال وصغار الاغنام فقد جاء هذا البحث يهدف الى:

- الكشف عن الانتروسين المنتج من قبل العزلات المحلية لبكتريا *E.faecalis* وتحديد مـدى فعاليته التثبيطية تجاه عدد من الانواع المختلفة من البكتريا المسببة لحالات الإسهال عند الاطفال وصغار الاغنام كوسيلة علاجية فعالة .

المواد وطرائق العمل

1- جمع العينات :

جمعت200 عينة سريرية لاطفال واشخاص بالغين من كلا الجنسين توزعت مابين (50عينة من براز اشخاص بالغين و50عينة من براز اطفال اصحاء و50 عينة من براز اشخاص يعانون من حالات اسهال و50 عينة من براز اطفال يعانون من حالات اسهال) للمدة من كانون الثاني ولغاية نيسان 2012 من مستشفيات مختلفة من مدينة بغداد (المنصور التعليمي للاطفال والمختبرات التعليمية لمدينة الطب) للتحري عن بكتريا *E . faecalis* ،اما بالنسبة للبكتريا االمسببة لحالات الاسهال لدى صغار الاغنام جمعت 100 عينة برازمن (مختبرات كلية الطب البيطري/ الجامعة المستنصرية) باخذ كمية من البراز من كل عينة(الاطفال وصغار الاغنام) بواسطة عيدان خشبية معقمة ووضعت في انابيب حاوية على 2 مليلتر من المحلول الملحي الفسلجي ، ثم زرعت على الاوساط الانتقائية الخاصة بالعـزل.

2- فحص العينات والتشخيص :

الاوساط الزرعية : زرعت العينات على وسط Bile Esculin Azide agar وحضنت الاطباق في درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة. ان ظهور المستعمرات وتغير لون الوسط الى الاسود بعد الحضن دليل على قابلية عزلات المكورات على انتاج انزيم Esculinase الذي يحلل الاسكولين الى الكلوكوز والاسكوليتين واتحاد الاخير مع ايونات الحديد ليكون معقد ذي لون اسود، وقابلية العزلات على النمو في تراكيز عالية من املاح الصفراء (8). وتمتاز *E.faecalis* بكونها مكورات موجبة لملون غرام وذي قطر (0.5 – 1) مايكروميتر، تترتب بشكل مكورات مفردة او ازواج او بشكل سلاسل قصيرة وقد تظهر الخلايا احيانا بشكل مكورة عصوية (Coccobacillary) عند عمل شريحة لخلايا ماخوذة من وسط صلب ومصبوغة بصبغة غرام اما لو اخذت الخلايا من وسط سائل مثل وسط Thioglycolate Broth فتظهر اكثر بيضوية وبشكل سلاسل طويلة وتعد هذه البكتريا ايضا غير متحركة وغير مكونة للابواغ والاسواط وغير منتجة للصبغات على الوسط الصلب (8) ,(9). تتصف المكورات المعوية البرازية بانها لاهوائية اختيارية (Facultative Anaerobic) سالبة لاختبار الاوكسيداز ولا تنتج السايتوكروم لذا تعطي فحصاً سالباً لاختبار الكتالاز واحيانا تعطي انتاجاً ضعيفاً للكتالاز (Weakly Positive) وخاصة عند تنميتها في وسط يحتوي على مركبات الهيم (10) ,(11).

الاختبارات الكيموحيوية : اعتمدت الاختبارات التشخيصية الواردة في مصنف Bergey's وغيرها من المصادر (11)،(12) لتشخيص العزلات لحد مستوى النوع والتي شملت ما يأتي :

اختبار الكتالاز واختبار الاوكسيداز و النمو في 6.5% كلوريد الصوديوم والنمو في 10ْم والنمو في رقم هيدروجيني 9.6 وتحليل الارجينين.

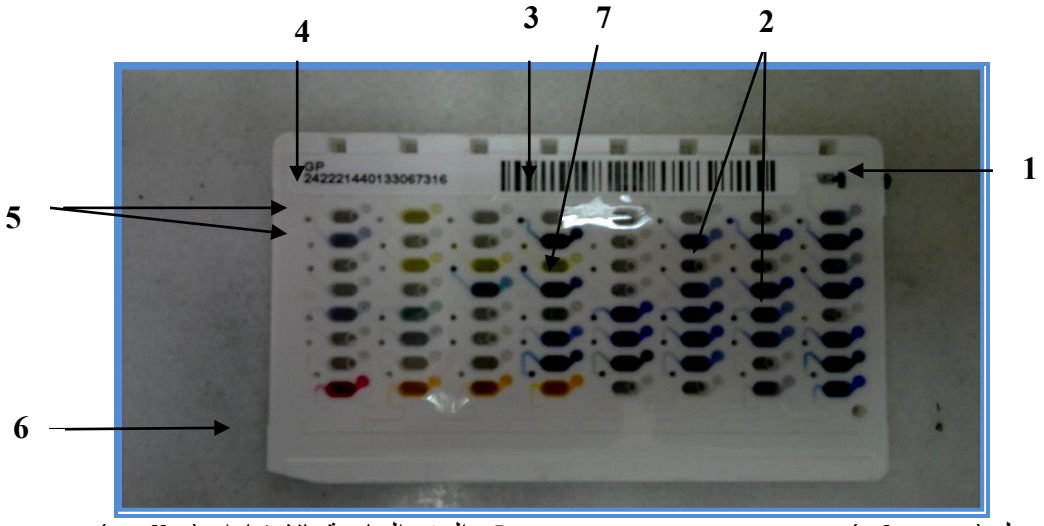
3-التشخيص بالعدة الجاهـزة : نظام VITEK 2 COMPACT

يتضمن التشخيص باستخدام GP ID (card) (gram positive identification gard)

صممت هذة البطاقة للتشخيص الاوتوماتيكي الانواع الكروية الموجبة لملون غرام والعصوية الغير مكونـة للسبورات والاصدار الحديث (current version) لبرامجيات الجهاز يقع تحت رقم 04.01 ويضم (115) نوعاً وان التشخيص بهذه البطاقة يعتمد على الطرق الكيموحيوية وتطوير مواد اساس جديدة وهناك (43) اختبار كيموحيوي مختلف يقيس استهلاك مصادر الكاربون والفعالية الانزيمية والمقاومة ونتيجـة التشخيص النهائي تستغرق حوالي 8 ساعات او أقل وتحتوي البطاقة على 64 حفرة (Well) تضم اوساطاً زرعية خاصة تحوي مواد أساس (substrates) خاصة بالاختبارات الكيموحيوية ، كما وتضم احدى الحفر وسط زرعي معد كسيطرة سالبة (negative control) broth وتحوي حفرة اخرى على وسط زرعي سائل معد للسيطرة على النمو (growth-control broth). تنجز هذه البطاقة عدداً من الاختبارات التقليدية (conventional methods) والتي تم تحويرها لتستخدم ضمن نظام Vitek 2 ، ينتج عن مفهوم البطاقة بشكلها الفريد من نوعه خلق ظروف هوائية وأخرى لمكروبات ذات احتياج قليل للهواء (microaerophilic)، وبحسب ملائمة كل اختبار وحسب تعليمات شركة .bioMérieux الفرنسية كما ورد في (13) . ويوضح الشكل (2-1) تصميم هذه البطاقة

الشكل (2-1)

(أ)



1- فتحة الدخول (inlet port) .
2- القنوات (Channles) .
3- الباركود الخاص بالبطاقة (par cod) .
4- رقم بطاقة GP لمعرفة نوع العينة .
5- الحفر الخاصة بالاختبارات(Wells).
6- أحد جوانب البطاقة (الواجهة الامامية).
7- غلاف بلاستيكي أمن (save gard).

(ب)

رقم الحفرة	الرمز	اسم الاختبار	رقم الحفرة	الرمز	اسم الاختبار
2	AMY	D-AMYGDALIN	32	POLY B	POLYMIXIN B RESISTANCE
4	PIPL	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C	37	dGAL	D-GALACTOSE
5	dXYL	D-XYLOSE	38	dRIB	D-RIBOSE
8	ADH1	ARGININE DIHYDROLASE1	39	ILATK	L-LACTATE alkalinization
9	BGAL	BETA-GALACTOSIDASE	42	LAC	LACTOSE
11	AGLU	ALPHA-GLUCOSIDASE	44	NAG	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE
13	APPA	Ala-Phe-Pro ARYLAMIDASE	45	dMAL	D-MALTOSE
14	CDEX	CYCLODEXTRIN	46	BACI	BACITRACIN RESISTANCE
15	AspA	L-Aspartate ARYLAMIDASE	47	NOVO	NOVOBIOCIN RESISTANCE
16	BGAR	BETA GALACTOPYRANOSIDASE	50	NC6.5	GROWTH IN 6.5%NaCL
17	AMAN	ALPHA-MANNOSIDASE	52	dMAN	D-MANNITOL
19	PHOS	PHOSPHATASE	53	dMNE	D-MANNOSE
20	LeuA	Leucine ARYLAMIDASE	54	MBdG	METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE
23	ProA	L-Proline ARYLAMIDASE	56	PUL	PULLULAN
24	BGURr	BETA GLUCURONIDASE	57	dRAF	D-RAFFINOSE
25	AGAL	ALPHA-GALACTOSIDASE	58	O129R	O/129 RESISTANCE(comp.vibrio)
26	PyrA	L-Pyrrolidonyl-ARYLAMIDASE	59	SAL	SALICIN
27	BGUR	BETA-GLUCURGNIDASE	60	SAC	SACCHAROSE/SUCROSE
28	AlaA	ALanine ARYLAMIDASE	62	dTRE	D-TREHALOSE
29	TyrA	Tyrosine ARYLAMIDASE	63	ADH2s	ARGININ DIHYDROLASE 2
30	dSOR	D-SORBITOL	64	OPTO	OPTOCHIN RESISTANCE
31	URE	UREASE			

الشكل (2-1) . أ- تصميم البطاقة (GP (Card ، ب-الاختبارات الخاصة بالبطاقة

خطوات تلقيح GP ID(Card) :-

1- خطط سطح وسط TSA بعزلة البكتريا المراد تشخيصها، وحضن عند 35-37مْ ولمدة 24-48 ساعة.

2- سحبت البطاقة GP من غلافها وسجل رقم النموذج على السجل الخاص بالجهاز .

3- علق عدد كافي من مستعمرات المزرعة النقية في 3.0ml من محلول Normal saline في انابيب اختبار بلاستيكية شفافة.

4- يقاس العالق للعزلة المراد تشخيصها بواسطة جهازالعكورة الخاص بجهاز vitek 2 compact (DensiChek™) بحيث تكون عكورةالعالق مساوية الى (0.50-0.63).

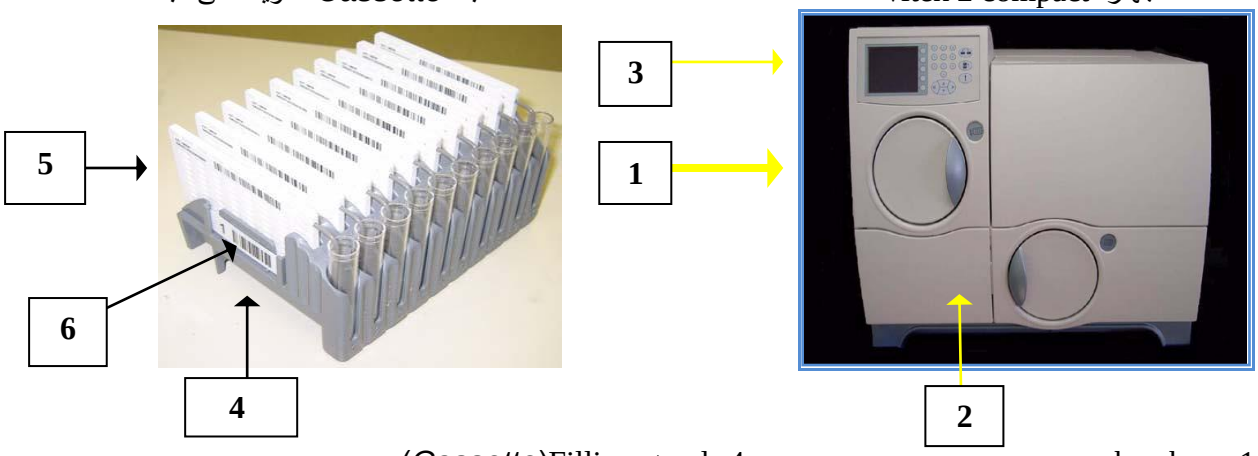
5- نقلت البطاقة المتصلة بوحدة أنبوب النقل (Card/ transfer tube unit) المحمولة على حامل الأنابيبFilling stand والمرتبط بها أنبوبة النقل بجزئها الطويل مغمور في أنبوبة الاختبار يدويا.كما في الشكل (ب).

6- . نقل الحامل داخل الجزء المخصص لتلقيح البطاقات والذي يصطلح تسميته vacuum chamber داخل الجهاز حيث لقحت البطاقة فيه وتم التحري عن تلقيحها بصورة صحيحة وهي بداخله، ثم يقوم الجهاز بقطع أنبوبة النقل Sealing بعدها نقلت البطاقات الى داخل Incubator، لغرض التحضين بدرجة 35.5وقراءة النتيجة خلال 8 ساعات او أقل فيما بعد. كما موضح في الشكل (أ).

7- عمل الجهاز خلال فترة التحضين على تحليل وخزن الأنماط الكيموحيوية Biochemical Patterns بصورة ذاتية، وبعد فترة التحضين حللت برمجيات الجهاز هذه الانماط وطبع تقرير التشخيص لكل بطاقة موجودة داخل Reader/ Incubato . وكما ورد في (13).

أ- جهاز vitek 2 compact

ب- *Cassette* حاوية على البطاقات



1- vacuum chamber
2- Incubator
3- screen
4- Filling stand(*Cassette*)
5- Card
6- inculation tube

4 - فحص العينات وتشخيص البكتريا المسببة للاسهال عند الاطفال وصغار الاغنام

الاوساط الزرعية:زرعت العينات على وسط MacConky agar و triple sugar iron و IMViC(indole,methyl red,Voges-Proskauer, citrate) لتفريق بكتريا *E.coli* عن بقية عائلة Enterobacteriaceae ومستعمراتها رمادية اللون،ناعمة عند زرعها على وسط الماكونكي اكار ،وغالبا ما تظهر تحلل الدم من النوع بيتا على الوسط blood agar واكثر السلالات مخمرة لسكر اللاكتوز وبسرعة هوائية ويظهر نموها خلال 12-18 ساعة عند درجة حرارة 35C° بينما بكتريا *E.coli* O157:H7 تكون غير مخمرة لسكر السوربيتول(sorbitol) بينما سلالات بكتريا*salmonella spp.* زرعت على وسط XLT4 agar وهو وسط قدم عام 1990 لغرض تثبيط البكتريا الشائعة النمو مع السالمونيلا من عينات البراز وهذا الوسط يشبه وسط XLD لكن sodium deoxycholate استبدل بمحلول 27% من Tergitol 4هذه المادة المساعدة تثبط نمو الميكروبات ماعدا السالمونيلا فتظهر مستعمراتها سوداء اللون بعد 18-24 ساعة من الحضن كما جاء في (14).

5- الاختبارات الكيموحيوية :

اعتمدت الاختبارات التشخيصية الواردة في مصنف Bergey's اختبار الكتالاز و اختبار الاوكسيداز، indole,methyl red,Voges-Proskauer, citrate وتفاعل الايسين والاورانثين وانتاج H2S وفحص تحليل اليوريا (11).

6-التشخيص بالعدة الجاهزة: استخدام اشرطة التشخيص Api 20-E والذي يتضمن 20 اختباراً كيموحيويا يتألف هذا النظام من شريط حاوي على ركائز فحص مجففة Dehydrated Test Substrates في أنابيب دقيقة مفردة، اذ يعاد تعليقها من خلال إضافة

كمية مناسبة من وسط نظام التشخيص Api-Strept Mediaالذي سبق وان لقح بالعزلة البكتيرية المراد دراستها .وبعد حضن الشريط لمدة (18-24)ساعة بدرجة حرارة37 مْ دونت النتائج وقرئت بالاعتماد على Api 20 – Strep Analytical Profile Index (API)كما ورد في(15) .

طرق الكشف عن البكتريوسين

7 -1 طريقة اقراص الاكار Cup assay method

لغرض الكشف عن قابلية العزلات على انتاج الانتروسين اتبعت طريقة اقراص الاكار وحسب الطريقة المذكورة في (16) وكالآتي :

زرعت بكتريا *E. faecalis* المنماة مسبقا في وسط مرق نقيع القلب والدماغ المحضر وبعمر 24 ساعة بطريقة النشر على وسط اكارMRS ثم حضنت الاطباق في درجة حرارة ˚37م لمدة 24 ساعة. وبعد الحضن عملت اقراص بواسطة ثاقب الفلين وبقطر6 مليمتر في هذا الوسط ووضعت على سطح الاكار المغذي المحضر والمنشور عليه بالناشر مقدار 0.1 مليلتر من مزروع كل من عزلات الاختبار البكتيرية بعد ان ثبت عدد الخلايا المزروعة بمقدار 10^8 خلية / مليلتر بعد مقارنتها مع محلول ماكفرلاند القياسي ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة ˚37م لمدة 24 ساعة، بعدها قيس قطر منطقة التثبيط حول الاقراص وقورنت مع معاملة السيطرة الحاوية على وسط MRS broth غير الملقح بالبكتريا.

2-7 طريقة الانتشار في الحفر Well Method Diffusion

حسب ماجاء في (17) للكشف عن انتاجية الانتيروسين في الوسط (MRS)السائل لبكتريا *E. faecalis* ، اذ زرعت الاطباق الحاوية على وسط الاكار المغذي بنشر 0.1 مليلتر من لقاح مزارع عزلات بكتريا الاختبار باستخدام الناشر الزجاجي المعقم (كلا على حدة) بعد ان ثبت عدد الخلايا المزروعة بمقدار 10^8 خلية / مليلتر ، بعمل ثقوب وبقطر8 مليمتر على سطح الوسط ملئت كل حفرة بـ 100 مايكروليتر من المزرعة السائلة لعزلات بكتريا *E. faecalis* و حضنت بعدها الاطباق بدرجة حرارة ˚37م لمدة 24 ساعة. قيست مناطق التثبيط حول الحفرالحاوية على العزلة المنتجة وقورنت مع معاملة السيطرة الحاوية على وسط MRS broth غير الملقح بالبكتريا .

8- حساسية عزلات البكتريا المسببة للاسهال للمضادات الحيوية:

أختبرت حساسية العزلات للمضادات الحيوية بأستعمال طريقة (Kirby-Bauer Method)كما جاء في (12). وعدت البكتريا كونها حساسة او مقاومة وحسب المواصفات القياسية والواردة في (18).

النتائج والمناقشة

تم الحصول على 40 عزلة تعود لبكتريا *E.faecalis* من مصادر البراز(نبيت طبيعي) ، شخصت العزلات تشخيصاً اولياً اعتماداً على صفات المستعمرات على الاوساط الزرعية ، وقد امتازت مستعمرات *E.faecalis* بكونها كبيرة، سوداء اللون، عند تنميتها على وسط Bile Esculin Azide agar ، في حين ظهرت على وسط اكار الدم بشكل مستعمرات رمادية اللون، محللة للدم من النوع بيتا . (11). وتمتاز *E.faecalis* بكونها مكورات موجبة لملون غرام وذي قطر (0.5 – 1) مايكروميتر، تترتب بشكل مكورات مفردة او ازواج او بشكل سلاسل قصيرة وقد تظهر الخلايا احيانا بشكل مكورة عصوية، وتعد هذه البكتريا ايضا غير متحركة وغير مكونة للابواغ والاسواط وغير منتجة للصبغات على الوسط الصلب واهملت الانواع الاخرى التي توزعت:(5)عزلات *E.faecium* وعزلتين*E.gallinarum* وعزلة *E.casseliflavus*. (11) و(12). شخصت العزلات النامية على الاوساط الانتقائية استنادا الى الفحوصات الكيموحيوية والواردة في (11) ، (12) اظهرت جميع العزلات فحصا سالبا لانزيمي الكتالاز والاوكسيداز والقدرة على النمو بدرجات حرارة (10و45) °م حيث تعد صفة مميزة لهذا الجنس عن الاجناس الاخرى الموجبة لملون غرام ورقم هيدروجيني قاعدي 9.6 ، وتحمل الملوحة العالية التي تصل الى 6.5% كلوريد الصوديوم وهذه التفاعلات الكيموحيوية تمثل المفتاح التشخيصي لجنس المكورات المعوية والتي تميزها عن بقية المسبحيات.بكتريا *E.faecalis* النوع الوحيد مخمر للبايروفيت (19). اظهرت العزلات القدرة على إنتاج أنزيم Hippuricase المحلل لمادة Hippurate منتجا الكلايسين وحامض البنزويك في حين أبدت العزلات المتبقية فحصا سالبا لانتاج الأنزيم واتصفت25 عزلة بالقدرة على انتاج الهيمولايسين المحلل لكريات الدم الحمراء للانسان من نوع بيتا (تحلل كامل) β- Hemolysis و15 عزلة قد أعطت تحلل جزئي α–Hemolysis .واتفقت نتائج العزل كما ذكرته (32) التي بينت ان اعلى نسبة لوجود بكتريا *E.faecalis* هي في عينات البراز. أمكن الحصول على 18 عزلة توزعت مابين بكتريا (18)عزلة *E.coli* و (5)عزلات *E.coli* O157:H7 و(8) *Salmonella spp.*كانت اغلب مستعمرات *E.coli* رمادية اللون،ناعمة ، و مخمرة لسكر اللاكتوز وبسرعة ،هوائية ويظهر نموها خلال 18-12 ساعة عند درجة حرارة35Cº ,عند زرعها على وسط MacConky agar ، و تظهر تحلل الدم من النوع بيتا على الوسط blood agar ما عدا *E.coli* O157:H7 غير مخمرة لسكر sorbitol (15). بينما بكتريا . *Salmonella spp* فتظهر مستعمراتها سوداء اللون بعد 24-18 ساعة من الحضن بدرجة حرارة 37Cº عند زرعها على وسط XLT4 agar. (15). حيث جاءت النتائج متقاربة مع نتائج (33).

نتائج الكشف عن الانتروسين

اختبرت قابلية العزلات المحلية لبكتريا المكورات المعوية البرازية *E.faecalis* في انتاج الأنتروسين على الأوساط الصلبة بوساطة طريقة

أقراص الأكار (Cup Agar) في وســط MRS الصلب و اكار نقيع القلب والدماغ تجاه عزلات بكتريا الأختبار والتي شملت البكتريا السالبة لملون غرام والمسببة لحالات الاسهال عند الاطفال، وقد أظهرت عزلات بكتريا *E.faecalis* المنتجة للأنتروسين تبايناً في التأثير التثبيطي تجاه بكتريا الاختبار وكما موضح في الجدول (1) والشكل (1) ويتراوح قطر التثبيط مابين(12-20) مليمتر بالنسبة لطريقة اقراص الأكار وكما لوحظ تباينا في التأثير التثبيطي للعزلات نفسها في الوسطين المستعملتين، ففي الوقت الذي اظهرت فيه فعالية 4 عزلات من بكتريا *E.faecalis* تجاه عزلة أو أكثر من بكتريا الأختبار، على انتاج الانتروسين على الوسط الصلب باستخدام طريقة أقراص الأكار وتتفق هذه النتائج مع النتائج المستحصلة من قبل (19) عند استخدامها عدة طرق في التحري عن انتاج البكتريوسين والتي أكدت كفاءة طريقة أقراص الأكار للكشف عن الفعالية التثبيطية للبكتريوسين المنتج وذكر (20) ان الوسط الصلب يحفز التضـاد بيـن العزلتين وانتـاج البكتريوسين وانتشاره بالوسط .

جدول(1) قابلية عزلات بكتريا *E. faecalis* المنتجة للانتروسين ضد عزلات بكتريا المسببة للاسهال بطريقة اقراص الاكار (Cup Agar)على وسط اكار MRS

العزلات المحلية لبكتريا *E.faecalis*	الفعالية ضد عزلات بكتريا الاختبار(قطر منطقة التثبيط بالمليمتر mm)			
	Salmonella enterica (4)عزلات	Salmonella typhimurium (4)عزلات	E.coli (18) عزلة	E.coli O157:H7 (5)عزلات
EF1	17	17	20-15	15
EF2	18	14	15	15
EF3	16	15	14	14
EF4	15	15	12	12
E:control	-	-	-	-

*قطر ثاقب الفلين(6)مليمتر ، (-) سيطرة عبارة عن وسط MRS الصلب غير الملقح بالبكتريا .

– أ –

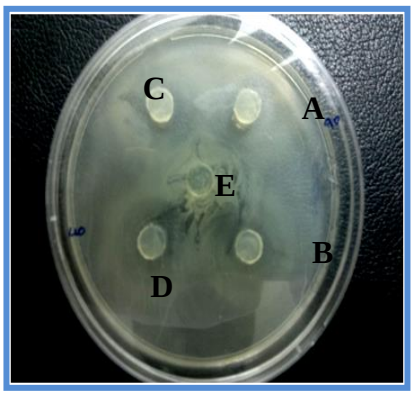
A: *E.faecalis* 1

B: *E.faecalis* 2

C: *E.faecalis* 3

D: *E.faecalis* 4

E:CONTROL



-ب-

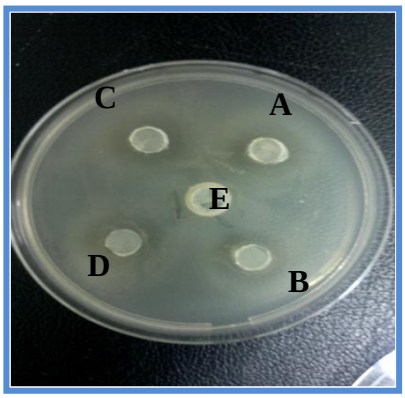
A: *E.faecalis* 1

B: *E.faecalis* 2

C: *E.faecalis* 3

D: *E.faecalis* 4

E: CONTROL



– ج –

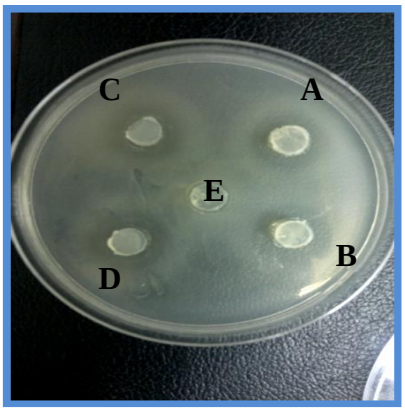
A: *E.faecalis* 1

B: *E.faecalis* 2

C: *E.faecalis* 3

D: *E.faecalis* 4

E: CONTROL



شكل(1) الفعالية التثبيطية للانتروسين المنتج من بعض عزلات بكتريا *E.faecalis* بأستخدام طريقة Cup Agar تجاه بكتريا الاختبار

أ - *E.coli* ب- *E.coli O157:H7* ج- *Salmonella spp.*

ولدراسة الفعالية التثبيطية الانتروسين المنتج من العزلات المحلية لبكتريا *E.faecalis* في الوسط السائل فقد اختبرت المزارع السائلة الى 4 عزلات بكتريا *E.faecalis* بطريقة Well Diffusion Method وقد أظهرت فعالية تثبيطية ضد بكتريا أو أكثر من عزلات الاختبار عندما تراوحت أقطار مناطق التثبيط حول الحفر مابين (12–19) مليمتر كما في الجدول (2) والشكل (2).

جدول(2) قابلية عزلات بكتريا *E. faecalis* المنتجة للانتروسين ضد عزلات بكتريا المسببة للإسهال بطريقة الانتشار (Well Diffusion Method) في الوسط السائل MRS Broth

العزلات المحلية لبكتريا *E.faecalis*	الفعالية ضد عزلات بكتريا الاختبار (قطر منطقة التثبيط بالمليمتر mm)			
	Salmonella enterica (4)عزلات	Salmonella typhimurium (4)عزلات	E.coli (18) عزلات	E.coliO157: H7 (8) عزلات
EF1	19	15	17	12
EF2	18	15	16	12
EF3	18	14	17	15
EF4	19	14	15	15
E:control	-	-	-	-

(-) هو وسط MRS broth غير الملقح بالبكتريا واستخدم كسيطرة control

ومن النتائج أعلاه يتضح لنا قابلية بعض العزلات في انتاج الانتروسين على الأوساط الصلبة كانت أفضل مقارنة مع إنتاجيتها في الوسط السائل على الرغم من وجود التباين في التثبيط لهذه العزلات. وهذا جاء متفقا مع ما أشار إليه (21) الى وجود تباين في فعالية البكتريا المنتجة للبكتريوسين في الأوساط الصلبة والسائلة، فالكائن المنتج لها على الوسط الصلب ليس بالضرورة أن يكون منتجا في الوسط السائل. وهذا ما أكده أيضا (22) عندما وجد أن إنتاج البكتريوسين من البكتريا في الوسط السائل بدون تحديد الظروف المثلى لأنتاجيته يشكل 0.01% من أنتاجه على الوسط الصلب.

وأشار (23) الى أهمية تحديد الظروف المثلى لانتاج الانتروسين A من بكتريا *E.faecalis* مثل نوع الوسط الزرعي السائل ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني. أما (24) فقد علل عدم كفاءة بعض العزلات المنتجة للبكتريوسين في أظهار فعاليتها في الوسط السائل الى افتقار الأخير الى بكتريا الاختبار التي تعمل محفزاً لأفراز البكتريوسين. ويعد وسط MRS السائل افضل وسط لانتاج البكتريوسين وهذا ما اكده (25) حيث توصل الى ان وسط MRS السائل أفضل وسط لانتاج البكتريوسين .

– أ –

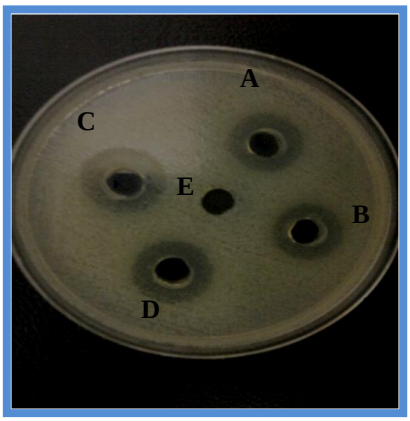
A: *E.faecalis* 1

B: *E.faecalis* 2

C: *E.faecalis* 3

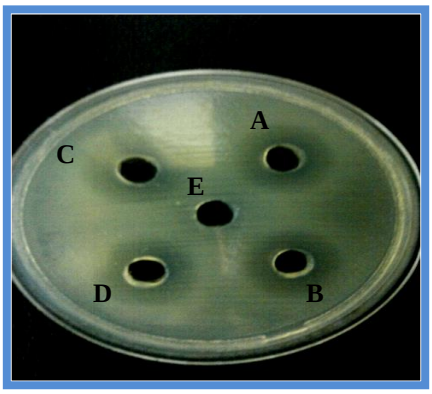
D: *E.faecalis* 4

E : CONTROL



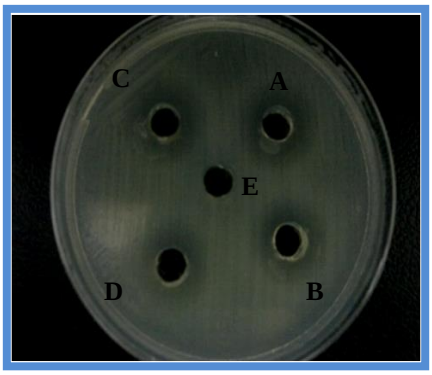
– ب –

A: *E.faecalis* 1
B: *E.faecalis* 2
C: *E.faecalis* 3
D: *E.faecalis* 4
E: CONTROL



– ج –

A: *E.faecalis* 1
B: *E.faecalis* 2
C: *E.faecalis* 3
D: *E.faecalis* 4
E: CONTROL



شكل (2) الفعالية التثبيطية للانتروسين المنتج من بعض عزلات بكتريا *E.faecalis* باستخدام طريقة Well Diffusion Method تجاه بكتريا الاختبار
أ - *E.coli* ب- *E.coli O157:H7* ج- *Salmonella spp.*

نتائج الكشف عن البكتريوسين :

وأظهرت نتائج تأثير الانتيروسين المنتج من بكتريا *E. faecalis* على البكتريا المسببة للاسهال شملت *E.coli* O157:H7، *E.coli*، *S. enterica*، *S. typhimurium* كل هذه العزلات كانت حساسة للانتيروسين . بالنسبة لبكتريا *E.coli* كانت حساسة وبقطر منطقة تثبيط بلغ (12-20) ملم علماً ان هذه العزلة البكتيرية كانت مقاومة لـ(9)مضادات حياتية: شملت Gentamycin وCefotaxime و Tetracyclinو Amikacin و aztreonam وImipenem وTobramycin , Ampicillinو amoxcillin-clavulanic acid اما بالنسبة لبكتريا *Salmonella enterica* و *Salmonella typhimurium* كانت حساسة للانتيروسين وبقطر (14-18) ملم علما ان هذه العزلات البكتيرية مقاومة لـ(11) مضاد حيوي شملت :- tetracycline وgentamicin وamoxcillin-clavulanic acid و ampicillin و chloramphenicol و aztreonam وpiperacillin و ticarcillin- glavulanic acid و amikacin.اما بالنسبة لعزلات بكتريا *E.coli* O157:H7 كانت حساسة للانتيروسين وبقطر (15- 17)علما ان هذه العزلات مقاومة لـ (11) مضاد حيوي شملت : aztreonam وpiperacillin وticarcillin- glavulanic acid و amikacin وgentamicin وamoxcillin- clavulanic acid و ampicillin و chloramphenicol وtetracycline .

جدول رقم (3) يبين تأثير الانتيروسين على العزلات البكتيرية المسببة للاسهال عند الاطفال وصغار الاغنام والمقاومة للمضادات الحياتية

نوع البكتريا المرضية	قطر منطقة التثبيط(ملم)	المقاومة للمضادات الحياتية
Salmonella spp.	14- 18	tetracycline وgentamicin وamoxcillin- clavulanic acid و ampicillin و chloramphenicol و aztreonam وpiperacillin و ticarcillin- glavulanic acid و amikacin.
E.coli O157:H7	15-17	tetracycline وgentamicin وamoxcillin- clavulanic acid و ampicillin و chloramphenicol و aztreonam وpiperacillin و ticarcillin- glavulanic acid و amikacin.
E.coli	12- 20	Gentamycin وCefotaxime وAmikacin و Tetracyclin, aztreonam و Imipenem و Ampicillin Tobramycinو amoxcillin-clavulanic acid

من النتائج اعلاه يتضح لنا تاثير الانتروسين المنتج من بكتريا *E.faecalis* ذي فعالية واسعة الطيف ضد البكتريا المسببة للإسهال عند الاطفال وصغار الاغنام وخصوصا السالبة لملون غرام ، وجاءت هذه النتائج متفقة مع ماأشار له (26) من ان رواشح بكتريا حامض اللاكتيك النامية في وسط (MRS) السائل تكون ذات فعالية تثبيط واسعة ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام. من الدراسات التي تطرقت الى هذا الموضوع دراسة ذكر بها ان هنالك أنواعاً اخرى من البكتريوسين مثل AS-48 المنتج من بكتريا *E.faecalis* ذي فعالية واسعة المدى ضد البكتريا الموجبة والسالبة لملون غرام (27). وفي دراسة محلية اجريت من قبل (28) على البكتريوسين المنتج من *E.faecalis* وجدت ان أعلى نسبة للعزلات المنتجة والمؤثرة في البكتريا الموجبة لملون غرام كانت 70% في حين تفاوتت قابلية باقي العزلات المنتجة في مدى تاثيرها على باقي انواع البكتريا العائدة للبكتريا الموجبة لملون غرام في حين لم تظهر أي من العزلات المدروسة فعاليتها تجاه بكتريا الاختبارالسالبة لملون غرام مثل *P.aeruginosa* و *E.coli* و *Salmonella sp. Shigella sp.*.تشير العديد من الدراسات التي تناولت الية عمل البكتريوسين الى تأثيره على العزلات الحساسة قد يكون سببه تحفيز بعض انزيمات التحلل الذاتي (Autolysine) التي تكون تحت الظروف الطبيعية مرتبطة بالاحماض الدهنية التي تدخل في تركيب الجدار والتي تعمل على تحطيم اغشية الخلايا البكتيرية من خلال تكوين قنوات ايونية تودي الى ازالة القطبية للاغشية الخلوية (Depolorization) (29) و(30). في حين تكمن مقاومة العزلات الأخرى الى امتلاكها الجين الذي يشفر للمناعة للانتروسين او حدوث بعض التغيرات البسيطة في تركيب أغشية وجدران هذه الخلايا او عدم امتلاكها للمستقبلات الخاصة لهذا الانتيروسين (31).

References

1. Javed, I.(2009). Characterization of Bacteriocin Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Dairy Products Department of Microbiology Quaid-i-Azam University, Islamabad .1- 10.
2. Corr,S .C.; Li,Y.; Riedel,C.U.; O'Toole,P.W.; Hill,C .and Gahan,C.G.M. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. P.N.A.S.,104(18) :7617–7621.
3. Yamamoto,Y. ; Togawa,Y. ; Shimosaka, M and Okazaki, M.(2003). Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RS-11. Appl. Environ. Microbiol. 69(10) : 5746–5753.
4. Mozzi, F., G. Rollan, G. Savoy de Giori, and G. Font de Valdez. (2006). Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87. J. Appl. Microbiol. 91:160-167.
5. Abo-Amer,A .E. (2007b) . Characterization of a Bacteriocin-Like Inhibitory Substance Produced by *Lactobacillus plantarum* Isolated from Egyptian Home-Made Yogurt.J . ScienceAsi, 33 : 313-319.
6. Karthikeyan, V. and Santhosh, S. W. (2009b) . Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from *Lactobacillus plantarum*. Department of biotechnology , School of Bioengineering , SRM University , Kattankulathur -603203, Tamilnadu,India. African Jounol of Microbiol. Res., 3 (5) : 233-239 .
7. Hirt, H. ; Manias, D.A. ; Bryon, E.M. ; Klein, J.R. ; Marklund, J.K. ; Staddon, J.H. ; Paustian, M.L. ; Kapur, V. and Dunny, G.M. (2005). Characterization of the pheromone response of the *Enterococcus faecalis* conjugation plasmid pCF10 : Complete sequence and comparative analysis of the transcriptional and phonotypic responses of pCF10 containing cell to pheromone induction. J.Bacteriol. 187(3): 1044–1054.
8. Macfaddin, J. F. (2000). Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria .3rd ed. Lippincott Willians and Wilkins, Co.London..
9. Forbes, B.A. ; Sahm, D. F.and Weissfeld, A. S. (2002). Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th edition, Mosby, Company Baltimore. USA.
10. Collins, C.H. and Jones, P.M. (1978). Pathogenic Streptococci. By. Read book, LTD. Windsor, Berks. England.
11. Holt, J.G. ; Krieg, N.R. ; Sneath, P.H. ; Staley, J.T. and Williams, S. T.(1994). Bergy's manual of determinative bacteriology. 9th edition, Williams and Wilkins, pp : 1063
12. Forbes, B.A. ; Sahm, D. F.and Weissfeld, A. S. (2002). Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th edition, Mosby, Company Baltimore. USA.
13. Anonymous, (2010). VITEK® 2 Systems Product Information. Durham, North Carolina 27704-0969 / USA, 2- 22.
14. Maza, L. M. D. ; Pezzlo, M. T. ;Shigei, J.T.; Peterson, E. M. (2005).Color atlas of medical bacteriology.american society for microbiology 1752N street,N.W. Washington, DC 20036-2904.
15. Jr,W.W.;Allen,S.;Janda,W.;Koneman, E.;Procop,G.;schreckenberger,P.; Woods,G.(2006)Konemans Color

Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology 6th edition. Lippincott Willians and Wilkins,Philadelphia.287-289.

16. القصاب، عبد الجبار عمر والخفاجي، زهرة محمود. (1992). تأثير الظروف المختلفة على الفعالية التثبيطية للعصيات اللبنية المعوية تجاه البكتريا المعوية المسببة للاسهال. كلية العلوم الزراعية العراقية.مجلد (123). العدد (7):18-26.

17. Gupta, U.; Radramma; Rati, E.R .and Joseph, R.(1998) .Nutritional quality of lactic acid fermented bitter gourd and fenugreek leaves . International Journal of Food Sciences and Nutrition, 49(2) : 101-108 .

18. Clinical and Laboratory Standerds Insititute (CLSI) .(2010).Performance Standerds For Antimicrobial Susceptibility Testing ;Seventeenth Informational Supplement.M100-S17 .27(3).

19. Facklam, R. and Elliott, J.A. (1995). Identification , classifiction and clinical relevance of catalase–negative, gram positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. Clin. Microboil. Rev. 8(4) : 479–494.

20. Al-Dulami, H.H.O. (1999). Effect of crude colicin extracted from *Escherichia coli* on immune cells. M.Sc Thesis, Collage of Science. Al–Mustensiriya University.

21. Tagg, S.R. ; Dajani ,A.S. and Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocin of gram positive bacteria. Bacteriol .Rev. 40 : 722–756.

22. Hardy, K. G. (1982). Bacteriocins in : Experimental Microbiol Ecology. 1st ed. By : Burns and Slater. Chapter 21. PP : 368–377.

23. Nilsen, T. ; Nes, I.F. and Holo, H.(2003). Enterolysin A, a cell wall–degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Appl. Environ. Microbiol. 69(5) : 2975–2984.

24. Pugsley, A.P. (1983). Auto induced synthesis of colicin E2. Mol. Gen. Genet. 190 : 379–383.

25. Karthikeyan, V .and Santhosh ,S.W.(2009a). Study of Bacteriocin as a Food Preservative and the *L . acidophilus* Strain as Probiotic . Department of Biotechnology, School of Bioengineering, SRM University, Kattankulathur-603203, Tamilnadu, India . Pakistan Journal of Nutrition, 8 (4) :335-340.

26. Gupta, U.; Radramma; Rati, E.R .and Joseph, R.(1998) .Nutritional quality of lactic acid fermented bitter gourd and fenugreek leaves . International Journal of Food Sciences and Nutrition, 49(2) : 101-108 .

27. Stompfova, V. ; Laukova, A. and Ouwehand, A.C. (2004). Selection of enterococci for potential canine probiotic additives. Vet. Microbiol. 100(1-2) : 1017–14.

28. Al-Barzangi S.I. (2001). A genetic study on bacteriocin – producing *Enterococus faecalis*. M.Sc. Thesis, Collage of Science, Baghdad University.

29. Galvez, A. ; Valdivia, E. ; Camafeita,H. ; Mendez,E. ; Martinez,E. and Maqeda, M . (1998) . Isolation and characterization of enterocin EJ97 , a bacteriocin produced . Arch . Microbiol. 171 : 59–65.

30. Jett, B.D.; Huycke, M.M- and Gilmore, M.S.(1994). Virulence of enterococci . Clin . Microbiol . Rev. 7(4) : 462–478.29- Fimland, G. ; Vincent, G. H. ; Eijsink, I. and Nissen–Meyer, J.(1998). Comparative studies of immunity protein of pediocin like bacteriocin . Microbiology .148 : 3661–3676.

31. Fimland, G. ; Vincent, G. H. ; Eijsink, I. and Nissen–Meyer, J.(1998). Comparative studies of immunity

33. Bahobail,A.S.;Mansour,AM.A.;Zaki,H ,M.;Hassan,NA.(2012). Bacteriological studies on Escherichia coli producing verocytotoxin which cause diarrhea in sheep and goats in Saudi Arabia Journal of Applied Sciences Research, 8(2): 845-862, 2012, ISSN 1819-544X

protein of pediocin like bacteriocin . Microbiology .148 : 3661–3676.

32. قندلا ، نهى جوزيف نجيب . (2006) . انتاج وتنقية وتوصيف الانتروسين المنتج من بكتريا *Enterococcus faecalis* المعزولة محليا من مصادر سريرية مختلفة . اطروحة دكتوراه/ كلية العلوم / الجامعة المستنصرية.

Effect of enterocin produced by *Enterococcus faecalis* on bacteria that cause diarrhea in children and young sheep

H. S. Awayid Kh.M.Khamas
Coll. of Sci./ Unive of Mustansiriya

Abstract

A total of 300 samples (100 samples from feases healthy adult persons, adult persons suffer from diarrhea and100 feases healthy child and from feases children suffer from diarrhea and 100 samples from feases young sheep suffer from diarrhea) , taken from various hospitals in the Baghdad city during the period from January to April 2012. All isolates were subjected to the cultural, microscopical, biochemical examinations by Vitek 2 for identification up to the species. The results showed that 40 isolates belonged to *Enterococcus faecalis* of which, 25 isolates from diarrhea cause and 15 isolates from normal flora , 31 isolates of which 18 isolates belonged to *E.coli* and 5 isolates belonged to *E.coli*O157:H7 and 8 isolates belonged to *Salmonella spp.* All isolates were subjected to cultural ,microscopical, biochemical examinations and used(API 20 –E) strip. and sensitivity of 31 isolates was tested against (11-9) Antibiotics. Results revealed that isolates showed multi resistance to antibiotics, All isolates of *E.coli* and *E.coli*O157:H7 ,*Salmonella spp.*resistant to some antibiotics for negative Bacteria and belonging to the group Enterobacteriaceae. And Detection of the ability of *E. faecalis* local isolates to produce enterocin by testing the inhibitory activity agar and broth in two media MRS,BHI and two method against bacteria cause diarrhea. And The results showed a variety of the local isolates in their inhibitory effect against bacteria cause diarrhea in children and young sheep by inhibitor zone between (12-20) mm and was MRS liquid and solid the best media from the brain heart infusion .