



الكشف عن قابلية المسببات المرضية المعزولة من عدة القسطرة القلبية على انتاج الغشاء الحيوي biofilm خارج الجسم الحي

*بتول شاكر عبد المجلاوي، هيام عبد الرضا كريم العواد، علي رحيم حنظل الهامل

قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة كربلاء، العراق

*مستشفى الإمام الحسين (عليه السلام) التعليمي، دائرة صحة كربلاء المقدسة

تاريخ الاستلام: 2016 / 1 / 4

تاريخ قبول النشر: 2016 / 3 / 31

Abstract

This study was conducted for the detection of virulence of pathogens isolated from cardiac catheterization kit on the production of biofilm in vitro .the catheter tip culture Was performed for each type of catheterization test as diagnostic catheterization samples included 66 (74.16%) has given 15 (22.73%), and therapeutic catheterization samples 15 (16.85%) has given 6 (40%) infected with the samples of diagnostic catheterization and therapeutic together 8 (8.99%) has given the results of 4 (50%) infected and results showed sensitivity and specificity values for the catheter Tip culture test (96%) and (100%), respectively,

the results were explained after cultured the samples on Enriched and differential media ,that (89) patients (a common sample) gave 25 (28.09%) positive sample for bacterial culture, and two of them showed two types of bacteria were (27) isolated bacterial, bacteria diagnosed isolates was 11 (70.74%) gram positive and 15 (55.56%) gram-negative and only one isolation of yeasts 1 (3.70%), although 64 (71.91%) did not give any growth. the ability of pathological isolates were tested on biofilm production by using three different methods, (TM) Tube method , (CRA) Cong Red Agar and Microtiter Plate (MTP) has given 25 (92.6%) , 16 (58.26%) and 26 (96.29%) the isolation of producing biofilm different quantities respectively , The isolation of producing biofilm in different quantities, respectively. The results of the investigation on the composition of the biofilm The MTP test has showed sensitivity (100%) and specificity 96%, while TM test values sensitivity was (96%) and (100%) specificity and CRA test was (61.5%) sensitivity and (100%) specificity values.

The absence of local study on the ability of pathogens isolated from cardiac catheterization kit on the production of biofilm came this study

*Search unsheathed from the first Master Researcher

Keywords

pathogens ,cardiac catheterization, biofilm, in vitro.



الخلاصة

اجريت هذه الدراسة للكشف عن ضراوة المسببات المرضية المعزولة من عدة القسطرة القلبية على انتاج الغشاء الحيوي biofilm خارج الجسم الحي، تم إجراء اختبار زرع طرف القسطار Catheter Tip لكل نوع من القسطرة إذ شملت عينات القسطرة التشخيصية 66 (74.16%) فقد أعطت 15 (22.73%) مصاب، وعينات القسطرة العلاجية 15 (16.85%) فقد أعطت 6 (40%) مصاب أما عينات القسطرة التشخيصية والعلاجية معا 8 (8.99%) فقد أعطت نتائج 4 (50%) مصاب، وبينت النتائج قيم الحساسية والنوعية لأختبار زرع طرف القسطار (96%) و(100%) على التوالي،

أتضح من النتائج بعد زرع العينات على الأوساط الإغنائية والتفريقية إن (89) مريض (عينة مشتركة) أعطت 25 (28.09%) عينة موجبة للزرع الجرثومي، وإثنان منها أظهرت نوعين من الجراثيم فكانت (27) عزلة جرثومية، شخصت العزلات الجرثومية فكانت 11 (70.74%) موجبة لصبغة غرام و 15 (55.56%) سالبة لصبغة غرام وعزلة واحدة فقط من الخمائر 1 (3.70%) وإن 64 (71.91%) لم تعطي أي نمو .

أختبرت قابلية العزلات المرضية على إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm وبأستعمال ثلاثة طرائق مختلفة وهي طريقة الانبوبة (Tube method) (TM) و اكار أحمر الكونغو (C.R.A Cong Red Agar) وصفائح المعايرة الدقيقة (Microtiter Plate (MTP) فقد أعطت 25 (92.6%) و 16 (58.26%) و 26 (96.29%) عزلة منتجة للغشاء الحيوي وبكميات مختلفة على التوالي . أظهرت نتائج التحري عن تكوين الغشاء الحيوي إن إختبار MTP له قيم حساسية (100%) ونوعية (96%) أما إختبار TM كانت الحساسية (96%) والنوعية (100%) وإختبار CRA فله قيم حساسية (61.5%) ونوعية (100%) . ونظراً لعدم وجود دراسة محلية عن قابلية المسببات المرضية المعزولة من عدة القسطرة القلبية على انتاج الغشاء الحيوي biofilm جاءت هذه الدراسة .

الكلمات المفتاحية

المسببات المرضية القسطرة القلبية، Biofilm، خارج الجسم الحي.



1. المقدمة:

هناك علاقة وثيقة بين قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي وقدرتها على احداث الامراض والتسبب بحدوث حالات الالتهابات المزمنة، فأن البكتريا المسببة للغشاء الحيوي تكون لها قابلية اكبر على استعمار جسم المريض والاقامة فيه ويصبح اقل حساسية للمضادات الحيوية، وتنتج هذه البكتريا بروتينات مرتبطة بالغشاء الحيوي في اثناء الاصابة (BAP) Biofilm Associated protein، ووجودها يسهل من تكوين الغشاء الحيوي المرتبط ببقاء الجرثومة مدة اطول في جسم المريض، حيث يقوم جسم المصاب بالاستجابة المناعية لهذه البروتينات فيلاحظ وجود اجسام مضادة لهذه البروتينات في مصل المريض Anti-BAP antibodies [1].

ترتبط نجاحات الطب الحديث ارتباطا وثيقا بالاستخدام المتزايد للأجهزة الطبية [2]، على الرغم من النجاح الكبير المنجز بالأدوات الطبية الجديدة، الا ان هذه السطوح غير الحية معرضة للاستعمار الجرثومي مما يخلق مشكلة صحية مهمة عندما يتم غرز اي مادة حيوية، يمكن ان تصبح موضع للاتصاق والاستعمار والعدوى البكتيرية، لذلك فأن اكثر انحاء العالم تعود الى بكتريا الغشاء الحيوي مع الادوات الطبية، وهذه الادوات الطبية مثل الاطراف الصناعية، زرع واستبدال العظام، توزيع العقاقير، القسطرات، زراعة الانسجة [3] والعدسات اللاصقة والاصطناعية [4]

من بين المواد الاكثر استعمالا القسطرة (أنابيب بسيطة) تغرز من السطح الخارجي الى العضو او الشريان، فقسطرات الاوعية الدموية الوريدية الداخلية التي تستعمل بشكل رئيسي في اعطاء السوائل، الادوية، التغذية غير المعوية، نواتج الدم، بالإضافة الى مراقبة حالة الاوردة الدموية،

وغسيل الكلية المزمن لدى المرضى الخارجيين [5].

ان استعمال الادوات للوصول الوعائي يرتبط بحدوث عدوى مجرى الدم داخل الاوعية الدموية، والناجمة عن الميكروبات التي تستعمر الاداة المغروزة او تلوث مجرى السائل في وقت الادخال او اثناء استخدامه [6].

ان بعض الدراسات الوبائية افترضت وجود صلة قوية بين الربط البكتيري في تجويف الفم مع تطور Atherosclerosis [7]، وكذلك حددت البكتريا في لويحات Atherosclerosis [8]، وقد يكون الغشاء الحيوي السبب في تطور Atherosclerosis [9].

ان وجود اعداد كبيرة من البكتريا مع تنوع كبير في مساحة صغيرة في عينة واحدة من لويحة Atherosclerosis يشير الى عدوى الغشاء الحيوي [10]، وان المضادات الحيوية الروتينية واسعة الطيف سوف تكون فعالة ضد العديد من الانواع التي تم تحديدها في البكتريا الحرة (العوالق)، حيث ان الغشاء الحيوي يعطي تحمل للمضادات الحيوية، وتبدي البكتريا المرتبطة بلويحات تصلب الشرايين في الغشاء الحيوي مقاومة عالية للمضادات الحيوية [9].

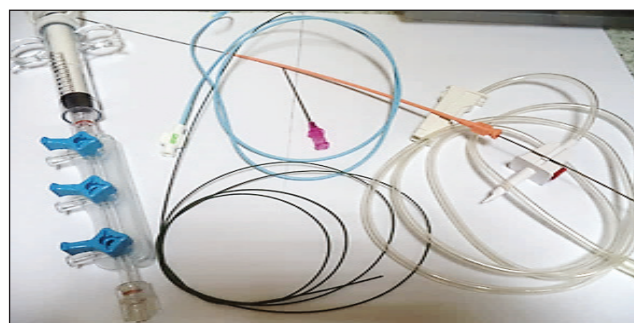
أثبت [11] أن من خلال دراسته عن مرضى Atherosclerosis الذين يعانون من امراض القلب التاجية بأن الاغشية الحيوية للبكتريا هي المسببة لتصلب الشرايين.

اقترحوا [12] من خلال بحثهم ان لويحات تصلب الشرايين Atherosclerosis تتكون من الاغشية الحيوية (الوظيفية)، ولاحظ الفريق ان صفات وخصائص لوحظت على جدران الشريان بجعلها تماما مناسبة لتشكيل الغشاء الحيوي والمسؤولة عن عدم فعالية المضادات الحيوية مثل Fluorquinolones، Macroides في التجارب السريرية.



المواد وطرائق العمل :

جمعت العينات من شعبة قسطرة القلب والشرابين في مستشفى الامام الحسين (عليه السلام) التعليمي في محافظة كربلاء المقدسة، إذا شملت عينات الدراسة (89) مريض من مرضى القسطرة القلبية وبنوعها القسطرة التشخيصية Diagnostic Catheter والقسطرة العلاجية Catheter Therapeutic والقسطرة التشخيصية والعلاجية معاً ولكلا الجنسين وبأعمار تراوحت من (29 - 75) سنة شكل (1).



شكل (1): يمثل عدة القسطرة القلبية

أُتبع طريقة زرع طرف القسطار Catheter Tip Culture الموصوفة من قبل [13] مع التحوير، وتسمى هذه الطريقة تقنية شبه كمية - Semiquantitative tech-nique، تم جمع (89) عينة وذلك بقطع (15) سم من طرف القسطار العلوي بعد خروجه مباشرة من الشريان Artery وتقسيمه الى ثلاثة أجزاء، طول كل قطعة (5) سم بوساطة مقص معقم ووضعت كل قطعة في انبوبة حاوية على مرق نقيع القلب والدماغ BHI broth وكان ذلك في صالة القسطرة وبجانب المريض، نقلت الى المختبر وحضنت بظروف هوائية ولا هوائية وبتوفر CO₂ ولمدة (24 - 48) ساعة وبدرجة حرارة (37°) م، وبعد ملاحظة عكورة النمو زرعت على وسطي الدم الاساس Blood agar ووسط الجكليت Chocolate agar بطريقة التخطيط على الوسط الصلب وحضنت بنفس الظروف أعلاه .

التحري عن قابلية العزلات المرضية على تشكيل الغشاء الحيوي (Biofilm) :-

1. طريقة الانبوبة (TM) Tube Method

حضر الوسط حسب الطريقة المتبعة من قبل [14] واستخدم التقدير النوعي qualitative لتشكيل الغشاء الحيوي biofilm حسب الطريقة الموصوفة من قبل [15, 16].

2. طريقة اكار احمر الكونغو (CRA) Congo Red

Agar اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [16, 17].

3. طريقة صفائح المعايرة الدقيقة

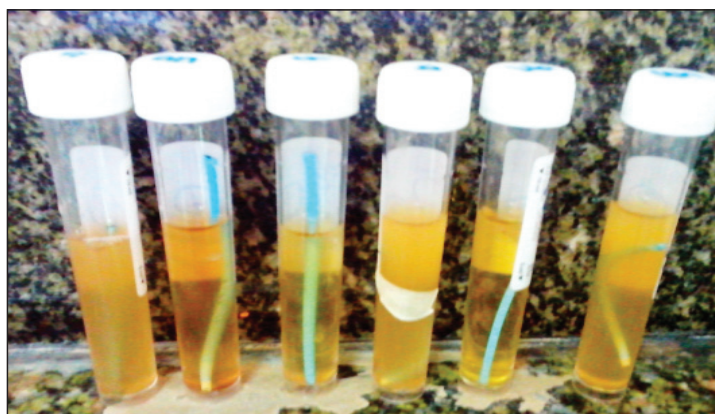
Microtiter Plate (MTP)

أُستخدم الفحص الكمي quantification لتشكيل الغشاء الحيوي حسب الطريقة الموصوفة من قبل [14, 15]. وقرأت النتيجة بأستخدام جهاز الاليزا ELISA reader لتقدير الكثافة الضوئية (Optical density OD) على طول موجي (570) نانومتر، وقيست الكثافة الضوئية للغشاء الحيوي biofilm حسب المعادلة الآتية:

$$\text{Mean OD (control)} - \text{Mean OD (test)} = \text{OD biofilm}$$

النتائج والمناقشة :

تسمى طريقة زرع طرف القسطار Catheter Tip culture طريقة شبه كمية Semiquantitative Technique تم أخذ (89) عينة وذلك بقطع (5) سم من طرف كل انبوب قسطرة Catheter استعمل في اجراء العملية وزرعه في الوسط السائل، بعدها نقلت العينات الى المختبر وبعد انتهاء فترة الحاضنة فحصت الانابيب بملاحظة العكورة turbidity، حيث ان القسطرة التشخيصية كان المصابين منهم 15 (22.73%)، والقسطرة العلاجية كان عدد المصابين 6 (40%) أما الاثنان معا فكان عدد المصابين 4 (50%) واعتبرت هذه الطريقة طريقة تأكيدية للطريقة السابقة الشكل (2) جدول (1)



شكل (2): زرع طرف القسطار Catheter Tip culture

جدول (1): النسب المتوية لظهور المسببات المرضية من عدة القسطرة القلبية حسب فئة العينات

Catheter Tip				
نوع العينات	عدد العينات	نسبتها المتوية	عدد العينات الموجبة	نسبتها المتوية
نوع القسطرة				
تشخيصية	66	% 74.16	15	% 22.73
علاجية	15	% 16.85	6	% 40
تشخيصيه وعلاجية معا	8	% 8.99	4	% 50
المجموع الكلي	89	% 100	25	% 28.09

اظهرت نتائج الدراسة ان نسبة الاصابة ببكتريا *Bacillus Spp* بنسبة (7.407%) و *S. pyogenes* الموجبة لصبغة كرام فكانت اعلى نسبة لبكتريا *S.aureus* بنسبة (3.703%) كما موضح في الجدول (2 و 3) .
14.814%، تليها *S.epidermidis* و *S.Pneumoniae*

جدول (2): النسب المتوية لظهور المسببات المرضية المعزولة من عدة القسطرة القلبية حسب نوع المسبب المرضي

النسبة المتوية	عدد العزلات	الانواع الجرثومية
% 40.74	11	بكتريا موجبة لصبغة غرام
% 55.56	15	بكتريا سالبة لصبغة غرام
% 3.70	1	خمائر
% 100	27	المجموع الكلي



جدول (3): نسبة الاصابة بالبكتريا والخمائر المعزولة من عينات مرضى القسرة القلبية :

النسبة المئوية %	عدد العزلات	نوع الجراثيم
7.407 %	2	<i>Bacillus spp.</i>
14.814 %	4	<i>Staphylococcus aureus</i>
7.407 %	2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
7.407 %	2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
3.703 %	1	<i>Streptococcus pyogenes</i>
7.407 %	2	<i>Escherichia coli</i>
11.111 %	3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7.407 %	2	<i>Proteus mirabilis</i>
3.703 %	1	<i>Pseudomonas fluorescense</i>
7.407 %	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3.703 %	1	<i>Pantoea spp</i>
3.703 %	1	<i>Salmonella spp</i>
3.703 %	1	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3.703 %	1	<i>Enterobacter cloacae</i>
3.703 %	1	<i>Serratia marcescens</i>
3.703 %	1	<i>Candida albicans</i>
100 %	27	المجموع

وقد جاءت هذه النتيجة مقارنة لما ذكره [18] ، ان سبب البيئين .

ارتفاع نسبة الاصابة بتجرثم الدم بالبكتريا العنقودية قد يعود لقابلية البكتريا على مقاومة المضادات الحيوية بالإضافة الى انتشار هذه البكتريا بشكل واسع في المحيط البيئي الخارجي وبيئة المستشفيات [19]، بينما اوضحت دراسة [20] ان النوع الشائع في اصابات تجرثم الدم هو *S. Pneumoniae* وقد يعود الى اختلاف الظروف البيئية والمناخية والصحية في

كما بينت النتائج ان المسبب الثاني لتجرثم الدم من البكتريا الموجبة لصبغة كرام هي بكتريا *S. Pneumoniae* حيث بلغت نسبتها (7.407 %) ، وأشار [21] ان هذه البكتريا لها دور كبير في التسبب بتجرثم الدم عند الاطفال . ان ارتفاع نسبة الاصابة ببكتريا السالبة لصبغة غرام اذ كانت بكتريا *K. pneumoniae* اعلى نسبة في حدوث الاصابة



كرام والبكتريا اللاهوائية، فضلاً عن البكتريا السالبة لصبغة كرام غالباً ما تكون مقاومة للمضادات الحيوية نتيجة عدم نفاذية غشائها الخارجي لمعظم المضادات الحيوية، وكذلك ان ارتفاع نسبة الاصابة بتجرثم الدم قد يكون نتيجة تكرار الحقن بالوريد لأغراض العلاج واعطاء السوائل منعاً للجفاف [27].

سجلت النتائج ظهور عزلة واحدة من المبيضات *C. albicans* بنسبة (3.703 %)، ان سبب ظهور هذا النوع من المبيضات هو قدرتها على التحول الشكلي *Dimorphicism* الذي يمكنها من التحول من شكل الخميرة الى الشكل الخيطي وبالعكس عند اصابتهما للإنسان والحيوان، وكذلك امتلاكها العديد من عوامل الضراوة منها قدرته على انتاج انزيم *Phospholipase* الذي يحلل الدهون المفسفرة وكذلك مقاومة درجات الحرارة العالية، فضلاً عن مقاومتها للمضادات الفطرية [28].

حيث اظهرت نتائج اختبار زرع طرف القسطار *Catheter Tip* فكانت قيم الحساسية (96%) والنوعية (100%)، ونتائج الدراسة الحالية جاءت مقارنة مع النتائج التي توصل اليها دراسة [29]، كانت تمتلك حساسية (100%) ونوعية 76 – 79 لتشخيص تجرثم الدم المرتبط بالقسطرة.

بينما حصلت دراسة [30] في البرازيل على قيم الحساسية والنوعية (100%) و(68.4%) والكائنات المعزولة هي *S.aureus* و *S.epidermidis* و *P.aeruginosa* و *Aci-netobacter bavmannii* والذي استخدم هذه الطريقة شبه الكمية لتقييم العدوى المرتبطة بقسطرة الاوردة المركزية والتي يمكن ان تستعمل كمؤشر لتجرثم الدم، بينما حصلت الدراسة المجراة من قبل [31] على قيم حساسية (92%) ونوعية (83%).

(11.111 %)، وبالدرجة الثانية *E.coli* و *P.mirabilis* و *P.aeruginosa* بنسبة (7.407%)، وكانت الاقل نسبة ظهور هي بكتريا *Pantoea* و *P.fluorescence* و *Salmonella* spp و *Aeromons hydrophila* و *Enterobacter Cloacae* و *Serratia marcescens* بنسبة (3.703 %).

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان بكتريا *K. pneumoniae* في صدارة المسببات البكتيرية السالبة لصبغة غرام، وايضا هذا يتفق مع ما ذكره [22]، وأعزى سبب الاصابة بهذه البكتريا الى امتلاكها المحفظة التي تعطيها القابلية على مقاومة عملية البلعمة *Phagocytosis* التي تقوم بها دفاعات المضيف للتخلص من هذه البكتريا مما يساعد على البقاء في مجرى الدم مدة اطول فضلاً عن مقاومتها للمضادات الحيوية.

تمتلك صفة المقاومة للمضادات الحيوية بين عزلات جنس *spp Kelbsiella*، لاسيما المرضى الراقدين في المستشفيات الى مدة طول بقاء المريض في المستشفى وكثرة استعمال بعض الاجهزة الطبية تعد اهم عوامل انتشار الاصابة والمقاومة ما تسبب في ظهور انواع اخرى مثل *Klebsiella oxytoca* والتي تمتلك مقاومة عالية للمضادات الحيوية [23].

اما بكتريا *P.aeruginosa* تعد الثاني من المسببات البكتيرية السالبة ولهذه الجرثومة امكانية الانتقال عن طريق ايدي الكادر الطبي والمرضى [24]، ولوحظ من نتائج هذه الدراسة ان اغلب العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام هي تابعة للعائلة المعوية *Enterobacteriaceae*، اذ يمكن لهذه الانواع النفاذ الى مجرى الدم عبر بطانة الامعاء [25].

كما اوضح [26] ان البكتريا السالبة لصبغة كرام تكون عملية عبورها اسهل من عملية عبور البكتريا الموجبة لصبغة

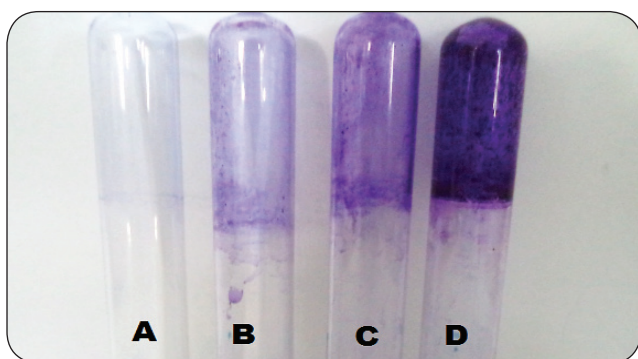


والتأكد من التشخيص باستخدام Api Candida .

قابلية العزلات المرضية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm:-
تم الكشف عن تشكيل الغشاء الحيوي بالاختبارات الآتية:

1. طريقة الأنبوبة (Tube Method (TM):-

شملت هذه الدراسة اختبار العزلات المرضية بهذه الطريقة والتي تسمى بطريقة كريستنس التتقليدية [15]، وتعد من أكثر الطرق شيوعاً وبساطة، إن سمك الغشاء المرئي قد تم الحصول عليه داخل جدران واسفل الأنبوبة الحاوية على العزلات المرضية المنتجة للغشاء الحيوي بكميات كبيرة تظهر بلون أزرق غامق وبالتدرج، فقد كانت بكتريا *S.aureus* أكثر البكتريا الموجهة لصبغة كرام انتاجاً للغشاء الحيوي وبكثافة، أما بكتريا *P.aeruginosa* تليها *E.coli* ثم *K.pneumoniae* أكثر البكتريا السالبة لصبغة كرام انتاجاً للغشاء الحيوي وبكثافة، وكما موضح في الشكل (3) الجدول (6).



A / غير منتج للغشاء الحيوي B / منتج ضعيف

C / منتج متوسط D / منتج قوي

شكل (3): قابلية البكتريا المرضية على إنتاج الغشاء الحيوي بطريقة TM.

أشار [13] بأن قسطرات الاوردة المحيطية بطريقة زرع طرف القسطار يعد مؤشر لخطر تجرثم الدم، اعتبرت هذه الطريقة كعامل وبرهان لتشخيص العدوى المرتبطة بالقسطرة [32]، وذلك إستاداً الى الدراسات المنفذة من قبل [32] والمؤكدة من قبل [33]، بينما حصل [30] لاختبار طرف القسطرة Catheter Tip على قيم حساسية (100%) ونوعية (68.4%)، ولاحظ [34] ان النوعية للتقنية شبه الكمية كانت (76%).

اقترح [35] ان الطريقة شبه الكمية تعتبر كمعيار للبكتريا التي تلتصق بالسطح الخارجي للقسطرة، وبينت الدراسات ان الطريقة شبه الكمية قادرة على تمييز تجرثم الدم المرتبط بالقسطرة وتعتبر حساسة وموثوقة [36]. ان هذه الطريقة شبه الكمية موصى بها بشكل كبير وهو اختبار سهل وسريع ويتم اجراءه بشكل دوري في مختبرات الاحياء المجهرية السريرية في البرازيل كما هو مشار من قبل [35]، وهذا الاختبار يشير الى الحساسية العالية والاصابة المرتبطة بالقسطرة وهي طريقة أكثر استعمالاً بسبب البساطة والكلفة المنخفضة.

اذان نتائج الاختبارات المظهرية والمجهرية والكيمو حيوية جاءت مطابقة لما ورد في انظمة التصنيف المعتمدة من قبل (39,38,37).

وتم تأكيد التشخيص باستخدام نظام التشخيص Api system لزيادة تأكيد التشخيص كونه يضم عددا من الاختبارات الكيمو حيوية المهمة، اذ استخدم نظام Api Staph و Api Strep و Api E 20، التي تمتاز بالسهولة والسرعة والدقة لتأكيد التشخيص الكيمو حيوي .

أما الخمائر *C. albicans* فقد شخّصت من خلال النمو على وسط السابرويد دكستروز اكار growth on SDA



جدول (6): قابلية البكتريا والخائثر المعزولة من مرضى القسرة القلبية على تشكيل الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة الانبوبة (TM) Tube method :

ت	المسبب المرضي	Absent	Weak	Modrate	Strong
A1	<i>Bacillus spp</i>	-	-	+	-
A2	<i>Bacillus spp</i>	-	-	-	+
A3	<i>S. aureus</i>	-	-	-	+
A4	<i>S. aureus</i>	-	-	-	+
A5	<i>S. aureus</i>	-	-	+	-
A6	<i>S. aureus</i>	-	-	-	+
A7	<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	-
A8	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	+
A9	<i>S. pneumonia</i>	-	-	+	-
A10	<i>S. pneumonia</i>	-	+	-	-
A11	<i>S. pyogenes</i>	-	-	+	-
A12	<i>E. coli</i>	-	-	-	+
A13	<i>E. coli</i>	-	-	-	+
A14	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	+
A15	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	+
A16	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-
A17	<i>P. mirabilis</i>	-	-	+	-
A18	<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	+
A19	<i>P. fluorescense</i>	-	-	-	-
A20	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	+
A21	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	+
A22	<i>Pantoea spp</i>	-	-	-	-
A23	<i>Salmonella spp</i>	-	-	+	-
A24	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	+	-
A25	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	+	+
A26	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	+	-
A27	<i>C. albicans</i>	-	-	-	+
	المجموع الكلي	(0%)0	(3.70%)1	(37.01%)10	(51.85%)14
	(92.6%) 25				

Weak: منتجة ضعيفة للغشاء الحيوي

Strong: منتجة قوية للغشاء الحيوي

Absent: غير منتجة للغشاء الحيوي

Moderate: منتجة متوسطة للغشاء الحيوي



اليه [17]، اظهرت نتائج طريقة اكار احمر الكونغو زيادة عدد الحالات الموجبة بزيادة زمن الحضان وهذه النتيجة جاءت بالاتفاق مع [41] حيث أثبتوا ان اطول وقت للحضان يعطي فرصة اكبر لهذه العزلة لإنتاج الصبغة كما في الشكل (4) الجدول (7).



شكل (4): قابلية البكتيريا المرضية على انتاج الغشاء الحيوي بطريقة C.R.A

وهذا يؤكد ماتوصلت اليه [40]، عند استعمالها المجهر الالكتروني الذي اظهر ان البكتيريا السالبة لصبغة غرام لها القدرة على الالتصاق وانتاج الغشاء الحيوي .

2. طريقة اكار احمر الكونغو Congo Red Agar :-

تم الحصول على مستعمرات ذات لون اسود للعزلات المرضية المنتجة للغشاء الحيوي 16 (59.26%) عزلة خلال (24 – 48) ساعة انتجت مستعمرات سوداء اللون على اكار احمر الكونغو و 11 (40.7%) عزلة اعطت مستعمرات وردية اللون مؤشرا على عدم انتاج الغشاء الحيوي، اذ كانت العنقوديات اكثر انتاجا للغشاء الحيوي من البكتيريا الموجبة لصبغة كرام وأن بكتيريا *K.pneumoniae* و *P.aeruginosa* اكثر انتاجا للغشاء الحيوي من البكتيريا السالبة لصبغة كرام وهذه النتائج جاءت مقارنة مع ماتوصل

جدول (7): قابلية البكتيريا والخمائر المعزولة من مرضى القسرة القلبية على تشكيل Biofilm بطريقة اكار احمر الكونغو (Congo red)

: Agar method (CRA)

ت	المسبب المرضي	٢٤ ساعة	٤٨ ساعة
A1	<i>Bacillus spp</i>	-	+
A2	<i>Bacillus spp</i>	+	+
A3	<i>S. aureus</i>	+	+
A4	<i>S. aureus</i>	+	+
A5	<i>S. aureus</i>	-	-
A6	<i>S. aureus</i>	-	+
A7	<i>S. epidermidis</i>	+	+
A8	<i>S. epidermidis</i>	+	+
A9	<i>S. pneumonia</i>	-	-
A10	<i>S. pneumonia</i>	-	-
A11	<i>S. pyogenes</i>	-	-
A12	<i>E coli</i>	+	+



-	-	<i>E coli</i>	A13
+	+	<i>K. pneumoniae</i>	A14
+	+	<i>K. pneumoniae</i>	A15
+	-	<i>K. pneumoniae</i>	A16
-	-	<i>Proteus mirabilis</i>	A17
+	-	<i>Proteus mirabilis</i>	A18
-	-	<i>P. fluorescense</i>	A19
+	+	<i>P. aeruginosa</i>	A20
+	+	<i>P.aeruginosa</i>	A21
-	-	<i>.Pantoea spp</i>	A22
-	-	<i>.Salmonella spp</i>	A23
-	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>	A24
+	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	A25
-	-	<i>Serratia marcescens</i>	A26
+	+	<i>C. albicans</i>	A27
١٦ (٥٨,٢٦ %)	١١ (٤٠,٧٤ %)	المجموع	

(+) نتيجة موجبة (-) نتيجة سالبة

صنفت العزلات المرضية وفقاً لإنتاجها للغشاء الحيوي وفق المعايير المنصوص عليها من قبل [43] على النحو التالي أقل من (0.120) غير منتجة للغشاء الحيوي و (0.120 - 0.240) منتجة ضعيفة أو متوسطة للغشاء الحيوي وأكثر من (0.240) منتجة قوية للغشاء الحيوي أو حسب الغشاء الحيوي حسب المعادلة التالية :

$$\text{control) - Mean OD (test) = OD Biofilm Mean OD}$$

علماً أن متوسط السيطرة يساوي (0.080)،

أظهرت نتائج هذه الدراسة الحالية أن 27 عزلة أعطت منها 26 (96.29%) عزلة منتجة للغشاء الحيوي بكثافة وعزلة واحدة 1 (3.70%) غير منتجة للغشاء الحيوي، كما موضح في الجدول (8).

تم الكشف عن الغشاء الحيوي بطرق مختلفة، حيث أن طريقة (TM) و (CRA) هي أكثر طريقة نوعية وموثوقة للكشف عن الكائنات المجهرية المنتجة للغشاء الحيوي وتستخدم كطريقة فحص عامة للكشف عن إنتاج الأخير في المختبرات [42].

3. صفائح المعايرة الدقيقة (MTP) (Microtiter Plate):

اختبرت قابلية العزلات المرضية على إنتاج الغشاء الحيوي بواسطة الاختبار الكمي بصفائح المعايرة الدقيقة Microtiter Plate وذلك لتأكيد الفحوصات السابقة باستخدام جهاز الاليزا ومعتمدة على قياسات الكثافة الضوئية Opti-cal density على طول موجي 570 نانومتر .



جدول (8): قيم الامتصاصية لاختبار المسببات المرضية على تشكيل Biofilm بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة (MTP) Microtiter plate :

OD Biofilm	Mean $\pm$ Sd	المسبب المرضي	ت
0.82	0.90 ± 0.07	Bacillus spp	A1
1.53	1.61 ± 0.16	Bacillus spp	A2
1.52	1.60 ± 0.31	S. aureus	A3
1.43	1.51 ± 0.30	S. aureus	A4
1.40	1.48 ± 0.12	S. aureus	A5
1.39	1.47 ± 0.19	S. aureus	A6
1.50	1.58 ± 0.02	S. epidermidis	A7
1.53	1.61 ± 0.06	S. epidermidis	A8
0.81	0.89 ± 0.02	S. pneumonia	A9
0.57	0.65 ± 0.16	S. pneumonia	A10
0.87	0.95 ± 0.21	S. pyogenes	A11
1.47	1.55 ± 0.10	E coli	A12
1.39	1.47 ± 0.10	E coli	A13
1.48	1.56 ± 0.07	K. pneumoniae	A14
1.36	1.44 ± 0.01	K. pneumoniae	A15
1.36	1.44 ± 0.08	K. pneumoniae	A16
0.92	1.00 ± 0.03	P. mirabilis	A17
1.59	1.67 ± 0.06	P. mirabilis	A18
0.11	0.19 ± 0.01	P. fluorescence	A19
1.80	1.88 ± 0.37	P. aeruginosa	A20
1.66	1.74 ± 0.06	P. aeruginosa	A21
0.64	0.72 ± 0.18	Pantoea spp	A22
0.91	0.99 ± 0.07	Salmonella spp	A23
0.92	1.00 ± 0.05	Aeromonas hydrophila	A24
1.68	1.77 ± 0.06	Enterobacter cloacae	A25
1.30	1.38 ± 0.09	Serratia marcescens	A26
1.24	1.32 ± 0.32	C. albicans	A27

0.080 = الكونترول

OD > 0.120 غير منتج للغشاء الحيوي

0.12 - 0.240 منتج ضعيف او متوسط للغشاء الحيوي

OD > 0.240 منتج قوية للغشاء الحيوي



مقاومة للمضادات الحيوية مثل الاختراق المقيد للمضادات الحيوية داخل الغشاء الحيوي [42].

أوضحت نتائج الدراسة الحالية ان الكائنات الحية الدقيقة المعزولة من القسرة القلبية الاكثر شيوعا في تكوين الغشاء الحيوي هي *P.aeroginsosa* و *K.pneumoniae* و *E.coli* و *S.aureus* و *S.epidermidis* جاءت بالاتفاق مع دراسة [50]، على تشكيل الغشاء الحيوي على قسرة الاوعية المركزية، هذه الكائنات الحية الدقيقة تنشأ من الفلورا الدقيقة لجلد المريض، الفلورا الدقيقة للعاملين في مجال الرعاية الصحية، حيث تتمكن من الوصول الى الاوعية الدموية عن طريق المهجرة من الجلد على مركز القسرة او المنفذ، لاحظ [51] ان تكون الغشاء الحيوي على القسرة الوريدية المركزية يعتمد على حجم وموقع تشكيل الغشاء الحيوي على القسرة والذي يتكون على المدى القصير خلال اقل من عشرة ايام، اما تشكيل الغشاء الحيوي على القسرة على المدى الطويل يحدث خلال [30] يوم، وان الغشاء الحيوي المتكون اكثر انتشارا على التجويف الداخلي للقسرة، وان لطبيعة السائل المدار من خلال قسرة الاوعية المركزية لها تأثير على النمو الميكروبي، وكذلك عدد الكائنات الحية على القسرة يرتبط بحدوث عدوى مجرى الدم في المريض [52].

اظهرت نتائج التحري عن تكوين الغشاء الحيوي ان اختبار MTP له قيم حساسية (100%) ونوعية (96%) اما اختبار TM فكانت الحساسية (96.5%) ونوعية (100%) واختبار CRA فله قيم حساسية (61.5%) ونوعية (100%).

مما تقدم نلاحظ ان نتائج اعلاه تشابهت مع نتائج (16) الذي اظهر ان طريقة MTP لها قيم حساسية (96.2%) ونوعية (94.5%) اما طريقة TM كانت حساسيتها (77.9%) ونوعية (96%) وطريقة CRA تمتلك قيم حساسية (7.6%) ونوعية (97.2%)، اي ان اختبار الانوبة

ان طريقة MTP ذات حساسية عالية وطريقة محددة يمكن ان يوصى بها لتحديد القابلية على تكوين الغشاء الحيوي هذه الملاحظات هي مطابقه مع الملاحظات المسجلة من [44,43,16].

هذه الطريقة تعتمد على قارئ ELISA لتحليل النتائج الايجابية والسلبية بينما اختبار TM و CRA يعتمد على العين المجردة، نتائجنا تقاربت مع نتائج الدراسة المعروضة من قبل [45,16]، الذين لاحظوا ارتباط جيد بين نتائج الانبوب النوعية والطريقة الطيفية MTP بشأن العزلات المنتجة للغشاء الحيوي بقوة، واستنتجوا كذلك انه من الصعب التمييز بين العزلات السالبة والضعيفة لتشكيل الغشاء الحيوي بواسطة طريقة الانبوب [45, 46].

أقترح [47] بأن طريقة TM بسيطة وموثوقة للكشف المبكر لانتاج الغشاء الحيوي، حيث ان سلالات Can- dida المعزولة من زرع الدم كانت منتجة للغشاء الحيوي بأستخدام طريقة TM و MTP، بينما تعد طريقة TM غير كافية لتحديد الانتاج الضعيف في عزلات Staphylococ- cus السريية [48,16].

وايضا اختبار TM يتماثل مع اختبار MTP في العزلات المنتجة القوية للغشاء الحيوي لكن يصعب تصنيف العزلات الموجبة الضعيفة للغشاء الحيوي عن العزلات السالبة للغشاء الحيوي [49].

بينت نتائج الدراسة ان بكتريا *P.aeroginsosa* و *K.pneumoniae* و *E.coli* و *S.aureus* و *S.epidermidis* و *C.albicans*، منتجة للغشاء الحيوي بكميات قوية وبطرائق مختلفة، جاءت نتائج هذه الدراسة مقارنة لنتائج الدراسة التي اجريت في الهند للكشف عن انتاج البكتريا للغشاء الحيوي بطرائق مختلفة، حيث ان البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي مسؤولة عن العديد من الاصابات الشديدة، وهذه تظهر



البكتريا موجودة في لويحات تصلب الشرايين الدراسات ربطت البكتريا الفموية بتجثر دم العابر [56,55]، وجد اعداد كبيرة من البكتريا مع تنوع كبير في مساحة صغيرة لعينة مفردة من تصلب الشرايين مؤشرا الى عدوى الغشاء الحيوي [10]، ان المضادات الحيوية واسعة الطيف تكون فعالة ضد العديد من الانواع التي تم تحديدها لو كانت في وضع نمط العوالق أنظرا لتحمل الغشاء الحيوي للمضادات الحيوية، ان البكتريا المرتبطة بلويحات تصلب الشرايين في نمط الغشاء الحيوي ذو مقاومة عالية للمضادات الحيوية، وقد ثبت ان الميكروبات تصل الى الاوعية الدموية للمضيف من خلال اليات متعددة بما في ذلك تناول الطعام، نظافة الفم، حركة الامعاء [58,57]، ان كانت البكتريا من مصادر فموية تكون اجزاء من الغشاء الحيوي وتمتلك المستعمرة دفاعات ضد مناعة المضيف والمضادات الحيوية [59]، هذه البكتريا يمكن عزلها بسرعة من الدورة الدموية بسبب تكرار دخول البكتريا الى الدورة الدموية، فأن عدد قليل من هذه الاجزاء تلتصق بسرعة بالخلايا البطانية المتضررة مع تعبير الجزيئات داخل خلوية Expressed intercellular adhesion (ICAMS)، والجزيئات الملتصقة بالخلايا الوعائية Vas- (VCAMS) cular cell adhesion molecules

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسة التي اجريت في امريكا من قبل [60]، حيث اظهرت ان البكتريا المرتبطة باللوحة الشريانية يمكن ان تكون واسعة النطاق وتنطوي على مجتمع متنوع وراثيا، وان الفحص المجهرى لهذه الكائنات المستعمرة مؤشرا على انها تراكيب لتشكيل الغشاء الحيوي داخل التصلب والانسجة المرتبطة بها حيث وجدت بكتريا P.aeruginosa في عينات لويحة الشرايين .

TM ارتبطت بشكل جيد مع اختبار صفائح المعايرة الدقيقة MTP، وان TMP يمكن ان تكون بمثابة اداة كمية يمكن الاعتماد عليها لتحديد القابلية على تكوين الغشاء الحيوي . على مدى السنوات القليلة الماضية تعد اجناس ال Candida من بين عوامل مسببات المرض المهمة لعدوى المستشفيات، معظم القسطرة مرتبطة بتسمم الدم المتسببة بواسطة الكائنات الحية الدقيقة التي تغزو الجروح داخل الجلد خلال ادخال القسطرة او بعد ادخالها، وتحدث هذه العدوى بسبب القدرة على تكوين الغشاء الحيوي والتي يعد كعامل ضراوة لحدوث مرض Candidiasis، ان الاغشية الحيوية الفطرية تحاول ان تحافظ على مكانها المناسب باعتبارها متعايشة وممرضة للبشر وهي من خلال الهرب من الاليات المناعية للمضيف، ومقاومة المضادات الفطرية وتحمل ضغوط المنافسة مع الكائنات الاخرى، ونتيجة لذلك الالتهابات المتعلقة بالغشاء الحيوي والتي يصعب علاجها [53].

تمثل القسطرة داخل الاوعية الدموية المستقرة عامل خطر يقترن بعدوى Candida المكتسبة بالمستشفيات، فأن هذه الاجهزة تصبح مستعمرة من قبل Candida التي تكون الغشاء الحيوي وان Candida albicans المعزولة من الدم تمتلك اليات اخرى من انتاج الغشاء الحيوي لأنشاء التهابات مجرى الدم [54]، اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة [10]، التي اجريت في امريكا الذي اظهر ان النتائج الجزيئية للمحتوى الجيني كان موجود في جميع لويحات تصلب الشرايين اعتمادا على تقييم PCR وكانت اكثر الاجناس السائدة هي Closteridium, Pseudomonas, Flavobacterium, Acintobacter, Streptococcus، وكان العديد من الانواع التي تم تحديدها تتفق مع مصدر البكتريا الفموي (عن طريق الفم)، وهذه النتائج تؤكد ان



Stoodley, P. Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol., 13: 34-40. (2005).

[5] Mermel, L.A.; Farr, B.M.; Sherertz, R.J.; Raad, I.I.; O Grady, N. & Harris. J.S. Guideline for the management of intra-vascular catheter-related infectious. Clinical Infectious Disease. ;32:1249-1272. (2001).

[6] Maki, D.G.; Kluger, D.M. & Crnich C.J. The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. Mayo Clinic Proceedings., 132:391-402. (2006).

[7] Nagata, E.; de Toledo, A. & Oho, T. Invasion of human aortic endothelial cells by oral viridans group streptococci and induction of inflammatory cytokine production. Mol. Oral. Microbiol., 26: 78-88. (2011).

[8] Koren, O.; Spor, A.; Felin, J.; Fak, F.; Stombaugh, J.; Tremaroli, V.; Behre, C.; Knight, R.; Fagerberg, B.; Ley, R. & Bäckhed, F. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 108: 4592-4598. (2011).

[9] Wolcott, R.D.; Rhoads, D.D.; Bennett, M.E.; Wolcott, B.M.; Gogokhia, L.; Costerton, J. & Dowd, S.E. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. J. Wound Care., 19: 45-53. (2010).

الاستنتاجات: أستنتجت الدراسة بأن الغشاء الحيوي المتكون بوساطة مسببات المرضية المعزولة من زرع طرف القسطار كانت هي احدى مسببات مرض تصلب الشرايين، واثبتت بأن طريقة MTP للكشف عن المسببات المرضية المكونة للغشاء الحيوي كانت هي الاكفاً .

التوصيات: اجراء اختبار زرع الدم Blood Culture قبل اجراء عملية القسطرة ومعالجة المريض، اجراء المزيد من الدراسات الجزيئية والوراثية للكشف عن تكوين الغشاء الحيوي بوقت مبكر لسهولة معالجته ومعرفة اسباب تكونه لكونه احد اسباب عوامل الضراوة .

References

- [1] Cucarella, C. ; Tormo, M.A. ; Ubed, C. ; Trotonda, M.P. ; Monzon, M. ; Peris, C. ; Amorena, B. ; Lasa, I. and Penades, J.R. Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine Staphylococcus aureus. Infect. Immun. 72(4) : 2177-2158. (2004).
- [2] Goad, M.E.P. & Goad D.L. Biomedical devices and biomaterials. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, eds. Handbook of Toxicologic Pathology. San Diego, SF: Acad.Press Har. Scie. and Technol .,459-477. (2002).
- [3] Lichter, J.A.; Van Vliet, K.J. & Rubner, M.F. Design of antibacterial surfaces and interfaces: polyelectrolyte multilayers as a multifunctional platform. Macromolecules ;42:8573-8586. (2009).
- [4] Fux, C.A.; Costerton, J.W.; Stewart, P.S. &



- slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun*, 37:317–326. (1982).
- [16] Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D.J.; Fatma, T. & Rattan, A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian J. Med. Microbiol*; 24(1):25-9. (2006).
- [17] Freeman, D.J.; Falkiner, F.R. & Keane, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.*, 42:872-874. (1989).
- [18] Akbar, D. H.; Mushtaq, M. A.; El-Tahawi, A. T. & Bahnasy, A. A. *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Saudi. Medical J.*, 21: 171-174. (2000).
- [19] Mukoyor, M.; Mabiza, E. & Gould, I. M. Staphylococcal bacteremia in Zimbabwe 1983. *J. Infect.*, 10: 233-235. (1985).
- [20] Enwere, G.; Biney, E.; Cheung, Y. B.; Zaman, S. M.; Okoko, B.; Oluwalana, C.; Vaughan, A. & Cutts, F. T. Epidemiologic and clinical characteristics of community-acquired invasive bacterial infections in children aged 2-29 months in The Gambia. *Pediatr. Infect. Dis. J.*; 25(8):700-705. (2006).
- [21] French, G. L.; Cheng, A. F. B.; Dnithie, R. & Cockram, C. S. Septicemia in Hong Kong. *J. Ant. Chemotherapy*. 25:115-125. (1990).
- [10] Wolcott, R.D.; Wolcott, J.J.; Palacio, C. & Rodriguez, S. A Possible Role of Bacterial Biofilm in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J. Bacteriol. Parasitol.* 3:127. (2012).
- [11] Ott, S.J.; El Mokhtari, N.E.; Musfeldt, M.; Hellmig, S.; Freitag, S.; Rehman, A.; Kühbacher, T.; Nikolaus, S.; Nam-solleck, P.; Blaut, M.; Hampe, J.; Sahly, H.; Reinecke, A.; Haake, N.; Günther, R.; Krüger, D.; Lins, M.; Herrmann, G.; Fölsch, U.R.; Simon, R. & Schreiber, S. Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation* ., 113:929-37. (2006).
- [12] Katz, J.T.; Shannon, R.P. Bacteria and coronary atheroma: more fingerprints but no smoking gun. *Circulation* ., 113:920-2. (2006).
- [13] Maki, D.G.; Weise, C.E. & Sarafin, H.W. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N. Engl. J. Med.*, 296:1305-9. (1977).
- [14] Mireles, J.R.; Toguchi, A. & Harshey, R.M. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol.*, 183: 5848–54. (2001).
- [15] Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Bisno, A.L. and Beachey, E.H. Adherence of



- Nogales, C. & Martín, E. Catheter-related bacteremia and fungemia. Reliability of two methods for catheter culture. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 15:575-8. (1992).
- [30] Storti, A. ; Manzato, A. J. ; Pizzolitto, A. C. & Pizzolitto, E. L. Assessment of central venous catheter – associated infections using semi- quantitative or quantitative culture methods . *Journal of Basic Applied Pharmaceutical Sciences .*, 27(3) :213-220. (2006).
- [31] Collignon, P.J.; Soni, N.; Pearson, I.Y.; Woods, W.P.; Munro, R.; Sorrell, T.C. Is semi-quantitative culture of central vein catheter tips useful in the diagnosis of catheter-associated bacteremia? *J. Clin. Microbiol.* 24:532-5. (1986).
- [32] Raad, I.I. & Bodey, G.P. Infectious complications of indwelling vascular catheters. *Clin. Infect. Dis.*, 15:197-210. (1992).
- [33] Bouza, E.; Muñoz, P.; López-Rodríguez, J.; Jesús Pérez, M.; Rincón, C.; Martín Rabadán, P.; Sánchez, C. & Bastida, E.A. A needleless closed system device (CLAVE) protects from intravascular catheter tip and hub. *J. Hosp. Infect.*, 54:279-87. (2003).
- [34] Bouza, E.; San Juan, R.; Muñoz, P.; Pascual, J.; Voss, A. & Desco, M. Cooperative Group of the European Study on Nosocomial Infections (ESGNI). A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial
- [22] Levey, I.; Leibovici, L.; Druker, M.; Samra, Z.; Konisberger, H. & Ashkenazi, S. A prospective study of gram-negative bacteremia in children. *Pediatr infect. Dis. J.*, 15:117-122. (1996).
- [23] Sidjabat, H.; Nimmo, G.R.; Walsh, T.R.; Binotto, E.; Htin, A.; Hayashi, Y.; Li, J.; Nation, R.L.; George, N. & Paterson, D.L. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* due to the New Delhi Metallo- β -lactamase. *Clin. Infect. Dis.* 52(4):481-4. (2011).
- [24] Nordbring, F. *Pseudomonas* clinical problems related to virulence factors and development of resistance. *Arch. Intern. Med.*, 142: 2010-2011. (1982).
- [25] Naaber, P.; Smidt, I.; Tamme, k.; Liigant, A.; Tapfer, H.; Mikel Saar, M. & Talvik, R. Translocation of indigenous microflora in an experimental model of Sepsis. *J. Med. Microbiol.*, 49:431-439. (2000).
- [26] Jawetz, E.; Melnick, J. L. & Adeberry, E. A. Review of medical microbiology. 21st ed London altose: lange medical publications. (1998).
- [27] Hossain, M.I.; Kabir, A. K. M. I.; Khan, W. A. & Fuchs, G. J. *Acinetobacter* bacteremia in patients with diarrheal disease. *Epidemiol. Infect.*, 120:139-142. (1998).
- [28] Ellis, D.H. Clinical mycology, the human opportunistic mycosis, Gillingham printers, Pty. Ltd. Asturalia. (1994).
- [29] Gutiérrez, J.; Leon, C.; Matamoros, R.;



- Carolyn, N. & Costerton, J.W. Bacterial Adherence to Biomaterial and Tissue The Significance of Its Role in clinical sepsis. The journal of Bone and Joint Surgery., 67 :264-237. (1985).
- [41] Oliveira, M.; Nunes, S.F.; Carneiro, C.; Bexiga R.; Bernardo, F.; & Vilela, C.L. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. J. Veterinary Microbiology, 124: (1-2), P187-191. (2007).
- [42] Rewatkar, A.R. & Wadher, B.J. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm formation methods. IOSR J. Pharm. and Biolog. Sci., 8(5) : 36-40. (2013).
- [43] Bose, S.; Khodke, M.; Basak, S.; & Mallik, S. K. Detection Of Biofilm Producing *Staphylococci*: Need Of The Hour. J. of Clin. & Diag. Res., 3(6):1915 – 1920. (2009).
- [44] Oliveira, A. & Cunha, M. L. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. BMC Res. Notes. 3: 260. (2010).
- [45] Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Younger, J.A.; Baddour, L.M.; Barrett, F.F. & Melton, D.M. Adherence of coagulase negative *Staphylococci* to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical susceptibility (ESGNI-005 Study). Clin. Microbiol. Infect.; 10:838-42. (2004).
- [35] Fätkenheuer, G.; Buchleidt, D.; Cornely, O.A.; Fuhr, H.G.; Karthaus, M.; Kishro, J.; Leithäuser, M.; Salwender, H.; Südhoff, T.; Szelényi, H. & Weissinger, F. Central venous catheter (CVC)-related infections in neutropenic patients. Guidelines of the infectious diseases working party (AGI-HO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO). Ann. Hematol., 82:149-57. (2003).
- [36] Blot, F.; Schmidt, E.; Nitenberg, G.; Tancrede, C.; Leclercq, B.; Laplanche, A. & Andremon, A. Earlier positivity of central venous versus peripheral blood cultures is highly predictive of catheter-related sepsis. J. Clin. Microbiol., 36:105-9. (1998).
- [37] MacFaddin, J. F. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA. (2000).
- [38] Forbes, B.A.; Daniel, F.S. & Alice, S.W. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th ed., Mosby Elsevier company. USA. formulations. Lett. Appl. Microbiol., 45: 330-335. (2007).
- [39] Jawetz, M. A.; Brooks, G.F.; Butel, J.S. & Morse, S.A. Medical microbiology. 25th ed., Lang medical, McGraw-Hill, USA. (2010).
- [40] Gristina, A.G.; Winston-Salem, M.D.;



- relationship between luminal colonization and duration of placement. *J. Infect. Dis.*,168:400-7. (1993).
- [52] Anaissie, E.; Samonis, G.; Kontoyiannis, D.; Costerton, J.; Sabharwal, U.; Bodey, G. Role of catheter colonization and infrequent hematogenous seeding in catheter-related infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*,14:135-7. (1995).
- [53] Baillie, G.S. & Douglas, L.J. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J. Med. Microbiol.*,48(7): 671-679. (1999).
- [54] Vinitha, M. & Mamata, B. Biofilm as Virulence Marker in *Candida* Isolated from Blood. *World Journal of Medical Sciences.*, 2 (1): 46-48. (2007).
- [55] Castillo, D.M.; Sánchez-Beltrán, M.C.; Castellanos, J.E.; Sanz, I.; Mayorga-Fayad, I. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J Clin Periodontol* 38: 418-427. (2011).
- [56] Delbosc, S.; Alsac, J.M.; Journe, C.; Louedec, L & Castier, Y.; Mallet, M.; Ruimy, R.; Rossignol, P.; Bouchard, P.; Michel, J.; Meilhac, O. *Porphyromonas gingivalis* Participates in Pathogenesis of Human Abdominal Aortic Aneurysm by Neutrophil Activation. Proof of Concept in Rats. *PLOS One* 6: 18679. (2011).
- [57] Scannapieco, F.A. Periodontal inflammation. *J Clin. Microbiol.*;22:996-1006. (1985).
- [46] Costerton, J.W.; Cheng, K.J.; Geesey, G.G.; Ladd, T.I.; Nickel, J.C.; Dasgupta, M. & Marrie, T.J. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:435-64. (1987).
- [47] Gokce, G.; Cerikcioglu, N. & Yagci, A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia.*;164(6):265-269. (2007).
- [48] Knobloch, J, K.; Horstkotte, M. A. ; Rohde, H. & Mack, D. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. and Immunol.*, 191 (2): 101-106. (2002).
- [49] Iiknur, D. ; Nuri, k. & Yasemin, O. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinical *Candida* isolates. *Afr. J. Microbiol. Res.* ,4(24): 2763-2768. (2010).
- [50] Elliott, T.S.J.; Moss, H.A.; Tebbs, S.E.; Wilson, I.C.; Bonser, R.S. Graham, T.R.; Burke, L.B. & Farouqi, M.H. Novel approach to investigate a source of microbial contamination of central venous catheters. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*;16:210-3. (1997).
- [51] Raad, I.; Costerton, W.; Sabharwal, U.; Sacilowski, M.; Anaissie, W. & Bodey, G. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative



- enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 54: 349-355. (2008).
- [60] Bernard, B. ; Lanter, K. S.; David, G. D. Bacteria Present in Carotid Arterial Plaques Are Found as Biofilm Deposits Which May Contribute to Enhanced Risk of Plaque Rupture . 5 (3) 6-14. (2014).
- mation: from gingivitis to systemic disease. *Compend. Contin. Educ. Dent.*, 25: 16-25. (2004).
- [58] Morozumi, T.; Kubota, T.; Abe, D.; Shimizu, T.; Komatsu, Y. & Yoshie H. Effects of irrigation with an antiseptic and oral administration of azithromycin on bacteremia caused by scaling and root planing. *J Periodontol* 81: 1555-1563. (2010).
- [59] Saito, A.; Inagaki, S.; Kimizuka, R.; Okuda, K.; Hosaka, Y.; Nakagawa, T. & Ishihara, K.. *Fusobacterium nucleatum*