Volume 1, Issue 7, October 2023 **ISSN (E):** 2938-3765

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CORYNEBACTRIUM DIPHTHERIA FROM PATIENTS IN MOSUL PROVINCE

Enas Sami Mahmood
College of Education for Pure Sciences, University of Mosul, Mosul, Iraq
Corresponding author: ahmedsamimahmood@gmail.com

Abstract
This thesis included isolating and diagnosing Corynobacterium by examining smears taken from the pseudohymenoptera in the pharynx, which is formed during the disease and the most important type of disease for humans in Corynebactrium diphtheria, which is positive and variable and may appear negative as a characteristic that is completely persistent and examined microscopically and then diagnosed using approved diagnostic methods Which comes in the forefront of the diagnostic biochemical tests, and the aim of this research is to identify the isolates that belong to the genera of these bacteria through the response of each isolate to a group of antibiotics used or not, and the severity of the sensitivity impairment. The antibiotics Chloramphenicol (5 mg) and Ampicllin (AP) were used and Erythromycin (5 mg), Streptomycin (25 mg), and Gentamycin (GM).

Keywords: Corynobacterium isolates, Antibiotics, Plant extract.

عزل تشخيص بكتيريا الخناق من المرضى في مدينة الموصل

ايناس سامي محمود
قسم علوم الحياة ، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة:

تضمنت هذه الرسالة عزل وتشخيص بكتيريا الخناق *Corynobacterium* من خلال فحص مسحات مأخوذة من الغشاء الرختيري الكاذب في البلعوم والذي يتكون أثناء المرض وأهم نوع مرضي للإنسان في عصيات الخناق *Corynebactrium diphtheria* تكون موجبة متغيرة وقد تظهر سالبة كصفة تدام بصورة تامة وفحصت مجهرياً ثم شخت باستخدام الطرائق التشخيصية المعتمدة والتي تأتي في مقدمتها الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية والهدف من هذا البحث هو التعرف على العزلات التي تنتمي إلى أجناس هذه البكتيريا من خلال استجابة كل عزلة لمجموعة من المضادات الحيوية المستعملة من عدمها وشدة ضعف الحساسية وقد استخدمت المضادات الحيوية Chloramphenicol (5 mg) و Ampicllin (AP) و Erythromycin (5 mg) و Streptomycin (25 mg) و Gentamycin (GM).

الكلمات المفتاحية: عزلات جرثومة *Corynobacterium*، المضادات الحيوية، المستخلص النباتي.

المقدمة:

تنتشر بكتيريا الخناق *Corynebactrium diphtheria* في بقاع العالم خاصة في دول العالم الثالث ولقد سجلت حالات عديدة في مدينة الموصل. إن العوامل الحياتية والبنية الاجتماعية مازالت تساعد على استيطانها في مناطق معينة وذلك لارتباطها بمجموعة كبيرة من

Web of Medicine: Journal of Medicine, Practice and Nursing
webofjournals.com/index.php/5
Licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

الالتهابات المرضية من الإصابات التي تحدث في المستشفيات من الأسباب التي زادت من خطورة هذه الجراثيم إن لها القدرة على إفراز الكثير من الأنزيمات منها أنزيم التجلط الحر والمقدي وتكوين أنزيم اليوريز وإنتاج الأنزيمات المحللة للدم بسبب أكسدة الهيموكلوبين:

$$\text{Haemoglobin} \xrightarrow{\text{oxidation}} \text{methamojlobin}$$

أدى الاستخدام المفرط والعشوائي للمضادات الحيوية إلى ظهور Nitrite إلى نتريت Nitrateولها القدرة على اختزال النترات سلالات جرثومية مقاومة للمضادات الحيوية ويعد هذا استجابة للضغط الانتخابي المسلط عن طريق المعالجة مما أدى على تطوير الجراثيم لعدة آليات مكنتها من المقاومة منها إحداث تغيرات في عمليات الضخ داخل الخلية وإنتاج أنزيمات فوق الخلوية تعمل على حدوث تحويرات يعمل على حدوث تحويرات في بروتينات الجدار الخلوي إذ عملت بلازميدات.Extra cellua enzymeفوق الخلوية

المواد وطرائق العمل:

العزلات البكتيرية:

تم في هذه الدراسة جمع العينات (300) عينة خلال فترة ثمانية أشهر بدءاً من الشهر الرابع 2021 وانتهاءً بالشهر الحادي عشر 2021 من مناطق مختلفة من جنوب الموصل شملت المدارس المتوسطة والإعدادية كما جمعت عينات من مستشفى الخنساء التعليمي في الموصل من منطقة الحنجرة بواسطة المسحات القطنية الجاهزة المعقمة (Zalma, *et al.*, 1990 ثم زرع العينات على أطباق حاوية) Albert stain (م وتصبغ بصبغة البرت (º) وحضنت الأطباق بدرجة حرارة blood agar37), (Cystine tellurite وسط اكار الدم) وصبغة لوفلز لاختبار الشكل الخلوي لعصيات الخناق واستخدمت الاختبارات الكيموحيوية (اختبار تخمر السكريات وتحلل النشا وتكوين أنزيم اليوريز واختبار اختزال النترات واختبار إسالة الجيلاتين) Hayakawa *et al.*, 1983.(

طريقة اختبار حساسية المضادات الحيوية:

حيث أجرى الفحص (McCloskey, *et al.*, 1995 حسب طريقة (CTBA) اختبرت حساسية البكتيريا المزروعة على وسط) من خلال زرع الجراثيم النقية في أنبوبة اختبار حاوية على (10) مل من وسط المعقم (CTBA م وباستخدام التخطيط على وسط (º) لمدة (24) ساعة وحضنت في درجة حرارة Brain heart infusion broth37) وباتجاهين متعاكسين متقاطعين لضمان انتشار الجراثيم على السطح بصورة عامة وتوضع أقراص المضادات الحيوية على السطح م لمدة (48) ساعة ºالمزروع بواسطة الضغط وضغطت الأقراص على السطح لتثنيها جيداً. وحضنت الأطباق المزروعة بدرجة 37 وبعدها سجلت نتائج الفحص بقياس قطر منطقة منع النمو البكتيري الظاهرة حول قطر أقراص المضادات الحيوية الفعالة بعد (24) و(48) ساعة) Konneth, *et al.*, 1995.(

جدول رقم (1) المضادات الحيوية المستخدمة وتراكيزها

المضاد الحيوي	المختصر	التركيز
Chloroampheico	(C)	5 Mg
Streplamycin	(St)	25 Mg
Erythromycin	(E)	5 MG
Centamycin	(G)	10 Mg

Licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Web of Medicine: Journal of Medicine, Practice and Nursing
webofjournals.com/index.php/5

اختبار انزيم تجلط البلازما Coagulase test:

- **اختبار انزيم التجلط المرتبط (اختبار الشريحة) Slide Test**

استخدمت في هذا الاختبار شريحة زجاجية نظيفة وضعت عليها قطرة المحلول الملحي الفسلجي مزجت مع جزء مستعمرة لجرثومة الخناق ، بعد ذلك اضيفت قطرة من البلازما غير المخففة الى المعلق ومزجت جيدة فاذا حدث تجلط خلال (5) ثواني تعد النتيجة موجبة بحسب ما جاء في (Finegold et al, 2016, 98).

- **اختبار انزيم التجلط الحر (اختبار الانبوب) Tube test**

اجري الاختبار بحسب طريقة (Howard et al, 2018, 21)

اذ اخذ 0.1 مل من المعلق الجرثومي (18-24) ساعة والنامي على وسط المرق المغذي N.broth واضيف الى انبوب اختبار صغير ومعقم يحتوي على 0.5 مل من البلازما وحضنت الانابيب بدرجة 37م في حمام مائي مدة 4 ساعات وتمت ملاحظة النتيجة.

اختبار تخمر السكريات Sugar fermentation test

القحت أوساط السكريات المختلفة بالمستعمرات النقية والمراد اختبارها وحضنت بدرجة حرارة 37مْ مدة (24-28) ساعة وتم تسجيل النتائج بملاحظة تغير لون الوسط من اللون الاحمر الى اللون الأصفر بسبب انتاج الحوامض العضوية بحسب ما جاء في (Atlas et al, 2011, 102).

- **اختبار تحلل الدم Hacmolysins tes**

اتبعت طريقة (Cruickshank) اذ لقح وسط اكار الدم بمستعمرة جرثومية نقية ثم حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37مْ مدة (18-24) ساعة بعد ذلك تمت ملاحظة التحلل الدموي حول المستعمرة (Cruickshank et al, 2013, 98).

Web of Medicine: Journal of Medicine, Practice and Nursing
webofjournals.com/index.php/5

Licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

تحضير المستخلصات النباتية

المستخلصات المائية

حضرت المستخلصات المائية بالاعتماد على طريقة الباحث Riose وجماعته سنة (1987) وذلك بمزج (40) غم من النموذج النباتي المجفف والمسحوق في (160) سم من الماء المقطر مع التحريك بوساطة جهاز المحراك المغناطيسي Magnetic stirrer لمدة ساعة واحدة ، بعدها وضع المزيج في الثلاجة لمدة (24) ساعة لغرض النقع ثم رشح المزيج من خلال عدة طبقات من الشاش النظيف ورشح مرة اخرى بوساطة قمع بخنز وباستخدام ورق ترشيح (Whatmann No.1) مع التفريغ لغرض التخلص من الأجزاء غير المسحوقة وبهذا نكون قد حصلنا على المستخلص المائي الخام ، بعد ذلك تم وضع المستخلص الخام في علب بلاستيكية وجفف بالتبريد تحت ضغط مخلخل بوساطة جهاز التجفيد (Lyohphilizer) ثم حفظت العينات بعد جفافها في قناني زجاجية ذات غطاء محكم بالتجميد لحين استخدامها في الدراسة.

المستخلصات الكحولية الخام

Preparation of Crude Alcon Extracts

اتبعت طريقة الباحث Grand و آخرين (1988) في تحضر المستخلص الايثانولي والمحورة عن الطريقة الاساسية للباحث Verporte واخرين (1982) و وذلك بمزج (40) غ من المسحوق النباتي في (400) سم من الكحول الإثيلي وبتركيز . (95%) داخل حمام ثلجي باستخدام جهاز المحرك الكهربائي Stirrer ولمدة (10) ساعات بعدها ترك المزيج في الثلاجة المدة (24) ساعة للنقع، رشح بعد ذلك بعدة طبقات من الشاش ومرر خلال قمع بخنر الحاوي على ورق ترشيح (Whatmann No.1) وأخذ الراشح وتم تبخير الايثانول باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary Vacuum Evaporator المجهز من شركة (Electrothermal) آذ يعمل الجهاز على اساس التبخير تحت ضغط مخلخل ودرجة حرارة لا تزيد عن (40) . واخذت الطبقة المتكونة من المستخلص الخام بعد التبخير اذ تم الحصول على (15) غم وتحفظ بالتجميد في قناني زجاجية معقمة ذات غطاء محكم لحين استخدامها في الدراسة.

تعقيم المستخلصات المائية

اخذ (1) غم من المستخلص المائي الجاف واذيب في (5) سم^3 من الماء المقطر المعقم وبذلك يكون لدينا مستخلص بنسبة (200) ملغم/سم^3 كتركيز قياسي، عقم هذا المستخلص باستخدام المرشحات الغشائية

Web of Medicine: Journal of Medicine, Practice and Nursing
webofjournals.com/index.php/5

Licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Volume 1, Issue 7, October 2023 ISSN (E): 2938-3765

(Membrane filter 0.22 um) لمنع مرور الجراثيم من خلالها وعد هذا التركيز القياسي مصدرا لتحضير التخافيف اللاحقة المستخدمة في الدراسة.

تعقيم المستخلصات الكحولية والمفصولة بجهاز الـ Soxhlet

حضر المستخلص الكحولي، الايثر البترولي، الكلوروفورمي، الاسيتوني ومستخلص البنزين باذابة (1) غم من المستخلص في (5) سم من مادة Dimethyl sulfoxide) (DMSO) ثم عقد الزيج بطريقة البسترة بدرجة حرارة (26)مْ لمدة (10) دقائق.

التحليل الاحصائي:

تم استخدام التصميم العشوائي الكامل C. R. D في تحليل البيانات وللتعرف على معنوية الفروق بين المعاملات استعمل اختبار دنكن المتعدد المديات.

النتائج والمناقشة

تم في هذه الدراسة جمع العينات (300) عينة خلال فترة ثمانية أشهر بدءاً من الشهر الرابع 2021 وانتهاءً بالشهر الحادي عشر 2021 من مناطق مختلفة من جنوب الموصل شملت المدارس المتوسطة والإعدادية كما جمعت عينات من مستشفى الخنساء التعليمي في الموصل من منطقة الحنجرة بواسطة المسحات القطنية الجاهزة المعقمة (Zalma, *et al*., 1990) ثم زرع العينات على أطباق حاوية وسط اكار الدم (blood agar37, (Cystine tellurite) وحضنت الأطباق بدرجة حرارة (°م.

جدول (2) تأثير المضادات الحيوية المختلفة على العزلات الجرثومية

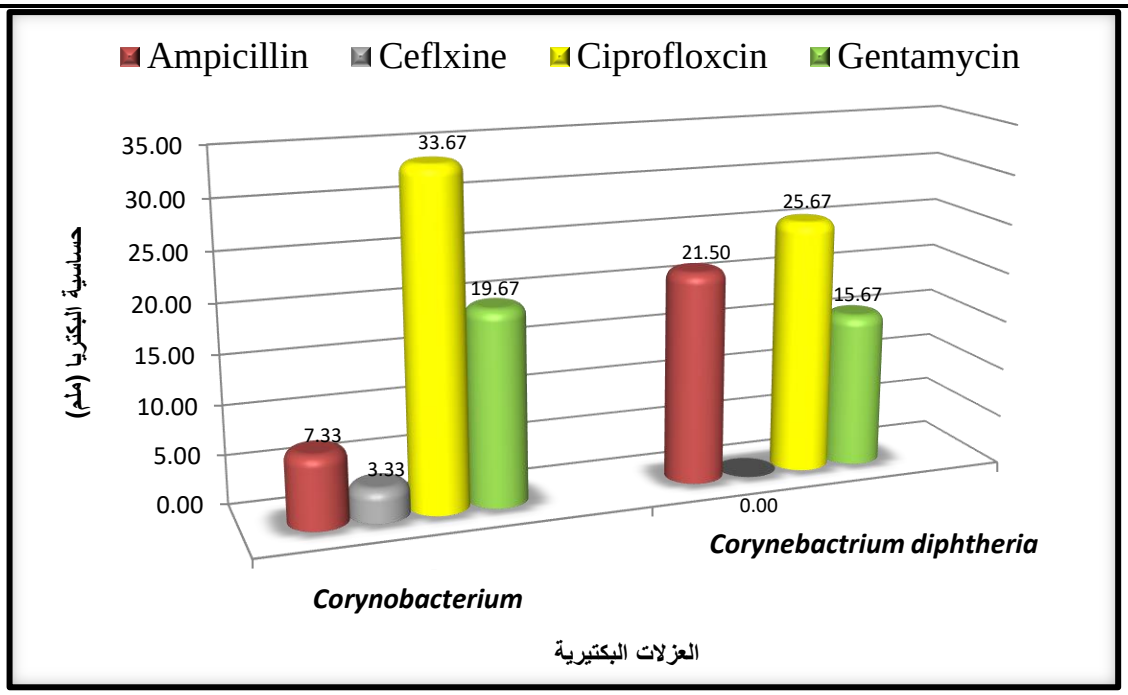
المعزولة من الحالات المرضية*Corynobacterium*

Gentamycin	Erythromycin	Choloramphecol	Ampicillin	المضاد الحيوي / العزلات
2.08+19.67 b	3.78+33.67 a	5.77+3.33 c	12.70+7.33 bc	*Corynobacterium*
2.51+15.67 b	4.51+25.67 a	0.000.00 c	8.76+21.50 Ab	*Corynebactrium diphtheria*

(*) الحروف غير المتشابهة أفقياً تشير الى وجود فروقات معنوية بين المتوسطات عند مستوى احتمال (P < 0.05) حسب اختبار دنكن، والعكس بالعكس.

Licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Web of Medicine: Journal of Medicine, Practice and Nursing
webofjournals.com/index.php/5



الشكل (2) يوضح تأثير المضادات الحيوية على حساسية عزلات جرثومة

Corynobacterium , Corynebactrium diphtheria

مقاومة بعض عزلات الخناق للمضادات الحيوية

يتبين من الجدول (2) تأثير مجموعة من المضادات الحيوية ذات الاتجاه التأثيري المتباين على بكتيريا الخناق والهدف من ذلك هو التعرف على العزلات التي تُعبر عنها الأنواع التي تنتمي إلى اجناس هذه البكتيريا من خلال استجابة كل عزلة لمجموعة المضادات الحيوية المستعملة من عدمها وشدة وضعف الحساسية لكل مضاد حيوي وذلك لمعرفة التغيرات التركيبية لكل عزلة من هذه العزلات.

أما بالنسبة للمضادات الحيوية المستعملة في هذا البحث مثل المضاد الحيوي Ampicillin و Gentamycin فإن النتائج فيها متغايرة بين مقاوم إلى معتدل وضعيف الحساسية كما هو مبين في الجدول نسبة إلى العزلات البكتيريا الأخرى مع المضادات الحيوية الأخرى المبينة في الجدول (2).

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

1. من خلال دراستنا تبين أن هناك اختلاف في تأثير النباتات الطبية على الجراثيم تبعة لمستخلصاتها.
2. أن للسلالات الجرثومية والمشخصة لم تبدي اختلافا واضحا عن بقية السلالات الجرثومية المعزولة.
3. أن السبب في تدهور الواقع الزراعي لإنتاج المحصول لم يكن سبب عدم ملائمة المناخ وانما بسبب الاهمال وسوء الادارة من جهة ومن جهة ثانية عدم مكافحة الآفات والأمراض التي تسبب موت النبات ومن ثم قلة انتاجه.

Web of Medicine: Journal of Medicine, Practice and Nursing
webofjournals.com/index.php/5
Licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

التوصيات:

1. نظرة لوفرة النباتات الطبية ذات التأثيرات في الاستخدامات العلاجية نوصي بأجراء العديد من البحوث بهذا الحقل.
2. ادخال بعض النباتات الطبية في الصناعات الدوائية ومستحضرات التجميل وشامبو الشعر والصابون وكذلك معاجين الأسنان.
3. يستعمل كمادة أولية أو ثانوية في صناعة الجلي والمربي وتكوين المواد الغذائية الأخرى والحلوة الخاصة بالأطفال كملون طبيعي وصحي.
4. ينصح في زراعته في الحدائق المنزلية او العامة لمال اوراقه وارتفاعه فضلا عن شكل زهوره الكأسية.
5. انشاء حملة اعلامية لتوضيح الفوائد الطبية والعلاجية لهذا النبات مما يشجع على زيادة استهلاكه يضفي سبب اخر لزيادة الانتاج.
6. تبني دراسات بحثية مشتركة تتبناها كلية العلوم والزراعة وبالتعاون مع مديرية الزراعة والشعب الزراعية لوضع مخطط يسهم في تنمية انتاج هذا المحصول تدعمه جهة مركزية في وزارة الزراعة لغرض امكانية زيادة انتاجه.
7. بناء الاحتواء هذا المحصول على فيتامين (C) يمكن استخدام الصناعات المرتبطة بإنتاج هذا المحصول من قبل المستثمرين مثل انشاء معمل لصناعة أقراص فيتامين (C) المنشط للجسم.

المصادر العربية:

- الحمود محمد حسن ويطيحة، احمد محمود (1995). دراسة بحثية Review article النباتات الطبية وتنظيم الخصوبة، مجلة العلوم الأساسية والتطبيقية، ليبيا 1: 77-92.
- الشريفي محمد جواد، عبد الحسين الصراف، (1991). النشرة الارشادية في زراعة الكجرات، وزارة الزراعة، الهيئة العامة للخدمات الزراعية.
- الشماع، علي عبدالمحسن (1989). العقاقير وكيمياء النباتات الطبية. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل، العراق.
- الصراف عبد المحسن محمد جواد، (1991)، النشرة الارشادية في زراعة الكجرات. وزارة الزراعة والري، الهيئة العامة للخدمات الزراعية، العراق.
- العاني حسين حميد عبدالجبار، (1990). الشاي الأحمر او الكجرات كتيب يصدر عن الهيئة العامة للخدمات الزراعية.
- قطب حسين فوزي طه، (1992). النباتات الطبياية، زراعتها ومكوناتها، الدار العربية للكتاب، ليبيا.
- المنظمة العربية للتنمية الزراعية (2017). النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي، الخرطوم.

Web of Medicine: Journal of Medicine, Practice and Nursing
webofjournals.com/index.php/5

Licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

- النعمان، اديبة يونس شريف حمو (1998). التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو اي من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

المصادر الاجنبية:

- Atlas, R. M. (2009). Laboratory manual of experimental microbiology. Mosby - year Book, Inc, USA.
- Atlas, R. M. (2011). Principles of microbiology. Mosby-Year Book Inc., USA.
- Basic Laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization, Geneva.
- Cowan, M. M. (2017). Plant products as antimicrobial agent. Clin. Microbiol. Rev. 12(4): 564-582. -106
- Finegold, S.M. and Martin, W.J. (1982). Microorganisms Encountered in Respiratory Tract Infections. Diagnostic Microbiology 6th ed., Mosby, London.
- Grace, o. o. (2014). Evaluation of the antimicrobial activity of citral. Letters In. Appli. Microbiol. 9(3): 105-108.
- Grindely , N.D.F. and Ander 4 son , E.S. (2011) Acridine treatment of F and Hfr strains of Escherichia coli k12 caring a neomycin - Kanamycin resistance determinant. Genet. Res. Camb .15: 327-334
- Koneman, E. W. ; Allen, S. D.; Janda, W. M; Schreckenborger, P. C. and winn, W. C.(2006). Color Atlas and text book of diagnostic microbiology. 4th ed, J. B. Lippincott Company, Washington.
- Morton, ton, J. (2018). "Roselle" in : Fruits of warm climates. Mimi USA. PP :281-286.

Web of Medicine: Journal of Medicine, Practice and Nursing
webofjournals.com/index.php/5
Licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

- Pessini, G.L; Dias Filho, B.P; Nakamura, C.V and Cortez D.A.G (2003). Antibacterial activity of extract and neolignans from piper regnelli. Var pallescens yunck. Mem. Inst. Oswaldocruz, Riod Janneire, 98(8): 1115 - 1120.

- Roden, E. D. ; David. P. and Small T(2013). Effect of nitrogen nutrition on roselle. In on roselle. In: J. Janick and J. E. Simon J(eds.), New Crops. Wiley, New York. PP. 583-584.

- Vandepitte, J. ; Engback, K.; Piot, P. and Heuk, C. (2003).

- Waage, S. K. and Hedin, P. A. (1985). Quercetin 3-0-Galactosyl (1-6) Glucoside a compound from narrow leafleted with antimicrobial activity. Phytochemistry. 24 : 243 - 245.

Web of Medicine: Journal of Medicine, Practice and Nursing
webofjournals.com/index.php/5

Licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.