جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة بكتريولوجية لبعض الاجناس البكتيرية السالبة لصبغة غرام المقاومة لمضادات البيتالاكتام والمعزولة من اخماج المجاري البولية في محافظة ديالى.

رسالة مقدمة الى

كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الأحياء المجهرية

من قبل

محمد خضير عباس النعيمي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى 2010– 2011

بإشراف

أ.د. عباس عبود فرحان الدليمي

١٤٣٥هـ **٢٠١٤م**

المقدمة

1. المقدمــة Introduction

تُعدُّ اخماج المجاري البولية من المشاكل التي تأتي بالمرتبة الثانية بعد أمراض الجهاز التنفسي, فهي تحظى باهتمام الباحثين ، والعاملين في المجال الطبي, وتكمن خطورتها في زيادة معدل الوفيات من خلال ما تُحدثه من أضرار كبيرة في الكلية مسببة العجز الكلوي . لذا فقد ازدادت الدراسات المتعلقة بالعوامل المسببة لهذه الالتهابات, ولا سيما الجرثومية منها (Foxman *etal*., 2000.)

تعد البكتيريا السالبة لصبغة كرام من أفراد العائلة المعوية المسبب الرئيس لهذا النوع من الالتهابات ، فهي تشكل ما مقداره (٤٠ – ٨٠ %) من مجموع مسببات التهابات الكلية ، وقد أشارت الدراسات إلى أن بكتيريا *Escherichia coli* واحدة من الأنواع البكتيرية المهمة الأكثر تسبباً في حدوث اخماج المجاري البولية سواء كان في ضمن أفراد المجتمع أو المرضى الراقدين في المستشفيات (Todar, 2002.)

إزداد الإهتمام بدراسة عوامل الضراوة لهذه البكتريا ذات العلاقة المباشرة أوغير المباشرة بالإمراضية ، ومن أهمها الهيمولايسين واليوريز لكونها عامل ضراوة تمتلكه العديد من أنواع البكتريا وينتج من قبل العديد من الاجناس البكتيرية المسببة لخمج المجاري البولية مثل (Ahmed *et al*.,2003) *Proteus , klebsiella , Pseudomonas*. (

تمتلك البكتريا السالبة لصبغة كرام القدرة على تكوين الأغشية الحيوية، هو تجمع لأحياء مجهرية مع إفرازاتها الخارج خلوية ويكون هذا التجمع بأشكال عدة، إما بعضها مع بعض بهيأة تجمعات(Aggregates)، أو إنها تلتصق على سطح ما مثل التصاقها على سطح صخرة أو على

) Interfaces(سطح الأسنان أو على سطح بركة في فراغات دقيقة تسمى الأسطح البينية)Hassan *etal*., 2011.(

يؤدي الحديد دور المفتاح بوصفه عاملاً مساعداً في سلسلة نقل الإلكترون لمختلف الأنزيمات كما) ولكي تنمو Lawlor *et al*., 2007 يعد الحديد عنصراً مهماً لنمو البكتريا وإحداث الامراضية (hostالبكتريا بنجاح في أنسجة المضيف يجب أن تأخذ الحديد من البروتينات الناقلة في المضيف هي مركبات Sidrophores,والسايدروفورات transport protein)) ((Bach *etal*., 2000 ذات أوزان جزيئة واطئة لها القدرة على سحب الحديد من بروتينيات Iron chelatorsكلابية المضيف المرتبطة بها (خلف وجرجيس ,٢٠١١).

أدى الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية إلى ظهور ممرضات بكتيرية انتهازية مقاومة هو β-lactamلهذه المضادات الحيوية، و من التقنيات التي تبديها البكتيريا لمقاومة مضادات β-lactam التي تحلل حلقة β-lactamaseإنتاجها لأنزيمات (Sobia *etal*, 2011).

وان الدراسات الحديثة MβLs و ESβLsاستخدمت طرائق مظهرية عدة لتشخيص إنزيمات PCR(Polymerase Chain Reaction تعتمد على استخدام تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميريز (β-lactamase (Pitout and Laupland, 2008.(للتحري عن الجينات التي تشفر إنزيمات

نظرا لاهمية الدراسات الخاصة بتحديد نوعية الاجناس البكتيرية السالبة المقاومة لمضادات البيتالاكتام والمسببة لاخماج المجاري البولية بين الراقدين وغير الراقدين في المستشفيات العراقية جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على مايلي:

١. تحديد الأجناس البكتيرية الأكثر شيوعا المسببة لاخماج المجاري البولية ومعرفة مقاومتها لمضادات البيتالاكتام و دراسة حساسية العزلات لمضادات البيتالاكتام وتحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لبعض هذه المضادات.
٢. إجراء دراسة مقارنة بين عوامل الضراوة للأجناس المختلفة .

٣. الكشف عن جينات *bla* $_{Tem}$, *bla* $_{shv}$ المشفرة لانزيمات البيتالاكتاميز المحطمة لمضادات البيتالاكتام.



نبذة عن أصابات المجاري البولية 2-1

يعد العالم العربي أبا بكر محمداً بن زكريا الرازي أول من قدّم وصفا" لألتهابات المجاري البولية ، عندما كان يعمل في المستشفى الرئيس في وحصى القناة البولية وذلك في القرن التاسع الميلادي (Asscher,1980بغداد) .)

تعد أمراض ألتهابات المجاري البولية أحد المشاكل الطبية التي تعاني منها معظم دول العالم (العبدلي ,٢٠١٠) ,إذ تأتي الأصابة بألتهابات المجاري البولية بالمرتبة الثانية بعد ألتهابات الجهاز التنفسي إذ يتعرض الذكور والأناث البالغين منهم والأطفال للأصابة بهذا المرض لاسيما وانه يعد من المسببات الرئيسة لوفاة الأطفال الرضع (Kareem and Bilal, 2011).

الاصابة بخمج المجاري البولية2-1-1

Infection of Urinary Tracts

تعد امراض الجهاز البولي من بين أهم المسببات المؤدية إلى العجز الكلوي والوفاة في كثير من دول العالم (Raksha *et al.*,2003). إذ يكون الادرار الاعتيادي معقماً وخالياً من الاحياء المجهرية بما في ذلك البكتريا والفطريات والفيروسات وغيرها ، ويحوي الادرار على الاملاح والمحاليل المعقدة والماء ، والتي تترشح من الدم بوساطة الكبيبات الكلوية (النفرونات) Nephrones , وهي كتلة من الاوعية الشعرية الدموية الدقيقة ملتفة مع بعضها البعض بشكل كبير إذ إن الدم يسلط ضغطا على جدرانها عند جريانه فيها مسببا ترشيح الفضلات من خلال هذه انتهاءً بالمثانة ، وبذلك (Renal pelvis) الجدران وانسيابها الى الحالب من خلال حويض الكلية فان الكلية تحافظ على نسبة متوازنة من الاملاح والمحاليل الاخرى في الدم ، بينما تقوم المثانة بحفظ الادرار وخزنه الى حين تفريغه الى الخارج (Staiman and. Lowe,2001)

تصنيف أصابات المجاري البولية 2-1-2

Classification of Urinary Tract Infection

إن التركيب الفسيولوجي للجهاز البولي يجعله معرضاً لنوعين من اخماج المجاري البولية وهي:-

1-2-1-2 أصابة المجاري البولية السفلي Lower Urinary Trac Infection

وهذه تتضمن:-

١- التهاب الاحليل (Uretheritis)

هو دخول البكتريا للاحليل واصابته, ويحدث عندما تنتقل البكتريا الى فتحة الاحليل عن طريق الجلد Catheterization وخاصة عند اطالة امد القثطرة ، وقد تحدث الاصابة عن طريق عملية بقائها في احليل المرضى الراقدين في المستشفيات، وتعد إصابات الإحليل شائعة في الرجال والنساء على السواء , إلا ان معظم الاصابات في النساء قد تمتد الى المثانة، وفي الرجال قد تكون الاصابة مقتصرة على جزء من الاحليل , أو قد تمتد الاصابة الى الغدد المجاورة للاحليل مثل التهاب غدة البروستات Prostatitis) Sim ,2001.)

٢- التهاب المثانة (Cystitis)

) يصيب الطبقة المخاطية ويكون Superficial ان ألتهابات المثانة تكون من النوع السطحي (الطائي ,٢٠٠٥) ، أما في (شائعاً بين الأناث صغار السن والنساء المتزوجات وبالأخص الحوامل الأعمار الكبيرة فيشمل كلا الجنسين وبصورة أقل بين الرجال ، ويعزى شيوع ألتهابات المثانة بين النساء الى أحليلهم العريض والقصير والى غياب سائل الموثة (Prostate) الذي يمتاز بصفاته المضادة للبكتريا , فضلا" على حدوث التغييرات الهرمونية التي تؤثر على إلتصاق البكتريا الى الطبقة المخاطية للمثانة Sligh and Timbury,1994).(

تعد بكتريا القولون *E.coli* , المسؤولة عن إحداث حوالي (٨٠-٩٠٪) من الإصابات في المثانة وأن الإصابات الحادة تعد من الإصابات المكتسبة من المستشفيات Acquired Nosocomial Infections (Ehinmidu,2003)..

2-2-1-2 خمج المجاري البولية العليا Upper Urinary Trac Infection

تسمى أيضاً بمرض برايت (Bright's disease) وتتضمن ألتهابات الكلية والحويض (Pyelonephritis) الحاد والمزمن ، وتُعد إصابة خطيرة ومهددة لحياة الشخص المصاب , وتشكل ما يسمى بالمتلازمة الخمجية (Infectious syndrom) Nester *et al* ., 2004(. يعد حدوث أنسدادات في المجاري البولية من أهم سمات هذه الألتهابات ، كما أن ظهور الحصى (Stones) والأورام من (Foregin bodies) والأجسام الغريبة (Cervical Prolaps) والتدلي العنقي (مسببات الأنسداد الشائعة Dielubanza and Schaeffer, 2011) .(

تصيب المجاري البولية *Proteus mirabilis* الى أن بكتريا (2001) وجماعته Liaw أشار الباحث العليا مسببة إلتهابات حويض الكلية وأنها السبب في تكوين حصوات الكلية فضلا" على حصوات المثانة.

2-1-3 الامراضية Pathogenesis

تصنف اصابات المجاري البولية من حيث شدة الامراضية الى :

2-1-3-1 إصابات المجاري البولية المعقد (Complicated U.T.I)

لوحظ أن إلتهابات المجاري البولية عادة يكون مترافقاً مع التشوهات التركيبية في القناة البولية (والتشوهات الولادية ، لكن المسبب الرئيس لتلك الألتهابات هي Obstruction والأنسدادات بكتريا (Li *et al.*,2004) *Proteus mirabilis*.

2-1-3-2 أصابات المجاري البولية غيرالمعقد (Uncomplicated U.T.I)

تكون القناة البولية طبيعية من الناحيتين التشريحية والفسيولوجية في هذا النوع من الألتهابات , كما أن الكلية تؤدي وظائفها بالشكل الطبيعي , وقد تكون هذه الألتهابات مصحوبة بأعراض وأحياناً بدون أعراض. (Torzewska *et al.,* 2003)

2-1-4 طرائق حدوث الالتهابات Routes of infection

هناك طرائق عدة تسلكها البكتريا لأحداث الأصابة بألتهابات المجاري البولية ومنها:

2-1-4-1 الأصابات الصاعدة (Ascending Infection)

،وفي حالة أهمال معالجة الألتهاب تتطور (Cystitis) يعد أهم الطرق للأصابة بألتهاب المثانة الأصابة الى ألتهاب الكلية وحويضها (Mobley , 2002) (Li &.

4-1-2- 2 الانتقال عن طريق الدم (Haemtogenus Spread) (

تزداد أحتمالية حدوث ألتهاب الكلية عند حصول أنسدادات تستوجب أجراء جراحة في الأحليل إذ توجد أنواع مختلفة من الجراثيم في الأحليل القاصي يمكن أن تدخل أثناء الأجراءات الجراحية في الأحليل وكـذلك في الأطفال الرضع إذ تصل الممرضات عن طريق الدم الى الكلية محدثة التــهابات المجاري البولية (Kaufman and Fairchild,2004).)

4-1-2- 3 الانتقال عن طريق اللمف (Lymphatogenus Spread) (

يحدث انتقال الأحياء المجهرية الممرضة الموجودة بالقولون الى المثانة عن طريق القنوات اللمفاوية للقولون (Kaufman and Fairchild,2004) (.

5-1-2 العوامل المساعدة في حدوث التهابات المجاري البولية

5-1-2- 1 الفشل الكلوي

يعد البطء في جريان الإدرار و كذلك الاستعمال المتكرر للقثطرة من عوامل الإصابة بخمج المسالك البولية (Gadallah *et al.*, 2000) .)

5-1-2- 2 القسطرة (Catheterization) (

تعد عملية قسطرة المثانة من العوامل الشائعة لحدوث إصابات إلتهابات المجاري البولية فمن ، مسببة ألتهابات (Liedle,2001)الممكن عن طريق أنابيب القسطرة ان تدخل العديد من البكتريا إذ لوحظ أن الأطفال الذين تجرى (Hospital Acquried U.T.I)المجاري البولية في المستشفيات لهم عمليات قسطرة في المستشفيات يحملون نسبة عالية من الاصابة بالتهابات المجاري البولية النوع الاكثر انتشاراً في احداث *E.coli*. وتعد بكتريا (Chen,2005)المكتسبة في المستشفيات التهابات المجاري البولية المعقدة المقترنة بالقثطرة , تليها بكتيريا *Proteus mirabilis* (Jacobsen *et al.*, 2008.)

5-1-2- 3عدم التفريغ المستمر للمثانة

إن ركود كمية من الادرار بالمثانة يؤدي الى حدوث الاصابة بالتهابات المجاري البولية , لان الادرار وسط ملائم لنمو الاحياء المجهرية (Efstathiou *et al.*,2003) .

5-1-2-4 مرض السكر

إن مرضى السكري لديهم عامل خطورة (Risk factor) متزايد للاصابة ليس لالتهاب المجاري البولية السفلية فقط وانما لالتهاب المجاري البولية العلوية كذلك، كما في التهاب حويض الكلية النفاخي (Emphysematous pyelonephritis)، والذي يحدث نتيجة تخمر سكر الكلوكوز وانتاج خليط من الغازات داخل الانسجة ، والذي غالبا ما يكون سلالات بكتريا *Escherichia coli* (Geerlings *et al.*, 2002.)

5-1-2- 5الحمل

يُعُّد التهاب المجاري البولية من أهم المشاكل التي تواجه المرأة الحامل , وهو عامل ممهد للأصابة بالتهاب المجاري البولية , وهذا يعود إلى التغيرات الفسيولوجية الطبيعية الحاصلة أثناء مدة الحمل والمتضمنة قلة الفعالية التموجية للحالبين , وتوسع حوض الكلية , والاحليل , وهذا ناتج عن استرخاء عضلات الاحليل نتيجة إفراز الهرمون الجنسي (Progesteron) , والانسداد الميكانيكي للرحم المتضخم مما يؤدي إلى تغير موقع الاحليل الذي يسبب إعاقة الادرار , فضلا عن زيادة نسبة السكر بالإدرار خلال مدة الحمل (مجيد,٢٠٠٤) .

5-1-2- 6الجنس والعمر Age and Sex

يحدث التهاب المجاري البولية في كلا الجنسين وبالفئات العمرية كافة , وتعد الالتهابات البولية عند الاطفال ذات أهمية كبيرة إذا لم تعالج بحكمة فإنها قد تؤدي إلى الوفاة سواء عند الصغر أو فيما بعد, وقد تترافق بخمج الدم أو قد تكون العلامة الأولى لتشوه تشريحي في المسلك البولي (Nashat في دراسة على فتيان وفتيات في عمر العشرين(2003) وجماعته Cohen) . لاحظ 2000 *et al.,* % أما عند الذكور فقد كانت ٨.٥ % بينما اشار 12.6أن نسبة الأصابة عند الأناث كانت

الى أن نسبة الأصابة بين الذكور ٢٥.٤ % أما لدى الأناث فقد (2004) وجماعته Rakaالباحث بلغت ٧٤.٦٪.

5-1-2-7 الحصىStones

تعرف الحصى بأنها عبارة عن تجمع لتركيب معقد مترسب من محلول عالي التشبع, تؤدي الحصى دوراً كبيراً في إحداث الانسدادات في المجاري البولية ، وهذا الأنسداد يؤدي الى ركود الأدرار فيكون وسطاً زرعياً ملائماً لنمو البكتريا المسببة لألتهاب المجاري البولية ، كما أن الأنسداد يمهد لأنتشار الألتهاب الى أعلى المجاري البولية من خلال التمهيد للأنعكاس المثاني الحالبي (Kasidas*et al.*,2004) .

5-1-2- 8 الختانCircumcision

أشار العديد من الباحثين أن عملية الختان تقلل نسبة الأصابة بألتهابات المجاري البولية , وفي دراسة محلية أُجريت على الاطفال الرضع المصابين بالتهابات المجاري البولية كانت نسبة الذكور غير المختونين المصابين بالتهابات المجاري البولية (٨٠ %) , في حين بلغت نسبة الذكور المختونين (٢٠٪) ويعود سبب ذلك لوجود منطقة القلفة التي تكثر فيها الجراثيم (توفيق،٢٠٠٥) .

9-5-1-2التشوهات في القناة البولية

إن التشوهات التركيبية في القناة البولية تساهم بأحداث الأصابة بألتهابات المجاري البولية *Proteus mirabilis* (Torzewska *et al.*,2003) . وبوساطة البكتريا ومنها

2-2 وصف عام لبعض الاجناس البكترية قيد الدراسة:

2-2-1 بكتيريا *Escherichia coli*

في الامعاء كجزء من النبيت الطبيعي للامعاء، الا ان العديد من *E.coli* تتواجد بكتريا انواعها تمتلك القدرة على احداث المرض عند مغادرتها موقعها الطبيعي، مسببة العديد من الامراض) التي لها نوعين: الذيفان الثابت Exotoxinلامتلاكها عوامل الضراوة المختلفة كالسموم الخارجية ( ) Heat Labile Toxin) والذيفان الحساس للحرارة (Heat Stable Toxinبالحرارة (

والهيمولايسين، حيث تنتج البكتريا الهيمولايسين الذي يساعدها في تحطيم الخلايا والتي تزيد من وجود الحديد وبذلك تحسن النمو البكتيري بشكل كبير(Wong *et al*.,2005).

تشكل هذه البكتريا (85 من الاصابات المكتسبة عن طريق المستشفيات، إذ تمتلك البكتريا (%) والتي تتلامس مع الخلايا الطلائية البولية وبذلك فان افراغ المثانة يمكن ان Fimbiraالسطحية (يؤدي الى التخلص من هذه البكتريا اثناء ذلك (Krieger, 2002.)

تعد بكتريا *E.coli*واحدة من اكثر الاسباب شيوعا للامراض والوفيات في الاطفال الذين يعانون من الاسهال في انحاء العالم جميعها خصوصا في الدول المتقدمة (2011) , *etal* Enayat.)

فضلا عن ذلك فإنها من أكثر الانواع المتسببة باحداث التهابات المجاري البولية (Todar,2002) ولاسيما عند النساء الحوامل , اذ تصل نسبة الاصابة بها الى (٩٠٪) Jawetz *et al.,* 1998)(. وتعد هذه الجرثومة من المسببات الشائعة جدا في احداث التهاب الاحليل والمثانة في النساء وتعد السبب الرئيس الأول في أحداث إصابات الكلى (Leveno *et al*.,2003) .

2-2-2 بكتريا المتقلبات *Proteus. mirabilis*

ينتمي جنس المتقلبة إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae والتي تعد عائلة كبيرة تضم العديد من الجراثيم المرضية مثل *Klebsiella* ،*Escherichia* ،*Serratia* ،*Enterobacter*)Brooks *et al*., 2007.(

تعد بكتريا *Proteus mirabilis* النوع الأهم في جنس *Proteus* من الناحية الطبية حيث أنها تسبب العديد من الألتهابات الجهازية والسطحية كألتهابات الجهاز التنفسي Respiratory وهي من (Otitis media) والأذن الوسطى (Wound) وألتهابات الجروح Tract infection

المسببات الرئيسة لخمج المجاري البوليةاذ تأتي بالمرتبة الثانية بعد بكتريا *E.coli* (Shwu-Jen,2000).

) إلى أن جراثيم المتقلبات هي العامل 2007(Filimon and Iacob توصل الباحثان)، إذ أن الإصابة إما Nosocomial infectionsالمرضي الأساس للإصابات داخل المستشفيات (في حالة أخماج الجهاز البولي .*Klebsiella* spp أن تكون بصورة مفردة أو تتواجد معها في حالة الأخماج السطحية للمواقع الجراحية .*Staphylococcus spp*أومع). 33.34%) وبنسبة (Superficial surgical-site infections)

3-2: بعض عوامل الضراوة للأجناس والأنواع البكتيرية قيد الدراسة

3-2-1 البكتريوسين Bacteriocin

بين الكائنات المجهرية منذ زمن (Antagonism) عرفت ظاهرة التضاد الميكروبي بعيد ،وقد أثارت هذه الظاهرة اهتمام الباحثين منذ أواخر القرن التاسع عشر عندما إن لبعض سلالات البكتريا القدرة على 1877 عام Joubert و Pasteurلاحظ كل من (Sarika *et al* .(,2010; إفراز مواد سامة ، أو إنزيمات محللة ، أو مواد مثبطة لنمو البكتريا Lee *et al*.,2009

توالت بعدها العديد من البحوث والدراسات لتفسير هذه الظاهرة ودرست طبيعة المواد المنتجة وقد عزيت إلى التنافس بين نوعين من البكتريا بسبب إنتاجها لهذه العوامل المضادة ، و أشار إلى إن البكتريوسينات تعد عوامل مضادة للبكتريا.(2006) وجماعته Dejong

عرفت البكتريوسينات انها عبارة عن مركبات ذوات طبيعة بروتينية تمتلك قابلية إبادة العديد من أنواع البكتريا أو الحد من نموها (Todorov ,2009).

تتشابه آليات عمل البكتريوسين في تأثيرها في الخلية الهدف مع آليات عمل مضادات الحيوية فقد تعمل على الجدار الخلوي أو الغشاء السايتوبلازمي (Han *et al*.,2011) ، والبعض منها يتداخل مع الفعاليات الايضية التي سيطرت عليها المادة الوراثية ، والبعض الآخر يثبط صنع البروتين(Gillor *et al*.,2005).

إن تأثير البكتريوسين في الخلايا البكترية الحساسة يكون قاتلا (bacteriocidal) (Al-Charrakh *et al*.,2011) أومثبطا للنمو (bacteriostatic) .(Sarika *et al*.,2010) وان التغيرات التي يحدثها البكتريوسين في الفعاليات الايضية الحيوية للخلايا المعاملة به تعتمد على نوع البكتريوسين وآلية عمله(Balla *et al*.,2000).

3-2- 2 انتاج السايدروفور Siderophore production

يتحدد نمو البكتريا في أنسجة المضيف ليس فقط باليات الدفاع لدى المضيف ،وإنما بتجهيز البكتريا بالحديد المتوافر وهو عامل ضروري لنمو البكتريا يشارك في عملية انتقال (الإلكترون والأوكسجين , إذ تحتاج الكثير من الإنزيمات للحديد وذلك لزيادة فاعليتها) , وان البكتريا التي تفتقد الى أنظمة سحب الحديد يختزل فيها معدل Blackburn ,2010) بصورة كبيرة مؤدية أحيانا الى حدوث تغيرات شكلية كثيرة Growth rateالنمو ( ) كما يتوقف DNA) ،وقد يتوقف تصنيع الحامض النووي (Morphological changes)(انقسام الخلية، ولهذا فان الخلايا البكتيرية تحتوي في الأقل على نظام واحد للحصول على هذا Ironالعنصر المهم مثل نظام السايدروفور ،وتعرف السايدروفور بأنها مركبات كلابية ( ) لها القدرة على سحب الحديد من مركباته ،وهي ذات أوزان جزيئية واطئة لها chelating و Transferrin ألفة عالية جدا للحديد، اذ يفرزمن الخلية ويرتبط بمركبات الحديد على سطح الخلية، ثم يعود الى داخل الخلية، وهذه المركبات تصنع في حالة Lactoferrin العتبي ,٢٠١٣) .(وجود تراكيز قليلة من الحديد في الوسط الذي تنمو فيه البكتريا

التي الجينات استنساخ على الجرثومة يحفز الميكروبية البيئة في الحديد قلة او إن انعدام مجموعة صنع الى ذلك عن فضلا الحديد حوامل صنع عن المسؤولة للانزيمات تشفر للحديد الحامل Siderophoresب للارتباط المتخصصة المستقبلات البروتينية.(Peterson, 2000)

Ferruتسمى ب التي المعقدات هذه تنقل الحديد حوامل قبل من الحديد جذب يتم ان بعد لحاملات بروتينية متخصصة مستقبلات طريق عن البكتيرية الخلية داخل الىsiderophore الخارجي (الغشاء في الحديدJawetz *etal*., 2004.)

و Aerobactinوقد وجد إن العائلة المعوية تنتج ثلاثة أنظمة للسايدروفور هي Enterobactin و Yersiniabactin) (Saharan and Nehra ,2011.

3-3-2 تكوين الغشاء الحيويBiofilm formation

يعد الغشاء الحيوي أحد عوامل الفوعة في بعض أنواع الجراثيم ، وهو عبارة عن تجمع الجراثيم أحادية الخلية وتكوين تركيب متعدد الخلايا والتي بدورها تلتصق على السطوح، يتكون الغشاء الحيوي كاستجابة لعدد من العوامل مثل الكثافة الخلوية العالية، نقص المغذيات والظروف البيئية غير الملائمة ، لذا فإن الغشاء الحيوي هو نمط من أنماط النمو المهمة في التكيف الفسيولوجي السريع للكائنات المرضية (Furukawa *et al*., 2006.)

توجد علاقة وثيقة بين قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي وقدرتها على إحداث المرض والتسبب بحدوث التهاب مزمن ، فالبكتريا المكونة للغشاء الحيوي لها قابلية أكبر على استعمار جسم المريض والاقامة فيه وتصبح اقل حساسية للعلاج بالمضادات الحيوية ، وتنتج البكتريا بروتينات إن ("BAP" Biofilm –Aassociated Protiens)مرتبطة بالغشاء الحيوي في اثناء الاصابة يسهل تكوين الغشاء الحيوي المرتبط ببقاء الجرثومة مدة أطول في (BAP)وجود هذه البروتينات جسم المريض، ويقوم الجسم المصاب بالاستجابة مناعيا لهذه البروتينات فيلاحظ وجود أجسام (Anti – BAP antibodies)مضادة لهذه البروتينات في مصل المريض (Cucarella *et al*., 2004).

الحيوية وتلوث الاجهزة الأغشية تكوين على قادرة لملون غرام السالبة البكتريا معظم تكون الطبيةومنها *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,، *Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis* .(Salih and AL–Ani,2013)

يمتـاز الغشـاء الحيـوي بإمتلاكـه تـأثير ضـار علـى صـحة الإنسـان ، وهـذه مـن الممكـن ملاحظتها عندما تتكون على الأنسجة الحية المزروعة بعد عملية جراحية طبية (Post *et al*., 2004) ، ومن ناحية ثانية فأن طرق إزالة ووقاية السطوح من الغشاء الحيوي الجرثومي تكون متعددة، منها استخدام القتل الحيوي (Biocides)، المضادات الحيوية (Antibiotics الموجات)، استخدام عوامل مخلبية (Chelating agents وكشط السطوح)، استخدام الصوتية فوق ((Ultra sound) (Scraping) (Boucher,2004. (

4-3-2 الأنثيال Swarming

إن إمتلاك جرثومة المتقلبات *Proteus* الأسواط المحيطية والتي لها دور في عملية الإلتصاق بالخلايا الظهارية يمثل الخطوة الأولى المهمة في إحداث الخمج (Harshey, 2003). تعد الأسواط أعضاء سطحية معقدة ومسؤولة عن حركة الجراثيم نحو بيئات مختلفة والمساهمة في فوعة الممرضات الجرثومية (Merino *et al*., 2006).

ثم تبدأ Swarming على الأسطح الصلبة بدايةً بدون أنثيال (*Proteus* تنمو بكتريا الـ ملم تقريباً ، (8)) ساعات من التلقيح عندما يصل قطر المستعمرة الى 3-8 الحركة الزاحفة بعد (إذ تبدأ الحركة لمدة معينة ثم تتوقف لمدة ثم تبدأ (Discontinous) ويكون هذا النمو غير مستمر (Swarming Cycle) حركة ثانية من جديد وبذلك تكون الحركة بشكل أمواج تمثل دورة الأنثيال وتعني قلب الرمية أو نقطة الهدف الرئيسة bull's eye وينتج عن هذه الدورة مستعمرات بشكل(Liaw *et al.*, 2000). (

تركيز الآكار بالوسط الزرعي وزمن (Inoculum) تعتمد سرعة هذه الظاهرة على كمية اللقاح , الطور اللوغاريتمي للمزروع البكتيري ، ويمكن تثبيط هذه الحركة بأستعمال مواد كيمياوية مثل Boric acid P – nitro phenylglycerol, Sodium azide والمضادات الحيوية , (Liaw *et al.*, 2000).

إن فائدة الأسواط هي الحركة وتجنب دفاعات المضيف، ثم الإرتباط بخلايا المضيف ، فضلاً) إذ يُسهم في تكوين الغشاء Colonizationعن كون ظاهرة الإنثيال توسع من مساحة الاستعمار (الحيويBioflm) على السطوح المختلفة مثل(Microtiter plates ((Gavin *(etal.*, 2003.

5-3-2 أنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production

يعد هذا الأنزيم محللا لكريات الدم الحمراء والذي ينتج من بعض أنواع الجراثيم، وهو من العوامل المساهمة في الأخماج الجرثومية ، وله تركيب جزيئي مختلف بحسب نوع الجراثيم ويوجد هذا الأنزيم (β–) وهو أنزيم مرتبط بالخلية، يكون التحلل فيه كلياً وفعاليته لا hemolysinعلى نوعين هما (α–) الذي يفرز خارج hemolysinيمكن فصلها عن الفعاليات الأيضية للخلية، والنوع الثاني هو ( ). Jawets *et al*.,2004الخلية خلال الطور اللوغارتمي ويكون التحلل فيه جزئياً (

في المجاري البولية عادة تفرز الهيمولايسين بوصفه عاملاً *E.coli* السلالات المرضية من ساماً خلوياً بسبب تكوينه ثقوبا في اغشية خلايا المضيف وهو احدى استراتيجيات البكتريا للحصول على الحديد ومكونات اخرى ضرورية للنمو البكتيري والناتجة عن تحلل خلايا المضيف كما ان فعالية الهيمولايسين نفسه ليست محددة فقط لكريات الدم الحمر لكون الفا– هيمولايسين المنتج من) بينما بيتا– هيمولايسين يثبط البلعمة Lymphocytes يحلل ايضا الخلايا اللمفاوية (*E.coli*) لخلايا كريات الدم البيضاء المتعادلة Chemotaxis) والانجذاب الكيمياوي (Phagocytosis( )Neutrophils) (Raksha *et al*.,2003.(

6-3-2 أنتاج اليوريز Urease production

تطرح اليوريا في إدرار جميع اللبائن كناتج لأزالة السمية إذ يطرح بمعدل ٠.٤–٠.٥ مولار من اليوريا مع أدرار الأنسان ، وهذا يعادل ١٠ كغم من اليوريا سنوياً (العبيدي ,٢٠٠٦) .

لأنزيم اليوريز دور كبير من الناحية الطبية لتسببه في حصى الكلية والتهاب حويض الكلية وله علاقة بتسمم الدم بسبب أرتفاع نسبة اليوريا بالدم كذلك يلعب دوراً في منع تنشيط

وبسبب قاعدية الأدرار يؤدي الى تحلل كريات الدم البيضاء المتواجدة في C4المتمم الرابع المنطقة (Li *et al.*, 2004.)

وينتج أنزيم اليوريز من قبل العديد من الأجناس البكتيرية المسببة لخمج المجاري البولية مثل *Proteus, Klebsiella , Pseudomonas* (Ahmed *et al.*,2003).

4-2 المضادات الحيوية Antibiotics

تعرف المضادات الحيوية بإنها من النواتج الايضية الثانوية الخاصة أو المحورة والتي تمتلك فعالية ضد مجاميع مختلفة من الاحياء المجهرية ، كذلك تعرف بأنها مواد كيمياوية عضوية تنتج من قبل الاحياء المجهرية المختلفة ، كما لها القدرة على تثبيط نمو الاحياء المجهرية الاخرى دون التأثير على خلايا المضيف ، وهي تشمل المنتجات المستحصلة بوساطة التحوير الكيمياوي للمضادات الطبيعية وغيرها من منتجات الايض المايكروبي أو بوساطة التحوير المايكروبي للمواد المصنعة (Prescott *et al.*, 2005) ، كما إنها أصبحت اليوم تنتج تركيبياً على نطاق واسع لاستخدامها في علاج مختلف الاخماج (المرجاني,٢٠١١) . ومن أهم مجاميع المضادات الحيوية :

1-4-2 مضادات البيتالاكتام β -Lactam antibiotic

ان المضادات الحيوية في هذه المجموعة تختلف في طيف فاعليتها وتأثيرها على العصيات السالبة لصبغة كرام، فضلا عن سميتها القليلة وثباتها في جسم الانسان وسرعة امتصاصها من الدم وامكانية تناولها عن طريق الفم، قابليتها على عبور حاجز الدماغ – الدم، وكذلك حساسيتها لانزيمات البيتالاكتاميز البكتيرية، هذه المضادات ذات فعالية قاتلة للبكتريا (Bacteriocidal) ويتطلب عملها ان تكون الخلايا نامية بشكل فعال لكي تظهر سميتها (Todar,2002.)

تعد مضادات البيتالاكتام من المضادات الأكثر أهميةً وأستخداماً منذ أكتشافها في عقد الأربعينيات من العقد المنصرم , يمكن عدها من المضادات الأمينة وذلك لفعاليتها العالية وطيفها الواسع وقلة تأثيراتها الجانبية بأستثناء المرضى الذين يعانون من الحساسية لهذه المضادات وتضم مضادات البيتالاكتام المجاميع الاتية :(Laurence et al.,1997).

1 البنسلينات ((Penicillins) 2 السيفالوسبورينات ((Celphalosporins)

3 الكاربانيم ((Carbapenem) 4 المونوباكتام ((Mono bactam).

أولا: البنسلينات Pencillins

هي مجموعة من المضادات الحيوية الطبيعية والمضادات شبه المصنعة ويتكون البنسلين (6-amino penicillanic acid من نواة البنسلين (Thiazolidin ring حلقة ثايوزوليدين (Beta lactam ring) مندمجة مع حلقة البيتالاكتام). تتصل النواة بسلسلة جانبية (R-) يضاف لها جذور مختلفة للحصول على مشتقات البنسلينات ويفقد مضاد البيتالاكتام فعاليته (Laurence et al.,1997) وتختلف في فعاليتها المضادة للبكتريا ضد الجرثومية عند تحطم حلقة البيتلاكتام بفعل انزيمات البيتالاكتاميز البكتيرية وينتج عن ذلك حامض البنسلونيك (Penicillonic acid) غير الفعال ميكروبياً (Katzung,2001.)

ثانيا: السيفالوسبورينات Cephalosporins

تتألف مضادات السيفالوسبورينات من حلقة بيتالاكتام متصله مع حلقة Dihydrothiazinc ring مكونة من نواة تدعى cephalosporanic acid). Kucers et al.,1997 تبعاً لنوع المشتق) (R2 و R1 وجود سلسلتين جانبيتين متغيرتين تمتلك هذه المضادات فعالية واسعة الطيف اكثر من مجموعة البنسلينات ضد البكتيريا المقاومة للبنسلينات وخاصة البكتيريا العصوية السالبة لصبغة كرام لذا تستخدم في علاج حالات الاصابات المتكرره بالبكتيريا وتستعمل كبدائل مع البنسلينات للمرضى الذين يعانون حساسية من البنسلين (المرجاني,٢٠١١).

ثالثا: مجموعة الكربانيم Carbapenems

Meropenem وOlvanic acid و Imipenem تضم مجموعة من المضادات منها تمتاز هذه Orally الذي يؤخذ بشكل Faropenemفضلاً عن المجموعة الحديثة التي تشمل المضادات بتأثيرها القاتل للبكتيريا (Bacteriocidal) (Dalhoff et al.,2003).

Monobactamرابعا: مجموعة المونوباكتام

اول افراد هذه المجموعة و يمتلك فعالية ضد البكتيريا السالبة Aztreonam يعد مضاد لصبغة كـرام ويمتاز بفعاليته القوية ضد افراد العائلة المعوية المنتجة لانزيم البيتالاكتاميز وضد بكتريا *Neisseria gonorrhoea, Haemophilus influenzae, Ps.aeruginosa* (المرجاني,٢٠١١)،في حين انه ليست له القدرة على الارتباط مع البروتينات المرتبطة بالبنسلين العائدة للبكتريا الموجبة لصبغة كرام والبكتريا (Penicillin Binding Proteins) PBPs ( ) اللاهوائية، لذلك يكون تأثيره ضعيفاً عليها (المرجاني,٢٠١١)، وهـو مفيد للمرضى الذين يعانون الحساسية مـن البنسلينات والسيفالوسبورينات .ويستخدم هـذا المضاد لعلاج التسمم الدموي واصابات المجاري البولية(Fuller and Sajatovic,2001).

مقاومة البكتيريا لمضادات البيتالاكتام 2-4-2

Bacterial Resistance to Beta-lactam Antibiotics

ان الاستعمال العشوائـي المتزايد لمضادات البيتالاكـتام فـي عـلاج الالتهـابات المختلفة أدى الى ازدياد المقاومة المتعددة لمضادات الحيوية المسببة لهـذه الالتهابات (Raka *et al.*,2004-).وهناك اليات عدة للمقاومة البكتيرية لمضادات البيتالاكتام وهي:

١.انتاج انزيمات البيتالاكتاميز المحللة للمضاد.

٢.تغيير موقع الهدف (target site) لعمل المضاد.

) في الغلاف الخلوي البكتيري المعروف بحاجز Outer membrane٣.تغيير الغشاء الخارجي (النفاذيةPermeability barrier ((Rawat *et al*., 2010)) ..وفي الوقت الذي تسود المقاومتان الاولى والثانية في البكتيريا الموجبة لصبغة كرام فإن بمقدور البكتيريا السالبة لصبغة كرام استخدام الاليات الثلاث لتثبيط المضاد (Postier,2000) وذلك بسبب الاختلاف في تركيب الجدار الخلوي لكل من البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام.

5-2 أنزيمات البيتالاكتاميز β -Lactamase Enzyme

تستطيع العديد من الانواع البكتيرية انتاج انزيمات تعمل على تحطيم مضادات البنسلينات (β) وتدعى هذه الأنزيمات أنزيمات البيتالاكتاميز Carbapenemsوالسيفالوسبورينات والكاربابنيم (Abraham & (المرجاني ، ٢٠١١) ، ويعود إكتشاف هذه الأنزيمات الى الباحثين Lactamase– قد حطم البنسلين ولهذا أطلق *E.coli* عند ملاحظتهما أن مستخلص سلالة (1940) عام Chain)2011. (الكعبي ، Penicillinaseعلى هذا الأنزيم أسم البنسيلينيز

تنتج هذه الأنزيمات من البكتريا فقط ولها صفة دفاعية متخصصة ضد مضادات البيتالاكتام في الجدار الخلوي , تحطم هذه (Peptidoglycan)التي تمنع تكوين طبقة الببتيدوكلايكلان في حلقة البيتالاكتام الموجودة في نواتي البنسلينات amide bond الأنزيمات أصرة الأمايد والسيفالوسبورينات جاعلة منها جزيئات غير فعالة بايولوجياً, وربما تكون أنزيمات البيتالاكتاميز)Koch,2000.مشتقة من أحد الأنزيمات الداخلة في تصنيع طبقة الببتيدوكلايكان (وبذلك توفر (Perplasmic space)يتركز تواجد هذه الأنزيمات في الفسحة البربلازمية إذا ما تعرضت للمهاجمة من قبل مضادات (PBPs)الحماية للبروتينات المرتبطة بالبنسلين) .هذه الأنزيمات تتحرر إلى خارج الخلايا البكتيرية بطريقة Kfoury and Araj,2003البيتالاكتام ( ) أكثر من الأفراز .leakageالنضح (

تنتج معظم أنواع الجراثيم السالبة لصبغة كرام أنزيمات البيتالاكتاميز، وتأتي أفراد العائلة المعوية في مقدمة هذه الأنواع ، ويعد إنتاج هذه الأنزيمات من جرثومة *P. mirabilis* مشكلة كبيرة في علاج الأخماج المتسببة عن تلك الجراثيم (De Champs *et al*., 2000).

2-5-1 تصنيف أنزيمات β -lactamase

الاختلاف في خصائص أنزيمات β -lactamase المكتشفة منذ زمن بعيد جعلها تخضع لجداول تصنيفية عدة منذ عام 1960 (kfoury and Araj, 2003) وضعا نوعان من أنواع التصنيف هي السائدة في تصنيف هذه الأنزيمات , التصنيف الجزيئي من قبل Ambler و التصنيف الوظيفي من قبل Bush وجماعته (Bryskier *et al*., 2005) .

يستخدم في تصنيف أنزيمات β -lactamase عادة الصفات الجزيئية والتي تشمل تسلسل النيوكليوتيدات أو الاحماض الامينية أو الصفات الوظيفية التي تشمل المادة الأساس والمواد المثبطة (Bush, 2003).

2-5-2 آلية عمل انزيمات البيتالاكتاميز

تبقى آلية العمل واحدة على الرغم من ازدياد انواعها المنتجة من البكتيريا . إذ تعمل انزيمات البيتالاكتاميز على تثبيط عمل مضادات البيتالاكتام من خلال كسرها لآصرة الامايد (Amid bond) الموجودة في حلقة البيتالاكتام (β–lactam ring) الموجودة في نواتي البنسلينات والسيفالوسبورينات الحساسة قبل وصول هذه المضادات الى موقع الهدف في جدار الخلية البكتيري (Rawat *et al*., 2010) . مؤدية الى تحطيم جزيئة المضاد ، يتحول بعدها الى مركب فاقد الفاعلية , يطلق على المركب الناتج من تحطيم البنسلينات اسم حامض البنسلويك (Penicilloic acid) ويحتوي على مجموعتين حامضيتين في حين هناك مجموعة واحدة في بينما ينتج مركب وسط غير مستقر يدعى المركب الاصلي ويكون المركب الجديد مستقراً , (Cephalosporoic acid) من تكسير السيفالوسبورينات وسرعان حامض السيفالوسبوريك المرجاني,٢٠١١). (ما يتفكك الى جزئين غير فعالين

العوامل الوراثية المسيطرة على أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز:2-5-3

يخضع أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز لسيطرة عوامل وراثية مختلفة ويمكن تقسيمها إلى:

3-5-2-1 أنزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية Chromosomal β -Lactamase

تنتج معظم أفراد البكتريا السالبة لصبغة كرام وفي مقدمتها أفراد العائلة المعوية والزوائف الزنجارية أنزيمات البيتالاكتاميزالكروموسومية ، وتحمي هذه الأنزيمات الخلية البكتيرية ضد العديد من مضادات البيتالاكتام وتكون الجينات المسؤولة عن تشفيرها محمولة على كروموسوم الخلية (السعدي,٢٠١١) وتقسم الأنزيمات الكروموسومية على قسمين :

- **الأنزيمات الكروموسومية منتظمة التكوين enzymes Chromosomal Constitutive**

تنتج هذه الأنزيمات بشكل طبيعي ومنتظم من دون الحاجة الى وجود عوامل محفزة، ويكون الى أن معظم Matsumoto (1999) and Inoueأنتاجها بمستويات واطئة .أشار الباحثان تنتج هذا النوع من الأنزيمات ولا سيما الفاقدة *Proteus vulgaris* البكتريا المعوية ومنها *(amp* R gene).

- **أنزيمات كروموسومية محفزة Chromosomal Inducible enzyme**

High وتسمى أنزيمات عالية التحفيز (inducer)ينتج هذا النوع من الأنزيمات بوجود محفز لتحولها من قليلة إلى عالية الأنتاج الأنزيمي ,يخضع أنتاج هذا النوع من inducible enzyme Repressor gene ينظم عملها جين كابح Structural genesالأنزيمات لجينات تركيبية وأن حدوث طفرة وراثية في الجينات التنظيمية أو في الجين Regulatory genesوجينات تنظيمية الكابح المنظم لعمل الجينات التنظيمية يؤدي الى زيادة أنتاج هذا النوع من الأنزيمات (الزنكنة ٢٠١٣,(.

3-5-2-2 أنزيمات البيتالاكتاميز البلازميدية

Plasmid-mediated β- Lactamase

وتكون صغيرة نسبياً مقارنةً مع DNAالبلازميدات عبارة عن جزيئات حلقية مغلقة من وهي تتضاعف ذاتياً Extra chromosomalكروموسوم الخلية وتدعى بالدنا خارج كروموسوم داخل الخلية وتحتوي الجينات الضرورية لصيانة وظائف البلازميد كبدء التضاعف والسيطرة عليه، بعضها جينات مسؤولة عن أنتقال البلازميدات نفسها عن طريق الأقتران البكتيري في حين يحمل (الطائي,٢٠٠٥).

تعد المقاومة المشفرة بالبلازميد أكثر أهمية من الناحية الطبية من المقاومة المسيطر عليها كروموسومياً وذلك لسهولة انتقالها بين الأنواع والأجناس المختلفة سواء كانت مرضية أم غير مرضية (الطائي,٢٠٠٦).

هنالك أنواع عدة من البلازميدات أهمها من الناحية السريرية البلازميدات الحاملة لجينات مقاومة المضادات الحيوية وجينات الضراوة ، ويمكن تقسيمها الى مجموعتين:

) وتمتاز بقابليتها على الأنتقال الذاتي لأحتوائها Conjugative plasmidsالبلازميدات الإقترانية (Tra gensعلى نوعين من الجينات تساعد الأولى في عملية الأتصال، والنوع الثاني يسمى ويساعد البلازميدات على الأنتقال من الخلية الواهبة (الذكرية) الى الخلية المستلمة (الأنثوية) عبر ، وهي غير قابلة Nonconjugative plasmidsالجسور الرابطة، والبلازميدات غير الأقترانية للأنتقال ولكنها يمكن أن تكون محركة بوساطة بلازميدات إقترانية أخرى عندما تكون منطقة التعبئة) . Tortora *et al.*,2007) فعالة (Mobilizing regionالها (

البيتالاكتميز التي تتوسطها جينات قافزة 3 -2-5-3

Transposons mediated β -Lactamase

التي تستطيع القفز من موقع الى آخر في جينوم DNAالعناصر القافزة هي تسلسلات من وأطلق عليها 1987، وأكتشف في البكتريا عام (Transposition)الخلية بعملية تسمى القفز)Prescott *et al.*,2005.(التسلسلات المنغرزة (Insertion sequences)

ينتقل الترانسبوزون من بلازميد الى آخر ومن بلازميد الى كروموسوم وبالعكس تحدث طفرة بعد وهي تزود البكتريا Target sequence إنغرازها في موقع وتسلسلات تسمى التسلسلات الهدف

بإمكانية التكيف في بيئات معينة مثل المستشفيات وتصبح البكتريا مقاومة نتيجة أنتقال جين المقاومة إليها بعملية القفز (Prescott *et al.*,2005.)

تصنف الترانسبوزونات الى :

- الترانسبوزونات البسيطة مثل Tn3 فإنه يشفر لمقاومة مضادات البيتالاكتام من خلال تشفير للأنزيمي TEM-1، TEM-2 .
- الترانسبوزونات المركبة وهي التي تحتوي على عناصر الأقحام Insertion Sequences IS عند نهايتين الترانسبوزونات المركبة مثل Tn5 إذ تحمل قطعة الدنا (DNA) بين تسلسل IS جيناً يشفر لمقاومة الكانامايسين(المرجاني,٢٠١١).

3-5-2- 4 أنزيمات البيتالاكتاميز التي تتواسطها الأنتجرونات Integrons-mediated β -Lactamase

الأنتجرون عنصر وراثي متخصص يسمح للجينات بالحركة بوساطة عمليات إعادة إرتباط (Cassette)متخصصة الموقع ، ويتألف الأنتجرون من جين يشفر لأنزيم الأنتيجريز مع كاسيتات جين مجاور التي تحتوي بصورة شائعة على جينات مقاومة المضادات الحيوية (Jacoby and Munoz-price,2005.)

6-2 أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

Extended Spectrumβ-Lactamases (ESBLS) :

أنزيمات ESβLs هي أنزيمات β-Lactamases التي تقاوم مضادات البنسلينات وسيفالوسبورينات الجيل الأول والثاني والثالث منها، والازترونام، عن طريق تحليلها لهذه المضادات, ولكنها تثبط بوساطة مثبطات β-Lactamases inhibitor مثل (clavulanic acid Oliveira *et al* , 2010 (.

ثم SHV-2تمثل حقبة الثمانينات بداية ظهور الأنزيمات واسعة الطيف عندما أكتشف الى ما TEM ثم توالت الأكتشافات فوصل عدد الأنزيمات التابعة لعائلة TEM-3أعقبه إكتشاف (Bradford , فضلا" عن أنواع أخرى SHVيزيد على ٩٠ نوعا" وهناك ٢٥ نوعا" ضمن عائلة 2001).

على السيرين في الجزء الفعال وهي ESBL تحتوي انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وان هذه Amblir's molecular class A الجزيئي Ambler حسب تصنيف Aتعود الى صنف وهي تثبط بوساطة Oximino – Cephalosporineالانزيمات لها القدرة على تحليل مادة Yan *et al* .,2006). (حامض الكلافيولنك و التازوباكتام

وبالرغم من أمتلاك هذه البكتريا لأنزيمات كروموسومية محفزة فإن أنتشار المقاومة بينها بشكل واسع يعود إلى أنتاجها لأنزيمات مشفرة بلازميدياً قادرة على تحطيم مجاميع مضادات البيتالاكتام الحديثة ومنها :

1 مجموعة −Imino methoxy cephalosporins التي تضم مضادات Cefotaxime ، Cefatazidime ،Ceftriaxone.

2 مجموعة −Oxyimino monobactam مثل مضاد Aztrenom.

3 مجموعة −α-methoxy cephosporin وتضم مضاد Cefotetan ،Cefoxitin.

4 مجموعة −Carbapenems ومنها مضاد Imipenem.

حيث إن البلازميدات المسؤولة عن إنتاج هذا النوع من الأنزيمات تشفر لمقاومة المضادات الحيوية، لذلك فإن العزلات المنتجة لهذه الأنزيمات تكون مقاومة لمجاميع متعددة من المضادات الحيوية)Elkholy *et al.*,2011 . (

أدى الإستخدام الواسع لمضادات سيفالوسبورينات الجيل الثالث في المجال الطبي العملي منذ سنة ١٩٨٠ الى إحداث تغييرات في أنزيمات البيتالاكتاميز ، وظهور أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) ، والتي تعد من الأسباب المهمة التي ساعدت البكتريا على مقاومة مضادات البيتالاكتام الحديثة (المرجاني ، ٢٠١١).

أن خليط البيراسلين/التازوباكتام فعال ضد عزلات (2003) وجماعته Babiniولاحظ Extended spectrum β المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف *Klebsiella* خليط التازوباكتم–بيراسلين في علاج (2004) وجماعته Bantar ، وأستخدم lactamase التهابات المجاري البولية التي تسببها بكتريا *Proteus mirabilis*.

بوساطة جين على البلازميد مما يسهل انتقالها بين الأنواع البكتيرية ESβLsتشفر أنزيمات من الانتشار الواسع لكل ESβLsو اشتقت أساسا أنزيمات (Varaiya *et al*, 2008) المختلفة من(Lee *et al* ., 2010) TEM and SHV β - lactamases family.

63 وأكثر من TEM β -Lactamases مشتق من 110وجد اليوم هناك أكثر من SHV β -Lactamses (Iroha *et al*., 2008)مشتقاً من ESβLs : . ومن عوائل أنزيمات

1-6-2 عائلة الـ TEM TEM family

لأول TEM-1 وقد سجل TEM-2، و TEM-1 من TEM- ESβLsتشتق أنزيمات المعزولة من احد المرضى في أثينا *Escherichia coil* من بكتريا 1965مرة عام (Lahlaoui *et al*., 2011). ،ومن هنا جاءت التسمية Temoneiraاليونان يسمى

القدرة على تحليل البنسلينات بشكل أكبر من مضادات TEM-1 يمتلك الانزيم Extended – Spectrum وفعالية قليلة جداً ضد Cephlothin, Oxacillin, Carbenicillin Clavulanic acid (Tavajjohi *et al*., 2011.(ويثبط بوساطة Cephalosporins

broad- إنتشر عالمياً بسبب المقاومة لـTEM1/2 إن البلازميد الذي يشفر spectrum penicillin's في البكتريا السالبة لصبغة غرام (Schmitt *et al* 2007) .

(جاسم,٢٠١٢).TEM-2 وTEM-1 الفعالية التحليلة نفسها لـTEM-13يمتلك لانزيم

كما أن الطفرات في TEM- Type- β -Lactamases نوع تابع لـ 100 اكتشف اكثر من TEM- β Lactamases استطاعت المحافظة على قدرتها التحليلية لسيفالوسبورينات الجيل عزلت من *K.pneumoniae* من عزلة لبكتريا *bla* $_{Tem-24}$ شَخَّصَ الجين 1988الثالث، وفي عام)Novais *et al*., 2010.مريض في احدى مستشفيات فرنسا (

2-6-2 عائلة الـSHV SHV- family

يعد الأنـزيم SHV- Type- ESβLs الأكثر تكرراً في العـزلات السريرية مقارنة بأنواع sulfhydryl variable و يشـير الى SHV الأخرى ESβLs (AL- Jasser, ;2006) .

يمتلك كفاءة *K. ozaenae* من النوع β-Lactamases عزل انزيم 1983في المانيا عام الـذي SHV-2 هذا الأنزيم يمـثل Ceftazidime اقل كفاءة اتجاه وCefotaximeفي تحليل في الموقع (جاسم,٢٠١٢).serine بال glycine باستبدال SHV-1 يختلف عن الأنزيم

الانواع البكترية التي تعود الى العائلة في عدد واسع من SHV type ESβLsشخـص و *P. aeruginosa* كان عن طريق بكتريا SHVالمعوية، وأن انتشار الانزيم *Acienetobacter spp* .(Huang *et al*., 2004)

ويـعـد مـــن أكـثر الأنـــواع سيـادة فـي *E. coil* مـن بكـتريا SHV-5 enzymesعـزل بكـتريا *K. pneumoniae* فضلا عـن SHV-12فهما أكـــثر العـــوائل انتشاراً (Hoşoĝlu *et al*., 2007) .

2-7 انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية

(MβLs) Metallo- Beta Lactamases

التي تتميز بقدرتها على تحليل Carbapenemase بانها إحدى انزيمات MβLSتتميز) و تظهر 2010 ,.Deshpande *et al*) EDTA مضادات الكاربابنيمات وتثبط بوساطة β- Lactam في قدرتها على تحليل كل مضادات MβLs الاهمية السريرية لأنزيمات (Walsh *et al*., 2005).

عادًة Metallo β- lactamases الى ان انزيمات (2001) وجماعته Yanاشار الباحث plasmid والمحمولة على integrons mobile gene cassettes ماتكون محمولة على chromosome. او

الى ان هذه الجينات قد تكون محمولة على (2010) وجماعته Cendejas كما اشار الباحث integron. ولكن غالباً ما تكون محمولة على chromosome او plasmidالـ

الـذي صـنفها ضـمن Ambler مـن قبـل العـالم 1980 عـام (MβLs)صـنفت انزيمـات والـذي وضـعها Bush صـنفت مـن قبـل العـالم 1999 وفـي عـام serin β- Lactamases بحسـب الصـفات الوظيفيـة (وبشـكل دقيـق تحليلهـا (group3)ضـمن مجموعـة منفصـلة وعـدم تثبيطـها بوسـاطةEDTA بحسـب حساسـيتها للـ(Bush, 1999)) Imipenemللـ ثـم طـّوّر 1995, هـذا التصـنيف كـان الاحـدث حتـى عـام serine β- Lactam Inhibitor (Bush *et al*., 1995) لتـزود بعـدد مـن الانزيمـات الـى المجموعـة الثالثـة 1997فـي عـام Group3.

الذي توضع فيه انزيمات Bush and Jacoby (2010) أما التصنيف الاحدث فهو تصنيف وبحسب التصنيف الجزيئي Group3 ضمن التصنيف الوظيفي في IMP-1) و(MβL VIM ضمنsub class B .

Ps. aeruginosa من عزلة لبكتريا 1988 لأول مرة في اليـابان عام $bla_{\text{Imp-1}}$ عزلت جينات (Walsh., 2008).

ووجد جين المقاومة هذا على البلازميدات الاقترانية الانتقالية التي تنتقل وبسهولة بين سلالات *Pseudomonas* .(walsh *et al*., 2005)

مرتبطا مع *K. pneumoniae* في فرنسا في بكتريا $bla_{\text{vim-1}}$كما و شخـص الجين Extended- spectrum β- Lactamase (Corvec *et al*., 2006).

لأول مـــرة New Delhi Metallo- β- Lactamase تـــم تشخيـــص الجـــين مـــن مـــريض ســـويدي فـــي (2008)فـــي عـــام K. *Pneumoniae* فـــي بكتـــريا الهند.(Mulvey *et al*., 2011; Zarfel *et al* 2011)

8-2 استخدام تقنية تفاعل البوليمز المتسلسل PCR)(polymerase chain reaction في التشخيص الجيني

تعد تقنية علمية في البايولوجي الجزيئي تعمل على تضخيم نسخة واحدة أو عدد قليل من DNA نسـخ الـ (Saiki *et al*., 1985) . الى آلاف النسخ من خلال المرور بـعدد من الأوامر

اكتشف الجهازالخاص بتقنية (PCR) عام 1983 من قبل العالم kary mullis (Barletta *et al*., 2003) , وقد اصبحت تقنية PCR تستخدم الان في التطبيقات الطبية ومختبرات البحوث البايولوجية , كما واستخدم في تشخيص بعض الجينات مثل الجينات المشفرة لـESβLفي دول مختلفة مثل ايران (Ramazanzadeh ., 2010) وفي الصين (Liu *et al*., 2008) وفي تركيا (Hosoglu *et al*., 2007) وعن انزيمات Metallo *B*-Lactamase (Lincopan *et al*., 2005) في البرازيل ،وكندا (Mulvey *et al*., 2011) والهند (Deshpande *et al*., 2010) وغيرهم من الباحثين.

وتتضمن: PCR يتطلب اعادة ثلاث خطوات أساسية في كل دورة من PCR ان عمل

١- Denaturation وهي عملية مسخ الشريط الثنائي لقالب الـDNA .

٢- annealing وهي عملية ارتباط Two oligonucleotideمن البادئ في شريط من القالب .

٣- extension وهي عملية الاستطالة الانزيمية للبادئ لإنتاج النسخة والتي تعمل كقالب في الدورات الآتية (kolmoding and Birch., 2002).

ألمواد وطرائق العمل

المواد وطرائق العمل3.

المواد 1- 3

الاجهزة والمواد المستعملة 1-1-3

أستعملت الاجهزة المدرجة في القائمة أدناه:

الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ
Incubater حاضنة	Memmert (Germany)

Memmert	Oven فرن كهربائي
Memmert	Water bath حمام مائي
Herolab(Germany)	UV-Transilluminatorمصدر الأشعة فوق البنفسجية
Heraeus (Germany)	Microfuge جهاز نبذ مركزي صغير
Labcco (Germany)	Vortex دوارة
Gallenkamp (England)	Centrifugeجهاز نبذ مركزي
Gallenkamp	Millipore filterالمرشحات الدقيقة
Gallenkamp	Distillatorجهاز التقطير
Gallenkamp	Shaking water bath حمام مائي هزاز
Olympus (Japan)	Light microscopeمجهر ضوئي
Hirayama (Japan)	Autoclave الموصدة
Mettler (Switzerland)	Sensitive balanceميزان حساس
Qean (Egypt)	Refrigeraterثلاجة
Radiometer (Denemark)	pH-meterمقياس الأس الهيدروجيني
Sony (Japan)	Sony كاميرا رقمية نوع
Helena(USA)	Gel Electrophoresis Apparatus جهاز ترحيل كهربائي

المواد الكيميائية والبايولوجية:2-1-3

المادة	الشركة المصنعة والمنشأ
Glycerolكليسيرول	BDH (England)
KH_2PO_4 فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	BDH (England)
Na_2HPO_4 فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين	BDH (England)
$Na_2HPO_4.2H_2O$فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين المائية	BDH (England)
Starch النشأ	BDH (England)
Iodine اليود	BDH (England)
Potassium iodideيوديد البوتاسيوم	BDH (England)
H_2SO_4 حامض الكبريتيك	BDH (England)
NaClكلوريد الصوديوم	BDH (England)
Ethanol إيثانول	BDH (England)
Tris – baseترس قاعدي	BDH (England)
Ethidium bromide بروميد الأثيديوم	BDH (England)
Potassium phosphateفوسفات البوتاسيوم	BDH (England)

BDH (England)	Glucoseكلوكوز
Oxoid (England)	Hydrogen peroxide بيروكسيد الهيدروجين
Oxoid (England)	Peptoneببتون
Merck (Germany)	Ureaيوريا
Merck (Germany)	Boric acidحامض البوريك
Fluka (Switzerland)	EDTA
Sigma (U.S.A)	Agaroseأكاروز
Difco (U.S.A)	Tryptoneتربتون
BDH (England)	$MgSO_4$ كبريتات المغنيسوم
BDH (England)	Crystal violet stain صبغة البلور البنفسجي
Fluka (Switzerland)	NaOH هيدروكسيد الصوديوم
Fluka (Switzerland)	Glucose كلكوز
Fluka (Switzerland)	Sucrose سكروز
Sigma	dipyridyl 2-2 ٢-٢ دايبيريديل
معمل أدوية سامراء	Thymine ثايمين
BDH (England)	CaCl2 كلوريد الكالسيوم
BDH (England)	Congo red stain صبغة الكونكوريد
BDH (England)	رباعي المثيل بارافنيلين ثنائي الأمين هيدروكسيد tetramethyl-P-phenylene-diamine dihydrochloride

Formaldehyde فورمالديهايد	BDH (England)
Aceton أسيتون	BDH (England)
BaCl2 كلوريد ألباريوم	BDH (England)
Methyl red أحمرالمثيل	BDH (England)
Ethanol كحول أثيلي	BDH (England)
باراثنائي أمين بنزالديهايد Para-dimethyl amino benzaldehyde	BDH (England)
KOH هيدروكسيد البوتاسيوم	BDH (England)
α-naphthol الفا- نفثول	BDH (England)
Casaino acidsالأحماض الأمينية الكازينية	BDH (England)

الاوساط الزرعية ألمستخدمة:3-1-3

الوسط	الشركة المجهزة والمنشأ
MacConkey agar أكارماكونكي	Himedia (India)
Blood base agarأكارالدم الاساس	Himedia
Urea agar baseأكار اليوريا الاساس	Himedia
Simmon Citrate agarوسط سترات السايمون	Himedia

Nutrient agar أكار المغذي	Oxoid
Methyle Red/Vogas proskaur MR/VPوسط	Oxoid
Muller-Hinton agarأكارمولرهنتون	Oxoid
Nutrient broth وسط المرق المغذي	Oxoid
Brain-heart infusion broth وسط نقيع القلب والدماغ	Oxoid
Kligler's iron agarوسط كليغلر	Merseyside (U.K)
Eosin Methylene Blue وسط الايوسين مثيلين الازرق	Himedia
أكار-أكار Agar-Agar	Difco (USA)
Pepton waterماء الببتون	Oxoid

4-1-3: الصبغات المستخدمة

ت	اسم الصبغة	المنشأ
1	Crystal violet (البلور البنفسجي)	Himedia (India)
2	Iodine Gram's(ايودين)	Himedia
3	Safranin(سفرانين)	Himedia

المضادات الحيوية :5- 1- 3

اقراص المضادات الحيوية المستخدمة واقطار منطقة التثبيط القياسية 3-1-5-1:

)NCCLs,2007 (

المنشأ	حساسة S	متوسطة I	مقاومة R	تركيز القرص µg/ml	الرمز	المضاد الحيوي
Bioanalyse(Turkey)	16	14-15	13	10	IMP	Imipenem
Bioanalyse	22	16-21	15	30	ATM	Aztreonam
Bioanalyse	23	15-22	14	30	CTX	Cefotaxime
Oxoid	18	14-17	13	10	AMC	Augmentin
Bioanalyse	18	15-17	14	30	CAZ	Ceftazidime
Bioanalyse	18	15-17	14	100	PRL	Piperacillin

2-5-1-3مساحيق المضادات الحيويةAntibiotics Powders

المضاد	الشركة المجهزة والمنشأ
Cefotaxime سيفاتوكسيم	Barcelona_Spain
Ceftazidime سيفتازيديم	Barcelona_Spain
Penicillin Gبنسلين جي	Sandox (Astralia)

مواد متفرقة أخرى: 3-1-6

1 عدة تشخيص. api 20E kit مجهزة من قبل شركة Bio'Mereux (France)

2عدةأستخلاص الدنا. DNA purification Kit مجهزة من قبل شركة Promega (USA)

3) مجهز من مصرف الدم/ دائرة صحة ديالى.**AB. دم بشري صنف (**

2-3: طرائق العمل

1-2-3: تحضير المحاليل والكواشف

حضرت المحاليل والكواشف والصبغات المستخدمة في الدراسة وفقا للمصادر المتبعة ، عقمت تلك التي تحتاج الى تعقيم باستخدام جهاز الموصدة Autoclave عند درجة حرارة 121 م ولمدة 15 دقيقة وتحت ضغط ٢ انج/ باوند بينما عقمت بقية المواد الأخرى التي تتعرض للتلف عند درجات الحرارة المرتفعة مثل اليوريا والمضادات الحيوية بالترشيح بمرشحات دقيقة Millipore filtre بقطر 0.22 مايكروميتر. اما المواد الزجاجية فقد عقمت بالفرن عند درجة حرارة 180 مْ ولمدة ساعتين.

1-1-2-3 المحلول الملحي الفسلجي : Normal Saline

وذلك لاستعماله في Forbes *et al.*,2002) بحسب ما جاء في حضر المحلول الملحي الفسلجي) مل ماء مقطر ثم اكمل الحجم 90 غم من كلوريد الصوديوم في 0.85 اجراء التخافيف وذلك بإذابة م° لحين الاستعمال. 4 مل ، عقم بالموصدة ، وحفظ بدرجة حرارة 100 الى

2-1-2-3 محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland Standard:

كما يلي: (Baron and Finegold, 1994) حضر المحلول حسب ما جاء في

) مل من حامض الكبريتيك المركز الى كمية 1 (محلول آ) :حامض الكبريتيك ١٪ حضر باضافة (مل. (100) من الماء المقطر ثم اكمل الحجم بالماء المقطر الى

(100)غم من كلوريد الباريوم في (1.175)(محلول ب) : محلول كلوريد الباريوم. حضر بأذابة) مل من المحلول (ب) في 99.5 مل من المحلول (آ) مع ((0.5)مل من الماء المقطر. مزج انبوبة نظيفة وجافة وذات غطاء محكم لمنع التبخر وتحفظ بالظلام. تمزج محتويات الأنبوبة جيدا قبل كل استعمال.

3-1-2-3: محاليل المضادات الحيوية

ملغم/مل حسب ما ورد 10) بتركيز نهائي مقداره Stock solutions حضرت محاليل خزينة ( ) لكل من المضادين الاتيين:- 2002 , NCCLsفي (

Ceftazidime , Cefotaxime

مل ،عقمت هذه 100مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى 90 غم من المضاد في 1بإذابة مايكروميتر وحفظت في الثلاجة 0.22المحاليل بالترشيح بوساطة مرشحات دقيقة ذات ثقوب بقطر لحين الاستعمال .

4-1-2-3 : محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز

Rapid Iodometricحضرت محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز بطريقة اليود السريعة) والمحاليل هي :WHO,1978 وذلك بحسب ما ورد في (Method

1-4-1-2-3 محلول النشأStarch Solution

مل من الماء المقطر، نقلت 10 غم من مادة النشأ في 0.1 حضر آنياً عند الاستعمال باذابة دقائق وذلك للتأكد من ذوبان النشأ ، حفظ 10م° لمدة 100القنينة الى حمام مائي بدرجة حرارة م°.4 المحلول في درجة

2-4-1-2-3 محلول اليودIodine Solution

مل من الماء المقطر 90 غم من يوديد البوتاسيوم في 5.32 غم من اليود و2.03حضر بإذابة م°.4 مل وحفظ المحلول في قنينة معتمة ومعقمة بدرجة 100 بعدها اكمل الحجم الى

3-4-1-2-3 محلول البنسلين جي (Penicillin G Solution)

حضر بإذابة البنسلين جي في دارئ الفوسفات المتكون من محلولين هما:-

في كمية $KHPO_4$) غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين 0.907المحلول (أ):- اذيب ( ) مل100من الماء المقطر ، اكمل بعدها الحجم الى (.

، و Na_2HPO_4) غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين 0.946 المحلول (ب):-اذيب (في كمية من $Na_2HPO_4.2H_2O$) غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين (المائية) 1.19( )مل من 87.6) مل، بعد ذلك أُخذ (100الماء المقطر ، أكمل بعدها الحجم بالماء المقطر الى ( ) بعد 6.0) مل من محلول(ب) خلطا معاً وضبط الرقم الهيدروجيني الى (12.4محلول (أ) و( ) ،عقم بالترشيح ووزع Penicilin G) غم من بنسلين جي (0.5693تحضيرهذا الدارئ ذوب فيه (م°) لحين الاستعمال.20-في عبوات صغيرة وحفظ عند درجة حرارة (

5-1-2-3محلول EDTA:

pHمل من الماء المقطر مع ضبط الاس الهيدروجيني1000 EDTA غم في 186,1حضر بإذابة م° 45قبل التعقيم بالمؤصدة وبعدها برد الوسط الى NaOH باضافة 8 (Bhalerao *et al*,2010).

6-1-2-3: محاليل عزل الدنا البلازميدي

وتضم (Promega (U.S.Aأستخدمت محاليل عزل الدنا البلازميدي المجهزة من قبل الشركة المحاليل الآتية :

١. Cell lysis buffer (CLB).

٢. Neutralization Solution (NSC).

٣. Endotoxin Removal Wash (ERB).

٤. Column Wash Solution (CWC).

٥. Elution Buffer (EBB).

Kit name : Pure Yield™ Plasmid Miniprep System .

7-1-2-3 محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions

وكما يأتي: (Maniatis *et al*., 1982حضرت محاليل الترحيل الكهربائي وحسب ماوردفي(

❖ دارئ الترس بوريت TBE

(مولار من 0.089) ، (Tris – base) مولار ترس قاعدي (0.089حضر بتركيز نهائي (اكمل الحجم الى ١ لتر ،EDTA) مولار من مادة 0.002) و (Boric acidحامض البوريك ( ) وعقم بالموصدة .8من الماء المقطر، ضبط الاس الهيدروجيني الى (

❖ صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide

(مل1) ملغم من صبغةبروميد الاثيديوم في (5) ملغم/مل، بإذابة (5 حضر محلول خزين تركيزه (%) 0.5من الماء المقطر المعقم، وخفف عند الاستعمال للحصول على تركيز نهائي مقداره (مايكروغرام/مليلتر .

❖ دارئ التحميل Loading Buffer

%) صبغة 25 .0ماء مقطر ، (%)20، (TBE%)50%) كليسيرول ، (30حضر من (بروموفينول الازرق.

8-1-2-3 المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR

1.8.1.2.3محلول PCR Master Mix - 1X

المجهزة له وكالاتي: Promegaتم تحضيره حسب تعليمات شركة

2x Green يتـكون مـن (داريء التفاعل PCR Master Mix، 2x أُخـذ حجم مـن محـلول وحدة / مل من انزيم البلمرة (50) الحاوي على 8.5 ذي الرقم الهيدروجيني Go taq reaction ملي مولار 400 فضلا عن القواعد النيتروجينية الاربعة بتركيز Go Taq DNA polymerase) واضافته الى حجم $MgCl_2$ملي مولار من)3 و(dTTP, dCTP, dGTP, dATPلكل من -) وبعدها مزج جيدا باستعمال المازج وحفظ في Nuclease free waterمماثل من محلول لحين الاستعمال.°م(20

2.8.1.2.3 محاليل البادئات primers solutions

K. penumoniae في بكتريا *bla- $_{imp-1}$,bla- $_{shv}$*اختبرت البادئات المستهدفة لجينات)، إذ تم تحضير محاليلها Senda *et al* ., 1996; Ramazanzadeh,2010 bوفقا لما ذكر في (باستعمال الماء(2-1) المجهزة لها وكما في الجدول Alpha DNA الخزينة حسب تعليمات شركة بيكومول/ مايكرو ليتر.100المقطر اللايوني للحصول على تـركيز

) التتابعات وتراكيز البؤادي وحجم الناتج المتوقع لكل بادئ.2- 3جدول (

ت	البادئ	تتابع الباديء $5^- \rightarrow 3^-$	عدد القواعد bp	الوزن الجزيئي µg/µmol	حجم الناتج bp.
1	SHV-F	GGGTTATTCTTATTTGTCGC	20	5675.8	800
	SHV-R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC	18	6131	
2	TEM-F	TCG GGG AAA TGT GCG CG	17	5292.4	950
	TEM-R	TGC TTA ATC AGT GAG GCACC	21	6118	

مايكرو 10 بيكومول/ مايكروليتر, وذلك بأخذ (10)حُضَر محلول كل بادي بشكل منفصل بتركيز مايكرو ليتر من الماء المقطر الايوني, 90ليتر من المحلول الخزين لكل بادي وبإضافته الى - ومزج جيداً وحفظ في الثلج لحين الاستعمال، في حين حفظت المحاليل الخزينة للبوادي في درجة مع مراعاة مزج المحلول بعد اخراجه من الثلج باستعمال المازج لمجانسته قبل الاستعمال.°م20

الدليل الحجمي لتحديد الوزن الجزيئي 3. 8.1.2.3

بتركيز (Promega\ USA) مجهز من شركة DNA ladder (1KB)استخدم الدليل الحجمي) زوج قاعدي . والذي 10000- 250 قطعة تراوحت (13 , مكون من مايكروغرام \ مل100 Blue /Orange مايكروليترمن1مايكروليتر من الدليل الحجمي مع 5 حضر انيا من خلال مزج) وحسب التعليمات المرفقة مع الشركة المجهزة.(6x Loading Dye

ألكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا:3-2-2

1-2-2-3 كاشف أنزيم الكاتاليز Catalase Reagent

) مل من الماء 9%) مع (30) مل من بيروكسيد الهيدروجين المركز (1 حضر من خلط (% بيروكسيد الهيدروجين، وحفظ في الثلاجة في عبوة داكنة ، استعمل 3المقطرللحصول على تركيز للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على انتاج انزيم الكاتاليز(Collee *et al.*, 1996).

2-2-2-3 كاشف ألاوكسيديز Oxidase reagent:

) غم من رباعي الميثيل بارافينيلين ثنائي الأمين ثنائي هيدوكلوريك 1حضر آنيا من أذابة (مل من الماء المقطر (90) في Tetramethyl-P-phenylene diamino dihydrochloride مل. أستخدم هذا الكاشف للكشف عن انتاج انزيم (100)المعقم ومن ثم اكمل الحجم الى الأوكسيديز من قبل البكتريا(Koneman *et al.*,1992) .

3-2-2-3 كاشف كوفاك Kovac`s reagent :

حضر الكاشف من إذابة (10 غم من باراثنائي ميثيل امين بنزالدهايد (P-dimethyl aminobenzal dehyde في (150) مل كحول ايزواميلي ثم اضيف (50) مل من حامض الهيدروكلوريك المركز ببطء حتى يكون الكاشف بلون اصفر شاحب، حفظ الكاشف في قنينة معتمة، وأستخدم للكشف عن تكوين الإندول (Koneman *et al.*,1992) .

4-2-2-3 كاشف أحمر المثيل Methyl red reagent :

حضرباذابة (0.1) غم من مسحوق احمر المثيل في (300) مل من الكحول الأثيلي (95%) ثم أضيف (200) مل من الماء المقطر.

5-2-2-3 كاشف فوكس بروسكور Voges-Proskauer reagent :

يتكون هذا الكاشف من جزئين:

الجزء الأول: من إذابة (5 غم مادة الفا نفثول (α-naphthol) في 100 مل من الكحول الأثيلي المطلق.

الجزء الثاني: من إذابة (40 غم هيدروكسيدالبوتاسيوم في ماء مقطر،اكمل الحجم الى(100 مل.)

3-2-3 الاوساط الزرعية Culture Media:

حضرت الاوساط الزرعية حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوات وضبط الاس الهيدروجني الى (7 ثم عقمت بالموصدة بدرجة حرارة 121) وضغط (15 باوند/ انج^{2}) لمدة 15م° ولمدة 24م° ساعة للتأكد من عدم تلوثها ، ومن ثم حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 دقيقة م° لحين الاستعمال، فيما حضرت الأوساط الاتية كما يأتي:- 4 بعدها حفظت في الثلاجة عند حرارة

1-3-2-3 وسط أكار الدم Blood base agar :

حضرت قاعدة الدم الاساس بحسب التعليمات المذكورة على العبوة وعقمت بالموصدة، بعدها % ، ومزج جيداً بعدها 5 بنسبة ABم° ثم اضيف صنف الدم 45-50 تركت لتبرد بدرجة حرارة م° لحين 4 ، حفظ بدرجة صب الوسط في اطباق معقمة ، وترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة الحال لكريات الدم الحمر .Hemolysin، أستخدم للعزل الاولي للبكتريا المنتجة لأنزيم الاستعمال

2-3-2-3 وسط أكار اليوريا Urea base Agar:

بحسب التعليمات الواردة Urea Base agar مل من وسط اكار اليوريا الاساس 950حضر مل من محلول 50م° اضيف اليه 45 من الشركة المصنعة وبعد تعقيمه بالموصدة وتبريده الى)، ثم صب Millipore Filter% يوريا معقمة بالترشيح باستخدام اغشية الترشيح الدقيقة (40 بصورة مائلة في أنابيب معقمة ذات اغطية محكمة، أستخدم الوسط لغرض الكشف عن قابلية)Li *et al* .,2004العزلات على إنتاج انزيم اليوريز (

3-3-2-3 وسط ماء الببتون Pepton water medium :

مل من الماء 100 غم من كلوريد الصوديوم في 0.5) غم من الببتون و 2حضر بإذابة (، أستخدم هذا الوسط في 7المقطر المعقم ، عقم بالموصدة بعد ضبط الاس الهيدروجيني الى .)Koneman *et al*.,1992التحري عن إنتاج الاندول (

4-3-2-3 وسط الحركةMotility medium

5غم من التربتون و10) وذلك بإذابة Harley and Prescott ,1996حضر وفق ماورد في (لتر من الماء المقطر ,ثم عقم بالموصدة بعد 1غم من اكار اكار في 5غم من كلوريد الصوديوم و)7.2ضبط الاس الهيدروجيني عند(

5-3-2-3 وسط الكونكوريد اكارmedium Congo-red agar

900غم من وسط اكار اكار في 10 غم سكروز و50غم من وسط المرق المغذي و 37اذيب غم منه في 0.8 مل من الماء المقطر , وعقم الوسط بالمؤصدة اما صبغة الكونكوريد فقد اذيب) °م(55مل من الماء المقطر وعقمت بالمؤصدة ,وبعدها اضيفت الى الوسط بعد تبريده الى 100 وصبت في اطباق معقمة, هذا الوسط يستخدم للكشف عن قابلية البكتريا في انتاج الطبقة المخاطية slime layer)Freeman *et al*,1989 .(

6-3-2-3 المدعم M_9 وسط إنتاج السايدروفور (M_9 minimal medium)

كما يأتي: (1989) Sambrook *et al.* حُضر الوسط الأساس وفق طريقة

غرام12.8	Na_2HPO_4	فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين
غرام3	KH_2PO_4	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين
غرام1	NH_4Cl	كلوريد الامونيوم
غرام0.5	NaCl	كلوريد الصوديوم
مليلتر960	Deionzied H_2O	ماء مقطر مزال الايونات

أضيفت المواد الآتية (بتركيز الخزين) المحضرة والمعقمة بالترشيح باستعمال مرشحات ذات ثقوب Nassif and Sansonetti (1986) مايكروميتر لكل دورق وفق ماأشار اليه 0.22بقطر .

غرام/مليلتر 0.5	Casamino acids	الأحماض الأمينية الكازينية
غرام/مليلتر 0.2	Glucose	كلوكوز
ملي غرام/مليلتر5	Thymine	ثايمين (مادة قياسية) (معمل أدوية سامراء)
مولر 2	$MgSO_4$	كبريتات المغنيسيوم
مولر 0.5	$CaCl_2$	كلوريد الكالسيوم

) ملیلتر من الوسط ثم100) غرام اكار لكل (2 المدعم وأضيف اليه (M_9حُضر وسط الحد الأدنى المعقمة بالترشيح خلال (2.2 dipyridyl)) ثنائي بايريديل2.2) ملي مولر من مادة (0.2 أضيف(((Nassif and Sansonetti (1986)) مايكروميتر0.22 مرشحات دقيقة ذات ثقوب بقطر (ويستخدم هذا الوسط للكشف عن قابلية العزلات على انتاج حاملات الحديد مما يؤكد دورها في امراضية هذه الجراثيم .

وسط حفظ العزلات (حفظ متوسط ألامد ٨ -١٢ شهر) :3-2-3-7

) مل 85) مل من الكليسرول إلى(15حُضر الوسط المستخدم لحفظ العزلات البكتيرية , بإضافة ( ) , ووزع في قناني صغيرة ذات Brain heard infusion brothمن مرق نقيع الدماغ والقلب (غطاء محكم وعقم بالموصدة, ترك ليبرد في درجة حرارة الغرفة , ثم لقح بمستعمرات نقية من البكتريا) , وحفظت القناني في درجة حرارة ((Loopالنامية على الوسط الاكار المغذي باستخدام الناقل م°) استخدمت هذه الطريقة في 37) ساعة في درجة حرارة (24) بعد حضانتها لمدة (°- م20 الحفظ الدائم(Ausubel *el al.*, 1987).

إدامة العزلات البكتيرية(حفظ قصير ألامد ٤ أشهر): 3-2-3-8

) بالعزلات Nutrient agar slant لقحت الانابيب الحاوية على وسط الآكار المغذي المائل (° م4 ساعة بعدها حفظت في درجة حرارة 24م لمدة 37البكتيرية ثم حضنت في درجة حرارة لحين الاستخدام وتمت عملية ادامة العزلات بشكل دوري شهرياً , وذلك بتنشيطها على الوسط المغذي السائل , ثم إعادة زراعتها على وسط مائل جديد لضمان بقاء العزلات بشكل نشط طيلة مدة الدراسة .

3-3 جمع العينات Collection of Samples:

عينة ادرار تحت الاشراف الطبي المختص من المرضى المصابين باخماج 300 جمعت التهاب المجاري البولية من اجناس واعمار مختلفة وتم جمع العينات من مستشفى البتول للولادة

/1 /1ولغاية /2013/9 1والاطفال ومستشفى بعقوبة التعليمي في مدينة بعقوبة ، للمدة بين 2014 إذ سجلت المعلومات المتعلقة بالمريض من المصدر والعمر والجنس وتاريخ أخذ العينة وأمراض اخرى في استمارة خاصة (ملحق ١)، زرعت النماذج مباشرة بعد أخذ العينة لغرض التشخيص.

4-3 زرع العينات Samples culture:

زرعت عينات الادرار بشكل فوري على وسط اكار الدم ووسط اكار الماكونكي ووسط الايوسين الماكونكي اكار بطريقة التخطيط وحضنت كافة مثيلين الازرق ، وتم تنقية العزلات على وسط ، أجري بعدها عدد من الفحوصات التشخيصية ساعة24م° لمدة 37 الاطباق هوائياً بدرجة المظهرية والكيموحيوية للبكتريا المعنية بالدراسة.

5-3 تشخيص العزلات البكتيرية:

1-5-3: التشخيص المظهري

) إذ شخصت المستعمرات Holt *et al.*,1994شخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على ما ورد في (مبدئياً اعتماداً على الصفات المظهرية وتضمنت شكل المستعمرات ولونها وقوامها ورائحتها وحجمها Eosin methylene blueعلى وسط أكار الماكونكي وأكار الدم ووسط الايوسين مثيلين الازرق ذات البريق المعدني. *E.coli* عن بكتريا *Klebsiella*الصلب لتفرقة بكتريا

2-5-3 : الصفات المجهرية

أخضعت العزلات الى الفحص المجهري بإستخدام صبغة كرام للتعرف على شكل البكتريا وترتيبها وتفاعلها مع ملون غرام.

3-5-3:الفحوصات الكيموحيوية

1 إختبار أنزيم الكاتاليز_Catalase test :

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم الكاتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين الى ماء ويتحرر غاز الاوكسجين بشكل فقاعات هوائية ، إذ نقل جزء من المزروع البكتيري الى شريحة زجاجية نظيفة وأضيف اليها بضع قطرات من 3% كاشف بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بإستخدام ماصة باستور، يعد ظهور فقاعات غاز الاوكسجين دليل على ايجابية الفحص (Koneman *et al.*,1992).

٢- إختبار أنزيم الاوكسيديز Oxidase test:

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم السيتوكروم اوكسيديز (Cytochrome oxidase) ، إذ شبعت ورقة ترشيح بقطرات من كاشف الاوكسيديز، وبوساطة أعواد خشبية معقمة نقلت مستعمرة من العزلة قيد الدراسة الى ورقة الترشيح ، تعد النتيجة موجبة (Koneman *et al.*,1992).الورقة (ثوانٍ من ملامسة الخلايا البكتيرية لكاشف الاوكسيديز على 10عند ظهور اللون البنفسجي خلال (

٣-إختبار الاندول Indole test :

استخدم للكشف عن وجود الاندول ، الذي يعد أحد نواتج أيض الحامض الاميني التربتوفان ، إذ لقح وسط ماء الببتون السائل Tryptophanase نتيجةً لامتلاك البكتريا لانزيم التربتوفانيز بمزروع العزلة قيد الدراسة ، حضن الوسط بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ، ثم أضيف 5 قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's reagent على السطح الداخلي لانبوبة الاختبار، تعد النتيجة موجبة عند ظهور حلقة حمراء خلال ثوانٍ من إضافة الكاشف (Koneman *et al.*,1992).

٤ _ إختبار احمر المثيل Methyl red test:

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج كميات كبيرة من احماض اللاكتيك بمزروع للعزلة قيد MR/VP نتيجة أيض الكلوكوز، إذ لقح مرق Formic أو الفورميك Lactic ، ثم أضيفت خمس قطرات من كاشف احمر ساعة48–72م° لمدة 37 الدراسة ، حضن بدرجة)Koneman *et al.*,1992.المثيل ، تعد النتيجة موجبة عند تغيير اللون الى احمر (

٥_ اختبار فوكس بروسكاور Voges –Proskaur test:

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج استيل مثيل كاربينو (اسيتوين) –72م° لمدة 37 بمزروع العزلة قيد الدراسة ، حضن بدرجة حرارة MR/VP إذ لقح مرق Acetoin) مل من محلول 0.6) مل من العالق الى أنبوبة إختبار نظيفة ، أضيف اليها (1نقل (. ساعة48 كاشف (40%) مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 0.2 متبوعاً (Vp1)الفانفثول (كاشف دقيقة 15) مع رج الانبوبة بلطف ، تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون الاحمر بعد حوالي Vp2)Koneman *et al.*,1992.(

٦_ إختبار استهلاك السترات Citrate Utilization test:

، ساعة24م° لمدة 37 ، حضن بدرجة زرعت العزلات على مائل وسط سايمون– ستريت عند تحول لون الوسط من الاخضر الى الازرق لاستهلاك السترات. تعد النتيجة موجبة

٧– إختبار التنمية على وسط حديد ثلاثي السكر Triple sugar iron agar (TSI) :

)، بالطعن والتخطيط على 3–2–3–7 (فقرة (TSI)لقحت الأنابيب الحاوية على وسط) ساعة. قرأت النتيجة 24) م° لمدة (37المائل بالعزلات المراد تشخيصها،حضنت بدرجة (بملاحظة تخمير سكريات الوسط من عدمه بوساطة تغير لون الكاشف الفينول الاحمر الى اللون الاصفر دليل على ان العزلات مخمرة للسكريات الثلاث فيما دلّ ظهور الفقاعات وتكسر الوسط دليل على ان العزلات منتجة لغاز CO_2 فضلاً عن تكون راسب اسود يدل على إنتاج غاز H_2S .

٨_اختبار الحركة Motility test:

)، بطريقة الطعن على 3-2-3-4 لقحت الأنابيب الحاوية على وسط اختبار الحركة (فقرة) سنتيمتر مع مراعاة عدم دخول الطعنة الى قعر الانبوب ، 3 ان تكون مسافة الطعنة مايقارب ( ) ساعة. النتيجة الموجبة تدل على ظهور تضبب حول 24)م° لمدة (37حضنت الانابيب بدرجة (الطعنة أي أن البكتريا لها القابلية على الحركة.

4-5-3 تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص api 20E Kit:

ذلك (Bio Merieux) الجاهزة وحسب تعليمات الشركة المصنعة api 20E Kitاستخدمت عدة) 20 والتي تتضمن ((Species)لزيادة التأكد من عملية تشخيص العزلات الى مستوى النوع اختباراً كيموحيوياً ولجميع العزلات .

) ولجميع العزلات كما biomerieuxأُتبعت الطريقة المبينة من الشركة المجهزة للعدة التشخيصية (يأتي:

- تحضير الشريط Preparation of the Strip:

) لجعل Tray) الموجودة في حاوية الشريط (Wellsتم وضع ٥ مليلترات من الماء في الحفر (الظروف رطبة ثم وضع الشريط داخل الحاوية.

- تحضير اللقاح البكتيري Preparation of bacterial inoculum:

في وسط أكار ماكونكي الى أنبوبة أختبارحاوية ٥ مليلتر من نُقلت مستعمرة مفردة نقية نامية وبعد المزج الجيد بأستعمال المازج قُورنت 2-2-1-1محلول الملح الفسلجي المحضر في الفقرة 2-1-2-2. المحضر في الفقرة 0.5عكورته بعكورة أنبوبة مكفرلاند

- تلقيح الشرائط Inoculation of the Strips:

بأستعمال ماصة باستور معقمة أُضيف العالق البكتيري على حافة الأنبوب الموجود على الشرائط) والجزء العلوي Tubeوملىء (مع تجنب حدوث فقاعات في أثناء الأضافة) الجزء السفلي ( ) أما GEL,VP,CIT) منه، بالنسبة لأختبارات السترات والفوكس بروسكور والجلاتين (Cupule( ) في الجزء العلوي Mineral Oilبقية الأنابيب فملىء الجزء السفلي (الأنبوب فقط) وأضيف الزيت (بالنسبة لأختبارات الأرجنين واللايسين والأورنثين وأنتاج كبريتيد الهيدروجين واليورياز) الخاصة بها وحضنت بدرجة ٣٧ Lid) أغلقت الحاوية بالغطاء (ADH,LDC,ODC,H2S,URE(مْ ولمدة ١٨-٢٤ ساعة .

- قراءة النتائج :

بعد أنتهاء مدة الحضن أُضيفت الكواشف المجهزة مع العدة التشخيصية وكما يأتي:

) وقرأت النتيجة مباشرة.IND) الى أنبوب الأندول (JAMESأ- قطرة من كاشف الأندول (

وقرأت TDAب- قطرة من كاشف من ١٠٪ كلوريد الحديديك الى أنبوب التربتوفان دي اميناز النتيجة مباشرة .

) (٦٪ VP2) من (٤٠٪ هيدروكسيد البوتاسيوم) ثم قطرة من كاشف (VP1(جـ - قطرة من كاشف)3-6.( ) وقرأت النتيجة خلال دقائق حسب الجدول (VPألفا - نفثول) الى أنبوب (

الجدول (3-6 الأختبارات الكيموحيوية بأستعمال نظام (API 20 E:

الأختبار	الرمز	النتيجة السالبة	النتيجة الموجبة
١-أنتاج أنزيم بيتا الكتوسايديز	ONPG	عديم اللون	أصفر
٢-تحلل الأرجنين	ADH	أصفر	أحمر/ برتقالي

٣-تحلل اللايسين	LDC	أصفر	أحمر/ برتقالي
٤-الأورنيثين	ODC	أصفر	أحمر/ برتقالي
٥-أستهلاك السترات	CIT	أصفر	أخضر/ أزرق
٦-أنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين	H2S	عديم اللون	راسب اسود
٧-أنتاج أنزيم اليوريز	URE	أصفر	أحمر/ برتقالي
٨-أنتاج أنزيم تربتوفانديامنيز	TDA	أصفر	بني غامق
٩-أنتاج الأندول	IND	حلقة صفراء	حلقة حمراء
١٠-أنتاج الأسيتون	VP	عديم اللون	وردي/ أحمر
١١-أنتاج أنزيم محلل الجلاتين	GEL	عدم أنتشار الصبغة	أنتشار صبغة سوداء
١٢-تخمر سكر الكلوكوز	GLU	أزرق	أصفر
١٣-تخمر المانيتول	MAN	أزرق	أصفر
١٤-تخمر الإينوسيتول	INO	أزرق	أصفر
١٥-تخمر السوربيتول	SOR	أزرق	أصفر
١٦-تخمر الراميزوز	RHA	أزرق	أصفر
١٧-تخمر السكروز	SAC	أزرق	أصفر
١٨-ميليبايوز	MEL	أزرق	أصفر
١٩-أمكدالين	AMY	أزرق	أصفر

٢٠-الأرابينوز	ARA	أزرق	أصفر

6-3: التحري عن بعض عوامل الضراوة في البكتريا

3-6-1 التحري عن إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production:

تم الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على إنتاج الهيمولايسين البكتيري بزرع هذه العزلات على وسط اكار الدم ، حضنت الاطباق بعد التلقيح في درجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة. ظهور النمو البكتيري دليل على قدرة البكتريا على إنتاج الهيمولايسين البكتيري (Atlas *et al.*,1995).

3-6-2 التحري عن إنتاج السايدروفور Sidrophore:

زرعت العزلات المراد تشخيصها على وسط الحد الأدنى المدعم (فقرة 3-2-3-6). حضنت الأطباق بدرجة (37م° ولمدة (48 ساعة. ظهور النمو البكتيري دليل على قدرة البكتريا على إنتاج السايدروفور (Nassif and Sanosonetti, 1986) .

3-6-3 اختبار إنتاج البكتريوسين Bacteriocin:

(طريقة الانتشار في الحفر)

للكشف عن إنتاجية البكتريوسين في راشح البكتريا قيد الدراسة ، اذ زرعت الاطباق الحاوية على وسط الاكار المغذي بنشر 0.1 مليلتر من لقاح مزارع عزلات بكتريا الاختبار بالناشر الزجاجي المعقم (كلا على حدة) بعد ان ثبت عدد الخلايا المزروعة بمقدار 10^8 خلية / مليلتر ،عملت حفر على سطح الوسط و طبقت هذه الطريقة بحسب ما جاء في Gupta *et al.* (1998)

مايكروليتر من راشح المزرعة السائلة لعزلات البكتريا قيد الدراسة , حضنت 100ملئت كل حفرة بـ ساعة. قيست مناطق التثبيط حول الحفر وقورنت مع 24 مدة ^{o} م 37بعدها الاطباق بدرجة معاملة السيطرة الحاوية على وسط الاكار المغذي غير الملقح بالبكتريا .

4-6-3 أختيار ظاهرة الأنثيال Swarming:

استخدم هذا الأختبار للكشف عن قابلية العزلات قيد الدراسة على أمتلاكها ظاهرة الأنثيال وأجري هذا وكما 2000) (وجماعتهLiawالفحص باستخدام طريقة الاوساط الزرعية الصلبة واتبعت طريقة يأتي :

) 10أ-لقح وسط اكار الدم الحاوي بطريقة البقع , اذ لقح مركز الطبق بـ (مايكروليتر من العالق البكتيري.

ساعة .18 ولمدة °م37ب-حضنت الاطباق بدرجة

ج-ظهور حركة التموج (الانثيال) تدل على ان النتيجة موجبة .

5-6-3 اختبار إنتاج أنزيم اليوريز Urease test :

)، بطريقتي الطعن والتخطيط على 3-2-3-2لقحت الانابيب الحاوية على وسط اكار اليوريا (فقرة) ساعة. دل تحول لون الوسط الى الوردي على إيجابية24)م° لمدة (37المائل ثم حضنت بدرجة (الاختبار.

6-6-3 إختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm:

Congo-red Method طريقة احمر الكونغو

مل من 5نقلت مستعمرة مفردة نقية على وسط اكار الماكونكي الى انبوبة اختبار حاوية على) وبعد المزج الجيد بوساطة المازج قورنت 3-2-1-1محلول الملح الفسلجي المحضر في الفقرة ( ) ولقح وسط الكونكوريد المحضر 3-2-1-2 المحضر في الفقرة (0.5عكورته بعكورة ماكفرلاند ساعة ،النتيجة 48 -24 م° ولمدة 37) وحضنت الاطباق في درجة حرارة 3-2-3-5في الفقرة (موجبة عندما تظهر المستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة ,اما النتيجة السالبة فتبقى المستعمرات وردية اللون(Mathur *etal,* 2006) .

Antibiotic suscepitibility test فحص الحساسية للمضادات الحيوية3-7

أستخدمت طريقة Bauer Kerby and القياسية لاختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية) وكالاتي : Vandepitte *et al.*,1991(

- لقح 5 مل من وسط المرق المغذي بـ 3-2مستعمرات من مزارع بكتيرية نقية بعمر 24 ساعة .
- رجت الانابيب جيداً، وحضنت بالحاضنة بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة .
- قورنت عكورة النمو بعكورة المحلول ثابت العكرة القياسي لاعطاء عدد تقريبي مساوٍ 1.5× 10^8خلية / مل.
- نقل 0.1 مل من العالق البكتيري ونشر على وسط اكار مولر هنتون، ترك الطبق لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لحين جفاف المزروع .
- نقلت اقراص المضادات الحيوية الى سطح الوسط الزرعي بوساطة ملقط معقم بمعدل 6-7 اقراص لكل طبق .
- حضنت الاطباق بدرجة 37 م° لمدة 18-24 ساعة قيست بعدها اقطار مناطق التثبيط حول كل قرص، عدت البكتيريا حساسة (S) او مقاومة (R)او متوسط (I)intermediate بحسب المواصفات القياسية الواردة في (2007) NCCLs.

β-Lactamase Production: التحري عن إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز 3-8

تحضير العالق البكتيري 3-8-1

) مايكروليتر 150) مل من محلول الملح الفسلجي بـ (5لقحت أنابيب إختبار تحوي كل منها على ( ) ساعة للعزلات قيد الدراسة ، مزجت 18من مزارع بكتيرية منماة في وسط نقيع الدماغ والقلب بعمر ( )خلية/مل ،وذلك بعد مقارنة 10^8بمازج وبذلك تم تحضير عالق بكتيري بتركيز تقريبي للخلايا ( ) 3-2-1-2عكرة النمو المتكونة مع عكرة محلول ثابت العكرة القياسي المحضر بحسب الفقرة (وإجراء العدد الحي للخلايا في المحلول .

Rapid Iodometric: أستخدام طريقة اليود القياسية السريعة 3-8-2

أستخدمت هذه الطريقة للكشف عن قابلية العزلات قيد الدراسة على أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز وذلك ، وكما يأتي : WHO (1978)حسب ما ورد في

١. حضرت مزارع للعزلات البكتيرية بعمر 24 ساعة .
٢. نقلت المستعمرات البكتيرية بوساطة العروة الى أنابيب صغيرة حاوية على (100) مايكرولتر من البنسلين جي (فقرة 3-2-1-4-3) . حضنت الانابيب لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 37 مْ.ثم أضيف الى كل انبوبة 50مايكروليتر من محلول النشأ ومزجت جيدا .
٣. أضيف الى كل انبوبة في أعلاه (20) مايكروليتر من محلول اليود(فقرة 3-2-1-4-2) إذ يتحول لون المحلول الى أزرق غامق نتيجة تفاعل اليود مع النشأ . مزجت محتويات الأنابيب جيدا لمدة دقيقة واحدة.
٤. أحتسبت النتيجة موجبة عند حصول تغير لوني سريع من اللون الأزرق الى اللون الأبيض خلال دقيقة واحدة فقط من إضافة الكاشف (اليود), أعيد الفحص بظهور نتيجة موجبة متأخرة (أكثر من خمس دقائق) .

التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف(ESBLs) 3-8-3 :

للتحري عن أنزيمات Disc approximationاستخدمت طريقة الأقراص المتاخمة المحورة البيتالاكتاميز واسعة الطيف وذلك حسب ما جاء في (Jarlier *etal*, 1988) وكالاتي:

١. حضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة وفق الفقرة (3-8-1) ونشر 0.1من العالق البكتيري بوساطة المسحة القطنية Swab المعقمة على أطباق حاوية على وسط مولر هنتون بصورة كاملة ، تركت الأطباق لمدة 10 دقائق لتجف.
٢. وضع قرص يحتوي على خليط من Amoxicillin/ Clavulanic acid (30 µg / Disc) في وسط الطبق الزرعي الملقح . بعد ذلك رتبت أقراص المضادات الحيوية, Aztreonam Cefotaxime,Ceftazidime على بعد 3 سم من مركز قرص خليط المضاد / المثبط.
٣. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مئوية ولمدة 18-24 ساعة.
٤. وبملاحظة مناطق التثبيط فإن حدوث أتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي وواحد أو أكثر من الأقراص المذكورة دليل على النتيجة الموجبة أي أنتاج العزلة للأنزيم.

التحري عن قابلية البكتريا لانتاج انزيم الميتالوبيتالاكتميز بأستخدام طريقة 3-8-4 اتحادالمضاد الحيوي IPM -EDTA :

)ونشر المزروع بوساطة المسحة 3-8-١١_حضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة وفق الفقرة (المعقمة على اطباق حاوية على وسط مولر هنتون بصورة كاملة, وتركت الاطباق swab القطنية دقائق لتجف .10 لمدة

في وسط الطبق الزرعي الملقح Imipenem) ٢10mg-وضع قرصين من المضاد الحيوي (سم .3 على ان تكون المسافة بينهما

) الى واحد من 3-2-1-8 المحضر في الفقرة (EDTA مايكروليتر من محلول 10 ٣-تم وضع اقراصImpeneum.

)ساعة 18-24م° لمدة (37 ٤-حضنت الاطباق عند درجة حرارة

Imipenemلم حول قرص ال 7ه- بعد ملاحظة مناطق التثبيط فإن زيادة منطقة التثبيط عن لوحده تعد النتيجة موجبة وان البكتريا تعد منتجة Imipenem مقارنة مع قرص ال EDTAمع الانزيم الميتالو بيتا لاكتميز Metallo_ Beta Lactamase MBL) Bhalerao *et al* , 2010 .(

3-9 قياس التركيز المثبط الادنى Minimal – Inhibitory Concentration

لحساب التركيز Two Fold Dilution Methodاستخدمت طريقة التخافيف المضاعفة المتسلسلة Stock and المثبط الادنى لعدد من المضادات الحياتية اعتماداً على ما ورد في Ridgway(1987) وكما يلي :

- حضرت تراكيز متسلسة متضاعفة تراوحت بين 0.5-1024 مايكروغرام/ مل لكل من المضادات الحيوية :

Ceftazidime , Cefotaxime

3-1-2-3) بإضافة نسب مختلفة من هذه المضادات من محاليلها الخزينة المحضرة في (الفقرة م° .45 الى وسط أكار مولر- هنتون المعقم والمبرد الى

- حضرت التخافيف العشرية وأختير التخفيف (10^{-2}) لمزارع البكتريا بعمر 24 ساعة بإستعمال المحلول المحلي الفسلجي المعقم .
- سحب 5 مايكروليتر من التخفيف اعلاه بوساطة ماصة دقيقة كلا على حدة ، ولقحت كقطرة واحدة على أوساط المضادات.
- كررت العملية للمزارع كافة بالتسلسل مكررين للتركيز الواحد، وتركت الاطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لحين جفاف القطرات قبل قلب الاطباق ، حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة .
- احتسب التركيز المثبط الادنى بأنه اقل تركيز يمنع ظهور النمو البكتيري بعد حضانة 24-18 ساعة بدرجة حرارة 37 م°.

ويمثل اقل تركيز يمكن ان يصله المضاد في Break pointتم مقارنة النتائج مع نقطة التوقف المصل ليعطي اعلى فعالية وبعده يصبح مقاوماً.

10-3إستخلاص الدنا البكتيري Extraction DNA Plasmid :

تم إستخلاص الدنا البكتيري بإتباع الخطوات الآتية إعتماداً على تعليمات الشركة المجهزة (Promega U.S.A):

١.نقل 1.5 ساعة الى أنبوبة ابندروف (18 مايكروليترمن المزروع البكتيري بعمر 600 مل).

٢.اضيف 100 مايكروليتر من الدارئ المحلل للخلايا Cell Lysis Buffer ، ومزج الخليط عن طريق تقليب الانبوبة 6 مرات .

٣.اضيف 350 مايكروليتر من محلول التعادل المبرد(Cold Neutralization Solution) 4-8C° ومزجت المحتويات بالتقليب عدة مرات.

٤.نبذ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق .

٥.نقل الراشح تقريباً 900 مايكروليتر الى عمود تنقية Pure Yield Minicolumn وأهملت الحبيبة اللزجة المتكونة .

٦.وضع عمود التنقية داخل انبوبة الجمع Collection Tube ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 15 ثانية .

٧.تم ازالة الراسب المتكون في أنبوبة الجمع ، وإرجاع عمود التنقية داخلها.

٨.أضيف 200 مايكروليتر من محلول Endotoxin Removal Wash الى عمودالتنقية Minicolumn ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 15 ثانية

٩.اضيف 400 مايكروليتر من محلول Column Wash Solution الى عمود التنقية Mincolumn ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة / دقيقة بالمنبذة الصغيرة لمدة 30 ثانية

١٠.نقل عمود التنقية Minicolumn الى أنبوبة إبند روف نظيفة سعة 1.5 مل ، ثم أضيف

مباشرة الى أنبوبة عمود التنقية وترك المزيج لمدة دقيقة Elution Bufferمايكروليتر من محلول واحدة بدرجة حرارة الغرفة .

،ثم غلقت انبوبة إبندرف الصغيرة باحكام ثانية 15 ١١.نبذ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة لمدة وقد اصبح جاهزاً كقالب دنا للتضاعف بواسطة °20C−، وحفظ الدنا البكتيري المستخلص بدرجة ومن ثم للترحيل الكهربائي. PCRتقنية سلسلة تفاعل أنزيم البلمرة

3−11 التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR

تحضير خليط التفاعل التضاعفي التسلسلي لكل جين 1.11.3

تضمنت هذه العملية الخطوات الاتية:

- أذيب محلول PCR master mix, 1X المحضر وفقا للفقرة (1.8.2.3) في درجة حرارة الغرفة ومزج بالمازج لغرض مجانسته قبل الاستعمال.
- اذيبت محاليل البواديء المحضرة وفق الفقرة (2.8.2.3) لكل جين في درجة حرارة الغرفة ومزجت بالمازج لغرض مجانستها قبل الاستعمال مع مراعاة استعمال الحمام الثلجي عند إجراء الاضافة لكل محلول ،وقد تمت اضافة المحاليل كما موضــح في الجدول (3-11) و (3-12).

جدول (3-11 المكونات اللازمة لخليط تفاعل PCR) الخاص بتضاعف الجين *bla Tem* ,*bla*

***shv*-▪**

ت	المكونات	التركيز النهائي	حجم خليط التفاعل لأنبوبة واحدة / مايكروليتر
١-	محلولPCR Master mix, 2x	1X	12.5
٢-	الباديء الامامي	1*	2.0

	10*		
٣-	10*البادييء الخلفي	1*	2.0
٤-	DNAقالب		2.0
٥-	ماء مقطر معقم		6.5
	الحجم النهائي		25

- بيكو مول / مايكروليتر.
- مزجت محتويات الانابيب جيداً باستعمال المازج وبعدها وضعت في جهاز PCR.

وكالاتي:(Ramazanzadeh, 2010)تم اجراء التفاعل التضاعفي حسب ما ذكر من قبل

الخطوة	العملية
١-	لغرض المسخ الاولي لقالب الدنا.° م94 دقائق بدرجة حرارة (3)دورة واحدة لمدة
٢-	٣٥دورة تضمنت: A- 30 ثانيةعند درجة حرارة 94م° لمسخ قالب الدنا. B- 30 ثانيةعند درجة حرارة 57م° لارتباط البادييء بقالب الدنا. C- دقيقة واحدة عند درجة حرارة 72 م° للاستطالة البواديء المرتبطة.
٣-	للاستطالة النهائية لشريط الدنا المتضاعف.° م72 دقائق بدرجة حرارة 5دورة واحدة لمدة

الكشف عن نواتج التضاعف 3-12

)%، ثم حملت 1كشف عن نواتج التضاعف بترحيل العينات على هلام الاكاروز المحضر بتركيز ( ) بالاضافة لترحيل الدليل 3-2-1-7العينات باستعمال داريء التحميل المحضر وفق الفقرة (-2-1-7)المستخدم لتحديد احجام قطع الدنا الثنائية الشريط المحضر وفق الفقرة (1Kbpالحجمي (دقيقة ،فحص الهلام بعد انتهاء 90) ، اذ تم ترحيل النواتج و الدليل الحجمي كهربائيا ولمدة 3 الترحيل من خلال تعريضه لمصدر الاشعة فوق البنفسجية وتم تقدير الاحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة بالمقارنة مع موقع الحزم للدليل الحجمي المرحل مع نواتج التضاعف

(Al-Jubouri *etal*,2012) .

النتائج والمناقشة

.النتائج والمناقشة4

العزل 1-4

والوسط التفريقي Blood agar اظهرت نتائج النمو المايكروبي على الوسط الإغنائي ان ظهور (١٨٥) عينة سالبة (عدم ظهور نمو مايكروبي على الاوساط MacConkey agar الزرعية) وبنسبة (٦١.٧٪) و(١١٥)عينة موجبة (ظهور نمو مايكروبي على الأوساط الزرعية) فقد كانت نسبة العينات الموجبة(٣٨.٣٪) ويعود السبب في ظهور نتائج الزرع البكتيري السالب الى كون المرضى قد تعاطوا مضادات الحياة قبل اخذ العينات مما يؤدي الى عدم ظهور البكتريا في العينة (العبدلي,٢٠١٠) . وقد يكون المسبب فايروسياً لاينمو في الاوساط الزرعية , أو قد يكون المسبب بكتريا لاتعزل بالطرائق الروتينية المتبعة كالبكتريا اللاهوائية فضلاً عن بكتريا وغيرها من الاحياء المجهرية *Leptospira spp* و *Mycobacterium tuberculosis spp.* الاخرى(Brooks *et al.*,2004) . تَمَّ الحصول في هذه الدراسة على (١١٥) عزلة بكتيرية سالبة وموجبة لصبغة كرام من مرضى يعانون من اعراض التهابات المجاري البولية، وقد لوحظت مواصفات تلك العزلات على الاوساط الزرعية لغرض معرفة اهم المسببات المرضية البكتيرية الشائعة المسببة لهذا المرض . اذ ان الاعتماد على طرائق التشخيص المختبرية مهم لغرض معرفة نوع المسبب الجرثومي ومن ثم اختيار العلاج الأمثل لألتهابات المجاري البولية (Brooks *et al.*,2004.)

نمو البكتريا على الاوساط الزرعية4-2

شخصت البكتريا السالبة لصبغة كرام مبدئيا على وسط اكار الدم واكار الماكونكي وبالأعتماد على بعض الصفات التفريقية الخاصة بكل نوع من انواع البكتريا ، فقد تم تشخيص الأنواع المختلفة من البكتريا التي تؤدي دورا مهما في احداث التهابات المجاري البولية ,ومنها بكتريا *E.coli* فقد أظهرت الصفات الزرعية ان المستعمرات وردية اللون (بسبب تخميرها سكر اللاكتوز) , كما ظهرت (Atlas *etal.*,1995)وصغيرة وجافة ذات نهايات منتظمة على وسط اكارالماكونكي جافة، صغيرة، وردية اللون وذات مركز غامق تعطي بريقاً اخضراً EMBالمستعمرات على وسط موجبة للكاتاليز , وسالبة للاوكسديز , سالبة لفحص اليوريز ,(Greenish Metallic Sheen)لماعاً موجبة لفحص الاندول والمثيل الأحمر , سالبة لفحص فوكس- بروسكاور وغير قادرة على استغلال جدول رقم (٢-٤).(Holt *etal.*,1994)الستريت

) Swarming باعتماد ظاهرة الحركة التموجية (*Proteus.mirabilis*وشخصت بكتريا على وسط اكار الدم بوصفها صفة تشخيصية اولية , وكذلك مستعمراتها صفراء شاحبة على وسط اكار الماكونكي بسبب عدم تخميرها سكر اللاكتوز فضلا عن رائحة النمو البكتيري التي تكون مشابهة لرائحة السمك على الوسط نفسه)تكون سالبة لصبغة كرام , موجبة للكاتاليز , وسالبة للاوكسديز , 2000 ,*al*. *et* Greenwood(متحركة, سالبة لفحص الاندول , موجبة لفحص المثيل الأحمر , سالبة لفحص فوكس- بروسكاور) جدول رقم (٢-٤). Holt *et al*.,1994)سالبة لفحص الستريت وموجبة لفحص اليوريز

فقد شخصت على وسط اكار الماكونكي بكون مستعمراتها *K. pneumoniae* اما بكتريا دائرية كبيرة الحجم، ذات حافات منتظمة وردية اللون وذات قوام مخاطي لامتلاكها الكبسولة , وتكون غير منتظمة , أعطت نتيجة سالبة في فحص الاندول وموجبة لفحص أحمر المثيل , أما النوع الاخر فقد أعطى نتيجة موجبة لفحص الاندول وسالبة للاحمر المثيل , كما اعطت نتيجة موجبة في كل من فحص الفوكس بروسكاور , استهلاك السترات, وفحص اليوريز , اما بالنسبة لفحص الحركة فكانت سالبة لفحص الحركة (Holt *et al*.,1994;Atlas *et al*.,1995). جدول رقم (٢-٤)

كبيرة نسبيا, بيضاء اللون, مخاطية على وسط الاكار *En. aerogenes* اما مستعمرات بكتريا المغذي, وظهرت كبيرة, وردية اللون ومخاطية على وسط الماكونكي , وكانت البكتريا سالبة لصبغة كرام, ومتحركة, وسالبة لفحص الاندول والمثيل الأحمر وموجبة لفحص فوكس- بروسكاور وقادرة على استغلال الستريت (موجبة لفحص الستريت) وسالبة لفحص اليوريز , وظهرت بكتريا *En . aerogenes* مشابهة في شكل مستعمراتها واختباراتها الكيموحيوية لبكتريا *En cloacae*.) جدول رقم (٢-٤).Holt *et al*.,1994ماعدا أنها كانت موجبة لفحص اليوريز(

دائرية, ملساء, وتكون مستعمراتها محللة *Ps.aeruginosa* فيما كانت مستعمرات بكتريا) على وسط أكار الدم, تنمو على وسط الماكونكي (Beta-hemolyticللدم تحللا من نوع β , pyocyaninوتظهر غير مخمرة لسكر اللاكتوز إذ تكون شاحبة وخضراء اللون لانتاجها صبغة كما تكون البكتريا سالبة لصبغة كرام, موجبة في فحص الاوكسديز والكاتاليز , موجبة لفحص الحركة, سالبة لفحص الاندول والمثيل الأحمر وفحص فوكس- بروسكاور وموجبة لفحص الستريت وسالبة لفحص اليوريز (Brooks *et al*.,2004).(٤-١) جدول رقم

):التشخيص المجهري والكيموحيوي للبكتريا السالبة المعزولة من 4-1جدول رقم (
التهابات المجاري البولية

نوع البكتريا / نوع الاختبار	*Escherichia coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*Enterobacter aerogenes*	*Enterobacter Cloacae*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Proteus mirabilis*
التصبيغ بصبغة كرام	-	-	-	-	-	-
اختبار أنتاج أنزيم الكاتاليز	+	+	+	+	+	+
اختبار أنتاج أنزيم الاوكسديز	-	-	-	-	+	-
الكشف عن أنتاج الاندول	+	-	-	-	-	-
اختبار المثيل الأحمر	+	+	-	-	-	+
اختبار فوكاس – بروسكاور	-	+	+	+	-	-
فحص قابلية البكتريا على استغلال الستريت	-	+	+	+	+	/+-
فحص الحركة	+	-	+	+	+	+
فحص اليوريز	-	+	-	/+-	-	+
اختبار استهلاك السكريات الثلاثية TSI(H2S) وإنتاج	A/A $-H_2S$ gas+	A/A $-H_2S$ + gas	A/A - H_2S - gas	A/A $-H_2S$ gas-	K / no chang - H_2S - gas	K /A + H_2S gas+

– : نتيجة متغايرة+/ A = acid K = alkaline+: دلالة على ايجابية الفحص -: دلالة على سلبية الفحص

التشخيص وللتأكد من تشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة التي تم عزلها فقد تم استخدام عدة التي تمتاز بالسهولة والسرعة في التشخيص لتأكيد نتائج التشخيص الكيموحيوي ، api_20E شكل(١-٤) ملحق (٢) .

تشخيص العزلات المرضية السالبة لصبغة كرام 3-4

أظهرت نتائج البحث المتعلقة بالتهابات المجاري البولية ان الاصابة تمثلت في (٦٦) عزلة سالبة لصبغة كرام وبنسبة (٥٧.٤٪) من مجموع العينات البالغة ١١٥عينة موجبة للنمو المايكروبي *Escherichia coli* ومن هذه العينات المرضية تم تشخيص (٢٥) عزلة تعود لبكتريا نسبة (٣٣.٣٣ %), و(٩) *Proteus mirabilis* وبنسبة(٣٧.٨٧٪), و(٢٢)عزلة تعود لبكتريا عزلة تعود لجنس) ٥(نسبة (١٣.٦٣٪),و *Klebsiella pneumoniae* عزلات تعود لبكتريا *بنسبة* (٥,٥١٪) *Enterobacter aerogenes* بنسبة(٧.٥٧٪) (١) عزلة *Enterobacter spp* وبنسبة (٦,٠٦٪),و(٥) عزلات تعود لبكتريا *Enterobactercloacae* و(٤) عزلات بنسبة (٧,٥٧%). *Pseudomonas aeruginosa*

في هذه الدراسة فقد شكلت نسبة (٣٧.٨٧٪) UTI كانت من أكثر مسببات *E.coli* إنَّ جرثومة والتي (Muhammad (2002) , وقد جاءت مقاربة للنسبة التي حصلت عليها4-2 جدول رقم (%)، ولاتتفق مع النتائج التي حصل عليها خورشيد (٢٠٠٥) فقد كانت (46.21كانت (65.59%).

Hygienic status المعزولة ربما يرجع إلى المستوى الصحي *E.coli* إن الأختلافات في نسب من اكثر انواع العائلة *E.coli* في المجتمعات المختلفة . وتعد الجراثيم المعوية وبالاخص جرثومة المعوية إحداثاً لالتهابات المجاري البولية وهذا ما اكدته العديد من الدراسات (Delzell and Lefevre.,2000).

فقد جاءت بالمرتبة الثانية بنسبة (٣٣.٣٣٪) إذ جاءت *Proteus mirabilis* أما جرثومة حيث وجدوا أن نسبة (2002) وجماعته Khurana متوافقة مع النتائج التي توصل إليها الباحث Ling الأصابة بهذه البكتريا كانت ٣٣.٣٣ % ، وهذه لاتتفق مع النتائج التي اشار اليها الباحث) في دراسة في جنوب شرق اسيا حول التهابات المجاري البولية إذ ان نسبة عزل 2003وجماعته (.تشير الكثير من الدراسات الى ان بكتريا جنس المتقلبات تأتي % 3 .8البكتريا جنس المتقلبات هي في احداث الاصابة بالتهابات المجاري البولية في كل الاعمار *E.coli* بألمرتبة الثانية بعد بكتريا).Nass *et al* ., 2000وللجنسين (

فجاءت نسبتها(١٣.٦٣٪) واتفقت مع ماتوصل اليه العبدلي *K.pneumoniae* أما جرثومة في التهاب المجاري البولية هي *K.pneumoniae*(٢٠١٠) الذي اشار الى ان نسبة جرثومة في *K.pneumoniae* ٢٠١٢) إذ كانت نسبة ((١٧.٦٪), ولم تتفق مع ماتوصل اليه الزبيدي عينات الإدرار (٢١.٨٪).

(٧,٥٧٪) إذ جاءت متوافقة تقريبامع الحسابي (٢٠٠٨) فقد *Enterobacter spp.* بينما كانت نسبة بلغت نسبة عزل هذه البكتريا(١٢٪) كذلك لم تتفق مع الحلفي (٢٠٠٩) فقد كانت نسبتها (١,٠٥٪).

كانت نسبتها (٧,٥٧%) فجاءت متوافقة مع الحلفي (٢٠٠٩) إذ *Ps.aeruginosa* بالنسبة للنوع كانت النسبة (٧,٣٦٪) , ولم تتفق مع السعدي (٢٠١١) فقد كانت النسبة (٤١.٣٪).وهذه الأختلافات ربما تعود إلى عدد العينات التي تم أخذها خلال فترة الدراسة والظروف الصحية للمرضى أو إلى تطور المقاومة من قبل السلالات تجاه المضادات الحيوية (Coker *et al*.,2000)

.

جدول (4-2) الانواع البكتيرية المعزولة من الادرار ونسبها المئوية

الاجناس البكتيرية	عدد العزلات	النسبة المئوية
Escherichia coli	٢٥	٣٧,٨٧
Proteus mirabilis	٢٢	٣٣,٣٣
K. pneumonia	٩	١٣,٦٣
Enterobacter spp	٥	٧,٥٧
Enterobacter aerogenes	١	١,٥١
Enterobacter cloacae	٤	٦,٠٦
Pseudomons aeruginosa	٥	٧,٥٧
المجموع	**٦٦**	**٥٧,٤٪**

التحري عن بعض عوامل الضراوة المهمة للبكتريا قيد الدراسة 4-4

إن قابلية البكتريا على احداث الخمج يعود لامتلاكها عدداً من عوامل الضراوة ، بعضها يلعب ما اجتمعت هذه العوامل فإنها ستكون المسؤولة دوراً مباشراً والبعض الاخر له دور غير مباشر فإذا عن إحداث الضرر في جسم المضيف ، أخضعت احد العزلات البكتيرية المخمرة للاكتوز وهي وبالاعتماد على الاعلى *P.mirabilis* واحد العزلات البكتيرية غير المخمرة للاكتوز وهي *E.coli* ٤٧) عزلة لدراسة هذه العوامل وقد كانت النتائج كما يأتي (نسبة من مجموع العزلات الكلية والبالغة :

4-4-1 إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production

قابلية عزلات البكتريا قيد الدراسةعلى إنتاج الهيمولايسين من خلال تنميتها في وسط اختبرت ، وقد أظهرت النتائج الموضحة في جدول AB% دم الانسان نوع 5أكار الدم الحاوي على المنتجة لانزيم الهيمولايسين ١٣ عزلة مما يشكل نسبة *E.coli*) إن عدد عزلات بكتريا (4-3 % من عزلات 50)التي وجدت ان 2005(٥٢٪)، تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليه العزاوي (كانت لها القابلية على انتاج الهيمولايسين, بينما كان إنتاج الهيمولايسين في بكتريا *E.coli* ٢٠عزلة ممايشكل نسبة (٩٠.٩٪) , تتفق هذه النتيجة مع ماتوصل اليه الطائي *P.mirabilis* %) اعطت نتائج 93.4) عزلة أي بنسبة (46) عزلة من مجموعة (43) الذي وجد أن (2005(موجبة لفحص أنتاج الهيمولايسين.

) أعداد العزلات المنتجة للهيمولايسين ونسبها4-3جدول (

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات الموجبة المنتجة للهيمولايسين	النسبة المئويةللعزلات المنتجة للهيمولايسين
E.coli	٢٥	١٣	٥٢٪

P.mirabilis	٢٢	٢٠	٩٠,٩%

2-4-4 الحركة المتموجة (الأنثيال) Swarming

أظهرت نتائج الدراسة أن جميع عزلات *Proteus mirabilis*) أي بنسبة (٢٢) الـ 100 قادرة (%) على أحداث الحركة التموجية ولاسيما أنها نامية على وسط فيه نسبة الأكار أعتيادية (1.5–2%) . ظهرت هذه الحركة بشكل أمواج متسلسلة ذات مركز واحد ، و تطابقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه (Liaw وجماعته 2003 عندما قاموا بتنمية بكتريا *Proteus mirabilis*) على وسط زرعي أكار لاحظوا ظاهرة الأنثيال من قبل هذه البكتريا , كما اتفقت مع نتائج العتبي (٢٠١٣)(1.5)حاو (%) قادرة على احداث الحركة التموجية .100التي وجدت ان ٩ عزلات وبنسبة (

3-4-4 إنتاج أنزيم اليوريز(Urease production):

تعد قابلية البكتيريا على أنتاج أنزيم اليوريز عاملاً من عوامل ضراوة البكتيريا إذ يعمل الأنزيم على تحليل اليوريا وتحرير الأمونيا القاعدية التي تعمل على رفع الأس الهيدروجيني للوسط مما يؤدي الى تغيير لون الكاشف احمر الفينول الى اللون الوردي في حالة أنتاج البكتيريا لهذا الأنزيم (Friedrich *et al.*, 2005) . تختلف قابلية البكتيريا في أنتاجها لهذا الأنزيم إذ وجد أن بكتيريا الأنزيم هذا *E.coli* لها القابيلة على أنتاج هذا الأنزيم ، في حين لم تنتج *Proteus mirabilis* غير منتجة لهذا الانزيم *E.coli*) إذ كانت جميع عزلات 2006وتتفق مع ماتوصلت اليه العبيدي (*P. mirabilis*) قابلية عزلات البكتيريا على أنتاج الأنزيم،إذ نلاحظ ان بكتريا 4–4..يوضح الجدول( ) إذ 2004% , وتتفق النتائج مع ما توصل إليه أسماعيل (100اعطت نتيجة موجبة للانزيم بنسبة **4–4**%) لهذا الأنزيم ايضا. **الجدول (** 100 منتجة (*P.mirabilis*كانت جميع عزلات **أعداد العزلات المنتجة لأنزيم اليوريز ونسبها**

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات الموجبة المنتجة لانزيم اليوريز	النسبة المئوية للعزلات المنتجة لأنزيم اليوريز
E.coli	٢٥	٠	%٠
P.mirabilis	٢٢	٢٢	٪١٠٠

4-4-4 التحري عن أنتاج السايدروفورات Siderophores

أظهرت النتائج والموضحة في جدول (4-5 ان نسبة انتاج بكتريا ال (*E.coli* للسايديروفور ٤٨٪ وكانت هذه النسبة تتفق مع ماتوصلت اليه العتبي (٢٠١٣) إذ بلغت نسبة انتاج السايدروفور) ان نسبة انتاج هذه البكتريا 2010 واخرون (Bnyan% ,ولم تتفق مع ماتوصل اليه 53.3 للسايدروفور ٩٪ *Proteus mirabilis* %.وبلغت نسبة انتاج بكتريا76.6للسايدروفورات بلغت وكانت هذه النسبة تتفق ايضا مع ماتوصلت اليه العتبي (٢٠١٣) إذ بلغت نسبة انتاج السايدروفور %.وقد ذكرت العتبي (٢٠١٣) ان اجناس العائلة المعوية تقسم الى مجموعتين اعتمادا على 11.11 المجموعة الاولى تضم السلالات ذات المعدل الواطىء لانتاج Aerobactinقدرتها على انتاج , والمجموعة الثانية تضم *Proteus,Serratia,Salmonella* وتضم اجناسAerobactin *E.coli* وتضم جنس Aerobactinالسلالات ذات المعدل العالي لانتاج

مما تجدر الإشارة إليه هنا ان العزلات القادرة على تكوين نظام السايدروفور جميعها غير قادرة على إنتاج الهيمولايسين على وسط اكار الدم ويبدو واضحاً من ذلك ان هناك علاقة بين إنتاج الهيمولايسين وتكوين السايدروفور, وهذا يؤكد نتيجة نمو العزلات على وسط أكار الدم وعدم إنتاجها للهيمولايسين إذ تلجأ البكتريا المعوية غير المنتجة للهيمولايسين الى إنتاج السيدروفورات لكي تتمكن من سحب الحديد من مركباته لحاجتها الضرورية له (العتبي ,٢٠١٣).

) أعداد العزلات المنتجة للسايدروفور ونسبها4-5الجدول (

نوع العزلات	عدد العزلات الكلية	عدد العزلات الموجبة المنتجة للسايدروفور	النسبة المئوية للعزلات المنتجة للسايدروفور
E.coli	٢٥	١٢	٤٨٪
P.mirabilis	٢٢	٢	٩٪

5-4-4إنتاج البكتريوسين Bacteriocin production

المنتجة *E.coli*) بأن عدد عزلات بكتريا 4-6بينت النتائج وكما هو واضح في الجدول (AL- Dhumainaللبكتريوسين ٨(٣٢٪) وجاءت هذه النتائج متقاربة جزئيا مع ماتوصل اليه , ولم تتفق مع ماتوصلت اليه العتبي (52.01%) *E.*coli) إذ اشار ان نسبة انتاج بكتريا2005(%).73.3 وبنسبة(11 المنتجة للبكتريوسين *E.coli*(٢٠١٣) اذ اشارت ان عدد عزلات بكتريا

) بأن عدد 4-6بينت النتائج وكما هو واضح في الجدول (*P. mirabilis* اما بالنسبة لبكتريا -ALعزلات البكتريا المنتجة للبكتريوسين١١ (٥٠٪) , وجاءت هذه النتائج متقاربة مع ماتوصل اليه), ولم تتفق مع *P.mirabilis*(67.9%) , إذ اشار ان نسبة انتاج بكتريا 2005 (Dhumaina *Proteus*) إذ كانت نسبة انتاج البكتريوسين في بكتريا ال 2007 واخرون (AL-Hamadan spp) 20.(%

إن اختلاف نسب العزلات المنتجة بين دراسة وأخرى يعتمد على عزلات الاختبار بصورة أساسية، قد تكون عزلة الاختبار متحسسة لنوع معين من البكتريوسين لكن إظهار الفعالية القاتلة يعزى إلى افتقارها للمستقبلات الخاصة بنقلة ، أو قد ينتج لكن بكميات قليلة لا تتمكن من قتل الخلية الحساسة ، كما قد تتعرض البكتريا إلى طفرات معينة لسبب أو الآخر مما قد ينتج عنه فقدان المستقبلات الخاصة للبكتريوسين وبالتالي تصبح عزلة الاختبار

إلى إن حدوث تحوير Cursino *et al*. (2002)مقاومة (العتبي,٢٠١٣) ، فقد أشار المستقبلات الخاصة للبكتريوسين نتيجة حدوث طفرات تؤدي إلى إن تكون العزلات مقاومة .

) قابليةعزلات البكترياعلى إنتاج البكتريوسين .(4-6جدول

نوع العزلات	عدد العزلات الكلية	عدد العزلات الموجبة المنتجة للبكتريوسين	رمز العزلة	قطرالتثبيط / ملم	النسبة المئوية للعزلات المنتجة للبكتريوسين
E.coli	٢٥	٨	E3	٦	٣٢٪
			E4	٦	
			E5	٤	
			E20	٤	
			E21	٤	
			E28	٦	
			E31	٤	
			E34	٤	
P.mirabilis	٢٢	١١	P7	٤	٥٠٪
			P14	٨	
			P16	٤	
			P18	٤	
			P24	٦	
			P25	٦	
			P35	٤	
			P39	٦	
			P41	٦	
			P43	٦	

6-4-4) إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm production:(

المنتجة للغشاء *E.coli*) بأن عدد عزلات بكتريا 4-7بينت النتائج وكما هو واضح في الجدول (الحيوي بطريقة أحمر الكونغو ٢٣(٩٢٪) وجاءت هذه النتائج متقاربة مع ماتوصلت اليه العتبي % 86.66 بطريقة احمرالكونغو *E.coli*(٢٠١٣) إذ بلغت نسبة انتاج الغشاء الحيوي في بكتريا ال) في دراسة اجراها في محافظة 2012 (NKgau وSamie,ولم تتفق هذه النسبة مع ماتوصل اليه للغشاء الحيوي بطريقة احمر *E.coli*لومبوبو جنوب افريقيا إذ وجد ان نسبة انتاج بكتريا ال 40.3%الكونغو بنسبة

بينت النتائج بأن عدد عزلات البكتريا المنتجة للغشاءالحيوي ٢٠ *P. mirabilis* اما بالنسبة لبكتريا) إذ بلغت نسبة انتاج 2008وبنسبة (٩٠.٩٪) , وتوافقت هذه النتائج مع ماتوصلت اليه سلمان (91.7%الغشاء الحيوي

إن البكتريا التي تنمو في الغشاء الحيوي تكون متحملة للعديد من المضادات الحيوية ومقاومة ولظروف بيئية مختلفة وأيضا Phagocytosis والبلعمة Opsonizationلكل من الإستساغة مقاومة لضغوط إنتقائيةBordi and Bentzmann,2011. ( )

) أعداد العزلات المنتجة للغشاء الحيوي ونسبها4-7الجدول (

نوع العزلات	عدد العزلات الكلية	عدد العزلات المنتجة للغشاء الحيوي	النسبة المئويةللعزلات المنتجة للغشاء الحيوي
E.coli	٢٥	٢٣	٩٢٪
P.mirabilis	٢٢	٢٠	٩٠,٩٪

4-5 التحري عن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز

Detection of β-Lactamase production

) أن(١٥)عزلة من مجموع (٢٥) 4-8 أظهرت نتائج هذه الدراسة كما يتضح من الجدول (وبنسبة (٦٠٪) أعطت نتيجة موجبة لفحص أنتاج البيتالاكتاميز , وتتفق هذه*E.coli*عزلة لبكتريا) عند عزلها من حالات تسمم الدم في 2003 وجماعته (Jainالباحث النتيجة مع ماتوصل اليه %, ولاتتفق مع 63.3 لهذا الإنزيم *E.coli*ردهة العناية المركزه للأطفال الخدج إذ كانت نسبة انتاج %) 33.33) الى ان نسبة إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز كانت (2005ماتوصلت اليه العزاوي (لبكتريا*E.coli*.

فقد أظهرت نتائج هذه الدراسة أن(٩)عزلات من مجموع (٢٢) *P.mirabilis*اما بالنسبة لبكتريا عزلة وبنسبة(٤٠.٩٪) أعطت نتيجة موجبة لفحص أنتاج البيتالاكتاميز , وتتفق هذه النتيجة مع المنتجة *Proteus mirabilis* عندما وجد ان نسبة بكتريا (2000) Almarjani ماتوصل اليه لانزيمات البيتالاكتاميز والمعزولة من مرض التهابات المجاري البولية تصل الى (٣٩.٦ %).

إن توافر بعض العزلات التي أعطت نتيجة سالبة لفحص البيتالاكتاميز ومقاومتها لمضاد واحد أو أكثر يدل على توافر آليات مقاومة أخرى غير البيتالاكتاميز مثل تغيير بروتينات الغشاء الخارجي بوصفها خطوة لتغيير موقع الهدف،أو أمتلاك حاجز النفاذية (Poirel*et al.*,2000) بأعتبار إن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز ليست الآلية الوحيدة في مقاومة مضادات البيتالاكتاميز.

) أعداد العزلات المنتجة لانزيم البيتالاكتاميز ونسبها 8 4- الجدول (

نوع العزلات	عدد العزلات الكلية	عددالعزلات المنتجة لانزيم البيتالاكتاميز	النسبة المئويةلانتاج البيتالاكتاميز
E.coli	٢٥	١٥	٦٠٪
P.mirabilis	٢٢	٩	٤٠,٩٪

التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف 6-4

Detection of Extended Spectrum β-Lactamase Enzyme

أخضعت جميع العزلات قيد الدراسة للكشف عن انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف, وقد أشارت النتائج في الجدول (4-9) الى أن بكتريا *E.coli* (كانت منتجة للانزيم بنسبة ١٢%) وجاءت هذه النسبة متوافقة مع ماتوصلت اليه العتبي (٢٠١٣) أن بكتريا *E.coli* كانت منتجة للانزيم بنسبة 6.66 % إذ بلغت نسبة عزلات Jabbar (2011), ولم توافق ماتوصل اليه مقدرتها على انتاج انزيمات بيتالاكتاميز واسعة الطيف ١٠٠٪.

فقد أظهرت نتائج هذه الدراسة أن(٧)عزلات من مجموع (٢٢) *P.mirabilis* اما بالنسبة لبكتريا عزلة وبنسبة(٣١.٨٪) أعطت نتيجة موجبة لفحص أنتاج الانزيم , تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه Bonfiglio وجماعته (2002) الذين أشاروا الى أن أنتاج بكتريا *P. mirabilis* لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بنسبة ٢٥.٧ % من خلال دراسة أجروها على مصابين بألتهابات المسالك البولية.

إن إنتشار السلالات البكتيرية المنتجة للأنزيمات الواسعة الطيف في أي مستشفى يعتمد على عوامل مختلفة منها طريقة أستعمال المضادات الحيوية، ومعدل النقل للسلالات المنتجة بين الأشخاص العاملين والراقدين في المستشفيات، ونوع التعقيم المستخدم في وحدات المستشفى وخاصة في وحدات العناية المركزة (Sarojamma and Ramakrishna. 2011) ,

) أعداد العزلات المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف ونسبها 4-9 الجدول (

نوع العزلات	عددالعزلات الكلية	عددالعزلات المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف	النسبة المئويةلانتاج انزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف
E.coli	٢٥	٣	٪١٢
P.mirabilis	٢٢	٧	٪٣١,٨

التحري عن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميزالمعدنية7-4

Detaction of Metalloβ-Lactamase Production

أخضعت جميع العزلات قيد الدراسة للكشف عن انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز المعدنية, إذ أشارت كانت (٣) عزلات منتجة للانزيم *E.coli*) الى أن بكتريا 4-10النتائج في الجدول ( ) والعتبي (٢٠١٣) إذ أشارو الى 2010١٢%) ولم تتفق هذه النتيجة مع كل من حسين ((وبنسبة اظهرت نتيجة سالبة في انتاج هذا الانزيم*E.coli*. ان

فقد أظهرت نتائج هذه الدراسة أن (٣) عزلات من مجموع (٢٢) *P.mirabilis*اما بالنسبة لبكتريا عزلة وبنسبة(١٣.٦٪) أعطت نتيجة موجبة لفحص أنتاج الانزيم , ولم تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما قد أظهرت نتيجة سالبة في*P.mirabilis*توصلت إليه العتبي (٢٠١٣) حيث اشارت الى ان عزلات للانزيم فقد اشار *P.mirabilis*) في انتاج ال 2010انتاج هذا الانزيم , ولم تتفق ايضا مع حسين (71.85%. عزلات على انتاج الانزيمات المعدنية وبنسبة 5الى قدرة

) تمنح MBLs وجدوا ان انزيمات (*etal*.,Mochon (2011)وفي دراسة أجراها الباحثون Mulvey*et*، ووجد الباحثونAztreonamالمقاومة لكل مضادات البيتالاكتام عدا مضاد يكون بسبب عدم قابلية Aztreonam أن حساسية البكتريا المنتجة لهذا الانزيم لمضاد (2011),*al*. على تحليل هذا الدواء .Bالأنزيم صنف

) اشار الى ظهور عزلة واحدة مقاومة 2005(Al-Ouqaili وفي دراسة اجريت من قبل الباحث لمضادات البيتالاكتاميز ومنتجة لهذا الانزيم كانت محمولة على بلازميد اقتراني . وقد يكون سبب عدم انتاج عزلات الدراسة لهذا الانزيم بوصفها حساسة لمضاد الاميبينيم بدرجة كبيرة.

) أعداد العزلات المنتجة لانزيمات الميتالوبيتالاكتاميز المعدنية ونسبها.4-10الجدول (

نوع العزلات	عدد العزلات الكلية	عددالعزلات المنتجة لانزيمات الميتالوبيتالاكتاميز المعدنية	النسبة المئويةلانتاج انزيمات الميتالوبيتالاكتاميز المعدنية

E.coli	٢٥	٣	%١٢
P.mirabilis	٢٢	٣	%١٣,٦

4-8 إختبار حساسية البكتريا لمضادات الحياة بطريقة الأقراص Bauer–Kirby

اختبرت حساسية العزلات قيد الدراسة أتجاه ٦ مضادات وتضمنت مضادات مجموعة البيتالاكتام حصرا التي شملت Ceftazidime و Piperacillin وCefotaxime و Imipenem و Aztreonam , ومضاد Augmentin وهو خليط من مثبط الانزيم (Clavulanic acid وAmoxcillin) , واعتمد على قياس قطر منطقة التثبيط ومقارنة ذلك مع ماورد في (NCCLs, 2007) . ملحق رقم (٣). لقد أظهرت النتائج تبايناً واضحاً في مدى أستجابة العزلات قيد الدراسة للمضادات المستعملة جدول (4–11). حيث كانت جميع عزلات بكتريا *E.coli* مقاومة لمضاد Ceftazidime و Piperacillin وCefotaxime و Imipenem و Aztreonam , ومضاد Augmentin بنسبة (٧٦٪),(٨٨٪), (٦٨٪),(٨٨٪) ,(٦٤٪), (٩٢٪) على التوالي, واتفقت نتائج الدراسة مع ماتوصل اليه الحميداوي (2005) إذ اشار الى نسبة مقاومة البكتريا لمضاد Cefotaxime 42.8% ولم تتفق النتائج مع ماأشار اليه Bonomo *et al.* (2003) أن نسبة مقاومة البكتريا لمضاد Cefotaxime 13.3%. واتفقت نتائج الدراسة مع العبدلي(٢٠١٠) إذ اشار الى ان عزلات بكتريا *E.coli* جميعها مقاومة لمضادات Cefotaxime وPiperacillin وAztreonam بنسب (٦٥٪)(٦٥%) و(٥٥٪) على التوالي.

ربما قد يعود سبب المقاومة لحدوث تغيير في حاجز النفاذية مما يؤدي الى صعوبة مرور المضاد ووصوله الى موقع عمله وهو خاص بالبكتيريا السالبة لملون غرام إذ يحتوي الغشاء الخارجي على قنوات بروتينية تدعى البورين التي تعمل على منع دخول المضادات الى داخل الخلية البكتيرية (Spanu *et al.*, 2002).

جاءت نتائج الدراسة متفقة مع دراسة النداوي (٢٠٠٥) على صالات العمليات إذ كانت نسبة المقاومة لمضاد Augmentin ١٠٠٪ لأيشركيا القولون ,وأختلفت نتائجنا مع نتائج الموسوي (٢٠٠٣) إذ كانت نسبة مقاومة أيشركيا القولون المعزولة من حالات تسمم الدم لدى الأطفال حديثي الولادة لمضاد Augmentin هي ٦٣,٦٪ .

مقاومة*E.coli* اتفقت دراستنا ايضا مع ماأشارت اليه العتبي (٢٠١٣) الى ان جميع عزلات بكتريا (% , 93.3 بنسبة(Aztreonam و Cefotaxime وCeftazidime و Piperacillinلمضاد (% على التوالي.60 %),(53.3%),(46.6

أما فيما يخص حساسية بكتريا *P.mirabilis* فقد كانت المقاومة لمضادات Ceftazidime و Augmentin بنسبة (٧٢.٧٪), ومضاد Aztreonam و Imipenem و Cefotaxime و Piperacillin على التوالي (٧٢.٧٪),(٧٧.٢٪),(٨١.٨٪),(٨٦.٣٪),(٧٢.٧٪),(٧٧.٢٪) وتتفق النتائج مع دراسة قاموا بها على اطفال في الهند يعانون من (2003) وجماعته Subha ماتوصل اليه في التهابات المسالك البولية وجدوا أن مقاومة عزلاتهم للسيفوتاكسيم كانت بنسبة 81% .

ولاتتفق الدراسة مع ماتوصلت اليه الباحثة سعيد (٢٠٠٧) فقد سجلت نسبة مقاومة مضاد Aztreonam لعزلات *Proteus.mirabilis* إذ ٥٪ مائياً من خلال إنتاجها لإنزيمات Azteroname تعمل هذه البكتيريا على تحليل مضاد البيتالاكتاميز واسعة الطيف Beta Lactamase Extended Spectrum)ESBLs.)

) ,اذ 2007 وهي نسبة قريبة مع عزلات الباحثة سعيد (Augmentin اما بالنسبة لمقاومة لمضاد المعزولة من مصادر سريرية مختلفة مقاومة لهذا المضاد بنسبة *P. mirabilis* ابدت عزلات)79.2. (%

P. والذي حدد نسبة مقاومة عزلات (2006), Luzzaro *et al* بينما اختلف الامر عما وجده *mirabilis*) والمعزولة من مصادر سريرية مختلفة ومن مناطق متفرقة في ايطاليا بـ (91.4.%

%) وهذا متوافق تقريبا 100 وبنسبة (Imipenem ابدت العزلات قيد الدراسة حساسية عالية للمضاد %) كما واتفقت نتائج 7.5) إذ ابدت عزلاتها مقاومة بنسبة (2007 مع دراسة الباحثة سعيد , (في الاردن إذ بلغت (Battikhi & Ammar, 2004) دراستنا الحالية مع دراسة للباحثين %) اذ يستخدم هذا المضاد في علاج حالات التجرثم الدموي (99.3 حساسية العزلات لهذا المضاد واصابات المسالك البولية Ang, *et al*, 2004) .)

الآلية الاساسية لمقاومة هذه المضادات (β-lactamases) يعد انتاج انزيمات البيتالاكتاميز وقد تكون *bla* genes وتدعى الجينات المشفرة لهذه الانزيمات (Valverde *et al*., 2004) محمولة بلازميديا او كروموسوميا (Fluit *et al*., 2001) .

) يوضح النسب المئوية لحساسية العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية 4-11الجدول (

المختلفة.

P.mirabilis			*Ecoli*			*المضادات الحيوية*
R	I	S	R	I	S	
13.7%	0%	%86.3	%12	%0	%88	Imipenem
72.7 %	%4.5	%22.7	%64	%8	28%	Aztreonam
81.8%	%13.7	%4.5	%68	%12	20%	Cefotaxime
77.2%	22.7%	%0	%92	%4	4%	Augmentin
%72.7	%13.6	%13.6	%76	%8	%16	Ceftazidime
77.2%	18.2%	%4.5	% 88	%0	%12	Piperacillin

4-9 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية Multiple Antibiotic Resistance

أصبحت مقاومة العزلات المرضية ولاسيما المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية مشكلة اخذت بالتزايد الامر الذي يؤدي الى صعوبة في اختيار العلاج المناسب وبالتالي ازدياد نسبة الوفيات (Karlowsky *et al* .,2003.)

تم تحديد مديات المقاومة لمضادات الحياة للعزلات قيد الدراسة إذ اظهرت النتائج ٤٣ عزلة وبنسبة (٩١,٥٪) تحمل صفة المقاومة المتعددة من مضادين الى ٥ مضادات من مجموع مضادات اعلى نسبة للمقاومة المتعددة*Ecoli* البيتالاكتام الكلية البالغ عددها ٦مضادات واظهرت عزلات)كل عزلة وعدد 4-12 وبنسبة (٩٠,٩٪).ويوضح الجدول (*P.mirabilis*(٩٢٪), تليها إذ اظهرت (2013)المضادات التي قاومتها . إتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتيجة دراسة العتبي %) تحمل صفة المقاومة المتعددة من مضادين الى 92.5 عزلة وبنسبة (37نتائج دراستها أن مضاداً من مجموع المضادات الكلية البالغ عددها١٤مضاداً واختلفت معها في انها اظهرت بان 11 %, ولم 93.3وبنسبة *E.coli* %, تليها 100 اعلى نسبة للمقاومة المتعددة*P.mirabilis*عزلات تحمل صفة المقاومة المتعددة.*P. mirabilis*) إذ كانت جميع عزلات 2008تتفق مع سلمان (

أصبح إنتشار الجينات التي تحمل المقاومة للمضادات الحيوية مشكلة تهدد الصحة العالمية وتساهم)Bistue*et al.*,2008.البلازميدات في إنتشار هذه المقاومة بوساطة البكتريا الممرضة (

إنتشار نمط المقاومة المتعددة للمضادات الجرثومية بين الجراثيم (2004) .*Piéboji et al*وثق) مقارنة مع الجراثيمpatientsالسالبة لصبغة كرام المعزولة من المرضى الراقدين في المستشفى ( ) وبفارق معنوي إحصائياً Outpatientsالمعزولة نفسها من المرضى المراجعين إلى المستشفى ( )0.05<P .(

إن عدم توافر العلاج الفعال ضد البكتريا التي تملك صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية هي البحث لإيجاد مضادات حديثة فعالة مشكلة خطيرة على صحة الانسان مما يستدعي الحاجة الى ضد هذه البكتريا(Ueda and Sunagawa,2003) .)

)المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية للعزلات قيد الدراسة .4-12جدول (

عدد المضادات التي قاومتها العزلات	عدد العزلات	ارقام العزلات ونوع العزلة
2	7	E1,E2,P8,E32,E33,E39,P46
3	5	E4,E5,E11,P24, P43
4	8	E10,E12,E15,P25,P35,P36,P47
5	23	E3,E6,E9,E16,E17, P19, E20,E21,E22,E27 ,E28,E29,E30 ,E31 ,P7 ,P14,P 18,P26,P38,P40,P42,P44,P45
النسبةالمئوية		(E 92%) ,P (90,9%)

❖ *P: Proteus miabilis , E:E.coli*

) لعدد من المضادات الحيويةMIC$_s$ تحديد التراكيز المثبطة الدنيا (10-4

) لبعض المضادات الحيوية التي اختيرت بوصفها تمثل M.I.C تم تحديد التركيز المثبط الادنى ( ) ، أخضعت جميع العزلات ، تم إختبار هذه Drug of choiceالمضادات الاكثر استعمالاً (، اعتمدت نقطة Ceftazidime، Cefotaximeالعزلات تجاه (٢) من مضادات البيتالاكتام وهي

) كأساس لحساب الاستجابة وتعرف NCCLs,2002) الموصوفة من قبل (Break pointالتوقف (
بإنها التركيز الامثل الذي يمكن ان يصله المضاد في المصل بحيث يوفر اعلى حداً للمعالجة ، يعد
) المحسوبة أقل من نقطة التوقف ، M.I.C) عندما تكون مقادير (Susceptibleالكائن مستجيباً (
واستخدمت طريقة التراكيز المضاعفة المتسلسلة في وسط اكار مولر هنتون لاجراء هذا الاختبار،
) المحسوبة اذ تؤثر M.I.Cلانَّ مكونات الوسط المستعمل تعد من العوامل المؤثرة على نتائج قيم (
المحسوبة لذلك يفضل إستخدام أكار مولر هنتون لاحتوائه على M.I.Cتأثيراً واضحاً على مقادير
(السعدي,٢٠١١) كمية قليلة من كلوريد الصوديوم ، ونسب قليلة من أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم
.

Cefotaxime) الى أن قيم التراكيز المثبطة الدنيا لمضاد 4-13تشير النتائج كما في الجدول (
) مايكروغرام/مل 1024>-4و(*E.coli*) مايكروغرام/مل لعزلات 1024>-2تراوحت ما بين (
) تراوحت قيم التركيز 2004 , واتفقت جزئيا مع ماتوصلت اليه مجيد (*P.mirabilis*لعزلات
) 32-256({ مابين *Proteus spp., E.coli* المثبط الادنى للمضاد السيفوتاكسيم للعزلات
مايكروغرام/مل على التوالي.}) 32-1024،(

لمضاد MIC_S) الذي اشار الى ان قيم 2010لم تتفق النتائج مع ماتوصل اليه العبدلي (
Cefotaxime) لعزلات 1024>-1024 (*E.coli*.

يعزى سبب المقاومة لمضادات السيفالوسبورينات الى الضغط المستمر لأستعمال المضادات والذي
ينتج عنه تطور صفة المقاومة وخاصة عن طريق موقع الهدف أوعن طريق أنظمة الدفق،وكل هذه
اليات يشفر لها كروموسوميا(Ruiz,2003).

يمكن ان يعزى سبب ارتفاع قيم التركيز المثبط الادنى للعزلات قيد الدراسة لمضادات البيتالاكتام
(السيفوتاكسيم) الى وجودعدة ميكانيكيات للمقاومة في مقدمتها انتاج انزيمات
البيتالاكتاميزالكروموسومية مثل OXA- 4,OXA-5,OXA-6,OXA-7,OXA-10)Danel *et al.*, 1999.(

−2 مابين (*P.mirabilis* , *E.coli* لعزلات Ceftazidime لمضاد MIC_Sسجلت قيم) مايكروغرام/مل على التوالي، ، ولم تتفق النتائج مع ما أشارت اليه 1024>−8), (1024> MIC وعزلتين أظهرت قيمة Ceftazidimeجاسم (٢٠١٢) أن ثلاث عزلات مقاومة لمضاد µg/ml للبكتريا المقاومة ما بينMIC، وكانت قيمة breakpoint µg/ml32 مساوية لقيمة) حيث اشارت الى إن عزلاتها2011 (Kandela). ولم تتفق ايضا مع ماتوصلت اليه 64−265(التركيز المثبط الادنى مابين (٣٢−١٢٨) مايكروغرام/مل. السيفتازديم وتراوح لمضادات مقاومة كانت

توجد عوامل عدة تؤثر على حساب قيم التركيز المثبط الادنى منها حجم اللقاح البكتيري، اذ تزداد قيمة التركيز المثبط الادنى بزيادة حجم اللقاح البكتيري وقيمة الاس الهيدروجيني للوسط ، فضلا عن طبيعة الجدار الخارجي وعدد القنوات الموجودة فيه (مجيد,٢٠٠٤)، ويمكن ان يعود السبب الى اختلاف قيم التركيز المثبط الادنى داخل الجسم الحي وبين قيمتها خارج الجسم الحي)*In vitro*.(

اشارت نتائج اختبار الحساسية واختبار قيم التركيز المثبط الادنى الى وجود اخلاف كبير بينهما للعزلات المختلفة وهذا يؤكد على ضرورة اجراء اختبار التركيز المثبط الادنى قبل اعطاء العلاج لاختلاف كل عزلة عن الاخرى في تركيز المضاد المؤثر عليها، وعلى هذا الاساس فكل مجيد,٢٠٠٤).(مريض يحتاج جرعة تختلف عن المريض الاخر

) قيم التراكيز المثبطة الدنيا لبعض المضادات الحيوية للعزلات البكتيرية قيد 4−13جدول (**الدراسة.**

CAZ	CTX	المضاد / العزلة
≥32	≥64	نقطة التوقف
32	32	*E.1*
2	2	*E.2*
128	<1024	*E.3*
4	4	*E.4*
16	32	*E.5*
128	<1024	*E.6*
<1024	<1024	*E.9*

64	**<1024**	***E.10***
256	**<1024**	***E.11***
8	**4**	***E.12***
1024	**256**	***E.15***
512	**1024**	***E.17***
<1024	**<1024**	***E.20***
1024	**<1024**	***E.21***
512	**128**	***E.22***
64	**128**	***E.23***
512	**<1024**	***E.27***
128	**<1024**	***E.28***
256	**<1024**	***E.29***
1024	**<1024**	***E.30***
1024	**<1024**	***E.31***
32	**128**	***E.32***
2	**4**	***E.33***
<1024	**128**	***E.34***
512	**64**	***E.37***
<1024	**256**	***P.7***
1024	**256**	***P. 8***
256	**32**	***P. 13***
1024	**<1024**	***P. 14***
<1024	**<1024**	***P.16***
<1024	**<1024**	***P.18***
<1024	**<1024**	***P.19***
512	**512**	***P.24***
256	**<1024**	***P.25***
512	**<1024**	***P.26***
256	**256**	***P.35***
8	**4**	***P.36***
<1024	**<1024**	***P.38***
256	**64**	***P.39***
128	**4**	***P.40***
128	**32**	***p.41***

128	**64**	***P.42***
128	**32**	***P.43***
512	**<1024**	***P.44***
512	**<1024**	***P.45***
256	**64**	***P.46***
256	**<1024**	***P.47***

4-11 النسق البلازميدي Plasmid profile

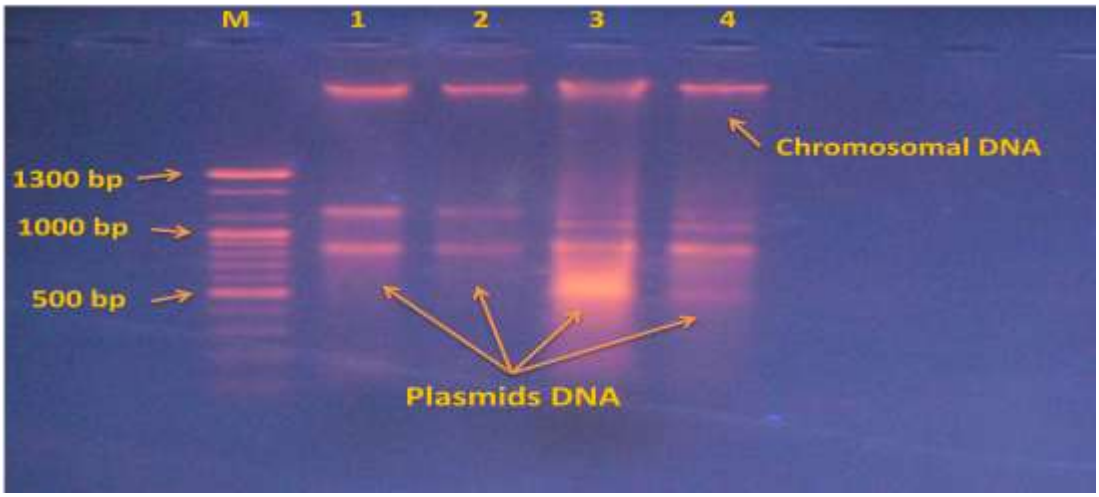
تم التحري عن المحتوى البلازميدي للعزلات قيد الدراسة من بكتريا *E.coli, P.mirabilis.* بأستخدام Pure Yield™ Plasmid Miniprep Kit المجهز من قبل شركة Promega (U.S.A) وبعد عزل الدنا البلازميدي وترحيل الدنا المستخلص على هلام الأكاروز وجد ان جميع العزلات حاوية على بلازميدات تتراوح من بلازميدين الى ثلاثة بلازميدات ، كما موضح في الشكل(4-1) .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أحتواء جميع عزلات *E.coli K.pneumoniae* على حزمتين بلازميديتين. اما *p.mirabilis* احتوت على ثلاث حزم بلازميدية.

اتفقت نتائج الدراسة مع ماأشارت اليه Al-Ismail(2007) ضمن نتائجها بامتلاك *E.coli* عزلات 7) من أن غالبية عزلات 1993 وجماعته (Lukomski لبلازميدين, واتفقت مع ما توصل اليه الخاضعة لدراستهم كانت تحتوي على ثلاث حزم بلازميدية. *Proteus mirabilis*

وتتفق هذه النتيجة مع ماتوصل اليه الطائي (2005) حيث أظهرت نتائج الدراسة أحتواء غالبية عزلات *p.mirabilis* وأشار الباحث Hoffaman وجماعته على أكثر من حزمة بلازميدية واحدة . عزلات الخاضعة لدراستهم تحتوي على أكثر من *Proteus mirabilis* الى أن جميع عزلات (1998) حزمة بلازميدية واحدة .

ولم تتفق النتائج مع ماتوصلت اليه صلاح (2005) التي اشارت الى ان نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز أظهرت احتواء جميع عزلات البكتريا السالبة لصبغة غرام على حزمة بلازميدية صغيرة واحدة متغيرة الموقع في الهلام.



الشكل (4-1) الترحيل الكهربائي للعزلات باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1%، 75 فولت / سم لمدة 90 دقيقة.

M: 100 bp DNA ladder

E.coli : المحتوى البلازميدي لل (1), (2) المسار

P.mirabilis: المحتوى البلازميدي (3), (4) المسار

4-12 الكشف عن الجين ***bla*** $_{SHv}$, ***bla*** $_{TEm}$ باستخدام تقنية PCR

تم اجراء التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) لعزلات *E.coli* المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف والبالغ عددها (3) عزلات ولعزلات *P.mirabilis* المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف والبالغ عددها (7) عزلات باستخدام بادئ متخصص يستهدف التسلسل النوعي لجين *bla* $_{SHV}$ ولجين *bla* $_{TEM}$ لغرض تشخيص الجينات المنتجة لأنزيمات ESβL , كما

استخدمت البادئات المتخصصة والمستعملة من قبل (Ruppé *et al.* 2009) , باعتماد برنامج التفاعل في الدراسة ألمذكورة, وبأجراء الظروف المذكورة من قبل الباحث لغرض تشخيص الجين *bla* $_{SHV}$ ولمدة 3 دقائق لغرض المسخ الاولي تليها (35) دورة تشمل ثلاث مراحل ، مدة المرحلة الواحدة تتراوح من ثانية الى دقيقة 30 وبدرجة حرارة (94c° وهذه الظروف هي استخدام درجة حرارة مقدارها 94 و57 و72 على التوالي وكما موضح في الجدول (4-14)).

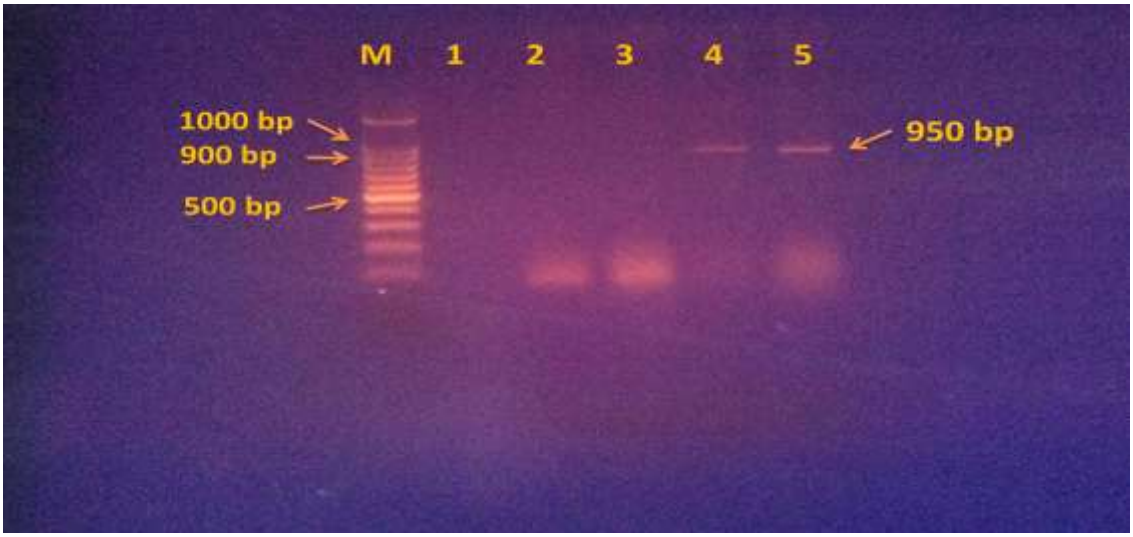
الجدول (4-14): الظروف المستخدمة في التشخيص الجيني لأنزيمات ESβL باستخدام البادىء SHV,TEM

خطوات PCR		ظروف PCR لـ TEM و *SHV*	
		درجة الحرارة	الوقت
Initial denaturation		94c°	3min
35 Cycle	denaturation	94c°	30Sec
	annealing	57c °	30Sec
	Extension	72c°	1min
Final Extension		72c°	5min

لوحظ عند فحصه تحت الاشعة فوق 1%بعد ترحيل ناتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز البنفسجية ظهور حزمة واحدة في جميع حفر الهلام وبالمستوى نفسه وهذا دليل ارتباط البادي مع التسلسل المكمل له في دنا القالب, كما موضح في الشكل (4-2).

كما وتم اخذ عزلتين غير منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بوصفها سيطرة للتأكد من عدم احتوائها جينات الدراسة.

وبنسبة *E.coli* عزلات 3عزلات مقسمة الى 10 أصل من عزلات 9هنالك بينت النتائج إن جين تحوي كانت85.7%)وبنسبة (عزلات 7 من أصل *P.mirabilis* عزلات 6 و100%)(% , وأن جميع 0.7هلام في قاعدة زوج 950 بحجم واعتمادا على ظهور حزمة bla_{TEM} العزلات كانت غيرحاوية على جين bla_{SHV} كما موضح في الشكل (4-2) .



الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل (PCR) (شكل 4-2)

M: 100bp DNA ladder, 1: negative control, 2: SHV gene for *E. coli*, 3: SHV gene for *P.mirabilis* , 4: TEM gene for *E. coli*, 5: TEM gene for *P.mirabilis*.

وجاءت هذه النتائج متفقة مغ ماتوصل اليه Kim *et al*,(2004) الذي أشار الى ان عزلات *E.coli* كانت تحوي جينات bla_{TEM} بنسبة (87.5%) ولم تتفق مع ماتوصل إليه Ruppé *etal* (2009) الذين اشارو الى ان عزلات *E.coli* كانت تحوي جينات bla_{TEM} بنسبة (76.4%).

أما بالنسبة لنتائج عزلات *P.mirabilis* فقد أتفقت مع Spanu *et al* (2002) ألذين أشارو الى ان عزلات *P.mirabilis* كانت تحوي جينات bla_{TEM} بنسبة (98%) ولم واتفقت مع Al-Jubori *et al* (2012) إذ بلغت نسبة تواجده في ال *P.mirabilis* (100%).

إذ بلغت نسبة تواجد جين bla_{SHV} (4.14%) إذ وجدو ان نسبة (2002) Spanu *et al*) ولم تتفق ايضا مع ماتوصل اليه Al-Jubori *et al*. 2012 مع *E.coli* ولم تتفق عزلات

الذين اشاروا الى عدم (Al-Jubori *et al.* 2012) واتفقت مع نتائج(52%تواجد هذا الجين (*bla* $_{SHV}$ تواجد جين في عزلات *P.mirabilis*.

المصـادر العربيــة

١. أسماعيل ، سعيد محمد عوض . (٢٠٠٤) . دراسة أستخلاص وتوصيف أنزيم اليوريز من بكتيريا المتقلبات المعزولة من مرضى خمج المجاري البولية في اليمن . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

٢. الحسابي ،اشرف سامي حسن (٢٠٠٨) . دراسة تاثير المستخلص المائي البارد لنباتي بذور الكتان *Linum usitatsimum* واوراق نبات التوت الابيض *Morus alba* ضد الانواع البكتيرية المعزولة من المصابين بالتهاب غدة البروستات . رسالة ماجستير،كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

٣. الحلفي, سوسن محمد كريم (٢٠٠٩) . حساسية بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من اخماج المجاري البولية لمضادي Ciprofloxacin و Lomefloxacin.رسالة ماجستير،كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية.

٤. الحميداوي,طالب فالح حسن.(٢٠٠٥).النشاط الهميولاسيني لبكتريا أشريكيا القولون المسببة لالتهابات المسالك البولية ومقاومتها لمضادات الحياة .أطروحة دكتورا في فلسفة الاحياء المجهرية , كلية العلوم, الجامعة المستنصرية.

٥. الزبيدي، محمد مهدي عبد المحسن (٢٠١٢). دور البلازميدات في إنتاج البكتريوسين من بكتريا *Klebsiellaspp* المعزولة من عينات سريرية .رسالة ماجستير, معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الأحيائية ,جامعة بغداد.

٦. الزنكنة,ايمان علي نور الله .(٢٠١٣). دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا *Klebsiella* spp المعزولة من إصابات مرضية مختلفة . رسالة ماجستير, كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة ديالى.

٧. السعدي, لينا عبد الاميرسلمان.(٢٠١١). دراسة بكتريولوجية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في مدينة بعقوبة وضواحيها .رسالة ماجستير,كلية التربية للعلوم الصرفة,جامعة ديالى.

٨. الطائي، زهير علي شفيق (٢٠٠٦) . تنقية وتوصيف انزيم البيتالاكتاميز المنتج بواسطة بكتريا *Klebsiella pneumoniae* . رسالة ماجستير، معهد الهندسة الوراثية و التقنيات الاحيائية، جامعة بغداد.

٩. الطائي ، هادي رحمن رشيد . (٢٠٠٥) . دراسة بكتريولوجية كيموحيوية وجزيئية لبكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من التهابات المجاري البولية في بعض مستشفيات مدينة بغداد ، رسالة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

١٠. العبدلي, ياسر عادل جبار.(٢٠١٠).إستخلاص وتنقية مركب الكاتشين من الشاي الأخضر (Camellia sinesis) وتأثيره التآزري على البكتيريا المسببة لالتهابات المجاري البولية .رسالة ماجستير, كلية العلوم ,الجامعة المستنصرية.

١١. العبيدي، رغد عبد اللطيف عبد الرزاق. (٢٠٠٦). دراسة بعض عوامل الضراوة للبكتريا المعزولة من ردهات الأطفال الخدج ومقاومتها لمضادات الحياة والمطهرات. رسالة ماجستير,كلية العلوم ,الجامعة المستنصرية.

١٢. العتبي, دعاء عدنان كاظم .(٢٠١٣) .دراسة بكتريلوجية لبعض اجناس العائلة المعوية المعزولة من صالات مستشفى الولادة في مدينة بعقوبة.رسالة ماجستير .كلية التربية للعلوم الصرفة ,جامعة ديالى.

١٣. العزاوي,سندس عادل ناجي .(٢٠٠٥). دراسة تأثير عسل النحل على البكتريا التي تلوث الحروق وإمكانية استخدامه في العلاج .رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة ديالى.

١٤. الكعبي, مروة حسن عبد علي (2011).تشخيص جينات bla_{TEM} وbla_{SHV} ، CTX-M-I و CTX-M-III باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا من بعض البكتريا السالبة لصبغة غرام.رسالة ماجستير ،كلية العلوم ،الجامعة المستنصرية.

١٥. المرجاني،محمد فرج.(٢٠١١) .المضادات الحيوية المقاومة الحيوية البكتيرية للمضادات الحيوية. عمان: دار دجلة.

١٦. الموسوي ، يعقوب عبد الواحد صالح . (٢٠٠٣) . التحري عن البكتيريا السالبة لصبغة غرام والخمائر كمسببات للتسمم الدموي في الأطفال وحديثي الولادة . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

١٧. النداوي ، تحرير هادي . (٢٠٠٥) . دراسة تأثير بعض المطهرات على بعض أنواع البكتيريا المعزولة من مرضى وصالات العمليات الجراحية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

١٨. حسين,احمد عليوي .(٢٠١٠) .دور الإنزيمات المحلله لمضادات البيتالاكتام وبعض عوامل الضراوة في مقاومة البكتريا المسببة لالتهاب الأذن الوسطى القيحي المُزمن في محافظة النجف.رسالة ماجستير,كلية العلوم, جامعة بابل.

١٩. جاسم ,نبأ علي.(٢٠١٢). التحري وراثياً عن إنتاج بعض إنزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف والمعدنية من بكتريا. *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من مصادر سريرية مختلة رسالة ماجستير ,كلية العلوم,الجامعة المستنصرية.

٢٠. خلف, صبحي حسين و جرجيس , شاكر غازي .(٢٠١١). التحري عن حاملات الحديد المعزولتين *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia* في جرثومتي من حالات التجويف الانفي.جامعة الموصل , مجلة أبحاث كلية التربية الأساسية ,مجلد ١١,العدد٢.

٢١. خورشيد, ثري أحمد (٢٠٠٥) . دراسة جرثومية لبعض مسببات أخماج المسلك البولي للمرضى في مستشفى آزادي العام في مدينة كركوك . رسالة ماجستير, كلية تربية, جامعة تكريت.

٢٢. سعيد , ليلى عبد الحميد (2007). التصنيف العددي بالتحليل العنقودي لمجموعة *Proteus Morganella providancia* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة , أطروحة دكتوراه –كلية العلوم – الجامعة المستنصرية .

٢٣. سلمان, افاق رشيد .(٢٠٠٨) .فوعة بعض أنواع المتقلبات *Proteus* spp. المعزولة من خمج الأذن الوسطى في بعقوبة وضواحيها. رسالة ماجستير, كلية التربية, جامعة ديالى.

٢٤. مجيد, هدى زهير.(٢٠٠٤). العوامل المؤثرة على انتاج انزيم الهيمولايسين من بكتريا مرضية معزولة من ادرار مرضى السكري و تحديد مقاومتها لبعض المضادات الحيوية.رسالة ماجستير,كلية العلوم ,جامعة بغداد.

المصادر الاجنبية

A

-Ahmed, V.U.; Hussain, J.; Hussain, H.; Jassbi, A.R.; Ullah, F.; Lodhi, M.A.; Yasin, A. and Choudhary, M.I. (2003). First natural urease inhibitor from *Euphorbia decipiens*. Chem. Pharm. Bull. 51(6): 719-23.

-Al-Charrakh ,A .H .; Yousif ,S .Y .and Al- Janabi ,H .S.(2011). Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocins from *Klebsiella* isolates from Hilla/Iraq . J. Microbial .Vol . 2(5):1-11.

-AL- Dhumaina,T . F. H.(2005). Extraction and Putrification of Colison produce By *Echerichi coli* Isoleted From urinary tract Infection . Nassiria Technical Institute, Thi-Qar .

-AL- Hamadan, A . H;Hussein. A . N and AL-Nashaa'. A . A.(2007). Curing of plasmid contents of *Proteus* spp. isolated from urinary tract infections in AL- Diwaniyah city**.** ***Al-Qadisiah Medical Journal*** .Vol. 1, No.3.pp. 160-169.

-AL-Jasser, A.M. (2006). Extended spectrum Beta Lactamases (ES*B*Ls): Global problem. Kuwait medical Journal., 38(3): 171-185.

-Al-Jubouri , A . S. ; Mahmood, Y. A.R ; AL-Salihi. S. Sh.(2012). Pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* isolated from diarrheal cases among children in Kirkuk city. Tikrit Journal of Pure Science Vol. 17 ,No. 4 .pp. 377- 388.

-Almarjani, M.F.(2000). Multiple antimicrobial resistance and some virulence factors of *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infection and study of their plasmid content. M.Sc.thesis submitted to the College of Science Al-Mustansiriya University. (In Arabic).

-AL-Ouqaili ,M. T. S. (2005).Genetic aspects of Ambler class c, extended spectrum and metallo-beta-lactamases among beta-lactam resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J .Al-Anbar Medical* Vol.5 , No.l .

-Ambler, R.p. (1980). The structure of B-Lactamases. Philos. Trans. R. London. B 239:321-331.

-Ang, J.Y. ; Eziike, E. and Asmar, B.(2004). Antibacterial resistance, Indian J. of pepiatricss, (71):229-239 .

-Asscher, A.W. (1980). Challenge of U. T. I. Academic Press Inc. (London) .PP: 1-59. --

Atlas,R.M.; Brown,A.E.; and Parks,L.C.(1995).Laboratory Manual Experimental Microbiology. 1th ed. *Mosby Yearbook*, Inc. pp: 888.

-Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Smith, J. A.; Seidman, J. D. &Struhi, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, *Inc. New York*.

B

-Babini, G.S.; Yuan, M.; Hall, L.M.C.; Livermore, D.M.(2003). Variable susceptibility to pipracillin/tazobactam amongst *Klebsiella spp.* with extended spectrum *β*-lactamases. Journal of Antimicrob.Chemother. 51. 605-12.

-**Bach**., S.; Dealmeida, A. and Carniel, E. (2000). The Yersinia high-pathogenicity is present in different members of the family Enterobacteriaceae. FEMS microbilo. Lett., 183: 289-294.

-Balla, E. ; Dicks, L.T. ; Toit, M.D. ; Van–Dermewe, M.J. and Holzapfel, W. H. (2000). Characterization and cloning of the gene encoding enterocin 1017A and enterocin 1017B, two antimiciobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. Appl. Environ. Microbiol. 66(4): 1298-1304.

- Bantar, C.; Vesco, E.; Heft, C.; Salamone, F.; Krayeski, M.; Gomez, H.; Goassolo, M.A.; Fiorillo, A.; Franco, D.; Arango, C.; Duret, F.; Oliva, M.E. (2004). Replacement of broad-spectrum cephalosporins by piperacillin/tazobactam: Impact on sustained high rates of bacterial resistance. Antimicrob.Agents Chemother. Feb.48 (2): 392-5.

-Barletta, J. M.S.; Stirting, D. (2003). Ashort History of the polymerase chain reaction. *Medical Research. J.*226: 3-6.

-Baron, E.J. and Finegold, S.M. (1994). Microorganisms Encountered In Urinary Tract in Baily & Scott's Diagnostic Microbiology. (9th) ed. Mosby Company U.S.A.

-Battikhi, M.N. and Ammar, S.I. (2004).Otitis Infection in jordan. clinical and microbiology feature. J. Saudi. Med. 25(9):1199-203 .

-Bhalerao, D. S., Roushani, S., Kinikar, A. G. and Akhter, I. (2010) ; Study of Metallo-beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pravara Rural Hospital. *Pravara Med Rev;*pp:1-5.

-Bistue, A. J. C. S. , Birshan, D. , Tomaras, A. P. , Dandekar, M. ,Tran, T. , Newmark, J. , Bui, D. , Gupta, N. , Hernandez, K. , Sarno, R. , Angeles Zorreguieta, A. , Actis, L. A. , Marcelo E. and Tolmasky, M. E. (2008) ; *Klebsiella pneumonia* Multiresistance Plasmid pMET1:Similarity with the Yersinia pestis Plasmid pCRY and Integrative Conjugative Elements. *journal.pone*. 3(3): pp.1-9.

-Blackburn , D.(2010). The Production of the *E. coli* common pilus by Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* . MSC .Thesis .College of Science .University of Florida.

-Bnyan.I. A.; AL-Saeed.M .S; Al-saad.N f. .(2010).Biofilm Formation by Bacterial Isolates from Burn Infected Patients. *Medical Journal of Babylon*- Vol. 9- No. 3.pp:517-525.

-Bonfiglio, G.; Perilli, M.; Stefani, S.; Amicosanti, G. & Nicoletti, G. (2002). Performance of extended-spectrum β-lactamases among *Enterobacteriaceae*: an Italian survey. Int.J.Antimicrob. Agents.19 (3): 213-7.

-Bonomo , R.A.; Donskey , C.J.; Blumer , I.L; Hujer , A.M.; Hoyenm , C.K.; Jacob , M.R.; whalen , G.G. and Salata, R.A. (2003) . Cefotaxime resistant bacteria colonizing older people admitted to an acute care hospital . (2003) .*J. AM. Geriatr* . Soc . Vol. 51 ,No. 4 : 519 –22 .

-Bordi, C. and De Bentzmann. S. (2011) ; Hacking into bacterial biofilms : a new therapeutic challenge. *Annals of Intensive* Care , 1:19.pp.2-8.

-Boucher,R.C. (2004). New cocepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease.Eur.Respir.J.23:146-158.

-Bradford, P.A.(2001). Extended- spectrum *B*-Lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistant threat. Clin microbiol Rev., 14: 933-951.

-Brooks,G.F. ; Butel, J.S. and Morse, S.A.(2004)**.** Alange Medical Book. Jawetz, Melnic and Adelberg,s , Medical Microbiology.23 th ed. McGraw Hill Companies, United States.

-Brooks , G. F.; Butel , J. S.;Carroll, K. C. and Morse, S. A. (2007) . Jawetz , Melinick , J.L. and Adlebergs Medical Microbiology ,24th ed. A lange medical book.

-Bryskier, A; conturier, c. and Lowther, J. (2005). B-Lactamases in hibitors under research. Antimicrobial agent "Antimicrobial and Antifungals",. American society for Microbiology (ASM) press., 410-431.

-Bush, K.; Jacoby, G.A. and Medeiros, A.A (1995) . A functional classification scheme for B-Lactam and its correlation with molecular struction. Antimicrob. Agents chemother., 39:1211-1233.

-Bush, K. (1999). B-Lactamases of increasing clinical importance. Curr. Pharm. Des.,5:839-845.

-Bush, K.(2003). *B*-Lactam antibiotics: penicillin, Antibiotic and chemotherapy: Anti- infective agents and their use in therapy 8th edition Ediburah, Churchill Livingston: MPG Book Ltd. UK.

-Bush , K. and Jacoby, G. A. (2010) Updated functional classification of B-Lactamases. Antimicrob Agents chemother. 54(3): 969- 976.

C

-Cendejas, E.; Gómez-Ginp; Gómez. Sánchez and mingorance, J.(2010). Detection and characterization of Enterobacteriaceae producing metallo -B-Lactamases in a tertiary – care hospital in Spain. Clin. microbial infect , 16:181-183.

-Chen, H. (2005). Utility of bedside bladder ultra sound before urethral catheterization in young children. Pediatrics- 115: 108-111.

-Cohen, L.A.; Gary, A.T.; Fales, W.H.& Madsen, R.W. (2003). Trends in fluoroquinone resistance of bacteria isolated from canine urinary tract. J.Vet.Diagn.Invest. Jul.15 (4): 338-43.

-Coker , C. ; Carrie , A.P.and Harry , L.T. (2000). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* in urinary tract infection , J. Microbio . And Inf. , 2:1497-1505 .

-Collee , J. G. ; Fraser , A. G. ; Marmion , B. P. and Simmons , A. (1996) . Mackie and McCartney practical medical microbiology . 14th ed. Churchill Livingston . pp.173-174.

-**Corvec**, S.; poirel, L.; Decousser, J.; Allouch, P,Y.; Drugeon, H. and Nordmann, P. (2006). Emergence of carbapenem- hydrolysing metallo –B-Lactamase VIM-1 in *pseudomonas aeruginosa* isolate in france. Ciln micrbiol infect,.12: 941-942.

-**Cucarella**, C. ; Tormo, M.A. ; Ubed, C. ; Trotonda, M.P. ; Monzon, M. ; Peris, C. ; Amorena, B. ; Lasa, I. and Penades, J.R. (2004). Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. Infection. *Immun.* 72(4) : 2177-2158.

-Cursino,L.; Smarda,J.;Chartone,E. and Nascimento,A. (2002). Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae Braz.*J. Microbiol*. 33 : 196-217.

-Crosa, J. H.; Tolmasky, M. E.; Actis, L. A. and Falkow, S. (1994). Plasmids: Methods for general and molecular bacteriology". American Society for Microbiology, Washington, 365-386.

D

-Dalhoff, A.; Nasu, T. and Okamoto, K.(2003). Beta-lactamase stability of Faropenem . *J. Anti.microbial. Agents Chemother.*

-Danel,F.;Hall,L;Duke,B;Gur,D. and Livremore,D.(1999) . OXA-17, a further Extnded Spectrum Variant of OXA-10 B-Lactamase isolated from *Ps.aeruginosa . J. Anti.microbial. Agents Chemother*. 43:pp.1362-1366 .

-De Champs,C. ; Bonnet,R. ; Sirot,D. ; Chanal,C. and Sirot,J. (2000). Clinical relevance *of Proteus mirabilis* in hospital patients : a two year survey.J.Antimicrob.Chemother.45:537-539**.**

-De Jong ,A.; Sacha , A. ;Van Hijum,F.; Kok,J. and Kuipers,O. (2006**).** Bacteriocin genome mining tool .Nucleic Acids Research .34(2)234-239**.**

- Deshpande, P.; Rodrigues, C.; shetty, A.; kapadi, F; Hedge, A; and soman, R. (2010). New Delhi Metallo beta Lactamases (NDM-1) in *Enterobacteriaceae:* Treatment option with carbapenems compromised. journal of the Assocaition of physicians of India.

-Dielubanza, E.J. and Schaeffer, A.J. (2011). Urinary tract infections in women.The Medical Clinics of North America 95 (1): 27-41.

-Delzell, J.E. and Lefevre, M.L. (2000). Urinary tract infection during pregnancy. Am. Academy of Family Physicians, 35(3):40-66.

E

-Efstathiou, S. P.; Pefanis, A. V. ; Tsioulos, D. I. ; Zacharos, A. G. ; Tsiakou, A. G. and Mountokalakis, D. T. (2003). Acute pyelonephritis in adults: prediction of mortality and failure of treatment. Archives of Internal Medicine. 163(4): 402-410.

-Ehinmidu, J.O. (2003).Antibiotics susceptibility patterns of urine bacterial isolates in Zaria, Nigeria. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2(2) : 223 – 228.

-El Kholy, A. A. , Gomma, H. E. , Younan, M. A. , Thabet, E. H. , Haleim, M. M. A. , El Anany, M. G.andHendeya, A. A. S.(2011) ; Extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and

Escherichia coli strains in a pediatric teaching hospital in Egypt**.** *Medical Research. J.*, Vol 10 No 1:27–31.

- **Enayat** ,K.;Sohili, F;Salimi,H; Soltan, D.and Mohammad, M .(2011). Frequency, antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Escherichia coli* pathotypes obtained from children with acute diarrhea. *Medical Research. J.*Vol. 4, No. 1 :pp. 23-28.

F

-Filimon,R. and Iacob,E. (2007). Incidence of nosocomial infections at the recovery clinic of Iasi Hospital,in 2004-2005.Rev.Med.Chir.Soc. Med.Nat.Iasi.111(1):255-257.

-Fluit, A.C.; Visser, M.R.; Schmitz, F.J. (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews. Oct. 836-71.

-Forbes, B. A. ;Sahm, D. F. and Wessifeld, A. S. (2002) . Bailey and Scotts' diagnostic microbiology . 9th ed . Mosby . U.S.A. Vol.1:509.

-Foxman, B. ; Gillepie, B. and Koopman, J.(2000) .Risk factors for second urinary tract infection in College Women. Am. J. Epidemiol. 151 : 1194.

-Friedrich , A.W.; Koch , R.; Bielasz ewska , M.; Zhang , W.; Karch , H. and mathys , W. (2005) . Distribution of the urease gene cluster among and urea activity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 lsolateds from humans **.** *J. of Clinical Microbiology* .Vol.43,No. 2 : pp.546-50 .

-Freeman, D.J., Falkiner,F.R. and Keane,C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci**.** *J. Clin. Pathol*. 42:pp.872-874.

-Fuller, M.A. and Sajatovic, M. (2001). Drug Information for Mental Health. Lexi-comp Inc. U.S.A. pp:12-42.

-Furukawa,S. ; Kuchma,S.L. and O,Toole,G.A. (2006). Keeping their options open : acute versus persistent infections. J.Bacteriol .188(4) :1211-1217 .

G

-Gadallah, M.F.;Arora, N.; Arumugam, R. and Moles, K.(2000). Role Of Fogarty Catheter Manipulation In Management Of Migrated, Non Functional Peritonial Dialysis Catheters. Am. J.Kidney Dis. 35.

-Gavin,R. ; Merino,S. ; Altarriba,M. ; Canals,R. ; Shaw,J.G. ;et al. (2003). Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by Aeromonas spp..FEMS Microbiol.Lett.224:77-83.

-Geerlings, S.E.; Meiland, R.; van Lith, E.C.; Brouwer, E.C.; Gaastra, W. and Hoepelman A.I.M. (2002). Adherence of Type 1-Fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial cells. More in diabetic women than in control subjects. The American Diabetes Association, Inc. Diabetes Care; 25: 1405-1409.

-Gordon ,D .M.; O·Brien ,C .L.(2006). Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli* . *J. of Clinical Microbiology* .152:3239-3244.

-Greenwood ,D.; Slack,R. and Peutherer,J.(2000). Medical Microbiology a guide to microbiol infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory diagnosis and control .15th .Ed .Harcourt publisher limited .United kingdom .London.

-Gunawardana, J. (2010). "Bismuth-Ethanedithiol: Apotential Drug to urinary tract Infections of Medical Devices Produced by *Staphylococcus epidermidis & Proteus mirabilis*" . Boca Raton, Florida, USA.

-Gupta, K. ; Hooton, T. M. and Stamm, W. E. (1998). Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community acquired urinary tract infections. *Am. Intern. Med*. 135 :pp. 41 – 50.

H

-Han ,B .; Yu , Z .; Liu ,B.; Ma ,Q. and Zhang ,R.(2011). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* YJG, isolated from the

mucosa of the gut of healthy chickens . J. Microbiology Research .Vol .5(10), :pp.1147-1155.

-Harley, J.P. and Prescott, L.M . (1996) .Labratory Exercises in Microbiology . 3rded .McGraw –Hill publishing company . New York.

-Harshy,R.M. (2003). Bacterial motility on a surface : many ways to common goal.Annu.Rev.Microbiol.57:249-273.

-Hassan, A. ; Usman, J. ; Kaleem, F. ; Omair, M. ; Khalid, A. ; Iqbal, M. (2011). Detection and antibiotic susceptibility pattern of biofilm producing gram positive and gram negative bacteria isolated from a tertiary care hospital of Pakistan. Malaysian J. Microbiol., 7(1), 57-60.

-**Holt**,J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.A.; & Williams, S.T.(1994). Bergys Manual Of Derminative Bacteriology. (9th) ed. Williams & Wilkins.

-Hoşoğlu, S.; Gűndes, S.; kolayli, F.; Karadenizli, A.; Demirdag, K.; Gunagdim, M; Altindis, M; caylan, Randumak, H. (2007). Extended spectrum B-Lactamases in ceftazidime resistance *Echerichia coil* and *Klebsiella pneumoniae* isolatoin Turkesh hospital. Indian J med microbiol. 25(4): 346-350.

-Huang, Z.M. mao, P.H.; chen, Y.; Wu, L. and Wu, J. (2004). Study on the molecular epidemiology of *SHV* Type beta-Lactamases – encoding gene of multiple- drug. Resistant *Acinetobacter baumannii* . Zhonghua Liu xing Bing Xue Za Zhi. 25:425-427.

- **Iroha**, I.R.; Amadi, E.S.; Agabus, A. C. and OJi, A.E. (2008). Susceptibilty pattern of Extended spectrum Beta- Lactamases Producing *Klebsiella pneumoniae* from clinical isolates. Internet Journal of Microbiology., 5(2).

J

-Jabbar ,A . D. (2011). Phenotypic and Genotypic Detection of Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBL) among *Escherichia coli* Isolated from Symptomatic Female's Genital Tract InfectionCollege of Science ,University of Wassit.

-Jacobsen, S.M. ; Stickler, D.J. ; Mobley, H.L.T. and Shirtliff, E.(2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* Clinical Microbial .Vol. 21:26-59 .

-Jacoby,G.A. and Munoz price,L.S. (2005) Mechanisms of disease the new β -Lactamases -new. *Engl. J. Med.* 352(4): 380 -391.

-Jain, A.; Roy, I.; Gupta, M.K.; Kumar, M. and Agarwal, S.K. (2003). Prevalence of extended spectrum betalactamase producing GramNegative bactria in septicaemic neonates in atertarycar hospitale. *J. MedMicrobiol* . Vol. 52,No. 5 :pp. 421-5.

-Jarlier, V.; Nicolas, M.; Fournier, G.; and Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β-Lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis*. Vol.10,No. 4 :pp. 867-78.

-Jawetz, Melnick & Adelberg, S. (1998). Medical Microbiology. (2nd) ed. Middle East Edition, Lebanon.

-Jawetz, E., Brooks, G. F., Butel, J. S. and Morse, S. A. (2004). JawetzMelnick and Adelberg's Medical Microbiology.23th ed. McGrawHill Com., Singapore.

-Jen -Shwu, L; Lai, Ho, S.W.; Luh, K.T.; Wang, W.B. (2000). Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Proteus mirabilis* by P- nitrophenylglycerol. J.Med- Microbiol.49: 723-731.

K

-Kandela, N.J. (2011). Detection of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and Klebocin Production from *Klebsiella pneumoniae* Local Isolates from Urinary Tract Infections. *AJPS*, Vol. 9, No.1.pp.21-42.

-Kareem, S. M. and Bilal ,S.A. (2011). Sensitivity of Bacteria *Escherichia coli* Iisolated fromUrinary Tract Infection toward Ciprofloxacin andLomefloxacin. Ibn AL- Haitham J. For Pure & Appl. Sci. Vol.24 (2).

-Karlowsky, J.A.; Jones, M.E.; Thornsberry, C.; Friedland, I.R.and Sahm, D.F. (2003). Trends in antimicrobial susceptibilities among *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in United States from 1998 to 2001. Antimicrobial. Agents . Chemother. May; 47(5): 1672-80.

-Kasidas G P, Samauell C T & Weir T B. (2004)." Renal stone analysis : why and how?" Annals of clinical Biochemistry . 41:91-97.

-Katzung,B.G.(2001) "Basic & Clinical Pharmacology".8th ed.Lange Medical Books/ McGraw Hill.NewYork.p:222.

-Kaufman, T. and Fairchild, M. (2004). Clinical Microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low Birth-weight infants. Clin. Microbiol. Rev. 17: 638-680.

-Kfoury,J.N.S.; andAraj,G.F.(2003) Recent developments in β-Lactamases and extended spectrum β -Lactamases**.** *Braz. J. Microbiol*. 327: 1209 - 12 13.

-Khurana, S.; Taneja, N.; Sharma, M. (2002). Extended-spectrum beta-lactamase mediated resistance in urinary tract isolates of family *Enterobacteriaceae*. Indian J.Med.Res. Oct.116: 145-9.

-Kim, J.Y.; Park, Y. J.; Kim, S. I.; Kang, M. W.; Lee, S. O.and Lee, K. Y. (2004).Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* producing extended spectrum β-lactamase VEB-1 in a Korean university hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 54:1144–1147.

-Kolmodin, L. A and Brich, D.E. (2002) Polymerase chain reaction basic Principles and routine Practice. PCR cloning Protocol. 2ed Edition Humanapress Inc. USA.

-Krieger,J.N.(2002) UTIs :what,s news?.J.Urol.,168:2351-2358. **-Kucers**, A. ; Crowe, S. M. ; Grayson, M. L. and Hoy, J. F. (1997). The Use of Antibiotics. (5 th) Edition Bath Press, Inc. Britain.

-Koch, A.L., (2000) Penicillin binding proteins β - Lactamase, and Lactamases: offensive, Attacks and counter measures, Microbiol, 26(4): 205-220.

-Koneman, E.W; Allen, S.D; Janda, W.M; Schreckenberger, P.C and Winn, W.C.J.(1992). Color Atlas and Textbook Of Diagnostic Microbiology. (4^{th}) ed. *J.B.Lippincott Company*. Philadelphia.

L

-Lahlaoui, H.; Dahmen, S.mossa, M-B. and omrane, B (2011). First detection of *TEM*-116 extended Spectrum *B*-Lactamase in providencia stuarti isolate from a Tunisian hospital. Indian Journal of Medical Microbiology., 29(3); 258-261.

-Laurence, D.R.; Bennett, P.N.; & Brown, M.J. (1997). Clinical Pharmacology. (8th)ed Churchill Livingstone London.

-Lawlor, M.S.; connor, C.O. and miller, V.L. (2007). Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. infection and Immunity., 75(3): 1463-1472.

-Lee , S .S .; Oh , T .J .; Kim , J .; Kim , J .B . and Lee ,H.S .(2009) .Bacteriocin from Purple Nonsulfur Phototrophic Bacteria, *Rhodobacter capsulatus* . J. Bacteriology and Virology .Vol .39 :269 -276.

-Lee, J. H.; Bae, I.K. and Lee, S.H. (2010) New Defintion of Extended – spectrum *B*-Lactamses conferring Emerging Antibiotic Resistance. Med Res Rev. 10-1002.

-**Leveno**, K.J.; Cunningham, F.G.; Gant, N.F.; Alexander, J.M. Bloom, S.L.; Casey, B.M.; Dashe, J.S.; Sheffield, J.S. and Yost, NP.(2003). Williams manual of obstetrics. McGraw-Hill companies, Inc. New York.

-Li, X.; & Mobley, H.L.T.(2002). Vaccines for *Proteus mirabilis* in urinary tract infection. International Journal of Antimicrobial Agents. 19: 461-5.

-Li, X.; Lockatel, C.V.; Johnson, D.E.; Lane, M.C.; Warren, J.W.&Mobley, H.L.T.(2004). Development of intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by *Proteus mirabilis.* Infect. Immun. Jan. 72(1): 66-75.

-Licopan, N; Mcculloch, J.A.; Reinert, C.; cassettari, V.C.; Gales, A.C. and Mamizuka, E.M. (2005). First Isolation of metallo *B*- Lactamase, producing Multiresistant *Klebsiella Pneumoniae*. From a patient in Brazil . Jouranl of clinical microbiology., 43(1)" 516-519.

-Liu, W.; chen, L.; Li, H.; Dnan, H; Zhana, Y.; Liang, X.; zon, M; Xu, L. and Hawkey, P.M (2008). Novel CTX-M beta Lactamases genotype distribut and speares into multibe spices of Enterobacteriaceae in changshs, southern. J Antimicrob. Doi: 10. 1093/ jac/ dkpo68.

-Ling, J.M.; Lam, A.W.; Chan, E.W.& Cheng, A.F. (2003). What have we learn from community-aquired infections in Hong Kong? J.Antimicrob.Chemother. Apr.51 (4): 895-904.

-Liaw, S.J., Lai, H.C.; Ho, S.W.; Wang, W.B. (2000). Inhibition Of Virulence Factor Expression and Swarming Differentiation In Proteus mirabilis by p-nitrophenylglycerol. J. Med. Microbiology. 49: 725-31**.**

-Liaw, S.J.; Lai, H.C.; Ho, S.W.; Luh, K.T.& Wang, W.B.(2001). Characterization of *p*-nitrophenylglycerol-resistant *Proteus mirabilis* super-swarming mutants. J. Med. Microbiology. 50: 1039-48.

-Liaw, S.J., Lai, H.C.; Ho, S.W.; Luh, K.T.& Wang, W.B. (2003). Role of RsmA in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. Journal of Medical.Microbiology. 52:pp. 19-28.

-Liedle, B. (2001).Catheter-associated urinary tract infections. Curr.Opin.Urol. Jan.11(1):75-9.

- Luzzaro,F. ; Mezzatesta,M. ; Mugnaioli,C. ; Perilli,M. ; Stefani,S. ; *et al.* (2006). Trends in production of extended spectrum β-Lactamases among Enterobacteria of medical interest : report of the second Italian nationwide suvey.*J.Clin. Microbiol.* Vol.44,No .5 :pp.1659-1664.

M

-Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; &Sambrook, J.(1982) Molecular cloning Fourth ed. Cold spring Harbor Laboratory. New York. Book.

-Mathur, T.; S. Singhal; S. Khan; D.J. Upadhyay; T. Fatma; and A. Rattan. (2006). Detection of Biofilm Formation among The Clinical Isolates of Staphylococci: An Evaluation of Three Different Screening Methods**.** *Indian J. Med. Microbiol*. Vol .24,No. 1 :pp.25-29.

-Matsumoto, y.& Inoue. M. (1999). Charactrization of SFO-l- a plasmid-mediated inducible classA β - lactamase from *Enterobacter cloacae*. J. Antimicrob. Agents. Chemoth. 93(2) 307-313.

-Merino,S. ; Shaw,J.G. and Tomas,J.M. (2006). Bacterial lateral flagella : an inducible flagella system . FEMS Microbiol.Lett.263:127-135.

-**Mochon**, A. B. , Garner, O. B. , Hindler, J. A. , Krogstad, P.and Ward, K. W. , Rasheed, J. K. , Anderson, K. F. , Limbago, B. M. and Humphries, R. M. (2011) ; New Delhi Metallo-β-Lactamase (NDM-1)-Producing *Klebsiella*

pneumoniae: Case Report and Laboratory Detection Strategies. *J. Clin. Microbiol.Vol. 49, No.* 4, pp. 1667–1670.

-Muhammad , S.A.(2002). A Bacteriological study on the incidence urinary tract infection in Rizgari Teaching Hospital in Erbil City MSc . Thesis.Univ.ofSalahaddin.

-Mulvey, M.R.; Grant, J.M; plewes, K.; Roscoe, D. and Boyd, D.A. (2011). New Delhi Metalo -*B*- Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Canada. Emerg Infect Disso.1701.101358.

N

-Nashat, N.A.A, Mohammed, N. R. S. and AL- Sharik, M.(2000). Urinary infection in group of Iraqi children. J. Fac. Med. Baghdad. 42(4): 108-112.

-Naas, T.; Benaoudia, F.; Massuard, S. and Nordman, P. (2000). Integron-located VEB-1 extended- spectrum β -Lactamase gene in *a Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. J. Antimicrob. Chemoth. 46: 703-711.

-Nassif,X. and Sansonetti, P.J.(1986). Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* KI and K2 with the presence of plasmid encoding Aerobactin. Infec. Immun. . Vol .54,No. 3 :pp. 603 - 608.

-National Committee For Clinical Laboratory Standareds .(2002). Perfomance Standared For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS. Villanova P.A.

-**National** Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)(2007) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; seventeenth informational supplement . M100 - S17. USA .

-**Nester,** E.W. ; Anderson, D.G. ; Roberts, C.E. ; Pearsall , N. N. and Nester,M.T.(2004). Microbiology.4th . ed. , McGraw-Hill-Comp. Inc.,U.S.A.

-Novais, A.; Baquero, f.; Machado, E.; canton, R.; peixe, l. and coque, T.M. (2010). International spread and persistence of *TEM*-24 is caused by the confluence of highly penetrating enterobacteriaceae clones and incA/C2 plasmid containing tn 1696: Tn / and 1S5075- Tn21. Antimicrob Agents chemother., 54(2): 825-834.

O

-O'Connell,M.(1984). Genetic Transfer in prokaryotes transformation, transduction and conjugation.: 2 -13 in Advanced Molecular Genetic by publisher,A. and Timmis. K. Springer verlug –Berlin J. Microbiol. 54(2).
-Oliveira, C. F.; salla, A.; Lara, V.M; Rleger, A.; Horta, J.A and Alves, S.H. (2010). prevalence of extended- spectrum beta- Lactamases producing Microorganisms in nosocomial and Molecular characteization of *SHV* type isolates. Braz. J. Microbiol. 4 (2).

P

-Peterson,J.W.(2000).Chapter 7 : Bacterial pathogenesis. Baron'medical microbiology, 4th ed. University of Texas. MedicalBranch. Available at. WWW.Fb4d.com.

-Piéboji,J.G. ;Koulla-Shiro,S.;Ngassam,P.; Adiogo,D. ; Njine,T.; (2004). Antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli isolates from inpatients and outpatients at Yaounde Central Hospital, Cameroon.Int.*J.Infect.Dis*. Vol. (8) 3 :pp.147-154.

-Pitout, J. D.D and laupland, K.B. (2008). Extended spectrum β-lactamase producing *enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. Lamcet infect Dis. 8: 159-166.

-Poirel, L.; Thomas, I.; Naas, T.; Karim, A.; and Nordmann, P.(2000) Biochemical sequence analysis of GES-1 a novel class A, extended – spectrum 13 – Lactamase, and the class 1 integron in 52 from *Klebsiella pneumonia*. *Antimicrob. Agents Chemother*. Vol. 44,No. 3 : pp.622-632.

-Post,J.C. ; Stoodley,P. ; Hall-Stoodley,L. and Ehrlich,G.D. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections.Curr.Opin.Otolaryngol. Head Neck Surg.12:185-190.

-Postier,R.G.(2000)Antibiotics-resistant organism infection .American Surgeon.66(2) : 112-116.

-Prescott, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. (2005). Microbiology. 6th ed. McGraw. Hill companies Inc. New York.

R

-Raka, L.; Mulliqi,-Osmani, G.; Berisha, L.; Begolli, L.; Omeragiq, S.; Parsons, L.; Salfinger, M.; Jaka, A.; Kurti, A. and Jakupi, X.(2004). Etiology and susceptibility of urinary tract isolates in Kosova. Int.J.Antimicrob.Agents. Mar.23 (Suppl 1): 2-5.

-Raksha,R.; Srinivasa , H. and Macaden ,R.S.(2003). Occarrence and characterisation of uropathogenic *Escherichia coli* in Urinary Trach Infection . Indian . J . Med . Microbiol .(2):(102 – 107) .

-Ramazanzadeh, R(2010). Etiologic agent and extended spectrum beta-Lactamases production urinary tract infect on in Sanandaj. Iran. Eastern Journal of medician. 15: 57-62.

-Rawat, D and Nair, D. (2010). Extended- Spectrum *B*- Lactamases Gram negative bacteria. J Glob infect Dis., 2(3): 263-274.

-Ruiz, J. (2003). Mechanisins of resistance to quinolones target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 51 :pp. 1109-1117.

-Ruppé, E.; Hem, S.; Lath, S.; Gautier, V.; Ariey, F.; Sarthou, J. L.; Monchy, D. and Arlet, G. (2009). CTX-M β-Lactamases in *Escherichia coli* from Communityacquired Urinary Tract Infections, Cambodia. *Emerg Infect Dis*. 15(5):741-8.

S

-Saharan , B .S .and Nehra , V.(2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review .Life Sciences and Medicine Research :pp.1-30.

-Saiki(1985). Enzymatic amplification of beta-globin sequence and restriction site analysis for diagnossis of sickle cell anemia. Science 230, 1350-4.

-Salih, M . T.,and AL-Ani, N . F. (2013) .Microbiological Aspects in Biofilm Produced by some Uropathogens Isolated from Patients with Indwelling Bladder Catheters. *Raf. J. Sci.*, Vol. 24, No.1. pp. 1-16.

-Sambrook, J; Fritsch, E; Maniatis, T. (1989). Molecular clouinga Laboratory manual. Cold spring harbor Laboratory. New York.

-Samie,A;NKgau.T.F.(2012).Biofilm production and antibiotic Susceptibility Profile of Escherichia Coli isolates from HIV and AIDS patients in The Limpopo province .*Africian Journal Biotechnology* Vol.11,No. 34 :pp.8560-8570.

-Sarika , A . R.; Lipton ,A .P .and Aishwarya ,M .S.(2010). Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions .J . Food Science and Technology .2(5):291-297.

-Sarojamma, V. and Ramakrishna, V. (2011) ; Prevalence of ESBL-Producing Klebsiellapneumoniae Isolates in Tertiary Care Hospital. International Scholarly Research Network . ISRN Microbiology.pp.1-5

-Schmitt, J.; Jacobs, E and Schmidt, H.(2007) . Molecular characterization of extended spectrum beta-Lactamases in Enterobacteriacae from patient of two hospitals in saxong, Germany, J med microbial., 56:241-249.

-Sim, J. (2001). Urinary Tract Infection. Nidus Info. Services, Inc. New York, U.S.A.

-Sligh, J.D.; & Timbury, M.C.(1994). Notes On Medical Bacteriology. Churchill Livingstone Inc. New York.

-Sobia, f.; Shahia, M.; Singh, A.; Kham, H.M.;Shulka, I, and Malik, A. (2011). Occurrence of bla_{AmpC} in cefoxitin- resistant *Escherichia coil* and *Klebsiella pneumonia* isolate from a North india tertiary care hospital. NZJ med Labsci, 65: 00-00.

-Spanu, T.; Luzzaro, F.; Perilli, M.; Amicosanti, G.; Toniolo, A.; Fadda, G. and the Italian ESBL study group .(2002). Occurance of extended-spectrum-B. lactamas and other antimicrobial drug. *Antimicrobial Agent* ***and Chemotherapy***. Jun. Vol .46 ,No. 1 :pp. 196-202.

-Staiman, V.R. and Lowe, F.C. (2001). Urologic problems in patients with acquired immunodeficiency syndrom. J. of Urol. Dis. ,12 (3): 100-112.

-Stocks, E.J.; and Ridway, G.L.(1987).Handling clinical specimens for microbiological studies 5th ed. Churchil living stone. (Cited). Pp.173–201.

-Subha, A.; Devi, V.R.& Ananthana, S. (2003). Amp C beta-lactamase producing multidrug resistant strains of *Klebsiella spp*. & *Escherichia coli* isolated from children under five in Chennai. Indian *J.Med.Res***.** Jan; 117: pp.13-8.

T

-Tavajjohi, Z.; monir, R. and Khorshidi, A. (2011). Detection and characterization of multidrug resistance and extended-spectrum- beta Lactmase produing pseudomonas aeruginosa isolates in teaching hospital., African Journal of microbiology resesarch., 5(20): 3223-3228.

-Tierney, M. Jr. ; Mephee, J. and Papadakis, A. (2003). "Current Medical Diagnosis & Treatment. 42th.ed. McGraw-Hill Comp. , Inc. , U.S.A.

-Todar,K.(2002) Antimicrobial agents used in treatment of infectious disease.citted by: http://www.kfshrc.edu.sa/annals/.

Todar, K. (2002a). Pathogenic E. coli . J. of Becteriology,33: 340-350 . -- **Todorov** ,S. D.(2009). Bacteriocins from Lactobacillus plantarum-Production ,Genetic Organization and mode action .J . Microbiology.40:209-221.

-Tortora, G.J. Funke, D.R. and Case, C.L.(2007). Microbiology . 3rd ed . pearson Education Inc. USA.

-Torzewska, A.; Staczek, P. and Rozalski, A.(2003). Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of *Proteus spp.* endotoxin polysaccharides. J.Med. Microbiology. 52(6): 471-7.

U

-Ueda, Y. & Sunagawa, M.(2003). In vitro and in vivo activity of novel 2-(thiazol-2-ylthio)-1-beta-methylcarbapenemeswith potent activity against multiresistant gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother*. Aug. Vol .47 ,No.(8): pp.2471-8.

V

-Valverde, A.; Coque, t.M.; Sanchez-Moreno, M.P.; Rollan, A.; Baquero, F. and Canton, R. (2004). Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended– spectrum β-lactamase – producing Enterobacteriaceae during non outbreak situations in Spain. *J. Clin. Microbiol*. Vol. **42**,No. 10 :pp.4769-4775 .

-Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuck, G. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO Switzerland.

W

-Walsh, T.R.; Toleman, M.A; poirel, L.. and Nordmann, p. (2005). Metallo B-Lactamases: the Quiet before the storan. Clinical microbiology Reviews., 18(2): 306-325.

-Walsh, TR. (2008). Clinically significant carbapenemase. An update. Curropin Infect Dis., 21:367-371.

-WHO. (1978). Techniques for the detection of β – Lactamase producing strains *ofneisseriagonorrhoeae*. 616:pp. 137 – 143.

-Wong,A.L.;Pang,M.W. and Yip,S.K.(2005) UTI in women: agynaecologist, s /obstetrician,s perspective. *J. Clin. Microbiol*.,39:39-42.

Y

-Yan, J.J.; Ko, W.C. and Wu, J.J (2001). Identification of a plasmid Encoding SHV-12 , TEM-1, and Variant of IMP-2 metallo -B-Lactamases, IPM-8, from a clinical Isolate of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents chemother., 45(8): 2368-2371.

-Yan , J.J. ; Hsueh, P.R. ; Ko, W.C. ; Luh, K.T. ; Tsai, S.H. ; Wu, H.M. and Wu, J.J. (2006). Metallo-beta-lactamase in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM -3 , a novel variant of the VIM-2 enzyme . Antimicrob . AgentsChemother . 45:2224-2228.

Z

-Zarfel, G.; Hoenigl, M.; Leitner, E.; salzar, H.J.F.; Masoud, L. et al. (2011). Emergence of New Delhi metallo B- Lactamases, Austria., Emerg infect Dis., Dol: 10: 10.2201/eid1 701.101331.

ملحق رقم (١)

استمارة معلومات خاصة بالمرضى

حقل المعلومات:

١- رقم العينة Sample number :

٢- تاريخ اخذ العينة :

٣- الاسم Name :

٤- العمر Date of birth :

٥- الجنس Sex :

٦- الحالة الاجتماعية :

٧- السكن :

٨- هل الشخص يعاني من مرض معين ( )

٩- هل تم تناول أي علاج قبل الفحص لا = ,نعم = نوعه=

ملحق(٢) نتائج التشخيص بأستخدام اشرطة نظام API 20 E



١- نتائج تشخيص بكتيريا *E.coli* بأستخدام نظام Api20 E



٢- نتائج تشخيص بكتيريا *K.pneumoniae* بأستخدام نظام Api20 E



٣-نتائج تشخيص بكتيريا *Ps.aeruginosa* بأستخدام نظام Api20 E



٤-نتائج تشخيص بكتيريا *Proteus mirabilis* بأستخدام نظام Api20 E



٥-نتائج تشخيص بكتيريا *Enterobacter cloacae* بأستخدام نظام Api20 E

ملحق (٣) مقاومة عزلات البكتريا قيد الدراسة للمضادات الحيوية المختلفة.

رقم العزلة	AT	PRL	CAZ	CTX	IMP	AMC
1	S	R	S	S	S	R
2	S	R	S	S	S	R
3	R	R	R	R	R	R
4	R	R	I	I	S	R
5	I	R	R	I	S	R
6	R	R	R	R	S	R
7	R	R	R	R	S	R
8	R	S	I	I	R	R
9	R	R	R	R	S	R
10	S	R	R	R	S	R
11	S	R	I	R	S	R
12	I	R	R	R	R	R
13	S	I	S	S	S	R

R	S	R	R	R	R	14
R	S	R	R	R	R	15
R	S	R	R	R	R	16
R	S	R	R	R	R	17
R	S	R	R	R	R	18
R	S	R	R	R	R	19
R	S	R	R	R	R	20
R	S	R	R	R	R	21
R	S	R	R	R	R	22
I	S	I	I	R	S	23
R	S	R	R	I	S	24
R	S	R	R	R	S	25
R	S	R	R	R	R	26
R	S	R	R	R	R	27
R	S	R	R	R	R	28
R	S	R	R	R	R	29
R	S	R	R	R	R	30
R	S	R	R	R	R	31
R	S	S	S	R	S	32
R	S	R	I	R	I	33
S	S	R	S	S	S	34
I	S	R	R	R	R	35
I	S	R	R	R	R	36
S	S	R	R	R	I	37
R	S	R	R	R	R	38
R	S	S	S	R	S	39
R	R	R	R	R	R	40
I	S	I	R	S	I	41
R	S	R	R	R	R	42
R	R	R	S	R	S	43
R	S	R	R	R	R	44
R	S	R	R	R	R	45
I	S	I	R	S	R	46
I	R	R	R	R	R	47