وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية التربية – قسم علوم الحياة

دراسة جزيئية مقارنة لحساسية جرثومتي *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus mirabilis* لعدد من المضادات الحيوية والمستخلصات النباتية

رسال مقدمة الى

مجلس كلية التربية – جامعة القادسية

وهي من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة/ الأحياء المجهرية

من قبل

سجاد كاظم حسين الفحام

إشراف

أ.م. علي عبد الرحيم الناشيّ

2017م ١٤٣٨

توصيه المشرف

أشهد بأن الرسالة الموسومة بـ دراسة جزيئية مقارنة لحساسية جرثومتي *Proteus mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa* لعدد من المضادات الحيوية والمستخلصات النباتية) قد أعدها الطالب سجاد كاظم حسين بأشرافي ، وهي من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة \ أحياء مجهرية.

التوقيع :

الاسم : علي عبد الرحيم الناشي

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية – جامعة القادسية

التاريخ : \ \ ٢٠١٧

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إستناداً إلى التوصية أعلاه التي قدمها الأستاذ المشرف، أُحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: د. رائد كاظم عبد

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية - جامعة القادسية

التاريخ: / /٢٠١٧

توصية المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة (دراسة جزيئية مقارنة لحساسية جرثومتي Proteus mirabilis و Pseudomonas aeruginosa لعدد من المضادات الحيوية والمستخلصات النباتية) قد راجعتها لغويا وصححت ما ورد فيها من أخطاء لغوية وأسلوبية وأصبحت الرسالة بذلك مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بالسلامة اللغوية .

التوقيع:

الاسم: خالد عبد فزاع

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية - جامعة القادسية

التاريخ: / /2016

قرار لجنة المناقشة

نشهد إننا أعضاء لجنة المناقشة قد اطلعنا على هذه الدراسة الموسومة (دراسة جزينية مقارنة لحساسية جرثومتي ***Proteus mirabilis*** و ***Pseudomonas aeruginosa*** **لعدد من المضادات الحيوية والمستخلصات النباتية)** وقد ناقشنا الطالب سجاد كاظم حسين في محتوياتها وفيما له علاقة بها نعتقد بأنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / أحياء مجهرية بتقدير (امتياز).

رئيس اللجنة
التوقيع :
الاسم : د. مهدي حسين محيل
المرتبة العلمية : استاذ
جامعة الكوفة / كلية العلوم
التاريخ : / / ٢٠١٧

عضو اللجنة
التوقيع :
الاسم : د. ماجد كاظم عبود
المرتبة العلمية : استاذ
جامعة القادسية / كلية التربية
التاريخ: / / ٢٠١٧

عضو اللجنة
التوقيع :
الاسم: د. آلاء عباس فاهم
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
جامعة القادسية/كلية العلوم
التاريخ: / / ٢٠١٧

عضو اللجنة (المشرف)
التوقيع :
الاسم : علي عبد رحيم الناشي
جامعة القادسية / كلية التربية
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
التاريخ: / / ٢٠١٧

مصادقة عمادة كلية التربية
التوقيع :
الاسم : د. خالد جواد العادلي
المرتبة العلمية : أستاذ
التاريخ : ٢٠/٥/ ٢٠١٧

قائمة المحتويات

التسلسل	العنوان	رقم الصفحة
1	المقدمة	1
الفصل الثاني : استعراض المراجع		
2	استعراض المراجع	4
1-2	بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*	4
1-1-2	التصنيف الكامل لبكتريا *P. aeruginosa*	6
2-1-2	وبائية وإمراضيه بكتريا *P. aeruginosa*	6
3-1-2	عوامل الضراوة virulence factors	8
4-1-2	مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية	11
1-4-1-2	ميكانيكية المقاومة في بكتريا *P. aeruginosa*	12
1-1-4-1-2	انتاج انزيمات β- lactamases	12
2-1-4-1-2	تحوير في جزيئة المضاد الحيوي Modifying of antibiotic molecule	14
3-1-4-1-2	تحوير هدف المضاد الحيوي Antibiotic target modification	15
4-1-4-1-2	المقاومة بتغير حاجز النفاذية The resistance by changing the permeability barrier of the cell wall	15
2-2	بكتريا المتقلبات الرائعة *Proteus mirabilis*	16
1-2-2	إمراضيه البكتريا *P. mirabilis*	17
2-2-2	عوامل الضراوة virulence factors	18
3-2	النباتات الطبية والاحياء المجهرية The medical plants & microorganisms	21
1-3-2	نبات الزنجبيل *Zingiber officinale*	22
2-3-2	نبات السماق *Rhus coriaria*	24
3-3-2	نبات الرمان *Punica granatum*	25
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل		
3	الواد وطرق العمل Materials & methods	27
1-3	المواد Materials	27
1-1-3	الاجهزة المخبرية Instruments	27
2-1-3	الادوات المختبرية Equipments	28
3-1-3	المواد الكيميائية Chemical materials	29
4-1-3	الاوساط الزرعية Culture media	30
5-1-3	النباتات الطبية	31
6-1-3	المضادات الحيوية Antibiotics	32
7-1-3	العدد التشخيصية Diagnostic kits	33
8-1-3	البادئات Primers	34
2-3	طرق العمل Methods	35
1-2-3	التعقيم Sterilization	35
2-2-3	المحاليل والكواشف والصبغات Solutions , Reagents & Pigments	35
3-2-3	الاوساط الزرعية Culture media	39
1-3-2-3	الاوساط الجاهزة Standard media	39
2-3-2-3	الاوساط التحضيرية Prepared media	39
3-3	جمع العينات Speciments Collection	40
4-3	العزل والتشخيص الجرثومي	41

1-4-3	العزل isolation	41
2-4-3	التشخيص Identification	41
5-3	جميع عينات النباتات الطبية المختبرة	45
1-5-3	تحضير المستخلصات النباتية The preparation of plants extractions	45
2-5-3	تعقيم المستخلصات النباتية المائية والكحولية	46
3-5-3	تحضير التراكيز المختلفة للمستخلصات النباتية	46
6-3	تأثير المستخلصات النباتية في الجرثومي	47
7-3	تحديد قيمة التركيز المثبط الادنى MIC	47
8-3	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	48
9-3	فحص تفاعل سلسلة البلمرة	48
10-3	التحليل الإحصائي Statistical analysis	52
	الفصل الرابع : النتائج والمناقشة	
1-4	العزل والتشخيص Isolation and identification	53
2-4	حساسية البكتريا للمضادات الحياتية Antibiotic Sensitivity Test	57
3-4	الكشف الاستدلالي عن المواد الفعالة في المستخلصات النباتية	64
1-3-4	مستخلصات قشور الرمان	65
2-3-4	مستخلصات جذور الزنجبيل	67
3-3-4	مستخلصات ثمار السماق	69
4-4	تحديد التركيز الادنى المثبط Minimum Inhibitory concentration (MIC)	73
5-4	الدراسة الجزيئية: تفاعل البلمرة Polymerase chain reaction	76
A-5-4	الكشف الجزيئي عن جين (*nfsA* gene)	76
B-5-4	الكشف الجزيئي عن جين (blaP1b gene)	78
C-5-4	الكشف الجزيئي عن جين (*tetA* gene)	80
D-5-4	الكشف الجزيئي عن جين (*Tri gene*)	82
E-5-4	الكشف الجزيئي عن جين (ADP gene)	84
F-5-4	الكشف الجزيئي عن جين (qnr gene)	86
	الفصل الخامس : الاستنتاجات والتوصيات	
1-5	الاستنتاجات	89
2-5	التوصيات	90
	المصادر	
	الملاحق	

قائمة الجداول

1-3	الأجهزة المختبرية المستعملة في الدراسة والشركات المصنعة لها	29
2-3	الأدوات المختبرية المستعملة في الدراسة والشركات المصنعة لها	30
3-3	المواد الكيمياوية المستعملة في الدراسة والشركات المصنعة لها	31
4-3	الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة والشركات المصنعة لها	33
5-3	النباتات الطبية المستعملة في الدراسة	34
6-3	المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة واقطار الحساسية والمقاومة المثبتة في الجداول القياسية في NCCL	34

7-3	العدد التشخيصية المستخدمة في الدراسة والشركات المصنعة لها	35
8-3	البادئات المستعملة في الفحص الجزيئي PCR	36
9-3	الأوساط الزرعية الجاهزة المستعملة في التجارب الميكروبية	39
1-4	عدد ونسبة العينات ذات النمو الجوهري وغير الجوهري تبعاً لمصدر العزل	54
2-4	العينات السريرية ذات النمو الجوهري وغير الجوهري موزعة بحسب الجنس	55
3-4 أ	الفحوصات الكيموحيوية المستعملة في تشخيص بكتريا *P. aeruginosa* وبكتريا *P. mirabilis*	57
3-4 ب	الأختبارات الكيموحيوية التي يتضمنها نظام Api20E	57
4-4	المضادات الحيوية المستعملة في أختبارات الحساسية	61
5-4	معدل أقطار تثبيط نمو عزلات *P. mierablis* بتأثير المضادات الحيوية	62
6-4	اقطار تثبيط النمو للمضادات الحيوية تجاه جرثومة *P. aeruginosa*	63
7-4	الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة طبياً والمضادة للبكتريا في المستخلص الخام للنبات	64
8-4	تأثير المستخلصات المائية والكحولية في نمو بكتريا *P. mirabilis*	71
9-4	تأثير المستخلصات المائية والكحولية في نمو بكتريا *P. aeruginosa*	72
10-4	التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلصات النباتية تجاه بكتريا *P. mirabilis* المأخوذة من حالات سريرية مختلفة	75
11-4	التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلصات النباتية تجاه بكتريا *P. aeruginosa* المأخوذة من حالات سريرية مختلفة	76

قائمة الأشكال

1-4	عدد ونسبة ذات النمو الجوهري وغير الجوهري تبعاً لمصدر العزل	54
2-4	العينات السريرية ذات النمو الجوهري وغير الجوهري موزعة بحسب الجنس	55
3-4	النسب المؤية لمقاومة المضادات الحيوية في بكتريا *P. mirabilis*	59
4-4	النسب المؤية لمقاومة المضادات الحيوية في بكتريا *P. aeruginosa*	60
5-4	إختبار الحساسية تجاه المضادات الحيوية في بكتريا *P. aeruginosa* و *P. mirabilis*	63
6-4	تأثير المستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان في نمو بكتريا *P. miribilis* و*P. aeruginosa*	67
7-4	تأثير المستخلصات المائية والكحولية لجذور نبات الزنجبيل في نمو بكتريا *P. miribilis* و *P. aeruginosa*	69
8-4	تأثير المستخلصات المائية والكحولية لثمار السماق في نمو بكتريا *P. miribilis* و *P. aeruginosa*	71
9-4	الترحيل الكهربائي لهلام الاكروز والحاوي على نتائج فحص PCR والخاص بتحديد جين المقاومة للمضاد الحيوي Nitrofurantoin (*nfsA* gene) resistance gene في جرثومة *Pseudomonas aeruginosa*	77

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة لإختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات المائية والكحولية (بإستعمال الإيثانول) لقشور ثمار الرمان وثمار السماق وجذور الزنجبيل تجاه نوعين من البكتريا هما: *Proteus mirabilis* و*Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من حالات سريرية مختلفة ، كما تم الكشف عن المركبات الكيميائية الطبيعية الفعالة المضادة للجراثيم التي تحويها المستخلصات النباتية المحضرة .

جمعت 290 عينة من الأشخاص المراجعين والراقدين في مستشفى الديوانية التعليمي ومن حالات سريرية شملت عينات مختلفة من جسم الإنسان المريض وهي الأذن، والجروح، والقشع، والإدرار ، والبراز للمدة من بداية أيلول 2015 ولغاية 25 كانون الثاني 2016 ، توزعت على 123 عينة مصدرها الذكور و167عينة مصدرها الإناث. وقد بلغ العدد الكلي للعزلات الجرثومية 278عزلة ، كان عدد العزلات الجرثومية التي مصدرها الإناث هي الأعلى إذ بلغ 159 (57.58%) مقارنة بالذكور الذي بلغ 119 (41.03%) كما بلغت عزلات جراثيم *P. aeruginosa* 19 (6.55%) توزعت على 9 (3.10%) و10 (3.44%) للذكور والإناث على التوالي ولجراثيم *P. mirabilis* 24 (8.27%) توزعت على 10 (3.44%) و 14 (4.82%) للذكور والإناث على التوالي.

أختبرت حساسية العزلات الجرثومية تجاه 15 مضاداً حيوياً متداولة في المؤسسات الصحية وتباينت الحساسية والمقاومة حسب طبيعة المضاد و نوع العزلة الجرثومية المختبرة و قد تميزت عزلات *P. aeruginosa* بمقاومتها العالية تجاه مضادات Trimethoprim ، Nitrufuration ، Naldixic acid ، Rifampin ، Tetracycline ، Pepracilin إذ بلغت (100% ، 100% ، 100% ، 94.73%، 89.47%، 84.21%) على التوالي بينما كانت جميع عزلات هذه الجراثيم حساسة تماماً تجاه مضادات Amikacin ، Ofloxacin و Imipenem إذ كانت المقاومة الجرثومية ضد كل منهم (0%). أعطت عزلات *P. mirabilis* مقاومة عالية تجاه مضادات Trimethoprim، Nitrufuration ، Rifampin ، Naldixic acid ، Pepracilin و Tetracycline إذ بلغت (100% ، 100% ، 100% ، 95.83% ، 91.66% ، 87.5%) على التوالي .

في حين كانت جميع عزلات هذه الجراثيم حساسة تماماً للمضاد Imipenem إذ بلغت المقاومة (0%) كما كانت عزلاتها حساسة تجاه المضادات Amoxicillin-Clavunic acid ، Amikacin و Amoxicillin إذ بلغت المقاومة لكل منها (4.16%).

أظهرت المستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان ، وجذور الزنجبيل ، وثمار السماق فعالية تثبيطية مؤثرة تجاه العزلات الجرثومية وكانت الفعالية تختلف حسب نوع العزلات الجرثومية وطبيعة المستخلص وإن الفعالية التثبيطية تناسبت طردياً مع زيادة التركيز ، فعند التركيز25 ملغم\مل للمستخلصات النباتية كان أفضل المستخلصات المائية فعالية تجاه عزلات *P. mirabilis* هو مستخلص ثمار السماق إذ بلغ قطر التثبيط (12.53) ملم وأفضل المستخلصات الكحولية هو مستخلص قشور الرمان وجذور الزنجبيل إذ بلغ قطر التثبيط لكل منهما (13.1) ملم.

أما عند التركيز 50 ملغم\مل فكانت المستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان هي الأكثر فعالية إذ بلغت أقطار التثبيط لهما (14.83 و 17.66) ملم على التوالي أما عند التركيز 100ملغم\مل فقد حافظت المستخلصات المائية والكحولية على تفوقهما إذ بلغت أقطار التثبيط لهما (21و23) ملم على التوالي كذلك كانت المستخلصات الكحولية لثمار السماق متميزة إذ بلغ قطر التثبيط (23) ملم تجاه عزلات *P. mirabilis* .

أظهرت نتائج المستخلصات المائية والكحولية فعالية تثبيطية مختلفة تجاه عزلات *P. aeruginosa* فعند التركيز 25 ملغم\مل كانت مستخلصات جذور الزنجبيل المائية والكحولية هي الأعلى فعالية إذ بلغت اقطار التثبيط (12.71 و 14.13) ملم على التوالي .

أما عند التركيز 50 ملغم\مل فقد اختلف التأثير حيث كانت أعلى فعالية للمستخلص المائي من نصيب مستخلص ثمار السماق بينما المستخلص الكحولي لقشور الرمان قد أستأثر بأعلى فعالية تجاه عزلات *P. aeruginosa* .في حين عند التركيز 100 ملغم\مل كانت الفعالية التثبيطية المتميزة من نصيب المستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان إذ بلغت أقطار التثبيط (20.26 و 22.02) ملم على التوالي .

كانت التراكيز المثبطة الدنيا للمستخلصات المائية والكحولية تجاه العزلات الجرثومية المعاملة متباينة في قيمها تبعاً لنوع المستخلص وطبيعة النبات والمصدر السريري الذي أُخذت منه العينات الجرثومية . كان التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان هي الأكثر فعالية تثبيطية تجاه عزلات *P. mirabilis* إذ سجل أدنى التراكيز المؤثرة للمستخلصات المائية والكحولية إذ بلغ المعدل (0.104 و 0.130) ملغم\مل على التوالي . أما التراكيز المثبطة الدنيا للمستخلصات النباتية تجاه عزلات *P. aeruginosa* فقد سجل المستخلص المائي أدنى قيمة للتركيز المثبط الأدنى إذ بلغ المعدل (0.430) ملغم\مل وضمن المستخلصات الكحولية كان المستخلص الكحولي لجذور الزنجبيل هو الأعلى فعالية تثبيطية حيث أعطى أدنى قيمة للتركيز المثبط الأدنى مؤثرة على عزلات *P. aeruginosa* مقارنة مع غيره من المستخلصات الكحولية إذ بلغ معدل التركيز(0.125) ملغم\مل .

تم الكشف عن مجموعة من جينات المقاومة بواسطة تقنية PCR وتم تحديد الجينات المسؤولة عن صفة المقاومة الجرثومية لعزلات كل من بكتريا *P. mirabilis* وبكتريا *P. aeruginosa* تجاه مضادات Nitrofurantoin ، Piperacillin ، Tetracycline ، Trimethoprim ، Rifampicin و Nalidix acid ، إذ وجد إن الجين (*nfsA*) المسؤول عن صفة المقاومة تجاه المضاد الحيوي Nitrofuration موجود في 17 عزلة من أصل 19 عزلة في بكتريا *P. aeruginosa* بنسبة 89.47% بينما كان الجين (*blaP1b*) المسؤول عن صفة المقاومة تجاه المضاد الحيوي Pipracillin موجود في 9 عزلات من أصل 19 عزلة بنسبة 47.37% في حين كان الجين (*tetA*) المسؤول عن صفة المقاومة تجاه المضاد الحيوي Tetracycline موجود في 10 عزلات من أصل 19 عزلة بنسبة 52.63% ، اما بالنسبة للجين(ADP) المسؤول من صفة المقاومة تجاه المضاد الحيوي Rifampin فقد وجد في جميع العزلات بنسبة 100% وكذلك الأمر بالنسبة لجين (*qnr*) المسؤول عن صفة المقاومة تجاه المضاد الحيوي Naldixic acid ، أما جين (*tri*) المسؤول عن صفة المقاومة تجاه المضاد الحيوي Trimethoprim فقد وجد في 8 عزلات من أصل 19 عزلة وبنسبة 42.1% .

كما تم الكشف عن الجينات المسؤول عن صفة المقاومة الجرثومية لعزلات بكتريا *P. mirabilis* ووجد أن الجين (*nfsa*) موجود في 20 عزلة من اصل 24 عزلة بنسبة 83.33% ، والجين (*blaP1b*) موجود في 7 عزلات من اصل 24 عزلة بنسبة 29.166%،أما بالنسبة لجين (*tetA*) فقدوجد في 23عزلة من اصل 24عزلة بنسبة 95.833%،وكذلك الأمر بالنسبة للجين (*tri*) و الجين (*ADP*)، كما وجد الجين (*qnr*) في 11 عزلة من أصل 24 عزلة بنسبة 45.833%.

المقدمة Introduction:

إن العلاج بالمضادات الحيوية من أهم وسائل السيطرة ضد حالات الإصابة بالأحياء المجهرية الممرضة ، إلا إنه بعض السلالات تكتسب خصائص المقاومة لهذه المضادات الحيوية و إن هذه المقاومة قابلة للإنتقال إلى الأجيال اللاحقة بطرائق مختلفة ومنها نقل جينات المقاومة (Uwaezuoke & Aririatu.,2004) . وبالنظر للأضرار الجانبية التي يسببها الإستعمال الواسع على جسم الأنسان والحيوان لهذه المضادات تطلب الأمر البحث عن مركبات ذات تأثيرات جانبية أقل ضرراً إذ أستعملت بعض الأعشاب والنباتات الطبية التي لها تأثير علاجي مفيد يكون بديلاً عن المضادات الحيوية (Mousa & Baker.,2001). ولهذا تم إجراء العديد من البحوث في إستعمال المستخلصات النباتية كعوامل مضادة تجاه الجراثيم ، إذ إن التأثيرات التثبيطية لبعض هذه النباتات والأعشاب الطبية تجاه الجراثيم الممرضة قد يعود الى أحد مركباتها الطبية الفعالة المضادة للجراثيم وتتميز المركبات الفعالة في النباتات الطبية لكونها جزيئات معقدة ، ومن الصعوبة بمكان إنتاجها مختبرياً إذ تكلف مبالغ كبيرة مما يفقدها عامل الجدوى من إنتاجها ، لذلك كانت الطريقة الأفضل في إنتاج هذه المواد هو الإهتمام بزراعة هذه الأعشاب والنباتات واستغلال مستخلصاتها المختلفة (Ahmet *et al.*,2010) .

إن بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من الأحياء المسببة للكثير من الأخماج ، ويمكن عزلها من البيئات الرطبة مثل: التربة ، والماء ، وقنوات تصريف المياه وتتميز هذه الجراثيم أيضاً بالمقاومة العالية للمضادات الحيوية والمواد المعقمة والمطهرة والعوامل الفيزيائية مثل: الرطوبة ، و الجفاف ، و الحرارة ، وإن المقاومة التي تبديها هذه الجراثيم تجاه المضادات الحيوية يعود لامتلاكها آليات أيضية عالية للمقاومة تتمثل بإنتاج إنزيمات يمكنها كسر جزيئات المضادات الحيوية وتحويرها وتحويلها الى مواد غير فعالة وغيرها من القدرات الفسلجية التي تتسبب في عدم فاعلية المضادات الحيوية في مكافحة المسببات المرضية ، وهذا ما دفع الباحثين ومراكز الدراسات للبحث عن طرائق ومواد أخرى لمكافحة الجراثيم (Fraimow & Abrutyn ,1995) .

إن بكتريا *P. aeruginosa* هي النوع الأكثر شيوعا بين الأنواع التابعة لجنس الزوائف ، و تشكل النسبة الأعلى كمسبب للإصابات بين المرضى الراقدين في المستشفيات خصوصاً المرضى المصابين بمتلازمة نقص المناعة المكتسبة Acquired immunodeficiency syndrom (AIDS)ومرضى السرطان ، وتصيب أيضاً المرضى الذين يعانون من أخماج الجروح والحروق ، كما إن هذه الجراثيم قادرة على غزو واستيطان أنسجة الجسم ودخول جهاز الدوران مسببة تجرثم الدم (Bacteriemia) (Davy and O'Tool,2000).

تتميز جراثيم *Proteus mirabilis* بكونها جراثيم ممرضة إنتهازية تتسبب في الكثير من الأحيان في التهابات المجاري البولية (Swierzko *et al.*,2000) ، ويمكن عزلها من إصابات الحروق، والتهاب الأذن الوسطى و أخماج الجروح و تسبب أيضاً التهابات المثانة ، التهابات الكلية وتجرثم الدم ويمكنها أن تتسبب في إصابات ذات الرئة، وإن التركيز على دراسة هذا النوع من الجراثيم بسبب ما يملكه من آليات ضراوة تمكنه من التسبب بالعديد من الإصابات المرضية ، إذ تظهر في هذا النوع الجرثومي ظاهرة الإنثيال (Swarming) التي تساعد هذه

الجراثيم في الإستيطان والإنتشار الواسع في منطقة الإصابة ويعتبر عامل الإلتصاق من عوامل الضراوة المهمة فيها، بالإضافة الى الدور الذي تقوم به في تكوين الحصى البولية (Urolithiasis) في المثانة والكلى ، ووجد إن لهذه الجراثيم دور في إلتهاب المفاصل (Reactive Arthritis) (Alazzwi *et al.*,2011) .

2. إستعراض المراجع Literatures Review:

2-1- بكتريا الزوائف الزنجارية *Psedumonas aeruginosa*

تعود هذه الجراثيم إلى جنس *Pseudomonas* ضمن العائلة Pseudomonadaceae ، التي تضم أجناساً متعددة أخرى أهمها *Azomonas*، *Azotolocter* ، *Cellvilorio* ، *Mesophilobacter* ، *Rhizobaeter* ، *Rugamonas* ، وتنضوي الأنواع التابعة لجنس *Pseudomonas* في خمس مجاميع جرثومية ويعود النوع *P. aeruginosa* الى المجموعة الأولى من النظام الثاني للتصنيف وهو النوع المثالي لمجموعته و التي تضم إثنا عشر نوعاً آخر (Japoni *et al.*,2009).

هي عصيات سالبة لملون كرام ، متحركة بواسطة سوط قطبي وحيد (Unipolar flagellum) ، أبعادها تتراوح بين (0.5 – 0.8) و (1.5–3) مايكرومتر، غير مكونة للسبورات، درجة الحرارة المثلى لنموها هي 37 م°، قدرتها على النمو عند درجة حرارة 42 م° هو ما يميزها عن أنواع أخرى لنفس الجنس وهي غير قادرة على النمو عند درجة حرارة 5م°، كما يمكن تشخيصها بصورة أولية من خلال رائحة مستعمراتها النامية على الوسط الزرعي أكار الدم و ذات رائحة تشبه رائحة العنب (Grap-like odor) وهي ذات بريق معدني (Metalic sheen) (Horn *et al.*,2010). توصف معظم سلالاتها بأنها إجبارية هوائية (Obligate aerobic)، لكن لوحظ إن بعضها إختيارية لاهوائية (Facultative anaerobs) إذ تستطيع النمو عند حدوث إنخفاض جزئي أو كلي للأوكسجين، كما إنها قادرة على النمو في ظروف لاهوائية في حالة توفر النترات NO_3 كمستقبل نهائي للأكترون في السلسلة التنفسية بدلاً من الأوكسجين (Anon,2008).

Class : Gamma Proteobacteria

Order : Pseudomonadales

Family : Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Species : *aeruginosa*

2-1-2- وبائية وامراضية بكتريا *P. aeruginosa*

تعد هذه الجرثومة من الممرضات الإنتهازية وبصورة رئيسة في أخماج السبيلين التنفسي والبولي والجروح ، والحروق (Garbe *et al.*,2010)، وكذلك هي من مسببات خمج المستشفيات الحاد والمزمن (Chronic and acute nosocomial infections) وخاصة في المرضى ضعيفي المناعة ، إذ تمتاز بقدرتها على البقاء حية في ظروف بيئية مختلفة فضلاً عن مقاومتها للعديد من المضادات الحياتية مما يمكنها من

الإستيطان والتكاثر داخل النسيج المتضرر بكفاءة وهذا بدوره يقود الى حالات الإنتان الجهازي (Systemic sepsis) مؤدية الى الوفاة (Hashimoto *et al* , 2009).

كما تعد هذه الجرثومة مسبباً مهماً لخمج الجروح ، وجروح ما بعد العمليات الجراحية (Post-operative wound infections). إذ وجد Masaadeh (2009) إن حوالي 27.8% من حالات خمج جروح العمليات الجراحية تسببها بكتريا *P. aeruginosa* وتشترك معها جراثيم أخرى بنسب أقل هي : *Escherichia coli* بنسبة 15.6%، *Staphylococcus aureus* بنسبة14.7%، *Acinctobacter calcoaceticus* بنسبة 13.0%، *Kclebsilla sp* بنسبة12.1%، *Proteus sp* بنسبة 6.0%، *Citrobacter fruendii* بنسبة 3.4%، *Streptococcus pyogenes* بنسبة 2.6% و *Enterococces faecalis* بنسبة 2.61% .

تعد هذه الجراثيم المسبب العام لإلتهابات الجلد (Dermatitis) وبصيلات الشعر (Follicutitis) و ينتشر مثل هذا النوع من الإصابات عن طريق المياه من خلال إستخدام البرك والحمامات المعدنية (Corazza *et al.*,2003). وعن طريق ملامستها للبشرة إذ يصبح بإمكانها الدخول الى بصيلات الشعر وبهذا ستبدأ بالتكاثر وإنتاج السموم والتي تعتبر مسبباً للإلتهابات ، وإن الأربية (Groin) والإبط (Armpits) ومناطق الجسم المغطاة بزي السباحة هي أغلب المناطق عرضة للإصابة بتلك الإلتهابات الجلدية وإلتهابات بصيلات الشعر، إذ سجلت حالات تفشي الإصابة عن طريق المياه خلال سنة (1996) من قبل المركز الأمريكي للسيطرة على الأمراض (U.S centers for Disease control & Prevention)، وإن حوالي 25% من تلك الحالات كانت التهابات جلدية متمثلة بالحكة والتقرحات الجلدية، أغلبها كان سببه جراثيم *P. aeruginosa* فضلاً عن كون تلك الحالات ناتجة عن السباحة في الحمامات المعدنية (Anon,) . 2000

هذه البكتريا مسبب شائع للأخماج التنفسية الحادة (Acute respiratory infections) في كل من المرضى الذين يستخدمون البخاخات (Ventilated patient) والمرضى من ضعيفي المناعة وذوي الأخماج التنفسية المزمنة والتليف الكيسي (Cystic fibrosis) (Kipnis *et al.*, 2006). كذلك تسبب إلتهاب القصبات (Bronchiectasis) (Yoon, 2010). إذ وجد إن الإصابة بهذا الممرض يحدث في أكثر من 80% من مرضى التليف الكيسي والتي تؤدي الى فقدان الرئة لوظائفها وحدوث الموت المبكر (Nazik *et al*., 2007).

وتعد هذه الجرثومة من اكثرالمسببات لذات الرئة المكتسبة من المستشفى (Hospital acquired Pneumonia) (Hauser *et al*.,2002). ويعد هذا المرض واحداً من الأمراض الجرثومية التي تتسبب بحالات الوفاة ، ويعود فشل محاولات العلاج لهذا المرض لقابلية الجراثيم المسببة له في مقاومة العديد من العلاجات (Hauser *et al* .,2002).فضلاً عن شدة الإصابة ومعدلاتها العالية (Kipnis *et al* .,2006). وربما يعود السبب الى إن إستخدام المضادات الحيوية يغير في النبيت البكتيري الطبيعي (Bacterial normal flora) المتواجد في السبيل التنفسي العلوي وبهذا يستطيع الممرض الذي أكتسبه المريض من المستشفى أن يحدث مرض ذات الرئة تدريجياً (Hauser *et al* .,2002).

تعد البكتريا *P. aeruginosa* المسبب الأكثر شيوعاً لخمج السبيل البولي للإنسان طوال فترة حياته، وكذلك تسبب خمج السبيل البولي المكتسب من المستشفى وقد ينتج الأخير من جراء العمليات

الجراحية والقثطرة طويلة الأمد (Long term indwelling catherterization surgery) (Mittal *et al.*, 2009). إذ وجد إن هذه الجراثيم تكون ما يقارب 11% من أخماج السبيل البولي في المستشفيات (Sharma *et al.*,2004). كما وجد إن أخماج السبيل البولي تكون شائعة عند النساء أكثر منه في الرجال بمعدل أعمار تتراوح بين (20-40) سنة بنسبة (20-30) %، أما عند النساء الأكبر عمراً 50 عاماً وأكبر فتتراوح نسبة الإصابة بين (4-43)% (Mittal *et al.*, 2009). وإن هذا النوع من الإصابة يحدث خصوصاً خلال فترة الحمل وأثناء الولادة (Obiogbolu *et al.*, 2009). كما تتسبب هذه الجرثومة بإلتهاب الأذن الوسطى (Otitis media) والتهاب الأذن الخارجية (Otitis externa)(Mansoor *et al.*,2009). كما وجد Grandisوآخرون (2004) إن *P. aeruginosa* المعزولة من إصابات الأذن تشكل 90 %من مجموع الجراثيم المعزولة ، في حين وجد Rosenfeld وآخرون (2006) أن نسبة عزل هذه الجرثومة تتراوح بين (20-60) % تليها *Staphyloccocus aureus* بنسبة (10-70) %، أما غيرها من الجراثيم السالبة لملون غرام فكانت بنسبة لا تتجاوز(2-3)% .

2-1-3- عوامل الضراوة Virulence factors

تمتلك جراثيم *P. aeruginosa* العديد من عوامل الضراوة والتي تمكنها من الإستيطان في جسم المضيف مسببة الحالة المرضية و المقاومة للوسائل الدفاعية الخلوية ومن أهم هذه العوامل : الغشاء الحيوي ، والشعيرات ، والمحفظة ، والإنزيمات لكل من الدهون والبروتين و الجيلاتين ، والشعيرات ، والليفين ، الليسيثين والحامض النووي DNA بالإضافة الى الفوسفاتيز القاعدي .

تتميز الشعيرات (Pili) بأنها تراكيب خيطية منتشرة على سطح الخلية الجرثومية إذ تمكن الخلية من الإلتصاق و الإستيطان على سطح الأنسجة الطلائية للمضيف (Brook *et al.*, 2010). والتي تعد الخطوة الأولى في أمراضية هذه الجراثيم ، تكون هذه الشعيرات بوليمر متجانس البناء (Homopolemer) من بروتين البلين (Pilin) على هيئة تركيب حلزوني لتكون أنبوباً مجوفاً ، وإن النهاية الكاربوكسلية للبلين تحتوي على حقل إرتباط هذه الجرثومة مع الخلايا الظهارية للمضيف (Kipnis *et al.*, 2006).

ترتبط جرثومة *P. aeruginosa* مع الخلايا الظهارية للجهاز التنفسي لإحداث الإصابة إذ تمتلك الجرثومة خمسةُ أنواع من عوامل الإلتصاق على سطحها هي: الشعيرات Pili من نوع N-methyl-phenyl alanine والملزنات الدموية haemagglutinin و exoenzyme S والأسواط flagella والتي ترتبط مع مستقبلات مناظرة على خلايا المضيف وهي: laminin و glycolipids وglycosphingo lipids و glycoproteins الحاوي على lactosyl وsialosyl residues (Hoiby *et al.*, 2001). وقد وجد في دراسات عديدة في الزجاج in vitro وفي داخل الجسم الحي in vivo قلة التصاق جراثيم *P. aeruginosa* مع الخلايا الظهارية التنفسية السليمة وعلى العكس فإن هذه الجرثومة تلتصق بشدة مع الخلايا الظهارية المتضررة (Ghafoor *et al.*, 2011). إذ إن الأنسجة المتضررة تلعب دوراً مهماً في إستعمار القناة التنفسية بجراثيم *P. aeruginosa* التي سوف تلتصق مع الخلايا الظهارية للقصبة الهوائية للفئران المصابة بالرشح ولكن ليس مع الخلايا الظهارية للقصبة الهوائية

السليمة وهذا ما يسمّى بالإلتصاق الإنتهازي Opportunistic adherence وهو خطوة مهمة في إلتهاب القرنية Keratitis وأخماج القناة البولية وأخماج القناة التنفسية (Baqui *et al*., 2007).

تتميز المحفظة (Capsule) والتي أحياناً تسمّى المادة اللزجة (Slime layer) بأنها مادة كيميائية ذات طبيعة لزجة تتكون من (Glycoprotein) تحيط بالخلية البكتيرية إذ تعطي المظهر المخاطي اللزج لسطح المستعمرة فضلاً عن كونها مسؤولة عن المقاومة للمضاد الحيوي (Todar, 2009). تتكون من مواد مختلفة ومن هذه المواد الألجينيت (Alginate) وهو سكريد مخاطي متعدد (Mucoid lipopolysaccharide) يكون طبقة المحفظة الخارجية ويعد من المكونات التي تفرزها السلالات المخاطية لهذه الجراثيم في حالات الإصابة الرئوية وخاصة التليف الكيسي، إذ يعمل على إفرازات متعدد سكريات خارجي (Exopolysaccharide) لتكوين غشاء حيوي و الذي بدوره يساعد الخلية الجرثومية على الإلتصاق بسطح الخلايا الطلائية ، و يعمل كحاجز يوفر الحماية للخلية الجرثومية في مقاومة المضادات الحيوية (Cotton, 2009). كما يلعب دوراً مهمّاً في حماية الخلية من الحرارة والجفاف ومقاومتها لعملية البلعمة (Todar, 2004).

يتميز الغشاء الحيوي(Biofilm) بأنه يتكون من مستعمرات دقيقة محاطة بمتعدد سكريات خارجي تنتجه جراثيم *P. aeruginosa* وهذا الغشاء يكون محبا للماء (Hydrophilic) فالماء هو المكون السائد فيه وإن خلايا الجرثومة تتوزع بصورة غير متجانسة في الغشاء الحيوي نتيجة تكوين المستعمرات الدقيقة وإن 10- 20% من حجم الغشاء الحيوي هو خلايا جرثومية فقط والبقية متعدد سكريات وتوجد أقنية مليئة بالماء أو شبكة أقنية ماء تدخل الى الغشاء الحيوي في حين إن المواد السائلة تنقل بوساطة الإنتشار الجزيئي Molecular diffusion خلال المادة الأساس المليئة بالماء(Water filled) matrix للغشاء الحيوي . وعادة فإن جرثومة *P. aeruginosa* المسببة للتليف الكيسي تكون غشاءاً حيوياً وخاصة في حالات الإصابات المزمنة والدائمة (Engel, 2003). ويكون سمك الغشاء الحيوي متبايناً بين (60-13 µm) وإن السمك يحدد بوساطة التوازن بين نمو الغشاء الحيوي وإنفصال الكتلة الحية الى البيئة وتحدث عملية تكوين الغشاء الحيوي في ثلاث مراحل : مرحلة الإلتصاق ، ومرحلة التكاثر مسببة تكوين المستعمرات الدقيقة Microcolonies وتمايز المستعمرات الدقيقة الى تراكيب متميزة (Ryder *et al*.,2007) .

يكون الغشاء الحيوي الذي تنتجه هذه الجراثيم مقاوماً للمضادات الحيوية مسبباً إصابات مزمنة في الأقنية البولية(Urinary tracts) والخلايا الظهارية لمرضى التليف الكيسي (Cystic fibrosis)وهذا الغشاء يكون مهما أيضاً بوصفه

2-1-4- مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* المضادات الحيوية:

بدأ إستخدام العلاج الكيميائي Chemotherapy من قبل العالم الألماني Paul Erlich (1854-1915) الذي أثبت بأن المضادات الحيوية لها سمية إنتقائية (Selectively toxic) إذ تقتل الكائن الممرض ولا تؤذي خلايا الإنسان وتكون مؤثرة في علاج الأمراض (Prescott *et al*.,1993) و المضادات الحيوية: هي المواد الناتجة عن العمليات الأيضية الطبيعية للأحياء المجهرية ولها القدرة على تثبيط الأحياء المجهرية الأخرى أو قتلها ، والمضادات المصنعة المشتقة مختبرياً من الصبغات وبعض المركبات العضوية ، والمضادات شبه المصنعة(Semi-synthetic) عند إضافة أو إزالة مجاميع وظيفية للنواتج الطبيعية للأحياء المجهرية وتقسم المضادات بحسب فعاليتها إلى :

1. المضادات القاتلة للأحياء المجهرية Microbicidal تحلل الأحياء المجهرية أو تقتلها بوساطة التحطيم المباشر لأهداف خلوية خاصة.
2. المضادات المثبطة للأحياء المجهرية Microbistatic تتداخل مع المسارات في الخلية الضرورية لإنقسام الخلية ولهذا السبب فإنها تثبط التكاثر . وإن المواقع الرئيسة لتأثير المضادات الحيوية هي أهدف محددة في خلية المضيف تختلف بإختلاف طبيعة المضاد مثل: جدار الخلية والرايبوسومات وغشاء الخلية والأحماض النووية وإنزيمات معينة وبناء. وإن الموقع التشريحي للإصابة والحالة السريرية للمريض المصاب بـ *P. aeruginosa* يحدد العلاج المناسب (Karou *et al.*,2005)

2-1-4-1 ميكانيكية المقاومة في جرثومة *P. aeruginosa*

1. إنتاج إنزيمات β-lactamases

المضادات الحيوية من مجموعة β-lactam هي جميع المضادات الحاوية على حلقة بيتا لاكتام β-lactam ring وهي تركيب كيميائي ضروري لفعاليتها المضادة للجراثيم ، وتسمح السلاسل الجانبية على حلقة البيتا لاكتام للمضادات من الدخول الى الغشاء الخارجي للجراثيم السالبة لصبغة كرام (Poole, 2005) ، وإن التأثير القاتل للجراثيم بفعل مضادات β-lactam تحتاج إلى الخطوات الآتية:

1. الإرتباط مع الجراثيم.
2. الدخول خلال الغشاء الخارجي والفسحة البيريبلازمية في الجراثيم السالبة لصبغة كرام .
3. التفاعل مع البروتينات الرابطة للبنسلين على الغشاء السايتوبلازمي .
4. تنشيط إنزيم Autolysin الذي يحلل murein في جدار الخلية (Mao *et al.*,2001) .

وإن ميكانيكية مقاومة *P. aeruginosa* لمضادات β–lactam هو نتيجة إنتاجها لإنزيمات β-lactamases : وهي إنزيمات خارجية جرثومية تحلل تركيب حلقة بيتا لاكتام لمضادات نوع β-lactam مثل: penicillin وCephalosporine ومضادات أخرى وتجعلها غير فعالة (Hocquet *et al.*,2003).

تصنف إنزيمات β -lactamases في جرثومة *P. aeruginosa* بالإعتماد على المادة الأساس التي تعمل عليها وموقع جيناتها التي تحمل على البلازميد أو الكروموسوم الى ثلاثة أنواع هي: Class I : التي تمثل إنزيمات Cephalosporinases المستحثه والتي توجد تقريباً في جميع عزلات *P. aeruginosa* وClass IIIa : تمثل الإنزيمات التي تكون حبيباتها محمولة على R-factor وتوجد أيضاً في الجراثيم المعوية وClass V : وهي إنزيمات خاصة بجراثيم *P. aeruginosa* ونادرة الوجود مثل Carbenicillinases . وجميع هذه الإنزيمات تقع في الفسحة البريبلازمية ,هي تتلف بالحرارة . وإن حث وتعبير إنزيمات β-lactamases يعتمد على تركيب جدار الخلية (Mesaros *et al.*,2007) .

وبصورة عامة فإن إنزيمات β -lactamases في الجراثيم الموجبة لصبغة كرام مثل Staphylococci تنتج β-lactamases الخارج خلوية ، تفرز الى الوسط وهذه الإنزيمات تحطم المضاد قبل أن يصبح بتماس مع سطح الخلية ، وإن هذه الإنزيمات تبنى بكميات كبيرة بعد الحثّ بوساطة المضاد المناظر ، وإن إضافة المزيد من المضاد فإنه يحثّ فقط تكوين

كميات أكبر من الإنزيم والنتيجة فإنه لا يمكن التغلب على المقاومة حتى بالجرع الكبيرة أو القوية نسبياً لكن إنزيمات β-lactamases في الجراثيم السالبة لصبغة كرام توجد في الفسحة البريبلازمية أو مرتبطة بالغشاء الداخلي وإنها تكون تركيبية أي تنتج بمعدلات ثابته وإنها لا تزداد بإضافة كميات أكبر من المضادات ، ولهذا السبب فإنه يمكن التغلب على المقاومة في هذه الجراثيم بالجرع الأعلى من المضاد (Gruson *et al.*,2003) .

يوجد مركبات تشابه مضادات β-lactam مثل: clavulanic acid وtazobactam وsulbactam تعمل بوصفها مثبطات لإنزيمات β-lactam لذلك تخلط مع مضادات بيتا-لاكتام لتشكل معقدات ثابتة غير فعالة مع إنزيمات β-lactamase مؤدية إلى فقدان فعالية إنزيم β-lactamase وحماية المضاد الحيوي من التفكك وتستخدم في العلاج (Mohanty *et al.*,2005) .

فمضادات clavulanic acid و sulbactam و tazobactam لا تثبط إنزيمات β-lactamase لجرثومة *P. aeruginosa* ولكن خلط هذه المثبطات مع البنسلينات واسعة الطيف مثل: Ticarcillin-Clavulanate Potassium و Piperacillin-Tazobactam تكون فعالة ضد جرثومة *P. aeruginosa* (Miller *et al.*,2001).

وإن مقاومة جرثومة *P. aeruginosa* للمضاد Imipenem مرتبطة مع فقدان قناة خاصة تسمى Porins من نوع Opr D يستخدمها هذا المضاد الحيوي لعبور الغشاء الخارجي ، والتي تنقل الأحماض الأمينية في الحالات الإعتيادية (Brooks *et al*., 2001) .

2- تحوير في جزيئة المضاد الحيوي Modifying of antibiotic molecule

تمتلك جراثيم الـ *P. aeruginosa* الكثير من الإنزيمات التي تستطيع تغيير المضاد الحيوي وتحويله الى مضاد غير فعال وإن هذه الإنزيمات يشفر لها بمورثات محمولة على أو خارج الكروموسوم الأصلي (Lepper *et al.*,2002).

ومن تلك الإنزيمات إنزيمات البيتالاكتميز The Beta-lactamase enzymes التي تقع على السطح الخارجي للغشاء السايتوبلازمي في الفسحة البيربلازمية ،أساس عملها تكسير حلقة البتالاكتميز الموجودة في التركيب الكيمياوي في كل من البنسلينات والسيفالوسبورينات (Hsueh *et al.*,2002).

كما إن إنزيم الأستيليز Acetylase يعمل على أستلة مجاميع الهيدروكسيل (OH) في المضاد الحيوي Chloromphinicol وهذه صفة متميزة لهذه الجراثيم لإمتلاكها مقاومة أخرى لوجود حاجز نفاذية ، أو تغير موقع إتصال المضاد الحيوي مع الجراثيم (Westwood *et al.*,2005).

إنزيمات الكلايكوسيدات aminoglycosides التي توجد على السطح الخارجي للغشاء السايتوبلازمي هي الأخرى تعمل على تحوير جزيئة المضاد الحيوي قبل دخوله الغشاء السايتوبلازمي حيث يفقد المضاد الحيوي إلفته في الإرتباط في الرايبوسوم (Greenwood *et al.*,2002). وقد تنشأ المقاومة الجرثومية تجاه المضاد الحيوي بفعل حدوث طفرة وراثية في مواقع إرتباط المضاد الحيوي مع المكان الخاص به في الخلية الجرثومية ، وبذلك يؤدي الى فقدان المضاد

الحيوي إلفته بالإرتباط مع الرايبوسومات وهذا ما يؤدي لمقاومة جراثيم *P. aeuroginosa* للمضادات الحيوية (Poole, 2005).

تعد المقاومة التي تمتلكها جراثيم *P. aeruginosa* من أهم أنواع المقاومة تجاه المضادات والمطهرات والأصباغ وعدّها بعض الدارسين أخطر من المقاومة الإنزيمية بسبب عدم نفاذية غشاء الجرثومة لمضاد حيوي معين فتصبح أحياناً غير قابلة لنفاذ جميع المضادات التي تنتمي للصنف نفسه (Horn *et al.*,2010). كما يمكن أن يرجع أساس المقاومة الى إمتلاك الجراثيم حاجزاً ذاتياً (Intrinsic barrier) الممثل بطبقة الغشاء الخارجي (Nikaido, 2003).

2-2- بكتريا المتقلبات الرائعة *Proteus mirabilis*:

هذه الجرثومة تعود لجنس *Proteus* ضمن قبيلة Protease وهذه القبيلة تضم ثلاثة أجناس هي: *Proteus* ، *Providencia* و *Morganella* تنتمي الى العائلة المعوية Enterobacteriaceae (Angela *et al.*,2003).

أُطلقت تسمية *Proteus* لأول مرة من قبل العالم Hauser عام 1885 وتعني متغايرة الشكل إذ تمتاز بقابليتها على الحركة وتغير شكل مستعمراتها تاركة بذلك مظهراً متموجاً فوق الأسطح الصلدة التي تنمو عليها، وهي صفة مميزة يطلق عليها ظاهرة الإنثيال (Swarming Phenomenon) وينفرد بها جنس المتقلبات عن بقية أفراد العائلة المعوية (Laftaah, 2012).

يمكن تمييز الـ Proteus كيموحيوياً بأنتاجه كبريتيد الهيدروجين على وسط TSI (Triple Sugar Iron)، وإنتاج إنزيمي اللايبيز والجلاتنيز، وعدم القدرة على تخمير سكر المانوز(Li *et al.*,2004). ويمتاز هذا الجنس أيضاً بقابليته على إنتاج صبغة بنية محمرة في وسط الأكار المغذي المضاف له 5% تربتوفان؛ وذلك لقابليته على أكسدة الحامض الأميني phenyl alanine وتحويله الى Phenyl-Pyruvic acid (Mustafa, 2010). يُظهر هذا الجنس أهمية سريريه إذ يسبب العديد من الأمراض منها: إلتهاب المجاري البولية ، وخراجات الجروح والحروق، وإلتهاب الأذن الوسطى والقناة التنفسية (Al-Bassam, 2010). ويضم جنس الـ Proteus أربعة أنواع هي:

(*P. penneri, P. vulgaris, P. mirabilis, P. myxofaciens*)

(O'hara *et al.*, 2000)

تمتاز جرثومة *P. mirabilis* بكونها عصيات سالبة لملون كرام متحركة بواسطة أسواط محيطية ويتراوح طولها مابين (1-3) مايكرومتر وعرضها حوالي (0.4-0.8) مايكرومتر، وتكون خلاياها قصيرة عند تنميتها في المرق المغذي بينما تتميز الى خلايا طويلة عند تنميتها على الوسط الصلب (Mordi, 2009). وهي لا تكون سبورات ، وإن معظم العزلات مهدبة (Fimbriate) هوائية ولا هوائية إختيارية وتمتاز برائحة قوية (Stankowska *et al.*,2007). يمتلك النوع *P. Mirabilis* ثلاث خصائص كيموحيوية تميزه عن بقية الأنواع التابعة للجنس *Proteus* وهي النتيجة السالبة لفحص الإندول؛ إذ وجد إن 2% فقط منها يمكن أن يعطي نتيجة موجبة لهذا الفحص وجميعها مؤكسدة للأورنثين غير مخمرة لسكر المانوز (Belas & Suvanasuthi ,2005). فضلاً عن صفات كيموحيوية أُخرى مثل القابلية على إنتاج غاز كبريتيد

الهيدروجين (98% من عزلاتها تمتلك هذه القابلية) وتخمر سكر الكلوكوز والتريهالوز والزايلوز، وعدم مقدرتها على تخمير سكر اللاكتوز والمانيتول والرامنوز (Yah *et al.*,2007).

تعيش بكتريا *P. mirabilis* في أمعاء الإنسان وأنواع عديدة من الحيوانات كنبيت طبيعي (Normal Flora) ويمكن أن توجد أيضاً في التربة، والمياه الملوثة، والأسمدة ، وقد تَمّ عزلها من نماذج مختلفة مثل: الإدرار، والجروح، والحروق، والدم، واللعاب بوصفها ممرضات إنتهازية (Davis & Flood, 2011).

2-2-1- إمراضية بكتريا *P. mirabilis*:

تعد هذه الجراثيم من أهم الأنواع التابعة للجنس *Proteus* نتيجة لدورها الإنتهازي في كل من إصابات المجاري البولية، والجهاز التنفسي، والجروح ، والحروق، والجلد، والأذن، والعينين، والحنجرة، والجهاز الهضمي عند تناول الأطعمة الملوثة (Stankowska *et al.*,2007)؛ إذ تعد هذه الجرثومة من الممرضات الأكثر شيوعاً في إصابات المجاري البولية من المرضى الخاضعين لعملية القثطرة (Catheterize) وغير الخاضعين لها وتأتي بالمرتبة الثانية بعد *E. coli* في تلك الإصابات؛ إذ تمتاز بإلفة عالية للجزء العلوي للقناة البولية (Jacobsen *et al.*,2006).

إن إصابة المجرى البولي بهذه الجراثيم يؤدي الى حدوث حالات مرضية عدة من ضمنها التجرثم البولي الذي ينتج عنه: الحمى، والإلتهاب الحاد لحويض الكلية، وإلتهاب الكلى المزمن، والحصى البولية، والفشل الكلوي الذي قد يؤدي الى الموت (Alazzwi & Alaa,2011). وتسبب أيضاً هذه الجراثيم إلتهاب المثانة (Cystitis) والتحصي البولي (Urolithiasis) (Armbruster *et al.*,2014).

لجراثيم*P. mirabilis* دور في إجتياح مجرى الدم مسببة بذلك تسمم الدم الجرثومي (Septicemia) والذي قد ينتج عن إصابة المجرى البولي أو إستخدام القثطرة لمدة طويلة، أو نتيجة للعمليات الجراحية. وهو من الأنواع التي يصعب معالجتها وغالباً ما يرافقه الوفاة التي قد تصل نسبتها مابين (15-88)% (Manos & Belas, 2006).

كما ثبت دور جراثيم *P. mirbilis* بوصفها مسبباً لمرض إلتهاب المفاصل الرثوي (Rheumatoid Arthritis) RA إذ لوحظ تكرار عزل الجراثيم من إدرار الأشخاص المصابين بهذا المرض وأيضاً إرتفاع في مستوى الأضداد ؛ مما يؤكد دور هذه الجراثيم في تطور هذا المرض (Rashid *et al.*,2001). فضلاً عن إصابات أُخرى تشترك بها هذه الجراثيم وهي إلتهاب السحايا لدى الأطفال حديثي الولادة (Neonatal meningeoncephalitis) ، وإلتهاب العظام (Osteomyelitis) (O'hara *et al.*,2000) .

2-2-2- عوامل الضراوة في بكتريا *P. mirabilis*

تمتلك هذه الجراثيم العديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من إصابة المضيف وإحداث المرض.

ومن أهم هذه العوامل: قابلية الإلتصاق ، والأسواط ، وعديد السكريدالشحمي ، والهيمولايسين ، والإنزيم المحلل للبروتين ، والإنزيم المحلل لليوريا.

تعد قابلية الجراثيم على الإلتصاق بالخلايا الطلائية للمضيف (Adherence) تعد من أهم عوامل الضراوة التي تمكنها من إحداث الإصابة منها ، إصابة المجاري البولية ، وهذه القابلية ترتبط مع ما يحتويه سطح الجراثيم من أهداب (Pili) أو أخملة (Fimbriae) التي ثبت إن لها دوراً مهماً في آلية الإلتصاق وقد لوحظ إن الخلايا ذات الخملة الكثيفة لها قدرة في إحداث الإصابة أفضل من الخلايا ذات الخملة القليلة (Abbas *et al.*,2015)، وقد تم تصنيف الخمل التي تمتلكها جراثيم *P. mirabilis* الى ثلاثة أنواع إعتماداً على قابليتها في تلازن كريات الدم الحمراء لأنواع مختلفة من الحيوانات وهي الخملة الحساسة للمانوز (Mannose-sensitive-Ms)، والخملة المقاومة للمانوز- شبيهة للكلبسيلا (Mannose-resistant/Klebsiella-like-MR/K)، والنوع الثالث مقاومة للمانوز-شبيهة البروتيس (Mannose-resistant/Proteus like-MR/P)، وقد لوحظ إن النوع MR/P له دور مهم في نشوء إلتهاب حويض الكلية قياساً بالنوع MR/K (Pablo *et al.*, 2003).

يكون للأسواط دور في الحركة الإنثيالية لجراثيم *P. mirabilis* فضلاً عن أهمية هذه الأسواط في إستيطان الجراثيم وإنتشارها في منطقة الإصابة؛ إذ تمتلك هذه الجراثيم أسواطاً محيطية تتراوح أعدادها بين (6-10) ، وطولها حوالي (1-2) مايكرومتر (Kishore, 2012). إن الإنثيالية (Swarming) هي حركة بشكل أمواج تبدأ من حافة المستعمرة الأصلية وتنتشر بشكل حلقات متحدة المركز على الأسطح المصلبة بوساطة الأكار أو الجلاتين، تبدأ الدورة الأنثيالية بتمايز الخلايا القصيرة ذات الأسواط القليلة الى خلايا متطاولة يبلغ طولها حوالي 80 مايكرومتر ومتزايدة في عدد أسواطها؛ إذ تتحفز الخلايا للدخول بعملية التمايز إعتماداً على مؤشرات في بيئة النمو مثل وجود الكلوتامين Glutamine الذي يعد عاملاً محفزاً للحركة الإنثيالية (Liaw *et al.*,2003) . وخلال هذه المرحلة تحدث عدة تغيرات على الخلايا المنثالة؛ إذ ينتج برويتن الفلاجين الـ Flagellin بكمية أكبر، كذلك تطرأ تغيرات على السلاسل الجانبية لمتعدد السكريد الشحمي (LPs) إذ تصبح أكثر طولاً والغشاء الخارجي أكثر مرونة ، ويزداد مستوى العديد من البروتينات وتعبير عدد من الإنزيمات منها: Tryptophanase، Phenylalanine de amylase ، Urease ، Hemolysins (Qaddoorri *et al.*,2015).

تدخل الخلايا المنثالة مرحلة أخرى هي التماسك مابين الخلايا وتنسيق العمليات الخلوية التي تدعم هذه الحركة لذا فإن ظاهرة الإنثيال هي سلوك حركي لعدد من الخلايا. هذه العمليات تتكرر الى أن يغطى سطح الأكار بالخلايا المتحركة، ثم تدخل بعدها الطور النهائي الذي يبدأ بإنتهاء عملية الإنثيال والبدء بالإنقسام الخلوي وتكوين الخلايا القصيرة (Laftaah, 2012).

يعد عديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide (LPS) ذيفاناً داخلياً (Endotoxin) تتكون جزيئته من ثلاثة مناطق هي: المستضد الجسمي (Somatic Antigen)، ومنطقة اللب (Core)، واللبيد (Lipid A) (Rozalski, 2008) A .

يتميز الـ LPS بإحتوائه على حامض اليورونك Uronic acid الذي قد يستبدل بالأحماض الأمينية، فضلاً عن سكريات غير إعتيادية في جزئه المستضدي (O-Antigen) أما منطقة اللب فتتكون من (Morgenstein *et al.*,2010) D- galacturonic acid.

يعد الـ LPS من أهم عوامل الضراوة المسببة للمرض في الجراثيم السالبة لملون كرام؛ إذ إنه يشترك في العديد من الوظائف الفسيولوجية الممرضة منها: الحمى، وإنخفاض ضغط الدم (Hypotension)، وإنتشار التخثر في الأوعية

(Intravascular Coagulation) والصدمة المميتة (Lethal Shock) فضلاً عن دوره في إحداث المقاومة الطبيعية للمضاد الحيوي Polymyxins B من خلال جزيئة L-AraP$_4$N (L-arabinose-4amin) التي تقع في مواقع محجوبة ضمن لب جزيئة الـ LPS التابعة لجراثيم*P. mirabilis* ؛ مما يقلل من عملية الإرتباط بالمضاد الحيوي وينتج عنه مقاومة الجراثيم (Kaca *et al.*,2009) .

تسهم سلسلة متعدد السكريد التي تقع ضمن جزئية LPS في مقاومة جراثيم *P. mirabilis* لبروتينات المصل الطبيعي التي لها تأثير قاتل على الجراثيم ؛ إذ إن لها دوراً في تثبيط عملية الإرتباط بين بروتينات المصل الجراثيم مما يجعلها مقاومة للتحلل بالتسمم وللتأثير القاتل للخلايا البلعمية، ولهذه المقاومة دور مهم في غزو خلايا المضيف (Invasiveness) وتجرثم الدم (Bacteremia) (Morgenstin *et al.*,2010) .

تعد المحفظة التي تحتوي على متعدد السكريات Polysaccharide التي تشكل غلافاً خارجياً يحيط بالخلية على شكل مادة لزجة تسمى Glycocalyx . ويمتاز عديد سكريد المحفظة (CPS) بقابليته على ربط أيونات المغنيسيوم (Mg^{+2}) وتكوين البلورات الملحية التي تدخل ضمن تركيب الحصى البولية (Urinary Stones) ؛ وبذلك فإن للـ (CPS) دوراً في إمراضية جراثيم *P. mirabilis* (Rather, 2005).

يتميز الهيمولايسين Hemolysin بطبيعة إنزيمية لها تأثير سمي على الخلايا، إذ تمتاز بقابليتها على تحليل كريات الدم الحمر وتمكن الجراثيم المنتجة لها في إصابات المجاري البولية من خلال فعاليتها السمية على الخلايا الطلائية للكلية. (Alamuri *et al.*,2009).

تمتلك جراثيم *P. mirabilis* هيمولايسيناً مختلفاً عن بقية الأنواع التابعة لجنس المتقلبات ، إذ لوحظ إنه من النوع المرتبط بالخلايا (Cell-associated haemolysin) ولا تعتمد فعاليته على أيونات الكالسيوم، ويرمز له (HpmA) ويعد هذا النوع من الهيمولايسين أشد ضراوة من بقية الأنواع وله دور في إمراضية الجراثيم وقدرتها على غزو أنسجة المضيف (Cestari *et al.*,2013).

تنتج جرثومة *P. mirabilis* إنزيمات حالة للبروتينات Proteases من النوع المعدني (Metallo Proteinase) لها دور في تحطيم الكلوبيولينات المناعية مثل IgA, IgG لخلايا المضيف ومن ثم فقدان دورها المناعي في حماية أنسجة المضيف من الجراثيم ومنتجاتها (Pellegrino *et al.*,2003).

تظهر البروتييزات دوراً مهماً في عملية الإنثيال من خلال إنتاجها للكوتامين الذي يحفز تكوين الخلايا المنثالة فقد وجد إن الخلايا غير المتحركة لا تمتلك القابلية على إنتاج إنزيم البروتييز (Rozalski *et al.*, 2012).

ويسهم البروتييز في إنتاج عوامل الضراوة الأخرى مثل :إنزيمات اليوريز ، والهيمولايسين التي تمكن الجرثومة من غزو خلايا المضيف؛ إذ لوحظ عدم قدرة الخلايا الفاقدة لإنزيم البروتييز على إحداث الإصابة في الكلية، وتكوين الخراجات (Abscesses) ويدل هذا على إن البروتييز من أهم عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه الجراثيم (Chouduri *et al.*,2013) .

- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1- المواد Materials

3-1-1- الأجهزة المختبرية Instruments

أستعملت في الدراسة مجموعة من الأجهزة المختبرية والموضحة في الجدول (3-1) مع الشركات المصنعة لها :

3-1-2 : الأدوات المختبرية Eequipments

أستعملت في الدراسة مجموعة من الأدوات المختبرية والموضحة في الجدول (3-2) مع الشركات المصنعة لها :

جدول (3-2): الأدوات المختبرية المستخدمة في الدراسة والشركات المصنعة لها

3-1-3: المواد الكيميائية Chemical materials

أستعملت في الدراسة مجموعة من المواد الكيميائية والموضحة في الجدول (3-3) مع الشركات المصنعة لها :

جدول(3-3) يوضح المواد الكيميائية المستخدمة والشركات المصنعة لها

3-1-4-الأوساط الزرعية Culture media

أستعملت في الدراسة مجموعة من الأوساط الزرعية والموضّحة في الجدول (3-4) مع الشركات المصنعة لها

جدول (3-4) الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة والشركات المصنعة لها

3-1-5- النباتات الطبية

أستعملت في الدراسة مجموعة من النباتات الطبية والموضحة في الجدول (3-5) مع أسمائها العلمية والعوائل التابعة لها:

3-1-6- المضادات الحيوية

أستعملت في الدراسة مجموعة من المضادات الحيوية والموضحة في الجدول (3-6) المجهزة من شركة Oxoid:

جدول (3-6) المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة وأقطار الحساسية والمقاومة المثبتة في الجداول القياسية المثبتة من قبل NCCL (2014)

3-1-7 – العدد التشخيصية Diagnostic kits

أستعملت في الدراسة مجموعة من العدد التشخيصية والموضحة في الجدول (3-7) مع الشركات المصنعة لها :

جدول (3-7): العدد التشخيصية المستخدمة في الدراسة ومكوناتها والشركات المصنعة لها

3-1-8 – البادئات Primers

تم إستعمال البادئات لإجراء فحص ال PCR والخاصّة بالتحرِّي عن بعض أنواع الجينات المقاومة للمضادات الحياتية في كلا الجرثومتين *Proteus mirabilis* و*Pseudomonas aeruginosa* . إذ تم تصميم جميع البادئات في هذا الدراسة وذلك بإستخدام موقع NCB1-Gebank Database وبرنامج تصميم البادئات Primer3plus . وقد تم تجهيز تلك البادئات عن طريق شركة Bioneer في كوريا.

جدول (3-8) البادئات المستخدمة في الفحص الجزيئي PCR

Primer	Sequence		Amplicon
Nitrofurantoin (*nfsA* gene)	F	GGGTATATATCGGCGGCCTG	245bp
	R	ATTATTGCTGCCACGGGTGA	
Piperacillin (*blaP1b* gene)	F	CTAAGTGCTGTAGGTGGCCC	350bp
	R	GCTTGATGCTCACTCCACA	
Tetracycline (*tetA* gene)	F	GCCGATATCACTGATGGCGA	323bp
	R	ACCTGTCCGACAAGTTGCAT	
Trimethoprin (*Tri* gene)	F	TGTGATTGTGTCTGGTGGTGG	300bp
	R	TAGTGCATCTAACGCCTGGC	
Rifampicin (*ADP* gene)	F	GTGTAAACCACGGCGCTTTA	402bp
	R	TACAAGCAGGTGCAAGGACC	
Nalidix acid (*qnr* gene)	F	TGTGACTTCAGCCATTGCCA	519bp
	R	CTGCCAGGCACAGATCTTGA	

TM: GenBank: DQ520936.1, RIF: GenBank: KU254577.1, TetA: GenBank: KF442248.1, PI: GenBank: HQ157204.1, NA: GenBank: DQ151889.1 Nit: NC_012892.2

2-3: طرائق العمل Methods

1-2-3 : التعقيم Sterilization

2-2-3 : المحاليل والكواشف والصبغات Solutions and Reagents and Pigments

A- المحاليل Solutions

1

B- الكواشف والصبغات Reagents and Stains

- الكشف عن القلويدات : أُجري الكشف عن القلويدات في المستخلصات النباتية بإستعمال كاشف ماير الذي حضر بإذابة (12.5) غم من كلوريد الزئبقيك و (5)غم من يوديد البوتاسيوم في لتر من الماء المقطر وتم الكشف عن القلويدات وذلك باضافة (1-2) مل من الكاشف الى (5) مل من المستخلص المائي أو الكحولي فظهور راسب أبيض الى أسمر دليل على وجود القلويدات في المستخلص(Harbone,1984).

- الكشف عن الفينولات : تم الكشف عن الفينولات بإستعمال كاشف خلات الرصاص 1% وهو محلول مائي أو كحولي ويتكون من1%خلات الرصاص
ويفيد في الكشف عن التانينات ، إذ تم إضافة كمية من الكاشف الى كمية مساوية من المستخلص المائي أو الكحولي فظهرور راسب أبيض هلامي القوام دلالة على وجود الفينولات في المستخلص النباتي(السلامي،1998).

- الكشف عن التانينات : أُجري الكشف عن التانينات وذلك بإستعمال كاشف كلوريد الحديديك وبتركيز1% وذلك بإضافة كمية من الكاشف الى كمية مساوية من المستخلص المائي ، إن ظهور راسب أخضر مزرق دل على وجود التانينات في المستخلص النباتي (Harbone,1984) .

- الكشف عن التربينات : أُجري الكشف عن التربينات بإستعمال كاشف الرغوة الصابونين ، إذ ترج قنينة محكمة الغلق تحوي على كمية من المستخلص الكحولي أو المائي ، إن ظهور الرغوة الكثيفة فوق سطح المستخلص تبقى مدة طويلة هو دليل على وجود التربينات في المستخلص النباتي(المختار،1994) .
- الكشف عن الزيوت الطيارة : أُتبعت الطريقة التي أوردها(1998) Indian Herbal Pharmicopeia وذلك بأخذ(10) مل من المستخلص النباتي، ويمرر خلال أوراق ترشيح watman No 0.1 تُعرض لمصدر للأشعة فوق البنفسجية فظهور اللون الوردي دليل على وجود الزيوت الطيارة .
- الكشف عن الراتنجات :أُتبعت طريقة الشامي (1982) للكشف عن الراتنجات إذ أُخذ 10 مل من المستخلص النباتي وأضيف اليه 20 مل من الماء المقطر المضاف له قطرات من حامض الهيدروكلوريك HCL 4% فظهور العكرة دليل على وجود الراتنجات.
- الكشف عن الصابونيات:أُتبعت الطريقة التي أوردها الشامي (1982) للكشف عن الصابونيات وذلك بإضافة 5 مل من المستخلص النباتي الى 3 مل من كلوريد الزئبقيك (Mercuric chloride) فظهور راسب أبيض دليل إيجابية الفحص ، كما تم استخدام طريقة Shihata(1933) اذ تم اخذ كمية من المستخلص ووضعها في انبوبة اختبار ورجها بشدة فظهور رغوة كثيفة تبقى لفترة دليل على ايجابية الاختبار.
- الكشف عن الكلايكوسيدات:أتبعت طريقة الشيخلي وجماعته(1993) للكشف عن وجود الكلايكوسيدات وذلك بأخذ 1مل من المستخلص النباتي ووضعه في انبوبة اختبار، واضيف اليه 2مل من كاشف بندكت ورج المزيج

جيداً، ثم وضعت الانبوبة في حمام مائي لمدة 5 دقائق بعدها بردت الانبوبة فتكون الراسب الاحمر دليل على وجود المركبات الكلايكوسيدية .

حضر كاشف بندكت كما اورده الشحات (1986) بإضافة 137غم من سترات الصوديوم و100غم من كاربونات الصوديوم المائية في 800مل من الماء المقطر، رشح المحلول وأضيف الى الرائق محلول كبريتات الناسيك(17.3غم في 100مل ماء مقطر)ثم أكمل الحجم الى 1000بإستخدام الماء المقطر.

2-3-2-3 : الأوساط التحضيرية Prepared media

1-2-3-2-3- أكار الدم Blood agar

حضر هذا الوسط بإضافة دم الإنسان بنسبة 5% إلى وسط أكار الدم الأساسي المحضر وفق تعليمات الشركة المصنعة والمعقم بعد تبريده إلى درجة حرارة 50م° ثم صب في أطباق معقمة وترك ليتصلب (Forbes *et al.*,2007). أستخدم لتميز البكتريا المحللة للدم عن غير المحللة .

2-2-3-2-3- وسط أكار اليوريا Urea agar

حُضر بإذابة 2.1 غم من Urea base agar في 95 مليلتر من الماء المقطّر وعقم بالمؤصدة ثم أذيب 2 غم من اليوريا في 5 مل من الماء المقطّر وعقم بالترشيح ثم أضيف إلى الوسط المعقم وبعد المزج والزرع في أنابيب معقمة بشكل مائل (Slant) ، حضن بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها ، ثم حفظ بدرجة حرارة 4 م° لحين إستعمالها، أستعمل هذا الوسط في التحري عن قابلية العزلات على تحليل اليوريا بفعل إنتاجها لإنزيم اليوريز (Koneman *et al.*,1992) .

3-2-3-2-3- وسط أحمر المثيل - فوكاس بروسكاور

(MR-VP) Methyl red Voges proskaur broth media

حُضر وفقا لما أورده Baron وجماعته (1994) وذلك بإذابة 1.75 غم من البيتون و 1.25 غم من فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين و 1.25غم من الكلوكوز في 250 مل من الماء المقطّر المعقم ثم عقم بالمؤصدة بعد ضبط الرقم الهيدروجيني عند 7. أستخدم للتحري عن قدرة البكتريا على التحلل الكلي والجزئي لسكر الكلوكوز .

4-2-3-2-3- وسط الإدامة Maintenance medium

حضر على وفق ما أورده Straus وجماعته (1987) ، بإضافة 15 مليلتر من كليسرول إلى 85 مل من وسط Tryptic Soy broth ووزع في قنان صغيرة الحجم ذات غطاء محكم ثم عقم بالمؤصدة وترك ليبرد بدرجة حرارة الغرفة ، أستخدم الوسط لحفظ العزلات لفترة طويلة بدرجة حرارة - 20م° .

أما حفظ عزلات البكتريا لمدَّة قصيرة الأمد بعد التشخيص فنميت العزلات في وسط نقيع القلب – الدماغ السائل بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة ثم زرعت على وسط الأكار المغذي المائل بظروف التنمية نفسها ، وبعدها حفظت بدرجة حرارة 4م° بالثلاجة (Maniatis *et al.*,1982) . أستخدمت هذه

العزلات في العمل اليومي مع مراعاة تجديدها و إدامتها بشكل دوري شهريا وذلك بتنشيط العزلات بوسط نقيع القلب– الدماغ السائل أولاً ثم يعاد زرعها على وسط الأكار المغذي المائل.

3-3 : جمع العينات Specimens Collection .

جمعت 290 عينة سريرية من المرضى الوافدين والراقدين في مستشفى الديوانية التعليمي في مدينة الديوانية للفترة من 1 أيلول 2015 ولغاية 31 كانون الثاني2016 شملت العينات حالات سريرية للأشخاص المرضى ومن الجنسين، إذ كانت 123عينة مصدرها الذكور و 167عينة مصدرها الإناث ومن أعمار مختلفة تضمنت 131عينة إدرار (Urine) ضمت 55 عينة من الذكور و76عينة من الإناث، و51عينة من مسحات الأذن (ear) ضمت 21عينة من الذكور و36عينة من الإناث ، و29 عينة من مسحات الجروح (Wound) ضمت 14عينة من الذكور و5 عينة من الإناث، و22من عينات القشع ضمت 12 عينة من الذكور و 10عينات من الإناث، و57من عينات البراز (stool) ضمت 21عينة من الذكور و36عينة من الإناث.

نقلت العينات الى مختبر البكتريولوجي في مستشفى الديوانية التعليمي بعد تعبئتها بالمستوعب المناسب إذ تم إستخدام حاويات بلاستيكية معقمة لعينات الإدرار و البراز وأستخدمت المسحات القطنية المعقمة لكل من عينات الأذن ، والجروح والقشع خلال مدة لا تتجاوز ساعتين و ونشطت العينات بزرعها على وسط نقيع المخ والقلب Brain Heart Infusion . و حضنت بدرجة حرارة (37)م لمدة (24) ساعة.

4-3: العزل والتشخيص الجرثومي Bacterial isolation and identification

1-4-3 : العزل Isolation

زرعت العينات المنشطة على وسطي أكار الدم و أكار الماكونكي للتحري عن البكتريا الملوثة للعينات و حضنت بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة للحصول على المستعمرات وأعيد زرعها على أوساط انتقائية وتفريقية أخرى لحين الحصول على جراثيم نقية وشخصت حسب الطرائق المعتمدة على وفق ما أورده (MacFaddin ,2000).

2-4-3 : التشخيص Identification

A-2-4-3 - الخصائص المظهرية Morphological Characteristics

عُدَّ هذا التشخيص أوليا إذ إعتمد على الصفات الزرعية للمستعمرات النامية على الأوساط الإنتقائية والتفريقية إذ إعتمد على لون المستعمرة ، وحواف المستعمرة ، وإرتفاعها ، وقوامها ، وقطرها وتكوين الصبغات على الوسط الغذائي وغيرها .

B-2-4-3 - الخصائص المجهرية Microscopic characteristics

أجري الفحص المجهري للخلايا البكتيرية من خلال تصبيغها بصبغة غرام وفحصها تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي. كما درست أشكال الخلايا بعد صبغها من خلال تداخل الخلايا مع الصبغة. وملاحظة تجمعها وأحجامها ووجود الأسواط وقدرتها على تكوين المحفظات والسبورات وطبيعة المواد المخزونة في السايتوبلازم.

3-4-2-C- الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests:

1- إختبار إنتاج أنزيم الأوكسيديز Oxidase test:

نقلت مستعمرة واحدة نقية منماة على وسط الأكار المغذي بعمر 18-24 ساعة الى ورقة ترشيح مبللة مسبقاً بكاشف إنزيم الأوكسيديز(فقرة 3-2-2-B)، بوساطة عيدان خشبية معقمة. إن تحول لون المستعمرة الى اللون البنفسجي الغامق مباشرة دليل على إيجابية الإختبار وقدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الأوكسيديز(Macfaddin,2000).

2- أختبار إنتاج إنزيم الكتاليز Catalase test:

وضع جزء من النمو البكتيري على شريحة زجاجية وأضيف إليها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين (فقرة 3-2-2-B) . إن ظهور فقاعات دليل على إيجابية الإختبار وقدرة الجرثومة على إنتاج الكتاليز (Macfaddin,2000) . يستعمل هذا الإختبار للتحري عن قدرة الجراثيم على إنتاج الكتاليز الذي يحفز على تحرير غاز الأوكسجين من تحلل المركب السام بيروكسيد الهيدروجين (H2O2).

3- إختبار الإندول Indol test:

لقح وسط ماء الببتون بمستعمرة مفردة من العزلة المراد تشخيصها. حضنت الأنابيب بدرجة 37مº لمدة 24 ساعة. أضيفت بعدها قطرتان من كاشف Kovac's reagent(فقرة 3-2-2-B) إن تكون حلقة حمراء يدل على إيجابية الإختبار، وهي قدرة الجراثيم على تحليل الحامض الأميني التربتوفان (Tryptophane) وإنتاج الإندول (Macfaddin,2000).

4- إختبار أحمر المثيل Methyl red test:

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط MR-VP بالجراثيم المراد تشخيصها (فقرة 3-2-4-2)، وحضنت الأنابيب بدرجة 37 مº لمدة 48-72 ساعة، وبعد إنتهاء مدة الحضن أضيف كاشف أحمر المثيل. فتغير لون الوسط الى الأحمر دلَّ على إيجابية الإختبار وهي قابلية الجراثيم على تخمير سكر الكلوكوز وإنتاج الحامض العضوي (Macfaddin,2000).

5- إختبار الفوكس بروسكور Voges-proskauer test:

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط MR-VP باللقاح الجرثومي، وحضنت الأنابيب بدرجة 37مº لمدة 48-72 ساعة،أضيف بعدها 6 قطرات من كاشف الفا- نفثول 5%(فقرة 3-2-2-B)، وقطرتان من هيدروكسيد البوتاسيوم 40%. دلَّ ظهور اللون الوردي خلال 5-10 دقائق على إيجابية الإختبار (Collee *et al.*,1996).

6- إختبار إستهلاك السترات Citrate utilization test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط سترات سايمون المائل، بالطعن والتخطيط، حضنت بدرجة 37 مº ولمدة 24 ساعة. فتحول لون الوسط من الأخضر الى الأزرق دلَّ على قدرة العزلات على إستهلاك السترات كمصدر

كاربوني وحيد، وبقاء اللون الأخضر دلَّ على عدم قدرتها على إستهلاك المصدر الكاربوني (Collee *et al.*,1996).

7- إختبار إنتاج إنزيم اليوريز Urease test:

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط أكار اليوريا المائل بالعزلة المراد إختبارها (فقرة 3-2-4-2)، بطريقة الطعن والتخطيط ثم حضنت بدرجة 37مº لمدة 24 ساعة. دلَّ تحول لون الوسط إلى الوردي على إيجابية الإختبار إذ تستطيع العزلات إنتاج إنزيم اليوريز وتحليل اليوريا في الوسط الغذائي (Collee *et al.*,1996).

8- فحص اختبار الحركة Motility Test :

أستعمل وسط الحركة (Motility medium) الذي حضر بإضافة (4) غم من مسحوق الأكار الى (20) غم من مسحوق المرق المغذي Nutrient broth وأذيبت المحتويات في لتر من الماء المقطر ، وبعد التعقيم لقحت الأنابيب بلقاح البكتريا المختبرة بطريقة الطعن ثم حظنت الأنابيب الملقحة بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة بوضع عمودي ، أستعمل هذا الفحص للكشف عن قابلية البكتريا على الحركة إذ إن إنتشار النمو البكتيري خارج حدود الطعنة دلالة على قابلية البكتريا على الحركة (Collee, *et al* .,1996) .

9_ إختبار فعالية إنزيم السايتوكروم أوكسيديز Cytochrome Oxidase Test

أجري الإختبار بإضافة الكاشف العديم اللون (Tetramethyl-P-Phenyl Diamine Dihydrochloride) الى ورقة ترشيح من نوع (Whatmann No.1) الى حد تشبع الورقة بالكاشف ، ثم نقلت كمية قليلة من المستعمرة بواسطة عيدان خشبية فوق ورقة الترشيح ، إن تلون المستعمرات باللون البنفسجي بعد (10) ثوانٍ دليل على النتيجة الموجبة (Macfaddin,2000) .

10- إختبار Kliger's Iron test وتكوين H2S :-

أستعمل وسط (Kliger's Iron Agar (KIA للكشف عن قدرة الجراثيم على تخمير سكر اللاكتوز و الكلوكوز من خلال تغير لون الوسط بفعل كاشف الفينول الأحمر إلى اللون الأصفر أو عدم تغير اللون ،إذ تلقح موائل الوسط بالطعن الى أسفل الأنبوب والتخطيط على السطح المائل للوسط ، إن تغير لون القعر فقط دون تغير لون المائل دليل على تخمر سكر الكلوكوز فقط ، ومن خلال هذا الوسط يقيم الكشف عن قابلية الجراثيم على إنتاج غاز H2S الذي يتفاعل مع أملاح الحديد في الوسط ليكون راسباً أسود من كبريتيد الحديدوز FeS (Macfaddin,2000) .

D-2-4-3 – التشخيص بنظام Api 20E

3-9- فحص تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase chain reaction(PCR)تم أجراء فحص تفاعل سلسلة البلمره وذلك بالتحري عن بعض أنواع الجينات المقاومة للمضادات الحياتية في الجرثومة *Proteus mirabilis* و*Pseudomonas aeruginosa* وأن هذا الفحص يتكون من عدة خطوات:

3-9-1 استخلاص الحمض النووي البكتيري Bacterial genomic DNA extraction تم أجراء استخلاص الحمض النووي للبكتريا قيد الدراسة وذلك باستخدام عدة (Genomic DNA extraction kit) المجهزة من شركة Geneaid الأمريكية، وتم إجراء الاستخلاص حسب تعليمات الشركة كآلاتي:

1- تم نقل 1مل عالق من كل عزلة من النامية على وسط مرق نقيع القلب والدماغ ووضعت في أنابيب إبندروف قياس 1.5 مل معقمة وبعدها ونقلت الى جهاز الطرد المركزي بسرعة xg15000 للمدة دقيقة وذلك لجمع الخلايا البكتيرية ثم التخلص من السائل الطافي.
2- تم إضافة 200ميكرولتر من محلول إنزيم اللايسوزايم Lysozyme buffer (20mg/ml) وبعدها مزج الخليط بواسطة المازج vortex لمدة 5 ثواني.
3- حضن المزيج بدرجة حراره الغرفة لمدة 10 دقائق وخلال فترة الحضن تم تقليب الأنابيب لضمان تحلل كامل للخلايا في المزيج.
4- تم إضافة 200 ميكرولتر من محلول GB Buffer المجهز مع العدة الى مزيج الخلايا المتحللة ومزج جيداً بواسطة المازج vortex لمدة 5 ثواني.
5- حضن المزيج بدرجة حراره 60م° لمدة 10 دقائق باستخدام الحمام المائي.
6- تم اضافة 200 ميكرولتر من الكحول الاثيلي المطلق الى المزيج المتحلل ومزج الخليط جيداً بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثواني.
7- تم نقل الخليط من انبوبة الابندروف الى انابيب جمع collection tubes قياس 2مل الحاوية على أعمدة تحوي مصفى لتنقية الحمض النووي GD filter colum والمجهزة مع العدة.
8- وضعت انابيب الجمع مع الأعمدة الحاوية على خليط في جهاز الطرد المركزي ودورت بسرعة xg15,000 لمدة دقيقة للتخلص من نواتج الخلايا المتحللة.
9- تم التخلص من المحلول الراسب للخلايا المتحللة ونقل ال GD colum الحاوي على الحمض النووي الى انبوبة جمع collection tube جديدة.
10- تم اضافة 400 ميكرولتر من محلول ال W1 Buffer المجهز مع العدة الى العمود الحاوي لغسل الحمض النووي ووضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة xg15,000 لمدة 30 ثانية.
11- تم التخلص من الراسب وبعد ذلك ضيف 600 ميكروليتر من محلول الغسل الحاوي على الكحول الاثيلي المطلق Wash buffer المجهزة مع العدة الى العمود الحواي على الحمض النووي لتخلص من الدهون داخل العمود ووضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة xg15,000 لمدة 30 ثانية.
12- تم التخلص من الراسب و أعيدت الانابيب الى جهاز الطرد المركزي مرة ثانية لتجفيف الأعمدة بسرعة xg15,000 لمدة 3 دقائق.
13- تم نقل الأعمدة الحاوية على الحمض النووي الى انابيب ابندروف معقمة واضيف 50 ميكرولتر من محلول الاذابة Elution Buffer المجهز مع العدة الى وسط العمود وترك لمدة 5 دقائق وبعدها

وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة xg15,000 لمدة 30 ثانية لإذابة الحمض النووي وحفظه بدرجة حرارة -20م لحين اجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة.

3-9-2- فحص الحمض النووي المستخلص DNA examination

تم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص وذلك من باستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) الخاص بالكشف وقياس تركيز الاحماض النووي حيث يتم الكشف الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي DNA (ng\µl) وقياس نقاوة الحامض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين (260/280nm) وتم استخدام الجهاز النحو التالي :

1- بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع DNA .
2- نقوم تصفير ركيزة المقياس مرتين وذلك بوضع 2 مايكرولتر من(ddH2O) باستخدام ميكروبايبيت معقمة على سطح ركيزة المقياس وجراء التصفير وبعها نقوم بتنظيف الركيزة باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز .
3- نقوم بوضع بالضغط 1 ميكرولتر من كل عينة من ال DNA المستخلص على ركيزة المقياس الجهاز ومن ثم بدء عملية قياس تركيز ال DNA وذلك باستخدام ومن ثم نقوم بتنظيف مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.
4- وكذلك تم تحديد نقاوة عينات ال DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260/280 nm) حيث ان الحمض النووي DNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

3-9-3 تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام عدة AccuPower® PCR PreMix المجهزة من قبل شركة ال Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة كالاتي:

1- تم تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة بطريقة Diplex PCR في انابيب PCR المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة وأضيفت المكونات الاخرى لمزيج تفاعل وحسب تعليمات الشركة كما في الجدول التال

PCR master mix		Volume
DNA template		5µL
First gene Primers (10pmol)	F. primer	1µL
	R. primer	1µL
Second gene Primers (10pmol)	F. primer	1µL
	R. primer	1µL
PCR water		11µL
Total		20µL

2- بعد اكمال تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة تم غلق الانابيب ومزجت بعناية بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثواني.

3- نقلت الانابيب لجهاز PCR Thermocycler لإجراء حالات الدورات الحرارية PCR Thermocycler conditions .

3-9-4- حالات الدورات الحرارية PCR Thermocycler conditions

تم جراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام PCR thermocycler

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95°C	5min
Denaturation	30	95°C	30sec.
Annealing		60°C'	30sec
Extension		72°C	1min
Final extension	1	72°C	5min
Hold	-	4°C	Forever

3-9-5 الترحيل الكهربائي الهلام Gel electrophoresis

تم اجراء الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الأكاروز بنسبة 1,5% وذلك قراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product كما يأتي:

1- تم اذابة 1 غم من هلام الأكاروز Agarose gel في 100 مل من محلول ال TBE buffer الدارئ بتركيز 1X وباستخدام الفرن الكهربائي لمدة 15 دقيقة.

2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50م وبعدها تم إضافة صبغة الحمض النووي المشعة Ethidium bromide ومزجت جيداً مع الهلام.

3- تم صب هلام الأكاروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb لتحديد أماكن عينات PCR، وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ومن ثم أزيل المشط من الهلام بعناية.

4- تم عملية تحميل العينات باستخدام صبغة التحميل Loading dye على ورق البارا فلم Parafilm paper وذلك بإضافة 1حجم من صبغة التحميل لكل اربعة حجوم من ناتج PCR product ووضعت في حفر الهلام.

5- تم إستخدام 10ميكروليتر من DNA ladder لقياس ناتج الفحص ووضع في الحفرة الاولى.

6- بعد اكتمال عملية التحميل تم غمر هلام الأكاروز باستخدام محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام تيار 100فولت وامبير 80 لمدة ساعة واحدة.

7- بعد انتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج PCR باستخدام مصدر الاشعة فوق البنفسجية U.V light source لتحديد ناتج مع وحدة القياس.

3-10- التحليل الإحصائي Statistical analysis

أخضعت جميع نتائج الدراسة الحالية للتحليل الإحصائي وأستخدم لهذا الغرض برنامج SPSS الإصدار (17) إذ جرى تطبيق إختباري Chi-square test وإختبار تحليل التباين الأحادي والمتعدد مع حساب أقل فرق معنوي LSD ، كما جرى إعتماد مجال الثقةConfidence intreral مساوياً الى 95% وقيمة مستوى الإحتمالية أقل من 0.05(Leech,2011).

1-4 العزل والتشخيص Isolation and identification :

جمعت (290) عينة سريرية من المرضى الوافدين والراقدين في مستشفى الديوانية التعليمي في محافظة الديوانية للفترة من 1 أيلول 2015 ولغاية 25 كانون الثاني2016 شملت حالات مرضية مختلفة ومن الجنسين، إذ كانت (123) عينة مصدرها مرضى ذكور بنسبة (42.413%) و (167) عينة مصدرها الإناث بنسبة (57.582%) ومن أعمار مختلفة ، وقد بلغ عدد العينات التي أظهرت نمواً جرثومياً جوهرياً (278) وبنسبة (95.86%) وكانت العينات التي مصدرها الإدرار هي الأعلى في التواجد البكتيري إذ بلغ عددها (131) وبنسبة(45.17%) وأدناها تواجداً تلك التي مصدرها القشع إذ بلغ عددها (19) وبنسبة (6.55%) كما في الجدول (4-1)

جدول(4-1)عدد ونسب العينات ذات النمو الجوهري والعينات ذات النمو غير الجوهري تبعاً لمصدر العزل

قيمة مربع كاي X^2 =50.24.

ت	مصدر العينات	عدد عينات الاختبار	العينات ذات النمو الجوهري		العينات ذات النموغيرالجوهري	
			العدد	النسبة%	العدد	النسبة%
1	الإدرار	131	131	45.172	0	0
2	البراز	57	57	19.655	0	0
3	الأذن	51	47	16.206	4	1.379
4	الجروح	29	24	8.275	5	1.724
5	القشع	22	19	6.551	3	1.034
المجموع		290	278	95.862	12	4.137

ش

خصت العزلات البكتيرية المعزولة بالإعتماد على نتائج الإختبارات الزرعية والمجهرية والخصائص الكيموحيوية فتوزعت العزلات الجرثومية النامية بعد تنقيتها الى البكتريا الآتية :*P. aeruginosa* ، *P. fluorscence* ، *P. mirabilis* ، *P. vulgaris* ، *E. coli* ، *Staphylococcus sp.* ، *Enterococcus sp.* ، *K. pneumonia* و *Streptococcus sp.* كما في الجدول (4-2) .

جدول(4-2)عدد ونسب العزلات البكتيرية المأخوذة من حالات سريرية موزعة بحسب الجنس

ت	الجراثيم المعزولة	عزلات كل نوع بكتيري		عزلات مصدرها الذكور		عزلات مصدرها الاناث	
		العدد	النسبة%	العدد	النسبة%	العدد	النسبة%
1	*Pseudomonas aeruginosa*	19	6.551	9	3.103	10	3.448
2	*Pseudomonas fluorescence*	28	9.655	11	3.793	17	5.862
3	*Proteus mirabilis*	24	8.275	10	3.448	14	4.827
4	*Proteus vulgaris*	28	9.655	15	5.172	13	4.482
5	*Escherichia coli*	61	21.034	23	7.9318	38	13.103
6	*Staphylococcus sp.*	51	17.586	18	6.206	33	11.379
7	*Enterococcus sp.*	17	5.862	6	2.068	11	3.793
8	*Klebsella peneumonia*	12	4.137	7	2.413	5	1.724
9	*Strptococcus sp.*	38	9.655	20	6.896	18	6.206

قيمة مربع كاي X^2 =189.28

وكانت عزلات *E. coli* هي الأعلى تواجداً إذ بلغ عدد عزلاتها الكلي (61) بنسبة (21.03%) كما إنها كانت في الإناث الأعلى نسبة مقارنة بالذكور حيث بلغت (38) بنسبة (13.10%) و (23) بنسبة (7.93%) على التوالي . وقد يكون السبب في تفاوت نسب الإصابة بين الإناث والذكور إلى التلوث الذي قد يحدث في المناطق المحيطة بالإحليل وإن هذه البكتريا بسبب قصر الإحليل عند الإناث فيساعد في نمو بكتريا *E.coli* المثانة وإحداث الإصابة خاصة في إصابات السبيل البولي (Perez & Moellinger, 2003)، كما تميزت بكتريا *K. pneumonia* بأنها الاقل في عدد العزلات إذ بلغت عزلاتها (12) عزلة بنسبة (4.13%) توزعت على الإناث والذكور (5) بنسبة(1.72%) و (7) بنسبة (2.41%) على التوالي وهذا توافق مع دراسة Biyikli وجماعته(2004) إذ تبين فيها إن نسب

عزل بكتريا *K. pneumonia* في الذكور أعلى منها في الإناث وقد أشاروا الى إن أكثر الإصابات المتكررة في الذكور ترجع إلى بكتريا *K. pneumonia*. كما لوحظ في معظم الحالات إن عدد العزلات الجرثومية التي مصدرها الإناث هي الأعلى نسبة، واتفقت هذه النتائج مع ما أشار اليه Freedman (2005) إن نسب عزل الجراثيم المكتسبة في المستشفيات وخاصة التي تتسبب في إصابات السبيل البولي تكون في الإناث أعلى منها في الذكور في حين لم تتطابق هذه النتائج مع ما جاء به Senior (1997) الذي أشار الى تقارب نسب الإصابة بين الذكور والإناث.

الجدول (4-3 أ) الفحوصات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتريا *P. aeruginosa* و بكتريا *P. mirabilis*

الاختبارات الكيموحيوية / الانواع الجرثومية	اليوريز	الاوكسيديز	IMVIC				الكتاليز	KIA S/B H_2S	اختبار الحركة	انتاج الصبغة	النمو في 42°م
			I	MR	VP	C					
Pr. mirabilis	+	-	-	+	-	+	+	ALK/ A+	+	-	-
Ps. aeruginosa	-	+	-	-	-	+	+	--	+	+	+

4-2- حساسية البكتريا للمضادات الحياتية Antibiotic Sensitivity Test:

تم إختبار حساسية العزلات لكل من جرثومتي المتقلبات الرائعة و الزوائف الزنجارية تجاه 15 مضاداً حيوياً متداولة صحياً في المستشفيات وبطريقة الأقراص شملت مضادات: Amikacin ، Gentamicin ، Piperacillin ،Azetronam ، Amoxicillin-Clavunic acid ، Nitrofuration ، Nalidixic ، Ciprofloxacin ، Oxacilin ، Imipenem ، Amoxicilin ،Rifampin acid ، Ofloxacin ، Tetracycline ، Trimethoprim وتم تحديد حساسية العزلات البكتيرية تجاه المضادات الحيوية بحسب المحددات التي أوردتها (NCCLS,2014).

أظهرت عزلات *P. aeruginosa* كما في الجدول (4-4) مقاومة عالية تجاه المضادات Naldixic acid و Trimethoprim وNitrofuration و Tetracycline بلغت (100%) لكل منها كما لوحظ وجود مقاومة عالية تجاه المضادات Pepracilin وRifampin بلغت (84.21% , 94.73%) على التوالي اذا لم تكن هناك فروق جوهرية بين المضادين Trimethoprim و Tetracycline ولم تكن هناك فروق جوهرية بين المضادين Nitrofuration وNaldixic acid. وقد وجدت فروق جوهرية بين نتائج تأثير المضادات الباقية وحسب الجدول (4-6) بالنسبة للمضادين

Naldixic و Trimethoprim فقد اتفقت نسبة المقاومة مع saleh وجماعته (2013) .أما بالنسبة للمضاد Tetracycline فقد اتفقت نتيجة نسبة المقاومة مع الطريا (2002). اما المضاد Rifampin فقد اتفقت نتيجة تأثيره مع عريبي (2010). أما بالنسبة للمضاد Pepracilin فقد اتفقت نتيجة تأثيره مع حسن(2013). وكانت المقاومة ضعيفة جداً تجاه مضاد Ciprofloxacin إذ بلغت (2.26%) النتائج مع نتائج Murray وأخرون (1999) . بالنسبة لمضادي Amoxicillin و Amoxicillin-clavulinic acid (15.789 % و 10.526%) على التوالي . وضعيفة تجاه مضادات Azetronam وGentamycinو Ofloxacin و حيث بلغت المقاومة (10.52% , 15.78% , 10.52%) على التوالي. كما تميزت جميع عزلات هذه البكتريا بحساسيتها تجاه مضادي Amikacin وImipenem إذ بلغت المقاومة (0%) . وهذا يتفق مع ما أورده Tam واخرون(2010) عن تفشي صفة المقاومة المتعددة في عزلات *P. aeruginosa* .

إن ظهور مقاومة بكتيرية ضعيفة تجاه المضاد Ciprofloxacin قد تعود إلى تغيرات بمنطقة الهدف أو الى زيادة في أنظمة الدفق (Jounson *et al.*,2005).

بالنسبة لمضاد Tetracycline، فقد بينت النتائج إن مقاومة البكتريا تجاهه 87.5% وتعود هذه المقاومة الى فقدان بروتينات الغشاء الخارجي البكتيري مما يقلل من نفاذية المضاد إلى داخل الخلايا الجرثومية (Murray *et al.*,2002). وهذه النتائج متفقة مع الموسوي (2003) .بالنسبة للمضاد (Piperacillin)، فقد كانت المقاومة التي أظهرتها هذه البكتريا تجاهه (91.666%) وقد تعود المقاومة للبنسلينات إلى إنتاجها لإنزيمات البيتالاكتاميز وهذا يتطابق مع مفتن (2000) بلغت نسبة المقاومة للبنسلينات (100%). وقد وجد Sahm (2001) إن 97% من عزلات *P. aeruginosa* كانت مقاومة لمجموعة البنسلينات و 88% من هذه العزلات كانت مقاومة لسيفالوسبورينات الجيل الأول والثانيوكانت المقاومة ضعيفة تجاه المضادين (Amoxicillin ,Amoxicillin-Clavunic acid) وقد يعود السبب الى إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز المحفزة كروموسومياً والتي لا تثبط بـ Clavulanic acid (Karlowsky *et al.*,2002).

قيمة أقل فرق معنويLSD = 1.23

قيمة اقل فرق المعنويLSD=1.03

4-3- الكشف الاستدلالي عن المواد الفعالة في المستخلصات النباتية:

أظهرت نتائج الفحص الكيميائي التمهيدي للمستخلصات النباتية كما في الجدول (4-7) أن المكونات الفعالة الموجودة كانت عديدة وهي الراتنجات والزيوت الطيارة فضلا عن المركبات الفينولية و التانينات

والكلايكوسيدات وغيرها وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما توصل اليه Friedman (2000) وتختلف هذه المركبات بحسب نوع النبات ،إذ إن الكشف عن المواد الفعالة وتشخيصها له أهمية في توظيف النتائج في مكافحة المسببات الجرثومية المرضية (Tyler ,1988) . وقد ثبتت فعالية مجموعة من هذه المواد الفعالة تجاه المسببات المايكروبية المرضية وأشارت دراسات متعددة الى إحتواء المستخلصات النباتية على المكونات الطبية ذات التأثير العلاجي الفعال في مكافحة الكثير من المسببات المايكروبية المرضية (DerMarderosian & Beutler.,2006). وقد ذكر Kather & Heym (2003) إحتواء بعض المستخلصات النباتية على الزيوت الطيارة والراتينجات وعناصر معدنية ، وإن لهذه المواد خصائص علاجية عديدة مضادة الجراثيم .

4-3-1- مستخلصات قشور الرمان

بينت نتائج الفحص الإستدلالي الكيميائي لمستخلص قشور الرمان وجود مواد فعالة منها : التانينات ، والكلايكوسيدات ، والقلويدات ، والصابونيات ، والفينولات ، والزيوت الطيارة ، والصمغيات وبحسب الفقرة (B-2-2-3) من المواد وطرائق العمل وكما مبين في الجدول (4-7).واتفقت هذه النتائج مع ما أورده Reed (1995) وكذلك وجود الكلايكوسيدات يتفق مع ما أورده المسعودي (2001). بينت النتائج كما في الجدولين(4-8) و(4-9)

حافظت المستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان كما في الجدول (4-9) على فعاليتها المثبطة أيضاً تجاه بكتريا *P. aeruginosa* وزيادة الفعالية المضادة للمستخلص مع زيادة التركيز إذ بلغت أقطار التثبيط عند التركيز 25 ملغم \مل للمستخلصين المائي والكحولي(11.9 و13.8)على التوالي وعند التركيز 50 ملغم \مل بلغت(14.5 و16.6) على التوالي . وكانت الفعالية في أحسن حالاتها عند تركيز 100 ملغم\مل إذ ازدادت أقطار التثبيط الى (20.2 و22) ملم للمستخلصين المائي والكحولي لقشور الرمان على التوالي وكان واضحاً إن المستخلص الكحولي هو المتفوق في الفعالية في جميع المعاملات المستعملة وتطابقت هذه النتائج مع ما ذكره Nimri وآخرون (1999) إن المستخلص الكحولي أكثر فعالية من المستخلص المائي لقشور الرمان ، وقد تعود فاعلية مستخلص قشور الرمان الى إحتواء هذه القشور على مواد فعالة مضادة منها التانينات والقلويدات مثل: Pelletirine و Pesudopelletirine، وتعد مادة التانين Tannin و Pelletirine من أكثر المواد فعالية في تثبيط وقتل الأحياء المجهرية إذ إن المحتوى العالي للتانينات والقلويدات في قشور الرمان يعطي النبات الفاعلية بالقضاء على أنواع مختلفة من الجراثيم المرضية الخطرة (Azouzz & Bullarman, 1982).

يمكن تفسير آلية عمل التانينات والمركبات الفينولية الموجودة في مستخلص قشور الرمان في فعاليتها المضادة للبكتريا بترسيب البروتينات الموجودة في الغشاء الخلوي أو داخل الخلية في حالة نفاذها الى داخل الخلية وتكوين أواصر هيدروجينية بين مجاميع الهيدروكسيل الحرة والمتعددة والبروتينات الخلوية وبالتالي تعطيل عمل بعض الأنزيمات المهمة في الخلية (Reed,1995; Zargham & Zargham,2008).

4-3-2- مستخلصات جذور الزنجبيل :

بينت نتائج الكشف الكيميائي لمستخلص جذور الزنجبيل وبحسب الفقرة (B-2-2-3) من المواد وطرائق العمل وجود المركبات الفعالة طبياً مثل :التربينات ، والكلايكوسيدات ، والقلويدات ، والصابونيات ، والفينولات ، والزيوت الطيارة. وهذا يتفق مع ما توصل اليه الشحات(2000) إذ عد مستخلص جذور الزنجبيل من المواد المثبطة لنمو الجراثيم لإحتوائه على مواد فعالة عديدة منها الفينولات والزيوت الطيارة . بينت نتائج ستعمال مستخلص جذور الزنجبيل كعامل تثبيط تجاه *P. miribilis* كما في الجدول (4-8) فقد كان التأثير تجاه هذه البكتريا قد أظهر فروق معنوية بين التراكيز المختلفة للمستخلص المائي إذ كانت زيادة التأثير تتناسب مع زيادة التركيز إذ أعطى تركيز100 ملغم\مل أكبر دائرة للتثبيط ، وهذا ينطبق مع ما أشار اليه Indue وآخرون (2006) إن المستخلص المائي لجذور الزنجبيل تأثير مثبط للبكتريا السالبة لملون كرام مثل *E. coli* .

أظهرت نتائج إستعمال مستخلصات الزنجبيل كمواد مثبطة تجاه *P. aeruginosa* كما في الجدول (4-9) وجود فروق معنوية بين التراكيز المختلفة لهذه المستخلصات فقد بلغت أقطار التثبيط عند التركيز 25 ملغم\مل للمستخلصين المائي والكحولي (12.7 و14.1) ملم على التوالي و(14.3 و15.3) ملم على التوالي عند التركيز 50 ملغم\مل .وتطابقت هذه النتائج مع ما أشار اليه Zaika (1988) الذي حصل على زيادة منطقة التثبيط بزيادة التركيز المستخلص الكحولي والمائي المستخدم لجذور الزنجبيل. في حين كانت الفعالية في أحسن حالاتها عند التركيز 100 ملغم\مل إذ ارتفعت الى (18.05 و 19.9) ملم للمستخلصين المائي والكحولي على التوالي . وهذا يتفق مع ما أشار اليه Sebiomo وجماعته (2011) إذ وجدوا زيادة في أقطار دائرة التثبيط مع الزيادة في تركيز المستخلص الكحولي والمائي لجذور الزنجبيل. إن نبات الزنجبيل يعالج العديد من الأمراض الميكروبية مثل الألتهابات البكتيرية و الفطرية و يحتوي العديد من المركبات التي تمتلك فعالية عالية مضادة للأحياء المجهرية وقد وجد إن جذور نبات الزنجبيل تحتوي على القلويدات التي تثبط نمو الجراثيم (Atai *et al* ,. 2009) . كما سجل المستخلص الكحولي فاعلية أكبر من المستخلص المائي ويقترب ذلك مما أشار اليه Cowan (1999) إن لمستخلصات جذور الزنجبيل فعالية عالية في تثبيط نمو البكتريا المعزولة من حالات سريرية لاحتوائها

على التانينات التي لها القدرة على تحفيز الخلايا البلعمية وتقوية المناعة في الجسم كما تعمل هذه المواد الموجودة في المستخلصات على تحطيم البروتينات الموجودة في جدار الخلية الجرثومية والتي تمكنها من الالتصاق. وقد وجد إن للقلويدات تأثيراً قاتلاً للجراثيم لقدرتها على الإندماج في أشرطة الحامض النووي DNA كما تتداخل مع المسارات الأيضية اللازمة وتثبط فعاليتها الفسلجية (Philipson *et al*,.1987). أشارت الدراسات أن المواد الفينولية في مستخلص الزنجبيل لها دور في فعالية هذه المتخلصات الدوائية كما ان للمركب 6-gingerol خواص مضادة للأكسدة (Bahandari *et al.*, 2005). يوجد Zingerone وshogaols بكمية قليلة في الزنجبيل الطازج لكن تتواجد بكمية أكبر في الزنجبيل المجفف (Jolad *et al*,. 2004). وقد تبين إن للزنجبيل فعالية دوائية تجاه *P. aeruginosa* ، *S. typhimurium*, *E. coli* و*P. meribilis* و *Candida albicans* (Jagetia *et al*., 2003). ان المستخلص الكحولي لجذور الزنجبيل له تأثير مثبط على نمو الجراثيم لاحتوائه على مادتي Zingiberene وFarnescene ومواد فعالة أُخرى مثل التربينات ، إذ لها دور تجاه البكتريا السالبة والموجبة لملون كرام إذ تعمل هذه المركبات على تحليل جدار الخلية أو إضعاف الفعالية الحيوية للخلية ، وقد تتداخل مع وظائف الغشاء الخلوي و إعاقة عملية النقل الفعال للأيونات والأملاح عبر الغشاء (Knoblock *et al* ,.1986).

4-3-3- مستخلصات ثمار السماق

بينت نتائج الكشف الكيميائي لمستخلص ثمار السماق وبحسب الفقرة (B-2-2-3) من المواد وطرائق العمل وجود المركبات الفعالة طبياً مثل :التانينات ، والتربينات ، والقلويدات ، والصابونيات ، والصمغيات ، و الزيوت الطيارة. وهذا يتطابق مع دراسة Kossah وجماعته (2010) بتميز ثمار السماق باحتوائها على عدد من المواد الفعالة مثل : الفلافونيدات ، والقلويدات ، والتربينات ، والصابونيات ، والزيوت الطيارة وبعض الأحماض العضوية مثل: حامض الستريك ، وحامض الماليك ويعتبر حامض الجاليك من المواد المهمة في مستخلص ثمار السماق ومن هنا فإن ثمار السماق مصدر جيد لهذه المركبات .

عند معاملة بكتريا *P. aeruginosa* بالمستخلصات المائية والكحولية لثمار السماق كانت جميع التراكيز المستعملة مثبطة للنمو الجرثومي وكان تأثير التركيز 5 ملم\مل ضعيفاً جداً ، كما يبدو من خلال قياس أقطار تثبيط النمو إن الفعالية تتناسب طردياً مع زيادة التركيز فعند المعاملة بالمستخلصات النباتية المائية والكحولية عند التركيز 25 ملغم\مل بلغت أقطار التثبيط (12.1 و13.2) ملم على التوالي وهذا تطابق مع دراسة Kelmanson وجماعته (2000) إذ أرجع فعالية المستخلص الكحولي لنبات السماق الى قطبية المذيب والتي تلعب دور في إستخلاص بعض المركبات الفعالة من دون الأخرى مما يؤدي الى

ترسيب أكبر كمية ممكنه من المركبات الفعالة وهذا ما لم تظهره المذيبات الأخرى المستعملة في هذه الدراسة. في حين بلغت أقطار التثبيط (15.6 و15.5) ملم على التوالي أيضاً عند التركيز 50 ملغم\مل سريرية وكما في جميع المعاملات في هذه الدراسة فإن التركيز العالي 100 ملغم\مل للمستخلصات المائية والكحولية فقد أمتلك الفعالية الأعلى في تثبيط النمو البكتيري إذ بلغت أقطار التثبيط (20 و20.7) على التوالي أيضاً. وتوافقت النتائج هذه مع ما ذكره الحديثي (2009) إن القدرة على التثبيط التي أظهرتها المستخلصات المائية والكحولية لثمار السماق ضد البكتريا المنتخبة قد يعزى الى قدرة المذيبات (الماء والكحول) على إذابة المكونات الفعالة في النبات والمؤثرة على نمو البكتريا بتأثيرها على جدران البكتريا وقدرتها على أختراقها أو علاقة تأثير هذه المستخلصات على الانزيمات البكتيرية أو التأثير على DNA و رايبوسومات الخلية .

أقل فرق معنويLSD=1.64

أقل فرق معنوي LSD=1.41

بالنسبة لتأثير مستخلص السماق على بكتريا *P. merabilis* فقد كانت هناك فروق معنوية بين التراكيز المختلفة للمستخلص المائي للسماق إذ ازداد قطر دائرة التثبيط بزيادة التركيز حيث كان أكبر قطر تثبيط عند التركيز 100ملغ\مل وكان يساوي (20) ملم وكان هناك أيضاً فروق معنوية بين التراكيز المختلفة للمستخلص الكحولي للسماق وقد أزداد قطر دائرة التثبيط بزيادة التركيز وقد كان أكبر قطر تثبيط عند التركيز 100ملغ\مل إذ بلغ (23) ملم ، وقد كان هناك فروق معنوية بين المستخلص المائي والكحولي للسماق تركيز100ملغ\مل إذ كان للمستخلص الكحولي تأثير أكبر من المستخلص المائي، وقد ذكر مجيد وآخرون (1988) إن لمستخلص السماق فعالية مضادة تجاه الجراثيم الموجبة والسالبة لملون كرام إذ يحتوي على مواد عفصية والتربينات الثلاثية والزيوت الطيارة والأحماض الدهنية ومواد ذات تأثير تجاه الجراثيم مثل: الميرستين ، ومواد دباغية مثل: Myricant بالإضافة الى حامض الجاليك Galic acid ذي التأثير الكبير على البكتريا والفيروسات .

4-4- تحديد التركيز الادنى المثبط Minimum Inhibitory concentration (MIC) :

يبين الجدول (4-10) التراكيز المثبطة الدنيا للمستخلصات النباتية المائية والكحولية لنمو عزلات بكتريا *P. mirabilis* ، وقد تبين من النتائج إن قيم التركيز المثبط الأدنى تتباين تبعاً لنوع المستخلص وطبيعة النبات الذي أخذ منه المستخلص وكذلك اعتماداً على المصدر السريري الذي أُخذت منه العزلات الجرثومية إذ تراوحت قيمة التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلصين المائي والكحولي لقشور الرمان تجاه هذه البكتريا بين (0.208-0.560) و (0.104-0.130) ملغم\سم^3 على التوالي والمعدل

(0.321 و0.109) على التوالي أيضاً أما المستخلصان المائي والكحولي لثمار السماق فقد تراوح (MIC) لهما بين (0.422-0.642) و(0.104-0.130) ملغم\سم^3 على التوالي والمعدل (0.55 و0.114) على التوالي ايضاً.

في حين أظهر المستخلصان المائي والكحولي لجذور الزنجبيل ان (MIC) لهما تراوح بين (0.422-0.936) و(0.532-0.844) ملغم\ سم^3 على التوالي والمعدل(0.695 و0.725) على التوالي أيضاً. ويبدو من هذه النتائج إن المستخلصات النباتية المائية والكحولية التي تعود لنباتات مختلفة قد تباينت في قيم (MIC) ويمكن تفسير هذا التباين على أساس الاختلاف في طبيعة المواد الطبية التي يضمها المستخلص أو على أساس عدم ضبط طريقة الاستخلاص وهذال يتفق مع ما أشار اليه عدد من الباحثين ومنهم العابدي (2006) و(Hernandez *et al* , 1994).

كما إن (MIC) للمستخلصات الكحولية كان ذو القيمة الأدنى وخاصة المستخلص الكحولي لقشور الرمان إذ سجل أوطأ معدل لل(MIC) مما يشير الى أنه الأكثر فعالية إذ بلغ (0.109) ملغم\سم^3 يليه المستخلص الكحولي لثمار السماق الذي كان مقارباً للأول إذ بلغ معدله (0.114). وهذا يتفق مع ما ذكره الكبيسي (2007) إذ أكد إن مستخلصات قشور الرمان كانت الأكثر فعالية في القضاء على الكثير من المسببات المرضية المجهرية التي تعزل من حالات سريرية . كما تتفق مع دراسة الياسين (2001) في تفوق مستخلصات ثمار السماق في تثبيط وقتل الجراثيم المرضية في أوطأ قيمة للتركيز المثبط الأدنى.

يبين الجدول (4-11) التراكيز المثبطة الدنيا للمستخلصات المائية والكحولية تجاه بكتريا *P. aeruginosa* ذات المصدر السريري وكان (MIC) للمستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان تجاه هذه العزلات قد تراوح بين (0.104-0.560) و(0.104-0.208) ملغم\سم^3 على التوالي والمعدل (0.430 و0.187) على التوالي أيضاً وكانت المستخلصات الكحولية لقشور الرمان أظهرت أدنى قيمة لل(MIC) مقارنة مع المستخلصات المائية في حين سجلت مستخلصات ثمار السماق المائية والكحولية قيماً للتركيز المثبط الأدنى تراوحت بين (0.422-0.592) و(0.422-0.734)ملغم\سم^3 على التوالي و المعدل(0.466 و0.546) على التوالي أيضاً. بينما تراوحت قيم (MIC) للمستخلص المائي للزنجبيل بين (0.422-0.532) ملغم\سم^3 بينما كانت قيم التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الكحولي للزنجبيل قد أظهرت قيمة ثابتة في كل المعاملات بلغت(0.125) ملغم\سم^3 ومعدلها(0.125) أيضاً وهي قيمة لل(MIC) منخفضة مما يدل على الفعالية المتميزة للمستخلص الكحولي لجذور الزنجبيل تجاه عزلا ت بكتريا *P. aeruginosa* وهذا ما أكده Sebiomo (2011) إذ بينت دراستهما إن عزلات *P. aeruginosa* كانت حساسة للمستخلصات الكحولية للزنجبيل وتتثبط في أدنى قيمة للتركيز المثبط وإنها أكثر فعالية من المضاد الحيوي Amikacin . كما يبدو من النتائج أيضاً إن قيمة (MIC) الكحولي

لثمار السماق هي أعلى من قيمة المستخلص المائي . وهذا يتفق مع العديد من الدراسات منها دراسة Mousa وآخرون (2001) الذي ذكر إن التركيز المثبط الأدنى لمستخلصات ثمار السماق الكحولية هي أعلى من نظيرتها المائية. ولوحظ في جميع المعاملات إن التركيز المثبط الأدنى لمستخلصات الرمان المائية كانت متميزة وأظهرت فروقاً معنوية في تأثيرها على عزلات *P. mirabilis* و *P. aeruginosa* وهذا يتفق مع ما توصلت اليه الملاح (2011) إذ أختبرت المستخلصات المائية والكحولية لنباتات طبية من جملتها قشور الرمان فكان التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الكحولي للرمان من بين جميع المستخلصات المائية والكحولية للنباتات هو الأكثر تأثيراً على هذه الجراثيم وفي تركيز منخفض .

4-5- الدراسة الجزيئية:

- تفاعل البلمرة Polymerase chain reaction

A- الكشف الجزيئي عن جين (*nfsA* gene):

تستعمل تقنية التفاعل المتسلسل لإنزيم بلمرة الدنا PCR للتشخيص السريع والدقيق، تبين إحتواء 17 عزلة من عزلات *P. aeruginosa* بنسبة 89.49% على المورثة (*nfsA* gene) وكما في الشكل (4-9)، إذ لوحظ إن الحزمة ذات حجم جزيئي 245bp عند الترحيل الكهربائي لتضخيم الجين مما يثبت إمتلاك هذه العزلات لهذا الجين. كما تبين إحتواء 20 عزلة من عزلات *P. mirabilis* البالغ عددها 24 عزلة بنسبة83.33% على المورثة (*nfsA* gene) وكما في الشكل (4-10)، إذ ثبت إن الحزمة ذات حجم جزيئي 245bp عند الترحيل الكهربائي لتضخيم الجين مما يثبت إمتلاك هذه العزلات لهذا الجين المسؤول عن تكوين إنزيم Nitroreductases الذي له دورٌ مهمٌ في ظهور المقاومة تجاه المضاد الحيوي Nitrofurantoin وهذا يتفق مع أشار اليه Samuelson (1999).

B- الكشف الجزيئي عن جين (*blaP1b* gene):

تبينت نتئج الترحيل الكربائي إحتواء 9عزلات من عزلات *P. aeruginosa* البالغ عددها 19 عزلة بنسبة 47.37% على المورثة (*blaP1b* gene) وكما في الشكل (4-11)، إذ لوحظ إن الحزمة ذات حجم جزيئي bp 350 عند الترحيل الكهربائي لتضخيم الجين مما يثبت إمتلاك هذه العزلات لهذا الجين . وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Aubert *et al.*,2010). ويمكن وملاحظة إحتواء 7عزلات من عزلات *P. mirabilis* البالغ عددها 24 عزلة بنسبة29.166% على المورثة (*blaP1b* gene) وكما في الشكل (4-12)، إذ لوحظ إن الحزمة ذات حجم جزيئي 350bp عند الترحيل الكهربائي لتضخيم الجين مما يثبت إمتلاك هذه العزلات لهذا الجين. وبذلك اتفقت هذه النسبة مع نسبة Zander وجماعته (2013) الذين وجدوا أنّ جميع عزلات بكتريا *P .mirabilis* أبدت امتلاكها للجين .

C- الكشف الجزيئي عن جين (*tetA* gene):

ثبت إحتواء 10عزلات من عزلات *P. aeruginosa* البالغ عددها 19 عزلة بنسبة 52.63%على المورثة (*tetA* gene) وكما في الشكل (4-13)، إذ لوحظ إن الحزمة ذات حجم جزيئي 323 bp عند الترحيل الكهربائي لتضخيم الجين مما يثبت إمتلاك هذه العزلات لهذا الجين. وثبت إحتواء 23عزلة من عزلات *P. mirabilis* البالغ عددها 24 عزلة بنسبة95.833%على المورثة (*tetA* gene) وكما في الشكل (4-14)، إذ لوحظ إن الحزمة ذات حجم جزيئي 323bp عند الترحيل الكهربائي لتضخيم الجين مما يثبت إمتلاك هذه العزلات لهذا الجين.

.

إن مضاد Tetracyclin يعتبر من المضادات الحيوية واسعة الطيف تجاه الممرضات الجرثومية إذ يستعمل ضد البكتريا السالبة والموجبة لملون كرام والبكتريا الهوائية واللاهوائية(Levy,1992) . أشار Col (1987) الى إن هذه المجموعة من المضادات قد أستعملت بشكل كبير في معالجة الحالات السريرية وتأتي هذه المجموعة بعد الأمبيسيلينات من المجموع الكلي لإستهلاك المضادات الحيوية . وقد بين Chopra وجماعته (1992) إن الإستعمال الواسع والعشوائي للتتراسايكلينات أدى الى ظهور مقاومة في الممرضات البكتيرية تجاه هذا المضاد ، وكذلك ذكر Levy (1992). إن مجموعة التتراسايكلينات تؤثرعلى الرايبوسوم البكتيري لتثبيط عملية تخليق. إن أهم البروتينات في تحت الوحدة الرابوسومية 30S التي تمتلك قابلية عالية للإرتباط بالتتراسايكلينات هي: S3 ، S7 ، S14 ، S19 إذ إن التتراسايكلين يرتبط بشكل مباشر مع البروتين S7 (Buck *et al* .1990). إن المركبين التابعين للتتراسايكلين chelocardin وthiatitracycline -6 لكليهما أعراض جانبية سمية عند إستعمالهما في حين إن المركبات N,N-dimethylglyclamid أحد مشتقات Minocycline و المركب-6-dimethyl-6-deoxytetracycilinease قد تم إختبارهما وتبين إن هذه المركبات أقل سمية وتتأثر بأنظمة الدفق (efflux system) وبجينات *tet genes* (Goldstein *et al*. 1994). وقد تم عزل مجموعة من جينات *tet* genes من عزلات بكتريا *P. aeruginosa* ضمت : *tetC* , *tetB* , *tetA* و *tetD* (Jones *et al*.1992). وإن هذه الجينات المعزولة قسمت الى فئتين هما: *tetA* (P) و *tetB* (P) (Sloan *et al* .1994). في حين وصف في دراسات أخرى كل جين على حده لذا يمكن تسمية هذه الجينات *tetA* (A) أو *tet* (A) او *tetA* إذ إن كل هذه التسميات صحيحة (Levy *et al*.1990).

D- الكشف الجزيئي عن جين (*Tri gene*):

ثبت إحتواء 8عزلات من عزلات *P. aeruginosa* البالغ عددها 19 عزلة 42.1%على المورثة (*Tri* gene) وكما في الشكل (4-15)، إذ لوحظ إن الحزمة ذات حجم جزيئي 300 bp عند الترحيل

الكهربائي لتضخيم الجين مما يثبت إمتلاك هذه العزلات لهذا الجين. وثبت إحتواء 23عزلة من عزلات *P. mirabilis* البالغ عددها 24 عزلة بنسبة95.833%على المورثة (*tri* gene) وكما في الشكل (4-16)، إذ لوحظ إن الحزمة ذات حجم جزيئي 300 bp عند الترحيل الكهربائي لتضخيم الجين مما يثبت إمتلاك هذه العزلات لهذا الجين.

إن معظم التغييرات المهمة في الجين تكون بسبب إبدال الحامض الأميني glycine في الموقع 30 بالحامض الأميني tryptophan وإبدال الحامض الأميني glutamin بـ glutamic acid في الموقع 158. وإن التغير ف ي الموقع 30 يسبب تغيراً في الموقع الفعال لإنزيم DHFR مؤدياً الى زيادة في ثابت التفكك K_i للإنزيم (Flenspurg *et al.* 1987).

E- الكشف الجزيئي عن جين (ADP gene)

ثبت إحتواء جميع عزلات *P. aeruginosa* البالغ عددها 19 عزلة على المورثة (ADP gene) وكما في الشكل (4-17)، حيث لوحظ إن الحزمة ذات حجم جزيئي 402 bp عند الترحيل الكهربائي لتضخيم الجين مما يثبت إمتلاك العزلات لهذا الجين. كما يمكن ملاحظة إحتواء 23عزلة من عزلات *P. mirabilis* البالغ عددها 24 عزلة بنسبة 95.833% على المورثة (ADP gene) وكما في الشكل (4-18)، إذ لوحظ إن الحزمة ذات حجم جزيئي 402bp عند الترحيل الكهربائي لتضخيم الجين مما يثبت إمتلاك هذه العزلات لهذا الجين.

إن مضاد Rifampicin مهم في علاج حالات التدرن والإصابات التي تسببها البكتريا المقاومة كما يستخدم لعلاج مدى واسع من المسببات المرضية وإن الإستعمال العشوائي لهذا المضاد يتسبب بتزايد المقاومة المكروبية (Wright,2005). بسبب إستعمال مضاد الريفامبين للعلاج بشكل واسع أدى ذلك الى ظهور سلالات بكتيرية إكتسبت مقاومة ضد هذا المضاد بفعل طفرات وراثية أو إنتقال جينات قافزة ، وإن الريفامبيم مشتق من مضاد Rifamycin وإن هذا المضاد تنتجه*Amycolatopsis lmediterranei* كما إن جينات المقاومة الجرثومية تجاهه قد تطورت في البيئات الطبيعية كرد فعل تجاه هذه المركبات وكذلك الحال في الإصابات السريرية ، وإن المقاومة لمضاد الريفامبين في الحالات السريرية في مجموعة من البكتريا مثل : *Nocardia sp.* و*Bacillus sp.* و *Pseudomonas sp.* تعود لآليات مقاومة متعددة لأنظمة الدفق المضادة للريفامبين (Rifampin efflux system) (Morisaki *et al.*,2000). وإن المركب mono-ADPribosylation يتفكك بواسطة إنزيم ADP-ribosyltransferase (ARTS)ويستهدف الإنزيم بشكل خاص الأحماض الأمينية مثل : Asp , Glu ,

α-anomer مكوناً β-NAD^+ وإن التفاعل يستعمل Asn , Arg ,diphthamide ,phosphoserine ومحرراً جزيئة Nicotinamide of ADP-ribosylated amino acid (Holbourn *et al.*,2006).

F- الكشف الجزيئي عن جين (*qnr* gene):

لوحظ إحتواء جميع عزلات *P. aeruginosa* والبالغ عددها 19 عزلة على المورثة (*qnr* gene) وكما في الشكل (4-19)، إذ لوحظ إن الحزمة ذات حجم جزيئي 519bp عند الترحيل الكهربائي لتضخيم الجين مما يثبت إمتلاك العزلات لهذا الجين. ويمكن ملاحظة إحتواء 11عزلة من عزلات *P. mirabilis* والبالغ عددها 24 عزلة بنسبة 45.833% على المورثة (*qnr* gene) وكما في الشكل (4-20)، إذ لوحظ إن الحزمة ذات حجم جزيئي 519bp عند الترحيل الكهربائي لتضخيم الجين مما يثبت إمتلاك هذه العزلات لهذا الجين.

ينتمي المضاد الحيوي Naldixic acid الى مجموعة Quenolones وهي فعالة في معالجة إصابات المسالك البولية (UTIs) ، ويمكن لمجموعة من أنواع البكتريا المعوية مقاومة هذه المضادات إذ تكون هذه المقاومة بواسطة بروتينات أنظمة الدفق والعناصر الوراثية المنتقلة والتي تحمل جينات *qnr* genes التي تمنح صفة المقاومة ضد مضادات Quinolones ، كما إن بلازميدات المقاومة تجاه المضادين Ciprofloxacin و Naldixic acid قد إكتشفت لأول مرة في سلالات *K. penumoniae* في عام 1998 (Martinez *et al.*1998) . و إن الجين المسؤول عن هذه المقاومة هو *qnr* وسمي لاحقاً *qnrA* وهذا الجين محمول على البلازميد pM G252 الذي يشفر للعديد من آليات المقاومة وقد تم إكتشاف نوعين أيضاً من هذه الجينات هما *qnrS* و *qnrB* في عام 2005 و 2006 (Jacoby *et al* .2006).تنتمي البروتينات التي تشفر لها جينات *qnr* الى مجموعة Pentapeptaide repeat protein (PRPs) إذ تقوم هذه البروتينات بحماية انزيم DNAgyrase و إنزيم topoisomerase IV من المضادات التابعة لمجموعة quenolones (Tran *et al* .2005). تظهر جينات *qnr* قدراً كبيراً من التغاير إذ إن هناك ما لا يقل من 6 نسخ لجين *qnrA* و20 نسخة لجين *qnrB* و3 نسخ لجين *qnrS* حيث يكون الإختلاف فيما بينها في حامض أميني واحد أوأكثر (Jacoby *et al.*2008) . وقد وجد أيضاً جين آخر تابع لهذه المجموعة هو الجين *qneD* في عزلات *Salmonella sp.* (C*avaco et al* .2009). إن جينات *qnr* منتشرة بشكل واسع بين أنواع البكتريا المعوية وهي عادةً ما تنتقل مع العناصر الوراثية المنتقلة (Robiesek *et al* .2006). إن هذا الأنتشار الواسع لجينات *qnr* في أنواع مختلفة من البكتريا المعوية وتغايرها الكبير يدل على إن هناك جينات تابعة

لهذه المجموعة لم تكتشف بعد ، وقد تم إكتشاف بلازميد جديد مسؤول عن مقاومة مضادات qunolones يحمل جين qnrC إذ وجد هذا الجين على البلازميد pHS10 في العزلات السريرية لجرثومة *Proteus mirabilis* (Wang *et al* .2009). إن شفرة البدء في عملية بناء البروتين AUG موجودة في الخلايا بدائية النواة إلا إن هناك شفرات بدء أخرى مثل GUG و UUG تكون موجودة بنسب قليلة فنسبة الشفرةGUG 8% و نسبة الشفرة UUG1%، وإن عملية بناء البروتين تبدء بمركب N-formly methionine الذي يعتبر كمثيونين femmethionineمحور ويحتوي على مجموعة مورميل مرتبطة مع مجموعة الأمين فيه ويستخدم لبدء عملية بناء البروتين فقط ويرمزلل tRNA بعد إرتباطه بالمثيونين بـ($FMet\text{-}tRNA_f^{Met}$)، وإن إنزيم deformylase بازاحة مجموعة الفورميل من السلسلة المتكونة (Laursen *et al* .2005). وقد أشار Sussman وSimons (1996) إن شفرة البدء AUG هي الأكثر كفاءة من شفرات البدء الأخرى .

ظهرت مستخلصات قشور الرمان ، وثمار السماق ، وجذور الزنجبيل فعالية تضادية جيدة لكن هذه الفعالية كانت متفاوتة مع ملاحظة *P. aeruginosa* و *P. mirabilis* تجاه بكتريا إن التأثير يتناسب طردياً مع زيادة التركيز وكما كانت المستخلصات الكحولية بشكل عام أكثر فعالية من المستخلصات المائية وقد يعود ذلك الى القدرة الاكبر لها على إذابة مواد اكثر من المواد الفعالة المضادة للجراثيم.

1. إن التركيز المثبط الأدنى(MIC) لمستخلص قشور الرمان أعطى كفاءة أعلى في التثبيط تجاه العزلات البكتيرية المختبرة من باقي المستخلصات المستعملة في الدراسة وهذا مؤشر على إمكانية إستخدامه بديلاً عن بعض المضادات الحيوية في السيطرة على الجراثيم
2. تميزت جميع عزلات *P. aeruginosa* بحساسيتها التامة تجاه مضادات Amikacin ، Imipenem وOfloxacin مما يعطي مؤشراً على إمكانية إستعمالها في علاج الأخماج التي تسببها هذه الجرثومة وكذلك الحال مع مضاد Imipenem مع جرثومة *P. mirabilis* إذ كانت جميع العزلات حساسة تجاه هذا المضاد.
3. أظهرت العزلات الجرثومية المختبرة مقاومة عالية جداً تجاه المضادات Rifampin ، Nitrufuration ، Piperacillin ، Tetracycline ، Trimethoprin و Nalidix acid .
4. تبين إن هنالك جينات مقاومة مسؤولة عن المقاومة العالية للعزلات الجرثومية تجاه المضادات المستعملة إذ بين الفحص الجزيئي PCR وجود جينات المقاومة Piperacillin (blaP1b gene) Nitrofurantoin (nfsA gene) وTetracycline (tetA gene) و Trimethoprin (Tri gene) و Rifampicin(ADP gene) و Nalidix acid (qnr gene) حيث تكسب هذه الجينات صفة المقاومة للعزلات البكتيرية .

- **الملاح ، زهراء عبد المنعم رؤوف(2011).**عزل وتشخيص عدد من الجراثيم المسببة لخمج الجروح ومعالجتها بمستخلص الرمان والموز والعسل خارج وداخل الجسم الحي . رسالة ماجستير ، كلية التربية، جامعة الموصل.
- **ياسين، نجلاء نبهان (2005).** دراسة تأثير الأوزون المذاب في الماء على بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من المصابين بجروح وحروق مختلفة وعلى عملية شفاء الحيوانات المختبرية المصابة بالبكتريا نفسها. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد. العراق.
- **الياسين ، سارة عزيز وطبان (2001).** دراسة الفعالية التضادية للنباتات الطبية على بعض الجراثيم المرضية . رسالة ماجستير .كلية العلوم . جامعة الكوفة.
- **النعيمي، ابتهال محمد زاهد(2002)**، الاخماج البولية عند النساء الحوامل، دراسة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- **الموسوي، يعقوب عبد الواحد صالح (2003)**، التحري عن البكتريا السالبة لصبغة غرام والخمائر كمسببات للتسمم الدموي في الاطفال وحديثي الولادة، رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- **مفتن ، فاطمة شغيث . (2000).** انتشار وضراوة بكتريا الكلبسيلا المعزولة من التهابات المجاري البولية في الانسان ودراسة محتواها البلازميدي، اطروحة ماجستير احياء مجهرية، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- **مصطفى ، ايمان عبد العزيز.(1995).** التأثيرات البايلوجية المثبطة لمستخلصات بعض النباتات الطبية في بعض الاحياء الدقيقة المعزولة من قنوات جذور الاسنان غير الحية ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل.
- **المسعودي، هيام خالص، (2001).** استخدام مستخلصات الثوم وثمار الرمان في معالجة الفئران البيض المصابة بالمشعرات الفأرية *Trichomonas muris* . رسالة ماجستير ، كلية العلوم، جامعة بابل.
- **المختار ، انتصار جواد عبد . (1994)** . دراسة الخصائص الدوائية لبعض النباتات الطبية في بعض الديدان الطفيلية في الفئران المختبرية . رسالة ماجستير علوم – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد .
-

- Abass, K. F. ; Al Khafaji, J. and Al Sukri, M. S. (2015). Molecular Detection of Some Virulence Genes in *Proteus mirabilis* Isolated from Hillaprovince. IJRSB., 3(10): 85-89.
- Abu-Shanab B., Adwan G., Abu-Safiya et al. (2005). Antibacterial activity of Rhus coriaria.L extracts growth in Palestine Islamic Univ. Gaza (Natural)132:12-45.
- Adwan, G., B. Abu-Shanab, and K. Adwan (2010). Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobials against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. Asian Pac J Trop Med. 266-269.
- Adyary, A. V. ; Pena, F. B. Medina, M. B. and Vuorela, P. M. (2003). Studies on the toxicity *Punica granthum* whole fruit extract. J. Ethnopharmacology. 89(2):295-300.
- Ahmet, D. D; Mustafa, O.; Kenan, S. D.; Nurcan, E. and Coskun D.(2009). Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (*Punica granatum*) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics. Molecules , 14, 1808-1817
- Antimicrob.Agents Chemother. 53:603–608.
- Cestari, S. H. ; Ludovico, M. S. ; Martins, F. H.; De Rocha, P. S. ; Elis, W. and Pelayo, J. S. (2013). Molecular Detection of HpmA and HlyA Hemolysin of Uropathogenic Proteus mirabilis. Curr Microbiol ., 67:703–707.
- Chaitra, H. R. , Madhuri, M. , Swaroop, T. , Das Arijit, D. , and Rohit, C. (2012). Evaluation of Antimicrobial Properties, Phytochemical Contents and
- Chidambara, M. K. N, Jayaprakasha, G.K, and Singh, R. P. (2002). Studies onantioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extractusing *in vivo* models. J. Agric. Food Chem. 50:4791-4795.
- Chopra, I., Hawkey, P.M. and Hinton, M. (1992). tetracyclines,molecular and clinical aspects. J. Antimicrob.Chemother .29, 245-277.61:3282–3287
- Chouduri, A. U. ; Wadud, A. and Islam, A. I. (2013). Microbial safety assessment of municipal water and incidence of multi-drug resistant *Proteus* isolates in Rajshahi, Bangladesh. Curr Res Microbiol Biotechnol. 1:189-195.
- Col, N.F. and O'Connor, R.W. (1987). Estimating worldwide current antibiotic usage: Report of task force 1. Rev.Infect. Dis. 9, $232-243.
- Collee, J. G., Fraser, A. G., Marmion, b. P. and Simmons, A. (1996). Macie and McCartney practical medical microbiolog. 14th ed. Churchill Livingstone Inc. New York.

- Corazza,M.; Carla, E.; Rossi, M. R.; Pedna, M. F. and Virgili, A (2003). Face and body sponges : beauty aids or potential microbiological reservoir. Eur. J.Dermatol . 13: 571–3.
- Cotton,L. A. ; Graham, R. J. and. Lee, R. J.(2009). The Role of Alginate in *P. aeruginosa* PAO1 Biofilm Structural Resistance to Gentamicin and Ciprofloxacin. Journal of Experimental Microbiology and Immunology(JEMI). 13:58-62.
- Covington, A. D. (1997). Modren tanning chemistry. J. chem.. Soc. Rev., 26:73-146.
- Cowan,M.M.(1999) Plants produce as antimicrobial agents.Clin microbial.Res.12(4) : 564:582.
- Davey, M. E., and G. O. O'Toole. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Revs. 64(4):847-67.
- Davis, N. F. and Flood, H. D. (2011). Plasmid mediated virulence factors of some *Proteus* isolates. Acad. *J. biolog. Sci*., 1(1): 7-22.
- De Groot, R., M. Sluijter, A. de Bruyn, J. Campos, W. H. F. Goessens, A. L.Smith, and P. W. M. Hermans.(1996). Genetic characterization of trimethoprim resistance in Haemophilus influenzae. Antimicrob. Agents Chemother.40:2131–2136.
- DerMarderosian, A. and Beutler. J.A.(2006).The Review of Natural Products. St. Louis, 5th ed. California. different regions of Turkey. *J Food Agric Environ* ., 8: 31-33.
- Digrak , M. Hakki , A. Iicim (2001), *Rhus coriaria* linn, a plant of medical, nutrition and industrial importance: a review ., international journal of pharmaceutical Biology , 39(5) , 346-351.
- Dogan, M. and A. Akgul (2005). Characteristics and fatty acid compositions of *Rhus coriaria* cultivators from south Turkey. Chem. Nat. Comp. 41:724725.
- Drawz, S. M.and Bonomo, R. A. (2010). Three Decades of β-Lactamase Inhibitors . Clin. Microbiol. Rev., 23(1): 160–201.
- Drzyzga, O., A. Schmidt, and K.-H. Blotevogel. (1995). Reduction of nitrated VOL. 180, 1998 nfsA and nfsB IN 5-nitrufuran resistance development 5537 diphenylamine derivatives under anaerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol.
- Duke, J.A. , JoBogenschutz-Godwin, M. , Du Cellierd, J., Du Ke P-AK., (2003). CRC Handbook of Medical Plant CRC press, Boca Raton, 269-270.
- Engel, J. N. (2003). Molecular pathogenesis of acute *Pseudomonas aeruginosa* infections. Severe Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. A. R. Hauser and J. Rello. Dordrecht, Kluwer Academic Publsihers, 201-229.

- Ernst, R. K.; Adams, K. N. (2006). The *Pseudomonas aeruginosa* lipid A deacylase: Selection for expression and loss within the cystic fibrosis airway. J. Bacteriol., 188: 191-201.
- Evans, W. C., Treas and Evan's(1997). "Pharmacognosy" 4 th. ed. W. B.
- Fazeli, M. R., G. Amin, M. M. A. Attari, H. Ashtiani, H. Jamalifar, and N. Samadi (2007). Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multixora*)against some food-borne bacteria. Food. Cont. 18:646-649.
- Sloan, J., McMurry, L.M., Lyras, D., Levy, S.B. and Rood,J.I. (1994) The *CIostridium perfringens* Tet P determinant comprises two overlapping genes: *tetA(P),* which mediates active tetracycline efflux, and *tetB(P),* which is related to the ribosomal protection family of tetracycline-resistance determinants. Mol. Microbiol. 11,403-415.
- Stankowska, P.K; S. Y. Gbedema; S. N. A. Quay; Y. Adu-Sarkodie and C. O. Okrah. (2007). Occurrence, species distribution and antibitics resistance of *Proteus* isolates: A case study at the Komfo Anokye teaching hospital in Ghana. *International Journal of pharma. scie. and res,*. 1 (9): 347-352.
- Stickler, D.J, (2008). Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. Nat Clin Pract Urol 5(11):598–608.
- Straus, Carpenter WT(1987): The prediction of outcome in schizophrenia, I: characteristics of outcome. Arch Gen Psychiatry; 27:739-746.
- Subha, A. and Ananthan, S. (2002). Extended spectrum beta Lactamase (ESBL) mediated resistance to third generation Cephalosporins among *Klebsiella pneumoniae* in Chennai. Indian Journal of medical Microbiology. 20(2) : P 92-95.
- Suree, H.J.D. and Deans , S.G. (2010). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils . Journal of Applied Microbiology . 88: 308–316 .
- Sussman, J. K., E. L. Simons, and R. W. Simons. (1996). *Escherichia coli* translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon in vivo. Mol.Microbiol. 21:347–360.
- Swierzko,A.S. ; Kirikae,T. & Kirikae,F. (2000).Biological activities of lipopolysaccharides of Proteus Spp.and their interactions with polymyxinB. ; and 18-KDa cataionic antimicrobiol protein (cap 18) derived peptide.J.Med.Microbiol. 49:127-138
- Talaro, K. and Talaro, A. (1996). Foundation in microbiology. 2 nd ed., W.m.C. Brown Publi.
- Tanaka, E.; Kawamoto, S.; Fukushima, J.; Hamajima, K.; ONishi, H.; Miyagi, Y.; Iami, S.; Morihara, K. and Okuda, K. (1991). Detection of elastase

production in *Escherichia coli* with the etastase structural gene from several non-elastase-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*.J. Bacteriol., 173(19): 6153-6158. therapeutic properties of pomegranate. p.231-35.

the blaCARB-3 gene encoding the carbenicillinase-3 lactamase of *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 102:7–12.

- Todar ,K. (2004) . Text Book of Bacteriology . University of Wisconson –Madison , Department of Bacteriology .U.S.A.
- Todar, K. (2009). Todar's Textbook of Bacteriology. Microbial world. Opportunistic Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa.. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology.
- Tortora, G.J.; Funke, B.R. and Case, C.L. (2001). "Microbiology An Introduction". 5th ed., Benjamin Cummings Publishin Company, California, pp. 422-438, 531-554.
- Torzewska A, Rozalski, A. (2014). Inhibition of crystallization caused by *Proteus mirabilis* during the development of infectious urolithiasis by various phenolic substances. *Microbial Res* 169: 579–584.
- Torzewska A, Stączek P, Rożalski A (2003) Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of *Proteus* endotoxin polysacchrides. *J Med Microb* 52: 471–477.
- Tran, J. H., and G. A. Jacoby. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5638–5642.
- Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. (2005). Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with Escherichia coli DNA gyrase. Antimicrob. Agents Chemother. 49:118–125.
- Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper. (2005). Interaction of theplasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. Antimicrob. Agents Chemother. 49:3050–3052.

  translation initiation factor 3 discriminates the initiation codon in vivo. Mol.Microbiol. 21:347–360.
- Ünver A and Özcan M M. (2010).Fatty acid composition of seed. Herbal Medicine Research Centre (HMRC) Analytical Chemistry Letters, pp 129 – 132.
- Uwaezuoke, J. C. and Aririatu, L. E.(2004). A survey of Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* strains from clinical sources in Owerri. J. Appl. Sci. Environ. Managt. 8(1):67-8.

- Uzel, A.; Guvensen, A. and Cetin, E. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Anthemis xylopoda*, O. Schwarz from Turkey, J. of Ethnopharmacol., 95 (2-3):151-154.
- Van daele, S.; Vaneechoutte, M.; De boeck, K.; Knoop, C.; Malfroot, A.;Lebecque, P.; Leclercq-Foucart, J.; Van schil, L.; Desager, K.; and Baets, F.(2006). Survey of *pseudomonas aeruginosa* genotypes in colonised cystic fibrosis patients. J., 28:740-747.
- Vandepitte, J. ; Engback, K. ; Piot, P. and Heuk, C. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization, Geneva.
- Vanisree, H.I. , Caccamo, A. M. and Fathuddin M.M. (2004). In vivo antitrypanosomal potentials of ethyl acetate leaf extracts of *Punica granatum* against *Trypanosoma brucei brucei*,Adv. Agr. Bio., 1, 82-88.
- Varel, I. and Vincent, H. (2002). Carvacrol and thymol reduce swine waste odor and pathogens: stability of oils. Curr. Microbiol., 44: 38-43.
- Verpoorte, R. ; Tginastoi, A. ; Vandoorn, H. and Svendsen, A.B. (1982). Medical plant of serinam, 1-Antimicrobial activity and some medicinal plant. J. Ethnopharmacol.,5: 221-226.
- Vives-Flórez, M. and Garnica,D. (2006). Comparison of Virulence between Clinical and Environmental *Pseudomonas aeruginosa* Isolates.International Microbiology . 9:247-252.
- Voravuthikunchai. A. ; Lortheenuwat, A. Jeeju, W. A. (2004). Effective medical plants against enteroheamrrhagic gor human breast cancer. Breast cancer res. And treat.71(3): 203-217.
- Wang M, Guo Q, Xu X. (2009) .New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis.* Antimicrob Agents Chemother 53:1892-1897.
- Wang, H.; Provan, G.J. and Helliwell, K. (2000). Tea flavonoids their functions utilization and analysis Trends Food. Sci. Tech., 11: 152–160.
- Westwood, S.; Tommassen, J. and Jaeger, K.E. (2005). A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 181(22): 6977-6986.
- Wilson, B. A., Evans, J. J., Emslie, H., Alderman, N., & Burgess, P. (1998). The development of an ecologically valid test for assessing patients with a dysexecutive syndrome. Neuropsychological Rehabilitation, 8(3), 213–228.
- Wohlmuth , H. ; Leach , D. ; Smith , M. and Myers , S. (2005). Gingerol content of Diploid and tetrapliod clones of Ginger (Zingiber officinal). J. of Agric. Food Chemi. , 53 : 5772 – 5778 .

- Working Party the British Society for Antimicrobial Chemotherapy . (1991) . A guide to antibiotic sensitivity testing . J. Antimicrob. Chemothe .,27 (Suppl. D) : 1-50 .
- Wright GD (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. Adv Drug Deliv Rev 57:1451–1470
- Yah, S.C.; Eghafona, N.O.; Oranusi, S.; and Abouo, A. M. (2007).Widespread plasmid resistance genes among *Proteus* species in diabetic wounds of patients in the Ahmadu Bello university teaching hospital (ABUTH) Zaria. *Acad. J*.,6(15): 1757-1762.
- Yemitan O. K. and Izegbu M. C. (2006). Protective effects of *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) against carbon tetrachloride and acetaminopheninduced hepatotoxicity in rats. Phytother. Res. *20*:997-1002.
- Yoon,S.S. (2010). Anaerobiosis of *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for Treatments of Airway Infection . Journal of Bacteriology and Virology . 40(2) : 59 – 66.
- Zaika,L.L. (1988).Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. J. Food Safety. 9 (2): 97-118.
- Zander E, Segal A, Kaufmann P, Nelson H & Crosa G (2013). Expiration of blaP1b in clinical *Proteus mirabilis* , *Escherichia coli* isolates and association with altered carbapenem susceptibility. J Antimicrob Chemother 68: 308-311.
- Zargham H and Zargham R. (2008). Tannin extracted from Sumac inhibits vascular smooth muscle cell migration. Mcgill J Med 11:119–123
- Zenno, S., T. Kobori, M. Tanokura, and K. Saigo. (1999). Purification and characterization of NfrA1, a Bacillus subtilis nitro/flavin reductase capable interacting with the bacterial luciferase. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62:1978–1987.
- Zhanel, G.G., J.A. Karlowsky, G.K.M. Harding, A. Carrle, T. Mazzullit, and D.E.A.Low. (2000). A Canadian national surveillance study of urinary tract isolates from outpatients: Comparison of the activities of trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, mecillinam, nitrofurantoin, and ciprofloxacin. J. Antimicrob. Agents Chemother. 44(4): 1089–1092.
- Zhang, Y.; L. Yang; Y. Zu and F. Liu (2010). Oxidative stability of sunflower oil by carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*. *118:656-662.*
- Zhao W, Zhu H, Yu Z, Aoki K, Misumi J, Zhang X. (1998) Long-term Effects of Various Iodine and Fluorine Doses on the Thyroid and Fluorosis in Mice.Endocr Regul;32(2):63-70

Abstract

This study aimed to test the inhibitory effect of the water and alcohol extracts (using ethanol) on the peel of pomegranate , sumac fruits and ginger roots against two types of bacteria: *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical cases. The effective natural antibacterial compounds containing plant extracts.

290 samples were collected from patients at the Diwaniyah Teaching Hospital and from various clinical cases that included various samples of the patient's human body: ear swabs, wounds swabs, urine. sputum and faeces for the period from the beginning of September 2015 to 25 January 2016. The samples were distributed into 123 samples from males and 167 samples from females. The highest number of bacterial isolates was in the isolates from females 159 (159.5%), compared with 119 (41.03%) from males. The isolates of *P. aeruginosa* 19 (6.55%) were distributed at 9 (3.44%) for males and females respectively, and *Proteus mirabilis* 24 (8.27%) were distributed at 10 (3.44%) and 14 (4.82%) for males and females, respectively.

The sensitivity of bacterial isolates to 15 antibiotics circulating in health institutions was varied and sensitivity and resistance varied according to the type of the antibiotic and the type of bacterial isolation tested. The isolates of *P. aeruginosa* were characterized by their high resistance to antibiotics such as Trimethoprim, Nitrufuration, Naldixic Acid, Rifampin, Tetracycline (100%, 100%, 94.73%, 89.47% and 84.21%) respectively. While all isolates were completely sensitive to Amikacin, Ofloxacin and Imipenem.

The *P. mirabilis* isolates were highly resistant to antibiotics such as Trimethoprim, Nitrufuration, Rifampin, Naldixic acid, Pepracilin and Tetracycline (100%, 100%, 100%, 95.83%, 91.66% and 87.5%) respectively. while all isolates were highly sensitive to the antibiotic Imipenem (0%). The isolates were sensitive to Amoxicillin-Clavunic acid, Amikacin and Amoxicillin, with resistance (4.16%).

The effects of extractions of pomegranate, ginger root, and sumac fruits showed an effective inhibitory on bacterial isolates. Effectiveness varied according to the type of bacterial isolates and the nature of the extract. The inhibitory activity was directly proportional to the concentration. At 25 mg / ml for plant extracts, the best water extracts were effective against isolates *P. mirabilis* is the extract of the sumac fruits

with a diameter of inhibition (12.53) mm and the best extract of alcohol is the extract of pomegranate peel and ginger roots with a diameter of inhibition each (13.1) mm.

The 50 mg / ml were the most effective extracts of water and alcohol for pomegranate crusts (14.83 and 17.66 mm) respectively. At 100 mg / ml concentration, water and alcohol extracts maintained their superiority with diameters (21 and 23) Respectively. The alcohol extracts of the sumac fruits were also distinguished with a diameter of (23) mm inhibition against *P. mirabilis* isolates.

The results of water and alcohol extracts showed a different inhibitory effect for P. aeruginosa isolates. At 25 mg / ml concentration, the extracts of water and alcohol ginger were the most effective, with diameters (12.71 and 14.13 mm) respectively.

In the 50 mg / ml concentration, the effect was significantly different. The highest effect of the extract was obtained from the extract of the sumac fruits whereas the pomegranate extract of the pomegranate extract was highest in the *P. aeruginosa* isolates. While the concentration was 100 mg / ml, Water and alcohol extracts for pomegranate crusts with diameters (20.26 and 22.02 mm) respectively.

The minimum inhibitory concentrations of water and alcohol extracts for treated bacterial isolates varied in their values depending on the type of extract and the nature of the plant and the clinical source from which the bacterial samples were taken. The lowest inhibitory concentration of the water and alcohol extracts of pomegranate scales was the most effective inhibitory for *P. mirabilis* isolates, with the lowest concentration of water and alcohol extracts, with a mean of 0.104 and 0.130 mg / ml respectively. The lowest inhibitory concentrations of plant extracts towards *P. aeruginosa* isolates recorded the lowest value of the lowest inhibitory concentration (0.430 mg / ml) and within the alcoholic extracts. The extract of the ginger root was the highest inhibitory effect, P. aeruginosa isolates compared with other alcoholic extracts with a concentration rate of 0.125 mg / ml.

Some resistance genes were detected by PCR technique. The genes responsible for bacterial resistance were identified for isolates of *P. mirabilis* and *P. aeruginosa* against Nitrofurantoin, Piperacillin, Tetracycline, Trimethoprim, Rifampicin and Nalidix acid. *NfsA* is responsible for resistance to nitrofuration in 17 isolates out of 19 isolates in *P. aeruginosa* with 89.47% while the *blaP1b* gene

responsible for resistance to pipracilin was present in 9 isolates out of 19 isolates with 47.37% .When the *tetA* gene responsible for resistance to tetracycline was present in 10 isolates out of 19 ADP of resistance to Rifampin was found to be 100% in all isolates and for *qnr* responsible for resistance to Naldixic acid. The responsible *tri* is responsible for resistance to the antibiotic Trimethoprim was found in 8 isolates out of 19 isolation and 42.1%.

The genes responsible for bacterial resistance were detected for *P. mirabilis* isolates. The gene *nfsA* was found in 20 isolates out of 24 isolates with 83.33%, and the gene *blaP1b* was found in 7 isolates out of 24 isolation by 29.166%, 23 isolates out of 24 isolates were found to be 95.833%, as were the *tri* and ADP genes. The *qnr* was found in 11 isolates out of 24 isolates with 45.833%.

The Ministry of Higher Education and Scientific Research

University of Qadisiya\College of Education

Department of Biology

Molecular comparative study of *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa* sensitive to some antibiotics and plants extractions

A theses submitted to

Council of the College of Education - University of Qadisiya

It is part of a master's degree requirements in Biology/ Microbiology

By

Sajjad Kadhim Hussein al-faham

Supervised by

A. P. ***Ali abdul raheem al-Nashy***

2016