وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية/كلية التربية
قسم علوم الحياة

التقويم الجزيئي لعوامل الضراوة وجينات مقاومة المضادات الحياتية لبكتريا *Proteus mirabilis* في مدينة الديوانية

أطروحة مُقدّمة إلى مجلس كلية التربية/جامعة القادسية
وهي جزء من متطلّبات نيل شهادة دكتوراه فلسفة
علوم حياة / أحياء المجهرية

من قبل
نجلاء عبد الله داوّد العكيليّ
ماجستير علوم حياة/أحياء المجهرية 2004

إشراف

أ.د. ماجد كاظم عبود الشبليّ
أ.د. أزهار نوري حسين الموسويّ

1438 هـ
2017 م

بِسۡمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحۡمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

ٱقۡرَأۡ بِٱسۡمِ رَبِّكَ ٱلَّذِى خَلَقَ ١ خَلَقَ
ٱلۡإِنسَٰنَ مِنۡ عَلَقٍ ٢ ٱقۡرَأۡ وَرَبُّكَ
ٱلۡأَكۡرَمُ ٣ ٱلَّذِى عَلَّمَ بِٱلۡقَلَمِ ٤
عَلَّمَ ٱلۡإِنسَٰنَ مَا لَمۡ يَعۡلَمۡ ٥

صَدَقَ ٱللَّهُ ٱلۡعَظِيمُ

[العلق: ١-٥]

الاهداء

خشوعا" وإجلالا" وتعظيما" لمن علّمني مالم أعلم .....

اللّه سبحانه وتعالى

الى علم الهدى ومصباح الدجى .....

محمد (صلى اللّه عليه) والى اهل بيته

الطيبين

واصحابه الميامين (عليهم السلام)

الى الروض الطيب الذي إوي اليه.....

أبي الحبيب (رحمهُ الله)

الى القلب الكبير الذي ضّحى بالكثير .....

الى من حفرت الصخر لتشق لنا درب الحياة .....

أمّي الحبيبة (رحمها الله)

الى الشمعة التي أبصر بنورها .....

زوجي الغالي

الى من بهم أشد أزري ..... احبتي .....

اولادي اخوتي اخواتي

إلى كلّ من علّمني حرفا" .....

أساتذتي حفظهم الله

..... الى كل من يسّره نجاحي .....

الباحثة

نجلاء

شُكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين ابي القاسم محمد (صلى الله عليه وآله) وأهل بيته الطيبين الطاهرين ..... وبعد :

يسرني ويشرفني وانا انهي كتابة اطروحتي هذه ان اتوجه بخالص شكري إلى الأستاذ الدكتور ماجد كاظم الشبلي والأستاذة الدكتورة أزهار نوري الموسوي لِما قدماه من مقترحات قيمة وتوجيهات مستمرة طوال مُدة الدراسة وتنفيذ البحث .....فجزاهما الله خير الجزاء .....

واقدم شكري وتقديري إلى السيد عميد كلية التربية الأستاذ الدكتور خالد جواد العادلي ، كما اتقدم بوافر الشكر والامتنان إلى السيد رئيس قسم علوم الحياة الأستاذ المساعد الدكتور أحمد جاسم و السيد مقرر قسم علوم الحياة الأستاذ المساعد الدكتور حيدر عبد الواحد الغانمي لجهودهم المتواصلة في توفير ما يلزم توفيرهُ من متطلبات الدراسة ، وشكري وتقديري إلى أساتذتي في قسم علوم الحياة وجميع منتسبي قسم علوم الحياة وعمادة كلية التربية فجزاهم الله خير الجزاء.....

واقدم شكري أيضاً إلى السيد حسن حاجم التدريسي في كلية الطب البيطري-جامعة القادسية لما ابداه من مساعدة قيمة وتسهيلات طيلة مدة البحث .

ومِنَ الوفاء ان اكون ممتنة وعارفةً بالجميل إلى المنتسبين في قسم المختبرات في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى الولادة والأطفال التعليمي وأخص منهم البكتريولوجي أنمار حميد حبيب والبكتريولوجية أسيل يوسف وهالة سعد لما قدموه لي من مساعدة خلال مدة البحث .

وختاماً شكري وأمتناني إلى عائلتي فكانوا لي خير عون وسند لإكمال دراستي ، وإلى كل من مد يد العون لي وساندني خلال مدة دراستي .

والله وليُّ التوفيق

الباحثة

إقرار المشرف

نشهد أن إعداد الأطروحة الموسومة بـ (التقويم الجزيئي لعوامل الضراوة وجينات مقاومة المضادات الحياتية لبكتريا *Proteus mirabilis* في مدينة الديوانية) جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة/كلية التربية/جامعة القادسية، وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة/ الأحياء المجهرية.

التوقيع:
المشرف: أ.د. ماجد كاظم عبود الشبلي
اللقب العلمي: أستاذ
العنوان: كلية التربية/جامعة القادسية
التأريخ: / / 2017

التوقيع:
المشرف: أ.د. أزهار نوري الموسوي
اللقب العلمي: أستاذ
العنوان: كلية الصيدلة/جامعة القادسية
التأريخ: / / 2017

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناءً على التوصيات المقدمة المتوافرة، أُرشح هذه الأطروحة للمناقشة.

التوقيع:
الأسم: أ.م. د. أحمد جاسم
اللقب العلمي: أستاذ مساعد
التأريخ: / / 2017

إقرار المقوم اللغوي

نشهد أنّ الأطروحة الموسومة بـ (التقويم الجزيئي لعوامل الضراوة وجينات مقاومة المضادات الحياتية لبكتريا *Proteus mirabilis* في مدينة الديوانية) تمت مراجعتها لغوياً وأسلوبياً، فأصبحت بذلك مؤهلة للمُناقشة على قدر تعلُّق الأمر بالسلامة اللغوية.

التوقيع:

الأسم: أ. خالد عبد فزاع

اللقب العلمي: أستاذ

التأريخ: / / 2017

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين في أدناه بأننا أطلعنا على الأطروحة الموسومة بـ (التقويم الجزيئي لعوامل الضراوة وجينات مقاومة المضادات الحياتية لبكتريا *Proteus mirabilis* في مدينة الديوانية) وناقشنا الطالبة (نجلاء عبدالله داوَد العكيلي) في محتوياتها وفيما لهُ علاقة بها بتأريخ 10/12/ 2017 فوجدناها جديرة بالقبول لنيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة / الأحياء المجهرية بتقدير (امتياز).

رئيس اللجنة
التوقيع:
الأسم: أ. د. زيدان خليف عمران
العنوان: جامعة بابل / كلية علوم البنات
التأريخ: / 10 / 2017

عضو اللجنة
التوقيع:
الأسم: أ. د. جبار رسن زنكور
العنوان: جامعة بغداد / كلية الطب
التأريخ: / 10 / 2017

عضو اللجنة
التوقيع:
الأسم: أ. د. نيران عبيد جاسم
العنوان: جامعة القادسية / كلية الصيدلة
التأريخ: / 10 / 2017

عضو اللجنة
التوقيع:
الأسم: أ. د. أحلام كاظم نعيم
العنوان: جامعة الكوفة / كلية التربية للبنات
التأريخ: / 10 / 2017

عضو اللجنة
التوقيع:
الأسم: أ. م. د. بهيجة عبيس حمود
العنوان: جامعة القادسية / كلية التمريض
التأريخ: / 10 / 2017

عضو اللجنة والمشرف
التوقيع:
الأسم: أ. د. ماجد كاظم عبود
العنوان: جامعة القادسية / كلية التربية
التأريخ: / 10 / 2017

عضو اللجنة والمشرف
التوقيع:
الأسم: أ. د. أزهار نوري حسين
العنوان: جامعة القادسية / كلية الصيدلة
التأريخ: / 10 / 2017

مصادقة كلية التربية - جامعة القادسية

التوقيع:
العميد: أ. د. خالد جواد العادلي
التأريخ: 26/ ١١ / 2017

الخلاصة

الخلاصة :

جمعت 650 عينة من مصادر مختلفة شملت الإدرار (250) والأذن الوسطى (185) والجروح (40) والحروق (85) وأعلى عنق الرحم وبطانة الرحم (90) وأخذت هذه العينات من المرضى المراجعين والراقدين في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى الولادة والأطفال التعليمي في مدينة الديوانية للمدة من 2015/3/1 لغاية 2016/1/30 .

شخصت 64 عزلة عائدة لبكتريا *Proteus mirabilis* بالأعتماد على الصفات الزرعية والمجهرية والأختبارات الكيموحيوية وتم تأكيد تشخيصها بواسطة API 20 E وتفاعل البلمرة المتسلسل إضافة إلى التشخيص الجزيئي للتحري عن مورثة *16s* RNA ، تمَّ إجراء طريقة تسلسل الحامض النووي DNA وهذا تأكيداً لعزلات بكتريا *P.mirabilis* إلى جانب ذلك إجراء تحليل الشجرة الوراثية وإجراء التسجيل في موقع بنك الجينات في كوريا الجنوبية وكانت نتائج التسلسل الجيني (100%) .

بينت نتائج العزل ان أعلى نسبة للخمج تم الحصول عليها من الإدرار ثم الأذن الوسطى وعنق الرحم وبطانة الرحم وأخيراً الجروح والحروق ، إذْ سجلت (12.8%) و (9.18%) و (8.88%) و (7.5%) و (4.7%) كما ذُكر سابقاً .

تم التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز إذْ كانت جميع العزلات البكتيرية منتجة لهذه الانزيمات وبنسبة (100%) ، اختبرت مقاومة العزلات البكتيرية ضد 12 نوع من المضادات الحياتية المختلفة وأبدت العزلات مقاومة مختلفة ضد مضادات البيتالاكتام المتضمنة Penicillin و Amoxicillin / Clavulanic acid بنسبة (100%) و Cefotaxime بنسبة (86%) و Cephalexin بنسبة (90.62%) و Imipenem بنسبة (18.75%) و Meropenem بنسبة (15.62%) . كذلك قاومت البكتريا المعزولة مضادات مجموعة الامينوكلايكوسيدات وبنسب مختلفة وهي : Gentamycin و Amikacin و Tobramycin و Kanamycin و Streptomycin و Netlimicin (54.68%) و (31.25%) و (76.56%) و (81.25%) و (85.93%) و (81.25%) كما ذُكر سابقاً .

حُدد التركيز المثبط الادنى لعدد من المضادات الحياتية للامينوكلايكوسيدات للعزلات البكتيرية المقاومة وهي مضاد Gentamycin و Tobramycin و Kanamycin و Streptomycin و Netlimicin إذْ أظهرت العزلات قابليتها على النمو في تراكيز عالية تراوحت بين (32 - 1024) مايكروغرام/ مل .

درست بعض عوامل الضراوة مظهرياً ووراثياً ، إذْ كانت نسب المظهرية لأختبار الهيمولايسين وتكون الغشاء الحيوي والتحري عن الأسواط والأهلاب وأنزيم اليوريز عالية جداً وبنسب (90.62%) و (95.31%) و (100%) و (92.18%) و (100%) كما ذُكر سابقاً . اما من ناحية الجانب الوراثي فتم الحصول على خمسة جينات لعوامل الضراوة وبنسب متفاوتة إذْ كان لأنزيم اليوريز *ureC* ولتكوين الأهلاب *mrpA* ولتكوين الأسواط *flaA* ولأنزيم الهيمولايسين *hpmA* ولتكوين الغشاء الحيوي *luxS* وبنسب (60%) و (40%) و (100%) و (45%) و (55%) كما ذُكر سابقاً .

كذلك تم دراسة انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات عن طريق الأنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات إذْ كانت النتائج أيضاً متفاوتة للجينات *aac(3)-Ia* و *aac(6')-Ib* و *ant(4')-IIa* و *ant(2'')-Ia* و *aph(3'')-Ib* وبنسب (20%) و (40%) و (15%) و (50%) و (50%) كما ذُكر سابقاً .

آستخدمت مادة كبريتات دودسيل الصوديوم SDS لإجراء عملية التحييد لبعض عزلات *P.mirabilis* ، نجحت هذه العملية في التخلص من الحزم البلازميدية العائدة لتلك العزلات إذْ فقدت بعضاً من صفات المقاومة للمضادات الحياتية وإنتاج أنزيمات البيتالاكتام.

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

المقدمة Introduction

تعد بكتريا *Proteus mirabilis* من أهم الأنواع التابعة لجنس المتقلبات *Proteus*، هي بكتريا عصوية سالبة لصبغة غرام التي تنتمي إلى العائلة المعوية Enterobacteracea ضمن مجموعة Proteeae الواسعة الانتشار في الطبيعة التي يمكن عزلها من مصادرعدة كالتربة والماء والحيوانات (Shar *et al*., 2012 ; O'Soge *et al*., 2009)، والتي تعد من أهم أنواع البكتريا المنتشرة في المستشفيات والمسؤولة عن العديد من الاخماج المكتسبة فيها وتعد بكتريا *P.mirabilis* من الكائنات المجهرية الانتهازية لما تسببه من مشاكل صحية للإنسان (Brooks *et al*., 2007) .

تسبب بكتريا *P.mirabilis* بصورة رئيسة خمج المسالك البولية وعلى الرغم من ذلك فأنها تأتي بعد بكتريا *E.coli* في إحداث خمج المسالك البولية (Ramakrishnan and Scheid , 2005) . وكذلك تسبب هذه البكتريا خمج المسالك البولية للمرضى الراقدين في المستشفيات والمستخدمين للقثاطر البولية وكذلك الاشخاص الذين يعانون من مشاكل وظيفية وتشريحية غير طبيعة للمسالك البولية (Sosa *et al*., 2006) ، إذْ تستوطن هذه البكتريا اسطح القثاطر البولية ، وان قدرة هذه البكتريا على الاستيطان في المسالك البولية يعود إلى امكانية تخليق زوائد بروتينية تسمى الأهلاب (Fimbria) تساعد على الالتصاق بالخلايا الطلائية البولية والخلايا الطلائية الكلوية (Sabbauba *et al*., 2003)، ومن مضاعفات خمج المسالك البولية حصى الكلى (Kidney stone) وتجرثم البول (Bacteriuria) المتكرر، إذْ يعد أخماج المسالك البولية من المشاكل الصعبة الواسعة الانتشار في العالم ويصاب بهِ الملايين من الأشخاص سنوياً وتعد النساء أكثر ميلاً من الرجال للإصابة بهذا المرض ، إذْ يأتي بالمرتبة الثانية بعد أخماج المسالك التنفسية إذْ يتعرض الذكور والاناث لهذا المرض (Delzell and Lefevre , 2000).

يعد خمج الأذن الوسطى (Otitis media) أحد الاخماج التي تسببه بكتريا *P.mirabilis* وتصيب أعداد كبيرة من البشر في انحاء مختلفة من العالم ومسبباً مشاكل صحية مهمة وخاصة في مرحلة الطفولة المبكرة . إذْ ان (60 -80%) من الأطفال يتكرر لديهم خمج الأذن الوسطى خلال السنوات الأولى من العمر (Kalcioglu *et al*., 2006) ، فإن تكرار خمج الأذن الوسطى في مرحلة الطفولة يزيد من ضعف السمع وتأخر القدرة على الكلام ويؤثر على تعلم اللغة ومستوى ذكاء الطفل (Daly *et al*.,2005) ، ويعد التشخيص المبكر لخمج الأذن الوسطى الحادّ والمزمن مهم جداً في تفادي المخاطر والمضاعفات التي تصاحب هذا

الخمج في مراحله المتأخرة ، والمتمثلة بخراج الدماغ (Brain abscess) ، وأخماج السحايا (Meningitis) وتجلط الجيب الوريدي الجانبي (Lateral sinus thrombosis) ، وكذلك ان نسبة (58%) من المضاعفات تكون ناشئة عن خمج الأذن الوسطى (Pendido Nde *et al.*,2005) . كما ان بكتريا *P.mirabilis* لها دور في خمج الأذن الوسطى المزمن ، وان سوء أستعمال المضادات الحياتية ونقص المناعة إلى جانب طبيعة قناة اوستاكي مما يؤدي إلى تكرار خمج الأذن الوسطى لدى الأطفال (Hafidh *et al.*,2006) .

تسبب بكتريا *P.mirabilis* أخماج المعده والأمعاء للجهاز الهضمي عند تناول الغذاء الملوث بها إلى جانب ذلك أخماج مرضية للجهاز التناسلي والقناة التنفسية والجروح والحروق والتقيحات (Bahashwan and EL-Shafey ,2013 ; Mansy , 2001) .

ترتبط إمراضية هذه البكتريا بأمتلاكها العديد من عوامل الضراوة Virulence Factors والتي تمكنها من إحداث الخمج منها الأهلاب Fimbria والأسواط Flagella وإنتاج أنزيم اليوريز Urease وإنتاج الأنزيم الحال للدم Hemolysin وتكوين الغشاء الحيوي ، إلى جانب ذلك قدرة هذه البكتريا على إنتاج الأنزيم الحال للبروتين Protease (Sosa *et al.*,2006).

تمتلك هذه البكتريا القدرة على تكوين ظاهرة الانثيال (Swarmming) وهذه الظاهرة ناتجة من هجرة خلايا بكتيرية بعد تمايزها مكونة طبقة رقيقة لحلقات ممتدة وتعد حركة الانثيال من عوامل الضراوة المهمة لبكتريا المتقلبات لإحداث خمج المسالك البولية وأستطاعتها على غزو إجزاء مختلفة من المسالك البولية بواسطة الحركة السريعة والمتوسطة بالأسواط مما يزيد من إمراضية هذه البكتريا (Stickler *et al.*, 2008).

تتصف بكتريا *P.mirabilis* بإنتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز التي تعمل على تحوير جزيئة المضاد الحياتي ليصبح غير فعال قبل الوصول إلى الهدف ومن ثم يجعل البكتريا مقاومة لمضادات البيتالاكتام (Coque *et al.*, 2008) ، إلى جانب هذه الأنزيمات تقوم بحماية الخلية البكترية ضد العديد مـن مضادات البيتالاكتام (Sana *et al.*,2011) . كذلك تتصف بكتريا *P.mirabilis* بمقاومتها العالية لمضادات الامينوكلايكوسيدات من خلال إنتاجها للأنزيمات التي تحور الموقع الفعال للمضاد الحياتي ومن هذه الأنزيمات هي Acetyltransferase و Nucleotidtransferase و Phosphotransferase والتي يعبرعنها من خلال الجينات

aac(3)-Ia و *aac(6')-Ib* و *ant(4')-IIa* و *aph(3')-VI* و *aph(3'')-Ib* ولهذه الجينات أهمية كبيرة لشيوع تواجدها في بكتريا *P.mirabilis* (Ramirez and Tolmask, 2010) ، ولقلة الدراسات المحلية التي تسلط الضوء على هذه البكتريا من الناحية المظهرية والجزئية ومقاومتها للمضادات الحياتية جاءت هذه الدراسة التي تتضمن المحاور التالية :

1- عزل بكتريا *P.mirabilis* وتشخيصها من مستشفيات مدينة الديوانية .
2- تحليل تسلسل منطقة *16S r*DNA في الحامض النووي لغرض التأكيد التشخيصي لبعض العزلات البكتيرية وبناءالشجرة الوراثية للتتابعات في العزلات قيد الدراسة .
3- دراسة بعض عوامل الضراوة منها الأهلاب والأسواط وإنتاج أنزيم اليوريز وإنتاج الأنزيم الحال للدم وتكوين الغشاء الحيوي المرتبطة بإمراضية البكتريا مظهرياً وجينياً بأستخدام تقنية PCR .
4- التحري عن المورثات الكروموسومية والبلازميدية المسؤولة عن إنتاج الأنزيمات المحورة للامينوكلايكوسيدات في العزلات البكتيرية المقاومة لهذا النوع من المضادات الحياتية .
5- دراسة دور البلازميدات في مقاومة المضادات الحياتية لبعض العزلات البكتيرية عن طريق تجارب التحييد (Curing) .

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures Review

2: استعراض المراجع Literatures Review

2-1 : وصف جنس المتقلبات

ينتمي جنس المتقلبات إلى العائلة المعوية والى القبيلة المعروفة بـ *Proteeae* ، والتي تضـم بالإضـافة إلـى جنس المتقلبات الجنسين الـ *Morganella* و *Providencia* (Rozalskia *et al.*, 2012). تتميز هذه القبيلة بقدرتها على إزالة مجموعة الأمين من الحامض الأميني الفينايل النين منتجة حامض الفينايل بايروفك وهذا الأختبار يعد من الاختبارات التفريقية لهذه القبيلة عن غيرها من قبائل العائلة المعوية (Greenwood *et al.*, 2002) . أكتشف جنس المتقلبات *Proteus mirabilis* لأول مره من قبل Hauser عام 1885 م (O'Hara *et al.*, 2000) ، وتمكن العالم Henriksen عام 1950 من التمييز بين جنسي الـ *Proteus* والـ *Providencia* بالأعتمـاد على الفحوصات الكيموحيوية وأوضح قابلية إنتاجهما لأنزيم Deaminase الذي لا تنتجه بقية أفراد العائلة المعوية وبين ان جنس *Proteus* ينتج أنزيمي هما : Lipase و الـ Gelatinase وعدم قدرته على إنتاج الحامض من تخمر السكريات المختلفة كأرابينول والمانوز والمانيتول على خلاف ذلك جنس الـ *Providence* (Manos and Belas , 2006) . وبعد ذلك تغيرت مواقع هذه الأنواع إذْ ذُكر في مصنف بركي عام 1974 بأن هذا الجنس يضم خمسة أنواع هي : *P.mirabilis* و *P.vulgaris* و *P.rettgeri* و *P.morgani* و *P.inconstans* (Buchanan and Gibbons ,1974) . أما في الوقت الحالي ، فإن جنس المتقلبات *Proteus* يتكون من خمس أنواع هي : *P.mirabilis* و *P.vulgaris* و *P.penneri* و *P.hauseri* و *P .myxofaciens* (Janda and Abbot, 2006) . أما النوع *Proteus myxofaciens* ، فليس لها علاقه بإمراضية الإنسان، والذي تم عزله من فم يرقات العث *Porteria dispar* الحية والميتة (gypsy mouth larvae) (Janda and abbot , 2006) .

وصفت مؤخراً نتائج التحليل للتسلسل الجزئي لجين (*rpoB*) الذي يشفر لأنزيم RNA polymerase للوحدة الثانوية β-Subunit والذي أدت إلى أستنتاج بالمستوى الجيني للتفريق ما بين *P.myxofaciens* والأنواع لمجموعة *Proteus-Providencia* (Giammanco *et al.*, 2011) . وأستناداً إلى دراسات التهجين الـ (DNA) والأختلافات التركيبية في بروتينات معينه وكذلك الصفات المظهرية فقد نقل النوع *Proteus rettgeri* الذي اكتشفها Rettger عام 1904 الذي تمكن من عزله من الدواجن المصابة بمرض شبيه بالكوليرا وبهذا سميت بـهذا الاسـم تخليدا لهُ إلى جنس *Providencia* ليصبح النـوع *Providencia rettgeri* (O'Hara

et al., 2000). ووضع النوع *P.inconstans* للأسباب السابقة نفسها ضمن جنس الـ *Providencia* (Greenwood *et al*., 2002) ، وقـد أدرج حالياً النـوع *P.morganii* ضمن الجنس *Morganella* ليصبح *M.morganii* أعتماداً في ذلك على نسبة الكوانين والسايتوسين (G + C) التي تشكل 50% وهذه النسبة تكون عالية في هذا النوع مقارنة بالأنواع الأخرى لجنس الـ *Proteus* التي تشكل 39% (O'Hara *et al*., 2000 ; Melanie *et al*., 2008).

2-2 :الصفات العامة لبكتريا *Proteus mirabilis* General Characters of

توصف هذه البكتريا بأنها عصيات قصيرة سالبة لصبغة غرام ، قطرها يتراوح بين 0.3 - 1.0 مايكرومتر وطولها 0.6 - 6.0 مايكرومتر وتمتاز هذه البكتريا بأنها هوائية أختيارية تنمو تحت ظروف هوائية وتتحرك بشكل نشط وغيرمكونة للسبورات (Abbott , 2007) . كما أن هذه البكتريا غير مكونة للكبسولة ، وتحتوي على الأهلاب (Fimbriae) ، وكذلك تحتوي على الأسواط (Flagellae) ، وسالبة لفحص الأوكسيديز وأيضاً لفحص (Vogues proskaur) ، وموجبة لفحص أحمرالمثيل (Methyl red) ومنتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين H_2S عند نموها على وسط (Kligler iron agar) ، وكذلك بإمكانها تكوين Phenyl Pyruvic acid عند تنميتها على وسط حاوٍ على Phenylalanine بالأعتماد على إنتاج أنزيم Phenylalanine deaminase ، وتكون موجبة لفحص الكاتليز (Barrow and Felthan ,2003) . وأنواع بكتريا المتقلبات تعطي فحصاً سالباً للأندول ماعدا النوع *P.vulgaris* ، وهي تنموعلى الأكار المغذي ووسط أكار الدم وتظهر المستعمرات بشكل متجمع تسمى هذه الظاهرة بالانتشار الزاحف ، وتكون المستعمرات على وسط أكار الماكونكي غير مخمره لسكر اللاكتوز وتظهر بلون أصفر باهت غير أنها تخمر كلاً من سكر الكلوكوز والسكروز والكالاكتوز (Bahashwan and El-Shafey , 2013). وكذلك فحص ثلاثي سكريات الحديد لبكتريا *Proteus mirabilis* يعطي لون أحمر وترسبات سوداء لتخمر الكلوكوز فقط في حين بكتريا *Proteus vulgaris* تعطي لون أصفر وراسباً أسود في أختبار ثلاثي سكريات الحديد (El-Hakeem , 2015) . كما تمتلك هذه البكتريا عوامل ضراوة وأنزيمات كأنزيم اليوريز الذي يؤدي إلى تحلل اليوريا إلى CO_2 و NH_3 ، وأنزيم البروتيز Protease الذي يحلل البروتين وتحتوي هذه البكتريا على سموم مثل : السموم الحالة للدم (Hemolysin) ، وسموم التلازن (*Proteus* toxin agglutinin) (Pta) (Rozalski *et al*., 2012 ; Cestari *et al*., 2013) .

2-3 : بعض عوامل الضراوة المرتبطة بـإمراضية البكتريا

Some virulance factors associated with bacterial pathogenicity

تنتشر عصيات *P.mirabilis* بشكل واسع بالطبيعة ويمكن عزلها من الإنسان والحيوان والمياه كمياه المجاري والتربة والنباتات وتعتبر جزءاً من النبيت الطبيعي للقناة المعوية للإنسان والحيوان ، إذْ تمتلك بكتريا *P.mirabilis* عدداً من عوامل الضراوة التي تسهم في إمراضيتها (Schaffer *et al*., 2016 ; Baldo and Rocha , 2014) . ومن أهم عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه البكتريا :

2-3-1 : إنتاج أنزيم اليوريز Urease production

يعد هذا الأنزيم من عوامل الضراوة المهمة لـهذه البكـتريا وهـو مـن الأنزيمات المعدنية (Metallo enzymes) لاحتوائه على النيكل الذي يعد وجوده ضرورياً لتشكيل الموقع الفعال (Active site) للأنـزيم (Li *et al* . , 2004) . وينتج أنـزيم اليوريـز من العديـد مـن الاجناس البكتيرية المسببة لاخماج المسالك البولية مثل : *Proteus* spp. و *Klebsiella* و *Ecoli* spp. و *Staphylococcus* spp. (Nielubowicz and Mobley, 2010) . تعد بكتريا *P.mirabilis* من أهم الممرضات للمسالك البولية المنتجة للأنزيم اليوريزالذي يؤدي دوراً كبيـراً في عمـلية الأستـعمار (Colonization) (Dattelbaum *et al*.,2003 ; Jacobsen *et al*., 2008) . وقد أظهرت العديد من الدراسات بأن بكتريا *P.mirabilis* لها القابلية العالية على إنتـاج كمية كبـيرة من أنـزيم اليوريـز بخلاف البكـتريا الأخـرى (Kosikowska and Berlicki , 2011 ; Gendlina *et al*.,2002) .

تسبب هذه البكتريا بفعل هذا الأنزيم أخماج القناة البولية السفلى ولكن بشكل أقل وهذا ما أكده Chlabicz وجماعته (2011) في بولندا بأن هناك أخماج غير معقدة بواسطة بكتريا *P.mirabilis* بنسبة 3.4% . وبفعل أنزيم اليوريز تتحلل اليوريا إلى CO_2 و NH_3 مؤدياً إلى ٱرتفاع الـ pH في الإدرار مما يسبب تكوين الحصى البولية (Urolithiasis) (Jacobsen and Shirtliff , 2011) .

تترسب الأمونيا بشكل أملاح تعرف بـ Struvite وهي $MgNH_4PO_46H_2O$ وأملاح Carbonateapatite وهي $Ca_{10}\ (PO_4)_6\ CO_3$ في المادة المخاطية التي تنتج من قبل البكتريا وتدخل في تركيبها الخلوي وهي المادة التي تتكون من متعدد السكرايد وتعرف بـ Glycocalyx (Nielubowicz and Mobley, 2010 ; Torzewska *et al*., 2003) . ولوحظ أن هناك

ظروف بيئية تؤثرعلى إنتاج أنزيم اليوريز من قبل هذه البكتريا ومن هذه الظروف الرقم الهيدروجيني وتركيز اليوريا ووجود الكلوكوز والأمونيا التي تعتبرعوامل محفزة لبكتريا *Proteus* spp. مقارنة ببكتريا *Klebsiella* spp. إذْ يُنظم إنتاج هذا الأنزيم فيها استجابة لتركيز المواد النتروجينية مثل الأمونيا والكلوتامين واللايسين (Broomfield *et al.*,2009) .

أظهرت إحدى الدراسات بأَن أنزيم اليوريز في بكتريا *P.mirabilis* يرتبط بغشاء الخلية الخارجي الذي يفرز خارج الخلايا ، كما أن أنزيم اليوريز يوجد بشكل ذائب في السايتوبلازم (Rozalski *et al.*, 1997) ، وهذا ما اكدهُ Mobley و Li (2002) بإن أنزيم اليوريز هو من أنزيمات السايتوبلازم لبكتريا *P.mirabilis* .

أظهرت الدراسات المتخصصة بالتنظيم الوراثي لمجاميع الجينات ذات العلاقة بإنتاج أنزيم اليوريز عن تحديد التسلسل الكامل للنيوكليوتيدات ، قسمت هذه الجينات على مجموعتين المجموعة الاولى تعرف بالجينات التركيبية (Structural genes) أما المجموعة الأخرى فتعرف بالجينات الإضافية (Accessory genes) وإن هنالك جيناً يسيطرعلى عملية الاستنساخ (Transcription) يسمى الجين التنظيمي (Regulatory gene) ويرمز له بـ *ureR* وتتكون الوحدات التركيبية المسؤولة عن تكوين الجزء غير الفعال من الأنزيم من ثلاثة جينات ماعدا بكتريا *Helicobacter pylori* والتي تتكون من آثنين من الجينات التي تكون ربما ناتجة من عملية دمج تتم بإدخال أيونات النيكل إلى الموقع الفعال لليوريز الذي يكون موجوداً على بروتين ureC بواسطة بروتين ureE (Mulrooney and Hausinger , 2003 ; Carter *et al.*,2011) .

تمتلك بكتريا *P.mirabilis* ثمانية جينات مسؤولة عن إنتاج أنزيم اليوريز وتقسم على مجموعتين الأولى تعرف بالجينات التركيبية وتضم ثلاثة جينات وهي *ureA* و *ureB* و *ureC* المسؤولة عن تكوين الوحدات التركيبية المكونة للأنزيم غيرالفعال (Apoenzyme) (Poore *et al.*, 2001) .

فيما تضم المجموعة الثانية الجينات الإضافية هي *ureD* و *ureE* و *ureG* و *ureF* التي تشفر لمعقد البروتين الذي يربط أيونات النيكل وتدخل هذه الايونات في المواقع الفعالة للأنزيم غير الفعال وهكذا يتم تنشيط الموقع التحفيزي ويتم السيطرة على الجينات السبعة من قبل جين إخر يسمى الجين التنظيمي ويرمز له بـ *ureR* فعند وجود اليوريا في الوسط يترجم هذا الجين إلى البروتين ureR الذي يرتبط بالـ Promotor على الجين *ureD* مما يؤدي إلى ترجمة الجينات الأخرى (Musiani *et al.*,2004) . ويتماثل هذا التركيب في أغلب أنواع

الأجناس البكتيرية أما بكتريا *Helicobacter pylori* فهي تحتوي فقط على الجين *ureA* والجين *ureB* (Schoep *et al*., 2010) . أما بالنسبة لمجموعة الجينات الاضافية التي تتكون من أربعة جينات هي : *ureE* و*ureF* و ure*G* و *ureD* ، تتميز بأختلاف الموقع للجين *ureD* تبعاً إلى نوع الجنس البكتيري ، أن الجين *ureD* في بكتريا *P.mirabilis* وبكتريا *Klebsiella* spp. فهو يسبق الجينات التركيبية *ureA* و *ureB* و *ureC* أما بكتريا *Yersinia enterocolitica* وبكتريا *Mycobacterium tuberculosis* وبكتريا *Bacillus* spp. فإن الجين *ureD* يكون موجوداً بعد الجين الاضافي *ureG* (Konieczna *et al*., 2012) .

يمتاز أنزيم اليوريز المنتج من بكتريا *P. mirabilis* بكونه أكثر فعالية من اليوريز التي تنتجه الأجناس البكتيرية الأخرى حيث يؤدي إلى تكوين الغشاء الحيوي البلوري Crystallin biofilm الذي يكون أكثر أنواع الأغشية الحيوية تعقيداً والذي يعمل على غلق القثاطر البولية وتحمي البكتريا من المضادات الحياتية مما يؤدي إلى فشل العلاج بهذه المضادات (Stickler , 2008 ; Jones *et al* . , 2005) .

2-3-2 : الأهلاب Fimbriae

توجد على سطح الخلية البكتيرية أنواع مختلفة من الزوائد يطلق عليها الأهلاب (Fimbriae) التي لها دور في الالتصاق على سطح خلية العائل ، ويعرف الالتصاق (Adherence) بأنه عملية مهاجمة وأستعمار الكائن الممرض لخلايا النسيج المضيف ، وتعد الخطوة الاولى في إمراضية البكتريا (Emdy *et al*., 2003) ، وفي عملية الالتصاق يحدث التفاعل والأرتباط ما بين جزيئات سطحية موجودة على سطح الكائن الممرض تدعى هذه جزيئات باللواصق (Adhesin) أو تسمى بعوامل الالتصاق (Adhesive factors) (Bode *et al*., 2016 ; Khandelwal *et al*., 2009) ، أو قد تسمى بعوامل الأستعمار (Colonization factors) (Zhou *et al*., 2001) ، ترتبط هذه اللواصق مع مستقبلات سطحية متممة معها وموجودة على سطح خلية المضيف ، وعادة تكون اللواصق عبارة عن بروتينات دهنية أو بروتينات سكرية ، أما مستقبلاتها فتكون من السكريات فقط مثل : سكر المانوز (Tortora *et al*.,1998) ، أي ان الأهلاب هي تراكيب خارجية موجودة على سطح جدار الخلية ولها دور مهم في الالتصاق على سطوح الخلايا ، وهذا الالتصاق خطوة أساسية للأستعمار، والعدوى وخصوصاً عند آستمرار تدفق البول (Jansen *et al*., 2004 . (Foxman , 2014

أظهرت دراسة التحليل للتسلسل الجيني لبكتريا *P. mirabilis* امتلاكها 17 نوع من الأهلاب محتمل التصاقه بالخلايا الظهارية البولية (Nielubowicz ; Pearson *et al.*,2008 and Mobley , 2010) . وذكر Rocha وجماعته (2007) و Jacobsen وجماعته (2008) بأن خمسة أنواع من الأهلاب درست وهي : Mannose - resistant / *Proteus* like fimbriae (MRP) و *P.mirabilis* fimbriae (PMF) والتصاق الخلايا الظهارية Uroepithelial cell adhesion (UCA) أو ما يسمى بـ nonagglutinating fimbriae (NAF) و ambint-temperature fimbriae (ATF) و *P.mirabilis* (PMP) P-like pili .

تمتلك بكـتريا القولون *E.coli* أهـلاباً تشبه الأهـلاب فـي بكـتريا *P.mirabilis* (Coker *et al*., 2000) ، لكن Scavone وجماعته (2016) وجدوا في دراستهم بأن هنالك أربعة من الأهلاب (Fimbriae) ، والتي لها دور في تكوين الغشاء الحيوي (biofilm) وتشير دراستهم إلى أن ٱختلاف الأهلاب (Fimbriae) يسهم في تشكيل غشاء حيوي وظيفي مستقر ، وكذلك لها دور مرتبط بكل الطفرات وهذه الطفرات تقلل من قابلية البكتريا على الهجرة عبر أقسام القثطرة البولية لكن حركة الانثيال Swarming motility تكون متأثرة بكل طفرة ، ومع ذلك بعض الطفرات تشكل أغشية حيوية أقل بالمقارنة مع النوع البري MRP و ATF ، في حين النوعين الاخرين UCA و PMF تشكل أغشية حيوية أكبر . يمكن الٱستنتاج بأن الأهلاب Fimbriae لبكـتريا *P.mirabilis* لـها دور مميز في تـوليد الأغشية الحـيوية (biofilms) وخاصـة عنـدما تـكون مـرافقة مع القثـطرة (Catheters) ، أغلبية بكـتريا *P.mirabilis* تكون في تجمعات كبيرة خارج الخلية في تجويف المثانة وهذه التجمعات الواسعة تعزز من ترسيب ايونات الكالسيوم وهي خطوة أولى حاسمة في داء الحصى البولي (Urolithiasis) والأهم من ذلك يتطلب وجود كلاً من MRP Fimbriae وأنزيم اليوريز Urease في تكوين الحصى البولية (Schaffer *et al* ., 2016).

صُنفت الأهلاب إلى ستة أنواع ٱستناداً إلى معاملتها بواسطة مثبطات خارج الجسم وهي سكر المانوز D-Mannose (Jones *et al*., 1995) . فأهلاب النوع الأول تسمى بالأهلاب المقاومة للمانوز Mannose resistant *Proteus* (MR/P) وهو أفضل نوع وأهمها في بكتريا *P.mirabilis* وتعد من عوامل ٱستعمار المثانة المتخصصة في هذه البكتريا الممرضة للجهاز البولي ، كما أنها تكون ممرضة في عملية ٱستعمارالكلية في المسلك البولي التصاعدي (Li *et al*., 2002) . وان المعلومات الوراثية المشفرة لهذا النوع من الأهلاب تكون محمولة

على نسختين من الجينات الكروموسومية *mrp*ABCDEFGHJ (*mrp* operon) و (*mrpI*) ولكل جين من هذه الجينات دور في عملية الالتصاق (Bahrani and Mobley, 1994). وان بروتينات الأهلاب التي تنتجها هذه البكتريا تعد مستضدات مؤثرة في علاج أخماج المسالك البولية إذْ تم دراسة واستخلاص وتنقية بروتينات هذا النوع من الأهلاب وهو *mrp*A والتي تلعب دور مستضدات حماية ووقاية ، كما يمكن أستخدامها في العلاج ضد أخماخ المسالك البولية الناشئة من المسلك التصاعدي والدموي في الفئران المختبرية ، وهذه تسهم في تطور اللقاحات واكتشافها ضد *P.mirabilis* التي تعد من مسببات أخماج المسالك البولية المعقد (Rocha *et al*., 2007 ; Rafael, 2003) . وقد وجد ان نوع الأهلاب MRP التي تنتجها هذه بكتريا مشابهة وظيفياً وتركيبياً مع أهلاب النوع الأول التي تنتجها *E.coli* والتي لها دوراً في مهاجمة وأستعمار السطوح المخاطية للمضيف ويمكن تثبيط التصاق هذا النوع بالخلايا الطلائية بوجود سكر المانوز (Laragione *et al*., 2000) . أما النوع الثاني من الأهلاب يسمى أهلاب بكتريا *P.mirabilis* fimbriae (PMF) هذا النوع من الأهلاب تم تشخيصهُ من قبل Massad و Mobley (1994) . وان المعلومات الوراثية المشفرة لهذا النوع من الأهلاب تكون محمولة على خمسة جينات كروموسومية وهي *pmf*ACDEF ولكل جين من هذه الجينات له دور في عملية الالتصاق (Pearson *et al*., 2008) ، وهذا النوع له دور في تحديد الضراوة لبكتريا *P.mirabilis* (Zunino *et al*., 2003) ، أما Baldo و Rocha (2014) بأن هذا النوع من الأهلاب له دور مهم في أستعمار المثانة والكلى ، في حين النوع الثالث من الأهلاب يسمى لواصق الخلايا الطلائية Uroepithelial cell adhesion (UCA) والنوع الرابع من الأهلاب يسمى بالأهلاب غير المتلزنة لكريات الدم الحُمْر (NAF) وهذين النوعين من الأهلاب تنتظم بشكل قضبان مرنة وطويلة ولهذه الأهلاب دور في الضراوة لبكتريا *P.mirabilis* أي لها دور في عملية الالتصاق (Baldo and Rocha , 2014) ، أثبت Pelegrino وجماعتهُ (2013) بأن UCA و NAF تلعب دوراً مهماً في أستعمار المسالك البولية بأستخدام UCA المطفرة وسلالات النوع البري في الفئران المختبرية المصابة ، ولكن هذا النوع من الأهلاب ليس لها دورفي عملية التلازن الدموي (Tolson *et al*.,1997) .

تم دراسة واستخلاص وتنقية هذا النوع من الأهلاب ucaA التي تلعب دور مستضدات حماية ووقاية ويمكن أستخدامها في العلاج ضد أخماج المسالك البولية الناشئة من المسلك التصاعدي والدموي في الفئران المختبرية وهذه تساهم في تطور واكتشاف اللقاحات ضد *P.mirabilis* التي تعد من مسببات أخماج المسالك البولية المعقد (Rafael , 2003) . أما

النوع الخامس من الأهلاب يسمى بالأهلاب المتأثرة بدرجة حرارة المحيط Ambient-temperature (ATF) وهذا النوع من الأهلاب مهم في محيط نمو بكتريا *P.mirabilis* ، وبأستخدام تقنية المجهر الالكتروني لفحص التحضيرات النقية لهذه البكتريا ، وقد تبين ان الوزن الجزيئي لهذه الأهلاب 24,000 دالتون ، كما تبين ان ظروف النمو تؤثرعلى تكوين هذه الأهلاب إذْ وجد أنه في الاوساط السائلة والتحضين بدرجة $23C^0$ تتكون هذه الأهلاب ، أما في حالة الاوساط الصلبة والتحضين بدرجة $42C^0$ فهذه الأهلاب لا تتكون (Massad *et al.*,1994) . أثبتت البحوث أن البكتريا الطافرة التي لا تستطيع تكوين ATF (ATF-isogenic mutant) ليس لها القدرة على استعمار القناة البولية وإحداث أخماج المسالك البولية بالمسلك التصاعدي للفئران المختبرية مما يدل على ان ATF لا تلعب دوراً في إحداث الخمج ، الا ان هناك حاجة للمزيد من الدراسات لتأكيد هذه الحقيقة أو نفيها ، فقد تلعب ATF دوراً في إحداث U.T.Is للإنسان عكس ما اثبت في الحيوانات المختبرية وذلك بسبب دخول عامل آختلاف الأنواع (Zunion *et al.*, 2000). أما النوع السادس يسمى P-like *P.mirabilis* pili (PMP) هذا النوع من الأهلاب عزلت وشخصت من قبل Gaastra وجماعته (1996) ويتميز هذا النوع بقدرتهُ على إحداث أخماج المسالك البولية في الكلاب المصابة و PMP ايضاً لها القدرة على إحداث أخماج المسالك البولية في الإنسان للسلالة Hl4320 ، ان المعلومات الوراثية المشفرة لهذا النوع من الأهلاب تكون محمولة على تسعة جينات ، وهي : PMl2216 -PMl2224 (Pearson *et al.*, 2008) .

3-3-2 : الأسواط والحركة Flagella and Motility

الأسواط هي عبارة عن زوائد خيطية طويلة تشبه الشعر (Hair-like appendex) وحلزونية مجوفة وتبرز من السطح الخارجي للخلية وتستفاد منها البكتريا للحركة والأرتباط ، وتعد الأسواط أحد عوامل الضراوة لهذه البكتريا (Siddiqui,2003) . لكن يستفاد من توزيع الأسواط على سطح الخلية البكتيرية في تشخيص البكتريا وتصنيفها ويكون موقع الأسواط وعددها محدداً لكل جنس فهناك أجناس تمتلك سوطاً قطبياً واحداً فقط تسمى Monotrichous في حين ان الأجناس المحاطة بالأسواط تسمى Peritrichous كما في بكتريا *Escherichia* التي تمتلك ما بين 6 - 10 أسواط محيطية بينما بكتريا المتقلبات تمتلك مما يزيد 100 سوط محيطي الموقع ، حيث ان الأسواط تساعد البكتريا على الصعود والدخول إلى القناة البولية العليا وبعكس آتجاه تيار الإدرار مما يؤدي إلى حدوث أخماج في القناة البولية العليا وخاصةً أخماج الكلى (Forbes *et al.*, 1998) .

يعد بروتين (Flagillin) المكون الرئيسي للأسواط (Umpierrez *et al.*,2013) ، تمتلك بكتريا *P.mirabilis* آثنين من الجينات المسؤولة عن توليد الفلاجلين هما *fla*A و *fla*B (Hatt and Rather, 2008 ; Manos *et al* ., 2004) . أن وجود هذه الأسواط على أسطح البكتريا المرضية والانتهازية تُسهل عملية الأستعمار ونشرالخمج من المواقع الأولية (Armbruster and Mobley , 2012 ; Rather , 2005) . تتمكن بكتريا *P.mirabilis* بواسطة حركتها السريعة بالأسواط من غزو القناة البولية وتزيد من إمراضيتها وتجعلها قادرة على غزو الاحليل والمثانة والحالب والكليتين (Jacobsen *et al*., ; Liaw *et al*., 2003 2008) . تتميز بكتريا *P.mirabilis* بظاهرة الانثيال Swarming وتعد هذه الظاهرة من أهم عوامل الضراوة لهذه البكتريا والتي تعرف بأنها هي حركة البكتريا بشكل أمواج تبدأ من حافة المستعمرة الأصلية بواسطة الأسواط وهذه الظاهرة تلاحظ بوضوح على الوسط الصلب الاعتيادي وفيها تتميز جنس المتقلبات *Proteus* عن بقية أجناس العائلة المعوية (Gue *et al*., 2001 ; Rather , 2005)، ففي هذه الظاهرة يظهر النمو بشكل حلقات متحدة المركز مكونة ما يشبه أمواج البحر (Sea wave like) على أطباق أكارالدم (Verstraeten *et al*., 2008) . تعد ظاهرة الانثيال مهمة خلال دورة حياة بكتريا *P.mirabilis* إذْ تتمايز من خلايا انثيالية صغيرة (2 - 4) مايكرومتر بالطول والتي تمتلك من (6 - 10) أسواط محيطية إلى خلايا متطاولة تصل إلى(8) مايكرومتر والتي تمتلك الالاف من الأسواط خلال عملية الانثيال (Rozalski and Staczek , 2010 ; Belas and Suvanasuthi , 2005) .

تلاحظ ظاهرة الانثيال ظاهرياً من خلال الدورات المتكررة لهجرة الخلايا الانثيالية نتيجة الدمج فتكون الحركة على السطح الصلب بشكل عين الثور (Gibbs and Greenberg, 2011 ; Armbruster and Mobley , 2012) . أن جزيئات الإشارة التي تعتبر مهمة للنمو الانثيالي كجزئيات N-acyl homoserine lactones وهي لا تنتج بواسطة *P.mirabilis* (Morgenstein *et al*., 2010) ، وعلى الرغم من ذلك ، فقد تبين أن هناك مجموعة من المغذيات التي يمكن لها أن تؤثر على حركة الانثيال فإن إضافة N- acyl homoserine lactones إلى الوسط يزيد من قدرتها على الحركة لبعض سلالات *P.mirabilis* (Stankowska *et al* ., 2008a) ، كما أن إضافة الكلوتامين (Glutamine) إلى الوسط الزرعي يزيد من قدرتها على النمو الانثيالي (Armbruster *et al*.,2013). كما أن النمو الانثيالي أيضا يتأثر بالأحماض الدهنية كحامض الاوليك يحفز ، في حين الأحماض Lauric و myristic acids تمنع هذا النمو (Liaw *et al*., 2004) ، والميكانيكية بواسطة

الأحماض fatty acids و Glutamic لها دور في عملية الانثيال وتعتبر كإشارة اتصال خلية بخلية أخرى (Armbruster *et al*., 2013 ; Morgenstein *et al*., 2010) .

تكون بكتريا *P.mirabilis* بشكل خلايا عصوية قصيرة ، وهذا هو الشكل النموذجي لأفراد العائلة المعوية وعند حدوث ظاهرة الانثيال فإن هذه الخلايا تتحول إلى خلايا متطاولة كثيفة الأسواط وتظهر تحت المجهر بشكل خيوط متعددة الخلايا ومتعددة الانوية Multinucleate و Multicellular ، وان وجود متعدد السكرايد السطحي الخاص بهذه البكتريا Surface polysaccharides (SPS) هو المسؤول عن هذا التحول أو التمايز الشكلي وسرعتهُ (Margenstein *et al*., 2010) ، وان الجين *flaA* هو المسؤول عن تجمع الالياف البروتينية للأسواط في هذه البكتريا إلى جانب ذلك أن هذا الجين مسؤول عن تمايز الخلايا (Manos *et al*., 2004) . أن نوع الخلايا السائدة في المسالك البولية هي خلايا سابحة قصيرة قليلة الأسواط وليس خلايا انثيالية طويلة كثيفة الأسواط ووجد ان الخلايا السابحة القصيرة هي أكثر شيوعاً في إحداث أخماج المسالك البولية في الفئران(Jansen *et al*.,2003). كما اشار Fujihara وجماعتهُ (2011) بأن خلايا بكتريا *P.mirabilis* تتميز إلى خلايا انثيالية متعددة النوى ومتعددة الأسواط في الوسط الحامضي pH لإدرار المضيف وتعود تتميز إلى خلايا سابحة عندما تزداد قيمة pH وتكون قلوية بعد تأثير أنزيم اليوريز وفي هذه الحالة تكون الخلايا أعلى تأثيراً سمياً خلوياً .

أن أول من لاحظ حركة الانثيال هو Dienes عام (1946) إذْ أن السلالات المتشابهة من بكتريا المتقلبات تتداخل أمواج مستعمراتها مع بعضها بدون أن يكون بينها أخدود فاصل وهذا ما يدعى بظاهرة دينز (Dienes phenomenon) التي أستعملت في تصنيف أنواع المتقلبات وخاصة في الدراسات الوبائية المحلية ، فعند زرع سلالتين متشابهتين من المتقلبات في طبق حاوي على وسط غير مثبط لظاهرة الانثيال مثل أكار الدم في نقطتين متباعدتين فإن الانتشار يبدأ من كل نقطة بأتجاه النقطة الاخرى ويندمج النمو في الوسط ، أما في حالات السلالات المختلفة فإن الانتشار لا يندمج ويبقى منفصلاً ويمكن رؤيتهُ بصورة واضحة على الوسط الزرعي (Sosa *et al*., 2006) .

تم إجراء أختبار Dienes test من قبل El-Hakeem (2015) لسلالات *Proteus* والتي أظهرت تطابقاً في أختبار الحساسية للمضادات الحياتية وكذلك أظهرت نتيجته انه لا يوجد أي تشابه بين العترات . يبدأ نمو المتقلبات على الأوساط الصلبة ومن غير انثيال بالحركة الزاحفة بعد 3 - 8 ساعات من التلقيح عندما يصل قطر المستعمرة إلى 8 مليمتر تقريباً

ويكون هذا النمو والحركة غير مستمرة (Liaw *et al*., 2000) . توفر هذه الحركة استمرارية بقاء البكتريا تحت ظروف مناسبة وتساعدها في الاستجابة للظروف البيئية المناسبة وغير المناسبة ونجاح تنافسها مع الأنواع الأخرى من البكتريا حيث تمتلك البكتريا المسوطة نظام حركة متطوراً في الأوساط السائلة والأسطح الصلبة وهذا النظام مهم للنمو على السطوح والأوساط السائلة واللزجة (Rather ,2005; Harshy, 2003) .

4-3-2 : الأنزيمات الحالة للدم Haemolysins

حالاّت الدم Haemolysins هي أنزيمات خارج خلوية (Extracellular) تنتجها البكتريا وتعمل على تحليل كريات الدم الحمر (Erythrocytes) من خلال إحداث ثقوب في الغشاء الخلوي للكرية، وتختلف البكتريا المنتجة لحالاّت الدم في قابليتها على تحليل أنواع مختلفة من كريات الدم الحمر مثل : كريات الدم الحمر للإنسان والاغنام والارنب وكذلك تختلف في نوع التحليل الذي تحدثهُ (Liaw *et al*., 2000) .

هناك علاقة وثيقة بين إنتاج حالاّت الدم وبين ضراوة البكتريا من خلال فعاليتها السمية على الخلايا الطلائية المبطنة للأجهزة كالجهاز البولي متمثلة بالكلى وحوضها مسبباً بذلك أضراراً لهذه الخلايا ويؤدي إلى تلف الانسجة (Liaw *et al*., 2000) . تتميز بكتريا *P.mirabilis* بأن لها القدرة على إنتاج حالاّت الدم المعوية Enterohaemolysin حيث أثبتت البحوث وجود علاقة بين قدرة بكتريا *P.mirabilis* وقدرتها على إحداث تفاعلات افرازية سمية في القناة المعوية للإنسان والحيوانات المختبرية ، وأن القابلية على إنتاج حالاّت الدم لها علاقة وثيقة ومباشرة بالأخماج المعوية التي تسببها هذه البكتريا في الإنسان وخاصة للأطفال وحديثي الولادة (Gabidullin *et al*., 1990) .

يسيطر على إنتاج حالات الدم في بكتريا *P.mirabilis* جينين ويكونا مشتركينِ بإنتاج هذا الأنزيم (HpmA و HpmB) ، فناتج التعبير الجيني *hpmB* يعمل على نقل وتنشيط البروتين الناتج من التعبيرالجيني للجين *hpmA* الموجود في الفسحة بين البلازمية في حين أَنَّ البروتين HpmB موجود في الغشاء الخارجي ليشارك في عملية إنتاج البروتين HpmA (Lukomski *et al*.,1991) . وقد أثبتت الدراسات أن HpmA لهُ تأثير سمي عالٍ لخلايا الطلائية المبطنة للنبيب الملتوي القريب من الكلى ، كما أن الأنزيم المحلل لليوريا يسهم في هذه السمية للخلايا من خلال تحليلهُ لليوريا الموجودة في الكلى حيث ينتج الأمونيا التي تعد أيضاً سامة لخلايا نسيج الكلى (Mobley ,1996) .

5-3-2 : تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

هو تجمع للأحياء المجهرية والتصاقها بسطح خلايا المضيف في بيئة مائية وتكون محاطة ببوليميرات خارج خلوي Extracellular polymers وهذه البوليميرات هي عبارة عن سكريات متعددة إذْ يسهم هذا الغشاء في حدوث الخمج ومقاومة المضادات الحياتية ، والتصاق البكتريا على الأسطح هي واحدة من الخطوات الأولية التي تؤدي تكوين الغشاء الحيوي (Kokare *et al*., 2009 ; Lynch *et al*., 2003) ، إذْ تؤدي المواد البوليمرية الخارج الخلوية إلى تثبيت الغشاء الحيوي فهي توفر الحماية للخلايا الموجودة بداخلهُ من الظروف البيئية غير الملائمة مثل : الأشعة فوق البنفسجية والتغيير في الـ pH والصدمة الاوزموزية والجفاف والمواد السامة (Decharvalho , 2007) .

تمثل الأغشية الحيوية مشكلة طبية خطيرة إذ يمكن للبكتريا المكونة للأغشية الحيوية من أستعمار الأجهزة الطبية كجهاز القثطرة فهي تمثل مصدراً مهمّاً للتلوث والبكتريا المسببة للأمراض (Costerton *et al*.,1999) . تستطيع بكتريا *P.mirabilis* أن تكون الأغشية الحيوية البلورية وذلك عن طريق تجميع البلورات الناتجة من ترسب الكالسيوم وفوسفات المغنسيوم في الإدرار بفعل توليد الأمونيا من اليوريا بواسطة أنزيم اليوريز المنتج من قبل هذه البكتريا ممَّا يعيق تدفق الإدرار من المثانة (Morris *et al*., 1999) . ترتبط البكتريا الحاوية على هذه الأغشية بالأمراض المهمة في الإنسان مثل أخماج شغاف القلب والصمام وأخماج الأذن الوسطى المزمن وأخماج الجروح والحروق (Costerton *et al*., 1999) . أن الغشاء الحيوي الذي تكونه بكتريا *P.mirabilis* يمكن أن يسبب مشاكل خطيرة للمرضى عند أستعمالهم لأنبوب قثطرة المثانة إذْ أظهرت (93.75 %) عزلات بكتريا *P.mirabilis* لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي في أنابيب القثطرة (Ali , 2012). وهذا ما أثبته Qaddoorri وجماعته (2015) بأن هناك علاقة بين عوامل الضراوة وتكوين الغشاء الحيوي ، إذْ أظهرت العزلات (100%) بقابليتها على الانتشار إنتاج الغشاء الحيوي والسكريات المتعددة .

4-2 : الإمراضية Pathogenicity

تعد بكتريا *P.mirabilis* من الفلورا البكتيرية المتعايشة طبيعياً Normal flora في القناة المعوية مع باقي أنواع البكتريا المعوية للأشخاص الاصحاء لكن من الممكن ان تؤدي إلى إصابة الافراد ضعيفي المناعة في الغالب عندما تنتقل اليهم (Kearns , 2010 ; Giovanni *et al*., 2011) ، وتعد هذه البكتريا من الممرضات الاكثر شيوعاً التي تسبب أخماج المستشفيات والاخماج المكتسبة من المجتمع في كثير من البلدان لكون هذه البكتريا

انتهازية Oppaortunistic ، لذا فهي تسبب كثير من الإصابات الخمجية عند وجودها في غير موطنها الطبيعي كخمج المسالك البولية (Pellegrino *et al*., 2013) ، تأتي هذه البكتريا بالمرتبة الثانية بعد *E.coli* في إحداث أخماج UTIs المكتسبة من المستشفى (Flores-Mireles *et al*.,2015 ; O'Hara *et al*., 2000) ، حوالي 90% من بكتريا *P.mirabilis* التي تصيب المسالك البولية تسبب الفشل الكلوي (Elder , 2004) ، ويعتبر هذا النوع من البكتريا أكثر تكراراً في إحداث المسالك البولية (Jacobsen *et al*., 2008) . كما يعتبر هذا النوع *P.mirabilis* من أهم أنواع جنس المتقلبات وأكثرها شيوعاً في إحداث الاخماج ويصيب الفئات العمرية كلها إلى جانب ذلك عن إصابة كلا الجنسين ذكوراً واناثاً . (Orrett , 2001)

عزل هذا النوع من الأشخاص المصابين بالسكري أو من الذين يعانون من مشاكل وظيفية وتشريحية غير طبيعية في القناة البولية أو في المرضى المستخدمين القثطرة البولية ولمدة طويلة (Belas *et al*., 2004 ; Poore *et al*., 2001) . قد يعزى الاهتمام بهذا النوع بصورة رئيسة لقدرة هذه البكتريا على إحداث عدد كبير من الإصابات الانتهازية وتشمل أخماج الجروح والحروق (Abraham and Wamisho , 2009 ; Jefferson *et al*., 2003) ، وخمج السحايا لدى الأطفال حديثي الولادة أو الرضع وخمج نقي العظام Osteomyelitis (Janda and abbot , 2006 ; O'hara *et al*., 2000) ، وتجرثم الدم Septicemia (Pearson and Lee , 2004) . وأخماج القناة التنفسية وخمج العينين والأذنين والأنف والحنجرة وخمج القناة الهضمية وخمج الجهاز التناسلي (Bahashwan and EL- Shafey, 2013) .

يعد خمج الأذن الوسطى من الأمراض المهمة التي تصيب الأذن البشرية بفعل الإصابة بهذه البكتريا والتي تصيب الفئات العمرية كافة وكلا الجنسين ، إذْ يعد السبب الرئيس لفقدان السمع لدى الأطفال مما يؤثر على عملية النطق وتعلم اللغة ومستوى ذكاء الطفل (Rovers *et al*., 2001 ; رزوقي واخرون ، 2010) ، ويعزى بعض الباحثين تكرار المرض عند الاطفال إلى طبيعة ومواصفات قناة اوستاكي ، إذْ يتزامن المرض عادةً مع أمراض المسالك التنفسية العليا (Hemlin *et al*., 1994) ، ويعتبر خمج الأذن الوسطى من الأمراض الشائعة والمتكررة في مرحلة الطفولة ، إذْ تظهر أعلى معدلات الخمج خلال السنين الاولى من عمر الطفل (Paradise *et al*., 1999) ، وقد يؤدي عدم الاهتمام والإسراع بأخذ العلاج إلى تطور الخمج وانتقاله إلى أماكن أخرى كالأذن الداخلية والدماغ الذي يسبب اختلال التوازن وذلك

بدخول القيح إلى جهاز التوازن في الأذن وقد يحدث فقدان دائم للسمع (Hoberman and Poradise , 2000) .

ان أفراد جنس الـ *Proteus* وخاصة *P.mirabilis* تسبب الآفات البؤرية (Focal lesion) في الأشخاص المثبطين مناعياً والأشخاص المرضى والذين يستلمون السوائل عن طريق الوريد (Intravenous infusions) مثل : الدم والاملاح المغذية وقد يسبب هذا النوع من البكتريا الخمج الرئوي (Okimoto *et al*., 2010) ، ويمكن ان يسبب هذا النوع من البكتريا خمج عضلة القلب (Kalra *et al*., 2011) ، ويسبب ايضاً تعفن الأغذية لذا يُشّك بأنه عامل مسبب لخمج المعدة والامعاء Gastroenteritis والتسمم الغذائي (Madigan *et al*., 2003) . وتبين بأن لها دور في حدوث مرض خمج المفاصل الرثوي (RA) Rheumatoide arthritis ولوحظ تكرار عزل البكتريا من أدرار الأشخاص المصابين بهذا المرض وأيضاً أرتفاع في مستوى أضداد هذه البكتريا مما يؤكد دورالبكتريا في تطورالمرض (Rasid *et al*., 2001) . وترتبط إمراضية هذه البكتريا بعوامل عدة منها طول الرقود في المستشفى والأستخدام الطـويل العشوائي للمضادات الحياتية ممَّا يـؤدي إلى ظهـور سـلالات بكتـيرية مقاومة لـها (Piglansky *et al*., 2003) .

5-2 :المضادات الحياتية Antibiotics

1-5-2 : مضادات الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides Antibiotics

هي مجموعة من المضادات الحياتية ذات الأهمية السريرية والتأثير القاتل للبكتريا معاً منها Neomycin و Gentamicn و Streptomycin ، تشترك هذه المضادات في الخواص التركيبية والفعالية الحركية الدوائية ، ويعّد مضاد الستربتومايسين أول الامينوكلايكوسيدات الذي حدَّده ومَّيزه Salman Waksman في عام 1944 وعلى النقيض من البنسلين الذي كان معزولاً من الفطريات ، كان الستروبتومايسين أول المضادات الميكروبية المعزولة من مصدر بكتيري وكان اكتشافه معلومة مهمة في تاريخ المضادات الميكروبية لأنه كان أول علاج فعـَّال لمـرض السـل وهـو مـرض تسـبب في معاناة إنسانية هائلة لعـدد من القرون (Arya , 2007 ; Tsodikova and Labby , 2015) . تعمل هذه المضادات على تثبيط تخليق البروتين وذلـك عـن طـريق أرتباطها بالوحـدة الرايبوسـومية الصغـيرة (30s) وتثبيط معقد البـداية (Intiation complex) في عملية تخليق البروتين مما يؤدي ذلك إلى حدوث خطـأ في قراءة

mRNA ، ومن ثم يؤدي الى إنتاج بروتين غير فعال ، أي لا تتكون أواصر ببتيدية (Shahid et al., 2003 ; Mandell et al., 2010) .

تقاوم البكتريا هذه المجموعة من المضادات من خلال إنتاجها للأنزيمات التي تحور الموقع الفعال للمضاد الحياتي ومن هذه الأنزيمات هي Nucleotidtransferase و Phosphotransferase و Acetyltransferase و Kinase التي تعمل على تحوير موقع الهدف لهذاالمضادات الحياتية وكذلك تعمل على تحوير جزيئة المضاد الحياتي مما يؤدي الى عدم قدرة المضاد على الأرتباط بالرايبوسوم وفقدان فعاليته (Ramirez and Tolmasky , 2010) . ومن الأليات المقاومة الأخرى التي تمتلكها هذه البكتريا هو وجود انظمة الدفق التي تعمل من خلال طرح المضاد الحياتي خارج الخلية وعدم وصوله إلى موقع عمله وهذه من الميكانيكيات الفعالة في مقاومة مضادات الامينوكلايكوسيدات (Magnet *et al*., 2001) . ومن مضادات هذه المجموعة مضاد الجنتامايسين (Gentamycin) الذي يعتبرعلاجاً للمسالك البولية وهو من علاجات الخط الأول في هذا المجال ويكثر أستخدامه كمضاد أوَّلي ضد البكتريا المعوية (Therapeutic Guidelines, 2010).

يوصف مضاد الجنتامايسين كخليط مع مضادات البيتالاكتام لتقليل نشوء المقاومة ضد هذا المضاد الحياتي وتظهر له فعالية كبيرة عند خلطهُ مع البنسلينات ضد بكتريا المتقلبات والزوائف والأنواع السالبة لصبغة غرام (Mislin and Schalk ; Katzung , 2001 2014,). أما مضاد الاميكاسين (Amikacin) فهو من المضادات شبه المصنعة والمشتقة من الكانامايسين ، فيستخدم في علاج الاخماج التي تسببها بكتريا *E.coil* و *Proteus* spp. و *Enterobcter* spp. المقاومة للأمينوكلايكوسيدات الأخرى وهو مقاوم لأكثر الأنزيمات المشفرة بالبلازميدات (Plasmid - mediated enzyme) (Katzung , 2001 ; Tsadikova and Labby, 2015) .

2-1-5-1 : خصائص مضادات الامينوكلايكوسيدات وسميتها

Antibacterial characteristics and toxicity of aminoglycosides

تمتلك مضادات الامينوكلايكوسيدات فعالية واسعة ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام المهمة مثل : *Klebsiella* spp. و *Escherichia coli* و *Proteus* spp. و *Pseudomonas* spp. و *Shigella* spp. و *Salmonella* spp. وكذلك البكتريا

الموجبة لصبغة غـرام منها : *Staphylococcus aureus* وبعض *Streptococci* (Vakulenko and Mobashery , 2003) ، ومـع ذلك لم يكن لـها أي فعالية دوائية ضـد البكـتريا *Neisseria gonorrhoeae* و *Streptococcus pneumonia* و *Stenotrophomonas maltophilia* و *Burkholderia cepacia* ، والكائنات المجهرية اللاهوائية ، إذْ تعطي فعلاً تأزرياً مع المضادات الحياتية المثبطة للجدار الخـلوي مثل مضادات البيتالاكتام (β-lactam) أو مضادات الفانكومايسين (Vancomycin) (Gilbert , 2000 ; Hawser *et al*., 2009) .

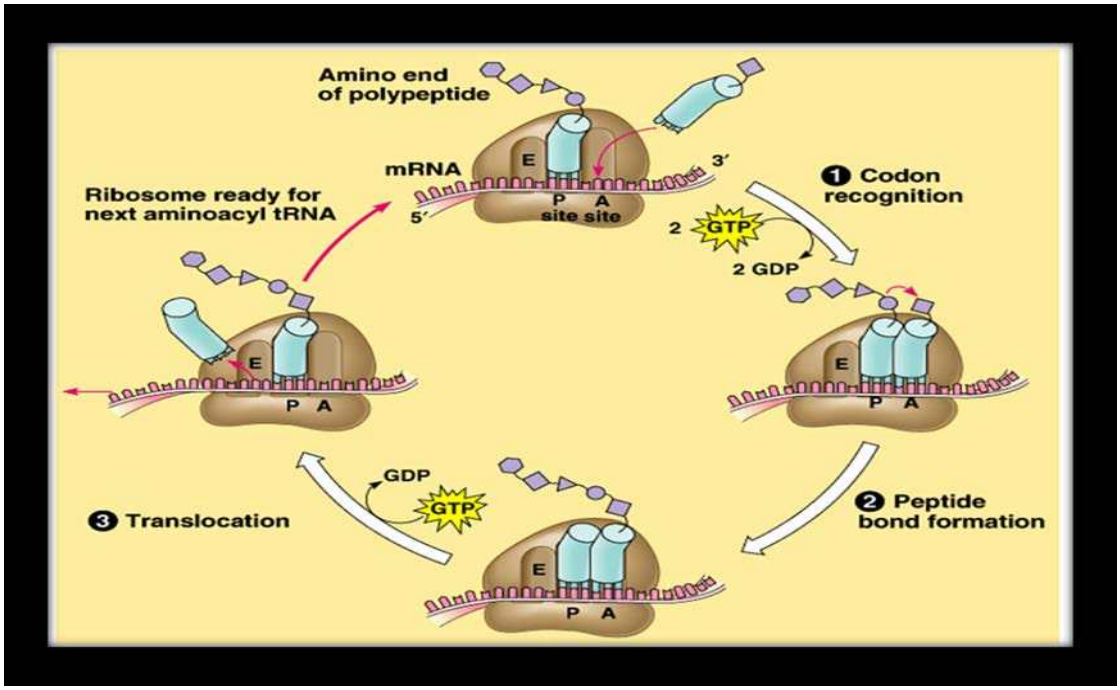
تمتلك الامينوكلايكوسيدات العديد من الخصائص التي تجعلها مفيدة كعوامل مضادة ذات تأثير قاتل للبكتريا ويعتمد ذلك على تركيزها ومدة التعرض البكتيري لهذه المضادات (Vakulenko and Mobashery , 2003) ، ويستمر التأثير القاتل للامينوكلايكوسيدات وذلك بسبب ٱرتباطها القوي بالرايبوسوم ، وهذا ما يؤدي إلى تثبيط تركيب جدار الخلية وذلك بسبب ٱمتصاص هذه المضادات داخل الخلايا وهذه صفة مميزة للامينوكلايكوسيدات ، ولكن هذه المضادات تعطي ردوداً سامة مثل التسمم الأذني والسمية الكلوية (Turnidge , 2003 ; Jana and Deb , 2006) . أن مضادات الســتربتومايسـين والـبراميسين مـن بـين الامينوكلايكوسيدات تستهدف خلايا الشعرالحسية للأذن الداخلية مما يؤدي إلى انحطاط خلايا الشعر الحسي وفقدان السمع الدائم بنسبة 5% من المرضى (Matt *et al*. ; Arya , 2007 2012,) . بما أن التأثيرالقاتل للبكتريا يعتمد على التركيز فإن تأثيرهذه المضادات الحياتية يشترك مع خطر التسمم الاذني والسمية الكلوية ، وذلك بسبب أخذ الجرعة مرة واحدة يومياً مـــع الامينـوكلايكوسـيدات وخاصـــة عـنـد المرضى الـذين لـديهم مشــاكل في وظــائف الكلى (Burton *et al*., 2006 ; Vakulenko and Mobashery , 2003) .

2-1-5-2 : الالية الجزئية لعمل مضادات الامينوكلايكوسيدات

Molecular mechanism of action Aminoglycoside Atibiotics

تعمل الامينوكلايكوسيدات بمهاجمة البكتريا بخطوتين أولاً ٱمتصاص الامينوكلايكوسيدات فـي البكـتريا هـي عمليـة مهمـة للنشــاط البيـولـوجي ثـانياً داخـل الخـلية البكـتيرية تــرتبط الامينوكلايكوسيدات بالرايبوسوم وتمنع تخليق البروتين (Herisse *et al*.; Xie *et al*., 2011 2017,). يلعب الرايبوسوم دوراً مهماً في ترجمة mRNA إلى البروتينات في الخلية البكتيرية (الشكل 2-1) (Synder and Champness , 2007) .

تتكون الوحدة الفرعية الكبيرة (50S) من أثنين من جزئيات الحامض النووي RNA وهي 5S و 23S RNA وحوالي 30 من البروتينات في حين أن الوحدة الفرعية الصغيرة (30S) تتكون من 16S RNA و 21-20 من البروتينات (Poehlsgaard and Douthwait , 2005 ; Qiong *et al*., 2009) . تمتلك الوحدة الثانوية 30S للرايبوسوم مواقع على هيئة جيوب وهي A-site (for acceptor) و P-site (for peptidyl) و E-site (for exit) ، الموقع A لديه قدرة كبيرة على التمييز بالأرتباط الصحيح وغير الصحيح بالحامض النووي tRNA ، مما يؤدي إلى دقة عالية من الترجمة translation (Han , 2005 ; Vakulenko and Mobashery , 2003). ترتبط الامينوكلايكوسيدات بمواقع محددة من الوحدة الرايبوسومية الثانوية 30S ribosomal subunit وتدخل في تخليق البروتين ، معظم الامينوكلايكوسيدات من صنف aminocylitol أو ما يسمى (2-deoxy streptamine aminocyclitol) على سبيل المثال الجنتاميسين Gentamicin يرتبط تحديداً بالموقع (A-site tRNA binding site) على الوحدة الثانوية 16S الحامض النووي rRNA ، والستربتومايسين Streptomycin الذي ينتمي إلى الصنف (Streptamine aminocyclitol) ايضاً يرتبط بالموقع A-site ولكن بالإضافة إلى أرتباطه بالحامض النووي rRNA يرتبط بالبروتينات الأخرى (Ogle and Arya , 2007 ; Ramakrishman , 2005) .



شكل (2-1) تخليق البروتين حيث يرتبط tRNA بالموقع A- Site للوحدة الرايبوسومية الصغيرة وتندمج الاحماض الامينية في سلسلة ببتيدية متنامية (Synder and Champness , 2007).

3-1-5-2 : مقاومةالمضادات الحياتية Antibiotics resistance

ابتدأ التقدم الكبير في تطوير العقاقير المضادة للميكروبات من منتصف القرن العشرين مما خلق مشكلة كبيرة بين الإنسان والكائنات الحية الدقيقة الممرضة والتي تسبب العدوى والمرض ، وهذا ما جعل البشر يعتقدون أنهم يمكن أن يخرجوا من هذه المشكلة بمجرد ان يتم آستخدام مضادات الميكروبات مما سبب رد فعل من قبل البكتريا من خلال إظهار اشكال مختلفة من المقاومة ومع زيادة آستخدام مضادات الميكروبات على مرّ السنين استجابة البكتريا من خلال تطوير أشكال مختلفة من المقاومة لواحد أو أكثر من المضادات الحياتية وهذا موجود في جميع أنحاءالعالم (Andersson and Hughes , 2011) .

اطلقت منظمة الصحة العالمية (WHO) في عام 2001 استراتيجية لمكافحة المشاكل الخطيرة الناتجة من ظهور وانتشارمقاومة المضادات الميكروبية التي تعتبر مشكلة عالمية يجب معالجتها في جميع البلدان ، قد تكون البكتريا مقاومة لصنف واحد أو أكثر من المضادات الحياتية ، وفي هذه الحالة تبين ان كل السلالات من الأنواع البكتيرية مقاومة لتلك المضادات (Blair *et al*., 2014 ; Tenver, 2006) . وهناك عدة اليات مختلفة مسؤولة عن تطوير مقاومة المضادات الحياتية وهي اولاً قد تكتسب البكتريا الجينات التي تشفر الأنزيمات والتي بدورها تعطل المضاد الحياتي قبل ان يكون له تأثير ، ثانياً قد تكتسب البكتريا مضخات التدفق التي تضخ العامل خارج الخلية قبل ان يصل إلى موقع الهدف (Molnar *et al*., 2004) ، ثالثاً قد تكتسب البكتريا الطفرات التي تحد من وصول العوامل المضادة إلى موقع الهدف داخل الخلية ، رابعاً واخيراً قد تكتسب البكتريا عدة جينات لمسار أيضي والذي يؤدي إلى اهداف خلوية متغيرة في البكتريا والتي لم تعد تحتوي على موقع يرتبط بها المضاد الحياتي . (Chuanchuen *et al*., 2003)

تنتقل المعلومات الوراثية من الخلية البكتيرية إلى خلية أخرى بعدة طرائق والتي عن طريقها تكتسب البكتريا مقاومة المضادات الحياتية ومن هذه الطرائق هو التحول Transformation والذي ينتقل فيه جزء من الحامض النووي الـ DNA ويحمل عدد من الجينات والمعلومات الوراثية ، وهذه الالية تم اكتشافها لأول مرة في مكورات ذات الرئة *Pneumococcus* ومن ثم ملاحظتها في بكتريا أخرى مثل : *Haemophilus* و *Niesseria* (Snyder and Champness , 2007) . تختلف الخطوات العامة لعملية التحول الطبيعي آعتماداً على ما اذا كانت البكتريا موجبة أو سالبة لصبغة غرام لأن البكتريا الموجبة تفتقر إلى الغشاء الخارجي حيث تكون عملية التحول في البكتريا السالبة لصبغة غرام أولاً بأن

الحامض النووي الـ DNA يشكل الشريط الثنائي (dsDNA) متجهاً للسطح الخارجي للبكتريا (Chen *et al*., 2005) ، ثانياً ينتقل الحامض النووي DNA عبر جدار الخلية والغشاء الخارجي ، ثالثاً إحدى شريطي الـ DNA ينحل بواسطة أنزيمات الـ Nucleases والخطوة الأخيرة ينتقل الشريط الأحادي للحامض النووي DNA (ssDNA) إلى السايتوبلازم عبر الغشاء الداخلي (Snyder and Champness , 2007) .

تعتبرخطوات عملية التحول في البكتريا الموجبة لصبغة غرام هي مشابه تماماً لعملية التحول في البكتريا السالبة الا أن الانتقال من خلال الغشاء الخارجي ليس ضروري فعندما يكون داخل السايتوبلازم فالشريط الأحادي (ssDNA) قد يصنع شريطاً مكملاً ويثبت نفسهُ كبلازميد بعد ذلك يصبح اندماجاً مستقراً إلى كرموسوم مستلم بواسطة أعادة التركيب المتشابه أو يتحلل (Chen *et al*., 2006 ; Chen and Dubmu , 2004) ، وبهذا استطاعت البكتريا تصنيع شريط مزدوج من (dsDNA) أي أن دورعملية التحول الطبيعي هو اصلاح الحامض النووي DNA والتجهيز واعادة التركيب لكي يزداد التنوع (Dubnau *et al*., 2004 ; Johnsborg *et al*., 2007) . ومن الطرق الأخرى لانتقال المادة الوراثية هو الاقتران البكتيري Bacterial Conjugation والذي يعرف بأنه العملية التي يتم بواسطتها انتقال الحامض النووي DNA من خلية إلى خلية أخرى مقترنة بها وقد لوحظت هذه العملية من قبل Joshua Lederberg و Edward Tatum في عام 1947 (Schroder and Lanka 2005 ,) . تحدث هذه العملية مع انتقال البلازميدات والعناصرالجينية الكروموسومية وترتبط عملية انتقال البلازميدات والعناصر الجينية مع جينات *tra*-gene (Smillie *et al*.,2010) . وهذه العملية تكون متشابهة بين البلازميدات والعناصرالجينية الكروموسومية ، حيث تعد البلازميدات من العوامل الوراثية التي تنتقل بطريقة الاقتران وبترددٍ عالٍ وان هذه العملية تتطلب وجود نوع من الجينات تدعى *tra*-genes تكون محمولة على بلازميد متنقل ذاتياً وتمتاز بعض البلازميدات المتنقلة ذاتياً بقابليتها على تحريك بلازميدات أخرى غير متنقلة ذاتياً (Smillie *et al*., 2010 ; Varsaki *et al*., 2009) ، لكي ينقل البلازميد يجب ان يكون بموقع ori T،فالجينات *tra*-genes يشفر لمكون Mpf (Mating pair formation) وكذلك يشفر لمكون Dtr (DNA Transfer and Replication) (Smillie *et al*., 2010) ، تنتقل العناصر الوراثية من خلال النبيبات المتكونة بين الخليتين المتصلتين من الخلية الواهبة إلى الخلية المستلمة ، فإن وظيفة الـ Mpf هو حمل الخلايا الواهبة والمستلمة سوياً على الأقتران، وتكوين أنبوب يتم من خلالهُ نقل الحامض النووي DNA أثناء عملية الأقتران وكذلك تشمل

البروتينات التي تصل مع مكون Dtr وهذا المكـون الذي يُهَيّئ البلازميـد للانتقال، أي عمليـة الأقتــران Conjugation تشمل الخلية الواهبة Donor cell التي تنتج أنبوب الاقتران وعن طريقه تتصل مع الخلية المستلمة Recipient cell (Cocales and Christie , 2004) ، وبعد ذلك نفس البلازميد الذي نقل هو يشفر كأنزيم relaxase الذي يجعل الشريط الأحادي المشطور بموقع oriT site للبلازميد ، ثم البلازميد المشفرلأنزيم helicase يفصل شريطا الحامض النووي DNA ، بعدها يُثبت أنزيم relaxase بنهاية 5' end بالشريط الأحادي للحامض النووي ssDNA وينتقل الشريط إلى الخلية المستلمة ومن ثم يدخل الخلية المستلمة ، وأنزيم relaxase يعيد تدوير الشريط الأحادي ssDNA ويعمل بتكوين شريط متمّم له واخيراً يتم تكوين شريط متمم للحامض النووي الأحادي ssDNA في الخلية الواهبة (Isaacs *et al*., 2011 ; Dominguez and O'Sullivan , 2013) .

4-1-5-2 : الأنزيمات المحورة لمضادات الامينوكلايكوسيدات

Aminoglycoside Antibiotics - Modifying enzymes (AMEs)

تعتبرالأنزيمات المحـورة لمضــادات الامينوكلايكوسـيدات الالـية الرئيسة لمقاومة الامينوكلايكوسيدات في العزلات السريرية لكل من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام وهي أنزيمات محورة لمجاميع الأمين أو الهيدروكسيل (Amino - or hydroxyl - groups) من الامينوكلايكوسيدات (Houghton *et al*., 2010 ; Vamane *et al*., 2007) ، تؤدي هذه الأنــزيمات إلى انخفاض أو الغاء أرتباط جـزيئة الامينوكلايكوساید بالرايبوسوم والفشل في تشغيل المرحلة الثانية التي تعتمد على الطاقة (Vakulenko and Mobashery,2003 ; Feldman *et al*., 2010). وتـرتبط هـذه الأنـزيمات المحـورة تساهمياً مـع مجمـوعة الهيدروكسيل (OH group) أو مع مجموعة الأمين (NH_2 group) في أحد صنفي مضادات الامينوكلايكوسيدات (Tolmasky,2007b) ، وتعمل هذه الأنزيمات على نقل مجموعة الاستيل (Acetyl group) المشتقة من المركب Acetyl-CoA ومجموعة الادنيل (Adenyl group) ومجموعة الفوسفات (phosphate group) المشتقة من مركب الطاقة ATP وبهذا تحفز تثبيط عمل مضادات الامينوكلايكوسيدات ، وترتبط هذه الأنزيمات المحورة أرتباط ضعيف بالموقع A للرايبوسوم (Walsh , 2003).

تـكون هذه الأنزيمات عادة محمـولة على العناصر الوراثـية المتنقلة كالبلازمـيدات الاقترانية R-Factor والجينات القافزة الاقترانية Transposons والانتغرونات Integrons

كذلك يمكن أن يُشفر لها الكرموسوم البكتيري (Sabtcheva *et al*., 2003) ، كما يمكن ان تتواجد جينات المقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات في البكتريا من خلال عملية الايض الخلوي الطبيعي لها حيث تكون أكثر من 50 نوع من الأنزيمات المحورة وهذا ما يؤدي الى أرتفاع مستويات المقاومة (Miro *et al*., 2013) .

وتقسم الأنزيمات المحورة للامينوكلايكوسيدات (AMEs) إلى ثلاث مجاميع (الشكل 2-2) (Ramirez and Tolmasky , 2010) هي :

1- الأنزيمات الناقلة لمجموعة الاستيل (AACs) Aminoglycoside N-Acetyl transferases

2- الأنزيمات الناقلة للنيوكليوتيدات (ANTs) Aminoglycoside O-Nucleotid transferases

3- الأنزيمات الناقلة لمجموعة الفوسفات (APHs) Aminoglycoside O-Phospho transferases

الشكل (2-2) يمثل الامينوكلايكوسيدات وموقع التحوير بواسطة AAC و ANT و APH (Ramirez and Tolmasky , 2010)

1-4-1-5-2 : الأنزيمات الناقلة لمجموعة الاستيل

Aminoglycoside N-Acetyl transferases (AACs)

تشكل هذه المجموعة أكبر مجاميع الأنزيمات المحورة لمضادات الامينوكلايكوسيدات وتنتمي إلى عائلة كبيرة من البروتينات والتي تشمل حوالي 10,000 بروتين (Vetting *et al*., 2005)، وتعمل هذه الأنزيمات على تحفيز حدوث عملية الاستلة Acetylation والتي تتضمن إضافة مجاميع الاستيل إلى الامين (NH_2 group) في جزئية الامينوكلايكوسيدات بأستخدام العامل المساعد Acetyl Co A كمادة واهبة وتحدث عملية الاستلة في الموقع 1 و 2' و 3 و 6' للامينوكلايكوسيدات (Ramirez and Tolmasky , 2010) . توجد أنزيمات الموقع الأول AAC (1) في *E.coli* و *Campylobacter* spp. و *actinomcete* وتعمل أنزيمات هذا الموقع على عدة مضادات هي : Aparamycin و Lividomycin و Ribostamycin (Vakulenko and Mobashery , 2003; Ramirez and Tolmasky,2010) ، الجين الذي يُشفر لهذه الأنزيمات لم يحدد واقترح sunada وجماعته (1999) بأن الجين يقع في الكرموسوم لكن لم يتم تأكيد هذه النتائج .أما بالنسبة لأنزيمات الموقع الثاني (2') AAC توجد في البكتريا السالبة لصبغة غرام وجنس البكتريا *Mycobacterium* وتعمل هذه الأنزيمات على تحوير مضادات الامينوكلايكوسيدات منها الجنتامايسين والتوبرامايسين والنتليمايسين ، والجين الذي يُشفر للـ AAC(2') يقع على الكروموسوم (Adams *et al*., 2008).

تتكون أنزيمات الموقع الثالث AAC(3) من عشرة أصناف ثانوية جميعها تم تحديدها في البكتريا السالبة لصبغة غرام ، حيث يتضمن الأنزيم AAC (3)-I خمسة أنزيمات هي AAC(3)-Ia و AAC(3)-Ib و AAC(3)-Ic و AAC(3)-Id و AAC(3)-Ie والتي تعطي مقاومة لمضاد الجنتامتسين ومضادات الامينوكلايكوسيدات الأخرى كمضاد Sisomicin و Fortimicin ، حيث توجد هذه الأنزيمات بأعداد كبيرة في العائلة المعوية Enterobacteriaceae والعزلات السريرية للبكتريا السالبة لصبغة غرام ، وجميع هذه الأنزيمات يُشفر لها من قبل الحوافظ الجينية Gene cassettes في الانتغرونات Integrons ، فالجين *aac(3)-Ie* يوجد في بكتريا *P.vulgaris* و *Salmonella* spp. و *P.aeruginosa* (Wilson and Hall , 2010 ; Gionechtti *et al*., 2008) . اما أنزيم AAC(3)-II ، فيتألف من ثلاثة أنواع هي AAC(3)-IIa و AAC(3)-IIb و AAC(3)-IIc التي تمنح المقاومة للمضادات Netilmicin و Tobramycin وSisomycin و Dibekacin و

Gentamicin والجينات التي تُشفر لها تقع على البلازميدات في الانتغرونات Integrons من قبل الحوافظ الجينية Gene Cassettes وغالباً ما ترتبط مع الجينات القافزة Transposons ، وتوجد جميع أنزيمات AAC(3)-II في الاجناس المختلفة للبكتريا السالبة لصبغة غرام (Dubois *et al*., 2008 ; Oteo *et al*., 2006) .

تعتبر أنزيمات الموقع السادس ACC(6') الاكثر شيوعاً من بين مجاميع الأنزيمات المحورة للامينوكلايكوسيدات AACs وتعمل على تحوير كل مضادات الامينوكلايكوسيدات وتكون موجودة في البكتريا السالبة لصبغة غرام والجينات المشفرة لهذه الأنزيمات تكون موجودة على البلازميد والكروموسومات غالباً ما تكون جزءاً من العناصر الوراثية المنتقلة (Vakulenko and Mobashery, 2003 ; Centron and Roy , 2000) . وتتضمن أنزيمات الموقع السادس AAC (6') نوعين من الاصناف الثانوية والرئيسة وهي AAC(6')-I و AAC(6')-II ، حيث يظهر أنزيم AAC(6')-I نشاطهُ ضد الجنتامايسين C_{1a} و C_2 والاميكاسين ، وهو ربما الاكثر سريرياً وذات الصلة في الأنزيمات الناقلة لمجموعة الاستيل ، يعتبر أنزيم AAC(6')-Ib-cr صنفاً ثانوياً لأنزيم AAC(6')-I وكذلك يظهر نشاطهُ ضد الفلوروكوينولينات (Ramirez and Tolmasky , 2010)، ويعتبر هذا الأنزيم هو أول أنزيم مكتشف له القدرة على منح المقاومة لنوعينِ مختلفينِ من المضادات الحياتية هي الامينوكلايكوسيدات والكوينولينات (Robicsek *et al*., 2006) ، والسبب في الانتشار الواسع لأنزيم AAC(6')-Ib بين البكتريا هو ان الجين المسؤول عن هذا الأنزيم يوجد على العناصر الوراثية المنتقلة وهذا ما يزيد من سرعة الانتقال (Vakulenko and Mobashery 2003,) . اما الأنزيم AAC(6')-II فيتضمن صنفينِ ثانويينِ من الأنزيمات هي AAC(6')IIa و AAC (6')-IIb (Tolmasky , 2007b) ، ويظهر هذا الأنزيم فعاليته ضد كل من الاشكال الثلاثة للجنتامايسين C_1 و C_{1a} و C_2 ولكن ليس له فعالية ضد الاميكاسين (Ramirez and Tolmasky , 2010) .

2-4-1-5-2 : الأنزيمات الناقلة للنيوكليوتيدات Aminoglycoside O-Nucleotid transferases (ANTs)

تعتبر مضادات الامينوكلايكوسيدات غير فعالة بواسطة الأنزيمات الناقلة للنيوكليوتيدات التي تحفز نقل مجموعة الادينوسين أحادية الفوسفات Adenosine mono phosphate من المادة الواهبة الادينوسين ثلاثي الفوسفات Adenosine triphosphate (ATP) إلى

مجموعة الهيدروكسيل في جزئية الامينوكلايكوسايد ، وتتألف هذه المجموعة من خمسة أصناف من ANTs التي تعمل على تحفيز عملية Adenlylation تبعاً إلى موقع التحوير وهي : ANT(6) و ANT(9) و ANT(4') و ANT(2'') و ANT(3'') (Coyne *et al.*, 2010) . تنتشر أنزيمات الموقع السادس ANT(6) على نطاق واسع في البكتريا الموجبة لصبغة غرام وتتصف هذه الأنزيمات بأنها غير متطابقة على الرغم من أنها تعمل على مقاومة الستربتومايسين ، والجينات المسؤولة التي تُشفر أنزيمات الموقع السادس ANT(6) موجودة على البلازميدات والجينات القافزة الاقترانية والانتغرونات ، وهي مرتبطة بتسلسل الحامض الاميني وتتضمن *ant(6)* و *ant(6)-Ia* و *ant 6* و *aad E* (Vakulenko and Tolmasky , 2007a ; Mobashery , 2003) ، وكذلك الجين *ant(6)-Ib* شُخص مؤخراً في العزلات المرضية لبكتريا *Compyloacter fetus* (Abril *et al.*, 2010) . أما أنزيم الموقع التاسع ANT(9) ، فقد شُخص وجوده في البكتريا الموجبة لصبغة غرام وهي : *Staphylococcus aureus* ويتضمن نوعينِ منه ANT(9)-Ia و ANT(9)-Ib التي تمنح المقاومة لمضاد Spectinomycin وتُحمل الجينات المشفرة لهذه الأنزيمات على الجينات القافزة (Ramirez and Tolmasky , 2010) ، وشخص وجود أنزيم ANT(9)-Ib في بكتريا *Enterococcus faecalis* والجين المشفر لهذا الأنزيم يُحمل على البلازميد (Lebalanc ,1991) .

يتضمن أنزيم الموقع الرابع ANT(4ˈ) صنفينِ ثانويينِ من الأنزيمات هما : الأنزيم الأول ANT(4ˈ)-I وشخص وجوده في البكتريا الموجبة لصبغة غرام والجين المشفر لهذا الأنزيم يوجد على البلازميد والتي تمنح المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات Tobramycin و Amikacin و Isepamicin و Dibekacin والتي تعتبر الالية الرئيسة لمقاومة هذه المضادات في البكتريا *S.aureus* في اليابان (Ramiraz and Tolmasky,2010) ، أما الأنزيم الثاني ANT(4ˈ)-II فيوجد في البكتريا السالبة لصبغة غرام ويمنح المقاومة لمضادات Tobramycin و Amikacin و Isepamicin ، وشخص نوعين من هذا الأنزيم هما ANT(4')-IIa ويوجد محمول على بلازميد في بكتريا *Pseudomonas* والعائلة المعوية Enterobacteriaceae ، وأنزيم ANT(4ˈ)-IIb يشفر من قبل الجينات القافزة لبكتريا *P.aeruginosa* (Coyne *et al.*, 2010) . ويوجد أنزيم الموقع الثاني ANT(2'') في البكتريا المعوية والبكتريا السالبة لصبغة غرام والغير المخمرة ويعمل على منح مستوى متوسط المقاومة ضد مضادات الامينوكلايكوسيدات Tobramycin و Gentamicin

و Kanamycin و Dibekacin و Sisomicin ، والأنزيم الوحيد ANT(2")-Ia للموقع الثاني هـو واسـع الانتشار ويمنح المقاومـة لمضاد Gentamicin و Tobramycin و Kanamycin ويُحمل الجين المشفر لهذا الأنـزيم على البلازميـدات والجينات القافـزة والانتغرونات (Haldorsen ,2011 ; Macleod *et al*., 2000) . يعد أنزيم الموقع الثالث ANT(3") من أكثر الأنزيمات شيوعاً من بين أنزيمات ANT ويُعبرعنه جينياً من خلال جين في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام وتحمل هذه الجينات المشفرة لهذا الأنزيم على الانتغرونات والحوافظ الجينية والبلازميدات والجينات القافزة (Ramirez and Tolmasky, 2010) .

3-4-1-5-2 : الأنزيمات الناقلة لمجموعة للفوسفات

Aminoglycoside O-Phospho transferases (APHs)

تنتج هذه المجموعة مستوى عالٍ من المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات ، لذا تعتبر هذه المجموعة الثانية من بين الأنزيمات المحورة للامينوكلايكوسيدات AMEs ، ولها القابلية على تحفيز نقل الفوسفات إلى جزيئة الامينوكلايكوساید ، التي تستخدم مركب الطاقة (ATP) ولها القابلية على فسفرة مجاميع الهيدروكسيل الموجودة في كل أصناف المضادات الحياتية وتتألف هذه المجموعة من سبعة أصناف من الأنزيمات تبعاً لموقع التحوير وهي : [APH(4) و APH(6) و APH(9) و APH(3') و APH(3") و APH(2") و APH(7")] (Vakulenko and Mobashery , 2003) .

يعتبر أنزيم APH(3') أكبر مجموعة الأنزيمات APH ويقسم إلى سبعة أصناف ثانوية وشُخص وجودها في أنواع مختلفة من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام وتُحمل الجينات المشفرة لهذه الأنزيمات على البلازميدات والكروموسومات وتعمل هذه الأنزيمات على تحوير مجموعة الهيدروكسيل في الموقع (3') لمضادات الامينوكلايكوسيدات ، مستوى المقاومة يكون مختلفاً في الاصناف الثانوية لهذا الأنزيم (Ramirez and Tolmasky ,2010) ، حيث حُدد الجين *aph(3')-IIb* في كرموسوم بكتريا *P.aeroginosa* (Winsor *et al*., 2005) ، وكـذلك حُـدد الجين *aph(3')-IIc* في بكـتريا *Stenotrophomonas maltophilia* (Okazaki and Avison , 2007) . وكلاً من الأنزيمين APH(3") و APH(6) يعملان على تحوير مجموعة الهيدروكسيل في الموقع الثالث والسادس ويمنحا المقاومة لمضاد الستربتومايسين ، والجينات المشفرة لهذين الأنزيمين تُحمل على الكروموسومات والبلازميدات والجينات القافزة ، ويتضمن أنزيم APH(3") نوعين هما : APH(3")-Ia و APH(3")-Ib

(Ramirez and Tolmasky , 2010) ، ويتضمن الأنـزيم APH(6) أربعة أنـواع هي : APH(6)Ia و Ib و Ic و Id) (Distler *et al*., 1987) . وبالنسبة الأنزيمات APH(4) و APH(7") يعطي مقاومة لمضاد Hygromycin والتي ليس له أي صلة سريرياً (Ramirez and Tolmasky ,2010) . في حين أَنَّ الأنزيم APH(9) فالجينات التي تُشفر له تُحمل على الكروموسوم ويمنح المقاومة لمضاد الستربتوماميسين (Suter *et al*., 1997) . اما الأنزيم APH(2") فهو يمنح المقاومة لمضاد الجنتامايسين في البكتريا الموجبة لصبغة غرام ، ويتضمن الأنزيم APH(2") أربعة أصناف ثانوية ، حيث ينتج الأنزيم APH(2")-Ib مستويات متوسطة المقاومة للمضادات الحياتية في حين ينتج الأنزيم APH(2")-Id مستويات عالية المقاومة للمضادات الحياتية ، والجينات المشفرة لهذه الأنزيمات تقع على البلازميدات والكروموسومات (Ramirez and Tolmasky , 2010 ; Smith and Baker , 2002) .

2-5-2 : مضادات البيتالاكتام β - Lactam Antibiotics

البيتالاكتام أسم يطلق على جميع المضادات الحياتية التي تحتوي على حلقة البيتالاكتام في تركيبها (Wilke *et al*., 2005) ، وتعّد هذه المجموعة من المضادات الأكثر أستخداماً منذ اكتشافها وذلك بسبب فعاليتها العالية ، إذْ تمثل 60% من جميع المضادات الحياتية المستخدمة للأخماج الناتجة عن البكتريا السالبة لصبغة غرام (Livermore and Woodord ,2006) . وتضم هذه المضادات أربع مجاميع رئيسة هي البنسليات (Penicillins) والسيفالوسبورينات (Cephalosporins) والكاربابينيم (Carbapenem) والمونوباكتام (Monobactam) (Wilke *et al*., 2005) . وتختلف هذه المجاميع في طبيعة الحلقة الإضافية المتصلة بحلقة البيتالاكتام ففي مجموعة البنسلينات نجد أن الحلقة الإضافية هي (5-Thiozolidin) ، وفي مجموعة السيفالوسبورين هي (6-Cephem) إضافة إلى وجود حلقتينِ اضافيتينِ في مضادات الكاربابينيم ، أما مجموعة مضادات المونوباكتام فتقتصرعلى حلقة البيتالاكتام فقط ، كذلك تجد أختلافات بين المضادات العائدة للمجموعة نفسها والذي يكون سبب أختلافها في نوع السلسلة الجانبية المتصلة بحلقة البيتالاكتام (Samaha - Kfoury and Araj , 2003) .

تعمل مجموعة مضادات الـ β-lactam على منع تكون الجسورالببتيدية التي تربط وحدات الأحماض الأمينية في طبقة البيتيدوكلايكان ضمن جدار الخلية البكتيرية مما يؤدي إلى وقف عملية تصنيع الجدار ومن ثم موت البكتريا نتيجة حساسيتها للضغط الاوزموزي

(Jawetz *et al*., 1998) . ونظراً للأخماج المكتسبة في المستشفيات ، فقد أصبحت معظم أجناس المتقلبات مقاومة لهذه المضادات بسبب إنتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز ، وأستعملت هذه المضادات علاجاً فعالاً ضد أخماج المسالك البولية وأخماج الأذن الوسطى وهي تعطي عن طريق الفم بسبب أمتصاصها الكامل في الأمعاء (Livermore and Woodford ,2006).

1-2-5-2: البنسلينات Penicillins

تم اكتشاف البنسلينات من قبل العالم Alexander Fleming عام 1929 من خلال ملاحظتهُ لمزارع بكتريا *Staphylococus aureus* التي كانت مثبطة بعد أن وجد أن هناك فطراً يدعى *Penicililum notatum* الذي لوّث المزرعة وثّبط نموها (Atlas,1995). وتتشابه جميع البنسلينات بالتركيب الأساسي وهو 6- حامض البنسيلانك الأميني (6 - aminopenicillanic acid) المتكون من حلقتين الأولى والأساسية متكونة من خمس ذرات وتدعى بحلقة الثايزولدين (Thiazolidin ring) ، التي ترتبط مع حلقة البيتالاكتام غير الثابتة المتكونة من أربع ذرات ، إذْ تعتمد صفات البنسلين على الذرة الجانبية رقم (6) التابعة لحلقة البيتالاكتام ، وتختلف البنسلينات بأختلاف هذه السلاسل الجانبية المرتبطة (Samaha-Kfoury and Araj , 2003) ، وتشمل كل من بنسلين penicillin G (Benzyl penicillin) وهو أول البنسلينات أستعمل بالأستخدام الطبي وبنسلين Penicillin V (Phenly methyl penicillin V) ويتكون من البنسلينات الطبيعية ذات الطيف الضيق (Livermore and Woodord , 2006) .

تمثل الامينوبنسليات Aminopenicillins الطيف الواسع للبنسلين ومثال على ذلك Ampicillin و Amoxicillin للأخماج المكتسبة في داخل المستشفيات ، فأصبحت أجناس المتقلبات مقاومة للمضادات وذلك بسبب إنتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز وهذه المضادات أستخدمت علاجاً فعّالاً ضد أخماج المسالك البولية والأذن الوسطى وهذه المضادات تعطى بواسطة الفم بسبب الأمتصاص التام لها في الأمعاء (Livermore ; Murray *et al*., 1999 and Woodford , 2006) .

2-2-5-2 : السيفالوسبورينات Cephalosporins

تم اكتشاف السيفالوسبورينات من قبل العالم Brotzu عام 1948 وتتكون مضادات السيفالوسبورينات من حلقة البيتالاكتام وتكون متصلة مع حلقة Dihydrothiazine مكونة نواة تسمى (7- amino cephalosporanic acid) مع وجود سلسلتينِ جانبيتينِ متغيرتينِ R_1

و R_2 تبعاً لنوع المشتق (Brooks *et al*., 2007) . وتقسم مركبات السيفالوسبورين كيميائياً الى مجموعتين الأولى الأوكسي- أمينوسيفالوسبورين (Oxyaminocephalosporin) والمجموعة الثانية هي الميثوكسي سيفالوسبورين (Methoxycephalosporin) ومن الأمثلة على المجموعة الأولى هي مجموعة مضادات السيفوتاكسيم (Cefotaxime) وسيفترياكسون (Ceftriaxone) وسيفتازيديم (Ceftazidime) . أما المجموعة الثانية ، مثل: السيفوكسيتين (Cefoxitin) والسيفوتيتان (Cefotetan) وهذه المركبات لها صلة بالسيفالوسبورينات ، ولكنها تمتلك مجموعة 8 - ميثوكسي (OCH_3) التي تدعى (Oxacephem) بدلاً من (7- aminocephalosporanic acid) الموجودة في مجموعة الأوكسي أمينوسيفالوسبورين (Yao and moellering , 2003) .

تقسم السيفالوسبورينات أعتماداً على التركيب الكيميائي وفاعليتها ضد النمو البكتيري ، وهي الجيل الأول وتشمل الـ Cephalothin و Cephaloridin و Cephalexin وتكون هذه المضادات فعالة جدا ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام ، ولكن نشاطها بسيط نسبياً ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام (Moya *et al*., 2010) . أما الجيل الثاني فهي المضادات الـ Cefuroxim و Cefoxitin وتكون مستقرة نوعاً ما وذلك بسبب وجود أنزيمات البيتالاكتاميز ، وهذا ما يزيد من نشاطها ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام (Samaha - Kfouy and Araji , 2003) . يضم الجيل الثالث المضادات الحياتية التي تكون أكثراستقراراً ، وذلك بسبب وجود أنزيمات البيتالاكتاميز ، ولها القدرة على عبور الجدار الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة غرام ومن هذه المضادات مثل : الـ Ceftazidime و Cefotaxime و Ceftriaxone (Greer, 2009 ; chaudhary and Aggarwal , 2004) . ويعتبر مضاد السيفوتاكسيم Cefotaxime هو أول مشتقات هذه المجموعة ويتميز بتأثيره الفعّال جداً ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام وخاصة بكتريا *P.mirabilis* ولكن له فعالية مغايره ضد بكتريا *P.vulgaris* (Murray *et al*., 1999) .

أما الجيل الرابع ، فمضادات هذا الجيل أظهرت زيادة في الاستقرارية وهي ليس فقط الأنزيمات التي تشفر لها على الكروموسومات بل حتى الأنزيمات التي تكون جيناتها محمولة على البلازميدات ومثل هذه المضادات هو السيفيم (Cepheme) (Yoa and Moellering , 2003 ; Kalai *et al*., 2005) .

3-2-5-2 : الكاربابينيم Carbapenem

تمتلك هذه المجموعة من المضادات طيفاً واسع الفعالية وتستخدم علاجاً للعديد من البكتريا السالبة لصبغة غرام التي تسبب عدوى خطيرة في المستشفيات ، وكذلك تكون فعالة ضد العديد من البكتريا الهوائية واللاهوائية الموجبة والسالبة لصبغة غرام مما يجعلها مفيدة جداً في علاج الاخماج البكتيرية لأن هذه المضادات تثبط تركيب جدار الخلي (Queenan and Papp-Wallace *et al*., 2011 ; Bush , 2007) . أصبحت منذ ذلك الحين مصدر قلق صحي عالمي كبير بعد ان وافقت إدارة الأغذية والعقاقير الاميركية بأستخدام إميبينيم (Impenem) في عام 1985 وميروبينيم (Meropenem) في عام 1996 وهذا يعني بداية مقاومة البكتريا السالبة لصبغة غرام لمضادات الكاربينيم بفترة تقدر من 15- 20 سنة وهذه المقاومة لا نجدها في المضادات الحياتية الاخرى (Clatworthy *et al*., 2007 ; Zavascki and Bulitta , 2013) ، قبل عام 2000 كان عدد قليل نسبياً من العزلات السريرية مقاومة لمضادات الكاربابينيم ومعظمها هي بكتريا *P.aeruginosa* و *A.baumannii* وذلك بسبب أمتلاكها أنزيمات البيتالاكتاميز β- Lactamase وانخفاض نفاذية الغشاء الخارجي (Zavascki *et al*., 2010) .

يعد الاميبينيم (Impenem) هو أول مضاد من مجموعة الكاربابينيم ذو فعالية عالية ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام والبكتريا اللاهوائية ، ويعتبر هذا المركب الدوائي مستقرّاً ولا يتأثر بأنزيمات بيتالاكتاميز β-Lactamase (Jacoby and Bush , 2009) . أما الميروبينيم (Meropenem) فهو أيضاً من مضادات الكاربينيم ذات الطيف الواسع الفعالية ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام وهذا التأثير القاتل لمضاد الميروبينيم ناتجة من تثبيطه لتصنيع جدار الخلية مما يؤدي إلى موت الخلية فهذا المضاد يخترق جدار خلية البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام ليصل إلى مواقع أرتباط البنسلين في الجدار الخلوي (PBP_s) Penicillin binding - proteins ، والميروبينيم يمتلك أستقرارية كبيرة لتحلل بيتالاكتاميز β-Lactamases من أكثر الفئات وخاصة Cephalosporinases و Penicillinases التي تنتجها البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام ويجب أن لا يستخدم الميروبينيم لعلاج البكتريا العنقودية المقاومة للمثيسيلين Methicillin - resistant *Staphylocci* (NCCLS,2003). وهنالك عدة آليات لمقاومة البكتريا للكاربينيم منها انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة غرام ويكون ذلك نتيجة انخفاض إنتاج الثقوب Porin مما يؤدي ذلك إلى قلّة الأمتصاص البكتيري وعدم وصولها إلى مواقع أرتباط البنسلين في الجدار

الخلوي (PBP_s) وزيادة مكونات أنظمة الدفق التي تعمل على قذف المضاد خارج الخلية وأخيراً إنتاج أنزيمات مضـادة للكاربينيم وهي : Carbapenemases و Metallo-β-Lactamases . (CLSI / NCCLS , 2005 ; NCCLS , 2004)

6-2 : تحييد البلازميد Plasmid Curing

تسمى عملية إزالة البلازميدات المشفرة لمقاومة المضادات الحياتية من الخلية البكتيرية بواسطة إحداث ضرر في الـ DNA البلازميدي والذي يؤدي إلى منع التضاعف الذاتي له بالتحييد Curing (Spengler *et al*., 2006) ، ان فقدان البلازميد اما ان يكون ذاتياً ولكن بترددات واطئة وذلك من خلال فشل انتقال نسخة البلازميد في الخلية البكتيرية الاصلية إلى الخلية البنوية وتسمى هـذه العملية بالتحييد التلقائي أو الانعـزال التلقائي Spontaneuos Segregation (Pickett *et al*., 2005) ، أو يحصل التحييد من خلال آستخدام العوامل الفيزيائية فعند تنمية البكـتريا في ظروف درجة حرارتها عالية تعمل على فقدان البلازميد ، فبكتريا *Staphylococcus* spp. فقدت البلازميدات المشفرة لأنزيم Penicillinase عند تنميتها بـدرجة حـرارة 43 م° وكـذلك فقـدان البلازمـيدات المشفرة لإنتاج البيتالاكتامـيز β-Lactmase عند تنميتها بدرجة حرارة 44 م°، وكذلك من العوامل الفيزيائية المهمة التي لها تأثير على عملية التحييد هو التشعيع كالأشعة فوق البنفسجية (Molnar *et al*., 2004) ، وبالإمكان زيادة تردد فقدان البلازميدات عند تعرض الخلايا البكتيرية إلى مركبات كيميائية تحشر نفسها بين قواعد الـ DNA ، مثل : الاكردين البرتقالي Achridin orange ، وبروميد الاثيديوم Ethidium bromide و Sodium dodecyl sulfate (SDS) ، وتعمل هذه المواد على تثبيط أنزيم DNA Polymerase مما يؤثر على عملية آستنساخ البلازميد دون التأثير على تكرار الكروموسوم (Kanekar and Kulkarni , 1998) .

وجد ان الفينوثيازينات المضادة للأكتئاب Antidepressant phenothiazines مثل : Chlorpromizine و Imipramine و Desipamine لها نشاط قوي ومضاد لمجموعة واسـعة مـن البكـتريا كـما في *Mycobacteria* أيّ لها دور في القضاء على البلازميدات التي تحمـل مـقـاومـة المضادات الحياتية (Molnar , 2006) . اي المضـادات الميكـروبية مع الفينوثيازينات تستهدف مواقع داخل الخلية البكتيرية ومن ثمَّ تؤثر على الغشاء البكتيري ويثبط تضاعف البلازميد والأنزيمات المختلفة (Molnar, 2004) .

تمكن Pahwa وجماعته (2012) من تحييد أربعة أنواع من البلازميدات يتراوح حجمها بين 3.5 -10 kb التي تعود لبكتريا *Acinobacter baumannii* عن طريق المعاملة بمادة بروميد الاثيديوم ، إذْ أصبح كلاً من الجنتاميسين والارثرومايسين والامبيسلين والكلندامايسين والفانكومايسين أكثر حساسية كما وجدوا ان مادة بروميد الاثيديوم أكثر فاعلية من مادة الاكردين البرتقالي في عملية تحييد البلازميد ، وكذلك وجدوا ان مادة SDS لها القابلية على تحييد بعض البلازميدات ، وهذا ما أكده حامد (2001) بأن بكتريا *Staphylococcus aureus* تفقد مقاومتها للبنسلين والجنتامايسين والستربتومايسين وبنسبة 100% عند معاملتها بمادة SDS وبتركيز 0.004% ، وكذلك وجد Lavanya وجماعته (2011) بأن عزلات *Lactobacillus* spp. جميعها أصبحت حساسة للجنتامايسين والاثرومايسين والامبيسلين والكلندامايسين والفانكومايسين وبنسبة 100% عند معاملتها بمادة SDS وبتركيز 1% ومن خلال عملية تحييد البلازميد فقد وجد ان مادة الـ SDS أكثر كفاءة في إحداث عملية التحييد مقارنة بمادة الاكردين البرتقالي ، فكانت فقدان المقاومة للمضادات الحياتية بالنسبة للـ SDS بمدى 70 - 100% ، اما بالنسبة للاكردين فكانت 28 - 100% (فرج وغنيمة ، 2010) .

ان أستخدام المواد كلاً من بروميد الاثيديوم والاكردين البرتقالي والمايتومايسين C (Mytomycin C) والاكرفيلافين (Acriflavin) لها القابلية على تحييد البلازميدات ولكن بدرجات متفاوتة إذْ تتداخل مع تضاعف البلازميدات من دون التأثيرعلى كروموسوم الخلية البكتيرية (Trevors and Oddile ,1986) ، وكذلك أَنَّ أستخدام مادة Guonidin hydrochloride لها دوركبير في تحييد البلازميدات لبكتريا *Staphylococcus aureus* وتؤدي إلى فقدان المقاومة للكادميوم والبنسلين (Costa *et al*., 1980). لذا فإن البكتريا المتعددة المقاومة للمضادات الحياتية عادةً ما تحتوي جينات قافزة متعددة وبلازميدات تحمل محددات وراثية لميكانيكيات مختلفة من المقاومة مما يجعل عملية العلاج بالمضادات الحياتية عملية صعبة جداً وهذا يؤدي إلى أستخدام مضادات حياتية واسعة الطيف غالية الثمن (Steward *et al*., 2001) ، وبهذا يمكن لخلايا البكتريا ان تفقد البلازميدات بواسطة عملية التحييد وتعتبر ذا فائدة كبيرة لأن من خلالها يمكن معرفة الصفات التي تحملها الجينات المشفرة لمقاومة المضادات الحياتية التي قد تكون الجينات المحمولة على بعض البلازميدات أو على كروموسوم الخلية البكتيرية (الفحام ، 1997)، وذلك بواسطة مقارنة فعاليات الخلايا الحاوية على البلازميد مع الخلايا المحيدة (النعيمي ، 2002) .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3 : المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1-3 : المواد Materials

1-1-3 : الأجهزة والأدوات المختبرية

جدول (3-1) : الأجهزة والأدوات المختبرية المستخدمة في الدراسة والشركات المصنعة لها .

ت	أســـــم الجهـــــاز	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	أشرطة نظام Api 20 E لتشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام مع الكواشف الخاصة بها	Biomerieux (France)
2	أطباق بلاستيكية Disposable petri dishes	Al-Hani (USA)
3	أنابيب اختبار Test tubes	Superestar (India)
4	الحاضنة Incubator	Gallenkamp (England)
5	الة قياس قطر منطقة التثبيط (فيرنيا) Calipers	NUMIT,OEM available China
6	ثلاجة Refrigerator	Concord (Lebanon)
7	جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis	Bioneer (Korea)
8	جهاز التقطير Distiller	Fisons (Japan)
9	جهاز الدورات الحرارية Thermocycler PCR	Hoelezean (Germany)
10	جهاز النبذ المركزي Centrifuge	Olympus (Japan)
11	حمام مائي Water bath	Memmert (Germany)
12	شرائح زجاجية Slides and cover slides	Superestar (India)
13	صفيحة ساخنة Hot plate	Gallenkamp (England)
14	فرن كهربائي Electric oven	Eriotti (Italy)
15	كابينة الزرع المجهري Laminar flow cabinet	Cruma (Spain)
16	كاميرا رقمية Digital camera	Sony (Japan)
17	مازج دوار Vortex	CYAN (china)
18	مجهر ضوئي Light microscope	Olympus (Japan)
19	محاقن Disposable Syringes	Superestar (India)
20	مسحات قطنية معقمة Sterilized cotton Swabs	SterellinLtd.(England)
21	مصدر الأشعة فوق البنفسجية UV-Trans illuminator	MUV (Taiwan)
22	مقياس الاس الهيدروجيني PH meter	Hoelezean (Germany)
23	منبذة مبردة Cooling centrifuge	Hermle (Germany)
24	موصدة Autoclave	Gallenkamp (England)
25	ميزان حساس Sensitive balance	Sartorius (USA)

2-1-3 : المواد الكيمياوية والبايلوجية

جدول (3-2) : المواد الكيمياوية والبايلوجية المستخدمة في الدراسة.

ت	اسم المادة	الشركة المصنعة
1	Agarose الأكاروز	Biolife (Italy)
2	Agar أكار	BDH (England)
3	Crystal violet البلور البنفسجي	
4	α-naphthol الفانفثول	
5	Hydrogen peroxide H_2O_2 بيروكسيد	
6	Gelaten جيلاتين	
7	H_2SO_4 حامض الكبريتيك	
8	HCL حامض الهيدروكلوريك	
9	Safranine سفرانين	
10	Methyl red صبغة أحمر الميثل	
11	Methene blue صبغة الميثل الأزرق	Bio BASIC INC /USA
12	Ethidium bromide صبغة بروميد الاثيديوم	Nerk (Germany)
13	Sulfate Sodium Dodecyl (SDS) صوديوم دودسيل سلفات	BDH (England)
14	Dipotassium hydrogen phosphate فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين	
15	Monopotassium hydrogen phosphate فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	
16	Tetra methyl paraphenylen diamine dihydro chloride كاشف الاكسديز	
17	Barium chloride كلوريد الباريوم	
18	Ferric chloride كلوريد الحديديك الثلاثي	
19	Sodium chloride كلوريد الصوديوم	
20	Glycerol كليسرول	
21	Urea Solution محلول اليوريا	
22	Potassium hydroxide هيدروكسيد البوتاسيوم	
23	Iodin يود	
24	Potassium iodid (KI) يوديد البوتاسيوم	

3-1-3 : الاوساط الزرعية

جدول (3-3) : الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة والشركات المصنعة لها.

ت	الوسط	الغرض	الشركة المصنعة
1	أساس الدم الصلب Blood agar base	أستخدام هذا الوسط للتحري عن قابلية العزلات على إنتاج انزيم الهيمولايسين وملاحظة ظاهرة الانثيال Swarming	Himedia (India)
2	أساس اليوريا الصلب Urea ager base	أستخدام للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم اليوريز	
3	ماء الببتون المغذي Pepton water broth	للكشف عن حلقة الاندول	
4	المرق المغذي Nutrient broth	مُنمي عام	Oxoid (England)
5	نقيع القلب – والدماغ الصلب Brain-Heart infusion agar	أستخدم كوسط ناقل وتنشيط العزلات	
6	وسط DNase الصلب	أستخدم للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج الـ DNase	Himedia (India)
7	وسط الفنيل النين Phenylalanine ager	أستخدم للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج حامض الفنيل بايروفيك من الفنيل النين	Oxoid (England)
8	وسط الكروم الصلب chrom agar	أستخدم كوسط تشخيصي	Himedia (India)
9	وسط الماكونكي الصلب MacConkey agar	أستخدم لوصفهُ وسطاً انتخابياً للبكتريا السالبة لصبغة غرام والتمييز بين البكتريا المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز	
10	وسط المثيل الأحمر/ فوكس- بروسكاور السائل Methyl red vogas- Proskaour broth	أستخدم للكشف عن التحليل الكامل أو الجزئي للسكريات وإنتاج الاستيل مثيل كاربون	
11	الوسط المغذي الصلب Nutrient agar	مُنمي عام	
12	وسط تربتون الصويا السائل Tryptone soya broth	للتحري عن قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي	
13	وسط سترات سيمون الصلب Simmon's citrate agar	أستخدم للكشف عن البكتريا المخمرة للسترات بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون	Oxoid (England)
14	وسط مولر هنتون Muller hinton ager	أستخدم لفحص حساسية البكتريا للمضادات الحياتية	Himedia (India)
15	Triple-sugar iron	أستخدم للتحري عن تخمر السكريات وإنتاج كبريتيد الهيدروجين H_2S	Oxoid (England)

4-1-3 : المضادات الحياتية Antibiotics

جدول (3-4) : أقراص المضادات الحياتية المستخدمة في فحص الحساسية وتراكيزها والشركة المجهزة.

صنف المضاد الحياتي	أسم المضاد الحياتي	الرمز	تركيز القرص مايكروغرام	الشركة
β-lactam / β-lactamase inhibitor combination	Amoxcillin / Clvulanic acid	AMC	20/10	Bioanalyse (Turkyi)
Penicillins	Penicillins	P	10	
Cephems	Cefotaxime Cephalexin	CTX CL	30 30	
Penems	Impenem Meropenem	IMP MEM	10 10	
Aminoglycosides	Gentamycin Amikacin Tobramycin Kanamycin Netilmicin Streptomycin	CN AK TOB K NET S	10 30 10 30 30 10	Oxoid (England)

5-1-3 : المضادات الحياتية المستخدمة لفحص التركيز المثبط الأدنى.

جدول (3-5) : المضادات الحياتية المستخدمة في قياس التركيز المثبط الأدنى للبكتريا والشركة المجهزة.

اسم المضاد	المنشأ
Gentamycin	Kocaeli (Turkey)
Tobramycin	
Kanamycin	
Netilmicin	
Streptomycin	Hamburg (Germany)

6-1-3 : البادئات Primers

تم تصميم بادئات خاصة بتشخيص بكتريا *Proteus mirabilis* وتحديد بعض جينات الضراوة في هذه الدراسة ، وذلك بأستخدام موقع NCBI - Gen Bank للحصول على تسلسل جين *16S* rRNA (AB079370.1) وبرنامج Primer 3 plus على وفق ما جاء في (Untergasser *et al*., 2007) وكذلك تمَ أستخدام بادئات أخرى وذلك للتحري عن جينات المقاومة للمضادات الحياتية الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides وفق ما جاء في Michalska وجماعته (2014a) وتم تجهيز جميع البادئات عن طريق شركة Bioneer الكوريا.

جدول (3-6): بادئات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات المستخدمة في هذه الدراسة.

Primer	Sequence		Amplicon	Reference
***16S* rRNA**	**F**	**5`-ATACCCTGGTAGTCCACGCT-3`**	**532bp**	**صُممت من قبل الباحث بأستخدام Plus-3**
	R	**5`-AGTTGCAGACTCCAATCCGG-3`**		
aac(3)-Ia	**F**	**5`-GGCTCAAGTATGGGCATCAT-3`**	**389bp**	**(Michalska *et al.*,2014a)**
	R	**5`-TCACCGTAATCTGCTTGCAC-3`**		
aac(6')-Ib	**F**	**5`-GCTCTTGGAAGCGGGGACGG-3`**	**300bp**	
	R	**5`-TCGCTCGAATGCCTGGCGTG-3`**		
ant(4')-IIa	**F**	**5`-ATCGTCTGCGAGAAGCGTAT-3`**	**839bp**	
	R	**5`-TAAAACGCCTATCCGTCACC-3`**		
ant(2")-Ia	**F**	**5`-GACACAACGCAGGTCACATT-3`**	**500bp**	
	R	**5`-CGCAAGACCTCAACCTTTTC-3`**		
aph(3")-Ib	**F**	**5`-CTTGGTGATAACGGCAATTCC-3`**	**548bp**	
	R	**5`-CCAATCGCAGATAGAAGGCAA-3`**		

جدول(3-7): بادئات بعض جينات الضراوة المستخدمة في هذه الدراسة:

Primer	Sequence		Amplicon	Rrference
Urease *ureC*	F	5'-CAAGCCCAAGAAGGTCTCGT-3'	517bp	صُممت من قبل الباحث بأستخدام برنامج Plus-3
	R	5'-CAAGATGCTCGTCCACGGTA-3'		
Fimbriae *mrpA*	F	5'-CGGGTTCTGCTTTAGCTGCA-3'	359bp	
	R	5'-GTTTTGAGCAGCACTTGGGG-3'		
Flagella *flaA*	F	5'-ATCAATGCAGCTGCGACACT-3'	445bp	
	R	5'-TGAAGTACCCGCTTGTTGCA-3'		
Hemolysin *hpmA*	F	5'-AGGTGCTAAACTGCATGCGA-3'	270bp	
	R	5'-ACAAAAGCACCTTGGTTGCC-3'		
Biofilm formation *LuxS*	F	5'-ACGTATGTCTGCACCTGCG-3'	290bp	
	R	5'-CCATAGCTGCCTTCCATGCA-3'		

2-3 : طرائق العمل Methods

1-2-3 : طرائق التعقيم Sterilization Methods

عقمت جميع الأوساط الزرعية الجاهزة والتركيبية والمحاليل المستخدمة التي لا تتأثر بالحرارة بجهاز المؤصدة (Autoclave) عند درجة الحرارة 121م° تحت ضغط 1 جو لمدة 15 دقيقة ، اما بالنسبة للزجاجيات فقد تم تعقيمها بالفرن الكهربائي (Oven) عند درجة حرارة 168م° لمدة ساعة ونصف ، اما المواد والمحاليل التي تتأثر بالحرارة فعقمت بواسطة مرشحات دقيقة (Millipore filters) بقطر 0.22 مايكرومتر (Benson , 2002) .

2-2-3 : تحضير المحاليل

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

حضر بإذابة 0.85 غم من NaCL في 90 مل من الماء المُقطَّر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المُقطَّر ثم عقم بالمؤصدة لمدة 15 دقيقة وحفظ بدرجة 4 م° إلى حين الأستعمال (Macfaddin , 2000) .

2-2-2-3 : محلول ثابت العكرة القياسي (0.5 مل Macfrland standard)

حُضر المحلول بحسب ما جاء في NCCLS (2003) وكالآتي :

محلول A : حُضر بإذابة 1.75 غم من كلوريد الباريوم ($BaCL_2$) في 90 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل للحصول على تركيز 0.048 مول/ لترمن $BaCL_2$.

محلول B : أضيف 1 مل من حامض الكبريتيك (H_2SO) إلى 90 مل ماء مقطر ، وأكمل الحجم إلى 100 مل .عند أستعمال محلول ماكفرلاند يمزج 0.5 مل من محلول A مع 99.5 مل من محلول B للحصول على عدد تقريبي للخلايا البكتيرية بمقدار 1.5×10^8خلية / مل .

3-2-2-3 : محلول دارئ الفوسفات الملحي Phosphate buffer saline

حُضر من إذابة 18 ملغم كلوريد الصوديوم و 0.34 ملغم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و 1.12 ملغم من فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين في 100 مل من الماء المقطر وعُدل الـ pH إلى 7.3 ثم عقم بالمؤصدة (Forbes *et al*., 2007) .

4-2-2-3 : محلول (SDS) Sodium Dodecyl Sulphate

حُضر محلول خزين آنياً Stock solution بتركيز 10% وذلك بإذابة 10 غرام من مادة SDS في 90 مل ماء مقطر (Sambrook *et al*., 1989) .أستخدم هذا المحلول في تجارب التحييد.

5-2-2-3 : محاليل المضادات الحياتية

حُضرت محاليل المضادات الحياتية CLSI (2010) بوصفها محاليل خزينة (Stock Solution) للمضادات المدرجة ادناه وذلك بإذابة 0.1 غم من المضاد في 10 مل من الماء المقطر المعقم وشملت هذه المضادات : Tobramycin و Gentamycin و Kanamycin و Netilmicin و Streptomycin .عقمت هذه المحاليل بالترشيح بواسطة مرشحات دقيقة (Milipore filter) ذات ثقوب 0.22 مايكرومتر .

6-2-2-3 : المحاليل المستخدمة في التحري عن إنتاج البيتالاكتاميز (طريقة اليود القياسية)

حضرت هذه المحاليل على وفق ما جاء في Collee وجماعته (1996) :

1- محلول بنسلين G : حضرالمحلول بإذابة 0.6 غم في مسحوق المضاد الحياتي في 50 مل من دارئ الفوسفات وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر ، وعقم المحلول بالترشيح

وعدل الـ pH إلى 7.2 وحفظ في درجة حرارة 20 م°.

2- محلول النشأ : حضر الحلول بإضافة 1 غم من النشأ في 100 مل من الماء المقطّر ثم وضع المزيج في حمام مائي في درجة حرارة 100 م° لمدة 10 دقائق بعد ذلك وضع في قنينة معقمة وحفظ في 4 م° .

3- محلول اليود : حضر بإذابة 2.03 غم من اليود و 5.32 من يوديد البوتاسيوم في 90 مل من لماء المقطر بعدها اكمل الحجم إلى 100 مل ثم وضع في قنينة معقمة وحفظ في 4 م° .

3-2-3 : تحضير الكواشف

1-3-2-3 : كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent

حُضرالاوكسيديز آنياً وذلك بإذابة 0.1 غم من مادة Tetramethyl -P-phenylalanine diamine dihydrochloride في 10 مل من الماء المقطَّر ، حفظ الكاشف في قنينة معتمة ، أستخدم الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم الاوكسديز (Baron *et al*., 1994) .

2-3-2-3 : كاشف الكتاليز Catalase reagent

حُضر بتركيز 3% من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وأستعمل في الكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج أنزيم الكتاليز (Macfaddin , 2000) .

3-3-2-3 : كاشف كوفاكس Kovac's reagent

حُضر بإذابة 5 غم من مادة Para-Dimethyl amino benzaldehyde في75مل من كحول أيزوأميل Isoamyal alcohol و 25 مل من حامض HCL يحفظ الكاشف في قنينة معتمة في الثلاجة ، وأستخدم الكاشف في أختبار إنتاج الاندول (Forbes *et al*., 2007).

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

حُضر الكاشف بإذابة 0.1 غم من صبغة أحمر المثيل في 300 مل من الكحول الاثيلي بتركيز 95% ثم أكمل الحجم إلى 500 مل بأستخدام الماء المقطّر (Macfaddin, 2000) .

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

يتكون الكاشف من :

A- كاشف الفانفثول (α-nephthol) الذي حُضر بإذابة 5 غم من المادة في 100 مل من الكحول الأثيلي المطلق ليصبح التركيز 5% .

B- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم الذي حُضر بإذابة 40 غم من المادة في 100 مل من الماء المقطّر ليصبح التركيز 40% (Forbes *et al*., 2007) .

6-3-2-3 : كاشف كلوريد الحديديك الثلاثي Ferric chloride

حُضر بإذابة 10 غم من كلوريد الحديديك في 100 مل من الماء المقطّر . أستعمل الكاشف للتحّري عن أنزيم Phenyl alanine deaminase (Macfaddin , 2000) .

7-3-2-3 : كاشف محلل DNase reagent DNA

حُضر الكاشف بإضافة 8.4 من حامض الهيدروكلوريك HCL الخزين ببطء إلى 80 مل إلى الماء المقطّر ، ثم أكمل الحجم إلى 100 مل من الماء المقطّر للحصول على 1 مولار من HCL . أستعمل الكاشف للتحّري عن قدرة البكتريا على إنتاج الأنـزيم المحلل لـ DNA . (Macfaddin , 2000)

4-2-3 : الاوساط الزرعية

1-4-2-3 : الاوساط الزرعية الجاهزة Ready Culture Media

حُضرت الأوساط الزرعية الجاهزة المستخدمة في الدراسة بحسب تعليمات الشركة المصنعة لها والمثبتة على العبوة وتم تعقيمها بجهاز المؤصدة عند درجة حرارة 121 م° ولمدة 15 دقيقة ، حُضر وسط أساس الدم الصلب وعقم ثم ترك إلى ان تصل درجة حرارته 50 م° ثم اضيف له 5% من الدم البشري وبعدها صبّ في أطباق بتري معقمة وحفظ في الثلاجة لحين الأستعمال (Macfaddin , 2000) .

2-4-2-3 : الاوساط الزرعية التركيبية Structural Culture Media

1- وسط أساس اليوريا الصلب Urea agar

حُضر وسط أساس اليوريا الصلب المعقم المحضر بحسب تعليمات الشركة المصنعة بعد ذلك اضيف 5 مل من محلول اليوريا 20% بعد تبريد الوسط بدرجة 50 م° ، ثم وزع الوسط على أنابيب وضعت بشكل مائل لكي تتصلب ، وأستعمل للتحّري عن قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم اليوريز.

2- وسط الجيلاتين Gelatine agar medium

حُضر الوسط بإذابة 6 غم من الجيلاتين في 500 مل من المرق المغذي ثم وزّع في أنابيب زجاجية بواقع 5 مل لكل أنبوبة ثم عقم بالمؤصدة وحفظ في الثلاجة لحين الأستعمال ،

أستعمل الوسط للتحّري عن العزلات القادرة على إنتاج أنزيم الجيلاتين (Atlas *et al.*, 1996) .

3- وسط تخمير السكريات Sugar Fermentation Medium

حُضر وسط Phenol red broth ضبط الأس الهيدروجيني إلى 7.2 ثم عقم بالمؤصدة ، أضيف 1 مل من المحلول السكري 1% لكل نوع من أنواع السكريات المختلفة المعقمة بالترشيح بواسطة مرشحات دقيقة ذات ثقوب 0.22 مايكرومتر ، والسكريات التي أستعملت هي الكلوكوز والفركتوز واللاكتوز والمانوز والكالكتوز والمالتوز (Forbes *et al.*,2007) .

3-2-5 : جمع العينات Samples collection

جمعت 650 عينة من المرضى المراجعين والراقدين في مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والاطفال في مدينة الديوانية ولمختلف الفئات العمرية ولكلا الجنسين للمدة من 2015/3/1 إلى 2016/1/30 وقد شملت الدراسة جمع العينات المختلفة وكما يأتي :

1- عينات الإدرار Urine samples

جمعت 250 عينة إدرار من المرضى الراقدين والمراجعين ومن مركز امراض الكلى والحصى البولية في انابيب بلاستيكية معقمة بواسطة عروة ناقلة نقلت فيها قطرة من الإدرار وزرعت على طبق أساس الدم الصلب وقطره أخرى زُرعت على وسط أساس الماكونكي الصلب بطريقة التخطيط ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة (18-24) ساعة .

2- عينات الحروق والجروح Burns and wounds samples

جمعت 125 عينة وبآستخدام مسحات قطنية معقمة دورت في مكان الحرق والجرح ثم زُرعت العينات بطريقة التخطيط على طبق أساس الدم الصلب وأساس الماكونكي الصلب ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة (18-24) ساعة .

3- عينات الأذن الوسطى Otitis media samples

جمعت 185 عينة ومن قبل الطبيب الاختصاص بواسطة مسحات قطنية معقمة وزُرعت العينات بطريقة التخطيط على طبق أساس الدم الصلب وأساس الماكونكي الصلب ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة (18-24) ساعة .

4- عينات أعلى عنق الرحم H.V.S وبطانة الرحم E.C.S

جمعت 90 عينة من النساء المراجعات والراقدات في مستشفى النسائية والأطفال من قبل الطبيبة الاختصاص بواسطة مسحات قطنية معقمة وزُرعت على وسط أساس الدم الصلب وأساس الماكونكي الصلب بطريقة التخطيط ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة (18-24) ساعة .

6-2-3 : عزل وتشخيص البكتريا المعزولة

Isolation and Identification of isolated bacteria

شخصت العزلات البكترية النامية على كلاً من وسط اساس الدم الصلب ووسط اساس الماكونكي الصلب اعتماداً على الأسس الآتية :

1-6-2-3 : الخصائص المزرعية Cultural characteristics

شُخصت مستعمرات بكتريا *P.mirabilis* مبدئياً بالاعتماد على الصفات المظهرية المتضمنة شكل المستعمرات وحجمها ولونها. وتم التركيز على المستعمرات التي تميزت بظاهرة الانثيال لبكتريا *P.mirabilis* على وسط اساس الدم الصلب ، كذلك ظهرت بمستعمرات شاحبة غير مخمرة لسكر اللاكتوز على وسط اساس المالكونكي الصلب ، إذْ تم دراسة أشكال المستعمرات النامية وخصائصها الزرعية والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفريقية (Macfaddin , 2000) . كما شخصت بكتريا *P.mirabilis* على وسط اساس كروم الصلب الذي يعتبر وسطاً تشخيصياً لها.

2-6-2-3 : الخصائص المجهرية Microscopic characteristics

تضمنت دراسة الخصائص المجهرية للمستعمرات البكتيرية بأخذ مسحة من هذه المستعمرات النامية على الأوساط الزرعية وتثبيتها وتصبيغها بصبغة غرام لملاحظة الشكل وتجمع الخلايا البكيرية وتفاعلها مع الصبغة وفحصها تحت المجهر الضوئي . (Forbes *et al*., 2007)

7-2-3 : الاختبارت الكيموحيوية Biochemical tests

1-7-2-3 : اختبار الكتاليز Catalase test

نقل جزء من مستعمرة فتية بعمر 24 ساعة بواسطة عيدان خشبية معقمة إلى شريحة زجاجية نظيفة ومن ثم وضعت قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3%

(فقره 3-2-3-2) على المستعمرة ، وكانت النتيجة موجبة بظهور فقاعات من غـاز الأوكسجين (Brown , 2007) .

3-2-7-2 : اختبار الاوكسيديز Oxidase test

تم إجراء الأختبار من خلال وضع جزء من المستعمرة على ورقة ترشيح مشبعة بكاشف الاوكسيديز(فقرة 3-2-3-1) ، وأن تكون اللون البنفسجي خلال 15-30 ثانية دليل على إيجابية الأختبار (Forbes , 2007) .

3-2-7-3 : اختبار اليوريز Urease test

لُقحت الانابيب الحاوية وسط مائل اليوريا بطريقة الطعن والتخطيط وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة . ان تغير الوسط من اللون الأصفر إلى اللون الوردي دليل على إيجابية الأختبار هو إنتاج أنزيم اليوريز من قبل البكتريا (Benson , 2002) .

3-2-7-4 : اختبار الاندول Indol test

لُقح وسط ماء الببتون بالبكتريا المراد اختبارها ثم حضن الوسط بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة وبعد ذلك اضيف بضع قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's reagent إلى الوسط (فقرة 3-2-3-3)، وان ظهور حلقة حمراء اللون دلالة على إيجابية الأختبار (Macffaddin ,2000) .

3-2-7-5 : اختبار أحمر المثيل Methyl test

لُقحت الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي MR- VP Media بالمزروع البكتيري ، حضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24-48 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضن اضيفت 5 قطرات من كاشف أحمر المثيل (فقرة 3-2-3-4) وان ظهور اللون الأحمر في الانبوبة تعد النتيجة موجبة ودلالة على إنتاج الحامض ، في حيث بقاء اللون الأصفر تعد النتيجة سالبة (Collee *et al.*, 1996) .

3-2-7-6 : اختبار فوكس - بروسكور Voges - Proskaur

إجري الأختبار بتلقيح الوسط الزرعي MR-VP بالمزروع البكتيري، وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24-48 ساعة بعد ذلك اضيف 0.5 مل من محلول الكاشف الفانفثول و 0.2 مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (فقرة 3-2-3-5) إلى كل أنبوبة مع التحريك الهادئ ثم ترك ساكناً لمدة 10-15 دقيقة . ظهور اللون الوردي دلالة على إيجابية الأختبار التي تشير

إلى التحلل الجزئي للسكر وإنتاج مركب Acetyl methyl carbonyl (Collee *et al*.,1996) .

3-2-7-7 : اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

أستخدام هذا الأختبار للتحري عن قدرة البكتريا لاستهلاك السترات التي تعتبر مصدراً وحيداً للكاربون ،إذْ تم تلقيح وسط Simmon citrate agar المائل بالمستعمرات البكتيرية المراد اختبارها وحضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24-48 ساعة . ان تحول لون الوسط من الاخضر إلى الازرق دلالة على إيجابية الفحص أي أستهلاك البكتريا للسترات (Winn *et al*., 2006) .

3-2-7-8 : اختبار تخمر السكريات الثلاثية وإنتاج الغاز

Triple - Suger iron agar and gas production test

تم الكشف عن قابلية البكتريا على تخمير السكريات الكلوكوز واللاكتوز والسكروز وإنتاج كبريتيد الهيدروجين وذلك بتلقيح الأنابيب الحاوية على وسط Triple-Suger iron بطريقة الطعن والتخطيط على السطح السائل بالمزروع البكتيري ثم حضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، ان تغير لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر في الجزء العميق يعد نتيجة موجبة لتخمر سكر الكلوكوز فقط ، في حين تغير لون الوسط ككل من الأحمر إلى الأصفر يعد نتيجة موجبة لتخمر سكر اللاكتوز والسكروز كذلك يكون الغاز على شكل فقاعات أسفل الوسط أما في حالة البكتريا المكونة لغاز كبريتيد الهيدروجين فيتكون راسب أسود في قعر الانبوب (Macfaddin , 2000).

3-2-7-9 : اختبار انزيم الجيلاتين Gelatinase liquification test

إجري هذا الأختبار للكشف على قدرة البكتريا عن إنتاج أنزيم الـ Gelatinase الذي يعمل على اسالة الجيلاتين فتم تلقيح أنابيب الوسط بطريقة الطعن وتم حضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة وتم التحري عن اسالة الجيلاتين بعد وضع أنابيب الوسط في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لمدة نصف ساعة ، فإن حدوث التميع دلالة على فعالية الأنزيم من قبل البكتريا (Collee *et al*., 1996) .

3-2-7-2-10 : اختبار تخمير السكريات Sugar Fermentation test

لُقح وسط تخمير السكريات المحضر (فقرة 3-2-4-2-3) ببكتريا حديثة النمو بعمر 24 ساعة وتم حضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 5 أيام ، فإن تحول الوسط من اللون الأحمر إلى اللون الأصفر دلالة على حدوث عملية التخمر للسكريات (Forbes *et al*., 2007) .

3-2-7-2-11 : اختبار ازاحة مجموعة الامين من الحامض الاميني فينايل الأنين

أستعمل هذا الأختبار للتحري على قدرة البكتريا على إزاحة مجموعة الامين NH_2 من الحامض الاميني فينايل الأنين وتحرير Phenyl pyruvic acid وغاز الامونيا NH_3 . لُقح وسط أكار Phenyalanine المائل بالمزروع البكتيري ثم حضن بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة بعد ذلك تم إضافة من 4-5 قطرات من كاشف محلول كلوريد الحديديك Ferric chloride بتركيز 10% على سطح الوسط مع تحريك الانبوبة بصورة دائرية لكي يغمر سطح الوسط بالكاشف فإن تغير لون الوسط إلى الأخضر يدل على ان النتيجة موجبة (Koneman *et al*.,1997) .

3-2-7-2-12 : اختبار تحليل أنزيم الدنيز DNase enzyme test

إجري تلقيح وسط محلل الدنا بمستعمرات بكتيرية فتية بعمر 18 ساعة على شكل بقع وحضنت الأطباق في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة وبعد الحضن غمر الطبق بكاشف محلل الـ (DNA) (فقرة 3-2-3-7). ان تكون منطقة شفافة حول منطقة التلقيح بعد غمر الطبق دلالة على إيجابية الأختبار (Collee *et al*., 1996) .

3-2-7-2-13 : حفظ وادامة العزلات البكتيرية

تم تلقيح الانابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتريا المراد حفظها وحضنت في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة بعد ذلك تم حفظها بدرجة حرارة 4 م° ، وكررت عملية الحفظ لإدامة العزلات وحيويتها وتجنب حدوث التلوث (Sambrook *et al*., 1989) . تم حفظ العزلات البكتيرية لمدة طويلة بواسطة إضافة الكليسيرول بنسبة 15% إلى الوسط المغذي السائل وحفظت بدرجة حرارة -20 م° وتم تجديدها كل 6 أشهر (NCCLS , 2003) .

3-2-8 : التحري عن بعض عوامل الضراوة للعزلات قيد الدراسة مظهرياً

3-2-8-1 : اختبار إنتاج الهيمولايسين Haemolysin production test

أتبعت الطريقة الواردة في (Senior and Hughes,1988) للتحري عن قابلية البكتريا المعزولة على إنتاج أنزيم الهيمولايسين وتحديد قابلية هذا الأنزيم على تحليل فصيلة AB من الدم البشري وكما يأتي :

1- نبذ مقدار 5 مل من عينة الدم المسحوبة انياً بأستعمال أنابيب بلاستيكية معقمة حاوية على مانع تخثر الدم للتخلص من البلازما والحصول على راسب خلايا الدم الحمر .

2- غسلت الخلايا مرتين متتاليتين بالمحلول الملحي الفسلجي مع ترسيب الخلايا بالنبذ المركزي بعد كل غسل .

3- أستعملت كريات الدم الحمر بنسبة 5% لتحضير وسط اساس الدم الصلب ، زرعت العزلات بطريقة التخطيط على الوسط وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة لملاحظة قابلية العزلات البكتيرية على تحليل الدم من خلال تكوين هالة شفافة حول المستعمرات النامية .

3-2-8-2 : اختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

إجري هذا الأختبار للكشف عن قابلية البكتريا على تكوين الأغشية الحيوية ، إذْ نقلت المستعمرات النامية للبكتريا إلى أنابيب أختبار زجاجية حاوية على وسط Tryptic soy broth المضاف اليه سكر الكلوكوز بتركيز 1% وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، بعد مدة الحضن سكبت العينات وغسلت الأنابيب بمحلول الفوسفات الملحي (Phosphate Buffer Saline) ثم جففت وصبغت بالصبغة البنفسجية البلورية (Crystal Violet) لمدة 3 دقائق بعدها سكبت الصبغة الزائدة وغسلت بالماء المقطّر ووضعت الأنابيب بشكل مقلوب لتجف ، وأعتـبرت النتيجة موجبة عنـد ظهور طبقة بنفسجية في قعر الأنابيب والجدران الداخلية (O'Toole *et al*., 2000) .

3-2-8-3 : التحري عن الأسواط Detection of flagella

أستخدمت طريقة القطرة المعلقة Hanging drop للتحّري عن البكتريا الحية وحركتها وفقاً لطريقة (Kiiyukia , 2003) وكما يأتي :

1- حضر المزروع البكتيري السائل وبعمر 24 ساعة ويؤخذ منه قطرة بواسطة الناقل حيث توضع في وسط غطاء الشريحة .

2- وضع بواسطة عود خشبي معقم أربع مسحات فازلين صغيرة أو أربع قطرات ماء صغيرة حول تقعر الشريحة .

3- قلبت الشريحة المقعرة على قطرة المزروع البكتيرية على الغطاء بحيث يكون التقعر مقابلاً تماماً للقطرة ويضغط على حافات غطاء الشريحة نحو الأسفل لضمان توزيع الفازلين على الحافات .

4- قلبت الشريحة إلى وضعها الصحيح وبذلك تكون القطرة المعلقة في تقعر الشريحة ويجب ملاحظة عدم لمس القطرة لقاع التجويف .

5- ثبتت الشريحة على قاعة المجهر وتفحص بالعدسة ذات قوة التكبير الواطئ وكذلك تفحص بأستخدام العدسة ذات قوة التكبير العالي ، وعند ذلك تشاهد البكتيريا وحركتها بوضوح .

3-2-8-4- التحري عن الأهلاب Detection of fimbriae

أستخدمت طريقة تلازن خلايا الدم الحُمْر وفقاً لطريقة (Iwahi *et al.*,1983) وكما يأتي :

1- حُضرت خلايا الدم للإنسان بأخذ عينة دم بشري من صنف O^+ واضيف اليها الهيبارين لمنع تجلط الدم ، وتم ترسيبها في جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 / دقيقة ولمدة خمس دقائق .

2- غسل الراسب الحاوي على كريات الدم الحُمْر بمحلول الملح الفسلجي لثلاث مرات حيث يتم نبذ العالق بسرعة 2000 دورة / دقيقة ولمدة خمس دقائق .

3- علقت بعدها الخلايا بحجم نهائي 3% في محلول الملح الفسلجي وستعملت ايضاً لإجراء الأختبار .

4- وضعت قطرة واحدة من المحلول المحضر سابقاً مع قطرة واحدة من مزروع بكتيري عمره 24 ساعة المراد أختباره على شريحة زجاجية نظيفة ومزج الخليط بواسطة عود خشبي معقم لمدة دقيقتين . ومن ثم فحصت الشريحة مجهرياً وقرأت النتائج كالآتي الموجب عند حدوث تلازن كريات الدم الحُمْر وظهور ما يشكل مجموعات مرتبة بشكل حصيرة ، في حين اعتبرت سالبة عند عدم حدوث تلازن كريات الدم الحُمْر وظهورها بشكل مفرد .

5- إجريت تجربة سيطرة مع كل عزلة إذْ حضرت شريحتان زجاجيتان ووُضع في الأولى عالق بكتيري مع المحلول الملحي الفسلجي ، فيما وضع عالق كريات الدم الحُمْر مع المحلول الملحي الفسلجي في الشريحة الثانية لملاحظة اي تلازن ذاتي ممكن ان يحدث .

9-2-3 : التشخيص بنظام API 20 E Analytical profile index

لتشخيص العزلات البكتيرية بوساطة هذا النظام فقد اتبعت تعليمات الشركة المصنعة (Biomerieux) .

10-2-3 : التحري عن إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز

Detection of β-Lactamase production

A : التحري عن البيتالاكتاميز بطريقة اليود السريعة

أستعملت الطريقة الواردة في (WHO , 2003) وكما يأتي :

1- حضرت مزارع بكتيرية بعمر 24 ساعة منماة على وسط أساس الدم الصلب ووسط أساس الماكونكي الصلب .

2- تم نقل عدد من المستعمرات بواسطة العروة إلى حفرة من حفر Microtiter plate الحاوية على 100 مايكروليتر من البنسلين وخلطت جيداً مع المحلول ، وبعدها حضنت لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة 37 م° .

3- أضيف 50 مايكروليتر من محلول النشأ (فقرة 3-2-2-6) ، ومزج جيداً مع محتويات الحفرة .

4- أضيف 20 مايكروليتر من محلول اليود (فقرة 3-2-2-6) ،إذْ تنتج لوناً ازرق غامقاً من تفاعل اليود مع النشا .

5- عدت النتيجة موجبة عند حصول تغير لوني وسريع من الأزرق الغامق إلى الأبيض بعد مرور أقل من دقيقة على اضافة الكواشف .

6- إجريت تجربة السيطرة السالبة بإتباع الخطوات السابقة ، ولكن بدون آستخدام المستعمرات البكتيرية.

B : التحري عن البيتالاكتاميز بطريقة أقراص النايتروسفين

1- تم ترطيب قرص النايتروسفين بقطرة من المحلول الملحي الفسلجي المعقم (Normal saline) حيث يتغير لون القرص من الأبيض إلى الأصفر .

2- نقلت مستعمرة بواسطة الـ Loop من وسط مولرهنتون بعمر 24 ساعة ووضعت على قرص النايتروسفين .

3- احتسبت النتيجة الموجبة عند تغير لون القرص من الأصفر إلى الأحمر وفي حالة النتيجة السالبة بقى اللون أصفر(Kilie and Yalinay , 2006) .

3-2-11 : اختبار مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية

3-2-11-1 : طريقة الانتشار بالأقراص Disk diffussion method

أختبرت الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بطريقة الاقراص أعتماداً على طريقة Bauer وجماعته (1966) ، إذْ نقل 2-4 مستعمرة من بكتريا *P.mirabilis* إلى أنبوبة أختبار حاوية على 5 مل من الوسط المغذي السائل ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 18 ساعة . خفف النمو الحاصل بأستعمال المحلول الملحي الفسلجي (فقرة3-2-2-1) وقورن النمو مع أنبوبة ماكفرلاند 0.5 القياسية ، وغمست المسحة القطنية بالوسط الزرعي المخفف وتم نشر البكتريا على وسط مولرهنتون الصلب بطريقة التخطيط وبعدة اتجاهات للتأكد من نشر البكتريا المراد أختبار حساسيتها بالتساوي ، ثم وضعت أقراص المضادات الحياتية على سطح الوسط . وحضنت الاطباق في درجة حرارة 37 م° لمدة 18 ساعة ، وسجلت النتائج أعتماداً على قياس قطر منطقة التثبيط المتكونة حول القرص ، وقورنت النتائج مع القيم القياسية المذكورة في (CLSI , 2012) .

3-2-11-2 : تحديد التركيز المثبط الادنى Determination of Minimal Inhibitory Concentrations

أستخدمت طريقة التخافيف المتسلسلة المضاعفة بالأكار لحساب MIC لعدد من المضادات الحياتية وبحسب ما جاء في CLSI (2012) إذْ حضرت تراكيز متسلسلة متضاعفة من المضادات الحياتية تراوحت بين 4-1024 مايكروغرام/مل لكل من المضادات الحياتية المستخدمة في هذه الدراسة . حُضر وسط مولرهنتون الصلب في قناني زجاجية معقمة ، وبمقدار 20 مل لكل قنينة بعدها عقمت بالمؤصدة وبردت إلى درجة حرارة 50 م° ثم أضيف المضاد الحياتي إلى القناني ورج جيداً ثم صبت في أطباق معقمة وحفظت في درجة حرارة 4 م° لحين الأستعمال كما حُضرت تخافيف عشرية لمزارع البكتريا بعمر 24 ساعة بأستعمال المحلول الملحي الفسلجي (فقرة 3-2-2-1) المعقم ثم سحب 4 مايكروليتر من التخافيف الخاصة بالبكتريا بواسطة ماصة دقيقة ولُقحت الأطباق الحاوية على التراكيز المختلفة من المضادات الحياتية ، ثم تركت الأطباق لمدة في درجة حرارة المختبر لكي تجف القطرات قبل ان تقلب الأطباق ، ثم وضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة ، بعدها احتسب التركيز المثبط الادنى (MIC) على انه أقل تركيزاً من المضاد الذي يمنع ظهور نمو البكتريا واضحاً .

3-2-12- أستخلاص الحامض النووي البكتيري Bacterial genomic DNA extraction

تم إجراء أستخلاص الحامض النووي DNA من بكتريا *P. mirabilis* وذلك بآستخدام عدة الـ (Genomic DNA extraction kit) المجهزة من شركة Geneaid الأمريكية ، وتم إجراء الاستخلاص بحسب تعليمات الشركة كآلاتي:

1- تم نقل 1مل عالق من كل عزلة من بكتريا *P.mirabilis* النامية على وسط مرق نقيع القلب والدماغ ، ووضعت في أنابيب أبندروف قياس 1.5 مل معقمة وبعدها نقلت النجهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة وذلك لجمع الخلايا البكتيرية ثم التخلص من السائل الطافي.

2- أضيف 200 ميكروليتر من محلول أنزيم اللايسوزايم Lysozyme buffer (20 ملغم/مل) وبعدها مزج الخليط بواسطة المازج vortex لمدة 5 ثوانٍ.

3- حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق وخلال مدة الحضن تم تقليب الأنابيب لضمان تحليل كامل للخلايا في المزيج.

4- تم إضافة 200 ميكروليتر من محلول GB Buffer المجهز من العدة الى مزيج الخلايا المتحللة ومزج جيداً بواسطة المازج vortex لمدة 5 ثوانٍ.

5- حضن المزيج بدرجة حراره 60 م° لمدة 10 دقيقة بآستخدام الحمام المائي.

6- تم إضافة 200 ميكروليتر من الكحول الأثيلي المطلق إلى المزيج المتحلل ومزج الخليط جيداً بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثوانٍ.

7- تم نقل الخليط من أنبوبة أبندروف إلى أنابيب جمع collection tubes قياس 2 مل الحاوية على أعمدة تحوي مصفى لتنقية الحمض النووي GD filter colum والمجهزة مع العدة.

8- وضعت أنابيب الجمع مع الأعمدة الحاوية على خليط في جهاز الطرد المركزي ودورت بسرعة 15000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة للتخلص من نواتج الخلايا المتحللة.

9- تم التخلص من المحلول الراسب للخلايا المتحللة ونقل الـ GD colum الحاوي على الحامض النووي الى أنبوبة جمع collection tube جديدة.

10- تم إضافة 400 ميكروليتر من محلول الـ W1 Buffer المجهز مع العدة الى العمود الحاوي على المصفى لغسل الحامض النووي ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 دورة/دقيقة لمدة 30 ثانية.

11- تم التخلص من الراسب وبعد ذلك أضيف 600 ميكروليتر من محلول الغسل الحاوي على الكحول الأثيلي المطلق Wash buffer المجهزة مع العدة الى العمود الحاوي على الحامض

النووي للتخلّص من الدهون داخل العمود ، ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 دورة/دقيقة لمدة 30 ثانية.

12- تم التخلّص من الراسب وأعيدت الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي مرة ثانية لتجفيف الأعمدة بسرعة 15000 دورة/دقيقة لمدة 3 دقائق.

13- تم نقل الأعمدة الحاوية على الحامض النووي إلى أنابيب أبندروف معقمة وأضيف 50 ميكروليتر من محلول الاذابة Elution Buffer المجهز مع العدة إلى وسط العمود وترك لمدة 5 دقائق وبعدها وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 دورة/دقيقة لمدة 30 ثانية لإذابة الحامض النووي ، وحفظ بدرجة حراره -20 م° لحين إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة.

3-2-13- فحص تفاعل سلسلة أنزيم البلمرة Polymerase chain reaction (PCR)

تم إجراء فحص تفاعل سلسلة أنزيم البلمرة ، وذلك للتشخيص التأكيدي لبكتريا *P.mirabilis* وكذلك التحري عن جينات المقاومة للمضادات الحياتية من نوع Aminoglycosides وبحسب طريقة (Michalska) وجماعتهُ (2014a) ، وكذلك التحّري عن جينات الضراوة في بكتريا *P.mirabilis* .

3-2-14- فحص الحامض النووي المستخلص DNA examination

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

1- بعد تشغيل جها ز Nanodrop تم أختيار برنامج قياس الحامض النووي نوع DNA .

2- يتم تصفير ركيزة المقياس مرتين وذلك بوضع 2 مايكروليتر من (ddH_2O) بآستخدام ميكروبايبيت معقمة على سطح ركيزة المقياس وإجراء التصفير وبعدها نقوم بتنظيف الركيزة بآستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز .

3- وضع 1 ميكروليتر من كل عينة من الـ DNA المستخلص على ركيزة مقياس الجهاز ومن ثم ضغط زر OK لبدء عملية قياس تركيز الـ DNA ومن ثم نقوم بتنظيف مرة أخرى لقياس العينة الأخرى.

4- تم تحديد نقاوة عينات الـ DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجبين (260/280 nm) إذْ ان الحامض النووي DNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

3-2-15 : تحضير مزيج تفاعل سلسلة أنزيم البلمرة PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل سلسلة أنزيم البلمرة بآستخدام عدة الـ AccuPower® PCR PreMix المجهزة من قبل شركة الـ Bioneer الكورية وبحسب تعليمات الشركة كالآتي :

1- تم تحضير مزيج تفاعل سلسلة انزيم البلمرة في أنابيب PCR المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة وأضيفت المكونات الأخرى لمزيج تفاعل وبحسب تعليمات الشركة .

2- بعد اكمال تحضير مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل تم غلق الأنابيب ، ومزجت بعناية بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثوانٍ.

3- نقلت الأنابيب لجهاز PCR Thermocycler لاستكمال الدورات الحرارية PCR thermocycler conditions .

3-2-16 : ظروف الدورات الحرارية PCR Thermocycler conditions

تم إجراء فحص تفاعل سلسلة انزيم البلمرة بآستخدام جهاز الـ PCR thermocycler وتم برمجة الجهاز كما في الجدول الآتي :

جدول (3-8) : مراحل تفاعل سلسلة انزيم البلمرة (PCR) في جهاز الدورات الحرارية .

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initialdenaturation	1	95°C	5min
Denaturation	30	95°C	30sec.
Annealing		(58°C)[1] (52°C)[2]	30sec
Extension		72°C	1min
Final extension	1	72°C	5min
Hold	-	4°C	Forever

1 = *16S* rRNA gene , 2 = Antibiotic resistance genes

3-2-17: الترحيل الكهربائي للهلام Gel electrophoresis

تم إجراء الترحيل الكهربائي بأستخدام هلام الأكاروز بنسبة 1.5% وذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product كما يأتي :

1- تم إذابة 1.5غم من هلام الأكاروز Agarose gel في 100 مل من الدارئ الـ TBE buffer بتركيز 1X وبأستخدام الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة 15 دقيقة.

2- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50 م° وبعدها تم إضافة 3 ميكروليتر من صبغة الحامض 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 ليتصلّب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ، ومن ثم أزيل المشط من الهلام بعناية.

4- تم عملية تحميل العينات بأستخدام صبغة التحميل Loading dye على ورق البارافلم Parafilm paper ، وذلك بإضافة 1حجم من صبغة التحميل لكل أربعة حجوم من ناتج تفاعل سلسلة أنزيم البلمرة PCR product ووضعت في حفر الهلام.

5- تم أستخدام سلم القياس DNA ladder بطول 100 زوج قاعدي لقياس ناتج الـ PCR ووضع في الحفرة الأولى.

6- بعد اكتمال عملية التحميل تم غمر هلام الأكاروز بأستخدام دارئ TBE Buffer بتركيز 1X وغلق غطاء جهاز الترحيل ، وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل بأستخدام قوة كهربائية 100فولت وتيار 80 ملي امبير لمدة ساعة واحدة.

7- بعد انتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج PCR بأستخدام مصدر الأشعة فوق البنفسجية U.V Transilluminator لتحديد الناتج مقارنة مع المَعلّمة الجزئية.

3-2-18: تحييد البلازميد Plasmid Curing

أتبعت الطريقة الواردة في (Trevors,1986) في تحييد البلازميد ، وكما يأتي :

1- تم تنمية العزلات في وسط نقيع القلب والدماغ السائل ، وحضنت بدرجة حرارة 37 م° في حاضنة هزازة لمدة 24 ساعة.

2- حضرت تراكيز متسلسلة متصاعدة من مادة SDS بأستخدام المحلول الخزين في أنابيب حاوية على وسط نقيع القلب والدماغ السائل شملت هذه التراكيز (0.5, 1 , 2 , 3 ,4 , 5, 6

, 7 , 8 , 9 , 10)% . تم نقل 100 مايكروليتر من كل مزروع بكتيري الى هذه الأنابيب وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة في حاضنة هزازة.

3- حضرت تخافيف عشرية متسلسلة من 10^{-4} إلى 10^{-7} للعزلات المعاملة بـ SDS وعزلات السيطرة غير المعاملة بأستخدام وسط نقيع القلب والدماغ السائل المعقم . تم نشر 100 مايكروليتر من كل تخفيف على وسط أساس المغذي الصلب وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة.

4- تم التحري عن الخلايا المحيدة بإنتخاب 100 مستعمرة مفردة من المستعمرات النامية على إطباق التخفيف في الفقرة السابقة . ثم نقلت هذه المستعمرات بوساطة عيدان خشبية معقمة بعملية الالتقاط والنقل Pick and patch إلى إطباق بتري حاوية على وسط أساس مولر هنتون الخالية من المضادات الحياتية وأعتبرت هذه الأطباق أطباقا مرجعية Master plates والى إطباق بتري أخرى حاوية على نفس الوسط الزرعي مضافاً إليه المضادات الحياتية التي قاومته البكتريا قبل عملية التحييد كلٌ على حدة. وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة. إذْ يدل عدم ظهور النمو على أطباق المضادات الحياتية على فقدان البكتريا لصفة المقاومة لذلك المضاد.

5- اختبرت السلالات الناتجة عن عملية التحييد لبعض المضادات الحياتية التي قاومتها العزلة الأصلية .

6- تم استخلاص الدنا البلازميدي للسلالات الناتجة من عملية التحييد وترحيلها كهربائياً على هلام الأكاروز للتحري عن الحزم البلازميدية المفقودة .

3-2-19 : استخلاص البلازميد Plasmid Extraction

تم إجراء استخلاص الحامض النووي من بكتريا الـ *P. mirabilis* وذلك بأستخدام عدة الـ (FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit) المجهزة من شركة Favorgen الكورية ، وتم إجراء الاستخلاص بحسب تعليمات الشركة كآلاتي:

1- تم نقل 1مل عالق من كل عزلة من بكتريا *P.mirabilis* النامية على وسط مرق نقيع القلب والدماغ ووضعت في أنابيب أبندروف قياس 1.5 مل معقمة وبعدها نقلت إلى جهاز الطرد المركزي بسرعة xg15000 لمدة دقيقة ، وذلك لجمع الخلايا البكتيرية ثم التخلص من السائل الطافي.

2- أضيف 250 ميكروليتر من محلول FAPD1 Buffer (RNase A) (20mg/ml) وبعدها مزج الخليط بواسطة المازج vortex لمدة 5 ثوانٍ.

3- أضيف 250 ميكروليتر من محلول FAPD2 Buffer وبعدها مزج الخليط بواسطة المازج vortex لمدة 5 ثوانٍ.

4- حُضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة (2-5) دقيقة وخلال مدة الحضن تم تقليب الأنابيب لضمان تحليل كامل للخلايا في المزيج.

5- أضيف 350 ميكروليتر من محلول FAPD3 Buffer وبعدها مزج الخليط بواسطة المازج vortex لمدة 5 ثوانٍ.

6- وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي ودورت بسرعة xg18000 لمدة دقيقة للتخلّص من نواتج الخلايا المتحللة.

7- نقل السائل الطافي إلى أنابيب جمع collection tubes قياس 2 مل الحاوية على أعمدة تحوي مصفى لتنقية الحامض النووي FAPD Colum والمجهزة مع العدة.

8- وضعت أنابيب الجمع مع الأعمدة الحاوية على خليط في جهاز الطرد المركزي ودورت بسرعة xg11000 لمدة دقيقة للتخلّص من نواتج الخلايا المتحللة.

9- تم التخلص من المحلول الراسب للخلايا المتحللة ونقل الـ FAPD Colum الحاوي على الحامض النووي إلى أنبوبة جمع collection tube جديدة.

10- تم إضافة 400 ميكروليتر من محلول الـ W1 Buffer المجهز مع العدة إلى العمود الحاوي لغسل الحامض النووي ، ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة xg15000 لمدة 30 ثانية.

11- تم التخلص من الراسب وبعد ذلك أضيف 600 ميكروليتر من محلول الغسل الحاوي على الكحول الأثيلي المطلق buffer Wash المجهز مع العدة إلى العمود الحاوي على الحامض النووي للتخلّص من الدهون داخل العمود ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة xg11000 لمدة 30 ثانية.

12- تم التخلص من الراسب واعيدت الأنابيب الى جهاز الطرد المركزي مرة ثانية لتجفيف الأعمدة بسرعة xg11000 لمدة 3 دقائق.

13- تم نقل الأعمدة الحاوية على الحامض النووي ، أي أنابيب أبندروف معقمة واضيف 50 ميكروليتر من محلول الإذابة Elution Buffer المجهز مع العدة الى وسط العمود ، وترك لمدة 5 دقائق ، وبعدها وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة xg11000 لمدة 30 ثانية لإذابة الحامض النووي ، وحفظ بدرجة حرارة -20 م° لحين إجراء الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز كما مبين في الطريقة المذكورة آنفاً.

20-2-3 : تسلسل الحامض النووي DNA sequencing

تمَّ إرسال 10 عينات من نواتج التفاعل للجين *16S* rRNA لإجراء التشخيص التأكيدي لبعض عزلات بكتريا *P. mirabilis* وذلك من خلال إجراء تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis للجين *16S* rRNA gene، وكذلك إجراء التسجيل العالمي في موقع بنك الجينات NCBI-Genbank حيث في البداية تم إجراء تفاعل الـ PCR البالغ طوله (532bp PCR product) إرسال ناتج تفاعل PCR إلى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية وذلك لإجراء تسلسل الحامض النووي بأستخدام جهاز AB DNA sequencing system وتم أستلام تتابعات العزلات المرسلة عبر تقرير الشركة آنفة الذكر .

إجري التحليل الجيني بأستخدام برنامج Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 (Mega 6.0) وكذلك موقع NCBI-BLAST وتم التسجيل العالمي بأستخدام NCBI-GenBank submission (Bankit submission tool) .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results

and Discussion

4 : النتائج والمناقشة

1-4 : العزل والتشخيص لبكتريا *Proteus mirabilis*

عزلت وشخصت 64 عزلة بنسبة (9.84%) عائدة لنوع *P.mirabilis* من مجموع 650 عينة وكما موضح (جدول 4-1) الذي يظهر نتائج العزل لبكتريا *P.mirabilis* وان أعلى نسبة تم الحصول عليها كانت من عينات الإدرار ، إذْ بلغت (12.8%) تليها عينات الأذن الوسطى بنسبة (9.18%) وثم عينات أعلى عنق الرحم وبطانة الرحم بنسبة (8.88%) وعينات الجروح والحروق بنسبة (7.5%) و (4.7%) كما ذُكر سابقاً.

جدول (4-1) : توزيع عزلات *P.mirabilis* بحسب نوع العينة ونسبتها.

ت	العينات	عدد العينات	عدد عزلات *P.mirabilis*	النسبة المئوية (%)
1	الإدرار	250	32	12.8
2	الأذن الوسطى	185	17	9.18
3	الجروح	40	3	7.5
4	الحروق	85	4	4.7
5	أعلى عنق الرحم وبطانة الرحم	90	8	8.88
6	المجموع	650	64	9.84

وعند مقارنة نتائج الدراسة الحالية مع ما سبقتها من الدراسات نجد ان نسبة الإصابة بخمج المسالك البولية التي كانت في هذه الدراسة بنسبة (12.8%) وكانت هذه النتيجة مقاربة مع دراسة كلاً من كاظم (2005) وكاظم وخلف (2012) إذْ كانت نسبة عزل بكتريا *P.mirabilis* من خمج المسالك البولية (11.85%) بينما حصل الدباغ (2000) على نسبة عزل لهذه البكتريا (17.3%) وكذلك وجد الجبوري (2000) ان نسبة الإصابة بهذه البكتريا هو (17.6%) من حالات أخماج المسالك البولية وكانت نسبة عزل *P.mirabilis* أعلى من نسبة عزل *P.vulgaris* (1.6%) وهذه النتيجة بديهية جداً . إذْ ان عزل بكتريا *P.mirabilis* من العينات السريرية أكثر شيوعاً من عزل بكتريا *P.vulgaris* والتي عادةً ما تعزل من الاشخاص المثبطين مناعياً كمرض الايدز والسرطان والاشخاص مستخدمي المضادات الحياتية لمدة طويلة (Konman *et al*.,1997) .

وجد ياسين (2005) ان نسبة الإصابة بهذه البكتريا (19%) من بين المسببات الأخرى المعزولة وكذلك طعمة (2006) ان نسبة عزل بكتريا *P.mirabilis* (18%) ، في حين ان دراسة Khurana وجماعته (2002) و Hassan (2008) التي أجراها في مدينة الناصرية و Hussien (2013) التي أجراها في مدينة النجف ، وعلي (2015) فكانت النسب المئوية لعزل هذه البكتريا هي (33.3%) و (48.8%) و (26.3%) و (28.82%) كما ذُكر سابقاً ، وهذه النتائج لا تتفق مع الدراسة الحالية وقد يكون سبب الأختلاف في نسب العزل لهذه البكتريا هو عدد العينات والمستشفيات المشمولة في الدراسة وكذلك طريقة جمع العينة ومدتها .

وجدت الدراسة الحالية ان نسبة خمج الأذن الوسطى (9.18%) وهذه النتيجة مقاربة لدراسة السعدي (2001) الذي لاحظ ان نسبة خمج الأذن الوسطى الناتج عن بكتريا *P.mirabilis* في مدينتي بغداد وديالى من بين العزلات البكتيرية هي (13.7%) وايضاً مقاربة لدراسة سلمان (2008) التي أظهرت ان نسبة خمج الأذن الوسطى الناتج عن بكتريا *P.mirabilis* كانت (10.4%) من بين العزلات التي تعود لجنس المتقلبات ، كما اظهرت دراسة رزوقي وجماعته (2010) بأنَّ خمج الأذن الوسطى هو أحد الامراض المهمة التي تصيب الفئات العمرية كافة لكلا الجنسين واظهرت نتائجه بأن بكتريا *P.aeruginosa* كانت المسبب الاكثر شيوعاً في خمج الأذن الوسطى وتليها بالمرتبة الثانية *P.mirabilis* وكانت نسبة الخمج بهذه البكتريا (17.64%) وجاءت متقاربة مع نسبة الخمج في الدراسة الحالية ، ايضاً مقاربة مع نتائج الدراسة التي أجراها Al-Duliami وجماعته (2011) على مرضى أخماج الأذن الوسطى في مستشفى بعقوبة ، إذْ بلغت نسبة عزل بكتريا .*Proteus* spp هي (12.9%) وكانت لبكتريا *P.mirabilis* النسبة الاكبر والتي بلغت (10.4%)، وكذلك مقاربة لنتائج الدراسة التي أجراها كلاً من Almalki (2011) في مستشفى الحبوبي لمحافظة ذي قار والعزاوي وجماعته (2015) على المرضى المصابين بخمج الأذن الوسطى القيحي المزمن والتي بلغت نسبة توافر بكتريا *P.mirabilis* فيها (7%). في حين اشار Tong (2001) إلى دور الفيروسات الموجودة في تجويف البلعوم الانفي (Nasopharynx) في أخماج الأذن الوسطى الحاد وأخماج الجهاز التنفسي الأخرى ، أو قد يعود السبب في عدم ظهور النمو الجرثومي لهذه المسحات إلى تناول المريض للمضادات الحياتية قبل جمع النموذج ، أذ وجد Kuczkowsk وجماعته (2004) ان المسحات المأخوذة من خمج الأذن الوسطى التي كانت سالبة للزرع البكتيري ، ربما يكون أكثر من سبب لتلك النتيجة منها ان تلك الأخماج ناتجة عن إصابات فيروسية أو فطرية ، وكذلك وجد Pajor وجماعته (2006) ان (11.4%) من

المسحات المأخوذة من (228) مريضاً يعانون من خمج الأذن الوسطى كانت بسبب الفطريات ، في حين وجدت الدراسة التي أجراها Shamsuddeen وجماعته (2010) على المرضى الوافدين إلى آستشارية الأنف والأذن والحنجرة في مدينة كانو في اليابان وكانت نسبة الخمج ببكتريا *P.mirabilis* (25.53%) ، وقد يكون سبب الآختلاف في نسب العزل لهذه البكتريا هو آختلاف البيئة التي أجريت فيها الدراسة .

أوجدت نتائج الدراسة الحالية ان نسبة الخمج في القناة التناسلية الانثوية (8.88%) ، حيث اشار Delzelle و Lefevre (2000) ان قصر الاحليل عند النساء إلى جانب توافر الدفء والرطوبة والتي تعد من العوامل المهمة في تكاثر الجراثيم ، إلى جانب ذلك ان بكتريا *P.mirabilis* تعد من البكتريا المتواجدة بشكل طبيعي في القناة المعوية والتي عند انتقالها إلى منطقة الاحليل والمهبل تؤدي إلى حدوث خمج المسالك البولية والتناسلية والتي تعد من الممرضات الانتهازية عند توفر الفرصة الملائمة لها وتسبب ايضاً خمج القناة التناسلية ، وهذا ما أكده Sim وجماعته (2006) بأن أخماج المهبل من أكثر أخماج القناة التناسلية الانثوية GTI شيوعاً عند النساء في سن الاخصاب إذ تنتشر الإصابات المهبلية المصحوبة بإفرازات مرضية غير طبيعية تسبب الألم والرائحة والحكة والحرقة والحمى وان سبب هذه الافرازات وجود أخماج داخلية في الجهاز التناسلي . جاءت الدراسة الحالية مقاربة لنتائج دراسة كلاً من خلف وكاظم (2009) و AL-thwani و Mohamed (2010) وعباس وكاظم (2014) إذ بلغت نسبة عزل هذه البكتريا من النساء (7.51%) و (5%) و (7.63%) كما ذُكر سابقاً .

أظهرت النتائج للدراسة الحالية ان نسبة الإصابة ببكتريا *P.mirabilis* لدى مرضى الجروح (7.5%) وكانت هذه النتيجة مقاربة مع نتيجة الدراسة التي أجراها Hamoshi (2004) في المستشفى التعليمي في محافظة أربيل على مرضى الجروح ، وكانت نسبة الإصابة بهذه البكتريا (8.71%) ، في حين كانت نتائج الدراسة التي توصل اليها كلاً من Mordi و Momoh (2009) على مرضى الجروح في المستشفى التعليمي لجامعة Benin في نيجيريا والعزاوي وجماعته (2015) في مدينة المقدادية كانت مغايرة للدراسة الحالية إذْ حصلت على نسبة (24.24%) و (26.8%) كما ذُكر سابقاً ، قد يكون سبب الآختلاف في نسب العزل لهذه البكتريا هو الموقع الجغرافي وعدد العينات وطريقة جمعها .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان نسبة الإصابة ببكتريا *P.mirabilis* لدى مرضى الحروق هي (4.7%) ، وكانت هذه النتيجة مقاربة مع نتيجة الدراسة التي أجريت من قبل كلاً من Alwan وجماعته (2011) كانت نسبة العزل لهذه البكتريا من بين العزلات البكتيرية

لمرضى الحروق في المستشفى التعليمي لكلية طب الكندي (4.44%) و Saxena وجماعته (2013) على مرضى الحروق وكانت نسبة الخمج بهذه البكتريا (3.7%) ، في حين كانت نتائج دراسة كلاً من AL-Taie وجماعته (2007) والتي أجريت في مدينة الموصل على المرضى المصابين بالحروق والعزاوي وجماعته (2015) في مدينة المقدادية إذ بلغت نسبة الإصابة بهذه البكتريا (22%) و (23.91%) كما ذُكر سابقاً ، قد يعود سبب الأختلاف في نسب العزل أختلاف طرائق جمع العينات وأختلاف مكان الجمع وزمانهُ وأختلاف طرائق عزل البكتريا إلى جانب ذلك وصفها لا تتوافر كنبيت طبيعي في موقع الإصابة لأخماج الجروح والحروق .

2-4 : الخصائص المظهرية والزرعية

شخصت 64 عزلة بكتيرية في هذه الدراسة بالآعتماد على الصفات المظهرية والزرعية وقد أعتمدت ظاهرة الانثيال Swarming على وسط اساس الدم الصلب التي تعد صفه تشخيصية أولية لبكتريا *P.mirabilis* بالإضافة إلى رائحة النمو البكتيري التي تكون كرائحة السمك المتعفن على الوسط وكذلك تم الحصول على مستعمرات مفردة شاحبة اللون ومتوسطة الحجم ذات حافات ملساء وغير مخمرة لسكر اللاكتوز عند تنميتها على وسط اساس الماكونكي الصلب وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره O'hara (2000) و Dharmadhikari وجماعته (2009) و AL-Bassam و AL-Kazaz (2013) ، وبعد ذلك تم تشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة على وسط أساس Chrom Agar الصلب الذي يعّد وسطاً تشخيصياً للبكتريا بالأعتماد على لون البكتريا وظهرت بكتريا *P.mirabilis* بشكل مستعمرات ذات لون بني ، وفيما يخص الفحص المجهري (جدول 4-2) فظهر شكل الخلايا البكتيرية المصبوغة بصبغة غرام عصوية قصيرة سالبة لصبغة غرام وغير مكونة للسبورات ، وهذا مقارب مع Holt وجماعته (1994) .

3-4 : الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

أستخدمت العديد من الفحوصات الكيموحيوية كفحوصات تكميلية للتشخيص الأولي والغرض منها تأكيد تشخيص جنس البكتريا قيد الدراسة (جدول 4-2) ، فقد أوضحت النتائج ان 64 عزلة بكتيرية أعطت فحصاً سالباً لأختبار الاوكسيديز وذلك لعدم قدرتها على إنتاج أنزيم الاوكسيديز Oxidase .

اما أختبار الكاتاليز فقد بينت النتائج قدرة 64 عزلة بكتيرية على إنتاج أنزيم الكاتاليز Catalase ، إذْ تميزت بظهور فقاعات هوائية على سطح الشريحة الزجاجية الحاوية على

البكتريا عند إضافة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ، اما ٱختبار اليوريز فأوضحت نتائج هذه الدراسة جميع العزلات البكتيرية قدرتها على إنتاج أنزيم اليوريز Urease بدليل تغير لون وسط اليوريا من اللون الأصفر إلى اللون الوردي .

اما بالنسبة لٱختبار الاندول ، فأظهرت جميع العزلات البكتيرية قيد الدراسة عدم إنتاجها لحلقة الاندول إذْ ان النتيجة الموجبة للٱختبار تؤدي إلى تكون حلقة حمراء نتيجة تحلل الحامض الاميني (التربتوفان) وتحوله إلى الاندول ويستخدم هذا الفحص للتمييز بين جنسي *P.mirabilis* وبقية أنواع جنس المتقلبات.

كما أعطيت العزلات البكتيرية المشخصة فحصاً موجباً لٱختبار أحمر المثيل ، وهذا دليل على قدرة البكتريا على تحليل سكر الكلوكوز، في حين كانت النتيجة سالبة عند إجراء آختبار فوكس- بروسكار (VP) وهذا يدّل على عدم قدرة البكتريا على تكوين المرّكب المتعادل Acetyl- methyl carbinol من التحلل الجزئي للسكر .

كما أظهرت جميع العزلات البكتيرية نتيجة موجبة لٱختبار ٱستهلاك السترات بوصفه المصدر الوحيد للكاربون إذ لوحظ تغير لون الوسط من الأخضر إلى اللون الأزرق نتيجة لتغير لون البروموثايمول إلى اللون الأزرق لزيادة الأس الهيدروجيني .

أظهرت جميع عزلات بكتريا *P.mirabilis* قدرتها على تخمير كل من سكر الكلوكوز والسكروز وأعطت غازاً وراسباً اسود على الوسط مّما يدّل على قدرة البكتريا على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S .

أعطت جميع العزلات البكتيرية نتيجة موجبة لٱختبار إزاحة مجموعة الأمين من الحامض الأميني فينايل الانين وهذه النتائج مطابقة لما أكده Holt وجماعته (1994) و Collee وجماعته (1996) و El-Hakeem (2015) . كما أظهرت جميع العزلات البكتيرية نتيجة موجبة لٱختبار الجيلاتنيز دلالة على قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم الجيلاتين وهي نتيجة مطابقة لما حصل عليه الطائي (2002) وياسين (2005) .

أعطت 56 عزلة بكتيرية من أصل 64 عزلة نتيجة موجبة لٱختبار DNase ، إذ كونت هذه العزلات هالات شفافة حول المستعمرات البكتيرية ، في حين بينت دراسة خلف وكاظم (2009) بأن جميع العزلات البكتيرية موجبة لهذا الٱختبار، في حين بينت دراسة الجناحي (2013) ان 18 عزلة من أصل 20 عزلة مكونة للهالة الشفافة حول المستعمرات وكذلك بينت دراسة علي (2015) ان 32 عزلة من أصل 49 عزلة مكونة للهالة الشفافة حول المستعمرات البكتيرية .

اما بالنسبة لأختبار تخمر السكريات ، إذ أظهرت جميع العزلات نتيجة موجبة لأختبار تخمر كلاً من الكلوكوز والكالاكتوز والفركتوز وتحول لون الوسط إلى الأصفر في حين لم تخمر كل من اللاكتوز والمانوز والمالتوز وأظهرت نتيجة سالبة كما في (جدول 4-3) ، فعندما تستخدم البكتريا السكريات كمصدر للكاربون والطاقة تنتج أحماضاً عضوية مختلفة وغازات مثل CO_2 و H_2 ، هذه النتيجة مقاربة مع ما ذكرهُ Collee وجماعته (1996) ومع دراسة AL-Bassam و AL-Kazaz (2013) .

جدول (4-2) : الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية لبكتريا *P.mirabilis* .

الاختبار	النتيجة
اليوريز	+
صبغة غرام	_
الاوكسديز	_
الكاتاليز	+
الاندول	_
أحمر المثيل	+
فوكس بروسكاور	_
استهلاك السترات	+
إنتاج غاز H_2S	+
إزاحة مجموعة الأمين من الحامض الأميني فينايل الانين	+
الجيلاتينز	+
تحلل الدنيز DNase	+
النمو على وسط TSI	Acid / Alkaline

جدول (4-3) : اختبارات تخمير بعض السكريات لبكتريا *P.mirabilis* .

نوع السكر	النتيجة
الكلوكوز	+
الكالاكتوز	+
الفركتوز	+
اللاكتوز	–
المانوز	–
المالتوز	–

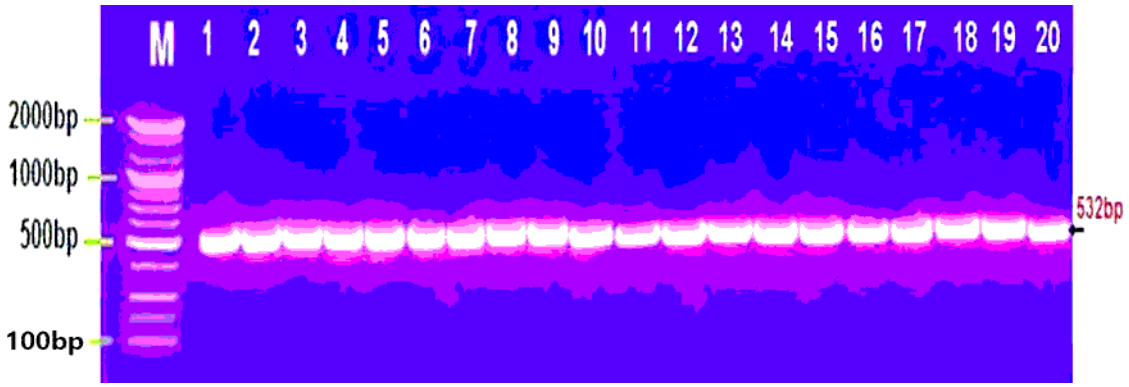
4-4 : تشخيص بكتريا *P.mirabilis* بنظام (API 20 E)

شخصت 64 عزلة لبكتريا *P.mirabilis* بآستخدام نظام التشخيص للبكتريا المعوية API 20 E إذْ يتميز هذا النظام بسرعة الكشف عن البكتريا من دون الحاجة إلى الاوساط الزرعية المتعددة وكذلك يقلل من عملية التلوث الزرعي وقد أعتمد هذا النظام للتأكد من صحة التشخيص إذْ انه يشمل جانباً من الفحوصات الكيموحيوية المهمة في تشخيص البكتريا [(الشكل 4-1) والملحق (1)] ، ويتضح من الشكل ان عزلات بكتريا *P.mirabilis* كانت موجبة لبعض اختبارات النظام وسالبة لأختبارات أخرى .

الشكل (4-1) شريط API 20 E المستخدم في تشخيص عزلات بكتريا *P.mirabilis*

5-4 : فحص تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase chain reaction

تم انتقاء 20 عزلة بكتيرية لإجراءتقنية تفاعل سلسلة البلمرة PCR ، لتشخيص بكتريا *P.mirabilis* بآستخدام الجين *16S* rRNA gene، أظهرت نتائج الدراسة الحالية آحتواء 20 عزلة بكتريا *P.mirabilis* على الجين *16S* rRNA الذي يمثل المورثة التشخيصية لهذه البكتريا (الشكل 4-2) ، إذْ استخلص الـ DNA بآستعمال العدة المستعملة لهذا الغرض وترحيله كهربائياً في هلام الاكاروز (1.5%) والكشف عنه بآستعمال صبغة الاثيديوم بروماید وفحصهُ بالأشعة فوق البنفسجية (UV) .



(الشكل 4-2) : الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز الذي يوضح نتائج بلمرة *16S* rRNA لبكتريا *P.mirabilis* ، الحفر من (1-20) عزلات البكتريا و M = المَعلّمة الجزيئية 100bp .

6-4 : تقنية تسلسل الحامض النووي DNA sequencer

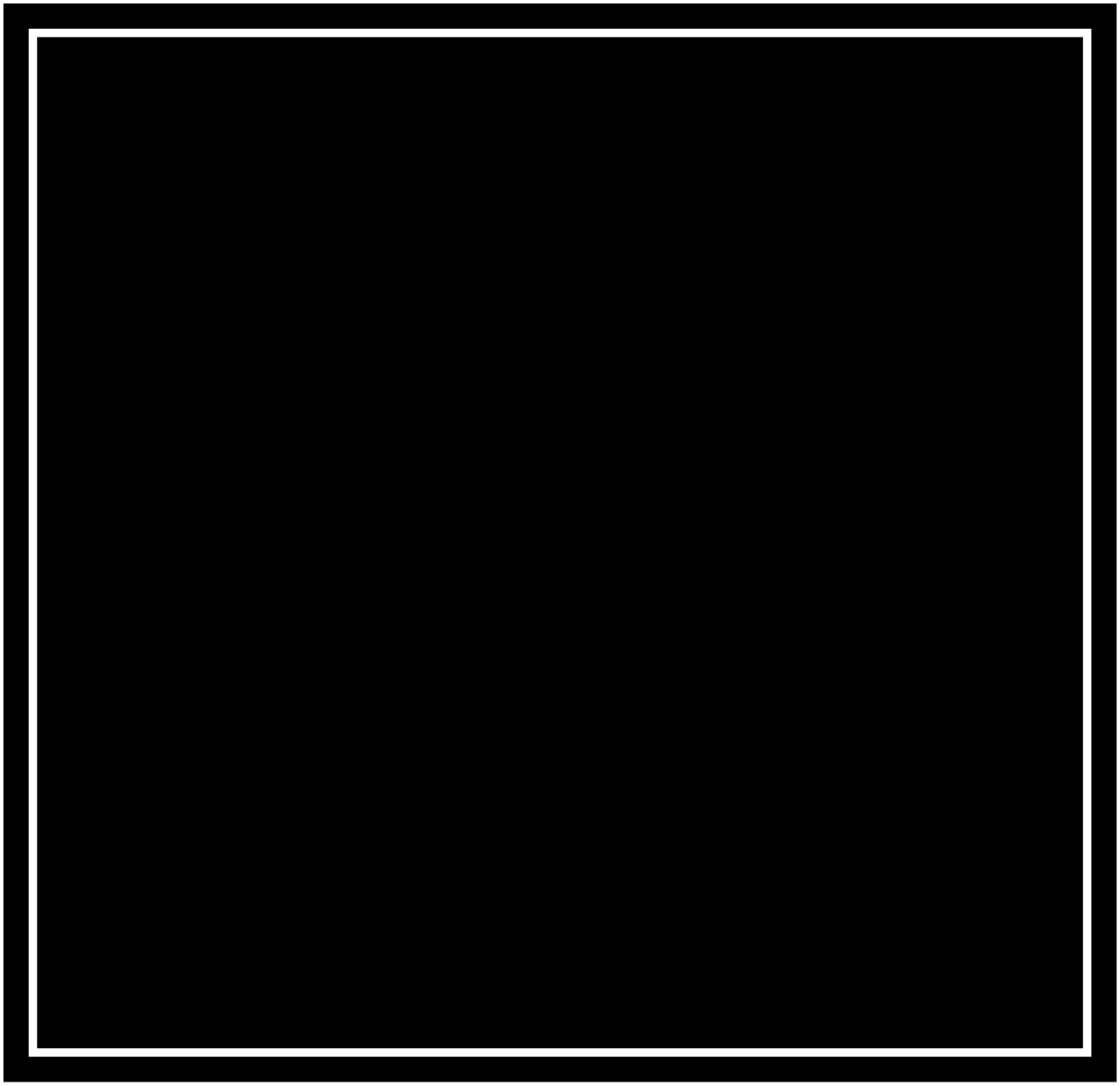
أظهرت نتائج التحليل لتسلسل الجين قيد التحليل للحامض النووي للدراسة الحالية وجود تطابق في تسلسل القواعد النتروجينية للجين *16S* rRNA بين عزلات بكتريا *P.mirabilis* المحلية وبين عزلات *P.mirabilis* العالمية المودعة في بنك الجينات(NCBI-Genebank) إذْ كانت نسبة التطابق لخمسة عـزلات (100%) والعـزلات الأخـرى بنسبة تطابق (99%) [(جدول 4-4) الملحق (2-11)] . إذْ ان نتيجة الدراسة الحالية مقاربة مع ما توصل اليه Jian-ke وجماعته (2015) إذ وجـد ان الجين *16S* rRNA الخـاص بتشخيص بكـتريا *P.mirabilis* يتطابق بنسبة أكثر من (99%) عند تحليلها بموقع NCBI-BLAST analysis ، وكذلك وجد نفس الباحث ان تحليل الشجرة الوراثية (Phylogenetic tree) للجين *16S* rRNA تطابقاً عالي جداً مع 20 سلالة من بكتريا *P.mirabilis* العالمية في بنك الجينات وكانت نسبة التطابق (98.9 - 99.7 %) وهذه مقاربة مع نتيجة تحليل الشجرة الوراثية للدراسة الحالية للجين *16S* rRNA (الشكل 4-3) إذ كانت العزلات متطابقة بنسبة (100%) لعزلة

P.mirabilis العالمية وايضاً قورنت مع أنواع نفس الجنس العالمية فهي مختلفة عن بقية أنواع جنس *Proteus* موضحة في (الشكل 4-3) .

أشار Drancort وجماعته (2000) و Petti وجماعته (2005) و El-Bakkali وجماعته (2013) ان التسلسل للجين *16S* rRNA يستخدم الان ويستند عليه في التعرف على العزلات البكتيرية المعزولة من المستشفيات والبيئات المختلفة إذْ كانت نسبة التعرف بآستخدام التسلسل للجين *16S* rRNA (93.1 %) مقارنة بالطرق الأخرى التي تحدد هوية العزلة البكتيرية إذْ كانت النسبة (60.34 %) .

جدول (4-4) يبين النسب المئوية للتحليل الجيني لجينات *16S* rRNA لعزلات بكتريا *P.mirabilis* المحلية مقارنة مع العالمية .

Local isolates and gene	Genbank accession number	NCBI-Identity (%)
P. mirabilis **isolate No.1 (*16S* rRNA) gene**	**MF682437**	**100%**
P. mirabilis **isolate No.2 (*16S* rRNA) gene**	**MF682438**	**99%**
P. mirabilis **isolate No.3 (*16S* rRNA) gene**	**MF682439**	**100%**
P. mirabilis **isolate No.4 (*16S* rRNA) gene**	**MF682440**	**99%**
P. mirabilis **isolate No.5 (*16S* rRNA) gene**	**MF682441**	**100%**
P. mirabilis **isolate No.6 (*16S* rRNA) gene**	**MF682442**	**100%**
P. mirabilis **isolate No.7 (*16S* rRNA) gene**	**MF682443**	**100%**
P. mirabilis **isolate No.8 (*16S* rRNA) gene**	**MF682444**	**99%**
P. mirabilis **isolate No.9 (*16S* rRNA) gene**	**MF682445**	**99%**
P. mirabilis **isolate No.10 (*16S* rRNA) gene**	**MF682446**	**99%**



(الشكل 4-3) تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis باستخدام برنامج (MEGA6) من نوع (UPGMA tree) لتسلسل الجين *16S* rRNA لعزلات بكتريا *P.mirabilis*

7-4 : التحّري عن أنزيمات البيتالاكتاميز Detection of β-Lactmase production

تم الكشف عن العزلات المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز لـ 64 عزلة لبكتريا *P.mirabilis* قيد الدراسة ، وآعتمد على طريقتين هي طريقة اليود السريعة وطريقة قرص النايتروسفين ، إذْ استخدمت طريقة اليود لأنها تعطي مسحاً أولياً شاملاً لجميع أنواع أنزيمات البيتالاكتام المنتجة من العزلات كما أنها تعد الطريقة السريعة في إعطاء النتائج ، إذْ تعتمد على أساس الكشف عن مركبي حامض البنسلونك وحامض السيفالوسبورونك لكل من البنسلينات

والسيفالوسبورينات ، إذْ يستخدم Penicillin G كأساس للفحص إذْ يتفاعل اليود مع النشأ وتكوين معقد بنفسجي غامق اللون والذي يبقى بدون تغير في حالة عدم افراز البيتالاكتاميز وهذا دلالة على عدم إنتاج الأنزيم اما في حالة إنتاج الأنزيم فإن الحامض المتكون يقوم باختزال اليود إلى اليوديد الذي لا يتمكن من التفاعل مع النشأ وتكوين المعقد البنفسجي اللون لذا يتحول مباشرة إلى اللون الأبيض وهذا دليل على النتيجة الموجبة (Bush *et al*., 1995 ; الموسوي 2000) ، واظهرت النتائج ان قابلية جميع عزلات *P.mirabilis* على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز بنسبة (100%) ونتائج الدراسة الحالية تتفق مع ما توصل اليه كلاً من كاظم (2005) والجنابي (2013) إذْ وجـدوا ان عـزلات بكـتريا *P.mirabilis* كانت منتجة لهذه الأنزيمات بنسبة (100%) ، وايضاً مقاربة الدراسة الحالية مع ما توصل اليه العزاوي وجماعته (2015) بأن هذه البكتريا تنتج أنزيمات البيتالاكتاميز بنسبة (91.89 %) ، حيث كانت نسبة الدراسة الحالية أعلى من نسبة كلاً من أسماعيل (2004) والموسوي (2006) والسراج (2007) و (2013) AL-Autbi إذ بلغت نسبة إنتاج الأنزيمات بين عزلاتهم (46.77%) و (60%) و (75%) و (55.55%) كما ذُكر سابقاً. ومن الملاحظ ان ارتفاع نسبة إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز مقارنة بالدراسات المذكورة آنفاً ربما يعزى إلى تغيير بروتينات الغشاء الخارجي بوصفها خطوة لتغيير موقع الهدف وتغيير في حاجز النفاذية وهذه تعد من طرائق المقاومة لمضادات البيتالاكتام ، ولذلك لا يعّد إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز الطريقة الوحيدة للمقاومة وان ظهور نتيجة سالبة لعدد من العزلات لفحص البيتالاكتاميز ومقاومتها لمضاد واحد أو أكثر دليل على امتلاكها لآليات المقاومة المختلفة .

وفيما يخص آختبار قرص النايتروسفين ، فأظهرت الدراسة الحالية أن جميع العزلات البكتيرية أعطت نتيجة موجبة بنسبة (100%) من خلال تغير لون قرص النايتروسفين من اللون الأصفر إلى اللون الأحمر ، وآتفقت نتائجنا مع ما توصل اليه Campos وجماعته (2004) بأن جميع العزلات البكتيرية المعزولة في دراسته أنتجت أنزيمات البيتالاكتام .

4-8 : اختبار مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية

4-8-1 : طريقة الأقراص

أظهرت النتائج المبينة في (جدول 4-5) ان 64 عزلة لبكتريا *P.mirabilis* لها مقاومة تامة بلغت (100%) لكل من مضاد Penicillin و Amoxicillin / Clavulanic acid وكانت نسبة المقاومة مقاربة مع العبيدي (2006) والجناحي (2013) وعلي (2015) ومرتفعة

قليلاً عن AL-Muhannak (2010) التي بلغت (90.4 %) ، في حين كانت دراسة كلاً من والنعيمي (2002) التي كانت نسبة المقاومة لمضاد Penicillin بلغت (88.2%) وهي أقل من نسبة المقاومة للدراسة الحالية و AL-Autbi (2013) التي كانت نسبة المقاومة للمضاد السابق نفسه هي (77.77%) والعــزاوي وجماعتـه (2015) التي كـانت نسـبة المقاومة لمضاد Amoxicillin / Clavulanic acid (83.8%) ، قد يعود سبب الأختلاف في هذه النسب لامتلاك العزلات البكتيرية لأنزيمات البيتالاكتاميز .

اما بالنسبة لمضادات السيفالوسبورينات المتمثلة بـ Cefotaxime فقد بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد في الدراسة الحالية (86%)، وكانت مقاربة لدراسة كلاً من Felego وجماعته (2010) فبلغت (70%) من عزلات بكتريا *P.mirabilis* وكانت مقاومة لمضاد Cefotaxime ، و Abdulghani (2012) فبلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد (83%) ، في حين جاءت نسبة المقاومة لهذا المضاد في دراستنا أقل من المقاومة التي توصل اليها كل من Khalaf و Kadhum (2009) و AL-Autbi (2013) والعزاوي وجماعته (2015) إذْ كانت نسبة المقاومة هي (100%) ، لكن جاءت نسبة المقاومة في دراستنا أعلى من المقاومة التي توصل اليها كل من Mishra وجماعته (2001) وياسين (2005) و AL-Bassam و AL-Kazaz (2013) وعلي (2015) إذْ كانت نسبهم (30%) و (28.75%) و (35%) و (61.22%) كما ذُكر سابقاً . كما أظهر المضاد Cephalexin في الدراسة الحالية نسبة المقاومة (90.62%) ، وكانت هذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه ياسين (2005) والجناحي (2013) إذْ كانت نسبهم (100%) و (80%) كما ذُكر سابقاً ، في حين جاءت نسبة المقاومة لهذا المضاد في دراستنا أعلى من المقاومة التي توصل اليها كل من خورشيد (2005) وعلي (2015) إذْ قاومت عزلاتهما هذا المضاد بنسبة (70%) و (42.85%) كما ذُكر سابقاً ، قد لا تقتصر مقاومة مضادات السيفالوسبورينات على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز وانما هنالك طرائق أخرى تتضمن تغيير نفاذية غشاء الخلية للمضاد ، وهذا بدوره يؤدي إلى صعوبة مرور المضاد ووصوله إلى موقع الهدف وهذه الآلية خاصة بالبكتريا السالبة لصبغة غرام إذْ يحتوي الغشاء الخارجي للبكتريا على قنوات بروتينية تدعى البورينات التي تعمل على منع دخول المضاد ووصوله إلى داخل الخلية البكتيرية (Spanu *et al.*, 2002) .

اما بالنسبة لمضادات الكاربينيم المتمثلة بـ Impenem فبلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد في الدراسة الحالية (18.75%) وكانت هذه النتيجة مقاربة إلى الدراسة التي أجراها كل من AL-Bassam و AL-Kazaz (2013) والعزاوي وجماعته (2015) إذْ بلغت نسب

المقاومة لهذا المضاد (15%) و (16.2%) كما ذُكر سابقاً ، وتختلف نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه كلاً من سلمان (2008) إذْ كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد (58%) و AL-Khateeb (2014) إذْ كانت نسبة المقاومة لنفس المضاد (25%) . كما جاءت نسبة المقاومة لمضاد Meropenem في الدراسة الحالية (15.62%) وهذه النسبة تختلف كثيراً عن النتائج المحلية حيث كانت دراسة كلاً من سلمان (2008) وعباس وكاظم (2014) ان نسب المقاومة لهذا المضاد بلغت (0%) و (41.7%) كما ذُكر سابقاً ، في حين أظهرت دراسة Battikhi و Ammar (2004) بأن نسبة حساسية العزلات البكتيرية لهذا المضاد كانت (100%) ، يعد الكاربينيم من المضادات الحياتية الاكثر فعالية لعلاج الأخماج الناتجة من البكتريا السالبة لصبغة غرام بسبب ثبوتيتها ضد التحلل المائي بواسطة أنزيمات البيتالاكتاميز بالإضافة إلى معدل نفاذيتها العالية من خلال الغشاء الخارجي للبكتريا (Hawkry and Munday , 2004) .

جدول (4-5) النسبة المئوية لبكتريا *P.mirabilis* المقاومة والحساسة للمضادات الحياتية .

المضادات الحياتية	العزلات المقاومة		العزلات الحساسة	
	العدد	النسبة المئوية (%)	العدد	النسبةالمئوية (%)
Penicillin	64	100	0	0
Amoxicillin/ Clavulanic acid	64	100	0	0
Cefotaxime	55	86	9	14.06
Cephalexin	58	90.62	6	9.37
Impenem	12	18.75	52	81.25
Meropenem	10	15.62	54	84.37
Gentamycin	35	54.68	29	45.31
Amikacin	20	31.25	44	68.75
Tobramycin	49	76.56	15	23.43
Kanamycin	52	81.25	12	18.75
Streptomycin	55	85.93	9	14.06
Netlimicin	52	81.25	12	18.75

اما بالنسبة لمضادات الامينوكلايكوسيدات التي شملت المضادات الحياتية Gentamycin فقد كانت نسبة المقاومة في الدراسة الحالية (54.68%) تقترب من النسبة التي حصل عليها ياسين (2005) وسلمان (2008) و Jaloob و Gafil (2012) و AL-Bassam و AL-

Kazaz (2013) إذْ كانت نسبة المقاومة (57%) و (50%) و (55.6%) و (50%) كما ذُكـر سـابقاً ، في حين كـانت دراسـة كلاً مـن AL-baytti (2010) و Bahashwan و Elshafey (2013) والعزاوي وجماعته (2015) فقد كانت نسبة المقاومة (90.9%) و (62.2%) و (83.8%) كما ذُكـر سـابقاً ، في حين سجل كـلاً مـن الطائي (2002) و Gangoue-pieboji وجماعته (2006) و Hussien (2013) أدنى نسب مقاومة هي (32%) و (33%) و (30%) كما ذُكر سابقاً ، حيث أشار Katzung (2001) إلى ان مقاومة مضاد الجنتاميسين التي تبديها البكتريا السالبة لصبغة غرام بسبب وجود البلازميدات مشفرة إلى الأنزيمات المحورة للامينوكلايكوسيدات ، وكذلك سبب المقاومة لمضاد الجنتامايسين هو وجود عناصر وراثية على كروموسوم الخلية البكتيرية تشفر لأنزيمات مثبطة للمضاد حيث تعمل هـذه الأنـزيمات على تحويـر المجموعة الأمينية أو المجموعة الهايـدروكسيلية لمضادات الامينوكلايكوسيدات أو تكون المقاومة عن طريق تغير موقع آرتباط المضادات بالرايبوسومات أثناء عملية تخليق البروتين من خلال حدوث طفرة في الوحدة الرايبوسومية 16S rRNA (Fernandes *et al*., 2003) . قد يكون سبب الآختلاف في هذه النسب هو الآستخدام الواسع لمضاد الجنتاميسين في المستشفيات التي أصبحت بيئة ملائمة لظهور الأحياء المجهرية المقاومة لمضاد الجنتاميسين .

اما بالنسبة لمضاد Amikacin تبين ان عزلات بكتريا *P.mirabilis* قد أبدت مقاومة ضعيفة إذْ بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد (31.25%) وكانت هذه النتيجة مقاربة إلى ما توصل اليه كلاً من Kezeer (2007) و Bahashwan و Elshafey (2013) والعزاوي وجماعته (2015) إذ بلغت نسب المقاومة (33.4%) و (38.4%) و (43.2%) كما ذُكرسابقاً ، في حين اختلفت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه كلاً من سلمان (2008) و Luzzara وجماعته (2011) وJaloob و Gafil (2012) و AL-Bassam و AL-Kazaz (2013) إذ بلغت نسب المقاومة (79.2%) و (1.6%) و (100%) و (5%) كما ذُكر سابقاً، في حين كانت دراسة كلاً من Endimiani وجماعته (2005) والجناحي (2013) بأن جميع عزلاتهم من بكتريا *P.mirabilis* أظهرت عدم مقاومتها آتجاه مضاد الـ Amikacin ، إذْ ان المقاومة التي تمتلكها هذه البكتريا ضد مجموعة من المضادات الحياتية للامينوكلايكوسايد ناتجة من التغير الذي يحدث تحت الوحدة الرايبوسومية 30S التي يرتبط بها المضاد ويؤدي هذا التغيير إلى نقصان أُلفة المضاد لها ومن ثم يؤدي إلى مقاومة الخلية البكتيرية (Fluit *et al*., 2001) . قد يفضل أكثر الناس آستعمال مضادات الامينوكلايكوسايد في العلاج لجودة عملها

وتوفرها ورخص ثمنها ، من جانب آخر فقد كانت نسبة المقاومة لمضاد Tobramycin هي (76.56%) في الدراسة الحالية ، وجاءت هذه النتيجة مقاربة لنتائج الدراسة التي أجراها العزاوي وجماعته (2015) والتي بلغت (81%) ، في حين كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد في الدراسة التي أجراها Winokur وجماعته (2001) هي (33.3%) .

أبدت عزلات بكتريا *P.mirabilis* في الدراسة الحالية مقاومة عالية أتجاه مضادات الامينوكلايكوسيدات المتمثلة بمضادات Kanamycin و Streptomycin و Netlimicin إذ بلغت نسبة المقاومة (81.25%) و (85.93%) و (81.25%) كما ذُكر سابقاً ، تعد نسبة مقاومة Streptomycin مقاربة لما توصل اليه Gad وجماعته (2011) إذْ بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد (75%) وبين ان نسبة المقاومة لمضاد Kanamycin (50%) وهي أقل من نسبة المقاومة في الدراسة الحالية ، اما بالنسبة لمضاد Netlimicin ، فإنّ نسبة المقاومة له كانت مقاربةً لما توصل اليه George (2012) إذ بلغت (94.7%) . ان إنتاج الأنزيمات التي تعمل على تحليل المضاد في البكتريا السالبة لصبغة غرام ، إضافةً إلى اسباب المقاومة العالية ضد هذه المضادات تقع ضمن عمليات الأستنساخ للموقع الهدف على الرايبوسوم بحيث يصبح المضاد لا يميل إلى الأرتباط بالموقع الهدف أو عن طريق تقليل تركيز المضاد داخل الخلية الهدف وهذا اما ان يكون عن طريق تقليل تركيز المضاد داخل الخلايا بسبب تقليل في نفاذية الغشاء الخارجي للخلية البكتيرية أو عن طريق أمتلاكها آلية الدفق الفعال (Galimand *et al*., 2003 ; Aghazadeh *et al*., 2014) . يمكن تفسير نسب المقاومة العالية التي أبدتها عزلات بكتريا *P.mirabilis* لمضادات الامينوكلايكوسيدات في الدراسة الحالية إلى زيادة الأستخدام العشوائي للمضادات الحياتية وكذلك أستخدام جرع تحت العلاجية مَّما يؤدي ذلك إلى نشوء العزلات الطافره إلى جانب ذلك إنتاج الأنزيمات المحورة للامينوكلايكوسيدات (AMEs) والتي قد تكون جيناتها المشفرة لهذه الأنزيمات محمولة على البلازميد أو على الكروموسوم .

2-8-4 : تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC)

تمَّ إخضاع 20 عزلة من بكتريا *P.mirabilis* قيد الدراسة إلى أختبار تحديد التراكيز المثبطة الدنيا لعدد من المضادات الحياتية الامينوكلايكوسيدات وهي مضاد Gentamycin و Tobramycin و Kanamycin و Streptomycin و Netilmicin بالأعتماد على نقطة التوقف المثبتة من CLSI (2016) كأساس لحساب الاستجابة بأعتبار التركيز الادنى للمضاد الحياتي الذي يثبط نمو البكتريا ويوفر أعلى حد من المضاد للمعالجة كما تعّد العزلة البكتيرية حسَّاسة عندما يكون مقدار الـ MIC أقل من نقطة التوقف المحسوبة بالمايكروغرام/ مل .

أستخدمت طريقة التراكيز المضاعفة المتسلسلة في تحديد التركيز المثبط الأدنى للعزلات البكتيرية قيد الدراسة على وسط مولرهنتون ويعّد هذا الوسط من الاوساط المفضلة لإجراء هذا الأختبار لكونه يحتوي على كمية قليلة من كلوريد الصوديوم ونسبة قليلة من أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم والتي يمكن أن تؤثر على المضادات الحياتية المستعملة في هذا الأختبار (Stocks and Ridgway , 1987) ، إلى جانب ذلك تأثر قيم MIC بحجم اللقاح وطبيعية الغشاء الخارجي للبكتريا وعدد القنوات الموجودة فيه (Nikaido , 1989) .

تشير النتائج الواردة في (جدول 4-6) إلى قيم الـ MIC للمضادات الحياتية المستخدمة في هذه الدراسة حيث أظهرت جميع العزلات مقاومة شديدة لمضادات الامينوكلايكوسيدات المتمثلة بمضاد Gentamycin إذْ تراوحت قيم الـ MIC بين (32-512) مايكروغرام/مل أضعاف نقطة التوقف ≤ 8 مايكرغرام/مل ، وجاءت نتيجة الدراسة الحالية مقاربة مع ما توصل اليه كلاً من دراسة الموسوي (2000) التي اشارت إلى ان التركيز المثبط الأدنى لمضاد Gentamycin (-512 ≤ 8) ، ودراسة سلمان (2008) حيث اشارت إلى ارتفاع قيمة MIC لمضاد Gentamycin ، في حين اشار Makled و Alghamdi (2006) إلى ان قيمة الـ MIC بين (0.5-256) . اما مضاد Tobramycin فكانت قيمة الـ MIC في الدراسة الحالية (32-512) مايكروغرام/مل وهي ايضاً اضعاف نقطة التوقف ≤ 8 مايكروغرام/مل وجاءت هذه النتائج مقاربة مع ما توصل اليه سلمان (2008) حيث بلغت قيمة الـ MIC لنفس المضاد (16-512)،إذ اشار دراسة كلاً من الموسوي (2000) أن قيمة الـ MIC لمضاد Tobramycin (4-1024) و Makled و Alghamdi (2006) إذْ بلغت قيمة MIC لنفس المضاد (0.5-256) مايكروغرام/مل ، وفيما يخص مضاد Kanamycin فكانت قيمة الـ MIC في الدراسة الحالية (32-1024) مايكروغرام/مل وهي أضعاف وبقيمة أعلى من نقطة التوقف ≤ 16 مايكروغرام /مل وجاءت نتيجة الدراسة الحالية مقاربة إلى ما توصل اليه Makled و Alghamdi (2006) إذْ بلغت قيمة الـ MIC (2-1024) مايكروغرام/مل.

تراوحت قيم الـ MIC لمضادي Streptomycin و Netilmicin في الدراسة الحالية (128-1024) مايكروغرام/مل وهي أضعاف نقطة التوقف (32 ≤ و 16 ≤) مايكروغرام/مل كما ذُكر سابقاً ، حيث اشار Makled و Alghamdi (2006) إلى ان قيمة الـ MIC لمضاد Streptomycin كانت (1-1024) مايكروغرام/مل وهي مقاربة لقيمة الـ MIC في الدراسة الحالية .

جدول (4-6) التراكيز المثبطة الدنيا لبعض المضادات الحياتية المستخدمة ضد العزلات المستخدمة قيد الدراسة .

NET 16≤ (مايكروغرام/مل)	S 32≤ (مايكروغرام/مل)	K 16≤ (مايكروغرام/مل)	TOB 8≤ (مايكروغرام/مل)	CN 8≤ (مايكروغرام/مل)	نقطة التوقف	أسم المضاد / رقم العزلة
1024	1024	128	512	256		1
1024	1024	512	512	256		2
1024	1024	64	64	256		3
128	512	1024	64	256		4
512	512	1024	32	512		5
256	512	256	256	512		6
256	256	256	32	128		7
256	128	256	64	256		8
256	512	512	512	64		9
128	1024	512	512	64		10
512	1024	32	128	512		11
1024	1024	512	256	512		12
1024	512	1024	128	64		13
1024	1024	1024	64	64		14
256	256	128	128	64		15
128	256	32	512	128		16
256	1024	32	512	256		17
512	128	128	32	256		18
256	512	512	256	128		19
256	256	64	256	32		20

NET = Netilmicin ، S = Streptomycin ، K = Kanamycin ، TOB = Tobramycin ، CN = Gentamycin

4-9 : التحري عن بعض عوامل الضراوة للعزلات قيد الدراسة مظهرياً

4-9-1 : اختبار إنتاج الهيمولايسين

أجري أختبار التحري عن قابلية 64 عزلة لبكتريا *P.mirabilis* على إنتاج أنزيم الهيمولايسين من خلال تنميتها على وسط أساس الدم الصلب الحاوي على دم الإنسان صنف AB بنسبة (5%) لكونه يعطي مناطق تحلل واضحة ، وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان البكتريا منتجة للأنزيم الحال للدم وبنسبة (90.62%) (جدول 4-7) هذه النتائج مقاربة مع ما توصل اليه AL-Taai (2005) و AL-Autbi (2013) وعلي (2015) والعزاوي وجماعته (2015) إلى ان بكتريا *P.mirabilis* تنتج الأنزيم بنسبة (93.4%) و (88.89%) و(89.7%) و (100%) كما ذُكر سابقاً ، كما تختلف نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه سلمان (2008) والحسيني وجماعته (2009) و AL-baytti (2010) اذ كانت هذه البكتريا تنتج الأنزيم الحال للدم بنسبة (66.7%) و (45%) و (45.5%) كما ذُكر سابقاً . أشار Liaw وجماعته (2003) بأن سمّية أنزيم الهيمولايسين المنتج من البكتريا تأتي من خلال تدمير الغشاء الخلوي لكريات الدم الحمر ومن ثم تؤدي إلى تحطيم الانسجة .

4-9-2 : اختبار تكون الغشاء الحيوي

أجري أختبار التحري عن قابلية 64 عزلة لبكتريا *P.mirabilis* على تكوين طبقة الغشاء الحيوي بأستخدام طريقة الانبوب ، واعتبرت النتيجة موجبة عندما تتكون الأغشية الحيوية على الجدران الداخلية وقعر الأنابيب بشكل طبقة بنفسجية ، إذْ أظهرت الدراسة الحالية لهذه البكتريا انها تمتلك القدرة على تكوين الغشاء الحيوي بنسبة (95.31%) (جدول 4-7) وهذه النتيجة مقاربة إلى ما توصل اليه سلمان (2008) و Qaddoorri وجماعته (2015) و AL-Mayahi (2017) بأن صفة تكون الغشاء الحيوي خارج الجسم الحي بنسبة (91.7%) و (100%) و (89.5%) كما ذُكر سابقاً ، إذْ كانت هذه النتيجة مقاربة مع نتائج العديد من الباحثين الذين اشاروا إلى ان هذه البكتريا تمتلك القدرة على إنتاج الغشاء الحيوي (Jones *et al*.,2005 ; Jones *et al*., 2006) .

تعمل عوامل الضراوة لبكتريا *P.mirabilis* بصورة تأزرية لجعل البكتريا أكثر ضراوة ، إذْ وجد Jones وجماعته (2005) و Schulz وجماعته (2008) ان امتلاك هذه البكتريا القابلية على إنتاج أنزيم اليوريز الذي يجعل الوسط قاعدياً وبهذا يؤدي إلى زيادة تكوين الغشاء الحيوي ، إذْ توصلت الدراسات نفسها ان تكوين الغشاء الحيوي يزداد في الوسط القاعدي

إلى جانب الدراسات التي قام بها Jansen وجماعته (2004) و Rocha وجماعته (2007) الذين اشاروا إلى الدور الذي تقوم به الاهلاب المقاومة للمانوز شبيه MR / P *Proteus* (Fimbriae) في تجميع الخلايا البكتيرية وتكوين الغشاء الحيوي وبالتالي تؤدي إلى الإصابة بالخمج ، وهذا يدعم نتائج الدراسة الحالية التي تشير إلى القدرة العالية لبكتريا *P.mirabilis* المعزولة من أخماج مختلفة على إنتاج أنزيم اليوريز وتكوين الغشاء الحيوي وخاصية التلازن لكريات الدم الحمر، وان امتلاك هذه البكتريا لصفة إنتاج الغشاء الحيوي قد يسهم بشكل كبير في مقاومة العلاج بالمضادات الحياتية.

4-9-3 : التحري عن الأسواط

أجري ٱختبار التحرّي عن العزلات البكتيرية الحية وحركتها بواسطة الأسواط بطريقة القطرة المعلقة وقد أظهرت الدراسة الحالية أن 64 عزلة لبكتريا *P.mirabilis* قادرة على الحركة بنسبة (100%) (جدول 4-7)، هذا ما أَشار اليه كلاً من AL-baytti (2010) التي أجريت في قضاء تكريت ، إذْ كانت نسبة قدرة البكتريا المعزولة من خمج المسالك البولية على تكوين ظاهرة الانثيال بواسطة حركتها السريعة بالأسواط (100%) ، والعزاوي وجماعته (2015) ان قدرة هذه البكتريا على الحركة يمكن ملاحظتها من خلال نموها على وسط اساس الدم الصلب إذْ ظهرت صفة الانثيال (Swarming) على الوسط بنسبة (100%) وهذه مطابقة مع نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لصفة الانثيال إذْ كانت بشكل امواج متحدة المركز والتي تعرف بما يسمى عين الثور .

4-9-4 : التحري عن الأهلاب

تم التحرّي عن ٱحتواء 64 عزلة لبكتريا *P.mirabilis* على أهلاب الالتصاق من خلال قدرتها على تلازن كريات الدم الحُمْر، إذْ أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان (92.18%) (جدول 4-7) أعطت نتيجة موجبة لهذا الاختبار، كانت هذه النتيجة مقاربة لدراسة كلاً من المرجاني (2000) إذْ كانت (86.6%) من العزلات تمتلك القابلية على تلازن كريات الدم الحُمْر وسلمان (2008) إذْ كانت (95.8%) من العزلات لها القابلية على تلازن كريات الدم الحُمْر ، في حين وجد Sosa وجماعته (2006) ان جميع عزلات بكتريا *P.mirabilis* كانت تمتلك صفة التلازن لكريات الدم الحُمْر للإنسان، إذْ اشار Cruickshank وجماعته (1975) ان فحصَ التلازن الدموي دليل يبين فيما اذا كان المزروع البكتيري يحتوي على الأهلاب ام لا .

جدول (4-7) الاعداد والنسب المئوية لعوامل الضراوة لـ 64 عزلة من بكتريا *P.mirabilis*

عوامل الضراوة	عدد عزلات بكتريا *P.mirabilis*	النسبة المئوية (%)
إنتاج الهيمولايسين	58	90.62
تكوين الغشاء الحيوي	61	95.31
امتلاك الأسواط	64	100
امتلاك الأهلاب	59	92.18

4-10 : التحري عن بعض عوامل الضراوة وراثياً

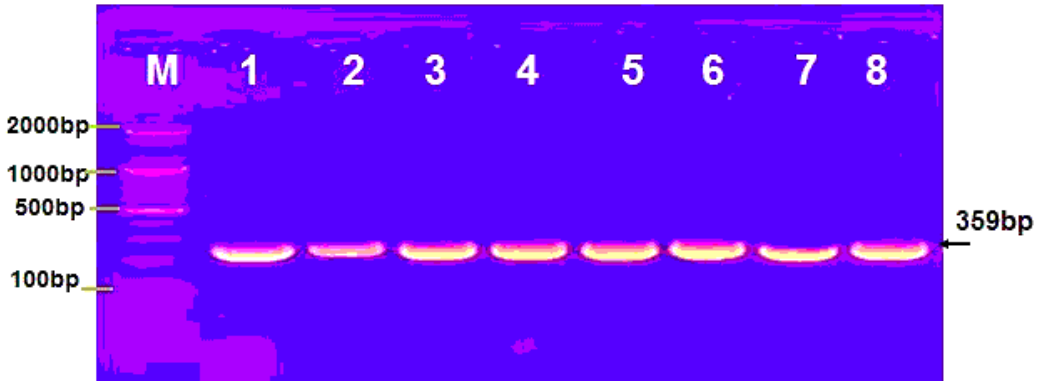
4-10-1 : أنزيم اليوريز

يعد جين *ureC* المسؤول عن إنتاج أنزيم اليوريز من الصفات التشخيصية لبكتريا *P.mirabilis* ، إذْ أظهرت 12 عزلة لبكتريا *P.mirabilis* امتلاكها للجين *ureC* وبنسبة (60%) من مجموع 20 عزلة بكتيرية (جدول 4-8) و (الشكل 4-4)، في حين أظهرت دراسة كلاً من Takeuchi وجماعته (1996) و Stankowska وجماعته (2008) في دراستهم التي أجريت في بولندا والجناحي (2013) بأن جميع عزلات *P.mirabilis* أظهرت امتلاكها للجين *ureC* فكانت نسبة الجين *ureC* (100%) ، بينما اظهرت دراسة علي (2015) و abbas وجماعته (2015) ان العزلات البكتيرية امتلكت هذا الجين وبنسبة (96.66%) و (18%) كما ذُكر سابقاً . وتأتي أهمية أنزيم اليوريز في إمراضية البكتريا من خلال تحلل اليوريا إلى الأمونيا ومن ثم يحمي البكتريا من التراكيز السامَّة والمرتفعة من اليوريا (Tanaka *et al*., 2003)، كما اشار Alamuri وجماعته (2009) ان هذا الأنزيم يساعد بكتريا *P.mirabilis* على أستهلاك اليوريا كمصدر للنتروجين لتصنيع الـ DNA والبروتين ، يعدّ أنزيم اليوريز من عوامل الضراوة المهمة التي تؤدي إلى مشاكل صحية مثل : حصى الكلى والتهاب حويض الكلى (Tanaka *et al*., 2004) .

(الشكل 4-4): الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز الذي يوضح نتائج بلمرة جين الضراوة Urease *ureC* لبكتريا *P.mirabilis* ، الحفر من (1-12) عزلات البكتريا و M = المَعلّمة الجزئية 100pb .

4-10-2 : التحري عن الأهلاب

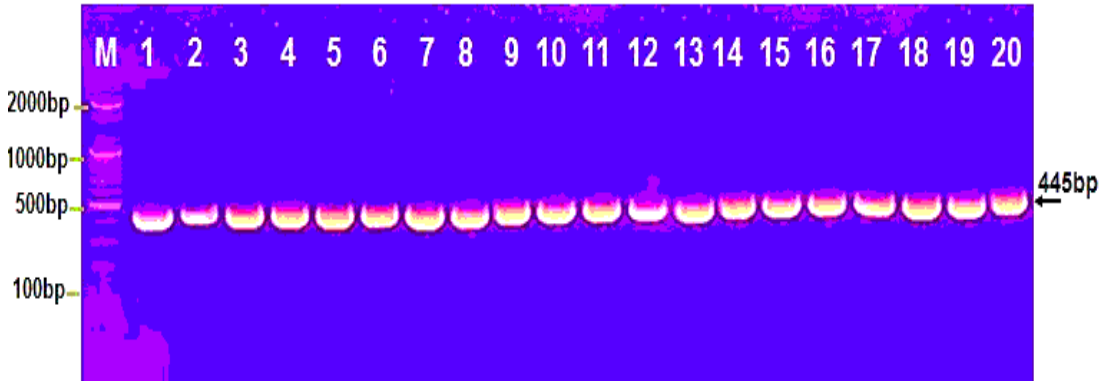
تعدّ الأهلاب المقاومة للمانوز MR / P هي أهم وأفضل نوع من الأهلاب في بكتريا *P.mirabilis* وتعدّ من عوامل الأستعمار لخلايا نسيج المضيف ، ويعد جين *mrpA* المسؤول عن دور عملية الالتصاق إذْ وجد الجين *mrpA* في الدراسة الحالية بنسبة (40%) من مجموع (جدول 4-8) و (الشكل4-5) ، وجاءت هذه النتيجة مقاربة مع ما توصل اليه Abbas وجماعته (2015) إذْ بلغت نسبة إنتاج الجين *mrpA* (35%) ، في حين كانت دراسة كل من Mishra وجماعته (2001) و AL-Mayahi (2017) إذْ بلغت نسبة إنتاج الجين *mrpA* من قبل بكتريا *P.mirabilis* (8%) و (100%) كما ذُكر سابقاً. ويعدّ نوع الأهلاب MR / P في هذه البكتريا التي يشفر لها من قبل الجين *mrpA* متشابهة وظيفياً ، وتركيبياً مع نوع أهلاب النوع الأول التي تنتجه بكتريا *E.coli* والتي لها دور في مهاجمة وآستعمار السطوح المخاطية للمضيف ، ويمكن تثبيط هذا النوع من الالتصاق بوجود سكر المانوز (Laragione *et al.*, 2000) .



الشكل (4-5): الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز الذي يوضح نتائج بلمرة جين الضراوة Fimbriae *mrpA* لبكتريا *P.mirabilis* ، الحفر من (1-8) عزلات البكتريا و M = المَعلّمة الجزئية 100pb .

4-10-3 : التحري عن الأسواط

تعدّ الأسواط احد عوامل الضراوة لهذه البكتريا التي يستفاد منها في الحركة والأرتباط وتساعدها في إحداث الخمج ، والمكون الرئيسي للأسواط هو بروتين يسمى الفلاجلين (Flagillin) (Umpierrez *et al.*, 2013) ، تمتلك بكتريا *P.mirabilis* اثنين من الجينات المسؤولة عن توليد الفلاجلين هما *flaA* و *flaB* (Hatt ; Manos *et al.*, 2004 and Rather , 2008) ، إذْ لوحظ من خلال الدراسة الحالية للجانب الوراثي عن الأسواط ان بكتريا *P.mirabilis* تمتلك الجين *flaA* بنسبة (100%) من مجموع 20 عزلة بكتيرية (جدول 4-8) و (الشكل 4-6) ، جاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة مع النتائج التي توصل اليها كلاً من (mohammed) (2014) وعلي (2015) و AL-Mayahi (2017) اذ كانت نسبهم (100%) و (86.66%) و (100%) كما ذُكر سابقاً .



(الشكل 4-6): الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز الذي يوضح نتائج بلمرة جين الضراوة *flaA* Flagellae لبكتريا *P.mirabilis* ، الحفر من (1-20) عزلات البكتريا و M = المَعلّمة الجزئية 100pb .

4-10-4 : أنزيم الهيمولايسين

يعدّ أنزيم الهيمولايسين مدمراً لغشاء كريات الدم الحُمْر عن طريق إحداث فتحات صغيرة في أغشية الكريات والخلايا الطلائية ، ويعدّ وجوده عاملاً مهماً لتزويد البكتريا بالحديد وبسبب سمية الخلايا (Cytotoxic) فأنه يؤدي إلى تحطم أنسجة المضيف (Liaw *et al.*, 2000) ، ومن ثمَّ يزيد من إمراضية البكتريا عند وجودها في أنسجة المضيف (Abed-Wahed *et al.*, 2001) . يعدّ الجين *hpmA* المسؤول عن إنتاج عامل الضراوة الهيمولايسين وهو مهم لبكتريا *P.mirabilis* ، أظهرت النتائج في الدراسة الحالية امتلاك هذه البكتريا للجين *hpmA* بنسبة (45%) من مجموع 20 عزلة بكتيرية (جدول 4-8) و (الشكل 4-7) ، وجاءت هذه النتيجة مقاربة مع ما توصل اليه Uphoff و Welch (1990)

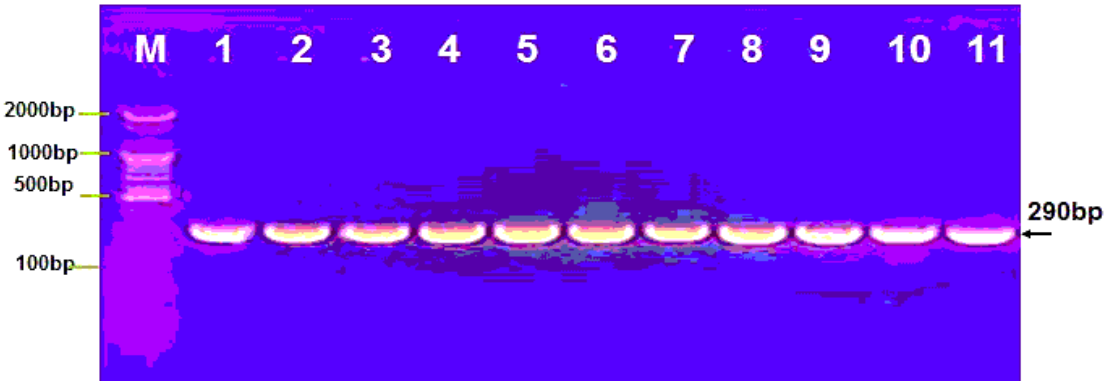
إذْ بلغت نسبة امتلاك بكتريا *P.mirabilis* للجين *hpmA* (46.7%) ، في حين كانت دراسة كلاً من Cestari وجماعته (2013) وعلي (2015) ان وجود هذا الجين في هذه البكتريا بنسبة (97.15%) و (100%) كما ذُكر سابقاً. يعدّ هذا الأنزيم من عوامل الضراوة التي تسهم في إمراضية هذه البكتريا ، إذْ يعمل على توفير المغذيات الناتجة من عمليات التحلل التي يقوم بها الأنزيم .

(الشكل 4-7): الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز الذي يوضح نتائج بلمرة جين الضراوة Hemolysin *hpmA* لبكتريا *P.mirabilis* ، الحفر من (1-9) عزلات البكتريا و M = المعلّمة الجزئية 100pb .

4-10-5 : تكوين الغشاء الحيوي

يعدّ الغشاء الحيوي تجمعاً للكائنات المجهرية والتصاقها بالأسطح ، إذْ تكون محاطة ببوليمرات خارج الخلوية (Extracellular polymers) إذْ تحتوي على سكريات متعددة وبهذا يشارك الغشاء الحيوي في حدوث الخمج والمقاومة للمضادات الحياتية (Kokare *et al.*, 2009) . تعمل هذه البوليمرات الخارج الخلوية على تثبيت الغشاء الحيوي على الأسطح وكذلك توفر الحماية للخلايا البكتيرية في الظروف غير الملائمة (Decharvalho,200) . حيث اظهرت نتائج الدراسة الحالية امتلاك عزلات بكتريا *P.mirabilis* للجين *luxS* وهو ضروري لتكوين الغشاء الحيوي إذْ كان بنسبة (55%) من مجموع 20 عزلة بكتيرية (جدول 4-8) و (الشكل 4-8) ، وجاءت هذه النتيجة مقاربة مع ما توصل إليه Abbas (2015) اذ كانت نسبة وجود الجين (47%) .

مما تقدم نستطيع القول ان إمراضية بكتريا *P.mirabilis* تطورت من خلال العديد من عوامل الضراوة المعبر عنها جينياً ، وان ضراوة هذه البكتريا تزيد من فهمنا عن كيفية قدرة النبيت الطبيعي على غزو أنسجة المضيف وإصابتها .



(الشكل 4-8): الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز الذي يوضح نتائج بلمرة جين الضراوة Biofilm formation *luxS* لبكتريا *P.mirabilis* ، الحفر من (1-11) عزلات البكتريا و M = المَعلّمة الجزئية 100pb .

جدول (4-8) : الاعداد والنسب المئوية لجينات عوامل الضراوة لـ 20 عزلة من بكتريا *P.mirabilis* .

الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة	عددعزلات بكتريا *P.mirabilis*	النسبة المئوية (%)
ureC	12	60
mrpA	8	40
flaA	20	100
hpmA	9	45
luxS	11	55

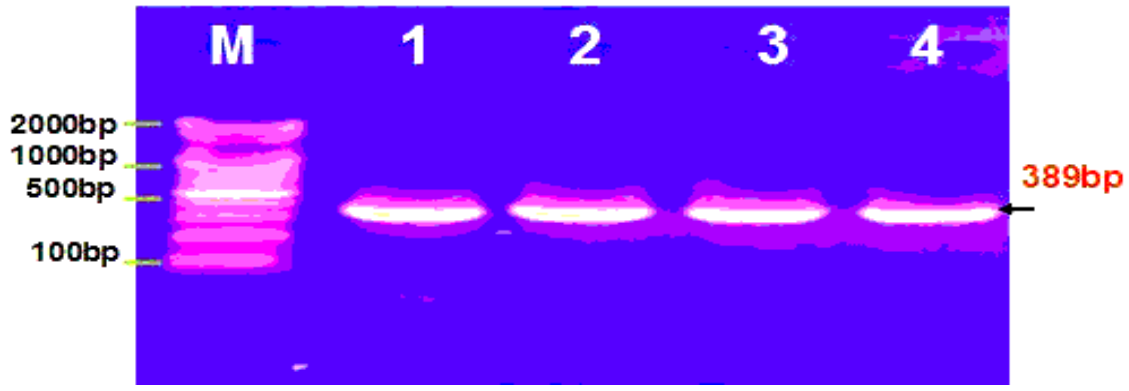
4-11 : انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات عن طريق الأنزيمات المحورة للامينوكلايكوسيدات

تعد إلية إنتاج الأنزيمات المحورة لمضادات الامينوكلايكوسيدات (AMEs) من أهم آليات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات وأكثرها شيوعاً (Zhou *et al.*, 2010) ، إذْ يبين (جدول 4-9) انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في عزلات بكتريا *P.mirabilis* ، إذْ درست خمسة جينات للأنزيمات المحورة لمضادات الامينوكلايكوسيدات .

جدول (4-9) : انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في عزلات بكتريا *P.mirabilis* .

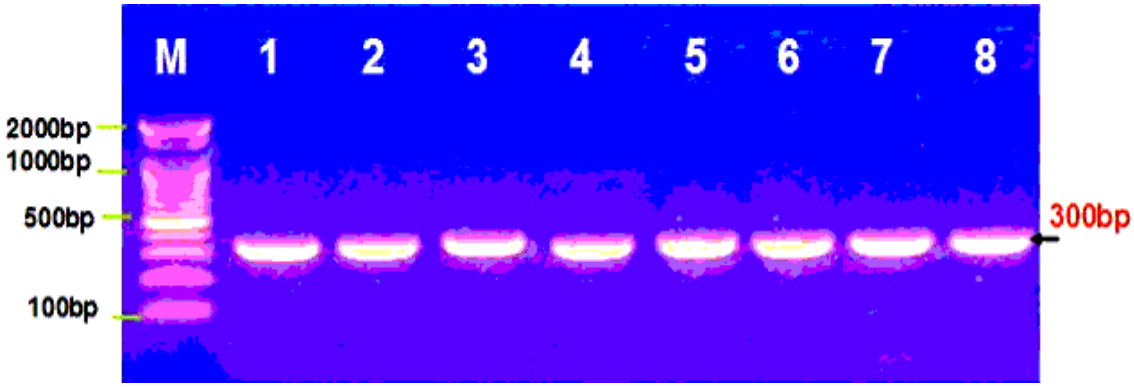
الجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات	عدد عزلات بكتريا *P.mirabilis*	النسبة المئوية (%)
aac(3)-Ia	4	20
aac(6')-Ib	8	40
ant(4')-IIa	3	15
ant(2'')-Ia	10	50
aph(3'')-Ib	10	50

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان تواجد الجين *aac(3)-Ia* في بكتريا *P.mirabilis* بنسبة (20%) من مجموع 20 عزلة بكتيرية (الشكل4-9) ، في حين أظهرت دراسة Michalska وجماعته (2014a) تواجد جين *aac(3)-Ia* بنسبة (1.51%) من 66 عزلة لهذه البكتريا ، ويعدّ هذا الجين مشفراً للأنزيمات الناقلة لمجموعة الاستيل (AACs) وتمنح المقاومة لمضاد Gentamycin ومضادات الامينوكلايكوسيدات الأخرى كمضاد Sisomicin و Fortimicin وتوجد هذه الأنزيمات بأعداد كبيرة في العائلة المعوية Enterobacteriaceae والعزلات السريرية للبكتريا السالبة لصبغة غرام (Ramirez and Tolmasky , 2010) .



(الشكل 4-9): الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز الذي يوضح نتائج بلمرة جين *aac(3)-Ia* المقاوم للمضادات الحياتية الامينوكلايكوسيدات في بكتريا *P.mirabilis* ، الحفر من (1-4) عزلات البكتريا و M = المعلّمة الجزئية 100pb .

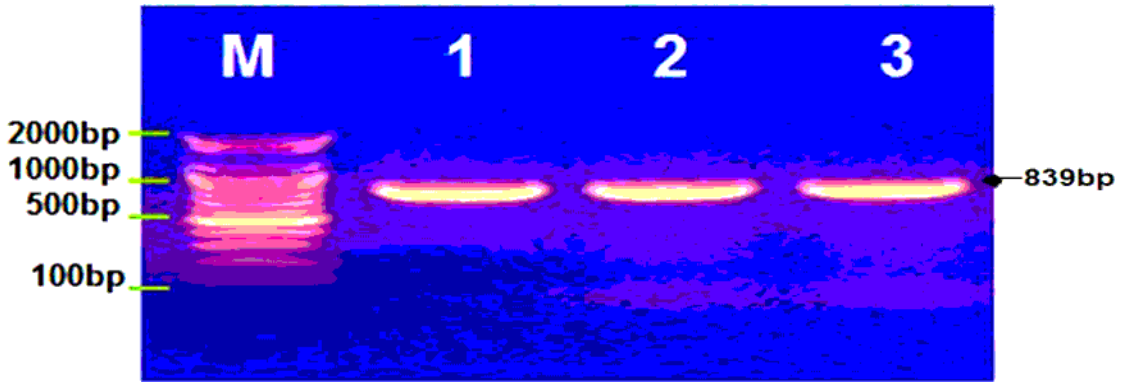
في حين أظهرت الدراسة الحالية ان نسبة الجين *aac(6')-Ib* كانت (40%) من مجموع 20 عزلة بكتيرية (الشكل 4-10) ، وكانت هذه النتيجة مقاربة مع ما توصل إليه كلاً من Dubois وجماعته (2008) في فرنسا إذْ تواجد الجين *aac(6')-Ib* في بكتريا *P.aeruginosa* وبنسبة (36.5%) و Haldorsen (2011) في النرويج إذْ كان تواجد الجين *aac(6')-Ib* في بكتريا *E.coli* بنسبة (37.28%) و Sacha وجماعته (2012) و Michalska وجماعته (2014b) إذْ كانت نسبة الجين *aac(6')-Ib* (58.3%) و (28%) كما ذُكر سابقاً ، في حين كانت دراسة كلاً من Wieczorek وجماعته (2008) و Michalska وجماعته (2014a) نسبة تواجد الجين (71.43%) و (13.63%) كما ذُكر سابقاً . ويعدّ هذا الجين ايضاً مشفراً للأنزيمات الناقلة لمجموعة الاستيل (AACs) إذْ ان هذه الأنزيمات تمنح المقاومة للبكتريا لنوعينِ مختلفينِ من المضادات وهي الامينوكلايكوسيدات والكوينولينات (Robicsek *et al.*,2006) ، وبسبب انتشار هذا النوع من الأنزيم AAC(6')-Ib بين البكتريا هو ان الجين المسؤول *aac(6')-Ib* عن هذا الأنزيم يوجد على العناصر الوراثية المتنقلة وهذا ما يزيد من سرعة الانتقال (Vakulenko and Mobashery, 2003) .



(الشكل 4-10): الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز الذي يوضح نتائج بلمرة جين *aac(6')-Ib* المقاوم للمضادات الحياتية الامينوكلايكوسيدات في بكتريا *P.mirabilis* ، الحفر من (1-8) عزلات البكتريا و M = المَعلّمة الجزئية 100pb .

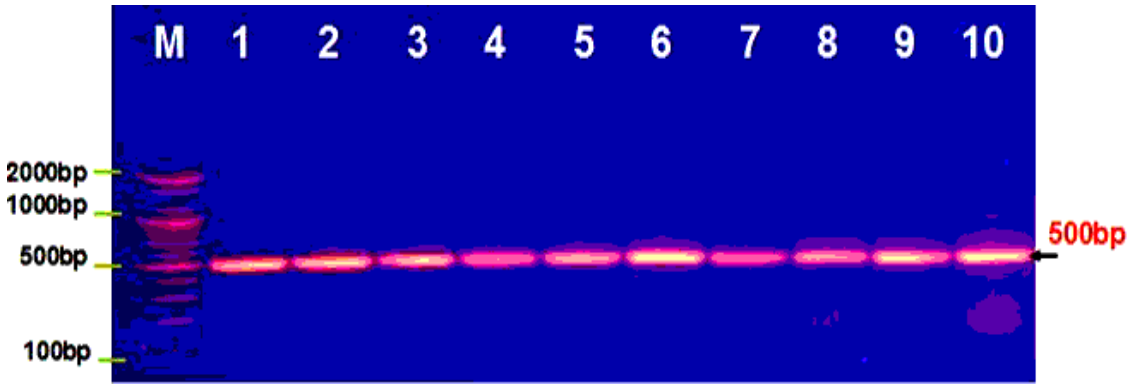
أظهرت الدراسة الحالية نسبة تواجد الجين *ant(4')-IIa* هي (15%) من مجموع 20 عزلة بكتيرية (الشكل 4-11) وهي أقل نسبة لهذا الجين ما بين الجينات الأخرى المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات وهذه النتيجة هي مقاربة إلى ما توصل اليه Michalska وجماعته (2014a) إذْ كان لا وجود للجين *ant(4')-IIa* من بين العزلات المشخصة في دراسته . حيث أشار Coyne وجماعته (2010) بأن هذا الجين هو يشفر لأنزيم ANT(4')-IIa ويوجد محمول على البلازميد في بكتريا *Pseudomonas* والعائلة المعوية

Enterobacteriaceae ، ويعتبر هذا الأنزيم من الأنزيمات الناقلة للنيوكليوتيدات (ANTs) .



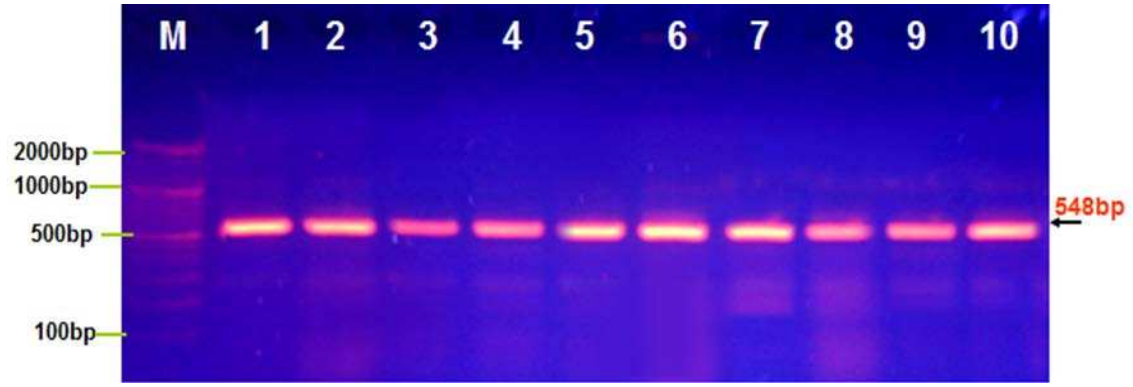
(الشكل 4-11): الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز الذي يوضح نتائج بلمرة جين *ant(4')-IIa* المقاوم للمضادات الحياتية الامينوكلايكوسيدات في بكتريا *P.mirabilis* ، الحفر من (1-3) عزلات البكتريا و M = المَعلّمة الجزئية 100pb .

كذلك أظهرت الدراسة الحالية بأن أعلى نسبة للجين *ant(2")-Ia* من بين الجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في عزلات بكتريا *P.mirabilis* إذْ كانت (50%) من مجموع 20 عزلة بكتيرية (الشكل4-12) ، في حين توصل كلاً من Haldorsen (2011) في النرويج بأن نسبة وجود الجين *ant(2")-Ia* في بكتريا *E.coli* (100%) و Michalska وجماعته (2014a) إذْ كانت نسبة وجود الجين في الدراسة التي أجراها لعزلات بكتريا *P.mirabilis* عالية من بين الجينات التي شخصها في دراسته (80.30%) وهذه النسب مقاربة مع الدراسة الحالية ، في حين كانت دراسة Michalska وجماعته (2014b) نسبة وجود الجين *ant(2")-Ia* من بين العزلات (36%) . يمنح الجين *ant(2")-Ia* مقاومة ضد مضادات الأمينوكلايكوسيدات مثل : Tobramycin و Gentamicin و Kanamycin أي إن هذا الجين المشفر لأنزيم ANT(2") يحمل على البلازميدات والجينات القافزة والانتغرونات ويعتبر هذا الأنزيم من الأنزيمات الناقلة للنيوكليوتيدات (Macleod *et al.*, 2000 ; Haldorsen, 2011) .



(الشكل 4-12): الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز الذي يوضح نتائج بلمرة جين *ant(2'')-Ia* المقاوم للمضادات الحياتية الامينوكلايكوسيدات في بكتريا *P.mirabilis* ، الحفر من (1-10) عزلات البكتريا و M = المَعلّمة الجزئية 100pb .

وكذلك أظهرت الدراسة الحالية ان هناك نسبة عالية للجين الأخر *aph(3'')-Ib* إذْ كانت نسبته في الدراسة الحالية ايضاً (50%) من مجموع 20 عزلة بكتيرية (الشكل 4-13) ، وهذه النتيجة لا تتفق مع ما توصل اليه Michalska وجماعته (2014a) إذْ كانت نسبة تواجد الجين *aph(3'')-Ib* من بين الجينات المشخصة من عزلات *P.mirabilis* (21.21%) وهي أقل من النسبة المسجلة في الدراسة الحالية . يمنح هذا الجين المقاومة للأنزيمات الناقلة للفوسفات (APHs) ، وتنتج هذه الأنزيمات مستوى عاليًا من المقاومة لهذه المضادات لذا تعتبر المجموعة الثانية من بعد الأنزيمات الناقلة لمجموعة الاستيل (AACs) ، وتحمل هذه الجينات المشفرة لهذه الأنزيمات على البلازميدات والكروموسومات ، وتعمل هذه الأنزيمات على تحوير مجموعة الهيدروكسيل في الموقع (3') لمضادات الامينوكلايكوسيدات (Vakulenko and Ramirez and Tolmsky ,2010 ; Mobashery ,2003) .



(الشكل 4-13): الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز الذي يوضح نتائج بلمرة جين *aph(3'')-Ib* المقاوم للمضادات الحياتية الامينوكلايكوسيدات في بكتريا *P.mirabilis* ، الحفر من (1-10) عزلات البكتريا و M = المَعلّمة الجزئية 100pb .

نستنتج من ذلك ان مقاومة العزلات السريرية لمضادات الامينوكلايكوسيدات تكون متنوعة ومختلفة بأختلاف عدة عوامل منها الموقع الجغرافي والأستخدام العشوائي للمضادات الحياتية وبصورة متكررة مما يؤدي إلى إنتاج الجينات المشفرة .

12-4 : تحييد البلازميد

تمَّ إجراء عملية التحييد للبلازميدات التي كشف عنها في بعض عزلات البكتريا *P.mirabilis* المعزولة من عينات مختلفة والغرض من إجراء هذه العملية للتعّرف على دور تلك البلازميدات في مقاومة المضادات الحياتية المختلفة ، إذْ تمَّ آستخدام مادة كبريتات دودسيل الصوديوم SDS .

تم انتخاب عزلتان (4 ،13) بصورة عشوائية من مجموع 20 عزلة بكتيرية وعوملت بمادة SDS وحدد التركيز الأمثل الذي أدَّى إلى تحييد البلازميدات في كلّ عزلة من العزلات المستخدمة في الدراسة .

أظهرت النتائج جدول (4-10) بأن أعلى تركيز سمح لنمو البكتريا هو (5%) للعزلة (4) وتركيز (6%) للعزلة (13) ، والذي أظهر فيه نمواً واضحاً يمكن ملاحظته بالعين المجردة ، إذ نشر منه لكلتا العزلتينِ المعاملتينِ بالمادة SDS بشكل مفرد على وسط مولرهنتون الحاوي على أحد المضادات الحياتية التي قاومتها العزلتان قبل معاملتهما بمادة SDS .

جدول(4-10): تأثير مادة SDS في نمو العزلتين(4 ،13) العائدتينِ لبكتريا *P.mirabilis* .

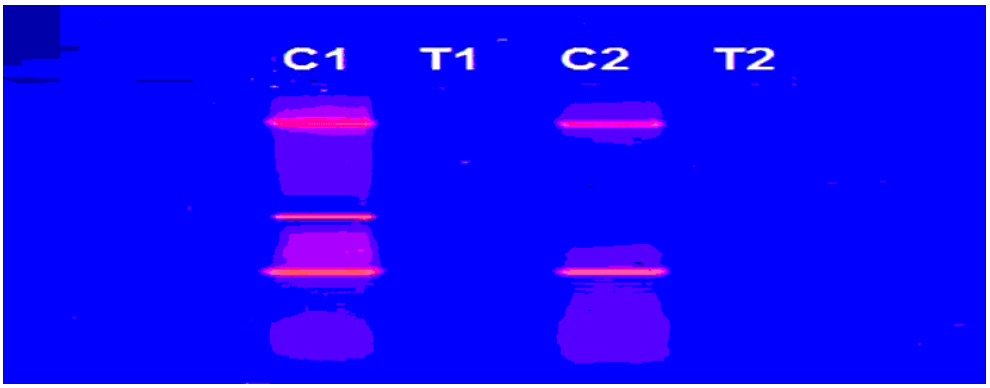
نمو العزلتان	تركيز مادة SDS (%)											
	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-
13	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-	-	-	-

+++ = نمو جيد جداً ، ++ = نمو جيد ، + = نمو متوسط ، - = لا يوجد نمو

تم انتخاب 100 مستعمرة من الاطباق الحاوية على المضاد الحياتي الذي سبق وان قاومتهما العزلتان الأصليتانِ ، فقد أظهرت عدداً من المستعمرات لكل من العزلتين 4 و 13 الناتجة بعد المعاملة بمادة SDS قد فشلت بالنمو على الاوساط الحاوية على المضادات الحياتية

المستخدمة في الدراسة ، تم انتخاب 5 مستعمرات من النمو بصورة عشوائية لدراسة مقاومتها للمضادات الحياتية وإنتاج أنزيمات البيتالاكتام .

وأظهرت نتائج الدراسة الحالية كما مبين في جدول (4-11) للعزلتين (4 و 13) بأن هذه المستعمرات فقدت القدرة على مقاومة بعض المضادات التي قاومتها قبل تعرضها لمادة الـ SDS ، كما انها فقدت قدرتها على إنتاج أنزيمات البيتالاكتام مَّما يشير إلى ان هذه الصفات ناتجة عن جينات بلازميدية مَّما جعلها تختفي بفقدان الحزم البلازميدية (الشكل 4-14) .



(الشكل 4-14): الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز(1.5%) والحاوي على البلازميدات قبل وبعد المعاملة بمادة SDS . إذْ تمثل العينات (C1 و C2) عـزلات سيطرة غير معاملة بمـادة الـ SDS والعينـات (T1 و T2) عزلات معاملة بمادة الـ SDS .

أظهرت هذه العزلات أستمرار مقاومتها لبعض المضادات الحياتية الأخرى وإمكانيتها على إنتاج أنزيمات البيتالاكتام ، وجاءت نتائج الدراسة الحالية بأن العزلات لم تفقد مقاومتها لمضاد البنسلين والستربتومايسين والكانامايسين والنتليمايسين وبهذا تكون مقاربة مع دراسة فرج وغنيمة (2010) التي وجدت فقدان المقاومة للمضادات الحياتية بمدى (70-100%) إذْ وجدت صفة فقدان المقاومة للمضادات الحياتية محمولة على البلازميد في حين لم تفقد مقاومة مضادات حياتية أخرى السبروفلوكساسين والامبيسلين والارثرومايسين والستربتومايسين مما يدّل على ان المورثات التي تشفر لمقاومتها محمولة على الكروموسوم. وكما أشار EL-Mansi وجماعته (2000) إلى دور مادة SDS لها تأثيراً كبـيراً في تحييد البلازميدات في بكـتريا *K.pneumoniae* بتردد عالي مقارنة ببقية عـوامل التحييد المستخدمة كبروميد الاثيديوم والنوفوبايوسين (Novobiocin) ، فقد لاحظ Radha وجماعته (2012) بأن عزلات بكتريا *E.coli* التي حصل عليها من بعض العزلات السريرية قد أصبحت حساسة لمضادات البيتالاكتام بعد معاملة تلك العزلات بمادة الـ SDS .

كما ذكرت الموسوي (2006) ان عـزلاتها العائدة إلى بكـتريا *E.coli* وبكـتريا *P.aeruginosa* الناتجة بعد معاملتها بمادة SDS قد فشلت بالنمو على الاوساط الحاوية على المضادات الحياتية . يعود حدوث التحييد في مقاومة المضادات الحياتية لمجموعة البيتالاكتام إلى ان صفة مقاومة هذه المضادات محمولة على البلازميدات عن طريق إنتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز (Jacoby , 1994) ، وهذه البكتريا المنتجة لهذه الأنزيمات عادة ما تكون بلازميداتها تحتوي على جينات تشفـر أيضـاً لمقاومـة المضـادات الحياتية الأخـرى كالامينوكلايكوسيدات ومضاد التتراسايكلين (Nathisuwan *et al*., 2001) .

جدول(4-11) : نتائج التحييد للعزلات المعاملة بمادة SDS في مقاومتها للمضادات الحياتية .

اسم المضاد الحياتي	عزلة (4)		عزلة (13)	
	الاصلية	المحيده	الاصلية	المُحيدة
Penicillin	+	+	+	-
Amoxicillin Clavulanic acid	+	+	+	-
Cefotaxime	+	-	+	-
Cephalexin	+	-	+	-
Impenem	+	-	+	-
Meropenem	+	-	+	-
Gentamycin	+	-	+	-
Amikacin	+	-	+	-
Tobramycin	+	-	+	-
Kanamycin	+	+	+	-
Streptomycin	+	+	+	+
Netlimicin	+	-	+	+
انتاج أنزيمات البيتالاكتام	+	-	+	-

وجود الصفة = + **فقدان الصفة = -**

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الإستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

الإستنتاجات :

1- بلغت أعلى نسبة خمج ببكتريا *Proteus mirabilis* لدى عينات الإدرار وأقل نسبة خمج بهذه البكتريا لدى عينات الحروق من مجموع العزلات البكتيرية الكلية .

2- أظهرت نتائج التحليل لتسلسل القواعد النتروجينية للجين *16S* rRNA وجود تطابقاً بين العزلات المحلية لبكتريا *P.mirabilis* والعزلات العالمية في موقع بنك الجينات NCBI-Genebank ، كذلك أثبت تحليل الشجرة الوراثية للجين *16S* rRNA تطابقاً عالياً بين العزلات المحلية والعالمية .

3- امتلاك عزلات بكتريا *P.mirabilis* صفة المقاومة لأكثر من مضاد حياتي ، إذْ اثبتت الدراسة مقاومة العزلات لمضادات البيتالاكتام لكلاً من Penicillin و / Amoxicillin Clavulanic acid ، في حين كان مضاد Meropenem و Imipenem من أكثر المضادات فاعلية ضد العزلات المختبرة .

4- أظهرت عزلات بكتريا *P.mirabilis* قيد الدراسة مقاومة متعددة لمضادات الامينوكلايكوسيدات إذْ كانت أعلى نسبة لمضاد Streptomycin ، وأقل نسبة لمضاد Amikacin .

5- امتلاك عزلات بكتريا *P.mirabilis* عدد من عوامل الضراوة التي تعزز قدرتها على إحداث الخمج ، فهي تمتلك أنزيم اليوريز والهيمولايسين وتكوين الغشاء الحيوي وامتلاك الأسواط والأهلاب إلى جانب ذلك امتلاك العزلات قيد الدراسة أنزيمات البيتالاكتاميز .

6- امتلاك 20 عزلة بكتيرية قيد الدراسة المقاومة لمضادات الامينوملايكوسيدات للجينات المشفرة لعوامل الضراوة فيها أنزيم اليوريز *ureC* و امتلاك الأهلاب الجين *mrpA* والأسواط الجين *flaA* وأنزيم الهيمولايسين الجين *hpmA* وتكوين الغشاء الحيوي الجين *luxS* ، إذْ كانت أعلى نسبة لوجود جينات الضراوة للجين *flaA* .

7- امتلاك 20 عزلة بكتيرية قيد الدراسة على جينات مشفرة لأنزيمات المحورة الامينوكلايكوسيدات المقاومة لهذه المضادات وهي : *aac(3)-Ia* و *aac(6')-Ib* و *ant(4')-IIa* و *ant(2'')-Ia* و *aph(3'')-Ib* ، حيث كانت أعلى نسبة لوجود الجين هو *ant(2'')-Ia* و *aph(3'')-Ib* .

8- أظهرت نتائج الدراسة الحالية بالإمكان فقدان البلازميدات بأستعمال مادة SDS مما افقدت العزلات قيد الدراسة بعضاً من صفات المقاومة للمضادات الحياتية وإنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز .

التوصيات :

1- إجراء المزيد من الدراسات على بكتريا *P.mirabilis* وفيما يخص عوامل الضراوة المتعلقة بإمراضيتها بأستعمال التقنيات الحديثة الأكثر تطوراً مثل تقنية Real time PCR .

2- ضرورة أجراء فحص الحساسية للعزلات البكتيرية قبل إعطاء العلاج للمرضى من أجل اختبار المضاد المناسب لعلاج الخمج ذو التأثير الفعال في البكتريا مع التقييد بأخذ الجرع العلاجية كاملة لتلافي حصول أي مضاعفات من عدم اخذ العلاج كاملاً .

3- يجب تقييم العلاقة بين العلاج بالمضادات الحياتية وإنتاج عوامل الضراوة المختلفة من خلال إجراء دراسات لجينات عوامل الضراوة وجينات المقاومة للمضادات الحياتية لهذه البكتريا والأنواع الأخرى من البكتريا.

4- الكشف عن الجينات المقاومة للامينوكلايكوسيدات في البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام .

5- إجراء تجارب التحييد على العزلات البكتيرية للتعرف على البلازميدات المفقودة وغير المفقودة التي تحمل صفة المقاومة للمضادات الحياتية وإنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز .

6- توصي الدراسة على دور الوعي الصحي والعناية بالنظافة العامة للحد من عوامل الضراوة والجينات المقاومة للمضادات التي تتعلق بهذه البكتريا والانتباه إلى عدم الاستعمال العشوائي للمضادات الحياتية الا بإستشارة الطبيب لتلافي ظهور السلالات المقاومة لتلك المضادات .

المصادر

References

المصادر

المصادر العربية :

إسماعيل، سعيد محمد عوض (2004). استخلاص وتوصيف إنزيم اليوريز من بكتريا المتقلبات المعزولة من مرضى خمج المسالك البولية في اليمن. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية. العراق.

الجبوري ، رسمية عمر سلطان (2000) . التحري عن انزيمات بيتالاكتاميز لعدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة اكرام المعزولة سريرياً وتأثير بعض المركبات الكمياوية المحضرة على هذه الجراثيم . رسالة ماجستير، كلية العلوم - جامعة الموصل / العراق .

الجناحي ،مروة راهي عبد المنعم. (2013).دراسة وراثية لبكتريا *Proteus mirabilis* المسببة لالتهاب المجاري البولية في الاطفال .رسالة ماجستير ،كلية التربية .جامعة القادسية.

حامد ، نوار هلال (2001) . ازالة مقاومة الجرثومة *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات مرضية مختلفة في الإنسان للمضادات الحيوية بآستخدام مواد كيمياوية وعوامل فيزياوية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم - جامعة الموصل .

الحسيني ، رعد خليل وعبد اللطيف ، رغد والجوفي ،اقبال خضر(2009) . دراسة انتاجية بعض عوامل الضراوة لبعض البكتريا المعزولة من ردهات الاطفال الخدج. مجلة علوم المستنصرية.2(20).

خلف ، صبحي حسين وكاظم ، بشرى علي (2009) . عزل ودراسة مرضية لجرثومة *Proteus mirabilis* . مجلة بغداد للعلوم . مجلد 7 (1) .

خلف ، صبحي حسين وكاظم ، بشرى علي.(2011).دراسة عن تنميط جرثوبة *Proteus mirabilis* المعزولة من المسالك البولية . مجلة بغداد للعلوم.9(2).

خورشيد، ثري أحمد (2005). دراسة جرثومية لبعض مسببات أخماج المسلك البولي للمرضى في مستشفى آزادي العام في مدينة كركوك. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة تكريت. العراق.

الدباغ، أيمن غانم أمين إسماعيل (2000). التهابات المجاري البولية لدى الأطفال دون الخامسة وعلاقة ذلك بسوء التغذية وبعض المتغيرات الحيوية في محافظة نينوى. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الموصل. العراق.

رزوقي ، بروج محمد وعباس ، عدويه فاضل وفرحان ، عباس عبود (2010) . دراسة لبعض عوامل الفوعة للمسببات الجرثومية لخمج الأذن الوسطى وتأثير المادة الشمعية للأذن. مجلة ديالى للعلوم الصرفة 6 (2) .

رشيد ، ايناس هاشم (2012) . تحليل البصمة الوراثية ومدى حجيتها القانونية في مسائل الاثبات القانوني (دراسة مقارنة) كلية القانون جامعة كربلاء . مجلة رسالة الحقوق ، 4 (2) .

السراج، لبنى صلاح الدين (2007). دراسة تأثير ليزر الدايود على المحتوى البلازميدي وبعض الخصائص لبكتريا *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* المعزولة محلياً. رسالة ماجستير. معهد الليزر للدراسات العليا. جامعة بغداد. العراق.

السعدي، حسن علي حسين (2001). تأثير البروتين الخام المستخلص من بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من خمج الأذن الوسطى على الخلايا المناعية. رسالة ماجستير. كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.

سلمان ، آفاق رشيد (2008) . فوعة بعض انواع المتقلبات *Proteus* spp المعزولة من خمج الاذن الوسطى في بعقوية وضواحيها. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة ديالى.

الطائي، كرامة تحرير أحمد (2002). دراسة تصنيفية وجزيئية لبعض عوامل الضراوة للبكتريا الممرضة *Proteus mirabilis* . رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد. العراق.

طعمة، منير عبد الرسول (2006). دراسة في التهاب المجاري البولية عند الأطفال دون سن الخامسة من العمر في مستشفى الأطفال في كربلاء. رسالة ماجستير. كلية الطب. جامعة بابل. العراق.

عباس ، ياس خضير وكاظم ، ايناس رزاق (2014) . عزل وتشخيص بعض أنواع الاحياء المجهرية المسببة لإصابات القناة التناسلية الانثوية ودراسة التأثير التثبيطي لبعض المستخلصات النباتية والمضادات الحياتية عليها . مجلة جامعة ذي قار . المجلد 9 (1) .

العبيدي، رغد عبد اللطيف عبد الرزاق (2006) . دراسة بعض عوامل الضراوة للبكتريا المعزولة من ردهات الأطفال الخدج ومقاومتها لمضادات الحياة والمطهرات . رسالة ماجستير. الجامعة المستنصرية / كلية العلوم .

العزاوي ، عدنان نعمة عبد الرضا والطائي ، هادي رحمن رشيد والرجب ، أبراهيم عدنان محمود (2015) . دراسة بكتريولوجية لبكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من أصابات سريرية مختلفة في مدينة المقدادية . مجلة ديالى للعلوم الصرفة. 11 (2) .

علي ، هند حسين (2015) . دراسة جزيئية لبعض عوامل الضراوة لبكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية في محافظة القادسية . رسالة ماجستير. كلية العلوم . جامعة القادسية .

الفحام ، محمد عبد الأخوة حسن (1997) . تنسل الشدقة C من مطثيات الكزاز والتعبير عنها في ايشرشيا القولون . أطروحة دكتوراه . كلية الطب البيطري - جامعة بغداد .

فرج ، ديمة نزار ، غنيمه ، قيس قاسم (2010) . تحييد البلازميد لبكتريا *Klebsiella Pneumoniae* المعزولة محلياً من التهابات المجاري البولية ودوره في المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية . المجلة العراقية للعلوم . المجلد 51 ، العدد 3 . ص 415 – 421 .

كاظم، بشرى علي (2005). عزل ودراسة مرضية لجرثومة *Proteus mirabilis*. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الموصل. العراق.

كاظم، بشرى علي وخلف ،حسين خلف (2012) . دراسة عن تنميط جرثومة بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من اصابات المسالك البولية ،مجلة بغداد للعلوم 9(2):229 كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .

كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .

المرجاني، محمد فرج شذر (2000). دراسة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وبعض عوامل الضراوة لبكتريا *Proteus mirabilis* المسببة لإلتهابات المجاري البولية في الانسان. (دراسة وراثية جزيئية). رسالة ماجستير. كلية العلوم- الجامعة المستنصرية.

الموسوي، أزهار نوري حسين (2006). العزل والتثبيت الوراثي للخمج البكتيري والفطري في المسالك البولية وعلاقته بمرض السكري بين النساء الحوامل في محافظة القادسية. أطروحة دكتوراه. كلية التربية. جامعة القادسية. العراق.

الموسوي، بتول كاظم سلمان (2000). عزل وتشخيص بعض البكتريا السالبة لصبغة كرام من خمجات جروح العمليات الجراحية ودراسة التأثير الخلطي للمضادات الحيوية (دراسة وراثية). رسالة ماجستير. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية. العراق.

النعيمي ، ابتهال محمد زاهد (2002) . الاخماج البولية عند النساء الحوامل . رسالة ماجستير . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .

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.

المصادر الاجنبية :

Abbas , K.F. ; Al-Khafaji , J.K. and Al-Shukri , M.S. (2015) . Molecular Detection of some Virulence Genes in *Proteus mirabilis* Isolation from Hilla province . International J. of research studies in Biosciences (IJRSB) , Vol. 3(10) , pp: 85-89 .

Abbott , S.L. (2007) . Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae. In:Manual of Clinical Microbiology, Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Landry M. L. and Pfaller, M. A.(eds.) 9th ed. ASM Press. Washington. USA, pp. 698-711 .

Abdulghani , S.T. (2012) . The out come of the Misuse of 3rd Generation Cephalosporins In Fallujah City, West of Iraq. Al-Anbar Med. J.,Vol.10(2), pp: 46-50.

Abed-Wahed , B.; AL-Husane , R. and AL-Zaa´k , A. (2001). Isolated and identification of bacteria caused UTIs and its ability to urease and hemolysin production. J. AL-Mustanseriah Sci. 12:13.

Abraham , Y. and Wamisho , B. (2009) . Microbial susceptibility of bacteria isolated from open fracture wounds presenting to the ear of black-lion hospital, Addis Ababa University. Ethiopia J. Microbiol. Res.,Vol. 3(12), pp: 939 – 951.

Abril, C.; Brodard, I. and Perreten, V. (2010). Two novel antibiotic resistance genes, *tet (44)* and *ant(6)-Ib*, are located within a transferable pathogenicity island in *Campylobacter fetu*s subsp. fetus. Antimicrob. Agents Chemother., Vol.54, pp:3052–3055.

Adams , M.D. ; Goglin , K. ; Molyneaux , N. ; Hujer , K.M. ; *et al.* (2008). Comparative genome sequence analysis of multidrug-

resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Bacteriol., Vol.190, pp:8053–8064.

Aghazadeh , M. ; Hojabri ,Z. ; Mahdian ,R. ; Nahaei ,M.R. ; Rahmati , M. ; Hojabri ,T. ; Pirzadeh ,T. and Pajand,O. (2014). Role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY (-OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in non-metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and burn patients. Infection, Genetics and Evolution., Vol. 24, pp:187-192.

Alamuri , P.; Eaton, K.A.; Himpsl, S.D.; Smith, S.N. and Mobley, H.L.T. (2009). Vaccination with *Proteus* toxic agglutinin, a hemolysin-independent cytotoxin *in vivo*, protects against *Proteus mirabilis* urinary tract infection. Infect. Immun., Vol.77, pp: 632-641.

AL-Autbi, D. A. K. (2013). Bacteriological study of some species of Enterobacteriaceae isolated from Hospital birth rooms in Baquba city. Thesis. Diyala University.

Al-Bassam , W.W. and Al- Kazaz , A. (2013). The isolation and Characterization of *Proteus mirabilis* from different clinical Samples . J. of Biotechnology Research center ,Vol .7 (2) .

AL-baytti , S. A. K. (2010). A bacteriological and genetic studies of *Proteus* spp. Caused urinary tract infection in Tikrit district. Thesis. University of Tikrit.

Al-Duliami , A.A. ; Nauman , N.G. ; Hasan , AR.SH. ; Al-Azawi , Z.H. (2011). Virulence Factors of *Protues mirabilis* Isolated From Patients Otitis Media in Baquba And it's Peripheries. Diyala J. of Med., Vol. 1(1), pp: 69-75.

Ali ,O.A.(2012). Prevention of *Proteus mirabilis* Biofilm by Surfactant Solution. Egypt. Acad. J. Biolog. Sci., Vol. 4(1), pp: 1- 8.

Al-khateeb , A. F. (2014) . Role of *Proteus mirabilis* DNA in Comparison to *Candida albicans* DNA in rats' joints infection. M. SC.Thesis.

Almalki , M.N. (2011). bacteriology and antibacterial susceptibility of tonsillopharyngitis and chronic suppurative otitis media cross sectional study in al.habobi hospital-thi-qar. Thi-Qar Med. J., Vol. 5(1), pp: 118-125.

AL-Mayahi , F.SA. (2017) . Phenotypic and Molecular detection of virulence factors in *proteus mirabilis* isolated from different clinical sources . Collage of science – Al-Qadisiya Universty.

Al-Muhannak , F.H.N. (2010). Spread of some Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Clinical Isolates of Gram-Negative Bacilli in Najaf. M.Sc. Thesis. College of medicine. Kufa university.

AL-Taai , H.R.R. (2005). Bacteriological, Biochemical and Molecular Study of *Proteus mirabilis* Isolated from Urinary Tract Infections in some Hospitals of Baghdad City. Thesis. AL-Mustansiriya University.

AL-Taie , A.A.D; Abdulla , B.A. ; Hussein , A.S. (2007). Bacterial Sensitivity and Resistance Which Isolated From Burns To Chemotherapy Agents In Mosul City. , Vol(1)12, pp: 184-191.

AL-thwani , A.N. ; Mohamed , B. J. (2010) . Detection of pathogenic bacteria and mixed infections with yeasts which cause vaginitis and Its relationship with age in Iraqi women ؛Iraqi J. of Sci., Vol.51(4), pp: 577-581.

Alwan , M.J. ; Lafta , I.J. ; Hamzah , A.M. (2001) . Bacterial isolation from burn wound infections and studying their antimicrobial Susceptibility . Kufa J. for Veterinary Med. Sci., Vol. 2 (1) .

Andersson , D.I and Hughes , D. (2011) . Peresistence of antibiotic resistance in bacterial Populations . FEMS Microbiol.Rev. , Vol. 35, pp: 901-911 .

A-Neddawi , T.H. (2015) . Correlation between virulence factor and biofilm formation in *proteus mirabilis* spp. Iraqi J. of Sci. , Vol . 56 (2) , pp : 1675- 1681 .

Armbruster , C.E. ; Hodges , SA. And Mobley , HL. (2013) . Initiation of Swarming motility by *proteus mirabilis* occurs in response to specific cues present in urine and requires excess L-Glutamine J. of Bacteriol. , Vol.195(6), pp : 1305-1319 .

Armbruster , C.E. and Mobley, H.L.T. (2012) . Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis* , Nature Rev. Microbiol., Vol. 10, 743–754.

Arya , D.P. (2007). Aminoglycoside antibiotics From chemical biology to drug discovery. Wiley- Interscience .

Atlas , R.M. ; Parks , L.C. ; and Brown , A.E. (1995) . Laboratory Manual of Experimental Microbiology. 1st ed. Mosby-Year book company. USA.

Bahashwan , S.A. And El-Shafey , H.M. (2013) . Antimicrobial Resistance Patterns Of *Proteus* Isolates From Clinical Specimens . European Sci. J.,Vol. 9 (27) . Taibah University , Al Madinah Al Munawara .

Bahrani, F.K. and Mobley, H.L.T. (1994) . *Proteus mirabilis* MR/P fimbrial operon: genetic organization, nucleotide sequence, and conditions for expression. J. Bacteriol., Vol. 176, pp:3412–3419.

Baldo , C. and Rocha , SP.D. (2014) . Virulence factors of Uropathogenic *proteus mirabilis* – A Mini review . J. of Sci. and Technology reseach , Vol. 3 (11) .

Baron , E.J. ; Chang, R. S. ; Haward, D.H. ; Miller , J.N. and Turner, J.A. (1994). Medical Microbiology: A Short Course. 2nd ed. Mosby Comp. USA.

Barrow ,G.I. and Felthan , R.K.A. (2003). Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd Ed. Cambridge University Press. Cambridge UK., pp: 351-353.

Battikhi , M.N. and Ammar , S.I. (2004). Otitis externa infection in Jordan. Clinical and microbiological features. Saudi. Med. J., Vol. 25(9), pp:1199-1203.

Bauer , A.W. ; Kirby, W.M.M. ; Sheris , J.C. and Truck , M.(1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol.,Vol. 45, pp: 493 – 496.

Belas , R., Suvanasuthi, R. (2005). The ability of Proteus mirabilis to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. J. Bacteriol. , Vol.187, pp: 6789–6803.

Belas , R. ; Manos , J. and Suvanasuthi. R. (2004) . *Proteus mirabilis* Zap A metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides . Infect. Immun., Vol.72(9) , pp :5159-5167.

Benson , H.J. (2002). Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology 8thed .The McGraw-Hill Companies USA.

Blair , JM.A. ; Webber , M.A. ; Baylay , A.J. ; Ogbolu , D.O. and paddock , LJ.V. (2014) . Molecular mechanisms of antibiotic resistance . Advance of nature reviews Microbiology .

Bode , N.J. ; Chan , K.W. ; Kong , X.P. and Pearson , M.M. (2016) . Distinct residues contribute to motility repression and autoregulation in the *Proteus mirabilis* fimbria-associated transcriptional regulator AtfJ. J. of Bacteriol. ,Vol. 198(15), pp : 2100-2112.

Brooks , G.F. ; Carroll , K.C. ; Butel , J.S. and Morse , S. A. (2007) . Jawets, Melnick, Adelberg's Medical microbiology. 24th ed. McGraw-Hill com. PP. 174.

Broomfield , R.J. ; Morgan , S.D.; Khan , A. and Stickler, D.J. (2009). Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens : a simple method of control. J . Med Microbiol., Vol. 58(10), pp : 1367–1375.

Brown , A . (2007) . Bensons Microbiological application laboratory manual in general microbiology . McGraw –Hill Co.INC. USA . pp:102 -263.

Buchanan, R.E. and Gibbons, N. E. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. William and Wilkins Comp. Baltimore, USA.

Burton , ME. ; Shaw , LM. ; Schentag , JJ. and Evans , WE. (2006) . eds. Applied Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Fourth edn. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins .

Bush , K. ; Jacoby,G. and Medeiros A. (1995). A functional class-ification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother.,Vol. 39(6), pp:1211-1233.

Campos , M.A. ; Vavgas, M.A. ; Regueiro , V. ; Albert , S. and Bengoechea, J.A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. J. Infect. Immun., Vol.72(12), pp : 7107-7114.

Carter , E.L. ; Proshlyakov , D.A. and Hausinger , R.P. (2011) . Apoprotein isolation and activation, and vibrational structure of the *Helicobacter mustelae* iron urease. J. Inorg. Biochem., Vol. 111, pp:195-202 .

Cascales , E. and Christie , P.J. (2004). Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. Sci., Vol. 304, pp : 1170-1173.

Centron , D. and Roy , P.H. (2002). Presence of a group II intron in a multiresistant *Serratia marcescens* strain that harbors three integrons and a novel gene fusion. Antimicrob. Agents Chemother. ,Vol. 46, pp:1402– 1409.

Cestari , S.E.; *et al.*(2013) . Molecular detection of HpmA and HlyA hemolysin of uropathogenic *Proteus mirabilis*. Curr. Microbiol., Vol. 67, pp:703–707 .

Chaudhary , U. and Aggarwal , R.(2004). Extended spectrum β-lacta-mases (ESBL) - an emerging threat to clinical therapeutics. Indian J. Med. Microbiol.,Vol. 22(2), pp:75-80.

Chen , I. ; Provved, R. and Dubnau, D. (2006) . A macromolecular complex formed by a pilin-like protein in competent Bacillus subtilis. J. Biol. Chem, Vol. 281, pp: 21720-21727.

Chen , I. and Dubnau, D. (2004) . DNA uptake during bacterial transformation. Nat. Rev. Microbiol., Vol. 2, pp: 241-249.

Chen , I. ; Christie , P.J. and Dubnau , D. (2005) . The ins and outs of DNA transfer in bacteria . Sci., Vol. 310, pp: 1456-1460.

Chippendale , G.R. ; Warren, J.W. ; Trifillis , A.L. and Mobley, H.L.T. (1994) . Internalization of *Proteus mirabilis* by human renal epithelial cells. Infect. Immun.,Vol. 62, pp: 3115–3121.

Chlabicz , S. ; Leszczyńska , K. ; Lukas , W. ; Gualco , L. ; Schito , G. ; Naber , K.G. (2011) . Uncomplictaed lower urinary tract infections in females-clinical aspects, aetiology and antimicrobial resistance epidemiology. Results of the ARESC (Antimicrobial Resistance Epidemiological Survey on Cystitis) study in Poland on their implications for empiric therapy. Przegl. Epidemiol. ,Vol.65, pp: 345– 351.

Chuanchuen , R. ; Karkhoff-Schweizer , R.R. and Schweizer, H.P. (2003) . High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely a result of efflux. Am. J. Infect. Control Vol.31, pp:124–127 .

Clatworthy , AE. ; Pierson , E. and Hung DT. (2007) . Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. Nat. Chem. Biol., Vol. 3(9) , pp: 541–548 .

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)/NCCLS.(2005) . Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 (ISBN1-56238-556-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA .

CLSI , clinical and laboratory standards institute. (2012) : Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement. M 100-S22., Wayne, Pa; 32 (3).

CLSI , clinical and laboratory standards institute (2016).Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th

informational supplement. M100-S25., Wayne, pa; 97-233.

CLSI , clinicaland laboratory standards institute.(2010) :Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement. M 100-S20., Wayne, Pa; 30 (1).

Coker , C. ; Poore , C.A. ; Li , X . and Mobley, H.L. (2000). Pathogenesis of Proteus mirabilis urinary tract infection. Microbes Infect., Vol. 2(12), pp:1497-1505 .

Collee , J.C. ; Fraser , A.G. ; Marmiam , B.P. and Simmon , S.A. (1996). Mackie and McCartney; Practical Medical Microbiology. 24th ed. The Churchill Livingstone. Inc. USA .

Cook , S.W. ; Mody , N. ; Valle , J. and Hull, R. (1995) . Molecular cloning of *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adherence (*uca*) genes. Infect. Immun , Vol.63, pp:2082–2086.

Coque , T.M. ; Baquero , F. and Canton , R. (2008). Increasing prevalence of ESBL - producing Enterobacteriaceae in Europe. Eurosurveillance, Vol. 13(47), pp:1-40.

Costerton , **J.W.; Stewart, P.S. and Greenberg , E.P.(1999**) . Bacterial common cause of persistent infections. Sci., Vol. 284, pp:1318 - 1322.

Coyne , S. ; Courvalin , P. and Galimand , M. (2010). Acquisition of multidrug resistance transposon Tn6061 and IS6100-mediated large chromosomal inversions in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Microbiol.,Vol.156, pp:1448–1458 .

Cruickshank , R.; Duguid , J.P.; Marmion , B.P. and Swain , R.H.A. (1975). Medical Microbiology .The practice of Medical Microbiology. 12th ed ., Vol. 2, Churchill Livingstone , Edinburgh, London and New York.

Curtin, J.W. and Donlan , R.M. (2006). Using bacteriophages to reduce forming of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents. Chemother., Vol.50, pp:1268-1275.

Daly, K.A. ; Rovers, M.M. ; Hoffman ,H.J. ; Uhari , M. ; Casselbrant, M.L. ; *et al.* (2005). Recent advances in otitis media. 1. Epidemiology, natural history, and risk factors. Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology., Vol.194, pp:8-15.

Dattelbaum , J.D. ; Lockatell , C.V.; Johnson , D.E. ; Harry , L. and Mobley ,T. (2003). UreR , the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster is required for urease activity and virulence in experimental urinary tract infections. Infections and Immunity.,Vol.71(2), pp:1026-1030.

De Charvalho , C. R. (2007). Biofilms : Recent developments on an old battle. Recent patents. J. Biotechnol., Vol.1, pp: 49-57.

Delzell , J.E and Lefevre , M.L. (2000) . Urinary tract infection During pregnancy The American Academy of family physicians .

Dharmadhikari , S.M. ; and Peshwe, A.S. (2009). Molecular level studies on multiple antibiotic and serum resistance in UTI pathogens.Indian J.Biotechnol.,Vol. 8, pp: 40-50.

Distler , J. ; Ebert , A. ; Mansouri , K. ; Pissowotzki , K. ; Stockmann , M. and Piepersberg, W. (1987) . Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. Nucleic Acids Res., Vol.15(19), pp:8041-8056.

Dominguez ,W. and O'Sullivan , DJ. (2013) . Developing an effic- ient and reproducible conjugation-based gene transfer system for biofilm bacteria . Microbiol. Rev., Vol.159, pp:328 -338 .

Drancourt , M. ; Bollet , C.; Carlioz , A. ; Martelin , R. ; Gayral , J-P. and Raoult, D. (2000) . 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J. Clin. Microbiol., Vol. 38, pp: 3623-3630.

Dubois ,V. ; Arpin ,C. ; Dupart ,V. ; Scavelli , A. ; Coulange , L.; Andre, C.; *et al.*(2008). B-lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). J. Antimicrob. Chemother.,Vol. 62, pp:316–323.

El.Hakeem , R.A. (2015) . Phemotypic and genotypic study on different *proteus* species isolated from Dakahleia and Damietta Governorates . Moster thesis Faculty of pharmacy , Mansoura University .

El-Bakkali , M. ; Chaoui , I. ; Zouhdi , M. ; Melloui , M. ; Arakrak , A. ; Elfahime , E. ; El-Mzibri , M. and Laglaoui , A.(2013) . Comparison of the conventional technique and *16S* rRNA gene Sequencing method in identification of clinical and Hospital environmental isolates in Morocco . African J. of Microbiol. Res. , Vol.7(50) , pp:5637-5644 .

Elder, J.S.(2004) .Urinary disorders in infants and children,In: Nelson Textbook of Pediatrics, Behrman, R.E.; Kleigman, R.M.; Jenson, H.B.(eds), 17th ed. , Saunders, New Delhi., pp : 1785-1789.

El-Mansi , M. ; Karen, J.A. ; Craig , A.I.; Inche , L.K. ; Linda , K.K. and David , J.P.(2000) . Isolation and curing of the *Klebsiella* species large indigenous plasmid using SDS. Microbiol., Vol.151(3), pp:201–208.

Emdy , L. ; Kerenyi , M. and Nagy , G. (2003) . Viruience factors of uropathogenic *E.coli* . Inter. J. Am. Ag., Vol.22(2), pp:29-33.

Endimiani , A. ; Luzzaro , F. ; Brigante ,G. ; Perilli , M. ; Lombardi ,G. ; *et al.* (2005). *Proteus mirabilis* bloodstream infections : risk factors and treatment outcome related to the expression of extended-spectrum β-Lactamases. Antimicrob . Agents. Chem-other., Vol.49(7), pp:2598-2605.

Feglo , P.K ; Gbedema, S.Y. ; Qaury, S.N.A. ; Adu-Sarkodie , Y. and Opoku-Okrah C. (2010). Occurrence, species distribution and antibiotic resistance of *Proteus* isolates: A case study at the Komfo Anokye Teaching Hospital (KATH) in Ghana. Inter. J. Pharm. Sci.Vol.1(9), pp:347-352.

Feldman , MB. ; Terry , DS. ; Altman , RB. And Blanchard, SC. (2010) . Aminoglycoside activity observed on single pre-translocation ribosome complexes. Nat Chem Biol., Vol. 6, p:244.

Flores-Mireles , A.L. ; Walker , J.N. ; Caparon , M. and Hultgren , S.J. (2015) . Urinary tract infections : epidemiology , mechanisms of infection and treatment options . Nature reviews Microbio-logy , university school of Medicine , Vol. 13 .

Fluit , A.C. ; Visser , M.R. and Schmitz , F.J. (2001) . Molecular dete-ction of antimicrobial resistance. Clin. Microbiol . Rev.,Vol. 41(4), pp:836-871.

Forbes , B.A. ; Sahm , D.F. and Weissfeld , A.S. (2007) . Diagnostic Microbiology. 12th ed. Baileyand Scotts'. Mosby Elsevier. China., pp: 93-247.

Forbes , B.A. ; Sahm , D.F. and Weissfeld , A.S. (1998) . Bailey and Scott’s Diagnostic Microbiology .10th ed . Mosby , Inc .

Foxman , B. (2014) . Urinary tract infection syndromes : occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. Infect. Dis. Clin. North Amer., Vol 28(1) ,pp:1-13.

Fraser , G.M. ; Claret , L. ; Furness , R. ; Gupta, S. ; Hughes, C. (2002). Swarmingcoupled expression of the *Proteus mirabilis hpmBA* hemolysin operon. Microbiol., Vol.148, pp: 2191-201.

Fujihara , M. ; Obara , H. ; Watanabe , Y. ; Ono , H.K. ; Sasaki J. ; Goryo , M. and Harasawa , R. (2011). Acidic environments induce differentiation of *Proteus mirabilis* into swarmer morphotypes. Microbiol. Immunol., Vol. 55, pp: 489-493.

Gaastra , W. ; Van Oosterom , R.A. ; Pieters, E.W. ; Bergmans , H.E. ; Van Dijk , L. ; Agnes , A. and Ter Huurne , H.M. (1996) . Isolation and characterisation of dog uropathogenic *Proteus mirabilis* strains, Veterinary Microbiol., Vol. 48, pp. 57-71 .

Gad , G.F. ; Mohamed , H.A. and Ashour , H.M. (2011) . Amino-glycoside resistance rates , phenotypes , and mechanisms of Gram-Negative bacteria from infected patients in Upper Egypt .J. plos one tenth anniversary .

Galimand , M. ; Courvalin, P. and Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in enterob-acteriaceae due to *16S* r RNA methylation. Antimicrob. Agents chemother., Vol.47, pp: 2565-2571.

Gangoue-Pieboji , J. ; Koulla-Shiro , S. ; Ngassam , P. ; *et al.* (2006). Antimicrobial activity against gram negative bacilli from Yaounde Central Hospital , Cameroon. Afr. Health Sci. ,Vol 6(4), pp: 232-235.

Gendlina , I. ; Gutman , D.M. ; Thomas , V. and Collins , C.M. (2002). Urea dependent signal transduction by the virulence

regulator UreR. J. Biol. Chem.,Vol. 277(40), pp:37349-37358.

George , K.M. (2012) . Effect of antimicrobial agents on oral microorganisms . Dissertattion ,Charles Univeristy in prague Faculty of Medicine Hradec kralove .

Giammanco , G.M. ; Grimont , P.A. ; Grimont , F.; Lefevre , M. ; Gibbs , K.A. ; Wenren , L.M. and Greenberg , E.P. (2011). Identity gene expression in *Proteus mirabilis* J. Bacteriol. ,Vol. 193(13), pp: 3286–3292.

Gilbert , D.N. (2000). Principles and practice of infectious diseases, aminoglycosides. Churchill Livingstone. New York.,pp: 307–336.

Gionechetti , F. ; Zucca , P. ; Gombac , F. ; Monti Bragadin , C. ; Lagatolla , C. ; Tonin , E. ; Edalucci , E. ; Vitali , L.A. and Dolzani , L. (2008). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from med-iterranean herring gulls (Larus cachinnans). Microb. Drug Resist.,Vol.14, pp:93–99.

Giovanni , M. ; Pactrick , A. ; Germont , F. ; Lefevre , M. and Pignato , S. (2011) . Phylogenetic analysis of the genera *proteus*, *morganella* and *providencia* by comparison of *rPoB* gene sequences of type and clinical strains *myxofaciens* in new genes systematic and evolutionary *inv* gene in isolated *salmonella* from broilers by PCR method. Int. J., Vol. 4(8), pp: 557 – 559.

Greenwood , D. ; Slack , R.C.B. and Peuthere , J.F. (2002). Medical Microbiology. A guide to microbial infections , pathogenesis , immunity , laboratory diagnosis and control. 16th ed. Edinburl, London , New York , Philadephia , Sydney , Toronto.

Greer , N.D. (2009) **.** Tigecycline (tygacil): the firstin the glycylcy-clineclass of antibiotics.proc, (Bayl univ med cent).,Vol. 19 (2): pp: 155-61.

Gue , M.; Duport, V. ; Dufour , A. and Sire , O. (2001). Bacterial swarming: a biochemical time-resolved FTIR-ATR studt of *Proteus mirabilis* swarm-cell differentiation. J. Biochem.,Vol. 40(39), pp: 11938-45.

Hafidh , M.A. ; Keogh , I. ; Walsh , R.M. ; Walsh , M. and Rawluk , D.(2006) . Otogenic intracranial complications: a 7-year retros-pective. Am.J. otolaryngol., Vol.27(6), pp:390-395.

Haldorsen , B.C. (2011) . Amionglycoside reaistance in clinical Gram-negative isolation from Norway . Master thesis in Medical biology , Faculty of Health Sciences , University of Troms .

Hamoshi , R.M.D. (2004). Inhibitory Effect of some medicinal plants on Staphylococcus aureus isolated from different cutaneous infections. Thesis Submitted. Mosul University.

Han , Q. *et al.* (2005) . Molecular recognition by glycoside pseudo base pairs and triples in an apramycin-RNA complex. Angew Chem Int Ed Engl, Vol. 44 , pp :2694–2700 .

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

Hassan ,Talib Falah. (2008). Study of *Proteus mirablis* Infections in AL-Nassiria City. J. of Thi-Qar University., Vol 4(3) , p: 9.

Hatt , J.K. and Rather , P.N. (2008). Characterization of novel gene, *wosA*, regulating FlhDC expression in *Proteus mirabilis*. J. Bacteriol. , Vol.190, pp: 1946-1955.

Hawkey , P. and Munday , C. (2004). Multiple resistance in Gram-negative bacteria. Lippincott Williams and Wilkins. Rev. Med. Microbiol., Vol. 15(2).

Hawser , SP.; Bouchillon , SK. ; Hoban , DJ. and Badal, RE. (2009) . In vitro susceptibilities of aerobic and facultative anaerobic Gram-negative bacilli from patients with intra-abdominal infections worldwide from 2005–2007: results from the SMART study. Int. J. Antimicrob. Agents., Vol. 34, pp: 585-588 .

Hemlin , C. ; Brauner , A. ; Carenfelt , C. and Wrerlind , B. (1994) . Nasopharyngeal flora in otitis media with effusion: Acoma-rative semi quantitative analysis. Acta. Otolaryngol. ,Vol. 111(3), p: 556 .

Herisse , M. ; Duverger , Y. ; Verstraete , I.M. ; Barras , F. and Ezraty , B. (2017) . Sliver potentiates aminoglycoside toxicity by enhancing their up take . US National Library of Medicin National institutes of health .

Hoberman , A. and Paradise, I.L. (2000) . Acute otitis media: diagnosis and management in the year 2000. Pediatr. Ann., Vol.29(6), pp: 609-620.

Holt , J.G. ; Kreig , N.R. ; Sheath , P.H. ; Staley, J.T. and Williams , S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins. USA., PP: 532 - 553.

Houghton, J. L.; Green, K.D. ; Chen, W. and Garneau-Tsodikova , S. (2010) . The future of aminoglycosides: The end or renaissance? Chem. Biochem., Vol. 11, pp:880-902.

Hussien , Ahmed Aleiwi (2013). Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase in *Proteus .mirablis* isolation from

Patients With Significat Bacteriuria in Najaf Provina.QMJ. , Vol.16(9), pp:149.

Isaacs , F.J. ; Carr , P.A. ; Wang, H.H. ; Lajoie , M.J. ; Sterling , B. ; Kraal , L. ; Tolonen, A. C. ; Gianoulis , T.A. ; Goodman , D.B.; *et al.* (2011) . Precise manipulation of chromosomes in vivo enables genome-wide codon replacement. Sci., Vol. 333, pp : 348-353.

Jacobsen , S.M. and Shirtliff, M.E. (2011) . *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. Virulence , Vol 2, pp: 460-465 .

Jacobsen , S.M. ; Stickler , D.J. ; Mobley, H.L.T. and Shirtliff, M.E. (2008) . Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clin. Microbiol. Rev.,Vol. 21(1), pp: 26-59.

Jacoby, G.A. (1994) . Properties of plasmids responsible for production of extended spectrum beta–lactamase. Eur. J. Clin. Infect. ,Vol. 13(51), pp: 2-11.

Jaloob , A. A. and Gafil, F. A. (2012). Effect of some antibiotics on aerobic pathogenic bacteria causing otitis media and urinary tract infection in AlManathera city in Iraq: A comparative in vitro study**.** Q. M. J. , Vol.8(13), pp: 156-168.

Jana , S. and Deb, JK. (2006) . Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.70 , pp: 140-150 .

Janda , J.M. and Abbot , S.L. (2006) . The Enterobacteriaceae. ASM Press. Washington. pp : 233-259.

Jansen , B.V. ; Lockatell , C.V. ; Johnson , D.E. and Mobley, H.L.T. (2003). Visualisation of *Proteus mirabilis* morphotypes in the

urinary tract: the elongated swarmer cell is rarely observed in ascending urinary tract infection. Infect. Immun., Vol.71, pp: 3607-3613.

Jansen , A.M. ; Lockatell ,V. ; Johnson , D.E. and Mobley , H.L. (2004). Mannos-resistant *Proteus*–like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract , dictate the *In vivo* localization of bacteria and contribute to biofilm formation. Infect. Immun., Vol.72(12), pp:7294-7305.

Jawetz , E. ; J.K. Melnick and E.A. Adelberg (1998). Enterobacteri - aceae in medical microbiology review. 12th ed. Apelton and large , Middle eastol Libravie Dublin , Beirut. pp:223-224.

Jefferson , L. S. ; Macedo , S. ; Simone , C. R. and Castro , C. (2003) . Sepsis in burned patients. Med. Trop.,Vol.36(6), pp: 647-652.

Jian-Ke , W. ; Yue-ning , C. ; Li , Y. ; Hang , 10 Z ; peng , L. ; Ming-wei , T. and Shi-peng ,C. (2015) . Isolation , Identification of Mink *proteus mirabilis* and Sequence Analysis of *16S* rRNA gene . J. of China animal Husbandry and Veterinary Medicine .

Johnsbory , O. ; Eldholm , V. and Havarstein , L.S. (2007) . Natural genetic transformation : prevalence , mechanisms and function . Res. in Microbiol. ,Vol.158,pp: 767-778 .

Jones , C.H. ; Pinkner , J.S. ; Roth , R. ; Heuser , J. ; Nicholes , A.V.; Abraham, S. and Hultgren, S. J. (1995). FimH adhesin of type 1 piliis assembled into a fibrillar tip structure in the Entero-bacteriaceae**.** Proc. Nat. Acad. Sci. USA., Vol. 92, pp:2081-2085.

Jones , B.V., E. Mahenthiralingam , N. A. Sabbuba , and D. J. Stickler. (2005). Role of swarming in the formation of crystalline Proteus mirabilis biofilms on urinary catheters. J. Med. Microbiol., Vol. 54, pp:807-813 .

Jones , G.L. ; Muller , C.T. ; OReilly , M. and Stickler , D.J. (2006). Effect of Triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. J. Antimicrob. Chemother., Vol.57(2), pp:266-272.

Kalai , S. ; Achour, W. ; Abdeladhim , A. ; Bejaoui , M. and Bentt-assen , A. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* isolated in immune-compromised patients: antimicrobial resistance, seroty- ping and molecular typing. Med. Mal. Infect., Vol. 35 (11), pp: 530 – 535.

Kalcioglu , M.T. ; Ozturan , O. ; Durmaz , R. and Aktas , E. (2006). In vitro efficacy of the successive or staggered use of eardrops. Eur. Arch. Otorhinolaryngol.,Vol.263(5), pp:395-398.

Kalra , A. ; Cooley , C. and Tsigrelis , C. (2011). Treatment of end-ocarditis due to *Proteus* species : a literature review. Int. J. Infect. Dis.,Vol. 15, pp: 222-225 .

Kanekar , P.P. and Kulkarni , R.S. (1998) . Effects of some curing agents on phenotypic stability in *Pseudomonas* putida degrading epsilon . Caproloctam . J . Microbiol. And Biotechnol. ,Vol. 14 (2) , pp: 255- 257.

Katzung , B.G. (2001). Basic and Clinical Pharmacology. 8th ed. New York, Lange Medical Books. McGraw-Hill medical Publishing division. 1217.

Kearns , D.B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. Nat. Rev. Microbiol., Vol.8(9), pp: 634-644 .

Kezeer , E.G. (2007). Bacteriological study of otitis externa and susceptibility to antimicrobial agents. J. Fac. Med. Baghdad . , Vol.49(2), pp: 281-283.

Khalaf , S.H. and Kadhum , A.T.B. (2009) . Isolation and Pathogenic Study on *Proteus mirabilis*. Baghdad J. of sci**.** Vol. 7 (1), pp:317-326.

Khurana , S.; Taneja , N. and Sharma , M. (2002). Extended-spectrum beta-lactamase mediated resistance in urinary tract isolates of family enterobacteriaceae. Indian. J. Med. Res.,Vol.116, pp: 145-149.

Kiiyukia , C. (2003) . Laboratory manual of food Microbiology for Ethiopian health and nutrition research institute .

Kilie , E. and Yalinay , M. (2006). Comparison of staphylococcal B-lactamase detection methods. J. Pharm. Sci.,Vol. 31, pp: 79-84.

Kokare , C.R. ; Chakraborty , S. ; Khopade , A.N. and Mahadik , K.R.(2009) . Biofilm Importance and applications . Indian . J. Biote- chnol., Vol.8, pp:159-168.

Koneman , E.W. ; Allen , S.D. ; Janada , W.M. ; Schreckenberger , P. C. and Winn , W.C. (1997). Color atlas and text book of Diagnostic Microbiology . 5th ed., Lippincott-Raben publishers , Philadelphia, U.S.A.

Konieczna , I. ; Zarnowiec , P. ; Kwinkowski , M. ; Kolesinska , B. ; Fraccyk , J. ; Kaminski , Z. and Kaca , W. (2012) . Bacterial urease and its role long-lasting human diseases . Current protein and peptide Sci. ,Vol.13, pp:789-806.

Kosikowska , P. and Berlicki , L. (2011) . Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review. Expert Opin. Ther. Pat.,Vol. 21, pp: 945-957 .

Kuczkowski , J. ; Piatek , R. and Kur , J. (2004). Bacterial infections in chronic otitis media- usefulness of molecular diagnostics based on PCR method. Otolaryngol. Pol. ,Vol.58(3), pp:497-504.

Laragione , R.M. ; Cooleg , W.A. and Wood , Ward-M.J. (2000) . role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coil* 078 , K 80 to tissue culture cells and tracheal and gutt explants . J . Med. Microbial., Vol. 49, pp: 327-338 .

Lavanya , B. ; Sowmiya , S. ; Balaji , S. and Muthuvelan , B. (2011). Plasmid profiling and curing of *Lactobacillus* strains isolated from fermented milk for probiotic applications. J. Sci. Technol., Vol.3(2), pp: 95-101.

LeBlanc , D.J. ; Lee , L.N. and Inamine , J.M. (1991) . Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenyl-transferases AAD (9) determinant from *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother.,Vol. 35, pp:1804–1810.

Levinson ,W. and Jawetz, E. (2000) . Medical Microbiology and Immunology :Examination & Board Review (6^{th} ed). Mc Graw-Hill, U.S.A. pp. 85-89.

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

Li , X. and Mobley , H. L.T. (2002) . Vaccines for *Proteus mirabilis* in urinary tract infection. Int. J. Antimicrob. Agents., Vol. 6(190), pp:461-465.

Li , X. ; Lockatell ,V. ; Johnson , D.E. and Mobley , H.L.T.(2002). Identification of MrpI as the sole recombinase that regulates the phase variation of MR/P fimbria, a bladder colonization factor of uropathogenic *Proteus mirabilis.* Molecular Microbiol.,Vol. 45(3), pp: 865-74.

Liaw , S. J.; Lai , H. C. ; Ho , S.W. and Wang, W.B. (2000). Inhibition of virulence factor expression and swaring differentiation in *Proteus mirabilis* by.P.nitrophnylglycerol. Med. Microbiol. ,Vol. 49, pp:725-731.

Liaw , S.J. ; Lai , H.C. and Wang. ,W.B. (2004) . Modulation of swarming and virulence by fatty acids trough the RsbA protein in *Proteus mirabilis*. Infect. Immun.,Vol.72, pp: 6836-6845.

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

Livermore , D.M. and Woodford , N. (2006). The β-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol., Vol.14(9), pp: 413-420.

Lukomski , S. ; Serwecinska , L.; Rozalski , A.; Dziadek, J. ; Staczek , P. and Jaworski , A. (1991) . Cell-free and cell-bound hemolytic activities of Proteus penneri determination by different Hly determinants, Canadian J. of Microbiol., Vol. 37, pp. 419–424, 1991.

Luzzaro , F. ; Lombardi , G. ; Perlli , M. ; Belloni , R. ; Amicosante , G. and Toniolo , A. (2001) . Antimicrobial susceptibility testing and ESBL production in clinical isolates of *Proteus mirabilis*: An evaluation with the phoenix™ automated microbiology system. Presesnted at the 10 1st General Meeting of the Amer. Soci. for Microbiology.

Lynch , J.F. ; Lappin-Scott , H.M. and Costerton , J.W. (2003) . Microbial**.** biofilms, Cambridge University Press, Cambridge .

Macfaddin , J.F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

Macleod , D.L.; Nelson, L.E.; Shawar , R.M. ; Lin , B.B. ; Lockwood , L.G. ; Dirk , J.E.; Miller, G.H. ; Burns , J.L. and Garber , R.L. (2000). Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. J. Infect. Dis.,Vol. 181, pp:1180–1184.

Madigan , M.T.; Martinko , J.M. and Parker, J.(2003) . Brock Biology of Microorganism. 10th ed. Pearson Eduction ,Inc.

Magnet , S. ; Courvalin, P. ; and Lambert, T. (2001) . Resistance/-Nodulation-Cell Division-Type efflux Pump In-ved in Aminoglycoside Resistance in *Acinetobacter baumannii* Strain BM 4454. Antimicrob. Agents Chemother.,Vol. 45(12), pp:3375-3380.

Makled , A. and Alghamdi , A. (2006) . Surveillance Aminoglycosides Resistance Among *proteus mirabilis* Isolation from Different units in Jeddah Hospital Saudi Arabia . Egyptian J. of Med. Microbiol. , Vol .15 (2) .

Mandell , GL. ; Bennett JE. ; Dolin , R.M. ; Douglas , and Bennett's (2015) . Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th edn. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone / Elsevier .

Manos , J. and Belas , R. (2006). The genera *Proteus, Providencia* and *Morganella*. J. Prokaryotes,Vol. 6, pp: 245-269 .

Manos , J. Artimovich , E. Belas , R. (2004) . Enhanced motility of *Proteus mirabilis* strain expressing hybrid FlaAB flagella, Microbiol., Vol.150, pp**;**1291-9.

Mansy , M.S.M. (2001) . Genomic fingerprinting using random amplified polymorphic DNA for discrimination between *Proteus mirabilis* strains. Egypt. J. Biotechnol., Vol. (9), pp:67-79.

Massad , G. ; Bahrani , F.K. and Mobley, H.L. (1994) . *Proteus mirabilis* fimbriae : identification, isolation, and characterization of a new ambient-temperature fimbria, Infection and Immunity, Vol. 62, pp.1989-1994 .

Matt , T. ; Leong Ng , C. ; Lang , K. ; Sha , S. ; *et al* (2012) . dissociation of antibacterial activity and aminoglycoside ototoxicity in the 4- monosubstituted 2- deoxysteptamine apramycin . PNAS of med. sci. Vol. 109 (27) , pp: 10984-10989 .

McManus , A.T., Moody , E.E. and Mason , A. D. (1980) . Bacterial motility: a component in experimental *Pseudomonas aeruginosa* burn wound sepsis., Vol.(6), pp:235-239.

Michalska , AD. ; Sacha , PT. ; Kaczynsk , K. and Tryniszewska , EA. (2014a) . the diversity of aminoglycoside – enzymes among ESBL - positive *proteus mirabilis* Clinical Strains . J. of Med. tube Sci. , Vol. 2 (4) , pp:15-20 .

Michalska , AD. ; Sacha , PT. ; Ojdana , D. ; Wieczorek , A. and Tryniszewska , E. (2014b) . Prevalence of resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones among *Pseudomonas aeruginosa* strains in a University Hospital in Northeastern Poland . Brazilian J. of Microbiol., Vol. 45(4) .

Miro , E.; Grünbaum, F.; Gomez , L.; Rivera , A.; Mirelis , B.; Coll , P. ; and Navarro , F. (2013) . Characterization of aminoglycoside modifying enzymes in Enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. Microb. Drug Resist., Vol. 19(2), pp:94-99.

Mishra , M . ; Thakar , Y.S. and pathak , A.A. (2001). Haemagglutination , haemolysin production and serum resistance of *Proteus* and related species isolated from clinical source. Indian. J. of Med. andMicrobiol., Vol. 19(2), pp: 91-96.

Mobely, H.L.T. and Chippendle , G.R. (1990). Hemagglutinin, urease and hemolysin production by *Proteus mirabilis*. J. Inf. Dis. , Vol.161, pp: 525-530.

Mobley, H.L.T. (1996) . Virulence of *Proteus mirabilis*. In: H.L.T. Mobley, J.W. Warren (eds.) Urinary tract infections, molecular pathogenesis and clinica management. ASM Press, Washington DC, pp. 245-269.

Mohammed , G.J. (2014). Phenotyping and molecular characterization of *proteus vulgaris* isolated from patients with urinary tract infections. Ph.D.Thesis,College of Medicine, Babylon University.

Molnar , A. (2006) . Plasmid curing in ecosystems of bacteria , efflux pump inhibitors in bacteria and cancer cells. Ph.D.NW thesis Faculty of Medical - university of szeded , Hungary .

Molnar , J. ; Molnar , A. ; Spengler , G. and Mandi , Y. (2004) . Infectious plasmid resistance and efflux pump mediated resistance. Acta Microbiol. Immunol. Hung.,Vol 51(3),pp: 333-349 .

Mordi , R. M. and Momoh , M. I. (2009). Incidence of *Proteus* species in wound infections and their sensitivity pattern in the University of Benin Teaching Hospital. African J. of Biotechnol., Vol 8(5), pp: 725- 730.

Morgenstein , R.M.; Szostek , B. and Rather , P.N. (2010). Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. FEMS Microbiol. Rev.,Vol.34, pp:753-763.

Morris , N. S. ; Stickler, D. J. and McLean , R. J.C. (1999) . The development of bacterial biofilms on indwelling catheters. World J. Urol., Vol.17, pp: 345-350.

Moya , B. ; Zamorano , L. ; Juan , C. ; José , L.P. ; Yigong , Ge. and Oliver , A. (2010). Activity of a new cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against β-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected *in vitro* and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients. Antimicrob. Agents Chemother.,Vol. 54(3), pp:1213–1217 .

Mulrooney , S.B. ; and Hausinger , R.P. (2003) . Nickel up takeand utilization by microorganisms. FEMS Microbiol. Rev.,Vol. 27 (2-3), pp : 239-261.

Murray, P. R.; Baron , E.; Pfaller , M. A.; Tenover , F. C. and Yolken , R.H. (1999). Manual of clinical microbiology. 7th ed. A smpress. Washington. U.S.A.

Musiani , F. ; Zambelli , B. ; Stola , M. and Ciurli , S. (2004) . Nickel trafficking : insights into the fold and function of UreE , a urease metallochaperone. J. Inorg. Biochem., Vol. 98(5), pp : 803-813.

Nathisuwan , S.; Burgess , D.S. and Lewis , J.S. (2001) . Extended spectrum beta–lactamase: epidemiology, detection and treatment. *Pharmacotherapy*., Vol. 21, pp:920 - 926.

NCCLS. (2004) . Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard Sixth Edition. NCCLS document M11-A6 (ISBN 1-56238-517-8). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA .

NCCLS. (2003) . (National Committee for Clinical Laboratory Standards) . Performance Standards for Discs Susceptibility Testing Proved Standard. Wayne, Pennsylvania, USA, pp: 100-513.

Nielubowicz , G. and Mobley , H.L.T. (2010) . Hostpathogen Interactions In Urinary Tract Infections. Nature Rev. Urol.,Vol. 7, pp: 430-441 .

Nikaido , H. (1989). Outer membrane barriers as a mechanisms of antimicrobial resistance. J. Antimicrob. Agents Chemother.,Vol. 33, pp:1831-1836.

O'Soge , O. ; Agiardino , M. ; Clranova , I. L. ; Pearson , J. C. and Roberts , M. (2009) . Low prevalence of antibiotic-resistant gramnegative bacteria isolated from rural south western Ugandan ground water. Water Sci.,Vol. 35(3), pp: 230-236.

O'Hara , C.M. ; Brenner , F.M. and Miller , J.M. (2000) . Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. Clin. Microbiol. Rev.,Vol.13(4), pp: 534-546.

O'Toole , G. ; Keplan , H. B. and Kolter , R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annul. Rev. Microbiol., Vol. 54, pp: 49-79.

Ogle , J.M. and Ramakrishnan ,V. (2005). Structural insights into translational fidelity. Annu. Rev. Biochem.,Vol. 74, pp:129 -177 .

Okazaki , A. and Avison , M.B. (2007). Aph(3′)-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob. Agents Chemother.,Vol. 51(1), pp:359-360.

Okimoto , N. ; Hayashi , T. ; Ishiga , M. ; Nanba , F. ; Kishimoto , M. ; Yagi , S. ; Kurihara , T. ; Asoka , N. and Tamada , S. (2010) .

Clinical features of *Proteus mirabilis* pneumonia. J. Infect. Chemother, Vol.16, pp:364-366 .

Orrett , F.A. (2001) .Urinary tract infection in general practice in arural community in south trinidad .saudi ; Med .J., Vol. 22(6), pp : 537-540 .

Oteo , J. ; Navarro , C. ; Cercenado , E.; Delgado-Iribarren , A. ; Wilhelmi , I. ; *et al.*(2006). Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. J. Clin. Microbiol., Vol.44, pp:2359-2366.

Pahwa , S.; Kaur , J.; Cameotra , S.S.; Nandanwar , H. and Kaur , P. (2012). Curing of multiple plasmids by ETBR in *Acinetobacter buamannii*: A clinical isolate. J. Adv. Dev. Res.,Vol.3(1), pp: 82-84**.**

Pajor , A. ; Durko , M. ; Jankowski , A. ; Bartoszko-Tyczkowska , A. and Stanczyk , R.(2006) . Bacteriological evaluation in chronic otitis media. Otolaryngol. Pol. ,Vol.60(5), pp:757-763.

Papp-Wallace , KM. ; Endimiani , A. ; Taracila , MA. and Bonomo RA. (2011) . Carbapenems: past, present, and future. Antimicrob. Agents Chemother, Vol. 55(11),pp: 4943-4960 .

Paradise , J.L. ; Feldman , H.M. ; Colborn, D.K. ; Camphell, T.F. ; Dollaghan, C.A. and Rockette, H.E. (1999) . Parental stress and parent-rated child behavior in relation to otitis media in the first three years of life. Pediatr. , Vol.104(12), pp:1237-1264 .

Pearson , M.M. ; Sebaihia , M. ; Quail , M.A. ; Seshasayee , A.S. ; Luscombe , N.M. ; Abdellah , Z. ; Churcher , C. ; *et al.* (2008). Complete genome sequence Of uropathogenic *Proteus*

mirabilis, a master of both adherence and motility. J. of Bacteriol., Vol.190, pp: 4027-4037 .

Pearson , A. and Lee, A. (2004). *Proteus* spp. *Morganella morganii* and *Providencia* spp. bacteremia's. CRD. J.,Vol.14(8), pp: 44-57.

Pellegrino , R. ; Scavone , P. ; Umpierrez , A. ; Maskell , D.J. and Zunino , P. (2013) . *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract, Pathogens and Disease .Vol. 67, pp.104-107 .

Penido Nde ,O. ; Borni , A. ; Iha , L.C. ; Suguri ,V.M. ; Onishi , E. ; *et al.* (2005). Intracranial complications of otitis media : 15 years of experience in 33 patients. Otolaryngol. Head Neck Surg.,Vol. 132 (1), pp: 37-42.

Peterson , L.R. (2008). Currently available antimicrobial agents and their potential for use as monotherapy. Clin Microbial. Infect. , Vol.14(6), pp:30-45.

Petti , CA. ; Polage , CR. and Schreckenberger, P. (2005). The role of *16S* rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. J. Clin. Microbiol., Vol. 43, pp: 6123-6125.

Piglansky , L. ; Leibovitz , E. ; Raiz , S. ; Greenberg , D. ; Press , J. Leiberman , A. and Dagan , R. (2003) . Bacteriologic and clinical efficacy of high dose amoxicillin for therapy of acute otitis media in children. Pediatr. Infect. Dis. J.,Vol. 22(10), pp:936-7 .

Poehlsgaard , J. and Douthwaite , S. (2005). The bacterial ribosome as a target for antibiotics. Nat. Rev. Microbiol.,Vol. 3(11), pp:870-881.

Poore , C.A. ; Coker , C. ; Dattelbaum , J.D. and Mobley , H.L.T. (2001). Identification of the domains of UreR, an Ara C-linke transcriptional regulator of the urease gene cluster in *Proteus mirabilis* .J. Bacteriol., Vol.183 (15), pp: 4526-4535.

Pickett , M. ; Everson , J. ; Pead , P. and Clarke , I. (2005). The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydophila pnumoniae* (N16): Accurate determination of copy number and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. Microbiology Vol.151, pp:893-903.

Qaddoorri , S.S ; Laftaah , B.A. ; Abd Algani , M.N. ; Al-Segar , R.K. ; Raoof , A.M. ; *et al.* (2015) . Correlation between virulence factor and biofilm formation in *proteus* spp. Iraqi J. of sci.,Vol. 56(2) , pp:1675-1681 .

Qion , WU. ; Zhang , Y . ; Han , L. ; Sun , J . and Ni , Y . (2009) . plasmid - Mediated 16S rRNA Methylases in Aminooglycoside . Resistant Enterobacteriaceae isolates in Shanghai and china . Antimicrobial Agents and chemotherapy, Vol.53 , No.1. pp: 271 - 272 .

Queenan , AM. and Bush, K.(2007) . Carbapenemases : the versatile beta-lactamases . Clin. Microbiol. Rev.,Vol 20(3), pp: 440-458 .

Radha , K. ; Mahima , R. and Ramanathan , G. (2012). Survey on drug resistant pattern of clinical isolates and effect of plant extract on the drug resistant pattern. J. Biol. Sci.,Vol. 1(3), pp:14-19 .

Rafael , P.(2003) . *Proteus mirabilis* fimbrial proteins used as antigens against U.T.Is Biotech .Week ., pp:155-156.

Ramakrishnan , K. and Scheid , D.C. (2005). Diagnosis and Management of acute pyelonephritis in adults . Amer. family physician.,Vol.71(5), pp: 933-942.

Ramirez , M. S. and Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist.Updat., Vol.13, pp:151-171.

Rashid , T. ; Tiwana , H. ; Wilson , C. and Ebringer , A. (2001). Rheumatoid arthritis as an autoimmune disease caused by *Proteus* urinary tract infections: A proposal for a therapeutic protocol. IMA J.,Vol.3, pp : 675-680 .

Rather , P.N. (2005). Swarmer Cell Differentiation In *Proteus Mirabilis.* Environm. Microbiol. , Vol.7, pp:1065-1073.

Robicsek , A. ; Strahilevitz , J. ; Jacoby , G.A. ; Macielag , M. ; Abbanat , D.; Park , C.H. ; Bush, K. and Hooper , D.C. (2006). Fluoroquinolone- modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat. Med.,Vol. 12, pp:83-88**.**

Rocha , S.P. ; Pelayo , J.S. and Elias, W.P. (2007) . Fimbriae of uropathogenic *Proteus mirabilis* , FEMS Immunol. and Med. Microbiol., Vol. 51, pp :1-7.

Rovers , M.M. ; Krabble, P.F. ; Straatman, H. ; Lngel, K. ; Vanderwilt , G.J. and Zielhuis, G.M. (2001) . Randomized controlled trail of ventilation tubes (grommets) on quality of life atage 1-2 years. Arch . Dis . child, Vol. 84, pp:45-49 .

Rozalski , A. ; Długonska , H. and Kotełko , K. (1986) . Cell invasiveness of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* strains. Arch. Immunol. Ther. Exp., Vol. 34, pp: 505-511.

Rozalski , A . ; Sidorczyk , Z. and Kotelko , K. (1997) . Potential virulence factor of *Proteus bacilli* . Microbiol . Mol . Biol., Rev., Vol.61(1), pp : 65-89 .

Rozalski , A. ; Torzewska , A. ; Moryl , M. ; Kwil , I. ; Maszewska , A. ; *et al.* (2012) . *Proteus* sp.-an Opportunistic bacterial

pathogen- classification , Swarming growth , clinical significance and virulence factors . Folia Biolog . Oecolog ., Vol.8 , pp: 1-7 .

Rozalski , A. and Stączek, P.(2010). *Proteus*. In: D. LIU , (ed.) Molecular detection of foodborne pathogens. CRS Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton , pp. 417-430.

Sabtcheva , S. ; Galimand, M. ; Gerbaud, G. ; Courvalin, P. and Lambert, T. (2003) . Aminoglycoside resistance gene *ant(4')-IIb* of *Pseudomonas aeruginosa* BM4492, a clinical isolate from Bulgaria. Antimicrob. Agents Chemother.,Vol.4, pp:1584-1588.

Samaha-Kfoury , J.N. and Araj , G.F. (2003) . Recent developments in β- lactamases and extended spectrum β- lactamases. Brit. Med. J.,Vol. 327(7425), pp:1209–1213.

Sambrook , J. ; Frigan , E. and Miniaoctis , T. (1989). Molecular cloning a Laboratory Manual, Springer Harbor Laboratory, New York, USA.

Sana , T.; Rami , K. ; Racha , B. ; Fouad , D. ; Marcel , A. ; Hassan, M. and Monzer , H. (2011) . Detection of genes TEM, OXA, SHVand CTX-M in 73 clinical isolates of *Escherichia coli* producers of extended-spectrum beta-lactamasesand determination of their susceptibility to antibiotics. International Arabic J. Antimicrob. Agents, Vol.1(5), pp:1-6.

Saxena , N. ; Dadhich , D. and Maheshwari , D. (2013). aerobic bacterial isolates from burn wound infection patients and their antimicrobial susceptibility pattern in kota, rajasthan. J. of Evolution of Med. and Dental Sci.,Vol.2(23),pp: 4156-4160.

Scavone , P. ; Iribarnegaray , Caetan , A.L. ; Schlapp , G. ; *et al.* (2016) . Fimbriae have distinguish able roles in *proteus mirabilis* bio- film formation . pathog. Dis .Vol.74(5) .

Schaffer , JN. ; norsworthy , AN. ; Sun ,T. and pearson , MM (2016). *proteus mirabilis* fimbriae - and urease - dependent clusters assemble in an extracellular niche to initiate bladder stone formation . J. PNAS ,Vol.133(16), pp:4494- 4499 .

Schoep , T.D. ; Fulurija , A. ; Good , F. ; Lu , W. ; Himbeck , RP. ; Schwan , C. ; *et al.* (2010) . Surface Properties of *Helicobacter pylori* Urease Complex Are Essential for Persistence. PLoS ONE, Vol.5(11),pp:15042.

Schroder , G. and Lanka , E. (2005) . The mating pair formation system of conjugative plasmids - aversatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. Plasmid ,Vol. 54, pp: 1-25.

Schulz , A. ; Vestweber , A.M. ; Leis , W. ; Stark , D. and Dressler , D. (2008).An improved of a catheterized human badder for scree-ning bactericidal agents. Aktuelle Urol.,Vol. 39(1), pp: 53-57.

Senior , B.W. and Hughes , C. (1988) . Production of properties of haemolysins from clinical isolates of the proteeae. J. Med. Microbiol.,Vol. 25(1), pp: 17-25.

Shamsuddeen ,U. ; Usman , A.D. ; Bukar , A. and Safiya , I.A. (2010). Bacterial agents of otitis media and their sensitivity to some antibiotics in aminu kano teaching hospital, kano state. *Bayero* J. of Pure and App. Sci.,Vol.3(1),pp:191-194.

Shar , A. ; Kazi , Y.F. ; Kanhar , N.A. and Soomyo , I.H. (2012) . Bacterial community patterns of municipal water of Sukkur city in different seasons. J. Biotech.,Vol.11(9), pp:2287-2295.

Shirtliff , M.E. (2008). Complicated catheter- associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis.* Clin. Microbiol. Rev.,Vol.21,pp: 26-59.

Smillie , C. ; Garcillan-Barcia , M.P. ; Francia , M.V. ; Rocha , E.P.C. and dela Cruz, F. (2010) . Mobility of plasmids. Microbiol. Mol. Biol. Rev., Vol. 74, pp: 434-452.

Smith , C.A. and Baker , E.N. (2002). Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. Curr. Drug Targets Infect. Disord.,Vol. 2(2), pp:143-160.

Snyder , L. and Champness ,W.(2007) . Molecular genetics of bacteria. ASM Pres .

Sosa ,V. ; Schlapp , G. and Zunino , P. (2006). *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice. Microbiol. , Vol.152, pp:2149-2157.

Spanu ,T.; Luzzaro , F. ; Perilli , M. ; Amicosanti , G. ; Toniolo , A. ; Fadda , G. ; and The Italian ESBL Study Group (2002) . Occurance of extended-spectrum β-lactamases in members of the family enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to β-lactams and other antimicrobial drugs. Antimicrobial Agents . Chemotherapy., Vol.46(1), pp: 196-202.

Spengler , G. ; Molnar , A. ; Schelz , Z. ; Amaral , L. ; Sharples , D. and Molmar , J. (2006) . The mechanism of plasmid curing in bacteria . Article in current drug targets ,Vol. 7 (7) .

Stamm ,W.E. (1999) . Urinary tract infections.In:"Clinical infections diseases : a practical approach".Root, R.K.(ed.).Oxford University Press, Inc. New York. pp:649-656.

Stankowska , D. ; Kwinkowski , M. ; Kaca , W. and Stickler , D.J. (2008b). Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. Rev. Nature. Clin. Urol.,Vol.11(5), pp: 598-608.

Stankowska , D. ; Kwinkowski , M. and Kaca ,W. (2008a) . Quantification of *Proteus mirabilis* virulence factors and modulation by acylated homoserine lactones. J. Microbiol. Immunol. Infect., Vol.41(3), pp:243-253.

Steward , C.D. ; Rasheed, J.K. ; Hubert , S.K. ; Biddle , J.W. and Raney, P.M. (2001) . Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committees for Clinical Laboratory Standards, extended spectrum beta–lactamase detection methods. J. Clin.Microbial., Vol.39, pp:2864-2872.

Stickler , D. J. (2008). Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. Rev. Nature. Clin. Urol.,Vol.11(5) , pp : 598-608.

Stocks , EJ. and Ridgway , G.L. (1987) . Haudling clinical specimens for Microbiological stadies 5thed Charchill Liviugstone Edinburgh., pp: 173-201.

Suter , T.M. ; Viswanathan , V.K. and Cianciotto , N.P. (1997) . Isolation of a gene encoding a novel spectinomycin phosphortransferase from *Legionella pneumophila*. Antimicrob. Agents Chemother.,Vol.41(6), pp:1385-1388.

Takeuchi , H. ; Yamamoto , S. ; Terai , A . ; Kurazono , H. ; Takeda ,Y. ; Okada ,Y. and Yoshida , O. (1996) . Detection of *Proteus mirabilis* urease gene in urinary calculi by polymerase. chain reaction International journal of Urology , Vol 3(3), pp:202-206.

Tanaka , T. ; Kawase , M. and Tani , S. (2004) . α-hydroxyketones as inhibitors of urease .Bioorganic and medicinal chemistry., Vol.12, pp: 501-5.

Tanaka ,T. ; Kawase , M. and Tani , S. (2003) . Urease inhibitory activity of simple α,β-unsaturated ketones. Life Sci., Vol.73, pp: 2985-2990.

Tenover , F.C.(2006) . Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am. J. Infect. Control .,Vol. 34, pp:3-10.

Therapeutic Guidelines (2010) . Antibiotic, 14 edn. Melbourne: Therapeutic Guidelines .

Tolmasky , M.E. (2007a). Aminoglycoside-modifying enzymes: characteristics, localization, and dissemination, enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition. ASM Press, Washington. pp: 35-52.

Tolmasky , M.E. (2007b). Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition, overview of dissemination mechanisms of genes coding for resistance to antibiotics. ASM Press, Washington . pp: 267-270.

Tong , H.H. ; Wieser , J.N. ; James , M.A. and DeMaria ,T.F. (2001) . Effect of influenza A virus infection on nasopharyngeal colonization and otitis media induced by transparent or opaque phenotype variants of *Streptococccus pneumoniae* in the cinchhilla model. Infect. Immun.,Vol.69, pp: 602-606.

Torzewska , A. ; Staczek , P. and Rozalski , A. (2003) . Crystallization of urine mineral components may depend on the chemical nature of Proteus endotoxin polysaccharide. J. Med. Microbiol.,Vol. 52(6).

Trevors , J.T. (1986). Plasmid curing in bacteria. FEMS Microbiol. Vol. 32, pp:149-157.

Trevors , J.T. and Oddile , T. (1986). Resistant plasmid transfer in soil and water. J. Can. Microbial, Vol. 32, pp:610-613.

Tsodikova , S.G. and Labby , K.J. (2015) . Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics : Overview and perspectives . J. is The Royal Soci. of Chem. ,Vol. 19, pp: 43-58.

Turnidge , J. (2003) . Pharmacodynamics and dosing of amino-glycosides. J. Infect Dis Clin North, Vol. 17, pp: 503-528.

Umpierreze , A. ; Scavone , P. ; Romanin , D. ; Alejandre , J. ; Chabalgoity , J. ; Rumbo , M. and Zunino , P. (2013) . Innate immune responses to Proteus mirabilis flagellin in the urinary tract. pp:1-9.

Untergasser , A. ; Nijveen , H. ; Rao , X. ; Bisseling , T. ; Geurts , R. and Leunissen , J.A. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Res. 35(Web Server issue), pp:71-74.

Uphoff , TS. and Welch , RA. (1990) . Nucleotide sequencing of the *proteus mirabilis* calcium - independent hemolysin genes (hpmA and hpmB) reveals sequence similarity with the serratia marcescens hemolysin genes (shlA and shlB) . J. of bacterial. , Vol.173(3), pp: 1206-1216 .

Vakulenko , S.B. and Mobashery , S. (2003) . Versatility of amino-glycosides and prospects for their future. Clin. Microbiol. Rev.,Vol.16, pp: 430-450.

Varsaki , A. ; Moncalian, G. ; del Pilar , GB.M. ; Drainas, C. and dela Cruz , F. (2009) . Analysis of ColE1 MbeC unveils an

extended ribbon-helix-helix family of nicking accessory proteins.J.Bacteriol.,Vol.191, pp:1446-1455.

Verstraeten , N. ; Brekanen , K. ; Debkumari , B. ; Fauvart , M. ; Fransaer , J. ; Vermant , J. and Michiels , J. (2008) . Living on a surface: swarming and biofilm formation. Trends Microbiol. , Vol.16, pp:496-506.

Vetting , M.W. ; LP, S.d.C. ; Yu , M. ; Hegde , S.S. ; Magnet , S. ; Roderick, S.L. and Blanchard, J.S. (2005). Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. Arch. Biochem. Biophys.,Vol. 433, pp:212- 226.

W.H.O. (World Health Organization) (2003) . Technique for the detection of B-lactamase production strain of *Neisseria gonorrhea*. PP:137-143.

Walsh, C. (2003). Antibiotics: actions, origins, resistance. ASM Press., Vol.13, pp:3059-3060.

Warren , J.W. ; Tenney , J.H. ; Hoopes , J.M. ; Muncie , H.L. and Anthony, W.C. (1982). A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. J. Infect Dis., Vol. 146, pp :719-723.

Warren , J.W. and Mobley , H.L.T. (1996). Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. In molecular path-ogenesis and clinical management. ASM Press, Washington . pp. 2-28.

Wieczorek , P.; Sacha , P.; Hauschild ,T.; *et al*. (2008) .The aac(6')-Ib gene in Proteus mirabilis strains resistant to aminoglycosides. Folia Histochem Cytobiol ,Vol.46 (4), pp: 531-533.

Wilke , M.S.; Lovering A.L. and Strynadka , N.C.J. (2005) . B-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. Curr. Opin. Microbiol.,Vol. 8(5), pp: 525-533.

Wilson , N.L. and Hall , R.M. (2010). Unusual class 1 integron configuration found in *Salmonella* genomic island 2 from *Salmonella enterica* serovar Emek. Antimicrob. Agents Chemother.,Vol. 54, pp:513-516.

Winn , J.W. ; Allen, S. ; Janda, W. ; Koneman , E. ; Procop , G. ; Schreckenberger , P. and Woods , G. (2006). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed., Lippincott-raven Publishers. Philadelphia, PP: 239-270. USA.

Winokur , P.L.; Canton , R.; Casellas , J.M. and Legakis , N. (2001). Variations in the performance of strains expressing an extended-spectrum β-Lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clinical Infections Diseases. ,Vol.32(2), pp: 94-103.

Winsor , G.L. ; Lo , R. ; Sui , S.J. ; Ung , K.S. ; Huang , S. ; Cheng , D. ; Ching,W.K. ; Hancock, R.E. and Brinkman, F.S. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* genome database and pseudo CAP: facilitating community-based, continually updated, genome annotation. Nucleic Acids Res.,Vol. 33, pp:338–343.

Wisterish , B.W. and Lechtman S.S. (1980). Laboratory Exercises in Microbiology, 4th ed.

Xie , J. ; Talaska , AE. and Schacht , J. (2011) . New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. Hear Res, Vol. 281, pp : 28-37.

Yamane , K. ; Wachino , J. ; Suzuki , S. ; Shibata , N. ; Kato , H. ; Shibayama , K. ; Kimura , K. ; Kai , K. ; Ishikawa , S. ; Ozawa, Y.; Konda, T. and Arakawa, Y. (2007). *16S* rRNA methylase– producing, Gram-negative Pathogens, Japan. Emerg. Infect. Dis., Vol.13(4), pp:642-646.

Yao , J.D.C. and Moellering, R.C.J. (2003). Antibacterial Agents. Manual of Clinical Microbiology P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover and R. H. Yolken. Washington, DC.; Amer. Soci. of Microbiol. , pp : 1039-1073.

Zavascki , A.P. and Bulitta , J.B. (2013) . Combination therapy for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacteria . Expert Rev. Anhi Intfect . Vol.11(12) , pp: 1333-1353 .

Zhou , Y. ; Yu , H. ; Guo , Q. ; Xu , X. ; Ye , X. ; Wu , S. ; Guo , Y. and Wang , M. (2010). Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., Vol.29(11), pp:1349-1353.

Zunino , P. ; Geymonat , L. ; Allen , A.G. ; Legnani-Fajardo , C. and Maskell , D.J. (2000) . Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection,‖ FEMS Med. Microbiol. and Immunol., Vol. 29, pp:137-143.

Zunino , P. ; Sosa , V. ; Allen , A.G. ; Preston , A. ; Schlapp , G. and Maskell , D.J. (2003) . *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice, Microbiol., Vol.149, pp. 3231-3237 .

are anti-Gentamycin , Tobramycin , Kanamycin , Streptomycin , Netlimicin the isolates showed their ability to grow in high concentrations ranging from (32-1024)µg / ml .

Some of the virulence factors have been studied phenotypically and genetically , as the percentage of the phenotypic hemolysis test , biofilm formation , the investigation of the flagella , fimbria and urease enzyme are very high and rates (90.62 , 95.31 , 100 , 92.18 , 100) % , respectively . In terms of the genetic aspect , five genes were obtained for virulence factors and at varying rates , as the urease enzyme *ureC* , fimbria formation *mrpA* , flagella *flaA* , hemolysin enzyme *hpmA* and biofilm formation *luxS* (60 , 40 ,100 , 45 , 55) % , respectively .

The prevalence of resistant genes for the anti-aminoglycosides was also studied , the results were also variable for genes *aac(3)-Ia* , *aac(6')-Ib* , *ant(4')-IIa* , *ant(2'')-Ia* and *aph(3'')-Ib* , in percentages (20 , 40 , 15 , 50 , 50) % , respectively .

Sodium Dodecyl Sulfate SDS was used to make the curing process *P.mirabilis* , this process has succeeded in getting rid of plasmid bands belonging to the isolates as has lost some of the characters of resistance to antibiotics and production β-lactamase .

Summary :

A total of 650 clinical samples were collected from different sources included urine (250) ,middle ear (185) , wounds (40) , burns (85) , high cervical and endometrium cervical (90) .The site of collection is outpatients in Maternal , and General Teaching Hospital in AL-Diwania city during the period from May 2015 to January 2016 .

Sixty four isolates of *Proteus mirabilis* were diagnosed according to cellular morphology , culture morphology , biochemical tests and their diagnosis were confirmed by API 20 E and chain reaction in addition sequence analysis of *16S* rRNA .

The results showed that the highest percentage of infection was obtained from the urine and then the middle ear , wounds , burns , high cervical and endometrium cervical as recorded (12.8 , 9.18 , 8.88 , 7.5 , 4.7) % respectively , the results of the gene sequence (100%) βata-Lactam enzymes were investigated if all bacterial isolates were produced by these enzymes and by (100%) , the resistance of bacterial isolates to 12 different antibiotics was tested and isolates showed different resistance to anti-βata Lactam including penicillin and Amoxicillin / Clavulanic acid by (100%) , cefotaxime by (86%) , and Cephalexin by (90.62%) , Imipenem by (18.75%) , and Meropenem by (15.62%) the isolated bacteria also resisted anti-aminoglycosides and with different rates of Gentamycin , Amikacin , Tobramycin , Kanamycin ,Streptomycin , and Netlimicin , it was in varying proportions (54.68 , 31.25 , 76.56 , 81.25 , 85.93 ,81.25) % , respectively .

Select the minimum inhibitory concentration of a number of antibiotics for aminoglycosides for resistant bacterial isolates which

Summary

Minisitry of Higher Education
and Scientific Research
University of AL-Qadisiyah
College of Education
Department of Biology

Molecular Evaluation Of Virulence Factors And Resistance Genes Of Antibiotics In *Proteus mirabilis* In AL-Diwaniya Province

A thesis
Submitted to the council of the College of Education
University of AL-Qadisiyah in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy
Biology / Microbiology

By

Najlaa Abdallah Dawood AL-Oqaili
Master of Biology / Microbiology – 2004

Supervised by

Prof.Dr.Majed Kadim Aboud AL-Shebli **Asst.prof.Dr.Azhar N.H.Almousawi**

2017 A.D **1483 A.H**