



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة القادسية / كلية العلوم

قسم علوم الحياة

انتشار بكتريا *Pantoea agglomerans* و *Pantoea calida* المعزولة من عينات مختلفة في مستشفيات مدينة الديوانية

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم / جامعة القادسية وهي جزء من متطلبات نيل درجة

الماجستير علوم في علوم الحياة / أحياء مجهرية

من قبل

عذراء عبدالأمير عبدالرب

بكلوريوس علوم- علوم حياة/ جامعة القادسية (٢٠١٦)

إشراف

أ. د. سيوف خومان علوان

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَمَا تَوْفِيقِي إِلَّا بِاللَّهِ عَلَيْهِ تَوَكَّلْتُ وَإِلَيْهِ



أُنِيبُ

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيِّ الْعَظِيمِ

(سورة هود: ٨٨)

أقرار المشرف

أشهد أن رسالة الماجستير الموسومة بـ : (انتشار بكتريا *Pantoea agglomerans* و *Pantoea calida* المعزولة من عينات مختلفة في مستشفيات مدينة الديوانية) المقدمة من الطالبة (عذراء عبدالامير عبد الرب) تم اعدادها بأشرافي ، وهي من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة .

الامضاء :

الاسم : أ.د. سيوف خومان علوان

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2019

توصية رئيس قسم علوم الحياة

اشارة الى التوصية المقدمة من الأستاذ المشرف أحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

الامضاء :

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

الاسم : أ.م.د. حبيب وسيل كاظم

التاريخ : / / 2019

إقرار المقوم اللغوي

اشهد انه قد تم التقويم اللغوي لرسالة الطالبة عذراء عبد الامير عبد الرب الموسومة
(انتشاربكتريا *Pantoea agglomerans* و *calida Pantoea* المعزولة من عينات مختلفة في
مستشفيات مدينة الديوانية)

الامضاء:

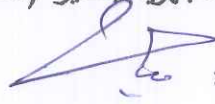
الاسم: م.أ.م.د. اصيل محمد كاظم

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ: 2019/ / خ:

اقرار لجنة المناقشة

نشهد اننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ: (انتشار بكتريا *Pantoea calida* و *Pantoea agglomerans* المعزولة من عينات مختلفة في مستشفيات مدينة الديوانية) وناقشنا الطالبة عذراء عبد الامير عبد الرب في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 2019/3/7 وانها جديرة لنيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة/علم الاحياء المجهرية بتقدير (امتياز).



التوقيع:

عضو اللجنة

الاسم: أ.د.ميادة فرحان درويش

اللقب العلمي: استاذ

العنوان: كلية العلوم/ جامعة الكوفة

التاريخ: 2019/ /

التوقيع:



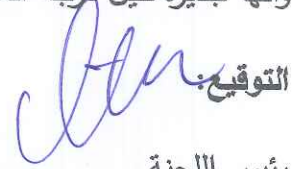
عضو اللجنة (المشرف)

الاسم: أ. د.سيوف خومان علوان

اللقب العلمي: استاذ

العنوان: كلية العلوم/ جامعة القادسية

التاريخ: 2019/ /



التوقيع:

رئيس اللجنة

الاسم: أ.د.ميثم غالي يوسف

اللقب العلمي: استاذ

العنوان: كلية العلوم/ جامعة القادسية

التاريخ: 2019/ /

التوقيع:



عضو اللجنة

الاسم: أ.م.د.نوال محمد عتبه

اللقب العلمي: استاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم/ جامعة بغداد

التاريخ: 2019/ /

قرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية العلوم بجلستهالمنعقدة في / / 2019/ وقرر منحها شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة/ علم الاحياء المجهرية.

التوقيع:

الاسم: أ. د.نبيل عبد الرضا

اللقب العلمي: استاذ

التاريخ: 2019/ /

الإهداء

"خشوعاً واجلاباً وتعظيماً لمن علمني ما لم اعلم

الله سبحانه وتعالى"

وإلى حفظة سرِّ الله ومهبطِ وحيه

الرسول الكريم ﴿صلى الله عليه وآله وسلم﴾ وأهل بيته الطيبين الطاهرين

إلى من حصدا الأشواك عن دربي ليمهد لي طريق العلم

نروجي وسندي الذي ساندني معنوياً ومادياً طيلة فترة دراستي

إلى الشفاه التي أكثرت الدعاء لي كلما نطقت . . . والدتي الغالية . . . براً وإحساناً

إلى كل من وقف معي من الأهل والأحباب وبالخصوص عمي وعمتي الغاليتين وأبي وأخوتي

وأخواتي محبةً ووفاءً

إلى كل من علمني حرفاً ومهد لي للعلم طريقاً أساتذتي الأفاضل

أهدي ثمرة جهدي المتواضع عذراء

شكر وامتنان

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على اشرف الأنبياء والمرسلين أبي القاسم محمد ﷺ صلى الله عليه واله وسلم و أهل بيته الطيبين الطاهرين.

يطيب لي وأنا انهي رسالتي هذه إن أوجه أسمى آيات الشكر والاعتزاز **لأستاذتي الفاضلة الاستاذة الدكتورة سيوف خومان علوان** التي كانت اختاً كبيرةً قبل أن تكون مشرفةً متمنيةً لها دوام الصحة والعافية ودوام التألق العلمي ان شاء الله لاقتراحها موضوع البحث ومشاركتها معي في تكبد المشاق لتوفير مستلزمات البحث، وإرشاداتها القيمة التي لم تفارقني طيلة فترة البحث ، التي كان لها الأثر الكبير في انجاز البحث وفقها الله وجزاها عني خير الجزاء.

وأقدم الشكر والامتنان الجزيلين الى عمادة كلية العلوم /قسم علوم الحياة/جامعة القادسية واطمئن بالشكر الجزيل عميد كلية العلوم **الاستاذ الدكتور نبيل عبد عبدالرضا** ورئيس قسم علوم الحياة **الاستاذ المساعد الدكتور حبيب وسيل شبر** لرعايتهم واهتمامهم بطلبتهم ومدعم يد العون لنا على مواصلة الدراسة والبحث.....

كما يسرني ان اتقدم بالشكر الجزيل الى كافة التدريسين والتدريسيات في كلية العلوم /قسم علوم الحياة واطمئن بالشكر الجزيل والتقدير لزملائي في الدراسات العليا **الاستاذ غالب والاستاذ عباس والاستاذ صلاح والاستاذ محمد واخواتي الست رشا والست شيماء ناجي والست رجوان والست تمارا.**

كما اتقدم بالشكر والامتنان الى منتسبي- فرع الاحياء المجهرية في مختبر الصحة العامة - لتقديمهم كل التسهيلات والمعونة، واطمئن بشكري وامتناني **للمست فرح وست احلام والاستاذ صاحب والاستاذ وعد وست رؤى وست منار واستاذ امير** ، والى كل من قدم لي يد العون جزاهم الله خيراً.

ويسرني أن أقدم أجمل عبارات الشكر لمنتسبي الاستشارية الصدرية وبالخصوص **الاستاذ فلاح وست سرى** لما قدموه من معونة ، ومنتسبي قسم المختبرات شعبة البكتريولوجي في مستشفى الديوانية التعليمي في الديوانية واطمئن منهم **الدكتور انمار** لما ابداه من مساعده لي جزاه الله عني خيراً.

ومن باب العرفان بالجميل أقدم شكري الجزيل وامتناني الى جميع المرضى الذين لولاهم ماانجزت عملي هذ مع دعواتي الخالصة لهم بالشفاء العاجل كما اتقدم بالشكر الجزيل لكل من مدَّ لي يد العون وساندني بكلمات التشجيع والدعم المعنوي والى كل من نطقت شفاه بالدعاء لي خلال مدة البحث جزاهم ربي خير الجزاء .

ومن الله العون والتوفيق

عذراء

الخلاصة

Summary

الخلاصة

تعد بكتريا *Pantoea spp.* احد انواع المسببات المرضية الانتهازية المتسببة في انتشار عدوى المستشفيات عالمياً في هذه الدراسة جُمعت 623 عينة توزعت ما بين 483 عينة من الحالات السريرية المختلفة بنسبة (77.52%) و 140 عينة بيئية بنسبة (22.47%) من مستشفيات مدينة الديوانية التي شملت مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى النسائية والاطفال التعليمي ومركز الحروق التخصصي والاستشارية الصدرية ومختبر الصحة العامة للمدة من تشرين الاول 2017 الى حزيران 2018 . وتم جمع العينات السريرية من المرضى الراقدين والوافدين الى المستشفيات المذكورة أعلاه و بأعمار مختلفة لكلا الجنسين ،ومن ثم قسمت هذه العينات بحسب مصادر جمعها الى 82 عينة ادرار ، 23 مسحة بلعوم ، 49، مسحة اذن ، 83 عينة من التنقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى ، 27 عينة براز ، 31 مسحة قيح العمليات الملتهبة ، 44 مسحة جروح ، 70 مسحة حروق و 74 عينة قشع . أما العينات البيئية فقد شملت (30 مسحة من الارضية ، 40 مسحة من الادوات الطبية ، 20 مسحة من الاجهزة الطبية ، 30 مسحة من الجدران ، 20 مسحة من الاسرة).

أظهرت النتائج الأولية للأختبارات الزرعية والكيموحيوية عائلية 24 عزلة لبكتريا نوع *Pantoea* وتم تأكيد تشخيصها بأستخدام API-20E و تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR .

إذ سجلت الدراسة الحالية تواجد لنوعين ممرضين لجنس *Pantoea* في مستشفيات مدينة الديوانية، النوع الاول *Pantoea agglomerans* بنسبة (2.27%) و أعلى من النوع الثاني *Pantoea calida* .

كما توصلت الدراسة الحالية الى ارتفاع الاصابة ببكتريا *Pantoea spp.* في الفئات العمرية (41-50) سنة بنسبة (36.84%) وكانت نسبة اصابة الذكور أعلى (57.89%) مقارنة بالأنثى (42.10%) .

تم إجراء فحص الحساسية الدوائية لـ 24 عزلة من بكتريا *Pantoea* المعزولة في هذه الدراسة تجاه 21 مضاداً حيوياً والعائدة لـ 12 صنفاً من اصناف المضادات الحياتية بأستخدام طريقة أنتشار الاقراص. إذ أظهرت عزلات بكتريا *Pantoea* نسبة مقاومة عالية تجاه مضادات بيرياسيلين (75%) ، تاكارسلين -كلافولانك اسد (87.5%) ومضاد اموكسيلين -كلافولانك اسد بنسبة (100%). وكذلك أظهرت العزلات مقاومة عالية لمضادات صنف السيفالوسبورينات (الجيل الثالث) متمثلة بمضادات سيفتازيديم بنسبة (100%) ،مضاد سيفترياكزون بنسبة (87.5%) ازترونام بنسبة (91.6%) . فيما

يخص مضادات الكاربابنيم فقد أظهر مضاد ميروبيينيم فعاليته تجاه جميع عزلات بكتريا *Pantoea* spp. التي ابدت حساسيتها تجاهه بنسبة (100%) وسجلت هذه البكتريا نسبة مقاومة اقل لمضاد اميكاسين (8.3%).

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود مقاومة مشتركة بين اصناف المضادات الحياتية المستخدمة والتي لوحظت في عزلات بكتريا *Pantoea* spp. مما جعلها تمتلك مقاومة متعددة لهذه المضادات. اذ سجلت هذه البكتريا انواع مختلفة من المقاومة المتعددة نوع Extensive drug (XDR) resistance بعد مقاومتها كل اصناف المضادات الحياتية عدا صنف واحد اواثنين بنسبة (54.1%) في حين اظهرت هذه البكتريا صفة المقاومة المتعددة (Multidrug resistant) (MDR) بعد مقاومتها لثلاث أو أكثر من أصناف المضادات المستخدمة نسبة (29.1%) فيما سجلت هذه البكتريا نسبة مقاومة لكل اصناف المضادات الحياتية (Pandrug resistance) (PDR) (16.6%).

واختبرت جميع عزلات بكتريا *Pantoea* spp. للتحري عن انتشار جينات الضراوة (*avrXacE2, avrXacE1, hrpG, hrc, rcsA, rcsB, hpaA, acrAB*) بينها باستعمال تقنية سلسلة تفاعل انزيم البلمرة PCR (Monoplex). اذ سجلت أعلى نسبة تواجد للجين *hrpG* فقد كانت عدد العزلات الحاوية عليه 19 عزلة وبنسبة (79.16%). يليه جين *hrc* بنسبة (70.83%) بواقع 17 عزلة اما عدد عزلات هذه البكتريا الحاوية على الجين *avrXacE2* فقد بلغ 13 عزلة بنسبة (54.16%). اما بالنسبة لتواجد جين *rcsA* فقد سجل نسبة (68.42%) بواقع 13 عزلة. في حين لم تسجل الدراسة الحالية اي نسب لتواجد جينات الضراوة (*avrXacE1, rcsB, hpaA, acrAB*) بين عزلات هذه البكتريا. كما توصلت الدراسة الحالية الى ان بكتريا *Pantoea* ممرض انتهازي يسبب اصابات للانسان بالرغم من ندرة وجودها في مستشفيات مدينة الديوانية مثل التهابات الجهاز البولي والتهابات الجهاز الهضمي والتهابات الجهاز التنفسي كما ان هذه البكتريا مقاومة للمضادات الحياتية الشائعة الاستعمال.

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع
2-1	Introduction / المقدمة / الفصل الأول
19-3	Literatures Review / استعراض المراجع / الفصل الثاني
5-3	1.2: نبذة تاريخية
6	2.2: تصنيف جنس <i>Pantoea</i>
7-6	1.2.2: الصفات العامة لبكتريا <i>Pantoea spp</i> .
8-7	2.2.2: الصفات العامة لبكتريا <i>Pantoea agglomerans</i>
8	3.2.2: الصفات العامة لبكتريا <i>Pantoea calida</i>
10-8	3.2: الامراضية وعوامل الضراوة
11-10	1.3.2: النظام الافرازي الثالث في البكتريا
12	2.3.2: متعدد السكريات الخارجية
13-12	3.3.2: انزيمات گلوكاينيز الداخلية
14-13	4.3.2: انتاج حوامل الحديد
15-14	5.3.2: الغشاء الحيوي
16	4.2: جينات الضراوة
16	<i>hrp gene and hrc gene</i> :1.4.2
17	<i>rcsA gene and rcsB gene</i> :2.4.2
18	<i>avrxacE1 gene and avrxacE2 gene</i> :3.4.2
18	<i>hpaA gene</i> : 4.4.2
19	<i>acrAB gene</i> :5.4.2

الصفحة	الموضوع
40-20	الفصل الثالث / المواد وطرائق العمل
20	3: المواد وطرائق العمل Materials and methods
20	1.3: المواد Material
20	1.1.3: الأجهزة والأدوات المخبرية Equipment and apparatus
21	2.1.3: المواد البايولوجية و الكيمياوية Chemical material and Biological
22	3.1.3: الأوساط الزرعية الجاهزة Ready media
22	4.1.3: الأوساط الزرعية المحضرة مختبرياً laboratory prepared media
24-23	5.1.3: أقراص المضادات الحيوية (Antibiotic disks) المجهزة من شركة (Turkey) Bioanalyse
25-24	6.1.3: بادئات الـDNA (DNA primers)
26-25	7.1.3: العدد الـجاهزة
27	2.3: طرائق العمل Method
27	1.2.3: تحضير الأوساط الزرعية Preparation of culture media
27	1.1.2.3: تحضير الأوساط
27	2.1.2.3: تعقيم الأوساط
29-27	3.1.2.3: الأوساط الزرعية المحضرة مختبرياً laboratory prepared media
29	4.3: تحضير المحاليل والكواشف Solutions and Reagents
29	1.4.3: المحاليل
29	1.1.4.3: محاليل صبغة كرام Gram stain solutions
29	2.1.4.3: المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline solution
29	3.1.4.3: المحلول الدائري الفوسفاتي الملحي Phosphate buffer saline (PBS)
30-29	4.1.4.3: أنبوبة ماكفرلاند القياسية McFarland tube standard No. (0.5)
30	2.4.3: الكواشف
30	1.2.4.3: كاشف الكتاليز Catalase reagent
30	2.2.4.3: كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent

31-30	3.2.4.3: كاشف فوكس بروسكاور Voges proskauer reagent
31	4.2.4.3: كاشف احمر المثيل Methyl red reagent
31	5.2.4.3: كاشف كوفاكس :Kovac's reagent
31	5.3: جمع العينات Collection of samples
31	6.3: عزل البكتريا Isolation of bacteria
32	7.3:تشخيص البكتريا Identification of bacteria
32	1.7.3: الخصائص المظهرية والتشخيص المجهرى Phenotypic characteristics and Microscopic diagnosis
32	2.7.3: الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests
32	1.2.7.3: اختبار الكتاليز Catalase test
32	2.2.7.3: اختبار الاوكسيدز Oxidase test
33-32	3.2.7.3: اختبار انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين Production of hydrogen sulfite test
33	4.2.7.3: اختبار قابلية الحركة Motility test
33	5.2.7.3: اختبار تخمر الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation test
33	6.2.7.3: اختبار اليوريز Urease test
34-33	7.2.7.3: مجموعة اختبارات IMViC التي تشمل
35-34	3.7.3:التشخيص بنظام Api 20 E Api 20 E diagnosis system
35	8.3: حفظ وإدامة العزلات البكتيرية Preservation and maintenance of bacterial isolates
35	1.8.3: الحفظ قصير الأمد
35	2.8.3: الحفظ طويل الامد
36	9.3: اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility testing
36	10.3:تفاعل السلسلة المتبلمرة Polymerase Chain Reaction(PCR)
37-36	1.10.3:استخلاص الحامض النووي البكتيري (Genomic DNA extraction)
38	2-10-3:فحص الحامض النووي المستخلص DNA examination
39-38	3.10.3: تحضير مزيج انزيم سلسلة التفاعل الجزيئي المتبلمر (PCR)
39	4.10.3:برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الDNA
40	5.10.3: الترحيل الكهربائي بالهلام Agarose gel electrophoresis

40	Statistical analysis التحليل الاحصائي 11.3
79-41	الفصل الرابع / النتائج والمناقشة
41	Reusults and disscuion النتائج والمناقشة 4
43-41	Study society مجتمع الدراسة 1.4
47-43	Isolation and Identification العزل والتشخيص 2.4
47	Cultural and Microscopic characteristic الصفات الزرعية والمجهريّة 1.2.4
48-47	Biochmical Test الفحوصات الكيموحيوية 2.2.4
49	3.2.4 : تشخيص بكتريا <i>Pantoea spp.</i> باستخدام نظام API-20E Diagnosis of <i>Pantoea spp.</i> Using the API-20E system
50-49	4.2.4: تشخيص بكتريا <i>Pantoea spp.</i> باستعمال تقنية الـ PCR Diagnosis of <i>Pantoea spp.</i> using PCR technology
53-50	3.4: انتشار عزلات <i>Pantoea spp.</i> وتوزيعها حسب العمر والجنس
56-54	4.4: انتشار عزلات <i>Pantoea spp.</i> وتوزيعها حسب منطقة السكن وحالة المرضى
61-57	Antibiotic Sensitivity Test اختبار فحص الحساسية 4.4
64-62	5.4: المقاومة المشتركة لاصناف المضادات الاخرى
71-64	6.4: انتشار جينات الضراوة بين عزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i>
74-72	7.4: انتشار جينات الضراوة بين عزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i> وتوزيعها بحسب حالة المرضى ومنطقة السكن
76-75	8.4: توزيع وانتشار جينات الضراوة في عزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i> حسب نوع المقاومة المشتركة لاصناف المضادات الحياتية
79-77	9.4: توزيع وانتشار اكثر من جين من جينات الضراوة بين عزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i>
81-80	الاستنتاجات والتوصيات Conclusion & Recommendation
80	Conclusions الاستنتاجات
81	Recommendations التوصيات
103-82	المصادر References

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
5	الانواع العائدة لبكتريا <i>Pantoea</i>	(1-2)
25-24	بادنات ال DNA التي استعملت خلال هذه الدراسة.	(1-3)
39	مكونات مزيج تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة بحجم 20 مايكروليتر	(2-3)
39	الظروف الحرارية المستعملة في جهاز المضخم الحراري PCR	(3-3)
43	النسب المنوية لعزل بكتريا <i>Pantoea spp.</i> وعزلات البكتريا السالبة والموجبة لصبغة جرام والعزلات الخالية من النمو البكتيري	(1-4)
46	النسب المنوية لعزل بكتريا <i>Pantoea</i> وانواعها من المصادر السريرية المختلفة	(2-4)
47	النسب المنوية لعزل بكتريا <i>Pantoea</i> وانواعها من المصادر البيئية المختلفة	(3-4)
48	الاختبارات الكيموحيوية لأنواع <i>Pantoea spp.</i> المعزولة من مصادر مختلفة	(4-4)
52	توزيع عزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i> وانواعها المعزولة من عينات سريرية مختلفة حسب الفئات العمرية	(5-4)
53	توزيع عزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i> وانواعها المعزولة من عينات سريرية مختلفة حسب الجنس	(6-4)
55	توزيع عزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i> وانواعها المعزولة من عينات سريرية مختلفة حسب منطقة السكن	(7-4)
56	توزيع عزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i> وانواعها المعزولة من عينات سريرية مختلفة حسب حالة المرضى	(8-4)
61	النسب المنوية لعزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i> المقاومة للمضادات الحياتية	(9-4)
63	النسب المنوية لانواع المقاومة التي ابدتها عزلات بكتريا <i>Pantoea</i> وانوعها المشمولة في الدراسة	(10-4)
67	النسب المنوية لتوزيع وانتشار جينات الضراوة في عزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i> وانواعها المختلفة المشمولة بالدراسة	(11-4)
73	النسب المنوية لتوزيع وانتشار جينات الضراوة المشمولة بالدراسة في بكتريا <i>Pantoea spp.</i> حسب حالة المرضى	(12-4)
74	النسب المنوية لتوزيع وانتشار جينات الضراوة المشمولة بالدراسة في بكتريا <i>Pantoea spp.</i> حسب منطقة السكن	(13-4)
76	النسب المنوية لتوزيع وانتشار جينات الضراوة المشمولة بالدراسة حسب نوع المقاومة التي ابدتها عزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i>	(14-4)
79-78	النسب المنوية لانتشار جينات الضراوة بين عزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i>	(15-4)

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	مركز الشكل
11	a- الجهاز الافرازي الثالث في البكتريا السالبة لصبغة كرام b- اوبرونات جينات <i>hrp/hrc</i> المشفرة من قبل النظام الافرازي الثالث في البكتريا (Oh et al. 2005)	(1-2)
42	النسبة المئوية للعدد الكلي للعينات السريرية والبيئية المشمولة قيد الدراسة	(1-4)
49	شريط API20E المستخدم لتشخيص بكتريا <i>Pantoea spp</i>	(2-4)
50	الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين ال 16SrRNA gene الخاص بتشخيص جرثومة <i>Pantoea spp.</i> إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر من رقم (1-24) عزلات جرثومة <i>Pantoea spp.</i> الموجبة للفحص بناتج طوله 523bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.	(3-4)
68	الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين <i>avrXacE2</i> gene في جرثومة <i>Pantoea spp.</i> إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر رقم (3,7,8,9,10, 13, 16, 18,19,20,22,23,24), عزلات جرثومة <i>Pantoea</i> الموجبة للجين بناتج طوله 204bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.	(4-4)
68	الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين <i>hrpG</i> gene في جرثومة <i>Pantoea spp.</i> إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر رقم (1,2,3, 7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22) عزلات جرثومة <i>Pantoea spp.</i> الموجبة للجين بناتج طوله 402bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة	(5-4)
69	الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين <i>hrc</i> gene في جرثومة <i>Pantoea spp.</i> إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر رقم (1,2,3,4,5, 6, 7,8,9, 12,13,14,15,17, 22,23,24), عزلات جرثومة <i>Pantoea spp.</i> الموجبة للجين بناتج طوله 647bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.	(6-4)
69	الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين <i>rcaA</i> gene في جرثومة <i>Pantoea spp.</i> إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر رقم (4, 6, 7,9,10,11,12,14,15,17,19,22,24), عزلات جرثومة <i>Pantoea spp.</i> الموجبة للجين بناتج طوله 395bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.	(7-4)

70	الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين <i>avrXacE1</i> gene في جرثومة <i>Pantoea spp.</i> إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر من رقم (24-1) عزلات جرثومة <i>Pantoea spp.</i> السالبة للجين بناتج طوله 304 bp. وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.	(8-4)
70	الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين ال <i>rCSB</i> gene في جرثومة <i>Pantoea spp.</i> إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر من رقم (24-1) عزلات جرثومة <i>Pantoea spp.</i> السالبة للجين بناتج طوله 438bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.	(9-4)
71	الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين <i>hpaA</i> gene في جرثومة <i>Pantoea spp.</i> إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر من رقم (24-1) عزلات جرثومة <i>Pantoea spp.</i> السالبة للجين بناتج طوله 519bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.	(10-4)
71	الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين <i>acrAB</i> gene في جرثومة <i>Pantoea spp.</i> إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر من رقم (24-1) عزلات جرثومة <i>Pantoea spp.</i> السالبة للجين بناتج طوله 515bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.	(11-4)

قائمة المختصرات

المختصر	تعريفه
AHL	N-Acyle Homoserine Lactone
AMEs	Aminoglycoside-Modifying Enzymes
B	Beta
CFU	Colony forming unit
CLSI	Clinical and laboratory standard institutes
CPS	Capsule polysaccharide synthesis
CSF	Cerebral spinal fluid
DdH2O	Deionized distilled water
EPS	Exopolysaccharide
<i>hrc gene</i>	Hypersensitive response conserved
<i>hrp gene</i>	Hypersensitive response and pathogenesis
IAA	Indole-3-acetic acid
KIA	Kilger's Iron Agar
LPS	Lipopolysaccharides
MDR	Multidrug Resistance
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCCLS	National committee for clinical laboratory standards
PAI	Plasmid-borne pathogenesis island
PCR	Polymerase chain reaction
QSS	Quorum sensing system
<i>rsc genes</i>	Regulator of capsule synthesis genes
SHV	Sulfa-hydral variant β -lactamase
TBE	Tris-borate-EDTA buffer
T3SS	Type three secretion system
UTI	Urinary tract infection
WHO	World Health Organization

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

Introduction

1: المقدمة

عُرِفَت بكتريا *Pantoea* spp بانتمائها الى العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* وهي سالبة لصبغة جرام. وقد عزلت من بيئات ومواطن متنوعة تضمنت الماء، التربة، الغبار، منتجات الالبان، اللحوم والحشرات والحيوان والانسان. كما تم عزلها من نفايات الغسيل الصناعية، اما موطنها الاصلي فهو النبات (Leonila et al.,2017).

تكمن المشكلة الاساسية في أنَّ بكتريا *Pantoea* spp مرتبطة بأمراض انتهازية على الرغم من انها ليست عامل عدوى اجباري لانها كانت بكتريا تعايشية مع النبات وتحولت الى بكتريا ممرضة يمكن ان تكون سببا بالعدوى الانتهازية للانسان غالباً بسبب الاجزاء النباتية كالأشواك او كعدوى مكتسبة في المستشفيات أغلبها بالافراد منقوصي المناعة (Dutkiewicz et al.,2016).

أظهرت الدراسات والبحوث عالميا العديد من الاليات التي تمتلكها بكتريا *Pantoea* spp مما ساعدها بالتغشي داخل المستشفيات والتسبب بالعديد من الأمراض للانسان بالإضافة الى مقاومتها العالية للمضادات الحيوية. (Bello et al.,2018). وإن مقاومة عزلات بكتريا *Pantoea* spp للمضادات الحيوية لاسيما المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية MDR (Multidrug Resistance) لها دور كبير في العدوى للانسان وقابلية انتشار هذه البكتريا باماكن اخرى غير المستشفيات. (Beltran et al.,2018).

وأكدت منظمة الصحة العالمية بان مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية هي احدى المخاوف الرئيسية على الصحة العالمية والقطاعات المرتبطة بها حيث يمكن ان تؤثر على أي شخص بغض النظر عن عمره وموقعه الجغرافي (WHO,2016).

وتنتقل الإصابة التي تسببها بكتريا *Pantoea* spp من اجزاء نباتية مصابة تخترق الجلد نتيجة الصدمة (Trauma) عند قيام المزارعين بالحصاد الزراعي أو أثناء لعب الاطفال بالحدايق او عند القيام باعمال البستنة بالحدايق فتدخل هذه البكتريا الى الجروح والدم وتسبب العدوى الانتهازية وتنتشر عن طريق الدم الى اعضاء الجسم المختلفة وتسبب عدة أمراض منها التهاب المفاصل والتهاب شغاف القلب والتهاب العظم والنقي والتهاب الدماغ في الانسان (Siwakoti et al.,2018)، كما تسبب حالات تجرثم الدم وتسمم الدم عن طريق الادوات والاجهزة الطبية الملوثة كجهاز غسيل الكلى وادوات الجراحة وتزداد الإصابة بهذه البكتريا في الاشخاص منقوصي المناعة وفي حالات الاورام السرطانية وبعد عمليات نقل الاعضاء (Pandya et al.,2018).

تمتلك بكتريا *Pantoea* spp جينات مسؤولة عن الامراضية اذ حددت جينات *hrc,hrp,avr* genes كجينات لها علاقة في الامراضية وزيادة ضراوة هذه البكتريا داخل المضيف ،اذ بعد حقن البروتينات المؤثرة (Effectors proteins) المشفرة من هذه الجينات من خلال النظام الافرازي الثالث (Type T3SS) (three secretion system) في خلايا المضيف تعمل هذه البروتينات الفعالة على كبح الاستجابة المناعية للمضيف والتلاعب في الفعاليات الخلوية الخاصة به وتحويل دفاعات المضيف بما ينفع البكتريا الممرضة ،كما حددت جينات ضراوة اخرى مسؤولة عن انتاج السكريات الخارجية المتعددة EPS (Exopolysaccharide) التي تساهم في عملية التصاق البكتريا وكذلك حددت الانزيمات التي لها الدور الفاعل في امراضية هذه البكتريا مثل انزيم السليوليز Cellulase الذي يساعد بتحليل جدران الخلايا النباتية التي تتألف من طبقة سميكة من بوليمر السليلوز التي توفر حماية للنبات من تغلغل الميكروبات مما تزيد من ضراوة البكتريا المسببة للمرض داخل خلايا المضيف (Schwarz et al.,2010).

بالنظر لكون الدراسات والبحوث المحلية بخصوص هذه البكتريا قليلة جدا من ناحية ومن ناحية اخرى ارتفاع نسبة مقاومة بكتريا *Pantoea* spp لمعظم المضادات الحيوية الشائعة المستخدمة في الوقت الحاضر (Abdalhussen and Darweesh;2016) ونظرا لعدم توفر دراسة سابقة عن تفشي بكتريا *Pantoea* spp داخل المستشفيات وخصوصا الانواع المسببة للمرض مع مقاومتها العالية للمضادات الحيوية في مدينة الديوانية هدفت الدراسة الى :

دراسة جزيئية لبكتريا *Pantoea* spp المعزولة من مستشفيات الديوانية من خلال الجوانب الاتية :

1- عزل وتشخيص بكتريا *Pantoea* spp من مستشفيات الديوانية من العينات السريرية والعينات البيئية كالأدوات والاجهزة الطبية والارضية.

2- تشخيص بكتريا *Pantoea* spp باستخدام انزيم التفاعل الجزيئي المتبلمر (PCR)

3- تحديد الانواع الخاصة ببكتريا *Pantoea* spp المتفشية داخل مستشفيات الديوانية .

4- اجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية تجاه بكتريا *Pantoea* spp. لمعرفة نمط المقاومة التي تبديها البكتريا تجاه هذه المضادات .

5- تصميم بادئات (primers) لجينات الضراوة المشمولة في الدراسة الحالية والتي تضمنت الجينات الاتية:

acrAB,rcsA,rcsB,hrpG,hrc,avrxcE1,avrxcE2,hpaA genes

6- التحري عن انتشار جينات الضراوة المذكورة أعلاه لعزلات بكتريا *Pantoea* spp.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures Review

Literatures review

2: استعراض المراجع

2.1: نبذة تاريخية

ان جميع البكتريا المسببة لأمراض النباتات التي تعود للعائلة المعوية كانت في الماضي تنتمي الى جنس *Erwina*، وتكون هذه البكتريا عسوية الشكل سالبة لصبغة جرام ، غير مكونة للسبورات مخمرة لسكر اللاكتوز (Beji et al., 1988). في عام 1960 قام Dye 's بتقسيم جنس الايروينا *Erwina* على اربع مجموعات بالاعتماد على نوع اعراض المرض الذي تسببه البكتريا على النبات (*Amylovora, Carotovora, Herbicola, atypical Erwina*) (Verdonnck et al., 1987).

وفي عام 1971 نقشت بكتريا *Herbicola* في الولايات المتحدة مسببة انتان الدم Septicemia إذ كان عدد المرضى المصابين بهذه البكتريا 378 شخص توفي منهم 40 شخصاً (Brenner et al., 1984) وفي عام 1972 كانت بكتريا *Pantoea* تقع ضمن *Erwina herbicola-Enterobacter* (*agglomerans complex*) ولقد اعتبره العلماء مأزق تصنيفي (Ewing and Fife, 1972).

في عام 1980 استمر علماء الامراض باستخدام *Erwina herbicola* اثناء الوصف السريري لامراضيتها في حين علماء الاحياء المجهرية كانوا يستخدمون *Enterobacter agglomerans* واطهارها في القوائم المعتمدة من الاسماء البكتيرية (Skerman, 1980) مما أدى الى تحديد العديد من السلالات بالشكل الخاطئ وحدثت مشاكل في تصنيفها بسبب ان العديد من الانواع والسلالات التي تنتمي الى مجموعة كبيرة من البكتيريا اصبحت تعرف باسم مركب وعلى مر السنين تم نقل العديد من الانواع العائدة الى بكتيريا *Erwina spp.* التي تضمنت الانواع الثلاثة *Erwina herbicola, Enterobacter agglomerans, Pantoea, Brenneria, Enterobacter, Pectobacterium*

الى الاجناس الاتية *Erwina milletiae*, الى الاجناس الاتية *Erwina milletiae, Pantoea, Brenneria, Enterobacter, Pectobacterium* مما أدى الى خلق الارباك بشأن التصنيف الصحيح للعديد من الانواع وفي اواخر عام 's 1980 نقلت الانواع الثلاثة الى جنس ونوع جديد *Pantoea agglomerans* (Beji et al., 1988; Gavini et al., 1989).

بعد عدة سنوات نقلت *Erwina ananas* و *Erwina uredovora* الى جنس ونوع جديد هو *Pantoea ananas* كما نقلت *Erwina stewartii* الى نوع جديد لجنس *Pantoea* هو *Pantoea stewartii* (Mergaert et al., 1993). وفي وقت لاحق تحول اسم النوع *ananas* الاناناس النباتي الى النوع *anantis* بعد موافقة المدونة الدولية لتسمية البكتيريا (Truper and De clari, 1997).

وفي عام 1984 أجرى Brenner دراسة أكدت وجود العديد من المجاميع حسب تهجين الحمض النووي تتضمن مجموعة التهجين الاول والثاني والرابع والخامس (I,II,V,IV) على التوالي قسمت على اساس الحامض النووي 16srRNA والتي ينبغي ان تدرج ضمن جنس *Pantoea*. وعلى اساسها قسم جنس *Pantoea* على مجموعتين من الانواع المجموعة الاولى سميت الانواع الاصلية "core" species وتضمنت الانواع الاتية *P. dispersa*, *P. stewartii*, *P. ananatis*, *P. agglomerans* والمجموعة الثانية سميت الانواع اليابانية "Japanese" species التي تم عزلها من الفواكه والتربة في اليابان تضمنت الانواع الاتية: *P. punctate*, *P. citrea*, *P. teirea* (Grimont and Grimont,2005).

ان الانواع العائدة لجنس *Pantoea* مبدئيا عرفت كمرضات نباتية وان هذه البكتريا موطنها الاصلي هو النبات ، أذ سببت *Pantoea agglomerans* امراضا للنباتات المضيفة لها كالبصل والقطن والذرة وغيرها واعتبرت، ايضا، ممرض انتهازي للانسان (Cooksey,1986;Burr et al.,1991;Medrana and Bell,2007) كما سبب *P.anantis* على مدى واسع امراضا للنباتات المضيفة لها كالحنطة والذرة (Coother et al ., 2004 ;Goszczyuska et al ; 2007).

وفي دراسات لاحقة لتقسيم Brenner حددت سلالات لبكتريا *Pantoea* اعتمدت على تقنية PCR بوجود بوادئ متخصصة للانواع مثل *P.anantis* (Gitaitis et al.,2002;Walcoll et al .,2002).

كما اعتمدت دراسات اخرى في تحديد انواع جديدة لبكتريا *Pantoea* على تسلسلات 16srRNA (Coutinho et al.,2002;Medrano and Bell.,2007). فيما اعتمدت دراسات اخرى على تقنية تهجين الدنا DNA-DNA Hybridisation لتحديد انواع اخرى لبكتريا *Pantoea* (Kageyama et al.,1992;Mergaert et al., 1993).

اما عدد الانواع التي وصفت ضمن جنس *Pantoea* كان 21 نوعا كما موضحةً في جدول (1-2).

جدول (1-2) أنواع بكتريا *Pantoea*

Species	Reference
<i>P. agglomerans</i>	(Gavini <i>et al.</i> ,1989)
<i>P. dispersa</i>	(Gavini <i>et al.</i> ,1989)
<i>P. ananatis</i>	(Mergaert <i>et al.</i> ,1993)
<i>P. stewartii</i> subsp. <i>Indologenes</i>	(Mergaert <i>et al.</i> ,1993)
<i>P. stewartii</i> subsp. <i>Stewartii</i>	(Mergaert <i>et al.</i> , 1993)
<i>P. anthophila</i>	(Brady <i>et al.</i> ,2009a,b)
<i>P. deleyi</i>	(Brady <i>et al.</i> ,2009a,b)
<i>P. eucalypti</i>	(Brady <i>et al.</i> ,2009a,b)
<i>P. vagans</i>	(Brady <i>et al.</i> ,2009a,b)
<i>P. gavinae</i>	(Popp <i>et al.</i> ,2010)
<i>P. calida</i>	(Popp <i>et al.</i> ,2010)
<i>P. eucrina</i>	(Brady <i>et al.</i> ,2010a,b)
<i>P. septica</i>	(Brady <i>et al.</i> ,2010a,b)
<i>P. conspicua</i>	(Brady <i>et al.</i> ,2010a,b)
<i>P. cypripedii</i>	(Brady <i>et al.</i> ,2010a,b)
<i>P. brenneri</i>	(Brady <i>et al.</i> , 2010a,b)
<i>P. allii</i>	(Brady <i>et al.</i> ,2011)
<i>P. wallisii</i>	(Brady <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. rodasii</i>	(Brady <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. rwandensis</i>	(Brady <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. beijingensis</i>	(Liu <i>et al.</i> ,2013)

2.2: تصنيف جنس *Pantoea*

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gamma Proteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Pantoea*

1.2.2: الصفات العامة لبكتريا *Pantoea* spp .

تعتبر بكتريا *Pantoea* spp إحدى افراد العائلة المعوية *Enterobacteriaceae*، التي تضم أكبر مجموعة من الكائنات الدقيقة، وهي عصيات قصيرة سالبة لصبغة جرام لاهوائية اختيارية، وتعد هذه البكتريا مخمرة لسكر اللاكتوز وتتميز مستعمراتها على الوسط الزرعى كالأكار المغذي بانها ملساء وشبه شفافة قليلة التحدب ذات حواف كاملة كما تمتاز بعض انواعها الممرضة للإنسان بتكوينها مستعمرات مخاطية، تتحرك خلايا هذا النوع بواسطة أسواط محيطية تتميز بعض انواعها بإنتاج صبغات صفراء اللون او صفراء شاحبة في حين بعض الانواع غير منتجة للصبغات، تتميز أنواع هذه البكتريا بانها غير مكونة للكبسولة وغير منتجة للسبورات. ويضم جنس *Pantoea* حاليا 21 نوعا وغالبا ما توجد هذه الأنواع مرتبطة بمجموعة كبيرة من النباتات المضيفة لها مثل نباتات التي تعيش بداخلها البكتريا من دون ظهور اعراض مرضية عليها التي تسمى Endophyte او النباتات السطحية Epiphyte التي تعيش بعيدا عن التماس مع التربة اذ تغرس جذورها على جذوع اشجار نباتات اخرى او فوق الاغصان العليا للنباتات كما توجد في بيئات اخرى كالغبار والمياه والتربة ومنتجات الالبان واللحوم والحيوانات والانسان.

(Cruz *et al.*,2007 ;Donnenberg and Michael,2009; De Maayer *et al.*, 2012).

تعد بكتريا *Pantoea* spp إحدى الممرضات الانتهازية (Opportunistic pathogens) إذ تعتبر من أهم الانواع البكتيرية المسببة بما يعرف بعدوى المستشفيات (Nosocomial infections)، ويمكنها أن تسبب الأمراض للإنسان والحيوان والنبات (Dutkiewicz *et al.*,2016).

اذ تسبب حالات مرضية مختلفة ولاسيما بعد العمليات الجراحية، كالتهاب الدماغ (Meningitis) اذ شخصت بكتريا *Pantoea* في سائل النخاع الشوكي (CSF) Cerebro spinal fluid (Fritz et al.,2014) كذلك قد تكون سبباً بتجرثم الدم Bacteriemia، وانتان الدم Septeciemia خاصةً في الاطفال حديثي الولادة والتهابات الجهاز البولي Urinary tract infection (UTI) والتهاب باطن المثانة Endophthalmiti والتهاب شغاف القلب Endocardsitis والتهاب العظم والنقي Osteomyelitis والتهاب المفاصل القيجي Septic arthritis (Panta et al.,2018).

2.2.2: الصفات العامة لبكتريا *Pantoea agglomerans*

خلايا هذه البكتريا عصيات متحركة لاهوائية اختيارية غير مكونة للسبورات ومستعمراتها مخاطية شبه شفافة تنتج صبغات ذات لون اصفر او بيجي ، عرفت قديما بـ *Enterobacter agglomerans* ، وهي مخمرة لسكر اللاكتوز وسكر السكروز وسكر الزايلوز وسكر المالتوز (Cruz et al.,2007;Sharma et al.,2012) . مُيزت امراضية هذه البكتريا لأول مرة كممرض للنبات من Dye's في عام 1980 كما حددت اصابات داخل المستشفيات لها.

يعتبر هذا النوع من اكثر الانواع شيوعا في تسببه بالامراضية للانسان إذ سجلت اصابته كممرض انتهازى مرتبط بتلوث الانابيب المستعملة لاغراض علاجية او باختراقه الجلد من خلال الضربة بسبب الاشواك النباتية اثناء الحصاد الزراعي او اثناء لعب الاطفال مما يسبب دخولها من الجلد الى الانسجة ومن ثم التسبب في التهابات مزمنة (Jain et al.,2012) كما ارتبطت بالاصابات داخل المستشفيات الناجمة عن تلوث المعدات الطبية اثناء القسطرات الوريدية او تلوث منتجات الدم كالبلازما او الصفائح الدموية او نقل السوائل الاخرى (Habsah et al.,2005; Bosszczowski et al.,2012).

عزلت هذه البكتريا من عينات عديدة منها الادرار، الجروح، القيح، الدم، الحنجرة وغيرها كما ثبت بتسببها باصابات التهابية متعددة منها انتان الدم Septicemia وتجرثم الدم Bacteremia والتهاب الدماغ Meningitis (Bicado et al.,2007) وتسبب خراج الدماغ والرئة Lung brain abscess والتهاب نقي العظم Osteomyelitis والتهاب المفاصل القيجي Septic arthritis و التهاب غشاء البريتون Peritonitis وغيرها (Kratz et al.,2003). كما تسبب بكتريا *P. agglomerans* الانتان أي وجود هذه البكتريا في مجرى الدم بعد اصابة المعدة والامعاء بالتهاب حاد بسبب الاصابة بنوع فيروسي يسمى بالفيروسية العجلية الذي يعود الى فصيلة الحامض النووي الرايبوزي المزدوج dsRNA ويسبب الاسهال

الحاد وضرر شديد للخلايا التي تغلف الامعاء الدقيقة (Cicchetti et al.,2006) .كما سجل Cruz et al.,(2007) 53 اصابة ببكتريا *P. agglomerans* في الاطفال.

3.2.2: الصفات العامة لبكتريا *Pantoea calida*

عصيات سالبة لصبغة غرام متحركة ،لاهوائية اختيارية غير مكونة للسبورات تكون خلاياها اما مزدوجة او منفردة تتميز مستعمراتها بعدم انتاجها للصبغات كما تتميز بكونها ذات تحذب واضح غير منتجة للانزول وموجبة لاختبار الكاتليز وسالبة لاختبار الاوكسيدز وتنمو جيدا في 37 م° في حين يكون نموها ضعيفا في 10م° أما الدرجة المثلى للنمو فتتراوح بين(37-44) م° وتكون الخلايا ذات شكل بيضوي اما طول الخلايا فيتراوح من (2-1,5) مايكرون وعرضها 1 مايكرون . تعتبر هذه البكتريا مخمرة لسكر اللاكتوز وسكر الفركتوز وسكر المانوز وسكر الغالالكتوز وسكر الرافنوزوسكر الكلوز (Barberan et al.,2017) ...

كانت هذه البكتريا غير مرتبطة باصابات للانسان لكن الدراسات الحديثة اكدت ارتباطها بالامراضية للانسان حيث ارتبطت بالاصابات بعد العمليات الجراحية بعد عزلها من عينات سائل النخاع الشوكي (CSF) نتيجة ظهور اعراض بعد خمسة ايام من اجراء العملية الجراحية لالتهاب الدماغ Meningitis (Fritz et al.,2014). وفي دراسات اجراها Seng et al.,(2013) اكد وجوب اضافة هذه البكتريا الى الانواع المسببة للامراض الانتهازية التي تعود الى العائلة المعوية نتيجة لما سببته من اصابات بعد العمليات الجراحية .

3.2:الامراضية وعوامل الضراوة

تشمل الامراضية عدد من الخطوات المعقدة من أجل دخول البكتريا الى المضيف وتتضمن هذه الخطوات ،كبح دفاعات المضيف الاولية وكبح الكشف الدفاعي الخاص بالاستجابة المناعية للمضيف ومن ثم تكاثر البكتريا داخل المضي ف واخيرا ظهور اعراض المرض المميزة (Alfano and Collmer,2004).

تمتلك بكتريا *Pantoea spp.* عوامل ضراوة عديدة تساعدها في امراضيتها قد تكون هذه العوامل خلوية متمثلة بالاسواط (flagella)،الاهلاب (pili) والشعيرات (fimbria) التي تساعد البكتيريا على الحركة والالتصاق بخلايا المضيف او بروتينات خارجية تساهم بالامراضية مثل الجيلاتينيز Gelatinase والبروتياز سيرين Serine protease التي تكون مواد خارج خلوية اذ يساهم كلاهما في توفير الغذاء

للبيكتيريا عن طريق تحطيم النسيج للمضيف ووظائف اخرى في تشكيل الغشاء الحيوي Biofilm والمادة اللزجة المخاطية التي تزيد من دفاعات ومقاومة البكتيريا (Popp *et al.*,2010;Raheleh *et al.*,2015) او قد تكون عوامل الضراوة عبارة عن مسارات تنظيمية تسيطر عليها مجموعة من جينات الضراوة مثل النظام الافرازي الثالث Type three secretion system (T3SS) يتم تشفير نظام T3SS عن طريق مجموعتين من الجينات المجموعة الاولى تعرف ب (*hrp*) جينات الامراضية المسؤولة عن الحساسية المفرطة (Hypersensitive response and pathogenisity). والمجموعة الثانية تعرف ب (*hrc*) الجينات المحافظة المسؤولة عن الحساسية المفرطة (Hypersensitive response conserved) حيث يتم تقسيم جينات *hrc* على عائلتين Hrc-Hrp1 و Hrc-Hrp2

(Alfano and Collmer,2004;Correa *et al.*,2012). هذه العائلتين من الجينات مسؤولة عن تصنيع الالهاب *pili* التي تساعد للوصول الى مابعد جدار الخلية المضيفة كالنبات والاستعمار داخل خلايا المضيف (Correa *et al.*,2012). تعتبر الخطوة المهمة من عمليات الاصابة هي ان تكون الكائنات الدقيقة اقرب مايكون الى الاسطح المخاطية للمضيف ويكون ذلك من خلال ربطها بالخلية المضيفة بواسطة الالتصاق (adherence) عادة ماتكون خواص المادة اللاصقة في العائلة المعوية معبرة عن طريق مجموعة مختلفة من الالهاب *pili* وهي لواحق مرنة شبيهة بالقضبان تضم الزوائد او اللواحق appendages الداخلة في الاقتران البيكتيري وتنقل المادة الجينية (DNA) بين البكتيريا. اصبح مصطلح *pilus* مصطلحا عاما لوصف جميع انواع الزوائد الخيطية غير السوطية وغالبا مايستعمل للتبادل مع مصطلح *fimbriae* وهو يلعب دورا حاسما في الامراضية البيكتيرية عن طريق السماح للبيكتيريا بالالتصاق والاستعمار على وجه التحديد بالمخاط او الخلايا الطلائية للجهاز البولي والتناسلي والتنفسي والامعاء ومن ثم الشروع بالمرض (Holt and Ledbtter,1998). كما ان قدرة بكتريا *Pantoea spp.* على كونها تسبب العدوى للانسان ينطوي لوجود عدد من عوامل الضراوة كما هو الحال في جميع مسببات الامراض السالبة لصبغة جرام اذ يعتقد ان متعدد السكريات الدهنية LPS (Lipopolysacchride) الموجودة في الغشاء الخارجي تعتبر عاملاً محدداً مهماً للضراوة لانه يحفز الاستجابة الالتهابية للمضيف (Gangloff *et al.*,2005). كما يزيد من تطور اعراض المرض بالمضيف من خلال تفعيل البروتينات المرتبطة بالامراضية في المضيف مثل الكلوكاينيز Glucanase كما تم اثبات ان ايقاف جين LPS في البكتيريا يقلل من ضراوتها (Alfano and Collmer,1997).

كما وجد ان جين *rpf* (Regulation of pathogenicity factors) ينظم انتاج عوامل الضراوة مثل بروتينيز Protease ومتعدد السكريات الخارجية EPS ولاكبيز Ligases (Barber *et al.*,1997).

وقد ادى ظهور بكتريا *Pantoea* مؤخرا في الانسان الى ادراك ان هذا الجنس يمثل مجموعة من مسببات الامراض المتعددة للمضيف (Volksh *et al.*,2009;Vahling-Amstrong *et al.*,2016) وقد وجد ان السلالات السريرية لبكتريا *Pantoea* التي تنمو بدرجة حرارة 37 م تكون اكثر امراضية من السلالات البيئية التي تنمو بدرجة حرارة 24م درجة مئوية وقدرتها على النمو بهذه الدرجة الحرارية تشير الى قدرتها على استغلال مضيف الانسان (Brady *et al.*,2010).

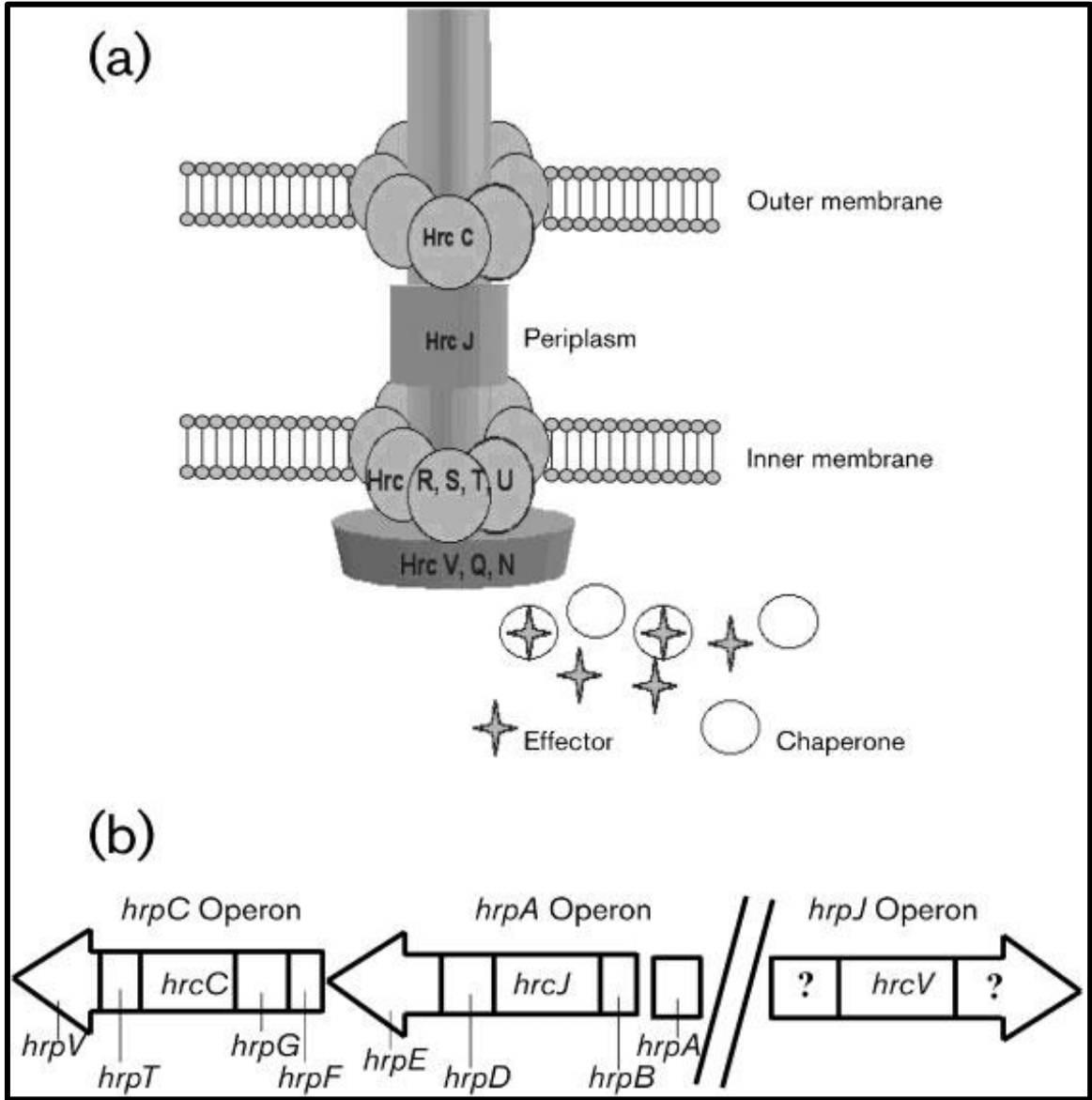
1.3.2: النظام الافرازي الثالث في البكتريا

تحتوي مسببات الامراض لكل من النبات والحيوان والانسان ذات الصبغة السالبة لغرام على نظام الافراز الثالث T3SS (Type three secretion system)، اذ وجد هذا النظام في اغلب البكتريا الممرضة للنبات او جميعها تقريبا. T3SS هو ميكانيكية متخصصة تسمح للبكتريا باستعمال البروتينات الفعالة المرتبطة بالاصابة و المراد حقنها في الخلايا المضيفة اذ تعد كل من بكتريا *Erwina* وبكتريا *Pantoea* وبكتريا *Ralstonia* من الممرضات النباتية Phytopathogens التي لديها نظام T3SS الذي يعطي هذه الممرضات القدرة على استعمار النبات وتسبب موت الخلايا للنبات المضيف اثناء تطور المرض. كما يشارك هذا النظام في افراز السموم مثل هيموليسين (hemolysin) و سايكلوسين (cyclolysin) (Hennecke and Verma,2001; Alfano and Collmer ,2004).

لقد وجد ان البكتريا المسببة للامراضية لها القدرة على التنوع البيولوجي الذي يكون اما التنوع داخل نفس النوع او التنوع بين العائلات والاجناس والانواع لوجود هذا النظام الافرازي T3SS كما يسمى هذا النظام ايضا Injectisome الذي من خلاله تحقن البكتريا البروتينات الفعالة المرتبطة بالاصابة التي تساهم بتحطيم انسجة المضيف شكل(1-2). وتتمثل الوظيفة الاساسية لهذا النظام بنقل البروتينات الفعالة المرتبطة بالاصابة عبر الغشاء البكتيري الى خلايا المضيف (Desvaux *et al.*,2004).

يحتوي نظام T3SS على ثلاثة اجزاء تتضمن مجمع الابرة needle complex الذي يعبر الاغشية الداخلية والخارجية ويبرز من الخلية والجزء الثاني الجسم القاعدي The basal body والذي يشكل قاعدة تخترق الاغشية البكتيرية للطبقة المحيطة والجزء الثالث بوابة التصدير Export gate التي تسيطر على البروتينات المتخصصة بالاصابة التي تفرزها خلال مجمع الابرة. ويعبر عن البروتينات الفعالة في

سايتوبلازم البكتريا ثم تنتقل عبر مجمع الابر الى العصارة الخلوية الساييتوسول Cytosol للخلية العائلة حقيقية النواة إذ تقوم بوظائفها في التلاعب في نظام الدفاع الخاص بالضيف (Gazi et al., 2012).



شكل (1-2) a -الجهاز الافرازي الثالث في البكتريا السالبة لصبغة كرام

b- اوبرونات جينات *hrp/hrc* المشفرة من قبل النظام الافرازي الثالث في البكتريا (Oh et al. 2005).

2.3.2: متعدد السكريات الخارجية

هو أحد عوامل الضراوة المتواجد بشكل عام في بكتريا *Pantoea spp* إذ يلعب دوراً حاسماً ومهماً في تسهيل التصاق البكتريا على سطح المضيف اثناء المراحل الاولية للتفاعلات مع انسجة المضيف ويساهم في منع وصول العوامل المغذية كالماء مثلاً للخلايا المصابة (Dolph *et al.*,1988;Beck *et al.* ,1995; Roper,2011) . يتألف Exopolysaccharide (EPS) من ثلاثة سكريات متعددة بنسبة 3:3:1 وهي الغلوكورونيك اسد (Glucuronic acid) ,كلوكوز (Glucose) وگالاكتوز (Galactose) (Nimtz *et al.*,1996;Yang *et al.*,1996;Roper,2011).

يتم انتاج EPS عن طريق نظام الاستشعار Quorum sensing system (QSS) هذا النظام يعتبر نظام تنبيه واستجابة لاشارات بيئية ويرتبط هذا النظام بالكثافة العددية للبكتريا اي معدل انتشار الخلايا البكتيرية في الوسط ويستعمل ايضاً للتعبير الجيني وتشكيل الاغشية الحيوية وعوامل الضراوة ومقاومة المضادات الحيوية ويستعمل لهذا النظام اشارات التي تكون على شكل جزيئات محفزة ذاتياً (Auto inducer molecules) التي تستعملها كأشارات كيميائية هما AHL (N-Acyle Homoserine Lactone) و يستخدم من قبل البكتريا الممرضة السالبة لصبغة جرام ويتم تصنيع AHL من قبل جين *Esai* الذي يرتبط مع جين *Esar* لتصنيع عامل الضراوة EPS الذي يلعب دوراً مهماً في تطور اعراض المرض للمضيف (Carlier *et al.* ,2009;Roper,2011).

3.3.2: انزيمات گلوكاينيز الداخلية

وهو احد عوامل الضراوة التي تساعد البكتريا في اثناء مهاجمتها المضيف ،وتلعب دورا مهما في الامراضية عن طريق تسهيل الاختراق للبكتريا وتكوين المستعمرات في خلايا المضيف (Sluys *et al.* 2002). قد تكون انزيمات محطمة للجدار الخلوي cell wall degrading enzymes التي تفرزها العديد من البكتريا المسببة للامراض النباتية على الجدار الخلوي مثل السليليز cellulase الذي يكسر السليلوز cellulose والبكتينيز pectinase يكسر البكتين pectin والبروتينيز protease الذي يكسر جزيئات البروتين الكبيرة الى جزيئات بروتين قصيرة وغيرها ،إذ يشار الى النظام الافرازي الثاني (T2SS) Type two secretion system الذي يفرز الانزيمات الضرورية المطلوبة لاحداث الضراوة داخل انسجة المضيف للعديد من البكتريا الممرضة phytopathogens (Carpita and Gibeaut,1993; Stathopoulos *et al.*,2000).

وفي دراسة اجراها (2011) Mohammadi *et al* اوضحت ان الانزيم EGase قادر على تحطيم أصرة β 1-4 xylosyl و β 1-4 glucosyl المتواجدة في الجدار الخلوي للنبات واهميته في العدوى الجهازية لبكتريا *Pantoea spp* عن طريق انتشار هذه البكتريا في خلايا وانسجة المضيف مع ظهور الاعراض المرضية للمضيف.

4.3.2: انتاج حوامل الحديد

الحديد هو عنصر اساسي لنمو العديد من الكائنات الحية الدقيقة ويعتبر العنصر الرابع المتوفر بغزارة في الارض وله دور مهم في تكاثر وبقاء البكتريا الممرضة في داخل انسجة الكائنات الحية حقيقية النواة، ويلعب دورا مهما كعامل مساعد في سلسلة نقل الالكترن والانزيمات المتنوعة الاخرى ، يتواجد الحديد في البيئات الحاوية على الاوكسجين وPH متعادل بشكل بوليمرات اوكسي هيدروكسيد غير ذائبة (Insoluble oxyhydroxide polymers) ذات صيغة عامة $FeOOH$ على الرغم من هذه الكميات الكبيرة المتواجدة في البيئات الا ان تركيزه داخل الكائن الحي يكون واطناً (Wieland *et al.*,2011). إذ إن أغلب الحديد اما ان يكون خارجاً خلوياً اي يتواجد بالافرازات المخاطية والبلازمية مثل ترانسفيرين Transferrin او يكون مرتبطاً بالبروتينات السكرية مثل Lactoferrin وبذلك يكون مستوى وفرة الحديد الحر قليلة جداً وعليه فأن اغلبية البكتريا السالبة لصبغة غرام تستجيب للأشارات البيئية المتمثلة بتحديد وفرة الحديد بواسطة نظام نقل الحديد و تفرز حوامل الحديد Siderophore من جميع البكتريا الهوائية واللاهوائية الاختيارية التي تنمو في بيئات حاوية على كميات قليلة من الحديد وتعمل على تشكيل ارتباط مع مركبات الحديد Ferric Iron (Miethke and Marahile,2007;Burbank *et al.*,2014).

ان انتاج السايديروفور (Siderophore) التي تكون ذات الفة عالية للحديد وذات اوزان جزيئية واطنة وتمتلك الفة كافية لتحويل الحديد في الهيئة التي تحتاجها البكتريا او سحبه من المعقدات الحاوية عليه ثم تسهل عملية توصيله الى داخل الخلية البكتيرية بواسطة مستقبلات بروتينية غشائية خاصة له علاقة بضرارة الكثير من البكتريا الممرضة للانسان والحيوان وكذلك مقاومة البروتينات الناقلة للحديد داخل جسم المضيف (Livermore, 2001). اظهرت دراسات حديثة ان انتاج Siderophore ضروري جدا كأحد عوامل الضراوة في بكتريا *Pantoea spp*. إذ تمكنها من مهاجمة الانسجة الخاصة بالمضيف التي يفترض ان تكون في بيئات ذات تركيز واطى من الحديد . وبذلك ياتي دور حوامل الحديد التي تتحد مع الحديد الموجود في بروتينات المضيف او من المعقدات الحاوية عليه لتشكيل معقد The iron-siderophore complex

وينتقل هذا المعقد الى سايتوبلازم البكتريا وبعدها يحرر الحديد من Siderophore الى داخل البكتريا و ان هذه العملية تجري بتوازن لان الافراط الزائد من الحديد يمكن ان يؤدي الى تكوين الجذور الحرة السامة للخلايا البكتيرية ومن ثم فإن توازن الحديد امر حيوي ويجب ان يكون منظم بإحكام

(Zheng *et al.*,1999;Miethke and Marahiel,2007;Burbank *et al.*,2014).

إن البروتينات اللازمة لتكوين وافراز حاملات الحديد Siderophore في بكتريا *Pantoea spp.* هي مشفرة على اوبرون مكون من خمس جينات اربعة منها تشفر لانتاج انزيمات تدعى Aerobactin synthase لبناء الايروباكتين الذي يحافظ على بقاء وتكاثر البكتريا داخل البيئات ذات التراكيز الواطئة من الحديد وتشمل *iucA,iucB,iucD,iucC* اما الجين الخامس *iut* الذي يشفر لانتاج المستقبلات البروتينية للسايروفور Siderophore في الغشاء الخارجي للبكتريا (Burbank *et al.*,2014).

توجد في اغلب البكتريا العائدة للعائلة المعوية انظمة حوامل الحديد siderophore systems وتشمل The hydroxyl mate-type Aerobactin type نوع الايروباكتين المعروف بالهايدروكسي ميت aerobactin الذي ينتج من السلالات الممرضة وخاصة السلالات المسببة للاخماج وتجرثم الدم ونوع الانتيروباكتين Enterobactin type المعروف بالكاينكول Catechol-type enterobactin الذي ينتج من قبل السلالات الممرضة وغير الممرضة للبكتريا المعوية (Mokracka *et al.*,2004). تستعمل بكتريا *Pantoea* انظمة حوامل الحديد خلال الخطوات الاولى من تشكيل الغشاء الحيوي Bio film (Burbank *et al.*,2015).

5.3.2: الغشاء الحيوي

يعرف الغشاء الحيوي Bio film بانه تجمع معقد للكائنات المجهرية حيث ترتبط بتجمعات اما احادية او متعددة تتمثل هذه التجمعات بافراز نسيج او غشاء خارج الخلية بشكل طبقة واقية ومغلقة للتجمعات البكتيرية ،حيث تفرز بكتريا *Pantoea spp.* مادة لاصقة مخاطية تسمى slime هي مادة مخاطية غير متبلورة ومغلقة للمستعمرات الميكروبية. ان الكائنات الحية الدقيقة وحيدة الخلايا كالبكتريا تتواجد بشكلين الاول تكون حرة او عائمة بوسط سائل و الشكل الثاني تكون الخلايا مكدسة وملصقة بشدة بعضها لبعض وبالغالب يكون الالتصاق بسطح صلب تساعدها بذلك عوامل الالتصاق الخلوي كالاهاب pilus ، يعتبر هذا التغير بالسلوك البكتيري عائداً لعوامل منها نظام الاستشعار (التنبه او الاستجابة) Quorum sensing system الذي عن طريقه تتواصل البكتريا مع بعضها في الغشاء الحيوي عن طريق اشارات كيميائية تسمى

محفزات ذاتية auto inducers كما سمي نظام الاستشعار بنظام التواصل الكيميائي الذي يسمح للبكتريا بالتحكم بالبيئة وتغيير التصرف استجابة لتغيرات مجتمع الغشاء الحيوي. ويتألف الغشاء الحيوي من مواد متبلمرة خارجية مؤلفة من بروتينات وسكريات متعددة وحمض امينية ودهون تسمى (EPS)

.(Stewart and Costwrtton,2001;Fuqua,2007) Extra cellular polymeric substance

يحمي الغشاء الحيوي الخلايا المتواجدة بداخله ويساعد البكتريا على البقاء حية في الظروف القاسية داخل المضيف كما يساعدها في الاصابات المزمنة والمستعصية نتيجة لارتفاع مقاومتها العالية للجهاز المناعي الذي يعتبر احد جوانب الامراضية نتيجة لوجود الاغشية الحيوية منها التهاب شغاف القلب والتهاب الاذن الوسطى والاصابات المتعلقة بالادوات الطبية والتهاب القنطرة (O'Toole *et al.*,2000 ; Lapidot *et al.*,2006)

وتظهر البكتريا في الغشاء الحيوي درجة عالية من المقاومة للعوامل المضادة للجراثيم كما تزداد المقاومة للبكتريا في داخل الغشاء الحيوي للمضادات الحيوية اضعافا تصل الى 1000 ضعف من مقاومتها وهي حرة المعيشة ومقاومة للمنظفات الكيميائية (Davey and Otoole , 2000). ان خطوة الالتصاق بالاسطح تعتبر مهمة جدا وخطوة رئيسة لبدء تشكيل الغشاء الحيوي ويمكن تلخيص تطور Biofilm بخطوات تبدأ بتعلق الخلايا الفردية بسطح صلب، والتصاق او ارتباط غير معكوس وبعدها البدء بتكاثر المستعمرات البكتيرية المنظمة بصورة دقيقة ثم تطور الاغشية الحيوية المعقدة حيث تصبح متعددة الطبقات وبعدها وتعتبر الخطوة الاخيرة تشتت الغشاء الحيوي نتيجة زيادة تجمع الخلايا البكتيرية بداخله مما يؤدي الى تأكله وخروج الخلايا البكتيرية التي تسبب اصابات جديدة وفي اماكن مختلفة (Kokare *et al.*,2009). اكثر من 99% من الكائنات الحية الدقيقة الموجودة على الارض تعيش بشكل غشاء حيوي لان تشكيل الغشاء الحيوي شرط اساسي لوجود جميع المجاميع الميكروبية كخطوة اساسية لبقاء واستمرار المجتمعات الميكروبية (Sutherland ,2001a).

4.2:جينات الضراوة

hrp gene and *hrc* gene:1.4.2

وهي الجينات التي تشفر البروتينات المؤثرة الفعالة (Effectors proteins) المرتبطة بتشكيل النظام الافرازي الثالث في البكتريا T3SS ، وبعدها تنقل البروتينات المؤثرة الى داخل خلايا المضيف وتعتبر هذه الجينات سلسلة تنظيمية تتحكم في تنظيم منطقة *hrp region* ومجموعة من الجينات المسؤولة على التخليق الحيوي لحمض الاندول -3-استيك (IAA) Indole -3- acetic acid والسيتوكينين Cytokinin ولوجود هذه الجينات في بكتريا *Pantoea* تحولت من بكتريا تعايشية مع النبات التي كانت تسمى سابقا الى بكتريا ممرضة ارتبطت بمسببات الامراض الخاصة بالمضيف من خلال تواجد جزر الامراضية التي تنتقل بواسطة البلازميد PAI (Plasmid-borne pathogenesis island) إذ انفردت هذه الجزر بصلتها برفع الضراوة للبكتريا المهاجمة للمضيف نتيجة لوجود هذه الجينات الوظيفية هما جينات *hrc* وجينات *hrp* التي تشفر لبروتينات النظام الافرازي الثالث T3SS (Manulis and Barash,2003;Barash and Manulis-Sasson,2007)

ان جينات *hrc* تصنع الاهلاب pili التي تساعد البكتريا للوصول الى مابعد جدار الخلية المضيفة للبكتريا (Alfano and Collmer,2004;Correa et al .,2012). كما تم تحديد موقع جينات *hrp* و *hrc* بانها موجودة بالبلازميد في البكتريا السالبة لصبغة لكرام المسببة لامراضية الانسان والحيوان والنبات (Hueck,1998;Vipre et al.,1998). تشفر جينات *hrp* بروتينات خارج الخلية على سبيل المثال harpins التي يفرزها نظام T3SS ، وعادة ماتترتب جينات *hrp* في مجموعات حوالي 20 جين منها ما يشفر لمكونات الغشاء الخارجي في البكتريا بينما العديد منها يشفر لنظام الافراز الثالث على الرغم من ان المحددات الاولية للامراضية وللضراوة في العديد من البكتريا هي انزيمات مفرزة مثل سليلوليزز. celluloses بروتينيز protease التي تعمل على تحطيم انسجة المضيف فأن من المعروف حاليا ان جينات *hrp* اعتبرت احدى محددات الامراضية للعديد من البكتريا المرضية السالبة لصبغة كرام (Lingren,1997). كما تم دراسة هذه الجينات على نطاق واسع وخصوصا جين *hrpG* وهو جين تنظيمي نسخي مرتبط وملزم للحامض النووي DNA إذ يعمل هذا الجين في الجزء العلوي من السلسلة التنظيمية لمجموعة جينات *hrp* و يقوم بتنظيم وظيفة جميع الجينات في مجموعة *hrp* (Wengelnik et al .,1996;Lindgren ,1997; Galan and Collmer,1999)

rcsA gene and *rscB* gene:2.4.2

تعتبر جينات *rscA* و *rscB* جينات تنظيمية تتحكم بانتاج الكبسولة متعددة السكريات (Cps)

Capsule polysaccharide synthesis او انتاج (EPS) Exopolysaccharide ، ان انتاج الكبسولة التي تعتبر احد عوامل الضراوة و الامراضية في البكتريا اذ تعتبر غطاء يحميها من البلعمة الخلوية وزيادة مقاومتها للاستجابة المناعية للمضيف واستحثاث الالتهاب للمضيف، تحتاج الى ثلاثة من جينات *rsc* التنظيمية (Regulator of capsule synthesis genes) وتشمل *rscA*, *rscB*, *rscC* كما يساهم انزيم البروتياز protease في انتاج الكبسولة بالاضافة الى العديد من الوظائف الاخرى كالتحلل البروتيني لبعض البروتينات التنظيمية المهمة لتصنيع الكبسولة Rcs (Regulator of capsule synthesis proteins) مثل بروتينات مثل *RcsA* الذي يعتبر بروتين منشط تنظيمي يعمل مع بروتينات *RcsB* هذا المعقد البروتيني مهم بتصنيع الكبسولة وهو شائع في العائلة المعوية الذي يفترض انه يبدأ باشارات كيميائية او استجابة خلوية تنظيمية التي يتم التعرف عليها عن طريق بروتينات *RcsF* المرتبطة بالغشاء الخارجي التي تكون بروتينات دهنية lipoprotein وبروتينات *RcsC* ايضاً متواجدة بالغشاء الخارجي و تستلم الاشارات البيئية وتنقلها الى البروتينات المنشطة (*RcsA*, *RcsB*) الموجودة بالساييتوبلازم يبدأ ارتباط *RcsA* مع *RcsB* لتشكيل معقد التنشيط الذي بدوره ينشط مجموعة جينات *rsc* لتشفير البروتينات حيث يشفر جين *rscA* بروتينات *RcsA* وجين *rscB* يشفر بروتينات *RcsB* وبعد تشفير هذه البروتينات يبدأ التصنيع للكبسولة (Gottesman *et al.*,1985;Majdalani and Gottesman,2005). كما تساهم بروتينات *RcsA* بـانتاج EPS اذ وجد عند ايقاف جين *rscA* عن طريق طفرات الادراج وهي طفرات جينية تحدث بسبب اضافة زوج من القواعد النتروجينية لسلسلة الحامض النووي DNA والتي تسبب نقص في EPS سوف تلغى ضراوة *Pantoea spp* موازنة بالسلاسل الاخرى من نوع بكتيري اخر التي تحمل هذا الجين لان هذا الجين يعتبر بمثابة عامل ضراوة ويؤثر بشدة على تشكيل اعراض المرض وزيادة شدتها في المضيف المستهدف (Kim *et al.*,2017; Roper,2011). كما حددت تسلسلات النيكلويدات لجين *rscA* لأول مرة بواسطة (Allen *et al.*,1987) إذ اعتبر هو الاول الذي حددها وتم موازنة التسلسلات مع انواع اخرى مختلفة عائدة للعائلة المعوية ومن ثم تم التحقق منها بشكل فردي في وقت لاحق (Bernhard *et al.*, 1990;Coleman *et al.*,1990).

***avrXacE1* gene and *avrXacE2* gene: 3.4.2**

هي الجينات التي يرمز لها *avr* genes التي تشفر مجموعة من البروتينات المؤثرة الفعالة المرتبطة بأمراضية بكتريا *Pantoea* spp. تسمى بروتينات الضراوة *virulence proteins* و تشجع هذه البروتينات نمو العوامل الممرضة في المضيف المعرض للأصابة وتسيطر هذه الجينات على قدرة البكتريا في كبح دفاعات المضيف وصد الاستجابة المناعية للمضيف (Leach and White,1996;Alfano and Collmer,1997)

كما وتتداخل البروتينات المشفرة من قبل هذه الجينات مع المقاومة لان جينات *avr* تقوم بتغيير اشارة انظمة الدفاع في المضيف المقاوم و في حالة غياب جين المقاومة *R gene* في العديد من المضائف فإن هذه الجينات تعمل كعوامل ضراوة لاتدعم فقط نمو البكتريا في المضيف بما في ذلك الذي يظهر درجة مختلفة من المقاومة وانما يزيد العدوانية و الامراضية لهذه البكتريا (Collmer,1998).

***hpaA* gene:4.4.2**

يزيد جين *hpaA gene* من افراز الالهلاب *pilius* ويربك اجهزة الدفاع في المضيف ويزيد الضراوة فيها لان الالهلاب تزيد من قابلية البكتريا بالالتصاق بانسجة المضيف ومن ثم التلاعب بفعاليات المضيف الخلوية (Lu et al.,2008;Lorenz et al.,2008). ويعتبر *HpaA* بروتين مناعي وتحكم وسيطرة مهم في نظام الافراز من النوع الثالث T3SS الذي يشفر من قبل جين *hpaA* الذي يوجد بالنواة ويمكن ان ينتقل الى الخلية المضيفة عبر مسار T3SS كما وجد ان المجموعة الرئيسية لجينات *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) تتألف من ست عوامل نسخية بروتينية تقوم بتوجيه انزيم RNA polymerase الى المحفز (Promotor) لبدء عملية النسخ والعوامل هي : *hrpA*, *hrpB*, *hrpC*, *hrpD*, *hrpE*, *hrpF* و اشارت الدراسات ان العامل النسخي *hrpD* يحتوي على الجين *hpaA* الذي يسمى *hrp* المرتبط (*for hrp-associated*) وهو ضروري بشكل خاص لتطور المرض كما تؤثر الطفرات التي تحدث لهذا الجين *hpaA* على الامراضية لكنه يحتفظ جزئياً بالقدرة على تحفيز الضراوة للبكتريا الممرضة (Huguet et al .,1998).

acrAB gene:5.4.2

يلعب هذا الجين دوراً مهماً في مقاومة المضادات الحيوية في العزلات السريرية للبكتريا سالبة لـغرام فضلاً عن التكيف البيئي وزيادة الضراوة ويشفر جين *acrAB* بروتينات *acrAB* وتتكون بروتينات *acrAB* من معقد بروتيني يتألف من بروتين *acrA* هو بروتين نقل للغشاء الداخلي الذي يعتبر بروتين ناقل للإشارات البيئية الداخلية والخارجية للخلية البكتيرية أما بروتين *acrB* فهو بروتين متواجد في *periplasmic* المسافة بين الغشاء الداخلي والغشاء الخارجي للبكتريا (Lobedanz,2007;Touze,2004) إن تواجد هذا الجين في البكتريا هو مهم إذ يوفر امكانية مقاومتها للمضادات الحيوية وتتطلب البكتريا ازالة اثار العوامل المضادة المنتجة من قبل المضيف من أجل التسبب بالعدوى ويساعدها تواجد جين *acrAB* لانجاز هذه المهمة و اشارت الدراسات الى إن تواجد هذا الجين في البكتريا الممرضة بالإضافة الى منحها مقاومة المضادات الحيوية فإنه يمنحها مقاومة عالية للعوامل المختلفة مثل المبيدات والاصباغ وغيرها (Perez *et al.*,2012). كما اشارت بعض الدراسات الى ان التعبير العالي *overexpression* لهذا الجين هو علامة على المقاومة المتعددة للأدوية (MDR) Multidrug resistance (Swick *et al.* ,2011).

الفصل الثالث

المواد و طرائق العمل

Materials and Methods

Materials and methods

3: المواد وطرائق العمل

Materials

1.3: المواد

Equipment and apparatus

1.1.3: الأجهزة والأدوات المخبرية

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم الجهاز	
Al-Hani (USA)	Disposable Petri Dish	اطباق بلاستيكية
Sigma (England)	Ependorff tubes	انابيب ابندروف
superestar (India)	Test tubes	انابيب اختبار
GFL (Germany)	Deep freezer	التجميد العميق
Xpress (England)	Vaccum pump	التفريغ الهوائي
GFL (Germany)	Distiller	التقطير
Concord (Lebanon)	Refrigerator	ثلاجة
Memmert (Germany)	Incubator	حاضنة
Kottermann (Germany)	Water bath	حمام مائي
BBL (USA)	Conical flasks	دورق مخروطي
Superestar (India)	Slides and Cover slides	شرائح زجاجية وغطاء الشريحة
Eriotti (Italy)	Electric oven	فرن كهربائي
China	Calipers	فيرنيا
Sony (Japan)	Nano Drop	قياس كثافة DNA
Cruma (Spain)	Laminar flow cabinet	كابينة الزرع المجهرية
Sony (Japan)	Digital camera	كاميرا رقمية
Melrose park (USA)	Vortex mixer	مازج الدوار
Certyfied (Germany)	Automatic micropipettes	ماصات دقيقة
Olympus (Japan)	Compound light microscope	المجهر الضوئي المركب
Superestar (India)	Disposable Syringes	محاقن
Gallen kaamp (England)	Magnetic stirrer	محرك مغناطيسي
Difco (USA)	Millipore filters paper (0.22µm)	مرشحات دقيقة غشائية
StereIlinLtd (England)	Sterilized Cotton Swabs	مسحات قطنية معقمة
Gallen Kaamp(England)	Hot plate	مسخن حراري
MUV (Taiwan)	UV-transilluminater	مصدر الأشعة فوق البنفسجية
A & B co. (Singapore)	Thermocycler apparatus	المضخم الحراري PCR
LKB (sewedan)	PH-meter	مقياس الحموضة
Hettich (Germany)	Cooling centrifuge	منبذة (مبردة)
Hettich (Germany)	High speed centrifuge	منبذة عالية السرعة
Hiclave (Japan)	Autoclave	موصدة
A& D co. (Japan)	Sensitive electronic alance	ميزان الكتروني حساس
Himedia (India)	Standard wire loop (1µ)	الناقل الزرع القياسي
Lab-net (Tiwan)	Electrophoresis unit	وحدة ترحيل كهربائي

2.1.3: المواد البايولوجية و الكيمياوية Chemical and Biological materials

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم المادة	
Fluka (Switzerland)	L-arabinose	أرابينوز
Biolife (Italy)	Agarose	أكاروز
Difco (USA)	Peptone	بيتون
Sigma (England)	Ethidium bromide	بروميدي الأثيديوم
BDH (USA)	Crystal violet	البلور البنفسجي
SDI (Iraq)	Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	بيروكسيد الهيدروجين
BB (USA)	Gelatin	جيلاتين
BDH (USA)	Sulphuric acid (H ₂ SO ₄)	حامض الكبريتيك
BDH (USA)	Hydrochloric acid (HCl)	حامض الهيدروكلوريك
Blood bank (Diwaniya)	Blood	الدم
BDH (USA)	Tetramethyl-P-phenylene diamine dihydrochloride	رباعي المثيل بارافينيل- ثنائي كلوريد الهيدروجين
Sigma (England)	Safranin	سفرانين
Difco	Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	سكروز
Bioneer (Korea)	DNA Ladder(100bp)	سلم الحامض النووي القياسي
Bioneer (Korea)	Loading dye	صبغة التحميل
Himedia (India)	Gram stain	صبغة غرام
BDH (USA)	α-naphthol (C ₁₀ H ₈ O)	الفانثول
BDH (USA)	Monopotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين
Fluka (Switzerland)	Sodium monohydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين
Fluka (Switzerland)	Sodium dihydrogen phosphate (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين
BDH (USA)	Phenol	الفينول
BDH (USA)	Ethanol (96%)	كحول الايثانول
Fluka (Switzerland)	Barium chloride	كلوريد الباريوم
BDH (USA)	Sodium chloride (NaCl)	كلوريد الصوديوم
Difco (USA)	Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	كلوكوز
Fluka (Switzerland)	Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	كليسيرول
Bioneer (Korea)	PCR water	ماء سلسلة البلمرة
BDH (USA)	Maltose	مالتوز
BDH (USA)	Mannitol	مانيتول
BDH (USA)	Methyl red (C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₂)	المثيل الاحمر
BIOBASICINC(USA)	TBE buffer	محلول الترحيل الدائري
Mast Diagnostic (USA)	Urea solution	محلول اليوريا
Difco (USA)	Beef extract	مستخلص اللحم
BDH (USA)	Potassium hydroxide (KOH)	هيدروكسيد البوتاسيوم
Fluka (Switzerland)	Sodium hydroxide (NaOH)	هيدروكسيد الصوديوم

3.1.3: الأوساط الزرعية الجاهزة Ready media

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم الوسط الزراعي	
Mastdiagnostic (USA)	Brain heart infusion agar	وسط نقيع القلب-الدماغ الصلب
	Brain heart infusion broth	وسط نقيع القلب-الدماغ السائل
Himedia (India)	MacConky agar	وسط آغار الماكونكي
	Peptone water	وسط ماء البيبتون
	Simon citrate agar	وسط استهلاك السترات
	Triple sugar iron agar	آغار السكريات الثلاثي
	Nutrient agar	الوسط المغذي الصلب
	Nutrient broth	الوسط المغذي السائل
Oxiod (USA)	Kligler's Iron Agar(KIA)	وسط كلكلر
	Muller Hinton agar	وسط مولر-هنتون
Oxiod (USA)	MR/VP broth	وسط المثليل الاحمر / فوكس-بروسكاور السائل

4.1.3: الأوساط الزرعية المحضرة مختبرياً laboratory prepared media

طريقة التحضير	اسم الوسط الزراعي	
حضر مختبرياً	Gelatin	وسط الجيلاتين
حضر مختبرياً	Sugar fermentation medium	وسط تخمر السكريات
حضر مختبرياً	Motility	وسط الحركة
حضر مختبرياً	Urea agar base	وسط اليوريا الصلب
حضر مختبرياً	Blood agar	وسط آغار الدم
حضر مختبرياً	Nitrate broth medium	وسط مرق النترات

5.1.3 :أقراص المضادات الحيوية (Antibiotic disks) المجهزة من شركة
(Turkey) Bioanalyse

التركيز/م ايكروغرام	الرمز	اسم المضاد الحيوي	تحت الصنف للمضاد الحيوي	صنف المضاد الحيوي
100	PRL	Piperacillin بيراسيلين	Ureidopeicillin	Penicillins
20/10	AMC	Amoxicillin -clavulanic acid أموكسيسيلين - حامض كلافولانك		β -lactam/ β - lactamase inhibitor combination
75/10	TCC	Ticarcillin/ clavulanic acid تيكارسيلين - حامض كلافولانك		
30	ATM	Aztreonam ازترونام		Monobactams
30	AK	Amikacin اميكاسين		Aminoglycosides
10	CN	Gentamicin جنتاميسين		
10	TOB	Tobramycin توبراميسين		
5	CIP	Ciprofloxacin سيبروفلوكساسين	Floroquinolone s	Quinolones
5	LEV	Levofloxacin ليفوفلوكساسين		
10	NOR	Norfloxacin نورفلوكساسين		
30	NA	Nalidixic acid نالديكسك اسيد		
5	TM	Trimethprim ترايميثوبريم		Folate Pathway
25	SXT	Trimethoprim- amethoxazoleSulf ترايميثوبريم- سدلفاميثوكازول		Inhibitors
30	TE	Tetracycline تيتراسايكلين		Tetracyclines
30	DO	Doxycycline دوكسيسايكلين		

30	C	Chloramphenicol كلورامفينكول		Phenicoles
300	NIT	Nitrofurantoin نتروفورانتين		Nitrofurans
15	AZM	Azthromycin ازت رومايه سين		Macrolides
10	MEM	Meropenem ميروبينيم	Carbapenem	Penems
30	CRO	Ceftriaxon سد ف تري اكرون	Cephalosporin الجيل الثالث	Cephems
30	CAZ	Ceftazidime سد ف تازيديم		

6.1.3: بادئات الـ DNA (DNA primers):

تم استعمال البادئات الخاصة بجين *16srRNA* gene والمسؤول عن تشخيص بكتريا *Pantoea* spp. كما استعملت البادئات المسؤولة عن تحديد جينات الضراوة في هذه البكتريا. فيما صممت جميع البادئات من خلال استعمال موقع NCBI-Genbank وبرنامج primer3plus design وتم تجهيز هذه البادئات عن طريق شركة Bioneer في كوريا جدول (1-3).

جدول (1-3) بادئات الـ DNA التي استعملت في هذه الدراسة.

Gene bank code	Amplicon	Sequence	Primer
FR832419.1	523bp	CCTGGACAAAGACTGACGCT	F
		CGCTTCTCTTTGTATGCGCC	R
AY307102.1	515bp	CCAAACAACAAGCGCAGGAA	F
		TTCCATGATGCCGCTCACAT	R
M60621.1	395bp	AAGTCCATCCGTTGACGCTT	F
		CAATTTACCGATGGCTGCCG	R
Y09848.1	438bp	GAACAACAACCCGGCCATTC	F
		CTTTTGATAAGGCCGCCACG	R
U56662.2:3068-		CTGAATTGCAGCAGTGGGC	F

3512	402bp	GTAAAAATGCCAGGCTGTGCA	R	
U56662.2:3505-5535	647bp	TACAGCCAGCTGATTGCCAA	F	<i>hrc</i>
		CGCTGTGAGATTTTCATGGCG	R	
FJ815213.1	304bp	TCCACGTATCCGATTGAGCG	F	<i>avrxaE1</i>
		AGATGGGCTGTGCGTCATC	R	
FJ815241.1	204bp	CCCTGGACGAATTCGGACAC	F	<i>avrxaE2</i>
		CAACACGATGCAAGAGACGC	R	
NC-003197.2:1195402-1196306	519bp	TGGGCAGTAACGATGTGCAT	F	<i>hpaA</i>
		AAAGTTTCAGTTCACCGCGC	R	

Forward :F البادئ الامامي ، Reverse : R البادئ العكسي

7.1.3: العدد ال جاهزة

الشركة المصنعة(أشمنلأ)	المكونات	العدة
Biomerieux (France)	2-nitrophenyl betaD – galactopyronoside	عدة API 20 E
	L-omithine	
	L-argnin	
	L-lysine	
	Trisodium citrate	
	Sodium thiosulfate	
	Urea	
	L-tryptophan 0.38	

	L-tryptophan 0.19 Sodium pyruvate Gelatin D-glucose D-manitol Inositol D-sorbitol L-rhamanose D-melibiose D-sucrose L-arabinose	
Dongsheng BIOTECH	Solution DS 15ml Solution MS 20 ml Proteinase K 1 ml Wash Buffer PE 15 ml Elution Buffer TE 5ml Spin Column 50pcs	عدة استخلاص الحامض النووي DNA Quick Bacteria Genomic DNA Extraction Kit
iNTRON Biotechnology	<i>i</i> -Taq™ DNA Polymerase 5U 2.5U dNTPs(dATP, dATP, dGTP,dTTP) each 2.5mM Gel Loading buffer 1X Reaction Buffer(10X) 1X	عدة مزيج تفاعل سلسلة البلمرة Maxime pcr premix Kit (<i>i</i> -Taq)

Methods

2.3: طرائق العمل

1.2.3: : تحضير الأوساط الزرعية Preparation of culture media

1.1.2.3:تحضير الاوساط

حضرت جميع الاوساط الزرعية المذكورة في الفقرة (3-1-3) بحسب تعليمات الشركة المصنعة لها و ضبط الاس الهيدروجيني للاوساط الزرعية بحسب الحاجة له باستثناء الاوساط التركيبية التي شملت وسطي اليوريا و اكار الدم .

2.1.2.3:تعقيم الاوساط

أ-التعقيم بالحرارة

عُقت جميع الأوساط الزرعية ال تركيبيّة، والجاهزة، و المحاليل المستعملة التي لاتتأثر بالحرارة بجهاز الموصدة عند درجة حرارة 121 م° وتحت ضغط 1 جو لمدة 15 دقيقة، أما الزجاجيات فقد عقت بالفرن الكهربائي في درجة حرارة 168 م° لمدة ساعتين (MacFaddin, 2000; Ryan and Ray, 2004)

ب-التعقيم بالترشيح

عُقت جميع المحاليل التي تتأثر بالحرارة مثل السكريات واليوريا باستعمال مرشحات غشائية (Millipore filter) ذات فتحات دقيقة بقطر (0.22) مايكرون.

3.1.2.3: الاوساط الزرعية المحضرة مختبرياً laboratory prepared media

A-وسط اختبار الحركة Motility media

حُضر وسط الحركة ، بإذابة 0.5 ملغم من البيبتون و 0.5 ملغم من ملح كلوريد الصوديوم (NaCl) و0.25 ملغم من أغار- أغار (Agar-Agar) في 100 مل من الماء المقطر، كما عدل الأس الهيدروجيني PH للوسط إلى 7، وبعدها وزع الوسط في انابيب زجاجية معقمة وعقت بالموصدة، ثم حفظ الوسط في درجة حرارة 4م° لحين الاستعمال (Collee et al., 1996).

B- وسط اختزال النترات Nitrate reduction medium

حُضر هذا الوسط بإذابة 0,02 غرام من نترات البوتاسيوم KNO3 و 5 غرام بيبتون في 1000 ملييلتر من ماء مقطرثم وضعت في حمام مائي لغرض اذابتها وبعد ذلك وزع

الوسط في انابيب اختبار نظيفة ثم عقت بالموعدة، يستعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا في اختزال النترات إلى نترت (Collee et al., 1996).

C-وسط تخمر الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation medium

تم تحضير هذا الوسط من المكونات الآتية :

• الوسط الاساس Basal medium

حُضِر بإذابة 10 غرام بيتون و 1 غرام من خلاصة اللحم و 5 غرام من ملح كلوريد الصوديوم (NaCl) و 0.018 غرام كاشف احمر الفينول في 1000 مليلتر من ماء مقطر و عدل الأس الهيدروجيني إلى 7.4 وبعدها تم توزيع الوسط في أنابيب زجاجية نظيفة ومعقمة تحتوي على انبوبة درهم (Durham tube) للكشف عن إنتاج الغاز. وبعد ذلك عقت الأوساط بالموعدة.

• المحلول السكري Sugar solution

حُضِرَت محاليل السكريات السكروز Sucrose و الكلوكوز D-glucose واللاكتوز Lactose والزايلوز Xylose والفركتوز Fructosc والانوسيتول L-Mannitol والكالكوز Galactose ، والمالتوز Maltose،والمانيتول Mannitol وسكر المانوز Mannoese، وسكر الرافينوز Raffinose بإذابة 1 غرام من السكر المراد الكشف عنه في 100 مليلتر من الماء المقطر المعقم وبعدها عقت المحاليل باستخدام مرشحات غشائية دقيقة ، و اضيف 0.1 مليلتر من محلول السكر الى كل انبوبة من الانابيب في الفقرة A التي تحتوي على 5 مليلتر من قاعدة الوسط، واعتماد هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على تخمير السكريات المختلفة وكذلك انتاج الغاز (MacFaddin, 2000).

D-وسط الجيلاتين المغذي Nutrient gelatin medium

حضر هذا الوسط بإذابة 120 غرام من الجيلاتين في 800 مليلتر من الماء المقطر، ثم سخن في درجة حرارة 50 م°، وبعدها أضيف إليه 3 غرام من خلاصة اللحم، و 5 غرام

من البيبتون، ثم أكمل الحجم إلى 1000 مليلتر من الماء المقطر، وأعيد تسخينه بالدرجة الحرارية نفسها، وبعدها 'عدّل الأس الهيدروجيني إلى 7، ثم وزع الوسط على أنابيب اختبار، وعقم بالموصدة، وترك ليتصلب بشكل افقي ثم حفظ في درجة 4 م° لحين الاستخدام . استخدم هذا الوسط لمعرفة البكتريا التي تنتج إنزيم الجيلاتينيز (MacFaddin, 2000).

Solutions and Reagents

4.3: تحضير المحاليل والكواشف

1.4.3: المحاليل

Gram stain solutions

1.1.4.3: محاليل صبغة كرام

تم الحصول على محاليل الصبغة جاهزة واستعملت هذه المحاليل لدراسة الخصائص المظهرية لخلايا البكتريا المعزولة تحت المجهر.

Normal saline solution

2.1.4.3: المحلول الملحي الفسيولوجي

حضر بإذابة 0.85 غرام من NaCl في 90 ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر، وعقم بالموصدة. استخدم هذا المحلول في إعداد اللقاح البكتيري المباشر (MacFaddin, 2000).

3.1.4.3: المحلول الدائري الفوسفاتي الملحي (Phosphate buffer saline (PBS)

حضر بإذابة 8 غم من كلوريد الصوديوم (NaCl)، 0.2 غم من كلوريد البوتاسيوم (KCl)، 0.2 غم من فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية (KH_2PO_4) و 1.15 غم من فوسفات الصوديوم الهيدروجينية (Na_2HPO_4) في واحد لتر من الماء المقطرو تم تعقيمها بالمؤصدة (Gruikshank *eta l.*, 1975).

4.1.4.3: أنبوبة ماكفرلاند القياسية (0.5) McFarland tube standard No.

حضرت من المحاليل الآتية وحسب ماجاء في NCCLS (2003):

A- محلول كلوريد الباريوم $BaCl_2 \cdot 2H_2O$

حضر المحلول بإذابة 1.175 غرام في 50 ملي لتر من الماء المقطر المعقم، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر للحصول على تركيز 0.048 مول/لتر من كلوريد الباريوم .

B- محلول حامض الكبريتيك H_2SO_4

حضر المحلول بإضافة 18 ملي لتر من حامض الكبريتيك المركز ببطء إلى 50 ملي لتر من الماء المعقم المقطر ، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر للحصول على تركيز 0.18 مول/لتر من الحامض . تم اضافة 0.5 ملي لتر من محلول (A) إلى 99.5 ملي لتر من محلول (B) وعدلت قراءة العكورة القياسية إلى (0.10-0.08) وحدة تكوين المستعمرة عند طول موجي 625 نانومتر وهذه القراءة تمثل ما يقارب عكورة $(10^8 \times 2-1)$ (Colony forming unit)(CFU) وحدة تكوين المستعمرة في ملي لتر واحد من البكتريا النامية، ووزع المحلول على أنابيب اختبار معقمة ذات سدادات محكمة بحجم 4 ملي لتر لكل أنبوبة وحفظت الانابيب في أماكن معتمة في درجة حرارة الغرفة، واستعملت لغرض موازنة كثافة النمو البكتيري في اللقاح المستعمل مع كثافة المحلول في الأنبوبة .

2.4.3: الكواشف

1.2.4.3: كاشف الكتاليز Catalase reagent

حُضر بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3% ثم حفظ في قنينة معقمة. واستعمل في الاستدلال على البكتريا المنتجة لإنزيم الكتاليز (Collee,1996).

2.2.4.3 : كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent

حضر أنياً بإذابة 1 غرام من رباعي المثيل- بارافينيلين ثنائي أمين ثنائي كلوريد الهيدروجين (Tetra methyle- P-phenylene diamine dihydro chloride) في 90 ملي لتر من الماء المقطر المعقم، وأكمل الحجم إلى 100 مل وحفظ في قنينة معتمة. استخدم هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الأوكسيديز (Prescott and Harley,1996)

3.2.4.3: كاشف فوكس بروسكاور Voges proskauer reagent

حضر من المحاليل الآتية:

محلول (A) الفانفتول (5%):

حُضر بإذابة 5 غرام من الفانفتول في 100 ملي لتر من الكحول الأيثلي بتركيز (96%).

محلول (B) هيدروكسيد البوتاسيوم (40%):

حُضر بإذابة 40 غرام من هيدروكسيد البوتاسيوم في حجم من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر. استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز وإنتاج الاستيل مثيل

كاربينول في اختبار الفوكس- بروسكاور (MacFaddin, 2000).

4.2.4.3: كاشف احمر المثيل Methyl red reagent

حُضِر هذا الكاشف بإذابة 0.1 غرام من صبغة احمر المثيل في 300 مليلتر من تركيز (95 % كحول اثيلي واكمل الحجم الى 500 مليلتر من الماء المقطر اسد تعمل الكاشف للكشف عن التحلل الكامل للسكريات (MacFaddin, 2000).

5.2.4.3: كاشف كوفاكس Kovac's reagent

حُضِر بإذابة 5 غم من Paradimethyl aminobenzaldehyde في 75 مليلتر من كحول ايزوبروبيلي باستخدام حمام مائي ثم أضيف له 25 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك المركز ليصل الحجم الى 100 مل، ويصبح لون الكاشف اصفر شاحب وحفظ في قنينة معتمدة في الثلاجة لغرض استعمال الكاشف في اختبار الاندول (Prescott and Harley, 1996).

Collection of samples

5.3: جمع العينات

جُمعت 483 عينة من الحالات السريرية و140 من العينات البيئية من مستشفيات الديوانية التي تضمنت مستشفى الديوانية التعليمي العام ومستشفى النسائية والاطفال التعليمي ومركز الحروق التخصصي والاستشارية الصدرية ومختبر الصحة العامة للمدة من تشرين الاول 2017 الى حزيران 2018 وجمعت العينات السريرية من المرضى الراقدين والوافدين الى المستشفيات المذكورة، حيث أخذت مسحات (swabs) من عينات سريرية مختلفة شملت عينات الادرار (82) ومسحات البلعوم (23) ومسحات الاذن الوسطى (49) ومسحات من منطقة التنقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى (83) وعينات البراز (عينات اسهال وغائط صلب) (27) ومسحات القيح (31) ومسحات الجروح (44) ومسحات الحروق (70) وعينات القشع (74)، اما العينات البيئية فقد شملت مسحات الارضية (30) ومسحات الادوات الطبية (40) ومسحات الاجهزة الطبية (20) ومسحات الجدران (30) ومسحات الاسرة (20)، استعملت المسحات القطنية الطبية الحاوية على وسط ناقل Transport media swabs في جمع العينات لضمان حيوية العزلات، وبعدها اجريت الاختبارات اللازمة الزراعية والكيموحيوية في مختبر كلية العلوم / جامعة القادسية للحصول على بكتريا *Pantoea spp.*

Isolation of bacteria

6.3: عزل البكتريا

لقتح الاوساط الزراعية اكار الماكونكي MacConkey agar واكار الدم Blood agar بمسحات العينات بطريقة التخطيط وبعدها حُضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 18-24 ساعة، وحُضنت الاطباق التي لم يظهر فيها نمو خلال 24 ساعة لمدة 24 ساعة اخرى قبل ان تعد نتيجة سالبة.

Identification of bacteria

7.3:تشخيص البكتريا

شخصت المستعمرات البكتيرية النامية حسب:

1.7.3: الخصائص المظهرية والتشخيص المجهرى

Phenotypic characteristics and microscopic diagnosis

شُخصت المستعمرات البكتيرية اعتمادا على الشكل و اللون والحواف و القوام و سطح المستعمرات وتمييز الروائح المميزة لها والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفرقي والانتقائي (Selective and differential media) وكذلك نمط التحلل الدموي على وسط آغار الدم، وتخمير اللاكتوز على وسط الماكونكي، كما فحصت العينات مجهريا من خلال اخذ مسحة مباشرة من المستعمرات النامية على الاوساط الزرعية ولوحظت الصفات المظهرية للخلايا التي شملت شكل الخلية البكتيرية، انتظام وترتيب الخلايا البكتيرية مع بعضها وطبيعة تفاعلها مع صبغة كرام (موجبة او سالبة) (Winn et al.,2006).

2.7.3: الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

اجريت مجموعة من الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص عزلات *pantoea spp.*:

1.2.7.3: اختبار الكتاليز Catalase test

نُقل جزء من المستعمرة الفتية النامية على الوسط الزرعى بعمر 24 ساعة بواسطة العيدان الخشبية المعقمة إلى شريحة زجاجية نظيفة وجافة و ثم أضيف لها قطرة من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بتركيز 3% ، ظهور الفقاعات من غاز الاوكسجين يدل على النتيجة الموجبة (Brown, 2007).

2.2.7..3: اختبار الاوكسيدز Oxidase test

نُقل جزء من المستعمرة الفتية النامية على الوسط الزرعى بعمر 24 ساعة بواسطة عيدان خشبية معقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف الذي حضر انيا ، ظهور اللون البنفسجي على المستعمرات البكتيرية خلال 10 ثوان دلالة على النتيجة الموجبة للكشف (Brown,2007).

3.2.7.3: اختبار انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين Production of hydrogen sulfite test

لُفح وسط الكلغلر (Kilger's Iron Agar (KIA) بطريقة الطعن والتخطيط بمستعمرة فتية بعمر 24 ساعة على سطح المائل، ثم حضنت الاوساط الملقحة بالبكتريا بدرجة حرارة 37م

لمدة 24 ساعة، ظهور الراسب الاسود في الانبوبة دلالة على النتيجة الموجبة لتكون الغاز اما تحول الوسط من اللون الاحمر الى اللون الاصفر دلالة على قابلية البكتريا على تخمر سكري الكلكوز واللاكتوز (MacFaddin,2000).

4.2.7.3: اختبار قابلية الحركة Motility test

أفحت الانابيب الحاوية على وسط الحركة بطريقة الطعن بمستعمرة فتية نقية بعمر 24 ساعة ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24-48 ساعة، انتشار النمو خارج حدود الطعنة مع وجود الضبابية يدل على النتيجة الموجبة (MacFaddin,2000).

5.2.7.3: اختبار تخمر الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation test

أفحت الأنابيب الحاوية على وسط تخمر الكربوهيدرات التي تكون فيها سكريات مختلفة بجزء من مستعمرة فتية نقية ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 2 - 5 يوم، بعدها لوحظ تحول لون الوسط من الاحمر الى الاصفر مما يدل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 2000).

6.2.7.3: اختبار اليوريز Urease test

أفح وسط آغار اليوريا المعقم بطريقة الترشيح بجزء من مستعمرة فتية نقية بطريقة الطعن والتخطيط Stabbing -streaking ثم حضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة تتراوح من 24 ساعة ولغاية 7 ايام، ان ظهور اللون الوردي دلالة على النتيجة الموجبة (MacFaddin,2000).

7.2.7.3: مجموعة اختبارات IMViC التي تشمل

A- اختبار الأندول Indol test

أفحت انابيب حاوية على ماء البيبتون (Peptone water) بجزء من مستعمرة فتية نقية المراد اختبارها ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 م° لمدة 18-24 ساعة، بعدها اضيف بضع قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's reagent إلى كل أنبوبة مع رجها جيدا ، ظهور الحلقة الحمراء أعلى الوسط دلالة على النتيجة الموجبة للاختبار كانتاج الاندول وقابلية البكتريا على تحليل الحامض الاميني Tryptophan (Macfaddin,2000).

B- اختبار احمر الميثيل Methyl red test

أُفحت انابيب حاوية على الوسط الزراعي M.R.V.P Medium بجزء من المستعمرة النقية للبكتريا المراد اختبارها ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37م لمدة 24-48 ساعة بعد ها اضيفت 5 قطرات من كاشف احمر الميثيل بعد انتهاء مدة الحضان مع الرج الجيد للانبوبة، ظهور اللون الاحمر يدل على ايجابية الاختبار وانتاج الحامض (Collee et al., 1996).

C- اختبار الفوكس بروسكور Voges Pros-kauer test

أُفحت انابيب حاوية على الوسط الزراعي MR-VP Medium ، بجزء من مستعمرة فنتية نقية ثم حضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24-48 ساعة بعدها اضيف 1 مليلتر من الكاشف إلى كل أنبوبة مع الحركة الهادئة وتركت ساكنة لمدة (10-15) دقيقة ، ظهور اللون الاحمر الكرزي يدل على ايجابية الاختبار (Collee et al., 1996).

D- اختبار استهلاك السترات Citrate utllization test

أُفحت الانابيب الحاوية على وسط سيمون ستريت المائل بجزء من المستعمرة النقية الفتية المراد اجراء الاختبار عليها ثم حضنت الاوساط بدرجة حرارة 37م لمدة 24-48 ساعة. تحول لون الوسط من الاخضر الى الازرق هو دليل على ايجابية الاختبار (MacFaddin, 2000).

Api 20 E diagnosis system

3.7.3:التشخيص بنظام Api 20 E

استعملت شرائط ال Api 20 E ،لتشخيص بكتريا *Pantoea* spp بالشكل النهائي اذ يحتوي هذا الشريط على انبوبة خاصة بالفحوصات الكيموحيوية التأكيدية كما في الخطوات الاتية :

Preparation of bacterial suspension

A-تحضير العالق البكتيري

أُفح 5 مليلتر من محلول الملح الفسلجي ب1-4 مستعمرة من بكتريا *Pantoea* spp باستعمال مسحة قطنية مع المزج المستمر.

Inoculation of the Api strip

B – تلقيح شريط Api

أفح مقدار 0.12 مليلتر من عالق البكتريا الذي تم تحضيره في خطوة (A) لكل انابيب الاختبار في شريط Api باستعمال Pipette , وبعدها اضيف الزيت المعدني المعقم الى الاختبارات التي مؤشر تحتها خط والتي تضمنت ADH,ODC,URE,LDC,H2S.

Incubating the strip in its chamber api

C – حضن شريط Api

وضع القليل من قطرات الماء داخل الانابيب الموجودة ضمن غطاء جهاز مع عدة ال Api وبعدها وضع شريط ال Api داخل هذا الغطاء ، وحضن شريط ال Api بدرجة حرارة 37 م لمدة 24-48 ساعة

Reading of result

D-قراءة النتيجة

شخصت بكتريا *Pantoea spp.* من خلال الشفرة الرقمية (Code number) التي تتكون وضع علامة (+) او علامة (-) لجميع الاختبارات الكيموحيوية الموجودة ضمن شريط ال api ، وبموازنة الارقام في اوراق خاصة مع الشريط وتشخيصها باستعمال الدليل.

8.3: حفظ وإدامة العزلات البكتيرية bacterial isolates

1.8.3: الحفظ قصير الأمد

لقت الأنابيب التي تحتوي على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتريا النقية المراد حفظها ثم حضنت في درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، وبعد ذلك حفظت في درجة 4 م، مع مراعاة تكرار عملية الحفظ كل شهر لتجديد حيوية العزلات وتجنب تلوثها ، (Collee et al., 1996).

2.8.3: الحفظ طويل الامد

لقت الأنابيب التي تحتوي على وسط نقيع القلب والدماغ السائل بالبكتريا المعزولة والمشخصة مع إضافة 15% من الكليسيرول إلى وسط نقيع القلب والدماغ السائل. استعمل هذا الوسط لحفظ البكتريا لعدة اشهر (MacFaddin, 2000).

9.3: اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility testing

اجري فحص الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية وذلك بالاعتماد على طريقة Bauer *et al* (2017) CLSI (1966) التي تضمنت أخذ 4-5 مستعمرات باستعمال عروة الناقل الحلقي نُقلت الى أنابيب اختبار تحتوي على 5 مليلتر من الوسط تربتون الصويا المغذي السائل، ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37م لحين ظهور العكورة ولمدة 8 ساعة، ثم تمت موازنة الأنابيب مع أنبوبة ماكفرلاند القياسية (0.5) بعد تخفيف النمو باستعمال محلول الملح الفسيولوجي المعقم، ثم غمست مسحة قطنية معقمة في وسط الصويا المزروع بالعزلة البكتيرية مع ازالة الفائض بالضغط على الجوانب الداخلية للأنبوبة، وبعدها نشرت البكتريا بطريقة التخطيط على وسط مولر-هنتون الصلب لاكثر من مرتين وباتجاهات مختلفة للتأكد من انتشار البكتريا المراد اجراء الاختبار عليها على الوسط وبالتساوي ، وبعدها تركت الاطباق حوالي 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة للتأكد من امتصاص الرطوبة. ثم نشرت أقراص المضادات الحيوية المذكورة في الفقرة (3-1-5) باستخدام ملقط معقم على وسط مولر -هنتون الصلب وذلك بحوالي 5 أقراص للطبق الواحد قياسه 100 ملي متر ،وبواقع 12 قرص في طبق قياسه 150 ملي متر ،اما المسافة بين كل قرص واخر كانت 20 ملي متر من مركز القرص الاول الى مركز القرص الثاني ، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة (18-24) ساعة لجميع انواع المضادات الحيوية بعدها تمت قراءة النتائج بقياس اقطار مناطق التثبيط بواسطة الفيرنيا (Caliper) وبموازنتها بالجدول القياسية المحددة من قبل (2017) CLSI .

10.3: تفاعل السلسلة المتبلعمة Polymerase Chain Reaction(PCR)

1.10.3: استخلاص الحامض النووي البكتيري (Genomic DNA extraction)

استخلص الحامض النووي الدنا من بكتيريا *Pantoea spp.* باستعمال عدة الاستخلاص المجهزة من شركة Biotech ، واجري الاستخلاص بالاعتماد على تعليمات الشركة وفي الاتي :

1- اخذ 1 مل من العالق البكتيري من كل عزلة من بكتريا *Pantoea spp.* النامية في وسط مرق نقيع القلب والدماغ ثم وضعت في انابيب ابندروف معقمة بحجم 1.5 مل ونقلت الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة/ دقيقة لمدة دقيقتين لتجميع الخلايا البكتيرية وبعدها التخلص من السائل الطافي .

2- اضيف 200 مايكروليتر من محلول DS (15ml) الى الانابيب التي تحوي الخلايا البكتيرية وبعدها مزج الخليط لمدة 5 ثواني باستعمال المازج vortex وذلك للحصول على خليط متجانس. ثم ترك الخليط

بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق مع تقليب الانابيب لضمان الحصول على تحلل كامل للخلايا البكتيرية في المزيج.

3- اضيف 20 مايكروليتر من انزيم Proteinase K كما اضيف 220 مايكروليتر من محلول MS الى مزيج الخلايا البكتيرية مع المزج الجيد بواسطة المازج Vortex لمدة 5 دقيقة وبعدها نقلت الى الحمام المائي بدرجة 65 م° لمدة 10 دقائق لتجانس الخليط جيدا .

4- اضيف 220 مايكروليتر من كحول الايثانول بتركيز (96-100%) الى المزيج المتحلل ثم مزج جيدا لمدة 5 ثواني باستعمال جهاز المازج vortex

5- نقل الخليط من انابيب ابندروف ووضع في انابيب الجمع (Collection tubes) المجهزة مع عدة استخراج DNA بحجم 2 مل والتي تحتوي على اعمدة دوارة (spin column) حاوية على مرشحات لتنقية الحامض النووي .

6- نقلت انابيب الجمع مع الاعمدة التي تحتوي على الخليط الى جهاز الطرد المركزي المبرد ودورت بسرعة 12000 دورة/ دقيقة لمدة 1 دقيقة لازالة نواتج الخلايا المتحللة ،مع التخلص من الراسب للخلايا المتحللة .

7 - اضيف 500 مايكروليتر من محلول (Wash buffer PS) المجهز مع عدة الاستخلاص الى كل عمود حاوي على الحامض النووي ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي ودورت بسرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة 1 دقيقة ،مع ازالة الراسب من انابيب الجمع .

8- اضيف 500 مايكروليتر من محلول (Wash buffer PE) المجهز مع العدة الى كل عمود حاوي على الحامض النووي ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي ودورت بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة 1 دقيقة مع التخلص من الراسب من انابيب الجمع .

9- اعيدت الخطوة رقم (8) مرة ثانية .وبعدها وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقيقة بسرعة 12000 دورة/ دقيقة لتجفيف الاعمدة .

10- وضعت الاعمدة التي تحتوي على الحامض النووي في انابيب ابندروف جديدة ومعقمة بحجم 1.5 مل بعد ذلك اضيف 90 مايكروليتر من محلول الاذابة (Elution buffer TE) المجهز مع العدة والموضوع مسبقا في درجة حرارة 60 م° الى مركز العمود ثم ترك في درجة حرارة الغرفة لمدة 2 دقيقة ، بعدها نقلت الانابيب الى جهاز الطرد المركزي ودورت بسرعة 12000 دورة/ دقيقة لمدة 2 دقيقة ،ثم حفظت الانابيب الحاوية على DNA النقي لحين استعمالها في تفاعل السلسلة المتبلورة (PCR).

2-10-3: فحص الحامض النووي المستخلص DNA examination

باستعمال جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO.USA) الخاص بكشف وقياس تركيز الحامض النووي تم التحري عن الحامض النووي DNA المستخلص من خلال تحديد تركيزه وقياس نقاوته عن طريق قراءة الامتصاصية باطوال موجية تتراوح بين (260/280nm) وكانت خطوات استخدام الجهاز على النحو الاتي :

- 1- حدد برنامج قياس الحامض النووي DNA .
- 2- حضرت ركيذة المقياس مرتين باستعمال ماصة معقمة على سطح ركيذة المقياس بعد اجراء التصفير تم وضع 2 مايكروليتر من الماء منزوع الايونات (Deionized distilled water)(ddH₂O)، وبعد ذلك نظفت الركيذة باستعمال ورق نشاف مخصص للجهاز.
- 3- اضيف 1 مايكروليتر من كل عينة من عينات الحامض النووي DNA المستخلص على ركيذة المقياس وبعدها تم الضغط على زر OK للبدء بعملية قياس تركيز ال DNA ثم كررت عملية التنظيف للركيذة لقياس العينة الاخرى .
- 4- حددت النقاوة لعينات الحامض النووي المستخلص عن طريق قراءة الامتصاصية بجهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260/280nm)، كما يعتبر الحامض النووي DNA المستخلص نقيا عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8)

3.10.3: تحضير مزيج انزيم سلسلة التفاعل الجزيئي المتبلر (PCR)

- حُضِرَ مزيج تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام عدة Maxime PCR Pre Mix (*i*-Taq) وبالاعتماد على اجاء من تعليمات شركة iNTRON الكورية وكما مبين في الجدول (2-3):
- 1- وضع مزيج سلسلة تفاعل البلمرة في انابيب PCR المجهزة مع العدة التي تحتوي على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة وبعدها اضيفت المواد الاخرى لمزيج التفاعل وبالاعتماد على تعليمات الشركة كما في جدول (2-3)
 2. - بعد اتمام تحضير مزيج سلسلة تفاعل البلمرة اغلقت الانابيب ووضعت بجهاز المازج Vortex لمدة 10 ثوان .
 - 3- وضعت الانابيب في جهاز المضخم الحراري PCR Thermocycler لغرض اجراء الظروف الدورات الحرارية PCR Thermocycler condition .

جدول (2-3) مكونات مزيج تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة بحجم 20 مايكروليتر

الحجم بالميكروليتر	المكونات	
5	DNA template	مستخلص الدنا المستعمل كقالب
1.5	Forward primer solution	محلول البادئ الأمامي
1.5	Reverse primer solution	محلول البادئ العكسي
12	Nuclease free water	الماء الخالي من الإنزيم المحلل للدنا
20	الحجم	

3-10-4: برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـ DNA

باستخدام المضخم الحراري PCR Thermocycler اجري تفاعل سلسلة انزيم البلمرة كما في الجدول الاتي :

جدول(3-3) الظروف الحرارية المستعملة في جهاز المضخم الحراري PCR

Gene Name	Temperature (°C) / Time					Cycles Numbr
	Initial Denaturat-ion / time	Cycling conditions			Final Extension / time	
		Denaturation	Annealing	Extension		
<i>16srRNA</i> <i>hrpG</i> <i>hrc</i> <i>avrXac1</i> <i>rcsA</i>	95/5 min	95/30Sec.	58/30Sec	72/1min	72 /5min	35
<i>rcsB</i> <i>avrxacE2</i>	95/5 min	95 /30Sec.	59/1 min	72/1 min	72/5min	35
<i>acrAB</i> <i>hpaA</i>	95/5min	95/30sec.	57/30sec	72/3min	72/5min	35

5.10.3: الترحيل الكهربائي بالهلام Agarose gel electrophoresis

- باستعمال هلام الاكاروز بنسبة 1% اجريت عملية الترحيل الكهربائي لغرض قراءة نتيجة PCR وتمت عملية الترحيل على وفق الخطوات الاتية:
- أخذ 1غرام من الاكاروز واذيب في 100 مل من محلول TBE buffer الدارى بتركيز 1X ثم وضع على الصفيحة الحرارية الممغنطة (Magnetic hot plate) لمدة 15 دقيقة حتى ملاحظة خروج الفقاعات .
 - يُرد هلام الاكاروز بعد تركه بدرجة حرارة 50 م و من ثم اضيف للهلام الصبغة المشعة Ethidium bromide مع مراعاة مزجها جيدا مع هلام الاكاروز .
 - استعمل قالب الترحيل Tray الذي يحتوي على مشط Comb لصب الهلام الممزوج بصبغة الايثيديوم برومايد فيه حتى يتم تهيئة الحفر لعينات ناتج ال PCR ثم ترك في درجة حرارة الغرفة ليتصلب لمدة 15 دقيقة وبعدها تم سحب المشط من الهلام برفق .
 - باستعمال صبغة التحميل Loading dye تم تحميل العينات على ورق parafilm paper بعدما اضيف 1حجم من صبغة التحميل لكل اربع حجوم من ناتج PCR ووزعت في حفر الهلام .
 - استعملت الحفرة الاولى لوضع سلم قياس الدنا DNA Ladder بحجم 10 مايكروليتر، وذلك لغرض قياس نواتج ال PCR .
 - بعد اتمام تحميل العينات في الحفر أُستخدم محلول TBE Buffer الدارى بتركيز 1X لغمر هلام الاكاروز وبعدها تم اغلاق غطاء الترحيل ومن ثم تشغيل الجهاز باستعمال 100 فولت، و80 امبير لمدة 1ساعة .
 - بعد انتهاء الترحيل الكهربائي، فُحص الهلام الذي يحتوي على ناتج ال PCR باستعمال مصدر الاشعة فوق البنفسجية U.V light source لتحديد ناتج PCR مع وحدة القياس .

11.3: التحليل الاحصائي : Statistical Analysis

حللت نتائج الدراسة احصائيا باستعمال البرنامج الاحصائي المعروف باسم الحزمة الاحصائية للعلوم الاجتماعية (statistical package for social sciences (IBM Corp., Armonk, NY, USA). الاصدار الواحد والعشرين وطبقا لبيانات نتائج الدراسة استعمل الاختبار الاحصائي مربع كاي Chi-square test لغرض معرفة الفروقات المعنوية كما جرى اعتماد مجال الثقة Confidence interval مساويا الى 95% وقيمة مستوى الاحتمالية أقل من 5% (P<0.05) (Field,2005).

الفصل الرابع
النتائج والمناقشة

Results and Discussion

Reusults and disscuion

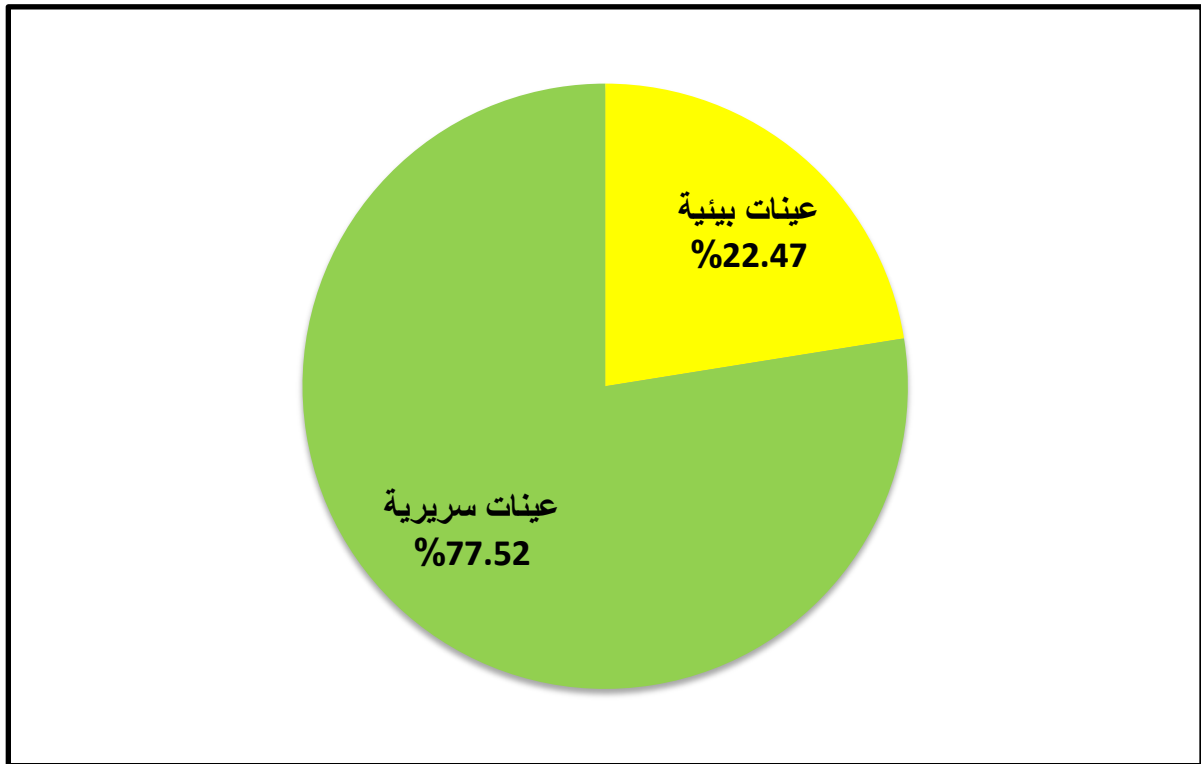
4: النتائج والمناقشة

Study society

1.4:مجتمع الدراسة

بلغت نسبة عزلات بكتريا *Pantoea* spp (3.85%) بواقع 24 عزلة والتي تم الحصول عليها من مجموع 623 عينة في مستشفيات مدينة الديوانية من مصادر مختلفة توزعت مصادرها ما بين عينات سريرية بلغ عددها 483 بنسبة (77.52%) وعينات بيئية بلغ عددها 140 بنسبة (22.47%) كما موضح في الشكل (1-4). اذ شملت العينات السريرية عينات الحروق بنسبة (11.23%)، عينات الادرار بنسبة (13.16%)، عينات من التنقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى بنسبة (13.32%)، عينات البراز بنسبة (4.33%)، عينات القيح بنسبة (4.97%)، عينات القشع بنسبة (11.87%)، مسحات الاذن بنسبة (7.86%)، مسحات الجروح بنسبة (7.06%) و مسحات البلعوم بنسبة (3.69%) فيما تضمنت العينات البيئية مسحات الادوات الطبية بنسبة (6.42%)، مسحات الاسرة بنسبة (3.21%)، مسحات الجدران (4.81%) ومسحات الاجهزة الطبية بنسبة (3.21%) ومسحات الارضية (4.81%) وكما موضح بالجدول (1-4).

بينت نتائج الدراسة الحالية ان الانواع البكتيرية العائدة لجنس بكتريا *Pantoea* هي ممرض انتهازي خطر قد يسبب الاصابات في حالات الضعف المناعي او عند وصوله الى المناطق الحساسة في الجسم ومما يزيد من ارتفاع مخاطر هذه الاصابات هي المقاومة العالية للمضادات الحيوية المستخدمة في العلاج. إذ اشارت النتائج إلى أن عدد عزلات البكتريا السالبة لصبغة جرام 400 عزلة بنسبة (64.20%) فيما سجلت البكتريا الموجبة لصبغة جرام عدد عزلات 132 بنسبة (21.18%) بينما كانت عدد العزلات الخالية من النمو البكتيري 67 بنسبة (10.75%) جدول (1-4).



شكل (1-4) النسبة المئوية للعدد الكلي للعينات السريرية والبيئية المشمولة قيد الدراسة

وبصورة عامة فإن المعلومات المتوفرة حول بكتريا *Pantoea spp.* قليلة جداً في العراق وقد اعتبرت ممرض غير شائع بتسببه للإصابات للإنسان كإصابات الجهاز التنفسي والتهابات المجاري البولية والتهابات الجهاز الهضمي (Nasser et al., 2007) إذ توصلت Abdalhussen and Darweesh (2016) إلى نسبة عزل لبكتريا *Pantoea spp.* (7.7%) من 40 عزلة وسجلت نسبة عزلات البكتريا السالبة والموجبة لصبغة جرام (55.05%) من 289 عزلة في حين سجلت نسبة عزلات البكتريا الخالية من النمو (44.95%) من 236 عزلة كما عزل Kursun et al (2012) بكتريا *Pantoea spp.* من وحدة العناية المركزة المرتبطة بمرضى ذات الرئة وأشار Boszczowski et al (2012) إلى تفشي بكتريا *Pantoea spp.* داخل المستشفيات وخاصةً في مرضى غسيل الكلى.

جدول (1-4) النسب المئوية لعزل بكتريا *Pantoea spp.* وعزلات البكتريا السالبة والموجبة لصبغة جرام والعينات الخالية من النمو البكتيري

عدد العينات الخالية من النمو البكتيري	البكتريا الموجبة لصبغة جرام	البكتريا السالبة لصبغة جرام	بكتريا <i>Pantoea spp.</i>	العدد الكلي للعينات حسب المصدر	المصدر
-	4 (5.71%)	66 (94.28%)	-	70 (11.23%)	مسحات الحروق
22 (26.82%)	20 (24.39%)	33 (40.2%)	7 (8.53%)	82 (13.16%)	عينات الادرار
-	10 (12.04%)	70 (84.33%)	3 (3.61%)	83 (13.32%)	منطقة التثقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى
-	4 (14.81%)	21 (77.77%)	2 (7.40%)	27 (4.33%)	عينات البراز
-	7 (22.58%)	22 (70.96%)	2 (6.45%)	31 (4.97%)	مسحات الفيج
-	22 (29.72%)	50 (67.56%)	2 (2.70%)	74 (11.87%)	عينات القثع
8 (16.32%)	12 (24.48%)	29 (59.18%)	-	49 (7.86%)	مسحات التهاب الاذن الوسطى
9 (20.45%)	10 (22.72%)	22 (50%)	3 (6.81%)	44 (7.06%)	مسحات الجروح
-	4 (17.39%)	19 (82.60%)	-	23 (3.69%)	مسحات البلعوم
10 (25%)	9 (22.5%)	18 (45%)	3 (7.5%)	40 (6.42%)	مسحات الادوات الطبية
5 (25%)	6 (30%)	9 (45%)	-	20 (3.21%)	مسحات الاسرة
8 (26.66%)	5 (16.66%)	17 (56.66%)	-	30 (4.81%)	مسحات الجدران
-	7 (35%)	11 (55%)	2 (10%)	20 (3.21%)	مسحات الاجهزة الطبية
5 (16.66%)	12 (40%)	13 (43.33%)	-	30 (4.81%)	مسحات الارضية
67 (10.75%)	132 (21.18%)	400 (64.20%)	24 (3.85%)	623	المجموع

Isolation and identification

2.4: العزل والتشخيص

كان هدف جمع العينات هو عزل بكتريا *Pantoea spp.* اذ عزلت هذه البكتريا بواقع 24 عزلة خلال هذه الدراسة حيث جمعت العينات بشكل عشوائي للتحري عن بؤر التلوث ببكتريا *Pantoea spp.* وعزلت هذه البكتريا بنسبة (3.85%) من مجموع مختلف العينات السريرية والبيئية (مسحات الحروق، عينات الادرار، منطقة التثقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى، عينات البراز، مسحات قيح العمليات الملتهبة، عينات القشع، مسحات التهاب الاذن الوسطى، مسحات الجروح، مسحات البلعوم، مسحات الادوات الطبية، مسحات الاسرة، مسحات الجدران، مسحات الاجهزة الطبية، مسحات الارضية) اذ عزلت هذه البكتريا من المرضى الذين يعانون من التهابات المجاري البولية والتهابات الاذن الوسطى والفشل الكلوي وامراض الجهاز التنفسي كمرض السل وامراض الجهاز الهضمي كما عزلت من الجروح الملتهبة وقيح العمليات الجراحية كالزائدة الدودية وعمليات الولادة القيصرية الملتهبة . وكانت اعلى نسبة عزل لبكتريا *Pantoea spp.* من عينات الادرار بنسبة (8.53%) بواقع 7 عزلات وتأتي عينات الجروح بالمرتبة الثانية بنسبة (6.81%) بواقع 3 عزلات فيما سجلت عينات منطقة التثقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى نسبة (3.61%) من 3 عزلات اما عينات القيح فقد سجلت نسبة (6.45%) من عزلتين وعينات القشع سجلت نسبة (2.70%) من عزلتين اما العينات التي لم تعزل منها بكتريا *Pantoea spp.* فقد كانت مسحات الاذن، مسحات الحروق، مسحات البلعوم كما موضح في جدول

(2-4).

اما بالنسبة لتوزيع عزلات بكتريا *Pantoea spp.* في العينات السريرية فقد توصلت نتائج الدراسة الحالية إلى أن عدد عزلات بكتريا *Pantoea spp.* بلغ 19 عزلة بنسبة (3.93%) من مجموع 483 عينة سريرية توزعت بين نوعين عائدين لجنس بكتريا *Pantoea* النوع الاول *Pantoea agglomerans* إذ بلغ عددها 11 عزلة بنسبة (2.27%) تم الحصول عليها من عينات الادرار بواقع 5 عزلات بنسبة (6.09%) من عينات التثقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى، عينات البراز، مسحات الجروح بواقع عزلتين لكل من العينات المذكورة وبنسبة (2.40%)، (7.40%)، (4.54%) على التوالي فيما لم تعزل من مسحات القيح وعمليات القشع ومسحات الاذن ومسحات البلعوم ومسحات الحروق جدول (2-4)، وسجلت دراسات اخرى نسبة عزل لهذا النوع من بكتريا *P. agglomerans* اذ سجل (Farhood and Chelab (2017) نسبة عزل لبكتريا *P. agglomerans* (2.56%) بواقع 3 عزلات من عينات الحروق في حين سجل (Ahamed and Ali (2014) عزلة واحدة فقط لبكتريا *P. agglomerans*. من النساء المصابات بالتهاب عنق الرحم كما عزل (Walterson and stavrinidas

(2015) هذا النوع من مصادر سريرية مثل الجروح والادرار ومسحات الاذن ومسحات البلعوم واكد ان بكتريا *Pantoea spp.* سببت حالات انتان الدم Sepsis داخل المستشفيات في حين توصل (Cruz et al (2007 الى عزل بكتريا *P.agglomerans* من القشع .

بينما تضمن النوع الثاني من بكتريا *Pantoea* المعزول في الدراسة الحالية بكتريا *Pantoea calida* اذ بلغ عدد العزلات 8 عزلة بنسبة (1.65%) تم الحصول عليها من عينات الادرار بواقع عزلتين بنسبة (2.43%) ومن عينات التنقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى والجروح بواقع عزلة واحدة لكل منهما وبنسب (1.20%)، (2.27%) على التوالي ومن عينات القيح بواقع عزلتين بنسبة (6.45%). في حين لم تعزل من عينات البراز والاذن ومسحات البلعوم والحروق . ومن الدراسات الاخرى لعزل هذا النوع من بكتريا *Pantoea* عزل (Walterson and stavrinidas (2015 بكتريا *P. calida* من عينات الادرار ومرضى غسيل الكلى في حين عزل (Popp et al (2010 بكتريا *P. calida* بواقع 5 عزلات من حليب الباودر للاطفال الرضع . اما بالنسبة لنتائج الدراسة الاحصائية فقد اظهرت وجود الفروق المعنوية بالنسبة لعدد العينات السريرية الكلي حسب كل مصدر عند مستوى احتمالية (P<0.05) جدول (2-4).

جدول (2-4)النسب المئوية لعزل بكتريا *Pantoea* وأنواعها من المصادر السريرية المختلفة

P value	X ²	النسبة المئوية لعزلات <i>pantoea calida</i>	النسبة المئوية لعزلات <i>pantoea agglomerans</i>	النسبة المئوية لعزلات <i>pantoea spp.</i>	العدد الكلي للعينات حسب كل مصدر	العينات السريرية
0.246(NS)	1.343	2 (2.43%)	5 (6.09%)	7 (8.53%)	82 (16.97%)	عينات الادرار
0.560(NS)	0.339	1 (1.20%)	2 (2.40%)	3 (3.61%)	83 (17.18%)	منطقة التنقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى
0.151(NS)	2.067	0(0)	2 (7.40%)	2 (7.40%)	27 (5.59%)	عينات البراز
0.151(NS)	2.067	2 (6.45%)	0(0)	2 (6.45%)	31 (6.41%)	مسحات القيح

0.154(NS)	2.027	2 (2.70%)	0(0)	2 (2.70%)	74 (15.32%)	عينات القشع
0.557(NS)	0.345	1 (2.27%)	2 (4.54%)	3 (6.81%)	44 (9.10%)	مسحات الجروح
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	49 (10.14%)	مسحات التهاب الاذن الوسطى
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	23 (4.76%)	مسحات البلعوم
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	70 (14.49%)	مسحات الحروق
0.487(NS)	0.483	8 (1.65%)	11 (2.27%)	19 (3.93%)	483	المجموع
		8.210	15.349	13.082	99.01	X^2
		0.413(NS)	0.053(NS)	0.109(NS)	0(S)	<i>P value</i>

S : اختلاف معنوي ($P < 0.05$) NS : لا يوجد اختلاف معنوي ($P > 0.05$)

اما بالنسبة للعينات البيئية فقد سجلت نتائج الدراسة الحالية أعلى نسبة عزل لبكتريا *Pantoea spp.* من الادوات الطبية (7.5%) بواقع 3 عزلات في حين كانت نسبة عزل بكتريا *Pantoea spp.* من الاجهزة الطبية (10%) بواقع عزلتين فقط أما العينات البيئية التي لم تعزل منها بكتريا *Pantoea spp.* فقد تضمنت مسحات الاسرة والجدران والارضية كما موضح في جدول (3-4).

ومن الدراسات الاخرى لعزل بكتريا *Pantoea spp.* من العينات البيئية ماتوصلوا اليه Rezzonic *et al* (2009) إذ عزلوا بكتريا *Pantoea spp.* من مصادر بيئية بلغ عددها 20 عزلة عائدة الى 3 سلالات ممرضة لجنس *Pantoea spp.* في حين سجل Cruz *et al* (2007) عزلات بيئية لهذه البكتريا كان مصدرها مسحات سطحية من داخل المستشفيات وتوصل Senanayake *et al* (2016) الى عزل هذه البكتريا من مصادر بيئية تضمنت الاسرة والحاضنات الخاصة بالاطفال حديثي الولادة والماء المعقم وماء المغاسل ومقابض الابواب داخل المستشفى في كندا .

وقد تعزى الاسباب الى عدم عزل بكتريا *Pantoea spp.* من مسحات الاسرة والجدران والارضية خلال هذه الدراسة الى العناية المشددة باستخدام المنظفات والمطهرات مع التعقيم المستمر داخل المستشفيات المعزولة منها . اما بالنسبة لنتائج الدراسة الاحصائية فقد اظهرت وجود الفروق المعنوية بالنسبة لعدد العينات البيئية الكلي حسب كل مصدر عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) جدول (3-4).

جدول (3-4) النسب المئوية لعزل بكتريا *Pantoea* وانواعها من المصادر البيئية المختلفة

P value	X2	النسبة المئوية لعزلات <i>Pantoea calida</i>	النسبة المئوية لعزلات <i>Pantoea agglomerans</i>	النسبة المئوية لعزلات <i>Pantoea spp.</i>	العدد الكلي للعينات حسب المصدر	العينات البيئية
0.556(NS)	0.346	2 (5%)	1 (2.5%)	3 (7.5%)	40 (28.57%)	الادوات الطبية
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	20 (14.28%)	الاسرة
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	30 (21.42%)	الحدران
1(NS)	0	1 (5%)	1 (5%)	2 (10%)	20 (14.28%)	الاجهزة
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	30 (21.42%)	الارضية
0.652(NS)	0.204	3 (2.14%)	2 (1.42%)	5 (3.57%)	140	المجموع
		3.583	3.297	7.156	12.500	X ²
		0.465(NS)	0.509(NS)	0.128(NS)	0.014(S)	P value

S : اختلاف معنوي (P<0.05) ، NS : لا يوجد اختلاف معنوي (P>0.05)

1.2.4:الصفات الزرعية والمجهرية

Cultural and microscopic characteristics

شُخصت عزلات بكتريا *Pantoea spp.* المعزولة من العينات السريرية والبيئية في الدراسة الحالية بالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرات النامية إذ ظهرت على وسط آغار الماكونكي متوسطة الحجم مدورة ،ناعمة ، وردية اللون مخمرة لسكر اللاكتوز وعدم انتاجها للصبغات او قد تنتج صبغات صفراء اللون او بيضاء بينما ظهرت على وسط آغار الدم مستعمرات ملساء محدبة ومدورة وتميزت بعدم تحللها للدم كما ظهرت تحت المجهر بأنها عصيات قصيرة اما منفردة او مزدوجة سالبة لصبغة جرام .

Biochemical test

2.2.4:الفحوصات الكيموحيوية

شُخصَ خلال هذه الدراسة نوعين ممرضين عائدين لجنس *Pantoea* النوع الاول *Pantoea agglomerans* والنوع الثاني *Pantoea calida* حيث شُخصَ هذين النوعين بطريقة تخمر الكاربوهيدرات فقد سجلت عزلات بكتريا *Pantoea agglomerans* نتيجة سالبة لتخمر سكر دي سورتول وسكر رافينوز بينما سجلت عزلات بكتريا *Pantoea calida* نتيجة موجبة لتخمر سكر دي سورتول وسكر رافينوز كما موضح بالجدول (4-4).وسُجلت جميع عزلات بكتريا *Pantoea spp.* المشمولة بالدراسة الحالية نتيجة سالبة لكل من اختبارات الاوكسيديز،اليوريز ، الفوكس بروسكور ، تحلل

الجيلاتين ، تحلل الدم، إنتاج الاندول وإنتاج غاز H₂S وتخمر سكر دي- اربيتول وسُجلت نتيجة موجبة لاختبار الكاتليز ، وفحص الحركة ، استهلاك السترات كما سُجلت جميع العزلات نتيجة موجبة لتخمر سكر لاكتوز وسكر سيلوبوز وسكر كلوز وسكر مالتوز وسكر سكروز وسكر ال-رامينوز وسكر گالكتوز .

جدول (4-4) : الاختبارات الكيموحيوية لأنواع *Pantoea spp.* المعزولة من مصادر مختلفة .

<i>P.calida</i>	<i>P.agglomerans</i>	نوع البكتريا الاختبارات	
+	+	Catalase	
-	-	Oxidase	
-	-	Hemolysis	
+	+	Motility	
-	-	Urease	
+	+	Gram negative bacilli	
-	-	Gelatin liquefaction	
K/A	K/A	Kliglar iron agar	
-	-	H ₂ S production	
-	-	Indole	IMVC
+	+	Methyl-red	
+	+	Vogas-Proskaur	
+	+	Citrate utilization	
+	+	Lactose	Sugars Fermentation
+	-	D-Sorbitol	
+	+	Galactose	
+	+	Glucose	
+	+	Cellobiose	
+	+	Sucrose	
+	+	Maltose	
+	-	Raffinose	
-	-	D-Arabitol	
+	+	L-Rhamnose	

3.2.4 : تشخيص بكتريا *Pantoea* spp. باستخدام نظام API20 E

Diagnosis of *Pantoea* spp. using the API20 E system

استعملت عدة التشخيص API 20E لتأكيد تشخيص بكتريا *Pantoea* spp المعزولة من العينات السريرية والعيّنات البيئية ، إذ يُعتبر هذا الاختبار من الاختبارات التشخيصية التي تمتاز بدقتها في تشخيص الأنواع البكتيرية المعوية ومن ضمنها بكتريا *Pantoea* spp ، إذ إن استعمال هذا النظام في التشخيص من الأمور المهمة في المختبرات البكتريولوجية لما يتميز به من سرعة ودقة وشمول لجميع الاختبارات الكيموحيوية المهمة دون الحاجة إلى استعمال العديد من الأوساط الزرعية المختلفة كما موضح في الشكل (2-4). إذ استخدم Senanayake *et al* (2016) نظام API-20E في تشخيص 55 عينة معزولة من الدم وكانت عائدة 14 عذلة لبكتريا *P.agglomerans* في حين اشار *Aly et al* (2008) الى تشخيص عزلات بكتريا *P.agglomerans* التي سببت اصابات بمجرى الدم لحديثي الولادة باستخدام API-20E .



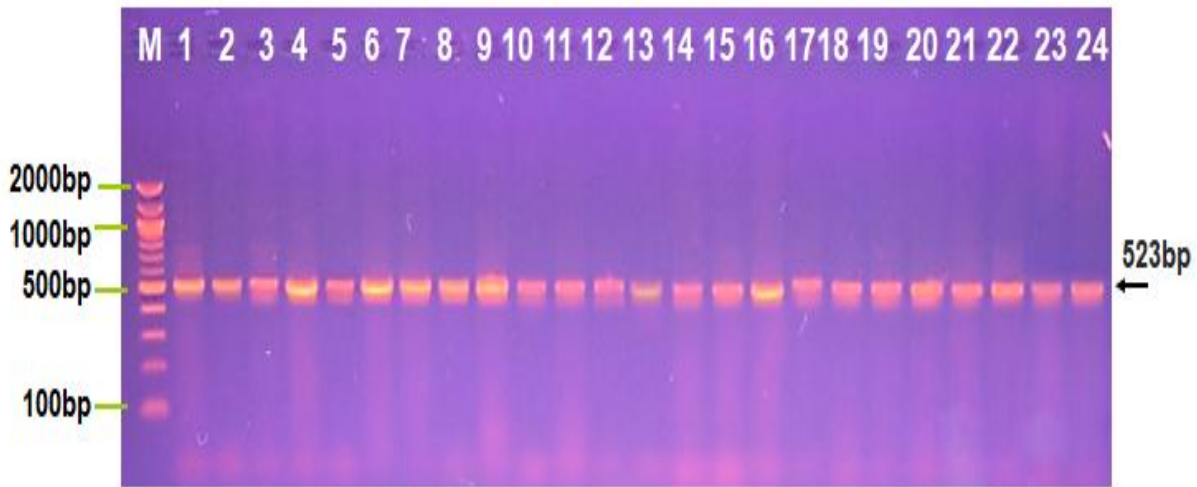
شكل (2-4) شريط API20 E المستخدم لتشخيص بكتريا *Pantoea* spp

4.2.4: تشخيص بكتريا *Pantoea* spp. باستخدام تقنية الPCR

Diagnosis of *Pantoea* spp.using PCR technology

شُخصت عزلات بكتريا *Pantoea* spp خلال هذه الدراسة باستعمال تقنية تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة Monoplex PCR باستعمال المورثة *16srRNA* gene ، إذ بينت النتائج الموضحة في الشكل (4 - 2) احتواء جميع العزلات على *16srRNA* gene ذو الوزن الجزيئي (523bp) الذي يمثل المورثة التشخيصية لهذه البكتريا ، مما يؤكد عائدة جميع العزلات إلى جنس *Pantoea* spp والبالغ عددها 24 عذلة وبذلك فإن تقنية PCR كانت حساسة 100% في تشخيص العزلات خلال هذه الدراسة .

إذ أشارت الدراسة التي اجراها Cheng *et al* (2013) الى استعمال *16srRNA gene* للكشف عن بكتريا *Pantoea spp.* من أصل 18 عزلة إذ أكدت عائلية 9 عزلات لبكتريا *Pantoea spp.* في حين توصل Deletoile *et al* (2009) في دراسته الى تشخيص عزلات بكتريا *Pantoea spp.* الممرضة للانسان والحيوان باستخدام *16S rRNA gene* إذ بلغت نسبة احتواء عزلاته لهذا الجين 95.6% .



الشكل (3-4): الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين *16srRNA gene* الخاص بتشخيص جرثومة *Pantoea spp.* حيث يمثل M: Marker ladder 2000-100bp والحفر من رقم (1-24) عزلات جرثومة *Pantoea spp.* الموجبة للفحص بناتج طوله 523bp وباستخدام تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.

3.4: انتشار عزلات *Pantoea spp.* السريرية وتوزيعها حسب العمر والجنس

Prevalence of *Pantoea spp.* isolates and their distribution by age and sex

صنفت الدراسة الحالية المرضى المصابين الى سبع فئات عمرية ابتداءً من السنة الواحدة وانتهاءً عند السنة الستين فما فوق كما موضح في جدول (4-4) إذ توصلت النتائج الى أعلى نسبة إصابة ببكتريا *Pantoea spp.* في الفئة العمرية (41-50) سنة بنسبة (36.84%) وبلغ عدد العزلات

7عزلة.تليها الفئة العمرية (51-60) سنة والفئة العمرية (أكبر من60) بواقع 4 لكل منهما ونسبة متساوية لكل منهما (21.05%) في حين سجل الباحث (Buyukcam et al (2018) في تركيا الاعمار التي تتراوح بين عمر شهر واحد الى 18 سنة اصابها ببكتريا *Pantoea spp.* كما سجل (2013) Cheng et al الفئات العمرية (32-74) التي حددت اصاباتها بالبكتريما بسبب بكتريا *Pantoea agglomerans*. كما سجلت الدراسة الحالية الفئات العمرية (30-21) سنة و(40-31) سنة اقل نسبة عزل فكانت عددالعزلات للفئة العمرية (30-21) سنة عزلة واحدة ونسبة (5.26%) والفئة العمرية (40-31) سنة 3عزلة ونسبة (15.78%) بينما لم تسجل الدراسة الحالية اصابات ببكتريا *Pantoea spp.* للفئات العمرية (1-10) و(11-20)، و سجل (Cruz et al (2007) حالات اصابة ببكتريا *P. agglomerans* في الفئات العمرية من عمرشهرين الى 21سنة في حين سجل (2008) Aly et al حالات تعفن الدم بسبب هذ البكتريا في الكويت من الاطفال حديثي الولادة في وحدة العناية المركزة التي تتراوح اعمارهم من 8- 17 يوم . أما بالنسبة لانواع بكتريا *Pantoea spp.* فقد توصلت نتائج الدراسة الحالية الى تواجد *P. agglomerans* بنسبة أعلى إذ بلغ عدد العزلات 4 عزلة في الفئات العمرية (41-50)سنة بنسبة (21.05%) تليها بالمرتبة الثانية الفئة العمرية اكبر من 60 سنة بواقع 3عزلات ونسبة (15.78%) اما الفئة العمرية(51-60) سنة فقد سجلت عزلتين فقط من *P. agglomerans* بنسبة (10.52%) اما الفئتين العمرتين (31-40)سنة و(21-30) سنة بواقع عزلة واحدة لكل منهما ونسبة (5.26%) لكل منهما . وتواجدت بكتريا *Pantoea calida* بنسبة اعلى في الفئة العمرية (41-50) سنة بواقع 3عزلات ونسبة (15.78%) والفئتين العمرتين(31-40) سنة و(51-60) سنة بواقع عزلتين لكل منهما ونسبة (10.52%) لكل منهما في حين سجلت الفئة العمرية اكبر من 60 تواجد عزلة واحدة فقط لبكتريا *Pantoea calida* بنسبة(5.26%) جدول (4-5) .

وفي دراسات مماثلة سجل Uche (2008) حالة اصابة بالبكتريما بسبب بكتريا *Pantoea spp.* لمريض بعمر 65سنة يعاني من فقر الدم الحاد بينما سجل (2015) Lo et al اصابة ببكتريا *Pantoea spp.* في السنغال لمريضة بعمر 35سنة بعد عزلها من الجلد.ونلاحظ من نتائج الدراسة الحالية والدراسات السابقة ان الاطفال والبالغين اكثر عرضة للاصابة ببكتريا *Pantoea spp.* وخاصةً الاشخاص منقوصي المناعة ولديهم اضطرابات بالجهاز المناعي مثل مرض الايدز او الاشخاص الذين ياخذون عقاقير لعلاج مرض السرطان او اثناء زراعة الاعضاء المنقولة من شخص لآخر إذ اعتبرت من اكثر الفئات العمرية عرضة للاصابة بالعدوى الانتهازية (Dutkiewicz et al.,2016) كما اشارت الدراسات الحديثة ان اصابات بكتريا *P. agglomerans* هي اصابات

خطرة جدا قد تؤدي الى الوفاة خاصة بالاطفال والبالغين الذين يعانون من امراض مزمنة مثل امراض الفشل الكلوي وامراض السل الرئوي (Buyukcam et al.,2018). اما بالنسبة لنتائج الدراسة الاحصائية فلم تظهر فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) بالنسبة لتوزيع عزلات بكتريا *Pantoea* وانواعها بحسب الفئات العمرية جدول (4-5).

جدول (4-5) توزيع عزلات بكتريا *Pantoea* وانواعها المعزولة من عينات سريرية مختلفة حسب الفئات العمرية

P value	X2	المجموع	اكبر من 60	(60-51)	(50-41)	(40-31)	(30-21)	(20-11)	(10-1)	الفئات العمرية
										بكتريا <i>Pantoea</i>
0.009(s)	16.947	19	(%21.05) 4	(%21.05) 4	(%36.84) 7	(%15.78)3	(%5.26) 1	0(0)	0(0)	بكتريا <i>Pantoea</i> spp.
0.117 (NS)	10.182	11	(%15.78) 3	(%10.52) 2	(%21.05) 4	(%5.26) 1	(%5.26) 1	0(0)	0(0)	بكتريا <i>Pantoea agglomerans</i>
0.171 (NS)	9.042	8	(%5.26) 1	(%10.52) 2	(%15.78)3	(%10.52)2	0(0)	0(0)	0(0)	بكتريا <i>Pantoea calida</i>
		7.658	2.625	1.500	2.786	1.500	1.500	0	0	X ²
		0.022(S)	0.269(NS)	0.420(NS)	0.248(NS)	0.420(NS)	0.420(NS)	1(NS)	1(NS)	P value

S : اختلاف معنوي ($P<0.05$) ، NS : لا يوجد اختلاف معنوي ($P>0.05$)

اما توزيع عزلات بكتريا *Pantoea* spp. بالنسبة لجنس المريض فقد توصلت النتائج خلال هذه الدراسة الى اصابة الذكور ببكتريا *Pantoea* spp. بنسبة اعلى (57.89%) وبواقع 11 عزلة مقارنة بالاناث (42.10%) بواقع 8 عزلات اذ بلغت عدد عزلات *Pantoea agglomerans* في الذكور 6 عزلات وبنسبة (31.57%) فيما سجلت الاناث نسبة عزل لهذه البكتريا (26.31%) بواقع 5 عزلات في حين تواجد النوع البكتيري *Pantoea calida* في الذكور بنسبة (26.31%) وبعده 5 عزلات فيما بلغت عدد العزلات للبكتريا نفسها في الاناث 3 عزلات وبنسبة (15.78%) جدول (4-6).

كما سجل الباحث (Cheng et al (2013) دراسة مشابهة للدراسة الحالية 18 حالة إصابة ببكتريا *Pantoea spp.* اذ بلغ عدد الذكور المصابين 11 حالة اما الاناث بلغ عددهن 7 حالات وسجل Chemis et al (2017) 11 حالة للاطفال حديثي الولادة مصابة ببكتريا *Pantoea spp.* اذ كانت الاصابة للذكور أعلى إذ بلغت 7 حالات من الذكور و4 حالات من الإناث .

في حين اشارت الدراسات الى تواجد هذه البكتريا في اماكن لم تكن متواجدة بها بالعادة إذ ارتبطت بشكل كبير مع الجروح والخدوش الناجمة عن المواد النباتية او اثناء العمليات الجراحية ذو العلاقة بتجرثم الدم إذ سجلت 53 حالة إصابة بهذه البكتريا الانتهازية اغلبها كانت بالمرضى الذكور إذ بلغ عددهم 34 حالة إما الإناث بلغ عددهن 19 حالة،(Cruz et al.,2007).

قد يعزى سبب ارتفاع نسبة الذكور بالنسبة للاناث في الدراسة الحالية الى حجم العينات المأخوذة من الذكور أكثر إذ بلغ عددها 278 عينة موازنة بعدد الاناث البالغ عددهن 205 وان الفرص المتاحة للذكور بمزاولة نشاطاتهم المختلفة اكثر من الاناث مثل النشاط الزراعي والصناعي وممارسة السباحة مما يسبب دخول الملوثات البكتيرية ويزيد من الاصابة الانتهازية للجسم(Delgado et al.,2001) .

اما بالنسبة لنتائج الدراسة الاحصائية فقد أظهرت وجود الفروق المعنوية بالنسبة لمجموع توزيع بكتريا *Pantoea spp.* بحسب الجنس عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) جدول(4-6) .

جدول(4-6)توزيع عزلات بكتريا *Pantoea* وانواعها المعزولة من عينات سريرية مختلفة حسب الجنس

P value	X2	المجموع	الجنس		بكتريا <i>Pantoea</i>
			الاناث	الذكور	
0.330(NS)	0.947	19	8(42.10%)	11(57.89%)	بكتريا <i>Pantoea spp.</i>
0.670(NS)	0.182	11	5(26.31%)	6(31.57%)	بكتريا <i>Pantoea agglomerans</i>
0.317(NS)	1	8	3(15.78%)	5(26.31%)	بكتريا <i>Pantoea calida</i>
0.169(NS)	1.895				
		7.658	3.563	4.227	X ²
		0.022(S)	0.168(NS)	0.121(NS)	P value

S : اختلاف معنوي ($P < 0.05$) , NS : لا يوجد اختلاف معنوي ($P > 0.05$)

4.4: انتشار عزلات *Pantoea spp.* وتوزيعها حسب منطقة السكن وحالة المرضى

Spread of *Pantoea spp.* isolates and their distribution according to the residence area and the condition of the patients

توصلت النتائج خلال هذه الدراسة الى ارتفاع نسبة عزل بكتريا *Pantoea spp.* في المرضى الذين يسكنون الريف بنسبة (68.42%) إذ بلغت عدد العزلات 13 عزلة من مرضى الريف . وتواجدت بكتريا *Pantoea agglomerans* بعدد أعلى بلغ 7 عزلات وبنسبة (36.84%) في حين كان عدد عزلات *Pantoea calida* 6 عزلات وبنسبة (31.57%) كما موضح في جدول (4-7).

إذ توصلت (Naha and Ramamorthi (2012) الى انتشار عزلات *Pantoea spp.* المسببة لحالات تسمم الدم (Septicemia) بين المزارعين في الريف إذ أكدت تزايد الحالات بالمستقبل خاصة بالمناطق الزراعية في الهند. كما سجل (Tiwari and Beriha (2015) حالة اصابة ببكتريا *Pantoea spp.* لطفل حديث ولادة من منطقة اوديشا الريفية في الهند . وتوصلت نتائج الدراسة الحالية الى نسبة عزل بكتريا *Pantoea spp.* من المرضى الذين يسكنون مدينة الديوانية (31.57%) إذ بلغ عدد العزلات 6 عزلات في حين كان عدد عزلات بكتريا *P. agglomerans* 4 عزلات وبنسبة (21.05%) بينما سجلت بكتريا *P. calida* 2 عزلة فقط من مرضى مدينة الديوانية جدول (4-7). كما اشار (Flores Popoca et al (2012) في دراسة سريرية الى ارتفاع عزلات هذه البكتريا إذ شخصت 10 عزلات لبكتريا *P. agglomerans* في مرضى منقوصي المناعة من مدينة مكسيكو. كما توصل (Senanayke et al (2016) الى عزل بكتريا *Pantoea spp.* من مستشفيات مدينة كندا مع ارتفاع حالات الاصابة ببكتريا *P. agglomerans* في الاطفال حديثي الولادة بواقع 14 حالة اصابة .

اذ تعزى اسباب ارتفاع نسبة عزل بكتريا *Pantoea spp.* في المستشفيات الى تلوث السوائل الوريدية كالدّم والبلازما في اثناء نقلها للمرضى بهذه البكتريا او تلوث الادوات الجراحية اثناء اجراء العمليات كالقسطرة القلبية وعمليات نقل الاعضاء واستئصال الزائدة الدودية وجراحة العيون او تلوث الاجهزة الطبية كاجهزة التنفس الاصطناعي واجهزة غسيل الكلى التي هي بتماس مع المريض اذ يتم تنقلها من مريض لاخر حيث ان بكتريا *Pantoea spp.* هي بكتريا بيئية موطنها الاصلي هو النبات نادرا ما تسبب العدوى الانتهازية للانسان داخل المستشفيات اذ سجلت 6 حالات اصابة في مدينة ايطاليا في المستشفى التعليمي اذ كان المرضى المصابين يعانون من امراض مسبقة مثل الاورام وامراض الجهاز التنفسي

(Liberto et al.,2008). اما بالنسبة لنتائج الدراسة الاحصائية فقد اظهرت وجود الفروق المعنوية بالنسبة لمجموع توزيع بكتريا *Pantoea* spp بحسب منطقة السكن عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) جدول (7-4).

جدول (7-4) توزيع عزلات بكتريا *Pantoea* وأنواعها المعزولة من عينات سريرية مختلفة حسب منطقة السكن

P value	X2	المجموع	الريف	المدينة	منطقة السكن
					بكتريا <i>Pantoea</i>
0.023(S)	5.158	19	13(68.42%)	6(31.57%)	بكتريا <i>Pantoea</i> spp.
0.201(NS)	1.636	11	7(36.84%)	4(21.05%)	بكتريا <i>Pantoea</i> <i>agglomerans</i>
0.046(S)	4	8	6(31.57%)	2(10.52%)	بكتريا <i>Pantoea calida</i>
0.001(S)	10.316				
		7.658	4.962	3	X ²
		0.022(S)	0.084(NS)	0.223(NS)	P value

S : اختلاف معنوي ($P<0.05$) ، NS : لا يوجد اختلاف معنوي ($P>0.05$)

أما توزيع عزلات بكتريا *Pantoea* spp بالنسبة لحالة المرضى بين وافدين وراقدين فقد سجلت الدراسة الحالية تواجد بكتريا *Pantoea* spp بنسبة أعلى في المرضى الوافدين (57.89%) بواقع 11 عزلة اذ سجلت بكتريا *P. calida* النسبة الاعلى بين (31.57%) بواقع 6 عزلات بينما سجلت بكتريا *P. agglomerans* النسبة الاقل بين المرضى الوافدين (26.31%) وبعده 5 عزلات جدول (8-4).

إذ أشارت (Naha and Ramamorthi (2012) في دراستها الى اصابة مزارع وافد الى المستشفى ببكتريا *P. agglomerans* في حين توصل (Buyukcam et al (2018) الى اصابة المرضى الوافدين بعدد أقل من المرضى الراقدين إذ سجل 14 حالة اصابة ببكتريا *P. agglomerans* تضمنت 12 من المرضى الراقدين بنسبة (85.7%) وحالتين فقط من المرضى الوافدين .

أما بالنسبة للمرضى الراقدين كانت نتائج هذه الدراسة عزل بكتريا *Pantoea* spp بنسبة (42.10%) بواقع 8 عزلات فيما كان عدد عزلات بكتريا *P. agglomerans* أعلى بواقع 6 عزلات

(31.57%) بينما سجلت بكتريا *P. calida* عزل أقل في المرضى الراقدين (10.52%) بواقع عزلتين فقط مما يدل على تفشي بكتريا *P. agglomerans* بين المرضى داخل المستشفيات جدول (4-8).

إذ توصل (Christakis et al (2007) الى اصابة مريض راقد ببكتريا *P. agglomerans* يعاني من سرطان القولون مما أدى الى اكتسابه هذا المرض الانتهازي واصابته بالبكتريما Bacteremia. فيما سجل (Chemsi et al (2017) حالات اصابة بتسمم الدم بسبب بكتريا *P. agglomerans* في المرضى الراقدين من الاطفال حديثي الولادة اذ بلغ عددهم 11 حالة.

إذ أشارت الدراسات الى ارتفاع نسبة اصابة الاشخاص الذين يمتنون المهن الزراعية بسبب الصدمة بالاشواك النباتية ومن ثم انتقالها من الجلد الى الاماكن الاخرى بالجسم ومن ثم انتقالها من المرضى الوافدين الى المستشفيات مسببة عدوى انتهازية في المرضى منقوصي المناعة (Dutikiewicz et al., 2016). اما بالنسبة لنتائج الدراسة الاحصائية فقد اظهرت وجود الفروق المعنوية بالنسبة لمجموع توزيع بكتريا *Pantoea spp.* بحسب حالة المرضى عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) جدول (4-8).

جدول (4-8) توزيع عزلات بكتريا *Pantoea* وأنواعها من عينات سريرية مختلفة حسب حالة المرضى

P value	X2	المجموع	الوافدين	الراقدين	حالة المرضى
					بكتريا <i>Pantoea</i>
0.330(NS)	0.947	19	11 (57.89%)	8 (42.10%)	بكتريا <i>Pantoea spp.</i>
0.670(NS)	0.182	11	5 (26.31%)	6 (31.57%)	بكتريا <i>Pantoea agglomerans</i>
0.046(NS)	4	8	6 (31.57%)	2 (10.52%)	بكتريا <i>Pantoea calida</i>
0.169(NS)	1.895				X^2
		7.658	4.227	5.250	P value
		0.022(S)	0.121(NS)	0.072(NS)	

S : اختلاف معنوي ($P < 0.05$) , NS : لا يوجد اختلاف معنوي ($P > 0.05$)

4.4: اختبار فحص الحساسية

Antibiotic sensitivity test

أختبرت حساسية بكتريا *Pantoea spp.* التي عزلت من العينات السريرية والبيئية خلال هذه الدراسة تجاه 21 مضاداً حياتياً بالاعتماد على طريقة (1966) *Bauer et al* (طريقة انتشار الأقراص) جدول (4-9) الذي يوضح نسب المقاومة والمقاومة المتوسطة و الحساسية لهذه البكتيريا تجاه المضادات المستعملة، إذ قورنت نتائج الفحص مع الجداول القياسية وبحسب ماجاء في (2017) CLSI, من خلال قياس أقطار مناطق التثبيط حول أقراص المضادات الحياتية المستعملة لمعرفة مدى مقاومة بكتريا *Pantoea spp.* للمضادات الحياتية المستعملة في مستشفيات الديوانية وخطورة مقاومة هذه البكتريا لهذه المضادات الحياتية المختلفة .

إذ اظهرت عزلت بكتريا *Pantoea spp.* المشمولة في الدراسة الحالية مقاومة عالية نسبياً تجاه مضاد بيراسيلين بنسبة (75%) إذ توصل (2013) *Mardaneh and Dallal* الى ان عزلت بكتريا *Pantoea spp.* كانت مقاومة لهذا المضاد بنسبة (37.5%) كما اشار (2018) *Buyukcam et al.* ان عزلت بكتريا *Pantoea spp.* قد اظهرت مقاومة تامة لهذا المضاد بينما توصل كل من (2009) *Deletoile et al.* و (2013) *Dallal* الى ان هذه البكتريا ابدت حساسيتها لهذا المضاد .

تتداخل البينيسليينات في عملية بناء الجدار الخلوي البكتيري ويحصل ذلك عند آخر مرحلة في بناء الجدار المتمثلة بربط البيبتيدات السكرية تحديداً ربط حامضين أمينيين اثنين هما الالانين وغلطيسين ، كلٍ منهما مرتبط بسلسلة مختلفة عديدة البيبتيد مكونة للجدار، تمنع هذه المضادات ربط الحامضين الأمينيين السابق ذكرهم (الالانين وغلطيسين) ببعضهما. وبذلك يصبح الجدار الخلوي البكتيري فاقد للروابط الداخلية cross-linkages بين البيبتيدات السكرية مما يُحدث خلل مورفولوجي (بالنسبة للشكل ومن ثم للوظيفة) بالجدران الخلوية للبكتريا المعرضة لهذه المضادات ، بعض انواع البكتيريا لديها القدرة على تصنيع إنزيمات تعطل دور مضادات البنسيلينات عن طريق فتحها حلقة البتا لاكتام β -Lactam الموجودة لدى البنسيلينات هي انزيمات البيتا لاكتاميز β -Lactamase أو انزيم البينيسلييناز Penicillinase (Bradford,2001).

اما بالنسبة لمضاد تاكارسلين -كلافولانك اسد فقد كانت العزلات المقاومة له بنسبة (87.5%) . وهذا ما أشار اليه (2013) *Mardaneh and Dallal* إذ أن عزلت هذه البكتريا كانت مقاومة لهذا المضاد بنسبة (50%) بينما أشار (2009) *Deletoile et al* الى فعالية مضاد تاكارسلين -كلافولانك اسد تجاه عزلت بكتريا *Pantoea spp.* إذ ابدت هذه العزلات حساسيتها تجاه هذا المضاد . أما مضاد اموكسيلين -كلافولانك اسد ، فقد كانت عزلت بكتريا *Pantoea spp.* المقاومة له بنسبة (100%)، وكانت هذه النتيجة مقارنة لما توصل اليه (2017) *Chemsy et al* بأن عزلت بكتريا *Pantoea spp.* أظهرت مقاومة لهذا المضاد، بينما اشار كل من (2003) *Shmid et al* و (2015) *Marais et al.* الى فعالية هذا المضاد تجاه عزلت بكتريا *Pantoea spp.* إذ أبدت هذه العزلات حساسيتها تجاه هذا المضاد.

وقد يعزى سبب المقاومة لهذه المضادات إلى قدرة البكتريا على إنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز التي يشفر لها كروموسومياً أو بلازميدياً إذ تعمل هذه الانزيمات على تثبيط فعالية مضادات البييتالاكتام وهي من اكثر وسائل المقاومة شيوعاً إذ توجد في معظم انواع البكتريا سواء أكانت سالبة أم موجبة لصبغة جرام، وهي في الغالب ما تكون في منطقة الفراغ المحيطي Periplasm في الانواع السالبة لصبغة غرام (Livermore, 1995; Bush, 1997) وتأتي اهميتها من خلال قدرتها على فتح حلقة البييتالاكتام لكل من البنسلينات والسيفالوسبورينات، وبذلك تكون هذه المضادات غير فعالة ضدالبكتريا (Koneman *et al.*, 1992). اما بالنسبة لمضادات السيفالوسبورينات (الجيل الثالث) مثل مضاد سيفتازيديم فقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان هذه البكتريا مقاومة له بنسبة عالية جدا (100%) وهذا ما أشار اليه (Buyukcam *et al*, 2018) في نتائجه الى مقاومة عزلات بكتريا *Pantoea* spp. لهذا المضاد بينما أشار كل من (Richter *et al* (2013) و (Cheng *et al* (2013) و (Venincase *et al* (2015) في دراستهم الى إن عزلات بكتريا *Pantoea* spp. أظهرت حساسية تامة لهذا المضاد. فيما سجلت الدراسة الحالية نسبة مقاومة عالية لمضاد سيفترياكزون (87.5%) إذ توصل (Chemis *et al* (2017) الى نتيجة مقاربة لنتائجنا إذ أبدت عزلات هذه البكتريا مقاومتها تجاه هذا المضاد بينما أشار كل من (Mehar *et al* (2013) و (Senanayke *et al* (2016) الى فعالية مضاد سيفترياكزون تجاه عزلات بكتريا *Pantoea* spp. تزداد المقاومة تجاه مضادات السيفالوسبورينات مع ازدياد استهلاكها وتعود هذه المقاومة الى افراز انزيمات Cephalosporinases (Lopez-Yeste *et al.*, 1996) وكذلك انزيمات البييتالاكتاميز ذات الطيف الواسع المحطمة لمضادات السيفالوسبورينات (Jacoby, 1994). كما أظهرت النتائج أيضا مقاومة العزلات قيد الدراسة لمضاد ازترونام بنسبة (91.6%)، بينما سجل (Mardaneh and Dallal (2013) (12.5) للعزلات المقاومة لهذا المضاد ونسبة (75%) للعزلات التي اظهرت حساسيتها تجاه هذا المضاد بينما توصل كل من (Deletoile *et al.*, (2009) و (Mehar *et al*, (2013) الى ان هذا المضاد فعال تجاه عزلات هذه البكتريا إذ اظهرت بكتريا *Pantoea* spp حساسيتها تجاه مضاد ازترونام. اما فيما يخص مضادات الكاربابنيم فقد أظهر مضاد ميروبنيم فعاليته تجاه جميع العزلات إذ أبدت العزلات حساسيتها تجاهه بنسبة (100%)، إذ سجل (Mardaneh and Dallal (2013) نسبة حساسية عزلات بكتريا *Pantoea* spp. لمضاد الميروبنيم (62.5%) كما أشار كل من (Senanayke *et al* (2016) و (Mehar *et al*, (2013) الى فعالية مضاد الميروبنيم إذ أظهرت عزلات بكتريا *Pantoea* spp حساسيتها لهذا المضاد بينما سجل كل من (Buyukcam *et al* (2018) و (Mardaneh and Dallal; (2013) نسبة مقاومة عزلات بكتريا *Pantoea* spp. لمضاد الميروبنيم (12.5%) . إذ تعتبر مضادات الكاربانيم العلاج الامثل للاصابات المتسببة من

الانواع البكتيرية العائدة للعائلة المعوية ، إذ أشارت إليه العديد من الدراسات الى فعالية هذه المضادات وقابليتها على اختراق الاغشية البكتيرية الخارجية بالاضافة الى ثباتيتها العالية تجاه معظم انزيمات البييتالاكتاميز (Miriagou *et al.*, 2003; Luzzaro *et al.*, 2004).

أما بالنسبة لمضادات الامينوكلايكوسيد (جنتاميسين ،توبراميسين،اميكاسين) فقد سجلت النتائج خلال هذه الدراسة نسبة المقاومة التي ابدتها بكتريا *Pantoea spp.* لمضاد جنتاميسين (50%) ولمضاد توبراميسين (54.1%) فيما سجلت العزلات مقاومة اقل لمضاد اميكاسين بنسبة (8.3%) ،كانت هذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه (Buyukcam *et al.*, 2018) في دراستهم اذ ان عزلات بكتريا *Pantoea spp.* كانت مقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيد (جنتاميسين ،توبراميسين،اميكاسين) بينما اشار (Shmid *et al.*, 2003) الى فعالية مضادي توبراميسين وجنتاميسين تجاه عزلات بكتريا *Pantoea spp.* إذ أبدت عزلاتهم حساسيتها تجاه هذين المضادين. اما (Richter *et al.*, 2013) فقد اشاروا الى ان مضاد جنتاميسين فعال لعزلات بكتريا *Pantoea spp.* اذ كانت العزلات حساسة تجاه هذا المضاد .

ان الالية الرئيسية لمقاومة بكتريا *Pantoea spp.* لمضادات الامينوكلايكوسيدات تعود الى تواجد الانزيمات المحورة للامينوكلايكوسيدات (Aminoglycoside-Modifying Enzymes (AMEs) ، اذ تكون مستويات المقاومة المرتفعة ضد هذه المضادات مرتبطة بوجود انزيم المثليز 16srRNA methylase فضلا عن تقليل نفاذية الجدار الخارجي والية الدفع (Aghazadeh *et al.*, 2014) وقد يكون مقاومة هذه البكتريا لمضادات الامينوكلايكوسيدات هو ظهور عزلات طافرة بسبب استعمال جرع مفرطة وكذلك ساعد الاستعمال العشوائي لهذه المضادات الى تطور المقاومة لبكتريا *Pantoea spp.* اما المضاد ازتروميسين فقد اظهر فعاليته تجاه عزلات بكتريا *Pantoea spp.* التي ابدت حساسيتها تجاه هذا المضاد بنسبة (70.8%) . كما اظهر المضاد تيتراسايكلين فعاليته تجاه عزلات *Pantoea spp.* بنسبة (50%) في حين اظهر المضاد دوكسيسايكلين حساسيته تجاه عزلات بكتريا *Pantoea spp.* بنسبة (58.3%) بينما كانت نسبة العزلات المقاومة له (41.6%).

اما بالنسبة لمضادات الكوينولونات فقد سجلت عزلات بكتريا *Pantoea spp.* نسبة مقاومة لمضاد سيبروفلوكساسين (45.8%) اذ توصل (Mardaneh and Dallal 2013) الى نسبة العزلات المقاومة (12.5) لمضاد سيبروفلوكساسين في حين سجل كل من (Magnet *et al.* 2008) و (Habhab and Blake 2008) حساسية عزلات بكتريا *Pantoea spp.* لمضاد سيبروفلوكساسين .

اما بالنسبة لمضاد نالدكسك اسيد فقد أبدت عزلات البكتريا قيد الدراسة مقاومة له بنسبة (58.3%) بينما توصل (Deletiole *et al.* 2009) الى ان عزلات هذه البكتريا ابدت حساسيتها تجاه مضاد نالدكسك اسد ، وسجلت العزلات قيد الدراسة مقاومة لمضادي نورفلوكساسين وليفولوكساسين بنسبة (50%) . وكانت هذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه (Cheng *et al.*, 2013) إذ أشاروا الى مقاومة هذه البكتريا لمضاد ليفولوكساسين بينما توصل كل

من (2013) Mardaneh and Dallal و (2013) Richter *et al* الى حساسية بكتريا *Pantoea spp* لمضاد ليفولوكساسين كما سجل (2015) Venincase *et al* حساسية عزلاتهم لمضادات الكوينولونات. اذ تمتاز هذه المضادات بقابليتها القاتلة للحياة المجهرية (Bactericidal) اذ تعمل على تثبيط بناء الـDNA وتثبيط فعالية الـDNA gyrase والذي يعمل على فك الارتباط الحلزوني للـDNA ويضمن تباعدهما عن بعضهما خلال عملية استنساخ الـDNA (Turnridge, 1995). اما سبب مقاومة هذه البكتريا لهذه المضادات فهو نتيجة حدوث طفرة في الانزيم الهدف DNA gyrase او بفعل نظام الضخ الخارجي (Efflux pump) وقد تحمل المورثات التي تشفر لهذه المقاومة على البلازميدات او على الكروموسومات (2002) (Martinel and Baquero).

اما المضادات ترايمثوبريم وترايمثوبريم _سلفاميثوكزول وكلورامفينيكول و نتروفيوراننتين فقد سجلت بكتريا *Pantoea spp* نسب مقاومة لهذه المضادات . (66.6%) ، (45.8%) ، (66.6%) ، (45.8%) على التوالي. اذ سجل (2012) Flores Popoca *et al* مقاومة عزلات بكتريا *Pantoea spp* لمضاد الكلورامفينيكول و نتروفيوراننتين .بينما سجل (2013) Mardaneh and Dallal حساسية عزلات هذه البكتريا بنسبة (100%) لمضاد كلورامفينيكول .في حين توصل (2009) Deletiole *et al* الى ان عزلات بكتريا *Pantoea spp* كانت حساسة لمضاد تريمتوبريم _سلفاميثوكزول . يعمل التريمثوبريم على منع تكوين حمض الفوليك (Folic Acid) مما يوقف عملية نمو و تكاثر البكتريا ، إلا أن تأثيره ضعيف وحده، لذا يستخدم عادة مع علاج السلفاميثوكزول

(Huovinen *et al* .,1995) كما ان مضاد الكلورامفينيكول له وظائف عدة منها تثبيط تكوين البروتين البكتيري، كما أن له مدى واسع جدا تجاه البكتريا السالبة لصبغة جرام اما اليات المقاومة لمضاد الكلورامفينيكول: نفاذيته من الاغشية الخارجية للبكتريا وهذه هي الآلية الأكثر شيوعا لمقاومة الكلورامفينيكول ، تحور الوحدات الثانوية الخاصة بالرايبوسوم 50 S إذ أن المقاومة التي تمنح من الطفرات في الوحدات الثانوية الخاصة بالرايبوسوم 50 S هي نادرة جدا. ثم إن مقاومة الكلورامفينيكول يمكن أن تعزز البلازميد بشفرة لمقاومة المضادات الاخرى

(Glazko. 1977). اما مضاد نتروفيوراننتين فيتداخل بعملية انتاج الحمض النووي البكتيري DNA وبناء الجدار الخلوي البكتيري والبروتين (1994) (McOsker and Fitzpatrick) .

يعزى تطور مقاومة المضادات الحياتية في بكتريا *Pantoea spp* بسبب تعرضها بشكل مستمر لهذه المضادات او اخذ هذه المضادات من المرضى من دون إجراء سابق لفحص الحساسية او حدوث طفرات جينية في البكتريا مما يزيد من مقاومة هذه البكتريا للمضادات الحياتية .

جدول (4-9) النسب المئوية لعزلات بكتريا *Pantoea spp.* المقاومة للمضادات الحيوية

النسبة المئوية للعزلات المقاومة	النسبة المئوية للعزلات متوسطة الحساسية	النسبة المئوية للعزلات الحساسة	الرمز	المضادات الحيوية المستعملة
18 (75%)	—	6 (25%)	PRL	Pipercilin
21 (87.5%)	—	3 (12.5%)	TCC	Ticaracilin/ Clavulanic acid
24 (100%)	—	—	AMC	Amoxicillin/ acid Clavulanic
21 (87.5%)	3 (12.5%)	—	CRO	Ceftriaxone
24 (100%)	—	—	CAZ	Ceftazidime
22 (91.6%)	—	2 (8.3%)	ATM	Aztreonam
—	—	24 (100%)	MEM	Meropenem
12 (50%)	6 (25%)	6 (25%)	CN	Gentamicin
13 (54.1%)	6 (25%)	5 (20.8%)	TOB	Tobramycin
2 (8.3%)	—	22 (91.6%)	AK	Amikacin
7 (29.1%)	—	17 (70.8%)	AZM	Azithromycin
12 (50%)	—	12 (50%)	TE	Tetracyclin
10 (41.6%)	—	14 (58.3%)	DO	Doxycycline
11 (45.8%)	—	13 (54.1%)	CIP	Ciprofloxacin
14 (58.3%)	1 (4.16%)	9 (37.5%)	NA	Nalidixic acid
12 (50%)	3 (12.5%)	9 (37.5%)	LEV	Levofloxacin
12 (50%)	4 (16.6%)	8 (33.3%)	NOR	Norfloxacin
16 (66.6%)	2 (8.33%)	6 (25%)	TM	Trimethoprim
11 (45.8%)	5 (20.8%)	8 (33.3%)	SXT	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole
11 (45.8%)	—	13 (54.1%)	C	Chloroamphenicol
16 (66.6%)	3 (12.5%)	5 (20.8%)	NIT	Nitrofurantoin

4 . 5:المقاومة المشتركة لاصناف المضادات الاخرى

توصلت نتائج الدراسة الحالية الى وجود مقاومة مشتركة بين أصناف المضادات الحياتية المستعملة في الدراسة الحالية مثل (السيفالوسبورينات،المونوباكتام ،الامينوكلايكوسيدات) التي لوحظت في عزلات بكتريا *Pantoea spp.* مما يجعلها تمتلك مقاومة متعددة لهذه المضادات و يطلق على مقاومة البكتريا المتعددة للمضادات الحياتية مصطلح (MDR) (Multidrug resistant) ويقصد بها قابلية البكتريا على مقاومة ثلاثة أصناف أو أكثر من المضادات الحياتية وتكون البكتريا قادرة على مقاومة مضاد واحد على الأقل ضمن الصنف الواحد (Magiorakos et al., 2012) ، إذ كانت 7 عزلات من بكتريا *Pantoea spp.* وبنسبة (29.1%) مقاومة لثلاث أو أكثر من أصناف المضادات المستعملة في هذه الدراسة وهي بذلك تحمل صفة المقاومة المتعددة MDR بحسب محددات (CLSI, 2017).

وقد يعزى سبب امتلاك هذه البكتريا صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحياتية لقابليتها على انتاج انزيمات البيتا-لاكتاميز المختلفة وانتاج الانزيمات المحورة للامينوكلايكوسيدات وامتلاكها الية الضخ الخارجي وهذه الاليات تعمل معاً مسببةً ظاهرة المقاومة المتعددة (Pournaras et al ., 2005).

في حين بلغ عدد عزلات نوع *P. agglomerans* عذلة واحدة التي قاومت اربعة اصناف كان مصدر العزلات الادرار والقشع ، بينما بلغ عدد عزلات النوع *P.calida* عزلتين والتي قاومت اربعة اصناف من المضادات الحياتية في حين كانت 4 عزلات من بكتريا *Pantoea spp.* مقاومة لخمس اصناف من المضادات الحياتية كان مصدرها القيح والادوات والاجهزة الطبية جميعها كان من بكتريا *P.calida* كما موضح في جدول (4-10).

وكانت نتائجنا هذه مقارنة لما توصلت اليه (Abdalhussen and Darweesh (2016) في دراسة اجريت في العراق الى ان عزلات بكتريا *Pantoea spp.* أظهرت مقاومة متعددة للمضادات الحياتية (MDR) ، كما أشار (Sharma et al (2012) في دراسة اجريت في ايران الى ان عزلات بكتريا *Pantoea spp.* أبدت مقاومة متعددة للمضادات الحياتية (MDR) وخاصة النوع *P. agglomerans* .

جدول (4-10) النسب المئوية لانواع المقاومة لعزلات بكتريا *Pantoea* وأنوعها المشمولة في الدراسة

نوع المقاومة	عدد عزلات <i>Pantoea</i> المقاومة spp.	عدد عزلات <i>Pantoea agglomerans</i> المقاومة	عدد عزلات <i>Pantoea calid</i> المقاومة	عدد اصناف المضادات الحيوية	مصدر العزلات
MDR (%29.1)7	3	1	2	4	ادرار، قشع
	4	-	4	5	قيح، اجهزة وادوات طبية
XDR (%54.1)13	2	-	2	6	ادرار، منطقة التنقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى
	4	1	3	7	جروح، ادوات واجهزة طبية
	3	3	-	9	جروح، براز
PDR (%16.6)4	4	4	-	10	ادرار، جروح منطقة التنقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى
	4	4	-	12	ادرار، غسيل الكلى

ان ارتفاع نسبة عزلات بكتريا *Pantoea spp.* ذات المقاومة المتعددة في مستشفيات الديوانية يعتبر مؤشراً على تفشي سلالات بكتريا *Pantoea spp.* داخل المستشفيات مع امتلاكها مقاومة متعددة للمضادات الحيوية مما يؤدي بالنتيجة الى الفشل العلاجي المستعمل الشائع حالياً لعلاج الاصابات التي تسببها هذه البكتريا .

ويطلق مصطلح المقاومة الشاملة (XDR) (Extensive drug resistance) على البكتريا المقاومة لكل اصناف المضادات الحيوية عدا صنف واحد او اثنين من اصناف المضادات إذ تكون البكتريا قادرة على مقاومة مضاد واحد على الأقل ضمن الصنف (Magiorakos et al., 2012) .

وفي الدراسة الحالية سجلت عزلات بكتريا *Pantoea* spp. مقاومة شاملة بنسبة (54.1%) وبلغ عددها 13 عزله . سجل منها النوع *P.agglomerans* عزلة واحدة قاومت 7 اصناف من المضادات الحياتية 3 عزلات قاومت 9 أصناف و4 عزلات قاومت 10 أصناف فيما سجل النوع *P.calida* 3 عزلات قاومت 7 أصناف من المضادات الحياتية اما مصادر العزلات التي اظهرت المقاومة الشاملة للمضادات الحياتية XDR فقد كانت مختلفة تضمنت عينات الجروح والادرار والبراز والادوات والاجهزة الطبية . وتكمن خطورة سلالات بكتريا *Pantoea* spp. ذات المقاومة الشاملة لاصناف المضادات الحياتية في تواجدها داخل المستشفيات وارتفاع نسبة مقاومتها يؤدي لتحويلها لسلالات مقاومة لكل العلاجات الشائعة. ان مقاومة المضادات الحياتية تظهر بسبب تكوين الطفرات التي تكون اما طبيعية او عشوائية التي تظهر في بعض الخلايا البكتيرية مما يجعلها مقاومة لمفعول المضاد الحياتي . بعد ذلك، تنتقل هذه الميزة إلى الجيل المقبل للخلايا البكتيرية الذي يتميز بكونه جيلا ذا مقاومة كاملة للمضاد الحياتي . بينت عدة دراسات أن طريقة استعمال المضادات الحياتية تؤثر بصفة كبيرة على تطور عدد الكائنات الحية الدقيقة المقاومة. اذ ان الفرط باستعمال المضادات الحياتية ذات الطيف الواسع مثل سيفالوسبورينات من الجيل الثاني والثالث يساعد بعملية تطور المقاومة للبكتريا الممرضة . وهناك عوامل أخرى تساهم بتطور انواع المقاومة للبكتريا الممرضة تتمثل في التشخيص غير الدقيق من قبل الطبيب ووصفه أدوية غير ضرورية، والاستعمال غير المناسب للمضادات الحياتية من قبل المريض ، إلى جانب استعمال المضادات الحياتية كمواد إضافية لطعام المواشي والدواجن لتشجيع نموها (Criz et al., 2005).

اما المقاومة لكل اصناف المضادات الحياتية المدروسة فيطلق عليها مصطلح (PDR) (Pandrug resistance) (Magiorakos et al., 2012) وسجلت عزلات بكتريا *Pantoea* spp. في الدراسة الحالية نسبة مقاومة لكل اصناف المضادات الحياتية (PDR) (16.6%) اذ بلغ عدد العزلات 4 عزلات وجميعها عائدة للنوع *P.agglomerans* و كانت مصادر العينات التي عزلت منها هذه البكتريا عينات التنقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسل الكلى والادرار.

4-6:امتلاك جينات الضراوة بين عزلات بكتريا *Pantoea* spp.

ان التحري عن تواجد جينات الضراوة في عزلات بكتريا *Pantoea* spp. السريرية والبيئية ذات اهمية كبيرة من الناحية الوبائية وبصورة عامة في العراق لعدم توفر دراسات محلية عن مدى انتشار جينات الضراوة في العزلات السريرية لبكتريا *Pantoea* spp. و في مستشفيات مدينة الديوانية بصورة خاصة اذ لم تسجل دراسات سابقة عن تواجد عزلات هذه البكتريا داخل المستشفيات مع انتشار جينات

الضراوة في العزلات قيد الدراسة لذلك هدفت دراستنا الحالية الى التحري عن مدى تواجد وانتشار جينات الضراوة في 24 عزلة لبكتريا *Pantoea spp.* باستعمال تقنية سلسلة تفاعل انزيم البلمرة PCR (Monoplex).

اذ يبين جدول (4-11) توزيع وانتشار ثمان جينات (*avrXacE2, avrXacE1, hrpG, hrc, rcsA*, *avrXacE2, avrXacE1, hrpG, hrc, rcsA*) توزيع وانتشار ثمان جينات (*avrXacE2, avrXacE1, hrpG, hrc, rcsA*) في عزلات بكتريا *Pantoea spp.* اذ بلغت عدد عزلات هذه البكتريا الحاوية لجين *avrXacE2* 13 عزلة بنسبة (54.16%) سجل النوع *P. agglomerans* نسبة تواجد هذا الجين (45,83%) بواقع 11 عزلة اما النوع *P. calida* فقد سجل نسبة تواجد هذا الجين (8.33%) بواقع عزلتين فقط شكل (4-4) . وهذه النتيجة كانت مقارنة لما اشار اليه *Astua-Monge et al* (2005) بتواجد جين *avrXacE2* في البكتريا الممرضة مما يساهم في رفع الضراوة وتطور اعراض المرض داخل خلايا المضيف. كما اشار *Rakhashiya et al* (2016) الى التعبير عن كمية هذا الجين اذ تواجد الجين بمستوى عالي في بكتريا *P. agglomerans* .

اذ اشارت الدراسات الى ان البكتريا الممرضة تعبر عن امراضيتها في المضيف بوجود جينات الضراوة *virulence genes* التي تشفر عبر بروتينات الضراوة *virulence proteins* إذ تقوم هذه الجينات بايقاف عمل الخلايا المناعية وتحطيم خلايا المضيف خاصة في حال عدم وجود جين المقاومة في المضيف المستهدف مما يزيد من الضراوة والامراضية الشديدة (*Dangl et al., 1994*).

كما أشارت دراسات اخرى الى ان التعبير عن جينات *avr* تتطلب تتواجد مسار *Hrp* الافرازي إذ تشفر بروتيناته عبر النظام الافرازي الثالث (T3SS) (*Vanden Ackerveken et al., 1996*).

أما الجين *hrpG* فقد كانت عدد العزلات الحاوية عليه 19 عزلة وبنسبة (79.16%) فيما سجل النوع *P. agglomerans* نسبة تواجد هذا الجين (50%) بواقع 12 عزلة اما النوع *P. calida* فقد سجل نسبة تواجد هذا الجين (29.16%) بواقع 7 عزلات شكل (4-5) وهذا ما توصل اليه *Rakhashiya et al* (2016) الى احتواء هذه البكتريا على هذا الجين إذ تواجد بمستوى عالي في بكتريا *P. agglomerans* كما اظهرت نتائج الدراسة الحالية تواجد جين *hrc* بين عزلات بكتريا *Pantoea spp.* بنسبة (70.83%) بواقع 17 عزلة اذ سجل النوع *P. agglomerans* عدد عزلات حاوية على هذا الجين بلغت 8 عزلات بنسبة (33.33%) فيما سجل النوع *P. calida* عدد عزلات حاوية على هذا الجين اعلى بلغت 9 عزلات بنسبة (37.5%) شكل (4-6) . وهذه النتيجة مقارنة لما توصل اليه *Kirzinger et al* (2015) الى انتشار هذا الجين بين عزلات بكتريا *Pantoea spp.* خاصة في النوعين

P. calida و *P. agglomerans* وسجل (Rakhashiya et al (2016) أيضاً تواجد جين *hrc* بكميات عالية في بكتريا *P. agglomerans* قياساً بالأنواع البكتيرية الأخرى العائدة للعائلة المعوية .

إذ يعتبر الجين *hrpG* جين تنظيمي ينظم عمل مجموعة جينات *hrp* في المضيف إذ اشارت الدراسات الى ان تحليل التسلسلات لعدد من جينات *hrp* للبكتريا الممرضة للنبات العائدة للعائلة المعوية اظهرت تشابهاً عالياً مع تسلسلات جينات *hrp* للبكتريا الممرضة للانسان إذ أن الجينات التنظيمية *hrp/hrc* تشفر عبر بروتينات النظام الإفرازي الثالث T3SS في البكتريا الممرضة التي تفرز بصورة مباشرة الى خلايا المضيف إذ تعتبر الجينات التنظيمية محددات أساسية للأمراضية (Bogdanove et al., 1996a).

أما بالنسبة لتواجد جين *rcaA* بين عزلات بكتريا *Pantoea* spp. المدروسة فقد سجل نسبة (68.42%) بواقع 13 عزلة وسجل النوعين *P. calida* و *P. agglomerans* تواجد الجين نسبة (25%) بواقع 6 عزلات و(29.16%) بواقع 7 عزلات على التوالي شكل (4-7). وهذا ما اشار اليه Kim et al (2017) الى تواجد جين *rcaA* في بكتريا *Pantoea* spp. الذي يشفر لانتاج EPS احد عوامل الضراوة في البكتريا الممرضة الذي له تأثير قوي بظهور اعراض المرض على المضيف إذ تعمل بروتينات RcsA على التشفير لهذا الجين لتصنيع الكبسولة متعددة السكريات المهمة للأمراضية البكتريا إذ اشارت الدراسات الى ان تواجد جين *rcaA* و *rcaB* يكون حاسماً للسلاسل المتعايشة مع المضيف لتحويلها الى سلالات ممرضة كما يزيد تكوين الغشاء الحيوي Biofilm مما يزيد ضراوة البكتريا الممرضة (Wall et al., 2018). في حين لم تسجل الدراسة الحالية اي نسب لتواجد جينات الضراوة ((*avrXacE1, rcaB, hpaA, acrAB*) بين عزلات بكتريا *Pantoea* spp. كما موضح بالجدول (4-1) والاشكال (4-8)، (4-9)، (4-10)، (4-11) على التوالي. بينما اشار Astua-Monge et al (2005) الى تواجد جين *avrXacE1* في البكتريا الممرضة المعزولة في دراستهم. وتوصل (Rakhashiya et al (2016) الى احتواء بكتريا *P. agglomerans* على جين *hpaA*. وقد أوضحت الدراسات ان جين *hpaA* يعمل على تحطيم خلايا واجهزة المضيف كما يعمل على كبح الخلايا الدفاعية الخاصة بالمضيف مما يساهم برفع الضراوة وتطور المرض (Lu et al., 2008). وفي دراسات اخرى اشارت إلى ان الجين *hpaA* يتأثر بالطفرات خاصة بالبكتريا الممرضة الا انه يبقى محتفظاً بتحفيز الجينات الأخرى المرتبطة بالأمراضية كما اشارت الى اهمية بروتينات HpaA بالتداخل مع عمل خلايا المضيف إذ تنتقل هذه البروتينات الى الخلية المضيفة عبر المسار الإفرازي في الفترة قبل التسبب باعراض المرض الشديدة (Bauer et al., 1994).

الفصل الرابع.....النتائج والمناقشة

كما ان تواجد جين *acrAB* في البكتريا الممرضة يزيد من الاصابات الانتهازية للبكتريا اذ اشارت الدراسات إلى ان تواجد هذا الجين في البكتريا المسببة للأمراض يحميها من دفاعات المضيف السامة ويحفز نموها البطيء في حال وجود مركبات سامة او مضادات حيائية او معقمات او منظفات كما ان وجود هذا الجين في البكتريا يدل على وجود سلالة طافرة مقاومة للعديد من السموم

(Brown et al., 2007). اما بالنسبة لنتائج الدراسة الاحصائية فقد اظهرت الدراسة الحالية وجود الفروق المعنوية في النسب المئوية لانتشار جينات الضراوة المشمولة بالدراسة في عزلات بكتريا *Pantoea spp.* وانواعها المختلفة جدول(11-4).

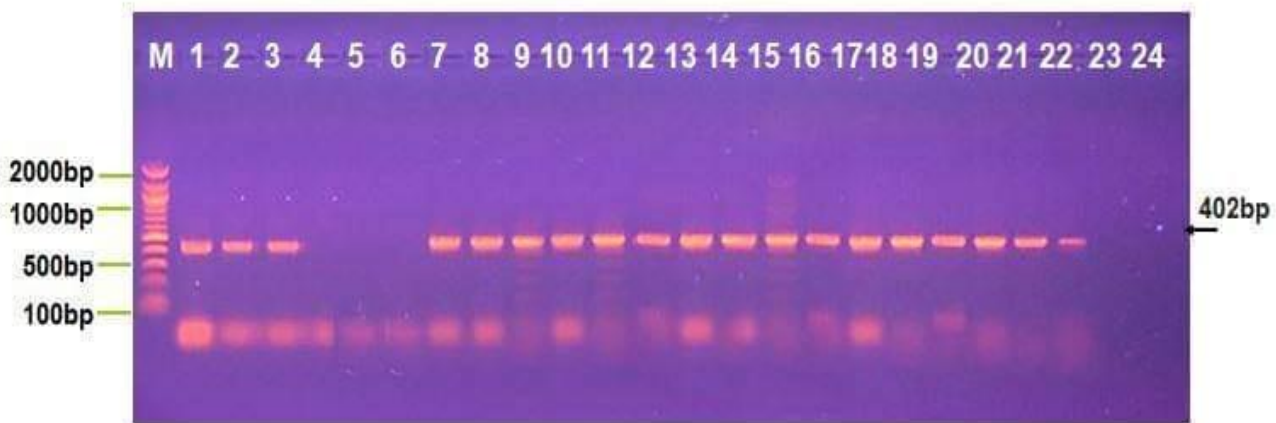
جدول (11-4)النسب المئوية لتوزيع وانتشار جينات الضراوة المشمولة بالدراسة في عزلات بكتريا *Pantoea spp.*

P Value	X2	رقم العزلات	بكتريا <i>P.calida</i> الحاوية للجين	رقم العزلات	بكتريا <i>P.agglomerans</i> الحاوية للجين	بكتريا <i>Pantoea</i> spp. الحاوية للجين	الجين
0.002	12.401	7,9	(%8.33)2	3,8,10,13,1 6,18,19, 20,22,23,2 4	(%45.83)11	(%54.16)13	<i>avrXacE2</i>
1	0	-	(0%) 0	-	(0%) 0	(0%) 0	<i>avrXacE1</i>
0.017	8.136	1,4,5,6,7,9,14,15,17	(%37.5)9	2,3,8,12,13 ,22,23,24	(%33.33) 8	(%70.83)17	<i>Hrc</i>
0.075	5.177	4,6,7,9,14,15,17	(%29.16) 7	10,11,12,1 9,22,24	(%25) 6	(%68.42)13	<i>rCSA</i>
1	0	-	(0%) 0	-	(0%) 0	(0%) 0	<i>rCSB</i>
1	0	-	(0%) 0	-	(0%) 0	(0%) 0	<i>hpaA</i>
1	0	-	(0%) 0	-	(0%) 0	(0%) 0	<i>acrAB</i>
1	0		38.075		60.383	96.715	X^2
1	0		0(S)		0(S)	0(S)	P value

S : اختلاف معنوي ($P < 0.05$) , NS : لا يوجد اختلاف معنوي ($P > 0.05$)



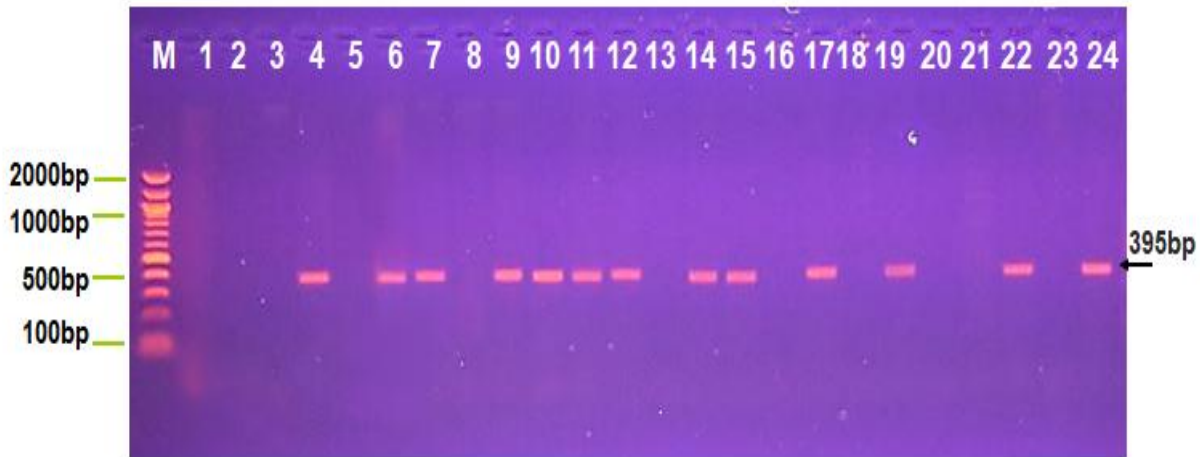
الشكل (4-4): الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين *avrxacE2* في جرثومة *Pantoea spp.* إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر رقم (3,7,8,9,10, ,13 ,16 ,18,19,20,22,23,24) عزلات جرثومة *Pantoea spp.* الموجبة للجين بناتج طوله 204bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.



الشكل (4-5): الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين *hrpG* في جرثومة *Pantoea spp.* إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر رقم (1,2,3, 7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22) عزلات جرثومة *Pantoea spp.* الموجبة للجين بناتج طوله 402bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.



الشكل (4-6): الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين *hrc* في جرثومة *Pantoea* spp. إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر رقم (1,2,3,4,5, 6, 7,8,9 ,12,13,14,15,17 ,22,23,24), عزلات جرثومة *Pantoea* spp. الموجبة للجين بناتج طوله 647bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.



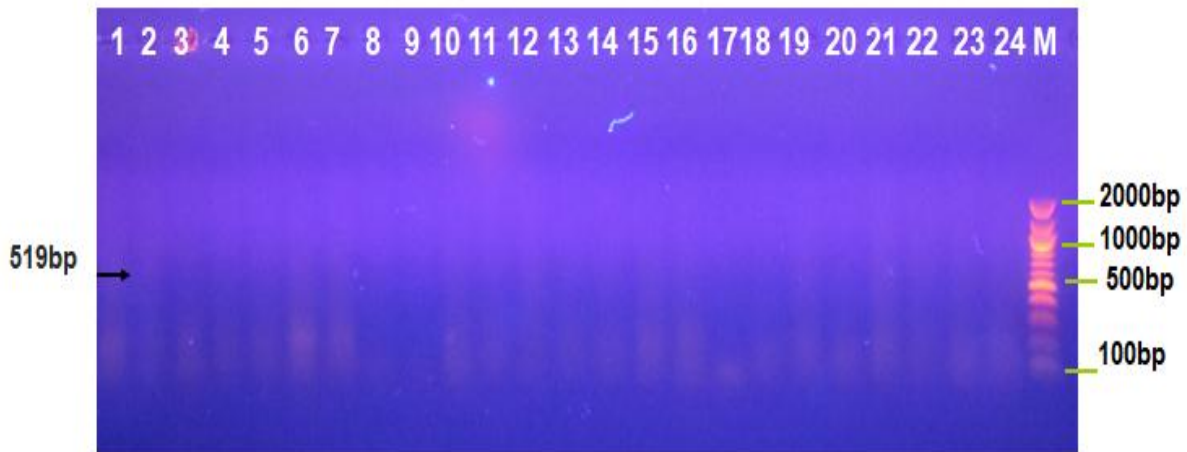
الشكل (4-7): الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين *rcsA* في جرثومة *Pantoea* spp. إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر رقم 4, 6, عزلات جرثومة *Pantoea* spp. الموجبة للجين بناتج طوله 395bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.



الشكل (4-8): الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين *avrxacE1* في جرثومة *Pantoea* spp. إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر من رقم (24-1) عزلات جرثومة *Pantoea* spp. السالبة للجين بناتج طوله 304 bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.



الشكل (4-9): الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين *rcsB* في جرثومة *Pantoea* spp. إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر من رقم (24-1) عزلات جرثومة *Pantoea* spp. السالبة للجين بناتج طوله 438bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير وفرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.



الشكل (4-10): الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين *hpaA* في جرثومة *Pantoea* spp. إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر من رقم (1-24) عزلات جرثومة *Pantoea* spp. السالبة للجين بناتج طوله 519bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير و فرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.



الشكل (4-11): الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز والحاوي على نتائج فحص PCR لجين *acrAB* في جرثومة *Pantoea* spp. إذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp و الحفر من رقم (1-24) عزلات جرثومة *Pantoea* spp. السالبة للجين بناتج طوله 515bp وباستعمال تيار كهربائي 80 أمبير و فرق جهد 100 فولت لمدة ساعة واحدة.

7-4:انتشار جينات الضراوة بين عزلات بكتريا *Pantoea spp.* وتوزيعها بحسب حالة المرضى ومنطقة السكن

بينت نتائج الدراسة الحالية تواجد جينات الضراوة بين عزلات *Pantoea spp.* المعزولة من المرضى الراقدين والوافدين الى مستشفيات مدينة الديوانية اذ سجلت هذه الدراسة تواجد جين *avrxaE2* في المرضى الراقدين في مستشفيات مدينة الديوانية بنسبة (21.05%) بواقع 4 عزلات بينما تواجد الجين *avrxaE2* في المرضى الوافدين الى مستشفيات الديوانية بنسبة اعلى (31.57%) بواقع 6 عزلات. اما تواجد الجين *hrpG* بين العزلات المعزولة من المرضى الراقدين فقد سجل نسبة (42.10%) بواقع 8 عزلات بينما كان تواجد هذا الجين في العزلات المعزولة من المرضى الوافدين بنسبة اقل (36.84%) بواقع 7 عزلات . فيما كان تواجد جين *hrc* بين عزلات بكتريا

Pantoea spp. المعزولة من المرضى الراقدين والوافدين الى مستشفيات الديوانية بنسبة متساوية (36.84%) وبواقع 7 عزلات من كلا الحالتين المرضى الوافدين والراقدين وسجل الجين *rcaA*

نسبة تواجده في العزلات المعزولة من المرضى الوافدين بنسبة اعلى (31.57%) بواقع 6 عزلات وتواجد هذا الجين في العزلات المعزولة من المرضى الراقدين بنسبة اقل (15.78%) بواقع 3 عزلات جدول (4-12) . ان نتائج هذه الدراسة ودراسات اخرى تشير الى زيادة الاصابة بهذه البكتريا مستقبلاً وزيادة انتشار جينات الضراوة بين البكتريا المنقولة من المرضى المزارعين الوافدين الى المستشفيات بالنظر الى تزايد اعداد السكان المزارعين والعمال المعرضين لهذه البكتريا اذ يعتبرون بؤرة للتلوث بسبب خوضهم بالمساحات الطينية وتعاملهم مع المواد النباتية باستمرار مما يجعل بكتريا *Pantoea spp.* قادرة على اختراق جلد الانسان بشكل مباشر من خلال مناطق الصدمة (Naha et al., 2012).

اما بالنسبة لنتائج الدراسة الاحصائية فقد اظهرت الدراسة الحالية وجود الفروق المعنوية في النسب المئوية لتوزيع وانتشار جينات الضراوة في عزلات بكتريا *Pantoea spp.* المشمولة بالدراسة حسب حالة المرضى جدول (4-12).

جدول (4-12) النسب المئوية لتوزيع وانتشار جينات الضراوة المشمولة بالدراسة في بكتريا *Pantoea spp.* حسب حالة المرضى

P value	X ²	المجموع	الوافدين	الراقدين	حالة المرضى الجينات
0.371(NS)	0.8	10	6 (31.57%)	4 (21.05%)	<i>avrXacE2</i>
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	<i>avrXacE1</i>
0.715(NS)	0.133	15	7 (36.84%)	8 (42.10%)	<i>hrpG</i>
1(NS)	0	14	7 (36.84%)	7 (36.84%)	<i>hrc</i>
0.157(NS)	2	9	6 (31.57%)	3 (15.78%)	<i>rCSA</i>
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	<i>rCSB</i>
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	<i>hpaA</i>
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	<i>acrAB</i>
		59.810	30.066	32.208	X²
		0(S)	0(S)	0(S)	P value

S : اختلاف معنوي (P<0.05) ، NS : لا يوجد اختلاف معنوي (P>0.05)

اما توزيع الجينات وانتشارها في عزلات بكتريا *Pantoea spp.* حسب منطقة السكن فقد توصلت نتائج الدراسة الحالية الى تواجد الجين *avrXacE2* في عزلات بكتريا *Pantoea spp.* المعزولة من مرضى الريف بنسبة أعلى (47.36%) بواقع 9 عزلات فيما كان عدد عزلات التي تواجد بها هذا الجين في مرضى المدينة عزلة واحدة فقط وبنسبة (5.26%) . في حين سجلت عدد العزلات المعزولة من مرضى الريف التي تواجد بها جين *hrpG* وجين *hrc* 10 عزلات وبنسبة (52.63%) لكل منهما . في حين تواجد هذين الجينين في العزلات المعزولة من مرضى المدينة بواقع 4,5 عزلات وبنسبة (26.31%) و(21.05%) على التوالي وتواجد الجين *rCSA* في العزلات المعزولة من مرضى الريف بنسبة أعلى (36.84%) بواقع 7 عزلات بينما سجل مرضى المدينة نسبة أقل لتواجد هذا الجين في العزلات

الفصل الرابع.....النتائج والمناقشة

المعزولة منهم بنسبة (10.52%) وبواقع عزلتين جدول (4-13). ان النسب العالية لتوزيع وانتشار جينات الضراوة بين عزلات بكتريا *Pantoea spp* المعزولة من الريف مقارنة بالمدينة يتفق مع ماكدته العديد من الدراسات إذ أشارت دراسات اجريت في الهند الى تزايد الاصابات الانتهازية ببكتريا *Pantoea spp* في منطقة اوديشا الريفية بسبب الاشواك النباتية وانتقالها للانسان مسببة عدوى مكتسبة بالمستشفيات (Tiwari and Beriha., 2015). كما ان عدم الاهتمام بالنظافة الشخصية وسوء استعمال العلاج وعدم الاسراع بالمعالجة وقلة الوعي الصحي والثقافي للمرضى الريفيين يسبب الاصابة الانتهازية ببكتريا *Pantoea spp* و تطور المرض واستمراره وقد يؤدي الى مضاعفات للانسان حيث يكون سببا رئيسي لالتهابات الجلد والجروح والخمج (Delgado et al.,2001). اما بالنسبة لنتائج الدراسة الاحصائية فقد اظهرت الدراسة الحالية وجود فروق معنوية في النسب المئوية لتوزيع وانتشار جينات الضراوة في عزلات بكتريا *Pantoea spp* المشمولة بالدراسة حسب منطقة السكن جدول (4-13).

جدول (4-13) النسب المئوية لتوزيع وانتشار جينات الضراوة المشمولة بالدراسة في بكتريا *Pantoea spp* حسب منطقة السكن

P value	X2	منطقة السكن			الجينات
		المجموع	الريف	المدينة	
0(S)	12.800	10	9 (47.36%)	1 (5.26%)	<i>avrxaE2</i>
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	<i>avrxaE1</i>
0.068(NS)	3.333	15	10 (52.63%)	5 (26.31%)	<i>hrpG</i>
0.023(S)	5.143	14	10 (52.63%)	4 (21.05%)	<i>hrc</i>
0.018(S)	5.556	9	7 (36.84%)	2 (10.52%)	<i>rcaA</i>
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	<i>rcaB</i>
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	<i>hpaA</i>
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	<i>acrAB</i>
		59.810	42.978	21.333	χ^2
		0(S)	0(S)	0.003(S)	P value

S : اختلاف معنوي (P<0.05) NS : لا يوجد اختلاف معنوي (P>0.05)

4-8:توزيع وانتشار جينات الضراوة في عزلات بكتريا *Pantoea spp* حسب نوع المقاومة المشتركة لاصناف المضادات الحيوية

توصلت الدراسة الحالية الى تواجد الجين *avrXacE2* بين عزلات بكتريا *Pantoea spp* التي اظهرت مقاومة متعددة للمضادات MDR بنسبة (4.16%) من عزلة واحدة فقط في حين تواجد هذا الجين في العزلات التي نوع مقاومتها XDR بنسبة اعلى (41.66%) بواقع 10 عزلات وتواجد هذا الجين في العزلات التي نوع مقاومتها PDR بنسبة (8.33%) بواقع عزلتين .

اما الجينين *hrpG* و *hrc* فقد تواجدا في العزلات التي نوع مقاومتها MDR وPDR بنسبة متساوية (16.66%) بواقع 4 عزلات لكل منهما بينما تواجد هذين الجينين في العزلات التي نوع مقاومتها XDR بنسبة اعلى(45.83%) بواقع 11 عزلة وبنسبة (37.5%) بواقع 9 عزلات على التوالي اما الجين *rCSA* فقد تواجد بنسبة اعلى في العزلات التي نوع مقاومتها XDR (29.16%) بواقع 7 عزلات تليها العزلات التي نوع مقاومتها MDR بنسبة (20.83%) بواقع 5 عزلات والعزلات التي نوع مقاومتها PDR كانت نسبتها (4.16%) في عزلة واحدة فقط جدول (4-14).

ان الاستعمال المتكرر وغير السليم للمضادات الحيوية يمثل عاملاً رئيساً في ظهور هذه السلالات المقاومة للمضادات الحيوية بسبب اكتساب الجينات المهمة لاستمرار امراضيتها عن طريق البلازميد ، لذلك ترشيد استعمال هذه المضادات في الحالات المرضية الضرورية فقط يمثل الخطوة الرئيسية في التصدي للسلالات المقاومة . اما بالنسبة لنتائج الدراسة الاحصائية فقد اظهرت الدراسة الحالية وجود الفروق المعنوية في النسب المئوية لتوزيع وانتشار جينات الضراوة في عزلات بكتريا *Pantoea spp* المشمولة بالدراسة حسب نوع المقاومة التي ابدتها عزلات هذه البكتريا جدول (4-14).

جدول (4-14) النسب المئوية لتوزيع وانتشار انتشار جينات الضراوة المشمولة بالدراسة حسب نوع المقاومة التي ابدتها عزلات بكتريا *Pantoea* spp.

P value	X ²	المجموع	عدد عزلات بكتريا <i>Pantoea</i> spp. نوع مقاومتها PDR	عدد عزلات بكتريا <i>Pantoea</i> spp. نوع مقاومتها XDR	عدد عزلات بكتريا <i>Pantoea</i> spp. نوع مقاومتها MDR	نوع المقاومة الجينات
0.001(S)	13.705	13(54)	(%8.33) 2	(%41.66) 10	(%4.16) 1	<i>avrXacE</i> ₂
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	<i>avrXacE</i> ₁
0.030(S)	7.007	19(75)	(%16.66) 4	(%45.83) 11	(%16.66) 4	<i>hrpG</i>
0.146(Ns)	3.850	17(70.83)	(%16.66) 4	(37.5) 9	(%16.66) 4	<i>hrc</i>
0.072(NS)	5.257	13(54.16)	(%4.16) 1	(%29.16) 7	(%20.83) 5	<i>rCSA</i>
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	<i>rCSB</i>
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	<i>hpaA</i>
1(NS)	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	<i>acrAB</i>
		96.343	16.876	48.176	20.648	X ²
		0(S)	0.018(S)	0(S)	0.004(S)	P value

S : اختلاف معنوي (P<0.05) ، NS : لا يوجد اختلاف معنوي (P>0.05)

9.4: توزيع وانتشار اكثر من جين من جينات الضراوة بين عزلات بكتريا *Pantoea* spp.

بينت نتائج الدراسة الحالية تواجد جين *hrpG* بين جميع عزلات بكتريا *Pantoea* spp. المعزولة في هذه الدراسة من مستشفيات مدينة الديوانية ماعدا 4 عزلات يليه بالمرتبة الثانية جين *hrc* اذ تواجد في 16 عزلة من العزلات قيد الدراسة ماعدا 8 عزلات اما الجين *rcaA* فقد تواجد في 13 عزلة من عزلات بكتريا *Pantoea* spp. في حين تواجد الجين *avrXacE2* في 12 عزلة كما موضح في الجدول (4-15).

فيما سجلت نتائج الدراسة الحالية العزلات التي احتوت على اكثر من جين اذ احتوت العزلات (22,9,7) اربع جينات ضراوة تضمنت (*hrpG,hrc,rcaA,avrXacE2*) بنسبة (16.66%) وكانت مصادر العزلات من الجروح والادرار والادوات الطبية .. إذ أشار (Rakhashiya et al (2016 الى تواجد خمسة جينات (*hrpG,hpaA,avrXacE1,hrc,avrXacE2*) في بكتريا *Pantoea* spp. .

اما بالنسبة للعزلات (24,19,,17,15,14,13,12,10,8) فقد احتوت على ثلاث جينات مختلفة بنسبة (12.5%) اذ احتوت العزلة 8 و13 على جينات (*hrpG,hrc,avrXacE2*) التي كانت مصادرها من الادرار ومنطقة التنقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى اما العزلة 10 و19 فقد احتوت الجينات (*hrpG,rcaA,avrXacE2*) وكانت مصادرها من الادوات الطبية والجروح في حين احتوت العزلات 12,14,15,17 على الجينات (*hrpG,hrc,rcaA*) التي كانت مصادرها القيق والادوات الطبية منطقة التنقيب الشرياني الوريدي لمرضى غسيل الكلى اما العزلة 24 فقد احتوت (*hrc,rcaA,avrXacE2*) وكان مصدرها البراز في حين كانت العزلات الحاوية على جينين هي (1,2,3,4,11,16,18,20,23) بنسبة (8.33%) اذ احتوت العزلات 1,2,3 على جينين (*hrpG,hrc*) وكان مصدرها الادرار فيما احتوت العزلات 4,11 على الجينات (*hrpG,rcaA*) وكانت مصادرها الادرار والاجهزة الطبية . وقد اشار (Chalupowicz et al (2009 الى تواجد الجينات التنظيمية المتمثلة بـ *hrc/hrpG* التي قيست كمياتها بتقنية RealTime-PCR في عزلات بكتريا *Pantoea* spp.

اما العزلات 16,18,20 فقد احتوت على الجينات (*hrpG,avrXacE2*) والعزلة 23 احتوت على الجينات (*hrc,avrXacE2*) التي كان مصدرها البراز كما سجلت الدراسة احتواء عزلات من بكتريا *Pantoea* spp. على جين واحد من جينات الضراوة تضمنت العزلات 21 و5 بنسبة (4.16%) اذ كانت العزلة 5 حاوية على جين *hrc* ومصدرها القشع بينما احتوت العزلة 21 على الجين *hrpG* وكان

مصدرها من القيقح. اذ اشار (Nizan-Koren *et al* (2003) الى تعبير عزلات هذه البكتريا عن الجين *hrpL* في اثناء اجراء الفحص بتقنية Real –Time PCR.

كما اشارت العديد من الدراسات إلى أن بكتريا *Pantoea spp.* تحولت من البكتريا المتعايشة مع النبات الى بكتريا ممرضة انتهازية للانسان نتيجة حصول هذه البكتريا على جزر الامراضية التي تنتقل عن طريق البلازميد اذ تحتوي هذه الجزر على مجموعة من الجينات التنظيمية *hrp/hrc* التي تشفر لنظام الافرازي الثالث في البكتريا مما يؤدي الى ظهور مسببات الامراض الجديدة كما اشارت الدراسات الى اهمية البروتينات المؤثرة Effector protiens في الدخول الى خلايا المضيف ومن ثم تضاعفها وتكاثرها بداخل الخلايا المضيفة والتلاعب بالخلايا المناعية للمضيف بما ينفع البكتريا الممرضة ممايساهم في انتشار الاصابة وتطور اعراض المرض، إذ تحتوي البكتريا المعوية جينات *hrp/hrc* التي تزيد من امراضيتها وضرورتها بما فيها بكتريا *Pantoea spp.* (Barash and Manulis- Sasson;2007).

اما بالنسبة لنتائج الدراسة الاحصائية فلم تظهر الفروق معنوية بالنسبة للنسب المئوية لانتشار جينات الضراوة بين عزلات بكتريا *Pantoea spp.* جدول (4-15).

جدول (4-15)النسب المئوية لانتشار جينات الضراوة بين عزلات بكتريا *Pantoea spp.*

النسبة المئوية لجينات الضراوة بين العزلات N= 24	جينات الضراوة بين عزلات بكتريا <i>Pantoea spp.</i>	العينات
2 (8.33%)	<i>hrpG,hrc</i>	1
2 (8.33%)	<i>hrpG,hrc</i>	2
2 (8.33%)	<i>hrpG,hrc</i>	3
2 (8.33%)	<i>hrpG, rcsA</i>	4
1 (4.16%)	<i>Hrc</i>	5
2 (8.33%)	<i>hrc,rcsA</i>	6
4 (16.66%)	<i>hrpG,hrc,rcsA,avrXacE2</i>	7
3 (12.5%)	<i>hrpG,hrc,avrXacE2</i>	8

(% 16.66) 4	<i>hrpG, hrc,rcsA,avrxcE2</i>	9
(% 12.5) 3	<i>hrpG,rcsA,avrxcE2</i>	10
(% 8.33) 2	<i>hrpG,rcsA</i>	11
(% 12.5) 3	<i>hrpG,hrc,rcsA</i>	12
(% 12.5) 3	<i>hrpG,hrc,avrxcE2</i>	13
(% 12.5) 3	<i>hrpG, hrc,rcsA</i>	14
(% 12.5) 3	<i>hrpG, hrc,rcsA</i>	15
(% 8.33) 2	<i>hrpG,avrxcE2</i>	16
(% 12.5) 3	<i>hrpG, hrc,rcsA</i>	17
(% 8.33) 2	<i>hrpG,avrxcE2</i>	18
(% 12.5) 3	<i>hrpG,rcsA,avrxcE2</i>	19
(% 8.33) 2	<i>hrpG,avrxcE2</i>	20
(% 4.16) 1	<i>hrpG</i>	21
(% 16.66) 4	<i>hrpG,hrc,rcsA,avrxcE2</i>	22
(% 8.33) 2	<i>hrc,avrxcE2</i>	23
(% 12.5) 3	<i>hrc,rcsA,avrxcE2</i>	24
7.022		X2
0.999(Ns)		P value

S : اختلاف معنوي (P<0.05) ، NS : لا يوجد اختلاف معنوي (P>0.05)

الأسباب والتوصيات

Conclusions & Recommendations

: الاستنتاجات Conclusions

- 1- اظهرت الدراسة الحالية انتشار بكتريا *Pantoea spp* كممرض انتهازي خطير في عدوى المستشفيات ومسؤوليتها عن العديد من الاصابات اذ تعتبر المساحات الزراعية في المناطق الريفية بؤراً تزيد من انتشار بكتريا *Pantoea spp*. بين المرضى المزارعين الوافدين الى المستشفيات مما يسبب عدوى مكتسبة بين المرضى الراقدين خصوصاً بالافراد منقوصي المناعة .
- 2- بينت نتائج الدراسة بتفشي النوعين *Pantoea agglomerans* و *Pantoea calida* في مستشفيات مدينة الديوانية اذ تواجدت *Pantoea agglomerans* بين العزلات المدروسة بنسب اعلى من *Pantoea calida*.
- 3- اظهرت جميع عزلات بكتريا *Pantoea spp* قيد الدراسة انواع من المقاومة MDR, XDR, PDR مما يشكل خطورةً وتحدياً علاجياً كبيراً.
- 4- اظهرت النتائج ان المضادين Meropenem و Amikacin هما الافضل فعالية تجاه بكتريا *Pantoea spp*.
- 5- اظهرت تقنية الـ(PCR) انتشاراً كبيراً لجينات الضراوة *avrXacE2*, *hrpG*, *hrc*, *rcaA* بين عزلات بكتريا *Pantoea spp* المدروسة وكان الجين *hrpG* هو الاكثر تواجداً.

التوصيات : Recommendations

1. ضرورة اجراء المسح الدوري للمستشفيات باستمرار لتحديد بؤر التلوث البكتيري والتحري عن مدى مقاومتها للمضادات الحياتية الشائعة الاستعمال في مستشفيات مدينة الديوانية بصورة خاصة وفي مستشفيات العراق بصورة عامة واستخدام فحص الحساسية الدوائية في مستشفيات مدينة الديوانية والتاكيد على ضرورة استعمال المضادات الحياتية عند الحاجة القصوى فقط لمنع ظهور السلالات الطافرة المقاومة للمضادات الحياتية .
2. اجراء المزيد من الدراسات على بكتريا *Pantoea spp.* المعزولة من النبات ومن المستشفيات لتحديد التعبير الجيني لجينينات الضراوة باستخدام التقنيات الاحداث مثل Real-Time PCR.
3. التحري عن جينات المقاومة للمضادات الحياتية في بكتريا *Pantoea spp.*
4. استخدام تقنية تصميم البودئ Primer design في الابحاث لكونها ذات نتائج موثوقة اذ ان اغلب السلالات المحلية تظهر تبايناً عن السلالات العالمية عند استخدام البودئ الجاهزة وقد لاتعطي نتائج.
5. اجراء دراسة مقارنة بين بكتريا *Pantoea spp.* المعزولة من النبات والتربة وبكتريا *Pantoea spp.* المعزولة من المستشفيات من حيث الانواع وانتشار جينات الضراوة وتسلسل القواعد النروجينية للوقوف على مصدر التلوث بهذه البكتريا والحد من انتشارها .
6. اجراء تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis لعزلات بكتريا *Pantoea spp.* في مدينة الديوانية ومقارنتها من حيث التشابه والاختلاف مع العزلات العالمية في بنك الجينات NCBI .

المصادر

References

References

A

AbdAlhussen, L. S., and Darweesh, M. F. (2016). Prevalence and antibiotic susceptibility patterns of *Pantoea* spp. isolated from clinical and environmental sources in Iraq. *IJ of ChemTech Research*, 9(08), 430-437.

Ahmad, S. S., and Ali, F. A. (2014). Detection of ESBL, AmpC and Metallo Beta-Lactamase mediated resistance in Gram-negative bacteria isolated from women with genital tract infection. *European Scientific Journal, ESJ*, 10(9).

Aghazadeh, M., Hojabri, Z., Mahdian, R., Nahaei, M. R., Rahmati, M., Hojabri, 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*, 24, 187-192.

Alfano J.R. and Collmer A. (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic- bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol.* 179:5655–5662.

Alfano, J.R. and Collmer, A. (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 385–414.

Allen, P., Hart, C. A. and Saunders, J. R. (1987). Isolation from *Klebsiella* and characterization of two *rca* genes that activate colanic acid capsular biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 133:331-340.

Aly, N. Y. A., Salmeen, H. N., Lila, R. A. A., and Nagaraja, P. A. (2008). *Pantoea agglomerans* bloodstream infection in preterm neonates. *Medical principles and practice*, 17(6), 500-503.

Astua-Monge, G., Freitas-Astua, J., Bacocina, G., Roncoletta, J., Carvalho, S. A., and Machado, M. A. (2005). Expression profiling of

virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Journal of bacteriology*, 187(3), 1201-1205.

B

Barash, I., and Manulis-Sasson, S. (2007). Virulence mechanisms and host specificity of gall-forming *Pantoea agglomerans*. *TRENDS in Microbiology*, 15(12), 538-545.

Barber, C. E., J.-L. Tang, J.-X. Feng, M.-Q. Pan, T. J. G. Wilson, H. Slater, J. M. Dow, P. Williams, and M. J. Daniels. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol. Microbiol.* 24:555–566.

Barberan, A., Velazquez, H. C., Jones, S., and Fierer, N. (2017). Hiding in plain sight: Mining bacterial species records for phenotypic trait information. *MSphere*, 2(4), e00237-17.

Bauer, A. W., Kirby, W. A. M., Sherris, J. S. and Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*,45: 493-496.

Bauer, D.W., Bogdanove, A.J., Beer, S.V., and Collmer, A. (1994) *Erwinia chrysant hemi hrp* genes and their involvement in soft rot pathogenesis and elicitation of the hypersensitive response. *Mol. Plant–Microbe Interact* 7: 573–581.

Beck von Bodman, S. and Farrand, S.K. (1995). Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. *J. Bacteriol.* 177, 5000–5008.

Beji, A., Mergaert, J., Gavini, F., Izard, D., Kersters, K., Leclerc, H. and De Ley, J. (1988). Subjective synonymy of *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*, and *Enterobacter agglomerans* and redefinition the taxen by genotypic and phenotypic data. *Int .Sysst. Bacteriol* 38,77-88.

Bello, N. (2018). Dawakin Kudu AT, Adetokun AB, Taura DW, Jobbi YD, Umar M. Yusuf I. Characterization and antimicrobial susceptibility

profile of bacteraemia causing pathogens isolated from febrile children with and without sickle cell disease in Kano, Nigeria. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 10(1), e2018016.

Beltran, J. A. P., Beltran, X. A. R., and Rodriguez, I. A. M. (2018). Perfil de resistencia antimicrobiana en bacilos Gram negativos no fermentadores aislados en fuentes hídricas. *Revista Médica de Risaralda*, 23(2), 38-42.

Bernhard, F., Poetter, K., Geider, K. and Coplin, D. L. (1990). The *rcsA* gene from *Erwinia amylovora*: identification, nucleotide sequence analysis, and regulation of exopolysaccharide biosynthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3:429-437.

Bicudo, E. L., Macedo, V. O., Carrara, M. A., Castro, F. F., and Rage, R. I. (2007). Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* in a pediatric urgent care center. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11(2), 281-284.

Bogdanove, A., Beer, S.V., Bonas, U., Boucher, C.A., Collmer A., Coplin, D.L. (1996a). Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol* 20: 681–683.

Boszczowski . I, Nobrega de Almeida Junior J, Peixoto de Miranda EJ, Pinheiro Freire M, Guimaraes T, Chaves CE,(2012): Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* bacteraemia associated with contaminated anticoagulant citrate dextrose solution: new name, old bug? *J. Hosp. Infect*; 80: 255-258.

Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews*, 14(4), 933-951.

Brady C, Cleenwerck I, Venter S. (2010a). Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium cyripedii* (Hori 1911) Brenner *et al.* 1973 emend. Hauben *et al.* 1998 to the genus as *Pantoea cyripedii* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*;60: 2430–40.

Brady C, Goszczynska T, Venter S.(2009a). *Pantoea allii* sp. nov., isolated from onion plants and seed. *Int J Syst Evol Micr* 2011;61:932–7. Brady C, Venter S, Cleenwerck I, et al. Isolation of *Enterobacter cowanii* from Eucalyptus showing symptoms of bacterial blight and dieback in Uruguay. *Lett. Appl. Microbiol*;49:461–5.

Brady C, Venter S, Cleenwerck I,(2009b). *Pantoea vagans* sp. nov., *Pantoea eucalypti* sp. nov., *Pantoea deleyi* sp. nov and *Pantoea anthophila* sp. nov. *Int .J .Syst. Evol. Micr.*;59:2339–45. 106.

Brady CL, Venter SN, Cleenwerck I.(2010b). Transfer of *Pantoea citrea*, *Pantoea punctata* and *Pantoea terrea* to the genus *Tatumella* emend. as *Tatumella citrea* comb. nov., *Tatumella punctata* comb. nov and *Tatumella terrea* comb. nov and description of *Tatumella morbirosei* sp nov. *Int. J .Syst .Evol .Micr.*;60: 484–94.

Brady, C. L., Goszczynska, T., Venter, S. N., Cleenwerck, I., De Vos, P., Gitaitis, R. D., and Coutinho, T. A. (2011). *Pantoea allii* sp. nov., isolated from onion plants and seed. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(4), 932-937.

Brady, C. L.; Cleenwerck, I.; Venter, S. N.; Engelbeen, K. ; de Vos, P. and Coutinho, T. A. (2010): Emended description of the genus *Pantoea* and description of four novel species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium cyripedii* (Hori 1911) Brenner *et al.* 1973 emend. Hauben *et al.* 1998 to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea cyripedii* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60:2430-2440.

Brady, C.L., Cleenwerck, I, Vander Westhuizen, L., (2012). *Pantoea rodasii* sp. nov., *Pantoea rwandensis* sp. nov. and *Pantoea wallisii* sp. nov., three novel *Pantoea* species isolated from Eucalyptus. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*;62:1457–64.

Brenner, D. J., Fanning, G. R., Knutson, J. K. L., Steigerwalt, A. G., & Krichevsky, M. I. (1984). Attempts to classify *herbicola* group-*Enterobacter agglomerans* strains by deoxyribonucleic acid hybridization

and phenotypic tests. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(1), 45-55.

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

Brown, D. G., Swanson, J. K., and Allen, C. (2007). Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. *Applied and environmental microbiology*, 73(9), 2777-2786.

Burbank, L. ; Mohammadi, M. and Roper, M. (2015): Siderophore-mediated iron acquisition influences motility and is required for full virulence of the xylem-dwelling bacterial phytopathogen *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Appl. Environ Microbiol.*, 81:139-48.

Burbank, L.P., Mohammadi, M., and Roper, M.C. (2014). Siderophore-mediated iron acquisition influences motility and is required for full virulence for the xylem-dwelling bacterial phytopathogen, *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2503-2514.

Burr T, Katz B, Abawi G,(1991). Comparison of tumorigenic strains of *Erwinia herbicola* isolated from table beet with *E. h. gypsophilae*. *Plant Dis*;75:855–8.

Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., and Shostak, A. W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of parasitology*, 575-583.

Buyukcam, A., Tuncer,o., Gur, D., Sancak, B., Ceyhan, M., Cengiz, A. B., and Kara, A. (2018). Clinical and microbiological characteristics of *Pantoea agglomerans* infection in children. *Journal of infection and public health*, 11(3), 304-309.

C

Carlier, A.L., Burbank, L.P., and von Bodman, B.S. (2009). Identification and characterization of three novel EsaI/EsaR quorum-sensing controlled stewartan exopolysaccharide biosynthetic genes in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*. *Mol. Microbiol.* 74, 903–913.

Carpita, N.C., and Gibeaut, D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal.* 3, 1-30.

Cheng, A., Liu, C. Y., Tsai, H. Y., Hsu, M. S., Yang, C. J., Huang, Y. T., and Hsueh, P. R. (2013). Bacteremia caused by *Pantoea agglomerans* at a medical center in Taiwan, 2000–2010. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(3), 187-194.

Chemsi, M., Benechchehab, Y., Lehlmi, M., Zerouali, K., Habzi, A., and Benomar, S. (2017). Nosocomial Infection of *Pantoea* spp. in Neonatal Unit About 11 Cases. *International Journal of Infectious Diseases and Therapy*, 2(4), 72.

Cicchetti R., Iacobini M., Midolla F., Papoff P., Mancuso M., Moretti C. (2006). *Pantoea agglomerans* sepsis after rotavirus gastroenteritis, *Pediatr. Infect. Dis J.* 25, 280–281.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, Pannsylvania. (2017). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 26th informational supplement. Approved standard M11-A8 .

Coleman, M., Pearce, R., Hitchin, E., Busfield, F., Mansfield, J. W. and Roberts, I. S. (1990). Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the *rcaA* gene of *Erwinia amylovora*, encoding a positive regulator of capsule expression: evidence for a family of related capsule activator proteins. *J. Gen. Microbiol.* 136:1799-1806.

Collee, J. G.; Marmion, B. P; Fraser, A. G. and Simmons, A. (1996). Mackie and McCarthy–Practical Medical Microbiology. 4th ed., Longman Singapore Publishers (Pte) Lt. Singapore pp 361 – 381.

Collmer, A. (1998). Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. *Current opinion in plant biology*, 1(4), 329-335.

Cooksey, D. A. (1986).Galls of *Gypsophila Palliculata* caused by *Erwinia herbicola*..*Plant Dis*70,464-468.

Correa, V.R., Majerczak, D. R., Ammar, E. D., Merighi, M., Pratt, R. C, Hogenhout, S.A., Coplin, D.L., and Redinbaugh, M. G. (2012). The bacteria *Pantoea stewartii* uses two different type III secretion systems to colonize its plant host and insect vector. *J. Applied and Environmental Microbiology*. 78, 6327-6336.

Cother, E. J., Reinke, R., McKenzie, C., Lanoiselet, V. M. and Noble, D. H. (2004). An unusual stem necrosis of rice caused by *Pantoea ananas* and the first record of this pathogen on rice in Australia. *Austral Plant Pathol*. 33,495-503.

Coutinho, T. A., Preisig, O., Mergaert, J., Cnockaert, M. C., Riedel, K. -H., Swings, J. and Wingfield, M. J. (2002).Bacterial blight and eieback of *Eucalyptus* species, hybrids .and clones in South Africa.*Plant Dis* 86,20-25.

Cirz RT, Chin JK, Andes DR, de Crecy-Lagard V, Craig WA, Romesberg FE (2005). ["Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance"](#). *PLoS Biol*. 3 (6): e176.

Cruickshank, R.; Duguid, J. P.; Marmion, B. P. and Swain H. A. (1975). Medical Microbiology. 12th ed. Churchill Livingstone, London.

Cruz A1. T, Cazacu AC, Allen CH (2007). *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J. Clin. Microbiol*; 45: 1989-1992.

D

Dangl, J. L. (1994). The enigmatic avirulence genes of phytopathogenic bacteria.*Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 192:99–118.

Davey, M. E. and Otoole, G. A.(2000): Microbial biofims: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64:847.

Deletoile, A., Decre, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Grimont, P., and Brisse, S. (2009). Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(2), 300-310.

Delgado, A. C. D., de Jesus Pedro, R., Aoki, F. H., Resende, M. R., Trabasso, P., Colombo, A. L., and Moretti, M. L. (2009). Clinical and microbiological assessment of patients with a long-term diagnosis of human immunodeficiency virus infection and *Candida* oral colonization. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(4), 364-371.

De Maayer, P., Chan, W.Y., Blom, J., Venter, S.N., Duffy, B., Smits, T.H.M., Coutinho, T.A. (2012). The large universal *Pantoea* plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification. *BMC Genomics*, 13, 625, 1471-2164.

Desvaux M, Parham N J, Scott-Tucker A and Henderson I R.(2004). The general secretory pathway: a general misnomer?. *Trends in Microbiology*; 12: 306-309.

Dolph, P.J., Majerczak, D.R., and Coplin, D.L. (1988). Characterization of a gene cluster for exopolysaccharide biosynthesis and virulence in *Erwinia stewartii*. *J. Bacteriol.* 170, 865–871.

Donnenberg and Michael (2009): Principles and Practice of Infectious Diseases. Chapter 218: *Enterobacteriaceae*. p. 2827.

Dow, M., M. Newman, and E. von Roepenack. (2000). The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:241–261.

Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M., and Milanowski, J. (2016). *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(2).

E

Ewing W, Fife M. (1972). *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck) comb. nov. (the *Herbicola-Lathyri* Bacteria). *Int. J. Syst. Bacteriol.*;22: 4–11.

F

Farhood, A. H., and Chelab, R. L. (2017). Isolation and Identification of Bacteria from Burn injuries by 16S rRNA Gene. *Journal of College of Education for Pure Science*, 7(1), 126-139.

Field, A. (2005) . Discovering Statistics using SPSS for Windows – Second Edition, Sage Publications Ltd.

Flores Popoca, E. O., Miranda García, M., Romero Figueroa, S., Mendoza Medellín, A., Sandoval Trujillo, H., Silva Rojas, H. V., and Ramírez Durán, N. (2012). *Pantoea agglomerans* in immunodeficient patients with different respiratory symptoms. *The Scientific World Journal*, 2012.

Fritz, S., Cassir, N., Noudel, R., De La Rosa, S., Roche, P. H., and Drancourt, M. (2014). Postsurgical *Pantoea calida* meningitis: a case report. *Journal of medical case reports*, 8(1), 195.

Fuqua C. (2007). "Biofilm formation by plant-associated bacteria". *Annual Review of Microbiology*. 61: 401–22.

G

Galan J E and Collmer A.(1999): Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*; 284: 1322-1328.

Gangloff, S. C., Zahringer, U., Bloudin, C., Guenounow, M., Silver, J. and Goyert, S.M. (2005): Influence of CD14 on ligand interactions between LPS and its receptor complex . *J. Immunol.*, 175:3940-3945.

Gavini F, Mergaert J, Bej A, Mielcarek C, Izard D., Kersters K, (1989). Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglornerans* comb. nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int .J .Syst .Bacteriol*; 39: 337-3.

Gazi, A.D., Sarris, P.F., Fadoulglou, V.E., Charova, S.N., Mathioudakis, N., Panopoulos, N., and Kokkinidis, M. (2012). Phylogenetic analysis of a gene cluster encoding an additional, rhizobial-

like type III secretion system that is narrowly distributed among *Pseudomonas syringae* strains. *BioMed Central*. 12, 1-15.

Gitaitis, R., Walcott, R., Culpepper, S., Sanders, H., Zolobowska, L. and Langston, D. (2002). Recovery of *Pantoea ananatis* causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. *Crop. Protection* 21,983-989.

Glazko, A. J. (1977). Absorption and excretion of parenteral doses of chloramphenical sodium succinate in comparison with peroral doses of chloramphenical. *Clin. Phaemacol Ther*, 21, 104.

Goszczyńska, T., Botha, W. J., Venter, S. N. and Coutinho, T. A. (2007). Isolation and identification of the causal agent of brown stalk rot, a new disease of maize in south Africa . *Plant Dis*91,711-718.

Gottesman, S., Trisler, P. and Torrescabassa, A. (1985). Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia-coli* K-12—characterization of 3 regulatory genes. *J. Bacteriol*. 162, 1111–1119-

Grimont, P. A. D. and Grimont, F. (2005). Genus: *Pantoea* In Volume TWO: The Proteobacteria, Part B :the Gammaproteobacteria .In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp . 713-720.Edited by *D.J. Brenner ,N.R. Krieg and J.T. Staley*. New York: Springer.

Cruikshank, R. B. (1975). Slavery in Nineteenth Century Siam. *Journal of the Siam Society*, 63(2), 315-333.

H

Habhab W, Blake PG (2008): *Pantoea* peritonitis: not just a “thorny” problem. *Perit Dial Int*, 28(4):430.

Habsah. H, Zeehaida M, Van Rostenberghe H, Noraida R, Wan Pauzi W I, Fatimah I. (2005). An outbreak of *Pantoea* spp. in a neonatal intensive care unit secondary to contaminated parenteral nutrition. *J. Hosp. Infect* ; 61: 213-218.

Hennecke H. and Verma D. P. S.(2001). Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions Subset of hybrid eukaryotic proteins is exported by the type I secretion system of *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology*,; 183: 1346-1358.

Holt, S.C. and Ledbtter, E.R.(1998). Relationships in prokaryotic cells. In: Topely and Wilson'P's microbiology and microbial infection Systematic bacteriology . By: Collier, L.;Balows, A. and Sussman, M. .9th ed. Euston Road, London. 2.

Huovinen, P., Sundstrom, L., Swedberg, G., and Skold, O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(2), 279.

Hueck C;(1998): Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 62: 379-433.

Huguet, E., Hahn, K., Wengelnik, K., and Bonas, U. (1998). *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. *Molecular microbiology*, 29(6), 1379-1390.

J

Jacoby, G. A. (1994). genetics of extended – spectrum β - lactamas Eur. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* Supplement 1: 2-11.

Jain S, Bohra I, Mahajan R, Jain S, Chugh TD(2012). *Pantoea agglomerans* infection behaving like a tumor after plant thorn injury: an unusual presentation. *Indian J. Pathol .Microbiol.*; 55: 386–8.

Jose Alejandro Pulido Beltran, Ximena Andrea Rodriguez Beltaán, Ivan Alberto Mendez Rodriguez.(2018). Perfil de resistencia antimicrobiana en bacilos Gram negativos no fermentadores aislados en fuentes hidricas. . *Med. Risaralda*; 23 (1): 38 – 42.

K

Kageyama, B., Nakae, M., Yagi, S., and Sonoyama, T. (1992). *Pantoea punctata* sp. nov., *Pantoea citrea* sp. nov., and *Pantoea terrea* sp. nov. isolated from fruit and soil samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(2), 203-210.

Kokare, C.R., Chakraborty, S., Khopade, A.N., and Mahadik, K.R. (2009). Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology*. 8, 159-168.

Koneman, E. W., Allen, S. D. and Janda, W. M. (1992). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 4ed. *J. B. Lippincott. Philadelphia, USA*

Kratz A., Greenberg D., Barki Y., Cohen E., Lifshitz M. (2003). *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review // *Archives of Disease in Childhood.* – 88. – P. 542–541.

Kim, M. K., Lee, S. M., Seuk, S. W., San Ryu, J., Kim, H. D., Kwon, J. H., & Yun, H. D. (2017). Characterization of the *rcaA* Gene from *Pantoea* sp. Strain PPE7 and Its Influence on Extracellular Polysaccharide Production and Virulence on *Pleurotus eryngii*. *The plant pathology journal*, 33(3), 276.

Kirzinger, M. W., Butz, C. J., and Stavriniades, J. (2015). Inheritance of *Pantoea* type III secretion systems through both vertical and horizontal transfer. *Molecular genetics and genomics*, 290(6), 2075-2088.

Kursun, O., Unal, N., Cesur, S.; Altın, N., Canbakan, B., Argun, C., Koldaş, K. and Sencan, I. (2012). A case of ventilator-associated pneumonia due to *Pantoea* sp. *Mikrobiyol. Bul.*, 46: 295-298.

L

Lapidot, A., Romling, U. and Yaron, S. (2006). Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. *Int. J. Food Microbiol.* 109:229-233.

Leach, J. E., and White F. F.. (1996). Bacterial avirulence genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:153–179.

Leonila M.L., Acioly, Vilar J. Carlos, Aline B. S., Fabiola C. Gomes A., Thayse A. L. S., and Galba M. C.T.(2017). Isolation, Identification, Characterization and Enzymatic Profile of the New Strain of *Pantoea agglomerans*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* ISSN: 2319-7706 Volume 6 Number 11 (2017) pp. 4152-4163.

Liberto, M. C., Matera, G., Puccio, R., Lo Russo, T., Colosimo, E., and Foca, E. (2009). Six cases of sepsis caused by *Pantoea agglomerans* in a teaching hospital. *The new microbiologica*, 32(1), 119.

Lindgren P. B.(1997). The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annual Review of Phytopathology*; 35: 129-152.

Liu Y, Wang S, Zhang D .(2013). *Pantoea beijingensis* sp nov., isolated from the fruiting body of *Pleurotus eryngii*. *Anton Leeuw*;104:1039–47.

Livermore, D. M. (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*, 8(4), 557-584.

Livermore, D. M. (2001). Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* 47: 247–250.

Lo, C. I., Padhmanabhan, R., Mediannikov, O., Nguyen, T. T., Raoult, D., Fournier, P. E., and Fenollar, F. (2015). Genome sequence and description of *Pantoea septica* strain FF5. *Standards in genomic sciences*, 10(1), 103.

Lobedanz S.(2007). A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:4612–4617.

Lopez-Yeste, M.; Xercavins, M.; Lite, J.; Cuchi, E. and Garan, J. (1996). Fluoroquinolone and aminoglycosides resistance in chromosomal cephalosporinase – over producing in gram negative bacilli strains with inducible beta–Lactamase. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 14 (4): 211 – 214.

Lorenz C, Kirchner O, Egler M, Stuttman J, Bonas U, Buttner D. (2008). HpaA from *Xanthomonas* is a regulator of type III secretion. *Mol. Microbiol.* 69:344–360.

Lu H, Patil P, Van Sluys MA, White FF, Ryan RP, Dow JM, Rabinowicz P, Salzberg SL, Leach JE, Sonti R. (2008). Acquisition and evolution of plant pathogenesis–associated gene clusters and candidate determinants of tissue-specificity in *Xanthomonas*. *PLoS ONE.* 3:e3828. doi:10.1371 / journal. pone. 0003828.

Luzzaro, F., Docquier, J. D., Colinon, C., Endimiani, A., Lombardi, G., Amicosante, G., Rossolini, G. M. and Toniolo, A. (2004). Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical

isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob. Agent Chemother.*, 48: 648-650

M

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

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., and Paterson, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.

Magnette, C., Tintillier, M., Horlait, G., Cuvelier, C., and Pochet, J. M. (2008). Severe peritonitis due to *Pantoea agglomerans* in a CCPD patient. *Peritoneal Dialysis International*, 28(2), 207-208.

Maher, C., Feiner, B., Baessler, K., and Schmid, C. (2013). Surgical management of pelvic organ prolapse in women. *Cochrane database of systematic reviews*, (4).

Majdalani, N., and Gottesman, S. (2005). The Rcs phosphorelay: A complex signal transduction system. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 379-404
The molecular basis for transformation of an epiphyte into a gall-forming pathogen as exemplified by *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. Pages 19-52 in: *Plant–Microbe Interactions*. Vol. 6. G. Stacey and N. Keen, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, U.S.A.

Manulis, S., and Barash, I. (2003). *Pantoea agglomerans* pvs. *gypsophilae* and *betae*, recently evolved pathogens?. *Molecular Plant Pathology*, 4(5), 307-314.

Manulis-Sasson S. B., S. (2007). Virulence mechanisms and host specificity of gall-forming *Pantoea agglomerans*. *Trends in Microbiolog* , Pages 538-54.

Martínez, J. L., and Baquero, F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical microbiology reviews*, 15(4), 647-679.

Marais, A. D., Kim, J. B., Wasserman, S. M., and Lambert, G. (2015). PCSK9 inhibition in LDL cholesterol reduction: genetics and therapeutic implications of very low plasma lipoprotein levels. *Pharmacology & therapeutics*, 145, 58-66.

Mardaneh, J., and Dallal, M. M. S. (2013). Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea (Enterobacter) agglomerans* isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran. *Iranian journal of microbiology*, 5(3), 263.

McOsker, C. C., and Fitzpatrick, P. M. (1994). Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 33(suppl_A), 23-30.

Medrano, E. G. and Bell, A. A. (2007). Role of *pantoea agglomerans* in Rosenberg opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. *J. Appl. Microbiol* 102,134-143.

Mergaert, J., Verdonck, L. and Kersters, K. (1993). Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively and description of *Pantoea stewartii* sub sp. *indologenes* sub sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol* 43,162-173.

Miethke, M. and Marahiel, M.A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 413-451.

Min Keun Kim¹, Sun Mi Lee¹, Su Won Seuk¹, Jae San Ryu¹, Hee Dae Kim¹, Jin Hyeuk Kwon¹, Yong Jo Choi¹, and Han Dae Yun¹(2017): Characterization of the *rcaA* Gene from *Pantoea* sp. Strain PPE7 and Its Influence on Extracellular Polysaccharide Production and Virulence on *Pleurotus eryngii*. *Plant Pathol. J.* 33(3) : 276-287.

Miriagou, V., Tzouveleakis, L. S., Rossiter, S., Tzelepi, E., Angulo, F. J., and Whichard, J. M. (2003). Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(4), 1297-1300.

Mohammadi, M., Burbank, L., and Roper, M. C. (2011). *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* produces an endoglucanase that is required for full virulence in sweet corn. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 463-70.

Mokracka, J., Koczura, R. and Kaznowski, A. (2004): Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter*spp. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 40:51-55.

N

Naha, K., and Ramamoorthi, P. M. (2012). Spontaneous septicaemia with multi-organ dysfunction- a new face for *Pantoea* agglomerans?. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 5(1), 83-84.

Nasser, Y. A., Hadeel, N. S. ,Reda, A. A. and Prem, A. N. (2007): *Pantoea agglomerans* Bloodstream Infection in Preterm Neonates . *Med Princ. Pract.*, 17:500-503 .

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003). Performance standards for disks susceptibility testing; approved standards, 6th ed. PP:100-113, Wayne, Pannsylvania, USA.

Nimtz, M., Mort, A., Domke, T., Wray, V., Zhang, Y., Qiu, F., Coplin, D. and Geider, K. (1996). Structure of amylovoran, the capsular exopolysaccharide from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Carbohydr. Res.* 287, 59–76.

Nizan-Koren, R., Manulis, S., Mor, H., Iraki, N. M., & Barash, I. (2003). The regulatory cascade that activates the Hrp regulon in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila*e. *Molecular plant-microbe interactions*, 16(3), 249-260.

O

Oh, C. S., and Beer, S. V. (2005). Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology letters*, 253(2), 185-192.

O'Toole, G. ,Kaplan, H.B. and Kolter, R. (2000): Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.*, 54:49-79.

P

Pandya, S., Aslam, S., Shenoy, R., Denham, J. D., Nanjappa, S., & Greene, J. N. (2018). *Pantoea* Infections in Cancer Patients: A Retrospective Chart Review and Review of Literature. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 26(5), 275-278.

Panta, R. K., Bell, S. T., Healy, J. L., Aamir, R., Bateman, C. J., Moghiseh, M., and Anderson, N. G. (2018). Element-specific spectral imaging of multiple contrast agents: a phantom study. *Journal of Instrumentation*, 13(02), T02001.

Perez, A., Poza, M., Fernandez, A., del Carmen Fernandez, M., Mallo, S., Merino, M., and Bou, G. (2012). Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4), 2084-2090.

Popp A, Cleenwerck I, Iversen C,(2010). *Pantoea gaviniae* sp. nov and *Pantoea calida* sp. nov., isolated from infant formula and an infant formula production environment. *Int .J .Syst. Evol.Micr.*;60:2786–92.

Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. (1996). *Microbiology*". 3rd ed., Wm.C. Brown Communication, Inc., Iowa, U.S.A.

Pournaras, S., Maniati, M., Spanakis, N., Ikonomidis, A., Tassios, P. T., Tsakris, A., and Maniatis, A. N. (2005). Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo- β -lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with bla VIM endemicity. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 56(4), 761-764.

R

Raheleh, S., Muhammad, N., Marc-Andre, J., Angela , S., Thomas, R. and Birgit, M.(2015): The genomes of closely related *Pantoea ananatis* maize seed endophytes having different effects on the host plant differ in secretion system genes and mobile genetic elements original research. *Fron. in microb.*, 10: 3389 .

Rakhashiya, P. M., Patel, P. P., Sheth, B. P., Tank, J. G., and Thaker, V. S. (2016). Detection of virulence and pathogenicity genes in selected phytopathovars. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 49(1-4), 64-73.

Rezzonico, F., Smits, T. H., Montesinos, E., Frey, J. E., and Duffy, B. (2009). Genotypic comparison of *Pantoea agglomerans* plant and clinical strains. *BMC microbiology*, 9(1), 204.

Richter, S. S., Sercia, L., Branda, J. A., Burnham, C. A., Bythrow, M., Ferraro, M. J., and Manji, R. (2013). Identification of *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 32(12), 1571-1578.

Roper, M.C. (2011). *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem dwelling pathogen of sweet corn. *Molecular Plant Pathology*. 12, 628-637.

Ryan, K. J. and Ray, C. G. (2004). sherris medical microbiology 4th ed. McGraw-Hill-NewYork. S5-9.

S

Schwarz, S., Hood, R. D., and Mougous, J. D. (2010). What is type VI secretion doing in all those bugs?. *Trends in microbiology*, 18(12), 531-537.

Senanayake, N. P., Thevanesam, V., and Karunanayake, L. (2016). An outbreak of *Pantoea agglomerans* infection in the neonatal intensive

care unit at Teaching Hospital, Kandy, Sri Lanka. *Sri Lanka Journal of Child Health*, 45(1).

Seng P, Abat C , Rolain JM, Colson P ,Lagier JC, Gouriet F, Fournier PE, Drancourt M, La Scola B, Raoult D,(2013): Identification of rare pathogenic bacteria in a clinical microbiology laboratory :impact of matrix-assisted laser desorption ionization time –of flight mass spectrometry: *J. Clin Microbiol* ,51:2182-2194.

Sharma M, Dogra BB, Misra R, Gandham N, Sardar M, . Jadhav S(2012). Multidrug resistant *Pantoea agglomerans* in a patient with septic arthritis-a rare report from India. *Int. J. Microbiol Res*; 4: 263-265.

Schmid, H., Schubert, S., Weber, C., and Bogner, J. R. (2003). Isolation of a *Pantoea dispersa*-like strain from a 71-year-old woman with acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Infection*, 31(1), 66-67.

Schwarz, J. M., Rodelsperger, C., Schuelke, M., and Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature methods*, 7(8), 575.

Siwakoti, S., Sah, R., Rajbhandari, R. S., and Khanal, B. (2018). *Pantoea agglomerans* Infections in Children: Report of Two Cases. *Case reports in pediatrics*, 2018.

Skerman, V., McGowan, V., Sneath, P., Moore, W., and Moore, L. V. (1980). Approved lists. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 30, 225-420.

Stathopoulos, C., Hendrixson, D.R., Thanassi, D.G., Hultgren, S.J., St Geme, J.W., III, Curtiss, R., III. (2000): Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: *an evolving story Microbes Infect.* 2 pp. 1061–1072.

Stewart PS., and Costerton J.W. (2001). "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms". *Lancet*. 358 (9276): 135–8.

Sutherland, I.W.(2001a): Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbio.*, 147:3-9.

Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L.(2011). Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:921–924.

T

Tiwari, S., and Beriha, S. S. (2015). *Pantoea* species causing early onset neonatal sepsis: a case report. *Journal of medical case reports*, 9(1), 188.

Touze T.,(2004). Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* *AcrAB-TolC* multidrug efflux system. *Mol. Microbiol.* 53:697–706.

Truper, H. G. and De Clari, L. (1997). Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition" *Int. J. Syst Bacteriol* 47,908-909.

Turnidge, J. (1995). Epidemiology of quinolone resistance. *Drugs*, 49(2), 43-47.

U

Uche, A. (2008). *Pantoea agglomerans* bacteremia in a 65-year-old man with acute myeloid leukemia: case report and review. *Southern medical journal*, 101(1), 102-103.

Utsab R. Panta, MD1, James A. Joslyn2, Rupal Shah, MD.(2018). *Pantoea agglomerans* bacteremia: A rare case of spontaneous human Infection by a plant pathogen in an immunocompromised host. *Appalachian Student Research Forum.* 170.

V

Vahling-Armstrong, C., Dung, J. K. S., Humann, J. L., and Schroeder, B. K. (2016). Effects of postharvest onion curing parameters on bulb rot caused by *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis* and *Pantoea allii* in storage. *Plant Pathology*, 65(4), 536-544.

Van den Ackerveken, G., Marois, E., and Bonas, U. (1996) Recognition of the bacterial avirulence protein *AvrBs3* occurs inside the host plant cell. *Cell* 87: 1307–1316.

Van Gijsegem F., Genin S. and Boucher C.(1995); hrp and avr genes, key determinants controlling the interactions between plants and gram-negative phytopathogenic bacteria, In: Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases, U S Singh, R P Singh and K Kohmoto (eds.), *Elsevier Science, Tarrytown, NY*, 1; 1: 273-292.

Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Menck, C. F. M., Da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., and Simpson, A. J. (2002). Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annual review of phytopathology*, 40(1), 169-189.

Venincasa, V. D., Kuriyan, A. E., Flynn Jr, H. W., Sridhar, J., and Miller, D. (2015). Endophthalmitis caused by *Pantoea agglomerans*: clinical features, antibiotic sensitivities, and outcomes. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)*, 9, 1203.

Verdonck, L., Mergaert, J., Rijckaert, C., Swings, J., Kersters, K., and De Ley, J. (1987). Genus *Erwinia*: numerical analysis of phenotypic features. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(1), 4-18.

Vipre V, Del Greco A, Golinowski W, Broughton W J and Perret X;(1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in Rhizobium. *Molecular Microbiology*,; 28: 1381-1389.

Volksch B., Thon S., Jacobsen I.D., Gube M. (2009). Polyphasic study of plant- and clinic-associated *Pantoea agglomerans* strains reveals indistinguishable virulence potential . Original Research Article Infection, *Genetics and Evolution*. 9, Iss. 6. – P. 1381–1391.

W

Walcott, R. R., Gitaitis, R. D., Castro, A. C., Sanders Jr., F. H. and Diaz-Perez, J. C. (2002). Natural infestation of onion seed by *Pantoea ananatis* ,causal agent of center rot.*Plant Dis*86,106-111.

Wall, E., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2018). The complex Rcs regulatory cascade. *Annual review of microbiology*, (0).

Walterson, A. M., and Stavrinides, J. (2015). *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 968-984.

Wengelnik K, Van den Ackerveken G, Bonas U. (1996). *hrpG*, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:704–712.

Wieland, C. W.; Lieshou, M.P.; Hoogendijk, A. J. and vander Poll, T. (2011): Host defence during *Klebsiella pneumonia* relies on haematopoietic-expressed Toll-like receptors 4 and 2. *J.Eur Respir.* 37: 848-857.

Winn, J. W., Allen, S., Janda, Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P. and Wood, G. (2006). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology , 6th ed ., Lippincott-raven Publishers .Philadelphia, PP:239-270. USA.

World Health Organization. (2016). **Antibiotic Resistance – Fact Sheet**; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>. [Last accessed on 2017 Mar 08]. Back to cited text no. 1

Y

Yang, B.Y., Gray, J.S. and Montgomery, R. (1996). The structure of stewartan, a capsular polysaccharide produced by *Erwinia stewartii* strain DC283. *Carbohydr. Res.* 296, 183– 201.

Z

Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D., and Storz, G. (1999). OxyR and SoxRS regulation of Fur. *J.Bacteriol.* 181, 4639-43.

Summary

Pantoea spp. one type of opportunistic pathogens opportunistic pathogens and associated with spreading of nosocomial infections worldwide .In this study, a total of 623 samples were collected and distributed as 483 (77.52%) clinical samples of different clinical cases and 140 (22.47%) environmental samples from hospitals in Al-Diwaniyah city including Al-Diwaniyah Teaching Hospital, Feminine and Children Teaching Hospital, Specialist Burns Center, Thoracic Counseling and Public Health Laboratory during the period from October 2017 to June 2018. The clinical samples were collected from patients who were outpatients and inpatients in the previously mentioned hospitals and with different ages for both sexes , then the clinical samples were divided according to their sources as following: 82 urine samples, 23 throat swabs, 49 ear swabs, 83 intravenous arterial puncture samples of dialysis patients, 27 stool samples, 31 pus swabs of inflamed surgeries, 44 wounds swabs, 70 burns swabs and 74 sputum samples . Environmental samples were included 30 ground swabs, 40 medical instruments swabs, 20 medical devices swabs, 30 walls swabs, 20 bed swabs.

The primary results of culture and biochemical tests revealed that 24 isolates were *Pantoea* species. The diagnosis was confirmed by using API 20E system and polymerase chain reaction technique.

The current study recorded the occurrence of two pathogenic species of *Pantoea* genus in hospitals of Al- Diwaniyah city, the first species was *Pantoea agglomerans* (2.27%) which showed higher percentage than second species *Pantoea calida*.

This study found that the incidence of *Pantoea* species infection was increased in the age group (41-50) years (36.84%) and the rate of males was higher (57.89%) than females (42.10%).

The antibiotics susceptibility test was performed to 24 isolates of *Pantoea* species in this study against 21 antibiotics which belong to 12 class by using diffusion method. The *Pantoea* isolates showed high resistance rate to piperacillin (75%) ,ticarcillin- calviolanac acid (87.5%), amoxicillin-clavulanic acid (100%). The isolates also showed high resistance to third generation cephalosporins drugs including ceftazidim (100%), ceftriaxone (87.5%) and aztreonam (91.6%).

Summary

With regard to carbapenim, meropenim has been shown to be effective toward all *Pantoea* isolates (100% sensitive). The isolates had low resistance to amikacin (8.3%).

The results of the present study also revealed that *Pantoea* isolates were resistant to different antibiotics belong to different classes making them multidrug resistant. These isolates recorded different types of multi-resistance type XDR (Extensive Drug Resistance) after resistance to all types of antibiotics, except one class or two (54.1%). The bacteria showed multidrug resistant (MDR) resistance after resistance to three or more of antibiotics (29.1%). In addition, these bacteria recorded a resistance for all antibiotics ratio resistance (PDR) (Pandrug resistance) (16.6%).

All isolates of *Pantoea* were tested for the incidence of virulence genes (*rscB*, *hpaA*, *acrAB* ,*avrXacE2*, *avrXacE1*, *hrpG*, *hrc*, *rscA*) by using polymerase chain reaction (PCR) technique (Monoplex).

The *hrpG* gene was showed the highest incidence rate among isolates whereas 19 isolates (79.16%) harbored it, followed by *hrc* gene existed in 17 isolates (70.83%), *rscA* gene existed in 13 isolates (68.42%) and *avrXacE2* gene existed in 13 isolates (54.16%) while the virulence genes (*avrXacE1*, *rscB*, *hpaA*, *acrAB*) were not existed among *Pantoea* isolates. The current study also found that the bacteria *Pantoea* opportunistic pathogen cause to human infections , despite the scarcity of presence in the hospitals of Al-Diwaniyah city of, such as urinary tract infections and digestive tract infections and respiratory infections as this bacteria resistant to common antibiotics use.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education & Scientific Research
University of Al-Qadisiyah
College of Science
Department of Biology



**Prevalence of *Pantoea agglomerans*
and *Pantoea calida* Isolated from different sources
in Al- Diwaniyah Hospitals City**

**A thesis
Submitted to The Council of The College of Science
University of Al-Qadisiyah as Partial
Fulfillment of The Requirements for The Degree
of Master of Science in
Biology / Microbiology**

**By
Athraa Abdulamir Abdulrab
B. Sc.Biology/ Al-Qadisiyah University (2016)**

**Supervision by
Professor
Dr. Syoof khowman Alwan**

2019 A.D

1440 A.H