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

# التحري عن بعض عوامل الضراوة التي تنتجها بعض انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام

بحث تخرج مقدم إلى

مجلس كلية التربية/ جامعة القادسية وهو جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة

من قبل

سيف جواد كريم العذاري

*أشراف*

*الدكتورة*

*احلام علي*

ابريل / 2019 م

شعبان / 1440هـ

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا﴾

سورة طه (114)

# شكروعرفان

قال رسول الله صلى الله عليه وسلم
"من لم يشكر الناس لم يشكر الله "
صدق رسول الله صلى عليه وسلم

الحمد لله على احسانه والشكر له على توفيقه وامتنانه ونشهد ان لا الله الا الله وحده لا شريك له تعظيما لشانه ونشهد ان سيدنا ونبينا محمد عبده ورسوله الداعي الى رضوانه صلى الله عليه وعلى اله واصحابه واتباعه وسلم

بعد شكر الله سبحانه وتعالى على توفيقه لنا لاتمام هذا البحث المتواضع أتقدم بجزيل الشكر الى الوالدين العزيزين الذين اعانوني وشجعوني على الاستمرار في مسيرة العلم والنجاح واكمال الدراسة الجامعية والبحث ; كما أتوجه بالشكر الجزيل الى من شرفتني بأشرافها على مذكرة بحثي الدكتورة أحلام علي التي لن تكفي حروف هذه المذكرة لايفائها حقها بصبرها الكبير علي ولتوجيهاتها العلمية التي لاتقدر بثمن والتي ساهمت بشكل كبير في إتمام واستكمال هذا العمل ; الى كل أساتذة قسم علوم الحياة كما أتوجه بخاص شكري وتقدري الى كل من ساعدني من قريب او بعيد على انجاز واتمام هذا العمل

"رب اوزعني ان اشكر نعمتك التي انعمت علي وعلى والدي وان اعمل صالحا ترضاه وادخلني برحمتك في عبادك الصالحين "

## الخلاصة:

جمعت 50 عينة من مرضى بمختلف الاعمار من الراقدين والمراجعين في مستشفى الديوانية التعليمي في مدينة الديوانية والذين يعانون من حالات الاسهال والتهاب المجاري البولية والتهاب الحروق. وقد تم عزل 70 عزله بكتيريه شخصت كالاتي:

34 عزله (23%) تعود لـ *Escherichia coli*، 26 عزلة (18%) تعود لـ *Klebsiella pneumoniae*، ، 27 عزلة (18%) تعود لـ *Salmonella typhimurium* 10 عزلات (7%) تعود لـ *Shigella dysenteria*، ، 39 عزلة (27%) تعود لـ *Pseudomonas aeruginosa*، تم دراسة واختبار قابلية كافة العزلات على مقاومة مضادات الامبسلين، السيفالاكسين، السيفوتاكسيم، الكلورامفنكول، الكانامايسين، السبروفلوكساسين، حامض النالدكسك، الجنتامايسين، الارثرومايسين، الريفامبسين، الستربتومايسين، التتراسايكلين، وذلك باستخدام الاقراص الحاوية على التركيز القياسي لهذه المضادات، اظهرت نتائج الاختبار قابلية معظم العزلات على مقاومة مضادات (الامبسلين، السيفالاكسين) بينما تباينت مقاومة بقية المضادات الاخرى. اشارت نتائج اختبار العوامل المرتبطة بضراوة البكتيريا الى ان كافة العزلات منتجة لانزيم البيتا–لاكتاميز بنسبة (100%) بينما كانت (38%) منتجة للسايدروفور و (42%) منتجة للهيمولايسين. انتخبت 6 عزلات والتي تمثل جميع الاجناس البكتيريه التي شملتها الدراسة والتي تتميز بمقاومة متعددة لمعظم مضادات الحيوية وحساسية مضاد الريفامبسين.

## المقدمة :-

تعد العائلة المعوية (*Enterbacteriaceae*) اكبر مجموعة تضم اجناسا مختلفة من الاجناس البكتيرية السالبة لصبغة كرام. قد تعيش اجناس هذه العائلة بصورة طبيعية (Normal flora) في امعاء الانسان والحيوان. الا ان بعض اجناس هذه العائلة قد تكون ممرضة انتهازية (apportunistic pathogenic). ومن اهم اجناس هذه العائلة والتي تم عزلها من الحالات المرضية (*Escheriachia*، *Shigella*، *Salmonella*، *Enerobacter*، *Klebsiella*، *Serratia*، *Proteus*).

اما عائلة الزوائف (*Pseudomonadaceae*) فتنتشر اجناس هذه العائلة في البيئة مثل الرمال والماء بشكل واسع، ولكن بعض اجناس هذه العائلة مرضية يمكن ان تحدث الخمج اذا حدث ضعف في دفاعات المضيف، ومن اهم الاجناس التي تم عزلها من الاصابات البكتيرية المختلفة *Pseudomonas aeruginosa* حيث تنتشر في بيئة المستشفيات ويمكن ان تحدث الاصابة بهذه البكتيريا في حالة توفر ظروف ملائمة لها (Jaweta *et al* 1998).

لقد اثبتت الدراسات ان الجينات المسؤولة عن صفة مقاومة مضادات الحيوية قد تكون بلازميدية الموقع سميت بلازميدات المقاومة (R-Plasmid)، بالاضافة الى وجودها على الكروموسوم ( Poriel *et al*; 2000).

ان ظهور البلازميدات مرتبطا ارتباطا وثيقا بتطور مضادات الحيوية وهذا ما اكدته الدراسات الوبائية الحديثة (Feria *et al*, 2002) لقد امكن التعرف على الية انتقال جينات المقاومة بين خلية بكترية واخرى بعد اكتشاف الية التبادل الوراثي.

ومن بين اهم اساليب المقاومة التي تتبعها البكتيريا هي انتاج انزيمات مثل Beta-Lactamase قادر على كسر حلقة Beta-Lactam للمضادات مما يجعلها غير قادرة على تادية عملها. لقد اظهرت الدراسات الحديثة تطورا كبيرا في شكل ونوع انزيم Beta-Lactamase مع تطور

مضادات الحيوية وهذا يعني حدوث طفرات وراثية في الجينات المسؤولة عن انتاج هذا الانزيم تجعل البكتيريا اكثر حصانة ضد مضادات متعددة لذلك وجب تجربة مثبطات هذا الانزيم (Bonomo *et al*., 2000).

لقد تبين من خلال دراسات عديدة ان تاثير المثبطات يرتبط بنوع معين من الانزيم لذا يمكن من خلال ذلك تصنيف انزيم Beta-Lactamase بعد معرفة الاساس الجزيئي لانتاج هذا الانزيم ( Ambler *et al*., 1991).

الهدف من الدراسة:-

1. التعرف على مقاومة بعض اجناس البكتيريا السالبة لصبغة كرام المعزولة محليا لانواع مختلفة من مضادات الحيوية.
2. الكشف عن بعض عوامل الضراوة الاخرى مثل انتاج انزيم البيتا – لاكتاميز والهيمولايسين والسايدروفور.
4. دراسة تاثير مثبطات انزيم البيتا – لاكتاميز.

# طرائق العمل

**التعقيم Sterilization:**

**1. التعقيم بالحرارة الرطبة (Moist Heat Sterilization):**

تعقم الاوساط الزراعية ما عدا وسط (اكار السالمونيلا–شكلا) s.s agar وبعض المحاليل والدوارئ باستعمال الموصدة (Auto Clave) عند درجة حرارة 121م وتحت ضغط 15 باوند/انج مدة 15 دقيقة.

**2. التعقيم بالحرارة الجافة (Dry-Sterilization):**

تعقم الزجاجيات والادوات المعدنية بالفرن الكهربائي (Oven) تحت درجة حرارة 180-200 م مدة ساعتين.

**3. التعقيم بالترشيح (Filter Sterilization):**

تم تعقيم الانزيمات والسكريات ومحاليل مضادات الحيوية وبعض المحاليل التي تتاثر بالحرارة بوساطة مرشحات دقيقة قطر فتحتها (0.22 و 0.45) مايكروميتر.

**جمع النماذج وعزل البكتيريا**: (Holt *et al.*, 1994)

**1. عينات الادرار:**

جمعت عينات الادرار من المراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي في مدينة الديوانية 0 جمعت العينات في اوعية زجاجية معقمة تم زرع هذه العينات في اطباق محتوية على وسط اكار الدم ونقلت بعد ذلك عينات من المزرعة بوساطة الـ Loop إلى اطباق اكار الماكونكيMacConkyAgar ووسط اكار الايوسين ازرق المثيل Eosin-Methyleneblue-EMB لعزل البكتيريا السالبة لصبغة كرام.

**2. عينات الخروج:**

جمعت عينات الخروج من المرضى المراجعين مستشفى الديوانية التعليمي ولقد جمعت العينات في اوعية بلاستيكية معقمة

.

**1–فحص فوكس–بروسكور (Voges-Proskaur test-VP):**

حضر نفس الوسط السابق (MR-VP) ولقح بالبكتيريا المراد اختبارها وحضن مدة (18-24) ساعة وبدرجة حرارة 37 م ثم اضيف إلى الوسط قطرة واحدة من كل كاشف (المحلول الاول– المحلول الثاني)( وترك الوسط لمدة 10 دقائق. يدل تغير لون الوسط إلى اللون الاحمر على ايجابية الفحص.

**2 –اختبار استهلاك السترات (Citrate Utiliziation Test):**

حضر وسط اختبار استهلاك السترات (Simmon Citrate) حسب تعليمات الشركة المصنعة ولقح بالبكتيريا وحضن الوسط مدة (18-24) ساعة وبدرجة حرارة 37 م. ظهور نمو وتحول لون الوسط من الاخضر إلى الازرق دليل على النتيجة الموجبة اي قدرة الجراثيم على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون واملاح الامونيوم كمصدر وحيد للنتروجين.

**3– اختبار النمو على الوسط TSI (Triple sugar Iron medium):**

حضر الوسط الجاهز TSI حسب تعليمات الشركة المصنعة ولقح الوسط بالبكتيريا المراد اختبارها بالتخطيط عل السطح ثم الطعن إلى القعر ثم حضن الوسط بدرجة حرارة 37 م مدة 24 ساعة، لوحظت التغييرات في الوسط من خلال تغيير لون الوسط او تكون غاز كبريتيد الهيدروجين ($H_2S$) او تكون راسب اسود من كبريتيد الحديدوز ($Fe_2S$) في قعر الانبوبة.

**4. فحص الاوكسيديز (Oxidase test):**

اخذ جزء من مستعمرة نامية على وسط الاكار المغذي مدة ساعة ووضع على ورقة ترشيح ثم اضيفت لها قطرة من كاشف،تكون لون بنفسجي غامق للدلالة على ان العزلة موجبة لهذا الفحص اذ تظهر النتيجة الموجبة خلال 30-60 ثانية.

**5 –اختبار انتاج الكاتاليز (Catalase Test):**

تم اجراء الاختبار بوضع جزء من النمو الجرثومي على شريحة زجاجية نظيفة ثم اضيفت له قطرة من بيروكسيد الهيدروجين، ظهور الفقاعات دليل على قابلية الجراثيم لانتاج انزيم الكاتاليز.

**6. فحص اليوريز (Urease test):**

لقح الوسط المحضر في الفقرة (2-1-7-1) بالبكتيريا وحضن مدة (18-24) ساعة وبدرجة 37 م. يدل تغيير لون الوسط إلى الوردي على ايجابية الفحص.

**ج. فحص قابلية البكتريا على الحركة (Motility test):**

لقح وسط الحركة (Motility media) بالبكتيريا بشكل طعنه (Stab) ثم حضن الوسط مدة (18-24) ساعة وبدرجة حرارة 37 م. يدل انتشار النمو حول مكان الطعنة على ان البكتيريا متحركة اما اذا كان النمو في مكان الطعنة فقط فيعني ان البكتيريا غير متحركة.

**حفظ وادامة العزلات:**

**أ. الحفظ قصير الامد (اسبوع إلى اسبوعين):**

نميت العزلات على وسط اكار الماكونكي ووسط الاكار المغذي بدرجة حرارة 37 م مدة 24 ساعة ثم حفظت في الثلاجة (4 م).

**ب. الحفظ لمدة ثلاثة اشهر:**

نميت العزلات على الوسط المغذي الصلب مدة (18-24) ساعة وبدرجة حرارة 37 م داخل انابيب صب الوسط فيها بشكل مائل ثم حفظت في الثلاجة بدرجة 4 م. تتم عملية الادامة لهذه العزلات دوريا كل (3) اشهر وذلك بزرعها في الوسط المغذي السائل لتنشيطها ومن ثم اعادة زرعها على وسط زرعي سائل جديد.

**ج. الحفظ طويل الامد: (Karach *et al.*, 1995)** لقد تم حفظ العزلات بدرجة حرارة (−20 م)، بعد تنميتها في وسط لوريا السائل (Luria.Bertani media) مدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م ثم اضيف لها 15% كليسرول المعقم.

**اختبار الحساسية لمضادات الحيوية:**

تم استعمال طريقة Kirby Bauer المذكورة في (Vandepitte *et al.*, 1991; Bauer *et al.*, 1996) للتعرف على مدى حساسية العزلات البكتيرية التي هي قيد الدراسة باستعمال مجموعة من اقراص مضادات الحيوية وكما يأتي:

حضرت اطباق وسط اكار مولر هنتون ووضعت بدرجة حرارة الغرفة قبل الاستعمال ثم تم تحضير عالق جرثومي بأخذ عدة مستعمرات معزولة نامية على وسط الاكار المغذي مدة 18 ساعة ووضعت في المحلول الفسلجي ومزجت جيدا بالمازج مدة 15 ثانية ثم ضبط العالق الجرثومي بتركيز $10^8$x1.5 وحدة مكونة للخلية بالمليمتر الواحد كذلك باستعمال انابيب ماكفرلاند (Mc farland tubes). بعدها تم تلقيح اطباق وسط اكار مولر هنتون وذلك بأخذ مسحة قطنية معقمة ووضعت في عالق اللقاح ثم ضغطت على جوانب الانبوب للتخلص من اللقاح الزائد. مررت المسحة القطنية على الطبق ثلاث مرات مع تدوير الطبقة بزاوية 60 في كل مرة بعدها مررت المسحة على حافة الطبق. وضعت اقراص مضادات الحيوية بعد 5 دقائق من التلقيح باستعمال ملقط معقم وبواقع (4-5) اقراص لكل طبقة ثم حضنت الاطباق مدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م قيست منطقة التثبيط باستعمال المسطرة وتمت مقارنتها مع الجداول القياسية (3) *E. coli* ATCC 27853 ،

**الجدول( 1)اقراص مضادات الحيوية المستعملة في اختبار الحساسية وتركيزها**

| مضادات الحيوية | | الرمز | تركيز المضاد Mg/ قرص | الشركة المنتجة |
|---|---|---|---|---|

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| امبسلين | Ampicillin | Ap | 10 | Oxoid |
| سيفوتاكسيم | Cefotaxime | CTX | 30 | BioMerieux |
| سيفالكسين | Cephalexin | CP | 30 | BioMerieux |
| كلورامفينكول | Chloramphenicol | Cm | 30 | Oxoid |
| سبروفلوكساسين | Ciprofloxacin | Cip | 5 | الرازي |
| الايرثرومايسين | Erthromycin | Erth | 15 | BioMerieux |
| جنتمايسين | Gentamicin | Gen | 30 | Oxoid |
| كانامايسين | Kanamycien | Km | 30 | الرازي |
| حامض النالدكسك | Naldixic acid | Nal | 30 | الرازي |
| ريفاميسين | Rifampicin | Rif | 5 | الرازي |
| ستربتومايسين | Streptomycin | Sm | 10 | Oxoid |
| تترا سايكلين | Tetracyclin | Tet | 30 | BioMerieux |

**الجدول اقطار مناطق التثبيط القياسية (NCCLS; 1990)**

| مضاد الحيوية والرمز | تركيز المضاد | حساس | معتدل الحساسية | مقاوم |
|---|---|---|---|---|
| امبسلين (Ap) Ampicillin | 10 | ≥ 17 | 14-16 | ≤ 13 |
| سيفوتاكسيم (CTX) Cefotaxime | 30 | ≥ 23 | 15-22 | ≤ 14 |
| سيفالاكسين (Cp) Cephalaxin | 30 | ≥ 18 | 15-17 | ≤ 14 |
| كلورافينكول (Cm) Chloramphenicol | 30 | ≥ 18 | 13-17 | ≤ 12 |
| سبروفلوكساسين (Cip) Ciprofloxacin | 5 | ≥ 21 | 16-20 | ≤ 15 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| الايرثرومايسين Erythromycin (Erth) | 15 | ≥ 18 | 14-17 | ≤ 13 |
| جنتاميسين Gentamicin (Gen) | 30 | ≥ 16 | 13-15 | ≤ 12 |
| الكانامايسين Kanamycin (Km) | 30 | ≥ 18 | 14-17 | ≤ 13 |
| حامض النلداكسك Naldixicacid (Nal) | 30 | ≥ 19 | 14-18 | ≤ 13 |
| ريفامبسين Rifampicin (Rif) | 5 | ≥ 24 | 17-23 | ≤ 16 |
| ستروبتومايسين Streptomycin (Sm) | 10 | ≥ 15 | 12-14 | ≤ 11 |
| تترا سايكلين Tetracyclin (Tet) | 30 | ≥ 19 | 15-18 | ≤ 14 |

**الكشف عن انزيم البيتا – لاكتاميز** (Lee *et al*., 1981)**:**

1. نميت العزلات قيد الدراسة على وسط الاكار المغذي وحضنت مدة (18-24) ساعة وتحت حرارة 37م.
2. تم اختيار مستعمرة بكتيرية مفردة وتمت تنميتها في (5 مليلتر) من وسط مستخلص نقي القلب والدماغ وحضنت في الحاضنة الهزازة مدة (18-24) ساعة وتحت درجة حرارة 37م.
3. تكسر بعدها الخلايا بواسطة Sonicator.
4. ثقب الوسط بوساطة الثاقب المعدني.
5. اضيف (5) mg/ml من مضاد الامبسلين و 10 الى 20 mg/ml من الانزيم في الثقوب المحضرة في الفقرة السابقة.
6. تحضن الاطباق في الثلاجة لمدة ساعة وتقرا النتائج بعد ذلك، البقع عديمة اللون تعني نتيجة (+) اما عدم تكون البقع فيعطي نتيجة (−).

**اختبار قابلية البكتيريا على انتاج الهيمولايسين:**

(Cappuccino *et al.*, 1987)

زرعت العزلات المراد معرفة قابليتها على تحليل الدم على وسط اكار الدم( وحضنت الاطباق مدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م مع وجود سيطرة موجبة وسالبة. تمت قراءة النتائج بعد ذلك والتي تعتمد على ظهور مناطق تحلل (Hemolysis) تحيط بمستعمرات العزلات للبكتيريا المحللة للدم.

**اختبار قابلية العزلات على انتاج السا يدروفور:**

(Johnson *et al.*, 1988)

تم اجراء الاختبار باستخدام وسط الحد الادنى للنمو (M9) المضاف اليه 2,2 dipyridyl (200) مايكرومول على وفق ما اشار اليه (Nassif *et al.*, 1987). صب الوسط في الاطباق المعقمة وبعد تصلبها مضت مدة (24) ساعة وبدرجة حرارة 37 م للتأكد من عدم تلوثها، ثم بعد ذلك زرعت الاطباق بالعزلات المراد معرفة قابليتها على الانتاج ثم حضن بدرجة حرارة 37 م مدة 24 ساعة مع وجود سيطرة موجبة وسالبة. سجلت النتائج على اساس وجود النمو (+) او عدمه (−).

**استخلاص انزيم البيتا لاكتاميز Extraction of Beta- Lactamase:**

**(Collee *et al.*, 1996)**

1. نميت العزلات قيد الدراسة على وسط الاكار المغذي وحضنت من (18-24) ساعة وتحت درجة حرارة 37 م.
2. تم اختيار مستعمرات بكتيرية مفردة وتمت تنميتها في 50 مليلتر من وسط مستخلص نقي القلب والدماغ وحضنت في الحاضنة الهزازة مدة (18-24) ساعة وتحت درجة حرارة 37 م.
3. تم نقل المزروع البكتيري إلى انابيب خاصة بجهاز النبذ المركزي المبرد حيث نبذ المزروع (6000 دورة/ دقيقة) مدة (30 دقيقة).
4. بعد الحصول على راسب الخلايا اضيف 5 مليلتر من محلول غسل الخلايا المحضر في الفقرة (1-6-6-2).

5. كسرت الخلايا بعد ذلك بوساطة جهاز الامواج فوق الصوتية (Sonicator) مدة (60 ثانية) متقطعة على ثلاث مدد كل فترة (20 ثانية).
6. تم بعد ذلك نبذ الخلايا مركزيا بوساطة جهاز النبذ المركزي المبرد (6000 دورة/ دقيقة) مدة نصف ساعة.
7. اهمل الراسب واخذ الراشح ووضع في انابيب ابندورف وحفظ في درجة حرارة (4 م) لحين استخدامه في التجارب.

**دراسة مثبطات انزيم البيتا لاكتاميز:**

اتبعت طريقة (Shaokat, 1986) في دراسة تاثير مثبطات انزيم البيتا- لاكتاميز وكما يأتي:

1. ثقب الوسط( بوساطة الثاقب المعدني عدد من الثقوب حسب الحاجة.
2. اضيف (5) mg/ml من الانزيم في احدى الحفر ثم اضيف اليه (10-20) mg/ml من محلول الامبسلين Ampicillienثم اضيف (0.7) mg/ml من المحلول المثبط المراد تجربته مثال على ذلك الـ Clavulanic acid (0.5) mg/ml والـ 100/mM EDTA.

## النتائج والمناقشة:

### عزل وتشخيص البكتيريا:

**Isolation and characterization of Bacteria**

تم تشخيص البكتيريا السالبة لصبغة كرام اعتمادا على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية الواردة في (Holt *et al*., 1994) لقد تم تشخيص (146) عزله بكتيرية عزلت من عينات الخروج والادرار والحروق. وقد اظهرت نتائج الاختبار الكيموحيوي وباستخدام نظام (Api 20) والاختبارات الكيموحيوية:-

**جدول (2) عدد العزلات ونسبتها المئوية**

| الجنس | عدد العزلات | النسبة المئوية % |
|---|---|---|
| *Escherichiea coli* | 34 | 23 |
| *Klebsiella pneumonia* | 26 | 18 |
| *Klebsiella oxytoca* | 5 | 4 |
| *Salmonella typhimurium* | 27 | 18 |
| *Shigella dysenteria* | 10 | 7 |
| *Shigella sonni* | 2 | 1 |
| *Sarrtia marcescens* | 3 | 2 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 39 | 27 |

### اختبار الحساسية لمضادات الحيوية:

تم اجراء فحص الحساسية لجميع العزلات قيد الدراسة والمتكونة من ستة اجناس وهي:

*E coli,* *Klebsiella sp.,*
*Serratia marcescens,* *Shigella sp.,*

*Salmonella sp.,* *Pseudmonas aeruginosa,*

وباستخدام طريقة الاقراص لعدد من مضادات الحيوية المدرجة في الجدول (2) كذلك انتخب عدد من السلالات المقاومة لاكبر عدد من مضادات الحيوية لقياس التركيز المثبط الادنى (MIC) لقد اظهرت العزلات بشكل عام مقاومه عالية ضد مضادات الامبسلين، والسيفالوسبورين، وهي من مضادات (البيتا-لاكتام) ويمكن ان يعزى ذلك الى التطور الحاصل في انزيم البيتا- لاكتاميز نتيجة حدوث طفرات في الجين المسؤول عن انتاج هذا الانزيم (Poriel *et al*., 2000). ان الجينات المشفرة لانتاج انزيم البيتا – لاكتاميز قد تكون محمولة على البلازميد او الجينات القافزة بالاضافة إلى كونها محمولة على الكروموسوم، وهذا يؤدي إلى انتشار المقاومة بين الاجناس البكتيرية المختلفة (Elhag *et al*., 1991) اما بالنسبة لمقاومة المضادات الاخرى فقد تكون ناتجة من الطفرات او التغيرات الحاصلة في السطح الخارجي للخلية البكتيرية او بسبب حصول تحويرات في rRNA (Rasmussen *et al*., 1999).

**العوامل المرتبطة بضراوة البكتيريا:**

ان حدوث الاصابة البكتيريه يعود الى امتلاك البكتيريا لعدد من عوامل الضراوة التي يكون بعضها ذا تاثير مباشر والاخر يكون غير مباشر، وتسهم هذه العوامل في جعل البكتيريا المرضية قادرة على تجاوز الخطوط الدفاعية في جسم المضيف وكذلك تثبيت البكتيريا في النسيج المصاب والعمل على تخريبه تختلف عوامل الضراوة من حيث وجودها فبعضها يكون ضمن التركيب الخلوي وبعضها الاخر تقوم البكتيريا بافرازه الى خارج الخلية مثل الانزيمات والذيفانات المختلفة.

**انتاج انزيم البيتا-لاكتاميز Beta-Lactamases:**

تتميز بعض العزلات البكتيريه المرضية السالبة لصبغة كرام بانتاج مدى واسع من انزيمات البيتا-لاكتاميز، ولهذه العزلات القابلية على احداث الخمج، وتتواجد في المستشفيات وبشكل خاص في وحدات العناية المركزية والامراض المزمنة، ومنها تنتشر الى اقسام المستشفى الاخرى (Cancia *et al*., 1994). يوجد اكثر من مئتي نوع مختلف من انزيمات البيتا-لاكتاميز تنتجه الاسرة المعوية وانواع بكتيرية مرضية اخرى، ان تنوع فعالية انزيمات البيتا-لاكتاميز المنتجة من قبل اليكتريا واتساعها قد يعزى الى حدوث

الطفرات (Hujer *et al.*, 2001). لقد اظهرت النتائج ان جميع العزلات المقاومة لمضادات الحيوية من نوع البيتا–لاكتام هي عزلات منتجة لانزيم البيتا–لاكتاميز.

**انتاج الهيمولايسين Heamolysin:**

ينتمي الهيمولايسين الى مجموعة البروتينات المحللة لكريات الدم الحمر(الزعاك; 1994). يرتبط انتاج الهيمولايسين على الاغلب بالعزلات المرضية سيما وانه يمثل عاملا من عوامل ضراوة البكتيريا ( Nassif and Sansonetti; 1987). يؤدي الهيمولايسين دورا مهما في تزويد البكتيريا بما تحتاجه من الحديد كذلك يعمل الهيمولايسين على تحليل كريات الدم البيض وبذلك فهو يسهم في اضعاف وسائل الدفاع لدى المضيف (Collee *et al.*, 1996). لقد اظهرت النتائج الجدول (3-2) عدم قدرة جميع العزلات المرضية على انتاج الهيمولايسين. وقد اشارت بعض الدراسات الى ان الهيمولايسين لا يعد ذو اهمية كبيرة في البكتيريا المسببة للاصابة المعوية وذلك لصعوبة اختراقها للانسجة في حين يكون للهيمولايسين دور مهم في حالة غزو البكتيريا للانسجة تحت المخاطية لتصل الى الدم (Prescott; 1999).

**السا يدروفور Sidrophore:**

ان احد العناصر الضرورية لنمو البكتيريا هو الحديد، غير ان الحديد بشكله الحر غير متوفر في البيئة الطبيعية بل يوجد بشكل رئيس ضمن الخلايا الجسمية او يكون مرتبطا مع البروتينات عالية الاتحاد مثل الترانسفرين (Transferrin) في المصول واللاكتوفيرين (Lactoferrin) في الافرازات الجسمية. ان هذه البروتينات غير ميسرة في المضيفات الطبيعية وبهذا لن تجد البكتيريا المهاجمة ما تحتاجه ما لم تطور اليه تستطيع بوساطتها استهلاك الحديد والنمو واحداث الخمج (infection) (الزعاك;1994). وانتاج السايدروفور واحدة من اهم اليات توفير الحديد للخلية البكتيرية، والسايدروفورات عبارة عن مواد كلابية تسحب الحديد من مركباته، وهي ذات اوزان جزيئية واطئة ولها الفة عالية جدا للحديد حيث تفرز من قبل الخلية البكتيرية الى مستقبلات خاصة او في البيئة التي تعيش فيها وبعدها يرجع الى داخل الخلية. تمتاز البكتيريا السالبة لصبغة كرام في تخليق السايدروفور على عكس البكتيريا الموجبة وبخاصة المكورات التي ليس لها القابلية على تصنيعه (Payne; 1988)، لذلك فان السايدروفور يعد عامل ضراوة مساند للبكتيريا

المرضية لمقاومته للبروتينات الناقلة للحديد داخل جسم المضيف وبالتالي الحصول على الحديد الضروري لنمو خلايا البكتيريا. والجدول (3-2) يوضح ان العزلات المنتجة للهيمولايسين هي عزلات غير منتجة للسايدروفور وبالعكس.

**جدول (3)عوامل الضراوة المنتجة في الانواع البكتيرية قيد الدراسة**

| العزلات المرضية | العدد الكلي | عدد العزلات المنتجة | | |
|---|---|---|---|---|
| | | الهيمولايسين | السايدروفور | البيتا– لاكتاميز |
| *Escherichiea coli* | 34 | 8 | 26 | 34 |
| *Klebsiella pneumonia* | 26 | 12 | 14 | 26 |
| *Klebsiella oxytoca* | 5 | 1 | 4 | 5 |
| *Salmonella typhimurum* | 27 | 1 | 27 | 27 |
| *Shigella dysenteria* | 10 | 7 | 3 | 10 |
| *Shigella sonni* | 2 | 7 | 2 | 2 |
| *Serratia marcescens* | 3 | 3 | 2 | 3 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | 39 | 30 | 9 | 39 |
| **النسب المئوية للعزلات المنتجة لعوامل الضراوة** | | **42%** | **58%** | **100%** |

## المصـــــادر العربية:

**الزعاك، علي عبد الرحمن.** (1994). البايلوجي الجزيئي لضراوة البكتيريا الطبعة الاولى، جامعة بغداد.

**الجيلاوي، رباب عمران راضي.** (2002). دراسة وراثية لصفة اللزوجة في بكتيريا الكلبسيلا *Klebsiella Pnumoniae*. رسالة دكتوراه كلية العلوم جامعة بغداد.

## *References:*


**Ambler, R.P.**; Coulson A.F. and Frere, J.M. (1991). A Standard numbering system for class A.B-Lactamase. Biochem. J. 276: 269-270.

**Arakawa, Y.**; Shibata, N.; Shibayama, K.; Kurokawa, H.; Yagi, T.; Fujiwara, H. and Goto, M. (2000). Convenient test for screeing Metallo-Beta-Lactamase-Producing Gram Negative Bacteria by Using Thiol compunds. Clinical Microbiol. J. 38: 40-43 (Internat).

.

**Baron, E.J**. and Finegold, S.M. (1990). Harding clinical specimens for microblogyical studies in. Diagnostic Microbiology. 8 th, PP. 177,

**Bauer, A.W.**; Kirby, W.M.; Sheeis, J.C. and Turch, A. (1996). Antibiotic Susceptibility testing by standardized single disk method-American. J. clin. Pathol. 45: 493-496.

.

**Bonomo, R.A.**; Fiorentino, M.; Salvatore, A.; Jacobs, M.; Morrisey, A.; Whalen, C. and salata, R.A. (2000). Enterobacter species Bactermia Factors predictive of Mortality at a Tertiary care institution. J. infectious Disease in clinical. 9: 123-127.

**Brenner, D.J.**; steigerwalt, A.G. and fanning, G.R. (1985). Differentiation of Enterobacter aerogenes from Klebsiella by deoxyribonucleic acid reassociation. International J. Systematic Bacteriology. 22: 193-200.

**Bush, K.**; Jacoby, G.A. and Medeiros, A. (1995). Functional classification scheme for Beta-Lactamase and its carretation with Molecular structures. J. Antimierob. Agents chemeth. 390: 1211-1233.

**Canica, M.M.**; Barthelemy, M.; Gilly, L.; Krish anamoorty R. and paul, G. (1994). Properties of IRT-14 (TEM-45), anewly characterized mutant of TEM-Type Beta-Lactamases. J. Antimicrob. Agents. Chemother. 41: 374-378.

**Collee, J.G.**; Miles, R.S. and Watt, B. (1996). Practicle Medical Microbiology. Churchill. Living Stone, London.

**Crichton, P.B.**; and old, D.C. (1990). Salmonellae of Serotypes Gallinarum and Pullorum grouped by biotyping and fimbrial-gene proding.J. Medical Microbioli. 32: 142-152.

**Crichton, P.B.**; Logan, J.M. ; Old, D.C. (1993). Aminiaturized biotyping system for strain discrimin in Escherichia Coli. J. Epidemology and infection. 111: 81-88.

**Delaire, M.**; Labia, R.; Samama, J.P. and Masson, J.M. (1992). Site directed mutagenesi sit of Escherichia Coli TEM-1 beta- Lactamase. J. Biol. Chem, 267: 20600-20606.

**Domenico, P.**; Schwatz, S. and cunha, B. (1989). Reduction of capsular polysaccharide production in Klebsiella Pneumoniae by sodium salicylate. J. infect. Immun. 57: 3778-3782.

**Duguid, J.P.** and Old, D.C. (1980). Adhesive properties of Entro bacteriaceae. In. Beachey, E.H. (ed) Bacterial adherence (Recpector and Recognition series B, Vol 6) champan and hall London, PP 187-217.

**Elhag**, K.M. Reed Hassan, M. (1991). The Prevalence of antibiotic resistance among gram negative bacilli from intensive care units in Oman. Sau. Med. J. 20 (5): 373-377.

**Gerdes, K.**; Rasmussen, P.B. and Molin, S. (1986). Uniguetype of maintenance function postegregational killing of plasmid free cells. Proe. Natl. Acad. Sci. Use. 38: 3116-3120.

**Govan, J.R.W.**; Brown, P.H. and Maddison, J. (1993). Evidence for transmission of pseudomonas cepacia by social contact in cytic fibrosis Lancet. 342: 15-19.

**Gross, R.J.** (1991). The pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhoea. Review in Medical Microbiology. 2: 37-44.

**Harold, C.** and Neu, M.D. (1985). Beta - Lactamase inhibiton: therapeutic Adrances. The American Journal of Medicine. 79: 1-12.

**Haw Key** and Peter, M. (1998). The origins and molecular basis of antibiotic resistance. British medical Journal. 317: 657-664.

**Henquell, C.**; chanal, C.; Sirot, D.; Labia, R. and sirot, J. (1995). Molecular charaterization of nine defferent types of Mutants among 107 inhibitor resistant TEN-beta lactamase from clinical isolates of Escherichia Coli Antimicrob. Agents. Chemother. 39: 427-430.

**Holmes,** B. and Gross, R.J. (1990). Coliform bactria Various other members of the Enterobacteria. In: Parker, M.T.; Duerden, B.I. (eds) Topley and Wilson's principles of bacteriology, Virology and Immunity, 8th ed. Vol. 2. PP. (415-441) Edward Arnold, London.

**Holt, J.G.**; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.; staley, J.T. and williams, S.T. (1994). Bergeys Mannual of determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wiskins publication London, New York.

**Hujer, A.M.**; Hujer, M.K. and Banoma, R.A. (2001). Mutagenesis of amin acid residuce in the SHV-1 B-Lactamase the premier role of Gly 238 ser in Penicillin and cephalosponin resistance. Biochem. Biophys. Acta. 1547: 37-50.

**Jawetz, E.**; Melinck, J.L. and Adelerg, E.A. (1998). Review of medical Microbiology 21 th edition. Middle Eest Edition, Beriut, Labanon.

**Johnson, J.R.**; Moseley, S.L.; Roberts, P.L. and Shaman, W.E. (1988). Aerobact in other virulence factors genes, among strains of Escherihia Coli Causing Urosepsisi association with patient characteristics. Infect. Immuno 56: 405-412.

**Kado**, **C.I.** and liu, S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. 145: 1365-1373.

**Karach**, H.; Russmann, H.; Schmidt, H., Schworzkopf, A. and heesmann, J. (1995). Lang termsheding and clonal turnover of EHEC 0157 indiarrheal disease. J. Clin. Microbiol. 33 : 1602-1604.

**Karmali**, M.A. ; steele, B.t.; Petric, M. and Lim C.C (1983). Sporadic cases of haemolyic. Uraemic Syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing Escherichia Coli in stools. J. Clin. Microbiol. 3: 619-260.

**Knowles, J.R.** (1985). Penicillin resistance: the chemistry of beta-lactamase inhibition. Account of chemical Res. 18: 97-104.

**Kraft, R.A.**; Prabhu, J.; Ursinus, A. and Hiltje, J.V. (1999). Inter ference with murein turrover has no effect on Growth but reduces B-Lactamase indaction in *Escherichia coli.* J. Bacteriol. 181: 3192-7192.

**Lee, W.S.** and Kamarmy L. (1981). Idometric Spot test for detection of B-Lactamase in Haemophilus influenzeve. J. Clin-Microbiol. 3 : 244-225.

**Lewin, B.** (2000). Gene IIV. Oxford University press. Chapter 15: 458-484.

**Lindquist, B.L.**; Lebenthal, E.; Lee, P.C. and stinson, M.W. (1987). Adherence of Samonella typhimurim to small-Intestional Enterocytes of the Rat. American Soci of Microbiol. 55: 3044-3050. (internet).

**Liras, P.** and Rodrgucs-Gacia, A. (2000). Minireview: clavulanic acid, 90(beta)-Lactamase inhibitor: biosyntesis and Molecular genetics applied Microbiol and Biotochnol. (Abstract) (Internet).

**Livermore,** D.M. (1995). Beta-Lactamase laborotary and Clinical reisstance. Clin. Microbiol. Rev. 8: 557-584.

**Massova, I.** and Mobsherry, S. (1997). Molecular basis for interaction between beta-Lactam antibiotic and beta Lactamase Accounts of chemical Research.

**Mavanathu, E.K.**; Lerner, S.A; Fekete, T.; Perlin, M.H.; Zaija, E. and prices, S. (1990) characterization of a mutant TEM beta lactamase that confers resistance to Ampicillin plus clavulanic acid. Antimicrobial agents and cheomtherapy. (abstreat) internet.

**Medeirose, A.A.** (1997). Evolution and dissemination of beta-Lactamase accelerated by generations of beta-Lactam antibiotics. Clin. Infect. Dis. 24 : 19-45.

**Miller, M.H.**; Edberg, L.J. ; Mondel, C.F. Behar, C. and steigbigel, N.H. (1980). Gentamicin uptake in Wild-type and aminogly coside-resistant small-colony mutants of *staphylo coccus aureus*. Antimicrob. Agents. Chemother. 18: 722-729.

**Minami, S.**; Akama, M.; Araki, Y.; Watanabe, H.; Nariata, H.; Iyobe, S.; and Mitsuhashi, S. (1996). Impenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa*

plasmids coding for class B Beta-Lactamase. J. Antimicrob. Chemother. 37: 433-444. (Internet).

**Miniatis, T.**; Fritch, E. and sambrook, J. (1982). Molecular cloning: alaboratory manual. Cold spring harbour Labortory. NewYork.

**Mouton, J.W.**; danhollander, J.G. and Horrevots, A.M. (1993). Emergence of antibiotic resistance amongst *Pseudomonas aeruginosa* Isolatas from patiens with cytic fibrosis. J. Antimcrob chemother. 31: 919-995.

**Nassif, X.** and sansonetti, P. (1987). Bacterial iron uptake Synthesis, there role invirulence Bull Inst. Pasteur. 85: 307-327.

**Nassif, X.**; Mazert; Mounier, J. and sansoetti, P. (1987). Evaluation with an iuc : Tn 10 mutant of the role of aerobacterin Production in the virulence of Shigella flexneri. Infect. Immun. 55: 1935-1969.

**National Committee for Clincial Laboratory Standards (NCCLS)** (1990). Voluntary consensus standards for Clincial laboratory Testing. Citted by: Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuck, C.C. (1991) Basic Laboratory procedures in Clinical Bacteriology. WHO, Geneva., PP. (85- 92).

**O' conell M.** (1984). Genetic tranfer inproka ryotes, transformation transduction and Conjugation. In: Advanced Molecular Genetics. (eds. A. pupler; K. Timmis). PP. 2-13. springer verlage, Berline.

**O'Donnell, J.G.**; Sorbello, A.F. Condoluci, D.V. and Barnish, M.J. (1993). Sinusit due to human immuno deficiency Virus infection J. Clin. Infact. Dis. 6: 404-406.

**Oliphant, A.R.** and Shruhl, K. (1989). Anefficient method for generating Proteins with alterad enzymatic properties; application to beta-Lactamase. Proc. Natl. Acad. Sei- 23: 9094-9098.

**Osano, E.**; Arakawa, Y.; Wacharotayankun, R.; Horii, T.; holt; Yoshimura, F. and Nka Ko. (1994). Molecular characterization of an enterobacterial Metallo beta-Lactamase. Found in a Clinial isolation of *serratia marcescens* that shows impienem resistance. Antimicro. Agents. Chemother. 38: 71-78.

**Panaite, D.M.** and Tolmasky, M.E. (1998). Characterization of mutants of the 6-N acety transformation encoded by the multi resistance transposon Tn 1331: effect of phen 171-to Leu 171 and 80-to Cys 80 substitution. Plasmid. 39: 123-133.

**Payne. S.D.** (1988). Iron and Virulence in the family Enero bacteriaceae. Microbiol. 16: 11-18.

**Pfeifle, D.**, Janas, E and Wiedemann, B. (2000). Role of Penicillin Binding Protein for the initiation of the Ampc B-Lactamase Expression in Enterobacter cloacae. Antimicrob. Agents. Chemother. 45 1-4:

**Poirel, L.**; Nass, T.; Nicolas, D.; Collet.; L.; Bellaise, S.; Cavallo, J. and Nordmann, D. (2000) characterization of VIM-2 carbapenem-hydrolyzing Metallo-Beta Lactamase and its Plasmid- and Integron- Borne Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical Isolates in France. Antimicrob. Agents chemother. 44: 891-897.

**Pospiech** and Neumann. (1995). Salting out procedure for the Isolation of genomic and Plasmid DNA chop 6. New York.

**Postier, R.G.** (2000). Antibiotic. Resistant Organism infaction. American Surgeon, Feb 2000, Vol. 66 Issue 2, P112, 5P.

**Prescott, L.M.**; Hardley, J.P.; Klein, D.A. (1999) Microbiology. 4th edition. PP: 503-591. Advision of the Mc Graw Hill companies. U.S.A.

**Philip, D.** and Lister. (2000). Inhibition of Beta-Lactamase. J. pharmacotherapy. 95: 20 (Internet).

**Raj, P.** (1995). Pathogenesis and Laboratory diagnosis of Esherichia Coli-associated antritis. Clin. Microbiol. 15: 89-39.

**Rasmussen, J.W.**; Jonsen, A.H. and Hoiby, N. (1999). Terminal truncations Amps-Beta Lactamase frane a clinical isolate of Pseudomones aeruginosa. Eur.J. Biochem 263: 473-485.

**Reisbig, R.**; Olsens; Eikid, K. (1981). The cytotoxin activity of Shigella toxin evidence for catalytic inactivation of 60 S ribosomal Subunit. J. Biol chem. 256: 8739-8744.

**Requerra, J.**; Baguero, F.; Perez-Diaz, J.C. and Martinez, J.L. (1991). Factor determinging resistance to beta-Lactamase combined with beta-Lactamase inhibitor in Escheriachia Coli. J. Antimicrob. Chemother. 27: 569-575.

**Rolinson, G.N.** (1998). Forty years of Beta-Lactam. Research. J. antimicrobi-Chemother. 41: 589-603.

**Same brook, J.**; Fritgah, E. and Maniatis, T. (1989). Molecular coloing, alabratory manual, cold spring Harbory. New York.

**Scotland, S.M.**; Gross, R.J. and Rowes, B. (1985). Enterionvasion and adhesion in diarrhoeagenie Escherichia Coli. In: Sussman, M (ed) the virulence of Escherichia Coli. Acadmic press, London, PP 394-405.

**Shaokat, S.** (1986). Contri Bution A.L'elude De L'emergence De L'A Beta-Lactamase SHV-1 Chezle Colibe Cill Au senegal-PHD. University De Clermonti Faculte De Pharmacie.

**Skerman, V.B.**; MaGowan, V. and sneath, P.H. (1980). Approved lists of bacterial hames. International.J. of Systematic Bacterol. 30: 225-420.

**Smith, H.R.** and Scotland, S.M. (1993). Isolation and identification methods for Escherictia Coli 0157 and other Vero Cytotoxine producing straine. J. Clin. Pathol. 46: 10-17.

**Snyder, L.** and Champense, W. (1997). Molecular Genetics of Bacteria, American Society for Microbiology. Washing Tor. New York.

**Thomas, G.M.**; Top, E.M.; Moenne, L.T and pembrek. (2000). The horizontal Gene pool; Bacterial Plasmid and Gene spread. Chap. PP: 249-285. Harwood Acabermic publishers. Australia.

**Vandpitte, J.**; Engback, K.; Piot, P and Heuek, C.C. (1991). Basic Laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO., Geneva., PP: 78-40.