جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة بغداد/ كلية التربية للعلوم الصرفة – ابن الهيثم

دراسة مقارنة للمحتوى البلازميدي للبكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز التابعة للعائلة المعوية والمعزولة من عينات بيئية و سريرية

رسالة مقدمة الى كلية التربية للعلوم الصرفة- ابن الهيثم/ جامعة بغداد

كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستيرفي علوم الحياة – الاحياء المجهرية

من قبل الطالبة

تقى عبد الكريم حميد

بكلوريوس علوم حياة/ 2013

باشراف

أ.م.د اسراء عبد الجبار أبراهيم

1437 هـ

2016 م

Republic of Iraq
University of Baghdad

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿مَا يَفْتَحِ اللَّهُ لِلنَّاسِ مِن رَّحْمَةٍ فَلَا مُمْسِكَ لَهَا وَمَا يُمْسِكْ
فَلَا مُرْسِلَ لَهُ مِن بَعْدِهِ وَهُوَ الْعَزِيزُ الْحَكِيمُ﴾

صدق الله العلي العظيم

فاطر (٢)

اقرار المشرف

اشهد ان الرسالة الموسومة بـــ (دراسة مقارنة للمحتوى البلازميدي للبكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز التابعة للعائلة المعوية والمعزولة من عينات بيئية و سريرية) المقدمة من قبل الطالبة (تقى عبد الكريم حميد) قد تمت تحت اشرافي في كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم / قسم علوم الحياة وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة .

التوقيع :

الاسم : أ.م .د اسرا ء عبد الجبار ابراهيم

التاريخ :

بناءً الى التوصيات المتوافرة ارشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : أ .م .د مازن نواف

رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ :

اقرار لجنة المناقشة

نشـــــهد نحـــــن اعضـــــاء لجنـــــة المناقشـــــة اطلعنـــــا علـــــى الرســـــالة الموســـــومة بـــ (دراسة مقارنة للمحتوى البلازميدي للبكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز التابعة للعائلة المعوية والمعزولة من عينات بيئية و سريرية) المقدمة من الطالبة (تقى عبد الكريم حميد) في قسم علوم الحياة وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونقدر انها جديرة بقبول نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / احياء مجهرية وبتقديـــر (امتياز) .

التوقيع :

الاسم :د. الهام سعيد عبد الكريم

المرتبة العلمية :استاذ مساعد

التاريخ :

رئيس اللجنة :

التوقيع :

الاسم :د.واثق عباس الدراغي

المرتبة العلمية :استاذ مساعد

التاريخ :

عضواً :

التوقيع :

الاسم :د.نبراس نزار محمود

المرتبة العلمية :استاذ مساعد

التاريخ :

عضواً :

التوقيع :

الاسم :د.اسراء عبد الجبار ابراهيم

المرتبة العلمية :استاذ مساعد

التاريخ :

مشرفاً :

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم

العميد :د.خالد فهد علي

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ :

الإهداء

الى . . .

❖ والديّ العزيزين حفظهما الله .

❖ والى كل افراد اسرتي . .

❖ والى روح جدي وجدتي رحمهما الله . .

❖ والى كل الاصدقاء، ومن كانوا برفقتي ومصاحبتي اثناء دراستي في الجامعة . .

❖ والى والدي الثاني خالي العزيز زياد . .

❖ والى بنت عمي نور وخالي مصطفى . .

❖ والى كل من لم يذخر جهداً في مساعدتي . . .

❖ والى كل من ساهم في تلقيني ولو بحرف في حياتي الدراسية . .

شكر وتقدير

يطيب لي وأنا اشرف على انهاء رسالتي بأذن الله أن أقدم شكري الجزيل وامتناني العميق الى الدكتورة الفاضلة اسراء عبد الجبار ابراهيم لاقتراحها مشروع البحث ولمتابعتها العلمية الدقيقة لكل خطوات المشروع واسداءها النصائح والمشورة العلمية طيلة مدة البحث . . وأتقدم بالشكر والامتنان إلى عمادة التربية ابن الهيثم للعلوم الصرفة والى رئاسة قسم علوم الحياة من أساتذة ومنتسبي القسم كافة .واخص بالشكر والتقدير الست ناهدة غازي /مدرس اللغة العربية لنصائحها اللغوية السديدة راجية من الله ان يمن عليها بالنجاح والتوفيق والصحة والسلامة والاستاذ انور عبد ناصر لمساعدته لي في تصوير العينات. . ولا يفوتني ان اشكر منتسبي مختبر البكتريولوجي في مستشفى الكندي التعليمي ولاسيما البكتريولوجية حوراء كاظم وايضا دكتور مازن نواف مسؤول المختبر والاستاذ ياسين محسن لما ابدوه الي من مساعدة كبيرة في جمع العينات وتشخيصها في مختبر المستشفى.. وتعجز الكلمات في التعبير عن مدى تقديري وامتناني الى الاستاذ زيد نصيف/ قسم التقنيات الاحيائية جامعة النهرين وايضا الدكتور سهيل رئيس قسم الاحصاء في جامعة بغداد لمساعدتهم لي في اعطاء المشورة والنصح. . ويلزمني جانب الوفاء ان أتقدم بالشكر والثناء الى زملاء الدراسة ولاسيما الزميل عباس فالح لوقفته معي ومساعدته لي وصديقتي روئ حميد التي ساعدتني كثيراً ختاما عسى ان أكون قد وفقت لتقديم جهدٍ علمي ليستعين به الطالب الجامعي وطلبة الدراسات العليا . .

الخلاصة

تم جمع 183 عزلة بكتيرية مخمرة لسكر اللاكتوز من عينات سريرية وبيئية مختلفة خلال 5 اشهروللمدة من 2014/9/1 إلى 2015/2/1 ،ما مجموعه 98 عزلة البكتيرية سريرية عزلت من عينات (ادرار، دمّ، قشع، مسحات الجروح والحروق) من المرضى الذين راجعوا المستشفيات المختلفة في مدينة بغداد، كما تم عزل 85 عزلة بكتيرية بيئية من عينات المياه من نهر دجلة من منطقة الشواكة، ومن عينات التربة من شرق بغداد من منطقة جديدة الشط ومن عينات براز الدجاج التي جمعت من حقل دواجن في مدينة الصدر.

تم تشخيص كل العزلات البكتيرية السريرية والبيئية على اساس الخصائص المظهرية ، والاختبارات البايوكيميائية. وقد اجريت الاختبارات التاكيدية الاضافية لتاكيد تشخيص هذه العزلات البكتيرية باستعمال Vitek-2 compact system واستعمال بادئ نوعي للكشف عن الجين 16S rRNA . وأظهرت النتائج تشخيص العزلات البكتيرية الاتية :

Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii, Serratia marcescens, Raoultella planticola, Chryseomonas luteola, Burkholderia cepacia, Aeromonas hydrophila, Streptococcus feacalis.

بينت نتائج فحص الحساسية ان جميع الانواع البكتيرية كانت متعددة المقاومة للمضادات الحيوية المستعملة ،وكانت معظم عزلات الـ *E.coli* (45 السريرية) مقاومة عالية اتجاه معظم المضادات : 100% (amikacin وampicillin),97% (cefepime و ceftazidime) (ceftriaxone) 95% و 86% (tobramycin) ,82% (amoxicillin)، 77%(gentamicin) 73% (aztreonam).

ابـدت عـزلات *E.coli* (28البيئيـة) ايضـاً مقاومـة عاليـة إذ بلغـت 100% لكـل مـن (ampicillin,ceftazidime,cefepime, tobramycine) و96% للـNitrofurantion و92% للـ Ceftriaxone و86% للـ (amoxicillin) و 82% (amikacin) و60 % لمضـادي (levofloxacin,impenem). امـاعزلات بكتريـا *Klebsiella pneumoniae* البيئيـة اظهـرت مقاومـة اتجـاه معظـم المضـادات الحيويـة إذ بلغـت نسـبة المقاومـة 100% لكـل مـن (ampicillin,amoxicillin,cefepime وceftazidime) بينمـا كانـت العـزلات السـريرية مقاومـة بنسـبة 30% للـ (ciprofloxacin) و8% مـن العـزلات البيئيـة مقاومـة لمضـادي (ciprofloxacin وlevofloxacin) .

بينـت نتـائج التشـخيص الجزيئـي لعـزلات *E.coli* باسـتعمال البـادئ النـوعي للجـين 16S rRNA ان كل العزلات البكتيرية المخمرة لسكر اللاكتوز احتوت هذا الجين وبنسبة (100 %). كما وجد ايضاً الجين 16S rRNA نفسه في الانواع الاتية:

Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes, Serratia marcescens, Raoultella planticola وبالوزن الجزيئي نفسه (544 زوج قاعدي) الذي وجد في عزلات بكتريا *Esherichia coli*. بينما اظهرت عزلات *Klebsiella pneumoniae* حزمتين للجين نفسه 16S rRNA واحدة وزنها الجزيئي 544 bp والاخرى اكبر من 1500 bp.

اظهرت نتائج تحليل DNA البلازميد باستعمال طريقة التحلل القاعدي ان 48/35 (75%) عزلة سريرية وبيئية احتوت بلازميدات حجمها 10000 bp و48/15 (31.25 %) عزلة احتوت على بلازميد حجمه اكبرمن 10000 bp .

استعملت مستخلصات اوراق النباتات الطبية :الكالبتوس والزيتون والحلبة كعوامل محييدة للبلازميد وبطريقتين: الاولى باضافة المستخلص النباتي الى الاوساط الزرعية والثانية باضافته مع DNA البلازميدي. اظهرت النتائج بأن كلا الطريقتين اعطت تأثيراً واضحاً.

قائمة المحتويات

التسلسل	العنـــوان	الصفحة
	الخلاصة	
	الخلاصة	I
	الفصل الاول	
1	المقدمة	1
1	هدف الدراسة	3
	الفصل الثاني	
2	استعراض المراجع	4
2	العائلة المعوية	4
1-2	الامراضية	6
1-1-2	التركيب المستضدي	8
2-1-2	عوامل الضراوة	9
2-2	انتشار افراد العائلة المعوية ومعيشتها	11
3-2	ادلة التلوث المايكروبي	12
4-2	طرائق التشخيص	13
1-4-2	الطرائق البايوكيميائية والمظهرية	13
2-4-2	الطرائق المصلية	14
3-4-2	الطرائق الجزيئية	14
4-4-2	تقنية مورثة 16SrRNA	15
5-4-2	البلازميدات	16
5-2	اجناس البكتريا المعوية المخمرة لسكر اللاكتوز	17
1-5-2	*Escherichia spp*	17
2-5-2	*Klebsiella spp*	19
3-5-2	*Enterobacter spp*	20
4-5-2	*Serratia spp*	21
5-5-2	*Citrobacter spp*	23
6-5-2	*Raoultella spp*	24

6-2	الانواع البكتيرية غير التابعة للعائلة المعوية التي تنمو على وسط الماكونكي وتظهر مستعمراتها ملونة	25
1-6-2	*Aeromonas hydrophila*	25
2-6-2	*Chrysemonas luteoda*	25
3-6-2	*Burkholderia cepacia*	26
4-6-2	*Streptococcus faecalis*	26
7-2	المضادات الحيوية و اليات المقاومة	27
8-2	النسق البلازميدي	31
1-8-2	تصنيف البلازميدات	32
9-2	الترانسبوزون	34
10-2	تحييد البلازميدات	35
1-10-2	النباتات المستعملة في التحييد	36
1-1-10-2	الحلبة *Trigonella foenum- graecum L.*	36
2-1-10-2	الكالبتوس *Eucalyptus incrassate*	36
3-1-10-2	الزيتون *Olea eurepea*	37
الفصل الثالث		
3.	المواد وطرائق العمل	38
1-1-3	الاجهزة والادوات	38
2-1-3	المواد الكيميائية	39
3-1-3	الاوساط الزرعية	40
4-1-3	الصبغات	40
5-1-3	الكواشف	41
3-1-6- أ	اقراص المضادات الحيوية	41
3-1-6- ب	المحاليل Solutions	42
7-1-3	العدد المستعملة في الدراسة	42
8-1-3	المورثة التشخيصية (البرايمر) 16SrRNA	43
2-3	طرائق العمل	43
1-2-3	طرائق التحضير والتعقيم	43
2-2-3	الاوساط الزرعية التركيبية	44

1-2-2-3	وسط لوريا السائل (Luria - Bertani medium)	44
2-2-2-3	وسط احمر المثيل وفوكس بروسكر (VP- MR)	44
3-2-3	تحضير المحاليل والكواشف	45
1-3-2-3	المحلول الملحي الفسلجي (Normal Saline)	45
2 -3-2-3	محلول ثابت العكورة القياسي (ماكفرلاند) Macfarland	45
3-3-2-3	محلول المضادات الحيوية Antibiotic solution	45
4-2-3	المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR	46
1-4-2-3	محاليل البادئات primers solutions	46
5-2-3	محاليل عزل الدنا البلازميدي بالطريقة القاعدية	46
3-2-5-2	(TEG) Sol	47
3-2-5-2	(N 0.2 NaoH) SDS 1% Sol II	47
3-2-5-3	Sol III محلول خلات البوتاسيوم Potassium acetate	47
4-5-2-3	(TES) Sol IIII	47
5-5-2-3	TE	47
6-5-2-3	فينول - كلورفورم Phenol-Choroform	48
6-2-3	حفظ وادامة العزلات البكتيرية	48
1-6-2-3	حفظ قصير الامد Short period culture	48
2-6-2-3	حفظ طويل الامد Long period culture	48
7-2-3	جمع العينات Sample collection	49
1-7-2-3	العينات السريرية Clinical specimens	49
2-7-2-3	العينات البيئية Environmental specimens	49
2-7-2-3-أ	العزل الجرثومي لعينات المياه	50
2-7-2-3- ب	العزل الجرثومي لعينات التربة	50
2-7-2-3- ج	العزل الجرثومي لفضلات الدجاج	51
8-2-3	عد المستعمرات البكتيرية	51
9-2-3	تشخيص البكتيريا العائلة المعوية المخمرة لسكر اللاكتوز	52
1-9-2-3	الفحص المجهري Microscopic Examination	52

2-9-2-3	الفحوصات البايوكيميائية	52
3-9-2-3	اختبارات الـ IMViC	53
4-9-2-3	التشخيص بجهاز الفايتك VIETK-2	54
10-2-3	اختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية	56
11-2-3	استخلاص الدنا البلازميدي بطريقة القاعدية (المانول)	56
12-2-3	استخلاص الدنا البلازميدي بوساطة العدة الجاهزة	58
13-2-3	الترحيل الكهربائي	60
14-2-3	تفاعل السلسلة المتعددة PCR	61
2-14-2-3	حسابات التفاعل البلمرة المتسلسل PCR	63
3-14-2-3	برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	63
15-2-3	تجارب التحييد البلازميدات	64
2-15-2-3	اختبارحساسية البكتريا للمستخلصات المائية والكحولية للنباتات	65
3-15-2-3	تحديد قيمة التركيز المثبط الادنى MIC للمستخلصات النباتية	65
4-15-2-3	تاثير المستخصات النباتية المباشر في الدنا البلازميدي	66
الفصل الرابع		
1-4	العزل والتشخيص Isolation and Diagnosis	67
1-1-4	العينات السريرية Clinical sample	67
1-1-1-4	نتائج الزرع الاولي لكل الانواع المدروسة على وسط الماكونكي	68
2-1-1-4	التشخيص بالاعتماد على وسط كروماجين	68
3-1-1-4	الفحص المجهري Microscopic examination	69
4-1-1-4	الاختبارات البايوكيميائية Biochemical test	70
5-1-1-4	علاقة العمر والجنس والإصابات بالانواع السريرية المعزولة	70
2-4	العينات البيئية Environmental sample	71
1-2-4	العد الكلي البكتيري للعينات	72
3-4	التشخيص بوساطة جهاز الفايتك	73
4-4	التشخيص الجزيئي بوساطة التحري عن مورثة 16SrRNA	74
5-4	اختبار فحص الحساسية Sensitivity of antibiotic	77
1-5-4	مقاومة العينات السريرية للمضادات الحيوية	77

2-5-4	مقاومة العينات البيئية للمضادات الحيوية	79
6-4	التحري عن الدنا البلازميدي Plasmid content	82
1-6-4	استخلاص البلازميد بطريقة العدة الجاهزة	82
2-6-4	استخلاص البلازميدات بالطريقة القاعدية (المانول)	84
7-4	تحييد البلازميدات Curing plasmid	87
1-7-4	الفعالية المباشرة للمستخلص النباتي في البكتريا	87
2-7-4	التركيز المثبط الادنى MIC للمستخلص النباتي	88
3-7-4	تاثير المستخلص في عملية تحييد الدنا البلازميدي عند استخلاصه	90
4-7-4	التاثير المباشرللمستخلص النباتي في الدنا البلازميدي	91
الفصل الخامس		
1-5	العزل والتشخيص Isolation and Diagnosis	94
1-1-5	العينات السريرية Clinical sample	94
5 -1-1-1	علاقة العمر والجنس بالاصابة بالبكتريا قيد الدراسة	95
2-5	العينات البيئية Environmental samples	96
3-5	التشخيص Diagnosis	99
4-5	التشخيص الجزيئي بواسطة التحري عن مورثة 16SrRNA	101
5-5	اختبار فحص الحساسية Sensitivity of antibiotic	102
6-5	التحري عن وجود البلازميدات Plasmid content	105
7-5	تحييد البلازميدات Curing plasmid	107
1-7-5	الفعالية المباشرة للمستخلص النباتي في البكتريا	107
2-7-5	تاثير المستخلص في عملية تحييد الدنا البلازميدي عند استخلاصة	110
3-7-5	التاثير المباشرللمستخلص النباتي في الدنا البلازميدي	111
الأستنتاجات والتوصيات		
	الإستنتاجات	112
	التوصيات	113
المصادر		
	المصادر العربية	114
	المصادرالاجنبية	116

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
1-2	المجاميع البكتيرية المهمة سريرياً التابعة للعائلة المعوية بحسب قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز	5
2-2	انواع العائلة المعوية المهمة سريرياً التي تسبب اهم الاصابات الشائعة	7
1-4	نسب واعداد العزلات السريرية	67
2-4	نتائج التشخيص على وسط الكروماجين Chromagar Orientation	69
3-4	الاختبارات البايوكميائية الخاصة بالانواع قيد الدراسة	70
4-4	نسب وانواع البكتريا المستحصلة من العينات البيئية	72
5-4	نسب الاعداد الحية للعينات البيئية	72
6-4	مناطق التثبيط الناتجة من تاثير المستخلصات النباتية في البكتريا	87
7-4	كثافة نمو المستعمرات البكتيرية وتحديد الـ MIC	88
8-4	اختبار الحساسية للعزلات المنتخبة بعد معاملتها بالمستخلصات النباتية	89

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
1-3	جهاز الفايتك المستعمل في التشخيص VITEK 2 System	55
1-4(أ-ب)	نمو بعض الاجناس على وسط Chromagar Orientation	69
2-4	الترحيل الكهربائي للدنا الكلي للعزلات البكتيرية باستعمال هلام الاكاروز	74
3-4	الترحيل الكهربائي لمورثة 16SrRNA لعزلات *E.coli* السريرية	75
4-4	الترحيل الكهربائي لمورثة 16SrRNA لعزلات *E.coli* البيئية	75
5-4	الترحيل الكهربائي لمورثة 16SrRNA للعزلات : *K.peumoniae*(1,2) *Enterobacter aerogenes* (94-41) *E.coli* (43,16)	76
6-4	الترحيل الكهربائي لمورثة 16SrRNA لعزلات : *R.planticola* (18) *K.oytoca* , (19) (170) *S. marcescens* ,(144) *C. freundii*	76
7-4	نسب المقاومة في بكتريا *E.coli* المعزولة من عينات بيئية وسريرية لمجموعة من المضادات الحيوية	78
8-4	نسب المقاومة في بكتريا *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من عينات بيئية وسريرية لمجموعة من المضادات الحيوية	81
9-4	مخطط يظهر فعالية المضادات الحيوية المستعملة اتجاه جميع العزلات	81
10-4	الحزم البلازميدية المعزولة من عينات بيئية وسريرية بطريقة العدة الجاهزة وفي ظروف ترحيل (اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف)	82
11-4	الحزم البلازميدية المعزولة من عينات سريرية بطريقة العدة الجاهزة وفي ظروف ترحيل (اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف).	83
12-4	الحزم البلازميدية المعزولة من عينات بيئية بطريقة العدة الجاهزة وفي ظروف ترحيل (اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف)	83
13-4 14-4	الحزم البلازميدية المعزولة من عينات سريرية بطريقة المانول القاعدي وفي ظروف ترحيل (اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف)	84 85
15-4 16-4 17-4	الحزم البلازميدية المعزولة من عينات سريرية بطريقة المانول القاعدي وطريقة الكت وفي ظروف ترحيل (اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف)	85 86 86
18-4	مناطق التثبيط الناتجة من تأثير المستخلص النباتي في البكتريا	88
19-4	اختبار الحساسية للعزلات بعد معاملتها بالمستخلصات النباتية	89
20-4	عملية التحييد للبلازميدات بعد معاملتها بالمستخلصات النباتية	91
21-4	تاثير المستخلصات النباتية بشكل مباشر في حزم البلازميد	93

المختصرات

المختصرات	المصطلحات
AFLP	amplified fragment length polymorphisms
Bp	base pair
bla	β-lactamases gene
β-lactamases	Beta-lactamases
CLSI	Clinical laboratory standards institute
DNA	Deoxyribose nucleic acid
EMB	Eosin methylene blue
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
ESβL	Extended spectrum β-lactamase
H-antigen	Flagella antigen
K-antigen	Capsule antigen
LPS	Lipopolysaccaride
LSU	Large subunit
Mg	Microgram
Ml	Microliter
MIC	Minimum inhibitory concentration
MAC	MacConkey agar
magA	mucoviscosity -associated gene
O- antigen	Somatic antigen
PCR	Polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSU	Small subunit
RFLP	restriction fragment length polymorphisms
RpoB	RNApolymerase Beta
SSA	Salmolla-ShigellAgar
HE	Hektoen enteric
WHO	World Health Organization
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate Agar

المقدمة

Introduction

تعد العائلة المعوية من اكبر المجاميع الجرثومية المهمة والشائعة وهي من العصيات السالبة لصبغة كرام إذ يكون الموطن الطبيعي لها القناة المعوية للإنسان والحيوان ،تظهر هذه العائلة انتشاراً واسعاً في الطبيعة اذ توجد في مختلف البيئات مثل التربة والمياه (Ryan *et al*.,2010) . تتميز افراد هذه العائلة بانها تنمو على اوساط زرعية اعتيادية ولا تحتاج الى اوساط معقدة إذ يمكن ان تنمو في وسط يحتوي على مصدر كاربوني واحد، فضلاً عن نموها على الاوساط الزرعية التفريقية مثل وسط XLDagar, MacConkey و Eosin methylene blue (Brooks *et al*.,2010) ان افراد هذه العائلة في اغلب الاحيان تكون بشكل فلورا طبيعية (غير مرضية) الا انها قد تصبح انتهازية مسببة لامراض متعددة من اهمها السحايا Meningitis والالتهابات المعوية Enteritis وتلوث الجروح wound infection وتسمم الدم Septicemia ، والتهابات المجاري البولية والتنفسية وتشترك في اصابات المستشفيات (Farmer *et al*.,2007) . تقسم الى مجموعة كبيرة من الاجناس منها المخمرة لسكر اللاكتوز مثل *Escherichia,Klebsiella,Enterobacter,Citrobacter,Serratia,* وغير المخمرة لسكر اللاكتوز مثل *Proteus,Shigella,Salmonella,Yersinia* (Paterson *et al*.,2006).

تعتمد الصفات الكيموحيوية للتشخيص على مستوى النوع مثل تخمرالكربوهيدرات وتحليل الاحماض الامينية والقدرة على انتاج الانزيمات المختلفة و كذلك الاعتماد على الاختبارات المصلية (Ryan *et al*.,2010)، مع ظهور تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction) وتطورها والتعرف على انواع مختلفة منها(RAPD-PCR,AFLP- REFLP-PCR و PCR Real-Time-PCR) ساهم بشكل كبير في تشخيص بعض انواع البكتريا التي كان من الصعب تشخيصها بالطرائق التقليدية (Sabat *et al*.,2000) .تشمل الطرائق الجزيئية في التشخيص انواعاً عديدة من اهمها تقنية الكشف عن جين 16SrRNAالذي يعد ثورة من المعرفة والكشف عن انواع جديدة لم تكن معروفة سابقا ولم يتم التعرف عليها بالطرائق التقليدية

(Morris *et al*., 2002) ويتم استعمالها لكل المجاميع البكتيرية سواء موجبة ام سالبة لصبغة كرام (Ferroni *et al*.,2002). تعد عملية تحديد النسق البلازميدي plasmid profile عملية مفيدة في تحديد وتصنيف السلالات الوبائية المتفشية بسبب انواع مختلفة من بكتريا *Escherichia.coli* *Klebsiella,Pseudomonas,Serratia,Staphylococcu* (Wachsmuth,1986) .

تمتلك هذه المجموعة عوامل ضراوة مختلفة منها القدرة على انتاج الذيفانات الخارجية والداخلية وتكوين الغشاء الحيوي وامتلاكها البلازميد الذي يعد احد العناصر المهمة في نشر صفة المقاومة للمضادات الحيوية المستعملة بين السلالات البكتيرية المختلفة، تنتقل هذه العناصر الوراثية من خلية الى اخرى عن طريق عملية الاقتران البكتيري او التحول الوراثي او التوصيل بل حتى بالقفز مثل الترانسبوزون (Brooks *et al* .,2010). ان ظهور العديد من السلالات البكتيرية المقاومة لواحدة او اكثر من المضادات الحيوية المهمة من الناحية العلاجية اصبحت مشكلة خطيرة من الناحيتين الاقتصادية والصحية إذ ان ظهور وانتشار المقاومة في افراد العائلة المعوية ساهم في صعوبة المعالجة للاصابات المكتسبة في المستشفيات (Peterson,2008) .

يعد التحييد Curing احد الاليات المالوفة في فقدان البلازميدات بوساطة معاملات متنوعة مع اهمية الاشارة الى كون بعض البلازميدات تعاني فقداناً ذاتياً الا ان الغالبية العظمى من البلازميدات تكون مستقرة بدرجة كبيرة وتتطلب استعمال عوامل محيدة Curing agents مختلفة لغرض زيادة تردد الفقدان التلقائي (Kuenkates and Kocazeybek, 2002)، يستعمل في عملية التحييد مواد مختلفة مثل مادة الاكردين البرتقالي والاثيديوم ومادة SDS ويتم ايضاً استعمال المستخلصات النباتية الطبية (Khder and Muhammed,2010) .

لذا كان الهدف من الدراسة :

1-عزل البكتريا المعوية المخمرة لسكر اللاكتوز وتحديد الانواع الاكثر انتشاراً. وتشخيصها من عينات بيئية وسريرية .

2- اعتماد جين 16S rRNA في الية التشخيص.

3- تحديد نوع المقاومة للمضادات الحيوية ونسبتها.

4- مقارنة المحتوى البلازميدي للعزلات قيد الدراسة وتحديد احجام البلازميدات الاكثر انتشاراً.

5- دراسة تاثير بعض المستخلصات النباتية الطبية لتحييد البلازميدات باستعمال طرائق مختبرية مختلفة .

استعراض المراجع

Literature Review

2- العائلة المعوية Enterobacteriaceae

استناداً الى تصنيف بركيز Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2004

تنتمي العائلة المعوية الى :

- الشعبة الرابعة عشر بروتوبكتريا (Phylum XIV Proteobacteria)
- الصنف الثالث كاما بروتوبكتريا (ClassIII Gammaproteobacteria)
- الرتبة الثالثة عشر البكتريا المعوية (Order XIII Enterobacteriales)
- العائلة البكتريا المعوية (Family I Enterobacteriaceae)

تضم العائلة المعوية اربعة واربعين جنساً و 176نوعاً (Brenner *et al.*, 2004). اعتمد اسم العائلة المعوية Enterobacteriaceae عام 1937 من قبل العالم O.Rahn باعتماد قابلية تخمر سكر الكلوكوز وانتاج الغاز من قبل الافراد التابعة للعائلة (Clive and Blackbarn, 2006) .تمتاز افراد هذه العائلة بكونهاعصيات سالبة لصبغة كرام تتراوح اطوال انواعها مابين 0.3-1.0× 1.0-6.0 ماكروميتر ،غير مكونة للأبواغ، تنمو في ظروف لاهوائية اختيارية ماعدا النوع *Sacharobacter fermentatus* وبعض سلالات *Erwinia* و *Yersinia* . متطلبات نموها بسيطة ولاتحتاج الى اوساط معقدة وتنمو على وسط الماكونكي MacConkey's medium (Brenner *et al.*, 2004) عدا بعض الانواع المتعايشة في الحشرات.

البعض منها مخمرة لسكر اللاكتوز اما البعض الاخر غير مخمرة له، الدرجة الحرارية المثلى لنمو معظم انواعها هي 37 °م الا ان بعض الانواع تفضل النمو في درجة حرارة تتراوح بين 22- 35°م (Brooks *et al.*,2010) المتحركة منها تتحرك بوساطة اسواط محيطية ماعدا جنس*Tatumella* و *Shigella* .

غالبيـــة الانـــواع موجبـــة لفحـــص الكتـــاليز ماعـــدا*Shigella dysenteriae*-Ogroup1 و*Xenorhabdus* وســالبة لفحــص الاوكســيديز عــدا الجــنس *Plesiomonas* . نســبة القاعــدة النيتروجينية G:C (Guanine: Cytosine) هي 38-60% (Brenner *et al*., 2004).

تقسم هذه العائلة على ثلاث مجاميع مهمة سريرياً اعتماداً على قدرة الانواع على تخمير سكر اللاكتوز او عدم قدرتها على تخميره (الجدول 2- 1) (Khan *et al*., 2011) وهناك بعض الانواع لها القدرة على تخمير سكر اللاكتوز ولكن بشكل بطيء ومتاخر مثل بعض انواع جنس *Citrobacter* و *Serratia* .

جدول (2-1) المجاميع البكتيرية المهمة سريرياً والتابعة للعائلة المعوية بحسب قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز(Khan *et al*.,2011)

بطيئة التخمير اللاكتوز Lactose fermenter	غير المخمرة اللاكتوز Lactose non fermenter	المخمرة اللاكتوز Lactose fermenter
Serratia marscecens	*Escheriachia coli (inactive)*	*Escherichia coli*
Citrobacter koseri	*Proteus mirabilis*	*Klebisella spp.*
Citrobacter freundii	*Proteus vulgaris*	*Enterobacter spp.*
	Prroteus penneri	
	Providencia stuartii	
	Providencia rettgeri	
	Morganella morganii	
	Salmonella spp.	
	Shigella spp.	

1-2 الامراضية *Pathogenesis*

تشكل العائلة المعوية نسبة 80 % من مجموع البكتريا العصوية السالبة لصبغة كرام والمهمة سريرياً ونسبة 50% من البكتريا المهمة سريرياً و من مجموع الاحياء المجهرية السريرية بشكل عام (جدول2-2) (Murray *et al*., 2003).

تتواجد هذه العائلة في اغلب الاحيان بشكل فلورا طبيعية (متعايشة) في امعاء الانسان والحيوان ولا تسبب له الامراض مثل بعض سلالات بكتريا *E.coli* (Farmer *et al*., 2007) الا ان بعض الاجناس التابعة لهذه العائلة تعد من الممرضات الانتهازية وتسبب العديد من الامراض مثل جنس *Klebsiella* التي تصيب الأشخاص الذين يعانون من الكبح المناعي والمرضى الراقدين في المستشفيات (Jazani *et al*., 2009) .

من الاصابات التي تسببها افراد هذه العائلة هي التهابات المجاري البولية وهي الاكثر شيوعاً وتليها الالتهابات الرئوية ، تلوث الجروح اصابات مجرى الدم و الجهاز العصبي المركزي كما ان بعض الافراد التابعة لهذه العائلة قد تسبب الالتهابات المعوية (Abbott , 2007) .

جـدول (2-2) انـواع العائلـة المعويـة المهمـة سـريرياً التـي تسـبب اهـم الاصـابات الشـائعة

(Murray *et al*., 2003)

	الجنس	اهم الانواع السريرية	اهم الاصابات الشائعة
1	*Citrobacter*	*C. freundii*	UTIs, pneumonia, meningitis, septicaemia, wound infections
2	*Enterobacter*	*E.aerogenes,E. cloacae*	UTIs, pneumonia, septicaemia, wound infections
3	*Escherichia*	*E. coli*	UTIs,pneumonia, septicaemia,wound infections
4	*Klebsiella*	*K.pneumoniae, K.oxytoca*	UTIs,diarrhoea, septicaemia, meningitis
5	*Morganella*	*M. morganii*	UTIs,pneumonia, septicaemia
6	*Plesiomonas*	*P. shigelloides*	UTIs, septicaemia
7	*Proteus*	*P. mirabilis, P. vulgaris*	diarrhoea, septicaemia
8	*Providencia*	*P. rettgeri, P. stuartii*	UTIs,pneumonia, septicaemia,
9	*Salmonella*	*S. enteritica*	diarrhoea,typhoid fever,septicaemia, UTIs, osteomylitis
10	*Serratia*	*S.marcescens, S.liquefaciens*	
11	*Shigella*	*S. sonnei, S. flexneri*	UTIs,meningitis,wound infections

12	*Yersinia*	*Y.pestis, Y.enterocolitica*	UTIs,pneumonia, woundinfections, septicaemia diarrhoea, dysentery plague,enteritis, diarrhoea, septicaemia

1-1-2 التركيب المستضدي Antigen structure

تمتلك العائلة المعوية ثلاثة انواع رئيسة من المستضدات التي تحدد ضراوة البكتريا وامراضيتها وهذه المستضدات هي: مستضد المحفظة capsule (K-antigen)، المستضد السوطي Flagella (H-antigen) و المستضد الجسمي somatic (O- antigen).

المستضد الجسمي Somatic antigen (O-Antigen) يتكون من السلسلة الجانبية لوحدات السكر المتكررة والموجودة في طبقة متعددة السكريد الشحمي Lipopolysaccaride (LPS) ضمن طبقة الغشاء الخارجي outer membrane في البكتريا، يتميز هذا المستضد باستقراره الحراري والكحولي وقدرتها على مقاومة الغليان وهذه الميزة جعلته صالحاً في تجارب التمنيع وتحفيز المصول المضادة (Brooks *et al*., 2010) يوجد اكثر من 160 تركيباً مختلفاً من هذا المستضد في سلالات مختلفة لبعض الانواع البكتيرية (Christian and Chris, 2002) وجد ان المستضد O-Antigen في جنس *Klebsiella* اقل تنوعاً بالنسبة للانواع الاخرى التابعة للعائلة المعوية (Perepelov *et al.*,2015) اما المستضد السوطي الذي يرمز له بالرمز H-Antigen الذي يحتوي على البروتين السوطي والذي يتالف من مجموعة من المحددات المستضدية توجد هذه المستضدات فقط في الانواع التي لها القدرة على الحركة ، من صفات هذا المستضد انه غير ثابت اتجاه الكحول والحوامض بخلاف المستضد الجسمي (Warren, 2012) .

تم التعرف على أكثر من 56 مستضداً سوطياً تابعاً لبكتريا *E.coli* (Blanco *et al*., 2005) اما النوع الثالث من المستضدات يسمى بمستضد المحفظة K-Capsule (Antigen) والذي يقع الى الخارج من المستضد الجسمي O-Antigen يوجد في بعض الانواع البكتيرية التابعة للعائلة المعوية ومنها بكتريا *Klebsiella* إذ تمتلك حوالي 88 نمطاً من مستضد المحفظة يتكون هذا المستضد في بعض الانواع من متعدد السكريات والبروتينات (Yeh *et al*., 2009 ; Brooks *et al*., 2010)

2-1-2 عوامل الضراوة Virulence Factor

تعرف الضراوة Virulence على انها مقياس لدرجة الامراضية Pathogencity التي تعني القابلية النوعية للبكتريا على احداث المرض ويعود لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة التي توجد بعضها ضمن التركيب الخلوي وبعضها الاخر يفرز خارج الجسم (Brooks *et al*., 2010). تمتلك العائلة المعوية العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها في احداث الامراض المختلفة ومنها الذيفانات الداخلية Endotoxin والتي تتمثل بمتعدد السكريات الشحمي Lipopopolysaccharide(LPS) وهو موجود ضمن اجناس بكتريا العائلة المعوية ويتألف من ثلاثة اجزاء مهمة هي Lipid A ومستضد O-Polysaccharide والمستضد السطحي الكبير (O-antigen) الذي يؤدي دوراًهاماً في امراضية وضراوة البكتريا واحداث الالتهاب والانتنان كما في بكتريا *K. peumoniae* (Evrard *et al*., 2010). هناك ايضا ذيفانات خارج خلوية Exotoxin كما في بكتريا *E.coli* إذ لها القدرة على انتاج الذيفانات المعوية Entrotoxin، والذيفان الشبيه بالذيفان المنتج من قبل بكتيريا *Shigella dysenteria*e و المتمثل بذيفان Shiga toxin الذي يؤثر في تصنيع بروتينات الخلايا الطلائية المعوية الضرورية في عمليات الايض (Brooks *et al*., 2010) او انتاج الهيمولايسين وهو من الذيفانات الخارج خلوية الخطرة وله تأثيرات في اغشية الخلايا ويسبب تحللها ومن اهم الخلايا الهدف لهذا الذيفان هو خلايا

الـدم الحمـر للإنسـان والحيوانـات والـبعض منهـا لـه تـأثيرات حتـى فـي كريـات الـدم البـيض (Tomita and Kamio, 1997) . تفرز بكتريا *E.coli* انواعا مختلفة من ذيفان الهيمولايسين، والنوع الاكثر شيوعاً هو α- hemolysin (Rodriguez, 2002).

البكتريوسينات Bacteriocin هي احد عوامل الضراوة وهي عبارة عن ببيتدات بكتيرية ولها خصائص مضادة لنمو الاحياء (Rodriguez *et al* .,2002) تنتج من قبل البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وتاخذ مسميات مختلفة اعتمادا على النوع البكتيري الذي ينتجها فمثلا بكتريا *K.peumoniae* تنتج البكتريوسين يسمى *Klebocin* والمنتج من قبل *Serratia marcescens* يسمى marcescens والبكتيريوسين المنتج من *Enterobacter cloaca* يسمى cloacin (Singh and Banerjee, 2008) اشارت احدى البحوث بان سلالات بكتريا القولون تعد منتجة جيدة للبكتريوسين (Ali, 2012).

تعد المحفظة الخط الدفاعي الاول للبكتريا وتتكون من السكريات المتعددة التي تعد من أهم السكريات التي تحيط بالخلايا البكتيرية لاسيما في بعض افراد العائلة المعوية كونهُ أحد أهم عوامل الضراوة وصفة مهمة لاحداث المرض في هذه العائلة إذ تكفي الكميات القليلة منه لمقاومة العوامل المناعية لجسم المضيف (Evrard *et al*., 2010) تم التعرف على تركيب المحفظة في كل من بكتريا *K.pneumonia* وبكتريا *E.coli* (Amako,1988) تتميز بعض الانواع المرضية للبكتريا *Enterobacter* بامتلاكها صفة المخاطية وذلك لاحتواء هذه الانواع على تركيب المحفظة ويعتقد ان المسيطر على هذه الصفة مجموعة من الجينات محمولة على بلازميد كبير الحجم يعتقد انه اكتسب من *K. pneumonia* الموجودة في الامعاء (Tomas, 2001).

ومن عوامل الضراوة التي تمتلكها العائلة المعوية هي السايد فورات Siderophores وهو عبارة عن مركبات كلابية او تعرف بحوامل الحديد ذات وزن جزيئي واطئ والذي يعمل على سحب الحديد من مضيفاتها ، تنتج العائلة المعوية ثلاثة انواع من السايد فورات Yersiniabactin ,Aerobactin

Enterobactin (Lawlor *et al*., 2007) .ان اكثر انواع الساید فورات انتاجاً هو الساید فور Enterobactin إذ تشكل نسبة انتاجه 90% اما الانواع الاخرى تنتج بشكل اقل.تتواجد انزيمات البيتالاكتمايز B-Lactamse بشكل كبير في افراد العائلة المعوية ويشفر لها العديد من الجينات التي تكون محمولة على اما الكروموسوم Chromosome اوعلى البلازميدات كبيرة الحجم اوالترانسبوزون (Chong *et al*., 2011).

الغشاء الحيوي biofilm احدعوامل الضراوة الموجودة في هذه العائلة وهو عبارة عن تجمعات حيوية وغير حيوية على سطوح الاجسام وهو تركيب فائق التعقيد بالنسبة للبكتريا وهو يعرف ايضا بالطبقة الخارج خلوية وهذه الطبقة تتشكل عادة من البروتينات والجزئيات الدقيقة الاخرى والكربوهيدرات والأحماض النووية مثل DNA (Branda *et al*.,2004). اظهرت احدى الدراسات المحلية للتحري عن قابلية بعض العزلات المرضية على تكوين الاغشية الحيوية ان اعلى نسبة لتكوين الاغشية ظهرت في بكتريا *Citrobacter freundii* و *Klebsiella spp* و*E .coli* وبنسبة 100 % (Al Omari *et al*., 2013).

2-2 انتشار افراد العائلة المعوية ومعيشتها

تتواجد اجناس العائلة المعوية في المياه والتربة واجسام الحيوانات والنباتات فمثلا جنس *Escherichia* النبيت الطبيعي لامعاء الانسان والحيوانات ذوات الدم الدافئ والنوع *E. blattae* في القناة المعوية للصرصر(Brenner *et al*., 2004) والجنس *Klebsiella* يتواجد في القناة الهضمية والتنفسية للإنسان وبعض الحيوانات وفي التربة والمياه والنباتات والحبوب والفاكهة (Warren, 2012) والاجناس *Citrobacter* و *Enterobacter* و *Morganella* و *Proteus* و *Salmonella* و *Serratia* تعزل من براز الانسان وعدد كبير من الحيوانات ذوات الدم الدافئ والبارد والتربة والمياه (Brooks *et al*., 2010). تنتشر افراد هذه العائلة بشكل واسع في المنازل

اذ يمكن ان تتواجد في المطابخ وعلى ادوات المطبخ فمثلاً يمكن ان نجدها على الواح التقطيع . (Guarner and Malagelada, 2003) .

3-2 ادلة التلوث المايكروبي Bacterial pollution indicators

تعتمد افراد العائلة المعوية كدليل اساسي لتلوث المياه والتربة والخضروات واللحوم بالمخلفات البرازية للإنسان والحيوانات المختلفة، إذ عدت بكتريا *E. coli* من اكثر الانواع المفيدة المستعملة كدليل او مؤشر للتلوث البرازي للمياه وهي لاتشكل خطرا على صحة الانسان لكن تستعمل كمؤشرالى وجود مخاطر على الصحة (Tyagi *et al*., 2006) .ان احد اهم اسباب استعمال القولونيات كمؤشر للتلوث هو وجودها باعداد كبيرة في البراز اكثر من اي مكان اخر في البيئة حيث وجد ان نسبة 90% من مجموع القولونيات المعزولة من المياه هي بكتريا *E.coli* (Hurst *et al*., 2002) ولكن الاعتماد على القولونيات كدليل للتلوث البرازي له مساوئ ايضا منها ان هذه البكتريا قد تاتي من براز الانسان او من براز الحيوان ومن ثَم فان من الصعب الكشف او التعرف عن سببب التلوث لتنوع مصادره لذالك قد يلجا في بعض الاحيان الى الاعتماد الى براز مجموعة بكتريا *Streptococcus* واستعماله كمؤشر للتلوث (FAO, 2005) .هناك انواع اخرى تابعة للعائلة المعوية يمكن ان تستعمل كدليل لتلوث المياه من اهمها *K.peumoniae* و *Serratia marcencese, Enterobacter aerogenes* و*Proteus vulgaris* وغيرها من الانواع التي تعود الى مجاميع بكتيرية مختلفة والتي تصل الى البيئة من مصادر عديدة منها محطات معالجة المياه ،الدواجن ، الماشية ،مضخات الصرف الصحي (Akoachere *et al* ., 2008) ان هذه المؤشرات الموجودة في البراز قد تسبب امراضا هامة منها الالتهابات المعوية والاسهال..، هنالك اشارات تؤكد الى ان الوفيات البشرية نتيجة الامراض المنقولة عن طريق البراز الذي يصل للمياه تتجاوز خمسة ملايين شخص سنويا (Olaolu *et al*., 2014) .

4-2 طرائق التشخيص Diagnosis method

2-4-1 الطرائق المظهرية والبايوكيميائية

Biochemical and morphological method

تعتمد الطرائق التقليدية البايوكيميائية في تشخيص الاجناس والانواع التابعة للعائلة المعوية. إذ يمكن استعمال من 50 الى اكثر من 200 اختبار بايوكيميائي للتشخيص والتصنيف تتضمن هذه الاختبارات القدرة على تخمير السكريات بانواعها المختلفة مثل الكلوكوز، اللاكتوز،D - رايبوز مانتول، رافينوز، مالتوز، زايلوز، وبعض أنواع البكتيريا لديها القدرة على تخمر السكريات خلال 24 ساعة مثل بكتريا القولون *E. coli* وبعضها قادر على تخميرها خلال 3 أيام وبعضها خلال أسبوع ويتضح لدينا مما سبق أن عملية التخمر عملية هامة كدراسة تصنيفية وتفريقية تميز بين الأنواع البكتيرية، وتعتمد اختبارات القدرة على افراز الانزيمات المهمة في الفعاليات الحيوية مثلًا اليوريز، جيلاتينيز، الفوسفاتيز (Forbes *et al* ., 2007) .

الاوساط الزرعية الاختيارية المعتمدة في تشخيص العائلة المعوية مثل وسط MacConkey(MAC) و Hektoen enteric (HE) و Eosin methylene blue (EMB) و Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) Salmolla-ShigellAgar (SSA) و (Brenner *et al*.,2004; Forbes *et al*., 2007) ويعتمد على نظام التشخيص البايو كيميائي باستعمال الحاسوب (Brenner *et al* ., 2004) و نظام API 20E (analytical profile index) الذي يعتمد على 20 اختباراً بايوكيميائياً و جهاز الفايتك Vitek-2 الذي يحتوي على 64 اختباراً بايوكيميائياً لتشخيص الاحياء المجهرية بشكل ألي .

2-4-2 الطرائق المصلية Serotype method

قد تم اكتشاف الأنماط المصلية من قبل Rebecca Lancefield في عام 1933، وهي نوع من انواع التصنيف الذي يقوم على اساس تراكيب او جزئيات موجودة على سطح الخلية البكتيرية (Alan and Susan, 2009).وتعتمد هذه الاختبارات على تفاعل المضاد مع المستضد وهي من أهم الطرائق في الدراسات البكتريولوجية الوبائية للتعرف على السلالات والأنماط المصلية المعنية والمسؤولة عن إحداث الاصابات الوبائية (Vidott *et al.*, 2000). فمثلاً عرفت أنماط مصلية عديدة ترجع لسلالة بكتريا القولون الممرضة للأمعاء Enteropathogenic *E.coli* (EPEC) *E.coli* وهي : (O39:NM وO88:H25 و O111:H8 و O111:H9 وO126:H12 و O142:H4 O127:H4 و O157:H8 و O157:H45) (Jensen *et al.*,2007) وتحتوي *K.pneumoniae* على 8 انماط للمستضد O ، الاكثر شيوعاً بين السلالات الضارية هو (O1,O2). وتحتوي على 88 نمطاً للمستضد K .ويعد النمطان K6-K1 هما اكثر الانماط خطورة من الناحية السريرية وبالتحديد تتركز الضراوة العالية على النمطين المصليين K1 وK2 لما تحتويه هذه الانماط من جينات الضراوة (Yeh *et al.*, 2009) .

3-4-2 الطرائق الجزيئية Molecular Method وتشمل:

1- تحديد نسبة الكوانين الى السايتوسين G+C % content
2- تهجين الدنا DNA-DNA hyperdization
3- التنوع البلازميدي
4- تسلسل القواعد النيتروجينية لجينات محددة
5- التقارب الوراثي باستعمال 16S rRNAو 18Sr RNA (Svedberg unit)
6- restriction fragment length polymorphisms (RFLP)

7-amplified fragment length polymorphisms(AFLP) (Sangdee,2008)

ان ما يعيق عملية التطور في مجال الكشف عن البكتريا والكائنات الدقيقة في البيئة والتقنيات الحيوية هو عدم وجود نظام تشخيص موثوق به (Goodfellow and Donnell, 1993) وغالباً ما تكون المحاولات لتحديد الانواع البكتيرية الجديدة المعزولة من البيئات الطبيعية كالمياه والتربة والمحيطات والبحار غير مرضية. وان الاعتماد على طرائق التشخيص المظهرية التقليدية يتطلب وقتاً طويلاً والعمل بحساسية اكثر (Sneath *et al*.,1986) مع ظهور تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR (Polymerase Chain Reaction) وتطورها والتعرف على انواع مختلفة منها REFLP-PCR وAFLP-PCR , RAPD-PCR وReal- Time-PCR ساهم بشكل كبير في تشخيص بعض انواع البكتريا التي كان من الصعب تشخيصها بالطرائق التقليدية (Sabat *et al*., 2000) إذ ان تقنية Real-time PCR تستعمل لتشخيص الانواع البكتيرية دون الحاجة الى عملية زرعها إذ تستعمل للكشف عن انواع بكتيرية مختلفة منها البكتريا البرازية وتعد طريقة سريعة في التشخيص (Rousselon *et al*., 2004) اما REFLP-PCR هي تقنية للتشخيص بالاعتماد على تحديد العديد من القطع الناتجة من عمليات القطع للجينوم البكتيري بوساطة انزيمات القطع Restriction enzyme إذ تنتج المئات من قطع DNA (Panneerchelvam and Norazmi ,2003) .

4-4-2 تقنية التسلسل لمورثة 16S rRNA

يتألف الرايبوسوم البكتيري 70S من وحدتين فرعيتين subunit وهي 50S و 30S. كل وحدة فرعية تتألف من جزيئيتين او واحدة من جزيئة الرنا الرايبوسومي وعدد من سلاسل الببتايد المتعدد. تحتوي الوحدة الفرعية الكبرى LSU(Large subunit) 50S على 5S, RNA 23S rRNA وتحتوي الوحدة الفرعية الصغرى SSU(Small subunit) 30 S على 16SrRNA (Prescott *et al*., 2005) .

في العقدين الماضين تم استعمال تقنية تعتمد على الحمض النووي الرايبي (RNA) التي تعد ثورة في معرفة التنوع الميكروبي لاسيما للاحياء الدقيقة المعزولة من البيئة (Morris *et al*., 2002) كذلك امكن استعمال التسلسل الجيني لمورثة 16SrRNA في التشخيص وايجاد العلاقات لتطورية بين السلالات البكتيرية المختلفة وهذه التقنية ساهمت في اعادة تصنيف الكثير من الانواع وكذلك تم التعرف على انواع بكتيرية جديدة لم تكن معروفة سابقا (Brenner *et al*., 2004) يحتوي هذا الجين على العديد من المناطق الثابتة التي تستعمل في تصميم البرايمرات المعتمدة في تصنيف المجاميع والتي تحتوي على تسع مناطق متغيرة تعتمد في التمييز بين المجاميع التصنيفية والانواع (Clarridge, 2004) يبلغ طول جين 16SrRNAفي بكتريا القولون *E.coli* 1500 زوج قاعدي ومعظم الكائنات الحية الاخرى تمتلك الطول نفسه مع زيادة او نقصان في 50 زوجاً قاعدياً (Walt *et al*., 2012) .

5-4-2 البلازميدات Plasmid

وهي عبارة عن اجسام كروموسومية اضافية متنقلة ،تتضاعف بشكل ذاتي ومستقل عن كروموسوم البكتريا .على الرغم من ان البلازميدات تكون نسبة صغيرة من الحمض النووي DNA الا انها تشمل 30% اواكثر من التنوع الوراثي في الجينات (Thomas, 2000) . يظهر الهيكل الرئيسي المكون للبلازميدات بشكل فسيفساء(Mosaic) إذ تتكون من العديد من الجينات المتنوعة في مصادرها (Osborn *et al* ., 2000) يتكون هذا الهيكل من مناطق تضاعف ومناطق الانتقال اما الجينات الملحقة فانها تمنح صفات المقاومة للمضادات الحيوية وعوامل الضراوة (Tauch *et al* ., 2002) بالرغم من الاهمية المحتملة للبلازميدات في الطب والصناعة والزراعة الا ان الفهم غير مكتمل في تكوين ومصدر معظم البلازميدات الموجودة في الطبيعة إذ تتطلب دراسات واسعة لتوفير انظمة لفهم علم الاوبئة الجزيئي للبلازميدات (Van Elsas *et al*.,2000)

ان التحليل البلازميدي Plasmid profile من اوائل طرائق التشخيص بالاعتماد على DNA كأساس في الدراسات الوبائية (Mayer, 1988) .

تعتمد الانزيمات القاطعة Restriction enzyme في دراسات البلازميدات، وتعد طريقة سهلة وفعالة في تصنيف العديد من السلالات التابعة لافراد من العائلة المعوية منها *Klebsiella* و*Enterobacter* و*Serratia* واجناس اخرى تابعة لمجاميع بكتيرية مختلفة (Robet, 1999) .

5-2 أجناس البكتريا المعوية المخمرة لسكر اللاكتوز

Escherichia spp 1-5-2

تم التعرف عليها لأول مرة من قبل طبيب الأطفال الألماني Theodor Escherich عام 1885م ، إذ تم عزلها من براز أطفال أصحاء حديثي الولادة كبكتريا فلورا متعايشة وغير مرضية في الأمعاء الغليظة حتى عام 1935 عندما لوحظ دورها في انتشار الاسهال بين الأطفال (Feng *et al.*, 2002) وهي عصيات مستقيمة سالبة لصبغة كرام، لا تكون الأبواغ،متحركة بأسواط متعددة،هوائية اختيارية، تنتج حامض وغاز من سكر الكلوكوز واللاكتوز وتخمر سكر السوربتول ولا تحلل اليوريا وسالبة لأنزيم الاوكسديز ولا تنتج غاز H_2S تولد الاندول وتفرز انزيم β.galactosidase ولايمكنها تحليل الجلاتين يضم هذا الجنس العديد من الانواع مثل : *E.adecarboxylata,E.blattae,E.fergusonii,E.hermanii,E.vulneris*

(Brenner *et al.*,2004). تتواجد وبشكل طبيعي في القناة الهضمية للانسان والحيوان ونادراً ما تسبب الامراض الا انها ايضا تعد مسببا لاكثر الامراض شيوعاً وتتميز السلالات المرضية Pathogenic strains بانتاج سموم Exotoxins وهذه السلالات هي :

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)و Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)و Enteroaggregative *E. coli* (EAEC)

Enterohaemorrhagic *E.coli* (EHEC)

(Brooks *et at*.,2010) Diffusely Adherent *E.coli* (DAEC) (EAEC)

ومن الامراض الشائعة التي تسببها هذه البكتريا الالتهابات المعوية ،المسالك البولية ، تسمم الدم التهاب السحايا للاطفال حديثي الولادة (Wult *et al*., 2000) . تنتشر هذه البكتريا بشكل واسع في الطبيعة إذ وجد في احد البحوث المحلية التي اجريت في محافظة بابل انتشار بكتريا *E.coli* في بيض واجهزة التفقيس إذ تشترك في احداث التلوث الميكروبي لبيض التفقيس (الحيران وفهد ,2012) تمتلك بكتريا *E.coli* العديد من عوامل الضراوة التي تسهل غزو النسيج منها افراز الذيفان المعوي (Enterotoxin) والهيمولايسين الذي يحلل الدم والذي تنتجه معظم السلالات الممرضة (Brooks *et al* ., 2010) . من عوامل الضراوة الاخرى هي امتلاكها عوامل الالتصاق Adhesion اذ يعد وجودها احد عوامل الفوعة التي تشكل الخطوة الاولى في تموقع البكتريا وتمركزها ومن ثم تكاثرها ومن ثَم احداث الاصابة (Wult *et al*., 2000) تنتج بكتريا *E.coli* انواعاً مختلفة من الخمل fimbrae في المراحل المختلفة من الاصابة وهذا يعد مهماً في فوعة بكتريا مثل Fim H الذي له دور في امراضية البكتريا التي تصيب المسالك البولية (Connel *et al*.,1996) وكذلك انتاج البكتريوسين إذ تشير احدى البحوث بان سلالات بكتريا *E.coli* تعد منتجة جيدة للبكتريوسين (Ali, 2012) تحتوي بكتريا القولون العديد من الجينات المحمولة على البلازميدات التي تعد احد عوامل الضراوة التي تجعل البكتريا تمتلك مقاومة متعددة للمضادات الحيوية (Shierack *et al*., 2006).استعملت بكتريا *E.coli* في تطبيقات واسعة النطاق منها في مجال الصناعة والمجالات الطبية وفي مجال تقنية الحمض النووي DNA . (Yoo *et al*., 2009)

Klebsiella spp. 2-5-2

وهي بكتريا سالبة لصبغة كرام عصوية الشكل،غير مكونة للسبور وغير متحركة، وتكون محاطة بكبسولة المكونة من السكريات المتعددة Polysaccharide موجبة لفحص السترات واليوريا وتظهر بشكل مستعمرات مخاطية وذات لون وردي على وسط الماكونكي نتيجة لقدرتها على تخمير سكر اللالكتوز (Brenner *et al*., 2004) .

يعد جنس الكلبسيلا من اقدم اجناس بكتريا العائلة المعوية (Drancourt *et al*.,2001) ،اكتشفها العالم الالماني Edwin klebs عام 1834 وسميت باسمه وشخصت اول مرة عام 1882 من قبل العالم Von Frisch (Umeh *et al* ., 2006) ، تتواجد هذه البكتريا على الجلد والبلعوم والقناة الهضمية كما إن تواجدها في التربة والمياه جعلها موجودة في الفواكه والخضروات وهي واحدة من اهم المسببات المرضية الانتهازية لعدة حالات سريرية مهمة (Baxamusu, 2011) مثل اخماج الجهاز التنفسي، اخماج الجهاز البولي وتعد من مسببات الجرثومية المهمة التي تشترك في احداث الانتان الدموي Septicemia واخماج الجروح والحروق وحالات الاسهال (Shubh, 2002). تسبب هذه البكتريا اصابات مختلفة لدى مرضى السكري ومرضى الرئة المزمن والاشخاص ذوي المناعة الضعيفة ،تعد هذه البكتريا من المسببات المهمة للاصابات المكتسبة بالمستشفيات (Sidjabat *et al*.,2011) . تم تسجيل سبعة انواع تابعة لجنس *Klebsiella* وهي : *K.atlantae, K.edwardsii, K.oxytoca, K.aerogenes ,K.ozaena,K.rhinoscleromatis,K.pneumoniae* (Brenner *et al*.,2004).

تم اعادة تصنيف *K.ornitholytica,K.planticola* و*K.terrigena* ضمن جنس جديد هو جنس *Raoultella* (Drancourt *et al*., 2001). تملك هذه البكتريا عدة عوامل تساعدها في احداث الاصابة ومنها المحفظة إذ يعد هذا التركيب من التراكيب المهمة في الامراضية (Highsmith, 2002) فضلاً عن الشعيرات Pili التي تساعد هذه البكتريا في الالتصاق على

الاسطح المخاطية للانسجة الحيوانية بذلك فانها تسهل عمل البكتريا في مكان الاصابة وكذلك فان طبقة عديد السكريات الدهنية Lipopolysaccharide في جدار البكتريا التي تعد كسم داخلي Endotoxin لها تأثيرات مهمة في احداث الاصابة داخل جسم الكائن الحي (Cryz *et al* ., 2000) .ان تخليق متعدد سكريد المحفظي المرتبط بصفة فرط اللزوجة المخاطي التي تحملها السلالات الضارية لبكتريا *K.pneumoniae* التي تسبب امراضاً خطيرة ترتبط بوجود جين magA(mucoviscosity-associated gene) ووجد ايضا ان هذه البكتريا تنتج انزيمات البيتالاكتميز واسعة الطيف التي تبطل عمل البنسلينات والسيفالوسبورينات (Katsanis, 2005) فضلاً عن انتاجها للبكتريوسين .

في دراسة محلية اجريت للبحث عن عامل ضراوة البكتريوسين في بكتريا *Klebsiella* اظهرت ان الجين المسؤول عن انتاجه هو بلازميدي الموقع وتم تاكيده عن طريق اجراء عملية الاقتران الوراثي وذلك بنقل البلازميد من بكتريا *Klebsiella* الى بكتريا *E.coli* الخالية من البلازميد إذ اصبحت الاخيرة منتجة له (الزبيدي وعبد الحسين,2011) .

Enterobacter spp 3-5-2

عصيات سالبة لصبغة كرام ،لاهوائية اختيارية معظم اجناسها تتحرك بوساطة اسواط محيطية تخمر سكر الكلكوز وتنتج الحامض، موجبة لفحص فوكس بروسكاور وسالبة للمثيل الاحمر والدرجة المثلى لنموه هي 30 °م ، 80% من انواعها تكون محاطة بمحفظة (Farmer *et al*., 2007) الصفة الكيموحيوية التي تميز افراد هذا الجنس عن غيرها من البكتريا المعوية هي قدرتها على تثبيت النتروجين في الظروف اللاهوائية بسبب احتوائها على انزيم Nitrogenase الذي يمسخ بوجود الاوكسجين (Ingraham *et al*., 1986) .يتواجد انواع هذا الجنس في بيئات مختلفة مثل التربة والمياه والمجاري واللحوم وبيئات المستشفيات وعلى جلد الانسان والحيوان (Nyenje *et al* ., 2012) يضم هذا الجنس عدة انواع وهي : *E. cloaca*

E.aerogenes و *E.luwigii,E.asburiae,E. kobei ,Esakaskii,. E. hormeachei* *E.agglomerans,E.gergoviae* ويعد النوع *E.cloaca* هو الاكثر امراضية (Brenner *et al*., 2005) عرف هذا الجنس اول مرة من قبل العالمين Edword و Horman وبقيت المعلومات عنه قليلة الى نهاية القرن التاسع عشر(Dworkin *et al*., 2006) .

تعد هذه البكتريا هي الاكثر شيوعاً بين افراد الممرضات السالبة لصبغة كرام المرتبطة مع الاصابات المكتسبة بالمستشفيات (Fraser *et al* ., 2011). تنتشر هذه البكتريا في انحاء العالم كافة وتعد الانواع *E. aerogenes, E.cloaca* مسؤولة عن غالبية الإصابات المعوية التي يسببها جنس *Enterobacter* إذ تقدر نسبة الاصابة 65-75٪ و 15-25٪، على التوالي (Kasper *et al*., 2004) تسبب العديد من الامراض منها التهاب القناة البولية والتهاب الجلد والانسجة الرخوة والقناة الصفراوية والجروح والجهاز العصبي المركزي (Mokracka *et al*., 2011). تقترن هذه البكتريا بحالات الوفيات لاسيما تجرثم الدم وذات الرئة (Kasper *et al*., 2004) تمتلك انواع بكتريا *Enterobacter* المرضية عوامل ضراوة تمكنها من احداث الالتهابات مثل الذيفانات المعوية والهيمولايسين وتنتج سماً شبيهاً بالشيكا Shiga like toxin الذي تنتجه بكتريا *E.coli*، في دراسات لاحقة بينت قابلية هذه البكتريا على تكوين Biofilm الذي يؤدي دوراً مهما في قابلية الالتصاق ببروتينات الجسم المختلفة (Lina *et al*., 2012) فضلا عن امتلاكها صفة المقاومة المتعددة لاسيما للمضادات البيتالاكتم وذالك لانتاج انزيمات β- lactmase (Kremer and Hoffmann, 2012) .

Serratia spp 4-5-2

عصيات سالبة لصبغة كرام ،غير متحركة موجبة لفحص السترات موجبة لفحص الكتاليز وسالبة لفحص الاوكسيديز صنف هذا الجنس ضمن مجموعة بكتريا العائلة المعوية ويمكن تميز جنس

Serrratia عن باقي الاجناس الاخرى للعائلة المعوية من خلال انتاج هذه البكتريا لثلاثة انزيمات خاصة وهي DNAase Lipase ,gelatinase (Giri *et al*., 2004) تعد بكتريا *Serratia marescens* النوع المرضي الأهم ضمن جنس *Serratia* فضلاً عن ان هناك انواع اخرى ضمن هذا الجنس وهي: *S.entomophila, S.ficairs, S.fonticola,* S.*grimesii,S. liguefaciens S. marcescens,S.odorifera,S.plymuthica,S.proteamaculans,S.rubidae* (Brenner *et al*., 2004) . يمتلك افراد هذا الجنس القابلية على التعايش في البيئة في ظروف مختلفة فيمكن ان تعزل من المياه والتربة والنباتات والحيوانات والانسان ويكون البعض من انواعها رمية والاخرى متطفلة (Greenwood *et al*., 2002). تسبب انواع هذا الجنس العديد من الامراض منها التهاب السحايا وذات الرئة واصابة القناتين البولية والتنفسية والتهاب قرنية العين والاذن الوسطى ، اذ تعد ممرضاً انتهازياً (Shigemura *et al*., 2009) .

هناك العديد من الصفات التي تساهم في امراضية هذه البكتريا ومنها امتلاكها لمستضدات عوامل الاستعمار CFA\1,CFA\2,CFA\3 (colonization factor) والتي تكون محمولة اماعلى البلازميد اوترانسبوزون (Ofek *et al*., 1997) تنتج هذه البكتريا نوعين من الصبغات وهي صبغة Prodigiosin الحمراء اللون وصبغة Pyrimin (Naumiulk *et al*.,2004) . تعد صبغة البروجيوسين وسيلة دفاعية تستعملها هذه البكتريا لمقاومة المضادات الحيوية (Dhamad,2009) .

من احد الاسباب التي تجعل هذه البكتريا مقاومة للمضادات الحيوية هي امتلاكها لانزيمات المحللة للمضادات الحيوية عديدة منها انتاجها لأنزيم CTX_M (انزيمات تحطيم السيفوتاكسيم) إذ ان جينات هذا الانزيم تكون محمولة على بلازميدات اقترانية كبيرة الحجم التي تنتقل بين اجناس العائلة المعوية (Baraniak *et al*., 2002) ومن جانب اخر تتميز هذه البكتريا بانتاج العديد من الانزيمات الخارج خلوية وبكميات كبيرة مثلNuclease Protease, Lipase مما يؤهل استغلالها

في تقنيات الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية وهذا يزيد من الاهتمام بهذه البكتيريا من الناحيتين الطبية والاقتصادية (Bell *et al*., 2002) .

Citrobacter spp 5-5-2

يوجد جنس *Citrobacter* بشكل طبيعي في براز الانسان والحيوانات الاخرى فضلًا عن وجوده في المياه والتربة والاغذية والمجاري، عرف موخراً كممرض انتهازي إذ تم عزله من عينات سريرية مختلفة كعينات البراز والادرار وعينات القشع والدم إذ تعد الانواع التابعة لها احدى مسببات اخماج المستشفيات لاسيما في الاشخاص ذوي المناعة الضعيفة (Kim *etal*.,2003). يضم هذا الجنس عدة انواع حسب مصنف بركز هي *,C.amalonaticus,C.fameri,C.rodentium,C.gillenii,C.sedlakii,C.koseri,C.werk manii,C.murliniae*. (Brenner *et al*., 2004) في دراسة محلية لعزل انواع مختلفة لهذا الجنس وجد من بين الأنواع الثلاثة التي عزلت *C. farmer, C. braakii* و*C. freundii* النوع *C. freundii* هو الاكثر شيوعاً إذ تشغل نسبة 75% من العزلات سريرية 50% من عينات البيئية من مجموع العينات التابعة لهذا الجنس (جواد , 2013) تسبب عدة امراض منها التهاب القناه البولية، اصابات مجرى الدم وانتان داخل البطن والتهاب السحايا في الاطفال (Pepperell *et al*., 2002).ان مقاومة مضادات البيتالاكتم كالبنسلينات والسيفالوسبورينات تعود بالدرجة الاساس الى انتاج بكتريا *Citrobater* لانزيمات ß-Lactamase (Perez *et al*., 1999) ان مقاومة المجموعة الكلايكوسيدية الامينية تعتمد على عدة ميكانيكيات اهمها امتلاك البكتريا انزيمات تحوير الجنتامايسين (Miller *et al*.,1995) اما مقاومة Chloramphenicol Tetracycline هي بسبب عامل (R-Factor) القابل للانتقال من بكتريا الى اخرى اذ تم الكشف عن هذا العامل في حوالي 50% من سلالات البكتريا التابعة لـ*Citrobacter* (Chowdhury *et al*., 1994).

Raoultella spp 6-5-2

عصيات سالبة لصبغة كرام،هوائية غير متحركة مخمرة لسكر اللاكتوز،محاطة بالمحفظة وترتبط ارتباطا وثيقا بجنس *Klebsiella* وكانت تعرف بـــ *Klebsiella planticola* ولكن تم اعادة تصنيفها عام 2001 كجنس منفصل عنها و ضمن مجموعة بكتريا العائلة المعوية (Drancourt *et al* ., 2001) تتواجد هذه البكتريا في التربة او المياه اوحتى الاسماك وكانت تعزل من عينات سريرية ومن بيئة المستشفيات (Lam and Salit, 2014) يضم هذا الجنس ثلاثة انـــواع مســـجلة وهـــي *R.terrigena,R.ornithindytica,R.planticola* ويعـــد النـــوع *R.planticola* الاكثر شيوعاً (Brenner *et al*., 2004) يعد هذا الجنس من الاجناس صعبة التشخيص بوساطة طرائق التشخيص الروتينية منها التفاعلات البايو كيميائية والصفات المظهرية إذ من الممكن الخلط بينها وبين جنس الكليبسلا لاسيما النوع *K.oxytoca* (Pulian *et al*., 2009) يتم تشخيص هذه البكتريا عن طريق نظام Vitek-2 او عن طريق 16S rRNA اوعن طريق جين rpoB (RNApolymeraseBeta)(Petti,2007) وتمتلك هذه البكتريا القدرة على انتاج الهستامين مسببه داء الاسقربوط وذلك عندما يتم تناول الاسماك البحرية بشكل مفرط ومطهو بصورة سيئة (Drancourt *et al*., 2001) يسبب النوع *R.plant*icola اصابات محدودة ونـــادرة , منهـــا التهابـــات البنكريـــاس و التهابـــات الاقنيـــة الصـــفراوية وتعفـــن الـــدم (Yokota *et al*., 2012) كذلك تسبب حمى النفاس (Karkhanis *et al*., 2011) .

6-2 الانواع البكتيرية غير التابعة للعائلة المعوية التي تنمو على وسط الماكونكي وتظهر مستعمراتها ملونة

نتيجة لنمو بعض الانواع قيد الدراسة المعزولة من مصادر مختلفة على وسط الماكونكي ومشابهتها بهذه الصفة للانواع المخمرة لسكر اللاكتوز اونتيجة انتاجها الصبغات التي تظهر ايضا الصفة نفسها لذلك ذكرت بشيء من الايجاز.

Aeromonas hydrophila 1-6-2

اهم مسبب مرضي في عائلة Aeromonadaceae إذ تسبب امراضا عديدة للإنسان اهمها التهاب المعدة والامعاء والشائعة لدى الاطفال الرضع (Vellibs, 2002) وتسبب التهاب الجروح والانسجة الرخوة إذ يحدث التلوث في الجروح عند التلامس مع الماء الملوث بها ويمكن ان تسبب الانتنان الدموي والتهاب العين وتسبب هذه البكتريا كذلك اخماجاً في المسالك البولية والمسالك التنفسية والتهاب السحايا وتعد هذه البكتريا من الممرضات البصرية في اغلب الحالات لاسيما عند الاشخاص الذين يعانون من نقص المناعة وامراض الكبد (Minnaganti *et al*., 2000) تنمو على وسط الماكونكي وتظهر بشكل مستعمرات وردية (Forbes *et al*., 2007).

Chrysemonas luteoda 2-6-2

بكتريا سالبة لصبغة كرام متحركة وتنمو في ظروف هوائية، عصوية الشكل تظهر مستعمراتها الملساء ذات صبغة صفراء الى برتقالي بعد 48 ساعة من الحضن، سالبة لفحص الاوكسيدز تنتشر في بيئات مختلفة منها في الماء او التربة وفي بيئات رطبة اخرى (Freney *et al*., 1988) سجلت هذه البكتريا كممرض جرثومي يصيب الانسان ويؤثر بشكل خاص في المرضى الذين يعانون من اضطرابات صحية منها تسمم الدم والتهاب السحايا والتهاب شغاف القلب وسجلت

الاصابة لهذه البكتريا في دولة المغرب العربي (Chihab *et al*., 2004) كانت سابقا تصنف على انها *Pseudomonas luteoda* ثم تم اعادة تصنيفها كجنس منفصل يعرف ب *Chrysemonas luteoda* (Kodama *et al*., 1985).

Burkholderia cepacia 3-6-2

عصيات سالبة لصبغة كرام في بعض الاحيان تكون بشكل عصيات قصيرة،تنمو في درجة حرارة تتراوح بين 25-27 °م اما الدرجة الحرارية المثلى لنموها فهي تتراوح بين 30-35 °م ، ،هوائية متحركة بوساطة اسواط قطبية ،منتجة للصبغات غير المتالقة (Jewell, 2000) صنفت هذه البكتريا لاول مرة ضمن جنس بكتريا *Pseudomonas* ولكن تم اعادة تصنيفها مع ستة انواع اخرى تابعة لجنس *Pseudomonas* ضمن جنس جديد يسمى *Burkholderia* نسبة الى مكتشفها (Yabuuchi *et al*., 1992) تتواجد في بيئات متعددة منها الانهار ومياه المجاري والتربة وحتى سطوح النباتات وذلك لانها تحتاج الى ظروف غذائية بسيطة وغير معقدة (Govan *et al*., 1993). تعد هذه البكتريا من الممرضات غير الشائعة للإنسان ولكن العديد من التقارير والبحوث اشارت الى امكانية ان تكون هذه البكتريا سبباً في الاصابة بالتهابات شغاف القلب ،الالتهابات الجلدية ، تعفن القدم ، واصابات الجروح والحروق وتجرثم الدم (Pegues *et al*., 1993) .

Streptococcus faecalis 4-6-2

بكتريا كروية الشكل ،موجبة لصبغة كرام وتترتب بشكل سلاسل او ازواج ،سالبة لفحص الكتاليز والاوكسديز ، لاهوائية اختيارية ،تنمو على الاوساط الزرعية الصلبة عادة وتكون بشكل مستعمرات قرصية واحدة (Warren, 2012) . وتمتاز بقدرتها على تخمر سكر المانيتول وليس لها القدرة على تخمر سكر الرافينوز والارابينوز (Holt *et al*., 1994) وتعد احد ادلة التلوث المايكروبي .

7-2 المضادات الحيوية و اليات المقاومة

ان لاكتشاف المضادات الحيوية التاثير الكبير في تراجع معدل الاخماج المسببة للأمراض وتستعمل بنطاق واسع لعلاج الجراثيم (Alobaida *et al* ., 1999)، الا ان فعالية المضاد في تراجع مستمر ومتزامن مع قدرة الجراثيم على تطوير قدرتها الدفاعية على مقاومة المضادات الحيوية بعدة وسائل مع امكانية انتقال هذه الصفة (مقاومة) من جنس بكتيري الى اخر (Raymond *et al*., 2003) ان اكثر المضادات استعمالا واسوأها تكون اسرع في تشجيع ظهور سلالات بكتيرية مقاومة وعادة ماتنتشر صفة المقاومة بشكل طردي مع الزيادة في استعمال هذه المضادات (Keren and chan,2002) تقسم الى مقاومة كرموسومية ومقاومة خارج كروموسومية (مكتسبة) وتعد المقاومة المكتسبة الاكثر اهمية بسبب امكانية نقل صفة المقاومة بين الانواع البكتيرية عن طريق انظمة نقل الجينات مثل البلازميدات وترانسبوزونات (Bannet, 2004) ان ظهور المقاومة وانتشارها في افراد العائلة المعوية ساهم في صعوبة المعالجة للاصابات المكتسبة في المستشفيات (Peterson, 2008).هناك العديد من الاليات التي تمتلكها البكتريا تمكنها من مقاومة المضادات منها: انتاج انزيمات قادرة على تحطيم وتثبيط فعالية المضاد الحيوي مثل انزيم β-lactamase الذي يعمل على تحطيم حلقة البيتالاكتم الموجودة بالمضاد الهدف وذلك بايقاف فعالية المضاد او تغير مواقع الهدف التي يعمل عليها المضاد الحيوي ومن ثَم يقلل اويمنع عملية الارتباط. اومنع دخول المضاد داخل البكتريا او نقل فعالية المضاد الى خارج البكتريا (Arias and maray, 2009) . من ابرز المضادات المستعملة هي :

أ- مجموعة مضادات البيتالاكتم Beta Lactam

يعد مضاد البنسلين Penicillin اول المضادات لهذه المجموعة استعمالا منذ عام 1941 م (Livermore and Woodford, 2006) وهي مجموعة واسعة الاستعمال والاكثر شيوعاً في العالم يمكن تميز هذه المجموعة من المضادات بوساطة تركيبها الذي يحتوي على حلقة Beta-Lactam بوساطة هذا التركيب الكيميائي يمكن تقسيمها على اربع مجاميع مختلفة Carbapenems, Cephalosporins , Penicillins, Monobactams. تم تطوير الاخير الى خمس اجيال .

ان الية عمل مضادات البيتالالكتم تعتمد على غلق عملية Transpeptidation التي تمنع تكون الجسور المستعرضة بين مكونات البيتديوكلايكان مما يؤدي الى تحطيم هذه الطبقة وتكون فعالية هذه المضادات على البكتريا المنقسمة حديثاً. وهي مركبات شبه صناعية منشؤها الفطريات والبكتريا الموجودة في البيئة (Walsh, 2003) اكثر من 80 مضاداً من مضادات البيتالاكتم يتم استعمالها سريرياً بعضها واسعة الطيف والبعض الاخر ذات الطيف الضيق وتعمل على البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (Chambers, 2005) .

ب - مجموعة مضادات الامينوكلايكوسيدية Aminoclycosids

استعملت لاول مرة عام 1940م وكان مصدرها البكتريا المعزولة من التربة وهي من المضادات المهمة طبياً (Shakil , 2008) تقسم هذه المجموعة على صنفين اساسية بالاعتماد على تركيبها الكيميائي الصنف الاول وهو streptomycin (1,3diaminoinositol moiety) اما الصنف الاخر فهو deoxystreptamin (Walsh,2003; Williams and Lemke, 2002) وتضم المجموعة انواعاً عديدة منها , Amikacin, Tobramycin, Gentamicin Kanamycin وNeomycin وهي واحد من اهم المضادات التي لها تأثير كبير على انواع مختلفة

من بكتريا الهوائية السالبة لصبغة كرام ومنها بصورة رئيسة بكتريا العائلة المعوية Enterobacteriaceae تعمل هذه المجموعة على تثبيط عملية تكوين البروتين بوساطة الارتباط بوحدة ثانوية 16Sللوحدة الثانوية الصغيرة 30Sفي RNA (Shakil, 2008) وكذلك تقاوم البكتريا لهذا النوع من المضادات عن طريق افراز انزيمات تعمل على تقليل فعالية المضاد منها: Amimoglycoside cetyl transferase(AAC) وAdenyl transferase (AAD) Amimoglycoside وAmimoglycoside Phospho trasferase (APH) يشفر لها من قبل ثلاث بلازميدات لكل نوع انزيمي (Kotra *et al*., 2000).

ج- مجموعة مضادات الكوانولين Guinolones

استعمل اول مضاد من هذه المجموعة سنة 1960م وهو مضاد Nalidixic acid الذي ينتمي الى الجيل الاول لهذه المجموعة يعمل بفعالية ضد الانواع التابعة لبكتريا العائلة المعوية ولا يعمل ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام ويستعمل بشكل اساسي في الالتهابات البولية .الجيل الثاني يضم عده مضادات منها Ciprofloxacin ويستعمل في الاصابات المكتسبة في المستشفيات وذات فعالية واسعة اتجاه افراد العائلة المعوية اما الجيل الثالث فيشبه الجيل الثاني من حيث التأثير لكنها تعمل ضد بكتريا streptococci ومنها مضادات Levofloxacin والجيل الرابع يعمل على البكتريا اللاهوائية وايضاً ذات فعالية عالية ضد بكتريا العائلة المعوية (Zorn *et al*.,2005). الية مقاومة هذه المضادات تتم عن طريق تثبيط تصنيع DNA وذلك باايقاف انزيم DNA gyrase ، كانت المقاومة لمضادات الكوانولين لمدة طويلة كرموسومية الاصل وذلك نتيجة لحصول طفرة واحدة في الانزيمات الهدف او تغيير في النفاذية اما في العشر سنوات الاخيرة ظهرت المقاومة لمضادات الكوانيولين بلازميدية الاصل (Catherine *et al*., 2002) .

د- مجموعة مضادات السلفا Sulphonamides group

تقوم مضادات الحياة هذه بإيقاف نمو البكتريا من خلال تثبيط أنزيم (DHPS) Dihydropteroate Synthetase وهذا الأنزيم ضروري في صنع حامض الفوليك البادئ في تصنيع الحامض النووي في خلايا البكتريا وتستعمل بشكل ناجح لمعالجة التهابات المجاري البولية (Myrvik and Weiser, 1988).

هـ- مجموعة مضادات التتراسايكلين Tetracyclin group

وهي مضادات مثبطة لنمو البكتريا Bacteriostatic ذات طيف واسع تعمل ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (Atlas *et al*., 1995) ،الية عمل هذه المضادات تتضمن عملية تثبيط لتصنيع البروتين داخل الخلية البكتيرية إذ ترتبط بالوحدة الرايبوسومية الصغيرة 30S ومن ثَم تمنع اتصال الـaminoacyl (الانزيم الناقل للاحماض الامينية) مع الرايبوسوم (Mandell *et al*., 1995). تتضمن مقاومة البكتريا لهذا المضاد اختزال نفاذية الغشاء الخلوي فضلاً عن الية الدفق العاكس و تشمل هذه المجموعة مضادات كلوروتتراسايكلين والدوكسبايكلين والمينوسايكلين (Atlas *et al*., 1995) .

و- مضادات اخرى Other antibiotic

وتضم عدة انواع منها و Colistin, Rifampin,Choromphencol وNitrofurantoin تعمل ضد بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* والمكورات المعوية Enterococci وايضا ضد بكتريا *E.coli* بدأ استعمال هذا المضاد لاول مرة عام 1950 م وظهرت له مقاومة من الانواع البكتيرية ، الية عمل هذا المضاد غير معروفة بشكل واضح لكنه يشترك في احداث الضرر للحمض النووي DNA البكتيري (Hooper ,2005) .

8-2 النسق البلازميدي Plasmid profile

عبارة عن تركيب حلقي من جزيئات دنـــــا تقع في السايتوبلازم خارج الكرموسوم له القابلية على التضاعف بشكل مستقل عن كرموسوم الخلية (Thoma *et al*., 2000) تم التعرف عليه لأول مرة في البكتريا التابعة للعائلة المعوية ثم بعد ذلك تم اكتشافها في كل السلالات البكتيرية (Dubey, 2009) . تعد البلازميدات من المواد الوراثية الشائعة الاستعمال في الهندسة الوراثية وتختلف في احجامها من بلازميد الى اخر ،ويؤثر حجم البلازميد في كفاءة عملية التحول الوراثي . (Selimovic *et al*., 2007) تختلف البلازميدات في احجامها إذ تتراوح بين كيلو زوج قاعدي واحد الى 2000 كيلو زوج قاعدي (Madigan *et al*., 2003) ويوجد في بدائية النواة مثل البكتريا وكذلك في حقيقية النواة مثل الخمائر والفطريات (Boundless, 2014) .تعد البلازميدات عناصر غير ضرورية لحياة البكتريا الا انها يمكن ان تشفر لعدة صفات مهمة منها المقاومة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة وانتاج الهيمولايسين وتخمير السكريات (Dubey,2009) قد تندمج بعض البلازميدات ضمن الكرموسوم وبذلك تسمى بأبسونات Episomes (Bukari *et al*., 1977) تمتلك البلازميدات القدرة على الانتقال بشكل ثنائي الاتجاه بين سلالتين وهذا يسمى shutitle vector إذ تمتلك منطقتي تضاعف مختلفة (Brown,2010) وهناك ثلاث اليات مهمة لانتقال البلازميدات وهي :

أ- الاقتران البكتيري Bacterial conjugation

وهي من اكثر طرائق الانتقال شيوعاً وتعد الطريقة الرئيسة لانتقال الجينات افقياً horizontally (Mulligan, 2004) تحصل عملية الاقتران بين الاجناس التي ترجع للنوع نفسه اوالانواع ذات الصلة القريبة وذلك بتردد عال مقارنة بين الانواع ذات الصلة البعيدة (Prescott *et al*., 2002)، لوحظ هذا النوع من الانتقال يحدث بين افراد العائلة المعوية ،فمثلًا لوحظ انتقال بلازميد اقتراني حجمه 92 كيلو قاعدة من بكتريا *K.pneumoniae* الذي يحمل

صفات مقاومة للمضادات الحيوية الى بكتريا *S.marcescens* ثم الى بكتريا *E.cloacae* (Mayer *et al*., 1986).

ب - التحول الوراثي Genetic transformation

وهي عملية انتقال المادة الوراثية دون الحاجة الى حدوث اتصال مباشر بين الخليتين واندماجها داخل المادة الوراثية للخلية المستلمة (Dioniso *et al*.,2002) يعد هذا النوع من الانتقال حالة نادرة بين الانواع البكتيرية ويمكن ان تؤدي الى ظهور سلالات طافرة (Rebert,2003) . تم استعمال عملية التحول الوراثي بوساطة البلازميدات لنقل الجينات التي تشفر لعدة صفات منها المقاومة للمضادات الحيوية بين افراد العائلة المعوية المختلفة منها النوع *Citrobacter.amalonaticus, Klebsiella pneumoniae and Enterobacter cloacae* . (Peloquin *et al*., 2000)

ج - التوصيل الوراثي Transduction

النوع الثالث الاليات انتقال البلازميدات هو التوصيل الوراثي ويتم فيه انتقال المادة الوراثيةDNA بين البكتريا بوساطة العاثيات bacteriophage ،ويعد عاثي لمبدا Lambda bacteriophage من اهم الوسائل التي يتم فيها عملية التوصيل الوراثي إذ يمكن ان تنقل جينات خاصة مثلا جينات تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحيوية ،يصيب هذا العاثي بكتريا *E.coli* و يتم ادخال اوحقن هذا العاثي خلال جدار الخلية البكتيرية الى السايتوبلازم (Griffiths *et al*., 2000).

1-8-2 تصنيف البلازميدات Classification of plasmid

تعد عملية تصنيف البلازميدات خطوة مهمة وضرورية في حالة دراسة العلاقات الوبائية. ويمكن تقسيم البلازميدات الى :

أ- بلازميدات اقترانية وبلازميدات غير الاقترانية:

تحتوي البلازميدات الاقترانية على مجموعة من الجينات الناقلة Tra-gene والتي تدفع لحدوث عملية الاقتران في البكتريا اما البلازميدات غير الاقترانية فلا تحتوي على الجينات الناقلة ومن ثَم فان البكتريا الحاوية على هذا النوع من البلازميدات غير قادرة على بدء عملية الاقتران (Margaret *et al*., 1999) .

ب- تقسيم البلازميدات اعتمادا على عدد نسخ البلازميد

1-البلازميدات المسترخية Relaxed plasmids او المستريحة : التي تتواجد في خلية المضيف بعدد كبير من النسخ ولايرتبط تضاعف DNA فيها بتضاعف DNA الخلية المضيف ويمكن ان يصل عدد نسخها داخل الخلية الواحدة الى 10-200 نسخة .

2- البلازميدات المتشددة أو المقيدة Stringent plasmid :التي يرتبط تضاعفها بتضاعف DNA المضيف وتتميز بقلة عدد نسخها في الخلية (Novick,1980) .

ج- قد تصنف البلازميدات على اساس الوظيفة الى :

1- بلازميدات الخصوبة F-plasimd (Fertility factor): تحتوي على جينات تشفر لعملية الاقتران البكتيري .

2- **بلازميدات المقاومة Resistent-plasmid** : تحتوي على جينات تشفر لعمليات مختلفة منها المقاومة للمضادات الحيوية ومقاومة المعادن الثقيلة او السموم مثل بلازميد Col-plasmid الذي يحتوي على جينات تشفر عن البكتريوسين والبروتينات التي تقتل البكتريا الاخرى،وقد وجد ان بكتريا *K.pneumoniae* تمتلك بلازميد R-factor إذ يمكن ان ينتقل الى سلالة مستلمة لبكتريا القولون *E.coli* (Markowitz *et al*., 1980).

3- **بلازميدات الضراوة Virulence-plasmid :** تحول البكتريا غير المرضية الى بكتريا مرضية ،توجد ضمن العائلة المعوية تترافق مع جينات المقاومة وتشفر لعوامل ضراوة متعددة قد

تكون عوامل التصاق Fimbriae او سموم مختلفة كما في بكتريا *E.coli* Enterotoxic (ETEC) (Brown, 2010). هناك نوع اخر من البلازميدات تعرف بالبلازميدات الخفية cryptic plasmid والتي ليس لها صفات مظهرية واضحة (Bukari *et al*., 1977) .

9-2 الترانسبوزون Transposone

هو عبارة عن تسلسل قصير من الحمض النووي DNA قادر على الانتقال الى مواقع عديدة ضمن الجينوم Genome يمكن ان تصل الى اعداد كبيرة من نسخ وتمثل جزءاً كبيراً من جينوم الفقريات (Lander *et al.*,2001) تعد هذه الجينات او العناصر الناقلة مصدراً للطفرات والامراض الوراثية من خلال اعادة ترتيب او التركيب للقطعة المنتقلة (Chen *et al*., 2005)، لنسخ الترانسبوزونات القدرة على عبور حاجز النوع وتدخل في جينوم انواع جديدة وذلك يعرف بالانتقال الافقي (horizontal transfer) (Silva *et al*.,2004) .اكتشفت الترانسبوزونات لاول مرة سنة 1948 من قبل Barbara McClintock عند عملها على نبات الذرة (Wicker *et al*., 2007) وتوجد انواع من الترانسبوزونات منها ما يسمى DNA-transposon وهو يملك علاقة مع انزيم خاص Reverse Transcription يساعده على القفز من موضعه.

يتعرف الانزيم على تتابع معين في نهاية كل ترانسبوزون ويقوم بقصها من موضعها الجيني. قد تذهب القطعة المتحررة الى موضع جديد على الكروموسوم او الى كروموسوم اخر إذ يقوم الانزيم بقطع قطعة ليسمح للترانسبوزون الحر بالجلوس مكانها. لهذا السبب يسمى هذا النوع بترانسبوزون القص واللصق (Curcio and Derbyshire, 2003)، النوع الثاني يسمى ترانسبوزون الاستنساخ واللصق .retrotransposon هذا النوع قادر على استنساخ نفسه ،وتبقى القطعة القديمة في مكانها في حين ان النسخة تنتشر في اماكن جديدة من الجينوم في هذه الحالة يقوم انزيم يستعمل ال RNA كحلقة وسطية بنسخ الجين ومساعدته على الانتشار (Curcio and Derbyshire,2003)

10-2 تحييد البلازميدات Curing plasmid

يعد التحييد واحداً من المميزات المألوفة في البلازميدات ويقصد به عملية فقدان البلازميدات بوساطة معاملات متنوعة مع اهمية الاشارة الى كون بعض البلازميدات تعاني فقدانا ذاتياً الا ان الغالبية العظمى من البلازميدات تكون مستقرة بدرجة كبيرة والتي تتطلب استعمال عوامل محيدة مختلفة لغرض زيادة تردد الفقدان التلقائي (Kuenkates and Kocazeybek, 2002). يعد التحييد طريقة جيدة للتعرف على البلازميدات المشفرة لعوامل الضراوة في البكتريا (Tervors,1968) يمكن تحييد البلازميدات باستعمال عوامل فيزيائية مثل تعريض البكتريا في درجة حرارة عالية ويستدل على حدوث حيود للبلازميدات من خلال حساسية هذه الجراثيم للمضادات الحيوية التي كانت مقاومة لها مثل فقدان المقاومة لمضاد Kanamycin في بكتريا *E.coli* عند تسخينها في درجة حرارة 42 مº كما ان هناك عدد من العوامل الكيميائية مثل Rifampin إذ وجد ان عمله كمحيد يكون من خلال تنشيط انزيم RNApolymeras الذي يؤثر في عملية تضاعف البلازميد (Motallebi *et al*., 2000) وبالامكان زيادة تردد فقدان البلازميدات عند تعرض الخلايا الى مركبات تحشر نفسها بين قواعد DNA وبشكل خاص الاكردينات مثل بروميد الاثيديوم Ethidium bromide او باستعمال مواد مثل الـ Acridine وSDS (Sodium dodecyl sulfate) (Ufomata, 2003) .

استعملت النباتات الطبية كمواد محيدة فعالة في تحييد الدنا البلازميدي لبكتريا القولون *E.coli* المعزولة من عينات سريرية مثل نبات بذور الكتان *Linusm usitatissium* و القرفة السرلانكية *Cinnamomum zeylanicium* (Khder and Muhammed, 2010) .

1-10-2 النباتات المستعملة في التحييد

1-1-10-2 الحلبة *Trigonella foenum- graecum L.*

تعد الحلبة *Trigonella foenum-graecum L*. احد أفراد العائلة البقولية Fabaceae موطنها الاصلي جنوب غرب قارة اوربا والدول المطلة على البحر الابيض المتوسط وشمال وغرب قارة أسيا (Shapiro and Gong, 2002) فهي احدى النباتات الهامة والشائعة الاستعمال في الطب منذ القدم ، تعود أهمية الحلبة إلى محتوياتها الكيميائية والغذائية، إذ تعد بذور الحلبة غنية بمجموعة من المكونات الغذائية مثل البروتينات، والدهون، والكربوهيدرات،الفيتامينات (Makai *et al*., 1999) فضلًا عن احتوائها على العديد من المركبات الطبية والصيدلانية الفعالة منها قلويدات التريجونيللين Trigonelline والكولين Coline (قطب,1981) التي تستعمل في علاج امراض السكري وخفض نسبة الكولسترول في الدم ومضادة للبكتريا وعلاج لمنع الحمل (Petropoulos, 2002) وفي تثبيط نمو الاورام الخبيثة او للوقاية من الاصابة بها (Duham,2001).

2-1-10-2 الكالبتوس *Eucalyptus incrassate*

يعود نبات الكالبتوس Eucalyptyus incrassta الى العائلة الاسية Myrtaceae ويعرف بشجرة الكافور إذ تعد من اطول الاشجار المعروفة اذ قد يصل ارتفاعها الى 100م الجزء المستعمل طبيا هي الاوراق الطازجة للحصول على زيت الكافور الطيار (يوسف, 1989) يحتوي اليوكالبتوس على مادة السينول Cineol و Eucalyptol ونسبة الزيت تتراوح بين 70%-80 تستعمل مستخلصاته وزيوته الطيارة كمضاد تجاه الفطريات الممرضة (Ramezani *et al*., 2002) وفي دراسات اكدت استعمال اوراق اليوكولبتوس الحاوية على oil كمطهرات او في معالجة الالتهابات البولية والتنفسية واصابات بكتيرية اخرى (Mehani and Ladjel , 2012) .

3-1-10-2 الزيتون *Olea eurepea*

ينتمي الى العائلة الزيتونية Oleaceae (يوسف, 1989) تستعمل خلاصة اوراق هذا النبات في علاج العديد من الامراض مثل الانفلونزا، وضغط الدم وداء السكري ومضاد للبكتريا والفايروسات والطفيليات و الفطريات، وذلك يعود لاحتواء اوراق الزيتون على العديد من المركبات (الاموليوروبين واللأولي استرول والليثين) ويحتوي زيت الزيتون على 75% من حامض الأوليك (حامض دهني احادي غير مشبع وجميعها مواد مثبطة لنمو الفطريات (منصور,2005) وهذه المركبات هي مواد ايضية ثانوية تبنى في النبات كاستجابة لاصابة مايكروبية او نتيجة الجروح وهي تتكون من حلقة اروماتية واحدة او اكثر ومجموعة واحدة او اكثر من O (Apak *et al*., 2007) ان للمركبات الفينولية تاثير اتجاه البكتريا الموجبة والسالبة لملون غرام على حد سواء واظهرت دراسة محلية تأثير مستخلص كحول الايثر النفطي الحار والبارد لاوراق الزيتون Olea europea في بعض انواع البكتريا الممرضة (حسن, 2012).

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods

3: المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1 الأجهزة والمواد :

3-1-1 الاجهزة والادوات Instruments and Tools

استعملت الاجهزة والادوات المبينة في القائمة ادناه لاجراء التجارب التي شملتها الدراسة:

(3-1-1) الاجهزة والادوات المختبرية المستعملة

ت	اسم الجهاز		الشركة المصنعة (المنشأ)
1	ثلاجة	Refrigerator	Korea (kelon)
2	جهاز استخلاص المركبات	Soxhlet apparatus	China
3	جهاز الترحيل الكهربائي	Electrophoresis	Japan (optimal)
4	جهاز الطرد المركزي	Cooled centrifuge	(Germany (Hetich)
5	جهاز تفريغ الهواء	High Vaccum Pump	USA
6	جهاز تقطير	Water Distillator	Germany
7	جهاز طرد مركزي صغير	Eppendroff centrifuge	Germany (Hetich)
8	حاضنة	Incubator	Germany
9	حاضنة هزازة	Shaking incubator	Germany
10	حمام مائي	Water bath	Memment
11	فرن كهربائي	Electric oven	China
12	كابينة الزرع	Laminar flow clean bench	Labtech(Korea)
13	كاميرا تصوير فوتوغرافية	Camera Canon	Optima(Japan)
14	المازج الدوار	Vortex	Janke, kinkel (Italy)
15	ماصات دقيقة	MicroPipettes	India
16	مجهر ضوئي	Light microscope	Kruss
17	مسخن حراري ممغنط	stirrer plates Hot	(Stuart-UK)
18	مصدر الأشعة فوق البنفسجية	Transilluminator	Japan,(Optima)
19	مقياس الأس الهيدروجيني	PH-Meter	Hanna

20	مؤصدة	Autoclave	Webco
21	ميزان كهربائي حساس	Sensitive electric balance	Germay(Denven)
22	وحدة ترشيح معدنية	Millipore steel unit	Germany

(3-1-2) المواد الكيميائية Chemical substance

ت	اسم المادة		الشركة المصنعة (المنشأ)
1	اثيلين - ثنائي امين - رباعي حامض الخليك ثنائي الصوديوم EDTA-Na2		Promega (USA)
2	الاكاروز	Agrose	Bioneer
3	ترس حامضي	Tris-HCl	BDH (England)
4	ترس قاعدي	Tris-Base	(Promega (USA)
5	دارئ الترحيل الكهربائي	TBE	Bioneer
6	حامض الخليك الثلجي	Glacial acetic acid	China
7	حامض الهيدروكلوريك	HCL	China
8	خلات البوتاسيوم	Potassium acetate	Promega (USA)
9	فينول	Phenol	China
10	كبريتات دو دوسيل الصوديوم	Sodium dodecyl Sulphate	Promega (USA)
11	كحول اثيلي مطلق	Absolute ethanol	Sentmenat (Spain)
12	كحول ايزواميل	Isoamyl Alcohol	China
13	كلوريد الصوديوم	NaCl	(BDH (England)
14	كلوكوز	Glucose	India
15	كليسرول	Glycerol	China
16	هيدروكسيد الصوديوم	NaOH	China

(3-1-3) الاوساط الزرعية Culture Media

ت	اسم الوسط	الشـــركة المصـــنعة (المنشأ)
1	اكار الحديد – ثنائي السكر Kliglar iron agar	(Oxoid (England)
2	خلاصة الخميرة Yeast extract	Biolife(Italy)
3	وسط أساس أكار اليوريا base Urea agar	Oxoid
4	وسط أكار السايمون ستريت Simmon's citrate agar	Oxoid
5	وسط أكار الماكونكي MacConkey's agar	Oxoid
6	أكار أيوسين المثيلين الأزرق Eosin-Methylene blue agar	Oxoid
7	وسط أكار مولرهنتون Muller-Hinton agar	Oxoid
8	وسط الأكار المغذي Nutrient agar	Oxoid
9	وسط المرق المغذي Nutrient broth	Oxoid
10	وسط كروماجين Chromagar Orientation	Pairs- France
11	وسط مرق نقيع القلب والدماغ Brain heart infusion broth	Oxoid

(4-1-3) الصبغات Stains

ت	اسم الصبغة	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	مجموعة ملون غرام (صيغة البنفسج البلوري Crystal Violet Stain و Safranin Stain و الأيودين Iodin وكحول الاثيلي Ethyl alchol 96%)	China
2	بروميد الاثيديوم Ethidium bromide	Bioneer
3	صبغة التحميل Loading dye	Bioneer

(5-1-3) الكواشف Reagents

ت	اسم الكاشف	الغرض من الاستعمال	الشـــركة المصنعة
1	بيروكسيد الهيدروجين H2O2 3%	للكشف عن انتاج انزيم الكتاليز	China
2	N,N,N,N-Tetra-Methyl-P-PhenylenDiamineDihydroChloride	للكشف عن انتاج انزيم الاوكسيدز	China
3	فوكس بروسكاور Voges Proskauer reagent (يتـالف مـن مـركبين:- VP1 مـن الفـا نفثـول ومـاء مقطر VP2- هيدروكسيد البوتاسيوم وكحول مطلق)	يسـتعمل للكشـف عـن تحلـل الجزئـي لسـكر الكلكوزوانتاج Acetyl methylcarbino	India
4	كاشف احمر المثيل Methyl reagent (Ethanol 95%,Methyl red)	ويسـتعمل للكشـف عـن تحلـل الكلـي لسـكر الكلكوزوانتـاج الاحمـاض (lactic,acetic (succinic,and formic acids	India
5	كاشـف كوفـاكس Kovac`s reagent (يتـالف مـن Para-dimethyl amino benzaldehyd و (Isoamyl alcohol	للكشـف عـن مركـب الانـدول مـن الحـامض الاميني التربتوفان	India

(6-1-3) أ اقراص المضادات الحيوية Antibiotic

ت	اسم المضاد	الرمز	تركيـز المضـاد فـي القرص µg/disk	الشركة المصنعة
1	Amikacin	AK	10	Bioanalyse
2	Ampicillin	AM	25	Bioanalyse
3	Amoxcillin	AX	25	Bioanalyse
4	Aztreonam	ATM	30	Bioanalyse
5	Cefepime	FEP	30	Bioanalyse
6	Ceftazidime	CAZ	10	Bioanalyse
7	Ceftriaxone	CRO	10	Bioanalyse
8	Ciprofloxacin	CIP	10	Bioanalyse
9	Iimpenen	IMP	10	Bioanalyse

10	Gentamicin	CN	10	Bioanalyse
11	Levofloxacin	LEV	5	Bioanalyse
12	Meropenem	MEM	10	Bioanalyse
13	Nitrofurantion	F	100	Bioanalyse
14	Trimethoprim+sulfamethoxaole	STX	25	Bioanalyse
15	Tobramycin	TOB	10	Bioanalyse

(3-1- 6) ب المحاليل Solutions

ت	اسم المضاد او المحلول	الشركة المصنعة
1	Amoxicillin	Inner Mongolia.(china)
2	Ampicillin	Inner Mongolia.(china)
3	Macfarland يقيس 1.5 × 10^8 مل / خلية	Bioneer

(3-1-7) العدد المستعملة في الدراسة

ت	اسم عدة التشخيص	نوع الاستعمال	الشركة المصنعة
1	VITEK 2 GN card	لتشخيص البكتريا السالبة لصبغة كرام	BioMerieux
2	VITEK-2ASTcard	اختبار الحساسية للمضادات	BioMerieux
3	AccuPrep® PlasmidMini Extraction Kit	استخلاص الدنا البلازميدي	Bioneer
4	عُدة فحص Go taq Green master mix PCR تضم عُدة الفحص المحاليل الكافية لإجراء 100 تفاعل كل تفاعل بحجم (50) مايكروليتر و يضم مايأتي : x1.25ml 2x PCR master mix2 x1.25ml Nuclease free water2	للكشف عن مورثة 16SrRNA	Promega
5	Wizad® Genomic DNApurification kit	عدة استخلاص DNA	Promega

(8-1-3) المورثة التشخيصية (البرايمر) (16SrRNA) (Fattahi *et al*.,2013)

البرايمر	التسلسل		الحجم
16SsRNA	الأمامي	GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTG	544 زوج قاعدي
	العكسي	AGCCCGGGGATTTCACATCTGA	

- **البرايمر مجهز من قبل شركة Bioneer (Korea)**

2-3 طرائق العمل

3- 2 -1 طرائق التحضير والتعقيم

حضرت الاوساط الزرعية المذكورة انفآ حسب تعليمات الشركة المصنعة لها والمرفقة على العبوة إذ يذوب الوزن المطلوب من الوسط في حجم معين من الماء المقطر ويتم وضعه على مسخن حراري ممغنط Hot plates stirrer ليغلي ثم يعقم بالمؤصدة وفي ظروف تعقيم مناسبة في درجة الحرارة 121°م وضغط 1 جو ولمدة 15 دقيقة بعد انتهاء مدة التعقيم تركت الاوساط لتبرد الى درجة حرارة 45°م ثم صبت في اطباق او أنابيب حسب حالة الوسط (صلب – سائل) وحسب الغرض من الاستعمال ثم وضعت في الحاضنة في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة للتأكد من حالة عدم التلوث والتخلص من الرطوبة وبعد ذلك حفظت في درجة حرارة 4°م لحين الاستعمال .

تعقم الادوات الزجاجية والمعدنية بوساطة الحرارة الجافة وعن طريق الفرن الكهربائي في درجة 160-180°م ولمدة 2-3 ساعات .اما محاليل المضادات فتم تعقيمها باستعمال مرشح غشائي ذات ثقوب بقطر 0.22 مايكروميتر.

3-2-2 الاوساط الزرعية التركيبية

3-2-2-1 وسط لوريا السائل (Luria - Bertani medium)

حضر باذابة 5 غم من مستخلص الخميرة Yeast extract و5غم من كلوريد الصوديوم NaCl و 10 غم من تربتون Trypton في لتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7.5 ووضع على مسخن حراري ممغنط Hot plates stirrer ليغلي ثم عقم بعدها بالمؤصدة وبعد انتهاء التعقيم ترك لمدة ربع ساعة حتى يبرد ووضع في الثلاجة لحين الاستعمال . (Sambrook *et al* .,1989)

3-2-2-2 وسط احمر المثيل وفوكس بروسكر (MR -VP)

حضر باذابة 7 غم من وسط البيبتون و5 غم من مسحوق الكلكوز و5غم من فوسفات البوتاسيوم في 1 لتر من الماء مقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7 ووزع في انابيب زجاجية معقمة ثم عقمت بالمؤصدة (Forbes *et al*.,2007).

3-2-3 تحضير المحاليل والكواشف

3-2-3-1 المحلول الملحي الفسلجي (Normal saline)

حضر المحلول باذابة 0.85 %غم من كلوريد الصوديوم NaCl في 100 مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7 ومن ثم عقم بالمؤصدة، يستعمل هذا المحلول لعمل التخافيف للتجارب الدراسة (Baron *et al*., 1999) .

3-2-3- 2 محلول ثابت العكرة القياسي (ماكفرلاند) Macfarland

يحضر مختبريا من

أ - اذابة 1.175 غم كلوريد الباريوم BaCl2 في 100 مل من الماء المقطر

ب - اضافة 1مل من حامض الكبريتيك المركز الى 99 مل ماء مقطر وبعدها يتم اضافة 0.5 مل من المحلول أ الى 9.95 مل من محلول ب ويمزج بشكل جيد ويتم وضعه بعد ذلك في علبة زجاجية معقمة ومحكمة الغلق لمنع عملية التبخير ويحفظ في مكان مظلم لحين الاستعمال (Vandepitt *et al* .,2003) .

3-2-3-3 محلول المضادات الحيوية Antibiotic solution

حضرت محاليل خزينة Stock solutions من المضادات الحيوية بوزن 25 ملي غرام من مضاد الاموكسلين في 10 مل من الماء المقطر ومن ثم عقم بمرشحات غشائية بقطر 0.22 مايكرون وحفظ في انبوب معقم في الثلاجة في درجة حرارة 4 °م لحين الاستعمال (Sambrook *et al* .,1989) .

3-2-4المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR

3-2-4-1 محاليل البادئات primers solutions

تم تحضير محاليلها الخزنية حسب تعليمات الشركة المجهزة وباستعمال الماء المقطر اللاأيوني المعقم للحصول على تركيز 100 بيكو مول / مايكرو ليتر وتم تحضير محلول كل بادئ و بشكل منفصل بتركيز 10 بيكو مول \ مايكرو ليتر و ذلك بأخذ 10 مايكرو ليتر من المحلول الخزين لكل بادئ و اضافته إلى 90 مايكرو ليتراً من الماء المقطر اللاأيوني ، و مُزج جيداً و حُفظ في الثلاجة لحين الاستعمال في حين حُفظت المحاليل الخزينة للبوادئ في درجة -20 ْم مع مُراعاة مزج المحلول بعد إخراجه من الثلج باستعمال المازج لمُجانسته قبل الاستعمال .

3-2-5 محاليل عزل الدنا البلازميدي بالطريقة القاعدية (المانول)

(Sambrook *et al* .,1989)

3-2-5-1 Sol (TEG)

يحضر باذابة 0.15 غم من الكلكوز (50 ملي مولار) و0.186غم من EDTA (10ملي مولار) و0.450 غم من Tris-HCl (25 ملي مولار) في 50 مل من الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني الى 8 ويوضع في جهاز التعقيم Autoclave وبعد الانتهاء من التعقيم يتم وضعه في الثلاجة في درجة حرارة 4°م لحين الاستعمال.

(N 0.2 NaoH) %1 SDS Sol II 2-5-2-3

يحضر باذابة 0.5 غم من SDS و0.4 غم من NaoH في 50 مل من الماء المقطر ويضبط الاس الهيدروجيني الى 12 ويحضر انيا وبدون عملية التعقيم .

Sol III 3-5-2-3 (محلول خلات البوتاسيوم Potassium acetate solution)

يحضر باذابة 29.442 غم من خلات البوتاسيوم Potassium acetate (5 مولار) في 60 مل من الماء المقطر ويترك ليذوب ثم يضاف اليه 11.5 مل من حامض الخليك الثلجي ويكمل الحجم الى 100 مل ثم يضبط الاس الهيدروجيني الى 4.8 ويحفظ بثلاجة لحين الاستعمال ويفضل استعماله مبرداً .

(TES) Sol IIII 4-5-2-3

يحضر باذابة 1.753 غم من كلوريد الصوديوم NaCl (0.089 مولر) و 1.116 غم من EDTA-Na2 (0.002 مولر) و 0.363 غم من Tris-HCl (0.089 مولر) ويكمل الحجم الى 300 مل ويضبط الاس الهيدروجيني الى 8 وبعدها يوضع المحلول في جهاز التعقيم وبعد انتهاء عملية التعقيم يحفظ في درجة 4 °م لحين الاستعمال.

TE 5-5-2-3

يحضر باذابة 0.018 غم من EDTA-NA2 و 0.060 من Tris-base غم في 50 مل من الماء المقطر وضبط الاس الهيدروجيني الى 8 ويعقم ويحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

6-5-2-3 فينول - كلورفورم (Phenol-Choroform)

يتم تحضيره باذابة الفينول في درجة حرارة 60 °م ويضاف اليه حجم متساوً من الكلورفورم ويمزج جيدا في ظروف معقمة ويحفظ في درجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال.

6-2-3 حفظ وادامة العزلات البكتيرية

1-6-2-3 حفظ قصير الامد Short period culture

يتم زرع البكتريا المأخوذة من عينات ومصادر مختلفة على وسط الاكار المغذي Nutrient agar الصلب والمائل Slant وتحضن لمدة 24 ساعة وفي درجة حرارة 37 °م وبعدها تحفظ في درجة حرارة 4 °م في الثلاجة وتستعمل للتجارب المطلوبة وقت الحاجة يتم تجديد هذه المزارع كل ثلاثة اشهر وذلك بتنشيطها على الوسط المغذي Brian Heart Infusion Broth واعادة زرعها على وسط مائل جديد لضمان بقائها نشطة خلال مدة الدراسة (Benson, 2001) .

2-6-2-3 حفظ طويل الامد Long period culture

لضمان المحافظة على حيوية ونشاط العزلات البكتيرية لوقت طويل خلال مدة الدراسة يستعمل وسط نقيع القلب - الدماغ المحضر مسبقا والمضاف اليه الكليسرول بنسبة 20%. يلقح الوسط بالمزارع البكتيرية ويحتضن لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37 °م . وبعدها يحفظ بدرجة 20- °م (WHO , 2003).

3-2-7 جمع العينات Sample collection

3-2-7-1 العينات السريرية Clinical specimens

جمعت عزلات بكتيرية من عينات سريرية مختلفة تضمنت (الادرار - الدم - القشع - المسحات الحروق - الجروح) من مستشفيات بغداد المتخصصة مستشفى الامام علي (ع) ، مستشفى ابن البلدي المختبرات التعليمية لمدينة الطب ،مستشفى بغداد ، مستشفى الشهيد الصدر للمدة من 2014/9/1 الى 2015 / 2/1 . زرعت العينات للتاكد من نقاوتها على وسط اكار الماكونكي و EMB وحضنت في الحاضنة في درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة و تم الاعتماد على الصفات المظهرية للخلايا باستعمال مجموعة ملون كرام والتفاعلات البايوكيميائية.

3-2-7-2 العينات البيئية Environmental specimens

جمعت عزلات بكتيرية من عينات بيئية مختلفة من مصادرتضمنت [(مياه نهر دجلة /منطقة الشواكة ، التربة المسمدة بسماد عضوي/ منطقة جديدة الشط شرق بغداد ، فضلات الدجاج/ مزرعة اهلية / مدينة الصدر)] بواقع مكررين لكل عينة وباوقات صباحية تراوحت بين الساعة السابعة الى الساعة التاسعة وللمدة 5 اشهر ابتدءاً من شهر 1- 9- 2014 الى الشهر 1- 2- 2015. ونقلت مباشرةً الى المختبر بعد انتهاء عملية الجمع ومن ثم اجريت عليها عمليات العزل والتشخيص واجراء الفحوصات البايوكيميائية والفحص المجهري واجراء فحوص تاكيدية بوساطة جهاز الفايتك .

3-2-7-2-أ العزل الجرثومي لعينات المياه

جمعت عينات المياه من منطقة الشواكة في بغداد والتابعة لقاطع الكرخ في قناني زجاجية معقمة وبسعة 1 لتر من سطح الماء على بعد 3 امتار من حافة النهر ، تم اخذ مكررين من موقع الدراسة وخلال ساعة من تاريخ الجمع ونقلت الى المختبر البحثي (مختبر الاحياء المجهرية والجزيئي المتقدم في كلية التربية للعلوم الصرفة /ابن الهيثم) لغرض اكمال عملية العزل والعد البكتيري .

استعملت طريقة الترشيح بوساطة اغشية الترشيح المعقمة وجهاز الترشيح Millipore steel unit إذ تم تصفية 60 مل لكل مكرر وتم استعمال جهاز تفريغ الهواء High Vaccum Pump لتسهيل عملية الترشيح .

طبع غشاء الترشيح (الحاوي على المحتوى المايكروبي) على وسط EMB ثم نقل بعدها بوساطة الملقط المعقم الى وسط الماكونكي وتركت على الوسط الاخير وحضنت بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة (Hleyn and Bicknell,2007). وتم حساب العدد البكتيري الكلي لكل عينة .

3-2-7-2- ب العزل الجرثومي لعينات التربة

جمعت عينات التربة من الارض المسمدة بسماد عضوي وبواقع مكررين من منطقة جديدة الشط شرق بغداد من سطح التربة وبعمق 5 سم في قناني زجاجية معقمة ووضعت العينات في حافظة حاوية على قطع ثلجية وذلك للحفاظ على المحتوى الميكروبي ونقلت الى المختبر مباشرة لاجراء عملية العزل خلال 1-2 ساعة من وقت الجمع ، إذ تم العزل بوزن 10 غم من عينة التربة بوساطة الميزان الحساس ومزجها ب 90 مل من المحلول الفسلجي المحضر مسبقا ورجت جيدا لمدة خمس دقائق ومن ثم اخذ باللوب المعقم من العالق البكتيري وزرعت على وسط الماكونكي ووسط

EMB وحضنت لمدة 24 ساعة في الحاضنة وبدرجة حرارة 37°م (Bahig *et al* .,2008) . وتم حساب العدد البكتيري الكلي لكل عينة .

3-2-7-2- ج العزل الجرثومي لفضلات الدجاج

جمعت عينات الفضلات من مزرعة دجاج اهلية في منطقة مدينة الصدر ووضعت في قناني زجاجية معقمة بسعة 1 لتر ونقلت بحافظة حاوية على قطع ثلجية للحفاظ على المحتوى الميكروبي الى المختبر مباشرة وبعد نقلها تم وزن 10 غم من العينة الماخوذة ومزجت مع المحلول الفسلجي بحجم 90 مل بتركيز 0.85% ورجت جيدا لمدة خمس دقاق وبعد ذلك اخذ بوساطة لوب معقم من العالق البكتيري وزرع على وسط الماكونكي ومن ثم على وسط EMB وحضنت لمدة 24 ساعة بالحاضنة وبدرجة 37 °م (Bashar *et al*.,2011). وتم حساب العدد البكتيري الكلي لكل عينة.

3-2-8 عد المستعمرات البكتيرية

استعملت طريقة الصب بالاطباق وذلك بمزج العينة stock بتخفيف (1:10) ونقل 1 مل من المزروع البكتيري الى انبوب يحتوي 9 مل من المحلول الفسلجي Nacl بتركيز 0.85 % والحصول على تخفيف 1:100 وتم اجراء تخافيف عشرية 10^{-1} الى 10^{-6}وتم اعتماد التخافيف الاخيرة بنقل 0.1 مل الى اطباق معقمة وصب بعدها الاكار الصلب الذائب والمبرد الى درة حرارة 45 °م مع تحريك الوسط بهدوء ثلاث مرات باتجاه عقرب الساعة وثلاث مرات باتجاه عكس عقرب الساعة ثم تركت الاطباق حتى تبرد ويتصلب الوسط ،ثم وضعت بصورة مقلوبة في الحاضنة في درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة ، تم عد المستعمرات النامية على الوسط الزرعي لكل تخفيف و حساب العدد الكلي للبكتريا الحية (50-250) مستعمرة وذلك بضرب عدد المستعمرات البكتيرية بمقلوب التخفيف (Harle and Prescott 1996) .

عدد الخلايا الحية لكل 1 مل او لكل غرام = عدد المستعمرات × معكوس التخفيف

3-2-9 تشخيص بكتيريا العائلة المعوية المخمرة لسكر اللاكتوز

Diagnosis of latose ferment of Enterobacteriaceae

3-2-9-1 الفحص المجهري Microscopic Examination

تم فحص المستعمرات باستعمال تقنية ملون كرام للتعرف على شكل وتجمع الخلايا ونوع الصبغة (سالبة،موجبة) .

3-2-9-2 الفحوصات البايوكيميائية Biochemical Test (Forbes *at el*.,2007)

1- اختبار الكتاليز Catalase test

وضع جزء من المستعمرات البكتيرية النامية على الطبق على شريحة زجاجية نظيفة ثم اضيف لها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين .ظهور الفقاعات دليل على ايجابية الفحص.

2- فحص الاوكسيدز Oxidase test

اخذ جزء من مستعمرات البكتيرية النامية على وسط الاكار المغذي ووضعت على ورقة ترشيح ثم اضيف اليها قطرة من الكاشف الاوكسيدز .ظهور لون بنفسجي غامق دليل على ايجابية الفحص وتظهر النتيجة الموجبة خلال 60 ثانية.

3-9-2-3 اختبارات الـ IMViC

حضرت حسب تعليمات الشركة المصنعة

1- فحص الاندول (Indol Test)

لقحت البكتيريا بوسط الببتون Peptone water وحضنت لمدة 18 -24 ساعة بدرجة حرارة 37°م وبعد انتهاء مدة الحضن اضيف 2 قطرة من كاشف كوفاكس . ظهور الحلقة الحمراء دليل على ايجابية الفحص .

2-اختبار احمر المثيل Methyl red test

لقحت الانابيب الحاوية على وسط الكلوكوز بتركيز 5% ثم حضن المزروع البكتيري في درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة وفي اليوم التالي اضيف الكاشف احمر المثيل وترك لمدة تتراوح بين 5-10 دقيقة بدرجة حرارة المختبر . تكون اللون الاحمر دلالة على ايجابية الاختبار.

3-اختبار فوكس بروسكاور Voges-Proskauer test

لقحت الانابيب الحاوية على وسط الكلكوز بتركيز 5% ومن ثم حضنت الانابيب في درجة حرارة 37°م لمدة 18-24 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضن تم اضافة حجوم متساوية من كاشفvp1 وال vp2 الى الوسط . ظهور اللون البرتقالي دليل على ايجابية الاختبار ويتم قراءة النتيجة بعد مرور 15 دقائق من وضع الكاشف.

4-اختبار استهلاك السترات Citrate utilization Test

اخذ جزء من المستعمرة البكتيرية بوساطة اللوب المعقم وزرعت على وسط السترات بطريقة التخطيط وحضنت لمده 24 ساعة وفي درجة حرارة 37 °م . تحول اللون من الاخضر الى الازرق دليل على ايجابية الفحص (بسبب وجود كاشف bromothymol blue).

5- اختبار انتاج أنزيم اليوريز (Urease test)

لقحت الانابيب الحاوية على وسط اليوريا بطريقة التخطيط على الوسط المائل ثم حضنت في درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة .تحول لون الوسط الى الوردي دليل على ايجابية الفحص وذالك نتيجة تحول لون الكاشف الفينول الاحمر Phenol red الموجود في الوسط .

6-اختبار تخمر السكريات (Kilgler Iron Agar)

لقح وسط تخمير السكريات (الكلكوز -اللاكتوز) بالبكتريا بطريقة الطعن ومن ثم التخطيط على الوسط المائل وحضنت لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37°م .اعتمدت النتيجة على اساس التغيرات في الدالة الحامضية PH في القعر والمائل للوسط . يلاحظ التخمر من خلال تغير لون الكاشف الفينول الاحمر الى اللون الاصفر .

7- فحص قابلية الحركة Motility Test

لقحت الانابيب التي تحتوي على وسط الحركة بوساطة الابرة المعقمة عن طريق عملية الطعن في عمق الوسط و حضنت الانابيب في الحاضنة لمدة 24 ساعة وفي درجة حرارة 37 °م ،ان عدم انتشار النمو خارج حدود الطعنة دليل على ان البكتريا غير متحركة اما انتشاره خارج حدود الطعنة فدليل على ان البكتريا متحركة (Harley and Prescott , 1996) .

3-2-9-4 التشخيص بجهاز الفايتك VIETK-2

تم التشخيص بالاعتماد على تعليمات الشركة المصنعة كالأتي :

زرعت عينات الادرار والقشع والدم ومسحات الحروق والجروح على وسط الماكونكي وحضنت في درجة 37 °م ولمدة 24 ساعة وبعد ظهور النمو البكتيري والمستعمرات على الاوساط المذكورة اخذ بوساطة اللوب المعقم مستعمرة نقية ومزجت في المحلول الملحي الفسلجي Nacl في الانبوب المجهز من قبل الشركة المصنعة ثم يقاس العالق للعزلة المراد تشخيصها بواسطة

جهـاز العكـورة الخـاص بجـهـاز Vitek2 (DensiChek™) إذ يجب ان يكون عكورة العالق مساوية الى 0.50-0.63. بعد ذلك وضعت الانابيب بالحامل الخاص بها بعد ان تم وضع شريط الفحص الخاص ونقلت الانابيب والاشرطة الى الجهاز ثم وضع اولا في حقل الحشو (Filler) الذي يقوم تلقائيا بملء الاشرطة بالعالق البكتيري وبعد الانتهاء من العملية اعطى الجهاز ايعاز انتهاء . نُقل الحامل الى الحقل الثاني القارئ (Reader) الذي قام اولا بقطع الاشرطة واعطاء ايعاز عبء (Burden) بشكل اشارة رقمية أذ احتفظ بالاشرطة اما المحمل الحاوي على الانابيب فأُخرج من الجهاز وثم ادخلت المعلومات الخاصة بالعينة في جهاز الحاسوب المرفق (الجنس ، العمر ، نوع العينة ، الاسم ، الرمز او رقم العينة) وتركت لمدة 4-6 ساعة لاعطاء نتيجة التشخيص .

الشكل (3-1) يوضح جهاز الفايتك المستعمل في التشخيص VITEK 2 System

3-2-10- اختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية Antibiotic senstivity

من اجل اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية تم استعمال طريقة Kirby-Bauer (Bauer *at el*.,1966).

- حضر العالق البكتيري وذلك بنقل مستعمرة مفردة نامية على وسط اكار المغذي الى انابيب معقمة سعة (15 مل) وحاوية على 5 مل من محلول الملحي الفسلجي 0.85% ومزج جيداً بوساطة المازج Vortex للحصول على عالق متجانس وقورن مع محلول ثابت العكورة القياس (ماكفرلاند) والذي يعطي عدداً مقارباً للخلايا 1.5×10^8 مل /خلية .
- اخذت مسحات قطنية (Swab) معقمة وضعت في العالق وشبعت به وتم التخلص من الزائد ثم مررت على الطبق الحاوي على وسط المولر هنتون ونقلت بعدها اقراص المضادات الحيوية بوساطة ملقط معقم (كحول مركز، لهب النار) وبواقع 5 اقراص لكل طبق بحيث تكون هناك مسافة مناسبة 15 ملم بين مضاد واخر لتجنب حدوث تداخل بين مناطق التثبيط ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة ،بعد انتهاء مدة الحضن سجلت النتائج وذلك بقياس قطر منطقة التثبيط حول كل قرص بالمليمتر (المسطرة) ثم قورنت بالنتائج المسجلة والمعتمدة عالمياً لقطر منطقة التثبيط (CLSI ,2012) .

3-2-11 استخلاص الدنا البلازميدي بطريقة القاعدية المانول(Alkaline lysis)

تم استخلاص جميع العزلات التابعة بكتريا العائلة المعوية المخمرة لسكر اللاكتوز بطريقة القاعدية (Popiech and Neuman,1995) المحورة عن (Brinboim and Doly1979) وذلك بحسب الخطوات الاتية :

1 - نميت البكتريا بعد التاكد من نقاوتها ب 50 مل من وسط لوريا السائل في درجة حرارة 37°م ولمدة 18 ساعة .

2- نبذ الانبوب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة / دقيقة (Cooled centrifuge) لمدة 10 دقائق.

3 - أزيل الرائق وغسلت الخلايا البكتيرية المتكونة بـ 2 مل من دارئ **(TES) Sol IIII** ثم نبذة بسرعة 6000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق كررت هذه الخطوة مرتين للمحلول نفسه .

4-ازيل الرائق وترك الراسب الذي اضيف اليه 1.5 مل من محلول **SoII** (**TEG**) وثم اضيف اليه ايضا 2.5 مل من محلول التحلل Lysis solution (SDS) وحضن بدرجة حرارة 25 -30 °م ولمدة 30 دقيقة.

5- اضيف 1.5 من محلول potassium acetate (**Sol III**) المبرد

6- وضع في الانبوب (الحاوي على الخلايا المتحللة) في الثلاجة في Ice-cold لمدة 10 دقائق بعد تحريكه بلطف بوساطة اليد عدة مرات ثم نبذه في جهاز الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق حتى نحصل على محلول رائق.

7- تم نقل 600 مايكرو ليتر من المحلول الرائق الى انابيب معقمة Eppendrof tube ويضاف لها كمية متساوية 600 مايكرو ليتر من محلول (كلورفورم- فينول) الممزوج مسبقا بشكل جيد ثم يتم تقليب الانابيب بحركة اليد 3-4 مرات ومن ثم تنبذ بوساطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 ولمدة 10 دقائق .

8- تم نقل الطبقة العليا الى انابيب صغيرة جديدة ويضاف اليه حجمين من كحول الايثانول المطلق 96% والمبرد ،يتم بعدها تقليب الانابيب بلطف 3-4 مرات وتخزن في درجة -20°م وتحفظ للمدة 24 ساعة .

9- في اليوم التالي تنبذ الانابيب بوساطة جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة 10000 دورة / دقيقة وتترك لتجف وللتخلص من الايثانول بصورة جيدة ومن ثم تعلق ب 20 مايكرو ليتراً من TE وتخزن في درجة حرارة -20°م لحين اجراء عملية الترحيل الكهربائي.

12-2-3 استخلاص الدنا البلازميدي (Plasmid Extraction) (Bioneer Kit)

تتالف عدة استخلاص الدنا البلازميدي AccuPrep® Plasmid Mini Extraction Kit الكورية المنشأ من المكونات الاتية :

الحجم	المكونات
60 مل	Buffer①
60 مل	Buffer②
80 مل	Buffer③
75 مل	Buffer④
2×16 مل	Buffer D
24 مل	Buffer ⑤
6 مليغرام	RNA ase Powder
200 ea	DNA Binding Columm Tube

وتم الاستخلاص حسب تعليمات الشركة المصنعة وبالخطوات الاتية:

1- تم نقل عدد من المستعمرات المفردة النقية للبكتريا المعزولة قيد الدراسة بوساطة الناقل المعدني المعقم Loop الى وسط لوريا السائل والمحضر مسبقا بحجم 10 مل ويضاف اليه المضاد الحيوي المناسب وبتركيز مناسب وتحضن لمدة 18 ساعة وبدرجة حرارة 37 °م .

2- يؤخذ 1.5 من المزروع البكتيري الى انبوب صغير ومعقم Eppendrof tube وينبذ بسرعة 13000 دورة / دقيقة ولمدة 3 دقائق حتى يظهر الراسب .

3- يزال الرائق بوساطة Pipetting

4- يضاف 250 مايكرو ليتراً من المحلول الاول ويمزج بوساطة Vortex.

5- يضاف 250 مايكرو ليتراً من المحلول الثاني ويحرك بلطف بوساطة اليد 3-4 مرات.

6- يضاف 350 مايكرو ليتراً من المحلول الثالث ويحرك ايضا بلطف بوساطة اليد 3-4 مرات.

7- يوضع في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 13000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق حتى نحصل على الرائق .

8- ينقل الرائق الى العمود الحاوي على الفلتر المجهز من قبل الشركة وينبذ بوساطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .

9- يضاف 500 مايكرو ليتر من محلول D وننتظر 5 دقاق ثم يوضع الانبوب في جهاز الطرد المركزي وينبذ بسرعة 13000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة .

10- يضاف 700 مايكرو ليتر من المحلول الرابع وينبذ العمود بسرعة 13000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة.

11- للتخلص من الايثانول الزائد يتم نبذ العمود مره اخرى بوساطة جهاز الطرد لمركزي ولمدة دقيقة بسرعة 13000 دورة / دقيقة .

12- ينقل العمود الحاوي على الفلتر الى انبوب صغير Eppendrof tube جديدة ثم يضاف اليه 20 مايكرو ليتر من محلول الخامس ويترك لمدة 5 دقائق لكي يعطى فرصة اكبر لدنا البلازميد ليرتبط بالفلتر.

13- نبذ الانبوب الصغير الموضع فيه الفلتر في جهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة لكي يتم انزال Plasmid الموجود بالفلتر ، بعدها يحفظ الناتج في درجة حرارة -20 °م لحين الاستعمال.

13-2-3 الترحيل الكهربائي Electrophoresis

اجري الترحيل الكهربائي للدنا المستخلص والدنا البلازميد ولناتج PCR حسب ماجاء في (Sambrook *et al.*,1989)

حضر هلام الاكاروز بتركيز 1% باذابته في 100 مل من محلول TB بتركيز 1x، سخن الاكاروز الى درجة الغليان على مسخن حراري ممغنط Hot stirrer plates وترك ليبرد في درجة حرارة 45 -50°م ثم اضيف صبغة بروميد الاثيديوم بحجم 2 مايكرو ليتر الى الاكاروز ومزج جيداً.

تم اعداد صفيحة وضع الاكاروز Tray و ثبيت المشط (Comb) لتكوين الحفر (Wells) المعدة لتحميل العينات ثم صب اللأكاروز بشكل هادئ ومستمر لتجنب حدوث الفقاعات الهوائية وبعدها ترك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة المختبر لمدة 35 دقيقة .

رفع المشط من الاكاروز المتصلب بهدوء وبعدها نقل الهلام مع القالب الى حوض الترحيل الكهربائي بعد ملئه بحجم مناسب من بفر الترحيل TBE ×1 ، ثم حملت العينات المعدة للترحيل بعد خلطها مع 2 مايكرو ليتر من دارئ التحميل x6 باستعمال ماصة دقيقة Micropipette بعدها تم اجراء عملية الترحيل الكهربائي بفرق جهد مقداره 70 فولت ولمدة ساعتين بعد الانتهاء من عملية الترحيل نقل القالب ورفع منه الهلام وتم تعريضه الى مصدر للاشعة فوق البنفسجية UV- Transillumingator عند طول موجي 340 نانوميتراً.

14-2-3 تفاعل السلسلة المتعددة Polymerase Chain Reaction (PCR)

1-14-2-3 استخلاص الحمض النووي DNA (DNA Extraction)

تم الاستخلاص باستعمال عدة الاستخلاص المجهزة من شركة (Promega) التي تتكون من

الحجم	المكونات
50 مل	محلول محلل النووى Nucle Lysis Solution
250 مايكروليتر	محلول الأنزيم المحلل للحامض النووي RNA (RNase)
25 مل	محلول المرسب للبروتين ProteinPrecipitation Solution
25 مل	محلول التذويب Rehydrate Solution
	مواد اضافية ايزو بروبانول 96%والايثانول 70%

ووفق تعليمات الشركة المصنعة وكانت السرعة المعتمدة في كل خطوات الاستخلاص هي 13000 دورة / دقيقة وكالاتي :

1- نقل عدد من المستعمرات المفردة النقية للعزلات قيد الدراسة باستعمال الناقل الى وسط لوريا السائل Luria broth حجم الوسط (10مل) و حضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 °م.

2- نقل 1500 مايكرو ليتر من المزروع البكتيري الى انبوية صغيرة Eppendrof tube ونبذ مركزيا لمدة ثلاث دقائق ثم ازيل الرائق بوساطة الماصة الدقيقة وتم الاحتفاظ بالراسب .

3-اضافة 600 مايكرو ليتر من المحلول محلل النووى (Nuclei Lysis Solution) ومزج مع الراسب بوساطة Vortex ونقل الانبوب بعدها الى الحمام المائي Water bath بدرجة حرارة 80 °م ولمدة خمس دقائق ثم تركت لتبرد بدرجة حرارة المختبر .

4- اضافة 3 مايكرو ليترات من محلول الأنزيم المحلل للحامض النووي RNA (RNase) ثم يحضن لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 37 °م ثم يترك بعد انتهاء مدة الحضن ليبرد في درجة المختبر .

5-اضيف 300 مايكرو ليتر من محلول المرسب للبروتين Protein Precipitation Solution ويمزج بوساطة الماصة الدقيقة ويوضع بعدها في ثلج لمدة خمس دقائق .

6- ثم نبذ مركزيا لمدة خمس دقائق .

7- نقل بعدها الرائق الى انبوب جديد و يضاف اليه 600 مايكرو ليتر من Isopropanol ويوضع بعدها في الثلج لمدة خمس دقائق لسحب الماء من DNA وجعله غير ذائب ولكي يترسب عند نبذه مركزيا.

8- بعدها ينبذ مركزيا لمدة ثلاث دقائق ثم يزال الرائق وتجفف الانبوبة على ورق ترشيح نظيفة.

9- يضاف بعدها 600 مايكرو ليتر من الايثانول بتركيز 70% ثم يقلب باليد عدة مرات ينبذ بعدها مركزيا لمدة دقيقتين.

10- يزال الرائق من الانبوب ويترك ليجف في الحاضنة بدرجة حرارة 37 °م لمدة 10 دقائق.

11- ثم يضاف 100 مايكرو ليتر من محلول التذويب Rehydrate solution ويوضع بعدها في الثلاجة لمدة خمس دقائق ، ثم يخزن في درجة حرارة -20 °م لحين الاستعمال.

3-2-14-2 حسابات التفاعل البلمرة المتسلسل PCR

مكونات التفاعل	الحجم
DNA- templet	1.5مايكروليتر
Forward primer	1 مايكرو ليتر
Reverse primer	1 مايكرو ليتر
PCR –water	6.5 مايكرو ليتر
Master mix	10 مايكرو ليتر
الحجم النهائي	20 مايكرو ليتر

يتم تحضير هذا المزيج بخلط المكونات المذكورة في الجدول اعلاه في انابيب Eppendrof tube ويتم المزج بوساطة المازج الالي Vortex ولمدة 6 ثوان ثم تنقل الى جهاز PCR لاتمام البرنامج

3-2-14-3 برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

تم ضبط ظروف واجراء الـ Optimization (Fattahi *et al*.,2013)

مراحل PCR	درجة الحرارة	عـــدد الـــدورات الحرارية	الوقت
مرحلة مسخ الدنا الاولي	94 °م	دورة واحدة	4 دقائق
مرحلة مسخ الدنا	94 °م	30 دورة	30 ثانية
مرحلة الالتحام	59 °م		30 ثانية
مرحلة الاستطالة	72 °م		30 ثانية
مرحلة الاستطالة النهائية	72 °م	دورة واحدة	7 دقائق
مرحلة السيطرة	4 °م	-	مستمرة

15-2-3 تجارب التحييد البلازميدات Curing of plasmids

1-15-2-3 المستخلصات النباتية

1- تحضير النبات

تم الحصول على النباتات الطبية الطازجة من الاسواق المحلية والمعشب النباتي في قسم علوم الحياة التابع للكلية ،وصنفت في مختبر تصنيف النبات /كلية التربية ابن الهيثم للعلوم الصرفة من قبل الدكتورة عذية كاظم المشهداني .وتم تنظيف اوراق نباتات الحلبة *Trigonella foenum- graecum L* والكالبتوس *Eucalyptus incrassate* وشجر الزيتون *Olea eurepea* من الاتربة والشوائب وغسلت بشكل جيد بالماء المقطر ثم تركت لتجف لمدة يومين الى ثلاثة ومن ثم طحنت بشكل جيد بوساطة الطاحونة الكهربائية لغرض الحصول على مسحوق ناعم ، وخزن في اكياس بلاستيكية نظيفة تم تعليمها باسم النبات لحين استعمالها في تجربة الاستخلاص (AL-Shamma *et al*.,1982) .

تم تحضير المستخلصات النباتية المائية والكحولية استناداً الى طريقة (Mohana *et al* .,2008) إذ وزن 20 غم من المسحوق النباتي الجاف ووضع في كشتبان Thumble في جهاز الاستخلاص Sox let Apparatus واستعمل 180 مليلتر من الماء المقطر بدرجة حرارة 80 °م ، بعدها رشح المحلول بورق الترشيح ووضع السائل في اطباق زجاجية مفتوحة وجفف في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 45 °م لحين الجفاف التام.

علقت المادة الجافة بالماء المقطر او 60 %كحول اثيلي لتحضير تركيز 600 ملي غرام لكل واحد مل من المستخلص ثم عقم المعلق باستعمال مرشحات غشائية Millipore filter بقطر 0.22 مايكرون وبعد ذلك وضعت المستخلصات المعقمة في علب زجاجية صغيرة ومعقمة واصبحت جاهزة للاستعمال .

3-2-15-2 اختبار حساسية البكتريا للمستخلصات المائية والكحولية للنباتات

بعد تحضير المستخلصات النباتية المائية والكحولية وتحضير العالق البكتيري لعزلة Kp(13) وثلاث عزلات Ec (133,139,91) بتركيز 1.5×10^8 خلية وذلك بمقارنته مع مقياس العكورة (ماكفرلاند) تم اختبار تاثير المستخلصات النباتية الطبية في العزلات البكتيرية بطريقة الحفر well diffusion method لتحديد فعالية هذه المستخلصات ضد البكتريا إذ تم تحضير وسط الاكار المغذي المعقم وصب في اطباق بلاستيكية معقمة وتركت لتبرد بشكل جيد ، ثم لقحت الاطباق الحاوية على الوسط بالبكتريا قيد الدراسة وباستعمال swab قطني وبطريقة الفرش ، ثم استعمل حفار الفلين cork borer بقطر 6 ملم لعمل حفر متساوية القطر على سطح الاكار والتي وضع فيها بعد ذلك 100 مايكرو ليتر من المستخلص النباتي و3% SDS ،حضنت الاطباق بعد ذلك في درجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة ،وبعد انتهاء مدة الحضن تم قياس قطر منطقة التثبيط بالمليمتر . (Akrayi,2012)

3-2-15-3 تحديد قيمة التركيز المثبط الادنى MIC للمستخلصات النباتية

تم تحديد قيمة التركيز المثبط الادنى للمستخلصات النباتية إذ اخذت انابيب اختبار معقمة ومحتوية على امل من وسط الببتون المائي peptone water المعقم ثم اضيف اليها المستخلص النباتي المحضر بتخافيف نصفية متسلسلة (1/2 ،1/4، 1/8) وايضا مادة SDS 3%، ثم لقح الوسط بـ 10 مايكرو ليتر من المزروع البكتيري بتركيز 1.5×10^8،حضنت بعد ذلك الانابيب لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 °م، وقورنت النتائج مع السيطرة المتمثلة ب بوسط الببتون والمزروع البكتيري فقط .

عمل sub cluture من كل انبوب على وسط الاكار وحضن في درجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضن تم قراءة النتائج ومن ثم تم اختيار مستعمرات بكتيرية نامية لاجراء عملية استخلاص البلازميد بطريقة القاعدية (Kivanc and Kunduhoglu ,1997) .

وبعدها تم عمل اختبار فحص الحساسية بطريقة الاقراص للمستعمرات النامية وذلك لمعرفة تاثير المستخلصات المستعملة في مقاومة البكتريا للمضادات (Bahig *et al* .,2008).

3-2-15-4 التاثير المباشر للمستخصات النباتية في الدنا البلازميدي

بعد اتمام عملية الاستخلاص للبلازميدات، يتم مزج 5 مايكرو ليترات من البلازميد المستخلص و5 مايكرو ليترات من المستخلص النباتي بانواعه الثلاثة المستعملة في الدراسة بتركيز 1200 مايكروغرام لكل مل و SDS بتركيز (1%) في انابيب ابندروف صغيرة وتحضن لمدة ساعة واحدة وبدرجة حرارة 37 °م وبعد انتهاء مدة الحضن يضاف الى المزيج 2 مايكرو ليتر من صبغة التحميل Loading dye ثم يتم ترحيلها كهربائياً وذلك باخذ 12 مايكرو ليتر من الخليط الممزوج (Prabhakara *et al* .,2007) .

النتـائج

Results

1-4 العزل والتشخيص Isolation and Diagnosis

1-1-4 العينات السريرية Clinical sample

تم جمع 98 عزلة بكتيرية مخمرة لسكر اللاكتوز من عينات سريرية مختلفة تضمنت (دم ، ادرار ، قشع، مسحات الجروح والحروق) لمختلف الاعمار من مستشفيات بغداد المتخصصة ومن ثم تم اجراء الفحوص التشخيصية الزرعية لها.

اظهرت النتائج ان كلا من بكتريا *E.coli* و *Klebsiella* هي اكثر الانواع شيوعاً بين العزلات المخمرة لسكر اللاكتوز وبنسبة 75.51% و15.3% على التوالي، وكما موضح في الجدول (1-4)

جدول(1-4) اعداد ونسب عزلات البكتريا السريرية

ت	النوع	العينات السريرية	عدد العزلات	النسبة %
1	*Escherichia coli*	Blood, urine, wound	74	75. 51
2	*Klebsiella pneumoniae*	Sputum,Urine,wound	15	15.3
3	*Enterobacter aerogenes*	Blood, urine	5	5.1
4	*Serratia marcescens*	Urine, blood,Wound	3	3.06
5	*Citrobacter freundii*	Urine	1	1.02
	المجموع		98	

شخصت الأنواع المدروسة تشخيصاً اولياً بالاعتماد على الصفات المظهرية الزرعية والمجهرية والبايوكيمائية وأكد التشخيص باستعمال جهاز الفايتك (Vitek-2) كتشخيص نهائي للعزلات من ثم تم التحري عن وجود مورثة 16SrRNA .

4-1-1-1 نتائج الزرع الاولي لكل الانواع المدروسة على وسط الماكونكي :

شخصت البكتريا مبدئيا على وسط اكار الماكونكي وبالاعتماد على قابلية تخمر سكر اللاكتوز وبعض الصفات التفريقية الخاصة بكل نوع من انواع البكتريا. ظهرت مستعمرات بكتريا *E.coli* وردية اللون بسبب تخمريها سكر اللاكتوزوصغيرة وجافة .

بكتريا *Klebsiella* كانت مستعمراتها غير منتظمة وردية اللون ذات قوام مخاطي بسبب وجود الكبسولة وايضاً بالنسبة *Enterobacter* فان مستعمراته كبيرة وردية ذات قوام جاف او مخاطي.

بكتيريا *Serratia* ظهرت مستعمراتها على وسط الماكونكي باللون الاحمر إذ ان هذه البكتريا بطيئة التخميرلسكر اللاكتوز و تستغرق 24-48 ساعة وهذا يشابه بكتريا *Citrobacter* التي تعد ايضاً بطيئة التخمر لسكر اللاكتوز وتكون مستعمراتها صغيرة ذات لون وردي فاتح ،دائرية على وسط الماكونكي . ثم نقلت بكتريا القولون *E.coli* الى وسط EMB لتميزيها عن الاجناس الاخرى إذ ظهرت مستعمراتها ذات بريق معدني مخضرمميز.

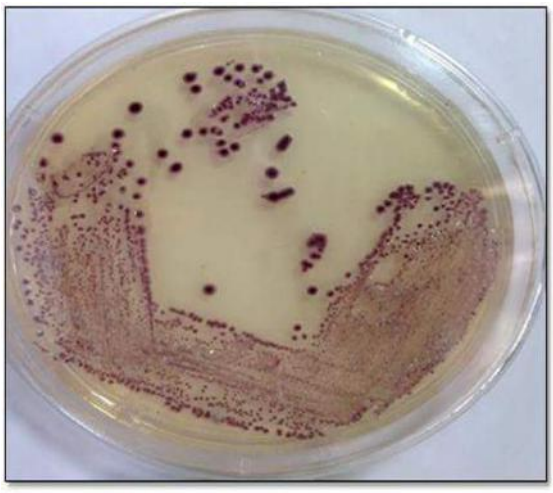
4-1-1 -2 التشخيص بالاعتماد على وسط كروماجين

Chromagar Orientation

بعد ان تم جمع العينات البيئية من مصادرها المتنوعة زرعت على وسط الكروماجين للتاكد من عملية تشخيص العزلات على مستوى الجنس، اظهرت نتائج الزرع على وسط الكروم اكار بحسب الدليل المرفق من قبل الشركة المصنعة للوسط ، كما في الجدول (4-2) والشكل (4-1).

جدول(4-2) نتائج التشخيص على وسط الكروماجين **Chromagar Orientation**

البكتريا	لون المستعمرة
E.coli	وردي داكن او لون عنابي
Klebsiella	ازرق معدني
Enterobater	ازرق معدني
Serratia	ازرق معدني
Citrobacter	زرقاء محاط بهالة بالون الوردي



(أ) (ب)

شكل (4-1 أ- ب) نمو بعض الاجناس على وسط Chromagar Orientation

4-1-1-3 الفحص المجهري Microscopic examination

ظهرت الخلايا المصبوغة بملون غرام تحت المجهر الضوئي بشكل عصيات قصيرة منفردة وذات لون احمر(سالبة) لصبغة كرام .

4-1-1-4 الاختبارات البايوكيميائية Biochemical tests

كانت نتائج التشخيص البايوكيمائي كما في الجدول (4-3).

جدول(4-3) الاختبارات البايوكميائية الخاصة بالانواع قيد الدراسة

الانواع	انتاج الاندول	احمر المثيل	فوكس بروسكاور	استهلاك السترات	السكريات الثنائية	اليوريز	الحركة	الاوكسديز	الكاتليز
E. coli	+	-	+	-	A/AG	-	+	-	+
K. pneumoniae	-	V	-	+	A/AG	+	-	-	+
K. oxytoca	+	V	+	+	A/AG	+	-	-	+
E. cloacae	-	-	+	+	A/A G	Vw	+	-	+
E. aerogenes	-	-	+	+	A/A G	-	+	-	+
C. freundii	-	+	-	+	A/A	Vw	+	-	+
S. marcescens	-	V	+	+	K/A or A/A	Vw	+	-	+

V : نتيجة متغايرة **W : ضعيف** **+ : نتيجة موجبة للفحص** **- : نتيجة سالبة للفحص**

A :حامض **AG: حامض مع الغاز**

4-1-1-5 علاقة العمر والجنس والإصابات بالانواع السريرية المعزولة

تم استعمال برنامج SPSS لايجاد علاقات الارتباط ومن اجل تحليل النتائج احصائيا ، توجد علاقة ارتباط معنوية عند المستوى $P > 0.01$ بين نوع العينة وبين الانواع التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية *C. freundii* و *K. pneumoniae* و *E. aerogenes* و *S. marcescens* و *E.coli* توجد ايضاً علاقة ارتباط معنوية احصائياً عند المستوى $P > 0.05$ بين نوع العينة والعمر. كانت نسبة الاصابة ببكتريا *E. coli* اكثر تردداً في عينات الادرار وبنسبة 66.3% واقل ترددا في عينات الدم والجروح وبنسبة 2% . اما بكتريا *K. pneumoniae* فكانت اكثر تردداً في عينات القشع وبنسبة 7% ولم تظهر في جميع العينات الاخرى. *E. aerogenes* ظهرت في عينات الادرار بنسبة 4.1 % اما في الدم فكانت نسبة ظهورها 1%.*S. marcescens* ظهرت في عينات الادرار والدم والجروح وبنسبة 1%.

بكتريا *E.coli* كانت اكثر اصابة للاناث منه في الذكور وبنسبة 48 % وهذا ينطبق ايضاً على بكتريا *K.pneumoniae* وبنسبة 8.2 % . اما بكتريا *E.aerogenes* فكانت في الذكور اكثر منه في الاناث وبنسبة 4.1 % .

بينت النتائج ان الاصابة ببكتريا *E.coli* عند الاطفال الذين تتراوح اعمارهم بين 1-10 سنوات هي اكثر من الفئات العمرية الاخرى إذ سجلت نسبة 29.6% واقل ظهوراً في الفئات العمرية 20-30 سنة .

اما الاصابة ببكتريا *K.pneumoniae* فكانت اكثر في الفئات العمرية التي تتراوح اعمارهم 40-60 سنة. لم تكن هناك فروقات معنوية بالتحليل الاحصائي بين الاصابات البكتيرية اللانواع والاعمار الاخرى.

2-4 العينات البيئية Environmental samples

تم الحصول على 85 عزلة بكتيرية مخمرة لسكر اللاكتوز من مجموع 85 عينة ماخوذة من مصادر مختلفة من البيئة وبواقع مكررين لكل موقع ،إذ جمعت العينات من التربة المسمدة بسماد عضوي ومن مياه النهر وفضلات الدجاج من مناطق بغداد واطرافها.

كانت بكتريا *E.coli* اكثر الانواع شيوعاً إذ سجلت نسبة 54.11% من مجموع الانواع المعزولة. سجلت اعلى نسبة لها في عينات فضلات الدجاج إذ تم الحصول على 28 وبنسبة 32.94 % اما في المياه فكانت نسبتها 16.47 % وفي التربة 4.7 % جدول (4-4) .

جدول (4-4) نسب وانواع البكتريا المستحصلة من العينات البيئية

ت	النوع	العينات البيئية	عدد العزلات	النسبة %
1	*Escherichia coli*	Water, chicken feces,Soil	46	54.1
2	*Klebsiella pneumonia*	Water, chicken feces	31	36.4
3	*K. oxytoca*	Chicken feces	2	2.3
4	*Raoultella planticola*	Water	1	1.17
5	*Chryseomonas luteola*	Soil	1	1.17
6	*Burkholderia cepacia*	Soil	1	1.17
7	*Aeromonas hydrophila*	Soil	1	1.17
8	*Streptococccus faecalis*	Soil,Water	2	2.3
	المجموع		85	

4-2-1 العد الكلي البكتيري للعينات

الاعداد الحية للمستعمرات المستحصلة من موقع الدراسة فكانت النتائج كما مبين في الجدول(4-5).

جدول (4-5) نسب الاعداد الحية للعينات البيئية

ت	العينات البيئية	معدل العد الكلي البكتيري × 10^4خلية لكل مل اوغرام
1	Water	3.26
2	Soil	125.69
3	Chicken feces	639.43

جمعت العينات البيئية في فصل الخريف والشتاء وذلك خلال شهر تشهرين الثاني الى شهر شباط ،إذ كانت نسب النتائج المسجلة للاعداد البكتيرية الحية لعينات المياه هي 3.26×10^4 خلية/مل ، والتربة 125.69×10^4 خلية/ مل والعينات المعزولة من فضلات الدجاج هي 639.43×10^{-4} خلية /مل .

3-4 التشخيص بوساطة جهاز الفايتك

Diagnosis by VIETK-2 system

شخصت العينات البيئية والسريرية كجزء من خطوات العمل التاكيدي لعملية تشخيص الانواع المعزولة من العينات ، يوفر هذا الجهاز الالكتروني حوالي 64 اختباراً من الاختبارات البايوكيميائية المختلفة فضلًا عن اختبار فحص الحساسية للعزلة المراد تشخيصها.

في الدراسة الحالية تم تشخيص 183 عزلة (98 عزلة سريرية و85 عزلة بيئية) والتي شخصت مسبقاً بالطرائق الزرعية والكيموحيوية ، تمت عملية التشخيص في المختبر في مستشفى الكندي التعليمي .

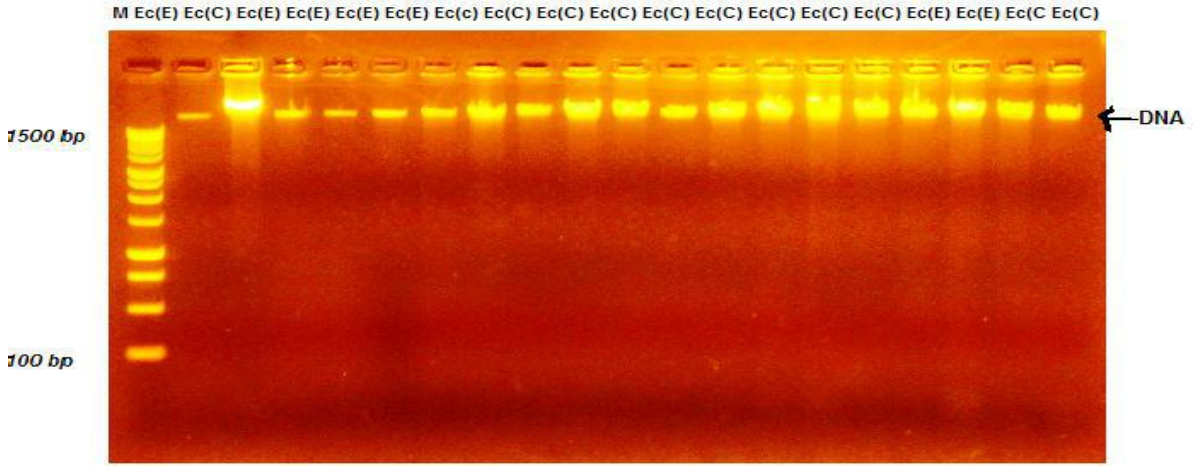
K.oxytoca احد الانواع التي تم تشخيصها عن طريق جهاز الفايتك وبنسبة 2.4% .ايضاً تم تشخيص نوع اخر مشابه في صفاته المظهرية وتفاعلاته البايوكيميائية لجنس *Klebsiella* وهو جنس *Raoultella planticola* وبنسبة 1.2% من مجموع العينات المستحصلة والمشخصة بجهاز الفايتك .

فضلًا عن تشخيص انواع اخرى بوساطة هذا الجهاز والتي لا تستطيع تخمير سكر اللاكتوز لكنها تنمو على وسط الماكونكي وتنتج صبغات وردية اللون ومنها *Chryseomona luteola* و *Burkolderia Cepacia* و *Aeromonas hydrophilia* وبنسبة 1.5 % لكل نوع .

4-4 التشخيص الجزيئي بوساطة التحري عن مورثة 16SrRNA

4-4-1 استخلاص الحامض النووي DNA Extraction

تم استخلاص الدنا الكلي من جميع العزلات البكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز باستعمال عدة الاستخلاص المجهزة من قبل شركة برومكيا الامريكية إذ تم زرع العزلات على وسط Luria-Bertani (LB) من اجل التنشيط وللحصول على كثافة نمو، كما موضح في الشكل الاتي.

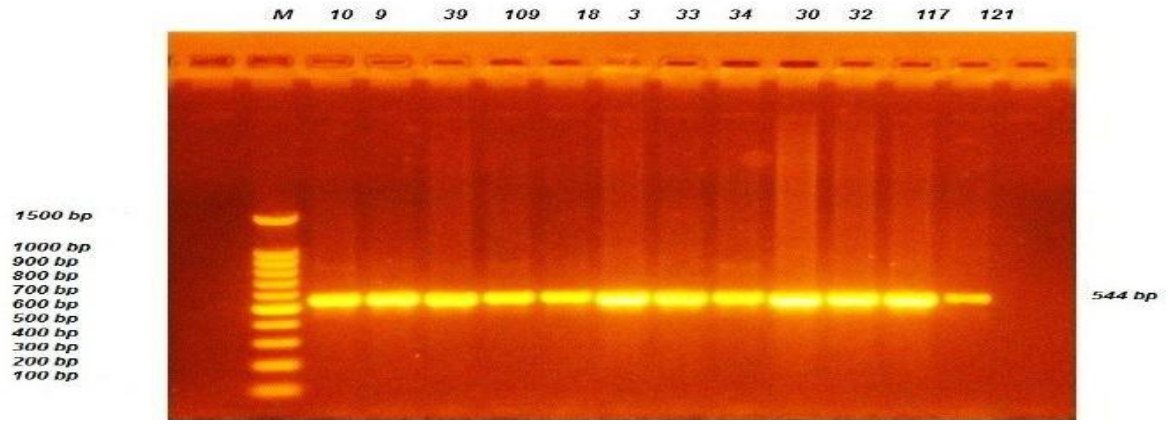


شكل (4-2) الترحيل الكهربائي للدنا DNA الكلي للعزلات البكتيرية باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1% وبكهربائية 70 فولت ولمدة ساعة واحدة .

4-4-2 تقنية تفاعل السلسلة المتعدد PCR

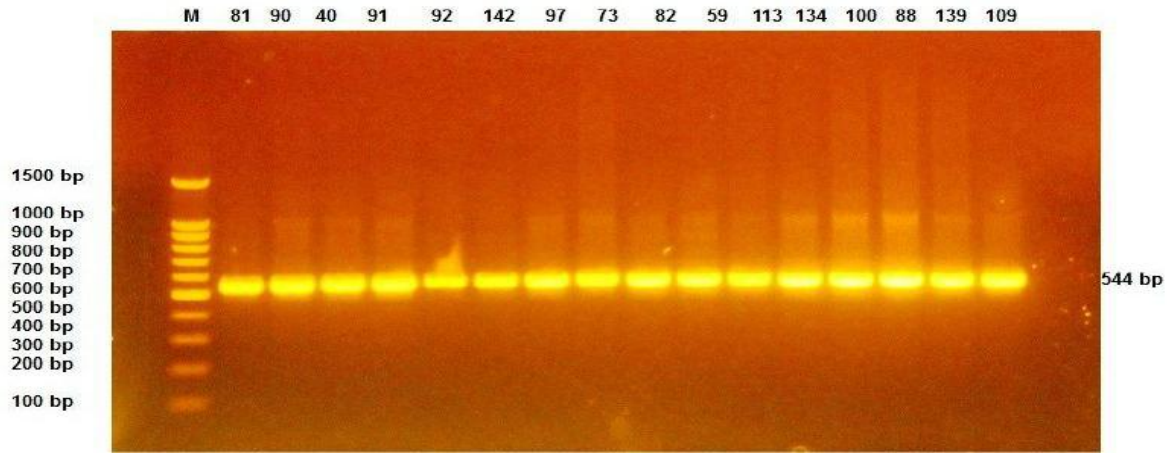
تم اجراء تفاعل السلسلة المتعدد بحجم نهائي 20 مايكرو ليتراً و باستعمال برايمر متخصص ببكتريا *E.coli* الذي يضم 23 قاعدة نيتروجينية واجري التفاعل حسب ظروف معينة مثبتة في الجدول المذكور مسبقاً في الفقرة 3-2-14-2 والخاص بجين 16SrRNA.

اظهرت نتائج التشخيص وجود هذا الجين الذي يبلغ وزنه الجزيئي 544 زوج قاعدي في جميع العزلات وبنسبة 100% في عزلات *E.coli* السريرية و البيئية (الشكل 4-3) (الشكل 4-4).

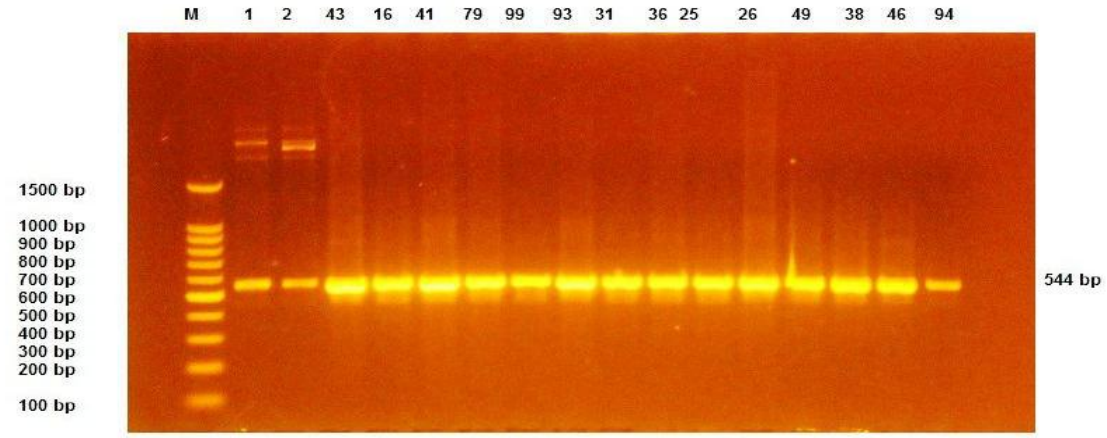


شكل (4-3) الترحيل الكهربائي لمورثة 16SrRNA لعزلات *E.coli* السريرية

بينما اظهرت عزلتين لبكتريا *Enterobacter aerogenes* تطابق للحزم المشابهه لبكتريا *E.coli* ومن جهة اخرى اظهرت *K. pneumoniae* وجود حزمتين للبرايمرنفسه عند الوزن الجزيئي 544 و <1500 (الشكل 4-5).

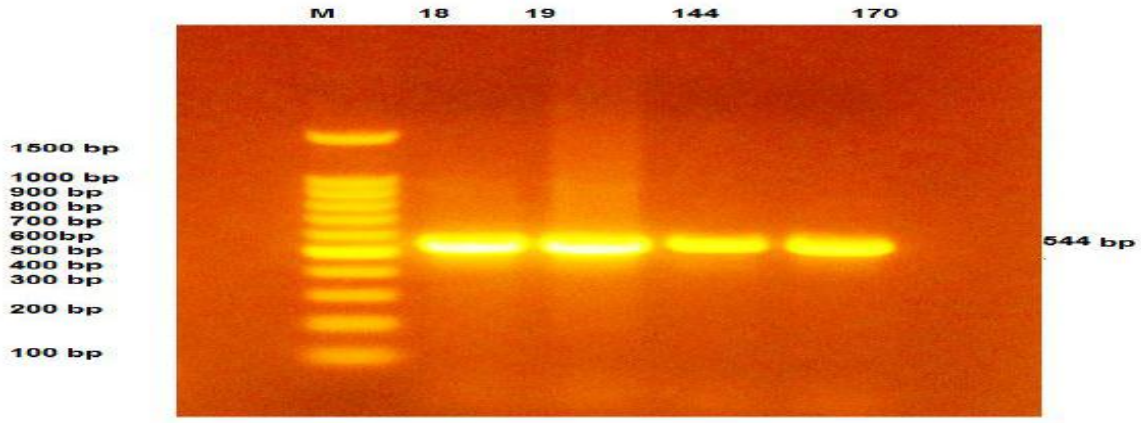


شكل (4-4) الترحيل الكهربائي لمورثة 16S rRNA لعزلات *E.coli* البيئية



شكل (4-5) الترحيل الكهربائي لمورثة 16SrRNA للعزلات. *K. pneumoniae* (1,2) *Enterobacter aerogenes* (43,16) *E.coli,* (94-41).

اظهـرت عـزلات كـل مـن بكتريـا *Serratia marcescens , Raoultella planticola* و *K.oytoca* و *Citrobacter freundii* تطابقاً للحزم المشـابهه *E.coli* إذ بينـت نتـائج الترحيل الكهربائي حزماً بحجم 544 زوج قاعدي ،الشكل (4-6).



شـكل (4-6) الترحيـل الكهربـائي لمورثـة 16SrRNA لعـزلات *: R.planticola* (19) , *K.oytoca* (18), *C. freundii* (144), *S. marcescens* (170)

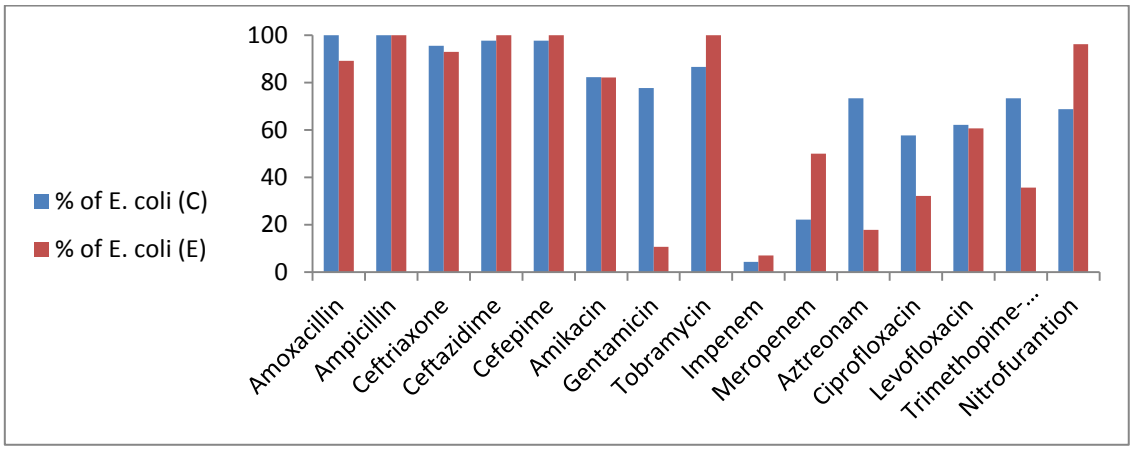
5-4 اختبار فحص الحساسية Sensitivity of antibiotic

اجري اختبار فحص الحساسية لـــ 120 عزلة من العزلات المشخصة باستعمال طريقة الاقراص ولخمسة عشر مضاداً المذكورة مسبقاً في الفقرة (3-1-6) للتعرف على نسب المقاومة التي تبديها العزلات المنتخبة ومقارنة هذه النسب تبعاً لمصدر العزل .

4-5-1 مقاومة العينات السريرية للمضادات الحيوية

اظهرت الدراسة الحالية مقاومة متعددة وواضحة لبكتريا السالبة لصبغة كرام والمخمرة لسكر اللاكتوز وهذه المقاومة كانت بشكل خاص لمجموعة مضادات β-Lactam .إذ بلغت نسبة المقاومة التي تبديها بكتريا *E.coli* المعزولة من العينات السريرية اتجاه مضادات Amoxcillin و Ampicillin هي 100% ونسبة مقاومتها لمضاد Ceftriaxone95.5% بينما كانت مقاومتها لمضادات Ceftazidime و Cefepime وTobramycin و Amikacin و Gentamicin هي 97.7% ,97.7% ، 86.6 %، 82.2% ، 77.7 % على التوالي .اما مجموعة مضادات الكاربنيم التي تضم مضادي Imipenem وMeropenem، فقد كانت نسب المقاومة 4.4 -22.2 % على التوالي . كانت نسبة المقاومة لمضاد Aztreoname الموجود ضمن مجموعة مضادات المونوبكتام 73.3 %.

مضادات الكوانيولين التي تضم مضادي Ciprofloxacin و Levofloxacin فقد كانت بكتريا القولون مقاومة للمضاد الاول بنسبة 57.7 % اما المضاد الثاني فقد كانت النسبة 62.2%.مجموعة مضادات السلفا ومضاد Nitrofurantoin كانت نسب المقاومة لها 73.3 % و 68.8 % على التوالي ، بلغت مقاومة بكتريا *E.coli* لمضادات السلفا ومضاد Nitrofurantoin 69-76.9% على التوالي .الشكل (4-7).



شكل (4-7) نسب المقاومة في بكتريا *E.coli* المعزولة من عينات بيئية وسريرية لمجموعة من المضادات الحيوية

تم اجراء فحص الحساسية لـ 13عزلة تابعة لبكتريا *K.pneumoniae* تم الحصول عليها في هذه الدراسة من العينات السريرية كما في الشكل (4-8)، وكما في بكتريا القولون فقد اظهرت هذه البكتريا مقاومة عالية لمضادات الببتالاكتم وبنسبة 100% لجميع المضادات الموجودة ضمن هذه المجموعة ماعدا مضاد الـ Ceftriaxone إذ بلغت نسبة مقاومتها لهذا المضاد 92.3 % . ولمجموعة مضادات الامينوكلايكوسيدية فقد كانت نسب المقاومة لمضاد Tobramycinو Amikacin وGentamicin هي 76.9% و46 % و46 % على التوالي . اما مجموعة مضادات الكوانيولين (ciprofloxacin و levofloxacin) فقد كانت نسب المقاومة تتراوح بين (30-46)% .

تم الحصول على 6 عزلات تابعة لبكتريا *Enterobacter aerogenes* واجري فحص الحساسية لجميع هذه العزلات وقد اظهرت مقاومة بشكل عالٍ لجميع مضادات الموجودة ضمن مجموعة البيتالاكتم وبنسبة 100% . اما المضادات Tobramycin و Gentamicin و Amikacin فقد كانت نسب المقاومة هي 100% و 50% و 33.3% على التوالي . وبنسبة33% لمضادات الكاربينيم . مضاد Aztreonam بلغت نسبة المقاومة له 83.3%، وللمضاد Levofloxacin, Ciprofloxacin

تراوحت النسب بين (33.3- 66.6)% ،والمقاومة لمضادات السلفا والـــ Nitrofurantoin هي 83-100% على التوالي .

كانت العزلات التي تم الحصول عليها لبكتريا *Serratia* ولـ *Citrobater* قليلة إذ جمعت 4 عزلات فقط وعمل لها اختبار فحص الحساسية .وكانت مقاومة بشكل عالٍ ومتعدد لكل مجاميع المضادات المستعملة في هذه الدراسة وبنسبة 100% ماعدا مضادات الكوانيولين والكاربنيم إذ تراوحت نسب المقاومة بين (50-100) % .

4-5-2 مقاومة العينات البيئية للمضادات الحيوية

اظهرت نتائج الدراسة الحالية نسب متفاوتة من المقاومة التي تبديها الانواع البكتيرية المعزولة من البيئات المختلفة اتجاه المضادات الحيوية .

بعد ان تم اختيار 28 عزلة تابعة لبكتريا *E.coli* اجري لها اختبار فحص الحساسية وكانت النتائج بشكل الاتي:

مضادات Ceftazidime و Ampicillin و Cefepime كانت نسبة المقاومة 100%

اما مضاد Amoxcillin كانت نسبة المقاومة 89% و92% لمضادCeftriaxone

اظهرت بكتريا القولون مقاومة عالية اتجاه مضاد Tobramycin وبنسبة 100% ،اما Amikain و Gentamycin بلغت نسبة المقاومة 82.2% , 10.7 % على التوالي.

مجموعة الكاربنيم (Impenem,meropenem) كانت فيها نسب المقاومة 50-7.1% على التوالي. 17.85 % لمضادAztreonam. نسب المقاومة لمضادات (Ciprofloxacin,Levofloxacin) كانت 32-60.7 % على التوالي . اما اتجاه مركبات السلفا ومضاد Nitrofurantoin فقد كانت 35.7، 96% على التوالي .

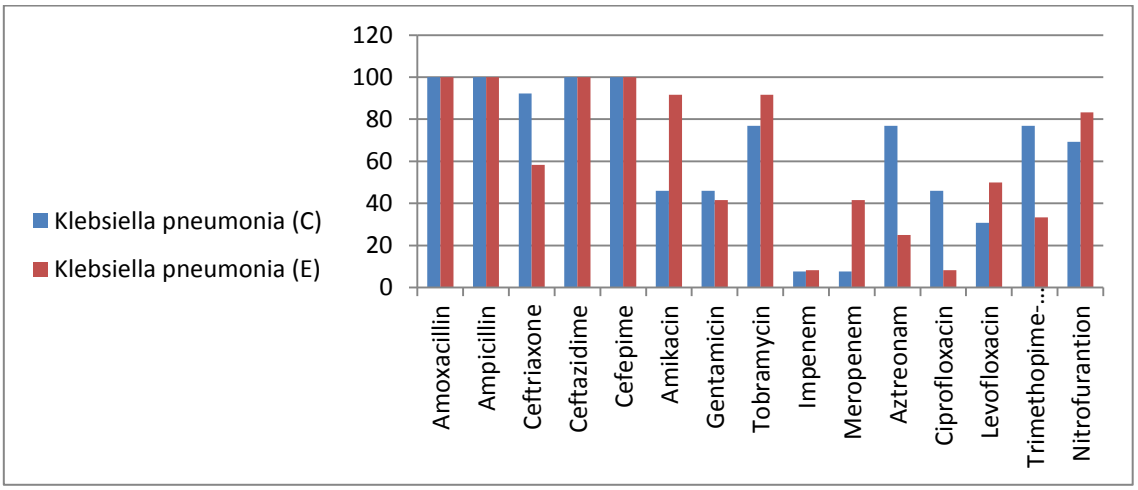
تم اجراء فحص الحساسية لنوعين تابعة لجنس الكلبسيلا وهي : *K.pneumoniae, K.oxytoca*

اظهرت نتائج الدراسة مقاومة تامة وبنسبة 100% لجميع مضادات مجموعة البيتالاكتم ماعدا مضاد Ceftriaxone إذ كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد من قبل بكتريا *K.pneumoniae* 58% و50 % للـ *K.oxytoca* .

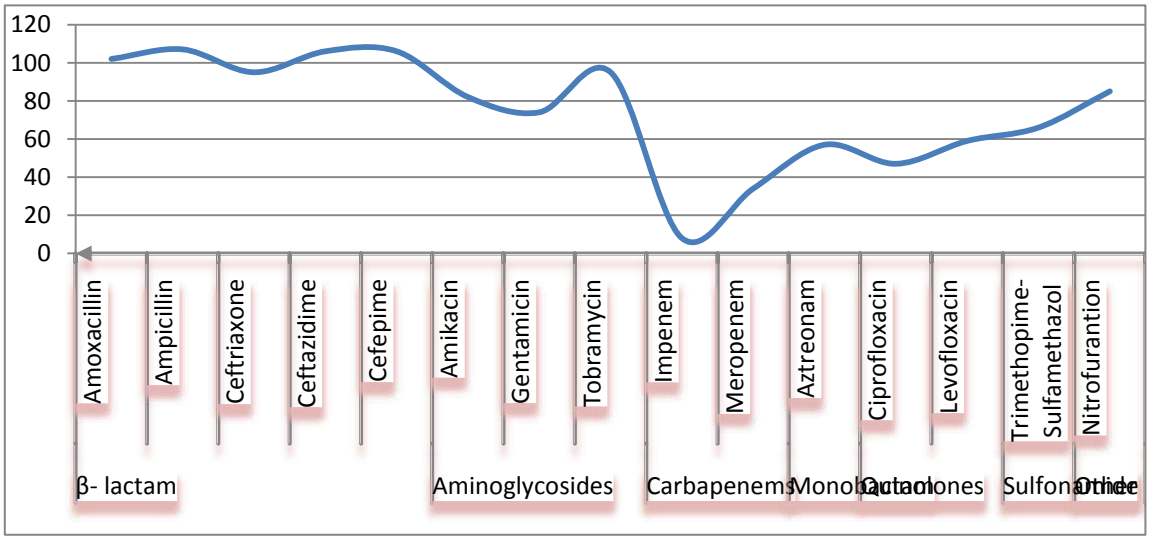
اظهرت بكتريا *K.pneumoniae* مقاومة عالية اتجاه مضادي Tobramycin وAmikacinوبنسبة 91.6% ولمضاد Gentamycin 41.6 % اما بكتريا *K.oxytoca* فقد كانت النسبة تتراوح بين 50-100% لمضادي Amikacin وTobramycin ،اما اتجاه مضاد Gentamycin فلم تظهر أية مقاومة ،المقاومة اتجاه مضادات مجموعة الكاربنيم كانت ضعيفة إذ تراوحت بين41.6 -8.3% في بكتريا الكلبسلا الرئوية في حين كانت 50% في بكتريا *K. oxytoca* اما مضادات المونوباكتم فقد بلغت المقاومة لها في بكتريا *K.pneumoniae* 25% ، في حين بلغت المقاومة لهذه المضادات في بكتريا *K. oxytoca* 50 %.

كانت نسبة مقاومة بكتريا *K.peumoniae* لمضادات الكوانيولين تتراوح بين (8.3-50)% اما في بكتريا *K.oxytoca* كانت اعلى وتتراوح بين (50-100) % .

مضادات السلفا كانت مقاومة بكتريا *K.pneumoniae* لها بنسبة 33.3 % اما اتجاه مضاد Nitrofurantoin فقد بلغت النسبة 83.3 % . اما بكتريا *K.oxytoca* فقد اظهرت مقاومة تامة ضد مركبات السلفا ومضادNitrofurantoin وبنسبة 100%.هناك انواع جديدة ظهرت عند عملية العزل للعينات البيئية ومنها بكتريا *R.planticola* ،اظهر هذا النوع مقاومة عالية لمضادات البيتالاكتم ومضادات السلفا ومضاد Nitrofurantoin وبنسبة 100% في حين كانت غير مقاومة لجميع انواع مضادات مجموعة الامينوكلايكوسيدية ومضادات الكوانيولين . والمونوباكتم . اما مضادات الكاربنيم فقد كانت مقاومة لمضاد Meropenem وغير مقاومة لمضاد Impenem. كما في الشكل (4-8) .



شكل (4-8) نسب المقاومة في بكتريا *K.peumoniae* المعزولة من عينات بيئية وسريرية لمجموعة من المضادات الحيوية .



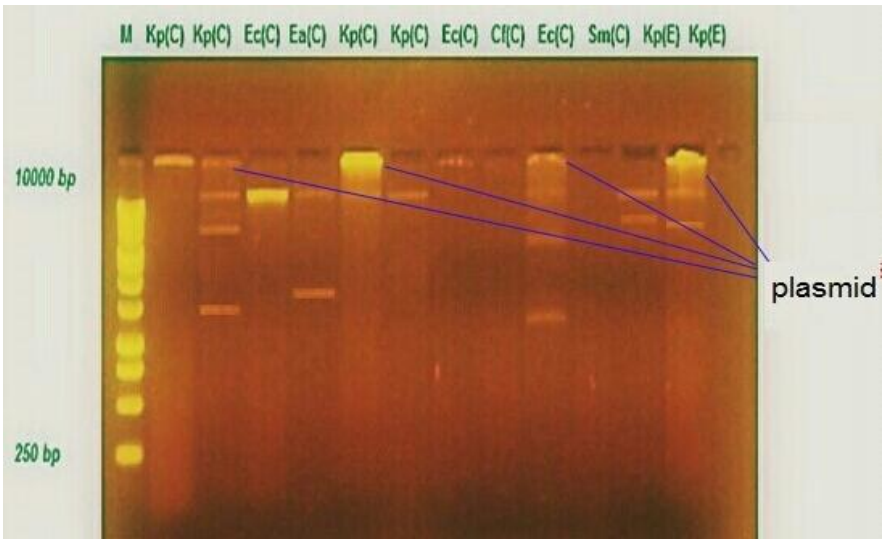
الشكل (4-9) مخطط يظهر فعالية المضادات الحيوية المستعملة اتجاه جميع العزلات

6-4 التحري عن الدنا البلازميدي Plasmid content

1-6-4 استخلاص البلازميد بطريقة العدة الجاهزة

AccuPrep® PlasmidMini Extraction Kit

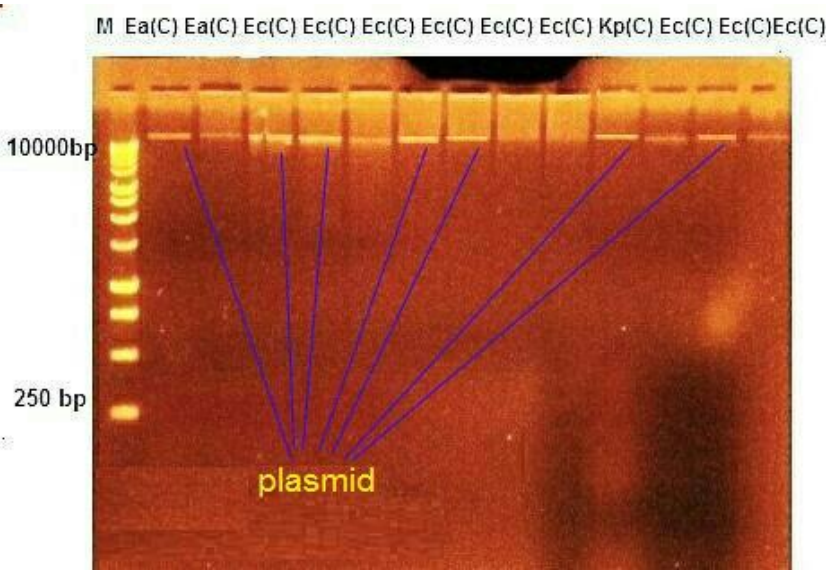
تم التحري عن المحتوى البلازميدي للعزلات قيد الدراسة باستعمال طريقة التحلل القاعدي Alkaline lysis المجهزة من الشركة المصنعة والتي يمكن من خلالها الحصول على البلازميدات بحجم 10000 زوج قاعدة ، اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز احتواء 35 عزلة من اصل 48 عزلة على بلازميد ذات اوزان جزيئية بحجم 10000 زوج قاعدي اي بنسبة 75 % كما موضح بالشكل (4-10) (4-11) (4-12)(4 -13) . واحتواء 15 عزلات اي بنسبة 31.25% على بلازميدات ذات اوزان جزيئة كبيرة تتجاوز 10000 زوج قاعدي .



No.	Isolates	No. of plasmid ≤ 10000 bp	No. of Mega plasmid ≥ 10000 bp
1	Kp (C)	-	1
2	Kp (C)	4	-
3	Ec (C)	1	-
4	Ea (C)	2	-
5	Kp (C)	-	2
6	Kp (C)	1	-
7	Ec (C)	-	-
8	Cf (C)	-	-
9	Ec (C)	3	1
10	Sm (C)	-	-
11	Kp (E)	2	-
12	Kp (E)	-	3

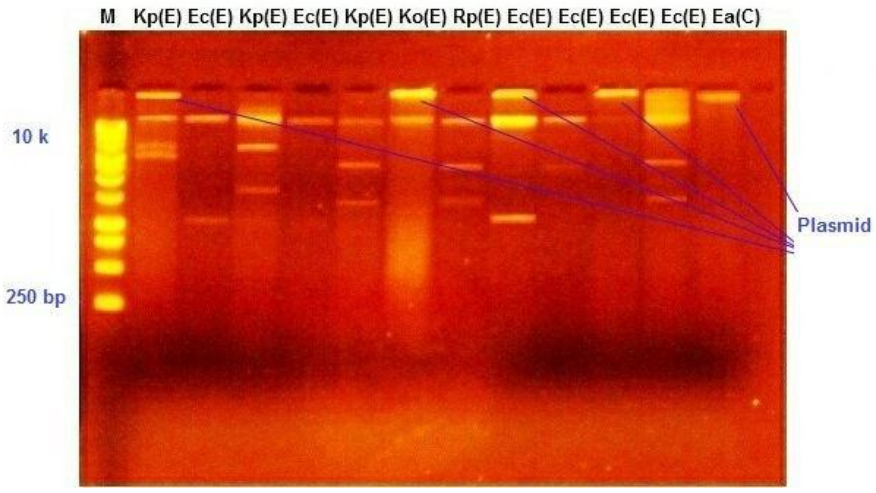
شكل (4-10) الحزم البلازميدية المعزولة من عينات بيئية وسريرية بطريقة العدة الجاهزة وفي ظروف ترحيل (اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف) .

(-) = عدم وجود حزم البلازميدية ، (C) = عزلات سريرية ، (E) = عزلات بيئية، (3) = ثلاثة حزم بلازميدية
(2) = حزمتين بلازميدية، (1)= حزمة بلازميدية واحدة.



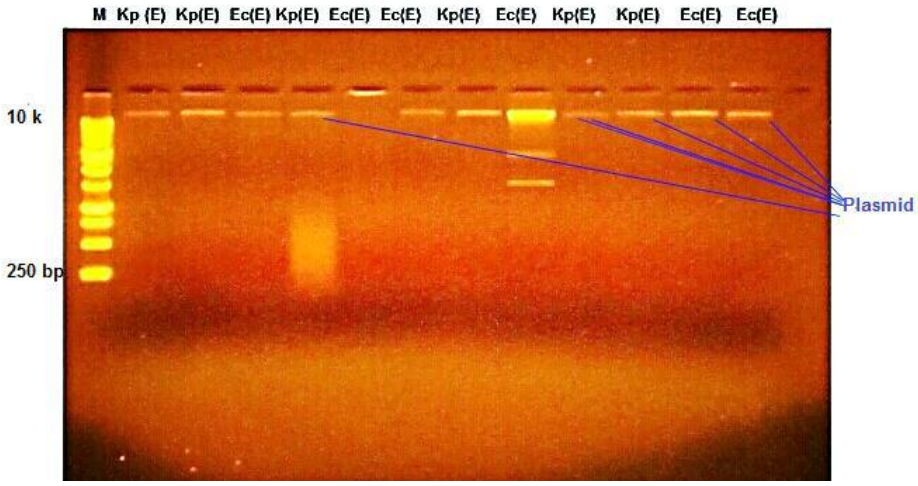
No.	isolates	No. of plasmid ≤ 10000 bp	No. of Mega plasmid ≥ 10000 bp
1	Ea (C)	1	-
2	Ea (C)	1	-
3	Ec (C)	1	-
4	Ec (C)	1	-
5	Ec (C)	1	-
6	Ec (C)	1	-
7	Ec (C)	1	-
8	Ec (C)	-	-
9	Kp (C)	-	-
10	Ec (C)	1	-
11	Ec (C)	1	-
12	Ec (C)	1	-

شكل (4-11) الحزم البلازميدية المعزولة من عينات سريرية بطريقة العدة الجاهزة وفي ظروف ترحيل (اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف).



No	Isolates	No. of plasmid ≤ 10000 bp	No. of Mega plasmid ≥ 10000 bp
1	Kp (E)	4	-
2	Ec (E)	2	-
3	Kp (E)	4	-
4	Ec (E)	1	-
5	Kp (E)	3	-
6	Ko (E)	-	2
7	Rp (E)	3	-
8	Ec (E)	1	2
9	Ec (E)	1	-
10	Ec (E)	-	1
11	Ec (E)	3	-
12	Ec(E)	-	1

شكل (4-12) الحزم البلازميدية المعزولة من عينات بيئية بطريقة العدة الجاهزة وفي ظروف ترحيل (اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف)

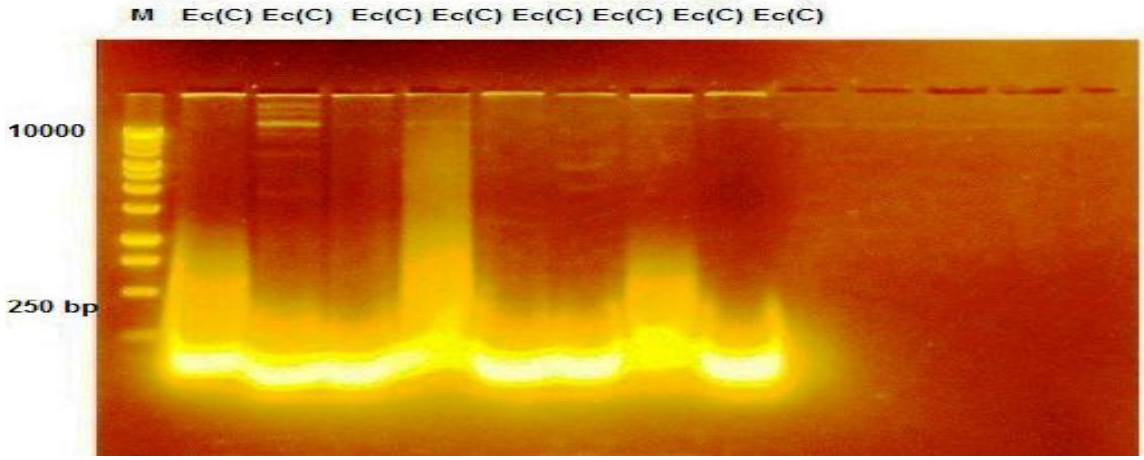


No.	Isolates	No. of plasmid ≤ 10000 bp	No. of plasmid ≥ 10000 bp
1	Kp (E)	1	-
2	Kp (E)	1	-
3	Ec (E)	1	-
4	Kp (E)	1	-
5	Ec (E)	-	1
6	Ec (E)	1	-
7	Kp (E)	1	-
8	Ec (E)	3	-
9	Kp (E)	1	-
10	Kp (E)	1	-
11	Ec (E)	1	-
12	Ec (E)	1	-

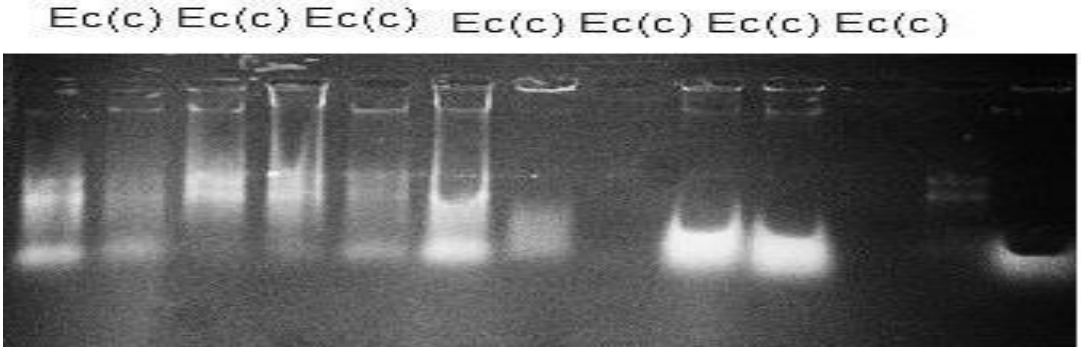
شكل (4-13) الحزم البلازميدية المعزولة من عينات بيئية بطريقة العدة الجاهزة وفي ظروف ترحيل (اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف) .

4-6-2 استخلاص البلازميدات بالطريقة القاعدية (المانول) Alkaline method

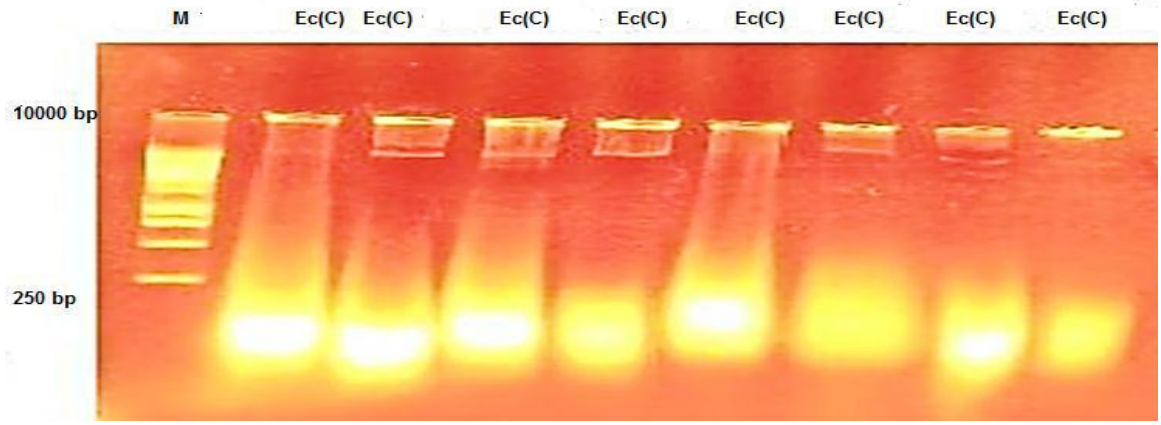
اظهر استعمال الطريقة القاعدية الروتينية لاستخلاص البلازميد صورة اوضح لعزل البلازميدات التي تزيد احجامها عن 10000 زوج قاعدي الشكل (4-14)، (4-15)، (4-16). يوضح الشكل (4-17) مقارنة لذات العينات عند الاستخلاص باستعمال العدة الجاهزة والطريقة الروتينية.



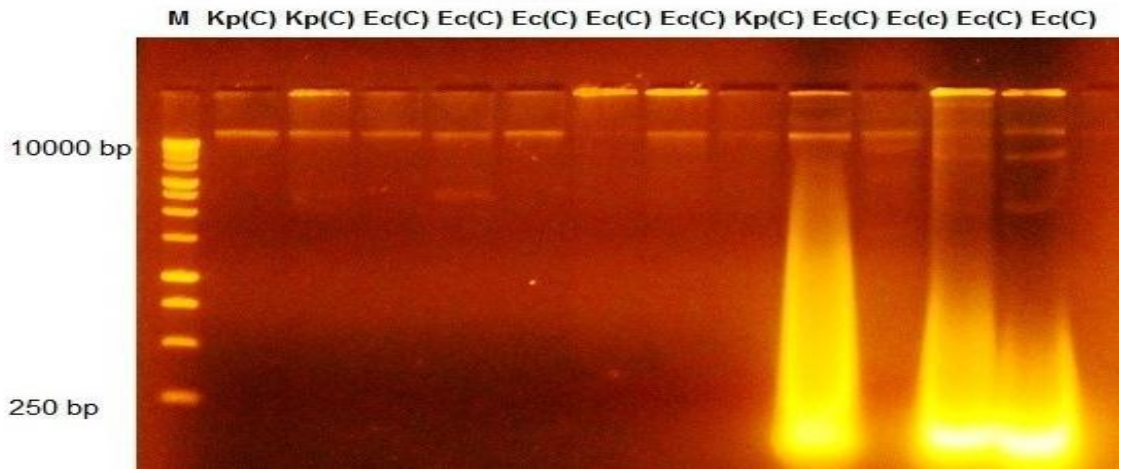
شكل (4-14) الحزم البلازميدية المعزولة من عينات سريرية بطريقة المانول القاعدي وفي ظروف (ترحيل اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف)



شكل (4-15) الحزم البلازميدية المعزولة من عينات سريرية بطريقة المانول القاعدي وفي ظروف ترحيل (اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف)



شكل (4-16) الحزم البلازميدية المعزولة من عينات سريرية بطريقة المانول القاعدي وفي ظروف ترحيل (اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف).



شكل (4-17) الحزم البلازميدية المعزولة من عينات سريرية بطريقة المانول القاعدي وطريقة العدة الجاهزة وفي ظروف ترحيل (اكاروز 1% وفرق جهد 70 فولت ولمدة ساعة ونصف) .

7-4 تحييد البلازميدات Curing plasmid

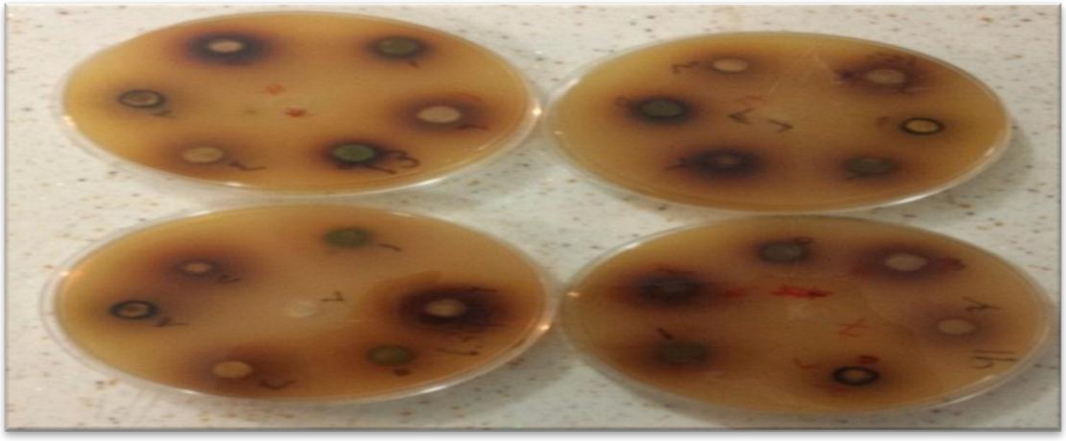
1-7-4 الفعالية المباشرة للمستخلص النباتي في البكتريا

تم دراسة فعالية مستخلصات اوراق النباتات بتركيز الكحولي والمائي (اوراق الزيتون ،الكالبتوس،الحلبة) بتركيز 600mg/ml ،فضلاً عن مادة SDS (3%) المحيدة وذلك باستعمال طريقة الحفر.

بعد زرع الانواع المدروسة [Kp (13),Ec (91),Ec (133), Ec (139)] بطريقة الفرش على الاكار الصلب ، نتائج الدراسة اظهرت عدم تاثر الانوع البكتيرية بالمستخلصات النباتية المستعملة ولا بمادة SDS إذ نمت البكتريا بشكل كثيف ولم تظهر أية منطقة للتثبيط ماعدا مادة الحلبة المائي التي اظهرت تاثيراً متوسطاً في العزلات كما في الجدول (4-6). إذ اثر مستخلص الحلبة المائي على بكتريا الايكولاي إذ تكونت منطقة تثبيط بقطر 7 ملم وايضا في بكتريا *K.peumoniae* إذ تكونت منطقة تثبيط بقطر 6 ملم، الشكل (4-18)

جدول(4-6) مناطق التثبيط الناتجة من تاثير المستخلصات النباتية في البكتريا

المستخلص النباتي	91 *E. coli*	*13 K. peumoniae*	133 *E. coli*	139 *E.coli*
	قطر منطقة التثبيط بالملم			
كالبتوس كحولي	-	-	-	-
كالبتوس مائي	-	-	-	-
حلبة كحولي	-	-	-	-
حلبة مائي	7 ملم	6ملم	8 ملم	7 ملم
اوراق زيتون كحولي	-	-	-	-
اوراق زيتون مائي	-	-	-	-
SDS 3 %	-	-	-	-



شكل (4 -18) مناطق التثبيط الناتجة من تأثير المستخلص النباتي في البكتريا قيد الدراسة

4-7-2 التركيز المثبط الادنى MIC للمستخلص النباتي

تم تحديد قيمة التركيز المثبط الادنى Minimum Inhibitory Concentration للمستخلصات النباتية (اوراق الزيتون ،الكالبتوس ، الحلبة) في الوسط السائل (ماء الببيتون) وذلك بعمل تخافيف مضاعفة متسلسلة (1/2، 1/4 ،1/8) لكل عينة من التركيز الاصلي . انتخبت عزلتان من الانواع المدرسة لتحديد MIC : عزلة رقم (133) *E.coli* وعزلة رقم (13) *K.pneumoniae* وسجلت النتائج كما في جدول (4-7).

جدول (4-7) كثافة نمو المستعمرات البكتيرية وتحديد الـ MIC

البكتريا	التركيز	SDS	زيتون مائي	زيتون كحولي	حلبة مائي	حلبة كحولي	كالبتوس مائي	كالبتوس كحولي
Ec (C)133	2/1	+	+	++	+	+	+	+
	4/1	+++	++	++	++	++	++	++
	8/1	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
Kp(E)13	2/1	+	+	+	+	+	+	+
	4/1	++	+	+	++	++	++	+
	8/1	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++

+ يشير الى النمو الضعيف للمستعمرات البكتيرية، ++ يشير الى النمو المتوسط للمستعمرات البكتيرية

+++ يشير الى النمو مستعمرات البكتيرية بدرجة كثيفة

من خلال الجدول المبين اعلاه نلاحظ حصول نمو كثيف عند التخفيف الثالث 1/8لكل من العزلتين واتجاه المستخلصات المائية والكحولية ومركب SDS، واقل كثافة نمو عند التخفيف 1/2. تم انتخاب مستعمرات للعزلة 13 (*K.pneumonia*) المعاملة بمستخلص الحلبة الكحولي و مستخلص الزيتون الكحولي والعزلة 133 (*E.coli*) المعاملة بمستخلص كالبتوس المائي و المعاملة بـ SDS3%، لاختبار كفاءة التحييد وعلاقتها بفعالية المضادات الحياتية.

جدول (4-8) اختبار الحساسية للعزلات المنتخبة بعد معاملتها بالمستخلصات النباتية

رقم العينة	Amoxiclin	Ampicilln	Ceftriaxone	Ceftazidime	Cefepime	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Impenem	Meropenem	Aztreonam	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Trimethopime Sulfamethazole	Nitrofurantion
13 قبل	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R
13بعد O-A	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S
13بعد L-A	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
133 قبل	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
133 بعد U-W	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
133 بعد SDS	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R

R= يشير الى العزلة المقاومة، S= يشير الى العزلة الحساسة، O-A = يشير الى مستخلص الزيتون الكحولي،
U-W= يشير الى مستخلص اليوكالبتوس المائي، L-A = يشير الى مستخلص الحلبة الكحولي

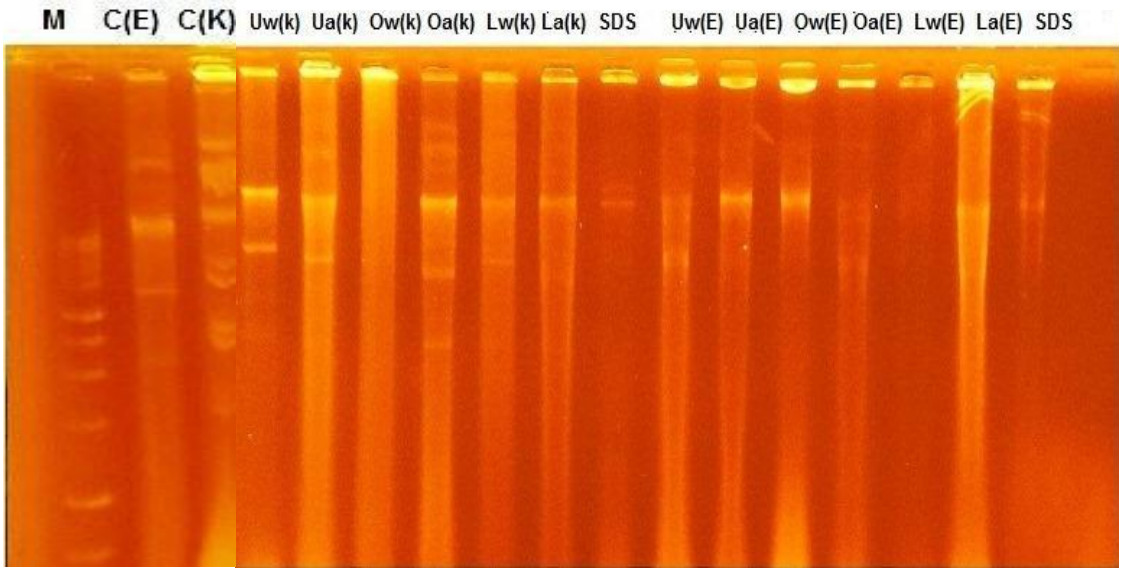
شكل (4 -19) تجربة اختبار الحساسية للعزلات بعد معاملتها بالمستخلصات النباتية

بينت نتائج اختبار الحساسية للمستعمرات المنتخبة تغيراً واضحاً في قابلية المقاومة للمضادات الحيوية، زادت نسبة الحساسية للمضادات لعزلة *E.coli* من 20% الى 46.6% عند المعاملة مع مستخلص الكالبتوس المائي وبنسبة 66.6% عند المعاملة بمركب SDS . من جهة اخرى اظهرت عزلة *Klebsiella* تبايناً في قابلية تاثير المضادات الحيوية ،ظهرت الحساسية لمضاد Amikacin وNitrofurantion واختفت الفعالية ضد Impenem و Meropenem بعد المعاملة بمستخلص الزيتون الكحولي.

اظهرت عزلة *Klebsiella* المعاملة بمستخلص الحلبة الكحولي حساسية ضد Amikacin Tobramycin و Nitrofurantion ومقاومة Meropenem و Sulfamethazole Trimethopime ، تراوحت نسب التأثير في الحساسية بين 40% الى 46.6% .

3-7-4 تاثير المستخلص في عملية تحييد الدنا البلازميدي عند استخلاصه بطريقة التحلل القاعدي

بعد ان تم اجراء عملية الاستخلاص بطريقة التحلل القاعدي على العزلتين 13 و133 المعاملتين بمستخلص المائي والكحولي من الكالبتوس،الحلبة، الزيتون وكذلك بـ SDS 1% لوحظ حدوث عملية تحييد لبلازميد واحد للعزلة Kp(13) المعاملة بمستخلص الكالبتوس المائي والكحولي والحلبة المائي مقارنة مع عزلة السيطرة اما العزلة المعاملة بمستخلص الزيتون المائي فقد حصل تحييد لثلاث بلازميدات،ولم تتاثر بمستخلص الزيتون الكحولي اذا احتفظت بجميع البلازميدات . وفقدت بلازميدين عند معاملتها بمادة SDS .العزلة رقم 133 حصل فقدان لبلازميدين لكل من مستخلص الكالبتوس المائي والزيتون الكحولي والمائي والحلبة المائي وفقدت بلازميد واحد عند معاملتها بمستخلص الكالبتوس والحلبة الكحولي اما مادة SDS فقد حيدت ثلاثة بلازميدات.



شكل (4-20) عملية التحييد للبلازميدات بعد معاملتها بالمستخلصات النباتية

Uw = تشير الى مستخلص اليوكالبتوس المائي، Ua = تشير الى مستخلص اليوكالبتوس الكحولي

Lw = تشير الى مستخلص الحلبة المائي، La = تشير الى مستخلص الحلبة الكحولي

Oa= تشير الى مستخلص الزيتون الكحولي، Ow = تشير الى مستخلص الزيتون المائي

K= تشير الى عزلة بكتريا الكلبسيلا الرئوية ،E= تشير الى عزلة بكتريا القولون

CK= يشير الى كونترول للعزلة الكليبسلا الرئوية ،CE= يشير الى كونترول للعزلة بكتريا القولون

يظهر من الصورة اعلاه بان بكتريا القولون كانت اكثر تاثراً بالمستخلصات النباتية المستعملة من بكتريا *K.peumoniae*.

4-7-4 التاثير المباشرللمستخلص النباتي في الدنا البلازميدي

تم اختيار اربع عزلات ذات المحتوى البلازميدي المتعدد وهي : [Ec(91),Kp(13) Ec(133),Ec(139)] ومن ثم اضافة المستخلص النباتي (الكالبتوس، حلبة ،زيتون) مع الدنا البلازميدي من العزلات المنتخبة وحضن لمدة ساعة في درجة حرارة 37 ° م ورحلت لمدة نصف ساعة ، وكانت النتائج كالتالي:

أ- مستخلص الكالبتوس المائي سبب تأكل البلازميدات الثلاثة التي تحتويها العزلة 13و139 والتي يبلغ وزنها الجزيئي اصغر اويساوي 10000 زوج قاعدي،.

ب- مستخلص الكالبتوس الكحولي اثر بشكل واضح في البلازميد الكبير للعزلة 91 والتأثيرنفسه كان واضحا على العزلة 133. اما في العزلة 13 احتفظت على البلازميد الصغير ولم تتاثر.

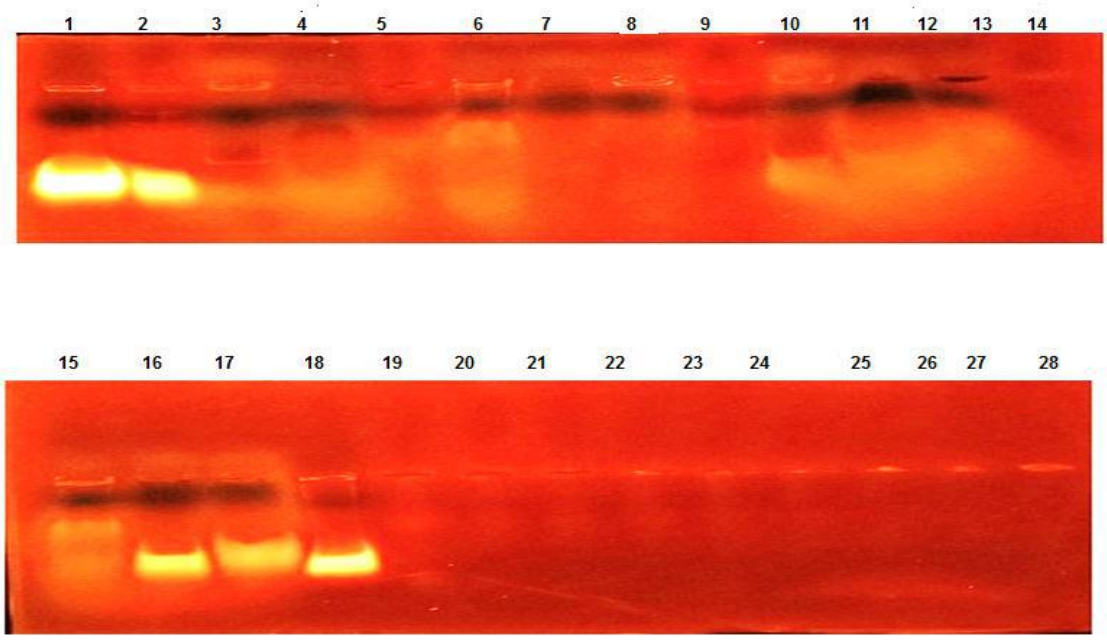
ج- مستخلص الحلبة المائي اثر في جميع الانواع البكترية البلازميدات.

د- مستخلص الحلبة الكحولي اثر في جميع الانواع البكتيرية للبلازميدات ولكنه لم يؤثر في البلازميدات الكبيرة الموجودة في العزلة 133.

هـ- مستخلص الزيتون المائي اثر على الحزم البلازميدية.

و- مستخلص الزيتون الكحولي اثر فقط في البلازميد في جميع العزلات.

ي- SDS بتركيز 1% اثر في البلازميدات الصغيرة في العزلة رقم 133 و 139 اما عزلة 13 فقد احتفظت ببلازميد واحد فقط وفقدت اثنان .



الشكل (4-21) تاثير المستخلصات النباتية بشكل مباشر في حزم البلازميد

- **1-2-3-4-5-6-7 = يشير الى عزلة رقم 91 المعاملة بمستخلص الكالبتوس الكحولي والمائي والحلبة الكحولي والمائي والزيتون الكحولي والمائي و SDSعلى التوالي**
- **8-9-10-11-12-13-14 = يشير الى العزلة رقم 13 المعاملة بمستخلص الكالبتوس الكحولي والمائي والحلبة الكحولي والمائي والزيتون الكحولي والمائي و SDS على التوالي**
- **15-16-17-18-19-20-21-= يشير الى العزلة رقم 133 المعاملة بمستخلص الكالبتوس الكحولي والمائي والحلبة الكحولي والمائي والزيتون الكحولي والمائي و SDSعلى التوالي**
- **22-23-24-25-26-27-28 = يشير الى العزلة رقم 139 المعاملة بمستخلص الكالبتوس الكحولي والمائي والحلبة الكحولي والمائي والزيتون الكحولي والمائي والـ SDS**

المناقشة

Discussion

1-5 العزل والتشخيص Isolation and diagnosis

1-1-5 العينات السريرية Clinical sample

تؤكد الدراسات الحديثة اهمية البكتريا المعوية المخمرة لسكر اللاكتوز في الاصابات السريرية في المستشفيات. ففي الدراسة الحالية تم جمع 98 عزلة سريرية تعود لبكتريا العائلة المعوية من مستشفيات بغداد المتخصصة .

بعد اجراء الفحوصات التشخيصية و الزرعية اظهرت النتائج ان كلاً من بكتيريا *E.coli* و *K.pneumoniae* هي اكثر الانواع شيوعاً. في احدى الدراسات السابقة تم جمع حوالي 812 عينة من مرضى المستشفيات، كان اول نوع بكتيري معزول هو *E.coli* من عينات الادرار والثانية هي بكتيريا *Enterobacter* والسادس هي *Klebsiella* ، لكن من عينات الدم فان بكتيريا *Enterobacter* و*E.coli* سجلت رابعاً وخامساً على التوالي (Japoni *et al*.,2009). اشار (Beyene and Tsegaye,2011) في دراستهما للكشف عن مسببات التهاب المجاري البولية ان مجموعة بكتيريا السالبة لصبغة كرام ومنها *E.coli* كانت من المسببات الأكثر شيوعاً في التهابات المسالك البولية .

البكتيريا السالبة لصبغة كرام عادة لا تتواجد في البيئة الجافة من الجلد الطبيعي (Chiller *et al*.,2001) لكنها تتواجد في بعض الاحيان في مناطق الثنيات الرطبة التي تسمح بنمو بكتيريا *Acintobacter* .

بينت الدراسة الحالية ان بكتيريا *Escherichia coli* و *Citrobacter freundii* هي اكثر الانواع المخمرة لسكر اللاكتوز المعزولة من الادرار. في دراسة سابقة تم فيها جمع العينات من التهابات العمليات الجراحية المزمنة سجلت بكتريا *Serratia spp* و*E.coli* في المرتبة السادسة والسابعة من بين الكائنات الحية المعزولة (Wolcott *et al*.,2009) .

كانت *K.peumoniae* المعزولة من عينات القشع هي الاكثر شيوعاً، في حين اشار(Cukic,2013) في دراسته لعينات القشع ان اول بكتيريا شائعة ومسببة للالتهاب الرئوي من وحدة العناية المركزة هي *Klebsiella* و*E.coli* و*Enterobacter* ثالثاً ورابعاً وسادساً على التوالي يتضح من نتائج الدراسة الحالية الى اهمية بكتريا القولون كنوع منتشربشكل واسع ضمن العينات السريرية لاسيما في عينات الادرارللاشخاص المصابين بالتهابات المجاري البولية .

5-1-1-1 علاقة العمر والجنس بالاصابة بالبكتريا قيد الدراسة

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي لـ 98 عزلة تعود لانواع بكتيرية مختلفة ولاجناس وفئات عمرية مختلفة ،ان بكتريا *E.coli* كانت تشكل النسبة الاكثر من بين الانواع الاخرى وذلك يعود الى ان معظم عينات التي تم الحصول عليها هي من عينات الادرار، قد يكون سبب انتشارها بهذه النسب الى شيوع التهابات المجاري البولية بين معظم الفئات العمرية ولان بكتريا *E.coli* تعد المسبب الرئيس لهذا المرض (Johnson, 1991).

اظهرت النتائج الحالية ان النساء اكثر عرضة للاصابة من الرجال ببكتريا *E.coli* بنسبة 48 % وهذا يتفق مع ماتوصل اليه نانكلى وعبد الرحمن (2015) اللذان وجدا ان بكتريا *E.coli* كانت اكثر ظهوراً في الاناث المصابة بالتهابات المجاري البولية. يعود السبب الى الاختلافات الفسلجية بين الجنسين إذ تصاب الاناث مرة واحدة على الأقل في مرحلة ما من حياتهن. كما يعد تكرار الإصابة امراً شائعاً ،هذا يرجع الى الطبيعة التشريحية الأنثوية من حيث قصر الاحليل وقربه الكبير من فتحة المستقيم والعلاقة الجنسية والتاريخ العائلي (Nicolle ,2008). اما الذكور فان نسبة الاصابة بالامراض تنخفض بسبب افرازات البروستات التي تعمل كمادة مطهرة ومضادة للجراثيم وبذلك تحمي الجهاز البولي الذكري (Westwood *et al*.,2005)، اما بكتريا *K.pneumoniae* فقد كانت اكثر شيوعاً في عينات القشع إذ ترتبط اصابة الجهاز التنفسي بهذا النوع البكتيري وايضا تعد من اهم مسببات

الامراض المكتسبة بالمستشفيات (Cukic , 2013). هذا يتفق مع ماتوصل (Jasim,2012) الذي اشار الى ان توزيع عزلات بكتريا *K.pneumoniae* المعزولة من مصادر سريرية كانت اعلى نسبة عزل لها من عينات القشع التي بلغت نسبتها 19% كما كانت نسبة عزلات *K.pneumoniae* من الادرار هي 1.7% .

بينت النتائج ايضا اصابة الاطفال ذوي الفئة العمرية التي تتراوح بين 1-10 سنوات ببكتريا القولون اكثر من الفئات العمرية الاخرى وهذا يعود الى ضعف البنية الجسدية للطفل او اتباع طرائق خاطئة لتنظيف منطقة الشرج مما ساعد على انتقال الجراثيم والاصابة بالأمراض (Cavagnaro, 2005).

2-5 العينات البيئية Environmental samples

تعد عملية فحص الاعداد الحية للبكتريا من الفحوصات المهمة والمميزة في مجال تقييم المياه إذ يتضمن فحص جميع الانواع البكتيرية ،كما ويعد هذاالفحص دليلاً مناسباً لكفاءةعملية التعقيم ومن ثم صلاحية الماء للاستهلاك .

كانت نتائج العد الكلي للبكتريا الحية في عينات المياه هي 26. 3×10^4 ، في دراسة سابقة لاحد الباحثين عن التلوث الميكروبي لنهر الحلة وجد ان الاعداد الحية للبكتريا المعزولة بلغ حوالي 1.75×10^{-4} خلية/مل (Abo Nasrya,2009) .

قد ترجع اسباب ازدياد اعداد البكتريا في المياه الى توفرالظروف الملائمة لنمو وتكاثر البكتريا، او وجود مستويات عالية من المواد العضوية او انخفاض منسوب مياه دجلة واستقباله لكميات كبيرة من مياه الصرف الصحي التي قد يكون مصدرها المنازل القريبة من منطقة الدراسة اوتاثير درجات الحرارة.

في دراسة محلية لدراسة بعض الملوثات البكتيرية لنهر الفرات وحتى نهاية مجرى النهر في منطقة الفلوجة وبحيرتي الثرثار والحبانية ،اظهرت النتائج ان العدد الكلي للانواع البكتيرية في المياه خلال مدة الدراسة تراوحت (70-314× 10^4) خلية /مل (عبد الرحمن واخرون ,2009). يعد وجود البكتريا في الطبقة السطحية ظاهرة طبيعية وتكون جزءاً من التركيب الحي للنظام البيئي ولكن عند وجود مصدر للتلوث العضوي كفضلات الانسان تساعد على زيادة الانواع البكتيرية وتنوعها (Hynes,1974). في دراسة محلية اجريت لنهر دجلة خلال شهري اغسطس وسبتمبر اشار فيها الباحث الى ان الاعداد الحية للبكتريا تراوحت مابين 1.28- 10×10^3خلية/مل . (Ibrahim *et al*.,2013)

في الدراسة الحالية كانت الاعداد البكتيرية الحية في عينات التربة العضوية هي 125.69 ×10^4 خلية/مل .اشار (Najmadeen,2011) الى ان الاعداد البكتيرية في التربة كانت تتراوح بين 6.07-8.77 ×10^4 خلية/مل ويتاثر توزيع الاحياء المجهرية في التربة بنسبة الرطوبة والمواد العضوية او الغذائية التي تحويها. وجد في دراسة سابقة اجريت في مصر للتربة العضوية في موقعين يتم سقيها بطرائق مختلفة ، ان الاعداد الحية للبكتريا المعزولة كانت تتراوح من 27-31×10^3 في فصل الصيف و 8-23 × 10^2 في فصل الشتاء (Bahig *et al*.,2008).

تحتوي فضلات الدجاج عدداً كبيراً ومتنوعاً من الكائنات الحية الدقيقة ، ويعود سبب اختيارعينات من فضلات الدجاج في هذه الدراسة الى سهولة اخذ العينات واهميتها في نقل الامراض الى السلسلة الغذائية للانسان. اغلب الدراسات الحالية تؤكد ان البكتريا المعوية يكون مصدرها الرئيس من الفضلات (Sekelja *et al*.,2012).

بينت نتائج الدراسة الحالية ان الاعداد البكتيرية في فضلات الدجاج بلغت 639.43×10^4. خلية/مل إذ تعد بكتيريا *E. coli* اكثر الأنواع انتشاراً في فضلات الدواجن (Adeleke and Omafuvbe ,2011).

تعد بكتريا القولون جزءاً من النبيت الطبيعي للقناة المعوية للانسان والدواجن وحيوانات اخرى الانها من الممكن ان تكون ممرضة لكليهما (Brooks *et al*.,2010).

في دراسة عالمية اجريت على فضلات الحيونات ومن ضمنها فضلات الدجاج اشارت الى ان اكثر من 1000 مستعمرة بكتيرية نامية يمكن ان تظهر لكل غرام واحد من فضلات الدواجن ولمدة ساعة واحدة من الحضن (Chien *et al*.,2011) .

بعد ان تم الحصول على 85 عزلة من مجموع العينات الماخوذة (85 عينة) من مصادر مختلفة من البيئة وبواقع مكررين لكل موقع إذ جمعت العينات من التربة المسمدة بسماد عضوي والمياه وفضلات الدجاج وكانت النسب المستحصلة من هذه الدراسة تشير الى ان البكتيريا المخمرة لسكر اللالكتوز والمعزولة من العينات البيئية هي الاكثر شيوعاً فقد سجلت تواجد بكتريا *E.coli* بنسبة 54.1 % من اجمالي العينات ثم *K.pneumonia* وبنسبة 36.4 % .

تعد هذه الانواع الشائعة هي مؤشرات او دلالة على تلوث ووجود خطر يهدد صحة الانسان والتي تتضمن القولونيات ومنها بكتيريا *E.coli* والمكورات المعوية Enterococci و*Pseudomonas* *Clostridrium perfringer* و *Aeromonas* (Fewtrell and Bartram, 2001) .

اشار حتيت ،(2009) الى ان المياه السطحية لنهري دجلة وديالى جنوب بغداد وبعمق 1م كانت اكثر تلوثاً ببكتريا Faecal coliform . في دراسات محلية سابقة اشار عبد الرحمن واخرون ، (2009) الى ان البكتريا العائلة المعوية شكلت اعلى نسبة من مجموع العزلات المشخصة والمعزولة من عينات

المياه لنهر الفرات إذ كانت 81% وهذه الاجناس هي: *Enterobacter K.pneumonia, E.coli* *Proteus mirabils, Citrobacter, Salmonella spp, spp ,*.

في دراسة اخرى عزلت انواع بكتيرية مختلفة من المياه وشملت كل من بكتريا : *E.coli Vibrio cholera ,Serratia plymuthica, Serratia ficaria ,Klebsiella pneumonia Rahnella aquatilis ,Proteus mirablis, Citrobacter ,Aeromona hydrophila Pseudomonas aeruginosa* و *Enterobacter cloacae* (Mohammed ,2011).

اظهرت الدراسة الحالية تواجد جنس *Raoultella planticola* في عينات المياه لاول مرة في منطقة الدراسة في محافظة بغداد ، إذ ظهر في احدى الدراسات المحلية لمحافظة الانبار هذا النوع و تم عزله من عينات بيئية مختلفة شملت الترب الزراعية وحظائر الحيوانات ومياه النهر ومياه الصرف الصحي (عبود واخرون,2012) .

اشارت دراسة للتربة الزراعية ان مجموعة الكاما بكتيرية *Gammaproteobacteria* التي تضم العائلة المعوية شكلت نسبة 3.5% من مجموع 751 (Sides,2010) .اما بكتيريا غير المخمرة لسكر اللاكتوز مثل *Burkholderia Cepacia ,Chryseomonas Pseudomonas, Aeromonas,hydrophis* هي من الأنواع الاكثر شيوعاً في التربة العضوية (Bahig *et al*.,2008).

3-5 التشخيص Diagnosis

تعد عملية التشخيص من العمليات الهامة في الدراسة البكتريولوجية للتوصل للنوع البكتيري المدروس ، فبعد الحصول على 98 من العينات السريرية من مستشفيات بغداد وزرعها على وسط الماكونكي واختيار المستعمرات التي تظهر بلون وردي على هذا الوسط بسبب قدرتها على تخمير سكراللاكتوز . تم اجراء الاختبارات البايوكيميايية باستعمال 9 اختبارات كخطوة اولية للتشخيص

لكنها لايمكن ان تكشف عن كل الانواع البكتيرية إذ يمكن اعتمادها للتشخيص على مستوى الجنس وذلك لان هذه الاختبارات التقليدية يمكن ان تخضع لتخمين من قبل الباحث او العامل المختبري فضلاً عن حاجتها لمزيد من الجهد والوقت والدقة، لذلك تم الاعتماد على تقنية اكثر تطوراً وادق في التشخيص كخطوة تاكيدية بوساطة استعمال الجهاز الالي الفايتك إذ تم ادخال 183 عينة منقاة للتشخيصها بوساطة هذا الجهاز الالي الذي يوفر 64 اختبارا بايوكيميائياً ومن ضمنها 18 اختباراً انزيمياً .في هذه الدراسة تم الحصول على خمسة انواع تابعة لمجموعة بكتريا العائلة المعوية من العينات السريرية وهي : *Serratia marcescens, Escherichia coli,K.pneumoniae Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii*. و الحصول على 8 انواع من العينات البئية وهي *Raoultella , K.oxytoca , Escherichia coli Klebsiella pneumonia , Burkholderia cepacia, Chryseomonas , Aeromonas hydrophila, planticola Streptococcus faecalis luteola*.

اجريت دراسة تم فيها اختيار37 عزلة مختبرية تابعة لبكتريا العائلة المعوية ،28 منها تابعة لنوع *Enterobacter sakazakii* و9 عزلات تابعة لانواع مختلفة لمجموعة بكتريا العائلة المعوية، نتائج التشخيص بوساطة VITEK-2 اظهرت ان 28 عزلة كانت تابعة لبكتريا *Enterobacter sakazakii* إذ كانت نسبة التشخيص لهذا النوع بوساطة هذا الجهاز هي 100% بينما الاصدار السابق ID32E لم يتعرف سوى على 71.4 % من هذه البكتريا (Fanjat *et al* .,2007) . من المتوقع ان نظام VITEK 2 بالتزامن مع البطاقة ID-GNB من شأنها أن يعمل بشكل جيد في تشخيص افراد العائلة المعوية وانواع مختارة من البكتريا غير المعوية non enteric في ظل ظروف المختبر السريري الروتيني المعقمة، ويعد هذا النظام اداة جديدة للتشخيص السريع لعصيات السالبة لصبغة كرام من العينات السريرية (Fanjat *et al* .,2007).

استعمل وسط الكروم اكار CHROMagar المجهز من قبل الشركة الفرنسية لتشخيص العينات البيئية ولتفريقها على مستوى الجنس، مقارنةً مع وسط الماكونكي والـ EMB اللذين استعملا كخطوة اولية في عزل المجاميع على اساس قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز.

وجد ان وسط الكروم يوفر الجهد والوقت في العزل لكنه يعد الوسط الاكثر كلفة والاقل توفراً في المختبرات ،يمكن ان يفيد وسط الكروم في المسح الوبائي في المستشفيات اذ يساعد في سرعة التشخيص ويمكن ان يوصى بها في الاستعمالات المختبرية الروتينية .

4-5 التشخيص الجزيئي بوساطة التحري عن مورثة 16SrRNA

بينت نتائج الدراسة باستعمال جين متخصص بنوع واحد (*E.coli*) وجود هذا الجين الذي يبلغ وزنه الجزيئي 544 زوج- قاعدي في جميع عزلات *E.coli* بيئية وسريرية و *S. marcescens* و *R. planticola* و *K. oxytoca* و *C.freundii* وبنسبة 100% .

من جهة اخرى ظهرت حزم بالوزن الجزيئي نفسه لكل من بكتريا *E.aerogenes* وحزمتان بوزن 544 و <1500 لبكتريا *K.peumoniae*. تشير عدد كبير من البحوث حول خصوصية البرايمرات16SrRNA في تشخيص الاجناس والمجاميع البكتيرية (Clarridge.,2004 ; Block and Ouellette.,2012). تشير دراسات اخرى الى اهمية 16S RNA في تشخيص النوع (Rahmani *et al.*, 2006). قد يرجع سبب ظهور حزمتين بدلاً من الحزمة الواحدة في النوع *K.peumoniae* الى تكرار الجين اي الوزن الجزيئي في الكروموسوم والبلازميد للعزلة نفسها حسب ماذكره موقع NCBI.

تؤكد الدراسة الحالية عدم اعتماد برايمر واحد 16SrRNA في تشخيص نوع او جنس بكتيري، وتؤكد على اهمية اعتماد الاختبارات البايوكيميائية والانزيمية في التشخيص الاولي فضلاً عن التوجه نحو الية اعتماد تقنية التسلسل الجيني لتوضيح الاختلافات ان وجدت (Woo *et al* .,2000). المقارنة

بوساطة تتابعات جين 16SrRNA يسمح بالتميز والتفريق بين الكائنات الحية على مستوى الجنس والنوع و السلالات ،لكن هناك اكثر من نوع واحد يمكن ان يشترك في تتابع جين معين (Clarridge,2004).

يمكن ان تتشابه بكتريا القولون في تتابعها الجيني مع اكثر من 50 نوعاً تابعاً لبكتريا العائلة المعوية (Clarridge,2004) . يفضل ان يتم الاعتماد على كامل طول القطعة 16SrRNA التي يبلغ وزنها الجزيئي 1.500 زوج قاعدي لاسيما عند تشخيص نوع مكتشف حديثاً اي نوع جديد (Kattar *et al*.,2001).

5-5 اختبار فحص الحساسية Sensitivity of antibiotic

ان استعمال المضادات الحيوية بشكل واسع النطاق وعشوائي ولمدد طويلة لاسيما المضادات ذات الطيف الواسع مثل السيفالوسبورينات في علاج امراض الانسان وفي تحسين نمو المواشي ساهم في ظهور سلالات بكتيرية ممرضة ومقاومة للمضادات ،فضلا عن العلاج الطبي بوساطة المضادات الحيوية ادى الى ازاحة جزء من المجاميع الجرثومية (الفلورا الطبيعية) في القناة الهضمية (Katzug,2004) .

تم اجراء فحص الحساسية للعزلات قيد الدراسة باستعمال مضادات حيوية تستعمل بشكل روتيني في المستشفيات العامة وايضا تعتمد في الكارت الخاص بفحص الحساسية في جهاز الفايتك .

اظهرت الدراسة الحالية مقاومة عالية ومتعددة للبكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز والتابعة للعائلة المعوية اتجاه المضادات المستعملة . إذ كانت بكتريا القولون *K.peumoniae , E.coli* اكثر الانواع في اظهار صفة المقاومة العالية ،وهذه المقاومة كانت بشكل خاص لمجموعة مضادات β-Lactam بنسبة 100% لاسيما لمجموعة البنسليات (Amoxcillin و Ampicillin) التي تعد من اكبر المجاميع واكثرها شيوعاً وتستعمل بنطاق واسع في العالم (Tärnberg,2012).

وهذا يتفق مع ماتوصل اليه الحمداني وعباس،(2013) اللذان اشارا الى المقاومة العالية التي تبديها بكتريا القولون لمضادات البيتالاكتم والسيفالوسبورينات . استعملت مضادات البيتالاكتم بشكل واسع وعشوائي في معالجة الاصابات الناتجة عن بكتريا *E.coli, K.peumoniae* في العراق وفي دول اخرى وهذا ادى الى انتشار وظهور سلالات مقاومة (Hassan,2012)

اشارت دراسات عديدة سابقة الى المستويات العالية من التدفق الجيني بين انواع بكتريا السالبة لصبغة كرام ومنها مجموعة العائلة المعوية (Stechera *et al*, 2012) التي قد تفضل استعمال البلازميدات لعملية نقل صفة المقاومة بين افراد العائلة المعوية .

يرجع سبب مقاومة بكتريا *E.coli* والعائلة المعوية للمضادات الحيوية هو القدرة على انتاج انزيمات ESBL التي تعمل على تحليل حلقة ß-lactam بما في ذلك السيفالوسبورين والمونوباكتم . (Zurfluh *et al*.,2015)

الانوع التابعة لبكتريا العائلة المعوية والمعزولة من العينات السريرية تشفر لمعظم انزيمات ESBL بوساطة جينات *bla*CTX-M-15 وايضا في العينات البيئية بما في ذلك سطح المياه واسماك المياه العذبة ، تؤدي انواع من بلازميدات عدم التوافق دوراً رئيسياً في انتشار الافقي لهذه الجينات المقاومة للمضادات المتعددة (Zurfluh *et al*.,2015) .

من اهم هذه الانزيمات هو TEM β-lactamases الذي قد يشفر لانتاجه جينات موجودة على البلازميد او على الكروموسوم (Brooks *et al*.,2010) يعد انزيم TEM-1 من الانزيمات الشائعة في مجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام وهو المسؤول عن 90 % من مقاومة بكتريا القولون لمضاد Ampicillin.

تعد انزيمات البيتالاكتميزمثل metallo β-lactamase و TEM β- AmpC β-lactamas مسؤولة عن المقاومة التي تبديها البكتريا للمضادات الحيوية (السيفالوسبورينات الجيل الثالث -والجيل

الرابع) وايضا مجموعة مضادات المونوباكتم (Essack *et al*., 2004) . في احد البحوث اشار صبحي،(2002) الى ان بكتريا *K.pneumoniae* تمتلك بلازميداً كبير الحجم 89 كيلوزوج قاعدي يعد مسؤولاً عن مقاومة هذه البكتريا لمضادات ampicillin,kanamycin,chloramphenicol وعن المقاومة المتوسطة لمضاد Amikacin ان صفة انتاج انزيمات البيتالاكتاميز هي ليست صفة مطلقة للعزلات البكتيرية كافة فقد تكون بعض العزلات البكترية غير منتجة لانزيمات البيتالاكتاميزرغم مقاومتها لمضادات البيتالاكتام لذلك تلجأ البكترياالى اليات اخرى لمقاومة مضادات البيتالاكتام غير انتاجها لانزيمات البيتالاكتميز مثل عدم قدرة المضاد على اختراق طبقة الغشاء الخارجي للبكتريا او امتلاكها لانظمة الدفق او ضعف الالفة بين المضاد ومواقع الهدف (Cherian *et al*.,2003 ; Schweizer , 2003) .

اظهرت الانواع البكتيرية المعزولة مقاومة واضحة لمضادات الكونيولين ، إذ كانت نسبة مقاومة بكتريا القولون تتراوح بين 32-62 % اما الكلبسيلا فكانت (8.3-50)%. في حين اشار (Al-Gerir,2012) في دراسته لاختبار الحساسية للكوانيولين ان النسبة كانت تتراوح بين (21-32) %.

تعمل مضادات الكوانيولين على تثبيط الحامض النووي البكتيري DNA من خلال ارتباطها بانزيم DNA-gyrase مؤدية الى موتها السريع (Hooper,2001) اشار (Vanden Bogaard,2001) الى ان سبب مقاومة الانواع البكتيرية لهذه المجموعة من المضادات هو حدوث طفرة كروموسومية تقلل نفاذية الغشاء الخلوي وتقلل من تراكم المضاد اوحدوث تغير في خاصية DNA .

مجموعة مضادات الكاربنيم (Impenem,Meropenem) اظهرت جميع العزلات المستحصلة سواء من المستشفيات او البيئة حساسيتها ضد مجموعة مضادات الكاربنيم وبنسبة عالية . وهذا يتفق مع الذي توصل اليه محمد واخرون،(2014) . التقارير المثبتة في البلدان العربية وفي الشرق الاوسط

تؤكد ان مقاومة افراد العائلة المعوية لمضادات الكاربينيم هو امر نادر الحدوث ،في شبه القارة الهندية وفي مدينة نيولدلهي ثبت امتلاك العزلات البكتيرية لانزيمات الكابينيمز المسؤولة عن مقاومة المضادات Carbapenems (El-Herte *et al*.,2012) .

اما مضادات مجموعة الامينوكلايكوسدية (Amikacin,Tobramycin,Gentamicin) فقد تفاوتت النسب المقاومة بين العزلات السريرية والبيئية فبعضها مقاوم واخرى كانت حساسة . تستعمل هذه المضادات وبشكل واسع في المراكز الصحية لاسيما لعلاج الالتهابات التي تسببها مجموعة بكتريا العائلة المعوية (Turnidge ,2003) قد يعود سبب المقاومة التي تبديها البكتيريا السالبة لصبغة كرام لهذه المجموعة من المضادات هو امتلاك هذه العزلات لانزيمات يشفر لها من قبل بلازميدات قابلة للتنقل تعمل على تحوير المضاد للمجموعة او تغير في موقع الهدف الذي يمثل الوحدة الرايبوسومية الصغيرة 30-Subunit (Zorn *et al*.,2005).

اما المضادات الاخرى مثل Nitrofurantion فكانت مقاومة جميع الانواع المدروسة لهذا المضاد عالية وتراوحت بين 77-100 % . وهذا يتفق مع ماجاء Abid و Al- Amaar ,(2015) حول مقاومة بكتريا *Enterobacter cloacae* لمضاد Nitrofurantion وبنسبة 100%.

6-5 التحري عن وجود البلازميدات Plasmid content

تعد عملية التحري عن وجود البلازميد والكروموسوم في الخلية البكتيرية مهمة جداً لمعرفة اسباب وعوامل الضراوة (Mayer 1988). تظهر اهمية دراسة المحتوى البلازميدي من خلال مقارنة البلازميدات المستخلصة من العزلات البكتيرية العائدة للنوع البكتيري نفسه او لانواع مختلفة وذلك عند وجود تماثل في عدد وحجم البلازميد المستخلص من النوع البكتيري الواحد وبين الانواع البكتيرية المختلفة (Threlfall and Frost,1990) . تمتاز الصفة المحمولة على بلازميد الى انها اكثر اهمية من تلك المحمولة على الكروموسوم وذلك لقابليتها على الانتقال وسرعة الانتشار بين

الانواع البكتيرية ،تزداد اهمية البلازميدات عندما تشفر لصفات مهمة منها المقاومة للعدد من المضادات الحيوية وانتقال هذه الصفة من البكتريا المرضية الى غير المرضية مسببة مشاكل خطيرة (Johnsen *et al*.,1991).

بينت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز للدراسة الحالية احتواء 35 عزلة من اصل 48 عزلة على بلازميد ذات اوزان جزيئية بحجم 10000 زوج قاعدي اي بنسبة 75% كما موضح بالشكل (4-10)(4-11) (4-12)(4 -13). احتواء 15 عزلات اي بنسبة 31.25% على بلازميدات ذات اوزان جزيئة كبيرة Mega plasmid تتجاوز 10000 زوج قاعدي. اظهرت معظم العزلات قيد الدراسة احتوائها على بلازميدات ذات وزن جزيئي مساوٍ للـ 10000 زوج قاعدي، اظهرت ايضاً بلازميدات متعددة تتراوح اعداها 1-4 بلازميدات في كل من *K.pneumonia,E.coli E.aerogenes, Klebsiella oxytoca, Raoultella planticola,*.

تبين الدراسة الحالية ان جميع العزلات البيئية احتوت على اكثر من بلازميد قد يصل الى 4 بلازميدات كما في بكتريا *K.pneumouiae* بينما كانت معظم العزلات السريرية حاوية على بلازميد واحد فقط.

في دراسة اجريت في الصين لبكتريا *K.pneumoniae* المعزولة من عينات سريرية انها تحتوي على بلازميدات بوزن جزيئي 90kb ويحمل جينات blactx-m-1 (Zhuo *et al*., 2013). دراسة اخرى بينت احتواء بكتريا *E.coli* و *K.pneumouiae* المعزولة سريريا من جينات على بلازميدات تراوحت بين 9-26 kb (Adeyankinnu *et al*.,2014) .

في دراسة وجد ان البلازميدات المعزولة من بكتريا *E.coli* و *K.pneumouiae* من عينات بيئية (المياه) ان وزنه الجزيئي يتراوح بين 4.36kb الى 23.13kb (Toba *et al*.,2015) بينت الدراسة الحالية ان *S. marcescens* لم تحتوِ على بلازميدات، بينما اشارت احدى الدراسات احتواء

هذه البكتريا على اثنين من البلازميدات الصغيرة بالوزن الجزيئي نفسه 4.3kb

(Mekhael and Yousif , 2009)

تعود اهمية دراسة البلازميدات للتحري عن عوامل الضراوة إذ ان بعض البلازميدات تكون حاملة للجينات التي تشفر عن عامل ضراوة معين مثل بلازميد R-factor الموجود في معظم انواع البكتريا المرضية وايضا انتقال صفة الضراوة بين الانواع البكتيرية (Barrow *et al*.,1986) يمكن الاستفادة من النسق البلازميدي كاحدى الطرائق المستعملة للتنميط وذلك لتحديد السلالات المتماثلة وتابعة للنوع البكتيري نفسه فضلاً عن التنميط المصلي والتنميط الكيموحيوي واختبارات فحص الحساسية ،اذ ساعدت هذه الطرائق التصنيفية في الدراسات والاستنتاجات الوبائية في حالات التسمم الغذائي او الاسهال (Wachsmuth *et al*.,1991) وايضا في فهم تطور الامراض البكتيرية . (Mayer,1988)

يعد النسق البلازميدي من المؤشرات الحديثة والمهمة في الاتجاه الطبي الذي يعرف بالوبائية الجزيئية ويفضل على الطرائق التصنيفية الاخرى لامكانية تطبيقها على انواع عديدة من البكتريا . (Mayer,1988)

5- 7 تحييد البلازميدات Curing plasmid

5 -7-1 الفعالية غيرالمباشرة للمستخلص النباتي في بلازميدات البكتريا

اثيرت في الاونة الاخيرة العديد من الشكوك حول مدى سلامة المضادات الحيوية من الناحية الصحية واصبح استعمالها مثيراً للجدل كونها ذات تأثيرات جانبية، لذا انصب الاهتمام على المصادر الطبيعية الكامنة في النباتات التي لا تمتلك تأثيرات سمية وتعد المركبات الفينولية من ابرز المضادات الميكروبية الطبيعية التي تشمل الفلافونيدات والتانينات والحوامض الفينولية .(Dahham *et al*.,2010)

بعد انتخاب اربع عزلات ، تم دراسة فعالية المستخلصات النباتية بتركيز الكحولي والمائي (اوراق الزيتون ،الكالبتوس،الحلبة) على هذه العزلات ، وبينت نتائج الدراسة عدم تاثرالانوع البكتيرية قيد الدراسة بالمستخلصات النباتية المستعملة ولا بمادة SDS إذ نمت البكتريا بشكل كثيف ولم تظهر أية منطقة للتثبيط ماعدا مادة الحلبة المائي التي اظهرت تاثيراً متوسطاً في العزلات. قد يعود سبب عدم ظهور مناطق التثبيط على وسط نمو البكتريا المعامل بالمستخلص النباتي هوعدم قدرة المستخلص على تثبيط الكائنات المجهرية (البكتريا) او ان طريقة الحفر تعطي نتائج اقل فعالية وذلك لقلة الحجم او التركيز المطلوب. في دراسة سابقة لمعرفة تأثير مستخلص الزيتون الكحولي في نمو اربع عزلات من البكتريا ، عزلتان سالبة لصبغة كرام *E.coli Klebsiella*.spp وعزلتان موجبة لصبغة كرام *S.aureus*, *Staphylococcus epidermis* اظهرت فعالية التثبيطة متفاوتة لمستخلص اوراق الزيتون إذ كانت اكثر فعالية على بكتريا *S.epidermis* وكان تاثيره في بكتريا *Klebsiella.spp* بقطر تثبيط 1سم (حسن،2012).ووجد زين الدين واخرون،(2010) عند دراستهم الفعالية التضادية للبكتريا في المستخلصات المائية وبعض المركبات العضوية لسيقان نبات الحلبة *Trigonella foenum graecum* L. واوراقها وجذورها وبذورها ضد ثلاثة أنواع من البكتريا السالبة لصبغة كرام *E.coli* و *Pseud.aeruginosa* و *Klebsiella.spp* وواحدة موجبة لصبغة كرام هي *Staph. aureus* بطريقة الانتشار في الحفر ، ووجد ان جميع المستخلصات لجميع الاجزاء النباتية لم تظهر أية فعالية تثبيطية لاي نوع من أنواع البكتريا .

وذكرت ناصر (2011) ان للمستخلص المائي المغلي لبذور الحلبة فعالية تثبيطية ضد نمو *E.coli* و *Staph. aureus* و*Streptococcus pyogenes* . واظهر المستخلص نفسه تأثيراً واضحاً في التئام الجرح الناتج من الخمج البكتيري في مدة 17 يوما مقارنة مع المضاد الحيوي الجنتامايسين.

بعد ان تم تحديد التركيز المثبط الادنى للعزلات MIC ،انتخبت مستعمرات للعزلة 13 *K. pneumonia* المعاملة بمستخلص الحلبة الكحولي و مستخلص الزيتون الكحولي والعزلة

133 *E.coli* المعاملة بمستخلص الكالبتوس المائي و المعاملة بـ SDS، لاختبار كفاءة االتحييد وعلاقتها بفعالية المضادات الحياتية، زادت نسبة الحساسية للمضادات لعزلة الايكولاي من 20% الى 46.6 % عند المعاملة مع مستخلص الكالبتوس المائي وبنسبة 66.6% عند المعاملة بمركب SDS ، من جهة اخرى اظهرت عزلة الكلبسيلا تبايناً في قابلية تاثير المضادات الحيوية ،ظهرت الحساسية لمضاد Amikacin و Nitrofurantion واختفت الفعالية ضد Impenem و Meropenem بعد المعاملة بمستخلص الزيتون الكحولي،عزلة الكليبسيلا المعاملة بمستخلص الحلبة الكحولي، اظهرت حساسية ضد Tobramycin Amikacin و Nitrofurantion ومقاومة Meropenem وSulfamethazole Trimethopime ، تراوحت نسب التأثير في الحساسية بين 40% الى 46.6% .

قد يعود سبب فقدان المقاومة للمضادات المستعملة من قبل الانواع البكتيرية الى ان صفة المقاومة قد تكون محمولة على البلازميد . وفي احدى الدراسات التي استعمل فيها مستخلصات نباتات بذور الكتان والقرفة السرلانكية ونبات البلوط على بكتريا القولون وجد ان هذه البكتريا فقدت صفة المقاومة بنسبة 90% للمضادات الحيوية بعد ان كانت مقاومة للـ16 مضاداً حيوياً وذلك لفقدانها البلازميد كانت تمتلكه بسبب عملية التحييد بهذه المستخلصات (Khder and Muhammed,2010).

5-7-2 تاثير المستخلص في عملية تحييد الدنا البلازميدي عند استخلاصه بطريقة التحلل القاعدي

تعد عملية تحييد وفقدان البلازميد المقاومة للمضادات الحيوية في السلالات المسببة للامراض اهمية كبيرة ،إذ تعد عملية مقاومة المضادات الحيوية من قبل الانواع البكتيرية من المشاكل الخطيرة ومن التحديات الصعبة للاطباء لايجاد العلاج المناسب والفعال وبدون اثار جانبية .

بعد ان تم اجراء عملية الاستخلاص بطريقة التحلل القاعدي للعزلتين 13 و133 المعاملتين بمستخلص (الكالبتوس،الحلبة، الزيتون) وبتركيزه المائي والكحولي وكذلك بـ SDS. اظهرت النتائج بان بكتريا القولون كانت اكثر تاثراً بالمستخلصات النباتية المستعملة من بكتريا الكلبسيلا الرئوية.

في دراسة سابقة بينت ان مستخلص القرفة الكحولي يعد عاملاً محيداً فعالاً يساعد على فقدان البلازميد من العزلات (Khder and Muhammed,2010).

في تجربة اخرى استعمل فيها الزيت الاساسي لنبات اكليل الجبل(الروزماري) في تحييد بلازميدات المقاومة للمضادات الحيوية. وتم تجربته على بكتريا القولون *E.coli* إذ عمل هذا الزيت على فقدان البلازميد وفقدان الصفة المظهرية للمقاومة للمضادات الحيوية (Ahmed, 2010) .

وجد ان نبات Plumbago zeylanica عامل محيد جيد في تحييد البلازميدات وذات كفاءة اعلى من العوامل المحيدة الاخرى مثل بروميد الاثيديوم او الاكردين البرتقالي (Patwardhan *et al*.,2015). اشار (فرج وغنيمة،2010) الى ان مادة SDS 1% تعد مادة محيدة فعالة لبلازميدات بكتريا الكلبسيلا الرئوية اذ لوحظ فقدان المقاومة للمضادات الحيوية بنسبة 70-100%.

3-7-5 التاثير المباشرللمستخلص النباتي في الدنا البلازميدي

اظهرت الدراسة الحالية تاثير المستخلصات النباتية (الحلبة -الزيتون-الكالبتوس) في البلازميدات المستخلصة إذ كانت مستخلصات الحلبة بتركيزها الكحولي والمائي ذات تاثير فعال في العزلات المنتخبة اكثر من الانواع الاخرى اذ سببت تاكل جميع انواع البلازميد. اشارت عدد من الدراسات الى اعتماد هذه التقنية في دراسة تاثير المواد الصيدلانية المصنعة (Prabhakara *et al.*, 2007; Al-Noor *et al.*, 2015) .

استعملت بذورنبات حبة البركة وثمار نبات الثوم لدراسة تاثيرها في الدنا الكلي والدنا البلازميدي المستخلص ،وجد ان هذه المستخلصات تحتفظ بشكلين بدلا من ثلاثة وهو الشكل الحلقي المفتوح والخطي فضلا عن الدنا الكروموسومي . اي ان المستخلص اضفى حماية للدنا البلازميدي من التحول الى الشكل الخطي (Haleem *et al.*,2013). ذلك لان هذه المستخلصات ساهمت في حماية الدنا البلازميدي من خلال تكوين اواصر بين المستخلص النباتي و المركب تؤدي الى خفض فعاليته المحطمة للجزيئة وبذلك اثبتت المستخلصات فعاليتها في ازاحة الجذور الحرة (Haleem *et al.*,2013) . اوقد يغلف المستخلص النباتي موقع مستقبلات المضاد الحيوي.

الدراسة الحالية اظهرت ان بعض العزلات قد تحولت من الصفة الحساسة للمضادات الحيوية الى المقاومة اي ان لهذه المستخلصات النباتية لها تاثيران ايجابي اوسلبي ،فهي اما ان تساهم في حماية جزيئة الدنا البلازميدي من التحطم وتحتفظ باشكالها او تؤثر فيه وتحييده ومن ثم يعمل المضاد بفعالية اكبر.في دراسة سابقة لمعرفة تاثير المضاد الحيوي الـــ cephalexin المرتبط ببعض المعادن في DNA المعزول من مصادر مختلفة منها الانسان،الحشرات،النبات ،البكتريا اتبعت فيها طريقة التاثير المباشر في الدنا والبلازميد في البكتريا واظهرت تاثيرات مختلفة (Al-Noor *et al.*,2015)

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات

1 - لوحظ ان اعلى نسبة لعزل بكتريا العائلة المعوية المخمرة لسكر اللاكتوز كانت في عينات الادرارفي الاناث .

2- سجلت اعداد بكتريا *E.coli* و*K.pneumonia* كاكثر الانواع شيوعاً سواء كان مصدرها بيئياً او سريرياً .

3- ظهور النوع *R.planticola* لاول مرة في محافظة بغداد ، وقد عزل من عينات المياه .

4- اظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة عالية لمضادات β-lactam (amoxicillin ،ceftazidime،cetriaxone،ampicillin،cefepime) بالمرتبة الاولى ولمجموعة مضادات الامينوكلايكوسدية بالمرتبة الثانية .

5- يعد التشخيص بجهاز الفايتك من اسهل وادق طرائق التشخيص في المختبرات الصحية وارخص منه في الطرائق الجزيئية والطرائق التقليدية .

6- امتلاك جميع العزلات البكتيرية المعوية المخمرة لسكر اللاكتوز على الجين التشخيصي 16SrRNA وبحجم 544 زوج قاعدي

7- امتلاك معظم العزلات قيد الدراسة على بلازميدات متعددة.

8 - امتلاك معظم الانواع البكتيرية المعزولة من البيئة على بلازميدات ذات وزن جزيئي يزيد عن 10000 زوج قاعدي.

9- تاثيرالمستخلصات النباتية (الكالبتوس- الحلبة- الزيتون) في عملية تحييد البلازميدات .

10- بينت النتائج ان المستخلص المائي لنبات الحلبة له القدرة على تثبيط نمو بكتريا *E.coli* و*K.pneumonia* .

11- تاثير بعض المستخلصات المستعملة في الدراسة في البلازميد والدنا الكلي بشكل مباشر.

التوصيات

1- القيام بدراسة وراثية ومظهرية مستفيضة للنوع *R.planticola* المعزول من المياه لمعرفة مدى ضراوته وقدرته على احداث المرض.

2- استعمال نباتات طبية اخرى لمعرفة مدى تاثيرها في عملية تحييد البلازميدات لاستعمالها كطريقة علاجية بديلة ضد العزلات المقاومة للمضادات الحيوية .

3- التوصل الى اليات جديدة للحد من انتشار بكتريا *E.coli* و*K.pneumonia*.

4- دراسة اسباب انتشار المقاومة للمضادات في العينات السريرية من خلال دراسة الجينات التي تحمل صفة المقاومة التي قد تكون محمولة على البلازميد اوترانسبوزون .

5- الحد من استعمال المضادات الحيوية التي اظهرت مقاومة عالية لكل الانواع البكتيرية (amoxicillin ،ceftazidime، cetriaxone ، ampicillin،cefepime) .

6-البحث عن بريمرات متخصصة لـ 16SrRNA(الجين المتخصص) للانواع البكتريا المعوية.

7- اعتماد التسلسل الجيني للحزم البلازميدية والقطع الكروموسومية المتماثلة في الاجناس والانواع المختلفة ، لتحديد نسبة التماثل والاختلاف في تسلسل القواعد النتروجينية .

المصـادر

References

جواد، ذكرى عدنان .(2013). توزيع انواع الجنس *Citrobacter* ما بين العينات السريرية والعينات البيئية للمستشفى التعليمي في جامعة النهرين ،مجلة جامعة كربلاء العلمية ،11(2).

حسن،انعام عبد القادر. (2012) . تأثير مستخلص كحول الايثر النفطي الحار والبارد لاوراق الزيتون *Olea europea* في نمو بعض انواع البكتريا الممرضة،مجلة كلية التربية الاساسية .العدد 75.

الحيران ،اشراء لوي حمدان وفهد، مجيد علي .(2012). دراسة الانماط المصلية لبكتريا القولونية المعزولة في مفاقس الدجاج ، مجلة الفرات للعلوم الزراعية ، 3 (2). 133- 142.

الزبيدي محمد مهدي ، عبد الحسين نورية. (2011). تحديد دور البلازميدات في انتاج البكيتروبين من الكلبسيلا المرضية، المجلة العراقية للتقانات الحياتية. 15(12): 227-241.

عبد الرحمن ،ابراهيم عبد الكريم. زيدان،تحسين علي.سعود،وهران منعم.(2009).دراسة بعض الملوثات البكتيرية في مياه نهر الفرات وبحيرتي الحبانية والثرثار،مجلة جامعة الانبارللعلوم الصرفة،العدد3(3).

عبود،امال داود.عبد، أدهام علي.تركي،احمد محمد.(2012).عزل البكتريا المنتجة لإ نزيم اليوريز من مصادر بيئية مختلفة في محافظة الأنبار ودارسة أهم العوامل المؤثرة في نشاطه ،مجلة الانبار للعلوم الزراعية،المجلد 10(1):185-197.

حتيت ، واثق عباس .(2009).تشخيص وتوزيع بكتريا القولون وبعض انواع البكتريا الممرضة مع مستوى تلوث المياه البرازي في نهري دجلة وديالى جنوب بغداد ،مجلة جامعة النهرين،12(4):42-50.

فـرج ، ديمــة نـزار وقاسـم، قـيس قاسـم.(2010). تحييـد البلازميـد لبكتريـا *Klebsiella pneumoniae* المعزولـة محليـا مـن التهابـات المجـاري البوليـة ودوره فـي المقاومـة المتعـددة للمضادات الحيوية، المجلة العراقية للعلوم، المجلد ٥١، العدد ٣، الصفحة ٤٢١-٤١٥.

قطب ، فوزي طـه . (1981) .النباتـات الطبيـة زراعتهـا ومكوناتهـا . دار المريخ للنشر . الرياض-161

منصـور، احمد توفيـق (2005). التطيـب بالطعـام (الوقايـة والعـالج بالغـذاء الصـحي). الطبعـة الثانية، المطبعة الاهلية لنشر والتوزيع.

نـاصـر، نـاريمـان صـالح (2011). دراسـة تـأثير المسـتخلص المـائي المغلـي للحلبـة فـي بعـض الأنواع البكتيرية. مجلة علوم الرافدين 22(2): 33- 39.

يوسـف منصـور.(1989).تصـنيف النباتـات البرية.جامعـة بغـداد، وزارة التعلـيم العـالي والبحـث العلمي ،398 صفحة.

A

Abbott ,S.L.(2007). *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomona*s and other Enterobacteriaceae. In Manual of clinical microbiology. Murray, P., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L.& Pfaller, MA.,editors. Washington DC. ASM Presss. 698-715.

Abid,I.N and Al-Amaar,M.H. (2015).Antibiotics susceptibility of *E.cloacae* and *E.sakazakii* that isolated from different clinical specimens. Magazin of Al-Kufa University for biology, 7(1): 2073-8854.

Abo Nasrya,W.D.(2009). The Bacterial Pollution for the steps for Hilla river in many sites after and before two stations of purification and sterilization of drinking water. Journal of Al-Kufa University for Biology.1(1):149-156.

Adeleke, E.O and Omafuvbe,B.O.(2011).Antibiotic resistance of aerobic mesophilic bacteria isolated from poultry feces. Research Journal of Microbiology, 6(4):356-365.

Adeyankinnu ,F A., Motayo ,B .O., Akinduti A., Akinbo J., Joseph I. Ogiogwa, J .I., Bukola, W. Aboderin ,B .W. and Agunlejika, R.A. (2014). A Multicenter Study of Beta-Lactamase Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Reveals High Level Chromosome Mediated Extended Spectrum β Lactamase Resistance in Ogun State, Nigeria. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. Article ID 819896,1-7.

Ahmed,SH.J.(2010). Plasmid curing by using essential oil of Rosmarinus officinalis. Medical Journal of Babylon-Vol. 7- No. 1-2.

Akoachere,J.T.K ; Oben ,P.N; Mbivnjo,B.S ; Ndip,L.M and Nidp,N. (2008).Bacterial indicators of pollution of the Douala lagoon, Cameroon: Public health implications. African Health Sciences; 8(2): 85-89.

Akrayi ,H.F.S.(2012). Antibacterial Effect of Seed Extracts of Cardamom (Elettaria cardamomum) against *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*.Tikrit Journal of Pure Science 17 (2) .

Alan, H. M and Susan,N. S. (2009). A foundation for neonatal care: a multi- disciplinary guide.Oxon 141AA.united Kingdown. 56:583-585pp.

Al-Hamdani,M.A and Abas,I.J.(2013) . Study of plasmid profile and susceptibility patterns of *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection in Basra.J .Thi-Qar.Sci.4(1).31-39.

Ali ,J.A.(2012).Hemolysin and Bacteriocin production of *E.coli* isolation from uniary tract infection .J,Babylon university ,5(20).

Al-Gerir,A.Z.(2012).Detection of extended spectrum beta-lactamases and antibiogram profile of *Klebsiella* species. Annals of the College of Medicine. 38 (1): 33-39.

Al-Noor,T.H; Ibrahim,I.AJ and Jawad,M.M.(2015). Studies on the interaction and effect of Mn(II), Fe(II), Co(II), Ni(II),Cu(II), Zn(II) and Cd(II) mixed- ligand complexes of cephalexin mono hydrate and furan-2-carboxylic acid to different DNA sources Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7(4):815-823.

Al-Obaida, I.; Ubod, L.; Jacab, M. and Johny,M.(1999).Isolation and characterization at coagulase-Negative mcthicillin Resistant stophyloc occus avreus from patient in an Intensive Care unit. Kuwait university. Kuwait Med principles. Pract 8:230-2368-pp.

Al- Omari ,A.W; Mohamad, A.M and Raoof, W.M. (2013). Detection of Biofilm for mation in some pathogenic Bacteria using tube and cong red Agar methods .Rafidain Journal.24(16): 65-55.

Amako ,K.; Meno,Y. ; Takade,A.(1988). Fine structure of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* k1. J.Bacteriol. 170(10):4960 -62.

Apak, R.; Güçlü,K.; Dernirata, B.;Özyürek, M.; Çelik,S.E.; Bektaşoǵlu,B.;Berker,K.I and Özyurt,D.(2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay Molecules 12:1496-1547.

Arias ,C. A, and Maray B.E.(2009) "Antibiotic resistant bugs in the 21st century-A clinical super-challenge"-New England Journal at medicine,360(5):439-443.

Atlas ,R.M.(1995). Microbiology Fundamentals and application .1 st ed. Macmillan comp., New York ,USA.

B

Bahig , A.E; Aly, E.A; Khaled ,A.A. and Amel ,K.A.(2008). Isolation ,characterization and application of bacterial population from agricultural soil at Sohag Province, Egypt. Malaysin Journal of Microbiology ,Vol 4 (2):42-50.

Bannet,R.(2004).Growing Group of extended spectrum B- lactamase in *Enterabacter cloacac* from acular infection. J.Annals Microbial.55(3):225-228.

Baraniak, A.; Fiett, J., Sulikowska,A., Hryniewcz, W.and Gniadkowski,M. (2002).Countrywide spread of CTX-M-3 Extended-Spectrum- *B*-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Poland. J. Antimicrob. Agent. Chemoth., 46(1): 151-159.

Baron, E.J. ; Peterson I.L.R. and Finegold, S.M.(1999).Baily and Scott's Diagnostic Microbiology . Mosby Year Book . New York . USA ., Pp:363-384.

Barrow,P.A., Simpson, J.,M, Lovell,M.,A. and Binns,M.,M.(1986) Contribution of Salmonella gallinarum Large plasmid towards virulence in fowl typhoid .Infect. and Immun. 55 (2): 388-392.

Bashar ,T.; Rahman ,M.; Rabbi, F.A.; Noor,R.and Rahman, M.M. (2011). Enterotoxin profiling and antibiogram of *Escherichia coli* Isolated from Poultry Feces in Dhaka District of Bangladesh. Stamford Journal of Microbiology, 1(1): 51-57.

Bauer, A.W.; Kirby ,W.M.M.; Sherris, J.C. and Truck ,M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol., 43:493-496.

Baxamusu,B.N.(2011),"*Klebsiella pneumonia* Treatment Buzzle", (2000-2011, 2012) Buzzle.com.

Bell , P . J. Sunna A. ; Gibbs , M.D and Bergguist , P .L .(2002). Prospecting for novel Lipase genes using PCR. Microbiology. 148:2283- 2291.

Benson .(2001).Microbiological Application .8th .Ed. The McGraw-Hill Companies ,USA.

Beyene, G and Tsegaye, W. (2011). Bacterial Uropathogens in Urinary Tract Infection and Antibiotic Susceptibility Pattern in Jimma University Specialized Hospital, Southwest Ethiopia. Ethiop J Health Sci. 21 (2): 141-146.

Blanco , M. ; Schumacher, S. ; Tasara, T. ; Zweifel, C. ; Blanco, J.E. Dahbi,G. ; Blanco, J. & Stephan, R.(2005). Serotype, intimin variant and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland identification of anew intimin variant gene(*eae-ɳ2*) . BMC Microbiol., 5:23.

Block, M.G. and Ouellette, A.(2012).Genetic identification of eleven aquatic bacteria using the 16S rDNA gene. J of Research Across the Disciplines.1-46.

Boundless.(2014).Type of plasmid and their biological significance.Boundless microbiology.

Branda ,S. S.; Vik, A. L.; Friedman and R. Kolter .(2005).Biofilms:the matrix revisited," Trends in Microbiology, 13(1).20-26.

Brenner,D.J.; Noel R. Krieg, James T. Staley, George M. Garrity Sc.D., David R. Boone, Paul De Vos , Michael Goodfellow, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer (2004). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume twoThe *Proteobacteria* Part B The *Gammaproteobacteria*. Publisher Springer US.

Brinboim ,H.C.and Doly,J.(1979).A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA .Nucleic Acid Res.;7(6):1513-1523.

Brooks .G.F; Carroll .K.C; Butel .J.S; Morse .S .A; Mietzner. T.A.(2010). Medical microbiology,Jawetz,MelnickandAdelbergs.25th.Edition.McGraw-Hill Companies, Printed in USA ,213-219.

Brown , T.A.(2010). Vectors for Gene cloning plasmid and Bacteriophage " Gene cloning and DNA Analysis An Introduction. (6^{th}.ed). Wiley-Blackewll.

Bukari , A.I.; Shapiro , J.A. and Adhya ,S.L.(1977).DNA insertion elements , plasmids and episomes .cold Harbor Laboratory press. Cold spring Harbor New York g.

C

Catherine, M.; Oliphant ,P.; Gary, M .and Green, M.D.(2002).Quniolones:Acomprehensive review.AM.Fam.physiol.,65(3):455-464.

Cavagnaro ,F . (2005) . Urinary tract infection in childhood.Clin microbial.18:417-422.

Chambers, H.F. (2005). Penicillins. In Principles and practice of infection diseases. Mandell , G.L., Bennett, J.E. & Dolin, R., editors. London. Elsevier, ChurchillLivingstone. 281-293.Characterization of a Gene Pair Encoding Iron-Regulated Xenocin and Immunity Proteins of *Xenorhabdus nematophila.* s*J.Bacteriology*,Vol.190(11):pp.3877-3885.

Chen,J.M; Stenson, P.D; Cooper, D.N; Ferec, C. (2005). A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. Hum Genet 117: 411Y427.

Cherian,B.P.; Manjunath ,m.;Pinto ,L. and Prabhakar,P.(2003). Extended spectrumß-lactamase production Enterobacteriaceae in a tertiary care hospital in Trinidad and Tobago .West Indian Med .J.Mar.52(1):3-31.

Chien,Y.C; Chien,C.J;Lin,T.H, Chien,S.H.(2011). Characteristics of microbial aerosols released from chicken and swine feces. J.Air Waste and management association.61(8):882-9

Chihab , W.; Alaoui, A. S and Amar,M .(2004). *Chryseomonas luteola* Identified as the Source of Serious Infections in a Moroccan University Hospital Journal Of Clinical Microbiology Vol. 42, No. 4. 1837-1839.

Chiller, K.; Selkin, B.A and Murakawa, G. J. (2001) Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. JID Symposium Proceedings, 6(3):170-174.

Chong , Y.; Ito, Y. and Kamimura, T.(2011) .Genetic evolution and clinical impact in extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Infect Gen Evol. 11(7):1499-504.

Chowdhury ,M .A; Rahman , K . M ; Miah ,M .R and Haq , J .A .(1994). Transferable drug resistance R - Factor among the entrobacteriaceae in urinary tract infections. A study at an urban hospital in Bangaladesh .J . Trop. Med . Hyg97(3):161-9.(med line).

Christian,R.andChris,W.(2002).Lipopolysacchride.Endotoxins.Annu.Rev.Biochemical.71:635-700.

Clarridge , J.E. (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clinical Microbiology Reviews. 17(4) 840-862 .

Clive deW. Blackbarn. (2006).Food Spoilage Microorganisms.Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC pp. 624-659.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute.(2012). Performance Standards for Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI Antimicrobial Susceptibility Document M 100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute

Connel ,H ; Agace ,W; Klemm ,P ; Schemberi ,M. and Marlids , S.(1996).Type1fimbriae expression enchance *E.coli* virulence for the uniary tract. PNAS.Vol.93.Issue.18.9827-9832.

Cruickshank , R.;. Duguid, J.D ; Marmion B. P. and Swain, R. H. A. (1975).Medical Microbiology, the Practice of Medical Microbiology. 12th ed., vol. 1 Churchill Livingstone, London and New York. 180-188.

Cryz ,S.J.;Furer,E. and germanier, G.(2000) Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis in fect . Immum.43: 440-441.

Cukic, V.(2013) .The Most Common Detected Bacteria in Sputum of Patients with the Acute Exacerbation of COPD. Mater Socio med. 25(4): 226-229.

Curcio ,M.J; Derbyshire, K.M .(2003) The outs and ins of transposition: from mu to kangaroo. Nat Rev Mol Cell Biol 4: 865Y877.

D

Dahham,S. S.; Ali, M. N.;Tabassum, H. and Khan,M.(2010). Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (Punica granatum L.)American-Eurasian J. Agric. and Environ. Sci. 9(3): 273-281.

Dhamad,A.E.(2009). A study of some antibiotics and NaCl affecting *Serratia marcescens* growth and product prodigiosin pigment , Journal Wassit for medical and Sciences ,Vol 2(2),41-45.

Dioniso,F.; Martic.; Radman, M.;Rodrigues, O.R and Taddel.F.(2002).Plasmid spread very fast in heterogeneous bacterial communities.J.Gen.Microbiol.,162:1525-1532.

Drancourt ,M. Bollet ,C.Carta ,A; Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of Klebsiella species delineate *Klebsiella* and a *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terregena* comb.nov. and *Raoultella planticola* comb.nov. Int .J Syst Evol Microbiol, Pt 3: 925-932.

Dubey , R. C. (2009). Multicolour Textbook of Biotechnology.4th Edition. S. Chand and Co. India. Pp. 71 -80.

Duham,W.(2001)"U.S.Researchers launch big prostate cancer study." Reuters. July. Grander , J. C. W. Maranville and E.T. Paparozzi .(1994). Nitrogen Efficiency Among Divers Sorghum Cultivars . Crop Sci. 43:728-733.

Dworkin , M.; Falkow,S.; Rosenberg and schle fererko, K.(2006). Rokaryotes third edition hand book on the biology of bacteria proteobacteriaGanma. Sub class. V6.

E

El-Herte, R.I ; Kanj, S .S; Matar, G.M and Araj, G.F.(2012). The threat of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Lebanon: an update on the regional and local epidemiology.J. Infect Public Health.5(3):233-43.

Essack, S. Y.; Hall, L. M. C. and Livermore D. M. (2004). *Klebsiella pneumoniae* isolate from South Africa with multiple TEM, SHV and AmpC beta-lactamases. Int J Antimicrob Agents 23, 398-400.

Evrard ,B.; Balestrino,D. ; Dosgilbert, J. L. ; Gachancard ,J. B.;Charbonnel ,N.; Forestier, C. ; Tridon ,A. (2010) . Roles of Capsule and Lipopolysaccharide O Antigen in Interactions of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and *Klebsiella pneumoniae* .INFECTION AND IMMUNITY . 210-219. Vol. 78, No.

F

Fanjat,N;Leclercq ,A.;Joosten, H.and Robichon,D.(2007).Comparison of the Phenotyping Methods ID 32E and VITEK 2 Compact GN with 16S rRNA Gene Sequencing for the Identification of *Enterobacter sakazakii*. journal of clinical microbiology, Vol. 45, No. 6. 2048-2050.

FAO.(2005).Quality control of waste water for irrigated crop production: Health risks associated with wastewater. Natural Resources Management and Environmental Development, 2: 10-17.

Farmer, J.J.; Boatwright ,K. D. and J and,J .M.(2007).Entrobacteriaceae Introduction and identification . In P. R. Murray , E. J. Baron , J.H. Jorgensen , M .L .Landry and

M.A. Pfaller (eds.) ,Manual of clinical microbiology , Washington , D. C. , USA , 9th ed ., :649-669.

.

Farmer III , J., Boatwright, K.D. & Janda, J.M.(2007). Enterobacteriaceae*:* introduction and identification. In Manual of clinical microbiology. Murray, P., Baron , E.J., Jorgensen J.H., Landry, M.L. & Pfaller, M.A., editors.. Washington DC. ASM Press. p. 649-669.

Fattahi ,F.;Mirvaghefi,A.;Farahmand,H.; Rafiee,G.andAbdollahi.(2013).Development of 16S rRNA Targeted PCR Method for the Detection of *Escherichia coli* in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Journal of Pathology. 8 (1), 36- 44.

Feng ,F.; weagan, T.S. and Gran, T.M.(2002). Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform bacteria. Bacteriological Analy- anti- and probiotics. Appl. *Microbiol Biotechnol*, 81:591-606.

Ferroni , A.; Sermet-Gaudelus, I.; Abachin ,E.; Quesne, G.; Lenoir, G.; Berche, P;Gaillard, J.L. (2002). Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of non fermenting Gram negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. J. Clin. Microbiol.40:3793-3797.

Fewtrell, L and Bartram, J .(2001). Water quality: guidelines, standards and health. WHO. Published by IWA Publishing, London, UK.

Forbes,B.A; Sahm,D.F andWwissfelb,A.S.(2007). Diagnosic Microbiology .Bailey and Scott s .12 th ed ,Mosby, Elsever. Fraser, S.L.; Arnett, M.; Sinave C.P. (2011). *Enterobacter* Infection: emedic- ine infections Disease. : 7,2010.

Fraser, S.L.; Arnett, M.; Sinave C.P. (2011). *Enterobacter* Infection: emedic- ine infections Disease. Up dated : Jan 7,2010.

http://www.emedicine. Medescape. Com. Entered 29///2011

Freney,J.,W. Hansen, J.Etienne, F. Vandenesch, and J. Fleurette.(1988). Postoperative infant septicemia caused by *Pseudomonas luteola* (CDC group Ve-1) and Pseudomonas oryzihabitans (CDC group Ve-2). J. Clin. Microbiol. 26:1241-1243.

G

Giri , A.V., Anandkumar, N.; Muthukumaran ,G. and Pennathur, G. (2004).A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. BMC Microbiology, 4: 11.

Goodfellow, M., and A. G. O'Donnell.(1993). Roots of bacterial systematics,p.3- 54. *In* M. Goodfellow and A. G. O'Donnell (ed.), Handbook of new bacterial systematics. Academic Press, London.

Govan,J.R.W;Brown,P.H.;Maddison,J.;Doherty,C.J.;Ne-Ison,J.W.;Dodd,M.;Greening, A.P.and webb,A.K.(1993). Evidence for transmission of *pseudomonas* cepacia by social contact in cystic fibrosis.Lancet.342:15-19.

Greenwood , D. ;Slaek , R .C. B .and Peutherer, J . F.(2002). Medical microbiology .(sixteenthed). Churchill Livingstor Genetic basis for dissemination of armA. J Antimicrob Chemother.

Griffiths,.J.A.F.; Miller,J.H,Suzuki,D.T.; Lewontin,R.C.and,M.; Gelbart,W.M.(2000). An Introduction to Genetic Analysis, 7th edition. New York: W. H. Freeman.

Guarner, F. and J.-R. Malagelada (2003)."Gut flora in health and disease."The Lancet 361: 512-519 .

H

Haleem,A.M; Shubber, E.K and Al-Shaibani,A.W.B.(2013).The Study of some Plant Extracts Effect on Free Radicals Removal from DNA in Vetro.Engineering and Technology Journal.31(7):174-180.

Harley, J.P. and Prescott ,L.M. (1996). Microbiology: Laboratory Exercises. 3rd edition, A division of the McGraw Hill Companies, USA.

Hassan,K. A.(2012). Isolation of *Escherichia coli* and *Klebseilla* From Patient With Urinary Tract Infection. Journal of Kufa for Nursing Science Vol. (3) No.(3):175-179.

Highsmith ,A.K.(2002). *Klebsiella pneumoniae*. Selected virulence factors that contribute to pathogenicity - infect. Control. 6:75-77.

Hleyn,J.and Bicknell,M.(2007) .Microbiology Experiments: A Health Science Perspective. Hill companies, Inc.،5th Edition, McGraw.

Holt , J. G.; Kreieg, N. R.; Sneath, P. H.; Staley, J. T. & Williams, S. T. (1994). "Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. 9th edition. Williams & Wilkins: 1063.

Hooper , D.C. (2005).Urinary tract agents: nitrofurantoin and methenamine. In Principles and practice of infectious diseases. Mandell, G.L., Bennett, J.E. & Dolin, R., editors . London. Elsevier, Churchill, Livingstone. p. 473-478.

Hooper , D.(2001). Mechain sms of flouro guinolone resistance " Emerging infect. Dis , 7(2):337-41.

Hurst , C. J.; Crawford, R. L.; Knudsen, G. R.; McInerney, M. J. and Stetzenbach, L.D. (2002). Manual of Environmental Microbiology., 2th Ed. ASM Press, Washington, DC.

Hynes,H.B.N.(1974).The Biology of polluted water. Liverpool Univ .press, Liverpool .

I

Ibrahim, I.AJ; Ismail ,M.I and Ibrahim ,Y.AJ. (2013) .Estimation of validity Tigris River water for swimming in Baghdad city. Advances in Physics Theories and Applications, 18:14-21.

Ingraham,J., Wheelis, M.L. and Painter, P.R. (1986). General Microbiology Fifth Eddition Published by Macmillan Education LTD.

J

Jasim,N.A.(2012).Genetics Detection of Metallic and Extended spectrum Beta-Lactamase production from *Klebsiella pneumoniae* Isolated from different clinical sources. A Thesis Submitted to the Council of College of Science, the University of Mustansiriyah.1-107.

Jazani ,N.H.,Ghasemnejad-Berenji ,H., and Sadegpoor ,S. (2009). Antibacterial effects of Iranian Mentha pulegium essential oil on isolates of *Klebsiella* sp.Pakistan .Journal of Biological Sciences. ,12(2):183-185.

Jensen , C. ; Ethelberg, S. ; Olesen, B. ; Schiellerup, P. ; Olsen, K.E.P. ; Scheutz, F. ; Nelson, E.M. ; Neimann, J. ; Hogh, B. ; Gerner-Smidth, P ; Molbak, K. &Krogfelt, K.A.(2007). Attaching and effacing *Escherichia coli* strain isolated from Danish children: Clinical significance and microbiological characteristics .Clin. Microbiol. Infect., 13:862-872 .

Jewell ,S.N.(2000).Purification and characterization of novel protease from *Burkholderia* strain 2.2N master thesis submitted to the department of biology, state university, Blacksburg,VA.

Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *E.coli* urinary tract infection. Clin. Microbiol. Rev. (4): 80-128pp.

Johnsen , J.; Warren , R.L. and Branstrom , A.A.(1991).Effects of FB2 and a mercury resistance plasmid from *Pseudompnas aeruginosa* PA103 on exoenzymes production. Journal of clinical Microbiology 29(5) : 940-944.

Japoni, A.; Vazin, A.;Hamedi ,M.; Davarpanah, M. A; Alborzi ,A and Rafaatpour, N. (2009) Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Intensive-Care-Unit Patient Samples. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 13(2):118-122.

K

Karkhanis , P.; Pandey, B.; Patni, S. (2011) A rare case of puerperal sepsis. A Case report. 9th International Scientific Meeting of Royal College of Obstetricians and Gynaecologists-Joint Meeting with the Hellenic Obstetric & Gynaecological Society.,Megaron Athens International Conference Centre, Athens, Greece. Poster.

Kasper,D.L; Braunwald, E.; Fauci ,A.S; Hauser, S.L; Longo D.L, Jameson JL, eds.(2004). Harrison's principles of internal medicine. 16th ed. New York: McGraw Hill,883-4.

Katsanis ,G.P. (2005). Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended -spectrum β- lactamase J. Clin . microbial 32:691-696 .

Kattar, M. M; Chavez, J. F ; Limaye, A. P; Rassoulian-Barrett, Yarfitz, S. L. ; Carlson, L. C; Houze, Y.; Swanzy, S.; Wood, , B. L.and Cookson. B. T.(2001). Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. J. Clin. Microbiol. 38:789-794.

Katzug , B.G.(2004). Chemotherapeutic drug basic and clinical pharmacology "9th ed .: 733-81.

Keren ,R. and chan. E.(2002) Ameta Analysis at randomized contzalled trials Comparing short and Larg couse antibiotic therapy for urinazy tract infection in children. Pediatrics. 109:70.

Khan, F ;Rizvi ,M; Shukla ,I; Malik, A .(2011). A novel approach for identification of members of Enterobacteriaceae isolated from clinical samples Biology and Medicine, 3 (2) Special Issue: 313-319.

Khder ,A.K and Muhammed , S. A.(2010). Potential of Aqueous and Alcohol Extracts of *Quercus infectoria*, *Linusm usitatissium* and *Cinnamomum zeylanicium* as Antimicrobials and Curing of Antibiotic Resistance in *E. coli* . Journal of Biological Sciences 2(5): 333-337.

Kim,P.W.; Harris, A.D.; Roghmann, M.; Morrisjr, J.G.; Strinivasan, A. and Perncevich, E.N. (2003). Epidemiological risk factor for isolation of ceftriaxone-resistant versus susceptible *Citrobacter freundii* in hospitalized patients. Antimicrob. Agen. Chemother. 47: 2882-7.

Kivanc , M. and Kunduhoglu, B. (1997). Antimicrobial Activity of Fresh Plant Juice on the Growth of Bacteria and Yeasts. Journal of Qafqaz University, 1: 26-53.

Kodama ,K.; Kimura,N and Komagata, K.(1985).Two new species of *Pseudomonas*: P. oryzihabitans isolated from rice paddy and clinical specimens and P. luteola isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Bacteriol. 35 :467-474.

Kotra ,L.P; Haddad, J .and Mobashert, S.(2000). Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. Antimicrob.Agents chemother. 12(44):3249-3256.

Kremer , A .N. and Hoffmann , H. (2012).Subtraetive hybridization yield . asliver resistance determinant unique to nosocomial pathogens in *the Enterobacter cloacae c*omplex . jcm / asm. 50 (10):3299- 3257.

Kuenkates , E. and Kocazeybek, B.(2002). High resistance rate against 15 different antibiotic in aerobic gram negative bacteria isolates of cardiology intensive care unit patient . Indian . J .Microbial. 20:208-210.

L

Lam ,P.H.W and Salit ,I.E.(2014). *Roaultella planticolla* following consumption of seafood .can.j.infect.Dis med microbial .25(4):83-84 pp.

Lander , E.S; Linton, L.M; Birren Betal.(2001) .Initial Sequencing and anaylsis of the human genome. Nature 409:860-921.

Lawlor ,M. S. ; Christopher, O.; and Virginia, L. M.(2007). Yersiniabactin Is Virulence Factor for Klebsiella pneumoniae during Pulmonary Infection. Infection and Immunity, Mar. Vol (75): 3.

Lina , M.M.; Gona ,F. and Stefani , S .(2012). *Enterobaeter cloacae* complex. Clinical impact and emerging antibiotic resistance Future microbial :887 - 902.

Livermore, D.M.and Woodford, N. (2006)."The blactamase threat in Enterobacteriaceae , *Pseudomonas* and *Acinetobacter*." Trends Microbiol 14: 413- 420.

M

Madigan ,M.; Martinko, J.; Parker,J. (2003). Brock Biology of Microorganisms. 10th ed.Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice Hall .

Makai ,S.; Balatincz, J. and Pocza, V.(1999). Examinations on biologm of germination of the fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) Acta Agronomica Óvàriensis. 41(1): 27-34.

Mandell ,G.L.;Benet,J.E. and Dolum ,R.(1995) : Principle and practice of infectious disease.4th ed. Churchill Livingston ,London.

Margaret ,C.; Smith.M and Sockettoed ,R.E.(1999) Genetic methods for Diverse Prokaryotes. Method in microbiology vol.29.Academi cpress.75-77.

Markowitz , S.M.; Veazey, J.M.; Macrina, F.L.; Mayhall, C.G. and Lamb,V.A. (1980). Sequential outbreaks of infection due to *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: Implication of a conjugative R plasmid. J. Infect. Dis., Vol (142):106-111.

Mayer , K.H ; Hopkins,J.D.; Gilleece ,E.S.; Chao, L.and O Brein ,T.F.(1986). Moleular evolution ,species distribution and clinical consequences of an edamic aminoglycoside resistance plasmid. Antimicrob.Agent.29:628-633.

Mayer ,L.W.(1988). Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease oubreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. J.Clin.Microbiol.Rev. 1:228-243.

Mehani , M. and Ladjel, S.(2012). Antimicrobial effect of essential oils of the plant *Eucalyptus camaldulensis* on some pathogenic bacteria. International Journal of Environmental Science and Development.3(2):86-88.

.

Mekhael,R and.**Y**ousif,S.Y.(2009). the role of red pigment produced by *Serratia marcescens* as antibacterial and plasmid curing agent. J. Duhok Univ..12(1): 268-274.

Miller , G .H ; Sabatelli , F . J. ; Naples , L. Hare ,R .S .and shaw , K . J .(1995). The most Frequency occurring aminoglycoside resistance mechanism combined result of

surveys in eight regions of world . the aminoglycoside assis tance study group. J . chemother. 7:17 - 30.

Minnaganti , V.; Patel, P.; Iancu, D.; Schoch, P. and Cunha , B. (2000). Necrotizing fasciitis caused by *Aeromonas hydrophila. Heart. Lung.* 29 (4): 306-308.

Mohana ,D.C.; Satish,S.and Raveesha,K.A.(2008).Antibacterial evaluation of some plant extracts againt some human pathogenic bacteria.Adv.Biol.Res.,2(3-4):49-55.

Mohammed,S.H.(2011). Bacteriological and Ecological Studies on Tigris River and three Purification Stations in Baghdad province. A thesis Submitted to the College of Science /Al-Mustansiriyah University.69-136.

Mohammed ,A.A; Muheel, M.H; Mujbel ,F. A.H.(2014). Study the Antimicrobial Drug Resistance to some Microbes Isolates from Skin and Blood in Burn Patients. J. of Al-Kufa University for Biology.6(2):15-23.

Mokracka ,J.; Koczura ,P. and Kaznowski, A.(2011).resistance patterns and Integrin cassette of Enterobacter cloacae Complex strain of human origin .J.Med. Microbiol.: 737-743.

Morris,R.M; Rappe, M.S; Connon, S.A;Vergin, K.L; Siebold, W.A; Carlson, C.A and Giovannoni, S.J. (2002) .SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. Nature 420: 806-810.

Motallebi , M.; Zamani, M.R. and Saffar, B. (2000). Serological and Biochemical Characteristics of Virulence Plasmid of *Yersinia* enterocolitica Isolates from Chicken in the Islamic Republic of Iran, Eastern. Med Health J.(6):1-6 .

Mulligan, M.E. (2004). Biochemistry 4103. Prokaryotic Gene Regulation Available from. URL :
http://www.mun.ca/biochem/courses/4103/topics/plasmids.htm

Murray, P.R; Baron ,E.J; Jorgensen, J.H; Pfaller M,A; Yolken R,H; (2003). Enterobacteriaceae. Introduction and identification. In: Farmer, JJ III (eds). Manual of Clinical Microbiology. Elsevier, Philadelphia, USA, 647.

Myrvik , Q.N and Weiser, R. S. (1988). Fundamental of medical bacteriology and mycology-2nd ed. Lea and Febiger poplication.

N

Nanakali,Z.G; Zirak,F.A.(2015). Antibiotic Resistance Study and Detection of Virulence Gene among Uropathogenic *E.coli*. Kirkuk University Journal /Scientific Studies.10 (3): 205-229.

Najmadeen,H.H.(2011). Effects of Soil Organic Matter, Total Nitrogen and Texture on Nitrogen Mineralization Process. Journal of Al-Nahrain University.14(2):144-151.

Naumiulk , L . ; Baraniak , A . ; Gniadkowski ,M. ; Rybak , B and K ur , J . (2004) Molecular Epidemiology at *Serratia marcescens* in two hoopitial in Darzig , paland over a- 5- year peraid . J. clin microb. ,42 (7):3108 - 3116.

Nicolle, L.E. (2008). "Uncomplicated urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis".Urol Clin North Am 35 (1): 1-12.

Novick ,R.P.(1980). Plasmid.Sci.Amer-243 (6):102-127.

Nyenje ,M.E.;Tanih ,N.F ; Green , E. and Ndip , R.N. (2012). Current status of Antibio grams of Listeria ivanovii and *Enterobacter cloacae* isolated From Ready - to - Eat foods in Alice , south African . Int .J. Environ . Res . public Health .9 :3101-3114 .

O

Ofek , I.; Mirelmam, D. and Sharon, N. (1997).Adherence of E.coli to Human Mucosal Cell," Nature,Vol. 265, 623-625.

Olaolu ,T.D ; Akpor, O.B and Akor,Ch.O .(2014). Pollution indicators and pathogenic microorganisms in wastewater treatment:Implication on receiving water bodies. International Journal of Environmental Protection and Policy.2(6):205-212.

Osborn , M.; Bron, S.; Firth, N.; Holsappel, S.; Huddleston, A.;Kiewiet, R.; Meijer, W.; Seegers, J. (2000) The evolution of bacterial plasmids. In The Horizontal Gene Pool ed. Thomas, C. 301-361. Amsterdam, the Netherlands: Harwood Academic Publishers.

P

Panneerchelvam ,S.and Norazmi,M.N.(2003).Forensic DNA profiling and database. Malaysian J Med Sci;10:20-26.

Paterson , D.L.(2006). Resistance in gram-negative bacteria Enterobacteriaceae. Am J Med; 119: 20-28.

Patwardhan,R.B; Dhakephalkar,P.K and Chopade,B.A.(2015).Antibacterial and plasmid curing activities of root extracts of Plumbago zeylanica. International Journal of Herbo Medica. Vol-2(1)13-2 .

.

Pegues ,D.;Carson,L.A.;Anderson,R.L.;Norgard,M.J.;Aargent,T.A.;Jarvis, W.R.and Woernle,C.H .(1993).Outbreak of *pseudomonas cepacia* bacterimia: Clinical features and Antimicrobial susceptibilities of isolates.J.infect.Dis.31(3):293.

Peloquin, J.J; Kuzina, L.V; Lauzon ,C.R; Miller T,A .(2000) Transformation of internal extracellular bacteria isolated from Rhagoletis completa Cresson gut with enhanced green fluorescent protein. Curr Microbiol 40:367-371.

Pepperell , C .; Kus ,J. V; Gardam, M.A.; Hummar, A.and Burrows , L .L. (2002). Low virulence *Citrobacter* species En code Resistance to multiple Antimicrobials Antimicrob Agents chemother., nov. 46(11):3555-3560.

Perepelov ,A,V;Wang,M;Filator ,A,V;Guo ,X; Shashkov,A,S;Wang L.k and Nirel,Y.A.(2015).Structure and genetics of the O-antigen of Enterobater cloacae G3054 containing di-n-acetyl pseud aminic acid . Al sevier Ltd .59-62.

Perez , M.M.;Amicosante , G . ; Franceschini, N . ; vila , J. ;R Ruiz , J. ; Oratore , A. ; Martin- Sanchez, A. M and Jimenez - de- Anta , M. T. (1999). Decreased production of Amc - type beta Lactamases associated with the development of resistance to quinolones in *Citrobaeter Freundii* strains . Microb - Drug Resist . 5(4):235 – 40.

Peterson , L.R.(2008). Antiobic policy and prescribing strategies for therapy of extended Spectrum B-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae : the role of piperacillin tazabactam .J. Clin. Microbial infect 14(1): 181-184.

Petropoulos , G.A. (2002). Fenugreek–The genus Trigonella. 1- 255. Taylor and Francis, London and New York.

Petti ,C.A.(2007).Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. Clin Infect Dis, 44(8):1108-1114.

Popiech and Neuman .(1995). Salting out procedure for the isolation of genomic DNA (cited by Niser,2000).

Prabhakara , M. C.; Basavaraju, B. and BhojyaNaik, H.S.(2007). Co(III) and Ni(II) Complexes Containing Bioactive Ligands: Synthesis, DNA Binding, and Photocleavage Studies. Hindawi Publishing Corporation Bioinorganic Chemistry and Applications, 1:1-7.

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

Pulian , V.M; Trigo, M.D.; Fenandez , A.B, Garcıa ,M.C; Quindos G.A.(2009). Enteric fever-like syndrome caused by *Raoultella orinithinolytica* (*Klebsiella ornithinolytica*). J Clin Microbiol; 47: 868-869.

ℝ

Rahmani,S. ; Forozandeh ,M.; Mosavp ,M.; and Rezaeej, A. (2006). Detection of bacteria by amplifying the 16s rRNA gene with universal primers and rflp. Medical journal of the Islamic republic of Iran ,19(4) 333-338 . .

Ramezani , H.; Singh, H. P.; Batish, D. R. Kohli, R. K. and Davgan, J. S. (2002). Fungicidial effect of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* and its major constituent citronellal. New Zealand plant protection. 55:327-330 .

Raymond ,G.; Samer F.; and Ahdulhhm.(2003) Extended Spectrum B-Lactamases among Grame negative Bacterial isolates from clinical specimens in three major Hospitalals in Northern Jordan, Ame Soc Microbial. 8. 1-3 .

.

Rebert ,I.S.(2003).The biochemistry and genetic of capsular polysaccharide production in bacteria . Annul. Rev . Mirobial,50:285-315 .

Robert ,D.A.(1999).Laboratoy procedures for the epidemiologic analysis of microorganism.Manual of clinical microbiology7th addition.

Rodriguez , J. M.; Martinez, M. J. and Kok, J. (2002). Pediocin PA- a wide- spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 42: 91-121.

Rousselon ,N.; Delgenes,J.P. and Godon,J.J. (2004). Anew real time PCR (Taq man PCR) system for detection of the 16S rDNA gene associated with fecal baccteia .microbial meth 59, 15-22.

Ryan ,K. ; Ray, C. G.; Nafees, A. ; Drew ,W. L.; James, P. (2010). Sherris Medical Microbiology.5 th.Ed. Hill publishing company New York.

S

Sabat , G. ;Rose, P.; Hickey, W. and Harkin J.M.(2000). Selective and Sensitive Method for PCR Amplification of *Escherichia coli* 16Sr RNA Genes in soil. Applied and Environmental Microbiology; 66: 844-849.

Sambrook ,J.;Fritsch,E.F.and Manitis,T.(1989).Molecular Cloning : A Laboraty Nanual,2ad.Cold Spring Harbor Laboratory Press,N.Y.

Sangdee ,A.(2008).Molecular Techniques: An Alternative Method for Bacterial Classification. J. Sci Technol MSU 2008;27(4):376-381.

Schweizer , H.P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeroginosa* and related bacteria: unanswered questions" Genetic and Moleclar Research , 2(1): 48- 62.

Sekelja ,M; Rud,I; Knutsen,S .H; Denstadli ,V; Westereng,B; . Næs,T and Rudi,K. (2012). Abrupt Temporal Fluctuations in the Chicken Fecal Microbiota Are Explained by Its Gastrointestinal Origin.Journal Applied and Environmental Microbiology p. 2941-2948.

Selimovic ;B . M , Babic ; T , kocic ; B , stojanovic ; P , Ristic ; L and Dinic;M . (2007) . Bacterial Plasmid . Acta medica Medianae ; 46 (4):61 - 62pp.

Shakil , S. (2008).Aminoglycosides versus bacteria-a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. J Biomed Sci. 15(1):5-14.

Shapiro , K. and Gong, W. C.(2002). Natural products used for diabetes. Journal of the American Pharmaceutical Association, 42: 217-226.

Shierack , P.; Steinruk,H. and Kleta,S. (2006).Virulence factor gene prolifes of *Eshcerichia .coli* isolates from clinical healthy pigs. Appl. Environ .mirobiol ,72:6680-6686.

Shigemura ,K.; Arakawa, S.; Tanaka, K. and Fujisawa, M. (2009). Clinical investigation of isolated bacteria from urinary tracts of hospitalized patients and their susceptibilities to antibiotics.J. Infect .and Chemoth.15(1): 18-2pp.

Sidjabat , H.; Nimmo, G.R., walsh ,T.R., Binotto E., H tin A., Hayashi .Y, L:.,Nation R. L., George N., and Paterson D.L.,(2011),"carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumonia* due to the new Delhi metallo-B Lactamse" clin. In fect. Dis. 52(4): 481-484.

Silva ,J.C.; Loreto, E.L; and Clark, J.B. (2004). Factors that Affect the Horizontal Transfer of Transposable Elements Curr. Lssues Mol. Biol, 6: 57-72.

Sides, K.E. (2010) .Agricultural Soil Bacteria; A Study of Collection, Cultvation, and Lysogen. Masters Theses. Universit of Tennssee - Knoxville.

Singh , J. and Banerjee, N. (2008). Transcriptional Analysis and Functional

Sneath, P. H. A.; Mair, N. S;. Sharpe, M. E and Holt ,H. G. (ed.). (1986). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2, p. 1599. Williams & Wilkins, Baltimore.

Stechera, B.; Denzlera, R.; Maiera, L.; Berneta, F.;Sanders, M. J.; Pickard, D.J.; Barthela, M.; Westendorfd, A.M.; Krogfelt, K.A; Walker, A.W; Ackermann, M.; Dobrindth, U.;

Thomson, N. R.; and Hardt ,W.D. (2012). Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae.PNAS,109(4):1269-1274

Subha, A .and Ananthan, S. (2002). Extended spectrum beta lactamase (ESBL) mediated resistance to third generation cephalosporins among *Klebsiella pneumoniae* in Chennai. Ind J Med Microbio.;20(2):92-95.

T

Tärnberg ,M.(2012) .Extended –spectrum beta –lactamase producin Enterobacteriaceae: aspects on detection, epidemiology and multi-drug resistance.Linköping University medical dissertations, No. 1300. Printed by LiU-Tryck, Linköping, Sweden, Linköping University medical .

.

Tauch , A.; Schneiker, S.; Selbitschka, W.; Puhler, A.; Van Overbeek, L.S.; Smalla, K.; Thomas, C.M.; Bailey, M.J. (2002) The complete nucleotide sequence and environmental distribution of the cryptic, conjugative, broadhost- range plasmid pIPO2 isolated from bacteria of the wheat rhizosphere. Microbiol 148, 1637-165.

Tervors, J.T.(1968).Plasmid curing in bacteria Fems. Microbiol. Rev.32(3-4):149-157.

Thomas, C.M. (ed.) (2000) The Horizontal Gene Pool Bacterial Plasmids and Gene Spread. Amsterdam, the Netherlands: Harwood Academic Publishers.

Threlfall,E.and Frost,J. (1990).The identification typing and finger printing of *Salmonella* laboratory aspects and epidemiological application.J.Appl.Bacteriol.86 (1):5- 16 .

Toba ,O.A.; Emmanuel ,A.E. and Alaba ,A.A. (2015). Plasmid profile of multi-drug resistance bacteria isolated from available water sources and Leachate samples from dumpsite At Ebira communities in Ekiti North Nenatorial District, Ekiti State, Nigeria**.** European J. of Advanced Research in Biological and life Sciences. 3(1):31-45.

Tomas ,T.M .(2001). The pathogenicity of *Enterobacter* spp. J. Rev. Med. Microbial . 1:196-204.

Tomita ,T. and Kamio,Y.(1997).Molecular Biology of pore-forming cytolysine from *Staphylococcus aureus*, alpha and gamma-hemolysin and leukocidin. Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol 61 (4) : 565.

Turnidge, J.(2003). Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides. Infect. Dis. Clin. N. Am. (13):503-528.

Tyagi ,V.K ; Kazmi ,A.A and Kumar ,A . (2006) .Alternative microbial indicators of fecal pollution current perspective .Iran .J. Environ. Health Sci.Eng .3(3) : 205- 216.

U

Ufomata , D. (2003). Bacteriological investigation of infected root canals in Beniu city , Nigeria west Africa. J. Med.(11):3:195-8.

Umeh , O.; Berkowitz, L.; shepp, D.; Talavera, F.; King, J.; Mylonakia, E. and cunha, B .(2006). Infectious disease, *Klebsiella* infection. J. Med. 27(1).

V

Vanden Bogaard, A.E.; London, N.; Driessen, C.;Stobberingh, E.E.(2001). Antibiotic Resistance of faecal *Escherichia coli* In poultry, Poultry Farmers and Poultry Slaughteres. J. Antimicrob. Chem., 47:763:771.

Vandepitte, J .;Verhaegen,J. ;Engbeck,K.; Rohner, R.and Heuck, .L.(2003). Basic laboratory procedure in clinical bacteriology. 2nd ed . World Health C Organization . Geneva.

Van Elsas ,J.D.; Fry, J.; Hirsch, P. and Molin, S.(2000). Ecology of plasmid transfer and spread. In The Horizontal Gene Pool ed. Thomas, C. pp.175-206. Amsterdam, the Netherlands: Harwood Academic Publishers.

Vellibs , L. M.(2002). Stool: *Aeromonas caviae*. Clin. Microbiol. Profici. Test,123: 163-167.

Vidott , M.c; Kobaysh , R.K.; Dias ,A.M.(2000) . Unidentified serogroups of enter pathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with diarrhoea in infants in Londria Parane , Brazil , J.Med .Microbiol 2000 sep .,99(9):823 -6.

W

Wachsmuth,I.;Bopp,C.;Cameron,D.;Strockbine,N.;Wells,J and Blak,P.(1991). The use of plasmid profile and nucleic acid probe sine pidemiology investigation of food borne ,diarrheal disease.12(1):77-89.

Wachsmuth , K.(1986).Molecular epidemiology of bacterial infections: examples of methodology and of investigations of outbreaks. Rev Infect;8:682-92.

Walsh ,C. (2003). Antibiotics: actions, origins, resistance. ASM Press. J.Prot. Scien.13(11): 3059-3060.

Warren ,L.(2012). Medical Microbiology and Immunology.Twelfth Edition.the McGraw-Hill companies.146-167.

Westwood, M.E. ;Whiting, P.F. ; Cooper, J.; Watt, I.S and Kleijnen J.(2005). Further investigation of confirmed urinary tract infection in children under five years. systematic review . BMC Pediatr.5:2

WHO.(2003). Basic laboratory procedure in clinical bacteriology. 2th ed . Geneva.

Wicker ,Th.; Sabot,F.; Hua-Van,A.; Capy, P; Chalhoub,B; Flavell ,A; Morgante ,M; Panaud,O; Paux,E and Schulman,A.H (2007). "A unified classification system for eukaryotic transposable elements ". Nature Reviews : Genetics. 8(12) : 973-82.

Williams ,D.A. and Lemke, T.L. (2002).Foye's principles of medicinal chemistry. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; ISBN. pp:1-7167,4339-6.

Wiswman , G.M. (1968). The Nature of Staophylococci beta- hemolysin. C and. J.,of Microbiol. 14.

Wolcott ,R. D; Gontcharova, V.; Sun, Y.; Zischakau, A. and Dowd ,S.E (2009).Bacterial diversity in surgical site infections: not just aerobic cocci anymore. J Wound Care**,** 18(8):317-323 .

.

Woo, P.C.Y .; Leung, P. K. L.; Leung, K.W.; Yuen, K.Y.(2000).Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of an Enterobacteriaceae species froma bone marrow transplant recipient J Clin Pathol : Mol Pathol. ;53:211-215.

Wult , B.G.; Bergsten, H.C;Connell, P.R.O (2000). P-Fimbriae enhance the early establish mont of *E.coli* in the human urinary tract mol Microbiol 38:456-464.

Y

Yabuuchi, E.;Kosako,Y.;Oyzio,H.;Yanon,I.;Hotta.;Hashimoto,Y.;Ezaki,T.and Arakawa , M.(1992).Proposal of *Burkholderia* gen nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group // to new genus, with type species *Burkholderia cepacia*. Microbiol.immunol.36:1251-1275.

Yeh ,K. M. Jung,C. L., Fon,Y.Y., Chang,P.F., Han,C. H.,Leung,K. S., Feng,Y,C.(2009). Revisiting the Importance of Virulence Determinant *magA* and Its Surrounding Genes in *Klebsiella pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscesses:Exact Role in Serotype K1 Capsule Formation. The Journal of Infectious Diseases 2010; 201:1259-1267.

Yokota , K.; Gomi ,H.; Miura, Y.; Sugano, K.; Morisawa, Y.(2012). Cholangitis with septic shock caused by *Raoultella planticola*. J Med Microbiol . 61 (Pt3): 446-449.

Yoo , S.H.;Jeong, H.; Kwon, S. K.; Kim, J.F .(2009) .Biological Features, Biotechnological and Applications of *Escherichia coli* B: Is B for better; Springer: Berlin, Germany

Z

Zaen Al-Abdeen, S. S.; B. M. Faraj and O. J. Nasrulla (2010). Antibacterial effects of fenugreek (*Trigonella foenum*-graecum). Bas. J. Vet. Res., 9(2): 133-138.

Zhuo, C.; Li ,X.Q.; Zong, Z.Y, and Zhong, N.S.(2013) Epidemic Plasmid Carrying ^{bla}CTX-M-15 in *Klebsiella penumoniae* in China. PLOS ONE, 8 | Issue 1:1-8.

Zorn ,B.G; Catalan ,A.; Escudero, J.A .and Dominguez, L.(2005).Genetic basis for dissemination of *armA*. J Antimicrob Chemother. 56:583-585.

Zurfluh,K; Glier,M; Hächler, H and Stephan, R.(2015). Replicon typing of plasmid carring blaCTX-M-15 among Enterobacteriaceae isolated at the environment, livestock and human interface. Science of The Total Environment ,Volumes 521-522,75-78.

الملاحق

Appendixes

ملحق (1) الخاص ب 64 اختبار من اختبارات الكيموحيوية الخاصة بجهاز VITIEK-2

Table 1-12: GN Well Contents

Well	Test	Mnemonic	Amount/Well
40	L-LACTATE alkalinisation	ILATk	0.15 mg
41	ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036 mg
42	SUCCINATE alkalinisation	SUCT	0.15 mg
43	Beta-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	NAGA	0.0306 mg
44	ALPHA-GALACTOSIDASE	AGAL	0.036 mg
45	PHOSPHATASE	PHOS	0.0504 mg
46	Glycine ARYLAMIDASE	GlyA	0.012 mg
47	ORNITHINE DECARBOXYLASE	ODC	0.3 mg
48	LYSINE DECARBOXYLASE	LDC	0.15 mg
52	DECARBOXYLASE BASE	ODEC	NA
53	L-HISTIDINE assimilation	IHISa	0.087 mg
56	COURMARATE	CMT	0.126 mg
57	BETA-GLUCORONIDASE	BGUR	0.0378 mg
58	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	O129R	0.0105 mg
59	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	GGAA	0.0576 mg
61	L-MALATE assimilation	IMLTa	0.042 mg
62	ELLMAN	ELLM	0.03 mg
64	L-LACTATE assimilation	ILATa	0.186 mg

Note: *Other well numbers between 1 and 64 not designated in this table are empty.*

GN Well Contents

Table 1-12: GN Well Contents

Well	Test	Mnemonic	Amount/Well
2	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	APPA	0.0384 mg
3	ADONITOL	ADO	0.1875 mg
4	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
5	L-ARABITOL	lARL	0.3 mg
7	D-CELLOBIOSE	dCEL	0.3 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0.036 mg
10	H2S PRODUCTION	H2S	0.0024 mg
11	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0.0408 mg
12	Glutamyl Arylamidase pNA	AGLTp	0.0324 mg
13	D-GLUCOSE	dGLU	0.3 mg
14	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	GGT	0.0228 mg
15	FERMENTATION/ GLUCOSE	OFF	0.45 mg
17	BETA-GLUCOSIDASE	BGLU	0.036 mg
18	D-MALTOSE	dMAL	0.3 mg
19	D-MANNITOL	dMAN	0.1875 mg
20	D-MANNOSE	dMNE	0.3 mg
21	BETA-XYLOSIDASE	BXYL	0.0324 mg
22	BETA-Alanine arylamidase pNA	BAlap	0.0174 mg
23	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0.0234 mg
26	LIPASE	LIP	0.0192 mg
27	PALATINOSE	PLE	0.3 mg
29	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA	0.0276 mg
31	UREASE	URE	0.15 mg
32	D-SORBITOL	dSOR	0.1875 mg
33	SACCHAROSE/SUCROSE	SAC	0.3 mg
34	D-TAGATOSE	dTAG	0.3 mg
35	D-TREHALOSE	dTRE	0.3 mg
36	CITRATE (SODIUM)	CIT	0.054 mg
37	MALONATE	MNT	0.15 mg
39	5-KETO-D-GLUCONATE	5KG	0.3 mg

ملحق(2) توضح التقرير الخاص باحدى العينات البيئية والمشخصة بجهاز VITIEK-2

bioMerieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Jan 13, 2015 11:48 CST

Patient Name: tuka20
Location:
Lab ID: 2020

Patient ID: 2020
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Raoultella planticola

Source: water

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time:	5.00 hours	Status:	Final
Selected Organism	95% Probability Bionumber:	Raoultella planticola 6625714757574010		
ID Analysis Messages				

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	+	5	IARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	+	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	+
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Page 1 of 1

ملحق(3) المعلومات الخاصة ببكتريا *Klebsiella pneumonia* السريرية

نوع العينة	الجنس	العمر	العزلات البكتيرية	الرمز	الرقم
Sputum	♂	32 سنة	*Klebsiella pneumonia*	KP (C)	51
Sputum	♀	61 سنة	*Klebsiella pneumonia*	KP (C)	52
Sputum	♀	55 سنة	*Klebsiella pneumonia*	KP (C)	53
Blood	♀	سنة واحدة	*Klebsiella pneumonia*	KP (C)	56
Sputum	♂	27 سنة	*Klebsiella pneumonia*	KP (C)	57
Ear swab	♀	13 سنة	*Klebsiella pneumonia*	KP (C)	60
Blood	♂	5 سنوات	*Klebsiella pneumonia*	KP (C)	61
Urine	♀	23 سنة	*Klebsiella pneumonia*	KP (C)	75
Sputum	♂	58 سنة	*Klebsiella pneumonia*	KP (C)	78
Sputum	♂	44 سنة	*Klebsiella pneumoniae*	KP (C)	86
Urine	♀	24 سنة	*Klebsiella pneumoniae*	KP (C)	89
Urine	♂	12 سنة	*Klebsiella pneumoniae*	KP (C)	102
Ear swab	♀	42 سنة	*Klebsiella pneumoniae*	KP (C)	103
Urine	♀	50 سنة	*Klebsiella pneumoniae*	KP (C)	104
Sputum	♂	45 سنة	*Klebsiella pneumoniae*	KP (C)	105

- **E = العينات البيئية**
- **C= العينات السريرية**

ملحق(4) المعلومات الخاصة ببكتريا *E.coli* البيئية

الرقم	الرمز	العزلات البكتيرية	نوع العينة
3	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Chicken stool
6	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Water
8	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Water
10	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Chicken stool
14	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Water
16	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Water
21	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Water
22	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Chicken stool
23	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Chicken stool
24	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Soil
25	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Chicken stool
26	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Chicken stool
27	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Chicken stool
28	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Water
29	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Chicken stool
30	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Chicken stool
31	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Chicken stool
32	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Chicken stool
33	E.c(E)	*Escherichia.Coli*	Chicken stool

34	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Chicken stool**
35	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Water**
36	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Soil**
37	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Water**
38	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Chicken stool**
39	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Water**
40	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Chicken stool**
41	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Chicken stool**
42	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Chicken stool**
43	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Chicken stool**
44	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Water**
45	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Chicken stool**
46	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Chicken stool**
47	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Chicken stool**
48	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Chicken stool**
49	**E.c(E)**	***Escherichia.Coli***	**Chicken stool**

ملحق(5) المعلومات الخاصة ببكتريا *E.coli* السريرية

نوع العينة	الجنس	العمر	العزلات البكتيرية	الرمز	رقم
Urine	♀	44 سنة	*Escherichia coli*	Ec (C)	54
Urine	♀	60 سنة	*Escherichia coli*	Ec (C)	62
Urine	♀	8 أشهر	*Escherichia coli*	Ec (C)	63
Urine	♀	5 سنوات	*Escherichia coli*	Ec (C	64
Urine	♀	35 سنة	*Escherichia coli*	Ec (C)	65
Blood	♀	2 سنة	*Escherichia coli*	Ec (C)	66
Urine	♀	3 سنوات	*Escherichia coli*	Ec (C)	67
Urine	♀	32 سنة	*Escherichia coli*	Ec (C)	68
Urine	♀	22 سنة	*Escherichia coli*	Ec (C)	69
Urine	♀	44 سنة	*Escherichia coli*	Ec (C)	70
Urine	♀	3 سنوات	*Escherichia coli*	Ec (C)	71
Urine	♂	28 سنة	*Escherichia coli*	Ec (C)	72
Urine	♀	42 سنة	*Escherichia coli*	Ec (C)	73
Urine	♀	52 سنة	*Escherichia coli*	Ec (C)	74
Urine	♀	2سنة و6أشهر	*Escherichia coli*	Ec (C)	76
Wound	♂	3 سنوات	*Escherichia coli*	Ec (C)	77
Swab	♂	46 سنة	*Escherichia coli*	Ec (C)	79
Woubd	♀	سنة و4 أشهر	*Escherichia coli*	Ec (C)	80

81	Ec (C)	*Escherichia coli*	شهرين	♀	Urine
84	Ec (C)	*Escherichia coli*	4 سنوات	♂	Urine
85	Ec (C)	*Escherichia coli*	24 سنة	♀	Urine
87	Ec (C)	*Escherichia coli*	52 سنة	♀	Urine
88	Ec (C)	*Escherichia coli*	4 سنوات	♀	Urine
90	Ec (C)	*Escherichia coli*	5 سنوات	♀	Urine
91	Ec (C)	*Escherichia coli*	18 سنة	♀	Urine
92	Ec (C)	*Escherichia coli*	25 سنة	♂	Urine
93	Ec (C)	*Escherichia coli*	سنة وشهرين	♂	Urine
95	Ec (C)	*Escherichia coli*	34 سنة	♂	Urine
96	Ec (C)	*Escherichia coli*	45 سنة	♂	Urine
97	Ec (C)	*Escherichia coli*	46 سنة	♀	Urine
98	Ec (C)	*Escherichia coli*	30 يوم	♂	Urine
99	Ec (C)	*Escherichia coli*	27 سنة	♂	Urine
100	Ec (C)	*Escherichia coli*	40 سنة	♀	Urine
101	Ec (C)	*Escherichia coli*	17 سنة	♂	Swab
106	Ec (C)	*Escherichia coli*	57 سنة	♀	Urine
107	Ec (C)	*Escherichia coli*	44 سنة	♀	Urine
108	Ec (C)	*Escherichia coli*	ستة أشهر	♀	Urine
109	Ec (C)	*Escherichia coli*	37 سنة	♂	Urine
110	Ec (C)	*Escherichia coli*	اربعة أشهر	♂	Urine
111	Ec (C)	*Escherichia coli*	7 سنوات	♂	Urine
112	Ec (C)	*Escherichia coli*	سنتين	♂	Urine

113	Ec (C)	*Escherichia coli*	33 سنة	♂	Urine
114	Ec (C)	*Escherichia coli*	سنة واحدة	♂	Urine
115	Ec (C)	*Escherichia coli*	22 سنة	♀	Urine
116	Ec (C)	*Escherichia coli*	3 سنوات	♀	Urine
117	Ec (C)	*Escherichia coli*	45 سنة	♀	Urine
118	Ec (C)	*Escherichia coli*	سنة واحدة	♀	Urine
119	Ec (C)	*Escherichia coli*	ستة اشهر	♂	Urine
120	Ec (C)	*Escherichia coli*	10 سنوات	♀	Urine
121	Ec (C)	*Escherichia coli*	3 سنوات	♂	Urine
122	Ec (C)	*Escherichia coli*	سنتين	♀	Urine
123	Ec (C)	*Escherichia coli*	سنة وشهرين	♂	Urine
124	Ec (C)	*Escherichia coli*	22 سنة	♀	Urine
125	Ec (C)	*Escherichia coli*	5 ايام	♂	Urine
126	Ec (C)	*Escherichia coli*	3 سنوات	♀	Urine
127	Ec (C)	*Escherichia coli*	سنة واحدة	♀	Urine
130	Ec (C)	*Escherichia coli*	4 سنوات	♀	Blood
131	Ec (C	*Escherichia coli*	سنة وشهرين	♂	Urine
132	Ec (C	*Escherichia coli*	سنة واحدة	♀	Urine
133	Ec (C	*Escherichia coli*	17 سنة	♂	Urine
134	Ec (C	*Escherichia coli*	4 اشهر	♀	Urine
135	Ec (C	*Escherichia coli*	46 سنة	♀	Urine
136	Ec (C	*Escherichia .coli*	سنة واحدة	♀	Urine
137	Ec (C	*Escherichia .coli*	6 سنوات	♀	Wound

Wound	♀	70 سنة	*Escherichia .coli*	Ec (C	138
Urine	♀	33 سنة	*Escherichia .coli*	Ec (C	139
Urine	♂	12 سنة	*Escherichia .coli*	Ec (C)	140
Urine	♂	3 اشهر	*Escherichia .coli*	Ec (C)	141
Urine	♀	2 اشهر	*Escherichia .coli*	Ec (C)	142
Urine	♀	سنة واحدة	*Escherichia .coli*	Ec (C)	143
Wound	♀	18 سنة	*Escherichia .coli*	Ec (C)	145
Urine	♂	30 سنة	*Escherichia .coli*	Ec (C)	146
Urine	♀	3 اشهر	*Escherichia .coli*	Ec (C)	147
Urine	♂	سنتين	*Escherichia .coli*	Ec (C)	148

ملحق(6)المعلومات الخاصة بباقي الانواع البكتيرية السريرية

نوع العينة	الجنس	العمر	العزلات البكتيرية	الرمز	الرقم
Urine	♂	50 سنة	*Enterobacter areogenes*	EA(C)	50
Urine	♂	سنة واحدة	*Enterobacter areogenes*	EA(C)	55
Urine	♀	سنتين	*Enterobacter areogenes*	EA(C)	58
Blood	♂	سنة واشهر	*Enterobacter areogenes*	EA(C)	59
Urine	♂	22 سنة	*Enterobacter areogenes*	EA(C)	94
Urine	♀	سنة	*Serratia marscense*	SM(C)	128

129	**SM(C)**	***Serratia marscense***	**3 سنوات**	♀	**Blood**
144	**CF(C)**	***Citrobacter freundii***	**ستة اشهر**	♂	**Urine**
149	**SM(C)**	***Serratia marscense***	**20 سنة**	♂	**Wound**

ملحق (7) يوضح اختبار الحساسية لبكتريا *E.coli* السريرية والبيئية للمضادات الحيوية

	ß-Lactam (1)					Aminoglycosides			ß-Lactam(2)			Quinolones		Sulfonamides	Other
	Penicillins		3rd _generation Cephalosporin		4th generation Cephalosporin				Carbapenems		Monobactam	2nd generation	3rd generation		
Spesies	Amoxicllin	Ampicilln	Ceftriaxone	Ceftazidime	Cefepime	Amikacin	Gentamycin	Tobramycin	Impenem	Meropenem	Aztreonam	Ciprofloxacin	levofloxacin	Trimethopime Sulfamethazole	Nitrofurantion
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S	R

E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R
E.coli (E)	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R
E.coli (E)	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R
E.coli(E)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
E.coli(E)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
E.coli (E)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R

E.coli (C)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R
E.coli(C.SW	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R
E.coli(C.P)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S

E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
E.coli (E.CS	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R
E.coli (E.W)	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S
E.coli(E.W)	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R
E.coli(E.CS)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R
E.coli (C.P)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S
*E.coli (*C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R

E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S
E.coli (C.U)	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	S
E.coli(C.ST)	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
E.coli (C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R
E.coli(C.B)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
E.coli(C.U)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
E.coli (C.U)	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S

- **Environmental sample chiken stool = E.CS ، Swabe = SW ، Blood =B ، Clinical sample Urine =C.U**
- **Clinical sample Pus= C.P**

ملحق(8) يوضح اختبار الحساسية لبكتريا *Enterobacter* للمضادات الحيوية

	B_Lactam(1)					Aminoglycosides			B_Lactam (2)			Quinolones		Sulfonamides	other
	Penicillins		3rd _generation Cephalosporin		4th generation Cephalosporin				Monobactam		Carbapenems	2nd generation	3rd generation		
Species	Amoxiclin	Ampicilln	Ceftriaxone	Ceftazidime	Cefepime	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Impenem	Meropenem	Aztreonam	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Trimethopime Sulfamethazole	Nitrofurantion
Enterobacter(C)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
Enterobater C)	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R
Enterobacter C)	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R
Enterobacter C)	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S
Enterobacter C) r	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R

ملحق(9) يوضح اختبار الحساسية *K.pneumoniae* البيئية والسريرية

	B_Lactam(1)					Aminoglycosides			B_Lactam(2)			Quinolones		Sulfonamides	Other
	Penicillins		3rd _generation Cephalosporin		4th generation Cephalosporin				Carbapenems		Monobactam	2nd generation	3rd generation		
Species *Klebsiella pneumoniae*	Amoxicillin	Ampicilln	Ceftriaxone	Ceftazidime	Cefepime	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Impenem	Meropenem	Aztreonam	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Trimethopime Sulfamethazole	Nitrofurantion
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R
K.pneumoniae	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	S	R
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R
K.pneumoniae	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R

K.pneumonia)	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
K.pneumonia)	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R
K.pneumoniae	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R
K.pneumoniae	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R
K.pneumonia)	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	R	R
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
K.pneumoniae	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S

ملحق(10) يوضح اختبار الحساسية لبعض الانواع البكتيرية البيئية للمضادات الحيوية

	B_Lactam (1)					Aminoglycosides			B_Lactam (2)			Quinolones		Sulfonamides	Other
	Penicillins		3rd _generation Cephalosporin		4th generation Cephalosporin				Carbapenems		Monobactam	2nd generation	3rd generation		
Species	Amoxiclin	Ampicilln	Ceftriaxone	Ceftazidime	Cefepime	Amikacin	Gentamycin	Tobramycin	Impenem	Meropenem	Aztreonam	Ciprofloxacin	levofloxacin	Trimethopime Sulfamethazole	Nitrofurantion
K. oxytoca	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R
K. oxytoca	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R
R.planticola	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R

Abstract

183 bacterial isolate from clinical and environmental samples are collected during the 5 months from 1/9/2014 to 1/2/2015.Which 98 clinical bacterial isolates were isolated from patients (urine, blood, sputum and swabs) from different hospitals in Baghdad city, and also 85 environmental bacterial isolates were isolated from Tigris river water samples which are collected from Al-Shawaka area , soil samples of eastern Baghdad collected from Jadied Shat area , and poultry feces which are collected from poultry farm in Al-Sadar city.

All clinical and environmental bacterial isolates were identified on the basis of morphology and biochemical tests.

Further Confirmative tests were used to confirm the identification of bacterial isolates by using Vitek-2 compact system and specific primer to detect 16S rRNA gene. Results of bacteria identification showed the following species:

Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella.oxytoca Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii, Serratia marcescens, Raoultella planticola, Chryseomonas luteola, Burkholderia cepacia, Aeromonas, Hydrophis , Streptococcus feacalis

The antibiotic resistance patterns showed that all bacterial species were multidrug resistant.Most clinical *E.coli* (45isolates) revealed high levels resistance against most antibiotics: (100%) amikacin and ampicillin, (97%) cefepime and ceftazidime, (95%) cetriaxone,(86%) tobramycin, (82%) amoxicillin, (77%) gentamicin, (73%) aztreonam. Also environmental *E. coli* (28isolates) showed high levels resistance, (100%) ampicillin, ceftazidime, cefepime and tobramycine, (96%) nitrofurantion, (92%) Ceftriaxone, (89%) amoxicillin, (82%) amikacin, (60%) levofloxacin and impenem. All *K.pneumoniae* showed high levels resistance against most antibiotics, ampicillin, amoxicillin, cefepime and ceftazidime (100%).While 30% resistance in ciprofloxacin

for clinical *K.pneumoniae* isolates and 8% resistance was shown in each meropenem and levofloxacin.

Results of molecular identification of *E.coli* isolates by using the specific primer for 16S rRNA gene showed that all isolates of Lactose fermenter contained this gene (100%). Also the same 16S rRNA gene was found in the bacteria *Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes, Serratia marcescens, Raoultella planticola* with the same molecular weight (544 base pair) that found in *E. coli* isolates. While *K.pneumoniae* isolates showed two bands for the same 16S rRNA gene with molecular weight of 544 and > 1500 bp.

The plasmid DNA analysis by using alkaline lysis method showed that 35/48 (75%) clinical and environmental bacterial isolates contained multiple plasmids their size 1oooo bp, and 15/48 (31.25 %) isolates contained plasmids with molecular weight more than 10000 bp.

The leaf extracts of medical plants, *Eucalyptus incrassate, Olea eurepea*, and *Trigonella foenum-graecum* L. used as agents to cure the plasmid via adding the plant extract to the culture media or with mixing it with the plasmid DNA. Results showed that both two methods give clear effect.

College of Education for Pure Science
(Ibn Al-Haitham)
Department of Biology

Comparative Study of Plasmid Content of Lactose Ferment Enterobacteriaceae Isolated From Environmental and Clinical Samples

Submitted to the College of Education for Pure Sciences / Ibn Al-Haitham of the University of Baghdad in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Master of Science in Biology /Microbiology

By

Tuqa Abdul kareem Hameed

B.SC.in Biology/2013

Supervised By

As.Prof. Dr Israa AJ. Ibrahim.

.

2016 A.G **1437 A.H**