وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء

دراسة بكتريولوجية ووراثية لبعض انواع *Providencia* المعزولة في كربلاء

رسالــة تقدمت بها

كوكب عبدالله حسيـن السعـــدي

الى

مجلس كلية التربية في جامعة كربـلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في

علـــوم الحيـــاة/ احيـــاء مجهريـــة

1426 هـ

تشرين الثاني

2005 م

بسم الله الرحمن الرحيم

(مـــايَفْتَحِ ٱللهُ لِلنّـــاسِ مِـــنْ رَ ْحَمـــةٍ فَـــلا مُمْسِـــكَ لَهَـــا وَمَايُمْسِـك فَـلا مُرْسِـلَ لَـهُ مِـنْ بَعْدِهِ وَهُوَ ٱلْعَزِيُزْ ٱلْحَكيمُ)

صدق الله العلي العظيم

سورة فاطر (آيـــة2)

اقــرار المشرفين

نشهد بأن اعداد هذه الرسالة جرى تحت اشرافنا في كلية التربية / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات درجة الماجستير في علوم الحياة / أحياء مجهرية .

اسم المشرف : د. محمد صبري عبد الرزاق
التوقيـــع :
المرتبـة العلمية : استاذ مساعد
العنوان : جامعة بابل / كلية الطب
التـاريــخ :

اسم المشرف :د. سعد حمد عبد اللطيف
التوقيـــع :
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
العنوان : جامعة كربلاء / كلية التربية
التـاريــخ :

اقرار رئاسة قسم علوم الحياة

نشهد بأننا قد أطلعنا على مجريات اعداع هذه الرسالة وبناءاً على التوصيات المقدمة لنا نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : د.ستار جاسم حتروش

المرتبة العلمية :مدرس

التاريخ :

اقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

نشهد بأننا قد أطلعنا على مجريات اعداع هذه الرسالة وبناءاً على التوصيات المقدمة لنا نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : د.سعد حمد عبد اللطيف

المرتبة العلمية :استاذ مساعد

التاريخ :

اقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننـــا اعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على الرسالة الموسومة " دراسة بكتيرلوجية ووراثية لبعض أنواع *Providencia* المعزولة في كربــلاء " وقد ناقشنا الطالبة **كوكب عبدالله حسين السعدي** في محتوياتها ، وفيما له علاقة بهاوذلك بتأريخ 12/27 / 2005 ووجدنا بأنها جديرة بالقبول وبتقدير (أمتياز) لنيل درجة ماجستير علوم الحياة / احياء مجهرية .

رئيس لجنة المناقشة

عضو اللجنة

التوقيع :

التوقيع :

الأسم :د.سعد مرزة حسين الاعرجي الأسم :

د.ماهر علي القريشي

المرتبة العلمية :استاذ مساعد

المرتبة العلمية : مدرس

العنوان :كلية الطب/ جامعة بابل

العنوان : المعهد الطبي / الكوفة

عضو اللجنة

عضو اللجنة

التوقيع :

التوقيع :

الأسم :د.محسن عبد الجبار الموسوي الأسم :

د.محمد صبري عبدالرزاق

المرتبة العلمية :مدرس

المرتبة العلمية :استاذ مساعد

العنوان : رئاسة جامعة كربلاء

العنوان :جامعة بابل / كلية الطب

مصادقة عمادة كلية التربية

أصادق على ماجاء في قرار اللجنة اعلاه

التوقيع :

الأسم :د.حسين كاظم القطب

المرتبة العلمية :مدرس

العنوان :جامعة كربلاء/كلية التربية.

الفهرس

الخلاصة أ
المختصرات الواردة في الرسالة ب-ت
الفهرس ث-ح

الفصل الاول-المقدمة واستعراض المراجع

1-1 مقدمة عامة **1**
2-1 الوصف العام لبكتريا *Providencia* **3**
3-1 المقاومة للمضادات الحيوية **5**
1-3-1 المقاومة لمضادات مجموعة B-lactams **8**
2-3-1 المقاومة لمضادات مجموعة Aminoglycosides **10**
3-3-1 المقاومة لمضادات مجموعة Quinolones **12**
4-1 الوبائية والانتشار **14**
5-1 الامراضية وعوامل الضراوة **15**
1-5-1 المحفظة البكتيرية **19**
2-5-1 عوامل الاستيطان اوالالتصاق **20**
3-5-1 الهيمولايسين البكتيري **22**
4-5-1 إنتاج السايدروفورات **24**
6-1 المحتوى الوراثي لبكتريا *Providencia* **25**
7-1 تحييد البلازميدات **29**

الفصل الثاني-المواد وطرائق العمل

1-2 الاجهزة المختبرية والمواد **31**
1-1-2 الأجهزة المختبرية **31**
2-1-2 المواد الكيمياوية والبايولوجية **32**
3-1-2 المحاليل والأوساط الزرعية **33**
1-3-1-2 المحاليل **33**
2-3-1-2 الاوساط الزرعية المحضرة **36**
4-1-2 الكواشف **38**
2-2 طرائق العمل **39**
1-2-2 جمع العينات **39**
2-2-2 تشخيص العينات **40**
3-2-2 تأثير المضادات الحيويةعلى البكتريا **44**
1-3-2-2 اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية بطريقة الأقراص **44**
2-3-2-2 اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية على الوسط الزرعي الصلب **44**
4-2-2 التحري عن المحفظة البكتيرية باستعمال التصبيغ السالب **44**

2-2-5 التحري عن بروتينات الالتصاق باستعمال طريقة التلازن الدموي 45
2-2-6 التحري عن إنتاج الهيمولايسين البكتيري 45
2-2-7 التحري عن إنتاج السايدروفور 45
2-2-8 استخلاص الـDNA البلازميدي 46
2-2-9 الترحيل الكهربائي للـDNA البلازميدي على هلام الاكاروز 47
2-2-10 عملية تحييد البلازميدات باستخدام SDS 48

الفصل الثالث- النتائج والمناقشة

3-1 العزل والتشخيص 49
3-2 تأثير بعض المضادات الحيوية في بكتريا *Providencia* 53
3-3 عوامل الضراوة 57
3-3-1 المحفظة البكتيرية 57
3-3-2 الكشف عن التراص الدموي 57
3-3-3 التحري عن إنتاج الهيمولايسين وقابلية البكتريا على تخليق السايدروفورات 59
3-4 التحري عن وجود الدنا البلازميدي 61
3-5 تحييد البلازميدات 62

الفصل الرابع

الاستنتاجات والتوصيات 66
المصادر العربية 67
المصادر الأجنبية 68
الملاحق

المختصرات الواردة في الرسالة

DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBE	Tris-borate – EDTA
UTI	Urinary Tract Infection
AMP	Ampicillin
RA	Rifampicin
TM	Trimethoprim
CIP	Ciprofloxacin
AMX	Amoxicillin
GM	Gentamicin
PRL	Piperacillin
CN	Clindamycin
CFM	Cefotaxime
SXT	Trimethoprim+Sulfmethoxazole
MR-VP	Methyl red - Voges-proskaur
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
URE	Urease
H_2S	H_2S production
ODC	Ornithine Decarboxylase
LDC	Lysine Decarboxylase

ADH	Arginine Dihydrolase
GEL	Gelatinase
VP	Acetone production
CIT	Citrate utilization
TDA	Tryptophane deaminase
IND	Indole production
RBC	Red Blood Cell
MRHA	Mannose-Resistant Heamagglutinin
MS	Mannose-Sensitive
MR/K	Mannose-Resistant / *Klebsiella* like
MR/P	Mannose-Resistant /P
CFA	Colonization Factor Antigen
RNA	Ribonucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
شكل(1-1)	تصنيف عوامل المضادات الحيوية حسب مواقع عملها	7
شكل(3-1)	نتائج نظام التشخيص API 20 E لعزلة *Providencia*	51
شكل(3-2)	نتائج الترحيل الكهربائي لعزلة *Providencia*	61
شكل(3-3)	نتائج تحييد البلازميدات	63

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
جدول(2-1)	الاجهزة والادوات المختبرية المستخدمة في الدراسة	31
جدول(2-2)	المواد الكيمياوية والبايولوجية المستخدمة في الدراسة	32
جدول(3-1)	نوع العينات المدروسة	49
جدول(3-2)	نتائج الاختبارات المظهرية والبايوكيميائية لبكتريا *Providencia*	50
جدول(3-3)	نتائج مقاومة بكتريا *Providencia* للمضادات الحيوية	54
جدول(3-4)	مقارنة نتائج مقاومة بكتريا *Providencia* للمضادات الحيوية قبل وبعد تحييد البلازميدات	63
جدول(3-5)	تأثير SDS في تحييد البلازميدات لبكتريا *Providencia*	64

الخلاصــة

تم عزل وتشخيص عزلتان من بكتريا *Providencia* من مجموع (164) عينة مرضية تم الحصول عليها من المرضى المراجعين والراقدين في مستشفى الحسين بمدينة كربلاء ،وكانت هاتان العزلتان من بكتريا*Providencia* أحداهما من عينة ادرار والاخرى من مسحات حروق ، وقد خضعت العزلتان الى الفحوص الزرعية والبايوكيمياوية كذلك استخدم نظام التشخيص api 20E المستخدم في تشخيص البكتريا المعوية.

وقد تم دراسة تأثير بعض المضادات الحياتية في كلتا العزلتين وقد اظهرت النتائج مقاومة العزلتين لكل من المضادات الحياتية الريفامبسين والامبسلين والاموكسلين والجنتامايسين والتراي مثبرايم والببراسلين والكلندامايسين و السيفوتاكسام. في حين كانت حساسة للسبروفلوكساسين .

كذلك تمت دراسة عدد من عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا وقد اظهرت النتائج احتواء العزلتين على المحفظة التي تعد من احد اهم عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا ،ثم اظهرت النتائج امتلاك العزلتين لعوامل الالتصاق .

و اظهرت نتائج الدراسة الخاصة بقابلية العزلات على انتاج الهيمولايسين والسايدروفورات ،بأن هذه العزلات غير قادرة على انتاج الهيمولايسين البكتيري ،في حين لها القدرة على انتاج السايدروفورات .

اما عن نتائج عزل الـDNA البلازميدي فقد اظهرت النتائج امتلاك بكتريا *Providencia* اكثر من بلازميد.

ثم درس تأثير مركب SDS في تحييد المحتوى البلازميدي وقد أظهرت النتائج قابلية هذا المركب على تحييد البلازميدات بشكل تام .

الفصل الاول
المقدمة واستعراض المراجع

Introduction and Literature review

الفصـل الاول

1- المقـدمــة

1-1 مقدمـة عامـة Introduction

تعد بكتريا *Providencia* من البكتريا العصوية السالبة لصبغة كرام والعائدة للعائلة المعوية،والتي لها القدرة على النمو في الاوساط الاعتيادية ، وقد صنفت هذه البكتريا الى خمسة انواع باستخدام طرائق التهجين الجزيئي وطرائق التنميط المظهري وهي :

P.stuarti ، *P.rettegeri* ، *P.rustiganii* ، *P.alcalfaciens* و *P.heimbachae*

وتوجد الانواع *P. stuarti , P. rettegeri* عادة في مصادر المياه المختلفة فيما عزلت الانواع *P.rettegeri* من عدد من الحيوانات والمتضمنة الطيور الداجنة والزواحف .

تسبب بكتريا الـ*Providencia* أصابات مختلفة في الانسان وقد ازداد مدى الاصابة بهذه البكتريا خلال السنوات الاخيرة.فقد تم عزلها من الانسان من عينات الادراروالخروج والدم ومسحات البلعوم والابط والجروح (Lautenbach,2002) .

وكان النوع *P. stuarti* هو الاكثر شيوعاً في اصابات الانسان، فهو شائع اكثر لدى المرضى ذوي الاستخدام طويل الامد للقثطرة catheter (Akabs *et al.*,1998). اما النوع *P. alcalfaciens* فهومن المسببات التي تلعب دوراً في احداث اصابات معوية في الانسان (Collier *et al.*,1998).

تشترك الانواع *P.rettegeri , P. stuarti* بأحداث أصابات للأشخاص المستخدمين للقثطرة ويكون المرضى الذين أجريت لهم عمليات جراحية في الجهاز البولي هم الأكثر عرضة لخطر الإصابة بهذه البكتريا .ويشترك هذان النوعان في إصابات الجهاز التنفسي وحالات الحروق (Lautenbach,2002).

تمتلك بكتريا *Providencia* عوامل ضراوة مهمة منها المحفظة البكتيرية وإنتاجها السموم الداخلية وكذلك بروتينات الالتصاق وإنتاجها للسايدروفورات .إضافة لمقاومتها للعديد من المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال وخصوصاً في ردهات المستشفيات .

اظهرت بعض الدراسات قابلية بكتريا *Providencia* على مقاومتها لواحد او اكثر من المضادات الحيوية(Rollins and Joseph,2000) والذي قد يرجع ذلك الى احتوائها على عناصر وراثية مختلفة كالبلازميدات والعناصر القافزة .

اهداف الدراسة :-

1- عزل بكتريا الـ*Providencia* من بعض الحالات المرضية وتشخيصها .
2- دراسة لبعض عوامل الضراوة فيها كالمحفظة البكتيرية والسايدروفورات والتراص الدموي .
3- دراسة حساسية هذه البكتريا تجاه مجموعة مختلفة من المضادات الحيوية للتعرف على افضل مضاد يمكن اعتماده في المعالجة .
4-الكشف عن المحتوى البلازميدي لهذه البكتريا للتأكد من عدد البلازميدات التي قد تحتويها السلالة.
5-اجراء عملية التحييد للبلازميدات للكشف عن علاقتها بالمقاومة للمضادات الحيوية.

2-1 الوصف العام لبكتريا الـ*Providencia*

تعد بكتريا الـ*Providencia* من البكتريا العصوية السالبة لصبغة كرام وتقع ضمن مجموعة Proteae التي تضم الاجناس (*Providencia*،*Proteus* ، و *Morganella*)،والعائدة للعائلة المعوية وغير مخمرة لسكر اللاكتوز ولاهوائية اختيارا ومتحركة بواسطة مجموعة من الاسواط الجانبية وسالبة لانزيم الاوكسديز وايجابية لانزيم الكاتليز وتنمو على اوساط زرعية بسيطة وتحوي محفظة بكتيرية تحيط بها ،كما انها تختزل النترات الى نتريت (RollinsandJoseph ,2000) .

يعد فحص ازالة مجموعة الامين من اللايسين والتربتوفان او الفينل الانيـــن هو الفحص الاكثر اهمية في تشخيص الاجناس الثلاثة من Proteae ، اذ يعتمد على فحص ازالة مجموعة الامين من التربتوفان والذي يميز هذه االاجناس الثلاثة عن بقية اجناس العائلة المعوية (Martin *et al*.,1995) ، ومن خلال الاعتماد على بعض الفحوصات البايوكيمياوية يمكن التفريق بينها اذ ان فحص انتاج كبريتيد الهيدروجين (H_2S) يفرق بين جنس *Proteus* الموجب لهذا الفحص من جنسي *Providencia* و*Morganella* السالبتين لهذا الفحص . وبالاعتماد على فحص استهلاك السترات نميز بين جنس *Morganella* السالب لهذا الفحص عن جنس *Providencia* الموجب (باستثناء النوع *P.heimbachae* والذي نميزه من الجنس *Morganella* من خلال فحص انتاج انزيم اليوريز الموجب في *Morganella* وسالب في *P.heimbachae*) . (O'Hara *et al*.,2000)

تمتاز مستعمرات بكتريا *Providencia* النامية على وسط الماكونكي الصلب بكونها مستعمرات شاحبة اللون بسبب عدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوزالموجود ضمن مكونات الوسط ، وتتميز كذلك برائحة خاصة تشبه رائحة الفاكهة، اما عند تنميتها على وسط الدم الصلب فأنها لاتكون ظاهرة العج (swarm) ،كذلك تمتاز ايضاً بكونها موجبة لفحص الاندول والمثيل الاحمرولكنها سالبة للفوكس-بروسكور وانتاج الجيلاتينيز واللاييز(Collier *et al*., 1998).

وتنقسم بكتريا الـ*Providencia* اعتماداً على التنميط المظهري ودراسات تهجين الـDNA الى :

P.stuarti-1

يعد هذا النوع اكثر الانواع اهمية من الناحية الطبية لتسببه في الاصابات المتأتية من عدوى المستشفيات وقابليته على مقاومةالعديد من المضادات الحيوية. اذ يعزل عادةً من اصابات الجهاز البولي للاشخاص المستخدمين للقثطرة البولية (Akbas *et al.*,1998)، بسبب احتوائه على الاهداب التي تمكنه من الالتصاق بالقثطرة البولية .(Mobley,1988) كذلك يعزل من اصابات الجهاز التنفسي وحالات الحروق (Lautenbach,2002).ويتميز بأنتاجه حامض من تخمر سكري الكالكتوز والتريهالوز (Hickman-Brenner *et al.*,1983) .بينما ليس له القابلية على تخمر سكر الارابيتول وسكر الادينتول وسكر المانيتول. وتنتج بعض سلالات هذا النوع انزيم اليوريز .(Farmer *et al.*,1977) .

P.rettgeri -2

عزلت سلالات هذا النوع في عام (1904) من لدن Rettger وان اهم مصادر عزلها هي الحيوانات والطيور الداجنة ،كذلك هي تشترك مع النوع الاول في عزلها من اصابات الجهاز البولي للاشخاص المستخدمين للقثطرة البولية ،واصابات الجهاز التنفسي وحالات الحروق(Lautenbach,2002) .ويتميز هذا النوع بقابليته على تحلل اليوريا من خلال انتاجه لانزيم اليوريز ، وانتاجه حامض من خلال تخمره لسكريات الارابيتول والادينتول والمانيتول ولكنه لايستطيع تخمر التريهالوز(Farmer *et al.*,1977) .

P.rustigianii-3

وصف هذا النوع من لدن (Hickman-Brenner *et al.*) عام 1983 ، وان مصادرعزل هذا النوع هي البطاريق ،والخنازير كما عزلت من فضلات الانسان .ويتميزهذا النوع بانتاجه حامض من خلال تخمرسكر الكالكتوز بينما لايخمر سكر التريهالوز ويمكن تميزه عن النوع *P.rettgeri* من خلال فحص اليوريز اذ انه لاينتج هذا الانزيم كما انه لايخمرسكرالارابيتول (Hickman-Brenner *et al*.,1983) .

4-*P.alcalifaciens*

عزل هذا النوع من حالات اسهال لاصابات معوية للانسان، ويتميز هذا النوع بعدم قدرته على انتاج حامض من خلال تخميره السكريات الكالكتوزوالتريهالوز بينما ينتج الحامض من خلال تخميره سكر الادينتول(Hickman-Brenner *et al*.,1983) .

5-*P.heimbachae*

مصادر عزل هذا النوع هو فضلات طائر البطريق والاجنه المجهضه لبعض الحيوانات (Lautenbach,2002).وقد قام Muller *et al*. (1986) بوصفه نوعاً جديداً ، وهويختلف عن الانواع الاخرى بكونه غير قادر على انتاج الاندول واستهلاك السترات كما انه لاينمو بوجود KCN ويخمر سكرالكالكتوز وكذلك سكر الرامينوز ولكن لايخمرسكر الكلوكوز (Collier *et al*.,1998).

3-1 المقاومة للمضادات الحيوية

إن لاكتشاف المضادات الحيوية (Antibiotics) أهميه كبيره في الحد من الاصابه بالبكتريا المختلفه ، ولكن بمرور الزمن أظهرت السلالات الجديده مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية المعروفه .ويمكن تقسيم مقاومة الاحياء المجهرية للمضادات الحيوية الى :-

I - مقاومة طبيعية وتشمل :-

1 - تحوير موقع الهدف بالنسبة للمضاد .

2 - تغيير نفاذية الخلية البكتيرية للمضاد .

3 - انتاج انزيمات مثبطة للمضاد مثل (B- lactamase) .

II - مقاومة مكتسبة و تحصل عن طريق عمليتين وراثيتين في البكتريا وهي :-

1 - الطفرة والانتخاب Mutation and selection:- تشيع الطفرات الذاتية في كروموسومات البكتريا المقاومة في افراد من المجتمعات البكتيرية وبالانتخاب الطبيعي الحاصل في البيئة فإن الخلية البكتيرية الاصلية(الطراز البري Wild type) تقتل وتتضاعف الطفرة المقاومة .

2 - انتقال الجينات Gene transfer

يؤدي انتقال الجينات الى نقل المقاومة الى كائنات اخرى . ويشفر عادة للمقاومة بواسطة عوامل خارج كروموسومية R facters (بلازميدات) .

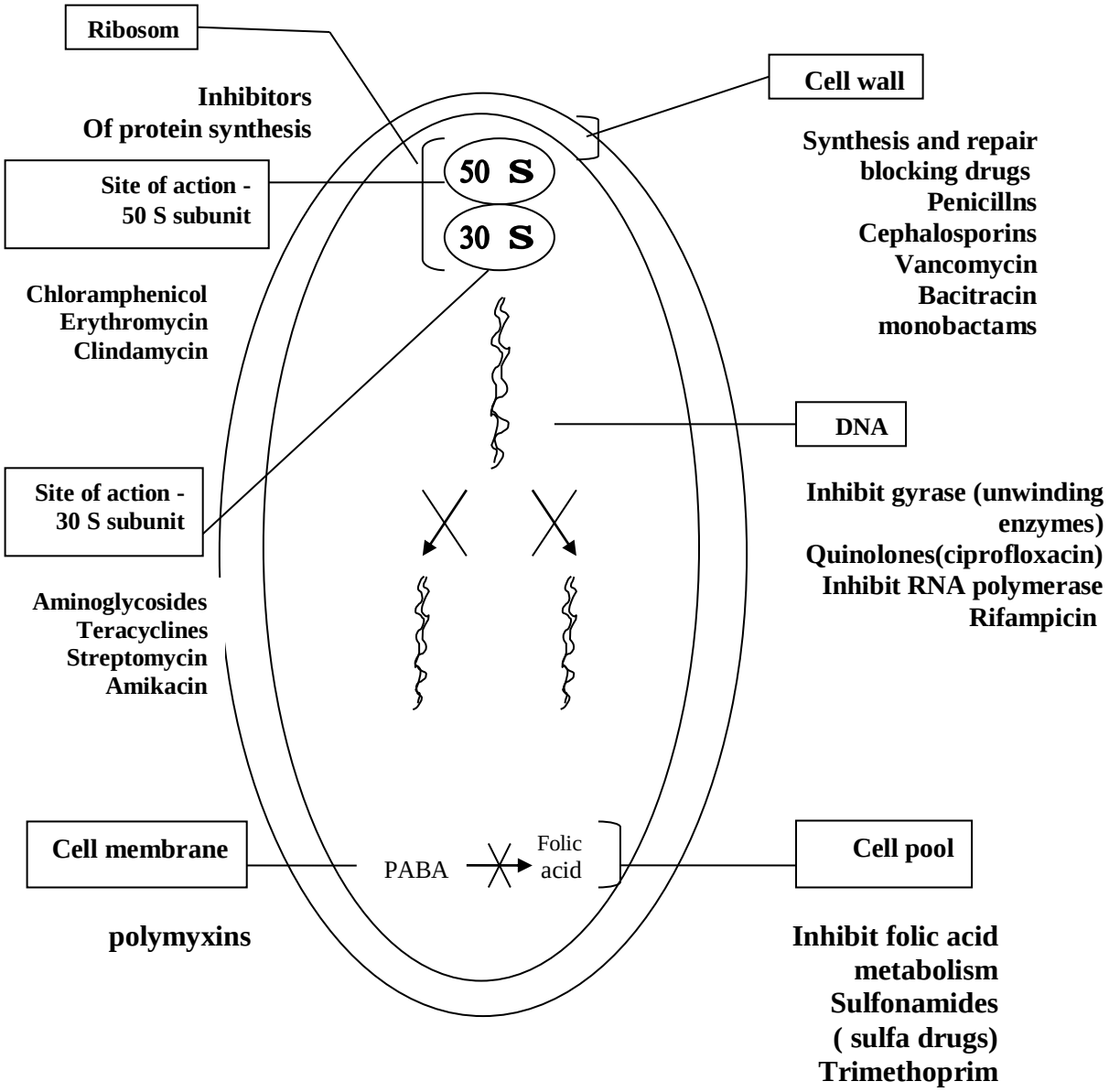
وتنتقل جينات المقاومة من خلية الى اخرى بواسطة عمليات الاستقطاع (Transduction) والتحول (Transformation) أو الاقتران (Conjugation) .

ان أحد المشاكل الرئيسة المترافقة مع الإستعمال الواسع للمضادات الحيوية هو نشوء سلالات بكتيرية مقاومة لهذه المضادات وهذا هو أحد الأمثلة على الفعاليات غير المنتهية في الطبيعة والتي تطور فيها الأحياء قدرتها على تحمل ظروف بيئية جديدة (Pelczar and Chan ,1981) .وان تأثير المضادات الحيوية على البكتريا اما ان يكون :-

- Static :- عوامل مثبطة لنمو البكتريا وليست قاتلة مثالها مثبطات عملية التخليق الحيوي للبروتين (Chloramphenicol).
- Cidal :- عوامل قاتلة مثل مثبطات تصنيع جدار الخلية (Penicillin)

تصنيف عوامل المضادات الحيوية حسب مواقع عملها
Classification of Antimicrobial agents by their sites of action

.....



شكل (1-1) تصنيف عوامل المضادات الحيوية حسب مواقع عملها

1-3-1 المقاومة لمضادات مجموعة B-lactams

تعد مجموعةB-lactams من المضادات الحيوية الاكثر اهمية من بين المجاميع الدوائية المضادة للبكتريا واكثرها استعمالاً.وتكمن فعالية هذه المجموعة من المضادات الحيوية من خلال منع تصنيع جدار الخلية التي بدورها تؤثر في نمو البكتريا. (Katzung,1989) .وتشمل مجموعةB-lactams :

-Penicillins

-1est,2nds,3rd and 4th generation of Cephalosporins

-Carbapenems

-Monopactams

تستطيع سلالات بكتريا *Providencia* انتاج انزيماتB-lactams التي تعمل على تحليل المركبات الاوليه من البنسلينات والسيفالوسبورينات ذات المدى الواسع (O'Hara *et al.*,2000). اذ تقاوم *P.rettgeri* السيفالوسبورينات ذات المدى الواسع من خلال امتلاكها لانزيم PER-1.(Bahar *et al.*,2004).

كذلك تنتج بكتريا *P. stuarti* انزيماً جديداً مشتقاً من مجموعةTEM ويسمى TEM-60 (Franceschini *et al.*,1998).

بينما ينتج النوع *P.rettgeri* والمعزل من اصابات الجهاز التنفسي انزيم TEM-24 المشفر له بواسطة بلازميد اقتراني وزنه الجزيئي(180 kp) (Marchandin *et al.*,1999) .

واثبتت الدراسات ان هناك فعالية عالية للسيفالوسبورينات ذات المدى الواسع ضد عزلات *Providencia* مقارنة مع مضادات B-lactams القديمة ، أو مع العقارات الأخرى المستعملة بكثرة في الوصفات الطبية والمسماة Fluoro Quinolones (سبروفلاكسوسين) (Cornaglla *et al.*,1995) .

بينما نسب Jones (1998) زيادة مشكلة العلاجات الطبية الى ازدياد مقاومة البكتريا للجيل الثالث من السيفالوسبورينات التي تحدثها انزيمات B-lactams ،وذكر

بأن مدى واسع من بكتريا العائلة المعوية وبضمنها *Providencia* تنتج انزيم AmpC كما اكد حقيقة وقوع الجين المشفر لهذا الانزيم على البلازميدات التي لها القابلية للانتقال من نوع الى اخر .

وقد اشار Kolar *et al.* (1999) الى تطور مقاومة بكتريا*P.rettgeri* للجيل الثالث من السيفالوسبورينات (cefoperazone) اذ ازدادت النسبة من (26.2%) في عام 1995 الى (53.2%) في عام 1997 .

كذلك اكدUrbaskova and Schindler (1994) في دراسة اجريت في جمهورية الجيك اعتماد مقاومة العصيات السالبة لصبغة كرام لمضادات الجيل الثالث من السيفالوسبورينات على نوع البكتريا وكانت المقاومة اعلى في البكتريا المسببة لعدوى المستشفيات ومن ضمنها *P. rettegeri*.

وأشار Levett *et al.* (1993) الى انتشار مقاومة البكتريا السالبة المعزولة والمشخصة من حالات الحروق والقرح للجيل الثالث من السيفالوسبورينات وحصل من خلال دراسته هذه على عزله *P.stuarti* من بين 7 عزلات بكتيرية كانت جميعها منتجه لإنزيمات B-lactams.

بينما أوضح Knothe and Shah (1992)حساسية بكتريا *Providencia* تجاه Cefodizime.واشار كذلك الى تشابه Cefodizime مع بقية سيفالوسبورينات الجيل الثالث بعدم تأثرها بأنزيمات B-lactams التي تنتجها البلازميدات لكنها تتحلل بالانزيمات المنتجه كروموسومياً.

وقد ذكر Iakovlev *et al.* (1994) فعالية Cefoperazon في حالات الحروق والجروح المتقيحه للانسجه الرخوة وبمختلف المواقع .اذ بلغت فعاليته في هذه الدراسة(75- 86.6%) وبالأحرى فقد اظهر فعالية عالية ضد سلالات بكتريا *Providencia* المعزولة من حالات مختلفة من الادرار ، والدم ، والقشع.

وكذلك اشار Suzuki *et al.* (1996) الى مقاومة بكتريا *Providencia* للـCefodizime.

1-3-2 المقاومة لمضادات مجموعة Aminoglycosides

تكمن فعالية المضادات الحيوية من مجموعة Aminoglycoside في ايقاف تصنيع البروتين من خلال ارتباطها بالرايبوسومات وايقاف تضاعف الخلية البكتيرية (Anderson *et al.*,1967) . وتستخدم هذه المضادات بشكل واسع في علاج البكتريا السالبة لصبغة كرام .وتشمل مجموعة Aminoglycosides

-Amikacin

-Gentamicin

-Neomycin

-Nefilmicin

-Streptomycin

-Tobramycin

ان المقاومة التي تبديها البكتريا لهذا النوع من المضادات الحياتية تكون من خلال عدة اليات هي :

1- اختزال في معدل امتصاص (uptake) المضاد الحياتي للبكتريا الداقل نسبة ممكنة.

2- تغير موقع الهدف الرايبوسومي . Alteration of the ribosome.

3- انتاج انزيمات تقوم بتحوير المضادAminoglycoside-modifying enzymes (Shaw.et.al.,1993 ; Foster *et.al.*,1983)

تكون الاليتان الاولى والثانية قليلة نسبياً كما انها تعطي مستوىً واطئاً من المقاومة اما الالية الثالثة وهي انتاج انزيمات محورة للكلايكوسيدات الامينية فانها اكثرها اهمية وتعطي مستواً عالٍ من المقاومة (Shaw *et al.*,1993) .

تمتلك سلالات *Providencia* مقاومة نسبيه لكل من المضادات الحياتيه من نوع Aminoglycoside .(Hyams *et al.*,1974).اذ تمتاز بكتريا *Providencia* بقدرتها على مقاومة المضادات الحياتية من مجموعة Aminoglycoside وذلك بأنتاجها انزيمات محورة للمضاد الحيوي .

وتقع الجينات المسؤولة عن اظهار صفة المقاومة لهذه المضادات على البلازميدات او الجينات القافزة (Shaw *et.al.*,1993) .وهذا ماساعد على الانتشار السريع لمقاومة Aminoglycoside مابين الانواع المختلفة من البكتريا . وتوجد هناك انزيمات محورة للـ Aminoglycoside (N-acetyltransferases) التي يشفر لها بواسطة جينات محمولة على الكروموسومات في بكتريا *Providencia*.والتي لاترتبط بالعوامل المتنقلة (Rather *et al.*,1993) .

فقد بين Macinga and Rather (1999) مقاومة Aminoglycoside بواسطة الانزيم الناقل للاسيتايل acetyltransferase الكروموسومي في بعض انواع هذه البكتريا وقد تم وصف الجين المشفر لهذا الأنزيم في *P. stuarti* بشيء من التفصيل اذ لوحظ انه يمتلك وظيفة واحدة على الأقل فبالإضافة إلى انه يعمل على نقل الاسيتايل الى Aminoglycoside فهو أيضاً ينقل مجموعة الاسيتايل إلى الببتيدوكلايكون ، ويشابه هذا التحوير تأثير النظام الحال في *P.stuarti*.

كذلك لوحظ احتواء بكتريا *Providencia* علىانزيم aminoglycosid 3-o-phosphotransferase الذي يحفز تحوير مجموعة الهيدروكسيل الموجودة ضمن تركيب جزيئة Aminoglycoside و يشفر له بواسطة جين واقع على بلازميد قافزوتقاوم من خلاله البكتريا المضاد الحيوي الاميكاسين.(Lambert *et.al.*,1994).

كذلك ذكر Clarke *et al.* (1996) انتشار الجين المشفر لانزيم gentamicin 2- _N acetyltransferas في بكتريا *P. stuarti* من بين أنواع Proteae. والذي يعتقد بحسب هذه الدراسة اشتراكه بعملية تحوير البيبتدوكلايكون

بنقل مجموعة الاسيتايل اليها(o-acetylation of peptidoglycon) والتي تظهر مظهراً عاماً لانتاج بكتريا*Providencia* لهذا النوع من البيبتيدوكلايكون المحور .

ومن الجدير بالذكر ان اليات مقاومة بكتريا*Providencia* للكلايكوسيدات الامينية هي اكثر تعقيداً اذا ماقورنت بباقي العائلة المعوية (Miller *et al*.,1997).

ازدادت عدد السلالات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية من نوع Aminoglycoside مؤخراً نتيجة الاستخدام المتكررلها في المستشفيات(Hyams *et al*.,1974) .

3-3-1 المقاومة لمضادات مجموعة Quinolones

تعد Quinolones مواد كيميائية استخلصت اول مرة من الاشجار اذ وجد ان لها مفعولاً قاتلاًللجراثيم (Bactericidal) عند استخدامها بتراكيز معينة ،واول مركب اكتشف من هذه المجموعة هو حامض النالديكسيك Naldixic acid ،وكذلك لوحظ انه عند اضافة ذرة فلور لهذه المضادات ستكون Fluorinated quinolones التي تكون فعاليتها اكثر من فعالية Quinolones (Katzung,1989).

تعمل هذه المجموعة على تثبيط تخليق الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA ، وتمتازبفعاليتها ضد العديد من البكتريا السالبة لصبغة كرام (Skelton,1999) . وتشمل مجموعة Quinolones :

I-Fluoro Quinolones

-Ciprofloxacin

-Enoxacin

-Lomefloxacin

-Norfloxacin

-Ofloxacin

-Trovafloxacin

II- Quinolones

- Nalidixic acid

اذ اشار Waites *et al.* (1994) الى ان مقاومة Quinolones تكون متفاوتة عند معظم البكتريا السالبة وقد اظهرت *Providencia* , *Pseudomona*, *Xanthomonas* , *Acinetobacter* نسبة عالية من المقاومة ازاء هذه المضادات .

وقد ازداد معدل انتشار المقاومة لمضادات Fluoro Quinolones في اوربا نتيجة الاستخدام المتكرر والعشوائي ، فقد اشار Kresken *et al.* (1994) الى ان بكتريا *Providencia* تظهر تبايناً في مقاومتها لهذا النوع من المضادات بنسبة اكثر من (26.7%).

وقداجرى Yee *et al.* (1992) اختبارتأثير السبروفلوكساسين على سلالات من بكتريا *P.stuarti* ولوحظ ان هناك مقاومة عالية لهذه السلالات ازاء المضاد ووجد ان جين المقاومة يحمل موقعاً للقطع بواسطة الانزيم EcoRI والذي لم يكن موجوداً في السلالات الحساسة لهذا المضاد .

ذكر Martinez-Martinez *et al.* (1993) في دراسته التي اجريت لتحديد انتشار السلالات المقاومة للسبروفلاكسوسين لانواع عصوية سالبة بأن بكتريا *Providencia* كانت الاعلى من بين الانواع المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين .

بين Chin and Neu (1994) في دراستهما لفعالية نوع جديد من Fluoro Quinolones ضدعزلات العائلة المعوية ومنها عزلات *P. stuarti*،*P. rettegeri*.

واشار Thabaut *et al.* (1994) في الدراسة التي اجريت في فرنسا عام 1991 حول تأثير المضادات Pefloxacin، Ofloxacin ، Ciprofloxacin على بعض انواع العائلة المعوية الى ان العائلة المعوية لها مقاومة قوية تجاه Pefloxacin مع وجود اختلافات بين الانواع المختلفة اذ تبلغ نسبة الاختلافات لانواع *Providencia*(%61) .

اضافة لذلك فقد اوضح Yamane *et al.* (1994) قدرة levofloxacin على التأثير العالي ازاء الإصابات البكترية الناجمة عن العائلة المعوية وبضمنها *P.stuartii* و*P.rettgeri* علماً ان فعالية هذا المضاد اكبر اذا ماقورنت بالـ ciprofloxacin .

4-1 الوبائية والانتشار Epidemiology

تعد بكتريا الـ *Providencia* من الممرضات الانتهازية للانسان وللحيوان على حد سواء (Pignato *et al.*,1999) والتي تسبب اصابات مباشرة اوثانوية ،وتكون امراض الجهاز البولي هي اكثر الاصابات الملاحظة انتشاراً. وتعتمد العدوى المكتسبة لهذه البكتريا بالنسبة للمرضى الراقدين في المستشفيات بدرجة كبيرة على طول مدة البقاء في المستشفى قبل الاصابة بهذه البكتريا والمضادات المستخدمة في العلاج واجراء العمليات (Vatapolous ,1996) .

فأنواع الـ*Providencia* وخصوصاً *P.stuarti* واحدة من المسببات الشائعة لاصابات الجهاز البولي المكتسبة من عدوى المستشفيات لدى المرضى المستخدمين للقثطرة البولية ولمدد طويلة .(Damron *et al.*,1986) .

فقد بينت دراسة Mobley *et al* (1988) بأن *P.stuarti* مسبب هام لاصابات الجهاز البولي الناتجة عن عدوى المستشفيات . وهذا ماذكره Hollick *et al* (1984) اذ اوضح احتمالية ان يكون سبب زيادة عزلات بكتريا الـ *Providencia*.في مزارع الادرار المفحوصة هو حالة اصابات ناتجة عن هذه البكتريا اذ كانت النسبة كبيرة بين الاشخاص المستخدمين للقثطرة البولية .

وتتميزسلالات بكتريا *P.stuarti* المتوطنة في المستشفيات بأنها ممكن ان تعاني من تغايرات في قابليتها على انتاج اليوريز (Penner *et al.*,1976) .

اذ اشار Hyams *et al.* (1974) الى ان وبائية بكتريا الـ *Providencia* تبرز في عدوى المستشفيات وخصوصاً في وحدات الحروق .اذ تستوطن هذه البكتريا في الجروح الناتجة عن الحروق (Rollins and Joseph,2000) .كما اشار الى الملاحظة نفسها Lautenbach(2002) الذي اكد ان الحروق هي اكثر المناطق عرضة للاصابة بهذه البكتريا .

وتعد بكتريا الـ*Providencia* من البكتريا المتوطنة في وحدات العناية المركزة لحالات الحروق والتي تتميز بعدم وجود حواجز بين اسرة المرضى مقارنة بالوحدات المفصولة بحواجز والتي يختزل فيها مستوى الاصابة بهذه البكتريا . (Shirani *et al.*,1986).

5-1 الامراضية وعوامل الضراوة

تسبب بكتريا الـ*Providencia* اصابات في مختلف مناطق الجسم ،فبالرغم من انها غير شائعة نسبياً فقد ازداد معدل الاصابة بها خلال السنوات الاخيرة وخصوصاً لدى المرضى الراقدين لمدد غير قصيرة في المستشفيات (Lautenbach,2002).اذ وصفت وبائيتها الحديثة في عدوى المستشفيات وخصوصاً في وحدات الحروق (Hyams *et.al.*,1974) .وهي تعد من الممرضات الانتهازية لكل من البشر والحيوانات (Pignato *et al.*,1999).

فبالرغم من ان انواع الـ *Providencia* تعد من ممرضات الجهاز البولي القليلة نسبياً في المرضى الذين يعانون من اصابات الجهاز البولي والمرضى غير المستخدمين للقثطرة البولية فهي تملك انتشاراً بين المرضى المستخدمين للقثطرة البولية حيث يحدث استيطان *Providencia* بعد الاستخدام الطويل (اكثر من ثلاثين يوماً) للقثطرة البولية في الجهاز البولي .والمسبب الاكثر شيوعاًمن بين انواعها في

اصابات الجهاز البولي المتأتية عن عدوى المستشفيات هو النوع *P.stuarti* (Akbas *et al*.,1998).

فقد ذكر Yasuoka *et al*. (1992) في تحليل اصابات الجهاز البولي (UTI) لدى مرضى كبار السن (معدل اعمارهم 76.9+/-12.1) الراقدين في احدى المستشفيات اليابانية بأن من مجموع (1897) مريض كان(121) منهم يعاني من اصابات الجهاز البولي أي بنسبة (6.4%) وقد حددت نسبة الاصابات البكتيرية بـ (88.7%)، وكانت نسبة الاصابة ببكتريا *Providencia* (12.8%) وهي ثاني اعلى مسبب بكتيري .

اوضح Matsuo *et al*. (1993) بأن بكتريا *p. stuarti* تسبب متلازمة اكياس الادرار الارجواني وهي تحول لون الادرارفي كيس القثطرة البولية الى اللون الارجواني او الازرق والذي يتبع استخدام القثطرة كما سجلت ثلاث حالات لنساء بعمر فوق 73 عاماً طريحات الفراش وتم التوصل الى اشتراك بكتريا *E. coli* و*M. morgani* بالاضافة الى *P. stuarti* بحدوث هذه الحالات .

كذلك فقد اشار Dealler *et al*. (1988) الى عزل بكتريا *P stuarti* من حالات الادرار الارجواني، فمن مجموع ست حالات تم عزل *P. stuarti* من خمس حالات منها بينما عُزلت بكتريا الكلبسيلا الرئوية من الحالة السادسة.ووجد ان هذا اللون هو مزيج من مادة (indirubin) الذائبة في الكيس البلاستيكي وصبغة النيلة (indigo) الموجودة على سطح الكيس .واللتين تنتجان من تحلل مادة كبريتات الاندوكسيل (indoxyl sulfate) المتواجدة في ادرار المرضى بفعل انزيم (indoxyl phosphatase) الذي تنتجه السلالات البكترية المسببة لهذه المتلازمة اذ يملك هذا الانزيم فعالية انزيمية مشابه للانزيم (indoxyle sulfatase). وغالباً ما يساعد وجود المستوى العالي من مادة كبريتات الاندوكسيل لدى هؤلاء المرضى واستيطان بكتريا *P. stuarti* في الجهاز البولي لهم على حدوث هذه الحالة.

كذلك اوضح Fain-Ghironi *et al.* (2003) تسجيل حالات الإصابة بهذه المتلازمة لنساء بعمر 85 عاماً بعد استخدام القثطرة البولية لمدد طويلة وكانت العزلات لبكتريا *Providencia* و*Citrobacter koseri* .

كما عزل Akbas *et al.* (1998) 40 عزلة *Providencia* من مجموع 331عينة ادرار (12.1%) وهي تمثل خامس اعلى تكرار بين عوامل اصابة الجهاز البولي للمرضى المستخدمين للقثطرة البولية والتي عزلت خلال مدة ثمانية اشهر في احد المراكزالطبية في تركيا .

كذلك اشار Terai *et al.* (1994) في دراسة اجريت في اليابان الى انه بالرغم من تحديد بكتريا الـ*Providencia* ، *Proteus* بوصفها كائنات مسببه في بعض اصابات الحصى ،الا انه في هذه الدراسة لم تحدد العلاقة بين الاصابات البكتيرية للجهاز البولي وتكوين الحصى .

عزل Rahav *et al.* (1994) بكتريا *P.stuarti* من عينات الادرار المأخوذه من19 حالة لمرضى كبار السن من مستخدمي القثطرة البولية، اذ ظهرت هذه البكتريا بنسبة(74%) لدى هؤلاء المرضى فقد كانت هي البكتريا الاكثر شيوعاً خلال مدة الدراسة التي استمرت 18 شهر .كما اشارالى ان بقاء هذه البكتريا كان معنوياً في الاناث اكثرمنه في الذكور .اذ غالباً ماتكون اصابات الجهاز البولي في الاناث وبمختلف الاعمار اكثر من الذكور ومن اسبابها قصر طول المجرى البولي واتساعه لدى الاناث الذي يمكن الممرضات البولية من الوصول الاسرع الى المثانة،كذلك يوفر مكاناً لحضانة البكتريا .(Anderson,1980) .

حدد Vatapolous *et al.* (1996) مجموعة الـ*Proteus* التي تضم انواع *Proteus* وانواع *Providencia* كواحدة من المجاميع البكتيرية المسببه لعدوى المستشفيات في اثينا خلال شهر تشرين الثاني من عام 1992 ،مما يشير الى ان هذه البكتريا واحدة من اهم مسببات عدوى المستشفيات .

وقد قام Stickler *et al.* (1998) باستخدام نموذج من القثطرةالبولية لاختبار قابلية البكتريا المنتجه لليوريز المتواجدة في الجهاز البولي على تغطية قثطرة المجاري البولية واشار الى قدرة بكتريا *P. rettegeri* التي تولد ادرار قاعدي pH (8.3-8.6) على تغطية القثطرة وبقوة خلال مدة 24 ساعة .

كما اشار Orrett (1999) الى عزل 3 عزلات (4%) من *P. rettegeri* من مجموع 74 عزلة بكتيرية سببت اصابات في الجهاز البولي .

اضافة الى ذلك تشترك بكتريا *Providencia* spp في اصابات الجهاز البولي لدى الاشخاص الذين يعانون من ضرر في النخاع الشوكي فقد اشار Biering-Sorensen *et al.* (2001) الى انه بالرغم من انخفاض الوفيات المتسببة عن تعقيدات الجهاز البولي بالنسبة لهؤلاء الاشخاص الا ان اصابات الجهاز البولي تبقى مسبباً مهماً للاعتلال في هذه الجماعات ومما لاشك فيه ازدياد خطر الاصابه في الافراد المستخدمين للقثطرة البولية ، وهذا يتفق مع ماذكره Akbas *et al.* (1998) من ازدياد خطر الاصابه بأنواع الـ*Providencia* لمرضى النخاع الشوكي المعانين من اضطرابات لامراض بولية.

كذلك تم عزل *P.stuarti* من اصابات الحروق اذ اشار Arslan *et al.* (1999) في دراسة اجريت في تركيا الى عزل *P.stuarti* بنسبة (10.22%) ومثلت ثالث اعلى مسبب ،في حين مثلت *P. rettegeri* (1%) من تلك الاصابات.

فضلاً عن ذلك فقد تم عزل بكتريا *Providencia*من حالات اسهال اذ استطاع Jagielski *et al.* (1992) من عزل بكتريا *P. rettegeri* من حالات الاسهال عند الاطفال .

كذلك فقد اشار Guth and Perrella (1996) الى عزل سلالات *P.alcalficiens*من حالات اسهال في منطقة في البرازيل .واشار Albert *et al.* (1998) الى عزل 17 عزله لبكتريا *P.alcalficiens*.من مجموع (814) عينه

غائط لحالات اسهال لدى اطفال دون الخامسه من العمر أي بنسبة (2.6%)، ويشير هذا الى ارتباط هذه الكائنات معنوياً بحالات الاسهال كما وبينت الدراسه نفسها الى ان(71%) من حالات اسهال الاطفال المتسببه عن *p. alcalfaciens* تكون مصاحبه لاصابات ببكتريا مرضية معوية اخرى .

بحث Murata *et al.* (2001) عن اسباب حدوث حالات عديدة من اصابات الامعاء في اليابان وقد اثبتت نتائج البحث ان (7) حالات من مجموع (18) حالة كانت بسبب بكتريا *P. alcalfaciens* .

وقد سجل Mohr-O ،Hara *et al.* (1999) اول حالة عزل لبكتريا *P. heimbachae* من عينات بشريه تم عزلها من عينة غائط لاحدى النساءالمصابات بالاسهال على الرغم من ان عزل هذه البكتريا كان محصوراً على عينات غائط البطاريق والاجنة المجهضة لبعض الحيوانات.

كذلك تشترك *Providencia* في حالات تجرثم الدم اذ اشار Pearson and Lee (2004) الى تسجيل (83) حالة تجرثم للدم في عام (2003) في كل من انكلترا وايرلندا الشماليه ووالاس سببتها بكتريا *Providencia* ويعود معظمها للنوع *.P.stuarti*

1-5-1 المحفظه البكتيريه Bacterial capsule

تعرف المحفظه البكتيريه على انها الغلاف الخارجي الذي يحيط بالخليه الجرثوميه وهي عبارة عن مركب من متعدد السكريد الذي يبرز كأهم مستضد سطحي surface antigen ،وعلى اساس تركيبه يمكن تصنيف البكتريا الى انواع مصليه مختلفه (Whitfield *et al.*,1999)

وتمتاز بكتريا الـ*Providencia* باحتوائها على محفظة تعد من اهم عوامل الضراوه فيها ،اذ ان للمحفظة علاقة باحداث الاصابات المختلفة . فقد اشار Cryze (1984) الى دور المحفظه في اصابات الحروق والجروح وان الشدة المرضية

تزداد مع زيادة انتاج متعدد السكريد المحفظي، ممايشير الى وجود علاقة بين حجم المحفظة وقابلية البكتريا على احداث الاصابه في الجلد المتضرر .

وقد اظهرت دراسات المجهر الالكتروني ان للمحفظة امتداد من متعدد السكريد يحيط بخلية البكتريا وله دور في التقاط الغذاء والتصاق البكتريا ومقاومة عوامل المضيف الدفاعية (Robbins *et al.*,1980) .

تحتوي الـ*Providencia* على المستضد المحفظيK-antigenالذي يرتبط وجوده بوجود المحفظة (Rollins and Joseph,2000).

2-5-1عوامل الاستيطان أوالالتصاق Adhesion or Colonization factors

تتطلب عملية استيطان البكتريا للانسجه المخاطيه امتلاك هذه البكتريا قابليه للالتصاق بهذه الانسجه ،وان وجود الاهداب pili او مايطلق عليه fimbriae يعد من العوامل الاساس لعملية الارتباط بالخلايا الطلائيه .

ولقد لاحظ Ofek *et al.* (1977) ان هذه الاهداب تتوسطها مواد شبيهه باللكتين او متخصصة بسكر المانوز موجودة على سطح البكتريا التي ترتبط مع مستلمات شبيهة بالمانوز Mannase-like receptor تقع على سطح الخلية المخاطية.

كذلك بين Livrelli *et al.* (1996) بأن العديد من افراد العائلة المعوية تمتلك الاهداب fimbriae وهي التي تعطيها القابلية على الارتباط الخاص بسطح خلية المضيف .

تمتلك بكتريا *Providencia*قابلية الالتصاق التي تمكنها من الاستيطان او البقاء في ادرار القثطرة البولية .(Cornaglia *et al.*,1995) .

وتعود قابلية بكتريا *Providencia* على البقاء في القنطره البولية للتلازن المانوز الشبيه للكلبسيلا (MR/K) (Lautenbach ,2002) .

وتنتج بكتريا *Providencia* العامل الهدبي الثالث type-3-fimbriae والذي يمكن الكشف عنه بواسطة التلازن لكريات الدم الذي يحدث عند معاملته مع حامض التانيك ،ويحدث هذا التلازن بوجود او غياب سكر المانوز ، وقد وجد ان العامل الهدبي الثالث يشفر له بواسطة جين يطلق عليه MrKD محمول على البلازميد (Sebghati *et al.*, 1998) . واشار Jagielski *et al.* (1992) الى احتواء بكتريا *P. rettegeri* على عامل الالتصاق MRHD.

وبين Schurtz *et al.* (1994) وجود جين مسؤول عن انتاج العامل الهدبي الثالث يقع تحت سيطرة اثنين من الجينات الكروموسومية احدهما يكون مسؤولاً عن تكوين الاهداب MrKA، والاخر لغرض الالتصاق MrKD ،ولاحظ ان الجين الاول يكون بنسختين احداهما محمولة على الكروموسوم والاخرى على البلازميد .

واشار Clouthier *et al.* (1994) الى ان مجموعة جينات SEF14 للسالمونيلا تحتوي جين رابع عبر عنه بـ SefD ينتج عنه بروتين منفرد تركيبه مشابه للاهداب البكتيريه الاخرى ، اضافة الى الجينات الثلاثة المعروفة سابقاً Sef ABC التي تشفر لاهداب انفرادية وبروتينات الغشاء الخارجي على التعاقب .

وبينت الدراسه نفسها بواسطة تحليل تهجين الـDNA ان SefD واسع الانتشار بين العائلة المعوية ويظهر في *Providencia*، *Escheriashia coli*، *Shigella*، *Enterobacter*. ولكنه غير موجود في البكتريا السالبة الاخرى من غير العائلة المعوية او في البكتريا الموجبة.

ذكر Kunin *et al.* (1995) ان مادة ساليسليت الصوديوم تثبط الحركة في *E. coli*، *Proteus mirabilis*، *Proteus vulgaris*، *Providencia stuartii* ، *Providencia rettgeri* وبشكل عكسي للنمط المعتمد على التركيز . فمثلما هو معروف ان الضغط الازموزي للسالسليت والطفرات الحاصله في المقاومه المتعدده للمضادات توقف التعبير عن pili اواهداب CFA في *E. coli* . وعندما نتأمل فان

ذلك ممكن ان يؤثر في التعبير عن الاسواط بشكل جيد ، فالساليسليت يوقف تصنيع الفلاجين في *E.coli* كذلك فان ظاهرة swarming لاتحدث في تركيز 20 مايكرومول من الساليسليت .

ان وجود عوامل الاستيطان او الاستعمار ضمن تركيب جدار الخلية البكتيرية يساعد البكتريا في التصاقها بالأنسجة التي تستوطنها ومن ثم اشتراكها مع عوامل ضراوة اخرى فانها ستحدث الاصابة وبهذا يمكن القول ان مستضدات الاستعمار عوامل ضراوة اساسية تساعد البكتريا على الاستيطان واحداث الاصابة .

3-5-1 الهيمولايسين البكتيري Bacterial Haemolysin

يعد الهيمولايسين المنتج من قبل بعض انواع البكتريا احد انواع البروتينات المحللة لكريات الدم الحمروهي ذات تركيب جزيئي يختلف من بكتريا الى أخرى ،وغالباً مايرتبط انتاجه بالبكتريا المعزولة من حالات مرضية لذا يعد من العوامل المسهمة في الامراضية (Nassif and Sansonetti,1987) .ووجد ان الهيمولايسين لايؤدي دوراً مهماً في الامراضية في البكتريا التي تسبب اصابات معوية مثل *E.coli* و *V.cholerae* لأنها في مثل هذه الحالات غالباً ماتكون منتجة للذيفانات ولا تخترق الانسجة بنفسها ، الا ان دورها قد يكون مهماً عندما تغزو هذه البكتريا الانسجة تحت المخاطية لتصل الى الدم (Ketyi,1984) .

ان انواع عدة من سلالات الاسرة المعوية وبعض انواع الهيموفلس لها القابلية على انتاج الهيمولايسين كذلك وجد ان عدداًمن سلالات المكورات الذهبية قادرة على انتاج انواع مختلفة من الهيمولايسين ولايعرف دورها في الامراضية الا ان Nolte (1982) اشار الى دور الهيمولايسين عند غزو الدم وحصول حالات التعفن الدموي البكتيري ،ولكن الالية الحقيقية التي يدخل فيها الهيمولايسين عامل ضراوة في الاصابات المختلفة ليس واضحاً تماماً على الرغم من ان بعض الاثباتات

تشير الى ان دوره يكمن في تزويد البكتريا المرضية بما تحتاجه من الحديد (Payne,1988) .

يرتبط الهيمولايسين مع عوامل اخرى يفترض ان يكون لها دور في الضراوة مثل المقاومة للمصول ووجود مستضدات خاصة بالاضافة الى وجود الاهداب ولاسيما تلك المرتبطة بتلزن كريات الدم الحمر بوجود العامل الهدبي الذي لايثبطه سكر المانوز (الزعاك ،1994) .

وقد اتضح ان الجينات المشفرة للهيمولايسين قد تكون محمولة على بلازميدات اقترانية (Gruing and Lebec ,1985) او على بلازميدات غير اقترانية (Hull *et al.*,1982) .

وقد تم نقل البلازميدات المسؤولة عن انتاج الهيمولايسين بوساطة الاقتران الى بكتريا اخرى غير منتجة للهيمولايسين لاسيما بين افراد العائلة المعوية (Hacker *et al.*,1985) .

ولايمكن عد الهيمولايسين عامل ضراوة مباشراً او غير مباشر ولكنه يعد من العوامل التي تشترك في الامراضية في حالات اصابات معينة وفي مواضع معينة ومع ذلك فأن وجوده يعد عاملاً مهماً في تزويد البكتريا بالحديد بالاضافة الى قابليته على حث افراز الهستامين وصنع الليكوترين وكذلك له القدرة على تدمير الخلايا وتحرير اللايسوزايم او تدمير كريات الدم البيض (الزعاك ،1994) .

وقد اشار Senior and Hughes (1988) في دراسة لفعالية التحلل الدموي لـ 198 عزلة بكتيرية عائدة لمجموعةProteae الى عدم قابلية أي من عزلات الـ *Providencia* بمجاميعها الاربعة والبالغ عددها 74 عزلة على انتاج الهيمولايسين.

4-5-1 انتاج السايدروفورات **Siderophores production**

يعد الحديد من العناصر التي لها اهميه خاصة للخلية ، لأنه يؤدي دوراً اساسياً في عمليات نقل الإلكترونات بالاضافة إلى عمله المعروف في نقل الاوكسجين واصبح التنافس على الحديد احد العوامل التي تحكم العلاقة بين البكتريا والمضيف ولذلك فمن الوسائل التي تستخدمها البكتريا للحصول على الحديد هو إنتاجها السايدرو فورات Siderophores (الزعاك ,1994).

كذلك أشار Payne (1988)الى إن كثيراً من الأنزيمات تحتاج إلى الحديد لزيادة فاعليتها وان البكتريا التي تفتقد أنظمة سحب الحديد يختزل معدل النمو فيها بصورة كبيرة وقد يؤدي إلى تغيرات شكلية كثيرة كذلك فإن هذه الخلايا التي تفتقد لهذه الانظمة قد يتوقف فيها تصنيع الحامض النووي DNA كما يتوقف فيها انقسام الخلية ولهذا فان الخلايا البكتيرية تحتوي في الأقل على نظام واحد للحصول على هذا العنصر المهم مثل نظام السايدروفورات .

والسايدروفورات هي مركبات كلابيه Iron chelating ساحبه للحديد توجد بأنواع منها (ايروبكتين،انتروبكتين) وتتمكن من خلالها البكتريا العائدة للعائلة المعوية من الحصول على الحديد (Rollins and Joseph, 2000) .

وتوفر معرفة نظام السايدروفورات لافراد العائلة المعوية تشخيصاً اضافياً لفصلها الى سلالات واجناس وانواع وتحت انواع . وممكن تميز السايدروفورات فيها الى ايروبكتين وانتروبكتين وانواع اخرى من السايدروفورات (Reissbrodt and Rabsch,1988) .

وتظهر اجناس الـProteae وبضمنها *Providencia* فعاليه واضحة لانتاج السايدروفورات فقد اشارت دراسات النمو ونقل الحديد الى تكوين حامض كيتوني من ازالة مجموعة الامين للحامض الاميني وتتأكد فعالية السايدروفورات مع احماض الفا-كيتو التي تمتلك سلسلة جانبيه اروماتيه او شبه اروماتيه مثل حامض الفينل –بايروفيك او اندول –بايروفيك الذي ينتج عن ازالة مجموعة الامين

للفينل –الانين والتربتوفان على التعاقب وتستهلك بكتريا *Providencia* السايدروفورات الخارجيه Exogenous siderophore المتمثله بهيدروكسيمات الحديد (حاملات الحديد) وبولي كاربوكسليت الحديد(رايزوفيرون والستريت) بعدد من الانزيمات المحللة للبروتين(proteas) (Drechsel *et al*., 1993).

يعد اللاكتوفيرون واحدة من ميكانيكيات الدفاع الحيويه ،تفرزه الاعضاء التناسلية الانثوية وهو من المواد البايولوجية المفيدة بالنظر لفعاليته ضد البكتريا ، اذ اثبت فعالية اللاكتوفيورن ضد 15 سلالة بكتريا تعود لعشرة انواع كما اثبت انه بالجمع بين اللاكتوفيرون و المضاد cefpodaxime (cpdx-ox) ترتفع الفعالية العلاجية لهذا المضاد ضد اصابات مختلفة من ضمنها الاصابات ببكتريا *P.rettegeri* . (Chimura *et al*.,1993)

6-1المحتوى الوراثي لبكتريا *Providencia*

تمتاز البكتريا بشكل عام بأحتوائها على كروموسوم واحد بنسخة واحدة أوعلى عدة نسخ ومع ذلك فقد وجد ان هناك عناصر وراثية أخرى مستقلة عن الكروموسوم التي تسمى بالبلازميدات وهي عبارة عن عناصر وراثيه توجد بشكل منفصل عن كر وموسوم المضيف ،لها القابلية على التضاعف الذاتي وتمكن الخلايا التي توجد فيها من العيش في الظروف الاستثنائية (Dale,1998) .

اضافة لذلك فقد وجد ان هناك عناصر وراثية اخرى تدعى بالجينات القافزة او العناصر المتنقلة (Transposone) التي تستطيع التحرك او القفز من موقع لاخر كتحركها من الكروموسوم الى البلازميد او بالعكس او تتحرك على الكروموسوم نفسه من موقع لاخر .

وتكون البلازميدات غالباً غير أساسيه لبقاء البكتريا إلا إنها توفر لها فائدة انتخابية في الوسط الذي تعيش فيه (Talaro and Talaro,1996) . اذ يمكن

للبلازميدات أن تحمل جينات ضراوة البكتريا مثل إنتاج الذيفانات ومقاومة المضادات الحيوية المتنوعة وكذلك إنتاج المضادات نفسها .وتتأرجح احجامها من 1×10^6 الى اكثر من 200×10^6 دالتون ، وهناك بعض البلازميدات لها القابلية على الانتقال بطريقة الاقتران ويطلق عليها بالبلازميدات الاقترانية Conjugative plasmid .والبعض الاخر غير قادر على الانتقال بطريقة الاقتران ويسمى بلازميدات غير اقترانية Non-Conjugative plasmids (البكري ،1991) .

وتنتقل البلازميدات بالاضافة الى عملية الاقتران بطرائق أخرى كالتحول الوراثي (Transformation) والتوصيل (Transduction) .ثم ان حصول بكتريا ذات ضراوة قليلة على بلازميد يحمل جينات لعوامل ضراوة يمكن أن يزيد من ضراوة البكتريا التي استلمت ذلك البلازميد (الزعاك ،1994) .

وتأتي علاقة البلازميدات بالامراضية من خلال ملاحظة احتواء بعض البلازميدات الى جينات المقاومة لأكثر من مضاد حيوي واحد كذلك تحتوي بالاضافة الى ذلك على جينات لعوامل الضراوة لأن هذه العوامل تلعب دوراًمباشراً وغير مباشر في الامراضية فان انتقالها عن طريق البلازميد الى بكتريا اخرى غير مرضية يزيد من امراضية الاخيرة ،اما من الناحية الوبائية فان انتشار البلازميدات بين السلالات العائدة الى النوع البكتيري نفسه والمسببة للاصابات نفسها يمكن ان يكون مؤشراً وبائياً عند وجود تماثل بين هذه البلازميدات وهذا مايسمى بالنسق البلازميدي Plasmid profile (Garcia *et al.*,1997) .

ان هذه الطريقة تصبح ذات جدوى اكثر اذا ماقترنت بطريقة اخرى مكملة لها وهي طريقة البصمة البلازميدية (plasmid finger printing) وفي هذه الطريقة يتم استخدام واحد أو أكثر من الانزيمات القاطعة لملاحظة التماثل بالحجم الجزيئي لقطع DNA نفسها بعد تجزئتها وترحيلها على هلام الاكاروز كهربائياً (Threlfall and Frost,1990) .

اضافة لما تقدم فقد اشارت الكثير من الدراسات الى وجود كثير من البلازميدات التي لاتعرف لها صفات مظهرية ولهذا يطلق عليها البلازميدات الخفية Cryptic plasmid ، وتنتشر مثل هذه البلازميدات في بعض انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام وقد وصفت البلازميدات الخفية في بكتريا *p. stuarti* .

. (McHale *et al*.,1981; Hawkey *et al*.,1984)

وتكون جميع البلازميدات تراكيب بسيطة نسبياً فمن الطبيعي يمكن فصلها عن كر وموسوم الخلية البكتيرية بطرائق فيزياويه مع طرد مركزي (Greenwood *et.al*.,1997) مثلما في استخدام طريقة التحليل القاعدي (Sambrook *et.al*;1989) . كذلك يمكن معرفة حجم البلازميد بواسطة الترحيل الكهربائي ، اذ ان التشابه في أحجام البلازميدات يساعد على معرفة الأنماط البكتيرية المعزولة المتشابهة.(Greenwood *et al*., 1997) .

ان لانتقال بلازميدات المقاومة التأثير الكبير في مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية كما انها تكون اكثر اهمية من تلك المحموله على الكروموسوم . (Johnson,1991)

فقد ذكر Akbas وجماعته (1998) الى ان المقاومة المتعدده للمضادات في انواع *Providencia* وخصوصاً النوع *P.stuarti* يشفر لها بواسطة جينات موجودة في بلازميدات مسؤوله عن نقل صفة المقاومة المتعدده للمضادات الى سلالات اخرى وعلى العموم فان *p.stuarti* لايعد من الممرضات الشديدة على الرغم من اشتراكه في العديد من الإصابات .

اشارD, orazio and Collins (1993) الى وجود بلازميد في عدد من انواع بكتريا*Providencia* المعزولة من الجهاز البولي والمشفر لجين انتاج اليوريز، يشير تحليل تتابع الـ DNA الى ان الجينات المحمولة على البلازميد والتي تشفر لإنزيم

اليوريز تكون متماثلة مع الجينات التي تشفر لانزيم اليوريزفي بكتريا *P. mirabilis* .

كذلك ذكر Lambert *et al.* (1994) احتواء بكتريا الـ *P. stuarti* على بلازميد قافز Transposon بوزن جزيئي (30 Bp) والذي يشفر لانزيم aminoglycoside 3-o phosphotransferase والذي من خلاله تقوم البكتريا بمقاومة الاميكاسين.

اضافة لذلك بين Jones(1998) المدى الواسع لبكتريا العائلة المعوية وبضمنها*Providencia* التي تنتج انزيم AmpC المقاوم لبعض مضادات B-lactams وقد وجد ان الجين المشفر له يقع على بلازميد له القدرة على التنقل من نوع الى اخر .

واشارت دراسة Mobley *et al.* (1985) الى احتواء *P.stuarti* على بلازميدات اقترانيه وبأوزان جزيئية تصل الى ما بين (82-Kp150) ولها القدرة على نقل صفة انتاج انزيم اليوريز من بكتريا*Providencia* الى بكتريا*E.coli* عن طريق عملية الاقتران.

اوضح Shlaes and Currie (1983) وجود بلازميد حجمه الجزيئي (36) ميكادالتون في 8عزلات من بكتريا*Providencia* المقاومة لعدد من المضادات وقد اشارت تجارب الاقتران والتحييد والتحول الى ان هذا البلازميد مسؤول عن المقاومة للجنتامايسين ،توبومايسين ،كانامايسين ،امبسيلين ،كاربنسلين وسيفالوثون . وتوحي نتائج الدراسة الى ان هذا البلازميد الاقتراني يتواجد في معظم انواع العائلة المعوية المسببة لعدوى المستشفيات .

7-1 تحييد البلازميدات plasmid curing

قد يحصل لبعض البلازميدات انعزال تلقائي وبالتالي فقدان من الخلية البكتيرية ، في حين تمتاز معظم البلازميدات بثباتها لذلك يتطلب استخدام عوامل

تحييد تزيد من نسبة الانعزال وبالتالي تسهل عملية فقدان او استئصال البلازميد نهائياً .

ان اهمية تحييد البلازميدات تكمن في التخلص من الصفات التي تضيفها الى البكتريا كصفة المقاومة للمضادات الحيوية أو وجود الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة وغيرها .(Snyder and Champness,1997) .

وهناك عدد من المواد المستخدمة في تحييد البلازميدات منها الصبغات كصبغة بروميد الاثيديوم والاكردين البرتقالي ، والتي يكون تأثيرها انها تحفز على زيادة عدد نسخ البلازميد (Pickeet *et al.*,2005) ،وكذلك الحوامض مثل حامض السالسليك والذي تعود قابليته على تحييد البلازميدات الى قدرته على سحب الايونات الموجبة الثنائية التكافؤ والمهمة في ثباتية الغشاء الخارجي للبكتريا وكذلك تأثيره في استقرارية الاغشية البلازمية وكذلك في فعالية الانزيمات الموجودة في الفسحة الموجودة حول الغشاء السايتوبلازمي (Domenico *et al.*,1989) ، وايضاً تستعمل المضادات الحياتية كالمضاد الحياتي الريفامبسين الذي يثبط عمل انزيم بوليميريز الـRNA (Johnston and Richmond,1970). وكذلك مضادات الانوكسوسين والافلاكسوسين والتي تثبط تضاعف البلازميد (Weisser and Wiedemann,1986) . كذلك استخدمت EDTA-tris عاملاً محيداً لبعض البكتريا مثل *E.coli* (Wooley *et al.*,1986) ،ووجد كذلك ان Sodium Dodcyl sulfate (SDS) يستطيع ان يحيد بعض البلازميدات اذ ان بعض الخلايا الحاوية على بلازميد تكون حساسة بدرجة كبيرة للـ(SDS) ويكون استخدام هذا المركب أفضل من بروميد الاثيديوم في عدد من البكتريا .(Sonstein and Baldwin,1972) . وكذلك فقد استخدمت mitomycin C في تحييدالبلازميدات (Curiale and Mills,1982) .

كذلك تستخدم الطريقة المعتمدة على رفع درجة حرارة نمو البكتريا ، فقد وجد إن تأثيرها جزئي في تحييد البلازميدات وكفاءتها اقل من استخدام المواد الكيمياوية

(May *et al.*,1964) على الرغم من خطورة الاخيرة والحذر من استخدامها مثل المايتومتسين(Mitomycin C) والاكريفلافين (Acriflavin) .

وان استخدام طرائق تحييد البلازميدات بوصفها تقنية من تقنيات الهندسة الوراثية له فائدة في تحديد الصفات المحمولة على البلازميدات ،اذ تفقد البكتريا قابليتها على اظهار تلك الصفات بعد افراغها من البلازميدات وهذه الطريقة يمكن استخدامها عند عدم وجود وسائل متاحة في تحديد تلك الصفات (السعيد،1997).

الفصل الثاني
المواد وطرائق العمل

Material and Methods

الفصل الثانـي
2-المواد وطرائق العمل
Material and Methods

2-1 الأجهـزة المختبريـــة والمواد
2-1-1 الأجهـزة المختبريـــة
تم استخدام الاجهزة والادوات المختبرية المدرجة في جدول (1-2) .

جدول (1-2)الاجهزة والأدوات المختبرية المستخدمة في الدراسة .

ت	اسـم الجهـاز	الشـركـة المصنعـة
1	الحاضنةIncubator	Gallenkamp,England
2	حمام مائي Water bath	Memmert,Germany
3	فرن كهربائي Oven	Gallenkamp,England
4	جهاز نبذ مركزي Centrifuge	Hermle,Germany
5	جهاز نبذ مركزي مبرد cooling Centrifuge	Hermle,Germany
6	موصدة Autoclave	National,Japan
7	جهاز ترحيل كهربائي Gel electrophorasis	Shndon,scientific Co.LTD,England
8	مصدر الاشعة فوق البنفسجية Transillminator	San.Gabriel,USA
9	مرشـــحات بقطـــر 0.45 µm مايكروميتر Miilipore filter	Satorius membrane filter Gm bH,w.Germany
10	ميزان Balance	Satorius,Germany
11	ميـــزان حســـاس الكتـــروني Sensitive electronic balance	Mettler ,switzerland
12	مجهر ضوئي Light microscope	Olympus, Japan
13	مقياس الاس الهيدروجيني pH meter	Hoelezeandcheluis,KG . Germany
14	ماصـات دقيقـة باحجـام مختلفـة Micropipttes	Socorex
15	ثلاجة refrigerator	Estar

2-1-2 المواد الكيمياويـــة والبايولوجيـــة

تم استخدام المواد الكيمياوية والبايولوجية المدرجة في جدول (2-2) .

جدول (2-2) المواد الكيمياوية والبايولوجية المستخدمة في الدراسة .

اسم المادة	الشركة المصنعة
A – المواد الكيمياوية :- 1 – كلوريد الصوديوم ، هيدروكسيد الصوديوم ، خلات الصوديوم، احمر المثيل ، الفانفثول ، حامض الخليك ، dipyrdyl ، اسيتون ، كبريتات دودوسيل الصوديوم SDS ، Na_2EDTA ، EDTA ، ايثانول ، كلوروفورم ، فينول ، الاكاروز ، كلوكوز ، ايزواميلو الكحول ،كليسرول ، فوسفات البوتاسيوم احادية وثنائية الهيدروجين ، فوسفات ثنائية الصوديوم ،فيكول ، حامض الهيدروكلوريك المركز،كحول اثيلي،بيروكسيد الهيدروجين ،كلوريد الحديديك ،DMAB .	B.D.H
2 –الصبغات بروميد الاثيديوم،بروفينول الازرق ،المثيل الاحمر،السفرانين،المثيل الازرق،الايودين ،الحبر الهندي	Ajax
3 – خلاصة الخميرة	Fluka
B - الأوساط الزرعية الوسط المغذي الصلب ، وسط ماكونكي الصلب ، وسط اكار الدم الاساسي ، وسط ستريت سايمون ، وسط كلكر الصلب ، وسط مولرهنتون ، وسط مستخلص القلب والدماغ السائل ، تربيون ، بيتون	Oxoid
C – المضادات الحياتية امبسيلين ، تراي مثبرام ، جنتاميسين ، ريفامبسين ، السيروفلاكسوسين	Sigma معمل ادوية سامراء/العراق
D – اقراص المضادات الحياتية	Oxoid
E – اشرطة نظام API 20E	Biomo- -rienr

3-1-2 المحاليل والأوساط الزرعية

ملاحظة: تم قياس pH للمحاليل والاوساط الزرعية باستخدام جهاز pH meter وضبط بأستخدام HCL(0.1عيارية) وNaOH(0.1عيارية) .

1-3-1-2 المحاليـــل Solutions

I- محاليـل المضادات الحياتيـة

حضرت على وفق ماذكره *(* Miniatis *et al*.,1982 *).*

A- محلول Ampicillin :-

حضرت باذابة 1 غم من المضاد الحيويAmpicillin في 90 مل من الماء المقطر المعقم ثم اكمل الحجم الى 100 مل بإستخدام الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 10 ملغم / مل .

B- محلول Rifampicin :-

حضر بإذابة 0.25 غم من المضاد الحيوي Rifampicin في 90 مل من الاسيتون ثم اكمل الحجم الى 100 مل بإستخدام الاسيتون للحصول على تركيز نهائي 2.5 ملغم / مل .

C - محلول Trimethoprim :-

حضر باذابة 0.25 غم من المضاد الحيوي Trimethoprim في 90 مل من الاسيتون ثم اكمل الحجم الى 100 مل بإستخدام الاسيتون للحصول على تركيزنهائي 2.5 ملغم / مل .

D - محلولCiprofloxacin :-

حضر بأذابة 0.2 غم من المضاد الحيويCiprofloxacin في 90 مل من الماء المقطر المعقم ثم اكمل الحجم ال 100 مل بإستخدم الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 2 ملغم / مل (السعيد 1997) .

E- محلول Gentamicin:-

استخدم بشكل محلول تركيزه 40 ملغم في 1 مللتر ثم تم تحضير تركيز 4000 مايكروغرام منه في 1 مللتر .

استخدمت مرشحات دقيقة (Milipor filter) بقطر(0.45µ m)لتعقيم المضادات الحيوية ثم حفظت في الثلاجة لحين الإستعمال ،وتضاف المضادات الحيوية من محاليلها الرئيسة الى الاوساط الزرعية الانتخابية ووفقا" للتراكيز (مايكروغرام / مل) المذكورة فيما يأتي :-

المضاد الحيوي	TM	CIP	RA	AMP
التركيز الاصلي(mg/ml)	2.5	2	2.5	10
التركيزالمضاف الى الوسط(µg/ml)	25	20	100	100

أما اقراص المضادات الحياتية والمجهزة من شركة (BRL) فتكون فعاليتها disc-potancy مثلما مدون وبتراكيز المايكروغرام .

المضاد الحيوي	CFM	CN	PRL	SXT	GM	AMX	AMP	CIP	RA
التركيز (µg/ml)	5	2	100	25	10	25	10	5	5

II- محلول - SET

يتكون من 75 ملي مولار NaCl و25 ملي مولار EDTA الاس الهيدروجيني له 8 يضاف له 20 ملي مولار Tris base الاس الهيدروجيني له (7.5) .استخدم هذا المحلول في استخلاص الـDNA من الخلايا .

III- محلول 25% SDS (Sodium Dodecyle Sulfate)

يتكون منSDS بنسبة 25% مذابة في محلول EDTA الاس الهيدروجيني له 8 .استخدم هذا المحلول لتكسير الخلايا البكتيرية عند استخلاص الـDNA.

IV- **محلول بروميد الاثيديوم Ethedium broimde**

حضر باذابة 0.25 غم من صبغة بروميد الاثيديوم في 50 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 5 ملغم/ مل (Sambrook *et al.*, 1989) .استخدم هذا المحلول في تصبيغ حزم الـDNA اثناء عملية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز.

V- محلول 5 مولار NaCl

يتكون من 5 مولار NaCl يضاف اليه 1 مولار من خلات الصوديوم .

VI- **محلول داري TE**

يتكون من 50 ملي مولار Tris- Hcl و 20 ملي مولار Na_2EDTA ثم عدل الاس الهدروجيني . وعقم بالموصدة ،استخدم هذا المحلول في اذابة الـDNA المحضر .

VII- **دارئ التحميل Loading buffer**

يتكون من 15% فيكول Ficoll و 25% من صبغة البروموفينول الأزرق (Sambrook *et al.*, 1989) .استخدم في تحميل في الـDNA حفر الهلام .

VIII- **دارئ T.B.E**

يتكون من 0.089 مولار Tris- base و 0.089 مولار حامض البوريك Boric acid و 0.02 مولار EDTA يذاب في 500 مل من الماء المقطر . وعدل الأس الهيدروجيني الى 8 وعقم بالموصدة (Sambrook *et al.*, 1989) .يستخدم لاغراض الترحيل الكهربائي .

IX- **محلول الفينول- كلوروفورم- ايزواميل الكحول**

حضر بمزج 100 مل من الفينول مع 96 مل من الكلوروفورم و4 مل من الايزواميلو الكحول .استخدم في تنقية وازالة البروتين من الـDNA البلازميدي .

X- محلول EDTA الملحي

يتكون من 0.15 مولار من Nacl و0.1 مولار منEDTA تذوب في الماء المقطر ويعدل الاس الهيدروجيني .

2-1-3-2 الأوساط الزرعية المحضرة

A- وسط لوريا السائل Luria-Broth

حضر الوسط باذابة المكونات الآتية في 950 مل من الماء المقطر :-

10 غم تربتون , و10 غم مستخلص الخميرة , و5 غم كلوريد الصوديومNaCl , ثم اكمل الحجم الى 1000 مل وعدل الأس الهيدروجيني الى 7.2 . ثم يعقم بالموصدة (Miniatis et.al, 1982).يستخدم هذا الوسط في تجارب عزل الـDNA.

B- وسط M9 السائل

ويحتوي على المكونات الآتية :-

6 غم فوسفات ثنائي الصوديوم الهيدروجينية , و3 غم فوسفات ثنائي البوتاسيوم الهيدروجينية و0.5 غم كلوريد الصوديوم و 1.0 غم من كلوريد الأمونيوم . واذيبت المكونات في 950 مل من الماء المقطر وعقم بالموصدة وبرد الى درجة 50مْ ثم أضيف الية 2 مل من 1 مولار كبريتات المغنيسيوم و10 مل من 20% كلكوز و 0.1 مل من 1 مولار $CaCl_2$ التي عقمت بالترشيح كل على انفراد واكمل الحجم الى 1000 مل (Miniatis *et al.*, 1982) .يستخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج السايدروفورات.

C - وسط احمر المثيل والفوكس بروسكور MR-VP

حضر الوسط باذابة 5 غم من بيتون و 5 غم K_2HP_4 في 1000 مل ماء مقطر أذيبت المكونات بوساطة حمام مائي وعدل الاس الهيدروجيني الى 7.6 وعقمت بالموصدة وبرد الوسط الى 50 مْ ثم أضيف اليه 50 مل من المحلول 10% كلوكوز الذي عقم بالترشيح ووزع الوسط في انابيب اختبار نظيفة معقمة (Macfaddin,2000).استخدم الوسط للكشف عن التحلل الكامل أو الجزئي للسكريات وتكوين الحامض أو الاستيل مثيل كاربون .

ومجموعة من الأوساط الزرعية التي حضرت على وفق تعليمات الشركة المجهزة وعقمت بالموصدة بدرجة حرارة 121مْ وضغط 15 باوند / أنج لمدة 15 دقيقة وهذه الأوساط هي :-

D - وسط اكار الدم الأساس Blood Agare Base

حضر وسط اكار الدم الأساس وعقم وترك الى أن وصلت حرارته الى 50 مْ ثم أضيف له الدم البشري بحيث اصبح تركيزه النهائي 5%.يستخدم في التحري عن قابلية البكتريا على انتاج الهيمولايسين وتحلل الدم .

E - وسط ماكونكي الصلب MacConKey Agar :يستخدم في تشخيص البكتريا .

F - وسط مولر– هنتون الصلب Muller-Hinton Agar : يستخدم في تنمية البكتريا لدراسة حساسيتها تجاة المضادات .

J - وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain Heart Infusion Broth : استخدم الوسط لحفظ العينات اثناء جمعها .

H - وسط كليكر Kligler Iron Agar: يستخدم في الكشف عن قابلية البكتريا على تخمر كل من سكر الكلوكوز واللاكتوز وكذلك في قابليتها على انتاج كبريتيد الهيدروجين .

I - وسط سترات سايمون Simmon-Citrate Agar : استخدم هذا الوسط

للكشف عن قابلية البكتريا على استهلاك السترات كمصدرللكاربون .

G - وسط المغذي الصلب Nutrient Agar : استخدم هذا الوسط لغرض تنمية وحفظ وادامة السلالات ك ذلك في تجارب تحييد البلازميدات .

K - وسط المرق المغذي Nutrient Broth: استخدم الوسط لتنمية البكتريا لاغراض عزل الـDNA البلازميدي.

L - وسط نقيع القلب والدماغ الصلب Brain Heart Infusion Agar: استخدم الوسط لتنمية البكتريا لغرض فحص قابليتها على التلازن مع كريات الدم الحمر .

4-1-2 الكواشف

A - كاشف كوفاكس Kovac's reagent

حضر الكاشف باذابة 10 غم من (DMAB) Dimethyl aminobenz aldehydo في 150 مل من amyl alcohol ثم أضيف 50 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز بصورة تدريجية الى المزيج،خزّن المحلول في قنينة معقمة ورّج بلطف قبل الاستعمال.أستخدم للكشف عن حلقة الاندول(MacFaddin ,2000).

B - كاشف احمر المثيل Medhyl red reagent

حضر الكاشف باذابة 0.1 غم من صبغة احمر المثيل في 300 مل من 95% كحول أثيلي وأكمل الحجم الى 500 مل باستخدام الماء المقطر(MacFaddin, 2000) .استخدم الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج الانزيمات القابلة على تحويل النواتج النهائية لأيض الكلوكوز الى حامض .

C - كاشف فوكس – بروسكور Vogas-Proskauer reagent

حضرعلى وفق ماجاء في Collee *et al* (1996) وعلى النحو الآتي :-

1 – كاشف الفانفثول alpha-nephthal الذي حضر باذابة 5 غم من مادة الفانفثول في 100 مل من الكحول الأثيلي المطلق .

2 – محلول هيدروكسيد الصوديوم الذي حضر باذابة 40 غم من مادة هيدروكسيد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر.

D - كاشف الاوكسديز Oxidase reagent

يحضر الكاشف آنيا" عند الاستخدام باذابة 0.1 غم من Tetra methyl- p- phenyl Diamine Dihydrochlorideفي 10 مل من الماء المقطر (Baron *et al.*,1995) يوضع الكاشف في قنينة معقمة .ويستخدم الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج الاوكسديز .

E - كاشف اختيار الكاتليز Catalase test

حضر الكاشف باذابة 3 غم من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في 100 مل من الماء المقطر المعقم وحفظ في قنينة معقمة (Baron *et al.*,1995) .واستخدم هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج الكاتليز .

F - كاشف كلوريد الحديديك ($FeCl_3$)

حضر الكاشف باذابة 3.4 غم من كلوريد الحديديك في 100 مل من الماء المقطر (MacFaddin,2000) . واستخدم هذا الكاشف للكشف عن Trtptophan deaminase.

2-2 طرائق العمل

2-2-1 جمع العينات

جمعت (164) عينة شملت (93) عينة ادرار و(53) مسحة حروق و(4) مسحات اذن و(8) مسحات بلعوم ومسحتين لمهبليتين ومسحتا جروح ومسحتين للجلد ،أخذت العينات للأعمار جميعها ولكلا الجنسين من المرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى الحسين بكربلاء وللمدة من 2004/9/1 الى 2005/3/1.

A - عينــات الادرار

تـم جمـع عينـات ادرارالمرضـى مـن ردهـات الجراحـة البوليـة فـي انابيـب بلاستيكية معقمة ثم بواسطة عروة ناقلة تنقل قطره من الادرار وتزرع على طبق اكار الدم وقطره أخرى تزرع على طبق ماكونكي وتحضن الاطباق هوائيا" بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعــة .

B - عينات الحروق والجروح

جمعت عينات الحروق وذلك باستخدام مسحات قطنية معقمة سبق وان رطبت بغمسها في انابيب أختبار حاوية على 5 مل من وسط نقيع القلب والدماغ (BHIB) ثم تدور المسحات في مكان الحروق أو الجرح وتعاد الى أنابيب الأختبار لتحضن هوائيا" بدرجة 37 مْ لمدة 24ساعة . ثم يعاد زرعها على وسط اكار الدم واكار الماكونكي لتجري عليها الأختبارات التشخيصية اللازمــة .

C - عينات المهبل

جمعت العينات من المريضات بالطريقه المذكوره في الفقره (2) نفسها .

D - عينات الاذن والبلعوم

جمعـت مسـحات الأذن (Ear Swab) ومسـحات البلعـوم (Throat Swab) واستخدمت الطريقة المذكورة في الفقرة (2) نفسها .

2-2-2 تشخيص العينات : تم تشخيص العينات من خلال التشخيص البكتريولوجي والبايوكيميائي للعزلات .

A - التشخيص البكتريولوجي

تم أخذ مستعمرات متفرقة نقية من كل نمو موجود على الأوساط الزرعية الخاصة بالزرع الاولي وشخصت اعتمادا" على الصفات الشكلية المتضمنة حجم المستعمرات ولونها وحافاتها وارتفاعها ثم دراسة صفات الخلايا تحت المجهر بعد تصبيغها بطريقة كرام (Gram Stain) والمتضمنة شكل الخلايا ولونها وتجمعها.بعد

ذلك يتم تشخيص العزلات اعتمادا" على ماشار اليه Collee *et al.* (1996) و MacFaddin (2000) . Holt *et al* (1994) .حول الطرائق والمواد والأوساط الزرعية المستخدمة في تشخيص البكتريا .

B - التشخيص البايوكيمياوي للعزلات

1 - اختبار الاندول Indol test

جرى تلقيح وسط ماء البيبتون بالعزلة المراد اختبارها وبعد مدة حضانة 48 ساعة أضيف 0.5 مل من كاشف كوفاكس (Kovac's reagent) الى الوسط ورجت الأنبوبة بهدوء وتكون اللون الاحمر بشكل حلقة دائرية بين الوسط والكاشف الكحولي الى الاعلى دلت على ايجابية الأختبار (MacFaddin,2000) .

2 - اختبار أحمر المثيل Methyl red test

اجري الفحص بتلقيح الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي MR-VP بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 –48 ساعة بعد ذلك تتم أضافة 5 قطرات من كاشف أحمر المثيل ،ان ظهور اللون الاحمر في الانبوبة بعد 15 دقيقه يدل على ان الفحص موجب (Collee *et al.*, 1996) .

3 - اختبار الفوكس –بروسكور Voges-proskaur test

اجري الفحص بتلقيح الوسط الزرعي MR-VP بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 –48 ساعة بعد ذلك تم اضافة 0.6 مل من كاشف الفا نفثول و 0.2 مل من هيدروكسيد الصوديوم الى كل انبوبة. ان ظهور اللون الوردي خلال 2-5 دقيقة دلل على النتيجة الموجبة للفحص .

4 - اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

اجري الفحص بتلقيح وسط السترات المائل بالمزروع البكتيري المراد فحصه وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة (24-48) ساعة . ان تحول لون الوسط الاخضر الى الازرق دلل على النتيجة الموجبة (MacFaddin,2000) .

5 - الكشف عن انزيم الكاتليز Catalase test

تم اجراء الفحص بنقل كمية قليلة من النمو البكتيري النامي على الوسط الزرعي بعمر 24 ساعة بواسطة العيدان الخشبية المعقمة الى سطح شريحة زجاجية نظيفة جافة ثم أضيفت لها قطرة من 3%بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) ان ظهور الفقاعات الغازية دلل على النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

6 - الكشف عن انزيم الاوكسديز Oxidase test

تم اجراء الفحص بنقل كمية من النمو البكتيري بواسطة العيدان الخشبية المعقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف المحضر آنيا" ، فكان ظهور اللون البنفسجي دليلا" على النتيجة الموجبة(Collee *et al*., 1996) .

7- الكشف عن تخمر السكريات الثلاثة وتكوين غاز H_2S

تم التحري عن قابلية البكتريا على تخمير السكريات الكلوكوز واللاكتوز وانتاج كبريتيد الهيدروجين وذلك بنقل المستنبت الفتي بعمر 24 ساعة الى وسط كلكلر (Kilgler Iron Agar,KIA) المائل وتم حضن الوسط بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24 ساعة ، ثم تقرأ التغيرات في الدالة الحامضية (pH) في القعر والسطح المائل للوسط ، ويلاحظ التخمر بواسطة تغير لون الكاشف الاحمر الى الاصفر . أما تكون الغاز فيكون غالبا" على شكل فقاعات اسفل الوسط الصلب أما البكتريا المنتجة لكبريتيد الهيدروجين فتكون راسبا" اسودا" في قعر الانبوب (MacFaddin,2000) .

C - أختبار نظام API 20 E API 20 E System test

أجري الاختبار للتأكد من تشخيص هذه البكتريا اذ ان نظام API 20 E المجهز في شركة Biomerieux هو نظام تشخيص للجراثيم المعوية وبقية انواع الجراثيم العصوية السالبة لصبغة كرام .ويحوي هذا النظام عشرين انبوبا" دقيقا" بداخلها مواد اساس منزوع منها الماء وتستخدم كحجرات للتفاعل .

ولتشخيص العزلات البكتيرية بواسطة هذا النظام اتبعت طريقة (Brown *et al.*,1995) اذ أخذ 5 مل من محلول الملح الفسيولوجيNaCl (0.85 %) ووضع في انبوبة اختبار معقمة ثم لقح بمستعمرة جرثومية فتية ورج العالق جيدا" . حضر شريط الأختبارات بوضع 5 مل من ماء الحنفية في الحافظة (Tray) لتجهيز رطوبة كافية في اثناء الحضن ووضع الشريط البلاستيكي داخل الحافظة ثم ملئت حجرات شريط APIبالعالق البكتيري ثم أضيف زيت البارفين السائل الى حجرات كل من الأختبارات URE, H_2S ,ODC, LDC, ADH بينما ملئت حجرات الأختبارات GEL, VP, CIT بأكملها بالعالق البكتيري ,وحضن الشريط لمدة 18-24 ساعة عند درجة حرارة 37 مْ ولقراءة النتائج أضيف الى اختبار TDA قطرة من محلول كلوريد الحديديك بتركيز(3.4 %) , وأضيف الى اختبار IND قطرة من كاشف كوفاكس , وأضيف الى اختبار VP قطرة من 40% من NaOH المذابة في الماء المقطر ثم قطرة من 5% الفانفثول المذاب في كحول الايثانول المطلق فتعطي نتائج هذا الفحص رقما" سباعي البصمة ومنه نستطيع تعين النتائج بناء" على جدول قياسي .

3-2-2 تأثير المضادات الحيوية على البكتريا

2 – 2– 3–1 أختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية بطريقة الأقراص

Disc Method Kirby-Bauer Method

تم أستخدام الوسط الزرعي مولر-هنتون لاجراءاختبار الحساسية للمضادات الحيوية بإستخدام أقراص للطيف الواحد. اذ تم زرع البكتريا في الوسط بطريقة التخطيط ثم وضع القرص على سطح الطبق وسجلت النتائج على وفق قطر الهالة (التي تعطي دلالة على منع النمو) واعتمادا" على المسافات القياسية لقطر الهالة التي تتوافر في النشرات التي زودت من الشركة المنتجة لهذه المضادات .

2 – 2– 3–2 اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية على الوسط الزرعي الصلب

حضر وسط الاكار المغذي ووزع في دوارق وعقم بالموصدة وبعدها برد لدرجة 50 مْ ثم أضيف واحد من محاليل المضادات الحيوية المحضرة سابقا" وبالتراكيز المذكورة في الفقرة (3-1-2) وباستخدام الوسط الزرعي الصلب وعلى وفق ماأوردة Miniatis وجماعته (1982) تصب أوساط المضادات في أطباق معقمة وتترك لتتصلب ثم تزرع السلالات البكترية على هذه الأوساط بطريقة التخطيط ،وتحضن الأطباق بدرجة 37 مْ مدة 24 ساعة ثم تقرأ النتائج في اليوم التالي وتحدد العزلات المقاومة التي تستطيع النمو على أوساط المضادات الحيوية (+) والعزلات الحساسة التي لاتستطيع النمو على هذه الأوساط (-)

2 – 2 –4 التحري عن المحفظة البكترية باستعمال التصبيغ السالب

Negative Staining Method

تم اتباع طريقة المسحة الرطبة وذلك بوضع قطرة من الحبر الهندي على سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة وبواسطة الناقل (loop) ثم نقل جزء من المستنبت البكتيري الفتي بعمر 18-24 ساعة والنامي في وسط نقيع القلب والدماغ

ومزج المستنبت مع الحبر مزجا" جيدا" ثم وضع غطاء الشريحة وضغط برفق بين ورقتين ترشيح لبعثرة تكتلات الخلايا البكتيرية , ثم فحصت الشريحة تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي , فكان وجود هالة شفافة غير مصبوغة بالحبر حول الخلية البكتيرية دليلا" على وجود المحفظة .

2 – 2 –5 التحري عن بروتينات الالتصاق باستعمال طريقة التلازن الدموي

Hemagglutination

تم اتباع طريقة التلازن الدموي وذلك بتحضير كريات دم حمر RBC بتركيز 3% A^+اذ يمزج 3 مل من الدم صنفA^+ 97 مل من الماء ويحضر وسط الدماغ (brian agar) المزود بالدم ويلقح بالبكتريا ويحضن لمدة 24 ساعة بدرجة 37 م ْ . ثم يخلط على شريحة نظيفة 25 مل من كريات الدم الحمر RBC مع Loopfull من المزروع البكتيري ويترك لمدة (5 دقائق) ثم تلاحظ النتيجة .اذ ان حدوث حالة التلازن والالتصاق بين البكتريا وكريات الدم الحمر دليل على النتيجة الموجبة .

2 – 2 –6 التحري عن انتاج الهيمولاسين البكتيري

Haemolysin Production

يتم تحضير وسط اكار الدم ويوزع على أطباق بتري معقمة ويحضن بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم وجود تلوث . ثم تزرع السلالات لمعرفة قابليتها على انتاج الهيمولاسين وتحضن الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة ثم تقرأ النتائج التي تعتمد على ظهور أو عدم ظهور مناطق تحلل (هالة شفافه) تحيط بمستعمرات البكتريا (Deboy *et al.*,1980) .

2 – 2 –7 التحري عن انتاج السايدروفور Siderephores praduction

يحضر الوسط الملحي M9 المضاف اليه 2% اكار ويعقم بالموصدة ثم يبرد الى درجة حرارة 50 مْ ويضاف اليه 0.25 من سكر الكلوكوز المعقم بالترشيح

كما يضاف dipyridyl (200 مايكرومول) على وفق ماأشار اليه Nassif وجماعته (1989) . ثم تفحص قابلية العزلات البكتيرية على النمو بوجود dipyridyl . وتحضن بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة وتسجل النتائج على اساس وجود النمو (+) وعدم النمو (-).

2 – 2 – 8 استخلاص الـ DNAالبلازميدي plasmid DNA extraction

عزل الـDNA البلازميدي اعتمادا" على طريقةKado and Liu(1981). حضر DNA الكلي بواسطة طريقة salting out لـ(Pospiech and Neuman(1995) مع بعض التحويرات .اذ تضمنت الطريقة الخطوات الاتية :-

1- نُميت الخلايا البكتيرية في 30 مل من الوسط الزرعي السائل Nutrient broth في درجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة .

2- رُسب العالق البكتيري بجهاز النبذ المركزي بسرعة 10000دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق وتم التخلص من الوسط الزرعي السائل .

3- تم اعادة تعليق الخلايا البكتيرية بـ 5 مل من المحلول المنظم SET المحضر في الفقرة II.

4- أُضيف اليه 600 مايكروليتر من 25% SDS ومُزج بالتقليب ثم حُضن لمدة 5 دقائق في 55مْ .

5- أُضيف اليه 2 مل من 5 مولارNaCl ومُزج بالتقليب ثم تُرك الى ان وصلت حرارته الى درجة 37مْ .

6- أُضيف اليه 5 مل من فينول -كلوروفورم –ايزوبروبانول بنسبة(1:24:25)حجم/ حجم .ومُزج بالتقليب لمدة 30 دقيقة بدرجة 20 مْ .

7- نُبذ بجهاز نبذ مركزي مبرد لمدة 15 دقيقة بسرعة 4500 (دورة/ دقيقة) .

8- نقلت الطبقة العليا الى انبوبةاخرى وأُضيف 0.6 حجم من الايزوبروبانول لكل حجم من هذه الطبقة ومُزجت بالتقليب .وبعد 3 دقائق لُف الـ DNA على ماصة باستور معقوفه وغُسل الـDNA بـ 5مل من70%ايثانول .

9- تُرك ليجف ثم ذوب في 1-2 مل من TEبدرجة 55 مْ .

10- حُفظ بدرجة –20 مْ لحين الاستعمال (خلال فترة اسبوع) .

2 – 2 – 9 الترحيل الكهربائي للـDNA البلازميدي على هلام الاكاروز

Agarose electrophoreasis

أتبعت الطريقة التي وصفها Sambrook وجماعته (1989) . أذ تعد عملية امرار تيار كهربائي خلال هلام الاكاروز واحدة من الطرائق المستخدمة لفصل خليط من قطع الـDNA ذات الاوزان الجزيئية المختلفة .علما" ان زيادة التقنية تسهل عملية حساب موقع أو مكان الـDNA في الهلام بصورة مباشرة . تبدأ عملية تحضير الهلام باذابة 0.7 غرام من الاكاروز في 100مل من دارئ (TB × 10) وتتم الاذابة باستخدام حمام مائي بدرجة (100 مْ) ويبرد بعد ذلك الى درجة (50مْ) ثم يضاف اليه 10 مايكروليتر من محلول 5 ملغم /مل من صبغة بروميد الاثيديوم . وتحضر صفيحة اسناد الاكاروز (Tray) وتحاط حافاتها بشريط لاصق وبشكل جيد لمنع تسرب الهلام الذائب بعد صبه .ثم يصب الاكاروز بكمية مناسبة ثم يغمس مشط تكوين الحفر (Comb) قرب احدى نهايتي الصفيحة ويترك ليتصلب لمدة نصف ساعة ثم يرفع مشط تكوين الحفر من الاكاروز المتصلب ويرفع الشريط اللاصق ثم تثبت الصفيحة على مساندها في وحدة الترحيل ثم يغطى الاكاروز بارتفاع واحد مللتر بدارئ TBE . تبدأ عملية اضافة نماذج DNA في في حفر الهلام اذ يمزج 10 مايكرولتر من الدن البلازميدي مع 3 مايكرولتر من محلول صبغة البروموفينول الازرق (Loading buffer) ثم ينزل مزيج الـDNA والصبغة في حفر الاكاروز وتبدأ بعد ذلك عملية الترحيل الكهربائي التي تختلف متطلباتها تبعا" لنوع الـDNA

وحجمها . اذ تستخدم فرق جهد واطئ (6 فولت / سم) وبمعدل مرور تيار 20 ملي امبير ولمدة زمنية 1-2 ساعة بعد ذلك يتم تقصي الحزم المصبوغة للـDNA البلازميدي بعد كشفها بالأشعة فوق البنفسجية .

2 – 2 – 10 عملية تحييد البلازميدات باستخدام SDS plasmids curing

1–حُضرت تراكيز نهائية من الـ Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) المذابة في وسط لوريا السائل هي 1%,1.5%,2%,4%,8% ووزعت في انابيب معقمة ثم زُرعت الانابيب بنقل 0.1 مل من المستنبت البكتيري وحُضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة .

2 - لوحظت كثافة النمو للخلايا المعاملة ومقارنتها بالخلايا غير المعاملة لتحديد التركيز المثبط الادنى SDS حيث كان 0.4% .

3 –قورنت كثافة النمو في الانابيب بنشر 0.2 مل من مزرعة السيطرة والمزروع المعامل بـ SDS وبتراكيز أوطأ او مقاربة للتركيز المثبط الادنى على وسط اكار المغذي الذي حضن بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة .

4 – تم مقارنة العدد الحي للخلايا في مجموعتي السيطرة والمعاملة . وتم اختبار تراكيز الـSDS التي تسبق التركيز المثبط الادنى لاختبار التحييد

5 – تم تعريض الخلايا الى عوامل التحييد وعزل المستعمرات النامية على الاكار المغذي وتم التحري على الخلايا المحيدة بانتخاب (100) مستعمرة ونقلت جميعها بوساطة عيدان خشبية وبطريقة(Picking and Patching)الى وسط الاكار المغذي المضاف له المضاد الحياتي الملائم .

6 – تم تكرار العملية نفسها للسلالات جميعها ولكن باستخدام الاكار المغذي المضاف له المضاد الحيوي الملائم ثم لوحظ النمو للمستعمرات المنقولة فعند عدم ظهور النمو على الوسط المضاف له المضاد وظهوره في الوسط الخالي يعني ان الخلية فقدت صفة المقاومة لذلك المضاد .

الفصل الثالث
النتائج و المناقشة

Results and Discussion

الفصـل الثالـث
3 – النتائج والمناقشـة
Results and Discussion

3-1 العزل والتشخيص

تم عزل وتشخيص عزلتين فقط (1.2%)عائدتين لبكتريا *Providencia* من مجموع (164) عينة مأخوذة من المرضى المراجعين والراقدين في مستشفى الحسين بمدينة كر بلاء ، وقد اخذت العينات من ردهات الجراحة البولية وردهات الحروق وللمدة من 2004/9/1 الى 2005/3/1 ، واشتملت العينات على 93 عينة إدرار و53 مسحة حروق و4 مسحات اذن و8 مسحات بلعوم ومسحتين مهبليتين ومسحتا جروح ومسحتين للجلد.ومثلما هو موضح في الجدول رقم (1-3)

جدول(1-3) نوع العينات المدروسة

نوع العينات المدروسة	العدد الكلي للمسببات البكتيرية	عدد البكتريا المعزولة	النسبة المئوية
ادرار	93	1	%1.07
مسحة حروق	53	1	%1.9
مسحة اذن	4	0	%0
مسحة بلعوم	8	0	%0
مسحة مهبل	2	0	%0
مسحة جروح	2	0	%0
مسحة جلد	2	0	%0
المجموع	164	2	%1.2

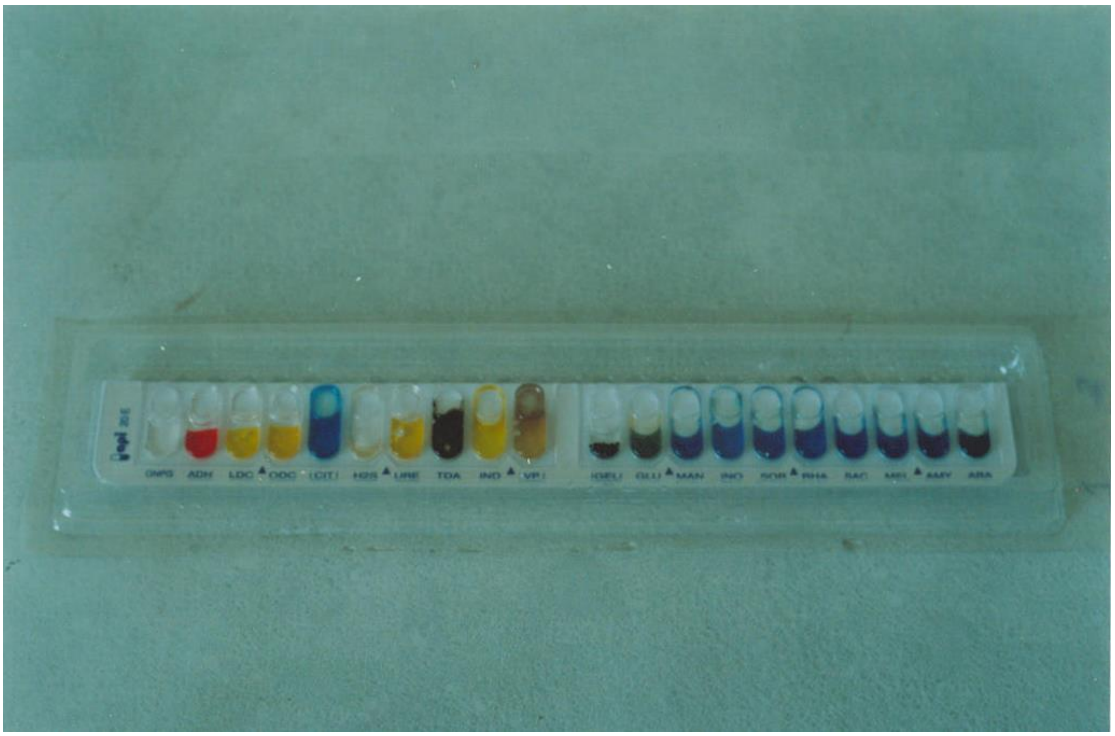
وقد تم عزل احد هذه العزلات من عينات الادرار والاخرى من عينات الحروق اعتمادا" على الاختبارات الزرعية والبايوكيمياوية المشار اليها من لدن Macfaddin (2000) و Holt *et al.* (1994) وكما هو موضح في الفقرة(2-2-2) A وBمن طرائق العمل حيث كانت النتائج مثلما هو موضح في الجدول رقم (2-3)

جدول (2-3) نتائج الاختبارات المظهرية والبايوكيميائية لبكتريا *Providencia*

التسلسل	الاختبارات	النتيجة
1	شكل الخلايا	عصوية
2	تفاعل الخلايا مع صبغة كرام	-
3	الحركة	+
4	النمو على وسط ماكونكي الصلب	+
5	النمو على وسط الدم الصلب	+
6	تحلل كريات الدم الحمر	-
7	النمو على وسط كلكلر	Acid/Acid
8	تخمر سكر اللاكتوز	- /اوتخمر بطيء
9	اختبار الكاتليز	+
10	اختبار الاوكسيديز	-
11	فحص الاندول	+
12	فحص احمر المثيل	+
13	فحص الفوكس بروسكور	-
14	فحص استهلاك السترات	+
15	انتاج غاز H_2S	-

ولغرض التأكد من تبعية العزلة لجنس الـ*Providencia* تم استخدم نظام التشخيص API 20 E ومثلما هو موضح في الفقرة (2-2-2) C من طرائق العمل .

إذ إن نظام التشخيص (API 20 E) يشمل جانبا" من الفحوصات البايوكيميائية المهمة في تشخيص البكتريا . ويتميز هذا النظام بسرعة الكشف عن البكتريا دون الحاجة الى الاوساط الزرعية المتعددة وكذلك يقلل عملية التلوث الزرعي . وقداعتمد هذا النظام للتأكد من صحة التشخيص للعزلة فكانت النتيجة مثلما في الشكل (1-3) .



شكل (1-3) نتائج نظام التشخيص API 20 E لعزلة *Providencia*

ومن الملاحظ من خلال نتائج هذه الدراسة ان معدل انتشار هذه البكتريا قليل اذا ماقورن بنتائج دراسات سابقة او بالمسببات البكتيرية الأخرى ،اذ تختلف النسب المئوية لعزل هذه البكتريا من دراسة لأخرى لاسباب منها وقت جمع العينات والاختلاف في عدد العينات المأخوذة والتباين في طرائق التشخيص المتبعة.

وقد وجد ان هناك تقاربا" في معدل انتشار هذه البكتريا ،اذ بلغت نسب الإصابة بهذه البكتريا بين مرضى وحدات العناية المركزة في أحد مستشفيات المملكة العربية السعودية(0.39%)(Abussaud ,1991) .

وفي دراسة أخرى لـ Orrett (1999) اجريت في مستشفى Trinidad في الهند تم عزل 3 عزلات (4%) من بكتريا *Providencia*من مجموع (74) عينة.

في حين كان هناك اختلاف عن النتيجة التي توصل اليها Akbas *et.al* (1998) اذ سجلت اعلى تكرار لاصابات الـ*Providencia* في تركيا وبنسبة (12.1%) .وكذلك دراسة Yasuoka *et al.* (1992) في اليابان اذ كانت بكتريا *Providencia* ثاني اعلى مسبب لاصابات الجهاز البولي وبنسبة(12.8%).

ان نسبة عزل هذه البكتريا تكاد تكون تكون قليلة اذا ماقورنت بالمسببات المرضية اذ تأرجحت بين(0 ــ 2.4%)

(National Committee of Clinical Laboratory Standards ,1993)

اما الدراسة التي اجراها Arslan(1999) فكانت نسبة عزل بكتريا الـ*Providencia* المعزولة من مسحات الحروق هي (10%).

وذكر Swiatlo *et al.* (1987)ان اكثر المناطق في جسم الانسان استيطانا" لبكتريا *Providencia* هي منطقة الجهاز البولي والتي من الممكن ان تبقى فيه مدة طويلة قد تصل إلى أربع سنوات .وهذا ما أكدته دراسة أخرى قام بها Woods and

Watanakunakorn (1996) اثبت من خلالها ان الجهاز البولي هو مصدر لحالات تجرثم الدم ببكتريا الـ*Providencia* وبنسبة عالية جدا" .

ويتضح من خلال النتائج المستخلصة في هذه الدراسة إن إصابات الجهاز البولي هي مصدر هام لعزل بكتريا الـ*Providencia* وتتفق هذه النتيجة مع ماذكره Mobley *et al.* (1988) من ان *Providencia* مسبب هام لاصابات الجهاز البولي الناتجة عن عدوى المستشفيات .وكذلك الدراسةالتي اجراها Hollick *et al.* (1984) التي اشارت الى ان *Providencia* هي من ممرضات الجهاز البولي الهامة ولكن نسبة تكرارها قليل اذا ماقورنت بالمسببات الاخرى .

وقد تم عزل هذه البكتريا من حالات الحروق وهي المصدر الثاني للإصابة بهذه البكتريا وتتفق هذه النتيجة مع ماذكره Rollins and Joseph (2000) من ان بكتريا الـ*Providencia*من الكائنات التي يتكرر استيطانها في الجروح الناتجة عن الحروق، اذ ان مرضى الحروق يكونون اكثر عرضة" للإصابة بهذه البكتريا (Lautenbach,2002). كذلك أشار إلى الملاحظة نفسها كل من Hyams *et al.* (1974) والذي اكد اشتراك هذه البكتريا في إصابات الحروق .

2-3 تأثير بعض المضادات الحيوية في بكتريا *Providencia*

درس تأثير عدد من المضادات الحيوية في عزلات بكتريا *Providencia* وقد استخدمت المضادات الحيوية الريفامبسين (RA) والسبروفلوكساسين(CIP) والامبسلين (AMP) والاموكسلين (AMX) والجنتامايسين(GM) والتراي مثبرام (SXT) والببراسلين(PRL) والكلندامايسين (CN) و السيفوتاكسام (CFM) وكما هو موضح في الفقرتين (1-3-2-2) و (2-3-2-2) من موادالعمل وطرائقه .وكانت النتائج مثلما موضحة في جدول رقم (3)

جدول (3-3) نتائج مقاومة بكتريا*Providencia* للمضادات الحيوية :

العينـــات / المضـــادات	1	2
الريفامبسين	+	+
السبروفلوكساسين	-	-
الامبسلين	+	+
الاموكسلين	+	+
الجنتامايسين	+	+
التراي مثبرام	+	+
الببراسلين	+	+
الكلندامايسين	+	+
السيفوتاكسام	+	+

(+) مقاومـــــــــــــــة (-) حساســـــــــــــــة

وقد لوحظ ان العزلتين كانتا مقاومتين لجميع المضادات الحياتية قيد الدراسة ماعدا السبروفلوكساسين اذ كانت حساسة بدرجة كبيرة جدا"،وكذلك يمكن ملاحظة ان نسق المقاومة متماثل يعطي الصورة بأن مصدر العدوى بهاتين العزلتين قد يكون هو مصدر واحد .

مما يبدو جليا" من الجدول رقم(3-3) ان العزلتين كانتا مقاومتين للبيبراسلين والامبسيلين والاموكسلين والعائدة الى مجموعة B-lactams .

وهي بذلك تتفق مع النتيجة التي توصل اليها Akbas *et al.*(1998) في قابلية بكتريا *Providencia* على مقاومة الامبيسلين والبيبراسيلين بنسبة عالية ، وذلك من خلال انتاج هذه البكتريالانزيمات B-lactams التي تعمل على حلقة B-lactam التي تدخل في تركيب البنسلينات والسيفالوسبورينات ذات المدى الواسع. (O·Hara *et al.*,2000) .

وبين Arslan(1999) مقاومة بكتريا الـ*Providencia* للبيبراسيلين بنسبة عالية قد تصل الى 94% وهي بذلك تطابق ماتم التوصل اليه في الدراسة الحالية .

ويلاحظ كذلك مقاومة العزلتين للمضاد الحياتي سيفوتاكسام وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليها.*Arslan et al* (1999) اذ ذكران مقاومة بكتريا *Providencia* لهذا المضاد قد بلغت نسبة (94%) من العزلات.

وقد اشارالى الملاحظة نفسها.*Kolar et al* (1999) حول مقاومة بكتريا *P.rettegeri* للجيل الثالث من السيفالوسبورينات والتي من ضمنها السيفوتاكسام .

في حين لاحظ .*Akbas et al* (1998) في دراسته مقاومة بكتريا الـ *Providencia* انها معتدلة في مقاومتها لهذا المضاد اذ كانت بنسبة(50%).وتعود قابلية مقاومة بكتريا*Providencia* لهذا النوع من المضادات من خلال إنتاجها أنزيمات بيتالاكتاميز من نوع TEM.(Franceschini *et al*.,1998) .

كذلك تم استخدام مضادات حيوية تعود الى مجموعة Aminoglycoside وهي الجنتامايسين وكلندامايسين والتراي مثبرم حيث ابدت بكتريا الـ*Providencia* مقاومة ضد الانواع الثلاثة من المضادات الحيوية ، وهذه النتيجة تتفق مع ماذكر.*Hyams et al* (1974) حول المقاومة النسبية لبكتريا *Providencia* لجميع مضادات مجموعةAminoglycoside.اذ تمتلك بكتريا الـ*Providencia* انزيمات محورة للكلايكوسيدات الأمينية وهي واحدة من اليات مقاومة الكلاكوسيدات الأمينية التي تمتلكها البكتريا المقاومة لهذا النوع من المضادات ، وتمتاز هذه الآلية بمستوى عال" من المقاومة . (Macinga and Rather,1999)

وقد بين.*Akbas et al* (1998) ان نسبة مقاومة بكتريا الـ*Providencia* النالمضاد الحيوي الجنتامايسين هي (91.2%) وللتراي مثبرام هي (94.1%) وهي نسب عالية تطابق إلى حد كبير النتيجة التي تم التوصل إليها في الدراسة الحالية.

كما استخدم المضاد الحياتي السبروفلوكساسين التابع الى مجموعة Quiniolones وكان تأثيره كبيرا" في بكتريا الـ*Providencia* اذ أظهرت العزلتان قيد الدراسة حساسية كبيرة تجاه هذا المضاد ، وتتفق هذه النتيجة مع ما أشارت إليه عدد من الدراسات الى حساسية بكتريا الـ*Providencia* لمجموعة Quiniolones .

اذ ان السبروفلوكساسين واحد من مضادات Quiniolones الاكثر فعالية ضد بكتريا *P.sturati* (O,Hara *et al*.,2000)

في حين بينت دراسة Cornaglla *et al*. (1995) تباين في حساسية الأنواع المختلفة من بكتريا الـ *Providencia* تجاه السبروفلوكساسين اذ بلغت نسبة حساسية النوع *P.sturati* (33.2%) وهي نسبة منخفضة مقارنة بنسبة الحساسية للأنواع الأخرى من الـ*Providencia* والتي كانت حساسيتها للسبروفلوكساسين بحدود (83%) .

وقد ذكر Akbas *et al*. (1998) إن نسبة الحساسية لبكتريا الـ*Providencia* ازاء المضاد الحيوي السبروفلوكساسين قد بلغت 61.8%.

وقد تم دراسة تأثير المضاد الحياتي الريفامبسين في عزلتي بكتريا الـ *Providencia* اذ لوحظ مقاومة العزلتين لهذا المضاد الحياتي، وهي نتيجة لاتتفق مع ما أشار اليه Kuzina *et al*. (2001) الذي ذكر حساسية بكتريا *Providencia* تجاه الريفامبسين .

لقد تطورت مقاومة الأنواع البكتيرية المختلفة لهذا المضاد الحيوي وبسرعة شديدة بالرغم من عدم استخدامه في معالجة الإصابات البكتيرية ،اذ يقتصر استخدامه في علاج التدرن الرئوي(Skelton,1999) .وربما تعود قابلية مقاومة الريفامبسين الى حدوث طفرات .

اذ إن جميع آليات مقاومة المضادات الحياتية نتجت عن الطفرات Mutations وإعادة الخلط Recombination واكتساب البلازميدات

Acquisition of plasmids.(Stanier *et al*., 1980) . وعندما تتولد المقاومة لمضاد معين في الخلية البكتيرية فأنها ممكن ان تنتقل إلى خلية أخرى وتكسبها المقاومة لذلك المضاد بأحدى الطرائق المتمثلة بالتحول والاقتران والتوصيل .

3-3 عوامل الضراوة

1-3-3 المحفظة البكتيرية

تم التحري عن امتلاك عزلة *Providencia* للمحفظة التي تحيط بالخلية البكتيرية وذلك باعتماد طريقة التصبيغ السالب والفحص المجهري وبحسب طريقة العمل الواردة في الفقرة (4-2-2) من مواد وطرائق العمل ، وقد بين هذه الفحص وجود هالة شفافة غير مصبوغة بالحبر الهندي حول الخلية البكتيرية وهذا دليل على وجود المحفظة .

وتسهم المحفظة في التصاق البكتريا والتقاط الغذاء ومقاومة عوامل المضيف الدفاعية (Robbins *et al*., 1980). ويعد وجود المحفظة أحد عوامل الضراوة الأساسية في البكتريا الممرضة ، فهي تحمي البكتريا في أثناء عملية الالتهام ثم إنها تعمل موانع تحول دون ارتباط عوامل الاستساغة بالغلاف الخارجي للبكتريا ومن ثم توقف عمل الخلايا البلعمية في جسم المضيف (Brubaker,1985).

2-3-3 الكشف عن التراص الدموي

تم الكشف عن التراص الدموي عن طريق مزج خلايا البكتريا مع خلايا كريات الدم الحمر للإنسان وبحسب طريقة العمل الواردة في الفقرة (5-2-2) وعدت النتيجة موجبة عند تلازن كريات الدم الحمر.

اعطت عزلتا *Providencia* قيد الدراسة تراصا" دمويا" لكريات الدم الحمر للإنسان إشارة الى احتوائها على بروتينات الالتصاق وهذا يتفق مع ما جاء في دراسة Cornaglia *et al*. (1995) الذي عزى قابلية بكتريا *P.sturati* على البقاء

في القثطرة البولية الى صفات الالتصاق المتخصصة لهذه البكتريا . ودراسة Lautenbach (2002) التي اشارفيها الى قابلية بكتريا *P.sturati* على البقاء في ادرار القثطرة البولية وهذا عائد الى التلازن بوجود سكر المانوزالشبيه للكلبسيلا (MR/K) الذي يتيح للبكتريا الالتصاق بالقثطرة البولية.اذ يلعب هذا النوع من التلازن دورا" في بقاء بكتريا*Providencia* والتصاقها في القثطرة البولية(Mobley *et al.*,1988) . وتتفق كذلك مع دراسة Jagielski *et al.* (1992)التي ذكرفيها امتلاك بكتريا *Providencia* تلازنا" دمويا" بوجود سكر المانوز (MRHA).

ان عوامل الاستعمار مثلما هو معروف عبارة عن تراكيب هدبية بروتينية ذات طبيعة استضدادية تتمركز على سطح الخلية وهي تراكيب صلبة او تكون عبارة عن تراكيب سلكية مرنة (Wirey flexible structure) وتتصف هذه الاهداب بكونها تتصف بالمضيف ولها استقلالية مصلية (الزعاك،1994) .

اذ اشارOld and Adegbola (1982) الى انتاج انواع Proteae تلازنا" دمويا"وتقسم الى ثلاثة انواع (MS,MR/K, and MR/P) ويمكن لهذه البكتريا ان تنتج نوعين او ثلاثة انواع من انماط التلازن الدموي عند تنميتها في وسط زرعي واحد أو أوساط مختلفة ،ويظهر من خلال الفحص المجهري للبكتريا المنتجة للتلازن الدموي أن هناك ستة أنواع مختلفة من الاهداب ، ترتبط هذه الأنواع المختلفة بنمط التلازن الدموي .وان انتشار أنماط التلازن الدموي والاهداب في الأنواع الثلاثةللـProteae يكون اكثر تعقيدا" مما هو موصوف في الأجناس الأخرى من العائلة المعوية .

3-3-3التحري عن انتاج الهيمولايسين وقابلية البكتريا في تخليق السايدروفورات

يعد وجود الحديد حاجة غذائية مهمة للخلايا الحية ، والحديد غير متوفر بشكل جاهز إذ إن الأحياء المجهرية الغازية لا تستطيع الحصول عليه بسهولة ،

ويعد توفرالحديد بشكل يصعب استغلاله من قبل البكتريا بصورة مباشرة هي أحدى الطرائق الدفاعية المهمة للمضيف(Weinberg,1978) .

تمتلك الكائنات المجهرية عدة اليات لغرض الحصول على الحديد من المضيف منها إنتاج الهيمولايسين او إنتاج مركبات لها القدرة على سحب الحديد مثل السايدروفورات (Neilands,1995) أو تكون قادرة على الافادة من الحديد المتوفر في الأنسجة المتضررة من جسم المريض بصورة مباشرة (Ward *et al.*,1986).

لذا تم التحري عن قابلية سلالات بكتريا *Providencia*على إنتاج الهيمولايسين البكتيري مثلما تمت الإشارة إليه في طرائق العمل الفقرة (6-2-2) وظهر عدم قدرة العزلتين قيد الدراسة على إنتاج الهيمولايسين في وسط الدم الصلب الحاوي على دم الإنسان مما يدل على عدم قابلية هذه البكتريا على إنتاج هذا العامل المهم في إحداث الامراضية .وهذا يتفق مع ما أشار إليه Senior and Hughes (1988) بخصوص عدم قابلية سلالات *Providencia* على انتاج الهيمولايسين .

وهناك عدة احتمالات لعدم قدرة البكتريا على انتاج الهيمولايسين منها ان فعالية الهيمولايسين يحكمها اوبرون يتكون من أربعة جينات وتشترك هذه الجينات معا" في التعبير عن إنتاج الهيمولايسين وقد يوجد بينها جين واحد غير فاعل في التعبير عن هذا الإنتاج مما يؤدي بالتالي آلي عدم قدرة البكتريا على إنتاج الهيمولايسين (الزعاك،1994) .

ويعد الهيمولايسين من العوامل المسهمة في الامراضية وأحد العوامل المهمة التي تنتجها البكتريا للحصول على الحديد(Payne,1988) .ومع ذلك فأنه قد لايؤدي دورا" في الإصابات المعوية وحالات الأسهال التي تسببها البكتريا مثل الاشيرشيا وضمات الكوليرا لانها غالبا" ماتكون منتجة للذيفانات المسؤولة عن احداث الاصابة

وفي الوقت نفسه فان البكتريا لاتخترق الانسجة بنفسها،في حين قد يكون هذا العامل مهما" عندما تغزو البكتريا الانسجة تحت المخاطية لتصل الى الدم (Ketyi,1984).

وقد اختبرت قابلية عزلتي بكتريا *Providencia*على تخليق انظمة نقل الحديد المتمثلة بالسايدروفورات وذلك بتنميتها على وسط M_9 الذي يحتوي على 200 مايكرومول من مركب Dipyridyl .ودونت النتيجة على اساس وجود النمو(+)او عدم وجوده(–)وكانت نتيجة الاختبار موجبة لهاتين العزلتين.

وهذا يتفق مع ماأشار اليهRollins and Joseph (2000) في قابلية افراد العائلة المعوية وبضمنها *Providencia* على انتاج السايدروفورات .

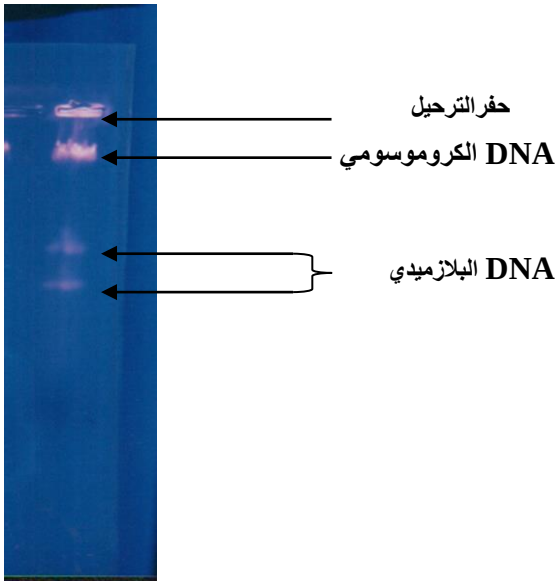
وقد ذكر Drechsel *et al.* وجماعته (1993) القابلية العالية لانتاج السايدروفورات التي تتمتع بها بكتريا ***Providencia.***

ان الدور الذي يدخل فيه الهيمولايسين والسايدروفورات بوصفهما عاملي ضراوة يساعد في حدوث الاصابة يكون غير واضح تماما" ، إلا انه توجد دلائل تشير إلى إن وظيفة الهيمولايسين تكمن في تزويد الأحياء المجهرية بما تحتاجه من الحديد ، أما أهمية السايدروفورات بوصفه عامل ضراوة فيأتي من خلال قابليته على جعل البكتريا قادرة على اجتياز الفعل المضاد للبروتينات الناقلة للحديد التي بدورها تحد من كمية الحديد المتوافر لنمو هذه البكتريا داخل الجسم (Valvano *et al*., 1986).

4-3 التحري عن وجودالـ DNA البلازميدي

تم التحري عن المحتوى البلازميدي للعزلة البكتيرية *Providencia* وباستخدام طريقة Kado and Liu(1981) اذ حضرالـ DNA الكلي بواسطة طريقة

Salting out (Pospiech and Neuman,1995) مع بعض التحويرات مثلما تمت الإشارة إليه في الفقرة (2-2-8) من طرائق العمل .ومن الشكل (2-3) تبين احتواء العزلة البكتيرية على بلازميدين



شكل (2-3) يبين نتائج الترحيل الكهربائي لعزلة *Providencia*

وهذه النتائج تتفق مع ماذكره الباحثون ،إذ أشار Hawkey *et al.* (1985) إلى احتواء بكتريا *P.stuarti* على بلازميد اقتراني وزنه الجزيئي (47kb) ينتقل عن طريق الاقتران إلى سلالات *P.stuarti* الخالية منه وينقل إليها صفة المقاومة للمضاد الحياتي الكاربنسلين ، أما المقاومة للجنتامايسين فأنها لم تنتقل ويبدو ان الجينات الخاصة بالمقاومة لهذا المضاد موجودة على الكروموسوم .

كذلك اوضحت الدراسة نفسها ان السلالات الحساسة للكاربنسلين او التي لا تمتلك هذا البلازميد تحتوي على بلازميد خفي (cryptic plasmid) بوزن جزيئي (36kb) ويرتبط بقوة بالبلازميدات الخفية ذات الاوزان الجزيئية (32kb) و (34kb) والمذكورة سابقا" في *P.stuarti* . كذلك تحتوي سلالات *P.stuarti* على الجين القافز Tn*1* الذي يشفر لانزيم TEM-lactamase .

وقد بين Silva (1998) في دراسته للمحتوى الوراثي لـ 36 عزلة من بكتريا *P.alcalifaciens* احتواء (16) عزلة منها على بلازميدات يتأرجح عددها بين (5-1) بلازميد اما أحجامها فتتأرجح مابين(kb174-9.5) بينما كانت بقية العزلات غير حاوية على بلازميدات .

إن تقنية النسق البلازميدي تعد واحدة من التقنيات الجزيئية المستخدمة في علم الوبائيات الجزيئي التي من خلالها تتم معرفة مدى التقارب بين العزلات المعزولة من حيث المنشأ او مصدر العدوى وكذلك يمكن من خلال هذه التقنية معرفة مدى انتشارها في البيئات المختلفة ، ومع ذلك فان هذه التقنية لم تعد كافية مالم تدعم بتقنيات أخرى مثل تقنية بصمة البلازميد والتهجين التي تثبت ان البلازميدات ذات النسق الواحد متماثلة من حيث الحجم الجزيئي وعدد النيوكليوتيدات وكذلك نوع الجينات الموجودة فيها

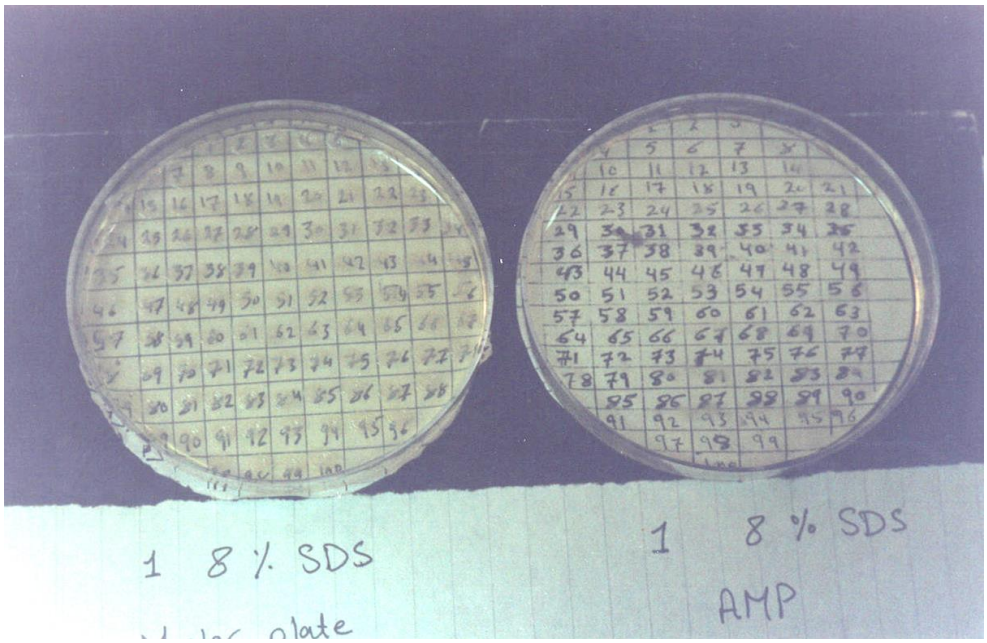
5-3 تحييد البلازميدات

تم إجراء تحييد البلازميدات التي تم الكشف عنها وذلك باستخدام المركب الكيميائي(Sodium Dodecyl Sulfat) (SDS) ،ومثلما تمت الإشارة إليه في الفقرة (2-2-10) من مواد العمل وطرائقه .اذ عوملت العزلة بـSDS وتم تحديد التركيزالامثل الذي أدى إلى تحييد البلازميدات في العزلة ، وبعد ذلك تم تنمية العزلة في الوسط المغذي الصلب Nutrient agar وتم انتخاب(100) مستعمرة ونقلت إلى أوساط زرعيه انتقائية حاوية على المضادات الحياتية بطريقة (Picking and Patching) حيث كانت النتائج مثلما في الجدول(4-3) الشكل(3-3).

جدول(4-3) مقارنة نتائج مقاومة بكتريا *Providencia* للمضادات الحيوية قبل وبعد تحييد البلازميدات

العزلة / المضادات الحيوية	قبل التحييد	بعد التحييد
الامبسلين AM	+	-
الجنتامايسين GM	+	+
التراي مثبرام TM	+	+

+ مقاومة - حساسة



شكل(3-3) يبين نتائج تحييد البلازميدات

أما عدد المستعمرات النامية فهي موضحة في الجدول(5-3) .

جدول(3-5) تأثير SDS في تحييد البلازميدات لبكتريا *Providencia*.

عدد المستعمرات النامية في الأوساط الانتقائية بعد استخدام الزرع بوجود SDS		
GM	TM	AM
100	100	75

تم زرع (100)مستعمرة ونقلت بطريقة(Picking and Patching) الى الاوساط الانتقائية الحاوية على المضادات الحياتية الملائمة .

GM :-الجنتامايسين (100مايكروغرام/ مل).

TM :-التراي مثبرام (25مايكروغرام / مل).

AM :- الامبسيلين (100مايكروغرام / مل).

وتشير النتائج التي تم التوصل اليها في هذه الدراسة إلى إن تركيز(SDS)المحييد لبكتريا الـ*Providencia* (8%) .

اذ ان المركب الكيميائي (SDS) فعال في تحييد البلازميدات وهذا يتفق مع دراسة الشكري (2002) التي اشارت الى فقدان كامل لبلازميدات العزلات المعاملة بهذا المركب .

وان معاملة الخلايا البكتيرية بمركب (SDS) يسبب اختزال في ضراوة البكتريا المرضية من خلال تأثيره في تقليل مستوى RNA والكاربوهيدرات الخلوي وتأثيره في فعالية انزيم البروتيز واليوريز .اذ يسبب هبوطا" حادا" لها . (Iwalokun *et al*.,2004).

ومن خلال النتائج المستخلصة في هذه الدراسة نجد حصول تغير في مقاومة العزلة البكتيرية المحيدة تجاه الامبسيلين بينما لم تتأثر مقاومتها للجنتامايسين وللتراي مثبرام ، مما يدل على إن الجين المسؤول عن صفة المقاومة للامبسلين محمول على البلازميد بينما تحمل الجينات المسؤولة عن صفة المقاومة لكل من الجنتامايسين والتراي مثبرام على الكروموسوم وليس على البلازميد . وهذا

يتفق مع ماذكره Macinga and Rather (1999) اذ أشارا إلى وقوع الجينات المشفرة لانتاج انزيمات (N-acetyltransferase) المقاومة للكلاكوسيدات الأمينية في بكتريا*Providencia* على الكروموسوم ثم ان هناك احتمالية ان تكون صفة المقاومة لهذه المضادات بنسختين محمولتين واحدة منها على البلازميد،والاخرى على الكروموسوم ،او قد تقع على جين قافز.

الفصل الرابـع
الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات :

1- امتلاك بكتريا *Providencia* عددا" من عوامل الضراوة مما يؤهلها للانضمام الى مجموعة البكتريا الممرضة للانسان .

2- ان عزلات بكتريا *Providencia* مقاومة للعديد من مضادات الحياة المستخدمة في العلاجات الطبية .

3- عد السبروفلوكساسين من العلاجات الفعالة ضد بكتريا *Providencia*.

4- احتواء بكتريا *Providencia* على اكثر من بلازميد واحد .

5- لمركب SDS القدرة على تحييد البلازميدات الموجودة في بكتريا *Providencia*.

التوصيات :

1- استمرارالتحري عن مدى انتشار هذه البكتريا في الاصابات المختلفة وفي البيئات الأخرى والتي من الممكن ان تتواجد فيها .

2- تقسيم العينات الى مجاميع والتحري عن ايهما معرض للأصابة أكثر الذكور ام الاناث ام الأطفال ومعرفة السبب .

3- امكانية استخدام الاجيال الجديدة من المضادات الحياتية في معالجة الإصابات التي تحدثها هذه البكتريا لاسيما ان هذه البكتريا ابدت مقاومة لأكثر من واحد من المضادات الحياتية الشائعة الاستخدام .

4- دراسة قابلية انتقال البلازميدات بين سلالات النوع الواحد او بين سلالات الأنواع المختلفة لبكتريا *Providencia*.

5- امكانية استخدام تقنيات جزيئية اخرى مثل طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) للكشف عن الجينات الموجودة في المحتوى الوراثي لهذه البكتريا.

المصــادر

References

المصادر العربية

- البكري ،غالب حمزة (1991) .مبـاديء الهندسـة الوراثيـة.جامعـة البصـرة .

- الزعاك ، علي (1994) .البايلوجي الجزيئي لضراوة البكتريا .الطبعة الاولى . جامعة بغداد .

- السعيد ، محمد صبري (1997) . النسق الوراثـي لبكتريـا الجهـاز التنفسـي الهوائية . أطروحة دكتوراه ،جامعة بغداد ،كلية العلوم .

- الشكري ،ميساء صالح مهدي (2002) .دراسة وراثية مرضية لبعض عزلات بكتريـا *Acinetobacter* المعزولـــة من اصابـات مرضيـة في مدينـة الحلـــة . رسالة ماجستير. كلية العلوم .جامعة بابل .

Refernces

- Abussaud, M.J.(1991) .Prevalence of nosocomial infections in a Saudi Arabian teaching hospital .J.Hosp.Infect. 17(3) : 23-28.
- Akbas ,E.;Aktepe,O.C.;Levent ,B.;DalkilinC,I.;and Guvener,E.(1998). *Providencia spp* in nosocomial urinary infection .Turk--ey. J. Med. Sciences 28 : 61-66 .
- Albert, M .J. ;Faruque,A.S.;and Mahalanabis ,D.(1998).Association of *Providencia alcalifaciens* with diarrhea in children . J . Clin .Microbiol . 36 (5) : 1433-1435 .
- Amyes, S. G. and Gemmel,C.G, (1997) Review articlo antibiotic resi--stance .J . Microbial . leb :436-470 .
- Anderson,J. R. (1980).Muir's Textbook of Pathology ."11th edition" . Edward Arnold Publication,London .1112 p.
- Anderson,P. Davies,J.and Davis B.D. :(1967) Effect of Spectinomycin on polypeptide synthesis in extracts of *Escherichia coli* .J. Mol.Biol.29 203-215 .
- Arslan , E.; Dalay ,C.; Yavuz ,M. ; Gocenler , L. ; Acarturk .S. (1999). Gram-Negative bacterial survellace in burn patient.annals of Burn and Fire Disesters .XII(2) .
- Atlas ,R.M. ;Park,L.C. and Brown, A.E.(1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology .1st ed.Mosby,Inc.Missonuri.
- Bahar ,G.; Erac ,B.; Mert ,A.; and Gulay ,Z. (2004) .PER-1 production in A urinary isolate of providencia rettgeri .J. Chemother. 16(4) : 343-346 .
- Baron , E . J .; Peterson , L. R . and Finegold , S.M. (1995) .Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology . "9th edition " The C.V. Mosby company , U . S . A.

- Barry, A. L. and Thornsberry, C. (1985). Susceptility Tests. Diffusion test Procedures . P : 978-87.In: Lennett, E. H. ;Balows , A. ;Hausler ,W.D.and Shadomy ,H .J.(eds.).American Society For Microbiology.Washington D.C.
- Biering - Sorensen ,F. ; Bagi,P. ; and Hoiby, N. (2001) .Urinary tract Infections in patiants with spinal cord lesions:treatment and prevention .Drug.61(9) :1275-1287 .
- Brown,A. E.;Parks,L. C. and Atlas,R.M.(1995). Laboratory manual of Experimental microbiology .Mosby-year Book,Inc.
- Brubaker, R. P. (1985) . Mechanisms of bacterial virulence . Ann.Rev. Microbiol . 39: 21-50 .
- Chimura ,T.;Hirayama,T.;and Nakahara ,M.(1993) .*In vitro* antimicro--bial activites of lactoferrin , its concomitant use with cefpodoxime proxetil and clinical effect of cefpodoxime proxetil .Jpn.J. Antibiot. 46(6) : 482-485 .
- Clarke, A. J.; Francis,D.; Keenleyside,W. J. (1996) .The prevalence of Gentamicin 2-N-acetyltransferase in the Proteeae and its Role in the O-acetylation of peptidoglycon .FEMS.Microbiol . Leet. 145(2) :201-207 .
- Clouthier , S. C. ; Collinson , S. K . ; and Kay ,W.W. (1994) . Unique fimbriae -like structure encoded by Sef D of the SEF14 fimbrial gene cluster of salmonella enteritidis .Mol. Mi--crobiol .12(6) :893-901.
- Collee , J.G. Fraser , A.G . ; Marmian ,B.P. and Simmon S. A. (1996). Mackie and McCartney.Practical Medical Microbiology "14th edition " The churchill Livingston .Inc.,U.S.A.
- Collier, L. ; Balows,A. ;and Sussman, M. (1998) .Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections ."9th edition"

Vol. 2. USA, Oxford University Press. Inc., NewYork :1046-1048 .

- Cornaglia, G. ;Frugoni ,S. ;Mazzariol,A. ;Piacentini,E. ;Berlusconi, A. ; and Fontana , R . (1995) .Activities of oral antibiotics on *Providencia* strians Isolated from Institutionalized elderly Patients with urinary tract Infections. Antimicr--obial Agent Chemotherapy . 39(12) : 2819-2821 .
- Cryze ,S.;Furer,E.;and Germanier,R.(1984).Exopermental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis : Role of capsular Pol--ysaccharide . Infect . Immun . 43(9) : 440-441 .
- Curiale,M. S.; and Mills,D.(1982) .Integration and partial excision of a cryptic plasmid in Psudomonas syringae pv. Phaseolic--ola. J.Bacteriol.152 (2) :797-802 .
- D'Orazio,S.E.;Collins,C.M.(1993).The plasmid- encoded urease Gene Cluster of the family Enterobacteriaceae is positively regulated by ure R,amember of the AraC family of tr--anscriptional .J. Bacteriol .175(11) : 3459-3467 .
- Dale,J.W. (1998).Molecular Genetics of Bacteria .3rd .John -Wiley and Sons ,Inc .,NewYork .
- Damron,D.J.;Warren,J.W.;Chippendale,G. R.;and Tenney,J.H. (1986). Do clinical microbiology in urine from patients with long -term urinary catheters ? Clin .Microbiol .24:400 -404.
- Dealler, S..; Hawkey,P.M.;Millar,M.R.(1988) . Enzymatic degradation of urinary indoxyl sulfate by of *providencia stuartii* and *klebsiella pneumoniae* causes the purple urine bag syndrome. J. Clin Microbiol .26(10) : 2152-2156 .
- Deboy ,J.;Wachsumth ,K and Davis,B. (1980). Heamolysin activity In

enterotoxigenic and non - enterotoxigenic strians of *E* . *coli*.J . Clin. Microbiol . 12:193-198 .

- Domenico,P.;Schwartz,S.;and Cunaha,B.(1989).Reduction of Capsul--ar polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate . Infect . Immun .57: 3778 - 3782.
- Drechsel,H .;Thieken, A.Reissbrodt, R.;Jung,G . ;and Winkelmann, G. (1993) .Alpha-keto acids are novel siderophpres in the genera *protus* , *Providencia* and *Morganella* and are produced by amino acid deaminases.J.Bacteriol.175 (9) : 2727-2733 .
- Fain-Ghironi,N. ;Le Gonidec,P. ;and Schaeffer,M.(2003) .Purple urine bag syndrome .Presse.Med .14;32(21):985-987.
- Farmar , J. J. 3rd ; Hickman , F. W. ; Benner , D. J. ; Schreiber ,M . ; Rickenbach , D. G.(1977) .Unusual enterobacteriaceae "*protus rettgeri*" that "change" into *providencia stuartii* . J.Clin Microbiol .6(4) : 373-8 .
- Foster ,T.J.: (1983) .Plasmid-derived resistance to antimicrobial agents . Microbiol. Rev.47: 361-409 .
- Franceschini,N. ;Perilli ,M. ;Segatora ,B. ; Setacci ,D.; Amicosante,G. ; Mazzariol ,A.; and Cornaglia ,G.(1998) .Ceftazidime and aztreonam resistance in *Providencia sturatii*. Cha--racterization of natural TEM-derived extended spect--rum B-Lactamase , TEM-60 .J .Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42(6) : 1459-1456 .
- Garcia,A.; Gerner - Smidt , P.and Brea ,L. M. (1997). Epidemiological study of *Acinetobacter species* isolated from a intensive care unit .J. APMIS.105:131-138 .
- Greenwood ,D.;Slack,R .and Peuthere ,J.(1997) .Medica Microbiology

.Fifteenth ed .NewYork .64-65 .

- Gruing ,H.; and Lebec,G.(1985) .Constitutive of iron chelate Inducible Hemolysin production in *Escherichia coli* Experimen--tia 41: 334-539 .
- Guth , B .E.; and Perrella , E .(1996) .Prevalence of invasive ability and Other virulance –associated characteristics in *Providencia alcalifaciens* strains isolated in Sao Paulo , Brazil .J.Med . microbiol .45(6): 459-462 .
- Hacker,T. ; Hof, H. ; Huges, C.; and Eoeble, N. (1985) .*Salmonella typhimurum* strians carring hemolysin plasmid and cloned hemolysin gene from *Escherichia coli*. Ann. De. Microbiol (Paris) . 136A :289-301 .
- Hawkey , P. M.; Bennett,P. M. ;and Hawkey, C. A. (1984) .Cryptic Plasmids in hospital isolates of *providencia stuartii*. J. Med. Microbiol.18:277-284.
- Hawkey, P. M. ; Bennett ,P.M. ; and Hawkey ,C.A .(1985) . Evolution of An R plasmid from acryptic plasmid by transpositi--on of two Copies of Tn1 in Providencia sturatii .J. General Microbiology . 131: 927-933 .
- Hickman –Brenner,F.W.;Farmer,J.J.3rd ;Steigerwalt ,A.G.;Brenner, D.J.(1983) .*Providencia rustigianii* : a new species in the family enterobacteriaceae formerly known as *P* . *alcalifaciens* biogroup 3 .J.Clin Microbiol .17(6):1057 -1060 .
- Hollick ,G.E .;Nolte .F.S .;Calnan ,B.J.; Penner ,J .L .; Batron ,L .J. ; and Spellacy .A .(1984). Characterization of endemic *Providencia sturatii* isolates from patients with urinary Devices .J.Clin .Microbiol .;3(6) :521-525.

- Holt , J.C. ; Krieg, N. R .,Sneath , A .; Stachley, J.T. and William S.T. (1994) .Bergy's manual of determinative bacterialogy. "9th edition " . Williams and Wiakins Publication . London , New York .
- Hull, S. I. ; Hul, R. A. Mishew,B. H. ; and Falcow, S. (1982) .Genetics of Hemolysin of Escherichia coli .J. Bacteriol .151:1006 -1012 .
- Hyams ,P.J. ; Simberkoff , M. S. ; and Rahal , J. J. (1974) .Synergy between Cephalosporin and aminoglycoside antibiotics against *providencia* and *protus* . Antimicrobiol Agents Chemotherpy 5 (6) :571-577 .
- Iakovlev,V. P.; Blatun,L.A.; Krutikov, M. G.; Puchkova,L.S.; Elagina, L.V. ; Izotova-GN. (1994) . A trial of using Cefobid (cefoperazone) in treating infections of the skin and soft tissues . Antibiot. Khimioter. 39(2-3): 57-60.
- Iwalokun, B. A. ; Olukosi,Y.A.; Adejoro, A.; Olaye,J. A.; Fashade, O. (2004).Comparative biochemical and molecular eval- -ution of swarming of Protus and effects of anti-swarm agents.African Journal of Biotechnology.3(1) :99-104.
- Jagielski , M .;Sztabinska-konch .H .; Rastawicki .W .; Szychi .J . Kaluzewski .S .; and Morzowska .A .(1992) .Occurance of p.fimbrii in strains from selected genera of Enteroba - -cteriaceae . Med .Dosw .Mikrobiol .44(3-4) : 97-107 .
- Johnston ,J . and Richmond ,M . (1970) . The increased rate of loss of Pencillinase plasmids from *Staphyllococcus aureus* in the presence of reifampicin J.Gen .Microbiol.60:137-139.
- Johnson , J. R.(1991).Virulence factor in *E .coli* urinary tract infection .clin . Microbiol . 4(1): 80-128 .

- Jones ,R. N.(1998).Important and emerging betalactamse-mediated resistances in hospital-based pathogens : the Amp C enzymes .Diag. Microbiol . Infect .Dis . 31(3) :461-466 .
- Kado , C. and Liu , S. T. (1981) .Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids .J. Bacteriol.145: 1365-1373.
- Katzung , B . (1989) . Basic and Clincal Pharmacology ,"4th ed". Appleton and Lang, California .
- Ketyi, I. ; (1984) . Non-toxin virulence factors of bacterial enteric Pathogens . Acta . Microbiol . Hung. 31: 1-25 .
- Knothe, H. ; Shah, P. M . (1992) . *In vitro* activity of cefodizime. Infection. 20 (1): S3-8.
- Kocka , F. E. ;Srinivasan , S.;Mowjood , M. Kantor , H. S. (1980) . Nosocomial multiply resistant *Providencia stuartii* : a long-term outbreak with multiple biotypes and sero--types at one hospital .J. Clin Microbiol . 11(2) : 167-169.
- Koh,C. L. (1986) .Antibiotic resistance and conjucative R plasmid in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Peninsular Malaysia .Trans .R Soc . Trop . Med. Hyg .80(1) :158-161.
- Kolar,M. ;Latal,T. ;and Hajek,V. (1999) .Development of bacterial resistance to the third generation cephalosporins and their clinical use.J.Chemother.11(4) :260-265.
- Kresken, M .; Hafner,D.; Mittermayer,H.; Verbist,L.;and Bergogne -Berezin , E . (1994) . Prevalence of fluoroquinolone resistence in Europe .Study Group 'Bacterial Resiste-

-nce' of the paul- Ehrlich-Society for Chemotheraby e. v. Infection. 2: s 90-8 .

- Kunin , C . M . ; Hua , T. H. ; and Bakaletz , L. O. (1995) .Effect of salicylate On expression of flagella by *Escherichia coli* and *Protus* , *Prvidencia* , and *psudomonas* spp.Infect. Immun. 63(5):1796-1799.
- Kuzina , L .V . ; Peloquin , J. J. ; Vacek , D. C.; Miller,T.A. (2001). Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies,Anastrepha ludens (Diptera: Tephritidae) .Curr Microbiol .42(4) :290-294 .
- Lambert,T.;Gerbaud ,G.; and Courvalin ,P.(1994) .Characterization of Transposon Tn1528 ,which confers amikacin resist --ance by Synthesis of aminoglycoside 3-o-phosphotra --nsferase type .Antimicrob .Agents .chemother .38 (4): 702-706 .
- Lautenbach ,E. (2002) Providencia infections .emedicine .
- Lee ,Y . (1999) Quniolone resistance : More than topoisomerases (Thesis) Seoul women's university , Seoul Korea .
- Levett,P.N.; Holt,H.A.;and McGowan,A.P.(1993) .Resistance tothird-generation cephalosporins in Barbados .West-Indian. Med-J. 42(2): 69-71.
- Livrelli,V.; De.Champs,C.; Di-Martino,P. ;Darfeulle,A. ; Forestier,C. ; Joly,B.(1996). Adhesive properties and antibiotic resis--tance of *Klebisella* ,*Enterobacter* , and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections.J.Clin.Micro-- biol , 34(8): 1963-1969 .
- MacFaddin, J. F.(2000) .Biochemical test for identification of medical Bacteria . "3rd edtion ". The Williams and Wilkins-

Baltimor . U.S.A.

- Macinga,D.R.; Rather,P.N.(1999). The chromosomal 2'-N- acetyltran--sferase of *Providencia stuartii*:physiological functions and genetic regulation. Front.Biosci. 1(4): 132-140.
- Marchandin ,H .; Carrieri ,C.;Sirot ,D.;Jean-pierre ,H.; and Darbas ,H . (1999) .TEM-24 produced by four different species of Enterobacteriaceae ,Including *Providencia rettgeri* , in A single patiant .J.Antimicrobial Agents and Chemoth--erapy . 43(8) : 2069-2073 .
- Martin , C. ; Orenga, S. ; Doleans , F. ; and Denis , F. (1995) .Value of media containing chromogenic substartes for the listing of urinary bacteria .Pathol.Biol (paris) .34(9) :749-753 .
- Martinez-Martinez, L. ; Suarez, A. I. ; Carranza, R. ; Perea, E.J.(1993) Ciprofloxacin resistance in gram negative bacilli.Epide--miologic Aspects .Enferm.Infecc.Microbiol. Clin.11(9) : 474-478 .
- Matsuo ,H .; Ishibashi ,T.; Arki,C.; Sakamaki ,H .; Mazume ,H .;Ueki ,Y.;Miyake ,S.; Tominaca ,Y. and Toyomura ,K .(1993). Report of three cases of purple urin pag syndrome whi--ch occurred with a combination of both *E .coli* and *M . morgani* Kansenshogaku . zasshi 67(5) : 487-490 .
- May ,J. ; Hougthon , R. ;and Perret ,C. (1964) .The effect of growth at elevated temperature on some heritable properties of *staphyllococcus aureus* .J. Gen. Microbiol. 37:157169 .
- McHale, P.J.;Keane,C.T.; and Dougan, G.(1981) .Antibiotic resistance in *Providencia stuartii* isolated in hospitals .J. Clin. Microb iol .13(6) : 1099-1104 .
- Miller,G. H. ; Sabatelli,F. J. Hara,R. S. ; Glupczynski,Y.; Mackey,P. ;

Shlaes,D; Shimizu,K.; and Shaw,K. J.(1997) .The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms – changes with time and geographic area : a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups .Clin .Infect. Dis .24 (1) : s 46- 62.

- Miniatis , T. ;Fritsch ,E .; and Sambrook ,J. (1982).Molecular Cloning ; Alaboratory Manual.Cold spring Harbour Laborat--ory . New York .
- Mobley , H . L . ; Chippendale ,G. R . ; Fraiman ,M. H. ; Tenney, J.H. ;Warren , J. W. (1985) .Variable phenotypes of *providencia stuartii* due to plasmid-encoded traits .J. Clin Microbiol .22(5) :851-853.
- Mobley,H.L.;Chippendale,G.R.; Tenney,J.H.; Mayrer,A.R.;Crisp,L.J.; Penner,J. L.; and Warren,J.W. (1988) . MR/K hema-- gglutination Of *Providencia stuartii* correlates with adherence to catheter- associated bacteruria. J.Infect . Dis.157(2) :264-271 .
- Mohr-O'Hara , C. ; Steigerwalt , A . G . ; Green , D. ; McDowell , M. ; Hill,B.C.; Brenner,D.J.; Miller,J.M.(1999) .Isolation of *Providencia heimbachae* from human feces .J.Clin . Microbiol .37(9) : 3048-3050 .
- Muller,H. E.; O'Hara,C. M.; Fanning,G. R. ; Hickman-Brenner, F. W.; Swenson,J.M.;and Brenner,D.J. (1986).*Providencia heimbachae*,a new species of Enterobacteriaceae isol--ateed from animales.Int.J. Syst.Bacteriol.36: 252-256.

- Murata ,T. ;Iida ,T; Shiomi ,Y.;Tagomori ,K.;Akeda ,Y.;Yanagihara ,I. ; Mushiake , S. ; Ishiguro , F. ; and Honda , T. (2001) . a large out break of food born infection attributed to *Providencia alcalifaciens* .J.Infect . Dis .184 (8) : 1050 -1055 .
- Nassif, X .; and Sansonetti, P. (1987) .Bacterial iron uptake synthesis : Their role in virulence .Bull .Inst. Pasteur. 85 :307-27.
- Nassif , X .; fournier,J.;Arnodel ,J. and SauSonetti ,P. (1989) . Mucoid phenotype of *Klebseilla pneumoniae* is aplasmid enco- -ded Virulence factor .J .Infect .Immun . 57(2):546-552 .
- National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) . (1993). Perfor mance standards for antimicrobial disk susceptibility test-5th Ed.Approved Standard. NCCLS Document M2-A5 13(24) .
- Neilands , J . B . (1995) . Siderophores : Structure and function of microbiol Iron transport compounds . J . Biological Chemistery .27 (45) : 26723-26726 .
- Neu,H. C. ; and Chin,N. X. (1994) . In vitro activity of the new floroq- uinolone CP-99,219. Antimicrob. Agents.Chemother. 38 (11) :2615-2622 .
- Nolte ,W . ; (1982) . Oral microbiology with basic microbiology and Immunology .19th (ed.) The C.V. Mosby company ST. Louis, Toronto, London .
- O'Hara, C.M.;Brenner,F. W. ; and Miller, J. M. (2000) .Classification , Identification ,and clinical significance of *Protus* , *Providencia*, and *Morganella* .Clin . Microbiol . Rev. 13 (4): 534-546 .
- Ofek,I.; Mirelmen,D.and Sharon, N.(1977) .Adherence of *Escherichia*

coli to human mucosal cells mediated by mannose receptors Nature. 265: 623-5 .

- Old , D.C.;and Adegbola ,R. A. (1982) .Haemagglutinins and fimbriae of *Morganella* ,*Proteus* and *Providenci* . J .Med. Mic--robiol .15 (4) :551-564 .
- Orrett ,F . A .(1999) .Prevalence of Protus species in urinary tract infe-ction in a regional hospital in Trinidad .chung .Hua .I – Hsuch - Tsa –chih –Taipei .62(7) :438-442 .
- Payne, S. ; (1988) .Iron and virulence in the family enterobacteriaceae. CRC. Crit .rev. Microbiol. 161(2) :81-104 .
- Pearson , A. ; and Lee , A. (2004) . *Protus* spp *Morganella morganii*, and *Providencia* spp bacteraemias , England , Wales , and Northern Ireland :2003 .CRD. Weekly .14(8) .
- Pelczar , M. J. and Chan , E. C. S. (1981). Elements of microbiology , McGraw-Hill,Inc.,U.S.A.
- Penner, J.L.;Hinton, N.A.;Whiteley, G.R. ;and Hennessy,J. N. (1976) . Variation in urease activity of endemic hospital strians of *Protus rettgeri* and *Providencia stuartii*.J.Infect.Dis. 134 (4): 370 –376 .
- Pickett,M. A. ;Everson,J. S. ;Pead, P.G.;and Clarke, I.N.(2005) .The plasmids of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydophila pnumoniae* (N16): accurate determination of copy num--ber and the paradoxical effect of plasmid-curing agents. Microbiology 151:893-903 .
- Pignato, S. ; Giammanco, G. M. ; Grimont, F. ; Grimont, P. A. ;and Giammanco, G. (1999) .Molecular characterization of the Genera *Protus*, *Morganella* , and *Providencia* by Ribotyping .J. Clin.Microbiol. 37(9) :2840-2847 .

- Pospiech,T. and Neumann,T.C. (1995). Plasmid isolation by alkaline and Potassium acetate precipitation .In:preparation and analysis of genomic and plasmid DNA .(Ed.Keser,T) Norwich .UK.
- Rahav , G.;Pinco, E .; Silbaq ,F.; and Bercovier , H .(1994) .Molecular Epidemiology of catheter – associated bacteriuria in nursing home patients .J .Clin . Microbiol .32 (4) :1031 - 1034 .
- Rather, P. N.; Orocz, E. S. ; Shaw, K. J. ; Hare, R. and Miller : (1993). Characterization and transcriptional regulation of the 2-N -acetyltraferase gene from *Providencia stuartii* .J. Bacteriol. 175: 6492-8 .
- Reissbrodt , R.; and Rabsch , W.(1988) . Further differentiation of ent--erobacteriaceae by means of siderophore-pattern ana--lysis.Zentralbl .Bakteriol.Mikrobiol.Hyg.[A] .268(3) : 306-317.
- Robbins , J.;Schneerson ,R .; Egan ,W.;Vann ,W . and Lin , D .(1980). Virulence properties of bacterial capsular polysacch--aride .p 115-132 .In Smith ,H . ;Schel ,J. and Turner, M . The molecular basis of microbial pathogeneticity Dahlm konferezen ,Weinheim , Germany .
- Rollins , D. M. and Joseph , S. . (2000) . BSCI 424 Pathogenic Micro-biolog -Enterobacteriaceae Summary.
- Rubin , S. ;and Rosenbium , E. (1971) . Effect of ethidium bromide on growth and on loss of Pencillinase of *Staphyllococcus aureus* .J.Bacteriol. 108 :1200-4 .
- Russell , A. D.; Suller ,M. T. E . and Maillard , J. Y. (1999) .Do antis--eptics and disinfectants select for antibiotic resistance,

J.Med . Microbiol . 48, 631-615 .

- Sambrook , J. ;Fritsch E . F.;and Miniatis ,T. (1989) . Molecular Clon--ing ,a laboratory manual ,2nd Spring Harbour Laborat--ory . New york .
- Schurtz, T. A. ;Hornick,D. B. ;Korhonen,T. K. ; Clegg, S. (1994) .The type 3 Fimbrial adhesion gene (mrkD) oF *Klebsiella* Species is not Conserved among all fimbriate strains. Infect.Immun.62(10): 4186-4191 .
- Sebghati,T.A.S.;Korhonen,T. K.; Hornick,D. B.; and Clegg,S. (1998) . Characterization of the Type 3 Fimbrial Adhesins of *Klebsiella* strains .Infect Immun. 66(6) :2887-2894.
- Senior, B . W. ; and Hughes. C . (1988) . Production of properties of haemolysins from clinical isolates of the Proteeae . J . Med .Microbiol. 25(1) : 17-25 .
- Shaw, K. J. Rather, P. N. Hare, R. S.and Miller G. H. (1993) . Molec –-ular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol .Rev.57:138-163.
- Shirani ,K .Z . ;McManus ,A .T .;Vaughan ,G .M .;McManus , W .F . ; Pruitt,B.A .Jr .;and M ason ,A .D .Jr .(1986) .Effect of environment on infection in burn patients.J.Arch.Surg. ;121(1) : 31-36 .
- Shlaes, D.M. ; Currie, C. A. (1983). Endemic gentamicin resistance R factors on a spinal cord injury unit . J . Clin Microbiol. 18(2):236-241.
- Shlaes ,D.M.;Lehman ,M .H.;Currie-McCumber, C.A.;Kim ,C.H.; and Floyd , R .(1986) .Prevalence of colonization with ant--ibiotic resistant gram-negative bacilli in a nursing home

care unit: the importance of cross-colonization as docu--mented by plasmid analysis . J . Infect .Control .; 7 (11) : 538-545 .

- Silva , M . S. B. (1998) .Genetic analysis of *Providencia alcalifaciens* (Enterobacteriaceae) .Genet.Mol.Biol. 21(2) .
- Skelton,J. (1999) .Micro Blk2 Rev.
- Snyder, L. ;and Champness,W. (1997) . Molecular genetics of bacteria "2nd edition". ASM. pres, Washington. D. C.
- Sobreira , M.; Leal , N. C .; Magalhaes, M . ; Guth , B . E . ; Almeida , A.M. (2001) . Molecular analysis of clinical isolates of *Providencia alcalifaciens* . J-Med – Microbiol . 50 (1) : 29-34 .
- Sonstein , A . ; and Baldwin , J. (1972) . Loss of Pencillinase plasmid after treatment of *Staphyllococcus aureus* with sodium dodocyl sulfate .J. Bacterial . 109: 265-292 .
- Stanier, R. Y. ; Adelberg, E. A. ; and Ingraham, J. L . (1980) .General Micro biology,4thed.,The Macmillan press Ltd.,London.
- Stickler ,D . ; Morris , M .C . ; and Sabbuba , N .(1998) .studies on the formation of crystalline bacterial bioflims on urethral catheters .Eur .J .Clin .Microbiol .infect . Dis .17 (9) : 649-652 .
- Stock ,I . ; Wiedemann , B . (1998) .Natural antibiotic suseptibility of *P. stuartii , P. rettgeri , P. alcalifacans* and*P.rustigianii* strains.J.Med Microbiol . 47(7) : 629-642 .
- Suzuki , Y. ; Ishihara , R . ; Ishii .Y.; Nakazawa , A . ; Deguchi , K .; Matsumoto,Y.;Nishinari,C.;Nakane ,Y.;and Fukumoto, T.(1996) . Antimicrobial activity of cefodizime against clinical isolates. Jpn-J-Antibiot. 49(10): 947-965.

- Swiatlo ,E .; Kocka . F . E .; Chittom ,A .L .; Kantor ,H . S . ; Gas ,S .; and Waiters ,L . (1987) . Survey of multiply resistant *Providencia sturatii* in achronic care unit . J .Hosp . Infect .9(2) : 182-190 .
- Talaro , K . and Talaro ,A .(1996) .Foundation in microbiology . Basic principles .Seconed edition.Mirror Higher Education Group , Inc. 9460 Keper Boulevard , Dubuqule , IA .52001 .
- Terai , A. ;Arai .Y.; Okada .Y .; and Yoshida .O . (1994) .urinary bact--eriology of continent urinary reserviors and calculus formation . Int .J .Urol .1(4) :332-336 .
- Thabaut, A. ; Meyran,M. ; Fabre,R. ; Dellamonica, P.; and Moreau, N. (1994) . Current status of resistance of bacteria to pefl--oxacin in hospital units.Cross resistance with ofloxacin and ciprofloxacin. Results of multicenter study. Pathol. Biol. Paris. 42(5) : 369-374.
- Threlfall,E. ; and Frost J.(1990) .The identification ,typing and epide –-miological applications.J.Appl. Bacteriol. 68(1): 5-16.
- Tumbarello, M. ;Citton, R. ; Spanu, T. ; Sanguinetti, M. ; Romano, L.; Fadda, G . ; and Cauda R. (2004) . ESBL-produsing multidrug –resistant *Providencia stuartii* infections in a university hospital .J.Antimicob Chemother . 53 (2): 277-282 .
- Urabaskova, P. ;Schindler, J. (1994) .Bacterial resistance to antibiotics in the Czech Republic .The Working Group for Mon--itoring Resistance in the Czech Republic . Cas. Lek. Cesk.133(1) : 10-4 .

- Valvano , M . A . ; Silver , R . P. and Crose, J . H . (1986) .Occurrence of Chromosome or plasmid mediated aerobacter in iro--n Transport system and hemolysin production among Clonal groups of human invasive strain of *Escherichia coli* KI.Infect. Immuno. 53(1) :192-199 .
- Valvano , M . A . (1992) . Pathogenicity and Molecular genetics of O-specific side – chain lipopolysaccharides of *E . coli* . J. Microbiol .38 :711-719 .
- Vatapolous , A . C . ; Kalapothaki .V . ; and Legakis , N . J . (1996) . Risk factors for nosocomial infections caused by gram-negative bacilli.The hellenic antibiotic resistance study group . J.Hosp .Infect .34(1) : 11-22 .
- Waites,K. ; Rand,K. ;Jenkins, S. ;Yangco, B. Brooking,E. ;Gaskins, D. Lewis,J. ;and Halkias,K. (1994) .Multicenter in vitro comparative study of fluoroquinolones after four years of widespread clinical use. Diagn . Microbiol . Infect . Dis.18(3) :181-189 .
- Ward , C. G. Hammond , J. S. and Bullen , J. J. (1986) . Effect of iron compounds on antibacterial function of human polym--orphs and plasma.Infect .Immuno .51(3) :723-730 .
- Weinberg ,E.D.(1978) .Iron and infection. Micromiol. Rev. 42: 45-66 .
- Weisser, J . ; and Wiedemann , B . (1986) . Eliminationof plasmids by enoxacin and ofloxacin at near inhibitory concentrations . J .Antimicrob Chemother.18(5) :575-583 .
- Whitfield ,C.;Roberts , I .S .(1999) .Structure,assembly and regulation of expression of capsules in *Eschierichia coli* . Mol . Microbiol . 31(5) : 1307-1319.
- WHO (2000) . Antimicrobial resistance : a global threat .Double issue.

No. 28 and 29 .

- Woods , T. D. ; and Watanakunakorn , C. (1996) . Bactermia due to *Providencia stuartii* : review of 49 episodes . South . Med . J. 89(2) :221-224 .
- Wooley, R. E. ; Dickerson,H.W.; Simmons,K.W.; Shotts, E.B.Jr ; and Brown,J. (1986) . Effect of EDTA - tris on *Esherichia coli* isolate containing R plasmids. Vet Microbiol . 12 (1) :65-75.
- Yamane, N.; Jones,R. N. ; Frei, R. ;Hoban,D. J. ; Pignatari, A. C. ; and Marco,F.(1994).Levofloxacin in vitro activity:results from an International comparative study with Oflox--cin and Ciprofloxacin .J. Chemother. 6(2):83-91.
- Yasuoka , A.;Hamabe ,S.;Tsuruta ,H.; Tomonaga,H.; Ogata ,H.; Koga, H.;Kohno ,S.;and Hara,K .(1992) .Analysis of urinary tract infections in hospitalizatized eldery patients with particular reference to the use of diapers . Kansensho--gaku .zasshi .66(12) : 1615-1620 .
- Yee, Y. C.; Muder, R. R. ; Hsieh, M. H. ; Lee,T. C. (1992) . Molecular epidemiology of endemic ciprofloxacin- susceptible and - resistant Enterobacteriaceae . Infect . Control . Hosp . Epidemiol .13 (12) : 706-710 .

اقطار التثبيط القياسية حسب (Barry and Thornsbverry, 1985;Atlas,1995)

.

المضـــــاد	قطر التثبيط بالملمتر		
	مقاومة R	متوسط المقاومة M	حساسة S
اموكسيلين	< 13	17-14	> 18
كلندامايسين	< 14	16-15	>17
جنتامايسين	< 12	—	>13
ببراسيلين	< 14	17-15	>18
ريفامبسين	< 16	19-17	>20
امبسلين	< 11	13-12	>14
تراي-مثيرام+سلفا ميثازول	< 10	15-11	>16
سيفوناكسام	< 14	17-15	>18
سبروفلوكساسين	< 13	18-14	>19

تفسير نتائج فحص API 20 E

ت	الاختبار	المـادة الاساس	الانظمة المشاركـة	النتيجـة +	النتيجـة -	الكواشف
1	ONPG	Ortho-nitro phenyl-B-D-galactopyranoside	Beta-galac	اصفر	عديم اللون	
2	ADH	Arginine	Arginine dehydratase	احمر برتقالي	اصفر	
3	LDC	Lysine	Lysine decarboxylase	احمر	اصفر	
4	ODC	Ornithine	Orinithine decarboxylase	احمر برتقالي	اصفر	
5	CIT	Sodium citrate	Citrate Utilisation	اخضر	ازرق	
6	H_2O	Sodium thiosulphate	H_2S production	ترسبات سوداء	عديم اللون	
7	URE	Urea	Urease	احمر	اصفر	
8	TDA	Tryptophane	Tryptophane deaminase	بني غامق	اصفر	TDA
9	IND	Tryptophane	IndoI production	حلقة حمراء	اصفر	KOVACS
10	VP	Sodium pyruvate	Acetone production	وردي اللون	عديم اللون	VP_1+VP_2
11	GEL	Gelatin	Gelatinase	انتشار الصبغة السوداء	عدم انتشار الصبغة السوداء	
12	GLU	Glucose	Fermentation / oxidation	اصفر	ازرق	
13	MNA	Mannitol	Fermentation / oxidation	اصفر	ازرق	
14	INO	Inositol	Fermentation / oxidation	اصفر	ازرق	
15	SOR	Sorbitol	Fermentation / oxidation	اصفر	ازرق	
16	RHA	Rhaminose	Fermentation / oxidation	اصفر	ازرق	
17	SAC	Sucrose	Fermentation / oxidation	اصفر	ازرق	
18	MEL	Melibiose	Fermentation / oxidation	اصفر	ازرق	
19	AMY	Amygdalin	Fermentation / oxidation	اصفر	ازرق	
20	ARA	Arabinose	Fermentation / oxidation	اصفر	ازرق	

Summary

A total of 164 different samples obtained from patients admitting to AL-Hussien Hospital in Karbala Province ,only two isolates of *Providencia* spp. were isolated and identified by means of traditional techniques and API system , One of the isolates was found in urine sample and the other in a burn swab.

The effect of some antibiotics on the two isolates was investigated, and the results showed that the isolates were resistant to Rifampicin, Ampicillin, Amoxcillin, Gentamycin, Trimethprim, Pipracillin, Clindamycin, and Cefotaxim, and sensitive only to Ciprofloxacin .

Some virulence factors of the isolates were also studied, and the results showed that the two strains have capsules which be regarded as the most virulant factor of the bacteria . Furthermore the results showed that the two strains have adhesion factors ,too .

The ability of the isolates to produce haemolysin, and siderophores was also observed and the results of this work showed that the isolates were unable to produce bacterial haemolysin ,but were able to produce siderophores .

The resultes of the plasmid DNA Study, showed that *Providencia* have more than one plasmid. Curing techniques by using SDS (Sodium Dodocyle Sulfate) showed that the bacterial isolates lost their plasmid content which indicates that SDS can make curing to the plasmids completely .

A Molecular and Bacteriological Study of Some Strains for *Providencia* Isolated in Karbala

A Thesis
Submitted by
KAWKAB ABD-ULLA HUSSIEN AL-SADDI

To
The Council Of the College Of
Education, University Of Kerbala In a Partial Fulfillment
Of the Requirements For The Degree of Master of Science
In Microbiology

2005