جـــامعـــــة كـــربـــلاء

كليــة العلــوم /قسـم علـوم الحيـاة

دراسة جينات المقاومة للمضادات الحيوية والمعزولة من بعض الأجناس البكتيرية المرضية وتحديد تأثير البكتيريا المعززة حيويا والمشخصة جزئياً

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلية العلوم / جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

كتبت بواســـطة

غفران كريم عبد

بكالوريوس علوم حياة – جامعة كربلاء2009

بإشـــــــــراف

أ. د علي عطية عبد الحسناوي

حزيران-2024 م **ذي الحجة-1445هـ**

بسم الله الرحمن الرحيم

يرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ
دَرَجَاتٍ والله بما تعملون خبير

صدق الله العلي العظيم
سورة المجادلة الآية 11

إقرار المشرف

اشهد إنّ إعداد هذه الرسالة الموسومة **(دراسة جينات المقاومة للمضادات الحيوية والمعزولة من بعض الأجناس البكتيرية المرضية وتحديد تأثير البكتيريا المعززة حيويا والمشخصة جزئياً)**

قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة كربلاء بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة.

التوقيـع:

الاســم: د. علي عطية عبد

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريـــخ: 5 / 6 / 2024

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على توصيات المشرف، أحيل هذه الدراسة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيانّ الرأي فيها.

التوقيـــع :

الاســـم: د. مؤيد نعيم كريم

المرتبة العلمية : مدرس

المرتبة العلمية : رئيس قسم علوم الحياة

التاريـــخ : 5 / 6 / 2024

قرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة ، نشهد بأننا اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ(**دراسة جينات المقاومة للمضادات الحيوية والمعزولة من بعض الاجناس البكتيرية المرضية وتحديد تأثير البكتيريا المعززة حيوية والمشخصة جزئياً**) وناقشنا الطالبة (**غفران كريم عبد**) في محتوياتها وفيما له علاقة بها، ونعتقد أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في كلية العلوم / قسم علوم حياة بتقدير (أمتياز).

التوقيع	التوقيع
الاسم : أ.د حسن علي حسين	الاسم: أ.م. د بلقيس عبد علي عبد عون
رئيس اللجنة	عضواً
مكان العمل جامعة كربلاء /كلية العلوم الطبية التطبيقية	**مكان العمل** جامعة الفرات الاوسط المعهد التقني كربلاء
التاريخ : / / 2024	التاريخ : / / 2024
التوقيع	التوقيع
الاسم :أ. م.د جمان خليل ابراهيم	الاسم : أ. د علي عطية عبد خابط
عضواً	عضواً ومشرفاً
مكان العمل: جامعة كربلاء/ كلية الطب البيطري	**مكان العمل:** جامعة كربلاء/ كلية العلوم
التاريخ : 14/10/ 2024	التاريخ : / / 2024

مصادقة عميد كلية العلوم / جامعة كربلاء

التوقيع:

الاسم : د. حسن جميل جواد الفتلاوي

المرتبة العلمية : استاذ دكتور

عميد كلية العلوم / جامعة كربلاء

/ / 2024

الاهداء

الى صاحب الوجه النظر والقلب الأبيض الكبير الى من سعى لأجل راحتي ونجاحي الى الذي لاأعرف معنى الخوف وهو بجانبي الكلمات لا تفيك ولو بحق من حقوقك علي

أبي الغالي ...الى روحك الطاهرة أهدي جهدي هذا

الى ملاكي في الحياة ومنبع الحنان صاحبة أجمل ابتسامة الى التي ساندتني في صلاتها ودعائها الى التي وجودها في حياتي يشعرني بالأمان الى أروع امرأة في العالم

أمي العزيزة

الى رفيق كفاحي في مسيرة الحياة أهدي هذا البحث تعبيرا عن خالص شكري لما قدمته لي طول فترة دراستي من دعم فكنت نعم الصديق ورفيق الدرب

زوجي الغالي

الى من هم ملاذي ورمز فخري وأعتزازي الى من شد الله بهم عضدي فكانوا خير معين

أخي واخواتي

الى أملي ومستقبلي الى أجمل ما أهدتني الحياة

أولادي وسعادتي آيات و أمين

غفران

شكر وتقدير

الحمد لله الأول بلا أول كان قبله والأخر بلا أخر كان بعده الذي قصرت عن رؤيته أبصار الناظرين وعجزت عن نعته أوهام الواصفين الحمدا لله حمدا كثيرا يليق بجلال وجهه وعظيم.
وانطلاقا من قولة تعالى" وَمَن يَشْكُرْ فَإِنَّمَا يَشْكُرُ لِنَفْسِهِ" فانني اتوجه بوافر الشكروالتقدير الى رئاسة جامعة كربلاء وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة على أتاحتهم لي الفرصة بإكمال دراستي كما اتوجة بجزيل الشكر والعرفان لأستاذي ومشرفي الأستاذ الدكتور علي عطية عبد الحسناوي الذي كانت له بصمات واضحة في توجيهاته وانتقاداته البناءة والقيمة ولجهوده المبذولة في التحليل الاحصائي وكان من دواعي سروري ان تكون مشرفي.
كما تقدم بجزيل الشكروالتقدير الى كادر مختبرات الأغذية التابعة للعتبة الحسينية المقدسة وبالاخص الست أميرة جبر والشكر موصول لمركز الامين للبحوث في العتبة العلوية المقدسة وبالاخص الدكتور الفاضل نوفل الدجيلي كما اتوجه بجزيل الشكر الى منتسبي الصحة في مستشفى الحسيني ومستشفى النسائية والتوليد.

لكم مني جزيل الشكروالتقدير

غفران

الخلاصة

Summary

الخلاصة

البروبيوتيك هي كائنات حية دقيقة توفر العديد من الفوائد للإنسان، بما في ذلك بكتيريا *Lactobacillus* الموجودة بشكل طبيعي في جسم الإنسان وفي بعض أنواع الأطعمة والمشروبات والمكملات الغذائية في هذه الدراسة تم تحديد النشاط التضادي لبعض أنواع بكتيريا *Lactobacillus* ضد بعض أنواع البكتيريا المسببة للأمراض المعزولة من مصادر سريرية مختلفة.

اذ جمعت 110 عينة من مرضى يعانون من التهاب الحروق والتهابات المجاري البولية والتهاب الجروح والخروج من كلا الجنسين وتم أجراء الدراسة للفترة من 3 آب 2022 ولغاية 5 كانون الثاني 2023 في مستشفى الامام الحسين (ع) التعليمي من ردهة الحروق ومن مستشفى النسائية والتوليد وزرعت على أوساط مناسبة ثم إجراء الاختبارات الكيميائية الحيوية والجزيئية لتشخيص البكتيريا المسببة للأمراض اذ شملت تشخيص جينات المقاومة التي تشمل(*qnrA . shv,bla tem,ermA, ,aac(6')-Ib -cr*) من ناحية أخرى، تم جمع 20 عينة مختلفة من الحليب الخام و الالبان محلية الصنع لعزل بكتيريا *Lactobacillus spp*. التي تم تشخيصها عن طريق الاختبارات المجهرية والكيميائية الحيوية والفحص الجزيئي. وأخيرا، بعد ذلك تم اختبارالتضادية لبكتيريا *Lactobacillus* ضد البكتيريا المسببة للأمراض وشملت:

1.*Lactobacillus. acidophilus+ Lactobacillus. rhamnosus*
2.*Lactobacillus. acidophilus + Lactobacillus. hellveticus*,
3.*Lactobacillus.acidophilus + Lactobacillus. plantarium*,
4.*Lactobacillus.rhamnosus + Lactobacillus.hellveticus*,
5.Lactobacillus. rhamnosus + Lactobacillus.plantarium,
6.Lactobacillus. rhamnosus+ Lactobacillus. Acidophilus
7. *Lactobacillus. hellveticus+ Lactobacillus. plantarium*

من جهة أخرى تم استعمال الراشح الخلوي لبكتريا حامض اللبن لدراسة الفعالية البايولوجية لبكتريا حامض اللبنيك ضد البكتريا المرضية في الدراسة الحالية، وأخيرا تم أختبار التفاعل التازري بين انواع بكتريا حامض اللبنيك المدروسة كلا على حده مع السكريات الاحادية المتعددة من نوع Fructooligosaccharides تم استعمال طريقة الانتشار من الحفر في كل التجارب السابقة.

في النتائج: تم الحصول على 5 عزلات من بكتريا *Staphylococcus aureus* و 7 من *E. coli* و 3 من *Pseudomonas aeruginosa* و 9 من *Klebsiella pneumonia* ,لقد تميزت بكتريا الكلبسيلا بانها الاعلى معنويا بامتلاكها للمورث *aac(6')-Ib -cr* والذي يشفر لصفة المقاومة لمجموعة

المضادات الحياتية من نوع الامينوكليكوزيدات ($P<0.05$) بالمقارنة مع بقية الاجناس البكتيرية بينما كانت بكتريا الزائفة الزنجارية اقل معنويا بامتلاك عزلتان منها لهذا المورث، اما بالنسبة لمورث *erma* فان النتائج كانت مماثلة لمورث *aac(6')-Ib –cr*، كانت بكتريا الكلبسيلا حاملة لمورث *qnrA*

والذي يشفر لصفة المقاومة لمجموعة المضادات الحياتية من نوع الفلوروكينولونات بواقع 4 عزلات وبصورة معنوية عن بقية الاجناس البكتيرية حيث تساوت تلك الاجناس فيما بينها بوجود عزلة واحدة من كل جنس حاملة لهذا المورث، ايضا كانت بكتريا الكلبسيلا الوحيدة الحاملة لمورث *shv* والذي يشفر لصفة المقاومة لمجموعة المضادات الحياتية من نوع البيتا لاكتام في حين لم تمتلك بقية الاجناس لهذا المورث، اما مورث *bla Tem* والذي يشفر لصفة المقاومة لمجموعة المضادات الحياتية من نوع البيتا لاكتام ايضا لم تختلف النتائج كثيرا عن نتائج مورث ال *shv* عدا وجود عزلة واحد من بكتريا الزائفة الزنجارية حاملة لهذا المورث في حين لم تكن المكورات العنقودية وبكتريا الايشيركا القولونية حاملة لهذا النوع من المورثات.

ومن جهة أخرى تم عزل 4 أنواع من *Lactobacillus* وهي *L. rhamnosus*، *L.hellveticus*، *L.Acidophilus*. *L .plantarium* لم تظهر جميع أنواع بكتريا حمض اللاكتيك لوحدها أي نشاط تضادي ضد الأنواع البكتيرية المسببة للأمراض وكذلك راشحها كما لم يظهر تاثيرا عند مزجها بصورة تأزرية اي نشاط بكتيري ، بينما أظهر اختبار النشاط التضادي لبكتريا حمض اللاكتيك مع السكر Fructooligosaccharides (FOS) أن نمو البكتيريا المسببة للأمراض تأثر بمناطق تثبيط متغيرة.

الاستنتاج: وجود قدرة تثبيطية كبيرة لجميع أنواع بكتريا حمض اللاكتيك بعد خلطها مع السكريات FOS مما أدى إلى تحسين نمو العصيات اللبنية.

قائمة المحتويات

التسلسل	المحتويات	الصفحة
	الخلاصة	أ
	قائمة المحتويات	I
	قائمة الأشكال	v
	قائمة الجدأول	VII
	قائمة المختصرات	VIII
1-1	**الفصل الأول** **المقدمة**	1
2-1	إستعراض المراجع	5
1-2-1	التهاب المسالك البولية Urinary tract infection	5
2-2-1	التهاب الحروق	7
3-2-1	البكتيريا الاكثر شيوعا في التهاب المسالك البولية والتهاب الحروق	8
1-3-2-1	*Staphylococcus aureus*	8
2-3-2-1	*E.coli*	9
3-3-2-1	*Klebsiella spp.*	10
4-3-2-1	*Pseudomonas spp.*	11
4-2-1	المضادات الحيوية (Antibiotics)	13
5-2-1	ميكانيكيات مقاومة البكتريا	14
1-5-2-1	الية تحوير عمل المضاد الحيوي او تثبيطه Drug Modification or Inactivation	16
2-5-2-1	الية منع الامتصاص الخلوي أو التدفق Prevention of Cellular Uptake or Efflux	16
3-5-2-1	الية تعديل الهدفTarget Modification	17
4-5-2-1	الية الإفراط في الإنتاج Target Overproduction or Enzymatic Bypass	17
5-5-2-1	جينات المقاومة البكتيرية Bacterial resistance genes	18
6-2-1	البكتريا المحفزة حيويا (Probiotic)	19

7-2-1	اليات عمل بكتريا حامض اللبنيك ضد مسببات الامراض	20
1-7-2-1	انتاج الاحماض العضوية Production of organic acids	20
1-1-7-2-1	انتاج بيروكسيد الهيدروجينHydrogen peroxide production	21
2-1-7-2-1	انتاج البكتريوسينBacteriocin production	21
3-1-7-2-1	المنافسة على المغذياتCompetition on nutrients	22
4-1-7-2-1	الالتصاق و الاستعمارAdhesion and Colonization	23
5-1-7-2-1	بكتيريا حامض اللبنيك حيويا تساعد في عملية الهضم Probiotics aid host digestion function	24
8-2-1	بكتيريا حامض اللبنيك *Lactobacillus*	24
1-8-2-1	المغذيات البكتيرية (Bacterial nutrients)	25
	الفصل الثاني **المواد وطرق العمل**	26
1-2	المواد Materials	28
1-1-2	الاجهزة والادوات المختبرية	28
1-2-2	المواد ذات الاستخدام الواحد	29
2-1-2	المواد الكيميائية	29
3-1-2	الاوساط الزرعية	30
4-1-2	العدد Kits	30
5-1-2	تحضيرات Master Mix	31
6-1-2	تحضير Product PCR للبكتيريا المرضيبة	31
7-1-2	البادئات لبكتيريا حامض اللبنيك	32
2-2	مخطط تصميم الدراسة	34
1-2-2	جمع عينات البكتيريا المرضية	35
1-1-2-2	الاوساط الزرعية المستخدمة بعزل وتنشيط البكتيريا	35
2-1-2-2	الكواشف والمحاليل المستخدمة في العزل والتشخيص للبكتريا	37
3-1-2-2	تشخيص العزلات البكتيرية	39
4-1-2-2	الفحوصات الكيموحيوية(Biochemical tests)	39
5-1-2-2	حفظ العزلات البكتيرية	42

6-1-2-2	التشخيص باستخدام جهاز الفايتك Vitec2 compact	42
7-1-2-2	التشخيص الجزيئيMolecular Identification	42
1-7-1-2-2	استخلاص الحامض النووي البكتيري Bacterial Genomic DNA Extraction	43
2-7-1-2-2	تحضيرمزيج سلسة تفاعل البلمرة PCR Master Mixture	44
1-2-7-1-2-2	محاليل البوادئ Primers Solution	44
2-2-7-1-2-2	مزيج Master Mix	44
3-2-7-1-2-2	تحضير PCR Product	45
6-7-1-2-2	اجراء تفاعل البلمرة(PCR Assay)	45
6-7-1-2-2	الترحيل الكهربائيElectrophoresis	45
2-2-2	الجمع والعزل والتشخيص لبكتيريا حامض اللبنيك *Lactobacillus. Sp*	46
1-2-2-2	الزرع والعزل والتشخيص	46
2-2-2-2	الفحص المظهري والمجهري	46
3-2-2-2	الفحص المظهري والمجهري Morphological and Microscopical examination	46
1-2-2-2-2	الفحوصات الكيميوحيويةBiochemical tests	46
3-2-2-2	التشخيص الجزيئي لبكتيريا حامض اللبنيك Molecular diagnosis of lactic acid	47
1-3-2-2-2	استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين من بكتريا حامض اللبنيك: Extraction of deoxyribonucleic acid from lactic acid bacteria:	47
3-3-2-2-2	تحديد نقاوة وتركيز الحمض النووي (DNA)	48
3-2-2	الترحيل الكهربائي	49
3-2-2	اختبارالفعالية التثبيطية لبكتريا حامض اللبنيك تجاه البكتيريا المرضية للأجناس	49
4-2-2	اختبارالفعالية التثبيطية لبكتريا حامض اللبنيك بصورة تازرية تجاه البكتيريا المرضية للأجناس المعزولة:	49

10-2-2-2	تحضير الراشح الخلوي لبكتريا حامض اللبن	50
5-3-2	اختبارالفعالية التثبيطية لراشح بكتريا حامض اللبنيك تجاه البكتيريا المرضية المعزولة	50
5-2-2	اختبارالفعالّة التثبيطية لراشح بكتريا حامض اللبنّك تجاه البكتيريا المرضية المعزولة	50
6-2-2	اختبارالفعالية التثبيطية لبكتريا حامض اللاكتيك مع اضافة المغذي الحيوي FOS تجاه البكتيريا المرضية للأجناس المعزوله	51
7-2-2	التحليل الاحصائي	51
	الفصل الثالث **النتائج والمناقشة**	
1-3	العزل البكتيري	53
1-1-3	التشخيص المجهري والمظهري للعزلات البكتيرية	54
2-1-3	التشخيص الكيموحيوي للعزلات البكتيرية	55
3-1-3	اختبار الحساسية للمضادات الحياتية	56
2-3	الكشف الجزيئي عن جينات المقاومة في العزلات البكتيرية المرضية قيد الدراسة	58
1-2-3	الكشف عن جين *acc*	58
2-2-3	الكشف عن جين *ermA*	60
3-2-3	الكشف عن جين *qnrA*	62
4-2-3	الكشف عن جين *shv*	63
5-2-3	الكشف عن جين *bla Tem*	65
3-3	التشخيص المجهري والمظهري والكيموحيوي لعزلات بكتيريا حامض اللبنيك *Lactobacillus.spp*	73
1-3-3	الكشف الجزيئي عن انواع بكتيريا حامض اللبنيك قيد الدراسة	74
2-3-3	الفعالية التضادية لبكتيريا حامض اللبنيك ضد البكتيريا المرضية	77
3-3-3	دراسة الفعالية البايولوجية لانواع بكتيريا حامض اللبنيك مع FOSضد الاجناس البكتيرية المدروسة	81

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
(1-1)	آلية التصاق البكتريا بسطح الخلايا في حالة إمراض التهاب المسالك البولية	6
(2-1)	المواقع المستهدفة للمضادات الحيوية	14
(3-1)	استراتيجيات متعددة تستخدمها الميكروبات لتطوير مقاومة الأدوية للمضادات الحيوية	15
(4-1)	التركيب الكيميائي لمركب FOS	26
(1-3)	الانواع البكتيريا المرضية المعزولة	53
(2-3)	**حساسية عزلات بكتيريا** *p.aeruginosa E.coli,، , klebsiella,* تجاه المضادات الحيوية	56
(3-3)	**حساسية عزلات بكتيريا *s.aureus* تجاه المضادات الحيوية**	57
(4-3)	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *aac(6')-Ib -cr* .	59
(5-3)	عدد العزلات البكتيرية قيد الدراسة والحاملة لمورث *aac(6')-Ib -cr*	59
(6-3)	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *ermA*	61
(7-3)	معدل عدد العزلات لمورث المقاومة *ermA* من البكتريا المعزولة قيد الدراسة من عينات مختلفة.	61
(8-3)	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *qnrA*	62
(9-3)	معدل عدد العزلات البكتيرية الحاملة لمورث المقاومة *qnrA* من البكتريا المعزولة قيد الدراسة من عينات مختلفة	63
(10-3)	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *shv*	64
(11-3)	معدل عدد العزلات البكتيرية المعزولة من عينات مختلفة حاملا لمورث المقاومة *shv*	64
(12-3)	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *bla Tem*	65
(13-3)	معدل عدد العزلات البكتيرية المعزولة من عينات مختلفة حاملا لمورث المقاومة *bla Tem*	66
(14-3)	عدد المورثات التي تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحياتية الموجودة في بكتيريا *S. aureus* المعزولة من عينات مختلفة	68
(15-3)	عدد العزلات البكتيرية من جنس*p.aeruginosa* والتي تحمل المورثات التي تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحياتية.	70
(16-3)	عدد العزلات البكتيرية من جنس *E. coli* والتي تحمل المورثات	71

	التي تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحياتية .	
(17-3)	عدد المورثات التي تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحياتية الموجودة في بكتيريا *K. pneumoniae* المعزولة من عينات مختلفة.	72
(18-3)	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لعزلبكتيريا حامض اللبنيك من نوع *L.acidophilus*	74
(19-3)	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لعزل البكتريا احامض اللبنيك من نوع *L. helveticus*	75
(20-3)	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحدد لعزل البكتريا احامض اللبنيك من نوع *L. plantarum*	76
(21-3)	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام بوادئ المحدد لعزل بكتريا حامض اللبنيك النوع *L.rhamnosus*	76
(22-3)	يوضح قطر منطقة التثبيط بتاثير أنواع مختلفة من بكتريا حامض اللبنيك مع FOS ضد *S. aureus* المعزولة من حالات مرضية مختلفة	81
(23-3)	يوضح قطر منطقة التثبيط لأنواع مختلفة من بكتريا حامض اللبنيك مع FOS ضد *E.coli* المعزولة من حالات مرضية مختلفة.	83
(24-1)	يوضح قطر منطقة التثبيط لأنواع مختلفة من بكتريا حامض اللبنيك مع FOS ضد *P. aeruginosa* المعزولة من حالات مرضية مختلفة.	84
(25-3)	يوضح قطر منطقة التثبيط لأنواع مختلفة من بكتريا حامض اللبنيك مع FOS ضد *K. pneumoniae* المعزولة من حالات مرضية مختلفة.	85
(26-3)	معدل قطر منطقة تثبيط البكتريا المرضية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة بتأ تثير مزيج بكتريا حامض اللبنيك من نوع *L.acidophilus*مع FOS.	86
(27-3)	معدل قطر منطقة تثبيط البكتريا المرضية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة بتأثير مزيج بكتريا حامض اللبنيك من نوع *L. hellveticus* مع FOS.	87
(28-3)	معدل قطر منطقة تثبيط البكتريا المرضية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة بتأثير مزيج بكتريا حامض اللبنيك من نوع *L.rhamnosus* مع FOS.	88
(29-3)	معدل قطر منطقة تثبيط البكتريا المرضية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة بتأ تثير مزيج بكتريا حامض اللبنيك من المتكون من *L.plantarum* مع FOS.	89

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
(1-2)	الأجهزة والادوات المستخدمة	28
(2-2)	المواد ذات الاستخدام الواحد	29
(3-2)	المواد الكيميائية	29
(4-2)	الأوساط الزرعية	30
(5-2)	المستخدمة ومناشئهاkitsعدد	30
(6-2)	البادئات المستخدمة للبكتريا المرضية	31
(7-2)	البادئات المستخدمة لبكتريا حامض اللبنيك	31
(8-2)	مكونات مزيجMaster Mix	32
(9-2)	pcr مكونات انيوب تفاعل	32
(10-2)	لكل بادئPCRظروف تفاعل	33
(11-2)	محتويات خليط التفاعل	33
(1-3)	الاختبارات الكيموحيوية المستعملة لتشخيص البكتريا المرضية المعزولة قيد الدراسة الحالية	56
(2-3)	المقاومة من معدل عدد العزلات البكتيرية الحاملة لمورثات البكتريا المعزولة قيد الدراسة	67
(3-3)	الاختبارات الكيموحيوية المستعملة لتشخيص لانواع بكتيريا حامض اللبنيك من جنس *Lactobacillus Spp.*	73
(4-3)	يظهر نوع عزلات بكتيريا حامض اللبنيك المعزولة من الالبان .	77

قائمة المختصرات

الاسم الكامل	المختصر
Base pair	bp
Catheter-associated UTIs	CAUTIs
Distilled Wate	DW
Erythromycin resistance gene	ermA
extended-spectrum β-lactamases	ESBLs
Fructooligosaccharides	FOS
Gastro Intestinal Tract	GIT
Generally Recognized As Safe	GRAS
Gram Negative identifier	GN-ID
Gram positive identifier	GP- ID-
Lactic acid bacteria	LAB
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*	MRSA
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*	MRSA
Methyl red	MR
outer membrane protein	OprD
penicillin-binding protein	PBPs
Polymerase chain reaction	PCR
polymeric immunoglobulin receptor	PIgR
Short-Chain Fatty Acids	SCFAs
Urinary tract infection	UTI
Uri-Pathogenic *Escherichia coli*	UPEC
Voges-Proskaure	VP

الفصل الأول

المقدمة واستعراض المراجع

1-1 المقدمة Introduction

تلعب الكائنات الحية الدقيقة المتعايشة أدوارًا رئيسية في علم وظائف الأعضاء للكائنات بما في ذلك الانسان، تتراوح بين الاستجابات المناعية والتمثيل الغذائي، وكذلك في نشوء المرض (Blaser *et al*., 2013). حيث تنقسم البكتيريا في علاقتها مع مضائفها إلى متبادلة المنفعة (تفيد نفسها والمضيف) ومتعايشة (تفيد نفسها ولكن لاتفيد المضيف) ومسببة للأمراض (تستفيد نفسها من خلال إيذاء المضيف)، وبكتيريا انتهازية (Marsh *et al*., 2009, Reid *et al*., 2011)،تستعمر البكتيريا الأسطح الظهارية في أجزاء معينة من الجسم، وهناك منافسة مستمرة باستمرار على المساحة والموارد بين الأنواع البكتيرية، يحمل الشخص البالغ 10 أضعاف عدد الميكروبات التي تحملها خلايا الثدييات، ويبلغ الوزن الإجمالي للبكتيريا التي تستعمر جسم الإنسان حوالي 1.25 كغم، بما في ذلك 1000 غرام في الجهاز الهضمي (Gastro Intestinal Tract)(GIT) و20 غرام في الفم، تعكس قدرة الكائنات الحية الدقيقة على استعمار مكان ما بشكل انتقائي وكذلك تكيفها التطوري (Wolff *et al.,* 2021) يلعب تكوين الكائنات الحية الدقيقة في الجهاز الهضمي دورًا مهمًا في صحة المضيف لأنه يشارك في نشوء الامراض وتطوير الجهاز المناعي (Bezirtzoglou *et al*., 2011)،حيث ترتبط بعض الأمراض بالتغيرات في الكائنات الحية الدقيقة، بما في ذلك السمنة وسوء التغذية ومجموعة متنوعة من الأمراض الالتهابية في الجلد والفم والجهاز المعوي (*Costello et al*., 2012)

اذ يعد جسم الإنسان موطن لملايين البكتيريا. ويقع أكبر مجتمع ميكروبي في الجهاز الهضميGIT ، بما في ذلك تجويف الفم مع أكثر من 700 نوع محدد. تساهم ***Lactobacillus spp.*** ، وهذه البكتيريا هي ساكن طبيعي في الجهاز الهضمي في الصحة من خلال الأغشية الحيوية والتعديل المناعي.

وفقا لمنظمة الصحة العالمية (WHO)2021 فان البكتيريا يمكن تقسيمها الى نوعان:

النوع الأول:البكتيريا النافعة مثل بكتيريا البيفيدو الطفيليه (*Bifidobacterium infantis*) و بكتيريا العصية اللبنية الحمضية (*Lactobacillus acidophilus*) التي تلعب دورا هاما في تحسين صحة الامعاء .

اما النوع الأخر فهو البكتريا الضارة وتشكل اجناس وانواع البكتيريا المرضية كافة ومنها بكتيريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* يمكن ان تؤدي الى امراض مختلفة تشمل الامراض المنقولة بالغذاء و التهابات المسالك البولية Urinary tract infection (UTI) بسبب قدرتها على التكاثر و انتاج السموم الضارة (Wolff *et al*., 2021).

يعتبر التهاب المسالك البولية والتهاب الحروق من الامراض الشائعة، وتشير عدوى المسالك البولية (UTI) إلى عدد كبير من الحالات السريرية بما في ذلك التهاب المثانة ، التهاب الحوض والكلية ، التهاب البروستات ، تعفن البول ، والقسطرة المرتبطة بالتهاب المسالك البولية (Gupta *et al*., 2017).

من ناحية أخرى تحدث عدوى جرح الحروق(Burn infections) بشكل شائع بسبب البكتيريا أو الفطريات أو الفيروسات ومع ذلك تسبب البكتيريا غالبية الالتهابات في معظم مراكز معالجة الحروق (Norbury *et al.,* 2016).

وتستخدم المضادات الحيوية والتي يمكن أن تكون فعالة في علاج الالتهابات البكتيرية، وعلى العكس فإنها قد يكون لها أيضًا آثار جانبية يمكن أن تتراوح من خفيفة مثل اضطراب الجهاز الهضمي أو الطفح الجلدي إلى أكثر شدة مثل ردود الفعل التحسسية أو الإسهال المرتبط بالمضادات الحيوية (Mohsen *et al*., 2020).

وكما اشارت منظمة الصحة العالمية الى ان سوء استخدام المضادات الحيوية والافراط في استخدامها أسهم في تطوير مقاومة الاحياء المجهرية ضد المضادات الحيوية و هو ما يمثل مصدر قلق كبير للصحة العالمية، اذ تحدث المقاومة للمضادات الحيوية عندما تتطور البكتريا و تصبح مقاومة للأدوية المستخدمة في علاج الامراض التي تسببها، اذ يمكن ان يؤدي هذا الى امراض مزمنة و زيادة في تكاليف العلاج و الرعاية الصحية، كما أن المنافسة بين الاجناس المايكروبية المرضية من خلال افرازها للمواد الكيميائية المختلفة لغرض قتل او تثبيط النمو حيث استغل العلماء هذه المواد الكيميائية لعلاج أنواع مختلفة من الأمراض المعدية وخاصة بعد اكتشاف البنسلين في عام 1928 من قبل العالم الاسكتلندي والحائز على جائزة نوبل ألكسندر فليمنج حيث قطعت المضادات الحيوية شوطا طويلا لعلاج الأمراض المعدية (Urban-Chmiel *et al*,. 2022).

قد تتعرض بعض البكتيريا لطفرات جينية عند تعرضها للمضادات الحيوية ويمكن أن تؤدي إلى تطوير مقاومتها لهذه المضادات الحيوية ، مما تسمح لها بالبقاء والتكاثر في وجود الدواء ، اذ يمكن لهذه البكتيريا المقاومة أن تتكاثر وتنتشر مما يجعل المضادات الحيوية أقل فعالية في علاجها (Fair and Tor , 2014).

يمكن للبكتيريا المرضية الاستفادة من وجود الطفرات التي تقوم بتعديل الموقع المستهدف للمضاد الحيوي ومن هذه الطرق efflux pump sysbla Tems حيث تحتوي بعض البكتيريا على هذه الأنظمة التي يمكنها من إزالة المضادات الحيوية قبل أن يكون لها تأثير، كما يمكن أن تزيد الطفرات من

نشاط efflux pump sysbla Tems مما يجعلها أكثر فعالية في إزالة المضادات الحيوية من الخلية البكتيرية. أيضا، يمكن للبكتريا إنتاج بعض الانزيمات المحورة للدواء ذات الفعاليات المختلفة إذ تعمل هذه الانزيمات على منع ارتباط المضادات الحيوية او تعديل نفاذية الخلية، كما تستطيع تطوير إنزيمات تكسر أو تغير المضادات الحيوية مما يجعلها عديمة الفائدة اضافة الى قدرتها على تخليق أو تنشيط هذه الإنزيمات مما يسمح للبكتيريا بالبقاء على قيد الحياة في وجود المضاد الحيوي (Wang *et al*., 2020).

ومن المهم تسليط الضوء على أن مقاومة المضادات الحيوية هي ليست نتيجة الطفرة بالكامل، فقد يمكن أن تكتسب البكتيريا أيضًا مورثات مقاومة من خلال النقل الأفقي للمورثات والذي يتضمن تبادل المواد الوراثية بين الاجناس والانواع البكتيرية المختلفة ، يسمح هذا لجينات المقاومة بالانتشار داخل التجمعات البكتيرية وبالتالي فان البحث عن وسيلة علاج بديلة عن الاستخدام المفرط للمضادات الحيوية في مكافحة المسببات البكتيرية للأمراض يعد أولوية قصوى في الابحاث الحديثة (Hojsak *et al*., 2018).

تلعب بكتيريا حامض اللبنيك (Probiotics) دورًا متعدد الأوجه في المجتمعات المايكروبية بسبب إنها تساعد في الحفاظ على توازن صحي للمجتمعات الميكروبية في الأمعاء من خلال التنافس مع البكتيريا الضارة على مواقع الالتصاق والمغذيات كما وتنتج هذه البكتريا أيضًا مواد مضادة للميكروبات مثل الأحماض العضوية والبكتريوسينات والتي تمنع نمو البكتيريا المسببة للأمراض. تمتاز بكتيريا حامض اللبنيك بجملة من الفوائد منها القدرة على تقوية جهاز المناعة وتعزيز استجابته لمسببات الأمراض مع تقليل الالتهاب، وكذلك امكانية أن تساعد في هضم وامتصاص العناصر الغذائية، وإنتاج الفيتامينات، والمساهمة في إنتاج الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة التي توفر الطاقة لخلايا القولون (Akbari *et al*., 2016).

بكتيريا حامض اللبنيك هي بكتيريا حية نافعة تتواجد في بعض أنواع الأطعمة والمشروبات والمكملات الغذائية و لها وظائف مهمة في الجسم، مثل الحفاظ على الحركة الطبيعية للأمعاء، وإتمام عمليات الهضم، وامتصاص العناصر الغذائية، وتعزيز مقاومة الجسم ضد العدوى (Hill *et al*., 2014).

يمكن لبكتيريا حامض اللبنيك ان تقاوم ظروف المعدة من درجة الحموضة 2.5- 3و انزيمات الببسين و املاح الصفراء و انزيمات البنكرياس و تحفيز الجهاز الهضمي و تكييف بيئة القولون (Abid *et al*., 2018)

لذلك فان هدفت الدراسة الحالية الى انجزت بهدف معرفة الفعالية لأنواع من بكتريا حامض اللبنيك

لوحـــدها او مـــع الفعـــل التـــازري بينهـــا وبـــين سلاســـل متعـــددة مـــن ســـكر الفركتـــوز Fructooligosaccharides (FOS) ضد بعض الاجناس من البكتريا المرضية من خلال الخطوات التالية:

1. عزل وتشخيص البكتريا المرضية من مصادر سريرية مختلفة، ثم اجراء فحص الحساسية للمضادات الحياتية ومن خلالها يتم تحديد المورثات التي من الممكن ان تكون مسؤولة عن صفة المقاومة بعدها تم استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن المورثات المشفرة لصفة المضادات الحيوية وكذلك تم عزل وتشخيص بكتريا حامض اللبنيك من الالبان باستخدام الاوساط الزرعية الاختيارية وكذلك الكيميائية الحيوية.
2. عزل بكتيريا حامض اللبنيك مجهريا واستخدام الفحوصات الكيميائية الحيوية وتاكيد التشخيص باستخدام تقنية pcr.
3. اجراء صفة التضادية لبكتيريا حامض اللبنيك لوحدها ضد البكتيريا المرضية مرة او باستخدام راشحها مع بعضها ضد البكتيريا المرضية مرة أخرى وكذلك تمت دراستها مع الفعل التازري لسلاسل متعددة سكر الفركتوز (FOS) ضد البكتيريا المرضية.

2-1 إستعراض المراجع (Literatures Review)

1-2-1 التهابات المسالك البولية :Urinary Tract Infection

هي عدوى بكتيرية شائعة تصيب القسم البولي السفلي، وقد تصيب الجهاز البولي كاملًا وصولًا إلى الكلى، ويمكن أن تصيب جميع الفئات العمرية، ولكن النساء أكثر عرضة لها من الرجال وذلك لقصر مجرى البول، وقد تصاب نصف النساء بالتهابات البول على الأقل مرة واحدة خلال فترة حياتهم،تنتشر التهابات المسالك البولية Urinary tract infection (UTI) على نطاق واسع حيث يقدر معدل الإصابة العالمي بها بما لا يقل عن 250 مليون شخص وهي مكلفة للمرضى ووكالات تمويل الرعاية الصحية (Ronald *et al*., 2001) ، وتعد النساء أكثر عرضة للإصابة بالتهاب المسالك البولية من الرجال (Hooton *et al*., 1996) .

اثبتت الدراسات السابقة ان اصابة الاشخاص بمرض السكري يفاقم الاصابة بجميع الامراض البولية المعدية بما في ذلك الخراج المحيطي والتهاب الكلية اضافة الى ان التهابات المجاري البولية يساعد بتضخم البروستات لدى الرجال خصوصا كبار السن (Hooton, 2000).

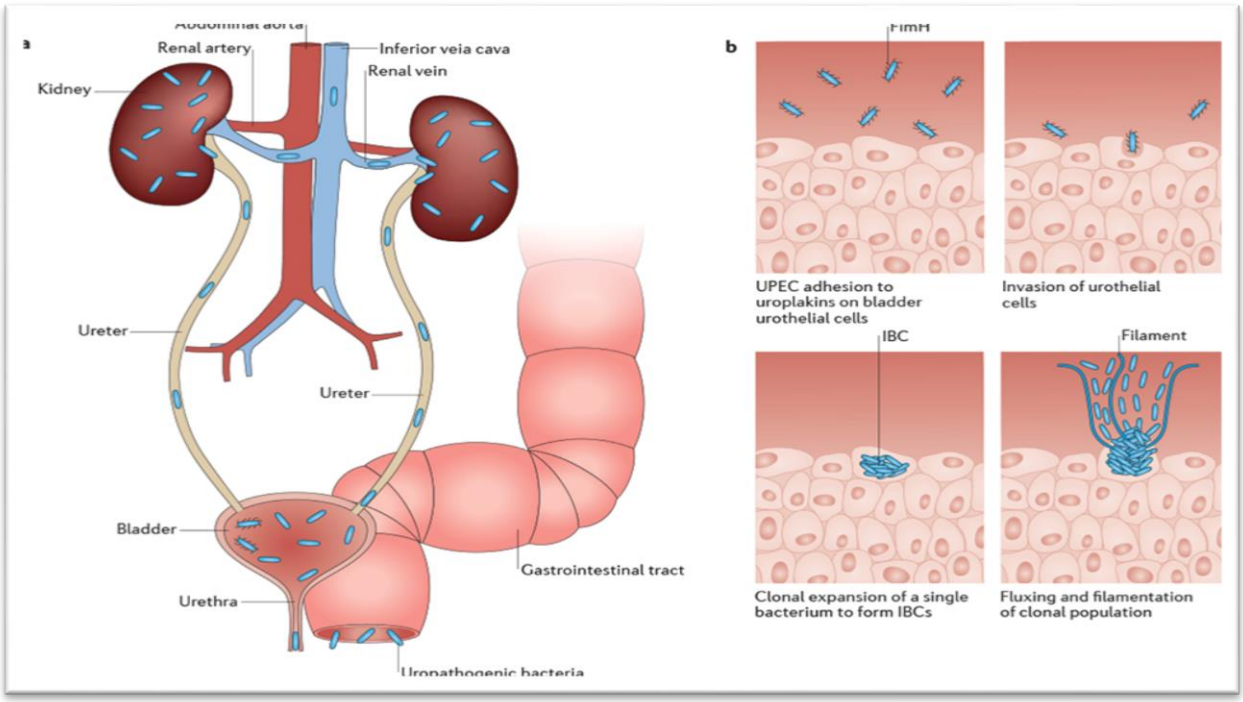
حيث ان التهاب المسالك البولية هي عدوى شائعة تسببها في الغالب بكتيريا الE.coli المسببة للأمراض البولية (UPEC) Uri-Pathogenic *Escherichia coli* والتي تكون المسببة للمرض بحوالي 80٪ من عدوى المسالك البولية (Foxman and Brown, 2003) .

امراض الجهاز البولي غالبا ما تكون مقترنة بالبكتريا الممرضة الموجودة في الأمعاء عند وصولها الى المثانة البولية ولفعل ذلك تستخدم هذه البكتريا خاصية الالتصاق التي تساعدها على الالتصاق على الخلايا الطلائية المبطنة للمثانة وأيضا بسبب قدرة هذه البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي والذي يمكن ان يساهم في بقاء البكتريا حية و التقليل من إمكانية قتلها بواسطة اليات الجهاز المناعي للمضيف (Murphy and Clegg, 2012)

يعتمد خطر تطور التهاب المسالك البولية إلى التهاب الكلية والانتان البولي جزئيًا على البيئة التي تم فيها اكتساب التهاب المسالك البولية على سبيل المثال عدوى المسالك البولية المرتبطة بالقسطرة Catheter-associated UTIs (CAUTIs) هذه العوامل تعمل على تمكين مسببات الأمراض المتنوعة بما في ذلك أعضاء من جنس *Enterococcus* و*S. aureus* من ربط الأغشية الحيوية وتجميعها على سطح القسطرة (Flores-Mireles *et al*., 2018)

إن المضادات الحيوية واسعة الطيف هي الدواء المفضل لمكافحة عدوى المسالك البولية ولكن استمرار ظهور مقاومة المضادات الحيوية أكد الحاجة الملحة إلى إستخدام المضادات الحيوية التي يمكنها علاج عدوى المسالك البولية بشكل انتقائي دون وجود اثار جانبية،حيث بينت الدراسات ان استهلاك المضادات الحيوية يؤدي إلى زيادة الالتهاب وتقويض البيئة المناعية المضيفة وتعزيز تكاثر *E.coli* عن طريق زيادة توافر النترات (Spees *et al*., 2013)، يمكن أن يؤدي العلاج بالمضادات الحيوية أيضًا إلى تقليل الكائنات الحية الدقيقة النافعة في منطقة المهبل عن طريق تقليل أنواع العصيات اللبنية المنتجة للبيروكسيد والتي تمنع استعمار(UPEC) في منطقة المهبل (Mayer *et al*., 2015).
ومن المفارقات أن المضادات الحيوية المستخدمة لعلاج عدوى المسالك البولية هي أيضًا عوامل خطر للإصابة بالتهابات المسالك البولية ربما بسبب تأثيرها على الأمعاء والميكروبات الحيوية في منطقة المهبل (Hooton *et al*., 2012).

أثبتت العديد من الدراسات الخاصة بإمراض التهاب المسالك البولية أنه بعد وصول البكتريا UPECإلى تجويف المثانة تلتصق بسطح الخلايا المظلية السطحية باستخدام خيوط لاصقة رقيقة كما يظهر الشكل (1-1) بعد الارتباط يتم استيعاب البكتيريا في الخلايا الظهارية حيث تتكاثر داخل هذا المكان المحمي داخل الخلايا لتكوين مجتمعات بكتيرية كبيرة تشبه الأغشية الحيوية ، تتمكن البكتريا من التكاثر في سيتوبلازم الخلية البولية قبل التدفق مرة أخرى إلى تجويف المثانة والالتصاق بالخلايا القريبة المظلية (Song *et al*., 2009) .



الشكل (1-1) آلية التصاق البكتريا بسطح الخلايا في حالة إمراض التهاب المسالك البولية (song *et al*.,2009)

2-2-1 التهاب الحروق (Burn inflammation)

الحروق هي اصابات تحدُث على الجلد عادةً، وتنجم عن الحرارة وضوء الشمس والكهرباء والأشعة أو الموادّ الكيميائية يعد الجلد ذو أهمية في الحفاظ على توازن سوائل الجسم والتنظيم الحراري وحماية المضيف من الإصابة، كما ان له أيضا وظائف مناعية وحسية عصبية واستقلابية مثل استقلاب فيتامين دال، حيث تسبب الإصابة الحرارية خرقا في سطح الجلد(Wysocki, 2016) .

ان الحاجز الجلدي المخترق هو السمة المميزة للإصابة بالحروق، حيث يحأول الجسم الحفاظ على التوازن من خلال بدء عملية تقلص الأوعية الدموية وتخثرها مباشرة بعد إصابة بالحروق اذ يعد التهاب الحروق واحد من أكثر أشكال الالتهابات خطورة (Roth and Hughes, 2004) إذ يؤدي التعرض للحروق إلى حالة من خفض المناعة التي تجعل مرضى الحروق عرضة للمضاعفات الالتهابية وقد تم ربط نقص المناعة الذي يتبع الإصابات بالحروق بـ "سموم الحروق" ., Moins-Teisserenc *et al*) .2021)

أثبتت الدراسات التجريبية والسريرية أن الحروق الشديدة بغض النظر عن السبب ، فانها تؤدي إلى اضطراب التهابي حاد للغاية خلال ساعات قليلة من الإصابة (Stone *et al*., 2016 ; Sood *et al* .(.,2016

حيث تساهم عدد من العوامل في حجم استجابة المضيف ضد الحروق مثل شدة الحرق (النسبة المئوية لمساحة سطح الجسم وعمق الحرق) والتعرض للتسمم فضلا عن العوامل المرتبطة بالشخص نفسه مثل العمر والحالات الطبية المزمنة الموجودة مسبقًا، اعتمادًا على حجم الإصابة فإن استجابة المضيف الأولية مباشرة بعد إصابة الحروق الشديدة تشبه الاستجابة بعد العديد من الحالات الالتهابية الأخرى. بعد الحروق الشديدة قد يتم تحفيز سلسلة الالتهابات عدة مرات عندما تتكرر سلسلة الالتهابات أو تظل غير منضبطة فإنها يمكن أن تدمر الأنسجة المضيفة وتساهم في خلل الأعضاء والوفاة (Osuka *et al* .,2014)، من جهة أخرى يكون سطح الحرق معقما حالا بعد الاحتراق لكن بعد مرور 48 ساعة فان هذا الجرح سيستوطن بواسطة البكتريا المتعايشة على الجلد وبعد أسبوع واحد او اكثر سيستوطن هذا الجرح بواسطة الكائنات المجهرية المعوية والرئوية للمضيف او من المستشفى المتواجد بها وهذا الاستيطان البكتيري اذا لم يتم السيطرة عليه ممكن ان يؤدي الى مضاعفات واحيانا الوفاة (Mandell *et al*., 2010).

3-2-1 البكتريا الأكثر شيوعا في التهاب المسالك البولية والتهاب الحروق

Staphylococcus aureus 1-3-2-1

تتميز *S.aureus* بكونها بكتريا كروية موجبة لصبغة غرام يبلغ قطرها حوالي 1 مايكروميتر تتجمع خلاياها بشكل مشابه لعناقيد العنب وذلك بالنظر لحدوث انقسامها الخلوي في أكثر من مستوى واحد وغالبا ما تكون متعايشة (Commensal) على الجلد ، والغدد الجلدية ، والأغشية المخاطية (Crossley and Archer, 1997)

تتصف بكتريا *S. aureus* بكونها لاهوائية اختيارية لها القدرة على انتاج الطاقة عن طريق التنفس الهوائي، وعن طريق التخمر الذي ينتج عنه الحصول على حامض اللاكتيك (lactic acid) بشكل رئيسي تعطي نتيجة موجبة لفحص أنزيم Catalase وأخرى سالبة لفحص أنزيم Oxidase (Crossley and Archer, 1997) أما على الأوساط الاغنائية فهي تشكل مستعمرات متوسطة الحجم ذات لون ذهبي كما أنها تسبب تحلل الدم من نوع (β) على الأطباق الحاوية على أكار الدم (Ryan and Ray,2004)

تفرز بكتريا *S. aureus* انزيم Coagulase الذي يتفاعل مع البروثرومبين في الدم مؤديا الى تجلط البلازما عن طريق تحويل مولد الليفين (fibrinogen) إلى الليفين (fibrin) و يستخدم فحص التجلط المذكور لتمييز *S. aureus* عن بقية أعضاء جنس *Staphylococci* والتي تدعى *Staphylococci* coagulase-negative (Ryan and Ray,2004).

تمتلك بكتريا *S.aureus* ميكانيكيات مختلفة لمقاومة المضادات الحيوية تتضمن هذه الميكانيكيات الحد من امتصاص المضاد و تحوير موقع الهدف للمضاد الحيوي بالإضافة الى التدفق النشط للمضاد. اعتمادا على نوع المضادات الحيوية تمتلك البكتريا واحد او اكثر من ميكانيكيات المقاومة و بالاخص وجود مورثات المقاومة على عناصر وراثية مثل البلازميدات اوالعناصر القافزة (transposon) والتي تسهل الانتقال الافقي لمورثات المقاومة بين البكتريا (Van Hoek *et al*., 2011) .

تمكنت *S.aureus* من التكيف بصورة جيدة لمختلف البيئات بسبب قدرتها العالية على التمثيل الغذائي و مقاومتها للعقاقير حيث اكتشف ان حوالي (25-30) % من الأشخاص الاصحاء حاملين بكتريا *S.aureus*على جلودهم او الاغشية المخاطية للبلعوم الانفي كفلورا طبيعية (normal flora) ولاتسبب أي عدوى في الحالة الطبيعية للجهاز المناعي (Rasigade and Vandenesch,2014) لكن بالرغم من ذلك تتمكن هذه البكتريا من احداث إصابات خطيرة عديدة من خلال غزوها

لمجرى الدم او الانسجة الداخلية حيث تتصف بكونها ممرض بشري يؤدي الى مظاهر سريرية تتراوح من عدوى جلدية وانسجة رخوة حميدة الى امراض جهازية مختلفة مهددة للحياة (Chambers and DeLeo, 2009) . وتبقى هذه البكتريا مشكلة صحية عامة صعبة بسبب ظهور وانتشار السلالات المقاومة للعقاقير المتعددة (Multiple Drug Resistant) مثل *S.aureus* المقاومة للمثيسيلين(MRSA) (Methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*)

(Taylor and Unakal, 2022) .

تعد *S. aureus* سبباً غير شائع نسبيا لإصابات الجهاز البولي لعامة السكان (Rasigade and Vandenesch., 2014) بالرغم من ان عزل هذه البكتريا من عينات البول يكون عادة ناتج عرضي لتجرثم الدم الذي يحصل في موقع أخر بالجسم (كما في حالات التهاب شغاف القلب) (Lee *et al*., 1978) ، الا انه في بعض الحالات ممكن ان تسبب هذه البكتريا عدوى المسالك البولية المتصاعدة (Ascending urinary tract infection) بالإضافة الى ان وجود القسطرة البولية (Catheter) ممكن ان يزيد من خطر انتقال هذه البكتريا الى الجهاز البولي (Coll *et al*., 1994)

Escherechia coli 2-3-2-1

هي بكتريا عصوية سالبة لصبغة غرام تنتمي للعائلة المعوية *Enterobacteriaceae* غير مكونة للأبواغ، تتراوح ابعادها بين 0.5 مايكروميتر قطراً و (1-3) مايكروميتر طـولاً (Roesch *et al.,* 2003) .

تتسم معظم سلالات هذه البكتريا بإعطائها نتيجة موجبة لفحص الاندول (indol) وأحمر المثيل (methyl red) بينما تعطي نتيجة سالبة لفحوصات الاوكسديز Oxidase و اليوريز Urease و الستريت Citrate وكبريتيد الهيدروجين (Roesch *et al*., 2003). تظهر البكتريا على هيئة مستعمرات رمادية ناعمة لماعة على وسط اكار الدم اما على وسط اكار الماكونكي فتنمو على شكل مستعمرات وردية مسطحة جافة محاطة بمنطقة وردية غامقة كنتيجة لترسيب املاح الصفراء اما مجهريا فتظهر على هيئة عصيات سالبة لصبغة غرام (Mahon and Lehman, 2019).

معظم سلالات هذه البكتريا متعايشة بصورة طبيعية في الأمعاء وخصوصا أمعاء الأطفال بينما تمكنت سلالات أخرى منها من اكتساب بعض عوامل الضراوة مما منحها القابلية على احداث بعض الامراض المقترنة بالعلامات السريرية مثل الإسهال المعوي، وأخماج المسالك البولية والسحايا (Kaper *et al*., 2004).

عوامل الضراوة لهذه البكتريا يمكن ان تقسم على مجموعتين وهي عوامل سطح الخلية البكتيرية وتتضمن (fimbriae) مثل النوع الأول ونوع P وهي تساعد على الالتصاق على سطح الخلية المضيف وأيضا تكوين الغشاء الحيوي واستحثاث الواسمات وتتضمن أيضا السوط والكبسولة و بروتين الغشاء الخارجي اما عوامل الضراوة الافرازية فتشمل الهيمولايسين وحاملات الحديد (Emody *et al*., 2003) .

لوحظ في عدد من البلدان خلال السنوات السابقة ظهور سلالات *E.coli* المتعددة المقاومة للمضادات الحياتية حيث ازدادت المقاومة للسيفالوسبورينات مما يشكل مشكلة كبيرة في معالجة هذه البكتريا والميكانيكية الشائعة لمقاومة مضادات البيتا لاكتام هي افراز البكتريا لانزيم البيتا لاكتاميز (Franiczek *et al*., 2012) وهناك اليات أخرى للمقاومة مثل وجود طفرة تشفر الى تغيير في موقع الهدف الذي يعمل عليه المضاد و تحوير في الموقع الهدف وانتاج انزيمات تكسر البنية التركيبية للمضاد (Nguyen *et al.,* 2009).

التهابات الجهاز البولي من اكثر الإصابات شيوعا حول العالم وتعد بكتريا *E.coli* السبب الرئيسي لتلك الإصابة حيث تكون قادرة على الالتصاق على الطبقة الطلائية لمثانة المضيف يعقب ذلك غزو البكتريا للطبقة الظهارية لمجرى البول حيث تستطيع هناك ان تتضاعف وتشكل تجمعات مضغوطة من البكتريا داخل الخلية ذات خصائص شبيهة بالغشاء الحيوي (Biofilm) (Zagaglia *et al*., 2022) .

Klebsiella spp. 3-3-2-1

تتصف بكتريا *K. pneumoniae* الرئوية بكونها سالبة لصبغة غرام يتراوح عرضها بين(0.3-1) مايكروميتر وطولها بين (0.6-6) مايكروميتر (Sharma *et al*.,2015) وتنتمي للعائلة المعوية (*Enterobacteriaceae*) التي تتضمن ممرضات معوية مهمة وتعد سبب مهم للعدوى المكتسبة من المستشفيات للجهاز البولي و ذات الرئة وتجرثم الدم (Bacterimia) وتعفن الدم (sepsis) (Jensen *et al*., 2020) .

تعد من الفلورا الطبيعية للامعاء وان حوالي ثلث سكان العالم يحملون هذه البكتريا بدون أي اعراض ظاهرة في جهازهم المعوي (Brisse *et al.,* 2006) و هذه البكتريا المتعايشة نادرا ما تسبب إصابة للأشخاص الاصحاء لكن بالنسبة للأشخاص ذو الأمراض المصاحبة فانهم عادة يكونون حساسين لبكتريا ذات الرئة المهددة للحياة و إصابات الجهاز البولي و إصابات مواضع العمليات الجراحية المتسببة بواسطة *K. pneumoniae* (Chen *et al.,* 2014) .

تتميز هذه البكتريا بكونها لاهوائية اختيارية تعطي نتيجة سالبة لكل من فحص الاوكسيديز والكاتاليز وتشكل مستعمرات رمادية اللون مخاطية القوام على وسط اكار الدم بينما تكون مستعمرات وردية فاتحة اللون كبيرة الحجم مخاطية القوام على وسط اكار الماكونكي وتظهر تحت المجهر على شكل عصيات سالبة لصبغة غرام (Mahon and Lehman., 2019) ، أصبحت هذه البكتريا وبشكل متزايد صعبة المعالجة نتيجة لمقاومتها للمضادات الحياتية وباليات المقاومة المختلفة منها تحوير وتعطيل انزيم المضاد الحيوي وتغييرات في موقع الهدف الذي يعمل عليه المضاد بالإضافة الى حدوث الطفرات وفقدان بروتين البورين (Porin) وزيادة التعبير الجيني لمضخة التدفق للمضاد الحيوي وأيضا قابليتها على انتاج الغشاء الحيوي (Biofilm) (Mulani *et al*., 2019) .

من ناحية أخرى فان هذه البكتريا تمتلك العديد من عوامل الضراوة بضمنها الكبسولة (capsule) و السموم الداخلية (endotoxins) ونظام التخلص من الحديد (Iron scavenging sysbla Tem) و الالتصاق حيث تلعب دورا مهما في امراضية البكتريا (Clegg and Murphy,2016).

وتعد بكتريا *K.pneumniaoe* بكتريا انتهازية و مسؤولة عن نسبة كبيرة من التهابات المسالك البولية (Farajnia *et al* ., 2009) ، حيث ان إصابات الجهاز البولي هي من اكثر الاصابات البكتيرية حدة و اكثرها حدوثا حول العالم (Al-Naqshbandi *et al* ., 2019).

أوضحت دراسة سابقة ان حدوث إصابة المسالك البولية بواسطة هذه البكتريا يتراوح من (5- 53)% (Sui *et al*., 2017) بالاضافة الى تسببها بعدة امراض منها امراض الكبد المزمنة (تليف الكبد)، والفشل الكلوي المزمن ، والتهاب الحروق (Janda, and Abbott, 2006).

***Pseudomonas spp*. 4-3-2-1**

ينتمي جنس *Pseudomonas* الى عائلة *Pseudomonadaceae* ، وهي بكتريا هوائية متحركة سالبة لصبغة غرام ، تكون بشكل عصيات متطأولة يتراوح طولها من (2-4) مايكروميتر ، لها سوطا قطبيا يمتلك دور رئيسي في الامراضية ، وهي غير مكونة للأبواغ ويمكن أن تنتج أصباغ ، مثل pyocyanine (وتكون خضراء مزرقة) و pyorubin وتكون صفراء مخضرة (Willcox,2007) يمكن تمييز مستعمراتها على وسط اكار الدم بكونها مسطحة ذات بريق معدني و حواف غير منتظمة محاطة بلون اخضر وذات رائحة شبيهة برائحة العنب ويمكن ان تشاهد منطقة شفافة حولها لانتاجها الهيمولايسين الذي يسبب تحلل الدم من نوع β اما على وسط الماكونكي فهي تظهر بهيئة

مستعمرات باهتة لعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز اما مجهريا فهي تظهر على شكل عصيات سالبة لصبغة غرام (Mahon and Lehman, 2019).

يسبب وجود هذه البكتريا مشكلة في اغلب المستشفيات عالميا كما يمكن العثور عليها على الاجهزة مما يزيد من خطر الإصابة بعدوى المستشفيات بنسبة تصل الى % (10-20) في جميع انحاء العالم، يمكن لهذه البكتريا ان تسبب سلسلة من الامراض الخطيرة منها ذات الرئة المرافقة للتنفس الصناعي واصابات مجرى الدم وإصابات الجهاز البولي واصابات الانسجة الرخوة والاصابات الجهازية (Chatterjee *et al*., 2016).

تتصف Pseudomonas *spp* بكونها مقاومة للعديد من المضادات الحيوية ويمكن ان تكتسب المقاومة لأغلب المضادات الحيوية تقريبا لتكون متعددة المقاومة للمضادات الحياتية (Pang *et al*., 2019) يأتي هذا بالتزامن مع وجود عوامل الضراوة لها والتي تؤدي الى زيادة نسبة حدوث المرض والوفيات (Strateva and Mitov, 2011).

هناك ثلاثة مستويات من اليات المقاومة من خلالها تتمكن هذه البكتريا من مقاومة المضادات وهي : جوهرية (Intrinsic) وتتضمن انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي والتعبير الجيني لمضخات التدفق التي تقذف المضاد الحيوي خارج الخلية وإنتاج الانزيمات المعطلة للمضاد و مكتسبة (Acquired) تتضمن اما الانتقال الافقي لجينات المقاومة او التغييرات التي تحدثها الطفرات (Breidenstein *et al*., 2011) و متكيفة (Adaptive) وتشمل تكوين الغشاء الحيوي في رئة المرضى حيث يعمل على تقليل انتشار المضاد الحيوي الى داخل الخلية البكتيرية (Drenkard, 2003) .

تمتلك *P.auruginosa* عوامل ضراوة عديدة مقسمة على عومل متعلقة بالخلية تتضمن الالتصاق و عديد السكريات الدهني و عوامل افرازية مثل السم الخارجي نوع A والبروتييز و الانزيمات الخارجية وغيرها (Mitov *et al*., 2010) .

تمثل إصابات الجهاز البولي المتعلقة بالقسطرة البولية حوالي 40% من الإصابات المكتسبة عن طريق المستشفيات وبكتريا *Pseudomonas* الموجودة داخل القسطرة تكون مسؤولة عن انتاج الغشاء الحيوي والتصاقه مباشرة على سطح القسطرة حيث يقوم هذا الغشاء بتقييد المكونات الميكروبية مؤديا الى احداث إصابة مزمنة تقود الى زيادة نسبة الامراضية وحالات الوفاة (Obritsch *et al*., 2005).

من اهم أسباب التهاب الحروق هي بكتريا *Pseudomonas* والتي هي جزء من الفلورا الطبيعية لجلد الانسان ونادرا ما تسبب عدوى للأشخاص الاصحاء بالرغم من كونها مسؤولة عن التهابات حادة في الأشخاص ضعيفي المناعة مثل أولئك الذين يعانون من حروق حادة حيث تسبب تلك الحروق اختراق كبير لطبقة الجلد والذي يكبح الجهاز المناعي جاعلا المريض اكثر عرضة للالتهاب بواسطة

P.aeuroginosa والتي تستوطن الجلد المحترق بسهولة بهذه الحالة ،اذ تبين بان إصابة الحروق ببكتريا *Pseudomonas* ممكن ان تنتشر الى أعضاء أخرى بعيدة وممكن ان تسبب تجرثم الدم والصدمة السمية الداخلية (endotoxic shock) و تعفن الدم (Church *et al.,* 2006) .

4-2-1 المضادات الحيوية (Antibiotics)

هي مواد عضوية تنتجها الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا والفطريات أثناء نموها وتكون قادرة بتركيز منخفض على تدمير أو منع نمو الكائنات الحية الدقيقة المنافسة لها (Jawad *et al.,* 2020).

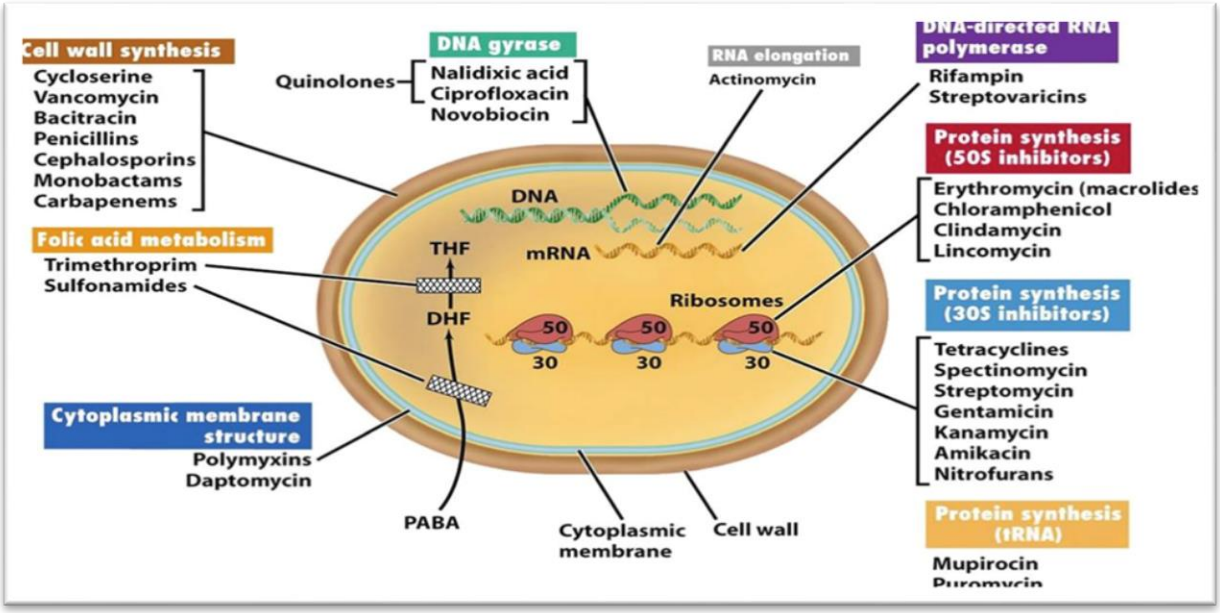
مصطلح المضادات الحيوية مأخوذ من كلمة "Antibiosis" والتي تعني حرفيا "ضد الحياة". في الماضي كانت المضادات الحيوية تعتبر مركبات عضوية ينتجها كائن حي دقيق وهي سامة لكائنات دقيقة أخرى(Russell, 2004) ونتيجة لهذه الفكرة تم تعريف المضاد الحيوي على أنه مادة تنتجها كائنات دقيقة واحدة **(**Denyer *et al*., 2004)، أو من أصل بيولوجي (Schlegel, 2003) والتي يمكن أن تمنع نمو البكتيريا بتركيز منخفضة أو تكون قاتلة للكائنات الحية الدقيقة الأخرى (Russell, 2004).

حديثا تم تعديل هذا التعريف ليشمل مضادات المايكروبايوتك التي يتم إنتاجها أيضًا جزئيًا أو كليًا من خلال وسائل اصطناعية (Arikekpar and Etebu,2016) في حين نجد ان بعض المضادات الحيوية قادرة على القضاء على الاحياء المجهرية الأخرى بشكل كامل وبعضها قادر فقط على منع نمو الاحياء المجهرية تسمى تلك التي تقتل البكتيريا bactericidal بينما تسمى تلك التي تثبط نمو البكتيريا bacteriostatic (Walsh, 2003) ،وعلى الرغم من أن المضادات الحيوية تشير عمومًا إلى مضادات البكتيريا إلا أن مركبات المضادات الحيوية يتم تمييزها كمضادات للبكتيريا ومضادات للفطريات لتعكس مجموعة الكائنات الحية الدقيقة التي تعاديها (Brooks *et al*., 2004) .

هناك طرق عذة لتصنيف المضادات الحيوية ولكن مخططات التصنيف الأكثر شيوعًا تعتمد على بنيتها الجزيئية وطريقة عملها وطيف نشاطها (Calderon and Sabunday, 2007) ، تظهر المضادات الحيوية الموجودة ضمن نفس الفئة الهيكلية نمطًا مماثلاً من الفعالية والسمية والآثار الجانبية المحتملة للحساسية(Van Hoek *et al*., 2011).

تشمل بعض الفئات الشائعة من المضادات الحيوية القائمة على التركيبات الكيميائية أو الجزيئية Beta-lactams, Macrolides, Tetracyclines, Quinolones, Aminoglycosides, Sulphonamides, Glycopeptides وOxazolidinones (Frank and Tacconelli, 2012) (Adzitey., 2015).

هناك العديد من الآليات التي تستخدمها البكتيريا لمقاومة المضادات الحيوية، مثل إفراز الإنزيمات التي تعطلها، وهذا ما يحدث في حالة البكتيريا المقاومة للبنسلين "G" التي تنتج إنزيم بيتا-لاكتاماز (Fischetti *e t al*., 2006).



الشكل (1-2) المواقع المستهدفة للمضادات الحيوية(Etebu and Arikekpar.,2016)

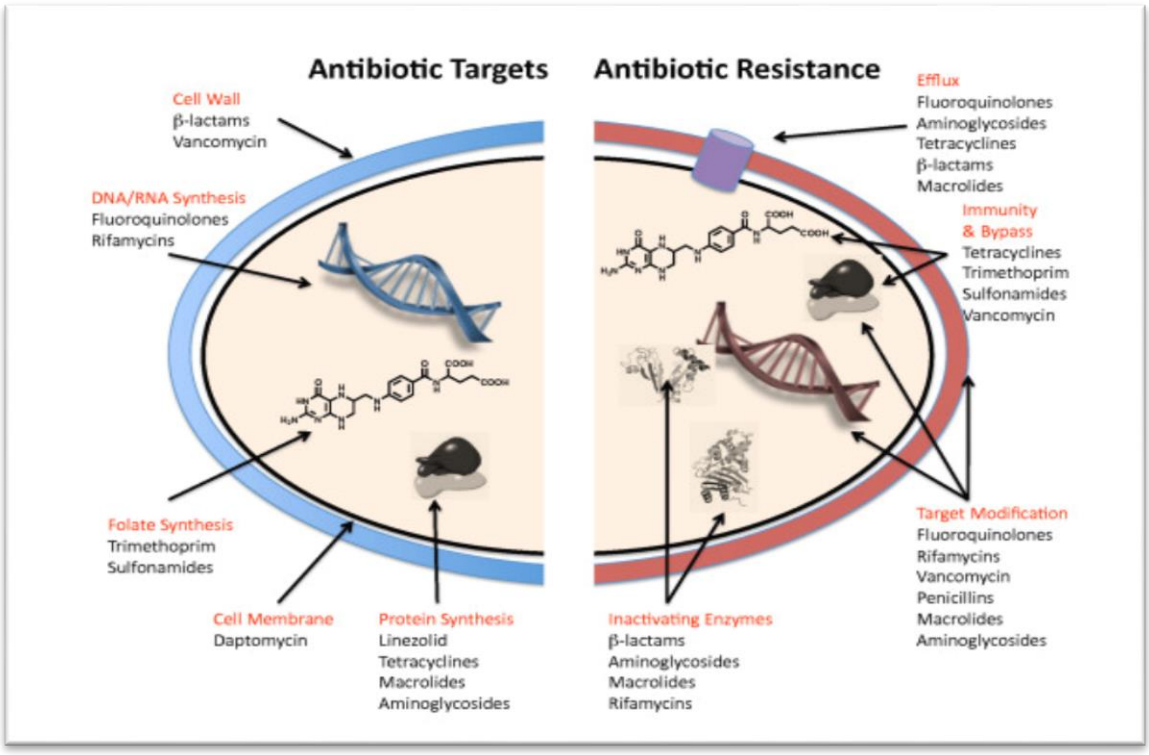
1-2-5 ميكانيكيات مقاومة البكتريا

مقاومة البكتيريا الواسعة النطاق للمضادات الحيوية هي السبب في مئات الآلاف من الوفيات كل عام، والمشكلة الأكثر خطورة هي العدد المتزايد باستمرار من البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة بشكل شائع بما في ذلك الأجيال الحديثة مثل (الفانكومايسين) ، حيث تؤكد سرعة انتشار جينات المقاومة حول العالم والارتفاع المقلق بانها مشكلة تؤثر على الصحة العامة على نطاق عالمي وتتطلب التعاون الدولي (Reygaert, 2018).

فاصبحت الزيادة السريعة في مقاومة المضادات الحيوية البكتيرية مشكلة ملحة للرعاية الصحية العالمية، من الضروري التقليل من استخدام المضادات الحيوية لمواجهة الفقدان المتزايد لفعاليتها، إلا أنه يجب استخدامها فقط في الحالات المؤكدة من الالتهابات البكتيرية بالإضافة إلى الاستخدام الدقيق للمضادات الحيوية(Piatek *et al*., 2020).

هناك عدة عوامل مهمة يمكن أن تسرع من تطور مقاومة الأدوية وتشمل هذه الإفراط في استخدام المضادات اوإساءة استخدامها، والاستخدام غير المناسب لمضادات الميكروبات، والجرعات وبدون وصفات العلاج، وعدم امتثال المريض لدورة العلاج الموصى بها. اثبتت الدراسات العثور على العديد من الجينات المسؤولة عن مقاومة الأدوية على البلازميدات plasmids أو على العناصر القافزة transposons التي يمكن نقلها بسهولة بين الميكروبات من خلال نقل الجينات الأفقي ، تتمتع transposons أيضًا بالقدرة على نقل جينات المقاومة بين plasmids والكروموسومات لتعزيز انتشار صفة المقاومة (Mahon *et al*., 2014).

هناك العديد من الآليات الشائعة لمقاومة المضادات الحيوية والتي تم تلخيصها في الشكل (1-3) وتشمل هذه الآليات التعديل الأنزيمي للدواء، وتعديل الهدف المضاد للميكروبات، ومنع اختراق الدواء أو تراكمه.



الشكل(1-3): استراتيجيات متعددة تستخدمها الميكروبات لتطوير مقاومة الأدوية للمضادات الحيوية (Ali, 2021)

حيث طورت البكتريا بمرور الوقت اليات مقاومة عديدة لهذه المضادات فقد امتلكت بكتريا *S.aureus* بما يسمى flow pump كذلك تميزت بوجود بدائل الاحماض الامينية في الموقع الفعال ل (Fluoroquinilones) لانزيمات topoisomerase IV و DNA gyrase و بكتريا *Pseudomonas* طورت مضخات التدفق لمقاومة هذه المضادات والتي تكون اما جوهرية (Intrinsic) او مكتسبة (Acquired) (Behazadi *et al.*, 2021) ، كذلك من خلال استحداث طفرات في الانزيمات الهدف للمضاد والتي تمنح مقاومة عالية المستوى لهذه المضادات (Jalal *et al.*, 2000) . اما بكتريا *K. pneumoniae* فقد وجد انها طورت كل اليات المقاومة لهذه المضادات المكتشفة في البكتريا السالبة لصبغة غرام وهذا يشمل الطفرات في جين *gyrA* في الانزيم الهدف لهذه المضادات والإنتاج المفرط لمضخات التدفق إضافة الى التعبير عن البلازميد الذي يحمل جينات *qnrA* التي تنتج البروتينات التي تحمي الانزيمات الهدف فيزيائيا من فعل هذه المضادات (Navon-Venezia

(*et al.,* 2017)،تقاوم بكتريا الE.coli تقاوم هذه المضادات من خلال تعدد الاشكال للنيوكليوتيد المفرد (Single nucleotide polymorphism)في جين *gyr*A
. (Von Baum and Marre, 2005)

1-5-2-1 الية تحوير عمل المضاد الحيوي او تثبيطه Antibiotic Modification or Inactivation

قد تشفر جينات المقاومة إلى إنزيمات تقوم بتعديل المضاد الحيوي كيميائيًا، وبالتالي تعطيله، أو تدميره من خلال التحلل المائي. تحدث مقاومة العديد من أنواع مضادات الميكروبات من خلال هذه الآلية ، على سبيل المثال ما يحدث عند مقاومة aminoglycoside ، مما يضعف ارتباط الدواء بالهدف البكتيري وكذلك بالنسبة لـ β-lactams. يمكن أن تكون المقاومة البكتيرية عبر التحلل المائي الأنزيمي لرابطة β-lactam داخل حلقة β-lactam من جزيء المضاد الحيوي ، وبمجرد كسر رابطة β-lactam يفقد الدواء نشاطه المضاد للبكتيريا ، حيث يعد هذا النوع من آلية المقاومة لإنزيمات β-lactams هي الآلية الأكثر شيوعًا لمقاومة β-lactam (Vanessa and Gerard, 2009) .

2-5-2-1 الية منع الامتصاص الخلوي أو التدفق Prevention of Cellular Uptake or Efflux

قد تطور البكتريا آليات مقاومة تتضمن تثبيط تراكم المضاد الحيوي، مما يمنعه من الوصول إلى هدفه الخلوي وهذه الإستراتيجية شائعة بين مسببات الأمراض Gram-negative pathogens ويمكن أن تنطوي على تغييرات في تكوين الدهون في الغشاء الخارجي outer membrane lipid composition ، وانتقائية قناة البورين porin channel selectivity ، و تراكيز قناة البورين porin channel concentrations فعلى سبيل المثال، الآلية الشائعة التي تستخدمها *P. aeruginosa* لمقاومة carbapenem هي تقليل كمية البورين OprD الخاص بها والذي يعد البوابة الرئيسية لدخول carbapenems عبر الغشاء الخارجي ، بالإضافة إلى ذلك تنتج العديد من البكتيريا المسببة للأمراض Gram-positive and Gram-negative مضخات التدفق التي تنقل المضاد الحيوي بشكل فعال خارج الخلية وتمنع تراكم الدواء مثال على ذلك تحدث مقاومة β-lactams ، tetracyclines ، fluoroquinolones بشكل شائع من خلال التدفق النشط خارج الخلية، ومن الشائع إلى حد ما أن تتمتع مضخة التدفق الواحدة بالقدرة على نقل أنواع متعددة من المضادات الحيوية . (Reygaert, 2018)

3-5-2-1 الية تعديل الهدف Target Modification

تعمل المضادات الحيوية على أهداف محددة جدًا لذلك فإن التغييرات الهيكلية لتلك الأهداف يمكن أن تمنع ارتباط الدواء مما يجعل الدواء غير فعال من خلال الطفرات التلقائية في الجينات التي تشفر أهداف المضادات للبكتيريا، اذ يمكن للتغيرات الجينية التي تؤثر على البروتينات المرتبطة بالبنسلين (PBPs) penicillin-binding proteins أن تمنع ارتباط أدوية β-lactam وتوفر مقاومة لأدوية متعددة ضمن هذه الفئة وهذه الآلية شائعة جدًا بين سلالات المكورات العقدية الرئوية *Streptococcus pneumoniae* ، التي تغير PBPs الخاصة بها من خلال الآليات الجينية في المقابل تطور سلالات المكورات *S. aureus* مقاومة الميثيسيلين methicillin (MRSA) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* من خلال اكتساب PBP جديد منخفض الألفة، بدلاً من تغيير PBPs .

لا يوفر البروتينات المرتبطة بالبنسلين الجديد منخفض الألفة مقاومة methicillin فحسب بل يوفر أيضًا مقاومة لجميع أدوية β- lactam تقريبًا باستثناء الجيل الخامس الأحدث من cephalosporins المصممة خصيصًا لقتل MRSA (Lambert, 2005) .

4-5-2-1 الية الإفراط في الإنتاج Target Overproduction or Enzymatic Bypass

عندما يعمل المضاد الحيوي كمضاد ايضي antimetabolite ويستهدف إنزيمًا معينًا لمنع نشاطه، فهناك طرق إضافية قد تحدث بها المقاومة البكتيرية، فقد تقوم البكتريا في إنتاج الإنزيم المستهدف من قبل المضادات الحيوية وبشكل مفرط بحيث تكون هناك كمية كافية من الإنزيم الذي لم يرتبط بالمضاد الحيوي من المضادات الحيوية للقيام بالتفاعل الأنزيمي المناسب كما قد تطور الخلية البكتيرية مسارًا جانبيًا بحيث تستغني عن وظيفة الإنزيم المستهدف من قبل المضاد الحيوي. وقد تم العثور على كل من هذه الاستراتيجيات كآليات لمقاومة sulfonamide، ثبت أن مقاومة Vancomycin بين *S. aureus* تنطوي على انخفاض الارتباط المتبادل لسلاسل الببتيد في جدار الخلية البكتيرية مما يوفر زيادة في أهداف ربط Vancomycin بجدار الخلية الخارجي الدي بدوره يوفر انسدادًا يمنع جزيئات الدواء الحرة من الاختراق إلى حيث يمكنها منع تكوين جدار الخلية الجديد (Munita and Arias, 2016).

6-5-2-1 جينات المقاومة البكتيرية Bacterial Resistance Genes

يمكن للبكتريا المرضية أن تكتسب جينات تشفر لاليات مقاومة المضادات الحيوية المتعددة، بما في ذلك إنزيمات اللاكتاميز واسعة الطيف Methicillin-resistant *Staphylococcus* (ESBLs) *aureus* وإنزيم AmpC-β-lactamase ، وCarbapenemase).

يمكن إجراء البحث عن جينات المقاومة باستخدام اختبارات الحساسية لتحديد ما إذا كانت البكتيريا مقاومة لمضادات حيوية معينة ام لا، كذلك التشخيص الجزيئي إذ يمكن استخدام التشخيص الجزيئي لتحديد وجود جينات المقاومة في البكتيريا، تمثل الجينات التي تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحيوية عقبة كبيرة في علاج الامراض التي تسببها تلك البكتريا ، حيث تجعل من الصعب علاج العدوى البكتيرية كما يمكن أن تؤدي جينات المقاومة إلى زيادة معدلات الإصابة بالعدوى، وزيادة شدة العدوى، وزيادة معدلات الوفيات (Ho *et al*., 2019).

جينات المقاومة من نوع *shv* هي جينات تمنح البكتيريا مقاومة لمضادات حيوية من مجموعة الأمينوغليكوزيدات، مثل التوبراميسين، والأمبيسيلين، والأميكاسين. هناك العديد من أنواع جينات المقاومة *shv*، ولكن أكثرها شيوعًا هي *shv1* ، و*shv2*، و*shv3*.

أيضا جينات المقاومة *bla tem* هي جينات تمنح البكتيريا مقاومة لمضادات حيوية من مجموعة البنسلين، مثل البنسلين، والأموكسيسلين، والأموكسيسيلين/كلافيولانات، و أكثرها شيوعًا هي *bla tem1* ، و*bla tem2*، و*bla tem3*. (Jena *et al*., 2017)

اثبتت الدراسات أيضا وجود جينات المقاومة *erm* و هي جينات تمنح البكتيريا مقاومة لمضادات حيوية من مجموعة الكينولونات، مثل سيبروفلوكساسين، وليفوفلوكساسين، ونورفلوكساسين و أكثرها شيوعًا هي *erm*B، و*erm*C، و*erm*E. (Baunoch *et al*., 2021) .

كما ان جينات المقاومة *qnrA* هي جينات تمنح البكتيريا مقاومة لمضادات حيوية من مجموعة الكوينولونات، مثل سيبروفلوكساسين، وليفوفلوكساسين، ونورفلوكساسين و أكثرها شيوعًا هي*qnrA*S ، و*qnrA*B.

بينما جينات المقاومة *aac(6)-lb-cr* هي جينات تمنح البكتيريا مقاومة لمضادات حيوية من مجموعة الأمينوغليكوزيدات، مثل التوبراميسين، والأمبيسيلين، والأميكاسينو و تعمل هذه الجينات عن طريق إضافة مجموعة استيل إلى المضادات الحيوية من مجموعة الأمينوغليكوزيدات، مما يجعلها أقل فعالية في قتل البكتيريا (Soundararajan *et al*., 2016) . تختلف هذه الجينات في كيفية مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية، ولكن جميعها تعمل عن طريق تغيير بنية البروتينات التي تستهدفها المضادات الحيوية (Ho *et al*., 2019).

6-2-1 البكتريا المحفزة حيويا (Probiotic):

عرفت منظمة الصحة العالمية (WHO)البكتريا المحفزة حيويا على انها " احياء مجهرية حية (Gasbarrini *et al*., 2015) ، تعطي هذه الاحياء فوائد عديدة للبشر، يمكن ان تتضمن منع تطور الملوثات المايكروبية المنقولة عن طريق الغذاء (McFarland *et al*., 2018) .

تتمتع البكتريا المحفزة حيويا بقدرة كبيرة على البقاء في ظل الظروف المعوية ، درجة الحموضة والاملاح الصفراوية، حيث تمتلك القدرة على تحمل الرقم الهيدروجيني 3 لمدة 3 ساعات، والأملاح الصفراوية 0.3٪ لمدة 4 ساعات، و1.9 ملغم / مل من إنزيمات البنكرياس لمدة 3 ساعات (Shokryazdan *et al*., 2014).

لقد أظهروا قدرة جيدة على الارتباط بالخلايا الظهارية المعوية كما تظهر تأثيرات مفيدة على المضيف ، (Mendonça *et al*., 2023).

تثبط البكتريا المحفزة حيويا نمو الممرضات المايكروبية المنقولة بالغذاء و تحمي المضيف من الممرضات و تثبط تطور الأورام و تمنح التوازن وتقوم بالحفاظ على البكتريا المعوية النافعة و توفير التوازن المناعي للطبقة المخاطية للمعدة (Khaneghah *et al*., 2020).

لم يتم توثيق الطرق التي تمكن البكتريا المحفزة حيويا من انجاز أعمالها بشكل جيد ومع ذلك هناك العديد من الاستتراتيجيات المفترضة التي تفسر آثارها الإيجابية (Mazziotta *et al*., 2023).

واحدة من اهم تلك الآليات هي المنافسة على مواقع الالتصاق مما يعني أن البكتريا المحفزة حيويا" تقاتل من أجل الالتصاقات الخلوية حيث يجب أن ترتبط العديد من الكائنات المسببة للأمراض ببطانة الجهاز الهضمي بشكل فعال(Javanshir *et al*., 2021) .

ومع ذلك يمكن لبعض سلالات بكتريا *Bifidobacterium* و *Lactobacillus* أن تلتصق بالبطانة وتعمل كحواجز عن طريق منع مسببات الأمراض من الالتصاق بالغشاء المخاطي، وقد تتجلى هذا التأثير مع سلالة *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* حيث أظهر كل من هذه الكائنات القدرة على تثبيط ارتباط الإشريكية القولونية بخلايا القولون ، وهناك آلية أخرى ممكنة لعمل هذه الكائنات وهي تحوير الفلورا الطبيعية من خلال تخليق المركبات المضادة للميكروبات (Javanshir *et al*., 2021).

أظهرت البكتريا المحفزة حيويا قدرة كبيرة لعلاج مجموعة متنوعة من الامراض وخاصة امراض الجهاز الهضمي (والتي تشمل الاسهال الحاد والاسهال المرتبط بالمضادات الحياتية والتهاب القولون التقرحي ومتلازمة القولون العصبي والاضطرابات الوظيفية للجهاز الهضمي و التهاب بطانة القولون النأخر.

واحدة من الخصائص المهمة للبكتريا المحفزة حيويا هي قدرتها على انتاج مواد مثل البكتريوسين (Bacteriocin) ومضادات السرطان او مواد أخرى ذات خصائص معززة للصحة او خصائص دوائية حيث تنتج العديد من أنواع العصيات اللبنية و *Bifidobacterium* البكتريوسين والذي يمكن تعريفه على انه "مركبات تنتجها البكتيريا التي تحتوي على جزء بروتين فعال حيويا و ذو نشاط قاتل للبكتريا (Sharifi-Rad *et al*., 2020).

7-2-1 اليات عمل بكتيريا حامض اللبنيك ضد مسببات الامراض: Mechanisms of action of lactic acid bacteria against pathogens:

إن العديد من اجناس وانواع بكتيريا حامض اللبنيك تمتلك اليات وطرق للعمل لتثبيط او قتل البكتيريا المرضية واحده او أكثر وفيما يأتي استعراض لاهم تلك الاليات :

1-7-2-1 انتاج الاحماض العضوية Production of organic acids

بكتيريا حمض اللاكتيك (LAB) هي مجموعة من البكتيريا الموجبة لصبغة غرام والتي لا تشكل ابواغ، تكون على شكل كرات أو عصيات تنتج مجموعة واسعة من الأحماض العضوية مثل حامض الخليك، وحامض اللبنيك، وحامض الليمون، وحامض السكسينيك، وحامض البروبيونيك ، وما إلى ذلك كمنتج نهائي لتخمير الكربوهيدرات (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010) تكون الأهداف الرئيسية لهذه الأحماض العضوية هي جدران الخلايا البكتيرية والأغشية السايتوبلازمية واستقلاب معين للبكتيريا يؤدي إلى تدمير وموت الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض (Nair *et al*., 2017).

تؤدي الأحماض العضوية، وخاصة حمض اللاكتيك الذي تنتجه بكتيريا حمض اللاكتيك (LAB) ، إلى خلق بيئة محلية غير مواتية لنموالبكتريا المرضية (Dittoe *et al*., 2018) حيث كشفت دراسة أجراها (Wang *et al*., 2015) أن تركيز حمض اللاكتيك بنسبة (0.5 حجم/حجم) يمنع نمو مسببات الأمراض، مثل *Salmonella* و*Escherichia coli* و *Listeria monocytogenes* .

بفضل الخصائص الفسيولوجية لبكتيريا حمض اللبن، مثل استخدام المواد الاساس والقدرات الأيضية والطبيعة الحيوية، فهي ذات أهمية كبيرة و من بين سلالات بكتيريا حمض اللبن، تعتبر *Lactobacillus*مهمة للغاية لمقاومتها العالية للأحماض وعائدها المرتفع من الأحماض العضوية وإنتاجيتها (Kylä-Nikkilä *et al*., 2000).

يُعتقد أن بعض سلالات *Lactobacillus* تظهر نشاطًا مناعيًا، ونشاطًا مضادًا لارتفاع ضغط الدم، والقدرة على ربط الكالسيوم، ونشاطًا مضادًا للورم(Nouaille *et al*., 2003) .

السكريات هي المادة الاساس المفضلة لبكتيريا حمض اللاكتيك المخمرة المتغايرة،ومع ذلك، تستطيع بكتيريا حمض اللاكتيك المخمرة تخمير الهكسوز وإنتاج حمض اللاكتيك من خلال تفاعل التحلل السكري وإنزيم ازالة الالكترونات من اللاكتيت (Lactate dehyrogenase) .

تم دراسة تطوير العمليات الميكروبية لإنتاج الأحماض العضوية باستخدام بكتيريا حمض اللاكتيك من قبل العديد من الباحثين .يتم إنتاج اللاكتات والسكسنات حاليًا على نطاق تجاري؛ وهناك حاجة إلى إجراء مزيد من البحث لتوسيع إنتاج الأحماض العضوية الأخرى من عمليات المختبر إلى العمليات التجارية واسعة النطاق(Pleissner *et al*., 2017) .

1-2-7-2-1 انتاج بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide production

إلى جانب المصادر الداخلية لـ H_2O_2 في جسم الإنسان، فإن وجود الجزيء في الغشاء المخاطي هو بشكل أساسي من أصل ميكروبي يتم إنتاجه بواسطة المكروبات الموجودة بالغشاء نفسه يمكن للبكتيريا المنتجة لحمض اللاكتيك، مثل العصيات اللبنية والمكورات العقدية والمكورات الرئوية، إطلاق كميات يمكن اكتشافها من H_2O_2 في بيئتها. تفتقر هذه البكتيريا إلى بروتينات الهيم والسيتوكروم للأكسدة الطرفية وتستخدم بروتينات الفلافو التي تصنع H_2O_2 من O_2 عن طريق أكسدة اللاكتات أو البيروفات أو NADH مع الإنزيمات المقابلة (Hertzberger *et al*.,2014)يمكن أن يتراكم H_2O_2 البكتيري إلى حد ما على الأغشية المخاطية لأن بكتيريا حمض اللاكتيك لا تستطيع تحويله مع إنزيمات مثل الكاتلاز أو البيروكسيديز (على سبيل المثال، NADH بيروكسيداز) بنفسها(kim et al .,2009).

وقد تبين أن الإنزيمات المولدة لبيروكسيد الهيدروجين ذات الأصل البكتيري يتم التعبير عنها بشكل أساسي، مما يشير إلى أن تخليق H_2O_2 يعتمد بشكل أساسي على O_2 المتوفر في البيئة (Miko and Barakony ,2023).

2-1-7-2-1 انتاج البكتريوسين Bacteriocin production

البكتريوسين هي ببتيدات متعددة الوظائف، مضادة للميكروبات تنتجها بكتيريا مختلفة تعمل بتركيزات منخفضة وتثبط بشكل عام نمو الأنواع ذات الطيف الضيق، لكن النتائج الأخيرة تشير أيضًا إلى تثبيطها للبكتيريا واسعة الطيف(Chi and Holo., 2018; Goyal *et al*., 2018) .

خلايا البكتيريا المنتجة لهذه المواد تكون مقاومة لهذه الببتيدات المضادة للميكروبات بسبب وجود بروتينات المناعة على الغشاء الخلوي للبكتيريا المنتجة ومثال عليها النايسين (Nisin) هو بكتريوسين تنتجه سلالات عديدة من *Lactococcus lactis* ، حصل على تصنيف generally recognized as safe (GRAS)(معترف به عمومًا على أنه آمن) من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) Food and Drug Administration ويستخدم بشكل عام في سلامة الغذاء

(Negash and Tesihai, 2020)

يمكن استخدام سلالات البكتيريا المنتجة للبكتريوسين كبكتيريا محفزه حيويا يستخدم البكتريوسين كإضافات غذائية، وفي علاج الأمراض المرتبطة بالبكتيريا المسببة للأمراض وعلاج السرطان . (Nishie *et al*., 2012 ; Yang *et al*., 2014).

في الواقع، يمكن للبكتريوسين الوقاية من بعض الأمراض المعدية التي تسببها سلالات ممرضة من البكتيريا الموجبة لصبغة غرام (*Streptococci*،*Staphylococci*, *Micrococci*) (Nigam *et al*., 2014).

على الرغم من عزل البكتريوسين من العديد من أنواع البكتريا مثل *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*، فقد أظهر نشاطًا كبيرًا ضد البكتيريا المسببة للأمراض، ومع ذلك، يبحث العلماء عن سلالات جديدة من منتجات غذائية مختلفة لحل مشكلة أكثر الالتهابات شيوعًا المرتبطة بالأغذية (Yang *et al*., 2014).

كما أدى زيادة الطلب من المستهلكين على المواد الحافظة الطبيعية إلى جعل العلماء يركزون على إيجاد مثبطات طبيعية جديدة .

تم استخدام بكتريا حامض اللبنيك المنتجة للبكتريوسين في العديد من المزارع البادئة لمنع الميكروبات المسببة للأمراض من استعمار العديد من المنتجات الغذائية، تجعل هذه الخصائص الواعدة للبكتريوسين والبكتيريا حمض اللبن المنتجة للبكتريوسين مهمة ليس فقط لحفظ الأغذية ولكن أيضًا لعلاج بعض مسببات الأمراض المقاومة للأدوية (Nigam *et al*., 2014 ; Güllüce *et al*., 2013).

3-1-7-2-1 المنافسة على المغذيات Competition on nutrients

تلعب بكتيريا حامض اللبنيك " دورًا رئيسيًا في الحفاظ على صحتنا عن طريق منافسة الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض على العناصر الغذائية التي تحتاجها الأخيرة للنمو (Bajaj *et al*., 2021).

وأشارت دراسة سابقة إلى أن الكائنات الحية المتعايشة (المفيدة) وبعض الكائنات المرضية تسعى للحصول على نفس الموارد الغذائية على عكس الأنواع البعيدة الصلة وتتضمن هذه المغذيات الفيتامينات والعناصر النزرة والركائز الكربونية والأحماض الصفراوية الثانوية (Strain *et al.,* 2022).

وفي دراسة أخرى تكمل الأبحاث المذكورة أعلاه، أشار دراسات أخرى إلى دور بكتريا حامض اللبنيك في امتصاص الحديدحيث يعد الحديد من المغذيات الدقيقة الأساسية لنمو ووظيفة معظم البكتيريا.

تربط بكتيريا حامض اللبنيك هيدروكسيد الحديديك على سطح خلاياها، مما يجعل إمدادات الحديد غير متوفرة للكائنات الحية المرضية (Elli *et al*., 2000) .

4-1-7-2-1 الالتصاق و الاستعمار Adhesion and Colonization

الالتصاق هو تفاعل خاص بين مكونات سطح البكتيريا والبنية المتممة له على سطح خلايا المضيف، وهو خطوة حاسمة ومسبقة لاستعمار البكتيريا في الجهاز الهضمي (Bagon *et al*., 2018; Montoro *et al.,* 2018) . تم تحديد العديد من عوامل الالتصاق التي تسهل الارتباط بالأسطح المخاطية والظهارية وتسهل الاستعمار (Koch *et al*., 2004) من بين مكونات الالتصاق ، يُقترح أن البروتينات السطحية تشارك في استعمار الخلايا الظهارية المعوية والغشاء المخاطي للثدييات (Rojas *et al*., 2002). يتكون بروتين الطبقة الخارجية (S-layer) من وحدة فرعية بروتينية أو جليكوبروتينية و هي البروتينات الأكثر إنتاجًا من الخلايا و يوجد تنوع كبير في تسلسلها ووظيفتها (Engelhardt., 2007).

تحتوي العديد من بكتيريا حمض اللاكتيك على بروتينات S-layer على أسطحها ، وقد يكون لبعض السلالات أكثر من بروتين S-layer واحد على أسطحها (Sára and Sleytr, 2000) .

على الرغم من أن قدرة بكتيريا حامض اللبنيك على الالتصاق بالجسم المضيف لا تضمن بالضرورة فائدة صحية، إلا أن التصاقها بالغشاء المخاطي المعوي يمكن أن يلعب دورًا وقائيًا محتملًا ضد مسببات الأمراض المعوية من خلال المنافسة على مواقع ارتباط خلايا الجسم المضيف .

بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن تزيد قدرة بكتيريا حامض اللبنيك على الالتصاق من فرصة التفاعل مع المضيف مما يؤدي إلى استعمار مؤقت، وبذلك يزيد من وقت عبورها في الأمعاء لممارسة تأثيراتها المفيدة المقصودة، على سبيل المثال، يعزز هذا الاستعمار المؤقت الفعل المحلي للمنتجات الأيضية التي تنتجها بكتيريا حامض اللبنيك مثل الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة، وكذلك التأثيرات المناعية التي تحدث عن طريق جزيئات موجودة على سطح البكتيريا والتي تعمل بروابط لمستقبلات المضيف في الظهارة المعوية وتحفز مسارات الإشارات .

من ناحية أخرى، يمكن لل(oligosaccharides) التي تعمل كمقدمات حيوية(prebiotics) أن تعزز أيضًا قدرة تلك البكتريا على الالتصاق، مما يوحي بأن تطوير منتجات تكافلية جديدة يمكن أن يكون أداة محتملة لزيادة مدة بقاء بكتيريا حامض اللبنيك في الأمعاء .(Celebioglu *et al*. 2017) بالإضافة إلى ذلك، يمكن للمقدمات الحيوية أن تعمل أيضًا كمستقبلات ، مما يثبط التصاق لبعض البكتيريا المسببة للأمراض بالأمعاء وفقًا لما استعرضه(Hickey, 2012)

. تتسم سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك (LAB) بإمكانية كبيرة لأنها تنتج مواد فعالة حيوية قاتلة للجراثيم قادرة على التحكم في نمو مسببات الأمراض،أفادت الدراسات السابقة بالآثار المفيدة التي تمنحها بكتيريا اللبن، بما في ذلك تثبيط البكتيريا الممرضة السالبة والموجبة لصبغة غرام (Charlier *et al*., 2008) .

Maragkoudakis *et al.,* 2006) إن الحفاظ على النشاطات المضادة للميكروبات للبروبيوتيك من شأنه أن يؤكد استخدامها في تطوير أغذية وظيفية لتحسين صحة المستهلك(Eduardo *et al.,* 2003).

اقترحت العديد من آليات التأثير المفيد للبكتريا المحفزة حيويا" تعتبر قدرة بكتيريا حامض اللبنيك " على الالتصاق بالغشاء المعوي مهمة للعديد من التأثيرات الصحية للبكتريا المحفزة حيويا التي تم ملاحظتها تم اقتراح أن قدرة البكتيريا على الالتصاق بالخلايا الظهارية والأسطح المخاطية كخاصية مهمة للعديد من سلالات البكتيريا المستخدمة كبكتريا محفزة حيويا، يعتبر الالتصاق شرطًا أساسيًا لاستعمار تلك البكتريا للتجويف المعوي، مما يوفر ميزة تنافسية في هذا النظام البيئي (Lebeer *et al*., 2008).

5-1-7-2-1 بكتيريا حامض اللبنيك تساعد في عملية الهضم

Probiotics aid host digestion function

يحتوي جسم الانسان على الميكروبات تعمل مع بعضها البعض لأداء وظائف مختلفة. يستوطن جسم الانسان مجاميع مختلفة من الحياء المجهرية تكون المجتمع الميكروبي للجسم وتعمل هذه المجاميع مع بعضها البعض ومن أهمها تلك الموجودة في الجهاز الهضم (Fioramonti *et al*., 2003).

تساعد هذه الميكروبات على تحسين عملية هضم الطعام والاستفادة منه .كما أنها تعوض النقص في المغذيات للانسان فهي تقلل الخطوات اللازمة في أجسامنا لتحويل تركيبات الطعام المعقدة إلى أبسط.

وعلى النقيض، يمكن لأنواع أخرى سيئة من الميكروبات أن تحتل مكانها وتقوم بهضم طعامنا بطريقة غير صحيحة .بل إنها قد تضيف بعض السموم إلى طعامنا أثناء عملية الهضم وبالتالي فإن كل دورة هضمية تؤدي إلى تدهور حقيقي لصحتنا (Amara, 2012) .

يتأثر البشر سلبا بعدم اتباعهم للخطوات الصحيحة لحماية أنفسهم من فقدان السلالات المفيدة واكتساب سلالات ضارة .وفي مثل هذه الحالات ، يلزم إعطاء بكتيريا حامض اللبنيك بجرعات أعلى (Reid *et al*., 2003).

8-2-1 *Lactobacillus*:

يشير جنس العصيات اللبنية إلى مجموعة من العصيات الموجبة لصبغة غرام المنتجة لحمض اللبنيك و التي ممكن ان تكون لاهوائية اجبارية واختيارية في الجهاز الهضمي والجهاز البولي التناسلي للإنسان (Madsen *et al*., 1999).

يشير اسم *Lactobacillus* إلى قدرة البكتيريا على إنتاج حامض اللبنيك، وليس له لقدرة على تخمير سكر اللاكتوز وانتاج حامض اللبنيك (Vanderhoof and Young, 2004) ، تستخدم العصيات اللبنية علاجيا كبكتريا محفزة حيويا ، على عكس المضادات الحيوية تعتبر بكتيريا " صديقة " ويتم تناولها

لغرض إعادة استعمار مناطق الجسم لتوفير فوائد غذائية بما في ذلك تحفيز عوامل النمو وزيادة التوافر الحيوي للمعادن ، كما ان للعصيات اللبنية أيضا قابلية تثبيت الحاجز المخاطي و التقليل من نفاذية الأمعاء (Shornikova *et al*., 1997) .

يتم استخدام بكتريا العصيات اللبنية بشكل منتظم في صناعة منتجات الالبان مثل الزبادي واللبن وجبنة الشيدر كبادئة (Aryana and Olson, 2017) .

تغيير الفلورا الطبيعية من قبل الكائنات المسببة للأمراض يؤدي إلى آثار جانبية، مثل الإسهال والتشنج والتهاب القولون الغشائي الكاذب الأقل شيوعا الناجم عن الإصابة ببكتريا *C. difficile* . (Reid *et al*., 1990) .كما يؤدي تناول بكتيريا حامض اللبنيك أثناء العلاج بالمضادات الحيوية الى منع أو يقلل من نضوب الفلورا الطبيعية واستعمار البكتيريا المسببة للأمراض حيث ان هناك بعض الأدلة لدعم هذه النظرية (Sullivan *et al*., 2003).

تقسم العصيات اللبنية المنتجة لبيروكسيد الهيدروجين تكون ذو فعل قاتل للبكتريا (Bactericidal) لاحد مسببات الأمراض المهبلية *Gardnerella vaginalis* ،وقد ارتبط وجودها في المهبل بانخفاض ترددات التهاب المهبل البكتيري وداء المشعرات كذلك يقوم حامض اللاكتيك المنتج من العصيات اللبنية بتخفيض درجة الحموضة للمهبل،والتي يمكن أن تمنع نمو مسببات الأمراض (Maggi *et al*., 2000)

1-8-2-1 المغذيات البكتيرية (Bacterial nutrients)

تتغذى البكتيريا بطرق مختلفة فتحصل البكتيريا غير ذاتية التغذية على طاقتها عن طريق استهلاك الكربون العضوي حيث يمتص معظمها المواد العضوية وتصنع البكتيريا ذاتية التغذية غذائها إما عن طريق التركيب الضوئي باستخدام ضوء الشمس والماء وثاني أكسيد الكربون أو بواسطة التركيب الكيميائي باستخدام ثاني أكسيد الكربون والماء والمواد الكيميائية مثل الأمونيا والنيتروجين والكبريت وغيرها (Guo *et al*., 2016).

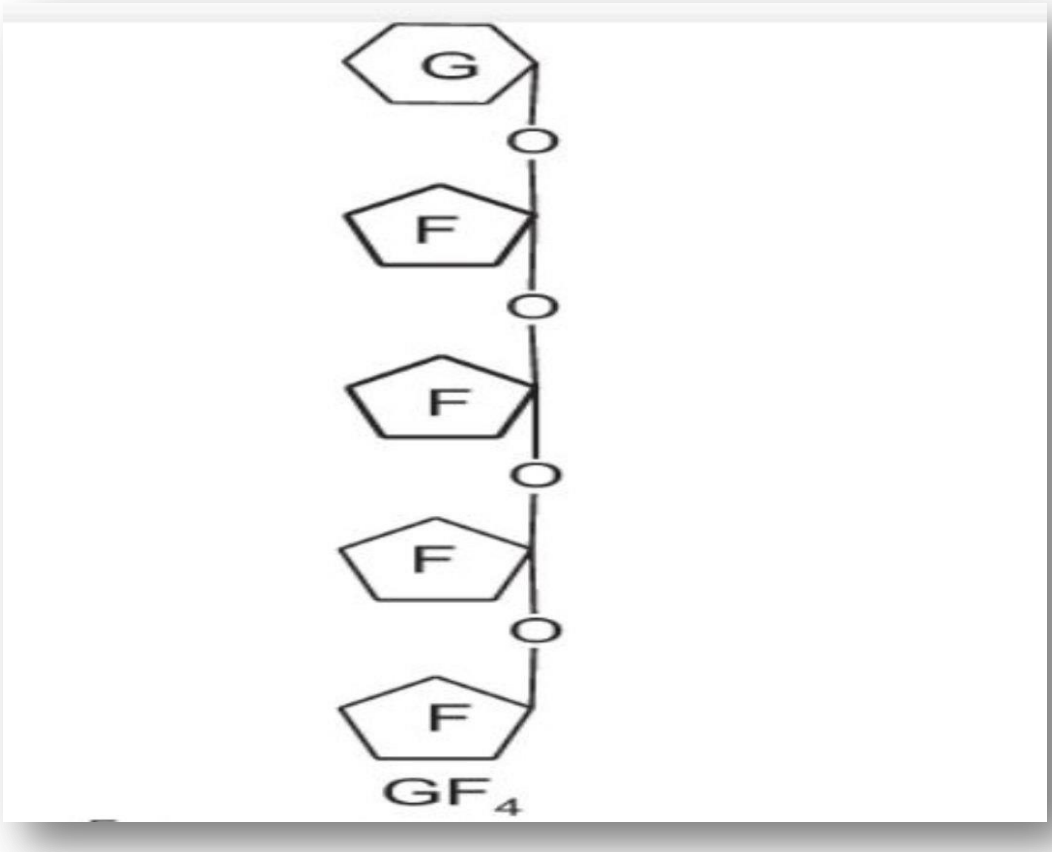
يعد Fructo-oligosaccharides (FOS) من اهم المغذيات البكتيرية وهو عبارة عن سكريات تتواجد بشكل طبيعي في النباتات

فهو النوع الأكثر شيوعًا من البريبايوتك وهو موجود في بعض الأطعمة مثل الموز والقمح والعسل والبصل والطماطم، وعلى عكس بكتيريا البروبيوتيك، لا يتم تدمير البريبايوتك عند طهيها،يعد FOS فركتان من عائلة الأنيولين الذي يستخدم على نطاق واسع في الأطعمة الوظيفية.

وهو ايضا مادة منخفضة السعرات الحرارية وغير مسرطنة تساعد الأشخاص على إدارة مستويات الكوليسترول والدهون لديهم وهو استرطابي للغاية(hygroscopic) وقابل للذوبان في الماء.

. يتألف من سلاسل خطية من وحدات الفركتوز مرتبطة بروابط β (2-1) ، يتراوح عدد وحدات الفركتوز من 2 إلى 60 وحدة وينتهي غالبًا بوحدة جلوكوز، لا يتم تحلل FOS الغذائي بواسطة الكلايكوسيدات المعوية بل تصل إلى الأعور دون التغيير هيكليًا وهناك يتم هضمها بواسطة البكتيريا المعوية لتكوين أحماض كربوكسيلية قصيرة السلسلة وL-lactate، وCO_2، والهيدروجين ومستقلبات أخرى. تمتلك FOS العديد من الخصائص المثيرة للاهتمام وتعد خالية من السعرات الحرارية، وغير مسرطنة.

وتعد من الألياف الغذائية القابلة للذوبان، علاوة على ذلك فإن FOS لها تأثيرات فسيولوجية مفيدة مهمة مثل انخفاض القدرة على السرطنة، وتأثير بكتيريا حامض اللبنيك وتحسين امتصاص المعادن وانخفاض مستويات الكوليسترول في الدم وثلاثي الجلسرين والدهون الفوسفاتية (Guo *et al*., 2016). كما موضح في الشكل (4-1).



الشكل (4-1) :التركيب الكيميائي لمركب Fructooligosaccharides (Singh and Singh., 2010)
G تمثل جزيئة واحدة من الجلوكوز F4 اربع وحدات من الفركتوز

أشارت الأبحاث الحديثة إلى الدور الرئيسي للتركيب الكيميائي للسكريات واطئة التعدد الفردية مثل البكتريا المحفزة حيويا على الكائنات الحية الدقيقة في الأمعاء (Koga *et al*., 2016) . وأظهرت هذه السكريات أيضا تأثيرها الإيجابي على وظيفة الكلى عن طريق التحكم في الكائنات الحية الدقيقة المتواجدة في الأمعاء والتي تنتج Indoxyl sulfate precursor في المصل (IS) ، كما أظهر (1- Kestose GF2) أحد مكونات ثلاثي السكاريد في FOS تاثيره على مرضى الكلى المزمن (Sueyoshi *et al*., 2019) و قدرته على تعزيز بكتريا *Faecali bacterium prausnitzii* (Koga *et al*., 2016) وكذلك علاج التهابات الجلد (Shibata *et al*., 2009).

لقد أظهرت العديد من الدراسات الخصائص الوظيفية لل(FOS) ، مثل خفض مستويات الكوليسترول ومستويات سكر الدم، وخفض ضغط الدم، وتحسين امتصاص الكالسيوم والمغنيسيوم، ولتثبيط إنتاج إنزيمات الاختزال (Reductases) التي يمكن أن تساهم في السرطان، يستخدم ال(FOS) لتحسين خلل التوازن الجرثومي عن طريق تعزيز نمو بكتيريا *Bifidobacterium*، ويقلل من نمو البكتيريا الضارة المحتملة ويعزز الجهاز المناعي .كما أصبح هناك طلب حاجة إلى هندسة نباتات وراثيا لإنتاجFOS .

تلعب (FOS) دوراً مهمًا للغاية في العمليات الحيوية ، وذلك يرتبط ارتباطاً وثيقاً بوجود البكتيريا المعوية . (Hoseinifar *et al*., 2017, Hoseinifar *et al*., 2014).

أظهرت الدراسات السابقة وجود اختلاف واضح في الوظيفة بين سلاسل FOS الطويلة والقصيرة (Mueller *et al*., 2016) و بين أنواع الFOS التي تتكون من هياكل جزيئية مختلفة (Coudray *et al*., 2003, Le Bourgot *et al*., 2019). و يبدو أن هذا الاختلاف لا يعود على الأرجح إلى تأخير إطلاق الFOS أثناء عملية التحلل ، يشير هذا التناقض الظاهر إلى أن درجة البنية الجزيئية المحددة للFOS قد تلعب دورًا مهمًا في امتصاصها والمسار الاستقلابي لها .(Charoenwongpaiboon *et al*., 2019).

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

1-2 المواد Materials

1-2-1الاجهزة والادوات المختبرية Equipments and Laboratory apparatus:

جدول رقم (2-1) اسماء وشركات لصنع الاجهزة والادوات المستخدمة في الدراسة الحالية لغرض التعقيم والعزل والتشخيص والقيام بتجارب الدراسة

جدول(2-1): الأجهزة والادوات المستخدمة

اسم الجهاز	المنشأ/الشركة المصنعة
حاضنة كهربائية Incubator	Binder
ميزان حساس Sensitive balance	Denver _ Germany
مؤصدة Autoclave	Labtech-Korea
مازج دوار Vortex mixer	ROMA-Italy
جهاز الطرد المركزي Centrifuge	Hettich – Germany
حاوية لاهوائية Anaerobic jar	Thermo Fisher-USA
المطياف الضوئي Spectrophotomete	Pye Unicam-England
جهاز Compact 2 Vitek	Biomerieux (France)
ادوات زجاجية Glass Wear	Thermo Fisher-USA
المجهر الضوئي (Light microscope)	Motic-Germany
ثلاجة (Refrigerator)	LG-Korea
مصباح بنزن (Bunsen burner)	Jenway-German
حمام مائي (Water path)	Tafesa – German

1-2-2 المواد ذات الاستخدام الواحدDisposable Materials:

جدول رقم (2-2)المواد ذات الاستعمال الواحد Disposable Material المستعملة في التجربة الحالية

جدول (2-2): المواد ذات الاستخدام الواحد

ت	اسم المادة	الشركة المصنعة	المصدر
1	اطباق البلاستيكية	Afco-Dipo	Jordan
2	انابيب مختبرية حجم 10مل	Afco-Dipo	Jordan
3	ورق ترشيح	Sartorius	Germany
4	اطراف الماصة الدقيقة	Slamed	Germany
5	غطاء الشريحة الزجاجية	Sail Brand	China
6	انابيب ابندروف	Sartorius	Germany
7	قفازات مطاطية	Broche	Malaysia
8	مسحة قطنية مع وسط ناقل	Amies	China
9	قطن طبي	HAD	China
10	شرائح المجهر	Sail Brand	China

2-1-2 المواد الكيميائية Chemicals material:

جدول رقم (2-3) المواد الكيميائية التي تم استخدامها في الدراسة الحالية والشركة المصنعة لها

جدول (2-3): المواد الكيميائية

ت	المادة اسم	الشركة المصنعة	المصدر
1	حامض الكبريتيكH2SO4	Fluka	Germany
2	كلوريد الباريوم	BDH	England
3	كاشف الاوكسديز	BDH	England
4	كليسرول	BDH	England
5	المحلول الملحي الفسيلوجي	Pioneer	Iraq
6	هلام الاكاروز	Promega	U.S.A
8	محلول الترحيل الدارئ (Tris-Borate-EDTA(TBE buffer	Biobasic Inc.	U.S.A
9	سلم الدنا DNA Marker Ladder (100-1500bp)	Add bio	Korea
10	ماء منزوع الايونات Nuclease free water	Add bio	Korea

3-1-2 الاوساط الزرعية Culture Media:

جدول رقم (2-4)الاوساط الزرعية والشركات المصنعة لها في هذه التجربة موضحة في الجدول ادناه:

جدول (2-4): الأوساط الزرعية

ت	الاوساط الزرعية	المنشأ/الشركة المصنعة	المصدر
1	De man Regosa agar	Himedia	India
2	De man Regosa broth	Himedia	India
3	Nutrient Agar	Himedia	India
4	Nutrient broth	Himedia	India
7	كليسيرول (Glycerol)	BDH	England
8	وسط Brain – Heart infusion broth	Himedia	India
9	وسط Muller- Hinton Agar	Himedia	India
10	وسط Mannitol Salt Agar	Himedia	India
11	Blood agar	Himedia	India
12	MacConkey agar	Himedia	India
	Eosin Methylene Blue (EMB)	Himedia	India
	Cetrimide Agar	Himedia	India

4-1-2 العددKits

جدول رقم (2-5) يبين العدد التي تم استعمالها في الدراسة والشركة المصنعة لها :

جدول (2-5): عدد kits المستخدمة ومناشئها

ت	العددKits	الشركة	المصدر
1	اشرطة جهاز الفايتك Vitek2gram positive Vitek2 gram negative Vitek2 Antimicrobial susceptibility test	Biomirieux,INC	France
2	Taq master mix	Bioneer	Korea
3	عدة استخلاص الحمض النووي الجيني Genomic DNA extraction kits	Intron	Korea

5-1-2 تحضير Master Mix

استخدم تم استعمال مزيج Master Mix المجهز من شركة (Add bio)الكورية والموضحة مثلما مبين في الجدولالتالي:

جدول (2-6): مكونات مزيج Master Mix

المكونات	تركيزه
Taq DNA Polymerase	2.5 U\ml
Each:dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2.5 Mm for each
Reaction Buffer(10x)	1x
Gel loading buffer	1x

6-1-2 تحضير PCR Product للبكتيريا المرضيية :

حضر المزيج الخاص بتفاعل PCR في الأنابيب الموجودة في العدة والذي يحتوي على كل المكونات اللازمة لأجراءهذا التفاعل كما يوضحه الجدول ادناه :

جدول: (2-7) مكونات انبوبة تفاعل PCR

المكونات	التركيز	الكمية
DNA Sample	100-200 ng	3
Forward Upstream Primer	10 Pico mole	1.5
Reverse Downstream primer	10 Pico mole	1.5
Master Mix	-	10
Nuclease-Free Water to	-	9
Total volume	-	25

7-1-2 تحضير PCR Product لبكتيريا حامض اللبنيك:

يوضح الجدول محتويات خليط التفاعل الخاص ببكتريا حامض اللبنيك :

جدول (2-8): محتويات خليط التفاعل

محتويات خليط التفاعل	الحجم(µl)
Master Mix	12.5
Bla Template DNA	6.5
Forward primer (10 pmol/µl)	2
Reverse primer (10 pmol/µl)	2
Nuclease free water	Up to 25

8-1-2 البادئات للكشف عن جينات المقاومة Primers :

جدول رقم (2- 6) يوضح البادئات وحجم الناتج المستخدم بالدراسة التي تم استعمالها في هذه الدراسة والتي تم تجهيزها من شركة Macrogen الكورية وتشمل :

جدول (2-9): البادئات المستخدمة للبكتريا المرضية

اسم البادئ	النيتروجينية القواعد تسلسل		حجم الناتج (bp)	المصادر
bla Tem	TCCGCTCATGAGACAATAACC	F	931	(Alikhani.,2013)
	TTGGTCTGACAGTTACCAATGC	R		
Shv	CTTTACTCGCCTTTATCG	F	827	(Peymani et al.,2017)
	TCCCGCAGATAAATCACCA	R		
ermA	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA	F	645	Juda *et al.*, (2016)
	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	R		
qnrA	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	F	593	(Jacoby *et al.*, 2003)
	ATCCAGATCCGCAAAGGTTA	R		
aac	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	F	482	Kim *et al.*, (2009)
	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	R		

9-1-2 ظروف التفاعل الخاصة بكل بادئ للبكتيريا المرضية:

الجدول (2-10) يوضح الجدول ظروف التفاعل التي خصت كل بادئ في البكتيريا المرضية :

جدول رقم (2-10) ظروف تفاعل PCR لكل بادئ

اسم البادئ	Initial denaturation	عدد الدورات	denaturation	annealing	extension	final extension	المصادر
bla Tem	94 °C / 5 min	Cycles (30)	94 °C /30s	53 °C / 30s	72 °C /1 min	72 °C /7 min	(Yang *et al*., 2018)
shv	94 °C / 5 min	Cycles (35)	94 °C /30s	53 °C / 30s	72 °C /1 min	72 °C /7 min	(Yang *et al*., 2018)
erma	94 °C / 5 min	Cycles (35)	94 °C /30s	51 °C / 30s	72 °C /1 min	72 °C /7 min	(Sutcliffe *et al*., 1996)
qnrAA	94 °C / 5 min	Cycles (35)	94 °C /30s	53 °C / 30s	72 °C /1 min	72 °C /7 min	(AbdelRahman *et al*.,2020)
aac(6')-Ib -cr	94 °C / 5 min	Cycles (35)	94 °C /30s	53 °C / 30s	72 °C /1 min	72 °C /7 min	(AbdelRahman *et al*.,2020)

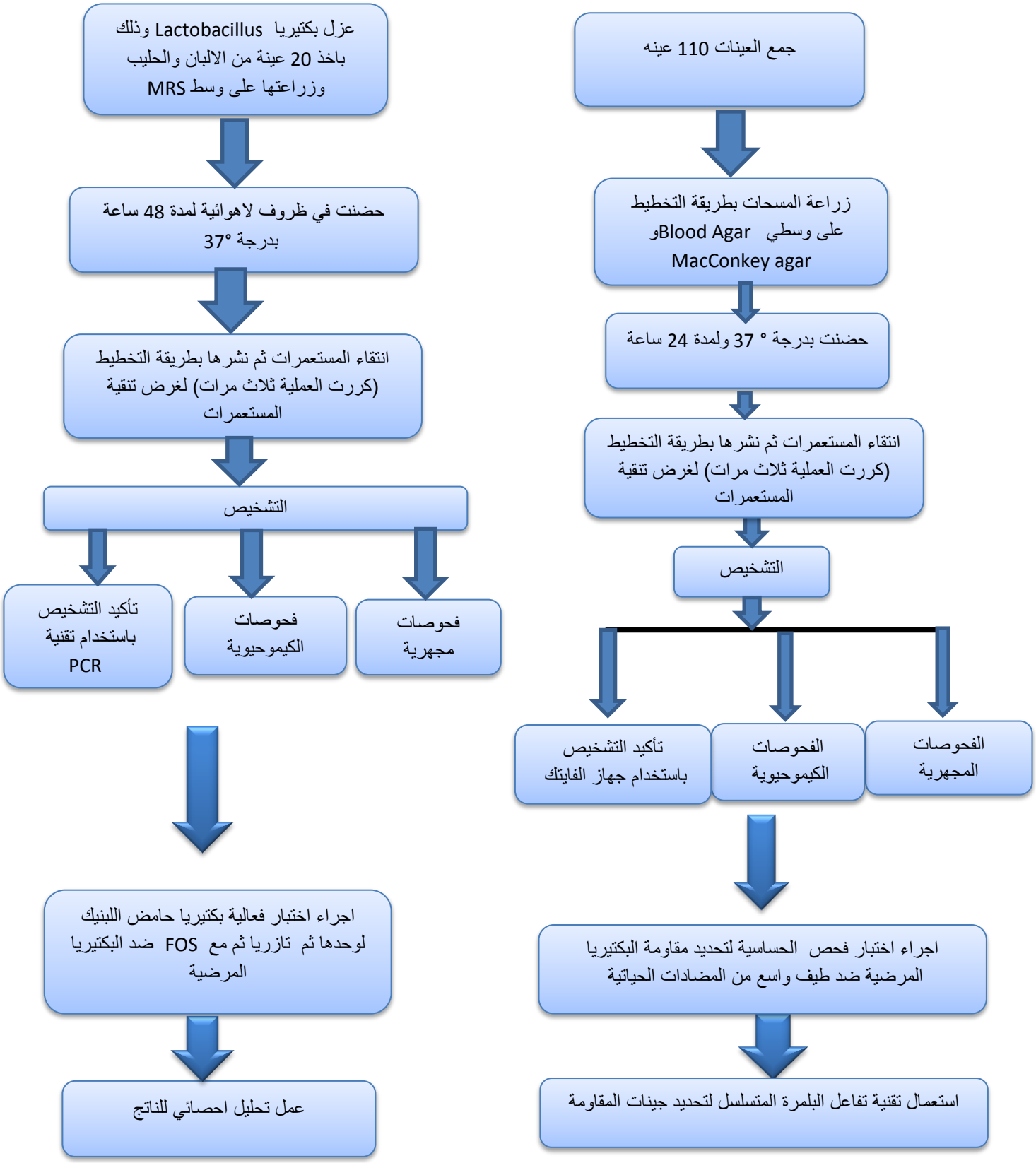
10-1-2البادئات لبكتيريا حامض اللبنيك Primers for lactic acid bacteria :

جدول رقم(2- 7)التسلسلات الخاصة ببكتريا lactic acid Bacteria:

جدول (2-11): البادئات المستخدمة في تشخيص بكتريا حامض اللبنيك

اسم البكتيريا	النيتروجينية القواعد تسلسل		حجم الناتج (bp)	المصادر
L. acidophilus	TCATGTTGGGATGCAATGAG	F	828	(You and Kim,2020)
	TTTCAAAACTTGTCCTGCTG	R		
L.helveticus	GTATGATCGTTCGCCACCAC	F	680	(You and Kim,2020)
	ATTGTCGCCATGAGTACAGG	R		
L. plantarum	AGGGTGAAGTCGTAACAAGTAGCC	F	428	(Kwon,et al 2004)
	CTAGTGGTAACAGTTGATTAAAACTGC	R		
L. rhamnosus	AGGGTGAAGTCGTAACAAGTAGCC	F	448	(Kwon,et al 2004)
	GCCAACAAGCTATGTGTTCGCTTGC	R		

2-2 مخطط تصميم الدراسة :



شكل (2-1) مخطط توضيحي لخطوات العمل المتبعة في هذه الدراسة

طرائق العمل

2-2-1 جمع عينات البكتيريا المرضية :

تم جمع 110عينة من مرضى يعانون من التهاب الحروق والتهابات المجاري البولية والتهاب الجروح والخروج من كلا الجنسين وتم أجراء الدراسة للفترة من 3 آب 2022 ولغاية 5 كانون الثاني 2023 في مستشفى الامام الحسين (ع) التعليمي من ردهة الحروق ومن مستشفى النسائية والتوليد بواسطة مسحات قطنية معقمة تحتوي على وسط ناقل للمحافظة على البكتيريا اثناء نقلها للمختبر ثم اخضعت المزارع البكتيرية النامية إلى الفحوصات المجهرية والكيميوحيوية بعد تشخيص المرضى من قبل الاباء الاختصاص بواسطة مسحات قطنية معقمة تحتوي على وسط ناقل للمحافظة على البكتيريا اثناء نقلها للمختبرحيث تم عزل البكتيريا المرضية بواقع 5 *S. aureus* عينات من الحروق والادرار و7 *E.coli* عينات من الجروح والادرار و3 *p. aeruginosa* من الحروق والجروح عينة و *K. pneumoniiae* بعدد 9 عينات من الجروح والحروق بعد اخضاع المرضى للفحص والمعالجة.

2-2-1-1 الاوساط الزرعية المستخدمة بعزل وتنشيط البكتيريا:

- **وسط Blood Agar base :-**

حضرهذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة بإذابة 40 غم في لتر ماء مقطر وتعقيمها بالأوتوكليف بدرجة 121م °لمدة 15 دقيقة بضغط جوي 15 p.s،بعد الانتهاء من عملية التعقيم تم تبريده إلى درجة (45-50) ْم وأضيف إليها دم بشري بنسبة 5٪، تم استخدام هذا الوسط كوسيط غني في عزل وتشخيص البكتيريا ، وذلك للكشف عن قدرة بكتيريا على تحليل الدم(Hemolysis) وكذلك قدرة البكتيريا على انتاج أنزيم الحال للدم(Hemolysin).

- **وسط MacConkey agar :-**

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة بإذابة 51.5غم في لتر ماء مقطر وتعقيمها بالأوتوكليف بدرجة 121م °لمدة 15 دقيقة بضغط جوي 15 p.s، تم استخدام هذا الوسط لعزل البكتيريا السالبة لصبغة كرام وتشخيصها من حيث قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز.

- **وسط Mannitol salt Agar :-**

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة بإذابة 108 غم في لتر ماء مقطر وتعقيمها بالأوتوكليف بدرجة 121م °لمدة 15 دقيقة بضغط جوي 15 p.s.

إذ تم استخدام هذا الوسط لعزل وتشخيص *S. aureus* من حيث قدرتها على تحمل ملوحة الوسط وكذلك قدرتها على تخمير سكر المانتول وتحويل اللون الاحمر للوسط الى اللون الاصفر.

- **وسط Muller- Hinton Agar :-**

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة 38 غم من الوسط في لتر واحد من الماء المقطر. تم تعقيم الوسط باستخدام الأوتوكليف بدرجة 121م °لمدة 15 دقيقة بضغط جوي 15 p.s ، وبعد الانتهاء من عملية التعقيم ، تم تبريده إلى (45-50) درجة مئوية وصب في أطباق بتري معقمة. استخدمت الصفائح لتنمية العزلات البكتيرية لغرض اختبار الحساسية للمضادات الحيوية.

- **وسط اكار الايوسين ازرق المثلين(Eosin Methylene Blue (EMB :**

تم تحضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة 35 غم من الوسط في لتر واحد من الماء المقطر، تم تعقيم الوسط باستخدام الأوتوكليف بدرجة 121°م لمدة 15 دقيقة بضغط جوي 15 p.s ، وبعد الانتهاء من عملية التعقيم ، تم تبريده إلى (45-50)° م وصب في أطباق بتري معقمة, ويعد وسط تفريقي استعمل بعد عملية العزل الأولي على وسط الماكونكي لتمييز عزلات *E.coli* عن انواع البكتيريا الأخرى للعائلة المعوية وذلك لظهور مستعمرات بكتريا *E. coli* بلون غامق ذي لمعان أخضر معدني.

- **وسط Brain – Heart Infusion Broth :-**

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة بإذابة 37 غم من الوسط في لتر من الماء المقطروتعقيمها بالأوتوكليف بدرجة 121° م لمدة 15 دقيقة بضغط جوي 15 p.s وتوزيعها في أنابيب معقمة.حيث تم استخدام هذاالوسيط لغرض إنماء وتنشيط البكتريا وكذلك استخدامه للحفاظ على العزلات البكتيرية وذلك بإضافة 15٪ جلسرين إلى 85٪ وسط سائل بعد التعقيم.

- **وسط MRS Agar:-**

حضرالوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك عن طريق اذابة 70غم من الوسط في لتر واحد من الماء المقطروتم تعقيمه في جهاز بالأوتوكليف بدرجة 121°م لمدة 15 دقيقة بضغط جوي 15 p.s وبعد ذلك تم تبريده الى درجة 45م °بوضعه بجهاز الحمام المائي وصب في اطباق واستعمل لغرض التنمية لعزلات *Lactibacillus spp*. .

- **وسط MRS Broth:-**

حضر الوسط بإذابة 55.5غم من هذا الوسط في لترواحد من الماء المقطر بحسب تعليمات الشركة المصنعة وتم تعقيمه عند 121م° لمدة 15دقيقة وقد استعمل لاجل تنمية عزلات *Lactibacillus spp*.

- **وسط اكار السترايميد Cetrimide Agar :**

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة بإذابة 46.4 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر ثم اضيف اليه 10 ميللتر من الكليسيرول وبعدها عقم بجهاز المؤصدة ثم ترك ليبرد الى درجة (45-50) °م وصب بعدها في أطباق معقمة، استعمل كوسط انتقائي لعزل وتشخيص بكتريا *P.aeruginosa* (Hashim.2013).

2-1-2-2 الكواشف والمحاليل المستخدمة في العزل والتشخيص للبكتريا:-

2-2-1-2-1محلول الملح الفسيلوجي (saline Normal)

حضر باذابة 8.5 غم من كلوريد الصوديوم NaClفي 1000 مل من الماء المقطر ثم وزع في انابيب اختبار ووضع في استعمل هذا المحلول لتحضير تخافيف المزارع البكتيرية (Suwansaksri *et al*.,2003).

2-2-1-2-2 محلول ماكفرلاند (أنبوب رقم 0.5) Macfarland Solution:-

حضر هذا المحلول من مرحلتين :

A. محلول كلوريد الباريوم (1.175٪): تم التحضير بإذابة 1.175 غم من كلوريد الباريوم في 90مل من الماء المقطر وبعد الانتهاء من الذوبان تم أضافة الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.

B. محلول حامض الكبريتيك (1%): تم اضافة 1 مل من حامض الكبريتيك المركز الى 99 مل من الماء المقطر .

تم تحضر محلول مكفرلاند (انبوبة رقم 0.5) وذلك بإضافة 0.5 مل من محلول A الى 99.5 مل من محلول B وتم مزج المحلول جيداً حيث تم استخدام هذا المحلول لغرض الوصول الى عدد تقريبي للخلايا البكتيرية الذي يقدر ب(10^8X 0.5) خلية لكل مليلتر (Esther and Fatima,2020) بعدها تم استخدام جهاز الفايتك لاجراء التشخيص الدقيق للبكتيريا .

2-2-1-2-3 ماء الببتون Peptone water

استخدم لاجراء التخافيف العشرية للمزارع البكتيرية، وقد حضر باذابة 15غم من الببتون في لتر من الماء المقطر، ثم وزع في انابيب وعقم باستخدام المؤصدة.

4-2-1-2-2 كاشف الاوكسيديز (Oxidase Reagent):-

تم تحضير هذا الكاشف آنيا باذابة 1غم من مادة رباعي مثيل بارافنيلين ثنائي امين ثنائي هيدروكلورايد (Tetramethyl P-phenylen diamine dihydrochloride)في 100مل من الماء المعقم وتم وضعه في عبوة معتمة ،تم استخدام هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتيريا على انتاج إنزيم الاوكسيديز (Macfaddin , 2000).

5-2-1-2-2 كاشف الكاتليز (Catalase reagent) :-

استخدمت مادة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% لأجل التحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الكاتليز (Tille , 2014).

6-2-1-2-2 صبغة غرام (Gram Stain):

استعملت هذه الصبغة الجاهزة المتكونة من (صبغة البنفسج البلوري Violet Crystal ، محلول الايودين Solution Iodine،الكحول المطلق وصبغة السفرانين Sufranine) لدراسة الخصائص المظهرية للبكتريا المعزولة ولغرض تفريق البكتريا الى سالبة أو موجبة لصبغة غرام.

7-2-1-2-2 محلول صبغة البنفسج البلوري

حضر محلول صبغة البنفسج البلوري بتركيز 1.0 %وذلك بإذابة 1.0 غم من الصبغة في 10مل من الميثانول المطلق وبعد ذوبانه بصورة تامة أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر اذ استعمل هذا المحلول للتحري عن قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي(Wood andLeesbug,2010).

8-2-1-2-2 كاشف احمر المثيل Methyl Red Reagent :

حضر بإذابة 1.0 غم من صبغة احمر المثيل في 300 مل من 95 %كحول اثيلي ثم أكمل الحجم الى 500 مل باستخدام الماء المقطر، وتم استخدامه للكشف عن التحلل الكلي لسكرالكلوكوز(MacFaddin,2000)

9-2-1-2-2 كاشف فوكس بروسكاورVoges- Proskaure reagent :

ويتكون من محلولين :

محلول (A) هيدروكسيد البوتاسيوم: KOH حضر بإذابة 40 غم من المادة في 90 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى 100 مل

.محلول(B) الفا نفثول (Alpha nephtho) :-حضر بإذابة 5 غم من المادة في 90 مل من الكحول االثيلي بتركيز 99 %ثم أكمل الحجم الى 100 مل باستعمال الكحول نفسه

.واستعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز وإنتاج Acetyl Methyl Carbinol في اختبار الفوكس – بروسكاور (MacFaddin,2000).

3-1-2-2 تشخيص العزلات البكتيرية Identification of Bacterial Isolates :

شخصت البكتريا بالاعتماد على الصفات الزرعية والمجهرية بالاضافة الى الفحوصات الكيموحيوية وكما يلي:

1-3-1-2-2 الفحوصات المجهرية (Microscopic tests) :

- **تصبيغ البكتريا:**

- اختيرت المستعمرات التي نمت على وسط Blood agarوتم تصبيغها بصبغة كرام لغرض التعرف على اشكال الخلايا وتجمعاتها بهذه الخطوات .

تم تحضير مسحة smear من العزلات البكتيرية وتم وضعها على صفيحة زجاجية، وتم غمر المسحة بصبغة البنفسجي البلوري crystal violate وتم تركها لمدة 30ثانية ،بعدها تم شطفها بالماء المقطر لمدة ثانيتين.

- تم غمر المسحة بمحلول Iodine، وتم تركها دقيقة واحدة ، ثم بعدها شطفت بالماء المقطر لثانيتين.

- وضع الشرحة بزاوية مقدارها 45 درجة، ثم بعدها تم اضافة مزيل اللون(كحول الأثيل)96% بطريقة تجعله يجري من بداية الصفيحة الى اسفلها لمدة 15 ثانية ثم شطفت بالماء المقطر لمدة ثانيتين برفق.

- غمر الصفيحة بصبغة السفرانينsafranin وتركها لدقيقة واحدة، وايضا تم شطفها بالماء المقطر مرتين وبرفق وتم تجفيف الشريحة بالهواء وبعدها اضيف زيت العدسات عليها.

- تم فحصت الشريحة على المجهر الضوئي (Froböse *et al.*,2020).

4-1-2-2الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests) :

1-4-1-2-2اختبار الكاتليز (Catalase test) :

تم اجراء هذا الفحص للكشف عن انتاج انزيم الكتليز،الذي يقوم بتحليل بيروكسيد الهيدروجين الى ماء والاوكسجين $2H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$ والذي يظهر فقاعات غازية ، تم اجراء هذا الاختبارمن خلال نقل جزء من المستعمرة النامية بعمر (18-24) ساعة الى الشريحة الزجاجية ، ثم تمت اضافة قطرة من

بيروكسيد الهيدروجين تركيزه (3 %) وتم مزجها بصورة جيدة ، تكون الفقاعات الغازية يدل على إيجابية الفحص(Maxton *et al*.,2013)

2-2-1-4-2اختبار الاوكسيديز (Oxidase test) :

تم وضع قطرة من كاشف الاوكسديزOxidase reagent الذي تم تحضيره مسبقا على ورقة معتمة

ثم بعدها تم نقل بضع من المستعمرات النامية على وسط اكار الماكونكي بعمر 24ساعة بواسطة عيدان خشب wooden sticksعلى الورقة ، ويعتبرتغيير لون المستعمرة الى اللون الارجواني في 10ثواني دليل قدرة البكتيريا على إنتاج انزيم الاوكسديز(Shields and Cathcart,2010) .

2-2-1-4-3الزرع على وسط Mannitol salt Agar :

استخدم هذا الوسط لغرض عزل *S.aureus*وتشخيصها من حيث القابلية على تحمل ملوحة الوسط اضافة الى قابليتها على تخمير سكر المانتول وتحويل الوسط الى اللون الاصفر (Tille , 2014) .

2-2-1-4- 4اختبار انزيم التخثر (coagulase test) :

اختبرت العينات عن طريق استخدام بلازما الدم حيث تم وضع 0.5 مل في انابيب معقمة بعدها تم نقل مستعمرة بكتيرية بعمر 24ساعة باستخدام ناقل بكتيري Loop الى الانابيب الحاوية على البلازما ثم تم مزجها جيدا وحضنت بدرجة حرارة (35-37) مº ولمدة 4ساعات،في حالة حصول التخثر دلالة على ايجابية الفحص (Tille , 2014).

2-2-1-4-5 اختبار الاندول (Indole test)

تم تلقيح وسط ماء الببتون السائل بمستعمرة بكتيرية بواسطة استخدام عروة الناقل المعقم ثم حضن بدرجة الوسط بدرجة حرارة 37 لمدة 24الى 48 ساعة بعد ذلك إضيف خمس قطرات من(كاشف كوفاكس) على السطح الداخلي للأنبوبة في حال ظهور حلقة حمراء خلال ثوان فانها دليل على ان الفحص موجب وان البكتريا تمتلك القابلية على تحويل الحامض الأميني Tryptophan الى Indole بسبب أمتلاكها (MacWilliam,2012).

2-2-1-4- 6اختبار فوكس بروسكاور (Voges-Proskaure test)

تم تلقيح وسط VP-MR بالبكتريا ثم حضنت بعد ذلك ولمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ بعدها تمت

أضافة 6.0 مل من محلول الكاشف الفا نفثول و2.0 مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم وتم مزجهما معا في انبوبة الاختبار في حالة تحول لون الوسط من اللون الأصفر الى اللون الوردي يكون دليل على إيجابية الفحص (McDevitt,2009).

2-2-1-4-7أختبار أحمر المثيل (Methyl Red Test)

تم تلقيح وسط VP-MR بالبكتريا المراد فحصها ثم بعد ذلك حضنت ولمدة 24 ساعة بدرجة حرارة° 37 م ثم أضيفت 5 قطرات من كاشف احمر المثيل وفي حال ظهور اللون الأحمر دليل على إيجابية الفحص وإن البكتريا الموجبة لهذا الفحص تملك القدرة على تخمر سكر الكلوكوز وإنتاج الأحماض (McDevitt,2009).

2-2-1-4-8 اختبار انزيم اليوريز(Urease test) :

لقح وسط اكار اليوريا المائل(slant agar Urea)بالمستعمرة البكتيرية المراد الكشف عن قابليتها على انتاج انزيم Urease الذي يكون محللا لليوريا ثم بعد ذلك حضنت لمدة 24-48 ساعة بدرجة حرارة37 م°حيث أن تغير لون الوسط الى اللون الوردي هو دليل على إيجابيةالفحص (MacFaddin,2000).

2-2-1-4-9اختبار تحلل الدم (Hemolysis test):

تم زارعة البكتريا على وسط غراء الدم Blood agar بطريقة التخطيط بعدها حضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م °في ظروف هوائية وذلك للكشف عن قدرة البكتريا التي تم عزلها على تحليل خلايا الدم الحمر وملاحظة نوع التحلل حول المستعمرات البكتيرية فيما اذا كان كامل أوجزئي (Zhang *et al.*,2016)

2-2-1-4-10 اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test:

لقح وسط غراء السترات السيمون المائل Simmons citrate slant بالبكتريا المراد الكشف عن قابليتها على استهالك السترات كمصدر وحيد للكاربون ثم حضنت بعد ذلك لمدة (24-48) ساعة بدرجة حرارة 37م° ان تغير لون الوسط الى اللون الوردي دلالة على إيجابية الفحص(MacFaddin,2000).

5-1-2-2 حفظ وإدامة العزلات:-

1-5-1-2-2 حفظ وادامة العزلات على المدى القريب:

تم حفظ العزلات للفترة قصيرة الامد بحسب ما ذكر (Zhgun et al.,2020) لحفظ العزلات وكذلك ادامتها ولغرض الاستعمال اليومي للمزارع البكتيرية وذلك عن طريق زراعتها في انابيب مائلة slantsحاوية على المغذي الصلب Nutrient agarحيث يتم حضنها لمدة 18ساعة وتنميتها بدرجة 37م° وبعدها يتم حفضها بالثلاجة .

2-5-1-2-2 حفظ العزلات على المدى البعيد:

تم حفظ العزلات البكتيرية في انابيب محتوية على وسط نقيع القلب والدماغ Brian – Heart infusion brotH الذي تم تحضيره مسبقا والذي اضيف إليه كليسيرولglycerol ، بعدها تم حفظ هذه الانابيب درجة حرارة -20 م°لحين استخدامها ، و تم تجديد العزلات كل 2 شهر(Green and Sambrook,2012)

6-1-2-2 التشخيص باستخدام جهاز الفايتك :Vitek2 Compact

استعمل هذا الجهاز وبحسب تعليمات الشركة المصنعة (Biomerieux France)لغرض تشخيص بكتيريا المرضية *K.pneumoniae*و *S.aureus* و *P.aeruginosa* و *E.coil* وذلك عن طريق نقل كمية من المستعمرات النامية على وسط ماكونكي بالنسبة للبكتيريا السالبة ووسط المانتول بالنسبة لبكتريا الموجب *Staph aureus* بعمر(18 - 24)ساعة الى انبوبة حاوية 3مليلتر من المحلول الملحي المعقم sterile saline ، وتم تضبيط عكورة المعلق البكتيري مقارنة بمحلول مكفر لاند القياسي وذلك 0.5 باستعمال جهاز Densi-chekبعدها وضعت أنبوبة المعلق داخل الجهازمع وضع البطاقة التشخيصية الخاصة ببكتيريا سالبة غرام GP-ID (Gram positive identifier) والبطاقة الموجبة لصبغة غرام GN-ID(Gram Negative identifier)، بعد حوالي 12-24ساعة ظهرت النتائج على شاشة الحاسوب (Hamam *et al*.,2019).

7-1-2-2 التشخيص الجزيئيMolecular Identification

استخدمت عدة الاستخلاص Genomic DNA extraction kit المجهزة من شركة

(ADD BIO)الكورية لغرض استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين وكما يلي :

1-7-1-2-2 استخلاص الحامض النووي البكتيري Bacterial Genomic DNA Extraction

1.تم اخذ 5 مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل brain heart infusion broth لتنمية العزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة.

2. تم اخذ أنابيب ابندروف قياس 1.5 مل وتم ملأها ب 1مل من الوسط الزرعي الحاوي على الخلايا النامية و نبذت بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة و بسرعة 13000 دورة\دقيقة ليتم جمع الخلايا البكتيرية وكذلك التخلص من الراشح.

3. تمت اضافة 500 مايكرو ليتر من محلول اللايسوزايم المنظم lysozyme buffer وكذلك 20 ميكرو ليتر من (انزيم اللايسوزايم lysozyme 50ملغم / مل)الى العينة بعدها تم اغلاق أنابيب الابندروف ورجت جيدا بواسطة جهاز المازج Vortex ولمدة 5 ثوان هذه الإضافة فقط للبكتريا الموجبة لصبغة كرام.

4. حضنت الأنابيب في حمام مائي بدرجة 37° م و لمدة 60 دقيقة.

5. وضعت الأنابيب بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة /دقيقة لمدة 3 دقائق بعدها تم التخلص من الراشح.

6. تمت اضافة 200 مايكرو ليتر من محلول Solution Lysis و 20 مايكرو ليتر Proteinase K Solution (20ملغم/ مل)الى العينة وتم مزجها جيدا بواسطة المازج و لمدة 5 ثوان.

7. بعدها حضنت الأنابيب في حمام مائي و بدرجة حرارة (56 مْ)لمدة 10 دقائق .

8. ثم اضيفت الى المزيج المتحلل 200 مايكرو ليتر من محلول Binding Solution و 200 مايكرو ليتر من كحول الايثانول المطلق ومزجت جيدا بالمازج لمدة 1 دقيقة باستخدام جهاز الطرد المركزي وعلى سرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق.

9. تم نقل 500 مايكرو ليتر من الراشح في الانابيب الى أنابيب الجمع(Collection Tubes) ذات سعة 2 مل الحاوية على أعمدة لها مصفى لغرض تنقية الحامض النووي(GD Filter Colum) الذي يكون مجهز مع العدة .

10. تم وضع انابيب أخرى مع فلاتر الأعمدة الحاوية على الخليط في جهاز الطرد المركزي

بسرعة 13000 دورة /دقيقة لمدة 1 دقيقة وأهملت نواتج الخلايا المتحللة، نقل فلتر العمود الذي يحوي الحامض النووي الى انبوبة جمع(Collection tube) .

11.اخذ 500 مايكرو ليتر من محلول الغسيل الأول (Washing 1 Solution) الذي يكون مجهزاً مع العدة الى فلتر العمود الذي يحوي الحامض النووي لغسل الحامض النووي ، وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة 13000 دورة /دقيقة لمدة 1 دقيقة واهملت المحتويات بعدها اضيف 500 مايكرو لتر من محلول الغسيل الثانيWashing 2 Solution المضاف اليه مسبقا كحول الايثانول (المجهز مع العدة)الى العمود الحاوي على الحامض النووي ووضع بجهاز الطرد المركزي وبسرعة 13000 دورة /دقيقة لمدة 1 دقيقة.

12. بعد التدوير بجهاز الطرد المركزي تم التخلص من المواد الموجودة في أنابيب الجمع بعدها وضع فلتر العمود الذي يحوي الحامض النووي في أنبوبة جمع جديدة ووضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة / دقيقة و لمدة 1 دقيقة وذلك لغرض تجفيف العينة.

13.استعملت أنابيب ابندروف معقمة سعة 1.5 مل وتم نقل فلاتر الأعمدة الحاوية على الحمض النووي اليها وتمت اضافة 100 مايكرو ليتر من محلول الاذابة(المجهز مع العدة)وترك لمدة5 دقائق لغرض امتصاص كل محلول الإذابة Elution Buffer من قبل الأعمدة بعدها وضعت بجهاز الطرد المركزي و بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 1 دقيقة، لإذابة الحامض النووي DNA بعدها حفظ الحامض النووي وبدرجة حرارة(20 - مْ)الى وقت استعمالها في اجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرةPCR .

2-7-1-2-2 تحضيرمزيج سلسة تفاعل البلمرة PCR Master Mixture :

2-7-1-2-2-1محاليل البوادئPrimers Solution

تم تحضر محلول البوادئ استنادا الى تعليمات الشركة المصنعة(Chromogen) وذلك بأخذ 10 مايكرو ليتر من كل بادئ واضافتها الى أنبوبة ابندروف جديدة حاوية على 90 مايكرو ليتر من الماء منزوع الايوناتDeionize Water للحصول علىWorking Solutionذو حجم 100 مايكرو ليتر وبتركيز ويحفظ بدرجة حرارة -20 مْ لحين الاستعمال كما حفظت محاليل البوادئ الخزينة في درجة -20 مْ.

2-7-1-2-2-2مزيج Master Mix

استخدم تم استعمال مزيج Master Mix مثلما مبين في الجدول (2-6)

3-2-6-1-2-2 تحضيرPCR Product :

حضر المزيج الخاص بتفاعلPCR كما ذكر في الجدول(2-7)

5-7-1-2-2 اجراء تفاعل البلمرة(PCR Assay)

تم غلق الانابيب وتمزج بعناية بجهاز المازجvortex ولمدة 10ثواني بعدها تدخل بجهاز Thermocycler PCRلغرض اجراء التفاعل وباستعمال البرامج المناسبه للتضاعف وكذلك ظروف التضاعف التي تخص كل بادئ وحسب الجدول (2-11) المذكور في الجدول(2-10).

6-7-1-2-2 الترحيل الكهربائيElectrophoresis

A. الصبغة المستعملة

أستخدمت صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide) المجهزة من شركة Bio BASIC INC.

B. محلول بفرTBE buffer X1

تم تحضير TBE buffer X1وبحسب التعليمات للشركة المصنعة , Inno-trian بإضافة 20 مل من TBEuffer بالتركيز X5 الى 80 مل من الماء المقطر.

C. هلام الاكاروزAgarose gel

تم تحضير هذا الهلام كما يلي :-

1. تم تذويب 1غم من مسحوق الاكاروز في 100 ملليتر من محلولTBE buffer X1 ،وباستخدام الحمام المائي تم تسخين المحلول الى درجة الذوبان بعدها تم تركه لتصل حرارته تقريبا 50 م ، بعدها اضيفت اليه 3مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم Bromide ethidium ومزجت بصورة جيد ا مع المحلول.
2. تم صب هلام الاكاروز بصورة هادئة ومستمرة لتفادي حدوث الفقاعات في قالب tray بعد ما تثبت الامشاط comb .
3. تم ترك الهلام لكي يتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، بعدها تم رفع الامشاط بحرص لغرض الحصول على الحفرwells (Mahon *et al* ., 2015).
4. أضافة عينات نواتج PCR الى الحفر .

2-2-2 الجمع والعزل والتشخيص لبكتيريا حامض اللبنيك *Lactobacillus spp.*:

تم جمع20عينة من مصادر مختلفة لعزل بكتيريا *Lactobacillus spp.* اشتملت هذه العينات على الحليب الخام والالبان محلية الصنع اذ جلبت للمختبر بصورة عبوات معقمة محكمة الغلق.

2-2-2-1 الزرع والعزل والتشخيص :

عزلت بكتيريا *Lactobacillus spp.* بطريقة التخافيف العشرية من خلال تنمية البكتيريا على الوسط الزرعي MRS ،حيث اخذ 1مل من العينات المأخوذه من مصادر مختلفة والتي تم ذكرها وتم اضافتها الى 9مل من ماء الببتون المحضر كما ذكر سابقا،بعدها اجري الرج بشكل جيد بواسطة المازج Vortex ،واجريت ثلاث تخافيف عشري (10^{-1} , 10^{-2}, 10^{-3})بواقع مكررين باستخدام انابيب اختبارتكون معقة بالمؤصدة ،وتم اخذ 0.1 مل من كل انبوب واعيد زراعته Subculture على وسط MRS Agarلغرض عزل البكتيريا ، وحضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24ساعة في ظروف لاهوائية باستخدام اسطوانات النمو اللاهوائية الجار وتم استخدام الانبوب اعطي نمو وتم انتقاء المستعمرات وبعدها نشرت بطريقة التخطيط وكررت هذه العلمية ثلاث مرات لغرض تنقية المستعمرات (Al-Dulaimi,2023) و لتشخيصها بجهازVitek2 .

2-2-2-2 الفحص المظهري والمجهري Morphological and Microscopical examination::

تم ملاحظة اشكال المستعمرات والوانها ولزوجتها وحافتها ،كذلك فحصت الخلايا تحت المجهر وذلك بتحضير الشرائح وتصبيغها بصبغة كرام وذلك لكي تتم تشخيص البكتيريا مبدئيا من خلال معرفة شكل البكتيريا ونوعها تم احذ المستعمرات التي شكلها محدب ومغزلي وذات اللون الأبيض إلى الكريمي ، ناعمة وضبابية،موجبة لصبغة كرام إذ تم نقل المستعمرات وحفظها في وسط MRS السائل لإجراء الفحوصات الكيميوحيوية

.(Kandler and Weiss,1986).

2-2-2-2-1 الفحوصات الكيميوحيويةBiochemical test

- تم اجراء فحص الكتليز والاوكسديز وصبغة كرام و المثل ريد السترات واليوريزوالاندول كما ذكر سابقا في اختبار البكتيريا المرضية .

- **اختبار تخمر السكريات Sugars Fermentation Test :**

اخذ 5 مل من وسط احمر الفينول الاساس الحاوي على نوع معين من السكريات و زرعت فيه مستعمراة من بكتيريا فتية بعمر 24 ساعة وملاحظة قدرة البكتيريا على التخمر خلال 24 ساعة حيث يتغير لون الوسط من الاحمر الى الاصفر دليل على ايجابية الاختبار (Pyar And Peh,2014).

حفظ العزلات على المدى القريب Short Term Storage :

حفظت العزلات البكتيرية المشخصة على وسط الغراء المغذي المائل بعد تلقيحه بالعزلات البكتيرية بطريقة الطعنة وحضنت في درجة حرارة 37 م° لمدة 18ساعة ثم نقلت الى الثلاجة في درجة حرارة 4 م°وتكرر عملية الحفظ من اجل الابقاء على حيوية العزلات وتجنب تلوثها كل(3-4)اسابيع (Zhgun *et al*.,202).

لضمان مزارع بكتيريا حامض اللبنيك لفترة طويلة تم استخدام وسطMRS Broth بعد توزيعه بقناني صغيرة بحجم 10مل محكمة الغلق ،ثم عقمت بالمؤصدة ، وبعد ان تم تبريدها لقحت بالمستعمرات البكتيرية بعمر 24 ساعة ، ثم حضنت عند حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة ثم اضيف اليها 4مل من الكليسرول أي بنسبة 20%وحفظت في المجمدة بدرجة-20 °م (Lewus *et al*., 1991).

حفظ العزلات على المدى البعيد Long Term Storage :

3-2-2-2 التشخيص الجزيئي لبكتيريا حامض اللبنيك Molecular Diagnosis Of Lactic Acid Bacteria :

1-3-2-2-2 استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين من بكتريا حامض اللبنيك: Extraction Of Deoxyribonucleic Acid From Lactic Acid Bacteria:

استخدمت العدة التشخيصية المعدة من قبل الشركة المصنعة و تم اجراء الخطوات التالية حسب تعليمات الشركة :

1. وضعت كمية مناسبة من الخلايا البكتيرية في أنبوب جهاز الطرد المركزي بحجم 1.5مل وتم فصلها لمدة دقيقة واحدة بمعدل 14000 دورة في الدقيقة بعدها تم التخلص من المحلول السطحي (الطبقة العليا).
2. تمت إضافة 200 ميكرولتر من بفر FATG وأعيد تعليق الراسب بواسطة جهاز الـ(vortex) و تم الحضن لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة.

3. تمت إضافة 200 ميكرولتر من بفر FABG إلى العينة ثم خلطها باستخدام الـ(vortex) وحضنت لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة للتأكد من تحلل العينة بالكامل أثناء الحضن، تم قلب أنبوب العينة كل 3 دقائق.
4. من الضروري تسخين محلول الشطف مسبقًا في حمام مائي عند 70°م.
5. تمت إضافة 200ميكرولتر من الإيثانول 96% إلى العينات وايضا خلطت بالـ(vortex) لمدة 10 ثوان
6. تم وضع عمود FABG في أنبوب جمع بحجم 2 مل و صُب الخليط بعناية في عمودFABG ، بما في ذلك أي رواسب ثم تمَّ اجراء طرد مركزي للخليط لمدة 5 دقائق بسرعة 14000 دورة في الدقيقة بعد ذلك، تم التخلص من أنبوب الجمع بحجم 2 مل، وأعيد وضع عمود FABG في أنبوب جمع جديد بحجم 2 مل.
7. تم غسل عمود FABG باستخدام 400 ميكرولتر من محلول الغسل W1، ثم تمَّ طرده لمدة دقيقة واحدة بسرعة 14000 دورة في الدقيقة، وتم التخلص من المستخلص.
8. تم وضع عمود FABG مرة أخرى في أنبوب جمع بحجم 2 مل، ثم تم غسل عمود FABG باستخدام 600 ميكرولتر من محلول بفر الغسل، وطرد لمدة دقيقة واحدة بسرعة 14000 دورة في الدقيقة، وتم التخلص من المستخلص.
9. تم وضع عمود FABG مرة أخرى في أنبوب جمع بحجم 2 مل، وتمَّ طرد العمود لمدة 3 دقائق إضافية بسرعة 14000 دورة في الدقيقة لتجفيف العمود.
10. تم وضع عمود FABG المجفف في أنبوب ميكرو جديد بحجم1.5 مل، وأُضيف 100 ميكرولتر من محلول الشطف المُدفأ إلى مركز غشاء عمود FABG ثم وُضع عمود FABG لمدة 3-5 دقائق أو حتى يتم امتصاص العازل بواسطة الغشاء، ثم تمَّ طرده لمدة دقيقة واحدة إلى دقيقتين بسرعة 14000 دورة في الدقيقة لاستخراج الحمض النووي.
11. تم خزن محلول الحامض النووي بدرجة حرارة -20°م .

2-2-2-3-2 تحديد نقاوة وتركيز الحمض النووي (DNA)

تم قياس تركيز الحمض النووي DNA ذو الشريط المزدوج (dsDNA) باستخدام جهاز المطياف الضوئي وذلك بقياس كثافته البصرية عند طول موجة 260 نانومتر ،اشيرت نسبة امتصاصية OD260 - OD280 إلى نقاوة محلول الحمض النووي، حيث يجب أن تكون هذه النسبة 1.8 للحمض النووي النقي (Stephenson, 2003)

3-3-2-2-2 الترحيل الكهربائيElectrophoresis

أستخدمت صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide) المجهزة من شركة Bio BASIC INC. كما تم تحضير محلول بفرTBE buffer X1 و هلام الاكاروزAgarose gel كما كما ذكر سابقا.

3-2-2اختبارالفعالية التثبيطية لبكتريا حامض اللبنيك تجاه البكتيريا المرضية للأجناس المعزولة:

Testing The Inhibitory Effectiveness Of Lactic Acid Bacteria Against Pathogenic Bacteria Of Isolated Species:

استخدمت طريقة الانتشار من الحفر well diffusion التي وصفها (Gupta *et al*.,1998) للكشف عن الفعالية التثبيطية لبكتريا حامض اللبنيك حيث زرعت كلا من *Staph aureus* و *Proteus spp.* و *Klebsiella spp.* و *E.coil* التي تم عزلها على وسط Mueller -Hinton agar حيث تم نشر 0.1مل وبتركيز 0.5 من محلول ماكفرلاند الذي يساوي $1.5x10^8$ من البكتريا المرضية باستخدام الناشر الزجاجي المعقم .

وتركت لمدة (5-10) دقيقة لتجف ، استعمل الثاقب الفليني لعمل ثقوب ذات قطر 5 مليمتر على سطح الطبق ، ملئت كل حفرة ب 50 مايكروليتر بتركيز يساوي 0.5 من محلول ماكفرلاند من بكتيريا حامض اللبنيك المزروعة على الوسط السائل MRS Broth بواقع ثلاث مكررات لكل عينة ،حضنت الاطباق بدرجة 37 °م ولمدة 24 ساعة،بعدها تم قياس منطقة التثبيط(Rajaram *et al*.,2010).

4-2-2اختبارالفعالية التثبيطية لبكتريا حامض اللبنيك بصورة تازرية تجاه البكتيريا المرضية للأجناس المعزولة: Synergistic inhibitory activity test of lactic acid bacteria against pathogenic bacteria from isolated genera:

تم تكرار الفقرة السابقة 2-2-2-8 لكن كل حفرة ملئت ب 50 مل من النوعين المتازرين لبكتيريا حامض اللبنيك حيث ملتئت ب25 مل من كل نوع من بكتيريا حامض اللبنيك كما موضح ادناه :

1. *Lactobacillus. acidophilus*+ *Lactobacillus. rhamnosus*
2. *Lactobacillus. acidophilus* + *Lactobacillus. hellveticus*,
3. *Lactobacillus.acidophilus* + *Lactobacillus. plantarium*,

4.*Lactobacillus.rhamnosus* + *Lactobacillus.hellveticus*,

5.*Lactobacillus. rhamnosus* + *Lactobacillus.plantarium*,

6.*Lactobacillus. rhamnosus*+ *Lactobacillus. Acidophilus*

7. *Lactobacillus. hellveticus*+ *Lactobacillus. Plantarium*

10-2-2-2 تحضير الراشح الخلوي لبكتريا حامض اللبن Preparation Of Filtrate For Lactic Acid Bacteria:

زرعت بكتريا حامض اللبنيك في وسط MRS broth ذو درجة حموضة 6.5 ، وحضنت عند 37 °م لمدة 24 ساعة تحت ظروف لا هوائية ،بعد التحضين تم استخدام جهاز الطرد المركزي و بسرعة 6000 دورة / دقيقة ولمدة 20 دقيقة لأجل الحصول على راشح الخلايا الحرة The cell-free supernatant بعد ذلك رشح السائل لأجل تعقيمه باستخدام اوراق ترشيح من نوع Millipor filterوبقطر 0.22مايكروميتر،عند درجة حرارة 37°م (Ghalfi and Benkerroum ,2006)

5-2-2 اختبارالفعالية التثبيطية لراشح بكتريا حامض اللبنيك تجاه البكتيريا المرضية المعزولة:

Test The Inhibitory Effectiveness Of Lactic Acid Bacteria Filtrate Against Isolated Pathogenic Bacteria:

استخدمت طريقة الانتشار من الحفر well diffusion التي وصفها (Gupta *et al*.,1998) للكشف عن الفعالية التثبيطية للبكتريا المعززة حيويا حيث زرعت كلا من *Staph aureus* و *Proteus spp.* و *Klebsella spp.* و *E.*coil التي تم عزلها سابقا وبصورة منفصلة على وسط Mueller -Hinton agar

حيث تم نشر 0.1 مل من البكتريا المرضية باستخدام الناشر الزجاجي المعقم وتركت لمدة (5-10) دقيقة لتجف ، استعمل الثاقب الفليني لعمل ثقوب ذات قطر 5 مليمتر على سطح الطبق ، ملئت كل حفرة ب 50 مايكروليتر من راشح بكتيريا حامض اللبنيك المزروعة على الوسط السائل MRS Broth ثلاث مكررات لكل عينة ،حضنت الاطباق بدرجة 37°م ولمدة 24 ساعة بعدها تم قياس منطقة التثبيط (Martinez-Gonzalez *et al*.,2004;Rajaram et *al*.,2010).

6-2-2 اختبارالفعالية التثبيطية لبكتريا حامض اللاكتيك مع اضافة المغذي الحيوي FOS تجاه البكتيريا المرضية للأجناس المعزولة:

Testing The Inhibitory Effectiveness Of Lactic Acid Bacteria With FOS Against Pathogenic Bacteria Of Isolated Species :

اخذت 10^8 cfu\ml من بكتيريا حامض اللبيك باستعمال المطياف الضوئي في 10مل من MRS Broth مع اضافة 2%من مادة FOS ووضعت بالحاضنة لمدة 48 ساعة وبدرجة37 °م تحت ظروف لاهوائية بعدها تم وضعها بجهاز الطرد المركزي بسرعة 7000 دورة\دقيقة بدرجة 4°م ،ثم بعدها اخذ الراشح وتم ترشيحه باستخدام مرشحات دقيقة Millipore (filters)بقطر0.22مايكروميتر(Ibrahem *et al*.,2024). استخدمت طريقة الانتشار من الحفر well diffusionالتي وصفها (Gupta *et al*.,1998) للكشف عن الفعالية التثبيطية لبكتيريا حامض اللبنيك حيث زرعت كلا من *Staph aureus* و *Pseudomnas spp.* و*Klebsella spp.* و *E.coil*التي تم عزلها سابقا على وسط Mueller -Hinton agar .

حيث نشر 0.1 مل من البكتريا المرضية باستخدام الناشر الزجاجي المعقم وتركت لمدة (5-10) دقيقة لتجف ، استعمل الثاقب الفليني لعمل ثقوب ذات قطر 5 ملم على سطح الطبق ، ملئت كل حفرة ب 50 مايكروليتر من البكتريا المعززة حيويا المعززه بمادة FOS المزروعة على الوسط السائل MRS Broth بواقع ثلاث مكررات لكل عينة ،حضنت الاطباق بدرجة (37 م° ولمدة) 24 ساعة،بعدها تم قياس منطقة التثبيط (Martinez-Gonzalez *et al*.,2004;Rajaram *et al*.,2010)

اعيد استخدام طريقة الحفر كما ذكر اعلاه ملئت الثقوب هذه المرة ب 50مايكروليتر من الراشح وحضنت لمدة24ساعة بدرجة38 °م.

7-2-2التحليل الاحصائي

تم التعبييرعن النتائج بصيغة (متوسط ± االنحراف المعياري) لثلاثة مكررات حيث تم استعمال اختبار تحليل التباين احادي الاتجاه One Way Anova مع اختبار Tukeys لاختبار الفروق المعنوية بين قدرة انواع مختلفة من جنس بكتريا حامض اللبن بعد مزجها مع السكر في تثبيط اجناس مختلفة من البكتريا المرضية وايضا لمعرفة الفروقات المعنوبة بين اعداد الكتريا المرضية الحاملة لجينات المقاومة للمضادات الحياتيةعند مستوى احتمالية مساوي($P \leq 0.05$) .

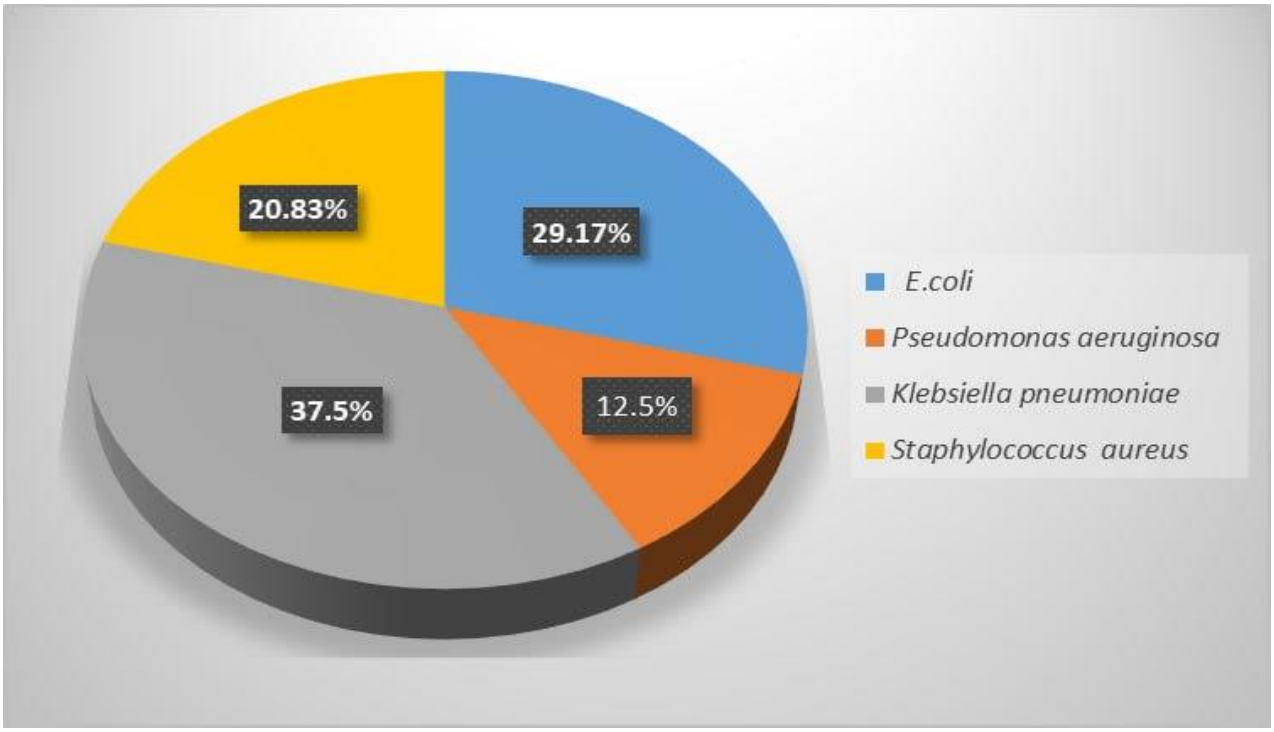
تم انجازالتحليل الاحصائي باستخدام برنامج Mini Tab الاحصائي الاصدار 17 ,IBM) .
Pennsylvania, USA)

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

3 -1 العزل البكتيري Bacterial isolation

تم الحصول على 24 عينة من 110 عزلة من مصادر سريرية مختلفة لذكور واناث باعمار مختلفة بضمنها الحروق والتهابات المجاري البولية والتهاب الجروح والخروج من كلا الجنسين وبعد تشخيص البكتريا تم الحصول على 5 عينات من *S.aureus* و7عينات من *E.coli* و3عينات من *P. aeruginosa* و*K. pneumoniae* بعدد9 عينات بعد اخضاع المرضى للفحص والمعالجة من قبل الطبيب المختص.



الشكل (3-1) الانواع البكتيريا المرضية المعزولة

حيث يوضح الشكل (3-1)ان بكتيريا *S.aureus* كانت بنسبة 20.8% عزلت من الحروق والجروح بينما *E.coli* كانت نسبتها 29.17% عزلت من الجروح والادرار وقد ظهرت بكتيريا *P.aeruginosa* بنسبة 12.5% واخيرا كانت نسبة *K. Pneumoniae* 37.5% .

1-1-3 التشخيص المجهري والمظهري للعزلات البكتيرية Microscopic And Phenotypic Identification Of Bacterial Isolates

شملت هذه الدراسة التشخيص المبدئي للعزلات البكتيرية الذي تم اعتمادا على الصفات المظهرية لمستعمراتها حيث درست الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية المعزولة والتي تشمل كلا من الحجم واللون والحافات والشكل والارتفاع حيث تم التشخيص الأولي بالاعتماد على الخصائص الزرعية للمستعمرات كشكل المستعمرات وقوامها اضافة الى قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز على الأوساط الصلبة.

ظهرت بكتيريا *P. aeruginosa* على شكل مستعمرات صفراء شاحبة ناعمة دائرية الشكل على وسط اكار الماكونكي بسبب عدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز، ذات رائحة شبيه لرائحة العنب، تم نقلها إلى وسط الستريمايد حيث أنه وسط انتقائي لاحتوائها على مادة(Cetrimide) ، الذي يمنع نمو جميع أنواع البكتيريا.

ومع ذلك، فهي تسمح بنمو بكتيريا *P. aeruginosa* فقط، والتي ظهرت مستعمراتها باللون الأخضر المزرق اللون بسبب إفرازها لصبغة Pyocyanin.

كماأعطت معظم بكتيريا *P. aeruginosa* تحللا كاملا للدم من نوع بيتا على وسط أجار الدم والذي يؤكد قدرتها على إنتاج الهيمولايسين وتحليل كريات الدم الحمراء. اما شكل هذه الخلايا الجرثومية فقد ظهرت على شكل عصيات سالبة لصبغ كرام عند فحصها مجهريا.(Procop *et al*., 2020) .

اما بالنسبة لمستعمرات بكتيريا *E. coli* فقد نمت على وسط الماكونكي وهووسط انتقائي لهذه البكتيريا (لاحتوائه على صبغة البنفسج البلوري مع أملاح الصفراء) على شكل مستعمرات ملساء جافة صغيرة دائرية الشكل تكون ذات لون وردي بسبب قدرتها على تخمر سكر اللاكتوز كذلك تظهر على شكل عصيات قصيرة سلبية الغرام عند صبغها بصبغة غرام وفحصها بالمجهر الضوئي Jacob *et al*., 2020).

أُعيد زرعها جميعا على وسط أكار الأيوسين أزرق المثيلين (EMB) فظهرت جميعها بلون داكن يميل إلى اللون البني وذات لمعان أخضر معدني , sheen metallic Greenish بسبب ترسب أزرق المثيل وصبغة الأيوسين في الوسط الحامضي بعد ارتباطهما مع بعض ، وإنتاج الصبغة يعني أن البكتريا أنتجت الحوامض العضوية من تخمر سكريات اللا كتوز والسكروز .(Brooks.,2004)

(تعد هاتان الصفتان اللون الوردي على أغار الماكونكي و اللمعان الاخضر المعدني على أكار الأيوسين أزرق المثيلين) من الصفات المميزة لبكتريا *E. col* عن غيرها من الاجناس البكتيرية العائدة إلى العائلة المعوية(Forbes *etal* ,.2007).

اما بكتيريا *K. pneumoniae* فقد كانت مستعمراتها ذات حجم كبير وحافاتها منتظمة وردية اللون ذات قوام مخاطي وذلك بسبب وجود المحفظة على وسط الماكونكي، وإما تحت المجهر فظهرت على شكل عصيات سالبة لصبغة كرام (Martin and Bachmanus,2018) ,اما بكتيريا *Staph* فبعد زراعتها على وسط المانتول الانتقائي ظهرت مستعمراتها باللون الاصفر البراق اما عند فحصها مجهريا ظهرت على شكل كتل أو مجموعات من الخلايا الكروية وقد ظهرت تجمعت هذه الكتل أو المجموعات مع بعضها لتشكل مجموعات تشبه العنقود(Cluster) (Chabi and Momtaz,2019).

2-1-3 التشخيص الكيموحيوي للعزلات البكتيرية:Bacterial Isolate: Biochemical Identification Of

أظهر في الجدول(3-1)نتائج التشخيص الكيموحيوي كما وصفت من قبل (Collee *et al*., 1996)، تم استخدام صبغة غرام لصبغ العزلات البكتيرية، أذاعطت *S. aureus* نتيجة إيجابية بينما أعطت *K. pneumoniae* و*E. coli* و *P. aeruginosa* نتيجة سلبية، كما أعطت جميع العزلات نتيجة إيجابية لاختبار الكاتيليز(Catalase) ، في حين أعطت جميع العزلات نتيجة سلبية لاختبار الاوكسيديز(Oxidase) باستثناء بكتيريا *P.aeruginosa* التي أظهرت نتيجة إيجابية، وفقط بكتيريا *S. aureus* أعطت نتيجة إيجابية لإنزيم تخثر الدم (coagulase) وهو أحد عوامل الضراوة لهذه البكتيريا (Katz., 2010),في حين كانت النتيجة سالبة لبقية العزلات الأخرى .

بينت نتائج فحص تحلل اليوريا نتيجة ايجابية لكل من بكتيريا *S. aureus* و *K.pneumoniae* بينما بقية العزلات الأخرى اعطت نتيجة سالبة ، كما اعطت بكتيريا *K. pneumoniae* نتيجة سالبة لتحلل الدم بينما كانت بقية العزلات لها القابلية على تحلل الدم واعطت نتيجة ايجابية اما بكتيريا *E. coli* فقد أظهرت نتيجة موجبة لفحص الاندول في حين كانت سالبة لفحص السترات، كذلك أعطت نتيجة موجبة لفحص احمر المثيل، كما أعطت بكتيريا *K. pneumoniae* فقط النتيجة الموجبة لاختبار الفوكس وسكاور.

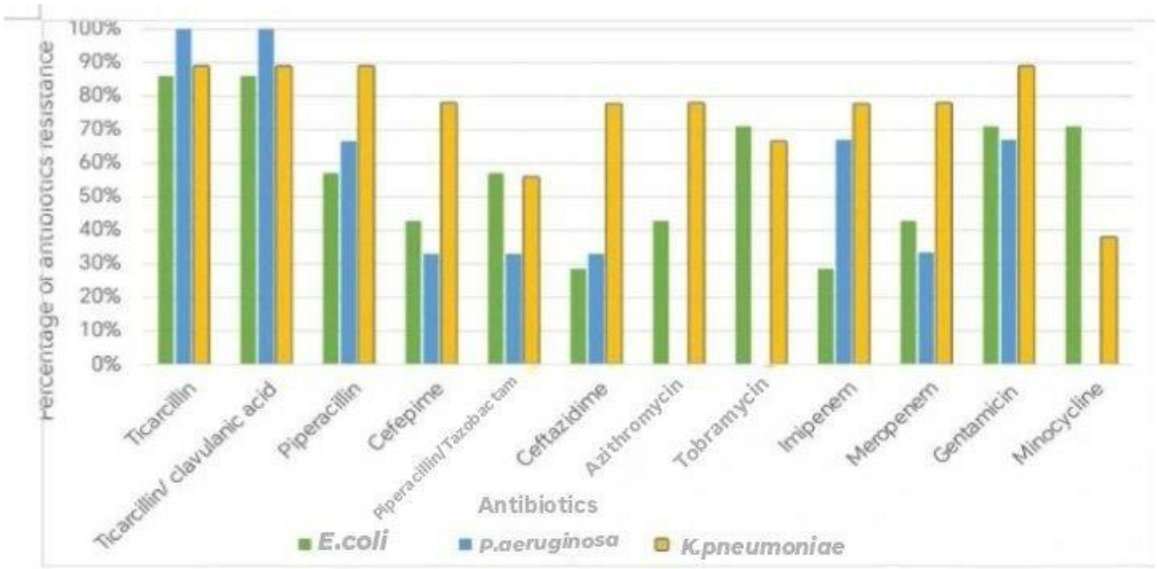
جدول (3-1) الاختبارات الكيموحيوية المستعملة لتشخيص البكتريا المرضية المعزولة قيد الدراسة الحالية

العزلات البكتيرية	الاختبارات الكيموحيوية									
	Gram Stain	Catalase	Oxidase	Coagulase	Urease	Hemolysis	Indole	Simmon Citrate	M-R	V-P
S.aureus	+	+	-	+	+	+	/	/	/	/
P.aeruginosa	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
E.coli	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
K.pneumoniae	-	+	-	/	+	-	-	+	-	+

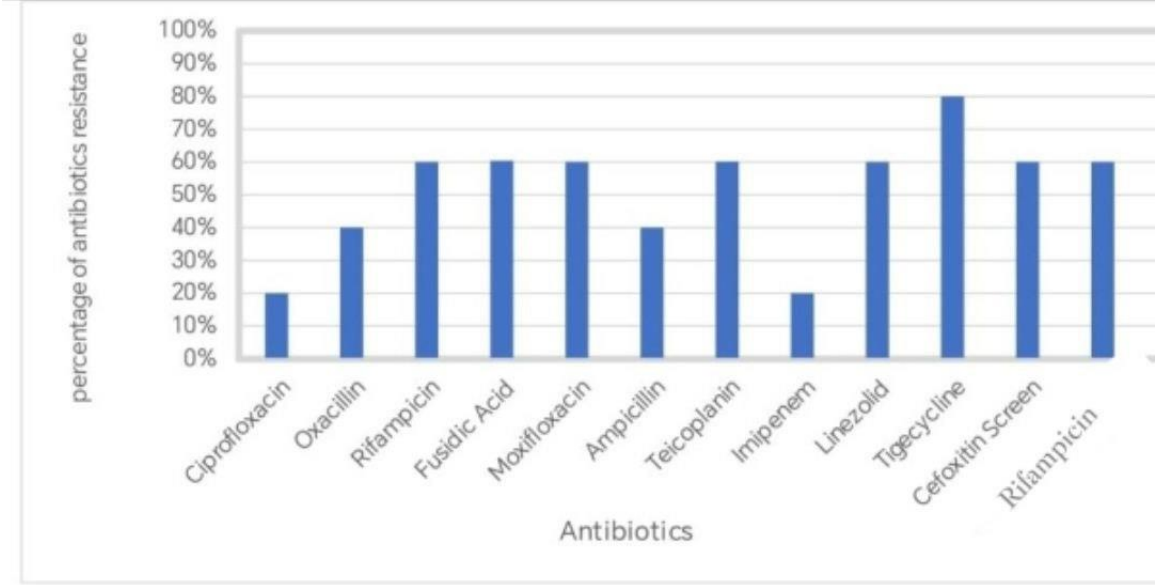
3-1-3اختبار المقاومة للمضادات الحياتية Antibiotic susceptibility test

تم أستخدام جهاز الفايتك لإجراء فحص المقاومة لطيف واسع من المضادات الحيوية المستخدمة في علاج الأمراض التي تسببها تلك الأجناس من البكتيريا التي تبين انها مقاومة لأنواع المضادات التي تشفر لها المورثات التي شملناها في هذه الدراسة.

الشكل (3-2) أظهر نتائج اختبار المضادات الحيوية كما اظهرها جهاز vitek2 compact system



الشكل (3-2) مقاومة ا*K.pneumoniae* ، *p.aeruginosa* ، *E.coli* تجاه لمضادات الحيوية



الشكل (3-3) مقاومة عزلات بكتيريا *staph . aureus* تجاه لمضادات الحيوية

من خلال هذا الاختبار تبين إن *E.coli* لديها أعلى مقاومة بنسبة 86% لمضادticarcillin ، Ticarcillin\ clavulanicوهذه النتيجة مماثلة لدراسة في الجزائر إذ تتفق هذه الدراسة مع ماذكره Ait-Mimoune وجماعته اذ كانت الحساسية لهذه المضادات بنسبة 82.5 % *E.coli* والتي تم الحصول عليها من مصادر سريرية في الجزائر (Ait-Mimoune *et al* 2022)، بينما كانت مضادات Ceftazidime, Imipenem هي الاقل مقاومة وبنسبة 28.5% حيث تعارضت هذه الدراسة مع دراسة محلية في بابل حيث كانت اوضحت نسبة مقاومة Ceftazidime بكتيريا *E.coli* بنسبة 89.3% و Imipenem بنسبة 0% (Shamki *et al* .,2012)،و تعارضت ايضا مع دراسة محلية في بابل لعينات من الادرار حيث كانت نسبة المقاومة لهذه المضادات الحيوية عالية (Al- Ezee,2019)والسبب في ذلك هو قد تكون البكتيريا طورت مقاومتها لهذ المضاد الحيوي خلال هذه السنوات.

من ناحية أخرى فإن الكليبسيلا أظهرت مقاومة عالية للTicarcillin\clavulanic Acid , Piperacillin, Gentamicin, Ticarcillin بنسبة 89% وهو ما يتفق مع (Raheem et ai 2021) بينما يتعارض مع (Ali and Kamil, 2022) وأقل مقاومة سجلت لمضاد minocyclines بنسبة 38٪، يثبط minocycline تخليق البروتين عن طريق الارتباط بمكون 16S rRNA للوحدة الفرعية الريبوسومية S30 وتثبيط توصيل أمينواسيل-الحمض الريبي النووي الناقل aminoacyl-tRNA إلى الموقع A، وبالتالي منع خطوة الاستطالة، حيث لديه نشاط واسع

الطيف ضد البكتيريا السالبة لصبغة الجرام، ولكن سبب المقاومة شائعة ترجع في المقام الأول إلى نشاط مضخة التدفق (Brennan-Krohn *et al* 2022).

وكانت أعلى مقاومة لبكتيريا *P. aeruginosa* لل Ticarcillin Ticarcillin\clavulanic acid بنسبة 100% تناقضت مع دراسة أجريت في باكستان لعينات مأخوذة من مصادر سريرية مختلفة، بما في ذلك المسحات والصديد والجروح والدم والبلغم والبول وعينات الحروق (Khan et al.,2023)

وأظهرت مقاومة سجلت بنسبة 33% لمضاد Meropenem, Ceftazidimeوكذلك Cefepime هذه النسبة مشابهة للدراسة التي أجريت في باكستان لعينات من الخروج و الادرار

(*Khan et al.*,2023) بينما لم تتفق هذه الدراسة مع نسبة مقاومة *P. aeruginosa* لمضاد Ticarcillin\clavulanic كذلك 33٪ كانت هذه النتيجة غير متفقة مع دراسة أجريت في إيران لعينات مأخوذة من مصدر سريري (Nazari-Alam et al.,2021).

أخيرا أظهرت النتائج أن *S.aureus* كانت أقل مقاومة للمضادات الحيويةBenzylpencillin Ciprofloxacin ,Imipenemبنسبة (20%)، والأعلى مقاومة للمضادات الحيوية Tigecycline (80%). تتوافق هذه النتائج مع دراسة بيتريلو في إيطاليا و (Petrillo *et al*., 2020).

ان اغلب العزلات قيد الدراسة أظهرت صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية المستعملة في العلاج، يعود سبب ذلك إلى حدوث طفرة في الكروموسوم أو قد تكون المقاومة محمولة على بلا زميد يشفر للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية(Varela *etal*.,2021).

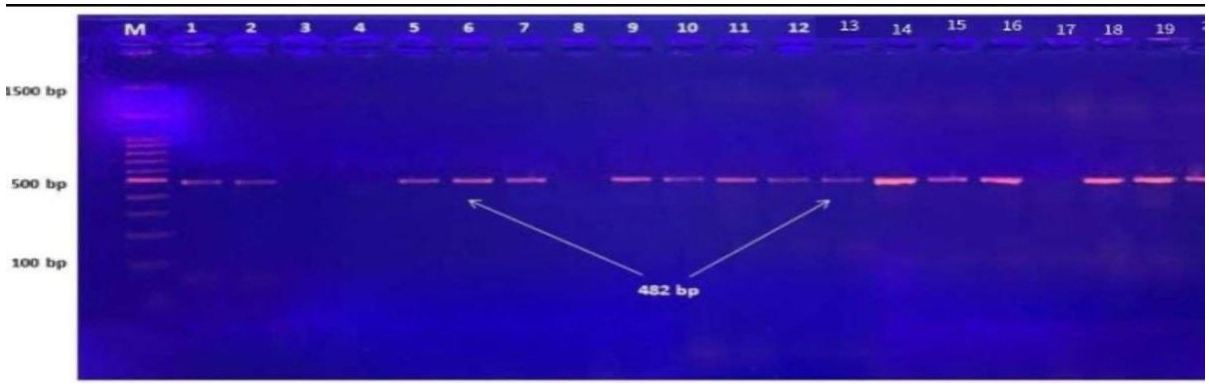
2-3 الكشف الجزيئي عن مورثات المقاومة في العزلات البكتيرية المرضية قيد الدراسة

Molecular detection of resistance genes in pathogenic bacterial isolates under study

1-2-3 الكشف عن مورث *acc*

اعتمادا على نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحياتية تم التحري عن مورثات المقاومة المستخدمة بدراستنا، فقد تم استعمال تقنية PCR للكشف عن مورثات المقاومة التي تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحيوية. حيث تم الكشف عن وجود مورث *acc* بالبكتريا المرضية المعزولة، وضح الشكل (3-4)

الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي تبين من خلالها ان البوادئ (Primers) الخاصة بالمورث *acc* كانت ناجحة في تضخيم هذا المورث من خلال ظهور حزمة بمقدار (482 bp).

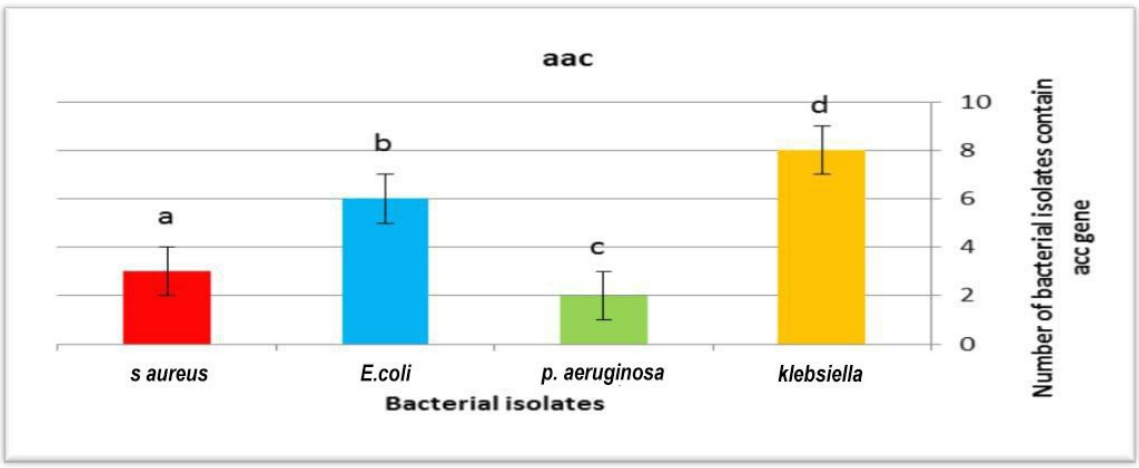


الشكل (3-4) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *aac(6')-Ib -cr* (482 bp) بتركيز هلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة حيث تتبين ارقام العزلات كما موضح ادناه

1. *S.aureus* , 2. *S.aureus* ,3.*S.aureus* , 4. *S.aureus* , 5. *E.coli* , 6 .*E.coli* , 7. *E.coli*, 8. *E.coli* ,

9. *E.coli*,10. *E.coli*,11.*P. aeruginosa* ,12. *P. aeruginosa*,13. *K. pneumoniae*,14. *K. pneumoniae*,

15. *K. pneumoniae*,16. *K. pneumoniae*,17. *K. pneumoniae*,18. *K. pneumoniae*,19. *K. pneumoniae*,20. *K. pneumoniae*



الشكل (3-5) عدد العزلات البكتيرية قيد الدراسة والحاملة لمورث *aac(6')-Ib -cr* الحروف مختلفة اعلى الاعمدة تشير الى وجود فرق معنوي في عدد العزلات التي تحمل المورث($P<0.05$).

أظهر الشكل (3-5) بأن بكتيريا *K.pneumoniae* كانت حاملة لمورث *aac(6')-Ib -cr* وبشكل اكثر معنوية من بقية الاجناس الأخرى في حين بكتيريا *P. aeruginosa* كانت الأقل معنوية في

امتلاكها لهذا المورث الذي يشفر لصفة المقاومة للمضادات الحيوية من نوع الامينوكلايكوسايد،ايضا يبين الشكل (3-5) فروقات معنوية واضحة ($p<0.05$) في عدد البكتيريا الحاملة لذلك المورث .

وكانت هذه النتيجة مشابهة لما حصل عليه Ruiz وأخرون سنة 2012 حيث تم الكشف عن مورث *aac(6')-Ib-cr* في كلا من *E.coli* و *K. pneumoniae*وكان هذا المورث الأكثر شيوعا من بين مورثات المقاومة للكيولونات Quilonones resistant genes (QNG) المكتشفة في الدراسة،ان وجود مورثات *aac(6')-Ib -cr* في *E.coli* يعتمد على الموقع الجغرافي، والافراط في استخدام المضادات الحيوية، وأنواع السلالات البكتيرية. تشير الدراسات إلى معدلات اكتشاف متغيرة، تتراوح من 20% إلى 80% اعتمادًا على متغير *aac(6')-Ib –cr* والمنطقة المحددة،وكانت دراسة سنة 2012 مشابهة تشخيص هذا المورث في بكتيريا *E.coli* (Ruiz *et al*., 2012).

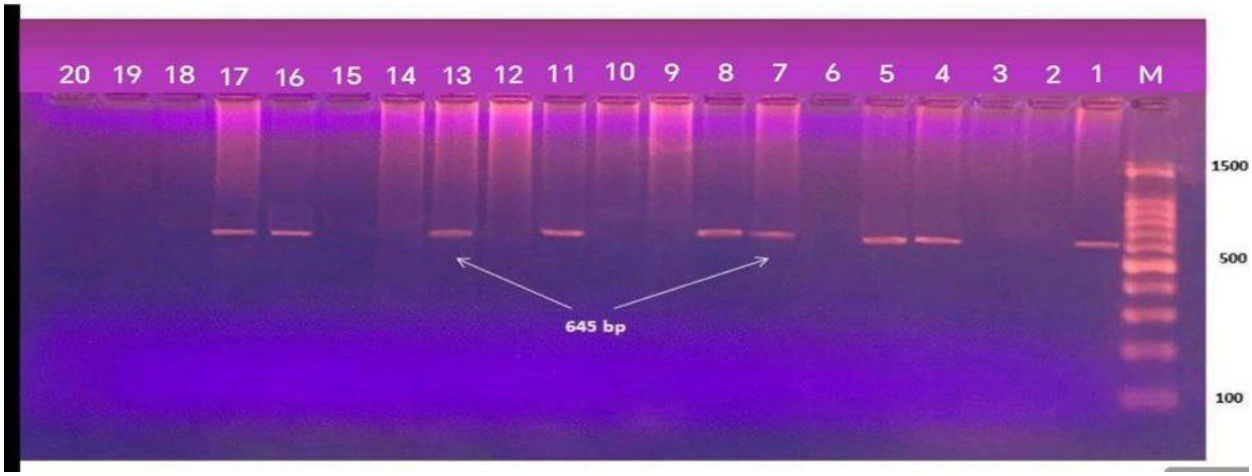
ان وجود هذه المورثات يمكن أن يحد بشكل كبير من خيارات علاج عدوى *E.coli* ، مما يزيد من خطر فشل العلاج والمضاعفات التي قد تهدد الحياة(Urban-Chmiel *et al*., 2022).

اما *S.aureus*فانها لاتزال تشكل تحديات كبيرة للصحة العامة في العديد من المناطق بسبب مشاكل مقاومة المضادات الحيوية المرتبطة بوجود مورث *aac(6')-Ib -cr* (Patrick *et al*., 2017)، و أظهرت الدراسات معدلات انتشار متفاوت لهذا المورث اعتمادا" على عوامل عديدة مثل أنماط استخدام المضادات الحيوية وأنواع محددة من سلالات *S. aureus* .

إن وجود مورث *aac(6')-Ib –cr* يقلل بشكل كبير من فعالية المضادات الحيوية المنتمية لعائلة aminoglycoside ، مما يحد من خيارات علاج الالتهابات التي تسببها *S.aureus*المقاومة. ويشكل هذا تحديًا كبيرًا في أماكن الرعاية الصحية، مما يساهم في الإصابة بالأمراض والوفيات. (Safarpoor *et al*., 2017).

3-2-2 الكشف عن مورث *ermA*

تم استعمال تقنية PCR في هذه الدراسة للكشف عن وجود مورث *ermA* بالبكتريا المرضية المعزولة، ويوضح الشكل (3-6) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي تبين من خلالها ان البواديُ (Primer)الخاصة بالمورث *ermA* كان ناجحاً في تضخيم هذا المورث من خلال ظهور حزمة بمقدار (645 bp).

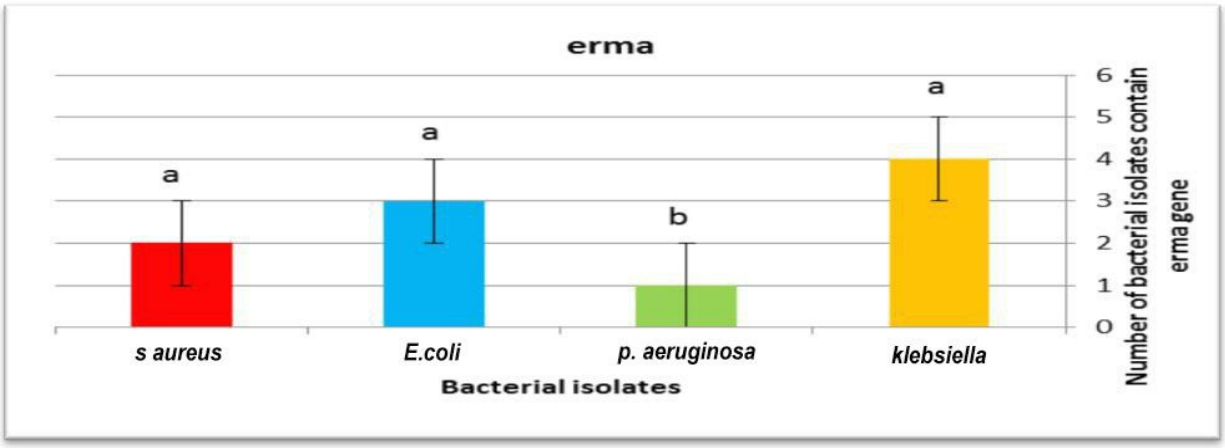


الشكل (3- 6) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *ermA* (645 bp)بتركيزهلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة حيث تتبين ارقام العزلات كما موضح ادناه

1. *S.aureus* , 2. *S.aureus* ,3.*S.aureus* , 4. *S.aureus* , *5. E.coli* , *6 .E.coli* , *7. E.coli, 8. E.coli* ,

9. E.coli,10. E.coli,11.P. aeruginosa ,12. P. aeruginosa,13. K. pneumoniae,14. K. pneumoniae,

15. K. pneumoniae,16. K. pneumoniae,17. K. pneumoniae,18. K. pneumoniae,19. K. pneumoniae,20. K. pneumoniae



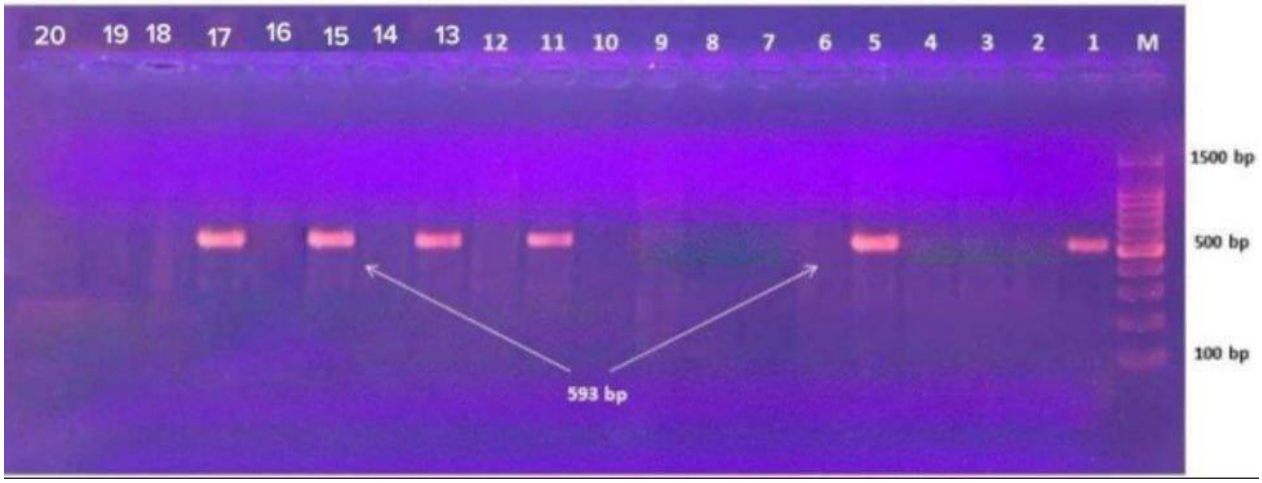
الشكل (3-7) معدل عدد العزلات لمورث المقاومة *ermA* من البكتريا المعزولة قيد الدراسة من عينات مختلفة الحروف مختلفة اعلى الاعمدة تشير الى وجود فرق معنوي في عدد العزلات التي تحمل المورث (*P*=0.031).

يتضح من الشكل(3-7) بأن بكتيريا *P. aeruginosa* كانت منخفضة معنويا في امتلاكها للمورث *ermA* الذي يشفر لصفة المقاومة ضد انواع المضادات الحيوية من نوع erythromycin

بينما بقية الاجناس البكتيرية تمتلك للمورث غير معنوي على الرغم من كون بكتيريا *E.coli* اعلى عددا في امتلاكها للمورث وهذه النتيجة جاءت مشابهة لدراسة اجريت سنة 2023 والتي بينت وجود ثلاث عزلات حاملة لمورث *ermA* من بين 92 عينة من بكتيريا (Duman *et al* .,2023).

3-2-3 الكشف عن مورث *qnrA*

اشار الشكل (3-8) الى نجاح البوادئ (Primers) الخاص بمورث *qnrA* بالبكتيريا المرضية المعزولة من خلال ظهور حزمة بمقدار (593 bp) خلال عملية الترحيل الكهربائي لنواتج ال PCRحيث بينت النتائج ان بكتيريا *K.pneumoniae* الاعلى وبصورة معنوية في امتلاكها لهذا المورث الذي يشفر لصفة المقاومة ضد المضادات الحيوية من نوع ceftazidime (p=0.014) بينما لم تظهر فروق معنوية بين بقية الاجناس البكتيرية في عدد المورثات التي تحملها.

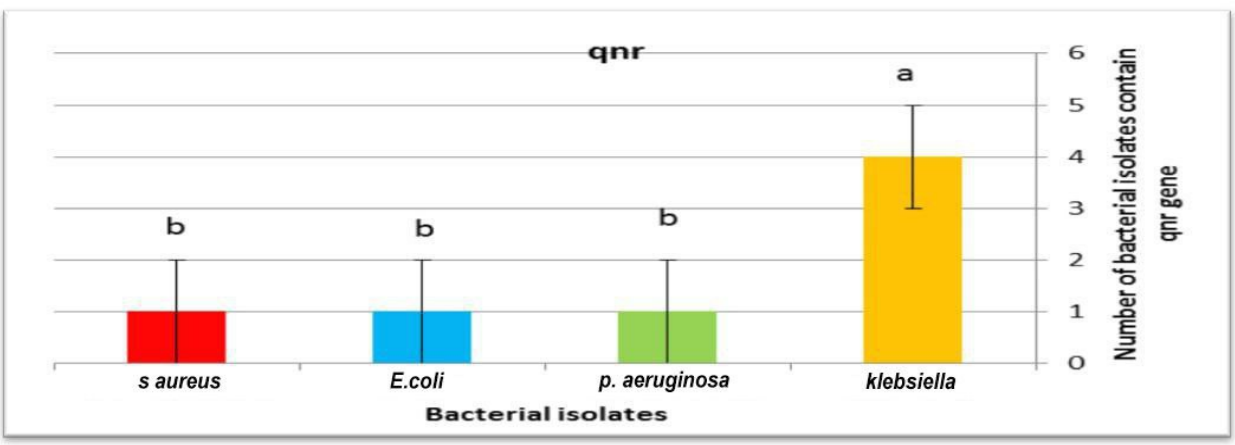


الشكل (3-8) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *qnrA* (593bp) بتركيزهلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة حيث تتبين ارقام العزلات كما موضح ادناه

1. *S.aureus* , 2. *S.aureus* ,3.*S.aureus* , 4. *S.aureus* , *5. E.coli* , *6 .E.coli* , *7. E.coli, 8. E.coli* ,

9. E.coli,10. E.coli,11.P. aeruginosa ,12. P. aeruginosa,13. K. pneumoniae,14. K. pneumoniae,

15. K. pneumoniae,16. K. pneumoniae,17. K. pneumoniae,18. K. pneumoniae,19. K. pneumoniae,20. K. pneumoniae



الشكل (3-9) معدل عدد العزلات البكتيرية الحاملة لمورث المقاومة *qnrA* من البكتريا المعزولة قيد الدراسة من عينات مختلفة الحروف مختلفة اعلى الاعمدة تشير الى وجود فرق معنوي في عدد العزلات الت تحمل المورث (*P*=0.014)

ان تواتر مورثات*qnrA* بين العزلات السريرية للبكتيريا المرضية الموضحة في هذه الدراسة كما موضح بالشكل(3-9) على من التكرار الذي تم تاكيده في دراسة الباحث Rezazadeh (Rezazadeh *et al*., 2016) في حين كانت النتيجة مشابهة لدراسة اجريت سنة 2008 (Wang *et al*.,2008) .

تنتج مقاومة الكينولون في البكتيريا المعوية بشكل رئيسي عن الطفرات في جينات DNA type II topoisomerase genes و/أو التغيرات في التعبير عن الغشاء الخارجي ومضخات التدفق. أشارت العديد من الدراسات الحديثة إلى أن آليات المقاومة التي يتوسطها البلازميد تلعب أيضًا دورًا مهمًا في مقاومة الفلوروكينولونات، ويتزايد انتشارها في جميع أنحاء العالم (Wang *et al*.,2008).

4-2-3 الكشف عن مورث *shv*

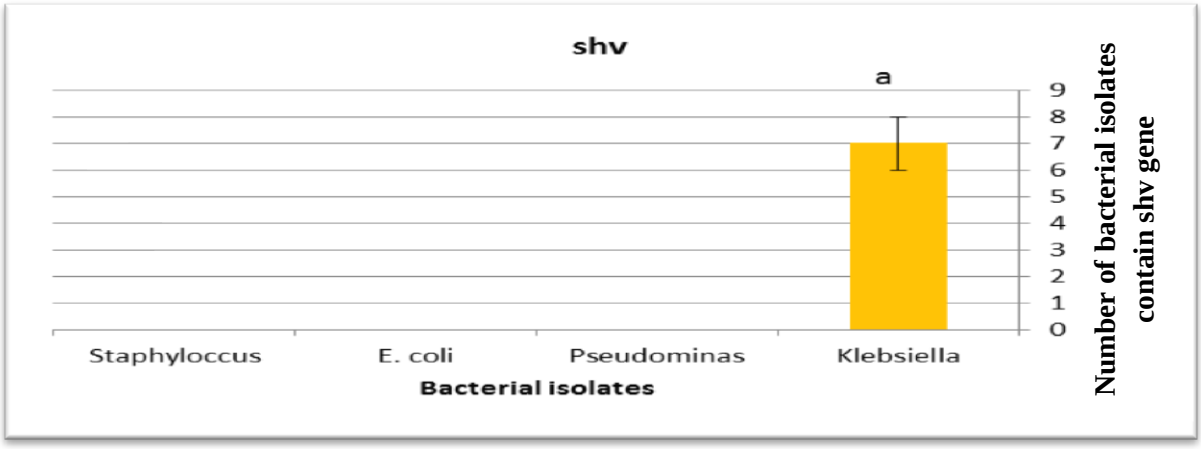
وايضا تم الكشف عن المورث *shv* في البكتريا المرضية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في هذه الدراسة بوساطة استعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ، وضح الشكل (3-10) الترحيل الكهربائي لنواتج PCRوالتي تبين خلالها ان البواديء (Primer) الخاصة بالمورث *shv* كان ناجحاً في تضخيم هذا المورث من خلال ظهور حزمة بمقدار (850bp).

الشكل (3-10) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *shv* (850bp) بتركيز هلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة حيث تتبين ارقام العزلات كما موضح ادناه

1. *S.aureus* , 2. *S.aureus* ,3.*S.aureus* , 4. *S.aureus* , *5. E.coli* , *6 .E.coli* , *7. E.coli, 8. E.coli* ,

9. E.coli,10. E.coli,11.P. aeruginosa ,12. P. aeruginosa,13. K. pneumoniae,14. K. pneumoniae,

15. K. pneumoniae,16. K. pneumoniae,17. K. pneumoniae,18. K. pneumoniae,19. K. pneumoniae,20. K. pneumoniae



الشكل (3-11) معدل عدد العزلات البكتيرية المعزولة من عينات مختلفة حاملا لمورث المقاومة *shv* الاعمدة التي تحمل حروف مختلفة تشير الى وجود فرق معنوي في عدد العزلات الت تحمل المورث (*P*=0.000).

يظهر من الشكل(3 -11) بان *K. pneumoniae* هي الوحيدة من البكتيريا المدروسة حيث سبع عزلات من اصل ثمانية كانت حاملة المورث من نوع *shv* بينما بقية الاجناس البكتيرية كانت فاقدة لهذه المورثات حيث كانت هذه النتيجة مشابهة لدراسة محلية أجريت سنة 2023 من قبل

(Al-Tuhmazi,Al-Hisnawi, 2023) كذلك هناك دراسة اجريت سنة 2022 من قبل الباحث Ghenea وأخرون ان من بين 14 عزلة لبكتيريا *E.coli* احتوت على مورث bla_{SHV-1} (Ghenea etal .,2022).

5-2-3 الكشف عن مورث *bla Tem*

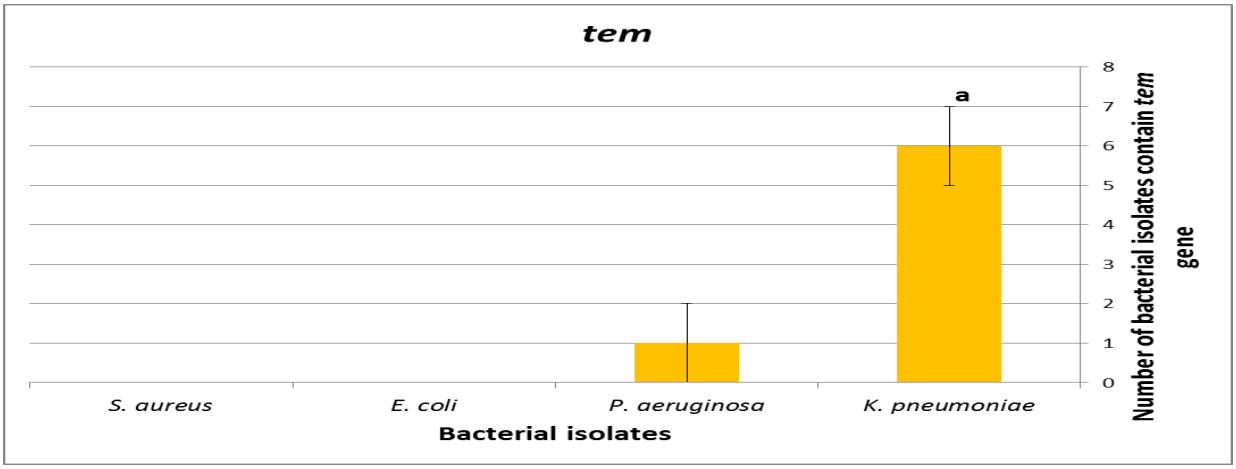
وضح الشكل (3-12) الترحيل الكهربائي لنواتج ال PCRوالتي تبين ان البوادئ primersالخاصة بالمورث *bla Tem* كان واضحا في تضخيم المورث من خلال ظهور حزمة بمقدار(971bp).

الشكل (3-12) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *bla Tem*(971bp) بتركيز هلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة حيث تتبين ارقام العزلات كما موضح ادناه

1. *S.aureus* , 2. *S.aureus* ,3.*S.aureus* , 4. *S.aureus* , *5. E.coli , 6 .E.coli , 7. E.coli, 8. E.coli ,*

9. E.coli,10. E.coli,11.P. aeruginosa ,12. P. aeruginosa,13. K. pneumoniae,14. K. pneumoniae,

15. K. pneumoniae,16. K. pneumoniae,17. K. pneumoniae,18. K. pneumoniae,19. K. pneumoniae,20. K. pneumoniae



الشكل (3-13) معدل عدد العزلات البكتيرية المعزولة من عينات مختلفة حاملا لمورث المقاومة *bla Tem* الاعمدة التي تحمل حروف مختلفة تشير الى وجود فرق معنوي في عدد العزلات الت تحمل المورث (*P*=0.000).

غالبًا ما يكون تحديد حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية، خاصة مع زيادة المقاومة، أمرًا بالغ الأهمية (Banerjee and Patel, 2023) .

يبين من الشكل(3- 13) ان بكتيريا *K. pneumoniae* الوحيدة التي كانت تحمل مورث *bla Tem* وبشكل معنوي عن بقية الاجناس تلتها بكتيريا *P. aeruginosa* بوجود عزلة واحده بينما كل عزلات *S.aureus* و*E.coli* لم تحمل المورث هذه النتيجة مشابهة لدراسة الباحثين (Al-Tuhmazi and Al-Hisnawi,2023) في عدم وجود هذا المورث في بكتيريا الاشريكية القولونبية.

يمكن أن تحدث المقاومة بسبب مجموعة متنوعة من الآليات مثل وجود إنزيم يثبط نشاط العامل المضاد للميكروبات، او وجود إنزيم بديل للإنزيم الذي يتم تثبيطه، كما يمكن ان تحدث المقاومة نتيجة حدوث طفرة في بنية الهدف الذي يعمل عليه المضاد الحيوي ، مما يقلل من ارتباط العامل المضاد للميكروبات او حدوث تعديل ما بعد النسخ أو ما بعد الترجمة لهدف العامل المضاد للميكروبات ، مما يقلل من ارتباطه وفي بعض حالات المقاومة يحدث انخفاض في معدل امتصاص المضادات الحيوية من قبل الاحياء المجهرية او قد يكون نتيجة عامل احيائي نشط صناعيا (Murugaiyan *et al*., 2022) و يوضح الجدول (3-2)عدد وأنواع مورثات المقاومة للمضادات الحيوية التي تم عزلها من البكتريا المستخدمة قيد الدراسة.

اذ أظهر في الجدول(3-2) بان عدد العزلات البكتيرية لل*K. pneumoniae* الحاملة للمورثات التي تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحيوية المدروسة كان اعلى وبصورة معنوية بالمقارنة مع بقية الاجناس البكتيرية قيد الدراسة ($p \leq 0.05$)، حيث توافقت هذه نتائج الدراسة الحالية بخصوص وجود عزلات من بكتيريا *K. pneumoniae* حاملة لمورثات *bla Tem* و *shv* التي تشفر لصفة المقاومة لعائلة β-Lactam من قبل (Li *et al*,.2018) وايضا وجود عزلات حاملة للمورث *aac* مع دراسة Doi وجماعته (Doi *et al*., 2016) اما وجود عزلات بكتيرية حاملة للمورث *ermA* افق مع لاحظه (Safika *et al*.,2022).

ومن ناحية أخرى بينت النتائج الموضحة في الجدول (3-2) بان هنالك فرقا معنوياً كبيراً على مستوى احتمال (p <0.05) لوجود مورث *qnrA* بين العزلات السريرية . حيث اكدت الدراسات السابقة وجود تواتر منخفض لمورثات *qnrA* بين العزلات السريرية لبكتيريا*E.coli* و *S. aureus* و *P. aeruginosa* .

من جهة أخرى أظهرت الدراسات السابقة لدى بكتريا *S.aureus*وجود علاقة جيدة بين مقاومةلإريثروميسين, ووجود مورثات المقاومة المشفرة لها حيث تم تأكيد وجود نسبة 83.4% من سلالات *S.aureus*المقاومة للإريثروميسين تحتوي على مورث*ermA* (Aggarwal *et al.,* 2019)

جدول (3-2) معدل عدد العزلات البكتيرية الحاملة لمورثات المقاومة من البكتريا المعزولة قيد الدراسة

العزلات البكتيرية	*aac(6')-Ib -cr (6')-Ib - cr*	*ermA*	*qnrA*	*shv*	*bla Tem*	*P value*
S.aureus	3	2	1	0	0	0.125
E.coli	6	3	1	0	0	*0.003
pseudomonas	2	1	1	0	0	0.191
K. pneumoniae	8	4	4	7	6	*0.002
P value	0.00001	0.0001	0.014	0.031	0.0001	/

*تشير الى وجود فروقات معنوية بين أنواع المورثات موزعة على الأجناس البكتيرية

أظهرت دراسة أن مورث *ermA* هو السائد بين مورثات مقاومة الإريثروميسين في *S. aureus* (Kaur and Chate, 2015) لكن في الدراسة الحالية كان معدل عدد العزلات التي

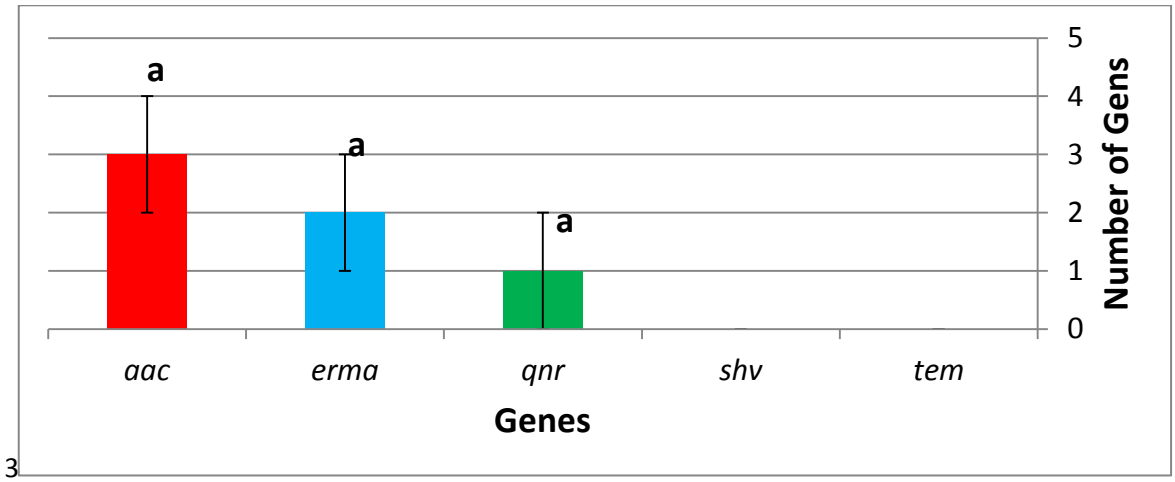
أظهرت مورث المقاومة *ermA* اقل من عدد العزلات التي أظهرت مورث المقاومة - *aac(6')-Ib* *.cr*

إن دراسة مورثات المقاومة للمضادات الحيويّة والتي تتمثل بقدرة البكتريا على تطوير آليات دفاعية لتجعلها صعبة العلاج اضحت ذا اهمية كبيرة . فظهور الطفرات في المورثات المسببة للمقاومة قد يجعل علاج الالتهابات البكتيريا اصعب، حيث تنشأ المقاومة إما بصورة طبيعية عن طريق الطفرات الوراثية وإما عن طريق انتقال المقاومة من جنس اكتسبها إلى جنس أخر لم يكتسبها (Reygaert, 2018) .

أوضحت النتائج الحالية لإمكانية تضخيم DNA من هذه العزلات البكتيرية بنجاح باستخدام تقنية (PCR)التي تتميز بوصفها تقنية بسيطة، سريعة وذات حساسية وخصوصية عاليتين.

تم استخدام تقنية PCR في هذه الدراسة للكشف عن وجود خمس انواع من المورثات (*ermA, shv* , *qnrA, aac(6')-Ib –cr, bla Tem*) في اجناس البكتريا المرضية قيد الدراسة.

وضح الشكل(3-14) والجدول (3-2) عدد عزلات بكتيريا *S.aureus* التي تحمل المورثات اذ أوضحت نتائج الترحيل الكهربائي PCR إن البوادئ (Primer) الخاصة بمورثات المقاومة كان ناجحاً في تضخيم هذا المورثات من خلال ظهور ناتج ذو احجام متوافقة ،وعند ملاحظة ناتج الترحيل إن ثلاث عزلات من بكتريا *S.aureus* قيد الدراسة تحوي مورث*aac(6')-Ib -cr* ، واثنين منها تحتوي على مورثات *ermA*، و واحدة فقط تحتوي على مورث *qnrA*.



تبين الشكل (3-14) عدد المورثات التي تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحياتية الموجودة في بكتيريا *S.aureus* المعزولة من عينات مختلفة ،الاعمدة التي تحمل حروف متشابهة لا تشير الى وجود فرق معنوي في عدد المورثات الموجودة في بكتريا S. aureus (*P*=0.125).

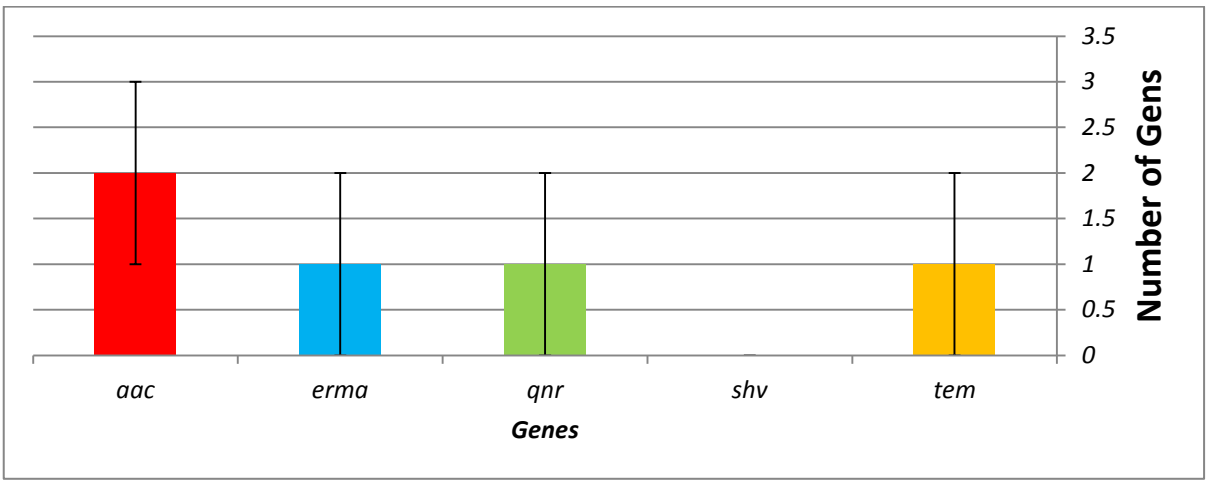
جاءت نتائج الدراسة الحالية متطابقة مع دراسات أخرى حيث أظهرت وجود مورث *ermA* والذي يعتبر من المورثات الاكثر اهمية لمقاومة المضادات الحيوية في *S.aureus*

(Timsina *et al*., 2021). حيث تقوم هذه المورثات بتشفير rRNA methylase الذي يعدّل موقع الريبوسوم المستهدف للمضادات الحيوية Macrolide lincosamide and streptogramin (MLS).

يمنع هذا التعديل المضادات الحيوية من الارتباط بالريبوسوم وتثبيط تخليق البروتين، مما يؤدي إلى المقاومة.(Lewis and Jorgensen, 2005) وفقًا لمنظمة الصحة العالمية (WHO)، فإن نمط مقاومة المضادات الحيوية لدى *S.aureus*يشكل تهديدًا خطيرًا على صحة الإنسان في جميع أنحاء العالم (WHO., 2019)حددت دراسة سابقة لمقاومة المضادات الحيوية وجود العديد من المورثات المقاومة بالذات مورثات*aac(6')-Ib -c* , الذي تم عزله في أكثر من 75% من جميع عزلات *S.aureus*المقاومة للأمينوكليكوسيد. (Rahimi *et al*., 2014)

اما بالنسبة لبكتريا *P.aeruginosa* فقد بين الشكل (3-14) ان العزلات التي تحمل المورث *aac(6')-Ib –cr* كان اعلى ولكن لم يتم ملاحظة وجود فروقات معنوية بالمقارنة مع العزلات التي تحمل المورث *erm* و *qnrA* ، كذلك لا يوجد أي عزلة للزائفة الزنجارية تحمل مورث *shv* وهذا ما يتوافق مع الدراسة التي أجريت في محافظة كربلاء من قبل (Al-Tuhmazi and Al-Hisnawi, 2023).

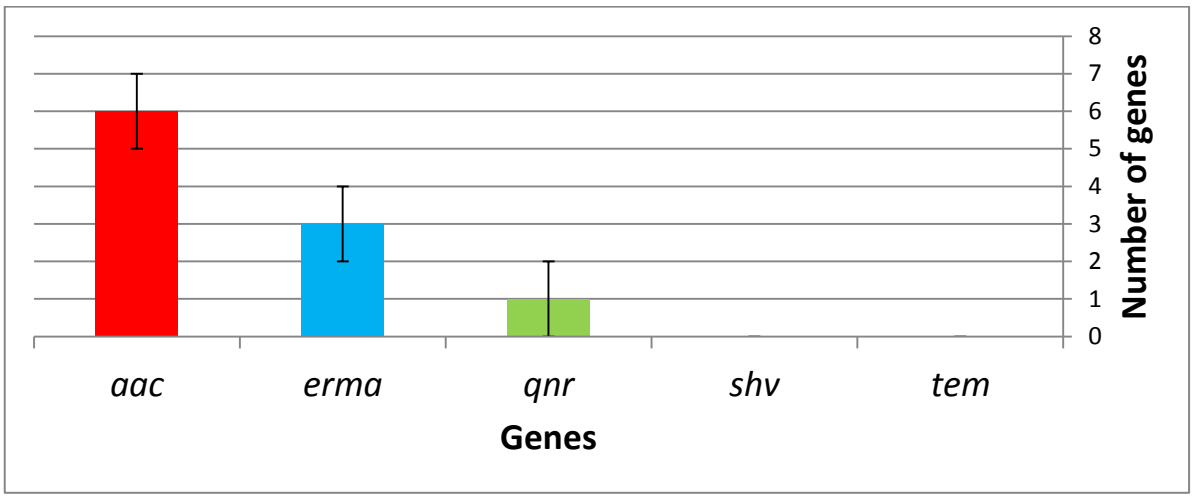
وضح الشكل(3-15) الأنواع المعزولة من مورثات المقاومة واعدادها التي ظهرت مع بكتريا *P. aeruginosa* اذ أكدت النتائج وجود اربع أنواع من مورثات المقاومة في هذا الجنس من البكتريا المرضية وهي (*aac(6')-Ib -cr, ermA,qnrA, bla Tem*) وبمعدلات متفاوتة ، حيث كان عد العزلات التي تحمل المورث *aac(6')-Ib -cr* ضعف ما عليه للعزلات التي تحمل المورثات (*erm*A, *qnrA*, *bla Tem*) وعلى الرغم من عدم وجود فروقات معنوية واضحة بين اعداد العزلات التي تحمل المورثات قيد الدراسةالا ان عدد العزلات التي تحمل المورث *aac(6')-Ib –cr* كانت ضعف ماعليه مقارنة بالعزلات التي تحمل بقية الانواع من المورثات .



الشكل (3-15) عدد العزلات البكتيرية من جنس *P.aeruginosa* والتي تحمل المورثات التي تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحياتية الاعمدة التي تحمل حروف متشابهة لا تشير الى وجود فرق معنوي في عدد المروثات الموجودة في بكتريا المكورات (*P*=0.19).

تطابقت نتائج الدراسة الحالية مع الدراسات السابقة والتي أظهرت ان بكتريا *P. aeruginosa* تملك مقاومة جوهرية للعديد من المضادات الحيوية والتي ترجع إلى آليات مقاومة مختلفة تكون جوهرية ومكتسبة من الكائنات الحية الدقيقةالأخرى(Hwang and Yoon., 2019; Pang *et al*., 2019). ان الآليات الرئيسية للمقاومة في هذه البكتيريا تتضمن: الإفراط في التعبير عن مضخات التدفق over-expression of efflux pumps ، وانخفاض نفاذية الغشاء الخارجي decreasing outer membrane permeability واكتساب طفرة مورثات المقاومة لتي تشفر لبروتينات التي تتحكم في اليات النقل الفعال للمضادات الحيوية عبر الغشاء الخارجي (Langendonk *et al.*, 2021).

اما بكتريا *E. coli* فقد أظهرت النتائج بانها تحمل المورثات التي تشفر لصفة المقاومة والتي تشبه الى حد كبير ماموجود في بكتيريا *S. aureus* تمثلت هذه المورثات (*ermA, qnrA*) الا ان عدد العزلات التي تحمل مورث المقاومة *aac(6')-Ib –cr* في بكتريا *E.coli* كان ضعف ما موجود في بكتريا *S. aureus* كما وضح ذلك في الشكل (3-16) حيث بينت النتائج ان مورث *aac(6')-Ib – cr* كان موجودا في العزلات البكتيرية بصورة مرتفعة ومعنوية مقارنة بالمورث *ermA* و *qnrA* وكذلك بان عدد العزلات التي تحمل المورث *qnrA* كان منخفضا وبصورة معنوية عن العزلات التي تحمل مورث *ermA* ،ان العزلات التي تحمل المورث*aac* كان اعلى معنويا مقارنة بالعزلات التي تحمل المورث *ermA* و *qnrA*. (($p \leq 0.05$)



الشكل (3-16)عدد العزلات البكتيرية من جنس *E. coli* والتي تحمل المورثات التي تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحياتية الاعمدة التي تحمل حروف متشابهة لا تشير الى وجود فرق معنوي في عدد المورثات الموجودة في بكتريا*E. coli* (*P*=0.003).

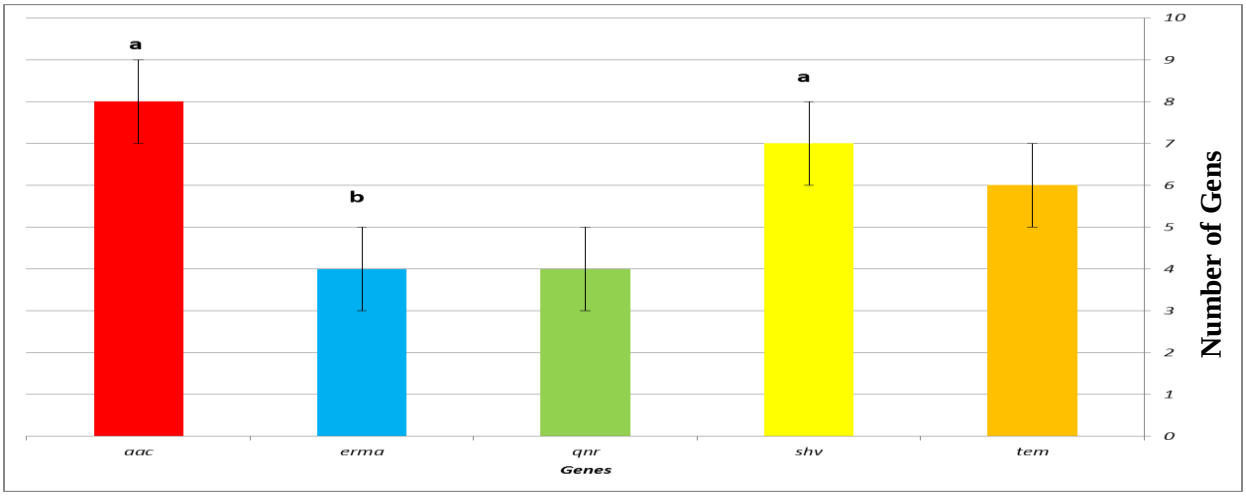
لقد اشارت دراسة أخرى أن مورثات *acc* قد تم عزلها من *E.coli* والتي تمنح مقاومة aminoglycosides و fluoroquinolone (Taviani *et al*., 2021).

تعمل مورثات *acc*على تعديل ريبوسومات البكتيريا، مما يمنع المضادات الحيوية aminoglycosides مثل Gentamicinمن الارتباط وتثبيط تخليق البروتين (Awosile *et al*., 2019)

اما مورثات مقاومة fluoroquinolone فقد تم اثبات وجودها في ال*E.coli* للدراسات السابقة فهي تعمل على تغيير إنزيم DNA gyrase البكتيري، وهو هدف المضادات الحيوية fluoroquinolone مثل Ciprofloxacin وlevofloxacin (Kibwana *et al*., 2023; Cheng *et al*., 2020) .

أظهرت النتائج المبينة في الشكل (3-17) أن بكتيريا *K. pneumoniae* تحمل كافة انواع المورثات التي تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحياتية قيد الدراسة حيث أن عدد العزلات لبكتيريا *K. pneumoniae*والتي تحمل المورثات *bla Tem*, *shv* و *aac(6')-Ib –cr* كان أعلى وبصورة معنوية عن عدد العزلات التي تحمل المورثات *ermA*, *qnrA* كانت الفروقات المعنوية لقيمة (*P*=0.002).

حيث كانت اكثر الاجناس البكتيرية الحاملة لمورثات المقاومة للمضادات الحياتية هي بكتريا *K. pneumoniae* يليها بكتريا *P. aeruginosa* ، تم تضخيم المورثات قد تم عن طريق الحمض النووي للبكتريا المعزولة باستخدام بوادئ خاصة بكل نوع، وبحسب النتائج فان بكتريا *K. pneumoniae* كانت حاملة لكل انواع المورثات المدروسة بنسب متفاوتة وكان عدد العزلات التابعة لهذه البكتريا والحاملة لمورث *aac(6')-Ib –cr* هو الاعلى بعدد (8) يليه عدد العزلات الحاملة للمورث *shv , bla Tem* بمعدل (6،7) اما الاقل ترددا فقط كانت عدد العزلات لمورثات المقاومة من نوع (*ermA, qnrA*).



الشكل (3-17) عدد المورثات التي تشفر لصفة المقاومة للمضادات الحياتية الموجودة في بكتيريا *K. pneumoniae* المعزولة من عينات مختلفة. الاعمدة التي تحمل حروف مختلفة تشير الى وجود فرق معنوي في عدد المورثات الموجودة في بكتريا *K. pneumoniae* المخاطية (*P*=0.002).

توافقت النتائج الحالية مع الدراسات السابقة والتي اكدت قدرة البكتريا هذه في انتاج انزيمات بيتا لاكتامايز ممتدة الطيف (ESBLs)Extended-spectrum β-lactamases والمقاومة لمعظم المضادات الحيوي(Mazzariol *et al*., 2017 ; Martin and Bachman, 2018) .

اكدت الدراسات السابقة وجود المورثات التي تشفر لصفة المقاومة والمعدلة Aminoglycosides وهي الأكثر شيوعًا في البكتيريا السالبة لصبغة غرام ، وخاصة *K .pneumoniae*،ان تطور السلالات البكتيرية المنتجة لـ ESBL مقاومة للمضادات الحيوية الأخرى مثل Aminoglycosides, tetracyclines, وsulfonamides (Mustafa and Abdullah, 2018).

إن وجود كل من مورثات *shv* و *bla Tem* في *K. pneumoniae* يجعل خيارات العلاج معقدة لكونها تساهم بشكل تآزري في زيادة المقاومة على نطاق أوسع، مما يقلل من فعالية المضادات الحيوية المختلفة من نوع بيتا لاكتام .وهذا يسلط الضوء على أهمية التشخيص السريع والدقيق لتحديد آليات المقاومة المحددة وتوجيه العلاج بالمضادات الحيوية المناسبة. (Ndlovu *et al*., 2023)

3-3 التشخيص المجهري والمظهري والكيموحيوي لعزلات بكتيريا حامض اللبنيك *Lactobacillus.spp*:

Microscopic, phenotypic and biochemical diagnosis of isolates of probiotic bacteria *Lactobacillus.spp*:

تم عزل بكتريا حامض اللبنيك من الألبان كما موضح سابقا حيث تم زراعة البكتيريا على وسط أختياريde Man–Rogosa agar . لنمو بكتريا حامض اللبنيك. وبعد ان نمت البكتيريا، تم اختيار المستعمرات التي تميزت بالشكل الدائري صغير الحجم بعضها محدب او مسطح ملساء ناعمة ولماعة بيضاء اللون او كريمية . وتم اجراء الفحص المجهري والاختبارات الكيموحيوية عليها . ويبين الجدول (3-3) نتائج الاختبارات الكيموحيوية .

جدول (3-3): الاختبارات الكيموحيوية المستعملة لتشخيص لانواع بكتيريا حامض اللبنيك من جنس *Lactobacillus* Spp.

نوع البكتيريا	صبغة غرام	اختبار الكتليز	اختبار الاوكسيديز	استهلاك السترات	اختبار الاندول	اختبار M-R	اختبار الاندول	تخمر السكريات		
								الكلوكوز	اللاكتوز	السكروز
L. acidophilus	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
L. helveticus	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
L. rhamnosus	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
L. plantarium	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+

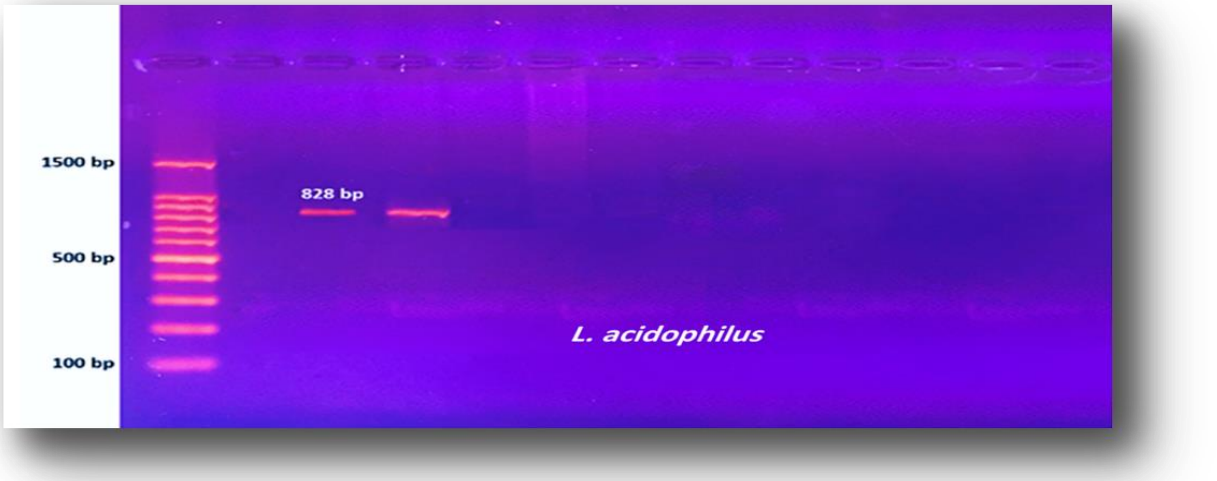
أظهرت النتائج ان بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* موجبة لصبغة كرام و والاوكسديزوايضا وكذلك ليس لها القدرة على استهلاك السترات كمصدر للكاربون وليس لها القدرة على انتاج الاندول من الحامض الاميني التربتوفان لعدم قدرتها على انتاج انزيم التربتوفاينيز وكذلك النتيجة كانت موجبة في اختبار احمر المثيل بينما كانت قدرتها على تخمر الكلوكوز واللاكتوز والسكروز موجبة،بينما أظهرت

بكتيريا *L. helveticus* نتيجة موجبة لصبغة كرام وأظهرت نتيجة سلبية لاختبار الاوكسديز ،كذلك غياب الفوران في اختبار الكاتليز كان دليل على سلبية البكتريا لاختبار الكاتليزوكانت النتيجة كانت موجبة في اختبار احمر المثيل واعطت نتيجة سلبية في استهلاك النترات وكانت في اختبار الأندول سلبية ايضا ،بينما أظهرت نتيجة ايجابية في اختبار تخمر الكلوكوزو اللاكتوز والسكروز.

اما *L. rhamnosus* فقد كانت مشابهة لما أنتجته الأنواع السابقة حيث كانت النتيجة ايجابية لصبغة كرام وكذلك اكدت الاختبارات على عدم امتلاكها على انزيم الكاتليز والاوكسيز حيث اعطت النتيجة سالبة في اختباري الاوكسديز والكتليز ونتيجة سالبة ايضا في اختبار السترات واختبار الاندول بينما كانت النتيجة موجبة لاختبار الكلوكوزو اللاكتوز والسكروزوكذلك احمرالمثيل، وأخيرا فأن نتائج بكتيريا *L. plantarium* كانت مماثلة في ايجابيتها لصبغة كرام وسالبة لاختبار الاوكسيز والكاتليز واختباراستهلاك السترات واختبار الاندول وايجابيتها لاختباراحمر المثيل و الكلوكوزو اللاكتوز والسكروز .

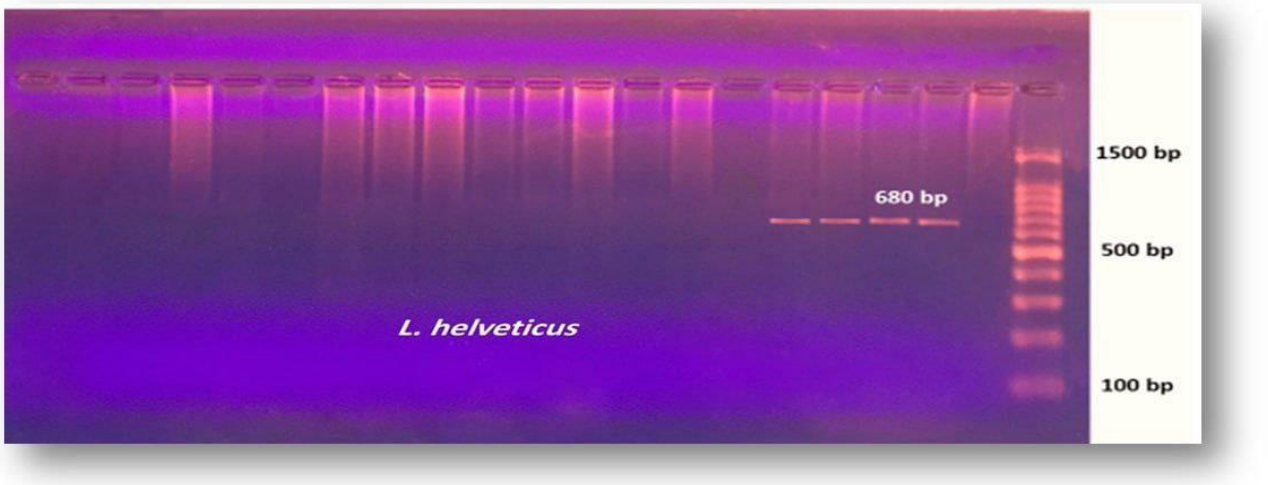
1-3-3 الكشف الجزيئي عن انواع بكتيريا حامض اللبنيك قيد الدراسة Molecular detection of probiotics genes isolates in the present study

تم استعمال تقنية PCR في هذه الدراسة للتحري عن وجود وعزل بكتيريا حامض اللبنيك من جنس *L. acidophilus* وأظهر الشكل (3-18) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي تبين من خلالها ان البوادئ (Primers)كانت ناجحة في تضخيم الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA الحامض النووي منقوص الأوكسجين من خلال ظهور حزمة بمقدار (828 bp) عند مقارنتها ladder .



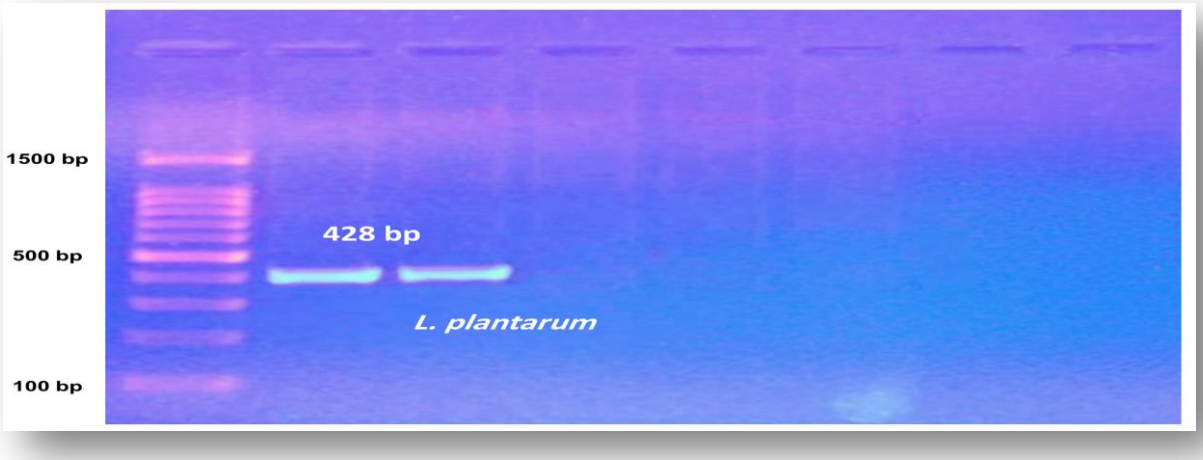
الشكل (3-18) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لعزل بكتيريا حامض اللبنيك من نوع *L.acidophilus* (828 bp) بتركيز هلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.

كما تم استعمال تقنية PCR في هذه الدراسة للكشف عن وجود وعزل البكتريا المحفزة حيويا من نوع *L. helveticus* كما موضح في الشكل (3-19) فأن عملية الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي تبين من خلالها ان البوادئ (Primers) كان ناجحاً في تضخيم هذا الاشارة من خلال ظهور حزمة بمقدار (680 bp) عند مقارنتها ladder ذات الحجم (100-1500bp),



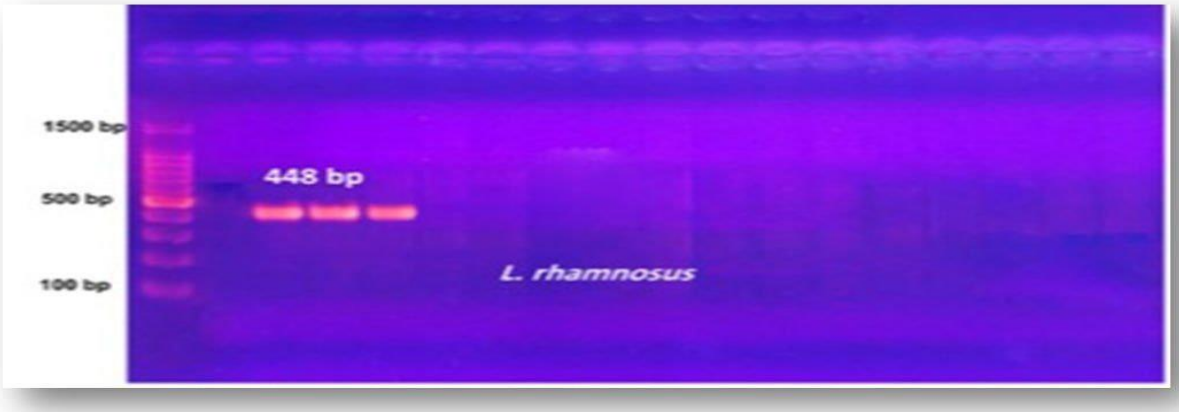
الشكل(3-19) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لعزل البكتريا حامض اللبن نوع *L. helveticus* (680bp)بتركيزهلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.

كما تم استعمال تقنية PCR في هذه الدراسة للكشف عن وجود وعزل البكتريا النافعة من نوع *L. plantarum* اذ وضح الشكل (3-20) عملية الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي تبين من خلالها ان البوادئ (Primers) قد نجحت في تضخيم هذا الاشارة من خلال ظهور حزمة بمقدار (428 bp) عند مقارنتهاladder ذات حجم (100-1500bp).



الشكل (3-20) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحدد لعزل البكتريا احامض اللبنيك نوع *L. plantarum* (428bp) بتركيزهلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.

تم استعمال تقنية PCR في هذه الدراسة للكشف عن وجود وعزل البكتريا المحفزة حيويا من نوع *L.rhamnosus* وضح الشكل (3-21) الترحيل الكهربائي لنواتج PCR والتي تبين من خلالها ان البوادئ (Primers) قد نجحت في تضخيم هذا الاشارة من خلال ظهور حزمة بمقدار (448 bp).



الشكل (3-21) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام بوادئ المحدد لعزل بكتريا حامض اللبنيك النوع *L.rhamnosus* (448bp) بتركيزهلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة

جدول (3-4) يظهر نوع عزلات بكتيريا حامض اللبنيك المعزولة من الالبان .

بكتيريا حامض اللبنيك المعزولة	عدد العزلات
L. acidophilus	**2**
L. helveticus	**4**
L. plantarum	**2**
L.rhamnosus	**3**

3-1-2الفعالية التضادية لبكتيريا حامض اللبنيك ضد البكتيريا المرضية :

Antimicroial activity of *Lactobacillus spp.* Against pathogenic bacteria:

في الدراسة الحالية لم تظهر بكتيريا حامض اللبنيك اي قابلية لتثبيط البكتريا المرضية حينما استخدمت لوحدها او تآزريا مع بعضها او عندما تم استخدام الراشح البكتيري لها اي قابلية تثبيط لنمو البكتريا المرضية .

بالرغم من ان الدراسات السابقة وثقت التأثيرات التثبيطية باستخدام بكتيريا حمض اللبنيك و راشحها ضد البكتريا المرضية بأن لها تأثيرات ناتجة عن إفراز هذه البكتيريا مواد مثبطة ضد البكتيريا السالبة وموجبة لصبغة غرام وهي *E. coli*, *Salmonella typhi* و *K. pneumoniae* . (Ziad., 2009).

حيث عرضت دراسة سابقة في الديوانية سنة 2011 لاستخدام البكتيريا الفعالة حيويا المعزولة من عينات من براز الاطفال بعمر 5 ايام الى سنة واحدة حيث أظهرت نتائج ايجابية وبينت ان هناك تأثير للبكتيريا الفعالة حيويا لوحدها من دون اضافة المغذيات فقد عرضت بكتيريا*L. gasseri* نتائج ايجابيةعلى بكتيريا *E.coli* وبقطر تثبيط حوالي 7 ملم وراشحها 6.5 ملم وايضا أظهرت بكتيريا *L.acidophilus* نتاج ايجابية مع بكتيريا *E.coli* وراشحها بقطر تثبيطي 5.6 و 5.1 ملم، بينما بكتيريا ال *S.aureus* كان قطر التثبيط ببكتيريا *L. acidophilus* حوالي 6 ملم والراشح بمقدار 5.5 ملم ، وهذا ما لم يتفق مع نتائج الدراسة الحالية حيث لم تظهر البكتيريا النافعة حيويا وراشحها اي تثبيط تجاه البكتيريا المرضية.(Nedawi ,2014) .

قد يكون ذلك بسبب كون البكتيريا المرضية قد اكتسبت مورثات مقاومة لها كون تلك الدراسة حصلت قبل 13سنة ومن البديهي تكون البكتيريا المرضية قد طورت ميكانيكيات لمقاومة البكتيريا المعززة حيويا ،وكانت نتائج الدراسة غير متوافقة ايضا مع دراسة أخرى استخدمت فيها بكتيريا *Lactobacillus plantar Lactobacillus Gasseri* ضد عدة سلالات تابعة لبكتيريا *E.coli* حيث أظهرت نتائج ايجابية بأقطار تثبيط بمعدل 10 Mm و*Lactobacillus Gasseri* بقطر تثبيط Mm10 (Ziad, 2009)

اكدت دراسة أخرى بأن السورلاكتين المنشط بالسطح الحيوي والذي تطلقه عزلات العصيات اللبنية قد ساهم بتطويرالطبقة المضادة للالتصاق ضد المكورات المعوية، كما تم تأكيد انخفاض في عدد المكورات المعوية الملتصقة يصل إلى حوالي 70٪ (Lamond, 2004).

نتائج الدراسة الحالية لم تتطابق مع اي من نتائج الدراسات السابقة ، قد يرجع السبب الى خصائص البكتيريا الممرضة فقد تكون مقاومة للمواد المضادة للميكروبات التي تنتجها البكتيريا المعززة حيويا او امتلاك البكتيريا الممرضة آليات مقاومة فعالة ضد التأثيرات التثبيطية لبكتريا المحفزة حيويا ودعمًا لهذه النتائج، أظهرت الدراسة التي أجراها مونوز وجماعته أن جميع أنواع *Lactobacillus spp.* التي تم اختبارفعاليتها البايولوجية ضد الكتيريا المرضية لم يظهرأي نشاط مضاد للبكتيريا المرضية قبل تعزيز نموها بالمكملات FOS.

ونتيجة هذه الدراسة تدعم نتيجة الدراسة الحالية حيث عزا الباحثون أسباب عدم وجود نشاط مضاد للميكروبات لجميع سلالات(LAB(Lactic acid bacteria الى مصدر عزل بكتيريا حامض اللبنيك وذلك لان سلالة واحدة فقط من أصل سبع سلالات اعطت تاثير مثبط نمو البكتيريا المرضية تم عزلها من دبس السكر، من ناحية أخرى يمكن أن يكون مصدر الكربون المستخدم لتعزيز نمو بكتيريا حامض اللبنيك هو السبب وراء التأثير المثبط للبكتيريا التي تشجع استقلاب بكتيريا حامض اللبنيك وتسرع الايض فيها مما يؤدي إلى إنتاج حمض الخل وحمض اللبن حيث يؤدي ذلك إلى تثبيط نمو مسببات الأمراض البكتيرية التي تم اختبارها(Muñoz *et al*., 2012) .

بالإضافة إلى ذلك، فإن البيانات الحالية مدعومة بدراسة أجراها تانغ وأخرون (2022) حيث وجدت أن التأثير المثبط لجميع أنواع بكتيريا حامض اللبنيك ،تم تحسينه من خلال مكملات FOS وInulin وOliposacchrides ضد *K.pneumoniae* (Tang *et al*., 2022).

في دراسة محلية أخرى (النجف/ العراق) أظهرت الفعاليةِ البيولوجية لبكتيريا *B. subtilis* تثبيطا ضد البكتيريا المرضية واكبر منطقة تثبيط كانت ضد بكتريا من نوع *S. aureus* ولكن باستخدام تقنية النانو حيث بلغت 24 (ملم) (Ali, 2021).

اكدت الدراسات السابقة ان عدائية (antagonism) البكتيريا المسببة للأمراض مع العصيات اللبنية يكون محددًا بسلالة العزلة وكذلك مسبب المرض (البكتيريا المستهدفة)، كما ان طريقة اختبار التضادية للبكتيريا لها دور أيضا في فعالية تقييم النشاط المثبط(Cadirci and Citak, 2005).

حيث لوحظ في دراسة سابقة ان لعزلات *L. plantarum* المعزولة من الفواكه والخضروات المتخمرة تمتلك الية تضادية قوية ضد مسببات الأمراض البكتيرية المنقولة بالغذاء (Manzoor *et al*., 2016).

كما اكد أخرون فعالية عدد كبير من عزلات العصيات اللبنية، بما في ذلك *L. acidophilus* و *L. plantarum* و*L. rhamnosus* ، التي تم عزلها من الأطعمة المخمرة التقليدية المحضرة بمزيج من الحبوب ومواد الألبان، نشاط مضاد عاليا ضد *E. coli* بمعدل قطر تثبيط وصل الى 22-30 ملم وبينما كان قطر التثبيط لبكتيريا *S. aureus* بين 15- 27 ملم وكان الاقل تاثيرا هي بكتيريا *L.rhamnosus* وبقطر تثبيط 18-31 ملم ضد *E. coli* و(15-27) ضد *S. aureus*

(Mashak, 2016) بينما لم تظهر سلالات العصيات اللبنية، بما في ذلك *L. rhamnosus* و*L.plantarum*، التي تم الحصول عليها من منتجات الألبان الغذائية (الزبادي والجبن المتوفرة تجاريًا) نشاطًا مثبطًا للنمو ضد ال*E.coli* (Jose *et al*., 2015) فقد أظهرت الدراسات الدور الفعال للبكتريا الفعالة حيويا في علاج التهاب القولون التقرحي حيث ساهمت في الحفاظ على استعادة التئام التهاب القولون التقرحي لفترة تزيد عن عام واحد (Saad *et al*., 2013) .

في دراسة سابقة ان بكتيريا حامض اللبنيك من نوع *L. rhamnosus* لديها القدرة على محاربة البكتيريا المسببة للأمراض والفطريات في الجهاز البولي التناسلي ، ومنع تكرار التهابات المسالك البولية لدى النساء. (Westerik *et al*., 2018)

اصبحت دراسة اختبار تثبيط نمو مسببات الأمراض من البكتريا المرضية امراً ضروريا خصوصاً في التجارب السريرية منذ ظهور الاهتمام بالبكتريا الفعالة حيويا كخيارا بديلة لمعالجة حالات العدوى للبكتريا المرضية .

وصفت الدراسات السابقة ان استخدم البكتريا الفعالة حياتيا سواء كانت ذات سلالة واحدة mono strain probiotics او متعددة السلالات multi strain probiotics ومن بينها *L.rhamnosus*قدرتها على تثبيط نمو البكتريا المرضية مثل *E.coli* (Fijan *et al*., 2018 ; Shokryazdan *et al*., 2014).

كما اشارت دراسات سابقة الى دور بكتيريا حامض اللبنيك كخيارات بديلة للقضاءعلى حالات العدوى ببكتيريا *K. pneumoniae* ، النتائج اثبتت دورها في تثبيط نموبكتيريا *K. pneumoniae* (Mogna *et al*., 2016)(Piatek *et al*., 2019)وهذا ماعارض دراستنا فلم تظهر بكتيريا حامض اللبنيك أي فعالية تضادية ضد البكتيريا المرضية لوحدها او لراشحها او بصورة تازريه .

دعمًا لهذه النتائج، أظهرت الدراسة التي أجراها مونوز وزملاؤه (Munoz *et al*,.2019l)أن جميع أنواع بكتيريا حامض اللبنيك وسلالاتها المعزولة في هذه الدراسة والتي شملت *Lactobacillus plantarum,casei* , *Lactobacillus brevis* أي نشاط مضاد للبكتيريا المرضية والتي شملت *Listeria innocua* قبل اضافة مكملات FOS.

عزا الباحثون أسباب عدم وجود نشاط مضاد للميكروبات لجميع سلالات LAB إلى مصدر عزل LAB بسبب عزلها من الالبان والذرة ناحية أخرى، يمكن أن يكون مصدر الكربون المستخدم لتعزيز LAB هو السبب وراء التأثير المثبط للبكتيريا التي تشجع نمو البكتيريا التي تم اختبارها، وقد أدى استقلاب LAB إلى إنتاج حامض الخليك وحامض اللبنيك يؤدي إلى تثبيط مسببات الأمراض.

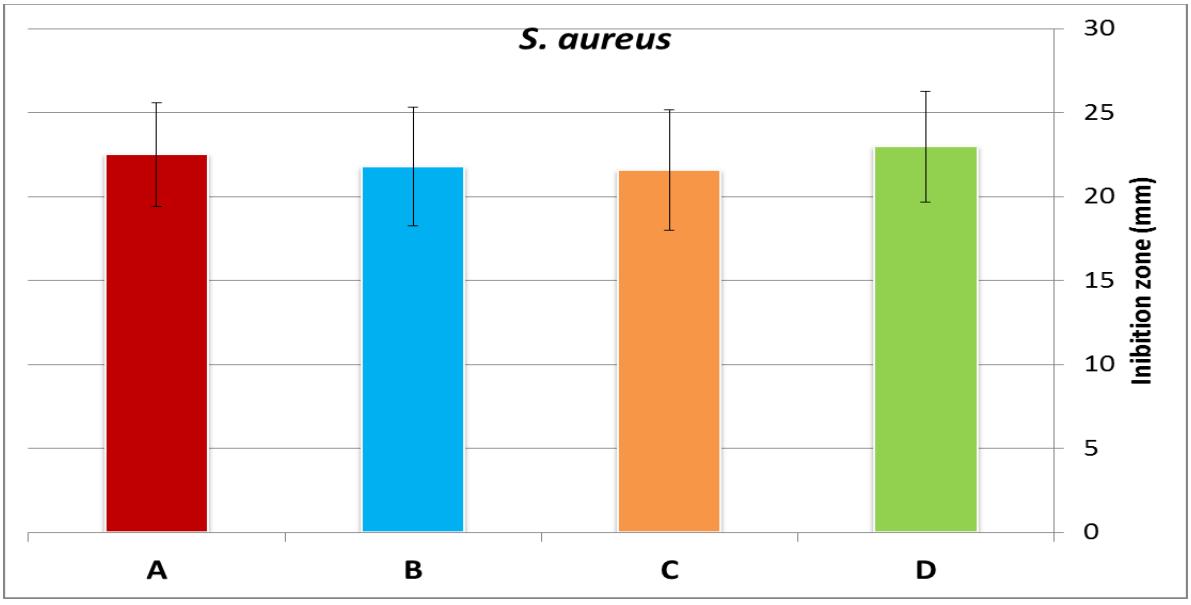
اجرى تانغ وزملاؤه دراسة لاحظوا فيها أن التأثير المثبط لجميع أنواع بكتيريا حامض اللبنيك تم تحسينه من خلال مكملات قليل السكاريدoligosaccharid والإينولين inulin وFOS ضد *K.pneumoniae* في الدراسة الحالية، تم تكرار التجربة باستخدام LAB مع مكملات FOS، وذلك لتحسين تأثيرها المثبط اذ يمكن للFOS أن يزيد من نمو LAB، مما يؤدي إلى انخفاض كبير في البكتيريا المسببة للأمراض(Tang *et al* .,2022).

3-3-3 دراسة الفعالية البايولوجية لانواع بكتيريا حامض اللبنيك مع FOSضد الاجناس البكتيرية المدروسة :

Study Microbial activity of synbiotic containing *Lactbacillus spp*. With FOS against bacterial genes tested:

تم اعاده التجربة باستخدام بكتريا حامض اللبنيك مع إضافة FOS وذلك من اجل تحسين فعاليتها ، و هو نوع من الألياف القابلة للذوبان .ويمكن أن يؤدي إضافة FOS إلى زيادة نمو بكتريا حامض اللبنيك ، مما يؤدي بدوره إلى زيادة قدرتها على تثبيط البكتيريا المرضية (You *et al*., 2022).

حيث أظهر مزيج البكتريا حامض اللبنيك مع FOS قابلية تثبيط جيدة حيث تم اختبارها مع انواع مختلفة من بكتريا حامض اللبنيك .



الشكل(3-22) يوضح قطر منطقة التثبيط بتاثير أنواع مختلفة من بكتريا حامض اللبنيك مع FOS ضد *S. aureus* المعزولة من حالات مرضية مختلفة. تشير الحروف الى انواع بكتريا حامض اللبنيك المستخدمة في الدراسة(A= *L. acidophilus* (+FOS B= *rhamnosus*+FOS, C= *L. hellveticus*+FOS, D=*L.plantarium* +FOS لاعمدة التي تحمل الحروف المتشابهة لا تظهر اي فروق معنوية في تاثير بكتيريا حامض اللبنيك مع FOS ضد (*P*=0.9341) .*S. aureus*

تم تثبيط اربعة مسببات للأمراض البكتيرية من قبل انواع مختلفة من بكتريا حامض اللبنيك الفعالة حيويا مع FOS بصورة متفاوتة ، حيث تفاوتت القدرة التثبيطية التآزرية لمزيج بكتيريا حامض اللبنيك مع FOSعلى تثبيط نمو *S. aureus* ، و كما موضح في الشكل (3-22) هنا لم يلاحظ وجود فرق

معنوي في قطر تثبيط *S. aureus* من قبل الانواع المختلفة لبكتيريا حامض اللبنيك المدروسة مع FOSفقد تفاوتت *S. aureus* في قدرتها على مقاومة مزيج يضم انواع من بكتيريا حامض اللبنيك مع FOS ، حيث اثبتت النتائج ان اقل منطقة تثبيط كانت بمقدار 21.5 ملم لمزيج *L. hellveticus*+FOS واكبر قطرتثبيط 22.95ملم للمزيج *L.plantarium*+FOS ومن هذه النتائج نلاحظ ان*L.plantarium* مع FOS اكثر قدرة على التثبيط بينما بكتيريا *L. hellveticus* هي الاقل ، حيث اثبتت دراسة Munozوأخرون 2012 ان FOSهو مصدر دائم للسكر وبالتالي فأن بكتيريا حامض اللبنيك يكون الايض لها مستمر مما يؤدي لأنتاج حوامض عضوية مثل حامض اللبنيك وحامض الخل (Muñoz *et al*., 2012).

جاءت هذه النتائج جاءت معارضة مع دراسة أخرى أجريت لتقييم تأثير مزيج من بكتريا حامض اللبنيك من نوع *L. helveticus* وسكريات FOS على نمو بكتيريا*S. aureus* , باستخدام تقنية الحيود الضوئي لقياس منطقة تثبيط النمو البكتيري. لاحظ الباحثون أن مزيج *L. helveticus*+FOS أظهر أكبر منطقة تثبيط من نمو بكتيريا*S.aureus* ، بينما أظهر مزيج FOS+*L.plantarum* أقل منطقة تثبيط ، قد اعزى الباحثون السبب الى امتلاك بكتيريا حامض اللبنيك من نوع *L. helveticus* خصائص فريدة تجعلها أكثر فعالية في تثبيط نمو البكتيريا الممرضة، مثل قدرتها على إنتاج أحماض اللبن والخل، وقدرتها على إنتاج مواد مضادة للبكتيريا، مثل الببتيدات المضادة للبكتيريا. كما أن مركبات FOSتساهم في تثبيط نمو البكتيريا الضارة عن طريق تعزيز نمو بكتيريا حامض اللبنيك . (Al-Jumaili and Al-Khafaji, 2023)

تمتاز *S.aureus* بقدرتها على تطوير مقاومتها للمضادات الحيوية وامتلاكها لعوامل الضراوه المختلفة التي تمكنها من غزو الأنسجة المضيفة وإتلافها ولكن،أظهرت قدرة بكتريا *L. hellveticus* على تثبيط البكتيريا المرضية قيد الدراسة اكثر من بقية الانواع الأخرى المستخدمة فأظهرت قدرتها على منع نمو ونشاط *S. aureus* بشكل فعال من خلال آليات مختلفة .

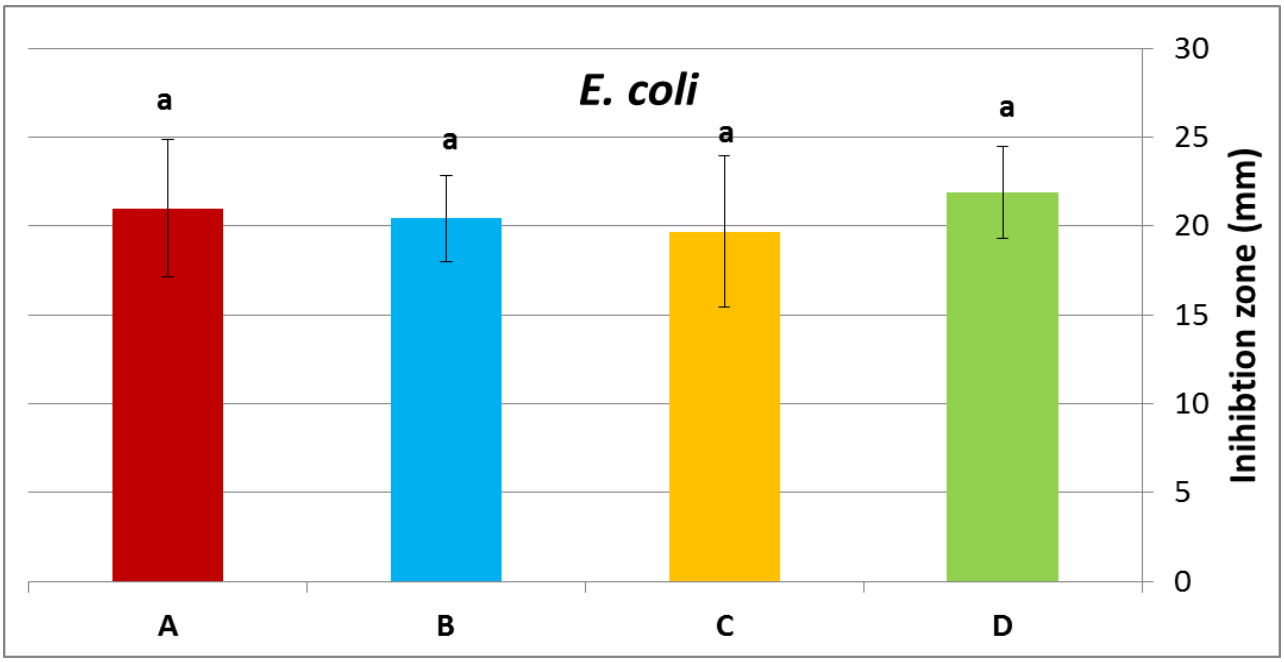
تمتلك بكتريا حامض اللبنيك اليات دفاع متنوعة تشمل التنافس على المصادر الغذائية وانتاجها لحامض اللاكتيك حيث يخلق بيئة حامضية تمنع نمو *S. aureus*.

حيث يظهر تحسننا ملحوظا للنشاط المضاد للبكتريا الفعالة حيويا ضد البكتريا المرضية موجبة لصبغةغرام إلى حد أكبر مقارنة بسالبة غرام ، مما يدل على اختلاف المستقبلات للمضادات الحياتية (Stefania *et al*., 2017)

كما تم دراسة نوع أخر من البكتيريا المرضية وهي *E.coli* التي تعد سببًا رئيسيًا للعديد من الامراض (Ochoa and Contreras, 2011) وكذلك مقاومتها للمضادات الحيوية واسعه الطيف (Poirel *et al*., 2018)،مؤخرا تم اعتبار البكتريا المحفزة حيويا احد العلاجات الفعالة لتثبيط *E.coli* (Fijan *et al*., 2018).

لقد كان لمزيج FOS و *L. plantarum* تأثيرًا تآزريًا، مما يزيد من فعاليتها ضد *E.coli* ولكنها لم تظهر فروقات معنوية حيث كانت قيمة الاحتمالية (*P*=0.721)، كما موضح في الشكل (3-22).

على الرغم من وجود فعالية بايولوجية قوية لمزيج انواع بكتيريا حامض اللبنيك مع FOSضد بكتيريا *Ecoli* الا انه لم يلاحظ وجود فروقات معنوية(*P*=0.721)وعلى كل حال فان مزيج *L. plantarum* أظهر فعل تازريا عاليا ضد بكتيريا القولون كما موضح في الشكل (3-23).

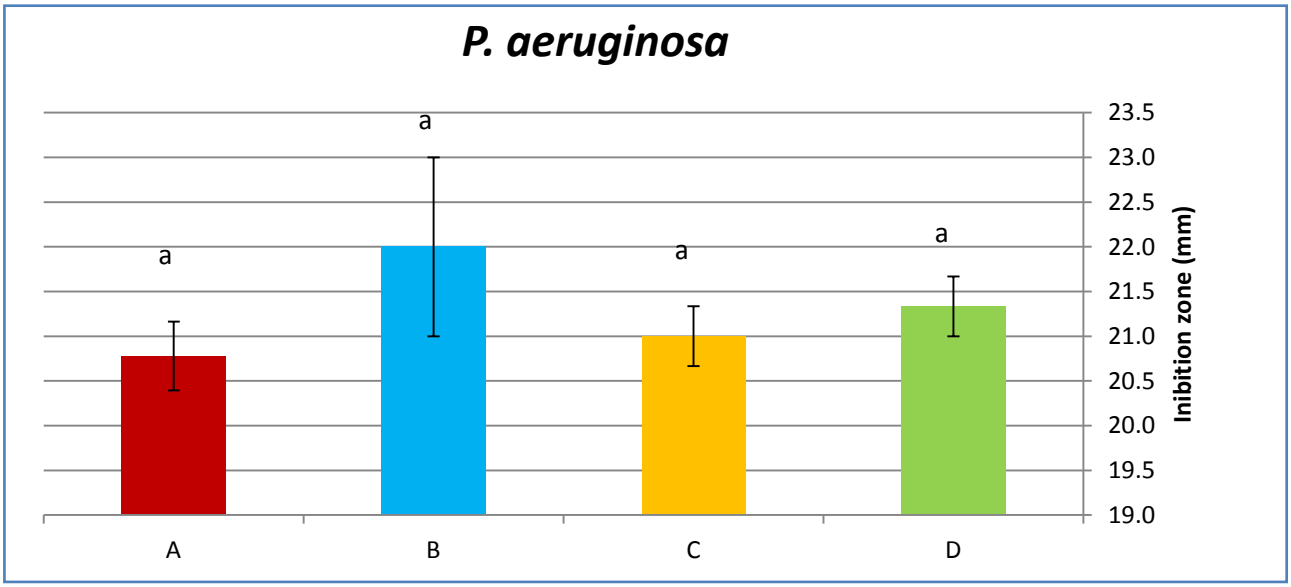


الشكل (3-23) قطر منطقة التثبيط لأنواع مختلفة من بكتريا حامض اللبن مع FOS ضد *E.coli* المعزولة من حالات مرضية مختلفة. تشير الحروف الى اجناس بكتريا اللبن المستخدمة في الدراسة (A= *L. acidophilus* +FOS B= *rhamnosus*+FOS, C= *L. hellveticus*+FOS, D=*L.plantarium* +FOS) الاعمدة التي تحمل الحروف المختلفة لا تظهر اي فروق معنوية في تاثير بكتريا حامض اللبن مع FOS ضد بكتريا الايشريشيا القولونية (*P*=0.721)

كانت النتائج تقريبا مشابهة للنتائج التي حصلنا عليها مع *S.aureus* اذ أنه لم يلاحظ وجود فروقات معنوية واضحة (*p*=0.721) وسجلت اقل منطقة تثبيط للمزيج 19.6 ملم للمزيج *L.hellveticus*+FOS واكبر قطر تثبيط هو 21.8 ملم لمزيج*L.plantarium*+FOS يمكن أن يكون مزيج FOS مع و *L. plantarum* ثنائيًا قويًا ضد مسببات الامراض خاصة *E.coli*ان لهذا

النوع من البكتريا النافعة القدرة على استهلاك العناصر الغذائية بكفاءة عالية مما يترك فرصة قليلة لنموالبكتيريا المرضية،كما تعمل *L. plantarum* على تقوية بطانة الانسجة من خلال إنتاج الأحماض الدهنية قصيرة السلسلةShort-Chain Fatty Acids (SCFAs) مما يزيد من صعوبة غزوها، توافقت هذه النتيجة مع دراسة تم اجراءها من قبل Dingو جماعته على الدواجن حيث اكد فيها ان مزيج FOS+*L. plantarum* ادى إلى تحسين تاثيرها على *E.coli* بتثبيط نمو البكتريا المرضية عن طريق زيادة مستويات SCFAs وتخفيف الأضرار الناجمة عنها ، وبالتالي منع تلف الانسجة وتعزيز الاستجابة المناعية (Ding *et al*., 2019).

من الشكل (3-24) يتبين وجود قدرة تثبيط عالية لانواع بكتيريا حامض اللبنيك المدروسة مع FOSضد بكتيريا *P. aeruginosa*على الرغم من عدم وجود فروقات معنوية واضحة (p=0.131)حيث سجلت اقل منطقة تثبيط هي 20.8 ملم لمزيج FOS+ *L. acidophilus* واعلى منطقة تثبيط 22.0 ملم لمزيجFOS+*L.rhamnosus* .



الشكل (3-24) يوضح قطر منطقة التثبيط لأنواع مختلفة من بكتريا حامض اللبنيك مع FOS ضد *P. aeruginosa* المعزولة من حالات مرضية مختلفة تشير الحروف الى اجناس بكتريا اللبن المستخدمة في الدراسة (A= *L. acidophilus* +FOS B= *rhamnosus*+FOS, C= *L. hellveticus*+FOS, D=*L.plantarium* +FOS) الاعمدة التي تحمل الحروف المختلفة لا تظهر اي فروق معنوية في تاثير البكتريا حامض اللبنيك مع FOS ضد بكتريا *P. aeruginosa* (*P*=0. 135)

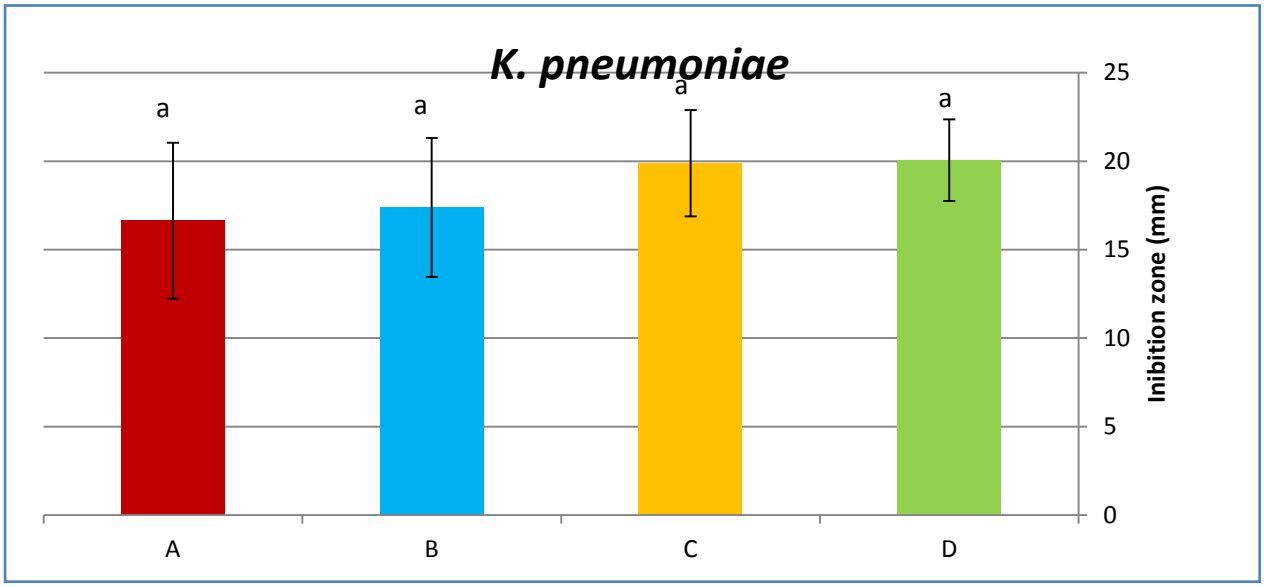
قد يكون السبب في فاعلية بكتيريا حامض اللبنيك من نوع *L. rhamnosus* ضد *P. aeruginosa* الى إنتاج حامض اللاكتيك الذي يخلق بيئة حامضية تعيق نمو وايض *P. aeruginosa*، والتي تفضل

البيئة المحايدة إلى القلوية قليلاً هذه النتيجة جاءت مشابه الى الدراسات السابقة التي اشارت الى فاعلية البكتريا حامض اللبنيك من نوع *L. rhamnosus* ضد البكتريا المرضية وبالتحديد *P. aeruginosa* ،حيث اكدت الدراسة التي تم اجرائها من قبل هوانغ وجماعته قدرة *L.rhamnosus* في تعزيز المناعة وزيادة اليات الدفاع، كما اكدت الدراسة قدرة بكتيريا حامض اللبنيك على تقليل الانتشار البكتيري وفرط النمو (Huang *et al*.,2020)

كما تمت ملاحظة أن العامل المضاد للميكروبات الذي تنتجه *L. plantarum*. يثبط نمو مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة إيجابية غرام وسالبة غرام. (Liasi *et al*,. 2009).

لوحظ في دراسة سابقة ان *L.rhamnosus* مع FOS يستعمل كمزيج جيد وفعال في الالبان المخمرة والتي استعملت في تلك الدراسة كصفة تضادية لمنع مسببات الاسهال من النمو (Anand *et al*., 2019)

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان *K. pneumoniae* اقل تأثرا بمزيج بكتيريا حامض اللبنيك من نوع *L.rhamnosus*مع FOS بمعدل تثبيط 16.6 ملم واعلى منطقة تثبيط 20.05ملم لمزيج البكتريا النافعة من نوع *L.plantarum* مع FOS وعلى الرغم من ذلك لم يلاحظ فروق معنوية بين انواع بكتيريا حامض اللبنيك مع FOS ضد بكتيريا *K. pneumoniae* (*P*=0.161)كما وضح في الشكل(3-26)

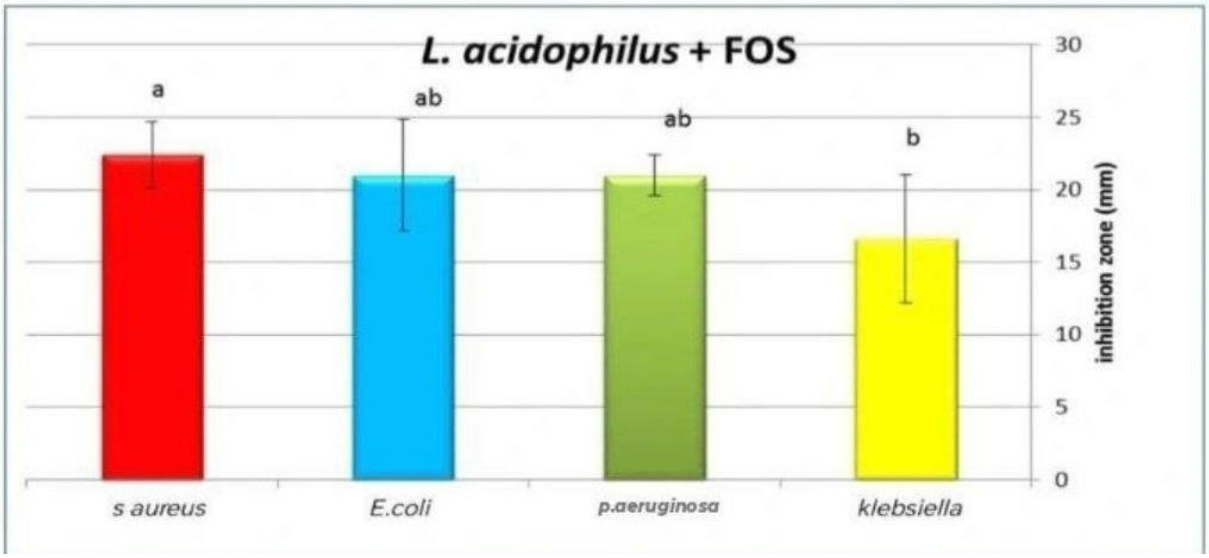


الشكل (3-26) قطر منطقة التثبيط لأنواع مختلفة من بكتريا حامض اللبنيك مع FOS ضد *K. pneumoniae* المعزولة من حالات مرضية مختلفة تشير الحروف الى اجناس بكتريا اللبن المستخدمة في الدراسة (A= *L. acidophilus* +FOS B= *rhamnosus*+FOS, C= *L. hellveticus*+FOS, D=*L.plantarium* +FOS) الاعمدة التي تحمل الحروف المختلفة لا تظهر اي فروق معنوية في تاثير البكتريا المحفزة حيويا مع *FOS* ضد بكتريا *K. pneumoniae* (*P*=0.161).

تعد بكتريا *K. pneumoniae* المسؤولة عن زيادة مثيرة للقلق في حالات العدوى في المستشفيات، وخاصة في وحدات العناية المركزة، لقد فقدت الكثير من المضادات الحيوية فعاليتها ضد *K.pneumoniae* وظهرت سلالات من هذه البكتريا الرئوية التي تقاوم معظم المضادات الحيوية المتاحة حاليا (Xu *et al*., 2017) . ونتيجة لذلك، ظهر الاهتمام بالبكتريا الفعالة حيويا كخيارات بديلة لإدارة حالات العدوى ببكتريا *K. pneumoniae* (Piatek *et al*., 2019).

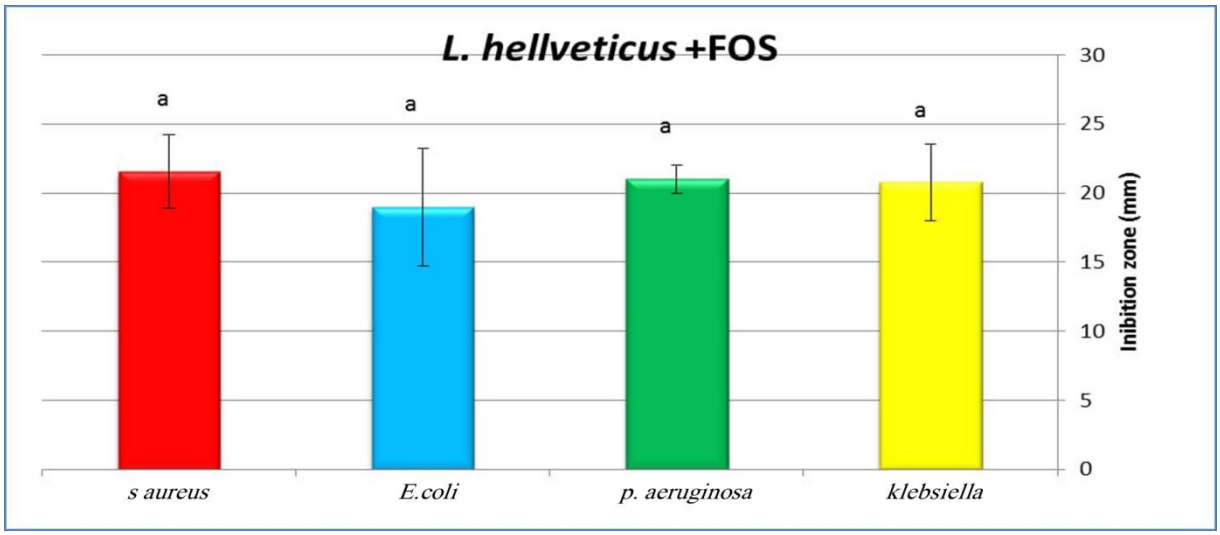
بينت نتائج اختبار فعالية مزيج بكتيريا حامض اللبنيك من نوع *L.acidophilus* مع FOSضد الاجناس البكتيرية الممرضة المدروسة بان جميعها قد تاثر نموها كثيرا بفعل هذا المزيج حيث كانت S. aureus اكثر تاثرا متمثلا بقطر منطقة التثبيط (22mm)حيث ظهر فرق معنوي واضح بالمقارنة مع بكتيريا *K. pneumoniae* التي كان نموها اقل تاثرا على الرغم منوجود منطقة تثبيط وبقطر (14mm) .

اما بكتيريا *E.coli* و *P. aeruginosa* على الرغم من وجود منطقة تثبيط كبيرة بسبب تاثير هذا المزيج على نموها الا انه لاتوجد فرق معنوي واضح بينهما مع بكتيريا *S. aureus* كما موضح بالشكل (3-27)



الشكل (3-27) معدل قطر منطقة تثبيط البكتريا المرضية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة بتأ تثير مزيج بكتريا حامض اللبنيك من نوع *L.acidophilus* مع FOS الاعمدة التي تحمل الحروف المختلفة تظهر فروق معنوية بتاثير بكتريا حامض اللبنيك من نوع *L.acidophilus* مع FOS ضد بكتريا المرضية (*P*=0.031)

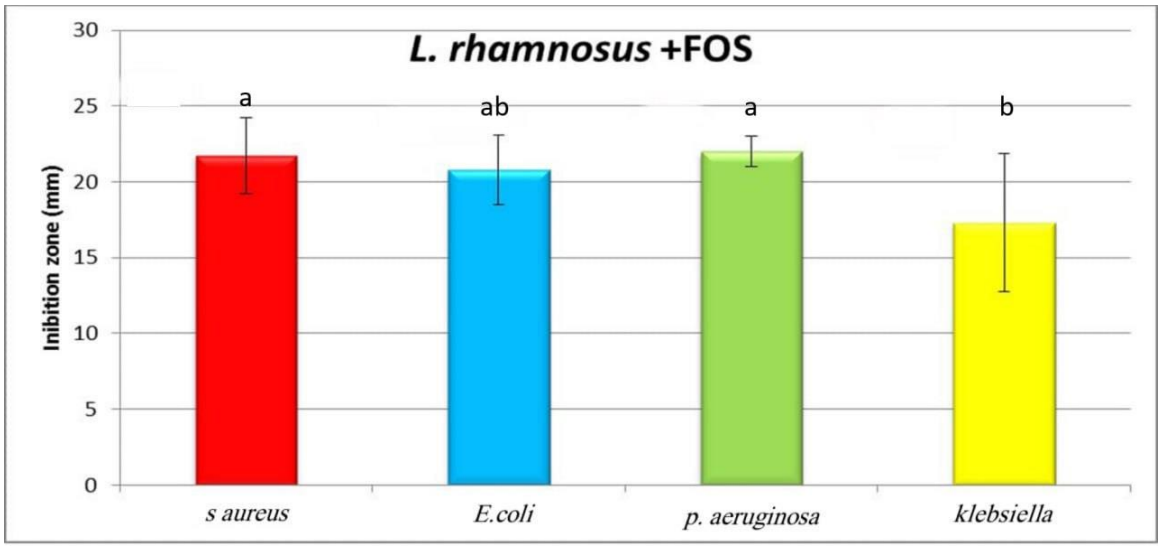
في الشكل اعلاه نتائج مزيج *L.acidophilus*+ FOS مع انواع البكتريا المعزولة من مصادر مختلفة حيث كان لها التأثير الاكبر في زياده التثبيط لبكتريا *S. aureus* ، *P. aeruginosa*، *E.coli* بمعدل قطر التثبيط وصل الى 22.4 ملم و 21 ملم وجاءت هذه النتيجة مشابهة لدراسة اجريت في البصرة،حيث اوضحت الدراسات السابقة ان بكتيريا حامض اللبنيك يمكنهما تغيير استجابات التعبير المورثي للخلية المضيفة لمسببات الأمراض (Ibrahem *et al*., 2022) حيث تم تأكيد ان *L. Acidophilus*يقلل من السيتوكينات لتخفيف مرض التهاب الأمعاء ، وتخفيف السرطان ، وتعديل المناعة،وخفض الكوليسترول وتخفيف الإسهال(Huang *et al*., 2021).



الشكل (3-28)معدل قطر منطقة تثبيط البكتريا المرضية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة بتأثير مزيج بكتريا حامض اللبنيك من نوع *L. hellveticus* مع FOS الاعمدة التي تحمل الحروف المتشابهة لا تظهر فروق معنوية بتأثير بكتريا حامض اللبنيك من نوع *L. hellveticus* مع FOS ضد بكتريا المرضية (*P*=0.557).

لوحظ سلوك مشابه لمزيج *L. hellveticus* + FOS مع*S. aureus*، كما في الشكل

(3-28) حيث ان منطقة التثبيط اعلى من مناطق تثبيط لاجناس البكتيريا الأخرى على الرغم من ان جميع البكتيريا المرضية قد تأثرت بمزيج *L. hellveticus* مع FOS الا انه لايوجد فرق معنوي بين اقطار منطقة التثبيط لكل جنس من البكتيريا المرضية بفعل مزيج بكتيريا حامض اللبنيك مع FOS وكانت اقل البكتيريا تاثرا بالمزيج هي *E.coli* قدرة التثبيط لبكتيريا حامض اللبنيك مع FOSضد البكتيريا المصابة (*P*>0.05) , وكانت هذه النتيجة مشابهة لدراسة سابقة لكن بتجربة بكتيريا *L.pantarum* مع FOS حيث كان قطر التثبيط *P. aeruginosa* اعلى من *E.coli* فكان معدل قطر التثبيط لها 10.8 ملم بينما *E.coli* 9.9 ملم (Grendpina *et al*.,2019).



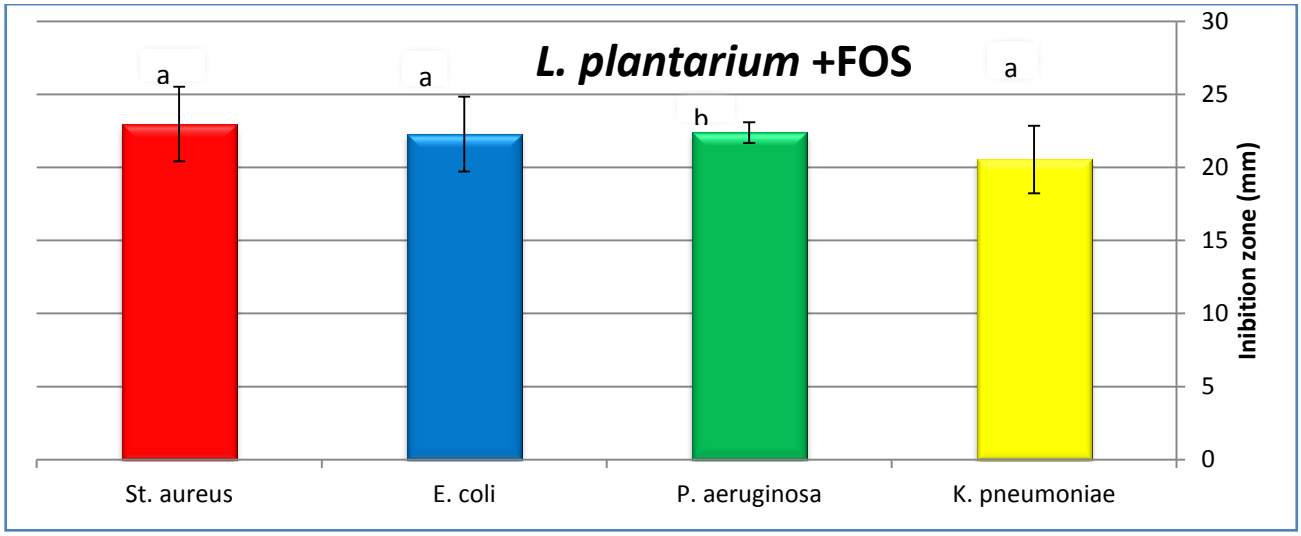
الشكل (3-29) معدل قطر منطقة تثبيط البكتريا المرضية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة بتأثير مزيج بكتريا حامض اللبنيك من نوع *L.rhamnosus* مع FOS الاعمدة التي تحمل الحروف المختلفة تعطي فروق معنوية بتأثير بكتريا حامض اللبنيك من نوع *L.rhamnosus* مع FOS ضد بكتريا المرضية (*P*=0.004)

بينت نتائج مزيج بكتيريا حامض اللبنيك من نوع *L. rhamnosus* مع FOSضد الاجناس البكتيرية الممرضة المدروسة كان جميعها قد تاثر نموها كثيرا بفعل هذا المزيج حيث كانت الاكثر تاثرا بكتيريا *P. aeruginosa* بكبر منطقة التثبيط 22ملم حيث ظهرت فرق معنوي واضح بالمقارنة مع بكتيريا *K.pneumoniae* التي كان نموها اقل تاثرا على الرغم من وجود منطقة تثبيط بقطر 17 ملم في حين بكتيريا *E.coli* و*S. aureus* على الرغم من وجود منقطة تثبيط كبيرة الا انه لايوجود فرق معنوي واضح بينها مع بكتيريا *P. aeruginosa* كما في الشكل (3-29) حيث تبين ان مزيج بكتيريا *L. rhamnosus* مع FOS كان له فروق معنوية بين *K. pneumoniae* وبين بقية الانواع البكتيرية الأخرى.

لقد أظهرت النتائج ان بكتيريا *L . rhamnosus* مع FOS ضد البكتيريا المرضية تشابة كبير مع تاثير *L. acidophilus* مع FOSحيث أظهر بان كل البكتيريا تأثرت بالمزيج من ناحية تثبيط نموها،وبكتيريا *K.pneumoniae* كانت الاقل تاثرا وبشكل معنوي من بقية الاجناس المرضية الأخرى .

فقد أظهرت النتائج تاثير مشابه بالقدرة التثبيطة لتأثير المزيج السابق المتكون من *L. rhamnosus* +FOS . لكن تم التأكيد من خلال النتائج المختبرية وجود تأثير غير معنوي ضد فعالية كل من

الانواع البكتيرية *K.pneumoniae* ، *E.coli, S. aureus* ،*P. aeruginosa* (*P*=0.004)، حيث تأثرت كل البكتريا المرضية قيد الدراسة باستعمال المزيج ولكن بشكل غير معنوي .



الشكل (3-30) معدل قطر منطقة تثبيط البكتريا المرضية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة بتأ تثير مزيج بكتريا حامض اللبنيك من المتكون من *L.plantarum* مع FOS الاعمدة التي تحمل الحروف المتشابهة لا تظهر فروق معنوية بتاثير بكتريا حامض اللبنيك من نوع *L.plantarum* مع FOS ضد البكتريا المرضية (*P*=0.145).

أظهر الشكل (3-30) بانه لاتوجد فروق معنوية لمزيج FOS ضد اجناس البكتيريا المرضية الثلاثة على الرغم من كون بكتيريا *K.pneumoniae* الاقل تاثرا من بين بقية الانواع من البكتيريا المرضية.

تم تأكيد أن FOS يقلل من النمو وتكوين الأغشية الحيوية للبكتيريا المرضية (Rubio-Gómez *et al*., 2020) ويمكن أن يحفز FOS بشكل انتقائي بكتيريا حامض اللبنيك أو *Bifidobacterium spp*. ،مختبريا تم تاكيد دور FOS لمنع نمو *P.aeruginosa* في الوسط الزرعي وتقليل التصاق *Clostridium difficile* وبعض مسببات الأمراض اللاهوائية بالخلايا المضيفة، كما أظهر *L. plantarum* و FOS تأثيرا مثبطا أكثر وضوحا من *L. plantarum* وحده أو FOS وحده(Dong *et al*., 2022) اذ يؤدي إضافة FOS إلى زيادة نمو بكتريا حامض اللبنيك ، وبذلك تزداد قدرتها على تثبيط البكتيريا المرضية (You *et al*., 2022)حيث يعتبر FOSهو مصدر دائم للسكر وبالتالي فأن الايض لبكتيريا حامض اللبنيك سيكون مستمرا و تنتج حوامض عضوية مثل حامض اللبنيك وحامض الخل (Muñoz *et al*., 2012) وقد اقتراح اليات مختلفة لدور البكتريا المحفزة حيويا ضد البكتريا المرضية، أولها قدرة الالتصاق القوية للبكتريا الفعالة حيويا حيث وجد أنها تلتصق بالخلايا الظهارية المعوية وتستعمرها، (do Carmo *et al*., 2018) كما اقترح الباحثين

ظاهرة أخرى وهي التخثر اي التصاق بكتيريا حامض اللبن بالبكتيريا المسببة للأمراض وبالتالي قتلها أو منع استعمارها في الجسم الحي. كما تم اثبات وجود علاقة إيجابية بين التجميع الذاتي للبكتيريا وقدرتها على الالتصاق وأن مزيج البكتريا المحفزة حيويا مع FOS لديه قدرة التصاق أعلى (van Zyl *et al*., 2020).

كما اكدت دراسات على انواع أخرى من بكتيريا حامض اللبن تضمنت *Lactobacillus crispatus* , *Lactobacillus jensenii* و *Lactobacillus vaginalis* حيث ذكرت ان عادة ما ينتج التأثير المثبط ضد البكتيريا المسببة للأمراض عن انخفاض الاس الهيدروجيني نتيجة لإنتاج الحمض، وإفراز بيروكسيد الهيدروجين، وإطلاق المضادات الحيوية الطبيعية (البكتريوسين) التي يتم تحفيزها بشكل انتقائي بواسطة Probiotics المختلفة (Rousseau *et al*., 2005).

وهناك ايضا ظاهره التجميع التلقائي وهي ظاهرة التكاثر الهائل والسريع للبكتيريا، مما يؤدي إلى تجميعها تلقائيًا في مجموعات ويساعد بكتيريا حامض اللبن على تكوين الأغشية الحيوية (Soundharrajan *et al*., 2019).

إن استخدام المغذيات البكتريا مع بكتيريا حامض اللبنيك له تأثيرات تآزرية إذا تم خلطهما، حيث أظهرت الدراسات نتائج افضل على معدل النمو لسلالات البكتيريا المحفزة حيويا بوجود هذه السكريات، وهناك دراسات اثبتت أن الإسهال المرتبط بالمضادات الحيوية يمكن الوقاية منه عن طريق التطبيق المشترك لاحد أنواع بكتريا حامض اللبن تحديدا *Lactobacillus sporogenes* مع FOS (Ibrahem *et al*., 2022).

اشارت الدراسات الحديثة إلى أن السكريات تعمل كركيزة لتكاثر بكتريا حامض اللبنيك LAB و Bifidobacteria وتمنع نمو خلايا سرطان القولون والبكتيريا المتعفنة أو المسببة للأمراض الموجودة في القولون من خلال إنتاج الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة (Lim *et al*., 2011).

اقتراح أن synbiotics هي إحدى آليات زيادة قدرة بكتريا حامض اللبنيك على العمل بشكل صحيح (Markowiak and Śliżewska, 2017) اذ تم تأكيد الفوائد الصحية التي توفرها

Synbioticsوارتباطها في زيادة النمو للبكتريا الفعالة حيويا وإنتاج الأحماض والقدرة المضادة للبكتيريا المرضية (Geng *et al*., 2023)

الفصل الرابع

الاستنتاجات و التوصيات

الاستنتاجات

1.تم الكشف عن بعض انواع البكتيريا المرضية *S.aureus* و *E.coli* و*P. aeruginosa* و *K. pneumoniae* مقاومة للمضادات الحيوية التي تحمل جينات عديدة تشفر لصفة المقاومة لطيف واسع من المضادات الحيوية .

2.عدم قدرة بكتيريا حامض اللبنيك على تثبيط البكتيريا المرضية المدروسة لوحدها او تآزريا بين اي نوعيين.

3.وجود قدرة تثبيطية كبيرة لبكتيريا حامض اللبنيك بكافة انواعها بعد مزجها مع سكريات FOS والتي حسنت نمو العصيات اللبنية .

التوصيات

1.إستخدام انواع المزيج التازري بين بكتيريا حامض اللبنيك مع FOS داخل الجسم الحي وملاحظة النقل البايولوجي لها.

2.عزل بكتيريا حامض اللبنيك من مصادر أخرى غير الالبان مثل المخللات او التربة ودراسة امكانية فعاليتها البايولوجية ضد مسببات الامراض .

3.دراسة الفعالية البايولوجية لمزيج بكتيريا حامض اللبنيك حامض مع FOS ضد انواع بكتيريا مسببه للامراض غير الانواع التي استخدمت في هذه الدراسة لملاحظة مدى تأثرها بالبكتيريا حامض اللبنيك .

المصادر

References

المصادر :

Aas, J. A., Dardis, S. R., Griffen, A. L., Stokes, L. N., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E., Leys, E. J., & Paster, B. J. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. https://journals.asm.org/journal/jcm.

Abbas, A., Srivastava, P., & Nirwan, P. S. (2015). Prevalence of MLSB resistance and observation of erm A & erm C genes at A tertiary care hospital. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 9(6), DC08.

Abid Y, Casillo A, Gharsallah H, Joulak I, Lanzetta R, Corsaro MM, Attia H, Azabou S. (2018). Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. Int J Biol Macromol. 2018 Mar; 108:719-728.

Adzitey, F. (2015). Antibiotic Classes and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates from Selected Poultry; A Mini Review. World s Veterinary Journal. 6. 36. 10.5455/wvj.20150853.

Aggarwal S, Jena S, Panda S, Sharma S, Dhawan B, Nath G, Singh NP, Nayak KC, Singh DV.(2019). Antibiotic Susceptibility, Virulence Pattern, and Typing of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated From Variety of Infections in India. Front Microbiol. 2019 Dec 4;10:2763. doi: 10.3389/fmicb.2019.02763. PMID: 31866962; PMCID: PMC6904308.

Ait-Mimoune, N., Hassaine, H., & Boulanoir, M. (2022). Bacteriological profile of urinary tract infections and antibiotic susceptibility of Escherichia coli in Algeria. Iranian journal of microbiology, 14(2), 156.

Akbari E, Asemi Z, Daneshvar Kakhaki R, Bahmani F, Kouchaki E, Tamtaji OR, Hamidi GA, Salami M.(2016). Effect of Probiotic Supplementation on Cognitive Function and Metabolic Status in Alzheimer's Disease: A Randomized, Double-Blind and Controlled Trial. Front Aging Neurosci. 2016 Nov 10;8:256. doi:

10.3389/fnagi.2016.00256. PMID: 27891089; PMCID: PMC5105117.

Al-Dulaimi, D. A. A. (2023). Extraction and purification of nisin produced by lactobacillus lactis isolated from various sources and study of its inhibitory action against some bacterial species and its effect on the biological preservation of beef (Master's thesis). Tikrit University, College of Education for Women, Department of Biology.

Al-Ezee, A. S. M. (2019). Occurrence of bla SHV, bla CTX-M, bla BLA TEM, and integrons genes in Escherichia coli isolated from urinary tract infection (Master's thesis). Diyala University, College of Education for Pure Sciences, Department of Biology.

Al–Ezee, A. S. M., Al–Taai, H. R. R., & Sultan, A. A. (2019). Occurrence oh blaSHV, blaCTX-M, blaBLA TEM and Integrons genes in coli Escherichia isolates from urinary tract infection. athesis. College of Education for pure science/Diyala University.

Ali Z. H. (2021). Synergetic effects of Bacillus subtilis as probiotics and Chitosan Nanoparticles against some Pathogenic Bacteria isolated from Burned Wound Infections. Thesis; 2021

Ali, S. Q., & Kamil, Y. M. (2022). Identifying the Resistant Bacterial Pattern in Patients with Diabetic Foot Ulcer. Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology, 1(4), 151–158. https://doi.org/10.55544/jrasb.1.4.20

Ali, Z. H. (2021). *Synergetic effects of Bacillus subtilis as probiotics and Chitosan Nanoparticles against some Pathogenic Bacteria isolated from Burned Wound Infections* . Master's thesis, University of Kufa, Faculty of Science

Alikhani MY, Hashemi SH, Aslani MM, Farajnia S. Prevalence and antibiotic resistance patterns of diarrheagenic E. coli isolated from adolescents and adults in Hamedan, Western Iran. Iranian journal of microbiology 2013; 5(1): 42-7.

Al-Jumaili, A., & Al-Khafaji, S. (2023). Effect of Lactobacillus helveticus

and fructooligosaccharides on the growth of Staphylococcus aureus. Journal of Dairy Science, 106(5), 6476-6484.

Al-Mayyahi, A. W. (2018). Detection of (exoT, exoY, exo S and exoU) Genes In Pseudomonas aeruginosa Isolate From Different Clinical Sources (Doctoral dissertation, M. Sc. Thesis Submitted to the Council of the Institute of Genetic Engineering and Biotechnology For Post Graduate Studies, University of Baghdad. 60-6

Al-Naqshbandi AA, Chawsheen MA, Abdulqader HH.(2019). Prevalence and antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from urine specimens received in rizgary hospital - Erbil. J Infect Public Health. 2019 May-Jun;12(3):330-336. doi: 10.1016/j.jiph.2018.11.005. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30522892.

Al-Tuhmazi, H., A., (2023) . Determine the Activity of Antibiotics Resistance against Bacterial Causative Agents of Diarrhea among Children Under the Age of 5 Years . Department of Biology, College of Sciences, Kerbala University, Kerbala, Iraq

Anand, S., Mandal, S., & Tomar, S. K. (2019). Effect of Lactobacillus rhamnosus NCDC 298 with FOS in Combination on Viability and Toxin Production of Enterotoxigenic Escherichia coli. Probiotics and antimicrobial proteins, 11, 23-29.

and Mentis , A. : (2004) . In Vitro and In Vivo inhibition of Helicobacter pylori by

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(2): 559-562.

Appl Microbiol. 88:695–703. 10.1046/j.1365-2672.2000.01013.x [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

Aryana KJ and Olson DW.(2017). A 100-Year Review: Yogurt and other

cultured dairy products. J Dairy Sci. 2017 Dec; 29153184., 100(12):9987-10013. doi: 10.3168/jds.2017-12981. PMID:

Awosile B, Reyes-Velez J, Cuesta-Astroz Y, Rodríguez-Lecompte JC, Saab ME, Heider LC, Keefe G, Sánchez J, McClure JT. |(2019). Short communication: Whole-genome sequence analysis of 4 fecal bla_{CMY-2}-producing Escherichia coli isolates from Holstein dairy calves. J Dairy Sci. 2020 Jan;103(1):877-883. doi: 10.3168/jds.2019-16560. Epub 2019 Nov 14. PMID: 31733866. bacteriology. Volume 2, Eds Wilkins.pp: 1208-1228.

Bagon, B. B., Valeriano, V. D. V., Oh, J. K., Pajarillo, E. A. B., Cho, C. S., and Kang, D. K. (2018). Comparative exoproteome analyses of *Lactobacillus spp*. reveals species-and strain-specific proteins involved in their extracellular interaction and probiotic potential. *L.W.T*. 93, 420–426. doi: 10.1016/j.lwt.2018.03.069

Bajaj BK, Claes IJ, Lebeer S. (2021) Functional mechanisms of probiotics. J Microbiol Biotechnol Food Sci. 2021:321–7. [Google Scholar] [Ref list]

Banerjee R and Patel R.(2023). Molecular diagnostics for genotypic detection of antibiotic resistance: current landscape and future directions. JAC Antimicrob Resist. 2023 Feb 17 and 5(1):dlad018

Baunoch D, Luke N, Wang D, Vollstedt A, Zhao X, Ko DSC, Huang S, Cacdac P, Sirls LT. (2021).Concordance Between Antibiotic Resistance Genes and Susceptibility in Symptomatic Urinary Tract Infections. Infect Drug Resist. 2021 Aug 19;14:3275-3286. doi: 10.2147/IDR.S323095. PMID: 34447256; PMCID: PMC8382965.

Beheshti S and Zia M.(2011) Bacteriology of burns and antibiogram in an

Iranian burn care center. Afr J Pharm Pharmacol. Apr 1; 5(4):538-416.

Bezirtzoglou, E., Tsiotsias, A., & Welling, G. W. (2011). Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence in situ hybridization (FISH). Anaerobe, 17(6), 478-482. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224411000847

Blaser R. A, Poeze M, Malbrain ML, Björck M, Oudemans-van Straaten HM, Starkopf J; (2013). Gastro-Intestinal Failure Trial Group. Gastrointestinal symptoms during the first week of intensive care are associated with poor outcome: a prospective multicentre study. Intensive Care Med. 2013 May;39(5):899-909. doi: 10.1007/s00134-013-2831-1. Epub 2013 Jan 31. PMID: 23370829; PMCID: PMC3625421.

Breidenstein, E.B., de la Fuente-Nunez, C., Hancock, R.E., (2011). Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. Trends Microbiol 19, 419–426.

Brennan-Krohn, T., Grote, A., Rodriguez, S., Kirby, J. E., & Earl, A. M. (2022). Transcriptomics reveals how minocycline-colistin synergy overcomes antibiotic resistance in multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 66(3), e01969-21

Brisse S, Grimont F, Grimont PAD. (2006).The Genus Klebsiella. New York, NY, USA: Springer Science+Business Media, LLC; 159–96, 2006. p.

Brooks G. F., Butel J. S. & Morse S. A. (2004). Jawetz, Melnick and Adelberg‟s Medical Microbiology, 23rd Edition. McGraw Hill Companies, Singapore.

Brusselaers N, Monstrey S, Snoeij T, Vandijck D, Lizy C, Hoste E, Lauwaert S, Colpaert K, Vandekerckhove L, Vogelaers D, Blot S.(2010). Morbidity and mortality of bloodstream infections in patients with severe

burn injury. Am J Crit Care. 2010 Nov;19(6):e81-7. doi: 10.4037/ajcc2010341. PMID: 21041189.

Cadirci, B.H. and Citak, S. A. (2005). comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. Pak. J. Nutr. 2005, 4, 237–241.

Calderon C. B. & Sabundayo B. P. (2007). Antimicrobial classifications: Drugs for bugs. In: Schwalbe R, Steele-Moore L & Goodwin AC (eds). Antimicrobial susceptibility testing protocols. CRC Press,

Cebra, J.J.(1999). Influences of microbiota on intestinal immune sysbla Tem development. *Am. J. Clin. Nutr.* , *69*, 1046s–1051s. [Google Scholar] [CrossRef]

Celebioglu, H. U., Olesen, S. V., Prehn, K., Lahtinen, S. J., Brix, S., Abou Hachem, M., & Svensson, B. (2017). Mucin-and carbohydrate-stimulated adhesion and subproteome changes of the probiotic bacterium Lactobacillus acidophilus NCFM. *Journal of proteomics*, *163*, 102-110.

Chabi, R., & Momtaz, H. (2019). Virulence factors and antibiotic resistance properties of the Staphylococcus epidermidis strains isolated from hospital infections in Ahvaz, Iran. *Tropical medicine and health*, *47(1)*, *1-9*

Chambers, H. and DeLeo, F. (2009).Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol 7, 629–641

Charlier, C., Even, S., Gautier, M., & le Loir, Y. (2008). Acidification is not involved in the early inhibition of Staphylococcus aureus growth by Lactococcus lactis in milk. International Dairy Journal, 18(2), 197-203. [invalid URL removed]

Charoenwongpaiboon, T., Sitthiyotha, T., Na Ayutthaya, P. P., Wangpaiboon, K., Chunsrivirot, S., Hengsakul Prousoontorn, M., & Pichyangkura, R. (2019). Modulation of fructooligosaccharide chain length and insight into the product binding motif of Lactobacillus reuteri 121 inulosucrase. Carbohydrate Polymers, 209, 111–121. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.078

Chatterjee M, Anju C, Biswas L, Kumar VA, Mohan CG, Biswas R.(2016). Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa and alternative therapeutic options. Int J Med Microbiol. 2016; 306(1):48–58

Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. (2014). Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: molecular and genetic decoding. Trends Microbiol. 2014 Dec;22(12):686-96. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.003. Epub 2014 Oct 7. PMID: 25304194; PMCID: PMC4365952.

Cheng P, Yang Y, Li F, Li X, Liu H, Fazilani SA, Guo W, Xu G, Zhang X. (2020). The prevalence and mechanism of fluoroquinolone resistance in Escherichia coli isolated from swine farms in China. BMC Vet Res. 2020 Jul 28;16(1):258. doi: 10.1186/s12917-020-02483-4. PMID: 32723358; PMCID: PMC7388466.

Chi, H. and Holo, H. (2018). Synergistic Antimicrobial Activity Between the Broad Spectrum Bacteriocin Garvicin KS and Nisin, Farnesol and Polymyxin B Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Curr. Microbiol.* 75, 272. doi: 10.1007/s00284-017-1375-y

Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R.(2006). Burn wound infections. Clin Microbiol Rev. 2006 Apr;19(2):403-34. doi: 10.1128/CMR.19.2.403-434.2006. PMID: 16614255; PMCID:

PMC1471990.

Clegg, S., & Murphy, C. N. (2016). Epidemiology and Virulence of Klebsiella pneumoniae . Microbiology Spectrum, 4(1).

Cleven BE, Palka-Santini M, Gielen J, Meembor S, Krönke M, Krut O.(2006). Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. J Clin Microbiol. 2006 Jul;44(7):2389-97. doi: 10.1128/JCM.02291-05. PMID: 16825354; PMCID: PMC1489523.

Coll PP, Crabtree BF, O'Connor PJ, Klenzak S.(1994). Clinical risk factors for methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteriuria in a skilled-care nursing home. Arch Fam Med 1994; 3:357–60

Collee, J.G., Miles, R.S., & Watt, B. (1996). Tests for identification of bacteria. Mackie *and McCartney practical medical microbiology, 14,131-49*

Costello, C., Galland, C., Sanghavi, D., & Clish, C. B. (2012). The microbiome in human health and disease. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7306068/

Coudray, C., Tressol, J. C., Gueux, E., & Rayssiguier, Y. (2003). Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. European Journal of Nutrition, 42, 91–98. https://doi.org/10.1007/s00394-003-0390-x

Crossley, K.B. and Archer, G.L. (1997). The Staphylococci in human disease. Churchill Livingstone.

CWBI-B28 against Listeria monocytogenes and ST2-Verotoxin producing

Escherichia coli

Dargahi, N.; Johnson, J.; Donkor, O.; Vasiljevic, T.; Apostolopoulos, V. (2019). Immunomodulatory effects of probiotics: Can they be used to treat allergies and autoimmune diseases? *Maturitas* , *119*, 25–38. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

Denyer S. P., Hodges N. A. & German S. P. (2004). Introduction to pharmaceutical microbiology. In: Denyer SP, Hodges NA & German SP (eds.) Hugo and Russell‟s Pharmaceutical Microbiology. 7th Ed. Blackwell Science, UK. Pp. 3-8.

Ding S, Wang Y, Yan W, Li A, Jiang H, Fang J. (2019). Effects of Lactobacillus plantarum 15-1 and fructooligosaccharides on the response of broilers to pathogenic Escherichia coli O78 challenge. PLoS One. 2019 Jun 13; 14(6):e0212079.

Dittoe, M., Chaunchai, W., & Bla Temelli, B. (2018). Role of lactic acid bacteria in enhancing food safety. Journal of Food Science and Agriculture and Environment, 6(2), 53-60.

do Carmo FLR, Rabah H, Huang S, Gaucher F, Deplanche M, Dutertre S, Jardin J, Le Loir Y, Azevedo V, Jan G. (2017). *Propionibacterium freudenreichii* Surface Protein SlpB Is Involved in Adhesion to Intestinal HT-29 Cells. Front Microbiol. 2017 Jun 8;8:1033. doi: 10.3389/fmicb.2017.01033. PMID: 28642747; PMCID: PMC5462946.

do Carmo, F. L., Rabah, H., De Oliveira Carvalho, R. D., Gaucher, F., Cordeiro, B. F., da Silva, S. H., ... & Jan, G. (2018). Extractable bacterial surface proteins in probiotic–host interaction. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 645.

Doi Y, Wachino JI, Arakawa Y. (2016). Aminoglycoside resistance: The emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. Infect Dis

Clin North Am. 2016 and 30(2):523–37. DOI: 10.5897/AJMR12.1517 ISSN 1996-0808 ©2013 Academic Journals

Donati L, Di Vico A, Nucci M, Quagliozzi L, Spagnuolo T, Labianca A, Bracaglia M, Ianniello F, Caruso A, Paradisi G. (2010) . Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. Arch. Gynecol. Obstet. 281:589–600. 10.1007/s00404-009-1318-3 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

Dong Q, Lu X, Gao B, Liu Y, Aslam MZ, Wang X, Li Z.(2022). *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* and Fructooligosaccharides Combination Inhibits the Growth, Adhesion, Invasion, and Virulence of *Listeria monocytogenes*. *Foods*.; 11(2):170. https://doi.org/10.3390/foods11020170

Drenkard E. (2003). Antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa biofilms, Microbes and Infection, Volume 5, Issue 13, , Pages 1213-1219, ISSN 1286-4579

Duman, M., Woo, S. J., Altun, S., & Satıcıoğlu, I. B. (2023). Tentative Epidemiological Cut-Off Values and Distribution of Resistance Genes in Aquatic Pseudomonas Species Isolated from Rainbow Trout. *Current Microbiology*, *80*(5), 157.

Eduardo, L., Chuayana, J. R., Carmina, V. P., Rosanna, M. A., Rivera, B., & Cabrera, E. C. (2003). Antimicrobial activity of probiotics from milk products. Philippine Journal of Microbiology and Infectious Diseases, 32(1), 71-74

Elli M, Zink R, Rytz A, Reniero R, Morelli L. (2000) Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media.

Emody L, Kerenyi M, Nagy G. (2003). Virulence factors of uropathogenic

Escherichia coli. Int J Antimicrob Agents. 2003; 2):29–33., 22(Suppl

Engelhardt, H.. (2007). Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. *J. Struct. Biol*. 160, 115–124. doi: 10.1016/j.jsb.2007.08.003

Esther, N., & Fatima, T. (2020). Evaluation of phytochemicals and activity index of some plant leaf extracts on typhoidal and nontyphoidal Salmonella isolates from selected hospitals in Bauchi, Nigeria. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 10(2), 120- 129.

Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int J Appl Microbiol Biotechnol* Res, 4(2016), 90-101

Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int J Appl Microbiol Biotechnol Res,* 4(2016), 90-101.

Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res, 4(2016), 90-101.

Fair R. J., and Tor Y. (2014) Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspectives in medicinal chemistry 6, 25–64 pmid:25232278

Farajnia S, Alikhani MY, Ghotaslou R, Naghili B, Nakhlband A. (2009). Causative agents and antimicrobial susceptibilities of urinary tract infections in the northwest of Iran. Int J Infect Dis. 2009 Mar;13(2):140-4. doi: 10.1016/j.ijid.2008.04.014. Epub 2008 Aug 13. PMID: 18703368.

Fidan, H., Esatbeyoglu, T., Simat, V., Trif, M., Tabanelli, G., Kostka, T., ... Özogul, F. (2022). Recent developments of lactic acid bacteria and their metabolites on foodborne pathogens and spoilage bacteria: Facts and gaps.

Food Bioscience, 47, 101741. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101741

Fijan S., Sulc D., Steyer A.(2018). Study of the In Vitro Antagonistic Activity of Various Mono-Strain and Multi-Strain Probiotics against Escherichia coli. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2018 and 15:1539.

Fioramonti J., Theodorou V., Bueno L. (2003) Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2003;17:711–724. [PubMed] [Google Scholar]

Fischetti, V. A. (2006). Surface proteins on Gram-positive bacteria. Gram-positive pathogens, 12-25.

Flores-Mireles AL, Walker JN, Bauman TM, Potretzke AM, Schreiber HL 4th, Park AM, Pinkner JS, Caparon MG, Hultgren SJ, Desai A.(2016). Fibrinogen Release and Deposition on Urinary Catheters Placed during Urological Procedures. J Urol. 2016 Aug;196(2):416-421. doi: 10.1016/j.juro.2016.01.100. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26827873; PMCID: PMC4965327.

Forbes,B.A.; Sahm,D.F.and Weissfeld , A.S.(2007). Baily and scotts Dignostic Microbiology. llth edition . Mosby , Inc . Baltimore, USA.,302-309

Foxman B & Brown P (2003). Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. Infect Dis Clin North Am 17, 227–241

Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, García JA, Paz-Ares J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. Nat Genet. 2007 Aug;39(8):1033-7. doi: 10.1038/ng2079. Epub 2007 Jul 22. PMID: 17643101.

Franiczek R, Sobieszczańska B, Turniak M, Kasprzykowska U,

Krzyzanowska B, Jermakow K, Mokracka-Latajka G.(2012). ESBL-producing Escherichia coli isolated from children with acute diarrhea - antimicrobial susceptibility, adherence patterns and phylogenetic background. Adv Clin Exp Med. 2012 Mar-Apr;21(2):187-92. PMID: 23214282.

Frank U. & Tacconelli E. (2012). The Daschner Guide to In-Hopsital Antibiotic Therapy. European standards. Available online at: http://www.springer.com/978-3-642-18401-7.

Froböse, N. J., Bjedov, S., Schuler, F., Kahl, B. C., Kampmeier, S., & Schaumburg, F. (2020). Gram staining: a comparison of two automated sysbla Tems and manual staining. Journal of clinical microbiology, 58(12), e01914-20.

Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A.(2015). Probiotics History. J Clin Gastroenterol. 2016, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on Sepbla Tember 13-15, 2015:S116-S119

Geng, S. , Zhang, T., Gao, J. , Li, X. , Chitrakar, B. , Mao, K. & Sang, Y. (2023). In vitro screening of synbiotics composed of Lactobacillus paracasei VL8 and various prebiotics and mechanism to inhibits the growth of Salmonella Typhimurium. LWT. 180. 114666. 10.1016/j.lwt.2023.114666.

Ghalfi. H,Thonart , P. and Benkerroum, N.:(2006).Inhibitory activity of Lactobacillus curvatus

Ghenea, A. E., Zlatian, O. M., Cristea, O. M., Ungureanu, A., Mititelu, R. R., Balasoiu, A. T., ... & Balasoiu, M. (2022). BLA TEM, CTX-M, SHV genes in ESBL-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from clinical samples in a county clinical emergency hospital Romania-predominance of CTX-M-15. *Antibiotics*, *11*(4), 503.

Gill, H.S.; Rutherfurd, K.J.; Prasad, J.; Gopal, P.K.(2000). Enhancement of natural and acquired immunity by Lactobacillus rhamnosus (HN001), Lactobacillus acidophilus (HN017) and Bifidobacterium lactis (HN019). *Br. J. Nutr*. 2000, *83*, 167–176. [Google Scholar] [CrossRef] [Green Version]

Gismondo M.R., Drago L., Lombardi A. (1999) Review of Probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 1999;12:287–292. [PubMed] [Google Scholar] [Ref list]

Goyal, C., Malik, R. K., Pradhan, D. (2018). Purification and Characterization of a Broad Spectrum Bacteriocin Produced by a Selected *Lactococcus Lactis* Strain 63 Isolated From Indian Dairy Products. *J. Food Sci. Technol*. 55, 3683–3692. doi: 10.1007/s13197-018-3298-4

Green, M.R. and Sambrook, J., 2012. Molecular cloning. A

Grendpina, N., Fitri, D. , Julendra, H. , Sofyan, A. & Damayanti, Ema. (2019). Enhancing Anti-pathogenic Bacteria Activity of Lactobacillus Plantarum AKK-30 Cultured on the Medium Containing Fructose-Oligosaccharides. 205-209. 10.5220/0009991802050209.

Güllüce, M., Karadayi, M., & Barış, Ö. (2013). Bacteriocins: Promising antimicrobials. Microbial pathogens and strategies for combating them. In A. Mendes-Vilas (Ed.), Science, Technology, and Education (pp. 1016–1027). FORMATEX, Madrid, Spain.

Guo, M., Chen, G., Chen, K. (2016). Fructooligosaccharides: Effects, Mechanisms, and Applications. In: Yin, H., Du, Y. (eds) Research Progress in Oligosaccharins. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3518-5_5

Gupta, K., Grigoryan, L., & Trautner, B. (2017). Urinary tract infection. Annals of internal medicine, 167(7), ITC49-ITC64.

Gupta, U.; Rudramma; Rati, E.R. and Joseph, R.: (1998) .Nutrition quality of lactic

Hamam, S. S., El Kholy, R. M., & Zaki, M. E. (2019). Study of various

Hashim, I., & Pharma, S. (2013). Microbiological culture media in pharmaceutical industry. Foster city, USA: OMICS Group eBooks

Hawes SE, Hillier SL, Benedetti J, Stevens CE, Koutsky LA, Wolner-Hanssen P, Holmes KK. (1996). Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. J. Infect. Dis. 174:1058–1063. 10.1093/infdis/174.5.1058 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H. L., Pridmore, R. D., Gysler, C., Kleerebezem, M., & de Mattos, M. J. T. (2014). H2O2 production in species of the Lactobacillus acidophilus group: a central role for a novel NADH-dependent flavin reductase. *Applied and environmental microbiology*, *80*(7), 2229-2239.

Hickey RM.(2012). The role of oligosaccharides from human milk and other sources in prevention of pathogen adhesion. *Int Dairy J*. 2012;22(2):141–146.
doi: 10.1016/j.idairyj.2011.09.012. [CrossRef] [Google Scholar]

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus stabla Tement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2014 Aug;11(8):506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66. Epub 2014 Jun 10.

PMID: 24912386.

Ho HJ, Tan MX, Chen MI, Tan TY, Koo SH, Koong AYL, Ng LP, Hu PL, Tan KT, Moey PKS, Koh EYL, Wong CS, Lye DC, Tan NC.(2019) Interaction between Antibiotic Resistance, Resistance Genes, and Treatment Response for Urinary Tract Infections in Primary Care. J Clin Microbiol. 2019 Aug 26;57(9):e00143-19. doi: 10.1128/JCM.00143-19. PMID: 31243084; PMCID: PMC6711900.

Hojsak I, Fabiano V, Pop TL, Goulet O, Zuccotti GV, Çokuğraş FC, Pettoello-Mantovani M, Kolaček S. (2018). Guidance on the use of probiotics in clinical practice in children with selected clinical conditions and in specific vulnerable groups. Acta Paediatr. 2018 Jun;107(6):927-937. doi: 10.1111/apa.14270. Epub 2018 Apr 16. PMID: 29446865; PMCID: PMC5969308.

Hooton TM, Roberts PL & Stapleton AE (2012). Cefpodoxime vs ciprofloxacin for short-course treatment of acute uncomplicated cystitis: a randomized trial. JAMA 307, 583–589, doi: 10.1001/jama.2012.80

Hooton, T. M. (2000). Pathogenesis of urinary tract infections: an update. Journal of antimicrobial chemotherapy, 46(suppl_1), 1-7.

Hooton, T. M., Scholes, D., Hughes, J. P., Winter, C., Roberts, P. L., Stapleton, A. E., ... & Stamm, W. E. (1996). A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. New England journal of medicine, 335(7), 468-47

Hoseinifar, S. H., Ahmadi, A., Raeisi, M., Hoseini, S. M., Khalili, M., & Behnampour, N. (2017). Comparative study on immunomodulatory and growth enhancing effects of three prebiotics (galactooligosaccharide, fructooligosaccharide and inulin) in common carp (Cyprinus carpio).

Aquaculture Research, 48, 3298–3307. https://doi. org/10.1111/are.1315

Hoseinifar, S. H., Soleimani, N., & Ringø, E. (2014). Effects of dietary fructo-oligosaccharide supplementation on the growth performance, haemato-immunological parameters, gut microbiota and stress resistance of common carp (Cyprinus carpio) fry. British Journal of Nutrition, 112, 1296–1302. https://doi.org/10.1017/ S0007114514002037.

Huang FC, Lu YT, Liao YH.(2020) Beneficial effect of probiotics on Pseudomonas aeruginosa-infected intestinal epithelial cells through inflammatory IL-8 and antimicrobial peptide human beta-defensin-2 modulation. Innate Immun. 2020 Oct; 26(7):592-600.

Hung, K. K., Lam, R. P., Lo, R. S., Tenney, J. W., Yang, M. L., Tai, M. C., & Graham, C. A. (2018). Cross-sectional study on emergency department management of sepsis. Hong Kong Medical Journal. 24(6), 571-578.

Hwang, W.and Yoon, S.S. (2019). Virulence Characteristics and an Action Mode of Antibiotic Resistance in Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa. Sci. Rep. 2019, 9, 1–15

Ibrahem AA, Al-Shawi SG, Al-Bla Temimi WKA.(2022). The antagonistic activity of the synbiotic containing Lactobacillus acidophilus and pineapple residue FOS against pathogenic bacteria. Braz J Biol. 2022 Mar 7;84:e258277. doi: 10.1590/1519-6984.258277. PMID: 35239793.

Jacob, M. E., Keelara, S., Aidara-Kane, A., Matheu Alvarez, J. R., & Fedorka-Cray, P. J. (2020). Optimizing a screening protocol for potential extended-spectrum β-lactamase Escherichia coli on MacConkey agar for use in a global surveillance program. *Journal of Clinical Microbiology, 58(9), e01039-19*

Jacoby, G. A., Chow, N., Waites, K. B. 2003. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance.

Jalal, S.; Ciofu, O.; Høiby, N.; Gotoh, N.; Wretlind, B.(2000). Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients. Antimicrob. Agents Chemother., 44, 710–712.

Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2006). The Genera Klebsiella and Raoultella. The Enterobacteria (2nd ed., pp. 115-129). Washington, USA: ASM Press.

Javanshir N, Hosseini GNG, Sadeghi M, Esmaeili R, Satarikia F, Ahmadian G, Allahyari N. (2021). Evaluation of the Function of Probiotics, Emphasizing the Role of their Binding to the Intestinal Epithelium in the Stability and their Effects on the Immune Sysbla Tem. Biol Proced Online. 2021 Dec 1;23(1):23. doi: 10.1186/s12575-021-00160-w. PMID: 34847891; PMCID: PMC8903605.

Jawad, A. & Aljamali, N. & Jawd, S. (2020). Development and Preparation of Ciprofloxacin Drug Derivatives for Treatment of Microbial Contamination in Hospitals and Environment. Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology. 14. 1115-1121.

Jena, J., Sahoo, R. K., Debata, N. K., & Subudhi, E. (2017). Prevalence of BLA TEM, SHV, and CTX-M genes of extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections in adults. 3 Biotech, 7, 1-7.

Jensen TS, Opstrup KV, Christiansen G, Rasmussen PV, Thomsen ME, Justesen DL, Schønheyder HC, Lausen M, Birkelund S.(2020). Complement mediated Klebsiella pneumoniae capsule changes. Microbes Infect. Jan-Feb;22(1):19-30. doi: 10.1016/j.micinf.2019.08.003. Epub 2019

Aug 29. PMID: 31473336.

Jose, N.M.; Bunt, C.R.; Hussain, M.A.(2015). Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. Microorganisms 2015, 3, 198–212.

Journal, 13(1)

Juda, M., Chudzik-Rzad, B., & Malm, A. (2016). The prevalence of genotypes that determine resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B compared with spiramycin susceptibility among erythromycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *111*(3), 155-160.

Kandler, O. and Weiss, N.: (1986): Regular, nonsporing Gram-positive PHA Sneath, NS Mair,

Kaper, J., Nataro, J. & Mobley, H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123–140 (2004). https://doi.org/10.1038/nrmicro818

Kapoor G, Saigal S, Elongavan A.(2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. J Anaesthesiol Clin Pharmacol. 2017 Jul-Sep; 33(3):300-305.

Katz, D. S. (2010). Coagulase test protocol. *American Society for Microbiology Laboratory Protocols. Available online: https://www. asmscience. org/content/education/protocol/protocol, 3220.*

Kaur, D. C., and Chate, S. S. (2015). Study of antibiotic resistance pattern in methicillin resistant Staphylococcus aureus with special reference to newer antibiotic. J. Glob. Infect. Dis. 7, 78–84.

Kernodle, D. S. (2006). Mechanisms of resistance to β-lactam antibiotics. *Gram-Positive Pathogens*, 769-781.

Khan, T., Ullah, H., Nasar, A., & Ullah, M. (2023). Antibiotic Resistance and sensitivity pattern of Pseudomonas aeruginosa obtained from clinical samples. *Lett Appl NanoBioScience*, *12*(4), 112.

Khaneghah, A. M., Abhari, K., Es, I., Soares, M. B., Oliveira, R. B., Hosseini, H., ... Sant'Ana, A. S. (2020). Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. *TRENDS IN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY*, 95 pp. 205-218. doi:10.1016/j.tifs.2019.11.022

Kibwana UO, Manyahi J, Sandnes HH, Blomberg B, Mshana SE, Langeland N, Roberts AP, Moyo SJ.(2023) Fluoroquinolone resistance among fecal extended spectrum βeta lactamases positive Enterobacterales isolates from children in Dar es Salaam, Tanzania. BMC Infect Dis. 2023 Mar 7;23(1):135. doi: 10.1186/s12879-023-08086-2. PMID: 36882712; PMCID: PMC9993647.

Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C., and Huebner, J. (2004). *Enterococcal* infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine*. 22, 822–830. doi: 10.1016/j.vaccine.2003.11.027

Koga Y, Tokunaga S, Nagano J, Sato F, Konishi K, Tochio T, Murakami Y, Masumoto N, Tezuka JI, Sudo N, Kubo C, Shibata R. (2016). Age-associated effect of kestose on Faecalibacterium prausnitzii and symptoms in the atopic dermatitis infants. Pediatr Res. 2016 Dec;80(6):844-851. doi: 10.1038/pr.2016.167. Epub 2016 Aug 16. PMID: 27537603; PMCID: PMC5156669.

Kwon, H. S., Yang, E. H., Yeon, S. W., Kang, B. H., & Kim, T. Y. (2004). Rapid identification of probiotic Lactobacillus species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS microbiology letters*, *239*(2), 267-275.

Kylä-Nikkilä, K., Hujanen, M., Leisola, M., & Palva, A. (2000). Metabolic engineering of Lactobacillus helveticus CNRZ32 for production of Purel-(+)-lactic acid. Applied and environmental microbiology, 66(9), 3835-3841.

Kylä-Nikkilä, K., Sarvas, M., & Mättö, M. (2000). Selective production of L(+)- and D(-)-lactic acid by recombinant Lactobacillus strains. Applied Microbiology and Biotechnology, 54(2), 155-161

Laboratory Manual 4th

Lactobacillus casei strain shirota . Appl . Environ . Microbiol ., 70(1) :518 – 526.

Lactobacillus casei strain shirota . Appl . Environ . Microbiol ., 70(1) :518 – 526.

Lambert PA.(2005). Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. Adv Drug Deliv Rev. 2005 Jul 29;57(10):1471-85. doi: 10.1016/j.addr.2005.04.003. PMID: 15964098.

Lamond, R.J. (2004).Bacterial Invasion of host cells .J. Advances in molecular and cellular microbiology Vol. 5. Cambridge university press. UK.

Langendonk, R.F.; Neill, D.R.; Fothergill, J.L.(2021). The Building Blocks of Antimicrobial Resistance in Pseudomonas aeruginosa: Implications for Current Resistance-Breaking Therapies. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2021, 11, 665759.

Le Bourgot, C., Ferret-Bernard, S., Apper, E., Taminiau, B., Cahu, A., Le Normand, L., ... Blat, S. (2019). Perinatal short-chain fructooligosaccharides program intestinal microbiota and improve enteroinsular axis function and inflammatory status in high-fat diet-fed adult pigs. FASEB Journal, 33, 301–313. https://doi.org/10.1096/fj.

201800108R.

Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 72(4), 728-764. https://doi.org/10.1128/MMBR.00018-08

Lee BK, Crossley K, Gerding DN.(1978). The association between Staphylococcus aureus bacteremia and bacteriuria. Am J Med 1978; 65:303–6.

Lewis, J.S. and Jorgensen, J.H.(2005). Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococci: Should Clinicians and Microbiologists be Concerned? Clin. Infect. Dis. 2005, 40, 280–285

Lewus, C. B.; Kaiser, A. and Montville, T. J. (1991): Inhibition of food borne bacterial pathogenus by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol., 57: 1683- 1688.

Li CF, Tang HL, Chiou CS, Tung KC, Lu MC, Lai YC.(2018). Draft genome sequence of CTX-M-type beta-lactamase-producing Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae isolated from a Box turtle. J Glob Antimicrob Resist. 2018 and 12:235–6.

Liasi SA, Azmi T, Hassan MD, Shuhaimi M, Rosfarizan M, Ariff AB. (2009). Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu. Malays J Microbiol 2009, 5:33–37.

Lim, S. M., Jeong, K. S., Lee, N. G., Park, S. M., & Ahn, D. H. (2011). Synergy effects by combination with lactic acid bacteria and frutooligosaccharides on the cell growth and antimicrobial activity. Food Science and Biotechnology, 20, 1389-1397.

Macfaddin , J.F.: (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria 3 rd ed Lippin cott

MacWilliams, M. P. (2012). Indole test protocol. *American Society for Microbiology, Washington, DC.*

Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN.(1999). Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. Gastroenterology.; 116(5):1107–14.

Maggi L, Mastromarino P, Macchia S, Brigidi P, Pirovano F, Matteuzzi D, Conte U. (2000).Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration. Eur J Pharm Biopharm. 2000 Nov;50(3):389-95. doi: 10.1016/s0939-6411(00)00121-1. PMID: 11072196.

Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. (2014). Textbook of Diagnostic Microbiology. St. Louis: Saunders; resistance, 2014. Antimicrobial agent mechanisms of action and; 254–273., pp.

Mahon MS, C. R, Lehman, Donald C. (2019). Evolve Student Resources for Mahon: Textbook of Diagnostic Microbiology, Sixth Edition

Mandell GL, Bennett JE, Dolin. (2010). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. USA: Churchill Livingstone Elsevier; 2010

Manzoor, A.; Ul-Haq, I.; Baig, S.; Qazi, J.I.; Seratlic, S. (2016). Efficacy of locally isolated lactic acid bacteria against antibiotic-resistant uropathogens. Jundishapur J. Microbiol. 2016, 9, e18952.

Maragkoudakis, P. A., Zoumpiopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of Lactobacillus

strains isolated from dairy products. International Dairy Journal, 16(2), 189-199. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.04.001

Markowiak P and Śliżewska K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. Nutrients. 2017 Sep 15;9(9):1021. doi: 10.3390/nu9091021. PMID: 28914794; PMCID: PMC5622781.

Marsh, T. L., O'Neill, E. G., & Steele, M. A. (2009). Diversity and regulation of the microbiota in the human intestine: a new frontier in medicine? Oncogene, 28(36), 3431-3444. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1395357/

Martin RM and Bachman MA.(2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Jan 22;8:4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004. PMID: 29404282; PMCID: PMC5786545.

Martinez – Gonzalez , B. ; Eriotou , E.; Michopoules , S.; Kolantzopoulos , G. ; Tsakalidou , E.

Mashak, K.(2016). Antimicrobial activity of lactobacillus isolated from kashk-e zard and tarkhineh, two Iranian traditional fermented foods. Int. J. Enteric Pathog. 2016, 4, e34692

Maxton, A., Benjamin, J. C., Ram, G. D., Bailey, S. B., & Ramteke, P. W. (2013). Antibacterial activity of isolated human intestinal microbiota Lactobacillus strains against methicillin resistant and susceptible Staphylococcus aureus.

Mayer BT, Srinivasan S, Fiedler TL, Marrazzo JM, Fredricks DN, Schiffer JT.(2015). Rapid and Profound Shifts in the Vaginal Microbiota Following Antibiotic Treatment for Bacterial Vaginosis. J Infect Dis. 2015 Sep 1;212(5):793-802. doi: 10.1093/infdis/jiv079. Epub 2015 Feb 12.

PMID: 25676470; PMCID: PMC4539900.

Mazzariol A, Bazaj A, Cornaglia G.(2017). Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. J Chemother. 2017 Dec;29(sup1):2-9. doi: 10.1080/1120009X.2017.1380395. PMID: 29271736.

Mazziotta C, Tognon M, Martini F, Torreggiani E, Rotondo JC. (2023). Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. Cells. 2023 Jan 2;12(1):184. doi: 10.3390/cells12010184. PMID: 36611977; PMCID: PMC9818925.

McDevitt, S. (2009). Methyl red and voges-proskauer test protocols. *American Society for Microbiology, 8*

McFarland LV, Evans CT, Goldstein EJC.(2018). Strain-Specificity and Disease-Specificity of Probiotic Efficacy: A Sysbla Tematic Review and Meta-Analysis. Front Med (Lausanne). 2018 May 7; 5:124.

Mendonça AA, Pinto-Neto WdP, da Paixão GA, Santos DdS, De Morais MA Jr., De Souza RB.(2023). Journey of the Probiotic Bacteria: Survival of the Fittest. *Microorganisms*. 2023; 11(1):95. https://doi.org/10.3390/microorganisms11010095 microbiology. 1st Edition. Mosby- year book, Inc. (USA).

Miko, E., & Barakonyi, A. (2023). The role of hydrogen-peroxide (H2O2) produced by vaginal microbiota in female reproductive health. *Antioxidants*, *12*(5), 1055.

Mitov I, Strateva T, Markova B. (2010). Prevalence of virulence genes among Bul- garian nosocomial and cystic fibrosis isolates of Pseudomonas aeruginosa. Braz J Microbiol. 2010; 41(3):588–95

Mogna L, Deidda F, Nicola S, Amoruso A, Del Piano M, Mogna G. (2016

). In Vitro Inhibition of Klebsiella pneumoniae by Lactobacillus delbrueckii Subsp. delbrueckii LDD01 (DSM 22106): An Innovative Strategy to Possibly Counteract Such Infections in Humans? J Clin Gastroenterol. 2016 Nov/Dec;50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on Sepbla Tember 13-15, 2015:S136-S139. doi: 10.1097/MCG.0000000000000680. PMID: 27741158.

Mohsen S, Dickinson JA, Somayaji R. (2020). Update on the adverse effects of \\antimicrobial therapies in community practice. Can Fam Physician. Sep; 66(9):651-659.

Moins-Teisserenc H, Cordeiro DJ, Audigier V, Ressaire Q, Benyamina M, Lambert J, Maki G, Homyrda L, Toubert A, Legrand M. (2021). Severe Altered Immune Status After Burn Injury Is Associated With Bacterial Infection and Septic Shock. Front Immunol. 2021 Mar 2;12:586195. doi: 10.3389/fimmu.2021.586195. PMID: 33737924; PMCID: PMC7960913.

Montoro, B. P., Benomar, N., Gómez, N. C., Ennahar, S., Horvatovich, P., Knapp, C. W., et al. (2018). Proteomic analysis of *Lactobacillus pentosus* for the identification of potential markers of adhesion and other probiotic features. *Food. Res. Int*. 111, 58–66. doi: 10.1016/j.foodres.2018.04.072

Moradveisi, B., Behzadi, S., Zakaryaei, F., Jalili, A., Rahmani, K., & Karimi, A. (2021). Evaluation of Anti-SARS-CoV-2 IgG Antibody in Healthcare Professionals Infected with COVID-19. Jundishapur Journal of Microbiology, 14(11).

Mueller, M., Reiner, J., Fleischhacker, L., Viernstein, H., Loeppert, R., & Praznik, W. (2016). Growth of selected probiotic strains with fructans from different sources relating to degree of polymerization and structure.

Journal of Functional Foods, 24, 264–275. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.010

Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. Front Microbiol.; 10:539.

Munita JM and Arias CA. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiol Spectr. 2016 Apr; 4(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

Muñoz M, Mosquera A, Alméciga-Díaz CJ, Melendez AP, Sánchez OF. (2012). Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in Lactobacillus strains isolated from ensiled corn and molasses. Anaerobe. 2012 Jun;18(3):321-30. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.01.007. Epub 2012 Feb 7. PMID: 22342961.

Munoz, M., Mosquera, A., Alméciga-Díaz, C. J., Melendez, A. P., & Sánchez, O. F. (2012). Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in Lactobacillus strains isolated from ensiled corn and molas

Murphy CN, Clegg S.(2012). Klebsiella pneumoniae and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. Future Microbiol. 2012 Aug; 7(8):991-1002.

Murugaiyan J, Kumar PA, Rao GS, Iskandar K, Hawser S, Hays JP, Mohsen Y, Adukkadukkam S, Awuah WA, Jose RAM, Sylvia N, Nansubuga EP, Tilocca B, Roncada P, Roson-Calero N, Moreno-Morales J, Amin R, Kumar BK, Kumar A, Toufik AR, Zaw TN, Akinwotu OO, Satyaseela MP, van Dongen MBM.(2022). Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. Antibiotics (Basel). 2022 Feb 4;11(2):200. doi:

10.3390/antibiotics11020200. PMID: 35203804; PMCID: PMC8868457.

Mustafa M.S. and Abdullah R.M. (2018). Antimicrobial susceptibility and molecular detection of acc(6′)-Ib and acc(6′)-II genes among Klebsiella pneumoniae isolates collected from patients J Pharmaceut Sci Res, 10 (2018), pp. 1048-1052

Nair, R., Panicker, G., & Raghavan, G. (2017). Antimicrobial activity of some selected organic acids against foodborne bacteria. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 6(1), 43-47.

Navon-Venezia, S.; Kondratyeva, K.; Carattoli, A.(2017). Klebsiella pneumoniae: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol. Rev. 2017, 41, 252–275

Nazari-Alam, A., Badie, F., Shaeri, M., Moniri, R., Akbari, H., & Mansoori, M. (2021). The Bacterial Profile and Microbial Susceptibility of Acute and Chronic Dacryocystitis in Matini Hospital, Kashan, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology, 14(5).

Ndlovu T, Kgosietsile L, Motshwarakgole P, Ndlovu SI.(2023). Evaluation of Potential Factors Influencing the Dissemination of Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae and Alternative Treatment Strategies. Trop Med Infect Dis. 2023 Jul 26; 8(8):381.

Nedawi, G.,D.,R. ; Naser, R.,T. and Abbas, T.,A., (2014). Isolation and identification of Lactobacillus and and its uses in the inhibition of some pathogenic bacteria. A Thesis submitted to the council of Thi-Qar university -collage of science

Negash, A. W. and Tsehai, B. A. (2020). Current Applications of Bacteriocin. *Int. J. Microbiol.* 2020, 1–7. doi: 10.1155/2020/4374891

Nguyen, M.C.P.; Woerther, P.L.; Bouvet, M.; Andremont, A.; Leclercq,

R.; Canu, A. (2009). Escherichia coli as reservoir for macrolide resistance genes. Emerg. Infect. Dis. 2009, 15, 1648–1650

Nigam, A., Gupta, D., & Sharma, A. (2014). Treatment of infectious disease: Beyond antibiotics. Microbiological Research, 169(9-10), 643–651. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501314000251

Nishie, M., Nagao, J.-I., & Sonomoto, K. (2012). Antibacterial peptides "bacteriocins": An overview of their diverse characteristics and applications. Biocontrol Science, 17(1), 1–16.

Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, Jeschke MG, Finnerty CC.(2016). Infection in Burns. Surg Infect (Larchmt). Apr; 17(2):250-5.

Nouaille, S., Ribeiro, R. L., & Chambon, J. F. (2003). Functional properties of lactic acid bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(12), 4001-4011.

O157.African Journal of Biotech. Nology,5(22):2303-2306.

Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R. (2005). Nosocomial infections due to multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa: Epidemiology and treatment options Pharmacotherapy.; 25:1353–64

Ochoa T.J. and Contreras C.A. (2011). Enteropathogenic, E. coli (EPEC) infection in children. Curr. Opin. Infect. Dis. 2011; 10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b., 24:478–483. doi:

Osuka, A., Ogura, H., Ueyama, M., Shimazu, T. & Lederer, J. A. (2014). Immune response to traumatic injury: harmony and discordance of immune sysbla Tem homeostasis. Acute Med. Surg. 1, 63–69

Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T-J, Cheng Z. (2019). Antibiotic

resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strate- gies. Biotechnol Adv.; 37(1):177–92.

Paster, B. J., Bocchino, C. P., Welch, D. W., Riehl, W. J., & Lennon, F. J. (2001). Phylogenetic diversity and stability of the bacterial community of the human throat microbiome. https://journals.asm.org/journal/jb

Patrick E. Akpaka, Rashida Roberts, Stefan Monecke, (2017). Molecular characterization of antimicrobial resistance genes against Staphylococcus aureus isolates from Trinidad and Tobago, Journal of Infection and Public Health, Volume 10, Issue 3, 2017, Pages.

Petrillo, F., Folliero, V., Santella, B., Franci, G., Foglia, F., Trotta, M. C., ... & Galdiero, M. (2020). Prevalence and antibiotic resistance patterns of ocular bacterial strains isolated from pediatric patients in University Hospital Of Campania "Luigi Vanvitelli," Naples, Italy. International Journal of Microbiology, 2020, 1-6.

Peymani,A :NASERPOUR-FARIVAR, T : and AZARHOOSH E. ZARE, KH.(2017). Distribution of blaBLA TEM, blaSHV, and blaCTX-M genes among ESBL-producing P. aeruginosa isolated from Qazvin and Tehran hospitals, Iran. J PREV MED HYG ; 58: E155-E160.

Piatek J, Krauss H, Ciechelska-Rybarczyk A, Bernatek M, Wojtyla-Buciora P, Sommermeyer H.(2020). In-Vitro Growth Inhibition of Bacterial Pathogens by Probiotics and a Synbiotic: Product Composition Matters. Int J Environ Res Public Health. 2020 May 11;17(9):3332. doi: 10.3390/ijerph17093332. PMID: 32403297; PMCID: PMC7246756.

Piatek, J., Bernatek, M., Ciechelska-Rybarczyk, A., Oleskow, B., & Sommermeyer, H. (2019). Inhibition of Carbapenem-Resistant NDM-1 Klebsiella pneumoniae Isolated from a Hospital Outbreak Patient by a Synbiotic: A Non-Antibiotic Treatment Option. International Journal of Medical Research and Health Sciences, 8(9), 12-20.

Pleissner D, Dietz D, van Duuren JBJH, Wittmann C, Yang X, Lin CSK, Venus J. (2019). Biotechnological Production of Organic Acids from Renewable Resources. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2019;166:373-410. doi: 10.1007/10_2016_73. PMID: 28265703.

Poirel L., Madec J.Y., Lupo A., Schink A.K., Kieffer N., Nordmann P., Schwarz S. (2018) Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. Microbiol. Spectr.; 10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017, 6 doi:

Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., & Janda, W. M. (2020). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Jones & Bartlett Learning

Pyar, H., & Peh, K. K. (2014). Characterization and identification of Lactobacillus acidophilus using biolog rapid identification sysbla Tem. Int J Pharm Pharm Sci, 6(1), 189-93

Raheem, H. Q., Hussein, E. F., Ghosh, S., & Alkafaas, S. S. (2021). Resistance of Klebsiella pneumoniae from Different Clinical Samples to Penicillin, Cephalosporin, Carbapenem and Fluoroquinolone (Vol. 44, Issue 06). http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Instance

Rahimi F., Katouli M., Pourshafie M.R.(2014). Characteristics of hospital and community acquired meticillin resistant Staphylococcus aureus in Tehran, Iran. J. Med. Microbiol. 2014; 6):796–804., 63(Pt

Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B., & Saravanakumar, A. (2010). Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by Lactobacillus lactis Isolated from Marine Environment. *Advance Journal of Food Science and Technology*, *2*, 138-144.

Rasigade, J. P. and Vandenesch, F.,(2014) Staphylococcus aureus: A pathogen with still unresolved issues, Infection, Genetics and Evolution, Volume 21, 2014, Pages 510-514, ISSN 1567-1348.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, C. (2010). Lactic acid bacteria: their applications in foods. Journal of Biological Macromolecules, 10(4), 293-300. [This citation format might be different than you're used to, but it includes all the necessary information to find the source

Reid G, Bruce AW, Cook RL, Llano M.(1990). Effect on urogenital flora of antibiotic therapy for urinary tract infection. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 1990; 22(1):43–7.

Reid G., Sanders M.E., Gaskins H.R., Gibson G.R., Mercenier A., Rastall R., Roberfroid M., Rowland I., Cherbut C., Klaenhammer T.R. (2003). New scientific paradigms for Probiotics and prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* ;37:105–118. [PubMed] [Google Scholar]

Reid, G., Sanders, D. W., Ranganathan, S., Vanhamme, B., Holt, K., & Collins, K. (2011). Probiotics and host health: current status and future prospects. British journal of nutrition, 106(S1), S1-S6. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224418306502

resistance in e isolated from urinary tract infections. The Open Microbiology

resistant and susceptible Staphylococcus aureus 2013 Vol. 7(18), pp. 1802-1808, 30

Reygaert WC.(2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiol. Jun 26;4(3):482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482. PMID: 31294229; PMCID: PMC6604941.

Rezazadeh M, Baghchesaraei H, Peymani A.(2016). Plasmid-Mediated Quinolone-Resistance (qnrA) Genes in Clinical Isolates of Escherichia coli Collected from Several Hospitals of Qazvin and Zanjan Provinces, Iran.

Osong Public Health Res Perspect. 2016 Oct and 7(5):307-.

Roesch, P. L.; Redford, P.; Batchelet, S.; Moritz, R. L.; Pellett, S.; Haugen, B. J.; Blattner, F. R. and Welch, R. A. (2003). Uropathogenic Escherichia coli use d-serine deaminase to modulate infection of the murine urinary tract. Molec. Microbiol. 49:

Rojas, M., Ascencio, F., and Conway, P. L. (2002). Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2330–2336. doi: 10.1128/AEM.68.5.2330-2336.2002

Ronald, A. R., Nicolle, L. E., Stamm, E., Krieger, J., Warren, J., Schaeffer, A., ... & Andriole, V. (2001). Urinary tract infection in adults: research priorities and strategies. International journal of antimicrobial agents, 17(4), 343-348.

Roth, J. J., and W. B. Hughes. (2004). The essential burn unit handbook. Quality Medical Publishing, St. Louis, Mo.

Rousseau, V., Lepargneur, J. P., Roques, C., Remaud-Simeon, M. & Paul, F. (2005). Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. Anaerobe 11, 145–153.

Rubio-Gómez JM, Santiago CM, Udaondo Z, Garitaonaindia MT, Krell T, Ramos JL, Daddaoua A. (2020). Full Transcriptomic Response of *Pseudomonas aeruginosa* to an Inulin-Derived Fructooligosaccharide. Front Microbiol. 2020 Feb 20;11:202. doi: 10.3389/fmicb.2020.00202. PMID: 32153524; PMCID: PMC7044273.

Ruiz, E. , Sáenz,Y. , Zarazaga,M., Rocha-Gracia,R., Martínez-Martínez,L., Arlet, G. and Torres,C. (2012) . *qnrA, aac(6')-Ib-*

cr and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 67, Issue 4, April 2012, Pages 886–897, https://doi.org/10.1093/jac/dkr548

Russell A. D. (2004). Types of antibiotics and synthetic antimicrobial agents. In: Denyer S. P., Hodges N. A. & German S. P. (eds.) Hugo and Russell‟s pharmaceutical microbiology. 7th Ed. Blackwell Science, UK. Pp. 152-186.

Ryan, K.J. and Ray, C.G. (2004). Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases. 4th edn. McGraw Hill Publishers.

Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J.M., Bressollier P.,(2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field, LWT - Food Science and Technology,. 50. 1–16. 10.1016/j.lwt.2012.05.014.

Safarpoor Dehkordi F, Gandomi H, Basti AA, Misaghi A, Rahimi E.(2017). Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from hospital food. Antimicrob Resist Infect Control. 2017 Oct 4;6:104. doi: 10.1186/s13756-017-0257-1. PMID: 29034091; PMCID: PMC5628482.

Safika, S., Nilasari, Z. and Pasaribu, F.H., (2022). Detection of antibiotic resistance coding gene in Klebsiella pneumoniae bacteria isolated from broiler chickens in West Java, Indonesia. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 12(7), pp.190-198.

Sára, M., & Sleytr, U. B. (2000). S-layer proteins. Journal of bacteriology, 182(4), 859-868.

Schlegel, H. G. (2003). General microbiology (7th ed.). Cambridge University Press

Servin, A.L.(2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev. , 28*, 405–440. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed] [Green Version]

Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., ... & Mentis, A. (2004). In vitro and in vivo inhibition of Helicobacter pylori by Lactobacillus casei strain Shirota. *Applied and environmental microbiology*, *70*(1), 518-526.

Shamki, J. A., Al-Charrakh, A. H., & Al-Khafaji, J. K. (2012). Detection of ESBLs in Enteropathogenic E. coli (EPEC) isolates associated with infantile diarrhea in Kut City. Medical Journal of Babylon, 9(2), 403-412.

Sharifi-Rad J, Rodrigues CF, Stojanović-Radić Z, Dimitrijević M, Aleksić A, Neffe-Skocińska K, Zielińska D, Kołożyn-Krajewska D, Salehi B, Milton Prabu S, Schutz F, Docea AO, Martins N, Calina D.(2020). Probiotics: Versatile Bioactive Components in Promoting Human Health. Medicina (Kaunas). 2020 Aug 27;56(9):433. doi: 10.3390/medicina56090433. PMID: 32867260; PMCID: PMC7560221.

Sharma, S. K., Mudgal, N. K., Sharma, P., & Shrngi, B. N. (2015). Comparison of phenotypic characteristics and virulence traits of Klebsiella pneumoniae obtained from pneumonic and healthy camels (Camelus dromedarius). *Adv. Anim. Vet. Sci, 3(2)*, 116-122

Shibata R, Kimura M, Takahashi H, Mikami K, Aiba Y, Takeda H, Koga Y.(2009) Clinical effects of kestose, a prebiotic oligosaccharide, on the treatment of atopic dermatitis in infants. Clin Exp Allergy. 2009 Sep;39(9):1397-403. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03295.x. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19508323.

Shokryazdan P, Sieo CC, Kalavathy R, Liang JB, Alitheen NB, Faseleh Jahromi M, Ho YW. (2014). Probiotic potential of Lactobacillus strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains.

Biomed Res Int. and 2014:927268.

Shokryazdan P., Sieo C.C., Kalavathy R., Liang J.B., Alitheen N.B., Jahromi M.F., Ho Y.W.(2014) Probiotic Potential of Lactobacillus Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. BioMed Res. Int. 2014 and 2014:927268.

Shornikova AV, Casas IA, Isolauri E, Mykkanen H, Vesikari T. (1997). Lactobacillus reuteri as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.; 24(4):399–404.

Singh, R. & Singh, R. (2010). Production of Fructooligosaccharides from Inulin by Endoinulinases and Their Prebiotic Potential. Food Technology and Biotechnology. 48. 435-45

Sleytr, U. B., Sára, M., Pum, D., and Schuster, B. (2001). Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Prog. Surf. Sci*. 68, 231–278. doi: 10.1016/S0079-6816(01)00008-9

Song J, Bishop BL, Li G, Grady R, Stapleton A, Abraham SN. (2009) TLR4-mediated expulsion of bacteria from infected bladder epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 1;106(35):14966-71. doi: 10.1073/pnas.0900527106. Epub 2009 Aug 17. PMID: 19706440; PMCID: PMC2736405.

Sood RF, Gibran NS, Arnoldo BD, Gamelli RL, Herndon DN, Tompkins RG;(2016). Inflammation the Host Response to Injury Investigators. Early leukocyte gene expression associated with age, burn size, and inhalation injury in severely burned adults. J Trauma Acute Care Surg. 2016 Feb;80(2):250-7. doi: 10.1097/TA.0000000000000905. PMID: 26517785; PMCID: PMC4731271.

Soundararajan, N., Shanmugam, P., Devanbu, C., & Sattar, S. B. A. (2016). A study on the aac-(61)-lb-cr gene prevalence among ciprofloxacin-resistant strains of uropathogenic Enterobacteriaceae. International Journal of Applied and Basic Medical Research,

Soundharrajan I, Kim D, Kuppusamy P, Muthusamy K, Lee HJ, Choi KC. (2019). Probiotic and *Triticale* Silage Fermentation Potential of *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus brevis* and Their Impacts on Pathogenic Bacteria. Microorganisms. 2019 Sep 4;7(9):318. doi: 10.3390/microorganisms7090318. PMID: 31487912; PMCID: PMC6780645.

Spees AM, Wangdi T, Lopez CA, Kingsbury DD, Xavier MN, Winter SE, Tsolis RM, Bäumler AJ. (2013). Streptomycin-induced inflammation enhances Escherichia coli gut colonization through nitrate respiration. mBio. 2013 Jul 2;4(4):e00430-13. doi: 10.1128/mBio.00430-13. PMID: 23820397; PMCID: PMC3705454.

Sridevi, V. Sumathi, V. Guru Prasad, M. and Satish Kumar. M. (2014). Fructooligosaccharides - type prebiotic : A Review. Journal of Pharmacy Research. 8. 321.

STEFANIA, D.M., MIRANDA, P., DIANA, M., CLAUDIA, Z., RITA, P. and DONATELLA, P., (2017). Antibiofilm and antiadhesive activities of different synbiotics. Journal of Probiotics and Health, vol. 5, no. 3, pp. 182-191.

Stephenson, A. A., Taggart, D. J., Xu, G., Fowler, J. D., Wu, H., & Suo, Z. (2023). The inhibitor of κB kinase β (IKKβ) phosphorylates IκBα twice in a single binding event through a sequential mechanism. Journal of Biological Chemistry, 299(1).

Stone J, Gawaziuk JP, Khan S, Chateau D, Bolton JM, Sareen J, Enns

J, Doupe M, Brownell M, Logsetty S. (2016). Outcomes in Adult Survivors of Childhood Burn Injuries as Compared with Matched Controls. J Burn Care Res. 2016 Mar-Apr;37(2):e166-73. doi: 10.1097/BCR.0000000000000323. PMID: 26594866.

Strain R, Stanton C, Ross RP. (2022) Effect of diet on pathogen performance in the microbiome. *Microbiome Res Rep.* 1:13. 10.20517/mrr.2021.10 [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

Strateva T and Mitov I.(2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa infections. Ann Microbiol.; 61(4):717–32.

Sueyoshi M, Fukunaga M, Mei M, Nakajima A, Tanaka G, Murase T, Narita Y, Hirata S, Kadowaki D. (2019). Effects of lactulose on renal function and gut microbiota in adenine-induced chronic kidney disease rats. Clin Exp Nephrol. 2019 Jul;23(7):908-919. doi: 10.1007/s10157-019-01727-4. Epub 2019 Mar 20. PMID: 30895529; PMCID: PMC6555783.

Sui W, Lipsky MJ, Matulay JT, Robins DJ, Onyeji IC, James MB, Theofanides MC, Wenske S.(2017). Timing and Predictors of Early Urologic and Infectious Complications After Renal Transplant: An Analysis of a New York Statewide Database. Exp Clin Transplant. 2018 Dec;16(6):665-670. doi: 10.6002/ect.2016.0357. Epub 2017 Jul 11. PMID: 28697717.

Sullivan A, Barkholt L, Nord CE.(2003). Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium lactis and Lactobacillus F19 prevent antibiotic-associated ecological disturbances of Bacteroides fragilis in the intestine. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy.; 52(2):

Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L.(1996) Detection of

erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrobial agents and chemotherapy,; 40(11):2562–2566. https://doi.org/10.1128/ AAC.40.11.2562 PMID: 8913465

Suwansaksri, J., Nithiuthai, S., Wiwanitkit, V., Soogarun, S., & Palatho, P. (2003). The formol-ether concentration technique for intestinal parasites: comparing 0.1 N sodium hydroxide with normal saline preparations. Southeast Asian journal of tropical medicine and public health, 33, 97-98.

Talaro K. P. & Chess B. (2008). Foundations in microbiology. 8th Ed. McGraw Hill, New York.

Tang, L., Zeng, Q., Chen, Y., Zhang, L., & Li, X. (2022). Effect of oligosaccharide, inulin, and fructooligosaccharide supplementation on the inhibitory effect of Lactobacillus spp. against Klebsiella pneumoniae-induced pneumonia in mice. Applied Microbiology and Biotechnology, 126(11-12), 2486-2495. [

Taviani E, Muchongo A, Kim SW, Van Kessel JAS, Haley BJ. (2021). Genomic Analysis of Antibiotic-Resistant and -Susceptible *Escherichia coli* Isolated from Bovine Sources in Maputo, Mozambique. Foodborne Pathog Dis. 2021 Jun;18(6):426-435. doi: 10.1089/fpd.2020.2901. Epub 2021 May 11. PMID: 33978455.

Taylor TA and Unakal CG.(2022). Staphylococcus Aureus. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 28722898.,. PMID:

Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent pep- tide exit path in the ribosome. J Mol Biol 330:1005–1014

Tille, P.M. (2014).Bailey and Scott's diagnostic microbiology.13th Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc.

Timsina, R., Shrestha, U., Singh, A., & Timalsina, B. (2021). Inducible

Clindamycin Resistance and *Erm* Genes in *Staphylococcus Aureus* in School Children in Kathmandu, Nepal. *Future Science OA*, *7*(1). https://doi.org/10.2144/fsoa-2020-0092

Urban-Chmiel R, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Wieczorek K, Dec M, Nowaczek A, Osek J.(2022). Antibiotic Resistance in Bacteria-A Review. Antibiotics (Basel). 2022 Aug 9 and 11(8):1079.

Urban-Chmiel R, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Wieczorek K, Dec M, Nowaczek A, Osek J. (2022). Antibiotic Resistance in Bacteria-A Review. Antibiotics (Basel). Aug 9; 11(8):1079.

Van Hoek, A.H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P. and Aarts, H.J., (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Frontiers in microbiology, 2, p.203.

van Zyl WF, Deane SM, Dicks LMT. (2020). Molecular insights into probiotic mechanisms of action employed against intestinal pathogenic bacteria. Gut Microbes. 2020 Nov 9;12(1):1831339. doi: 10.1080/19490976.2020.1831339. PMID: 33112695; PMCID: PMC7595611.

Vanderhoof J and Young RJ.(2004). Current and potential uses of probiotics. Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology. 2004; 3):S33–7., 93(5 Suppl

Vanessa D'Costa, Gerard D.(2009) Wright Biochemical Logic of Antibiotic Inactivation and Modification, Antimicrobial Drug Resistance., ISBN : 978-1-60327-592-7

Vareille-Delarbre M, Miquel S, Garcin S, Bertran T, Balestrino D, Evrard B, Forestier C. (2019). Immunomodulatory Effects of Lactobacillus

plantarum on Inflammatory Response Induced by Klebsiella pneumoniae. Infect Immun. 2019 Oct 18; 87(11):e00570-19.

Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., ... & Kumar, S. H. (2021). Bacterial resistance to antimicrobial agents. *Antibiotics*, *10*(5), 593

virulence genes, biofilm formation and extended-Spectrum β-lactamase

Von Baum, H. and Marre, R.(2005). Antimicrobial resistance of Escherichia coli and therapeutic implications. Int. J. Med. Microbiol. 2005, 295, 503–511

Walsh C. (2003). Antibiotics: actions, origins, resistance. 1st Ed. ASM Press, Washington, DC. 345p.

Wang A, Yang Y, Lu Q, Wang Y, Chen Y, Deng L, Ding H, Deng Q, Zhang H, Wang C, Liu L, Xu X, Wang L, Shen X.(2008). Presence of qnrA gene in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae resistant to ciprofloxacin isolated from pediatric patients in China. BMC Infect Dis. 2008 May 22;8:68. doi: 10.1186/1471-2334-8-68. PMID: 18498643; PMCID: PMC2409344.

Wang, Z., Sun, J., Ma, Y., & Li, Y. (2015). Effect of lactic acid concentration on growth of Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Listeria monocytogenes in apple juice. Journal of Food Science and Technology, 52(6), 1428-1433.

Westerik N, Kort R, Sybesma W, Reid G. .(2018) Lactobacillus rhamnosus probioticfood as a tool for empowerment across the value chain in Africa.Front Microbiol 9:1501. doi: 10.3389/fmicb.2018.0150.

WHO. Threats to Global Health in 2019. Available online: https://medium.com/@who/10-threats-to-global-healthin-2018-232daf0bbef32018. Ten threats to global health in 2019 (who.int)

Willcox, M. D. (2007). Pseudomonas aeruginosa infection and inflammation during contact lens wear: a review. Optometry and Vision Science : Official Publication of the American Academy of Optometry. 84(4): 273-278.

Williams and Wilkins , USA: 555-565

Wolff, D., Radojcic, V., Lafyatis, R., Cinar, R., Rosenstein, R. K., Cowen, E. W., ... & Paczesny, S. (2021). National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-Host disease: IV. the 2020 highly morbid forms report. *Transplantation and cellular therapy*, *27*(10), 817-835.

Wood, M. J., & Leesbug, F. L. (2010). Laboratory Manual for General Microbiology.

Wright, G.D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?. *BMC Biol* 8, 123 https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123

Wysocki, A. B. (2016). Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection. AACN Clin. Issues13:382-397.

Xu L., Sun X., Ma X.(2017). Sysbla Tematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 2017 and 16:18.

Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., & Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. Frontiers in Microbiology, 5, 241. https://www.frontiersin.org/journals/microbiology

You S, Ma Y, Yan B, Pei W, Wu Q, Ding C, Huang C. (2022). The promotion mechanism of prebiotics for probiotics: A review. Front Nutr. 2022 Oct 5; 9:1000517.

Zagaglia, C.; Ammendolia, M.G.; Maurizi, L.; Nicoletti, M.; Longhi, C.(2022). Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic Escherichia coli Strains—New Strategies for an Old Pathogen. Microorganisms 2022, 10, 1425

Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H., & Unden, G. (2006). Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied microbiology and biotechnology*, *72*, 421-429.

Zhang, H., Zheng, Y., Gao, H., Xu, P., Wang, M., Li, A., ... & Du, H. (2016). Identification and characterization of Staphylococcus aureus strains with an incomplete hemolytic phenotype. Frontiers in cellular and infection microbiology, 6, 146

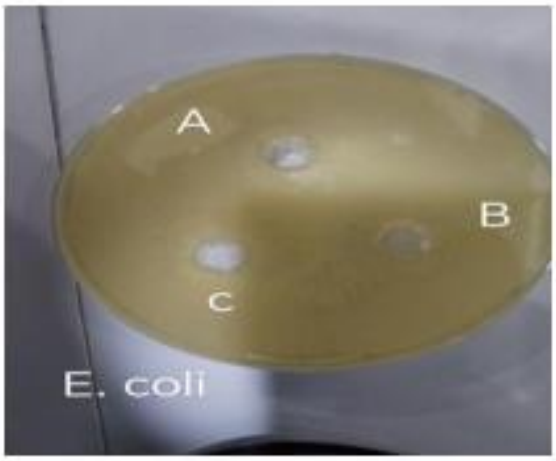
Zhao Q, Wang M, Xu D, Zhang Q, Liu W. (2015). Metabolic coupling of two small-molecule thiols programs the biosynthesis of lincomycin A. Nature 518:115–119.

Zhgun, A., Avdanina, D., Shumikhin, K., Simonenko, N., Lyubavskaya, E., Volkov, I., & Ivanov, V. (2020). Detection of potential biodeterioration risks for bla Tempera painting in 16th century exhibits from State Tretyakov Gallery. PLoS One, 15(4), e0230591.

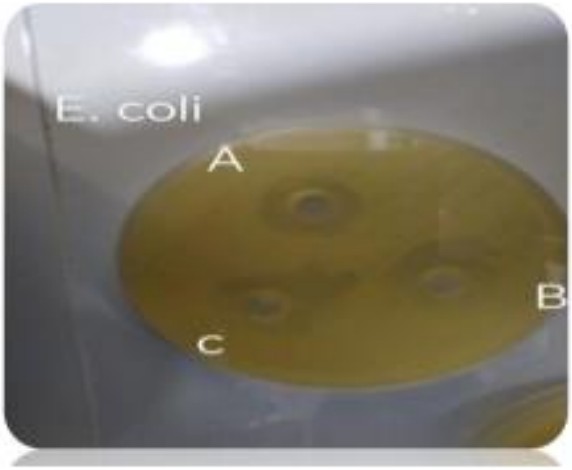
Ziad M. Al-Khozai. (2009). Inhibitory effects of Probiotic on growth and adhesion of some gram negative pathogenic bacteria Journal of Kerbala University , Vol. 7 No.1 Scientific.

الملاحق

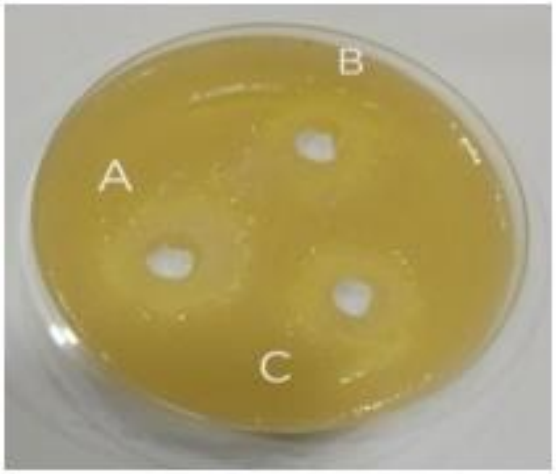
appendices



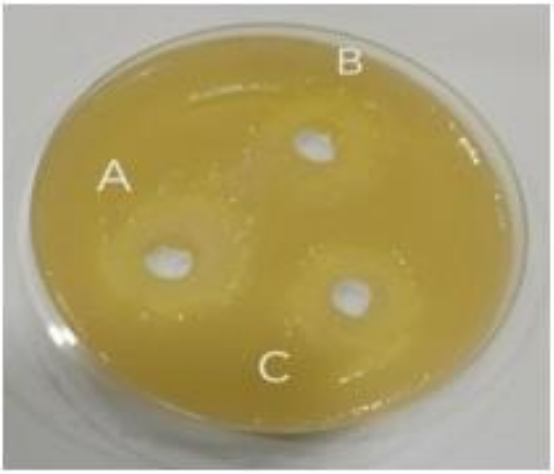
L. rhamn0sus+FOS against *E.C0li*



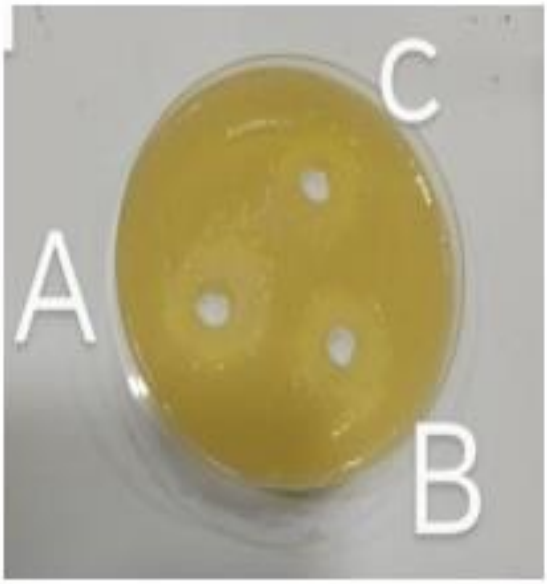
L.plantarum +fos against *E.C0li*



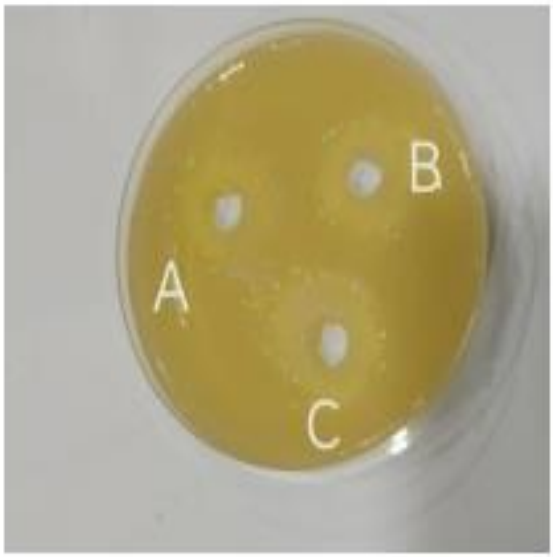
L.acidophilus+FOS against *E.C0li*



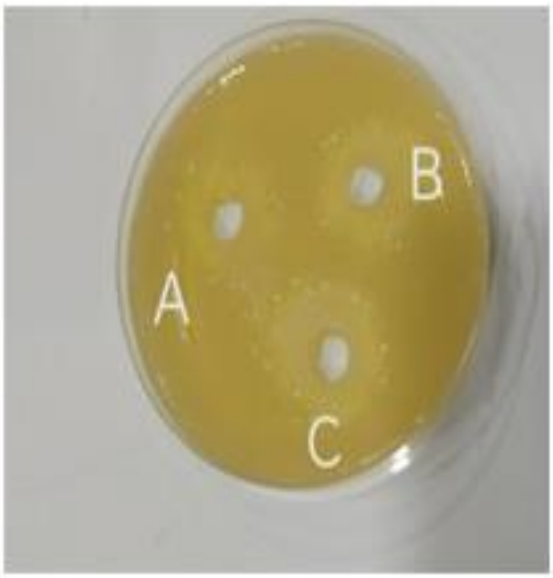
L.helveticus+FOS against *E.C0li*



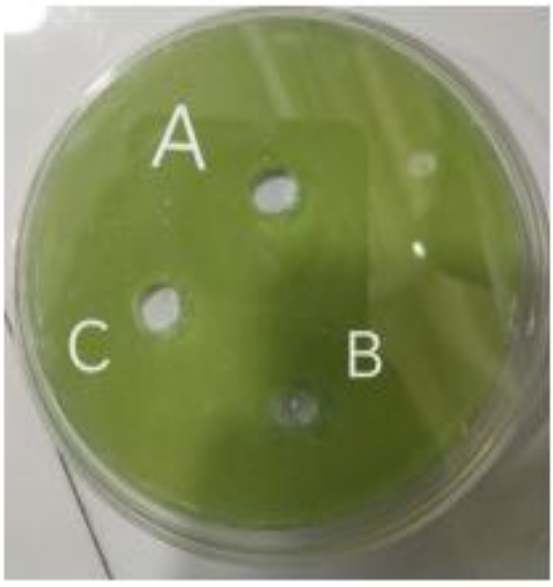
L.plantarum +FOS against *P.aeruginosa*



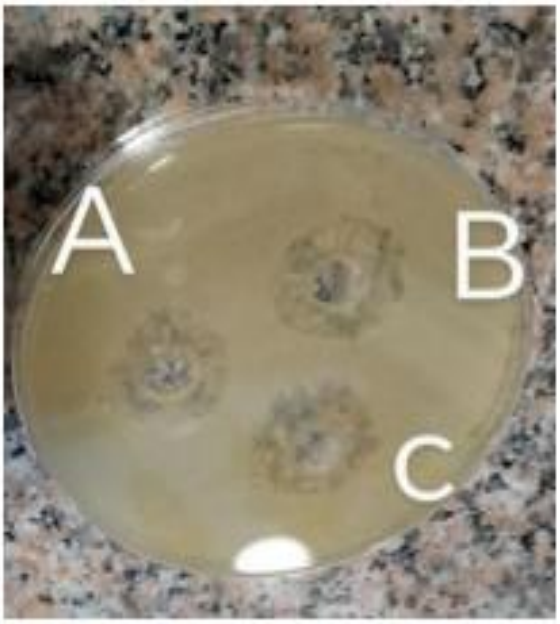
L. rhamn0sus+FOS against *P.aeruginosa*



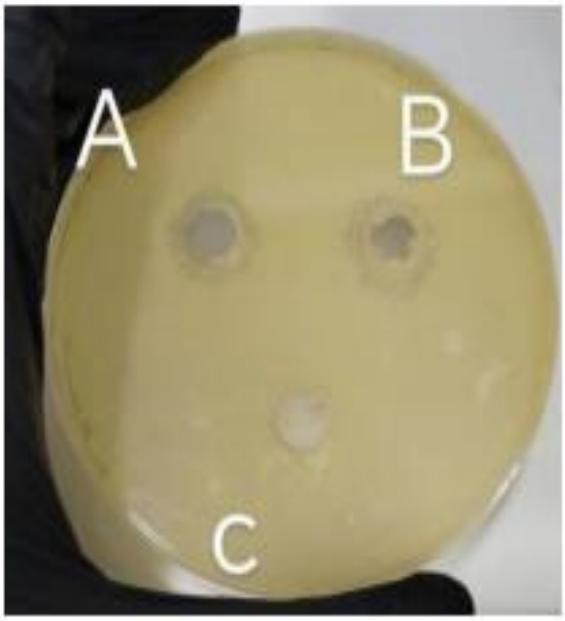
L.acidophilus+FOS against *P.aeruginosa*



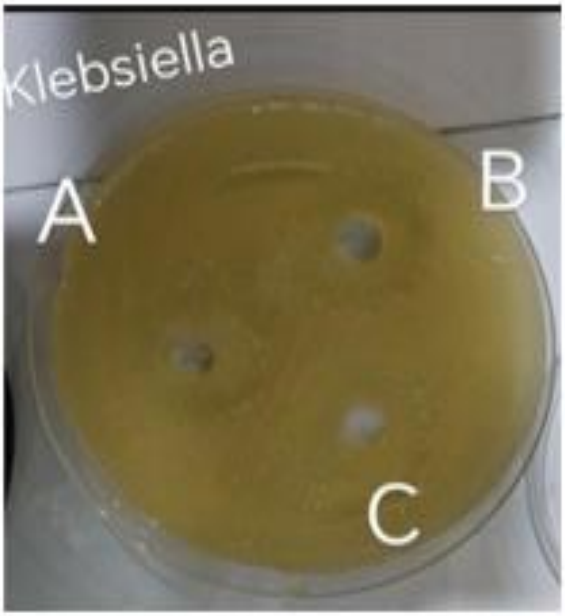
L.helveticus+FOS against *P.aeruginosa*



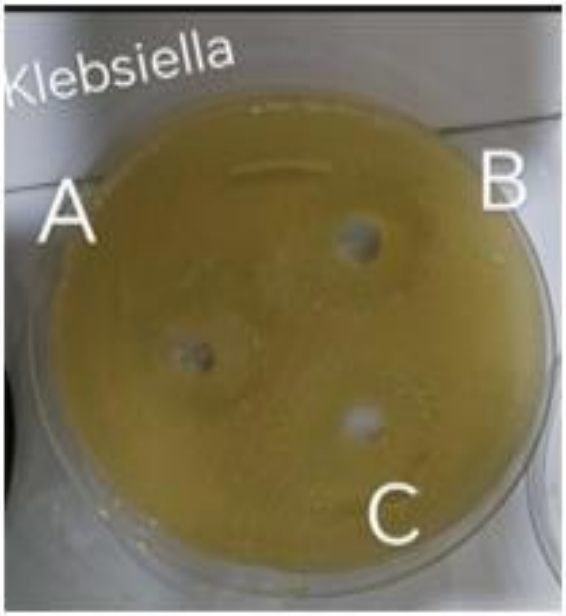
L.plantarum +FOS against *Klebsiella*



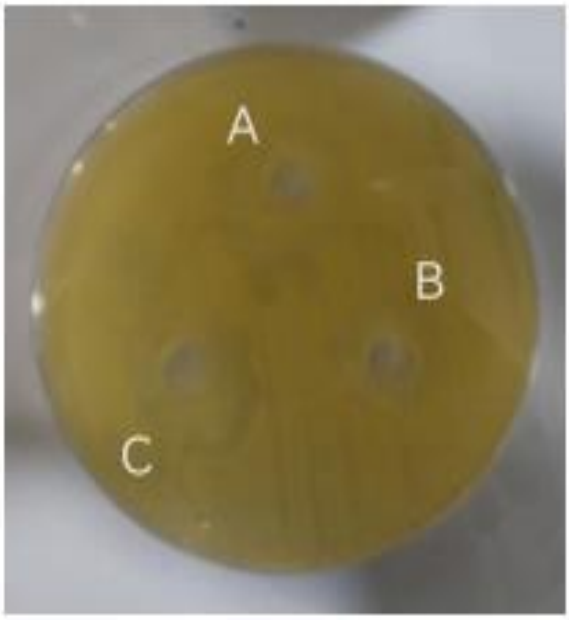
L. rhamnOsus+FOS against *Klebsiella*



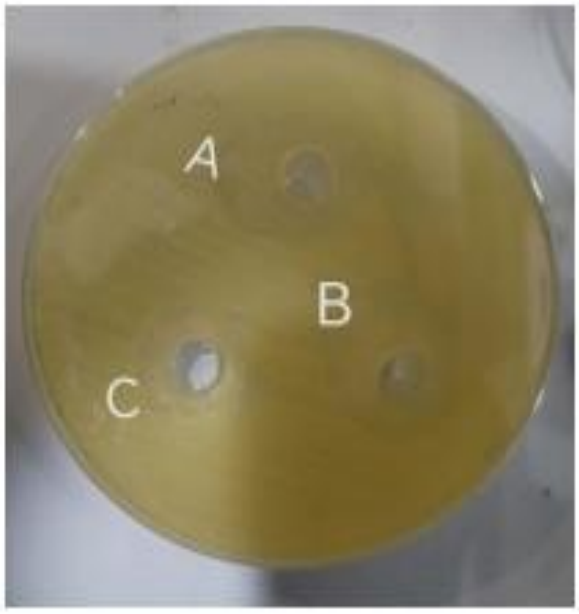
L.acidophilus+FOS against *Klebsiella*



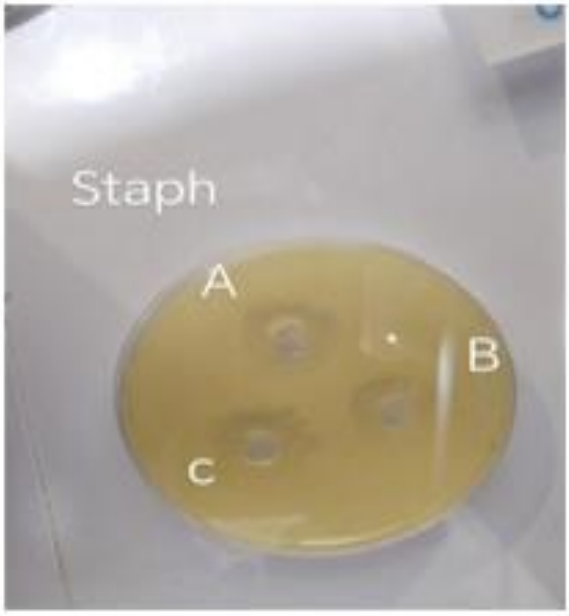
L.helveticus+FOS against *Klebsiella*



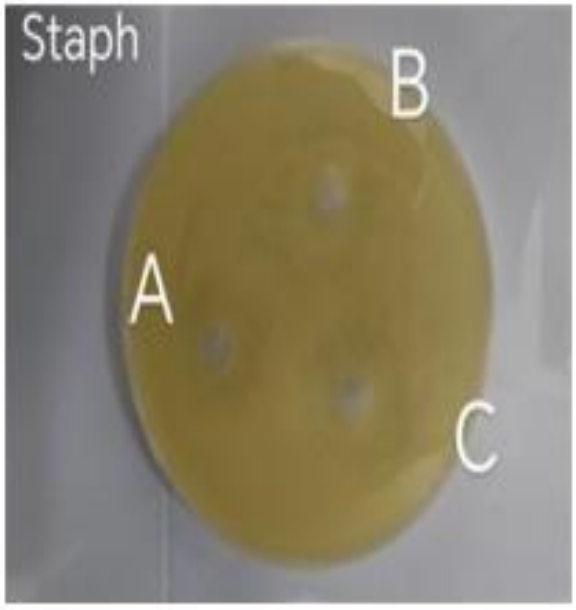
L.plantarum +FOS against *S.aureus*



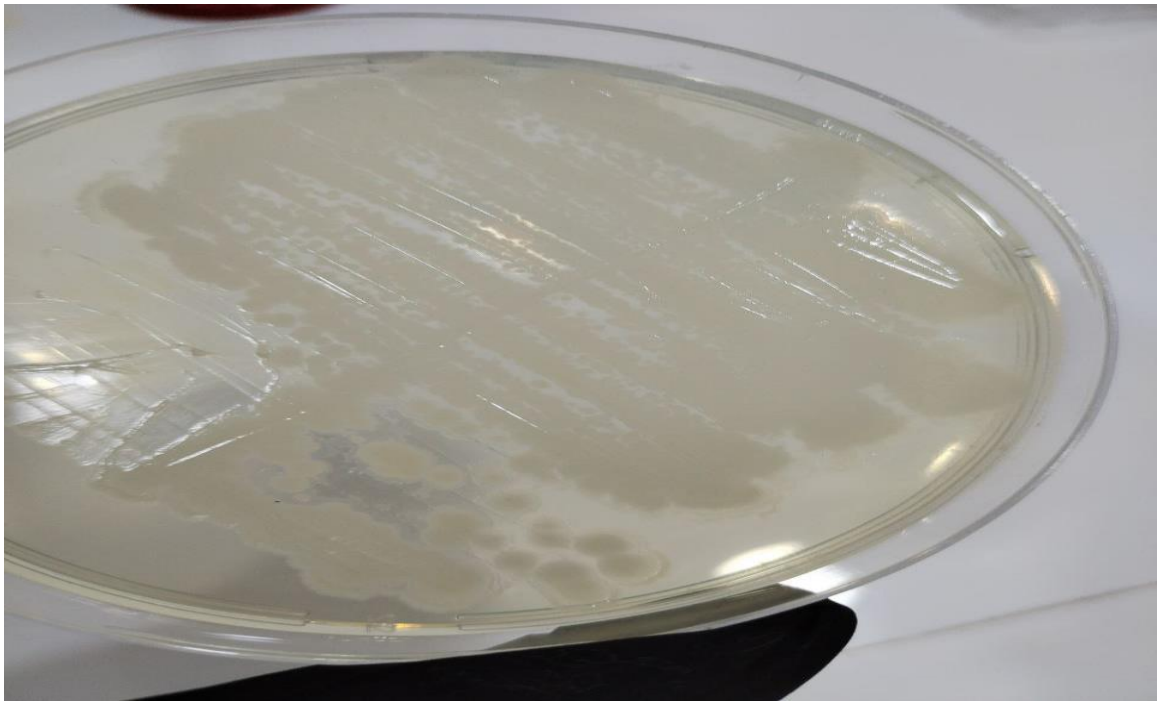
L. rhamn0sus+FOS against *S.aureus*



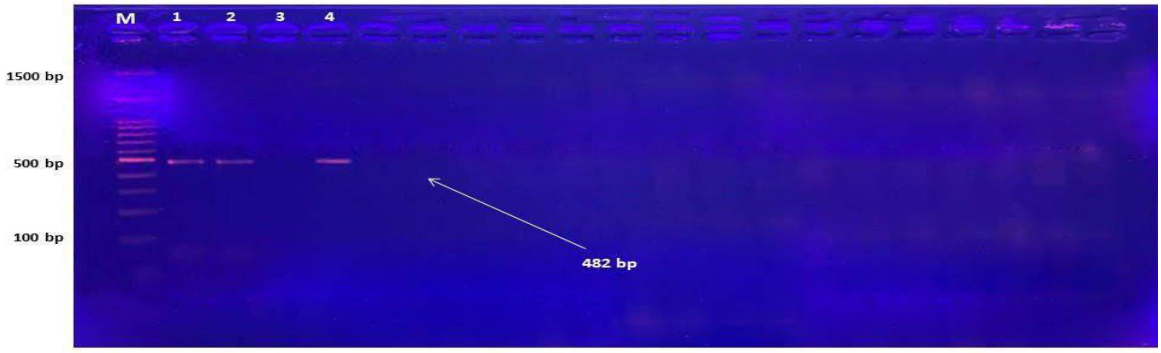
L.acidophilus+FOS against *S.aureus*



L.helveticus+FOS against *S.aureus*



عزلات بكتيريا حامض اللبنيك على الوسط الزرعيMRS

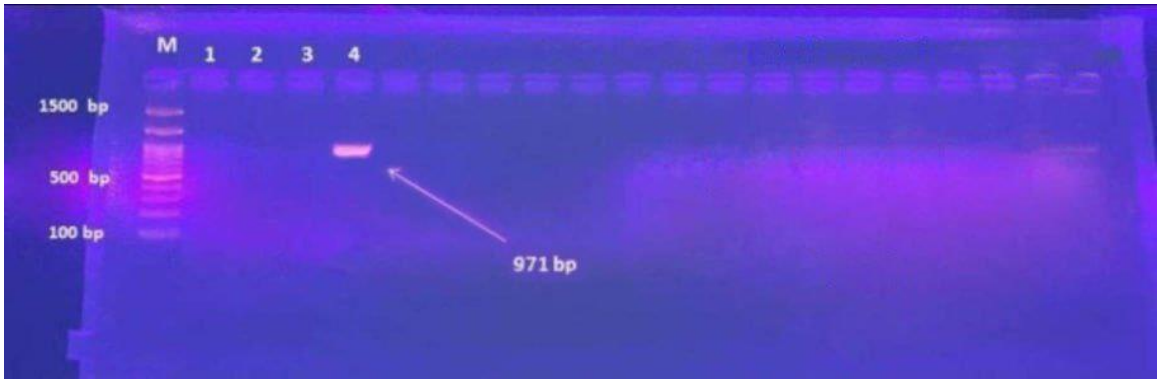


الشكل (3-1) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *aac(6')-Ib -cr* (bp 482) بتركيز هلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة.

تمثل العزلات 1.s.*aureus* , 2. *E.coli* ,3. *P. aeruginosa,* 4.*K. pneumoniae*

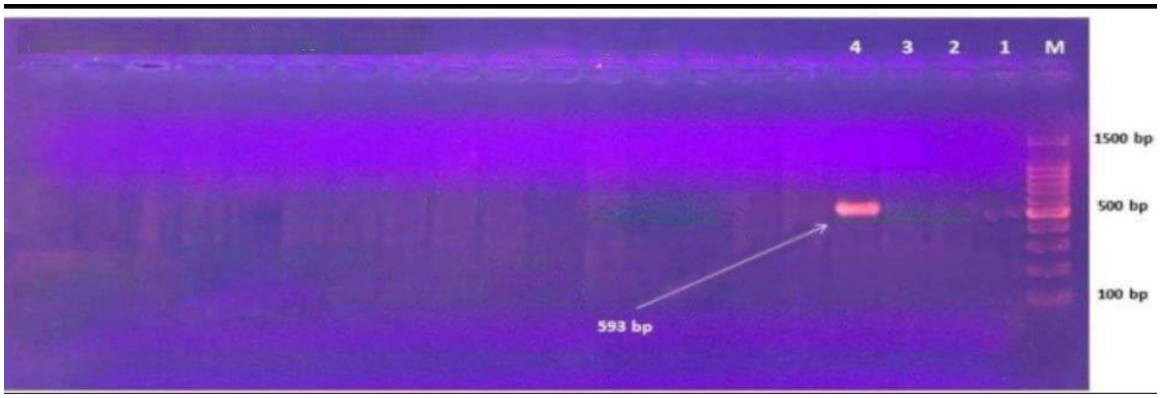
الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث shv (593 bp) بتركيز هلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة

تمثل العزلات 1.s.*aureus* , 2. *E.coli* ,3. *P. aeruginosa,* 4.*K. pneumoniae*



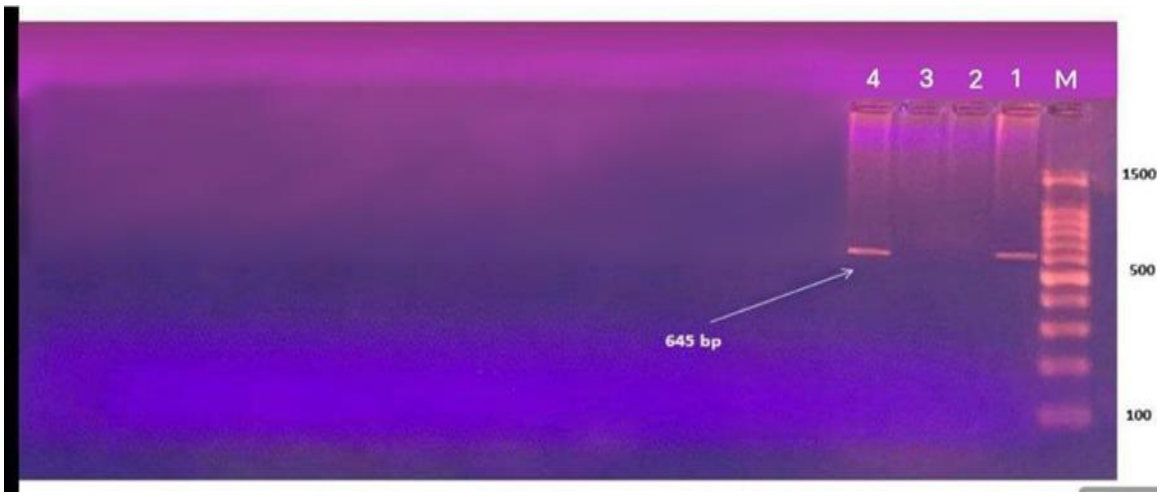
الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *bla Tem* 850 bp) بتركيز هلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة

تمثل العزلات 1.s.*aureus* , 2. *E.coli* ,3. *P. aeruginosa,* 4.*K. pneumoniae*



الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل PCR باستخدام البوادئ المحددة لمورث *qnrA* (645 bp) بتركيزهلام (1.5%)، وفولتية (70) فولت لمدة (50) دقيقة

تمثل العزلات 1.s.*aureus* , 2. *E.coli* ,3. *P. aeruginosa,* 4.*K. pneumoniae*



بتركيزهلام (1.5%)، وفولتية (70) 645 bp *ermA* باستخدام البوادئ المحددة لمورث PCR الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل فولت لمدة (50) دقيقة

تمثل العزلات 1.s.*aureus* , 2. *E.coli* ,3. *P. aeruginosa,* 4.*K. pneumoniae*

الملحق رقم (١)

Lactobacillus isolation form yogurt on MRS agar

Organism Quantity:
Selected Organism : Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae
ISP Infection Site:

Source: Swab **Collected:**

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	5.83 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	94% Probability	**Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae**		
	Bionumber:	6607775553564010		
ID Analysis Messages				

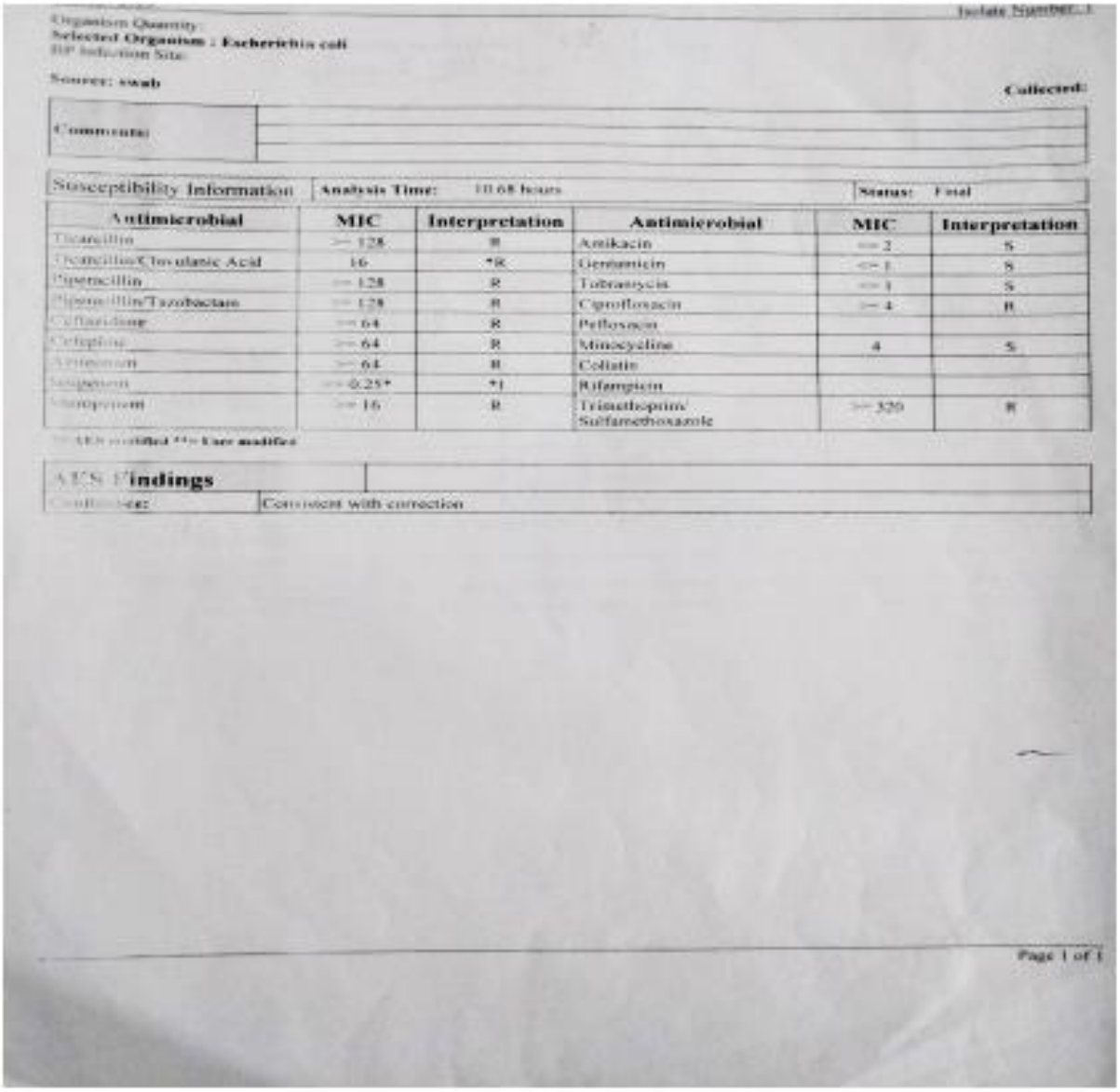
Susceptibility Information	**Analysis Time:**	9.25 hours	**Status:**	Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	>= 64	R
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Gentamicin	>= 16	R
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	>= 16	R
Piperacillin/Tazobactam	>= 128	R	Ciprofloxacin	2	*R
Cef[illegible]	>= 64	R	Pefloxacin		
Cef[illegible]	>= 64	R	Minocycline	>= 16	R
Az[illegible]	>= 64	R	Colistin		
Im[illegible]	>= 16	R	Rifampicin		
Me[illegible]	>= 16	R	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	<= 20	S

*= [illegible] modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Consistent

الملحق رقم (٢)



Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Escherichia coli
ISF Infection Site:

Source: swab

Collected:

Comments:	

Susceptibility Information	**Analysis Time:** 10.68 hours	**Status:** Final

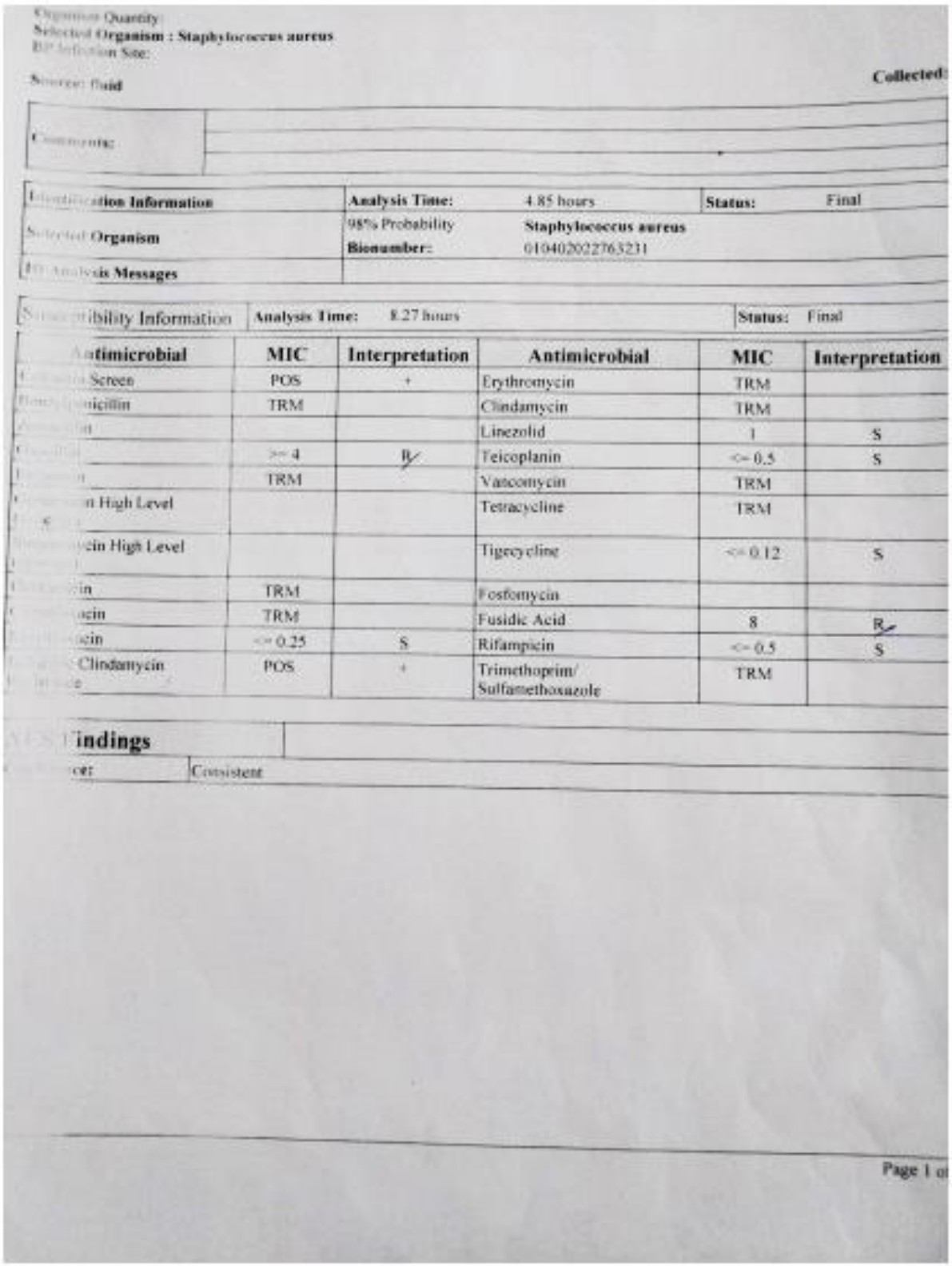
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Ticarcillin	>= 128	R	Amikacin	<= 2	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	16	*R	Gentamicin	<= 1	S
Piperacillin	>= 128	R	Tobramycin	<= 1	S
Piperacillin/Tazobactam	>= 128	R	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	>= 64	R	Pefloxacin		
Cefepime	>= 64	R	Minocycline	4	S
Aztreonam	>= 64	R	Colistin		
Imipenem	<= 0.25*	*I	Rifampicin		
Meropenem	>= 16	R	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	>= 320	R

*= AES modified **= User modified

AES Findings	
Confidence:	Consistent with correction

Page 1 of 1

الملحق رقم (٣)



Organism Quantity:
Selected Organism : Staphylococcus aureus
BP Infection Site:

Source: fluid

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time:	4.85 hours	Status:	Final
Selected Organism	98% Probability Bionumber:	Staphylococcus aureus 010402022763231		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	Analysis Time: 8.27 hours	Status:	Final

Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Screen	POS	+	Erythromycin	TRM	
icillin	TRM		Clindamycin	TRM	
in			Linezolid	1	S
	>= 4	R	Teicoplanin	<= 0.5	S
n	TRM		Vancomycin	TRM	
n High Level			Tetracycline	TRM	
cin High Level			Tigecycline	<= 0.12	S
in	TRM		Fosfomycin		
cin	TRM		Fusidic Acid	8	R
cin	<= 0.25	S	Rifampicin	<= 0.5	S
Clindamycin	POS	+	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	TRM	

indings	
ce:	Consistent

The summery

Probiotics are living microorganisms that provide many benefits to humans, including *Lactobacillus* that are naturally present in the human body and in some types of foods, drinks, and nutritional supplements.

In this study, the antagonistic activity of some types of *Lactobacillus* against some types of bacterial pathogens isolated from different clinical sources was determined. One hundred and ten samples were collected from burn infections, urinary tract infections, wound infections, and discharge from both sexes at Imam Hussein (peace be upon him) Teaching Hospital, from the burns lobby and from the Obstetrics and Gynecology Hospital, and cultured on appropriate media. Phenotypic and biochemical tests were then conducted to diagnose pathogenic and bacteria. Polymerase chain reaction method was applied to detect genes encoded for antibiotics resistance activity that including (*shv, bla Tem, ermA, , aac (6')-Ib - cr qnrA*). On the one hand, 20 different samples of raw milk and homemade yogurt were collected to isolate *Lactobacillus spp*., which were diagnosed by microscopic, biochemical and PCR method. Finally, the antagonism of *Lactobacillus* against pathogenic bacteria was then tested and included:

1.*Lactobacillus. acidophilus*+ *Lactobacillus. rhamnosus*

2.Lactobacillus. acidophilus + Lactobacillus. hellveticus,
3.Lactobacillus.acidophilus + Lactobacillus. plantarium,
4.Lactobacillus.rhamnosus + Lactobacillus.hellveticus,

5.Lactobacillus. rhamnosus + Lactobacillus.plantarium,

6.Lactobacillus. rhamnosus+ *Lactobacillus. Acidophilus*

7. Lactobacillus. hellveticus+ *Lactobacillus. plantarium*

Later, the cell filtrate of LAB was used to evaluate the biological effectiveness of *LAB* against pathogenic bacteria. Finally, the synergistic interaction between each species of Lactobacillus and polysaccharides of the type Fructooligosaccharides against each genera of bacterial pathogens was individually investigated. In all aforementioned trails, the method of diffusion from wells was used in all experiences..

In the results: 5 isolates of *Staphylococcus aureus*, 7 of *E. coli*, 3 of *Pseudomonas aeruginosa*, and 9 of *Klebsiella pneumonia* were obtained. The mentioned bacterial species were resistant to a wide range of antibiotics as *Klebsiella* bacteria were characterized as having the highest significance in their possession of the *aac(6')-Ib -cr* gene, which encodes resistance to a group of aminoglycoside antibiotics ($P<0.05$) compared to the rest of the bacterial genera, while *Pseudomonas aeruginosa* bacteria were significantly less in possession of two isolates of this gene. . As for the *erm*a gene, the results were similar to the *aac(6')-Ib -cr* gene. *Klebsiella* bacteria carried the *qnrA*A gene, which encodes resistance to a group of fluoroquinolone antibiotics, with 4 isolates significantly higher than the rest of the bacterial genera, as these genera were equal to each other, with one isolate from each species carrying this gene.

Also, *Klebsiella* bacteria were the only ones carrying the *shv* gene, which encodes resistance to a group of beta-lactam antibiotics, while the rest of the genera did not possess this gene. As for the *Bla Tem* gene, which encodes resistance to a group of beta-lactam antibiotics, the results did not differ significantly from the results of the shv gene, except for the presence of one isolate of the *Pseudomonas aeruginosa* bacteria carrying this gene, while *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria did not carry this type of gene.

In addition, 4 species of *Lactobacillus* were isolated including *L. rhamnosus*, *L. hellveticus*, and *L. acidophilus. L. plantarium*,

All types of *LAB* alone either overnight culture or supernatant overnight culture were not exhibited any antagonistic activity against bacterial pathogens. Moreover, the mixed of two species of LAB was also not revealed any action against tested pathogens. Testing of the antagonistic activity of *LAB* with FOS showed that the growth of pathogenic bacteria was affected by this mixture. Conclusion: There was a significant inhibitory ability for all types of *LAB* after mixing them with FOS, which led to improved growth of *Lactobacilli.*

University of Karbala
College of Science
Department of Biology

Molecular Study Of Antibiotics Resistance Genes of Some Pathogenic Bacterial Isolates And Determination The Effect Of Probiotic Bacteria Which Molecular Identified

A Thesis

Submitted to the council of the College of Science / University of Karbala In partial of fulfillment of requirements for degree of Master of Science in Biology

Written By:

Gufran Kareem Abd Rahi

BSc. Karbala University 2009

Supervised by

Prof. Dr. Ali A. Al-Hisnawi

2024 September AD **Rabi al-Awwal1445 AH**