جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة

# دراسة الانماط المصلية وعوامل الضراوة لبكتريا *E.coli* المعزولة من حالات خمج المجاري البولية لدى النساء في محافظة ديالى

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الأحياء المجهرية

تقدمت بها الطالبة

**لارة محمود شفيق السوره ميري**

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى 2011 – 2012

بإشراف

**أ.د. محمد خليفة خضير**

ذي الحجة 1435هـ تشرين الأول 2014 م

Repuplic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Sciences

# A study on serotypes and virulence factors of *Escherichia coli* isolated from women with urinary tract infections in Diyala province

**A Thesis submitted**
**To**

**The Council of College of Education for Pure Science**
**Diyala University In Partial Fulfillment of the Requirements**
**For the Degree of Master of Science in Biology / Microbiology**

**By**
**Lara Mahmood Shafeeq Al-Surameri**

**Supervised by**
**Professor**
**Dr. Mohammed Khalifa Khdair**

**October 2014 A.D** **Thilhija 1435 A.H**

بسم الله الرحمن الرحيم

(قَالُواْ سبحَانكَ لَاعلمَ لَناَ إِلَّاَ مَا

عَلَّمتَنَا إِنكَ أَنتَ العَلِيمُ الحَكِيمُ)

صدق الله العظيم

ب ب

سسسسس ـ32

# الإهداء

**إلى نور الدجى ورسول الهدى سيدنا ونبينا محمد (صلى الله عليه وسلم)...**

**إلى الأرواح الغالية التي فارقتنا يوما ...**

**إلى من مزقوا قلوبنا بفراقهم وأحزننا رحيلهم ...**

**إلى من تركوا ثغرة في حياتنا لا يملؤها سواهم ...**

**والدتي (رحمها الله )**

**إلى صاحب القلب الكبير إلى صاحب الوجه النضير ...**

**أنت الحبيب الغالي وأنت الأب المثالي ....**

**لو كان للحب وساماً فأنت بالوسام جدير ...**

**والدي العزيز**

**لأجلكم رسمت حرفي بضوء حبري ...**

**ونقشت حبكم في جوف عمقي ...**

**ولأنني أحبكم أهدي لكم ثمرة جهدي ...**

**إخوتي وأخواتي**

**إلى من حبه يجري في عروقي ويلهج بذكره فؤادي ...** **خالي ناظم**

**لارة**

## إقرار المشرف على الرسالة

أشهد أنّ إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية .

التوقيع :
المشرف : د. محمد خليفة خضير
اللقب العلمي : أستاذ
كلية العلوم / جامعة ديالى
التاريخ : / 12 / 2014

## توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة أرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :
الأسم : د. مثنى محمد ابراهيم
اللقب العلمي : مدرس
رئيس لجنة الدراسات العليا
التاريخ : / 12 / 2014

بسم الله الرحمن الرحيم

## إقرار الخبير اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ ( **دراسة الانماط المصلية وعوامل الضراوة لبكتريا*E.coli* المعزولة من حالات خمج المجاري البولية لدى النساء في محافظة ديالى** ) التي قدمتها طالبة الماجستير **(لارة محمود شفيق السوره ميري)** قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصحح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الامر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

**التوقيع:**

**الأسم:**

**التأريخ:**

بسم الله الرحمن الرحيم

## إقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ ( **دراسة الانماط المصلية وعوامل الضراوة لبكتريا*E.coli* المعزولة من حالات خمج المجاري البولية لدى النساء في محافظة ديالى** ) التي قدمتها طالبة الماجستير ( **لارة محمود شفيق السوره ميري** ) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

**التوقيع:**

**الأسم:**

**التأريخ:**

## إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة التقويم والمناقشة, اننا اطلعنا على الرسالة الموسومة ( **دراسة الانماط المصلية وعوامل الضراوة لبكتريا *E.coli* المعزولة من حالات خمج المجاري البولية لدى النساء في محافظة ديالى** ) وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية وبدرجة ( إمتياز ).

رئيس اللجنة

التوقيع :

الأسم : د. عباس عبود فرحان

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / 12 / 2014

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم : د. حميد مجيد جاسم

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / 12 / 2014

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم : د. كريم ابراهيم مبارك

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / 12 / 2014

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :

الأسم : د. محمد خليفة خضير

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / 12 / 2014

**مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة**

التوقيع :

الأسم : د. عباس عبود فرحان

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / 12 / 2014

# المحتويات


| التسلسل | الموضوع | الصفحة |
|---|---|---|
| **الفصل الاول : المقدمة** | | |
| **-1** | **المقدمة** | **1** |
| **الفصل الثاني : استعراض المراجع** | | |
| **-2** | **استعراض المراجع** | **3** |
| **1.2** | إلتهاب الجهاز البولي | **3** |
| **2.2** | تصنيف التهابات المسالك البولية | **4** |
| **3.2** | المسببات البكتيرية لأخماج المجاري البولية | **4** |
| **4.2** | الصفات العامة والمزرعية لبكتيريا الإشيريشيا القولونية | **5** |
| **1.4.2** | تصنيف بكتيريا الاشريشيا القولونية | **6** |
| **2.4.2** | وبائية بكتيريا الاشريشيا القولونية | **7** |
| **3.4.2** | إمراضية بكتيريا الاشريشيا القولونية | **8** |
| **4.4.2** | التركيب المستضدي لبكتيريا الاشريشيا القولونية | **9** |
| **5.4.2** | تركيب الجدار الخلوي لبكتيريا الاشريشيا القولونية | **11** |
| **1.5.4.2** | مكونات متعدد السكريد الشحمي | **11** |
| **5.2** | عوامل الضراوة | **13** |
| **1.5.2** | الإلتصاق | **13** |
| **2.5.2** | إنتاج الهيمولايسين | **14** |
| **3.5.2** | انزيم اليوريز | **16** |
| **4.5.2** | البكتيريوسين | **16** |

| | | |
|---|---|---|
| **5.5.2** | الغشاء الحيوي | **18** |
| **6.2** | إنزيمات البيتالاكتام | **19** |
| **1.6.2** | إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف | **21** |
| **2.6.2** | إنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية | **22** |
| **7.2** | حساسية بكتريا الإشريشيا القولونية لمضادات الحياة | **22** |
| **1.7.2** | مضادات البيتالاكتام | **24** |
| **1.1.7.2** | البنسلينات | **24** |
| **2.1.7.2** | السيفالوسبورينات | **25** |
| **3.1.7.2** | مضادات المونوباكتام | **25** |
| **4.1.7.2** | مضادات الكربابنيم | **25** |
| **2.7.2** | مضادات الامينوكلايكوسيدية | **25** |
| **3.7.2** | مضادات الكوينولينات | **26** |
| **4.7.2** | السلفوناميد والترايمثبريم | **26** |
| **5.7.2** | مضاد الكلورامفينيكول | **26** |
| **8.2** | آليات مقاومة بكتريا الاشريشيا القولونية للمضادات الحيوية | **27** |
| **الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل** | | |
| **3-** | **المواد وطرائق العمل** | **29** |
| **1.2.3** | تحضير المحاليل والكواشف | **34** |
| **1.1.2.3** | المحلول الملحي الفسلجي | **34** |
| **2.1.2.3** | محلول ثابت العكرة القياسي | **34** |
| **3.1.2.3** | محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز | **35** |
| **1.3.1.2.3** | محلول النشأ | **35** |
| **2.3.1.2.3** | محلول اليود | **35** |
| **3.3.1.2.3** | محلول البنسلين جي | **35** |

| | | |
|---|---|---|
| **4.1.2.3** | محلول ملحي مستعمل في جهاز VITEK2 | **36** |
| **5.1.2.3** | محلول الفورمالديهايد (10%) | **36** |
| **6.1.2.3** | محلول البلور البنفسجي | **36** |
| **7.1.2.3** | محلول صبغة السفرانين | **36** |
| **8.1.2.3** | محلول EDTA | **36** |
| **2.2.3** | الكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا | **37** |
| **1.2.2.3** | كاشف أنزيم الكاتاليز | **37** |
| **2.2.2.3** | كاشف ألاوكسيديز | **37** |
| **3.2.2.3** | كاشف كوفاك | **37** |
| **4.2.2.3** | كاشف أحمر المثيل | **37** |
| **5.2.2.3** | كاشف فوكس بروسكور | **38** |
| **3.2.3** | الاوساط الزرعية | **38** |
| **1.3.2.3** | وسط أكار الدم | **38** |
| **2.3.2.3** | وسط غراء الماكونكي | **38** |
| **3.3.2.3** | وسط نقيع القلب والدماغ السائل | **39** |
| **4.3.2.3** | وسط نقيع القلب والدماغ الصلب | **39** |
| **5.3.2.3** | وسط أكار اليوريا | **39** |
| **6.3.2.3** | وسط ماء الببتون | **39** |
| **7.3.2.3** | وسط الحركة | **39** |
| **8.3.2.3** | وسط الكونكوريد اكار | **39** |
| **9.3.2.3** | وسط غراء الزايلوز لايسين ديوكسي كوليت | **40** |
| **10.3.2.3** | وسط مثيل الأيوسين الأزرق | **40** |
| **11.3.2.3** | وسط التربتكيز صويا اكار | **40** |
| **12.3.2.3** | وسط أكار الكلغلر | **40** |

| | | |
|---|---|---|
| **13.3.2.3** | حفظ وإدامة العزلات الجرثومية | **41** |
| **3.3** | جمع العينات | **41** |
| **4.3** | زرع العينات | **42** |
| **5.3** | تشخيص العزلات البكتيرية | **42** |
| **1.5.3** | التشخيص المظهري والصفات الزرعية | **42** |
| **2.5.3** | الفحص المجهري | **42** |
| **3.5.3** | النمو على وسط غراء الزايلوز لايسين دوكسي كوليت (XLDA) | **43** |
| **4.5.3** | الفحوصات الكيموحيوية | **43** |
| **1.4.5.3** | إختبار أنزيم الكاتاليز | **43** |
| **2.4.5.3** | إختبار أنزيم الاوكسيديز | **43** |
| **3.4.5.3** | إختبار الاندول | **44** |
| **4.4.5.3** | إختبار أحمر المثيل | **44** |
| **5.4.5.3** | إختبار فوكس بروسكاور | **44** |
| **6.4.5.3** | إختبار استهلاك السترات | **44** |
| **7.4.5.3** | فحص تخمر السكريات وإنتاج $H_2S$ و $CO_2$ | **45** |
| **8.4.5.3** | إختبار الحركة | **45** |
| **5.5.3** | تشخيص البكتريا بإستخدام عدة التشخيص Api 20E Kit | **45** |
| **6.5.3** | تشخيص البكتريا بنظام VITEK 2 | **48** |
| **6.3** | الإختبار المصلي | **50** |
| **7.3** | التحري عن بعض عوامل الضراوة في البكتريا | **51** |
| **1.7.3** | التحري عن إنتاج الهيمولايسين | **51** |
| **2.7.3** | اختبار إنتاج البكتريوسين | **52** |
| **3.7.3** | اختبار إنتاج أنزيم اليوريز | **52** |
| **4.7.3** | اختبار تكوين الغشاء الحيوي | **52** |

| | | |
|---|---|---|
| **8.3** | فحص الحساسية للمضادات الحيوية | **54** |
| **9.3** | التحري عن إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز | **55** |
| **1.9.3** | تحضير العالق البكتيري | **55** |
| **2.9.3** | استخدام طريقة اليود القياسية السريعة | **55** |
| **3.9.3** | التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) | **56** |
| **4.9.3** | التحري عن قابلية البكتريا لانتاج انزيم الميتالوبيتالاكتميز بأستخدام طريقة اتحاد المضاد الحيوي EDTA – IPM | **57** |
| **10.3** | التحليل الإحصائي | **57** |
| | الفصل الرابع : النتائج والمناقشة | |
| **-4** | النتائج والمناقشة | **58** |
| **1.4** | عزل وتشخيص بكتيريا الاشريشيا القولونية | **58** |
| **1.1.4** | جمع العينات وعزلها | **58** |
| **2.1.4** | تشخيص العينات | **59** |
| **2.4** | التنميط السيرولوجي لعزلات بكتيريا الاشريشيا القولونية | **63** |
| **3.4** | التحري عن عوامل الضراوة | **65** |
| **1.3.4** | إنتاج الهيمولايسين | **65** |
| **2.3.4** | إنتاج البكتريوسين | **65** |
| **3.3.4** | إنتاج الغشاء الحيوي | **66** |
| **4.4** | التحري عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز | **69** |
| **5.4** | التحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف | **70** |
| **6.4** | التحري عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية | **71** |
| **7.4** | إختبار حساسية البكتريا للمضادات الحياتية | **73** |
| **8.4** | المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية | **77** |
| | **الاستنتاجات والتوصيات** | |

| | | |
|---|---|---|
| | الإستنتاجات | **80** |
| | التوصيات | **81** |
| **المصادر** | | |
| | المصادر العربية | **82** |
| | المصادر الاجنبية | **87** |
| | **الخلاصة باللغة الانكليزية** | **A** |

# قائمة الجداول


| التسلسل | العنوان | الصفحة |
|---|---|---|
| 1.2 | تصنيف بكتيريا الاشريشيا القولونية | 6 |
| 1.1.3 | الأجهزة | 29 |
| 2.1.3 | المواد الكيميائية والبايولوجية | 30 |
| 3.1.3 | الأوساط الزرعية ألمستخدمة | 31 |
| 1.4.1.3 | أقراص المضادات الحيوية المستخدمة لقياس حساسية بكتيريا *E.coli* | 32 |
| 5.5.3 | تشخيص البكتيريا باستخدام عدة التشخيص Api 20E Kit | 47 |
| 6.5.3 | تشخيص البكتريا بنظام VITEK 2 | 49 |
| 1.4 | الأعداد والنسب المئوية للبكتيريا المعزولة لعينات الدراسة | 59 |
| 2.4 | الفحوصات الكيموحيوية لبكتيريا *E.coli* المعزولة من المجاري البولية لدى النساء | 60 |
| 3.4 | العينات الموجبة لبكتيريا *E.coli* بحسب الفئات العمرية | 61 |
| 4.4 | أعداد ونسب عزلات بكتيريا *E.coli* المعزولة من النساء في الريف والمدينة | 62 |
| 5.4 | أعداد ونسب بكتيريا *E.coli* المعزولة من النساء الحوامل والمتزوجات والباكرات المصابات بخمج المجاري البولية | 63 |
| 6.4 | الأنماط السيرولوجية لبكتيريا *E.coli* المعزولة من نساء مصابات بخمج المجاري البولية | 64 |
| 7.4 | امتلاك العزلات قيد الدراسة لعدد من عوامل الضراوة والنسب المئوية لها | 68 |
| 8.4 | امتلاك عزلات بكتيريا *E.coli* لإنزيمات البيتالاكتيميز والواسعة الطيف والمعدنية ونسبها | 72 |
| 9.4 | النسب المئوية لحساسية بكتيريا *E.coli* للمضادات الحيوية المختلفة | 76 |
| 10.4 | المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي اظهرتها عزلات بكتريا *E.coli* | 78 |
| 11.4 | تقسيم العزلات المحلية لبكتريا *E.coli* الى مجموعتين على أساس عدد المضادات التي قاومتها | 79 |

# قائمة الأشكال


| التسلسل | العنوان | الصفحة |
|---|---|---|
| 1.4 | التحري عن إنتاج الغشاء الحيوي لبكتيريا *E.coli* المعزولة من النساء المصابات بخمج المجاري البولية بالطرائق المختلفة | 68 |
| 2.4 | التحري عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز لبكتيريا *E.coli* المعزولة من المجاري البولية | 72 |
| 3.4 | النسب المئوية لمقاومة بكتيريا *E.coli* لمضادات الحياة | 76 |

# قائمة ألمختصرات ألواردة في ألرسالة

| Abbreviation | Key |
|---|---|
| AE | Attachment and effacement lesion |
| API | Analytical Profile Index |
| ATP | Adinoseen Tryiphosphste |
| BBB | Blood–brain barrier |
| β-Lactamase | Beta Lactamase |
| cGMP | Cyclic Guanosin Monophosphate |
| CRA | Congo_Red Agar |
| DHFR | Dihydrofolatereductase |
| DNA | Deoxy Ribo Nucleic acid |
| DHPS | Dihydropteroate Synthetase |
| *E.coli* | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid |
| EHEC | Enterohemorrhagic *E. coli* |
| EIEC | Enteroinvasive E.coli |
| ELISA | *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* |
| EMB | Eosin methyline blue |
| EPEC | Enteropathogenic *E. coli* |
| ESBLs | Extended Spectrum β – Lactamases |
| EXPEC | Extraintestinalpathogenic *E. coli* |
| H-Ag | H Antigen |
| IPM | Imipenem |
| K-Ag | K Antigen |
| KDO | Keto-3-deoxy-D-mannooctulosonic |
| KIA | Kligler`s Iron Agar |
| *K.pneumoniae* | *Klebsiella pneumoniae* |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LT | Heat –Labile Enterotoxin |

| | |
|---|---|
| MβL | Metallo – β- Lactamase |
| MR/VP | Methyl red / Voges –Proskaur |
| MTP | *Microtiter Plate* |
| NAG | Phosphorylated N-acetyl glucosamine |
| NCCLs | National Committee for Clinical Laboratory Standard |
| NDM-1 | Newdelhimetallo-β- Lactamase |
| O-Ag | O Antigen |
| OPS | O – Specific polysaccharide |
| *P.aeruginosa*e | *Pseudomonas aerogenosae* |
| PBPs | Penicillin – Binding Protiens |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| RBC | Red Blood cell |
| SHV | Sulfohydro variable |
| ST | Heat−Stable Enterotoxin |
| TEM | Temonera |
| TSA | Trypticase Soy Agar |
| UPEC | Uropathogenic Escherichia coli |
| UTI | Urinary Tract Infection |
| WHO | World Health Organization |
| XLD | Xylose lysine deoxycholate agar |

# قائمة الملاحق


| التسلسل | العنوان | الصفحة |
|---|---|---|
| **1** | إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى والبيئة | 109 |
| **2** | جهاز VITEK 2 المستعمل لتشخيص البكتريا | 110 |
| **3** | أشرطة التشخيص بجهاز VITEK2 والمكون من 64 إختبار كيموحيوي | 110 |
| **4** | حساسية بكتيريا *E.coli* للمضادات الحياتية | 111 |
| **5** | إنتاج بكتيريا *E.coli* للبكتيريوسين | 116 |
| **6** | إنتاج بكتيريا *E.coli* للغشاء الحيوي بالطرائق الثلاث | 117-116 |

# الخلاصة

شملت هذه الدراسة 350 عينة إدرار وسطي ومنها تم الحصول على 100عزلة من بكتريا الاشريشيا القولونية المعزولة من النساء المصابات بالتهابات المجاري البولية في مستشفى خانقين العام, ومستشفى بعقوبةالتعليمي,ومستشفى البتول للولادة والأطفال في محافظة ديالى من الفترة 2013/10/15 ولغاية 2014/2/18 وتم التأكد من التشخيص بوساطة جهاز VITEK2 بعداستخدام نظام API-20Eوإجراء الإختبارات الزرعية,والمصلية, والمجهرية, والكيموحياتية.

أجري أختبار التلازن المصلي لمعرفة النمط المصلي لعزلات *Escherichia coli* المعزولة من الإدرار وقد أعطت 19عزلة منها وبنسبة 19% نتيجة موجبة للأمصال متعددة التكافؤ O26 , O55 , O111 , O119 , O126.

أظهرت النتائج قابلية 57 عزلة بكترية على إنتاج الهيمولايسين وبنسبة 57%, وإنتاج البكتريوسين شكل نسبة71% .

تم الكشف عن قابلية العزلات على إنتاج الغشاء الحيوي بثلاث طرائق هي طريقة الاليزا والأنابيب وأحمر الكونغو, اذ شكل نسبة 90% و 83% و78% على التوالي.

أظهرت النتائج قدرة بكتريا *E.coli* على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز بطريقة اليود القياسية السريعة بنسبة 88%, وإنتاجها لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بطريقة الأقراص المتاخمة Disc Approximation بنسبة 4% وإنتاجها لإنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية بطريقة IMP-EDTA combination disc بنسبة 2% .

أظهرت العزلات حساسية تجاه 16 مضاداً حيوياً إذ أظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة لمضاد Augmentin , Aztreonam , Ampicillin , Co-trimoxazole , Chloramphenicol بنسبة 100% و 93% و 92 % و 89% و 86% على التوالي .

أظهرت العزلات حساسية عالية لمضاد Ceftazidime , Gentamycin , Ciprofloxacin , Cefixime اذ بلغت نسبة مقاومة البكتريا لهذه المضادات41% و 38% و 35% و 30%, بينما أظهر مضاد Tobramycin و Imipenem حساسية عالية جداً وبنسبة 80% و100%.

أظهرت العزلات نمط مقاومة متعددة للمضادات الحياتية ضمت مجموعتين الأولى 69 عزلة وبنسبة 69% أظهرت مقاومة لـ 6–10 مضادات, أما المجموعة الثانية التي ضمت 31 عزلة وبنسبة 31% كانت مقاومة لـ 11–15 مضاداً.

# الشكر و التقدير

الحمد لله على ما عرفنّا من نفسه، وألهمنا من شكره وفتح لنا من أبواب علمه اللهم إني أحمدُكَ أرضى الحمد لك، وأحب الحمد إليك، وافضلَ الحمدَ عندك، حمداً لا ينقطع عددُهُ، ولا يفنى مددُهُ وأسألك المزيد من صلواتك وسلامك على مصدر الفضائل الذي ظل ماضياً على نفاذِ أمرك، حتى أضاءَ الطريق للخلق، وهدى الله به القلوب، وأقام به مُوضحاتِ الأعلام سيدنا محمد بن عبد الله افضل خلق الله، وأكرمهم عليه، وأعلاهم منزلة عنده، صلى الله عليه وعلى صحابته الأخيار، وآله الأبرار، أما بعد...

وانا اشارف على اكمال وانجاز هذه الرسالة ، ارجو من الله سبحانه وتعالى ان يجعلها سبيلا لخدمة مسيرة العلم والمعرفة وان يجعلها سببا في خدمة الإنسانية, لا يسعني وأنا أنهي السطور الاخيرة من رسالتي إلا أن أتقدم بالشكر والتقدير الجزيلين لاستاذي الفاضل الدكتورمحمد خليفة خضير على اقتراحه موضوع الرسالة واشرافه عليه فقد كان له الفضل في المتابعة وبذل الجهد واسداء النصيحة والتوجيه طوال مدة إعداد هذه الرسالة ولقد كان لحرصه الشديد وعينايته أثراً كبيراً في أن تظهر هذه الرسالة بهذا الشكل.

كما أتقدم بشكري وإمتناني الكثيرين لعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة المتمثلة بالأستاذ الدكتور عباس عبود فرحان ورئاسة قسم علوم الحياة ومنتسبيه، وأخص بالذكر الدكتور نجم عبد الله الزبيدي, والست شفاء وليد لما أبدوه من تسهيلات ومساعدات خلال مدة الدراسة.

أتوجه بشكري وتقديري الى منتسبي مستشفى خانقين العام جميعاً وكافة المختبرات في خانقين وأخص بالذكر البكتريولوجي أحمد حسن سعيد, والسيدة حلا علي سلمان ومنتسبي شعبة البكتريولوجي/مستشفى بعقوبة العام وخاصة السيدة ثريا كاظم، والسيدة الاء محمد محمود ومنتسبي مختبرات مستشفى البتول كافة, كما اتقدم بالشكر الجزيل للأخ الفاضل مصطفى سعد عبد الرحمن لما قدموه لي من العون والمساعدة وتعاونهم معي .

بمزيج من الثناء والعرفان إلى زميلاتي وزملائي طلبة الدراسات العليا وخاصة الطالبتين شهد نزار مصطفى ورنا صلاح مهدي, متمنية لهم الموفقية والنجاح, وأخيراً أقدم شكري العميق الى عائلتي العزيزة داعيةً من الباري (عزوجل) أن يمنَ عليهم بالصحة والعافية, وأشكر كل من مدّ لي يد العون والمساعدة ولو بكلمة أضاءت في طريقي نور الأمل لإتمام هذه الرسالة, عسى الله أن يجزي الجميع عني خير الجزاء والتمس العذر لمن فاتني شكرهم .

.

**لارة**

# المقدمة

# Introduction

# استعراض المراجع

# Literature Review

# المواد وطرائق العمل

# Materials & Methods

# النتائج و المناقشة

# Results & Discussion

# الاستنتاجات والتوصيات

# Conclusions

# &

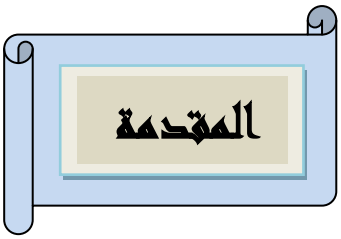
# Recommendations

# المصادر

# References

# الملاحق

# Appendix




## 1- المقدمـــة

يعد خمج المجاري البولية Urinary Tract Infection (UTI) من أكثر الإصابات الجرثومية الشائعة التي تصيب الأنسان (AlMudena وآخرون, 2014).

تعد *Escherichia coli* التابعة للعائلة المعوية من البكتيريا الشائعة التي تتوافر في أمعاء حيوانات مختلفة ومن ضمنها الأنسان, قسم من هذه السلالات التابعة لهذا النوع هي ممرضة اذ إن بعضها تسبب أمراضاً خطيرة وقاتلة للبشر (Belanger وآخرون, 2011).

تعد هذه البكتيريا السبب الرئيس لأغلب إصابات المسالك البولية وبنسبة (80%) كما إنها تسبب العديد من الأمراض الأخرى منها تسمم الدم, والإسهال, وكذلك إلتهاب السحايا الولادي (Nerino وآخرون, 2013).

تعد *Escherichia coli* Uropathogenic (UPEC) من أهم العوامل المسببة لإلتهابات المسالك البولية وهي تستغل عوامل الضراوة المتمثلة بالأهلاب والأسواط لتتمكن من إستعمار هذه المنطقة, إذ تستخدم هذه الأسواط للإنتقال من الإحليل الى المثانة ومن ثم تصعد الى الحالب والكلى (Rachel وآخرون, 2013).

كان لإكتشاف مضادات الحياة الأهمية الكبرى في علاج الإصابة بالمسالك البولية, وقد وجد عند فرط إستخدام المضاد الحياتي بشكل عشوائي يؤدي الى ظهور سلالات مقاومة للمضادات الحياتية, وعادة تتناسب صفة المقاومة طردياً مع الزيادة في إستعمال هذه المضادات, إذ إن ظهور سلالات مقاومة للمضادات الحياتية أدى الى الحاجة للتفكير بإستعمال أساليب علاجية أخرى لاسيما المعززات الحياتية Probiotic التي تعمل على تعزيز النبيت الطبيعي Normal flora في الأمعاء والقناة البولية ومن ثم الحماية من حدوث الإسهال وخمج المسالك البولية والأمراض الأخرى ( أحمد, 2008).

تمتلك بكتريا الاشريشيا القولونية العديد من عوامل الضراوة والتي تكون السبب في إمراضيتها ومن أهم هذه العوامل إمتلاكها المستضدات وقدرتها على الإلتصاق وكذلك إنتاجها لأنزيمات البيتالاكتميز وإنتاجها للهيمولاسين والبكتيريوسين وغيرها من عوامل الضراوة الأخرى (الجميلي, 2005 ; Daniel وآخرون, 2013).

سلالات *E.coli* تتميز بأنماطها المصلية بالإعتماد على مستضداتها السطحية التي هي المستضد السوطي H والمستضد الجسمي O وأحياناً المستضد المحفظي K, إذ وجد بأن هناك 1740 نمطاً مصلياً تابعة *E.coli* ( Liu وآخرون, 2008).

النمط المصلي O لسلالة UPEC ترتبط بعوامل ضراوة معينة بكل سلالة بكتيرية, واوضحت الدراسات بأن أهم الأنماط المصلية التابعة لسلالةUPEC هي: O1,O2,O4,O6,O7,O8,O15,O16,O18,O21,O22,O25,O75andO83 (Yamanoto, 2007 ; Abe وآخرون, 2008).

تختلف نسبة الإصابات بالمجاري البولية بهذه الجرثومة على مستوى العالم وعلى مستوى الوطن العربي اذ بلغت نسبة *E.coli* المعزولة من النساء المصابات UTI في منطقة كانبور في الهند77.27% وفي الخرطوم 65.1% وفي نيجيريا50.8% وفي غانا37.5% وفي جنوب أثيوبيا26.1%.

(Endale وآخرون, 2014 ; Onoh وآخرون, 2013 ; Agersew وآخرون, 2012; Ibrahim وآخرون, 2012).

**نظرا لقلة الدراسات حول دور الأنماط المصلية لهذه البكتيريا في إحداث الإصابة في محافظة ديالى لذا هدفت هذه الدراسة الى :-**

1- عزل وتشخيص بكتيريا *E.coli* من النساء المصابات بخمج المجاري البولية في محافظة ديالى .

2- تحديد النمط المصلي الأكثر شيوعا لبكتيريا *E.coli* في إحداث الإصابة.

3- دراسة بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه البكتيريا.

4- تحديد حساسية بكتيريا *E.coli* لبعض المضادات الحياتية .

## 2- إستعراض المراجع

### 2-1 إلتهابات الجهاز البولي Urinary Tract Infections :

يعرّف إلتهاب المجاري البولية على إنه وجود الممرضات في الإدرار بوجود أو عدم وجود أعراضاً للإلتهاب، وهذا التعريف يكون عام ويشمل إلتهاب المثانة وإلتهاب الكلية.أو يعرّف بأنه عزل الكائن المجهري من عينة الأدرار إعتماداً على أعراض المرض, كما ويعرّف بأنه الظرف الذي يتم فيه تكاثر الكائن المجهري وزيادة عدده في الجهاز البولي (السلامي, 2005).

تتمثل إصابة النساء بإلتهابات المجاري البولية بإصابة القناة البولية السفلى lower urinary tract وكذلك بإصابة الإحليل والمثانة والحالب، قد تحدث الإصابة في هذه المواقع بصورة منفصلة عن بعضها ، أو قد تحدث بشكل مجتمع مصحوبة بظهور أعراض أو عدمها، تحدث الـ UTI نتيجة لدخول الممرضات ويُعّد وجود أكثر من $10^5$ / سم3 من الممرضات في الإدرار الوسطي دليل على وجود الإصابة، كما وإن 30% من الممرضات تُكتسب من مصادر خارجية و تُشفى تلقائياً (الجمالي, 2005).

كما إن هناك أنواع مختلفة من الممرضات من الممكن أن تحدث الإصابة وأكثرها شيوعاً هي البكتريا السالبة لصبغة كرام والمتمثلة ببكتريا القولون *Escherichia coli* حيث تشكل 80%, هذا فضلاً عن المتقلبات .*Proteus* spp و .*Klebsiella* spp و .*Serratia* spp و .*Enterococcus* spp و .*Pseudomonas* spp وهذه الجراثيم مقاومة للمضادات الحيوية مما يسبب عودة الإصابة وصعوبة الشفاء, تلعب البكتريا الموجبة لصبغة كرام دوراً أقل في UTI كما *Staphyloccus saprophyticus* التي تمثل 10-15% من الحالات الحادة للـ UTI والمصحوبة بأعراض خاصةً لدى الشابات , تحدث المكورات المسبحية .*Enterococcus* spp إلتهابات المثانة وتساهم مع المكورات العنقودية الذهبية في تكوين حصى الكلية، ويعد عزل جرثومة *Staphyloccus aureus* دليلاً على حدوث إلتهابات الكلية (Braunwald وآخرون,2001).

## 2-2 تصنيف إلتهابات المسالك البولية Classification of UTIs :

تصنف إلتهابات المسالك البولية UTIs إلى عدة مجاميع أهمها إلتهاب المثانة الحاد, إلتهاب المثانة المتكرر ، إلتهاب الكلى الحاد ، إلتهاب المسالك البولية في المرضى المستخدمين للقسطرة, مرضى الإصابة البكتيرية للبول بدون أعراض, مرضى الإصابة البكتيرية للبول المزمن , إلتهاب الإحليل وإلتهاب البروستات (آل سماعيل, 2007) .

## 3-2 المسببات البكتيرية لأخماج المجاري البولية Etiology of bacterial UTIs :

هنالك العديد من الأنواع البكتيرية المسببة لأخماج المجاري البولية التي تختلف حسب مقاومة المريض ونوع الإصابة، وتشترك البكتيريا بنوعيها السالبة والموجبة لصبغة غرام في إحداث الإصابة, إلا إن البكتيريا العصوية السالبة لصبغة غرام العائدة إلى العائلة المعوية هي من أكثر الأنواع البكتيرية المسببة لهذه الأخماج لكونها أكثر أنواع البكتيريا السائدة ضمن الفلورا الطبيعية Normal flora والمتواجدة في أمعاء الشخص المصاب لذا تعرف بالأخماج داخلية المنشأ Endogenous infections، إضافة إلى البكتيريا المكتسبة من البيئة الملوثة المحيطة بالشخص المصاب والذي يعرف بالأخماج خارجية المنشأ Exogenous infections (أحمد, 2008).

من أهم العصيات البكتيرية السالبة لصبغة غرام *Escherichia coli* وهي المسؤولة عن 80% تقريباً من حالات الإصابة بالـ UTI ، أما العصيات الأخرى السالبة لصبغة كرام مثل *Proteus spp* و*Enterobacter spp.* وبكتيريا *Pseudomonas spp.* فهي تعّد من المسببات الأخرى لأخماج القناة البولية أما المكورات الموجبة لصبغة كرام مثل بكتيريا *Staphylococcus spp.* و*Enterococcus* (طعمة, 2006 ; النقيب, 2009).

تعّد بكتيريا *Klebsiella pneumonia* من الجراثيم المسببة للإلتهابات المكتسبة من المستشفيات للإنسان, في حين تؤدي بكتيريا *Proteus spp.* دوراً هاماً في تكوين الحصى (خورشيد, 2005)

تعّد البكتيريا اللاهوائية الإجبارية في حالات نادرة من المسببات الأخرى لـ UTI مثل بكتيريا *Bacteriodes fragilis* وبكتيريا *Peptostreptococci spp* , ومن الممرضات الأخرى *Chlamydia trachomatis* و *Mycobacterium tuberculosis* و

*Gardnerela vaginalis* و *Mycoplasma spp.* و *Trichomonas vaginalis* و *Nocardia asteroids* بإمكانها أيضاً إحداث الإصابة, وتعّد *Candida albicans* من الخمائر الشائعة لأمراض القناة البولية التناسلية Genitourinary tracts، حيث تمثل جزءاً من الفلورا الطبيعية للأغشية المخاطية وهي غير مرضية عادةً ، وإن عملية التفاعل بين الأعداد الكبيرة من البكتيريا و أعداد هذه الخمائر القليلة تؤدي إلى التوازن البيئي بين هذه المجاميع ، وعند إختلال ذلك التوازن يسبب الإصابة (خورشيد, 2005) .

## 4-2 الصفات العامة والمزرعية لبكتيريا الإشيريشيا القولونية:

تنتمي هذه البكتيريا إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae التي تضم أجناس أخرى مثل *Citrobacter* و *Salmonella* و *Proteus* و *Klebsiella* و *Morganella* وغيرها من الأجناس (Reddy, 2010).

وصفها لأول مرة العالم Theoder Escherich عام 1885 في ألمانيا وسميت Bacterium coli وهي معروفة الأن بإسم *Escherichia coli*, وقد عزلت من براز أطفال أصحاء لذلك عدت كجراثيم متعايشة غير مرضية أنذاك Non pathogenic , وفي عام 1894 تمكن العالم Escherich من عزل هذه البكتيريا من إدرار فتيات مصابات بإلتهاب المجاري البولية UTI (رؤوف, 2013).

تمتاز هذه البكتريا بكونها عصوية, سالبة لصبغة كرام، غير مكونة للأبواغ, هوائية Aerobe أو لا هوائية إختيارية Facultative anaerobe, متحركة لإمتلاكها أسواط محيطية، تمتلك بعض سلالاتها المحفظة، يبلغ طولها (1–3 ميكرون) وعرضها (0.6 ميكرون), وتتميز بقابليتها على تخمير سكر اللاكتوز والكلوكوز والمالتوز, ودرجة الحرارة المثلى لنموها 37°م، تنمو على الأوساط الزرعية الإعتيادية دون الحاجة إلى إضافة الدم أو المصل (AL-Zubaidy, 2005 ; Maulood , 2008).

تنمو على وسط أغار الماكونكي وتكّون مستعمرات محدبة ملساء ذات نهايات واضحة بلون وردي نتيجة لتخميرها سكر اللاكتوز, بعض من سلالاتها تحلل الدم تحللاً من النوع الكامل (أحمد, 2008).

تنمو أيضاً على الأوساط التفريقية مثل وسط ( EMB ) Eosin methyline blue التي تعطي بريقاً معدنياً لماعاً يسمى metallic sheen (الجلبي, 2008 ; العلواني, 2006).

تظهر هذه المستعمرات بلون أصفر على وسط أغار الزايلوز لايسين ديوكسي كوليت Xylose lysine deoxycholate agar ( XLD) (الخفاجي, 2010) .

هذه البكتريا توجد بصورة تعايشية في أمعاء الانسان ويطلق عليها إسم الممرض الإنتهازي أثناء إنتقالها من مكانها الطبيعي إلى مكان أخر مسببة العديد من الأمراض كإلتهاب المجاري البولية والسحايا (Sharma وآخرون,2007).

### 1-4-2 تصنيف بكتيريا الإشيريشيا القولونية *Escherichia coli* :Classification of

صنفت بكتريا *E.coli* بأنظمة تصنيفية وقد صنفها الباحث George وأخرون كالأتي: ( George وآخرون, 2007). كما هو في الجدول (2−1).

الجدول (2-1) تصنيف بكتريا الإشيريشيا القولونية

| | |
|---|---|
| Kingdom | Bacteria |
| Phylum | Proteobacteria |
| Class | Gammaproteobacteria |
| Order | Enterobacteriales |
| Family | Enterobacteriaceae |
| Genus | *Escherichia* |

يضم جنس الإشيريشيا الأنواع الآتية :

*E. coli, E. hermannii, E. fergusonii, E. vulneris and E. blattae* .

## 2-4-2 وبائية بكتيريا الإشيريشيا *Escherichia coli* Epidemiological of:

تتوافر البكتيريا المعوية في القناة الهضمية طبيعياً بعد أيام قليلة من الولادة مكونة النبيت الطبيعي Normal flora في الأمعاء وتشكل *E.coli* الجزء الرئيسي منها, بعض سلالاتها لها القابلية على أن تصبح إنتهازية وتسبب أمراضاً مختلفة عند إنتقالها من موضعها الأصلي (الأمعاء) إلى الأعضاء الأخرى مثل القناة البولية وقناة الصفراء أو أي عضو في التجويف البطني وخاصة عندما تتوفر الظروف المناسبة لنموها مثل ضعف المناعة ( العتبي, 2013 ).

أوضح الباحث (Seely وآخرون, 1992) في دراسته الى ان الإصابة بالـ UTIs تتمثل في النساء بصورة رئيسة بالتهاب المثانة المصحوب بأعراض أهمها عسر البول dysuria مع ألم ، والحاجة الى التبول urination وتواجد الخلايا القيحية في الادرار، ويعود السبب في ذلك الى قصر إحليل المرأة البالغ (2) انج في الطول، وقرب فتحة المخرج من فتحة البول .

كما أشار الباحث (Braunwald وآخرون, 2001) الى ان الإصابة بـ UTIs تشكل نسبة 2–8% في النساء الحوامل اي زيادة نسبة إلتهابات المجاري البولية في الحوامل أكثر من غير الحوامل والباكرات، ويعود السبب في ذلك الى ضغط الرحم على الحالب أثناء الحمل، قد يؤدي إلى ركود البول، ومن ثم حدوث الالتهاب، خاصة التهاب الكلى البكتيري، أو ما يسمى بـ Pyelonephirtis (آل سماعيل, 2007) .

أجرى الباحث Stamm وآخرون في سنة 1989 دراسة لمعرفة المسبب الحقيقي لظهور عسر البول الحاد في الشابات إذ كان يوصف قبل هذه الدراسة بأنه إلتهاب مثانة حاد أو إحليل حاد ، ويفرق بينهما إعتماداً على زرع الإدرار الوسطي وعدد الخلايا.

كذلك اوضحت الباحثة (Alhason, 2010) الى ان نسبة بكتيريا *E.coli* التي عزلت في المدينة كانت نسبة قليلة جداً ويعود السبب في نسبة انتشار بكتيريا *E.coli* في الريف أعلى منه في المدينة الى قلة الرعاية الصحية, وإنخفاض الوعي الصحي, والثقافي, وقلة وجود شبكات الماء الصالح للشرب, وكذلك إنعدام شبكات الصرف الصحي (Levy وMarshall, 2004).

أشارت الدراسات الى ان نسبة الاصابة بال UTI تختلف بحسب الفئات العمرية اذ وجدت الباحثة (دخيل و تكتوك, 2009) ان الفئة العمرية من 26–35 سنة هي الفئة الأكثر أصابة ب

UTI وشكلت نسبة 47.5% مقارنة ببقية الفئات العمرية الأقل من 26 والأكثر من 35 سنة, كما أوضح الباحث (زهران، 1995) في دراسته الى ان فئة البالغين هي أعلى الفئات العمرية في نسبة الاصابة اذ شكلت 37.19%.

توجد الجرثومة بشكل طبيعي في أمعاء الإنسان والحيوانات وكذلك توجد في التربة والمياه السطحية ودائماً وبشكل ثابت في براز الإنسان والحيوانات وتعتبر من الأسباب الرئيسية في إصابات المستشفيات وبالدرجة الأولى إصابات المجاري البولية Urinary tract infection إضافة إلى تسببها بخمج الجروح, وقد ذكرت إحدى الدراسات بأن طول فترة رقود المريض في المستشفى تزيد من إحتمالية الإصابة بهذه البكتريا حيث يكتسب المرضى هذه البكتريا من بيئة المستشفى المحيطة بهم ( الدليمي, 2005 ; فلفل, 2010).

ان العديد من أجهزة الجسم البشري لديها وسائل دفاعية متعددة ضد الإصابات الجرثومية ويمكن ملاحظة ذلك عند دراسة تشريح القناة البولية، إلا أنه قد يتم غزو هذه القناة في بعض الحالات من قبل مجموعة الفلورا الطبيعية الموجودة في أمعاء الإنسان والحيوان التي تتحول إلى كائنات إنتهازية بالإضافة إلى الأنواع البكتيرية الممرضة الأخرى وبالتالي تسبب العديد من الأمراض مثل إلتهابات المجاري البولية (الحائك، 2004 ; أحمد, 2008 ).

## 3-4-2 إمراضية بكتيريا الإشيريشيا *Escherichia coli* Pathogenicity of :

تمتلك هذه البكتريا وسائل إمراضية عديدة تساعدها على إحداث الإصابة ومنها إفرازها الذيفان المعوي Enterotoxin وإمتلاكها المخملات أو الأهلاب pili or fimbriae ويسمى بالمستضد(F) والذي يكون غير ثابت بالحرارة وهو يساعدها في عملية الإلتصاق وكذلك إمتلاكها المحفظة ويسمى أيضاً بالمستضد(K) أو (B) الذي يكون غير ثابت بالحرارة Heat labile ، ويتداخل هذا المستضد مع مستضد أخر هو المستضد الجسمي (O) والذي يكون ثابتاً بالحرارة Thermostable ويقاوم عملية البلعمة, وكذلك إمتلاكها الأسواط المحيطية peritrichous flagellae أو المستضد(H) والذي يكون مسؤولاً عن عملية الإلتصاق

Adherence, ويكون غير ثابت بالحرارة ، وهو المسؤول عن الإمراضية وإحداث الإصابة (Brooks وآخرون, 2004 ; فلفل, 2010 ; العتبي, 2013).

تعّد بكتريا *E.coli* واحدة من أكثر المسببات المرضية إذ إنها تعد من المسببات الرئيسية للإصابة بإلتهابات المسالك البولية وكذلك تسبب إلتهاب السحايا للإطفال حديثي الولادة Neonatal Meningitis والإصابات المكتسبة عند تواجد المرضى في المستشفيات Nosocomial Infections (Enayat وآخرون, 2011 ; Brooks وآخرون, 2010).

تلتصق الممرضات المعوية في النسيج الطلائي وتنتج سموماً خارجية، وإن الإلتصاق بالخلايا الطلائية لبطانة القناة الهضمية هي صفة تشفر لها جينات تتموضع على البلازميدات، وإذا كانت دفاعات المضيف ضعيفة فإن بكتريا *E.coli* تصل إلى مجرى الدم وتسبب التسمم الدموي Septicemia، كما تسبب سلالات *E.coli* العديد من حالات الإسهال لدى الأطفال (Melvin وHeyman , 2006 ; Al-Gosha'ah, 2005).

### 2-4-4 التركيب المستضدي لبكتيريا الإشيريشيا *E.coli* Antigenic composition of:

وجد العالم Kauffman عام 1940 نظاماً تصنيفياً خاصاً بإعتماده على الإختبارات التلازن المصلية وذلك بتصنيف السلالات البكتيرية إعتماداً على المستضدات الموجودة على جسم الخلية البكتيرية (Brooks وآخرون, 2010).

تمتلك هذه البكتيريا تركيباً مستضدياً معقداً، يحتوي على أكثر من 150 مستضداً مختلفاً بعضها يكون مقاوماً للحرارة مثل Lipopolysaccharide (LPS) والذي يسمى بالمستضد الجسمي, وهنالك أكثر من 50 نوعا من المستضدات السوطية أو المستضدات السطحية (Jawetz وآخرون, 2004 ; العلواني, 2006).

وهذه المستضدات تشمل :-

- **المستضد الجسمي (O) Somatic Antigen** : يعد هذا المستضد من عوامل الضراوة المهمة للـ *E.coli* ويكون مسؤولاً عن إعطاء الأنواع المصلية المختلفة. المستضد الجسمي هو مستضد مقاوم للحرارة Heat stable وهو غالباً يعّد إمتداداً لمتعدد السكريد الشحمي المكون للجزء الخارجي من الجدار الخلوي أي يمثل مستضدات الجدار الخارجي Cell wall antigens حيث يتكون من وحدات متكررة من متعدد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide (LPS) (العلواني, 2006 ;أحمد, 2008; Brooks وآخرون, 2010).
- **المستضد المحفظي (K) Capsular Antigen** : المستضد المحفظي هو مستضد حساس بالحرارة Heat labile ويكّون الغلاف الخارجي للمستضدات الجسمية لبعض أنواع جراثيم العائلة المعوية التي تمتلك المحفظة Capsule ويتضمن المستضد المحفظي متعدد السكريد الشحمي إضافة إلى البروتينات, هذا المستضد يقوم بتثبيط تفعيل المتمم أو منعه من الوصول إلى جدار الخلية البكتيرية وخاصة تلك المسببة لإلتهابات المجاري البولية ومنع عملية البلعمة الخلوية (Jawetz وآخرون, 2004 ; Mahon وآخرون,2007 ; أحمد, 2008).
- **المستضد السوطي (H) Flagellar antigen** :- المستضد السوطي هو مستضد حساس للحرارة وتقع هذه المستضدات على سطوح الأسواط Flagella المسؤولة الحركة ويمكن أن يمسخ أو يزال بوساطة الحرارة أو الكحول، يتكون المستضد السوطي من سلسلة الأحماض الأمينية المؤلفة من البروتينات السوطية Flagellin (Brooks وآخرون, 2010Salyers ;وWhitt, 2002) .

أشار الباحث (Tortora وآخرون, 2010) إلى إن هناك 187 مستضداً جسمياً (O-Ag) و56 مستضداً سوطياً (H-Ag) و80 مستضداً محفظياً (K-Ag) . وإعتماداً على هذه المستضدات تم تشخيص العديد من الأنماط المصلية التابعة لسلالات البكتيريا القولونية, حيث يعتبر التنميط المصلي من أهم الطرق التشخيصية للتعرف على السلالات الممرضة التي غالباً ما تمتلك العديد من عوامل الضراوة (Brooks وآخرون, 2010).

## 2-4-5 تركيب الجدار الخلوي لبكتيريا الإشيريشيا القولونية

## The cellular structure of the cell wall of *Escherichia coli*

جدار الخلية البكتيرية السالبة لصبغة كرام يتألف من :-

الغشاء السايتوبلازمي الداخلي Inner cytoplasmic membrane وجدار خارجي مكّون من المواد الأتية ( Phospholipoprotein, Mucopolysaccharides,Peptidoglycan ) إضافة الى تركيب Lipopolysaccharides (LPS) ويمثل تركيب (LPS) المحتوى الأساسي لجدار الخلية السالبة لصبغة كرام ويرتبط عادة مع بروتينات دهنية Lipoprotein وبروتينات الدهون المفسفرة phospholipids, إضافة لإرتباطه بالمستضد العام Common antigen الخاص بعائلة المعويات (الحميداوي,2001).

للغشاء الخارجي أهمية أخرى فهي تعتبر ذات أهمية طبية كونه حاجزاً ذات نفاذية إختيارية يحمي البكتريا السالبة لصبغة غرام من المواد الكيميائية المؤثرة على طبقة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan مثل المضادات الحيوية ومن أهمها مجموعة البنسلين وكذلك الأنزيمات مثل الإنزيم الحال lysozyme ويمنع دخول مثل هذه المواد ومهاجمتها لطبقة الببتيدوكلايكان (Reddy, 2010) .

بسبب موقعه الخارجي لجدار الخلية البكتيرية فأنه يتوسط التماس الخلوي البيئي. يؤدي دوراً مهماً كونه حاجزاً نفوذياً Permeability barrier إذ يسمح فقط بمرور الجزيئات المحبة للماء ذات الأوزان الجزيئية الواطئة وبذلك فأنه يمنع دخول أملاح الصفراء (Bile salts) والمواد السامة في القناة المعوية المعدية (Gastrointestinal tract)، كذلك يمنع دخول المواد الحالة (Lysozyme) والمواد المضادة للميكروبات الأخرى (Todar, 2002).

### 2-4-5-1 مكونات متعدد السكريد الشحمي Lipopolysaccharides (LPS) :

يكّون عديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharides (LPS) الجزء الداخلي من الغشاء الخارجي لخلايا البكتيريا السالبة لصبغة غرام ويتألف من ثلاث مناطق رئيسة، هي

منطقة الشحم Lipid A) region A) ومنطقة اللب (Core region) والمستضدالجسمي–O (Somatic O – antigen ) (Brooks وآخرون, 2007).

إن لطبقة LPS أهمية كبيرة إذ تلعب دوراً مهماً في إمراضية السلالات البكتيرية وتعمل أيضاً على حماية البكتيريا من المؤثرات الخارجية وكذلك تمنع أو تبطئ من دخول المواد السمية كالمضادات الحيوية وأملاح الصفراء إلى داخل الخلايا البكتيرية كما إنها تساعد الخلايا البكتيرية على الإلتصاق بخلايا المضيف (Leone وآخرون, 2007).

**1- منطقة Lipid A** :- تعتبر منطقة Lipid A أكثر مناطق LPS تشابهاً من حيث التركيب والمكونات إذ أنها تتشابه كيميائياً لكل البكتيريا السالبة لصبغة غرام وعلى تحديد كل الأنواع التابعة للعائلة المعوية Enterobacteraceae (AL-Zubaidy, 2005).

تتميز هذه المنطقة بأنها عبارة عن مادة دهنية كارهة للماء hydrophobic وتمثل الجزء المغروس من عديد السكريد الشحمي LPS في الغشاء وتتألف من ثنائي الكلوكوزامين المفسفر Phosphorylated N-acetyl glucosamine (NAG) dimmer الذان يرتبطان ببعض بواسطة الأصرة الكلايكوسيدية β(1–6) (Reddy, 2010 ; Levinson, 2008) .

**2- منطقة اللب Core region** :- ويؤلف اللب الجزء المركزي في تركيب جزيئة عديد السكريد الشحمي إذ يرتبط بالموقع 6 من جزيئة NAG في الشحم A ويتكون من سكريات متعددة، أهم الوحدات المكونة لها هي الـ heptose و السكريات الخماسية pentos و كذلك 2-Keto-3-deoxy-D-mannooctulosonic (KDO). اذ إن الـ KDO هو الأكثر وجوداً في المنطقة اللبية ويلعب دوراً مهماً في ربط منطقة Lipid A بالمنطقة اللبية بواسطة الأصرة الكلايكوسيدية (AL-Zubaidy, 2005).

**3- منطقة المستضدات الجسمية Somatic O – antigen** :- أما المستضد الجسمي_O أو عديد السكريد النوعي O – specific polysaccharide (OPS) فتسمى أيضاً بالسلسلة الجانبية O-side chain وهي مرتبطة بمنطقة Lipid A عن طريق المنطقة اللبية، وتتألف من وحدات فرعية متكررة Repeating subunits من قليل السكريد (Oligosaccharide) مكونة من 3–4 سكريات وتختلف السلسلة الواحدة في الطول إذ

تصل في بعضها إلى 40 وحدة فرعية متكررة , ويختلف تركيب هذه السلسلة من سلالة إلى أخر (Mahon وآخرون, 2007 ; Todar , 2002).

يتصف المستضد الجسمي_O بوجود تنوع كبير في مكونات Repeating subunits المكونة لها وهذا التنوع مهم جداً في التمييز ما بين السلالات البكتيرية التابعة للنوع نفسه، وكذلك ضمن الأنواع التابعة للعائلة المعوية يوجد هذا التنوع بشكل واضح في سلالات النوعين *E.coli* O157 و *Citrobacte freundii* (AL-Zubaidy, 2005).

## 5-2 عوامل الضراوة Virulence factors:

**الضراوة:-** هي قدرة البكتيريا على إحداث المرض, وتتمثل أهم عوامل الضراوة لبكتيريا *E.coli* بمستضدات المحفظة والأهلاب والهيمولايسين والبكتيريوسين والغشاء الحيوي وغيرها, هذا كله يفسر لماذا بعض سلالات الإيشريشيا القولونية قادرة على أن تحدث الإصابة في الكلية أو المثانة, وتسهم هذه العوامل في جعل البكتريا المرضية قادرة على تجاوز الخطوط الدفاعية الأساسية في الجسم كما تعمل على تحطيم النسيج الذي تستوطن فيه (الجميلي, 2005; النقيب, 2009 ; الزنكنة, 2012).

ومن هذه العوامل:-

### 1-5-2 الإلتصاق Adhesion :

يعد إلتصاق الخلية البكتيرية بالخلايا الطلائية للمضيف الخطوات الأولى لإحداث الإصابة والتي تتم عن طريق عدة أليات من أهمها الأهداب وهي عبارة عن تراكيب خيطية تتواجد على سطوح الخلايا الجرثومية تمكنها من الإرتباط بمستقبلات محددة موجودة على سطوح خلايا المضيف ( Tortora وآخرون 2010 ; Todar, 2008 ).

تمتلك سلالات بكتريا *E.coli* وخاصة السلالات الممرضة خارج المعوية EXPEC عدة أنواع من الأهداب Fimbriae والتي تشفر لها جينات أما تقع على الكروموسوم أو على البلازميدات ونتيجة لهذا التنوع الجيني تكيفت للعيش في بيئات مختلفة وزادت فرص إنتقالهاإلى

أماكن أخرى من جسم المضيف وإحداث الإصابات فيها (Antão وآخرون, 2009 ; Cedric وآخرون, 2004).

إن الأهداب تساعد البكتيريا على الإلتصاق بالخلايا الطلائية كما إن لها دوراً مهماً في إحداث التلازن الدموي Haemagglutination ومن أنواع الأهداب التي تمتلكها سلالات EXPEC هي Type -1- fimbriae, Dr fimbriae "dra", S- fimbriae,P- fimbriae و Curli - fimbriae (Ewers وآخرون, 2007).

وجد إن 80% من سلالات (UPEC) والمسببة لل UTI تمتلك أهداب من النوع الأول Type -1- fimbriae (Todar ,2008) كما وجد إن الأهداب من النوع (P- fimbriae) تسود في سلالات UPEC إضافة إلى السلالات المسببة لإلتهابات السحايا في الأطفال حديثي الولادة NMEC (Johnson و Russo , 2005).

أشار(Sharma وآخرون, 2006) إلى إن إستخدام إختبار الإرتباط بملون أحمر الكونغو كأحد الدلائل المظهرية للتميز بين بكتيريا *E.coli* المسببة للإنتانات القولون Colisepticaemic (invasive) *E.coli* عن تلك غير المسببة للإنتانات القولون non_Colisepticaemic *E.coli* .

## 2-5-2 إنتاج الهيمولاسين Hemolysin :

يعّد الهيمولايسين أحد أنواع الإنزيمات الحالة للخلايا، الذي يقوم بتحطيم الخلايا الطلائية البولية، ويعمل على تحليل الغشاء الخلوي لهذه الخلايا, فوظيفته الرئيسة توفير الحديد ($Fe^2$) الذي يكون ذات أهمية كبيرة في أيض الخلية البكتيرية, ويطلق على هذا التحلل بالتحلل الدموي (Haemolysis), ويعمل هذا الإنزيم أيضاً على إحداث ثقوب في أغشية الخلايا المرتبطة بها مسببة بذلك خروج ATP منها وبالتالي موت الخلية, تكون الأليات المنتجة للهيمولاسين والتي تسبب إلتهابات الكلية وحويضها أكثر سمية لخلايا النبيبات البولية الطلائية (أحمد, 2008 ; النقيب , 2009 ).

تعتبر قابلية البكتيريا على إنتاج الهيمولايسين وتحليل كريات الدم الحمراء من عوامل الضراوة المهمة التي تمتلكها العديد من الأنواع البكتيرية (Nazmukry وآخرون, 2010).

تتميز السلالات التي لها القابلية على إنتاج الهيمولاسين بقدرتها على إحداث العديد من الإصابات مثل إصابات الجهاز البولي UTI وإنتان الدم. إن ألية عمل هذا الإنزيم هوتركيبه من البورينات porins الذي يكون ذات قابلية على الإرتباط بطبقة الدهون المزدوجة لكريات الدم الحمر والبيض، فضلاًعن خلايا النبيبات البولية ، وبهذا الإرتباط فان هذه البكتيريا تعمل على إحداث الثقوب فيها فيؤدي ذلك الى خروج ATP منها مما يؤدي الى موت هذه الخلايا, إن السلالات التي تنتج إنزيم الهيمولاسين تكون ذات إمراضية وضراوة أكثر خطورة من السلالات غير المنتجة لهذا الإنزيم ( Siddiquie, 2003 ; الجميلي, 2005 ; رؤوف, 2013).

يصنف الهيمولاسين إلى أربعة أنواع إعتماداً لقدرته على تحلل كريات الدم الحمر وإحداث الإمراضية, **النوع الاول α- Hemolysin** يكون ثقوب في الغشاء الخلوي والذي يؤثر مباشرة في الطبقة المخاطية للمثانة مسبباً بذلك التهابات المجاري البولية, وتظهر منطقة ذات لون أخضر حول المستعمرة (باقر وآخرون,2001), **النوع الثاني β- Hemolysin** يحلل الأغشية ويعمل على إحداث تحلل كامل لكريات الدم الحمر حيث يصبح الوسط رائقاً حول المستعمرات على وسط أكار الدم (Soloaga وآخرون, 1999) , **النوع الثالث δ- Hemolysin** يتميزهذا النوع بأنه يحطم غشاء الخلية بالطريقة نفسها التي تعمل فيها المنظفات، أما **النوع الرابع Δ-haemolysin** لاتظهر تحلل حول المستعمرات توصف هذه البكتيريا بالبكتريا **غير المحللة للدم Non – haemolytic** (Han وآخرون, 2010).

يعّد الهيمولايسين من الذيفانات الخلوية Cytotoxins التي تمتلكها السلالات الممرضة لل *E.coli* والتي لها دور مهم في إمراضيتها (Dhakal وMulvey , 2012 ).

كذلك إن بكتيريا *E.coli* لها القدرة على إنتاج (α , β Hemolysin) ولا يقتصر تأثير التحلل على كريات الدم الحمراء RBC فقط وإنما يمتد الى أكثر من ذلك حيث إن α-Hemolysin يتميز بقابليتة أيضأ على تحليل الخلايا اللمفية Lymphocytes, و β- Hemolysin يلعب دورآ مهمآ في تثبيط عمليات البلعمة Phagocytosis, والإنجذاب الكيمياوي Chemotaxis نحو كريات الدم البيضاء العدلة Neutrophiles ( Al-Chalabi وآخرون, 2010 ; Todar, 2008).

## 3-5-2 إنزيم اليوريز Urease Enzyme :

يؤدي إنزيم اليوريز دوراً مهماً في خمج المسلك البولي UTI إذ يعمل هذا الإنزيم على زيادة تركيز أيون الأمونيوم في البول رافعاً بذلك الدالة الهيدروجينية pH للبول ومؤدية بذلك إلى تراكم أملاح فوسفات الأمونيوم وترسبهافي المسلك البولي مكونة الحصى Calculi(الخفاجي,2010).

أكدت الدراسات الحديثة على أهمية اليوريز بكونة مسبباً مرضياً وعامل ضراوة للعديد من الأنواع الجرثومية، ووجد ان بكتريا *E.coli* تنتج هذا الانزيم بنسبة 100% (العبيدي,2006).

ينتج هذا الأنزيم من قبل العديد من الأجناس البكتيرية المسببة لإصابات المجاري البولية مثل *Pseudomonas , Klebsiella , Proteus* , تعتبر اليوريا المركب النايتروجيني الرئيسي الذي يطرح من قبل جسم الإنسان، ويعمل هذا الأنزيم على تحويل اليوريا إلى الأمونيا $NH_4$، وحامض الكاربونيك $H_2CO_3$ ( الزنكنة, 2012).

## 4-5-2 البكتريوسين Bacteriocin:

هي مركبات بروتينية خارج خلوية Extracellular مضادة للميكروبات تنتج من أنواع مختلفة من البكتيريا وتكون فعالة ضد الانواع البكتيرية القريبة, إذ تمكن السلالات المنتجة لها

من التنافس مع السلالات غير المنتجة المتواجدة في نفس البيئة, وتنتج البكتريوسين خلال أو عند نهاية الطور اللوغارتمي لنمو البكتيريا, وقد أطلق العالم Jacob عام 1953 مصطلح البكتريوسين على البروتينات المثبطة للبكتيريا والتي تنتج من قبل البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام, حيث أكدت الدراسات إن البكتريا المعوية المنتجة للبكتريوسين تمتلك فرصة كبيرة لإصابة المجرى البولي (Delgado وآخرون, 2001 ; النقيب, 2010).

أحياناً تمتلك البكتريوسينات فعالية واسعة الطيف ضد الأنواع المختلفة من الجراثيم الموجبة أو السالبة لصبغة غرام, إن تأثير البكتريوسين في الخلايا البكتيرية الحساسة يكون قاتلاً bacteriocidal أومثبطاً للنمو bacteriostatic حيث إن البكتريوسين المنتج من بكتريا *Lactobacillus rhamnosus* فعال تجاه معظم أنواع البكتيريا (Al-Charrakh[a] وآخرون, Sarika ; 2011 وآخرون, 2010 ; Todorov, 2009).

تختلف تسمية البكتريوسين تبعاً للبكتريا المنتجة له فقد أشار( Hammami وآخرون, 2010) إلى أن البكتريوسين الذي تنتجه بكتريا *E.coli* يسمى Colicin ويطلق مصطلح بايوسين Pyocin على المادة المنتجة من قبل بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*.

أشار الباحثان (Riley وChavan, 2007 ) إلى إن البكتريوسين المنتج من بكتريا *Klebsiella pneumoniae* يسمى Klebocin والبكتريوسين المنتج من بكتريا *Serratia marcescens* يسمى Marcescens. يسمى البكتريوسين المنتج من بكتريا *Enterobacter cloacae* Cloacins (Singh وBanerjee, 2008).

إنتاج البكتريوسينات يُشفر له عدة جينات تُحمل على بلازميد مكون من ثلاثة جينات أولها جين إنتاج البكتريوسينBacteriocin gene ثم جين يُشفر لبروتين المناعة Immunity gene وذلك لمنع تأثر الخلية بالبكتريوسين المنتج من قبلها، ثم جين التحلل Lysis gene الذي يُشفر لبروتين محلل يُساعد في عملية تحررالبكتريوسين من الخلية المنتجة(Gillor وآخرون, 2005).

تتشابه آليات عمل البكتريوسين في تأثيرها على خلية الهدف مع آليات عمل مضادات الحيوية فقد تعمل على الجدار الخلوي أو الغشاء السايتوبلازمي (Han وآخرون, 2011).

يكمن تأثير البكتريوسين القاتل من خلال إدمصاصه على المستقبلات المتخصصة الموجودة على سطح البكتريا الحساسة له ، محدثاً تغييرات أيضية حياتية ومظهرية وبالتالي تؤدي الى قتل تلك الخلية البكتيرية, تتلخص ألية عمل البكتيروسين في خطوتين (Ennahar وآخرون 2000):

- **الخطوة الاولى:** تعتمد على الخاصية الفيزيائية لجزئيات البكتيروسين وهي عملية إدمصاص (Adsorption) هذه الجزيئات على سطح الخلايا المستقبلة وهذه العملية تنشئ ضرر فيسيولوجي للخلايا بشكل واضح .
- **الخطوة الثانية:** تعتمد على التركيب الكيميائي للبكتريوسينات التي تؤثر في التركيب الكيميوحيوي للخلايا المستهدفة وهي الفوسفولبيدات في غشاء الخلايا المستهدفة.

### 2-5-5 الغشاء الحيوي Biofilm :

الأغشية الحيوية Biofilms تعّرف بأنها عبارة عن تجمعات لأحياء مجهرية أحادية الخلية لتكوين تراكيب متعددة الخلايا تلتصق بالسطوح، وتكوينها يحدث نتيجة لأسباب بيئية منها نقص المغذيات, الكثافة العالية للخلايا وكذلك التعرض لضغوط بيئية فيزيائية ( العزاوي, 2008 ) .

يتكون الغشاء الحيوي نتيجة إلتصاق خلية بكتيرية مفردة بالسطح لبناءركيزة Substratum لنموها إلى مستعمرات صغيرة متكونة من عدة مئات من الخلايا المتزايدة، وتفرز هذه المستعمرات مادة تعرف بالسكريات المتعددة الخارجية Exopolysaccharide matrix وهي عبارة عن مادة بينية تحيط بالمستعمرات لتكوين تنظيم معقد متعدد الطبقات من الاغشية الحيوية (Merode وآخرون, 2006 ; Jawetz وآخرون, 2004 ).

هناك عدة عوامل لها تأثير بإلتصاق البكتريا تتضمن سطح البكتريا البروتيني ومتعدد السكريد Polysaccharide، وخاصة متعدد السكريد المحفظي, ووجود بروتينات المضيف والتفاعلات الفيزيوكيمياوية ( TuQuoc وآخرون, 2007).

يساعد الغشاء الحيوي البكتريا على البقاء حية في الظروف القاسية داخل المضيف وتعّد مسؤولة عن الإصابات المزمنة وكذلك الأمراض كإلتهاب اللثة وتسوس الأسنان , إلتهاب شغاف القلب، التليف الكيسي و إلتهاب الأذن الوسطى وغيرها، تتمكن الفطريات والجراثيم المرضية من تكوين الغشاء الحيوي في سطوح المستلزمات الطبية المختلفة مثل القثاطر المستخدمة لقسطرة الأوردة الرئيسة والمجاري البولية وصمامات القلب المصنعة والمفاصل البديلة لذا يوصى في هذه الحالات بالعلاج لفترات زمنية طويلة ( Khan وآخرون, 2011 ; Li وآخرون, 2003).

هناك علاقة بين قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي وقدرتها على إحداث المرض وكذلك التسبب بحدوث إلتهاب مزمن، فالبكتريا التي تكّون الغشاء الحيوي تكون ذات قابلية أكبر على إستعمار جسم المريض ومقاومة المضادات الحيوية والجهاز المناعي للمضيف ( Dadawala وآخرون, 2010 ; Cucarella وآخرون, 2004).

تتواصل البكتريا مع بعضها البعض في هذا الغشاء بواسطة إشارات كيميائية تدعى بالمحفزات الذاتية Auto inducers وتدعى عملية التواصل الكيميائية بظاهرة تحسس النصاب Quorum sensing وهي تسمح للبكتريا بالتحكم بالبيئة وتغيير التصرف إستجابة لتغيرات مجتمع الغشاء الحيوي (Hassan وآخرون, 2011 ; Venturi وآخرون, 2006).

من أهم البكتريا السالبة لصبغة كرام والقادرة على تكوين الأغشية الحيوية وتلوث الأجهزة الطبية: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* (Salih و AL-Ani, 2013 ).

## 6-2 إنزيمات البيتالاكتاميز β-Lactamase Enzyme :

في الأونة الأخيرة تم إكتشاف أعداد كبيرة من إنزيمات البيتالاكتام والتي أنتجتها البكتريا بسبب تعرضها لمضادات البيتالاكتام التي شاع إستخدامها سريرياً مما أتاح للبكتريا الفرصة لتطور ألياتها في إنتاج هذه الإنزيمات (بلال, 2010).

تنتج أنزيمات البيتالاكتاميز من أعداد كبيرة من البكتريا وخاصة المرضية منها, ولكن يختلف إنتاجها في البكتريا الموجبة عنه في السالبة لصبغة گرام, فهي تعتبر أنزيمات خارج خلوية في البكتريا الموجبة, أي تفرز الى الوسط الزرعي الذي تنمو فيه البكتريا, وتكون كمية الأنزيم المنتج كبيرة تعمل على تحطيم المضاد خارج الخلية (Solnik, 2003 ).

أما في البكتريا السالبة لصبغة گرام فإن الأنزيم يكون داخل خلوي أو من النوع المرتبط بالخلية Cell bound enzyme ويعود سبب الأختلاف إلى طبيعة الجدار الخلوي, إذ تكون كمية الأنزيم المنتجة في البكتريا السالبة قليلة وتبقى عادة محتجزة في الفسحة البيربلازمية, مما تعمل على إعاقة مرور جزيئات مضاد الحياة الى الداخل ( Kfoury و Araj , 2003).

يعتبر إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز من الطرق المهمة لمقاومة مضادات البيتالاكتام, حيث تعمل هذه الأنزيمات في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة گرام على كسر أصرة الأمايد amide bond لحلقة البيتالاكتام, فتتحول بذلك البنسلينات إلى حامض البنسلويك Pencilloic acid والسيفالوسبورينات إلى حامض السيفالوسبوريك Cephalosporonic acid وبذلك تصبح هذه المضادات غير فعالة وتفقد قدرتها على الإرتباط مع أنزيمات البروتينات المرتبطة بالبنسلين Penicillin-binding proteins (PBPs) مما يسمح ببناء الجدار الخلوي (Al- Jubouri وآخرون, 2012 ; Zapun وآخرون, 2008 ; Forbes وآخرون, 2007 ; Al-Jasser وآخرون, 2006 ).

تتفاوت كميات إنتاج هذه الأنزيمات وطريقة عملها في الأجناس الجرثومية فقد تكون محفزة Inducible β- lactamase أي إنها تحتاج إلى محفز ليتم إنتاجها ولا يستمر إنتاجها بغياب المحفز(المضاد) أو قد تكون ذاتية التكوين Constitutive أي تنتج حتى عند عدم وجود المحفز وتنتج هذا النوع من الأنزيمات الكثير من الأجناس البكتيرية مثل *E.coli, Salmonella, Shigella* ( Hsueh وآخرون, 2005).

تتوافر هذه الإنزيمات على بلازميدات والتي تكون أما بلازميدات إقترانية أو غير إقترانية أو توجد على العناصر القافزة Transposons حيث إن هذا التواجد يسهل من إنتقال الإنزيم إلى العديد من أجناس العائلة المعوية ( Tortora وآخرون, 2007 ; Prescott وآخرون, 2005 ; Ryan وRay, 2004).

## 2-6-1 إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

## Extended spectrum β-Lactamase ( ESβLs)

تعّد إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended spectrum β-Lactamase (ESβLs) من مشتقات إنزيمات البيتالاكتاميز الأصلية (OXA-1, SHV-1, TEM-1) إذ تطورت هذه الإنزيمات نتيجة لحصول طفرات وراثية أدت إلى تغير في تسلسل الأحماض الأمينية في موقعها الفعال (Pitout وآخرون, 2010).

تمتلك إنزيمات ESβLs فعالية واسعة ضد مضادات البيتالاكتام الحديثة فهي لها القابلية على تحليل البنسلينات وتحطم سيفالوسبورينات الجيل الثالث والأجيال الحديثة منها مثل مضادات Cefotaxime, Ceftriaxone, Ceftazidime وكذلك مجموعة Monobactam مثل مضاد Aztreonam ولكن ليس لها فعالية على مجموعة Carbapenems مثل مضاد Meropenen, Imipenem ومجموعة Cephamycins مثل مضاد Cefotetan Cefoxitin, وهي تثبط بمثبطات البيتالاكتام. إن إنزيمات ESβLs تشفر بواسطة بلازميدات إنتقالية Transmisible plasmids مما يسهل إنتقالها إلى السلالات الأخرى وهي غالباً ما تشفر لمقاومة مجاميع متعددة من المضادات مما يسبب ظهور سلالات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية (El kholy وآخرون, 2011 ; Wax وآخرون, 2008 ; Paterson وآخرون, 2005 ; Turner وآخرون, 2005 ; Martinez و Baquero, 2002).

كما أظهرت عدة دراسات سيادة أنزيمات CTX-M مقارنة ببقية أنواع إنزيمات ESβLs التي تنتجها أجناس العائلة المعوية ومنها *E.coli* في معظم دول العالم وكذلك في دول الشرق

الأوسط والعراق (Al-Hilali , 2010; Livermore وآخرون, 2007 ; Poirel وآخرون, 2005).

### 2-6-2 إنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo – β- Lactamase (MβL) :

عزلت هذه الإنزيمات من المرضى في مستشفى نيودلهي في الهند في عزلة واحدة لكل من بكتيريا *E.coli* وبكتيريا *K.pneumoniae* ( Yong وآخرون, 2009).

من خصائص هذه الإنزيمات :-

1- تتطلب إنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية عنصر الزنك لتحفيز نشاطها .

2- تتثبط هذه الإنزيمات من خلال وجود بعض المركبات مثل EDTA .

3- هذه الإنزيمات تحلل كل مضادات البيتالاكتام التي تتضمن Carbapenem بإستثناء Aztreonam (Monobactam).

4-هذه الأنزيمات تنّتج من سلالات لاتتأثربمثبطات سيرين بيتالاكتاميز Serine beta lactamase مثل (Clavulanate). ( Debasrita وآخرون, 2010 ; Ami وآخرون, 2008).

## 2-7 حساسية بكتريا الإشريشيا القولونية لمضادات الحياة

## The Sensitivity of *Escherichia coli* bacteria to antibiotics

تعّرف المضادات الحيوية بأنها من النواتج الأيضية الثانوية الخاصة أوالمحورة والتي تمتلك فعالية ضد مجاميع مختلفة من الأحياء المجهرية، كذلك تعّرف بأنها مواد كيمياوية عضوية تنتج من قبل الأحياء المجهرية المختلفة وتكون ذات قابلية على تثبيط نمو أحياء مجهرية أخرى دون التأثير على خلايا الجسم, وتشمل المضادات المنتجة بواسطة التحوير الكيميائي للمضادات الطبيعية أو بواسطة التحوير الأحيائي للمواد المصنعة ( Prescott وآخرون, 2005 ; المرجاني, 2011) .

تُقسم مضادات الحياة الى نوعين من المضادات من حيث التأثير فهي أما أن تكون مضادات قاتلة Bacteriocidal ومنها البنسلينات والسيفالوسبورينات ومضادات المجموعة الأمينوكلايكوسيدية،أو تكون مضادات مثبطة لنمو البكتريا Bacteriostatic ومنها التتراسايكلين والكلورامفينيكول (الزنكنة, 2012).

تختلف نسبة مقاومة العزلات البكتيرية لمضادات الحياة فقد أشار دراسة Ibraheam (2006) الى ان 88% من عزلاته مقاومة لمضاد Augmentin, كذلك أوضح الباحث علي (2010) الى ان جميع عزلاته قاومت مضاد Augmentin.

وجد الباحث Chambers (2001) الى ان سبب المقاومة لمضاد Augmentin يعود الى غزارة انتاج العزلات المقاومة لانزيمات البيتالاكتميز للتغلب على الفعل التثبيطي لمثبطات انزيمات البيتالاكتميز.

كما أوضح الباحث Parvin وآخرون (2006) والباحث Jarjees (2006) مقاومة البكتريا لمضاد Gentamycin و مضاد Ciprofloxacin والمقاومة العالية لمضاد Ampicillin وحساسية العزلات البكترية لمضاد Amikacin وImipenem, وان سبب مقاومة البكتريا Ampicillin يعود الى كثرة استخدام هذه المضادات وكذلك انتاج البكتريا لمضادات البيتالاكتميز مما يسبب الطفرة في الجينات البكترية فتتحول بذلك البكتريا من حساسة الى مقاومة (Chigbu وEzerony,2003).

أشارت العديد من الدراسات الى ان بكتريا *E.coli* ذات حساسية عالية لمضاد Imipenem وAmikacin اذ أشار الباحث Deep وآخرون (2004) الى الحساسية العالية للبكتيريا المعزولة من ردهة العناية المركزة تجاه مضاد Amikacin ، كذلك وجد الباحث Japoni وآخرون (2008) الى ان 98% من عزلات *E.coli* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة كانت حساسة لمضاد Imipenem .

تعزى الحساسية العالية نسبياً لمضادات Carbapenem مثل Imipenem للنفاذية العالية التي تمتلكها هذه المضادات عبر الجدار الخلوي للجراثيم السالبة لصبغة كرام, كما يعد هذا المضاد العلاج الاكثر فعالية مقارنة مع بقية المضادات المستخدمة (Labormbardi,2007).

كما أوضح الباحث Elmanama وآخرون (2006) الى ان 10.6% من عزلات *E.coli* كانت مقاومة لمضاد Gentamycin, وأشار الباحث Japoni وآخرون (2008) الى ان 18% من عزلات *E.coli* كانت مقاومة لمضاد Chloramphenicol, ووجد الباحث Al-Saati وآخرون (2009) الى ان عزلات *E.coli* كانت حساسة جداً لمضاد Chloramphenicol ومضاد Tobramycin.

تختلف هذه المضادات في طيف فعاليتها، فهي أما أن تكون مضادات واسعة الطيف Broad spectrum antibiotics مثل مضاد Gentamycin , Ampicillin وتعمل على البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام أو تكون ذات طيف ضيق Narrow spectrum antibiotics مثل Erythromycin, Penicillin حيث إنها تؤثر على مجموعة محددة من الأحياء المجهرية (Tortora وآخرون, 2010).

## 2-7-1 مضادات البيتالاكتام :

تعّد مضادات البيتالاكتام من المضادات ذات الفعالية القاتلة للجراثيم Bacteriocidal إذ تعتبر ذات أهمية كبيرة وذلك لإمتلاكها الجزء الفعال والمتمثل بحلقة البيتالاكتام β-lactam ring ولفعاليتها العالية ضد البكتريا حيث تعمل على جدار الخلية البكتيرية وذلك بتحللها،يرجع سبب زيادة المقاومةالمتعددة للمضادات الحياتية Multi-antibiotics resistance للبكتريا التي تسبب أخماج المجاري البولية إلى الإستعمال العشوائي لمضادات البيتالاكتام في علاج هذه الأخماج التي تسببها البكتريا, تتضمن مضادات البيتالاكتام الـ Pencillins, Cephalosporins, Carbapenems, Monobactams (Guilfoile وآخرون, 2007 ; Mahon وآخرون, 2007 ; Raka وآخرون, 2004 ).

### 2-7-1-1 البنسلينات Penicillins :

هي مجموعة من المضادات التي تحتوي على نواة البنسلين 6-amino penicillanic acid المكونة من حلقة Thiazolidine مرتبطة بحلقة البيتالاكتام β-lactam ring وتتصل بها سلاسل جانبية يضاف إليها جذور مختلفة لتكوين مشتقات مختلفة من البنسلينات, وتعّد البنسلينات من أولى المضادات الحيوية المستخدمة بصورة شائعة في المجالات الطبية لفعاليتها

العالية إذ تعمل على تثبيط تخليق الجدار الخلوي وذلك عن طريق إرتباطها بالبروتينات المرتبطة بالبنسلين PBPs (Brooks وآخرون, 2010; Nester وآخرون, 2004).

### 2-1-7-2 السيفالوسبورينات Cephalosporins :

تتكون مضادات السيفالوسبورينات من حلقة البيتالاكتام مرتبطة مع حلقة Dihydrothiazine مكونة نواة تدعى ( 7amino cephalosporanic acid) وتتصل بالنواة سلاسل جانبية تنتج عنها مشتقات مختلفة من السيفالوسبورينات. تُشابه السيفالوسبورينات البنسلينات في آلية عملها وغالباً ما تعطى للمرضى الذين لديهم حساسية تجاه البنسلينات ( Prescott وآخرون, 2005 ; Katzung وآخرون, 2004).

### 2-1-7-3 مضادات المونوباكتام Monobactams :

تعد من مضادات بيتالاكتام أحاديه الحلقة Monocyclic فهي تقاوم إنزيمات –β Lactamase لكنها تثبط بأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESβLs) وتكون ذات فعالية عالية ضد العصويات السالبة لصبغة كرام ومنها *P.aeruginosa* مثل مضاد الـ Aztreonam (المرجاني, 2011) .

### 2-1-7-4 مضادات الكربابنيم Carbapenems :

تضم هذه المجموعة مضادات مثل مضاد Imipenem و Meropenem الذان يمتلكان فعالية واسعة ضد معظم البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وكذلك البكتيريا المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز, حيث إن مضاد Imipenem يقاوم معظم إنزيمات البيتالاكتاميز عدا (MβL) إذ تعمل على تحليلهُ ويستعمل هذا المضاد لعلاج الحالات المرضية التي تسببها سلالات العائلة المعوية وخاصة المنتجة منها لأنزيمات (ESβLs) (Elouennass وآخرون2012 ; Howland و Mycek, 2006 ).

### 2-7-2 مضادات الأمينوكلايكوسيدات Aminoglycosides :

هي مجموعة من المضادات القاتلة للبكتريا Bacteriocidal مثل مضاد ,Streptomycin Amikacin , Tobramycin, Gentamicin, حيث تحتوي هذه المضادات في تركيبها على

سكريات أمينية amino sugars إذ تعمل على تثبيط عملية تصنيع البروتين داخل الخلية البكتيرية من خلال إرتباطها بالوحدة الرايبوسومية الصغيرة (30S) (Brooks وآخرون, 2010).

### 2-7-3 مضادات الكوينولينات Quinolones :

تتميز مضادات هذه المجموعة بإحتوائها على حلقة الكينولون 4-quinolone إذ تعمل على تثبيط تخليق الـDNA البكتيري وذلك عن طريق إعاقة أنزيم DNA gyrase مما يسبب موت الخلايا الجرثومية وهذه المضادات تؤثر في كل من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ومن أمثلتها Norfloxacin, Ciprofloxacin, Nalidixic acid( Tortora et al.,2010) كما وجد إن إنتشار مقاومة الكينولينات تزداد في السلالات المنتجة لإنزيم (ESβLs) (Yedekciوآخرون, 2012).

### 2-7-4 السلفوناميد والترايمثبريم Sulfonamides & Trimethoprime :

تقوم هذه المضادات بتثبيط نمو البكتريا حيث تقوم مركبات السلفا بإيقاف نمو البكتريا من خلال تثبيط إنزيم Dihydropteroate Synthetase (DHPS)، كما يعمل مضاد Trimethoprime على تثبيط إنزيم Dihydrofolatereductase (DHFR) إذ يستهدف هذين الإنزيمين مسار تخليق حامض الفوليك Folic acid synthesis pathway المهم في تخليق الـDNA, ونظراً لتشابه هذين المضادين في آلية عملهما فغالباً ما يتم جمعهما في توليفة تسمى (Co-trimoxazole) والتي تكون فعالة ضد العديد من أنواع البكتيريا وخاصة بكتيريا العائلة المعوية المسببة لإلتهابات المجاري البولية UTI (Forbes وآخرون, 2007 ; Brooks وآخرون, 2007).

### 2-7-5 مضاد الكلورامفينيكول Chloramphenicol :

يعّد من المضادات الواسعة الطيف ضد الجراثيم إذ يرتبط مع الوحدة الرايبوسومية (50S) فيعمل على تثبيط بناء البروتين وذلك بمنع إستطالة السلسلة الببتيدية ويثبط عمل إنزيم Peptidyltransferase (Brooks وآخرون, 2010).

أشار (Prescott وآخرون, 2005). على عدم إعطاء هذا المضاد إلا في الحالات المهددة للحياة أي عند عدم وجود مضاد بديل له لأنه يتميز بسميته العالية إذ يسبب فقر الدم الإنحلالي ويقلل من عدد كريات الدم البيض في الدم ويسبب العديد من حالات الحساسية.

## 8-2 مقاومة بكتريا الإشيريشيا القولونية للمضادات الحيوية

## Antibiotic Resistance of *Escherichia coli*

تعّد البكتريا السالبة لصبغة كرام أكثر مقاومة للمضادات الحياتية بالرغم من إن طبقة الببتيدوكلايكان أرق في جدارها مقارنة مع البكتريا الموجبة لصبغة كرام وذلك لأن جدار الخلية غير نفاذ نسبياً (عدوس, 2005), اذ تكتسب الميكروبات قابلية التكيف على تراكيز مختلفة من المضادات الحياتية بمرور الوقت (غني, 2011).

من الآليات التي تستطيع من خلالها الأحياء المجهرية أن تظهر مقاومة لمضادات الحياةهي:-

### أولاً- إنتاج الأنزيمات المثبطة لمضادات الحياة Enzymatic inactivation

تنتج الأحياء المجهرية إنزيمات تحطم العقار على سبيل المثال تنتج بكتريا *Staphylococci* المقاومة لبنسلين G إنزيم β-Lactamase الذي يحطم العقار وكذلك تنتُج العصيات السالبة لصبغة غرام المقاومة لمجموعة Aminoglycoside إنزيمات مثبطة لهذه المجموعة وهي (Acetylating , Phosphorylating enzyme , Adenylating enzyme) (Brooks وآخرون, 2001).

### ثانياً- تغير في حاجز النفاذية Permeability barrier

يعّد حاجز النفاذية من أهم وسائل المقاومة التي تتمكن بواسطتها البكتريا السالبة لصبغة غرام من مقاومة المضادات الحيوية حيث تتميز بإمتلاكها لمتعدد السكريد الشحمي (LPS) وبروتينات الغشاء الخارجي التي تسمىPorins وهي قنوات تسمح بمرور المواد ومنها المضادات الحيوية وتعتمد نسبة النفاذية على حجم وشكل وشحنة جزيئات المضاد المارة من خلال هذه الثقوب التي تكون ذات طبيعة بروتينية محبة للماء Hydrophilic وإن حدوث طفرات معينة يؤدي إلى إختزال عدد من هذه الثقوب في الغشاء الخارجي لبعض أنواع البكتريا يؤدي ذلك إلى التقليل من تدفق المضاد عبر هذه الأغشية وبالتالي تصبح البكتريا مقاومة لمضادات البيتالاكتام (Anathan و Subha , 2005 ; السعدي, 2011).

## ثالثاً- تغير موقع الهدف Target Site alteration

تمكن هذه الآلية البكتريا من تطوير مقاومتها لأنواع عدة من المضادات الحيوية ، إذ تحصل المقاومة عن طريق تغير موقع الهدف الذي يعمل عليه المضاد الحيوي بسبب حدوث طفرة وراثية في مواقع إرتباط المضاد الحيوي مع المكان الخاص به في الجرثومة، وبذلك يفقد المضاد الحيوي ألفتهُ للإرتباط مع الموقع الهدف ، وهذا يؤدي إلى تحول البكتريا من حساسة إلى مقاومة وهذا ما يحدث في المقاومة لمضاد الـ Erythromycin اذ يتم تغير الهدف وهو الوحدة الرايبوسومية (50S) وتغير الوحدة الرايبوسومية (30S) التي هي موقع الهدف للمجموعة Aminoglycosides مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية (Walsh وآخرون, 2000 ; Levinson و Jawetz, 2000).

## رابعاً- أنظمة الدفق Efflux pumps

إن للعديد من الأنواع البكتيرية عدداً من وسائل المقاومة, ومن هذه الوسائل هي مضخات الدفق لأنواع مختلفة من المضادات (Poole, 2005). التي تعمل على ضخ المواد الأيضية والسمية ومنها المضادات الحيوية الى خارج الخلية البكتيرية, وتوجد هذه الأنظمة في العديد من الأنواع البكتيرية ومنها *E. coli, P.aeruginosa, S.aureus* ( Piddock وآخرون, 2006 ; Schweizer وآخرون, 2003).

من وظائف مضخات الدفق الأخرى فإنها تعمل على تحويل مسار المضاد وطرحه إلى خارج الخلية البكتيرية وبسرعة أكبر من سرعة دخوله للخلية, وتتم هذه الألية التي تسمى بالضخ الخارجي بالتعاون مع الغشاء الخارجي (Kriengkauykiat وآخرون, 2005).

## خامساً - تغير في المسارات الأيضية Alteration in pathways

تظهر بعض البكتريا مقاومة لعمل المضاد من خلال تغير في مسارها الكيموحياتي كما هو الحال في مقاومة مضادات السلفانومايد Sulfonamides حيث تستطيع الجراثيم من أخذ حامض الفوليك Folic acid وهو يعتبر البادئ المهم في بناء الأحماض النووية من الخلايا المجاورة بدلاً من تصنيعه , وقد تعمل على زيادة إنتاج مركبات تنافسية تدخل المسار وتنافس المضاد وبذلك تقاوم فعله التثبيطي, كذلك إن تطور إنزيمات متغيرة تؤدي وظيفة أيضية وأقل تأثراً بالعقار فأنزيم Dihydrofolic acid reductase الذي تنتجه البكتريا المقاومة لـ Trimethoprim أقل تثبيطاً بـ Erimethoprim من البكتريا الحساسة لمضاد Trimethoprim ( Tenover وآخرون, 2006 ; Brooks وآخرون, 2001).

# 3- المواد وطرائق العمل

## 3-1 المواد

### 3-1-1 الأجهزة

| الجهاز | | الشركة المصنعة والمنشأ |
|---|---|---|
| حاضنة | Incubater | Memmert (Germany) |
| فرن كهربائي | Oven | Memmert |
| حمام مائي | Water bath | Memmert |
| ماصات دقيقة بأحجام مختلفة | Micropipettes | Brand ( Germany ) |
| جهاز فايتك | VITEK 2 | Bio Merieux |
| دوارة | Vortex | Labcco (Germany) |
| جهاز نبذ مركزي | Centrifuge | Gallenkamp ( England ) |
| المرشحات الدقيقة | Millipore filter | Gallenkamp |
| جهاز التقطير | Distillatar | Gallenkamp |
| مجهر ضوئي | Light microscope | Olympus ( Japan ) |
| الموصدة | Autoclave | Hirayama (Japan ) |
| ميزان حساس | Sensitive balance | Mettler ( Switzerland ) |
| ثلاجة | Refrigerater | Qean ( Egypt ) |
| مقياس الأس الهيدروجيني | pH-meter | Radiometer ( Denemark ) |
| كاميرا رقمية | Digital camera | Sony (Japan) |
| جهاز الاليزا | ELISA | OrganonTeknika (Belgium) |

## 3-1-2 المواد الكيميائية والبايولوجية:

| المادة | | الشركة المصنعة والمنشأ |
|---|---|---|
| كليسيرول | Glycerol | BDH ( England ) |
| فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين | $KH_2PO_4$ | BDH |
| فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين | $Na_2HPO_4$ | BDH |
| فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين المائية | $Na_2HPO_4.2H_2O$ | BDH |
| النشأ | Starch | BDH |
| اليود | Iodine | BDH |
| يوديد البوتاسيوم | Potassium iodide | BDH |
| حامض الكبريتيك | $H_2SO_4$ | BDH |
| كلوريد الصوديوم | NaCl | BDH |
| بيروكسيد الهيدروجين | Hydrogen peroxide | Oxoid ( England ) |
| ببتون | Peptone | Oxoid |
| يوريا | Urea | Merck ( Germany ) |
| خلاصة الخميرة | Yeast extract | Fluka ( Switzer land ) |
| | EDTA | Fluka |
| تربتون | Tryptone | Difco ( U.S.A ) |
| بنسلين جي | Penicillin G | Sandox ( Australia ) |
| صبغة البنفسجي المتبلور | Crystal violet stain | Himedia |
| ايودين | Gram's Iodine | Himedia |
| السفرانين | Safranin | Himedia |

| | |
|---|---|
| هيدروكسيد الصوديوم NaOH | Fluka (Switzerland) |
| سكروز Sucrose | Fluka |
| صبغة الكونكورايد Congo red stain | BDH |
| رباعي المثيل بارافنيلين ثنائي الأمين هيدروكسيد tetramethyl-P-phenylene-diamine dihydrochloride | BDH |
| فورمالديهايد Formaldehyde | BDH |
| كلوريد ألباريوم BaCl2 | BDH |
| أحمرالمثيل Methyl red | BDH |
| كحول أثيلي Ethanol | BDH |
| باراثنائي أمين بنزالديهايد Para-dimethyl amino benzaldehyde | BDH |
| هيدروكسيد البوتاسيوم KOH | BDH |
| الفا- نفثول α-naphthol | BDH |

## 3-1-3 الأوساط الزرعية المستخدمة:

| الوسط | الشركة المجهزة والمنشأ |
|---|---|
| أكارماكونكي MacConkey agar | Himedia (India) |
| أكارالدم الاساس Blood base agar | Himedia |
| وسط مرق صويا تربتون Tryptone Soya broth | Oxoid (England) |
| وسط اكار الصويا Trypticase Soy Agar | Oxoid |
| أكار اليوريا الاساس Urea agar base | Himedia |
| وسط سترات السايمون Simmon Citrate agar | Himedia |

| | |
|---|---|
| Oxoid | Methyle Red/Vogas proskaur وسط MR/VP |
| Oxoid | Muller-Hinton agar أكار مولر هنتون |
| Oxoid | Nutrient agar أكار المغذي |
| Oxoid | Nutrient broth وسط المرق المغذي |
| Oxoid | Brain-heart infusion agar وسط اكار نقيع القلب والدماغ |
| Oxoid | Brain-heart infusion broth مرق نقيع القلب والدماغ |
| Merseyside (U.K) | Kligler's iron agar وسط كليغلر |
| Himedia | وسط غراء الزايلوز لايسين ديوكسي كوليت Xylose lysine deoxycholate agar |
| Himedia | Eosin Methylene Blue وسط الأيوسين مثيلين الازرق |
| Difco (USA) | Agar – Agar أكار _أكار |
| Himedia | Yeast Extract Agar مستخلص الخميرة |
| Oxoid | Pepton water ماء الببتون |

## 3-1-4 المضادات الحيوية :

### 3-1-4 -1: اقراص المضادات الحيوية المستخدمة لقياس حساسية بكتيريا الاشريشيا القولونية (NCCLs, 2007 ).

| المنشأ | تركيز القرص µg/disc | الرمز | المضاد الحيوي |
|---|---|---|---|
| Oxoid (England) | 30 | AMC | Augmentin أكيومنتين |
| Bioanalyse (Turkey) | 10 | AMP | Ampicillin امبيسيلين |
| Bioanalyse | 30 | CTX | Cefotaxime سيفوتاكيسم |
| Bioanalyse | 10 | TOB | Tobramycin توبرامايسين |
| Oxoid | 10 | GEN | Gentamicin جينتامايسين |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Oxoid | 300 | NIT | Nitrofourantoin نيتروفيوريشن |
| Bioanalyse | 30 | NAL | Nalidixic acid ناليدكسك أسد |
| Bioanalyse | 30 | CHM | Chloramphenicol كلورامفينيكول |
| Oxoid | 100 | PRL | Piperacillin بيبراسيلين |
| Oxoid | 5 | CFM | Cefixime سيفيكسيم |
| Oxoid | 5 | CIP | Ciprofloxacin سبروفلوكاسين |
| Bioanalyse | 100 | CEP | Cephalothin سيفالوثين |
| Bioanalyse | 30 | AT | Aztreonam ازتيريونيم |
| Bioanalyse | 30 | CAZ | Ceftazidime سيفتازيديم |
| Oxoid | 30 | COT | Co-trimoxazol كو- ترايميزول |
| Oxoid | 10 | IMP | Imipenem ايميبينيم |

### 5-1-3 مواد متفرقة أخرى:

1. عدة تشخيص api 20E kit مجهزة من قبل شركة Bio'Mereux (France) .
2. عدة الاختبار المصلي Polyvalent Antisera for *Escherichia coli* .
3. دم بشري صنف (AB) مجهز من مصرف الدم/ ديالى .

## 2-3 طرائق العمل:

### 1-2-3 تحضير المحاليل والكواشف :

حضرت المحاليل والكواشف والصبغات المستخدمة في الدراسة ، عقمت تلك التي تحتاج إلى تعقيم باستخدام جهاز الموصدة Autoclave عند درجة حرارة 121 م ولمدة 15 دقيقة وتحت ضغط 15 باوند/2إنج بينما عقمت بقية المواد الأخرى التي تتعرض للتلف عند درجات الحرارة المرتفعة مثل اليوريا والمضادات الحيوية بالترشيح بمرشحات دقيقة Millipore filtre بقطر 0.22 مايكروميتر. أما المواد الزجاجية فقد عقمت بالفرن عند درجة حرارة 180مْ ولمدة ساعتين.

### 1-1-2-3 المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline :

حضر المحلول الملحي الفسلجي بحسب ما جاء في (Forbes وآخرون, 2002) وذلك لإستعماله في أجراء التخافيف بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 90 مل ماء مقطر ثم أكمل الحجم الى 100مل ، عقم بالموصدة ، وحفظ بدرجة حرارة 4 م° لحين الإستعمال.

### 2-1-2-3 محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland Standard :

حضر المحلول بحسب ما جاء في (Baron وFinegold , 1994) كما يلي:

(محلول آ) : حامض الكبريتيك 1%, حضر باضافة 1 مل من حامض الكبريتيك المركز الى كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم بالماء المقطر الى 100 مل.

(محلول ب) : محلول كلوريد الباريوم, حضر بأذابة 1.175 غم من كلوريد الباريوم في 100 مل من الماء المقطر. مزج 0.5 مل من المحلول (آ) مع 99.5 مل من المحلول (ب) في أنبوبة نظيفة وجافة وذات غطاء محكم لمنع التبخر وتحفظ بالظلام, تمزج محتويات الأنبوبة جيداً قبل كل إستعمال.

### 3-1-2-3 محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز :

## β - lactamase detection Solutions

حضرت محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز بطريقة اليود السريعة Rapid Iodometric Method وذلك بحسب ما ورد في (WHO, 1978) والمحاليل هي :

### 1-3-1-2-3 محلول النشأ Starch Solution :

حضر آنياً عند الإستعمال بإذابة 0.1 غم من مادة النشأ في 10 مل من الماء المقطر، نقلت القنينة إلى حمام مائي بدرجة حرارة 100م° لمدة 10 دقائق وذلك للتأكد من ذوبان النشأ، حفظ المحلول في درجة 4 م°.

### 2-3-1-2-3 محلول اليود Iodine Solution :

حضر بإذابة 2.03 غم من اليود و5.32 غم من يوديد البوتاسيوم في 90 مل من الماء المقطر بعدها أكمل الحجم الى 100 مل وحفظ المحلول في قنينة معتمة ومعقمة بدرجة 4 م°.

### 3-3-1-2-3 محلول البنسلين جي Penicillin G Solution :

حضر بإذابة البنسلين جي في دارئ الفوسفات المتكون من محلولين هما:-

المحلول (أ):- أذيب 0.907 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين $K_2HPO_4$ في كمية من الماء المقطر ، أكمل بعدها الحجم إلى 100 مل .

المحلول (ب):- أذيب 0.946 غم من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين $Na_2HPO_4$، و 1.19 غم من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين (المائية) $Na_2HPO_4.2H_2O$ في كمية من الماء المقطر ، أكمل بعدها الحجم بالماء المقطر إلى 100 مل، بعد ذلك أُخذ 87.6 مل من محلول (أ) و 12.4 مل من محلول(ب) خلطا معاً وضبط الرقم الهيدروجيني إلى 6.0 بعد تحضيرهذا الدارئ ذوب فيه 0.5693 غم من بنسلين جي (Penicilin G)، عقم بالترشيح ووزع في عبوات صغيرة وحفظ عند درجة حرارة 20- م° لحين الإستعمال.

### 4-1-2-3 محلول ملحي مستعمل في جهاز VITEK 2

حضر هذا المحلول بإذابة 0.5 غرام من كلوريد الصوديوم في 95 مليلتر من الماء المقطر ثم عدل pH إلى 7 وأكمل الحجم إلى 100 مليلتر.

### 5-1-2-3 محلول الفورمالديهايد (10%):

حضر بحسب ما ورد في (Backer و Silverton, 1985) بإضافة 250 مللتر من محلول الفورمالديهايد بتركيز 40% و 8.5 غم من كلوريد الصوديوم في 400 مللتر من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى لتر واحد من الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 4% ، حفظ في قنينة زجاجية معقمة في درجة حرارة الغرفة (25) م° لحين الإستخدام.

### 6-1-2-3 محلول البلور البنفسجي Crystal violet :

حضر بتركيز (1%) بإذابة 1 غرام من البلور البنفسجي (Crystal violet) في 100 مللتر من الماء المقطر، وعقم المحلول بطريقة الترشيح وحفظ في قنينة زجاجية معتمة وخزن في درجة حرارة الغرفة (Backer و Silverton, 1985).

### 7-1-2-3 محلول صبغة السفرانين Safranin stain :

حضر آنياً بإذابة0.1 غم من صبغة السفرانين في100 مل من الماء المقطر وعقم المحلول بطريقة الترشيح وحفظ في قنينة زجاجية معتمة وخزن في درجة حرارة الغرفة .

### 8-1-2-3 محلول EDTA:

حضر بإذابة 186,1غم في 1000مل من الماء المقطر مع ضبط الأس الهيدروجيني pH8 بإضافة NaOH قبل التعقيم بالمؤصدة وبعدها برد الوسط إلى 45 م° (Bhalerao وآخرون, 2010).

### 2-2-3 الكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا:

#### 1-2-2-3 كاشف إنزيم الكاتاليز Catalase Reagent :

حضر محلول بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% وذلك بإضافة 1 مللتر بيروكسيد الهيدروجين 30% إلى 9 مللتر من الماء المقطر المعقم. إستعمل الكاشف لمعرفة قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم الكاتاليز (Benson, 2002).

#### 2-2-2-3 كاشف الأوكسيديز Oxidase Reagent :

حضر آنياً من إذابة 1 غم من رباعي الميثيل بارافينيلين ثنائي الأمين ثنائي هيدوكلوريك Tetramethyl-P-phenylene diamino dihydrochloride في 90 مل من الماء المقطر المعقم ومن ثم أكمل الحجم إلى 100مل. إستخدم هذا الكاشف للكشف عن إنتاج إنزيم الأوكسيديز من قبل البكتريا (Koneman وآخرون, 1992).

#### 3-2-2-3 كاشف كوفاك Kovac`s Reagent :

حضر الكاشف من إذابة 10غم من باراثنائي ميثيل أمين بنزالدهايد P-dimethyl aminobenzal dehyde في 150 مل كحول أيزواميلي ثم أضيف 50 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز ببطء حتى يكون الكاشف بلون أصفر شاحب، حفظ الكاشف في قنينة معتمة، وأستخدم للكشف عن تكوين الإندول (Koneman وآخرون, 1992).

#### 4-2-2-3 كاشف أحمر المثيل Methyl red Reagent :

حضر بإذابة 0.1 غم من مسحوق أحمر المثيل في 300 مللتر من الكحول الأثيلي بتركيز 95% ثم أضيف 200 مللتر من الماء المقطر إستخدم الكاشف في إختبار المثيل الأحمر (Brown, 2007).

### 3-2-2-5 كاشف فوكس بروسكور Voges-Proskauer Reagent :

يتكون هذا الكاشف من محلولين :

**محلول (A):** حضر بإذابة 5غم مادة الفا نفثول α-naphthol في 100 مل من الكحول الأثيلي المطلق.

**محلول (B):** حضر بإذابة 40 غم من هيدروكسيدالبوتاسيوم KOH في 100 مللتر من ماء مقطر(Brown, 2007).

### 3-2-3 الأوساط الزرعية Culture Media :

حضرت الأوساط الزرعية بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوات وضبط الأس الهيدروجني إلى 7 ثم عقمت بالموصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط (15 باوند/ انج$^2$) لمدة 15 دقيقة ، ومن ثم حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها بعدها حفظت في الثلاجة عند حرارة 4 م° لحين الإستعمال، فيما حضرت الأوساط التالية كما يأتي:-

### 3-2-3-1 وسط أكار الدم Blood base Agar :

حضر وسط أكار الدم الأساس بحسب التعليمات المذكورة على العبوة وعقمت بالموصدة، بعدها تركت لتبرد بدرجة حرارة 45-50 م° ثم أضيف صنف الدم AB بنسبة 5% ، ومزج جيداً بعدها صب الوسط في أطباق معقمة ، وترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، حفظ بدرجة 4 م° لحين الإستعمال ، أستخدم للعزل الأولي للبكتريا المنتجة لإنزيم Hemolysin الحال لكريات الدم الحمر ( Cheesbrough, 2006).

### 3-2-3-2 وسط أكار الماكونكي MacConkey Agar :

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة، وعقم بالموصدة وترك ليبرد إلى درجة 50 درجة مئوي وتم صبه في أطباق بتري نظيفة ومعقمة، إستعمل هذا الوسط لعزل الجراثيم السالبة لملون غرام وتشخيصها من حيث إختبار قابليتهاعلى تخمير سكر اللاكتوز (Collee وآخرون, 1996).

### 3-3-2-3 وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain-heart infusion Broth :

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة وعقم بالموصدة وحفظت الاطباق لحين الإستخدام.

### 3-3-2-4 وسط نقيع القلب والدماغ الصلب Brain-heart infusion Agar :

حضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة وعقم بالموصدة وحفظت الاطباق لحين الإستخدام.

### 3-3-2-5 وسط أكار اليوريا Urea base Agar :

حضر 950 مل من وسط أكار اليوريا الأساس Urea Base agarبحسب التعليمات الواردة من الشركة المصنعة وبعد تعقيمه بالموصدة وتبريده إلى 45 م° أضيف إليه 50 مل من محلول 40% يوريا معقمة بالترشيح بإستخدام أغشية الترشيح الدقيقة (Millipore Filter)، ثم صب بصورة مائلة في أنابيب معقمة ذات أغطية محكمة، إستخدم الوسط لغرض الكشف عن قابلية العزلات على إنتاج إنزيم اليوريز (Li وآخرون, 2004).

### 3-3-2-6 وسط ماء الببتون Pepton water medium :

حضر بإذابة (2) غم من الببتون و 0.5 غم من كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر المعقم ، عقم بالموصدة بعد ضبط الأس الهيدروجيني إلى 7 ، إستخدم هذا الوسط في التحري عن إنتاج الأندول (Koneman وآخرون, 1992).

### 3-3-2-7 وسط الحركة Motility medium :

حضر على وفق ماورد في ( Harley و Prescott, 1996) وذلك بإذابة 10غم من التربتون و5غم من كلوريد الصوديوم و 5غم من أكار أكار في 1 لتر من الماء المقطر, ثم عقم بالموصدة بعد ضبط الأس الهيدروجيني عند(7.2).

### 3-3-2-8 وسط الكونكوريد أكار Congo-red Agar :

أذيب 37غم من وسط المرق المغذي و 50 غم سكروز و10 غم من وسط أكار أكار في 900 مل من الماء المقطر , وعقم الوسط بالمؤصدة أما صبغة الكونكوريد فقد أذيب 0.8 غم منه في 100مل من الماء المقطر وعقمت بالمؤصدة, وبعدها أضيفت إلى الوسط بعد تبريده إلى (55م°) وصبت في أطباق معقمة, هذا الوسط يستخدم للكشف عن قابلية البكتريا على إنتاج الطبقة المخاطية slime layar (Freeman وآخرون, 1989).

### 9-3-2-3 أكار زايلوز لايسين ديوكسي كوليت Xylose lysine deoxycholate Agar :

حضر على وفق تعليمات الشركة المجهزة، وتم تعقيمه بالتسخين إلى درجة الغليان مع الرج المستمر، نقل بعدها إلى حمام مائي بدرجة حرارة 50 درجة مئوية من ثم تم صبه في أطباق بتري نظيفة ومعقمة.

إستعمل هذا الوسط لإختبار قابلية العزلات الجرثومية على تخمير سكر الزايلوز والتحري عن انتاج انزيم Lysine decarboxylase وكذلك سحب مجموعة الكاربوكسيل ($COO^-$) من الحامض الأميني لايسين (Lysine) وأيضاً إنتاج غاز $H_2S$ (Forbes وآخرون, 2007).

### 10-3-2-3وسط مثيل الأيوسين الأزرق Eosin methylene blue medium (EMB)

حضر على وفق تعليمات الشركة المجهزة، وعقم بالموصدة وتم صبه في أطباق بتري لحين الإستعمال .إستخدم هذا الوسط لغرض تفريق جراثيم *E.coli* (Forbes وآخرون, 2007).

### 11-3-2-3 وسط التربتكيز صويا أكار Trypticase Soy Agar (TSA) :

حضر هذا الوسط بإذابة 19غم من TSA في 500مل من الماء المقطر بحسب تعليمات الشركة المصنعة, وأضيف إليه 3% من خلاصة الخميرة وعقمت بالمؤصدة ,إستخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج البكتريوسين (القصاب والخفاجي, 1992).

### 12-3-2-3 وسط أكار الكلغلر Kligler Iron Agar :

حضر هذا الوسط بإذابة 5.75 غم من الوسط Kligler Iron agar في كمية من الماء المقطر وبعد ذوبان الوسط أكمل الحجم النهائي إلى 500 مل من الماء المقطر. ووزع في أنابيب إختبار معقمة ليكون ممال الأكار، إستخدم للكشف عن الجراثيم المنتجة للغاز $H_2S$ (MacFaddin, 2000).

### 13-3-2-3 حفظ وإدامة العزلات الجرثومية :

- **الحفظ قصير الأمد Short-Term Preservation :**

زرعت العزلات الجرثومية بعد تشخيصها على وسط مانكونكي أكار ووسط الأكار المغذي وبطريقة التخطيط وحضنت عند 35 م° ولمدة 24 ساعة ثم لفت الأطباق بشريط Parafilm بصورة محكمة وحفظت في الثلاجة عند 4 م° ولمدة عدة أسابيع ( Cheesbrough, 2006).

- **الحفظ متوسط ألامد Medium-Term Preservation:**

حفظت العزلات الجرثومية في وسط الأكار المغذي المائل Nutrient agar slant المحضر في أنابيب زجاجية معقمة والحاوية على 10مللتر من الوسط المغذي وحفظت عند درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم نقلت بعدها إلى الثلاجة في درجة حرارة 4 م° ولمدة تتراوح بين 1–3 أشهر مع مراعاة إدامة العزلات دورياً كل 3 أشهر وإعادة زراعتها لتنشيطها طيلة فترة الدراسة ( Collee وآخرون, 1996).

- **الحفظ طويل الأمد Long-Term Preservation :**

حُضر الوسط المستخدم لحفظ العزلات البكتيرية , بإضافة 15 مل من الكليسرول إلى 85 مل من مرق نقيع الدماغ والقلب Brain heart infusion broth , ووزع في قناني صغيرة ذات غطاء محكم وعقم بالموصدة, ترك ليبرد في درجة حرارة الغرفة , ثم لقح بمستعمرات نقية من البكتريا النامية على وسط الأكار المغذي بإستخدام الناقل Loop , وحفظت القناني في درجة حرارة 20– م° بعد حضانتها لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37م° إستخدمت هذه الطريقة في الحفظ الدائم ( Ausubel وآخرون, 1987).

## 3-3 جمع العينات Collection of Samples :

جمعت 350 عينة من وسط مجرى البول (Mid-stream urine) من النساء المصابات بخمج المجاري البولية, تم جمع العينات من النساء المراجعات في مستشفى خانقين العام والرعاية الصحية في خانقين والمختبرات الخارجية في خانقين للفترة الواقعة بين

(2013/10/15 – ولغاية 2014/2/18). إذ سجلت المعلومات المتعلقة بالمريض من الإسم والعمر وأمراض أخرى في إستمارة خاصة (ملحق 1)، زرعت النماذج مباشرة بعد أخذ العينة لغرض التشخيص.

### 4-3 زرع العينات Samples culture :

زرعت العينات بشكل فوري على وسط أكار الدم, وسط أكار الماكونكي, ووسط الإيوسين مثيلين الأزرق ، وحضنت الأطباق بدرجة 37 مْ ولمدة 18– 24 ساعة وتم تنقية العزلات على وسط الماكونكي أكار بطريقة التخطيط , أجري بعدها عدد من الفحوصات التشخيصية المظهرية والكيموحيوية والمصلية للبكتريا المعنية بالدراسة.

### 5-3 تشخيص العزلات البكتيرية Bacterial Identification

### 1-5-3 التشخيص المظهري والصفات الزرعية Cultural Characteristics :

شخصت مستعمرات بكتريا *E.coli* بالإعتماد على الصفات الزرعية للمستعمرات النامية على وسط مانكونكي أكار ووسط أكار الدم وتم عزل وتنقية المستعمرات النامية وذلك بأخذ مستعمرة مفردة وإعادة زرعها بطريقة التخطيط Streaking على وسط مانكونكي أكار مرة أخرى للتأكد من نقاوة المستعمرة المعزولة.

بعد التشخيص الأولي للعزلات الجرثومية تم إعادة زرع هذه العزلات على وسط إيوسين مثيلين الأزرق Eosin methylene blue (EMB) والذي يعد من الأوساط التفريقية المهمة لتشخيص بكتريا *E.coli* إذ تعطي مستعمراتها المخمرة للاكتوز لمعاناً معدنياً أخضر Metalic_ sheen colony على هذا الوسط ( Winn وآخرون, 2006).

### 2-5-3 الفحص المجهري Microscopic Examination :

حضرت المسحات الجرثومية Bacterial smears من المستعمرات المعزولة بإستعمال شرائح زجاجية نظيفة وتم تلوينها بصبغة كرام ولوحظ شكل ولون الخلايا الجرثومية بإستعمال المجهر الضوئي Light microscope وبإستعمال العدسة الزيتية.

### 3-5-3 النمو على وسط أكار الزايلوز لايسين دوكسي كوليت (XLDA):

أعيد إستنبات العزلات على وسط غراء الزايلوز لايسين ديوكسي كوليت وحضنت الأطباق هوائياً بدرجة حرارة 37 درجة مئوية مدة (24 – 48) ساعة، لوحظ بعدها شكل النمو إذ يحتوي هذا الوسط على سكر الزايلوز والحامض الأميني اللايسين وأملاح الصفراء الأمر الذي جعله وسطاً تفريقياً انتقائياً في الوقت نفسه، إذ يتم من خلاله التحري عن قابلية الجراثيم على تخمير سكر الزايلوز وإزالة مجموعة الكاربوكسيل من الحامض الأميني لايسين فضلاً عن إختبار قابلية العزلات على النمو في وسط يحتوي على أملاح الصفراء بوصفها مثبطة لنمو بعض الأنواع الجرثومية. فضلاً عن ذلك من خلال هذا الوسط يجري التحري عن إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين $H_2S$ من بعض الأنواع الجرثومية.

### 4-5-3 الفحوصات الكيموحيوية: Biochemical Test :

شخصت العزلات الجرثومية بالإعتماد على مصنف بيرجي (Holt وآخرون, 1994) و( Brenner وآخرون, 1999) وبإستعمال الطرائق التي إتبعها (MacFaddin , 2000) و (Collee وآخرون, 1996) و (Forbes وآخرون, 2007) ومن خلال الإختبارات الكيموحيوية والمظهرية الآتية:

### 1-4-5-3 إختبار إنزيم الكاتاليز Catalase test :

إستخدم هذا الإختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الكاتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء ويتحرر غاز الأوكسجين بشكل فقاعات هوائية ، إذ نقل جزء من المزروع البكتيري إلى شريحة زجاجية نظيفة وأضيف إليها بضع قطرات من3% كاشف بيروكسيد الهيدروجين ($H_2O_2$) بإستخدام ماصة باستور، يعد ظهور فقاعات غاز الأوكسجين دليل على إيجابية الفحص (Koneman وآخرون, 1992).

### 2-4-5-3 إختبار إنزيم الأوكسيديز Oxidase test :

إستخدم هذا الإختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم السيتوكروم أوكسيديز (Cytochrome oxidase) ، إذ شبعت ورقة ترشيح بقطرات من كاشف الأوكسيديز، وبوساطة أعواد خشبية معقمة نقلت مستعمرة من العزلة قيد الدراسة إلى ورقة الترشيح ، تعد النتيجة

موجبة عند ظهور اللون البنفسجي خلال 10 ثوانٍ من ملامسة الخلايا البكتيرية لكاشف الأوكسيديز على الورقة (Koneman وآخرون, 1992).

### 3-4-5-3 إختبار الأندول Indole test :

إستخدم للكشف عن وجود الإندول ، الذي يعد أحد نواتج أيض الحامض الأميني التربتوفان نتيجةً لإمتلاك البكتريا لإنزيم التربتوفانيز Tryptophanase ، إذ لقح وسط ماء الببتون السائل بمزروع العزلة قيد الدراسة ، حضن الوسط بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ، ثم أضيف 5 قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's reagent على السطح الداخلي لإنبوبة الإختبار، تعد النتيجة موجبة عند ظهور حلقة حمراء خلال ثوان من إضافة الكاشف (Koneman وآخرون, 1992).

### 3-4-5-4 إختبار أحمر المثيل Methyl red test :

إستخدم هذا الإختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج كميات كبيرة من أحماض اللاكتيك Lactic أو الفورميك Formic نتيجة أيض الكلوكوز، إذ لقح مرق MR/VP بمزروع للعزلة قيد الدراسة ، حضن بدرجة 37 م° لمدة 48–72 ساعة ، ثم أضيفت خمس قطرات من كاشف أحمر المثيل، تعدّ النتيجة موجبة عند تغيير اللون إلى أحمر (Koneman وآخرون, 1992).

### 3-4-5-5 إختبار فوكس بروسكاور Voges –Proskaur test :

إستخدم هذا الإختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج أستيل مثيل كاربينول (أسيتوين) Acetoin إذ لقح مرق MR/VP بمزروع العزلة قيد الدراسة ، حضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 48–72 ساعة, نقل 1 مل من العالق إلى إنبوبة إختبار نظيفة ، أضيف إليها 0.6 مل من محلول الفانفثول (كاشفVp1) متبوعاً 0.2 مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 40% (كاشف Vp2) مع رج الأنبوبة بلطف ، تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون الأحمر بعد حوالي 15 دقيقة (Koneman وآخرون, 1992).

### 3-4-5-6 إختبار إستهلاك السترات Citrate Utilization test :

زرعت العزلات على مائل وسط سايمون– ستريت ، حضن بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ، تعد النتيجة موجبة عند تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق لإستهلاك السترات.

### 7-4-5-3 فحص تخمر السكريات وإنتاج $H_2S$ و $CO_2$ :

### Sugar Fermentation and $CO_2$, $H_2S$ Production Test

زرع وسط الحديد كلكلر الصلب المائل بالمزارع البكتيرية بطريقة التخطيط على السطح المائل، وحضن بحرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، بعدهاتمالتحريعن وجود غاز $H_2S$ و$CO_2$ .

### 8-4-5-3 إختبار الحركة Motility test :

لقح وسط إختبار الحركة بمستعمرات فتية من العزلات الجرثومية بطريقة الطعن بإستعمال الإبرة Needle وحضنت الأنابيب الملقحة بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة، يعد ظهور تضبب أو عكارة حول منطقة الطعن نتيجة موجبة للإختبار.

### 5-5-3 تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص Api 20E Kit :

إستخدمت عدة Api 20E Kit الجاهزة وبحسب تعليمات الشركة المصنعة Bio Merieux ذلك لزيادة التأكد من عملية تشخيص العزلات إلى مستوى النوع Species والتي تتضمن 20 إختباراً كيموحيوياً ولجميع العزلات بحسب ما ورد في (Brown, 2007) وكالآتي :_

- تحضير الشريط Preparation of the Strip :

تم وضع 5 مليلترات من الماء في الحفر (Wells) المتوافرة في حاوية الشريط (Tray) لجعل الظروف رطبة ثم وضع الشريط داخل الحاوية.

- تحضير اللقاح البكتيري Preparation of bacterial inoculum :

نُقلت مستعمرة مفردة نقية نامية على وسط أكار ماكونكي إلى أنبوبة أختبار حاوية على 5 مليلتر من محلول الملح الفسلجي المحظر في الفقرة (3-2-1-1) وبعد المزج الجيد بإستعمال المازج قُورنت عكورته بعكورة إنبوبة ماكفرلاند 0.5 المحضر في الفقرة (3-2-1-2).

- تلقيح الشرائط Inoculation of the Strips :

بأستعمال ماصة باستور معقمة أُضيف العالق البكتيري على حافة الإنبوب المتوافر على الشرائط وملىء (مع تجنب حدوث فقاعات في أثناء الإضافة) الجزء السفلي (Tube) والجزء العلوي (Cupule) منه، بالنسبة لأختبارات السترات والفوكس بروسكور والجلاتين (GEL,VP,CIT) أما بقية الأنابيب فملىء الجزء السفلي (الأنبوب فقط) وأضيف الزيت (Mineral Oil) في الجزء العلوي بالنسبة لإختبارات الأرجنين واللايسين والأورنثين وإنتاج كبريتيد الهيدروجين واليورياز (ADH,LDC,ODC,H2S,URE) أغلقت الحاوية بالغطاء (Lid) الخاصة بها وحضنت بدرجة 37 مْ ولمدة 18–24 ساعة .

- قراءة النتائج :

بعد إنتهاء مدة الحضن أُضيفت الكواشف المجهزة مع العدة التشخيصية وكما يأتي:

أ– قطرة من كاشف الأندول (JAMES) إلى إنبوب الأندول (IND) وقرأت النتيجة مباشرة.

ب– قطرة من كاشف من 10% كلوريد الحديديك إلى إنبوب التربتوفان ذي إميناز TDA وقرأت النتيجة مباشرة .

جـ – قطرة من كاشف (VP1) من (40% هيدروكسيد البوتاسيوم) ثم قطرة من كاشف (VP2) (6% ألفا – نفثول) إلى إنبوب (VP) وقرأت النتيجة خلال دقائق بحسب الجدول (3–1).

**الجدول (3-1) الإختبارات الكيموحيوية بإستعمال نظام APi 20 E :**

| ت | الأختبار | الرمز | النتيجة السالبة | النتيجة الموجبة |
|---|---|---|---|---|
| 1 | أنتاج أنزيم بيتا الكتوسايديز | ONPG | عديم اللون | أصفر |
| 2 | تحلل الأرجنين | ADH | أصفر | أحمر/ برتقالي |
| 3 | تحلل اللايسين | LDC | أصفر | أحمر/ برتقالي |
| 4 | الأورنيثين | ODC | أصفر | أحمر/ برتقالي |
| 5 | أستهلاك السترات | CIT | أصفر | أخضر/ أزرق |
| 6 | أنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين | H2S | عديم اللون | راسب اسود |
| 7 | أنتاج أنزيم اليوريز | URE | أصفر | أحمر/ برتقالي |
| 8 | أنتاج أنزيم تربتوفانديامنيز | TDA | أصفر | بني غامق |
| 9 | أنتاج الأندول | IND | حلقة صفراء | حلقة حمراء |
| 10 | أنتاج الأسيتون | VP | عديم اللون | وردي/ أحمر |
| 11 | أنتاج أنزيم محلل الجلاتين | GEL | عدم أنتشار الصبغة | أنتشار صبغة سوداء |
| 12 | تخمر سكر الكلوكوز | GLU | أزرق | أصفر |
| 13 | تخمر المانيتول | MAN | أزرق | أصفر |
| 14 | تخمر الإينوسيتول | INO | أزرق | أصفر |
| 15 | تخمر السوربيتول | SOR | أزرق | أصفر |
| 16 | تخمر الرامينوز | RHA | أزرق | أصفر |
| 17 | تخمر السكروز | SAC | أزرق | أصفر |
| 18 | ميليبايوز | MEL | أزرق | أصفر |
| 19 | أمكدالين | AMY | أزرق | أصفر |
| 20 | الأرابينوز | ARA | أزرق | أصفر |

### 6-5-3 تشخيص البكتريا بنظام VITEK 2 :

إستعمل هذا الجهاز المجهز من شركة (Bio Merieux) بتشخيص البكتريا بدرجة عالية جداً من الدقة إذ يتضمن هذا الجهاز 64 إختباراً من الإختبارات الكيموحيوية التي تستعمل في تشخيص البكتريا بحيث تصل درجة دقة التشخيص بهذا الجهاز إلى 98% كذلك يمكن إجراء فحص الحساسية لمضادات الحيوية بهذا الجهاز.

**المواد المستعملة :**

1- VITEK 2 Cassette
2- محلول ملحي معقم محضر في فقرة (3-2-1-4 )
3- أوساط زرعية (وسط ماكونكي و وسط نقيع القلب ووسط الأكار المغذي )
4- قطعة بلاستيكية تسمى (Polystyrene) لغرض حمل الأنابيب
5 - VITEK 2 GN Card
6 - VITEK 2 DENSICHEK
7 - Vortex
8 - مسحة معقمة
9 - VITEK 2 DENSICHEK Power Adapter

**طريقة العمل :-**

1- زرعت البكتريا المراد فحصها على وسط أكار الماكونكي أو الأكار المغذي وحضنت مدة 24 ساعة وبدرجة 37 مْ وبطريقه التخطيط .

2- أجري فحص صبغة كرام للعينة لغرض إختيار VITEK 2 Cassette المناسب.

3 -تم إنتقاء مستعمرة مفردة نقية من البكتريا وتخفيفها في 3 مليلتر من المحلول الملحي الموضوع في إنبوبة معقمة ومحمولة بحامل خاص.

4- قيست عكورة المستعمرة بجهاز VITEK 2 DENSICHEK بحيث تكون العكورة 0.5 – 0.63 .

5- وضع العالق الموجود في الإنبوبة في VITEK 2 Cassette الخاص بالبكتريا السالبة لصبغة كرام.

6- ثم نقل VITEK 2 Cassette إلى الجهاز لغرض تشخيص البكتريا عن طريق 64 فحصاً كيموحيوياً (جدول 3-2).

7- ظهرت النتيجة بعد 24 ساعة من وضع العينة في الجهاز، (جدول 3-2).

## الجدول (3-2) الفحوصات الكيموحيوية التي يقوم بها جهاز VITEK2

| رقم الحفرة | اسم الاختبار | المختصر | تركيز المركب |
|---|---|---|---|
| 2 | Ala –Phe-Pro-ARYLAMIDASE | APPA | 0.0384 MG |
| 3 | ADONITOL | ADO | 0.1875 mg |
| 4 | L-Pyrrolydonyl –ARYLAMIDASE | PyrA | 0.018 mg |
| 5 | L-ARABITOL | IARL | 0.3 mg |
| 7 | D-CELLOBIOSE | dCEL | 0.3 mg |
| 9 | BETA –GALACTOSIDASE | BGAL | 0.036 mg |
| 10 | H2S PRODUCTION | H2S | 0.0024 mg |
| 11 | BETA -N –ACETYL - GLUCOSAMINDASE | BNAG | 0.0408 mg |
| 12 | Glutamyl Arylamidase pNA | AGLTp | 0.0324 mg |
| 13 | D-GLUCOSE | Dglu | 0.3 mg |
| 14 | GAMMA -GLUTAMYL - TRANSFERASE | GGT | 0.0223 mg |
| 15 | FERMENTATION /GLUCOSE | OFF | 0.45 mg |
| 17 | BETA -GLUCOSIDASE | BGLU | 0.036 mg |
| 18 | D –MALTOSE | dMAL | 0.3 mg |
| 19 | D-MANNITOL | Dman | 0.1875 mg |
| 20 | D-MANNOSE | Dmne | 0.3 mg |
| 21 | BETA –XYLOSIDASE | BXYL | 0.0324 mg |
| 22 | BETA-Alanine aryamidase Pna | BAlap | 0.0174 mg |
| 23 | L-Proline ARYLAMIDASE | ProA | 0.0234 mg |
| 26 | LIPASE | LIP | 0.0192 mg |
| 27 | PALATINOSE | PLE | 0.3 mg |
| 29 | Tyrosine ARYLAMIDASE | TyrA | 0.0276 mg |
| 31 | UREASE | URE | 0.15 mg |
| 32 | D-SORBITOL | dSOR | 0.1875 mg |
| 33 | SACCHAROSE /SUCROSE | SAC | 0.3 mg |
| 34 | D-TAGATOSE | dTAG | 0.3 mg |
| 35 | D-TREHALOSE | dTRE | 0.3 mg |
| 36 | CITRATE (SODIUM) | GIT | 0.054 mg |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 0.15 mg | MNT | MALONATE | 37 |
| 0.3 mg | 5RG | 5-KETO –D –GLUCONATE | 39 |
| 0.15 mg | ILATK | L-LACTATE alkalipisation | 40 |
| 0.036 mg | AGLU | ALPHA –GLUCOSIDASE | 41 |
| 0.15 mg | SUCT | SUCCINATE alkalipisation | 42 |
| 0.0306 mg | NAGA | Beta –N-ACETYL – GALACTOSAMINIDASE | 43 |
| 0.036 mg | AGAL | ALPHA-GALACTOSIDASE | 44 |
| 0.0504 mg | PHOS | PHOSPHATASE | 45 |
| 0.012 mg | GlyA | Glycine ARYLAMIDASE | 46 |
| 0.3 mg | ODC | ORNITHINE DECARBOXYLASE | 47 |
| 0.15 mg | LDC | LYSINE DECARBOXYLASE | 48 |
| NA | ODEC | DECARBOXYLASE BASE | 52 |
| 0.087 mg | IHISa | L-HISTIDINE assimilation | 53 |
| 0.126 mg | CMT | COURMARATE | 56 |
| 0.0378 mg | BGUR | BETA –GLUCORONIDASE | 57 |
| 0.0105 mg | O129 R | O/129 RESISTANCE (comp. vibrio.) | 58 |
| 0.0576 mg | GGAA | GLU-GLY-Arg-ARYLAMIDASE | 59 |
| 0.042 mg | IMLTa | L-MALATE assimilation | 61 |
| 0.03 mg | ELLM | ELLMAN | 62 |
| 0.186 mg | ILATa | L-LACTATE assimilation | 64 |

## 6-3 الإختبار المصلي Serological Test :

أجري تحديد النوع المصلي لسلالة بكتريا إيشريشيا القولونية المعزولة من النساء المصابات بإلتهابات المجاري البولية بطريقة Rapid Slide Agglutination Test وبإستخدام عدة الإختبار المصلي المتعددة التكافؤ (Polyvalent antisera for *E.coli*) وتبين إنها أحد أنواع سلالات بكتريا إيشريشيا القولونية المسببة للمرض، وذلك بإستخدام المصول المضادة Antisera والذي يحدد $O_{26}$ , $O_{55}$ , $O_{111}$ , $O_{119}$ , $O_{126}$ Anti-coli وبحسب تعليمات الشركة المصنعة Plasmatec , UK وكالآتي :-

**1**- حضر لقاح كثيف من العزلات المراد فحصها من وسط الأكار المغذي وبعمر 24 ساعة, ووضع في 3 مللتر من المحلول الملحي الطبيعي 0.85% مع الرج الجيد لتجانس المحلول.

**2**- وضع العالق الجرثومي في حمام مائي بدرجة حرارة 100 م لمدة 60 دقيقة أو يتم وضعه في الموصدة بدرجة حرارة 121 ولمدة 15 دقيقة.

**3**- نبذ العالق الجرثومي بالمنبذة بسرعة (900) لمدة 20 دقيقة وطرح الراشح وأضيف إلى الراسب 0.5 مللتر من المحلول الفسلجي الطبيعي ورج جيداً إلى أن يتجانس إذ إستخدم هذا العالق للتحري عن المستضد الجسمي somatic O- antigen .

**4**- وضعت قطرة من العالق على شريحة زجاجية نظيفة ومزجت مع قطرة من مضاد المصل Polyvalent antisera ووضعت قطرة أخرى من مضاد المصل على شريحة زجاجية نظيفة أخرى ومزجت مع قطرتين من المحلول الملحي الطبيعي إذ إستخدمت نموذجاً للسيطرة.

**5**- فحصت الشريحة مع التحريك لمدة دقيقة واحدة حيث يدل حدوث التلازن الحبيبي في شريحة العالق الجرثومي وعدم حدوثه في شريحة السيطرة على إجابية الإختبار.

**6**- العزلات الموجبة للإختبار المصلي متعدد التكافؤ تعتبر حاملة للمستضد الجسمي O-antigenic factor ولتحديد السلالة المصلية يجري الإختبار بإستعمال الأمصال المضادة أحادية التكافؤ Monovalent antisera .

## 7-3 التحري عن بعض عوامل الضراوة في البكتريا :

### 1-7-3 التحري عن إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production :

تم الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على إنتاج الهيمولايسين البكتيري بزرع هذه العزلات على وسط أكار الدم, حضنت الأطباق بعد التلقيح في درجة حرارة 37م° ولمدة 24 (Atlas وآخرون, 1995).

### 2-7-3 إختبار إنتاج البكتريوسين Bacteriocin :

إستخدمت طريقة (القصاب والخفاجي، 1992) للتحري عن السلالات المنتجة للبكتريوسين والسلالات الحساسة له إذ إستخدمت العزلات كافة بوصفها عزلات منتجة كما إستخدمت العزلات نفسها كعزلات حساسة وقد أجري الإختبار كالآتي:

زرعت البكتريا المنماة مسبقاً في وسط نقيع القلب والدماغ وبعمر 24 ساعة بطريقة النشر على وسط أكار TSA المحظر في الفقرة (3-2-3-11) ثم حضنت الأطباق بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة, بعدالحضن عملت أقراص بوساطة الثاقب الفليني في هذا الوسط ووضعت على سطح الأكار المغذي والمنشور عليه بالناشر مقدار 0.1 مل من مزروع كل من عزلات الإختبار البكتيرية المذكورة بعد مقارنتها مع محلول ماكفرلاند القياسي المحظر ثم حضنت الأطباق بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة, سجلت النتائج وهي توافر مناطق تثبيط حول قطعة الأكار الحاوي على السلالة المنتجة.

### 3-7-3 إختبار إنتاج إنزيم اليوريز Urease test :

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط أكار اليوريا فقرة (3-2-3-5)، بطريقتي الطعن والتخطيط المائل ثم حضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة. دل تحول لون الوسط إلى الوردي على إيجابية الإختبار.

### 4-7-3 إختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm :

### A- طريقة أحمر الكونغو Congo-red Method :

نقلت مستعمرة مفردة نقية على وسط أكار الماكونكي إلى إنبوبة إختبارحاوية على 5 مل من محلول الملحي الفسلجي المحضر في الفقرة(3-2-1-1) وبعد المزج الجيد بوساطة المازج قورنت عكورته بعكورة ماكفرلاند0.5 المحضر في الفقرة (3-2-1-2) ولقح وسط الكونكورويد المحضر في الفقرة (3-2-3-8) وحضنت الأطباق في درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 -48 ساعة ، النتيجة موجبة عندما تظهر المستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة ,أما النتيجة السالبة فتبقى المستعمرات وردية اللون (Mathur وآخرون, 2006 ; Freeman وآخرون, 1989).

## B- طريقة الأنابيب Tube Method :

1-لقحت أنابيب حاوية على 10 مل من وسط مرق تربتون صويا بالبكتريا المقارنة عكورتها مع ماكفرلاند 0,5 ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .

2-أزيل الوسط الموجود في الأنابيب بالتفريغ ثم يضاف 10 مل من صبغة السفرانين المحضرة في الفقرة (3-2-1-7).

3-تفرغ صبغة السفرانين وتقلب الأنابيب على قطعة شاش نظيفة إلى أن تجف بدرجة حرارة الغرفة .

4- تعد النتيجة موجبة على أساس وجود تصبيغ في قعر الإنبوب وعلى الجدران وتعد النتيجة خاطئة في حالة وجود قطرات مائية أو هوائية ملتصقة على الجدار(Freeman وآخرون, 1989).

## C- إختبار تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الاليزا ELISA Method :

أجري هذا الإختبار بحسب الطريقة التي أشار إليها (Sandoe وآخرون، 2003) وكالأتي:-

1- نقلت 3-4 مستعمرات من البكتريا بعمر 24-48 ساعة ، ثم لقحت بأنابيب حاوية على 5-10مللتر من مرق نقيع القلب والدماغ ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة.

2- نبذت الأنابيب مركزياً للتخلص من الوسط والحصول على المعلق الجرثومي, غسلت الخلايا بالمحلول الملحي الفسيولوجي المعقم مرتين.

3- وضع 180مايكروليترمن مرق نقيع القلب والدماغ في (Flat-bottomed tissue culture plate)، وخصصت لكل عزلة حفرتين ثم أضيف 20مايكروليتر من المعلق الجرثومي المحضر إلى الحفر المخصصة لكل عزلة. تركت ثلاث حفر كسيطرة، إذ وضع فيها 200 مايكروليتر من وسط مرق نقيع القلب والدماغ غير الملقح.

4- غطي الطبق بورقة نظيفة ولاصقة (Para Film) ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة.

5- أزيل الوسط المتوافر في الحفر بوساطة ماصة دقيقة (Micropipette) مثبتة عند200 مايكروليتر ثم غسلت الحفر مرة واحدة بإستخدام المحلول الملحي الفسيولوجي وبمعدل 300 مايكروليتر وبإستخدام غاسل منظومة الاليزا (ELISA-washer).

6- وضع 10% فورمالديهايد المحضر في الفقرة ( 3-2-1-5) بمعدل 200 مايكروليتر لكل حفرة لتثبيت الغشاء الحيوي المتكون من العزلات الجرثومية على السطوح الداخلية لحفر الصفيحة وترك الطبق لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة 25°م، ثم أزيل الفورمالديهايد من جميع الحفر بإستخدام ماصة دقيقة مثبتة عند 200 مايكروليتر.

7- قلب الطبق على قطعة شاش نظيفة ووضع بشكل مقلوب إلى اليوم التالي بدرجة حرارة الغرفة.

8- أضيف البلور البنفسجي (Crystal violet) المحضر في الفقرة ( 3-2-1-6) بمعدل 200 مايكروليتر لكل حفرة لتصبيغ الغشاء الحيوي المتكون.

9- قرأت الكثافة البصرية بإستخدام قارىء منظومة الاليزا (ELISA reader) عند طول موجي 590 نانوميتر.

## 8-3 فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic suscepitibilitytest :

أستخدمت طريقة Bauer & Kerby القياسية لإختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية (Vandepitte وآخرون, 1991). وكالآتي :

1- لقح 5 مل من وسط المرق المغذي بـ 3-2مستعمرات من مزارع بكتيرية نقية بعمر 24 ساعة .
2- رجت الأنابيب جيداً، وحضنت بالحاضنة بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة .
3- قورنت عكورة النمو بعكورة المحلول ثابت العكرة القياسي لإعطاء عدد تقريبي مساوي $1.5\times10^8$ خلية / مل.

4- نقل 0.1 مل من العالق البكتيري ونشر على وسط أكار مولر هنتون، ترك الطبق لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لحين جفاف المزروع .
5- نقلت أقراص المضادات الحيوية إلى سطح الوسط الزرعي بوساطة ملقط معقم بمعدل 6-7 أقراص لكل طبق .
6- حضنت الأطباق بدرجة 37م° لمدة 18-24 ساعة قيست بعدها أقطار مناطق التثبيط حول كل قرص، عدت البكتيريا حساسة Sensitive (S) أو مقاومة Resistance (R) اومتوسط intermediate (I) بحسب المواصفات القياسية الواردة في (NCCLs , 2007).

## 9-3 التحري عن إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز β-Lactamase Production :

### 1-9-3 تحضير العالق البكتيري:

لقحت أنابيب إختبار تحوي كل منها على 5مل من محلول الملح الفسلجي بـ 150مايكروليتر من مزارع بكتيرية منماة في وسط نقيع الدماغ والقلب بعمر 18 ساعة للعزلات قيد الدراسة، مزجت بمازج وبذلك تم تحضير عالق بكتيري بتركيز تقريبي للخلايا ($10^8$) خلية/مل، وذلك بعد مقارنة عكرة النمو المتكونة مع عكرة محلول ثابت العكرة القياسي المحضر بحسب الفقرة ( 3-2-1-2 ) وإجراء العدد الحي للخلايا في المحلول .

### 2-9-3 إستخدام طريقة اليود القياسية السريعة Rapid Iodometric :

إستخدمت هذه الطريقة للكشف عن قابلية العزلات قيد الدراسة على إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز وذلك بحسب ما ورد في (WHO, 1978) وكما يأتي :

1. حضرت مزارع للعزلات البكتيرية بعمر 24 ساعة .
2. نقلت المستعمرات البكتيرية بوساطة العروة إلى أنابيب صغيرة حاوية على 100مايكروليتر من البنسلين جي فقرة (3-2-1-3-3) . حضنت الأنابيب لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 37 مْ. ثم أضيف إلى كل إنبوبة 50 مايكروليتر من محلول النشأ ومزجت جيداً.

3. أضيف إلى كل إنبوبة في أعلاه 20 مايكروليتر من محلول اليود فقرة (3-2-1-3-2) إذ يتحول لون المحلول إلى أزرق غامق نتيجة تفاعل اليود مع النشأ . مزجت محتويات الأنابيب جيداً لمدة دقيقة واحدة.

4. أحتسبت النتيجة موجبة عند حصول تغير لوني سريع من اللون الأزرق إلى اللون الأبيض خلال دقيقة واحدة فقط من أضافة الكاشف (اليود), أعيد الفحص بظهور نتيجة موجبة متأخرة (أكثر من خمس دقائق) .

### 3-9-3 التحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) :

إستخدمت طريقة الأقراص المتاخمة Disc approximation للتحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وذلك بحسب ما جاء في (Jarlier وآخرون, 1988) وكالآتي :

1. حضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة على وفق الفقرة (3-9-1) ونشر 0.1 من العالق البكتيري بوساطة المسحة القطنية Swab المعقمة على أطباق حاوية على وسط مولرهنتون بصورة كاملة، تركت الأطباق لمدة 10 دقائق لتجف.

2. وضع قرص يحتوي على خليط من Amoxicillin/ Clavulanic acid (30 µg / Disc) في وسط الطبق الزرعي الملقح . بعد ذلك رتبت أقراص المضادات الحيوية, Aztreonam Cefotaxime,Ceftazidime على بعد 3 سم من مركز قرص خليط المضاد / المثبط.

3. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 مئوية ولمدة 18-24 ساعة.

4. وبملاحظة مناطق التثبيط فإن حدوث إتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي وواحد أو أكثر من الأقراص المذكورة دليل على النتيجة الموجبة أي إنتاج العزلة للإنزيم.

### 4-9-3 التحري عن قابلية البكتريا لانتاج انزيم الميتالوبيتالاكتميز بإستخدام طريقة إتحادالمضاد الحيوي EDTA – IPM:

1- حضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة على وفق الفقرة (3-9-1) ونشر المزروع بوساطة المسحة القطنية swab المعقمة على أطباق حاوية على وسط مولرهنتون بصورة كاملة, وتركت الأطباق لمدة 10 دقائق لتجف .

2- وضع قرصين من المضاد الحيوي Imipenem (10mg) في وسط الطبق الزرعي الملقح على أن تكون المسافة بينهما 3 سم .

3- تم وضع 10 مايكروليتر من محلول EDTA المحضر في الفقرة (3-2-1-8) إلى واحد من أقراص Impeneum .

4- حضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 م° لمدة 18-24 ساعة.

5- بعد ملاحظة مناطق التثبيط فإن زيادة منطقة التثبيط عن7ملم حول قرص ال Imipenem مع EDTA مقارنة مع قرص ال Imipenem لوحده تعد النتيجة موجبة وإن البكتريا تعد منتجة لإنزيم الميتالوبيتالاكتميز Metallo_Beta Lactamas (MBL) (Bhalerao وآخرون, 2010).

### 10-3 التحليل الإحصائي:

تم تحليل النتائج إحصائياً بإستعمال إختبار مربع كاي Chi square وبإستخدام النظام الإحصائي SPSS (2010) لتحليل المعلومات ( Glantz وآخرون, 1987).

# 4- النتائج والمناقشة

## 4-1 عزل وتشخيص بكتريا الإشريشيا Isolation and Identification of *E.coli*

### 4-1-1 جمع العينات وعزلها samples collection and isolation

جمعت 350 عينة إدرار وسطي من النساء المصابات بالتهابات المجاري البولية (UTI). جمعت العينات من النساء المراجعات في المستشفيات: البتول للولادة والأطفال, ومستشفى بعقوبة التعليمي، والعيادة الإستشارية الخارجية، ومستشفى خانقين العام, والرعاية الصحية في خانقين, والمختبرات الخارجية في خانقين للفترة الواقعة بين (2013/10/15 ولغاية 2014/2/18).

أظهرت النتائج في الجدول (4-1) الى إن 248 عينة من عينات الإدرار أظهرت نمواً موجباً للزرع البكتيري أي بنسبة 70.9%, اتفقت نتائج العزل الجرثومي مع ما توصلت اليها الباحثة AL-Salayi (2002) في أربيل إذ سجلت دراستها نمواً بكتيرياً بنسبة 65%, في حين لم تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت إليها الباحثة النعيمي (2002) في بغداد والباحثة Ahmed (2000) في اربيل اذ شكلت النتائج نسبة 26.8 % , 33.3 % على التوالي .

كما أظهرت النتائج ان 102 من العينات وبنسبة 29.1% لم تظهر نمواً بكتيرياً حتى بعد الحضن لمدة 48 ساعة, ربما يعود السبب الى استعمال المضادات الحياتية أو إن الإصابة ناجمة عن مسببات غير جرثومية مثل الفايروسات والفطريات والجراثيم اللاهوائية التي لايمكن عزلها بطرق الزرع الإعتيادية المتبعة في هذه الدراسة والتي ربما تحتاج إلى أوساط زرعية خاصة لنموها, تم الحصول على 100عزلة من بكتريا *Escherichia coli* من مجموع 350 عينة سريرية وبنسبة 28.57%.

أتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث الصائغ (2005) في بابل إذ بلغت نسبة عزل بكتريا *E.coli* من المرضى المصابين بال UTIs 23.5%.

لم تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث Biyikli وجماعته (2004) في مدينة اسطنبول في تركيا والباحث خورشيد (2005) في كركوك والباحث Ozbakir وجماعته (2010) والباحث AL_Salamy (2012) في الكوفة والباحث Al_Hemidawi (2005) في بغداد إذ أظهر نتائج الدراسة نسبة 63% و 65.59% و79.17% و44.2% و42.1% وعلى التوالي.

يعود سبب الإختلاف في نسب *E.coli* المعزولة الى أسباب عدة مثل عدد العينات التي تمت دراستها, وموسم أخذ العينات, والموقع الجغرافي, والحالة الإجتماعية, والثقافية, والوعي الصحي لدى الأفراد موضوع الدراسة (أحمد, 2008).

**جدول (4-1) الأعداد والنسب المئوية للبكتيريا المعزولة لعينات الدراسة**

| النساء المصابات | اعداد العينات | النسبة المئوية % |
|---|---|---|
| **عدد الحالات الموجبة** | 248 | 70.9 |
| **عدد الحالات السالبة** | 102 | 29. 1 |
| **العدد الكلي** | 350 | 100 |

## 4-1-2 تشخيص العينات Samples Identification

تم إجراء تشخيص عزلات *E.coli* في هذه الدراسة بإستعمال ثلاث طرائق علمية وذلك للتأكد من ان هذه العزلات تعود الى هذا الجنس, شملت هذه الطرائق طريقة التشخيص عن طريق الإختبارات الكيموحيوية والتي تعدّ طريقة تقليدية في التشخيص البكتيري وبلغت عدد العزلات الموجبة *E.coli* 101عزلة, كما موضح في الجدول (4-2).

**جدول ( 4-2) الفحوصات الكيموحيوية لبكتيريا *E.coli* المعزولة من المجاري البولية لدى النساء**

| Biochemical test | Catalase | Oxidase | Lactose fermention | Indole | Methyl-red | Voges - proskaur | Simmon citrate | Ureas | Motility | TSI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***E.coli*** | + | - | + | + | + | - | - | - | + | A/A $H_2S$ - gas + |

بعدها تم استخدام طريقة API_20E وهي طريقة حديثة في التشخيص اذ تمتاز بالسهولة والسرعة وكانت متطابقة مع طريقة الإختبارات الكيموحيوية وتم التأكد من ان العزلات كاملة تعود الى جنس *E.coli* .

لغرض التأكد النهائي من صحة تشخيص البكتريا بدقة تصل الى 98%، إستعمل جهاز ViTEk2 والذي يعدّ الأكثر حداثة في التشخيص المختبري وهو الجهاز الوحيد الموجود في مستشفى خانقين العام, أظهرت نتائج التشخيص ان 100عزلة أعطت نتيجة إيجابية وعزلة واحدة سالبة وتم استبعادها في هذه الدراسة.

أتفقت هذه النتيجة مع ما توصلت اليها الزنكنة (2012) في ديالى الى ان عدد عزلات بكتريا *K.pneumoniae* بلغت 22 عزلة بعد أن كانت 24 عزلة إذ لم يعطِ الجهاز تشخيص عزلتين مشخصة سابقاً بالطرائق الأخرى.

بينت النتائج في الجدول (4-3) ان نسبة بكتريا *E.coli* شكلت 51% ضمن الفئة العمرية 15-25 ونسبة 30% ضمن الفئة العمرية 26-45 ونسبة 19% ضمن الفئة العمرية 46-65.

إتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث Tazebew وجماعته (2013) في شمال غرب أثيوبيا والذي وجد ان الفئة العمرية 15-24 شكلت نسبة 54.5% ولم تتفق للفئة العمرية

25–44 التي شكلت نسبة 45.5%, اتفقت نتيجة الدراسة الحالية أيضاً مع الباحث Sujatha وجماعته (2014) في مدينة كانبور الذي وجد ان *E.coli* شكلت نسبة 52.5% للفئة العمرية 16–25 في حين لم تتفق للفئة العمرية 26–45 والتي شكلت نسبة 47.5%.

لم تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث Ashish وجماعته (2013) في الهند الذي وجد ان *E.coli* شكلت نسبة 68.89% للفئة العمرية 15–29 واتفقت للفئة العمرية 30–45 والتي شكلت31.11%, ولم تتفق نتيجة الدراسة الحالية ايضاً مع الباحث Turpin وجماعته (2007) في غانا الذي وجد ان نسبة *E.coli* للفئة العمرية 15–24, 25–44 شكلت نسبة 12.5% , 87.5% على التوالي, أظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم ظهور فرقٍ معنويّ .

**جدول (4–3) العينات الموجبة لبكتيريا *E.coli* بحسب الفئات العمرية**

| الفئة العمرية | عدد العزلات الموجبة | النسبة المئوية للعزلات الموجبة % | عدد عزلات *E.coli* | النسبة المئوية للعزلات الموجبة % |
|---|---|---|---|---|
| من 15–25 سنة | 123 | 49.6 | 51 | 51 |
| من 26–45 سنة | 79 | 31.85 | 30 | 30 |
| من 46–65 سنة | 46 | 18.55 | 19 | 19 |
| المجموع | 248 | 100 | 100 | 100 |

أوضحت النتائج في الجدول (4–4) ان نسبة بكتريا *E.coli* شكلت نسبة 60% في الريف و40% في المدينة أتفقت هذه النتائج مع ماتوصلت اليها Nanakaly (2010) في أربيل اذ وجدت ان نسبة *E.coli* في المدينة شكلت نسبة 44.6 %.

لم تتفق هذه النتيجة مع الباحث Al- Sayigh وجماعته (2013) في بابل اذ وجد ان بكتيريا *E.coli* شكلت نسبة 68%, وأشار الباحث Devanand وجماعته (2013) في دراسة أخرى أجريت في مدينة ميورت في الهند اذ وجد ان بكتيريا *E.coli* شكلت نسبة 51.51% .

لوحظ من الجدول (4 –4) ان نسبة بكتيريا *E.coli* في الريف أعلى منه في المدينة ربما يعود السبب في ذلك الى قلة الرعاية الصحية, وإنخفاض الوعي الصحي, والثقافي, وقلة وجود شبكات الماء الصالح للشرب, وكذلك إنعدام شبكات الصرف الصحي (Levy وMarshall, 2004). أظهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم ظهور فرقٍ معنويّ بين نسب البكتيريا المعزولة من النساء في الريف والمدينة .

**جدول (4 –4) أعداد ونسب عزلات بكتيريا *E.coli* المعزولة من النساء في الريف والمدينة**

| السكن | عدد العزلات الموجبة | النسبة المئوية للعزلات % | عدد عزلات *E.coli* | النسبة المئوية % |
|---|---|---|---|---|
| الريف | 144 | 58.07 | 60 | 60 |
| المدينة | 104 | 41.93 | 40 | 40 |
| المجموع | 248 | 100 | 100 | 100 |

أظهرت النتائج في الجدول (4 –5) ان نسبة بكتريا *E.coli* المعزولة من النساء الحوامل والمتزوجات والباكرات شكلت نسبة 51%, 32%, 17%على التوالي, أتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث Nubia وآخرون (2012) الذي وجد ان نسبة *E.coli* في النساء الحوامل في السويد بلغت 50% وفي اليوغندا بلغت 56% وفي الفيتنام بلغت 42%, في نسبة *E.coli*

التي بلغت 50% في النساء غير الحوامل في السويد. في دراسة أخرى أشارت الباحثة النعيمي (2002) الى ان نسبة *E.coli* في النساء الحوامل شكلت 26.8% , أظهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم ظهور فرقٍ معنويّ .

**جدول (4–5) أعداد ونسب بكتيريا *E.coli* المعزولة من النساء الحوامل والمتزوجات والباكرات المصابات بخمج المجاري البولية**

| الحالة الاجتماعية | العدد الكلي للعزلات | النسبة المئوية % | عدد الحالات الموجبة | النسبة المئوية % | عزلات *E.coli* | النسبة المئوية لعزلات *E.coli* % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| النساء الحوامل | 162 | 46.29 | 108 | 43.5 | 51 | 51 |
| النساء المتزوجات | 116 | 33.14 | 81 | 32.7 | 32 | 32 |
| النساء الباكرات | 72 | 20.57 | 59 | 23.8 | 17 | 17 |
| المجموع | 350 | 100 | 248 | 100 | 100 | 100 |

## 4–2 التنميط السيرولوجي لعزلات بكتيريا الإشريشيا القولونية

## Serological Test of *Escherichia coli* bacteria

أظهرت النتائج ان 19 عزلة من مجموع 100عزلة *E.coli* أعطت نتيجة موجبة للأمصال المتعددة التكافؤ O26 , O55, O111 , O119 , O126 اي بنسبة 19%.

كما مبين في الجدول (4–6), أتفقت نتيجة هذه الدراسة مع ما توصل اليه الباحثان Abdullah و Al-Moslih (2005) في الشارقة في الإمارات العربية المتحدة الى ان ثلاث عزلات من أصل 16 عزلة وبنسبة 18.75% قد أعطت نتيجة موجبة للنمط المصلي O26 ,O111 , O55 , O119.

لم تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث رؤوف (2013) في كركوك الذي وجد ان 7عزلات بنسبة 28% من مجموع 25 عزلة ذات قابلية على اعطاء نتيجة موجبة للأمصال

متعددة التكافؤ, لم تتفق هذه النتيجة أيضا مع ما توصلت اليها الباحثة Soheila وجماعتها (2009) الى ان 25.2% من عزلاته أعطت نتيجة موجبة للأنماط المصلية O26 ,O111 , O119 , O55.

كما رأى الباحثانAl-Charrakh و Al-Muhana (2010) في النجف الى إن 17.1% من عزلاتة قد أعطت نتيجة موجبة للأنماط O26 ,O86, O119, O128,O44,O111 . لم تظهر نتائج التحليل الاحصائي فرقٍ معنويّ.

**جدول (4–6) الأنماط السيرولوجية لبكتيريا *E.coli* المعزولة من نساء مصابات بخمج المجاري البولية**

| رمز العزلة | إنتاج الأنماط المصلية | رمز العزلة | إنتاج الأنماط المصلية | رمز العزلة | إنتاج الأنماط المصلية | رمز العزلة | إنتاج الأنماط المصلية |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| E1 | - | E26 | + | E51 | - | E76 | - |
| E2 | - | E27 | + | E52 | + | E77 | - |
| E3 | - | E28 | - | E53 | - | E78 | - |
| E4 | - | E29 | - | E54 | - | E79 | + |
| E5 | - | E30 | - | E55 | - | E80 | - |
| E6 | - | E31 | + | E56 | - | E81 | - |
| E7 | + | E32 | - | E57 | - | E82 | - |
| E8 | - | E33 | - | E58 | - | E83 | - |
| E9 | - | E34 | - | E59 | + | E84 | - |
| E10 | + | E35 | - | E60 | + | E85 | - |
| E11 | - | E36 | - | E61 | - | E86 | + |
| E12 | - | E37 | + | E62 | - | E87 | - |
| E13 | - | E38 | - | E63 | - | E88 | + |
| E14 | - | E39 | - | E64 | - | E89 | - |
| E15 | - | E40 | - | E65 | - | E90 | - |
| E16 | - | E41 | - | E66 | - | E91 | - |
| E17 | - | E42 | - | E67 | + | E92 | - |
| E18 | + | E43 | - | E68 | - | E93 | - |
| E19 | - | E44 | - | E69 | - | E94 | - |
| E20 | - | E45 | + | E70 | - | E95 | - |
| E21 | - | E46 | + | E71 | - | E96 | + |
| E22 | - | E47 | - | E72 | - | E97 | - |
| E23 | - | E48 | - | E73 | - | E98 | - |
| E24 | + | E49 | - | E74 | - | E99 | - |
| E25 | - | E 50 | - | E75 | - | E100 | + |

## 4-3 التحري عن عوامل الضراوة Virulence Factors :-

### 4-3-1 إنتاج الهيمولايسين Hemolysin production :

أظهرت نتائج الدراسة الحالية قابلية 57 عزلة من بكتريا *E.coli* أي بنسبة 57% على إنتاج الهيمولايسين عند تنميتها على وسط أكار الدم الحاوي على 5% دم الانسان نوع AB . تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليها الباحثة العبيدي (2002) في بغداد والباحثة العزاوي (2005) في ديالى الى ان قابلية عزلات *E.coli* على انتاج الهيمولايسين بنسبة 51.4% و50% على التوالي .

لم تتفق هذه النتيجة مع الباحثة Yasmeen وجماعتها(2009) و الباحث Olowel (2008) في جنوب غرب نيجيريا اذ بلغ نسبة انتاج العزلات للهيمولايسين 21% , 26.8%.

لم تتفق هذه النتيجة أيضاً مع ما توصلت اليها الباحثة Nanakaly (2010) في أربيل التي وجدت إن جميع عزلات *E.coli* منتجة للهيمولايسين وبنسبة 100%, وكذلك لم تتفق مع الباحث رؤوف (2013) الذي وجد ان عزلاته المنتجة للهيمولايسين بلغت نسبة 3.5%. كما وجدت Al hason (2010) في بابل إن 40.4% من عزلات UPEC المسببة لل UTI ذات قابلية على إنتاج الهيمولايسن.

ينتج الهيولايسين لوجود محفزة في وسط النمو (الدم) مما يحفز الجينات التركيبية والتنظيمية على انتاج هذا الإنزيم، وقد يكون سبب تفاوت النسب في إنتاج الهيمولايسن من مكان إلى آخر بسبب الطفرات الوراثية أو بسبب البيئة والعوامل الإجتماعية والثقافية وكذلك الإستخدام المفرط للمضادات الحياتية (Mahon و Manuselis، 2000).

### 4-3-2 إنتاج البكتريوسين Bacteriocin production :

أظهرت نتائج العزلات بأن عدد عزلات بكتريا *E.coli* المنتجة للبكتريوسين بلغت 71عزلة أي بنسبة 71%, اتفقت هذه النتيجة مع ماتوصلت اليها العتبي (2013) في ديالى الى إن نسبة بكتريا *E.coli* المنتجة للبكتريوسين بلغت 75.4% , ولم تتفق هذه النتيجة مع ماتوصل اليه الباحثون Jwan (2012) في بابل و Smajs (2010) و AL-Dhumaina (2005) في ذي قار الذين أشاروا الى إن نسبة إنتاج بكتريا *E.coli* للبكتيريوسين قد بلغ 56.7%, 54%,

52.01% على التوالي. أيضاً لم تتفق نتائج الدراسة مع ما توصل اليه كل من الباحثين و Gordon وO'Brien (2006) , Smarda و Obdrzalek (2001) الى ان نسبة عزلات *E.coli* المنتجة للبكتيريوسين 38% , 32.3% وعلى التوالي.

إن سبب اختلاف نسب العزلات المنتجة للبكتيريووسين بين دراسة وأخرى يعود الى عزلات الاختبار والتي قد تكون متحسسة لنوع معين من البكتريوسين أو قد يكون السبب ايضا إلى عدم وجود عزلة متحسسة أو إلى عدم إنتاج البكتريوسين أصلاً، أو تصبح العزلة مقاومة نتيجة لتعرضها لطفرات معينة مما ينتج عنه فقدان المستقبلات الخاصة للبكتريوسين, تم إستخدام الوسط الصلب TSA مضافا إليه خميرة بنسبة (1%) في الكشف عن انتاج البكتيريوسين, اذ أشار الباحث Al-Charrakh[a] وأخرون (2011) الى إن الوسط الصلب أفضل الأوساط لإنتاج البكتريوسين ، بسبب وجود مستقبلات للخلية البكتيرية في الوسط الصلب وعدم وجودها في الوسط السائل, حيث إن إضافة خلاصة الخميرة يزيد من انتاج البكتريوسين.

## 4-3-3 إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm production:

تختلف الطرائق المتبعة في الكشف عن انتاج الغشاء الحيوي فيما بينها والتي تتمثل بطريقة الاليزا, وطريقة الأنابيب, وطريقة أحمر الكونغو بصورة أساس, إذ بينت الدراسات الحديثة ان طريقة الاليزا هي الطريقة الاكثر سهولة وحساسة لاختبار قدرة بكتريا *E.coli* على انتاج الغشاء الحيوي ( Samie وNkgau, 2012 ; Mathur وآخرون, 2006).

تم الكشف عن إنتاج الغشاء الحيوي من قبل بكتريا *E.coli* في هذه الدراسة بالطرائق الثلاث كما موضح في الشكل (4-1) وأعطت هذه الطرائق نتائج متباينة بسبب الإختلاف في دقة الطريقة المتبعة ويعتمد إنتاج الطبقة المخاطية على عوامل عدة منها الطريقة المتبعة في الكشف عن الغشاء الحيوي وكذلك نوع الوسط المستخدم وفترة الحضن وظروفها.

تعدّ طريقة الاليزا من افضل الطرق وأدقها في الكشف عن الغشاء الحيوي, اذ بلغت نسبة انتاج الغشاء الحيوي في بكتريا *E.coli* في هذه الدراسة بطريقة الاليزا 90% كما في الجدول (4-7), اتفقت هذه النتيجة مع ما توصلت اليها العتبي (2013) في ديالى ان نسبة 93.33%

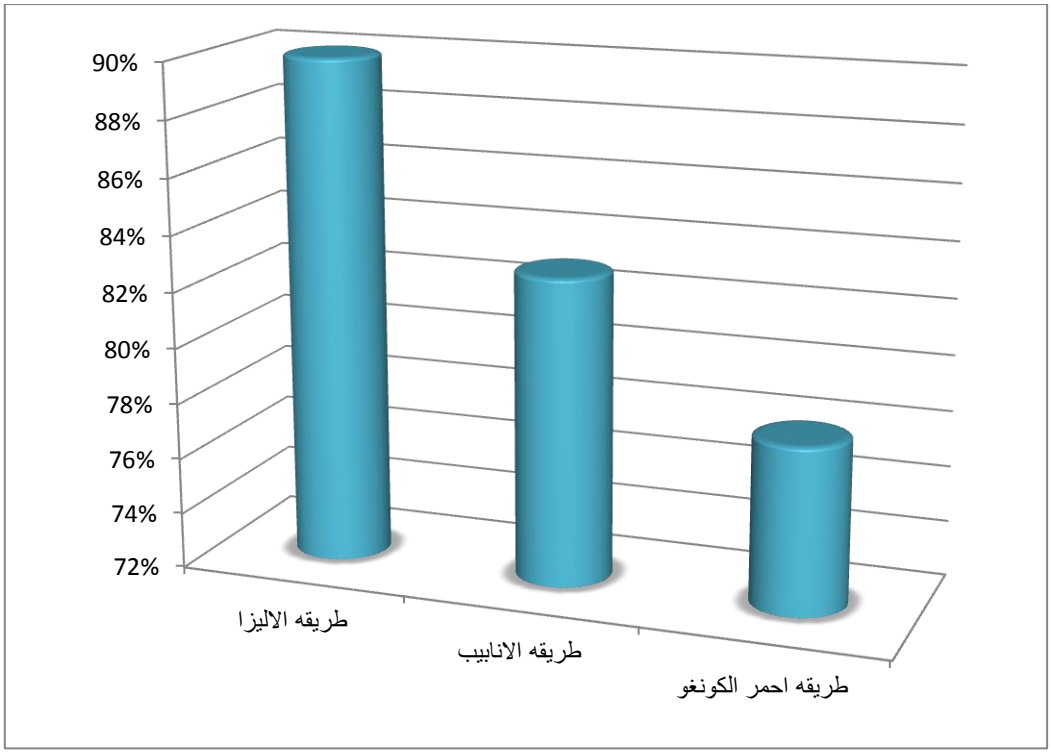
من بكتيريا *E.coli* منتجة للغشاء الحيوي بطريقة الاليزا ولم تتفق هذه النتيجة مع ماتوصلت اليها الباحثة خضر (2013) في العراق إذ بلغت نسبة العزلات الموجبة 51.429% .

سجلت عزلات *E.coli* قيد الدراسة نسبة 83% في انتاج الغشاء الحيوي بطريقة الانابيب إذ اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ماتوصل اليه الباحث Makia وآخرون (2013) و Al-chalabi وآخرون (2010) فقد بلغت نسبة انتاج البكتيريا للغشاء الحيوي بطريقة Tube method 90.26%, 90.9%, إلا إنها لم تتفق مع نتائج التجربة التي أجراها Subramanian وآخرون(2012) في الهند إذ بلغت نسبة إنتاج الغشاء الحيوي 53.3% وبالطريقة ذاتها.

تعدّ طريقة أحمر الكونغو أقل الطرائق دقة في الكشف عن الغشاء الحيوي بسبب تأثرها بعوامل متعددة كالأوكسجين و درجة الحرارة وظروف بيئية أخرى, والتي من الممكن أن تعطي نتائج مغايرة (الرجب, 2014). إذ بلغت نسبة إنتاج البكتيريا للغشاء الحيوي في الدراسة الحالية بهذه الطريقة 78% لم تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليها العتبي (2013) والباحث Dadawala وجماعته (2010) اذ وجدوا ان 86.66% و 85.71% من عزلاتهم ذات قدرة على الارتباط باحمر الكونغو.

كما توصل Meshram و جماعته (2012) الى ان جميع عزلات *E.coli* الممرضة والمعزولة من اشخاص مصابين بال UTI منتجة للطبقة اللزجة Biofilm Formation مقارنة ب 70% من العزلات المعزولة من براز الاشخاص الاصحاء, وكذلك أوضح بان قدرة *E.coli* على الالتصاق وتكوين الطبقة اللزجة تزداد عند توافرها في الظروف غير الملائمة .

اظهرت نتائج التحليل الإحصائي إن هناك فرقاً معنوياً P.v <0.05 .




**الشكل ( 4-1) التحري عن إنتاج الغشاء الحيوي لبكتيريا *E.coli* المعزولة من النساء المصابات بخمج المجاري البولية بالطرائق المختلفة**

**جدول (4 -7) إمتلاك عزلات بكتيريا *E.coli* لعدد من عوامل الضراوة والنسب المئوية لها**

| عامل الضراوة | عدد عزلات *E.coli* المنتجة | النسبة المئوية للعزلات المنتجة % |
|---|---|---|
| انتاج الهيمولايسين | 57 | 57 |
| انتاج اليوريز | 0 | 0 |
| انتاج البكتيريوسين | 71 | 71 |
| الغشاء الحيوي بطريقة الاليزا | 90 | 90 |

## 4-4 التحري عن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز

## Detection of β-Lactamase production

تعدّ طريقة اليود السريعة المستخدمة من الطرائق المميزة بسهولة إجرائها, وقصر فترتها الزمنية لإعطاء النتيجة, فضلاً عن توافر المواد اللازمة للاختبار, أما مساوئها فهي احتمال إعطاء نتيجة كاذبة عند استخدام مضاد البنسلين–ج المحضر منذ مدة زمنية طويلة، لذا يفضل تحضيره آنياً (حسين, 2010).

أظهرت عزلات ال *E.coli* نسب عالية لإنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز إذ بلغت نسبة إنتاج العزلات لهذه الإنزيمات بحسب طريقة اليود السريعة 88%, إتفقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه الباحث رؤوف (2013) في كركوك الذي وجد إن نسبة 91.2% من عزلات *E.coli* ذات قابلية على إنتاج هذا الإنزيم, وإتفقت أيضاً مع Suleiman (2008) في تكريت الذي رأى إن نسبة إنتاج *E.coli* لإنزيمات البيتالاكتاميز بلغت 92.9%.

كذلك أشارت الباحث Karim (2007) في السليمانية الى إن 84.6% من عزلات *E.coli* المعزولة من الإدرار والمسببة لإلتهابات المجاري البولية منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز.

لم تتفق هذه النتيجة مع ماتوصلت اليها الباحثة العزاوي (2005) في ديالى والباحث Toroglu وجماعته (2005) والباحث Jain وجماعته (2003) الى ان نسبة إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز لبكتريا *E.coli* كانت 33.33% , 42.2% , 63.3% وعلى التوالي.

يمكن تفسير هذه النتائج اعتماداً على تركيز إنزيم البيتالاكتميز، إذ إن الاختزال السريع لليود إلى ايوديد يعتمد على تركيز وفعالية الإنزيم ، وان هذه الفعالية تتأثر بدرجات الحرارة والرقم الهيدروجيني pH، وكمية الإنزيم المنتج خارجياً ، وعليه يمكن القول أن العزلة التي أعطت فحصاً موجباً أسرع من بقية العزلات تحوي جزيئات من الإنزيم ما يكفي لتحويل أكبر عدد من جزيئات البنسلين–ج إلى حامض البنسلوك وهذا يؤدي إلى ظهور النتيجة الموجبة سريعاً (الحسيني, 2005).

إن توافر بعض العزلات التي أعطت نتيجة سالبة لفحص البيتالاكتاميز ومقاومتها لأكثر من مضاد من مضادات البيتالاكتام يدل على أسباب عدة أما هذه العزلات تنتج هذه الإنزيمات بنسب قليلة تختزن في الفسحة البيربلازمية مما يصعب الكشف عنها بهذه الطرائق

(الجبوري, 2000), أو ان هذه العزلات تمتلك آليات مقاومة أخرى غير البيتالاكتاميز مثل تقليل الألفة نحو البروتينات المرتبطة بالبنسلين (PBPs) بوصفها خطوة لتغيير موقع الهدف أو أمتلاك حاجز النفاذية (Tenover, 2006 ; Hooper, 2002 ;Poirel وآخرون,2000). بأعتبار إن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز ليست الآلية الوحيدة في مقاومة مضادات البيتالاكتام.

هناك أختلاف واضح في وقت إعطاء النتيجة الموجبة تتراوح من بضع ثوانٍ إلى دقيقتين السبب في ذلك هو ان أنزيم البيتالاكتاميز يعمل على أختزال اليود الى ايوديد ويكون الأخير غير قادر على التفاعل مع النشأ لتكوين المعقد البنفسجي اللون فيتحول بذلك مباشرة الى اللون الابيض دلالة على إيجابية التفاعل, ويمكن تفسير هذا الأختلاف في الوقت على أساس تركيز أنزيم البيتالاكتاميز المنتج في الفسحة البيربلازمية Periplasmic فكلما كان تركيز الأنزيم أكثر، كان الوقت اللازم لظهور النتيجة الموجبة أقل، والعكس صحيح، ويرجع الأمر في ذلك الى الجينات المشفرة لهذه الأنزيمات تكون أما بلازميدية أو كروموسومية (الزنكنة, 2012 ; رؤوف, 2013).

## 4-5 التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

## Detection of Extended Spectrum β-Lactamase Enzyme

أستخدمت طريقة الأقراص المتاخمة Disk Approximation Method للتحري عن قابلية عزلات *E.coli* على انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended-spectrum β- Lactamase (ESβLs), ( CLSI, 2011) (Livermore و Brown, 2001 ).

أظهرت نتائج الدراسة الى إن عدد عزلات *E.coli* المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف هي 4 عزلات بنسبة 4%, اتفقت هذه النسبة مع ماتوصل اليه الباحث Al-Marjani وآخرون (2008) في ديالى الى ان 6.66% من عزلات *E.coli* منتجة لهذه الأنزيمات, اتفقت أيضاً مع ما توصل إليه Karim (2007) في السليمانية الى ان الجراثيم *E.coli* المعزولة من اخماج الجهاز البولي UTI كانت منتجة لأنزيمات ESβLs بنسبة 5.7%.

لم تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليها الباحثة Al-Salihi وآخرون (2012) في كركوك اذ اظهرت النتائج الى إن 12.5% من عزلات *E.coli* منتجة لهذا الأنزيم , لم تتفق هذه الدراسة أيضاً مع الباحثون AL_Salamy (2012) في الكوفة وJabbar (2011) في واسط و

Ankur (2009) في الهند والحسو وجرجيس (2008) الذين توصلوا الى نسب أعلى لما توصلت إليه هذه الدراسة إذ بلغت نسبة عزلات *E.coli* على إنتاج أنزيمات بيتالاكتاميز واسعة الطيف 38.4% ,100% ,63.6% ,40% وعلى التوالي.

أكد الباحثان (Sarojamma وRamakrishna, 2011) على إن إنتشار السلالات البكتيرية المنتجة للأنزيمات الواسعة الطيف في المستشفيات يعتمد على عوامل مختلفة منها طريقة أستعمال المضادات الحيوية، ومعدل النقل للسلالات المنتجة بين الأشخاص العاملين والراقدين في المستشفيات، ونوع التعقيم المستخدم في وحدات المستشفى وخاصة في وحدات العناية المركزة (الزنكنة, 2012).

## 4-6 التحري عن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية

## Detaction of Metalloβ-Lactamase Production

بينت نتائج الدراسة الحالية انتاج عزلتين من العزلات قيد الدراسة لانزيمات البيتالاكتاميز المعدنية وبنسبة 2% كما في الشكل (4-2) , وقد يعود السبب في عدم انتاج العزلات لهذه لإنزيمات بنسبة 98% الى حساسيتها العالية تجاه مضاد Imipenem ففي دراسة اجراها الباحث Al-Ouqaili (2005) في العراق الذي أشار إلى ظهور عزلة واحدة مقاومة لمضادات البيتالاكتاميز ومنتجة لهذا الانزيم كانت محمولة على بلازميد اقتراني ( الرجب, 2013).

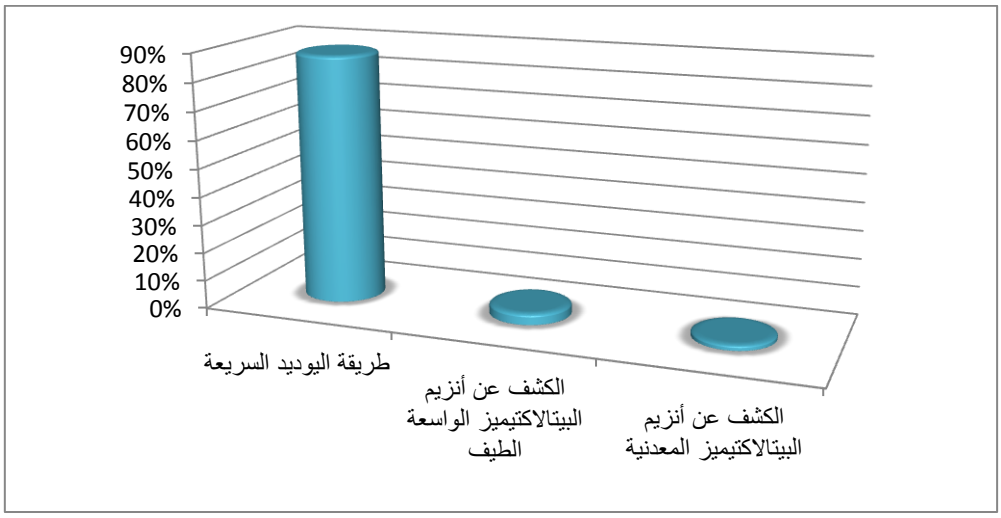
اتفقت النتيجة الحالية مع العتبي (2013) و حسين (2010) في بابل إذ أشاروا إلى إن عزلات *E.coli* اظهرت نتيجة سالبة في انتاج هذا الانزيم.

لم تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحثون في بعض الدول اذ توصل الباحث Zarfel وآخرون (2011) في استراليا والباحث Kumarasamy وآخرون (2010) في الولايات المتحدة والباحث Poirel وآخرون (2010) في فرنسا الى ان نسبة عزلات *E.coli* المنتجة لأنزيمات البيتالاكتيميز المعدنية كانت33.33 %, 17.24% , 25% وعلى التوالي.

في دراسة أجراها الباحث Mochen واخرون (2011) وجدوا ان انزيمات (MBLs) تمنح المقاومة لكل مضادات البيتالاكتام عدا مضاد Aztreonam، حيث وجد الباحث Mulvey

وآخرون (2011) الى أن حساسية البكتريا المنتجة لهذا الانزيم لمضاد Aztreonam يكون بسبب عدم قابلية الأنزيم صنف B على تحليل هذا الدواء, كما موضح في الجدول (4-8).

كما أشار الباحث Charan واخرون (2012) الى ان أستخدام إتحاد المضادين Colisten ، Tigecycline مع Meropenem يعد علاجا ناجحا ضد السلالات المنتجة لهذا الانزيم، أو الأتحاد مع Aztreonam أو أي مضاد للـ Monobactam بشرط أن يكون مقاوما للتحلل من قبل أنزيم Metallo lactamases، (العتبي, 2013) أظهرت نتائج التحليل الإحصائي ظهور فرقٍ معنويّ P.value < 0.05 .




**الشكل (4-2) التحري عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز لبكتيريا *E.coli* المعزولة من المجاري البولية**

**جدول (4-8) إمتلاك عزلات بكتيريا *E.coli* لإنزيمات البيتالاكتيميز والواسعة الطيف والمعدنية ونسبها**

| الكشف عن أنواع أنزيم البيتالاكتيميز | النسبة المئوية لعزلات *E.coli* المنتجة للأنزيم % | النسبة المئوية لعزلات *E.coli* غير المنتجة للأنزيم % |
|---|---|---|
| أنزيم البيتالاكتيميز | 88 | 12 |
| أنزيم البيتالاكتيميز الواسعة الطيف | 4 | 96 |
| أنزيم البيتالاكتيميز المعدنية | 2 | 98 |

## 4-7 إختبار حساسية البكتريا للمضادات الحياتية:

إختبرت حساسية عزلات *E.coli* تجاه (16) نوعاً من المضادات الحيوية, لمعرفة نوع الاستجابة من خلال قياس قطر منطقة التثبيط ومقارنة النتائج مع ما ورد في NCCLS (2002) ، ملحق (4) و توزعت هذه المضادات ما بين مضادات مجموعة البيتالاكتام التي شملت Cefixime و Ceftazidime و Piperacillin وCefotaxime و Imipenem و Aztreonam ومن مجموعة الامينوكلايكوسيدية Gentamycin و Tobramycin و Ampicillin والكوينولونات Ciprofloxacin اضافة الى مضادات جرثومية أخرى كمضادات Nitrofourantoin و Chloramphenicol و Naldixic acid و Cephalothin, ويعد مضاد Augmentin الذي هو عبارة عن خليط من مثبط الانزيم (Clavulanic acid وAmoxcillin) ومضاد Co-Trimoxazol وهو عبارة عن خليط من (Trimethoprim و Salphamethoxazole) كما هو موضح في الجدول (4-9).

أظهرت النتائج تبايناً واضحاً في مقاومة بكتريا *E.coli* للمضادات الحيوية، فقد كانت عزلات *E.coli* مقاومة لبعض المضادات الحياتية كمضاد Augmentin بنسبة 100% ومضاد Ampicillin بنسبة 92%, اتفقت هذه النتائج مع الباحث Abd-Al Sattar (2004) في بغداد والباحث Shirazi وآخرون (2006) اذ كانت نسبة مقاومة عزلات *E.coli* لمضاد Ampicillin 90% و 98%.

أشارت الباحثة السراج (2007) في بغداد والباحثان Shahab و Narideh (1997) في إيران الى ان عزلات *E.coli* مقاومة لمضاد Amoxicillin بنسبة 100%. ولكن نتائج هذه الدراسة لم تتفق مع ما ذكره الباحثان Sharma وGrover (2004) اذ اكد ان نسبة مقاومة بكتيريا *E.coli* لمضاد Ampicillin بلغ 60% . في حين لم تتفق هذه النتيجة مع ما جاء به الباحث Johnson وآخرون (1995) الذي وجد ان نسبة مقاومة *E.coli* للمضاد Ampicillin قليلة جدا تصل الى 20%.

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (4-3) الى ان نسبة مقاومة بكتريا *E.coli* لمضاد Cefotaxime بلغت 50% واتفقت هذه النتيجة مع ماتوصل اليه الباحث الحميداوي (2005) في بغداد الى ان نسبة مقاومة البكتريا لمضاد Cefotaxime 42.8% ولم تتفق هذه النتيجة

مع ماتوصل اليه طعمة (2006) في كربلاء والسراج (2007) اذ اشاروا الى ان نسبة مقاومة البكتريا لمضاد Cefotaxime شكل نسبة 16.1%, 80% على التوالي .

يعود سبب المقاومة لحدوث تغيير في حاجز النفاذية مما يؤدي الى صعوبة مرور المضاد ووصوله الى موقع عمله وهو خاص بالبكتيريا السالبة لملون غرام إذ يحتوي الغشاء الخارجي على قنوات بروتينية تدعى البورين التي تعمل على منع دخول المضادات الى داخل الخلية البكتيرية (Spanu وآخرون, 2002).

كما بلغت مقاومة العزلات قيد الدراسة للمضادات Gentamycin , Tobramycin , Cefixime , Piperacillin , Chloramphenicol , Naldixic acid , Nitrofurantoin , Ciprofloxacin, Cephalothin 20% و38% و67% و 59% و 86% و 75% و 30% و 35% و 78% على التوالي.

قاربت هذه النتائج مع ما جاءت بها الباحثة Salah (2007) في اربيل اذ كانت نسبة مقاومة عزلات *E.coli* للمضادات Tobramycin , Gentamycin , Nitrofurantoin , Cefixime , Piperacillin , Chloramphenicol , Naldixic acid , Cephalothin , Ciprofloxacin 8.4% , 49.39% , 91.56% , 49.39% , 97.59% , 67.46% , 36.14% , 26.50% , 61.44% على التوالي.

نتائج هذه الدراسة تشابه مع Nanakaly (2010) اذ كانت نسبة مقاومة عزلات *E.coli* للمضادات Ampicillin, Amoxicillin, Naldixic acid, Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Trimethoprime هي: 96% , 80% , 88% , 40% , 52% , 88% على التوالي.

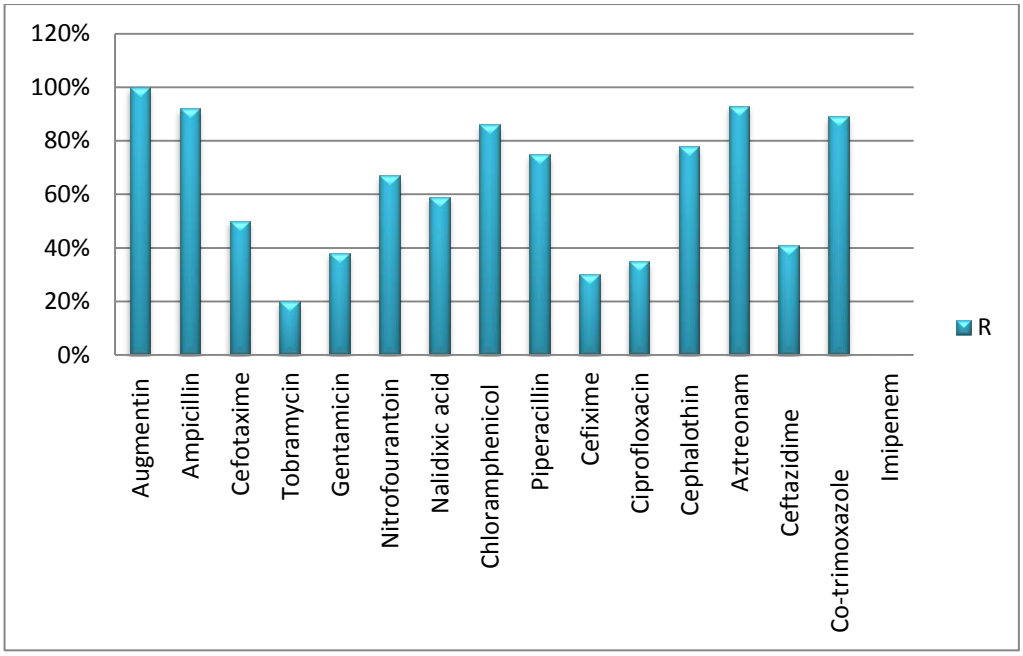
أظهرت العزلات مقاومة لمضاد Aztreonam بنسبة 93% و Ceftazidime بنسبة 41% ومضاد Co-trimoxazole بنسبة 89% , اتفقت هذه النتيجة مع ما توصلت اليها الباحثة العتبي (2013) التي وجدت ان نسبة مقاومة عزلات *E.coli* لمضاد Ceftazidim 46.6% ولمضاد Co-trimoxazole 81% في حين لم تتفق معها بالنسبة لمضاد Aztreonam التي وجدت نسبته 60% .

لم تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليها الباحثة خورشيد (2005) التي وجدت ان عزلاتها مقاومة لمضاد Co-Trimoxazol بنسبة65%, ولم تتوافق هذه النتيجة أيضاً مع Boullegue وآخرون (2004) اذ كانت نسبة مقاومة بكتيريا *E.coli* لمضاد Co-trimoxazole 40%.

كذلك بالنسبة لمضاد Imipenem فلم تظهر أية عزلة مقاومة له فقد كانت عزلات *E.coli* جميعها حساسة لها وبنسبة 100%,اتفقت هذه النتيجة مع الباحث Kako (2010) في أربيل الذي وجد ان عزلاتة حساسة لمضاد Imipenem وبنسبة 100%.

وجدت السراج (2005) الى ان بكتيريا *E.coli* قاومت المضادات Ampicillin, , Nitrofurantoin, Gentamycin ,Ciprofloxacin ,Naldixic acid ,Amoxicillin Chloramphenicol بنسبة : (95%), (95%), (30%), (35%), (25%) (30%), (60%) على التوالي.

لوحظ ان عدد من عزلات *E.coli* قد أبدت حساسية تجاه عدد من المضادات الحياتية وذلك لقدرة هذه المضادات على التغلغل والدخول الى داخل الخلية البكتيرية أو الإرتباط بها وبالتالي يؤدي ذلك الى حدوث خلل في النظام الأنزيمي للخلايا البكتيرية وبالتالي حدوث تحلل الخلية وموت البكتيريا, وفي الوقت نفسه فإننا نلاحظ وجود مقاومة بكتيريا *E.coli* لبعض المضادات لأسباب عديدة منهاحدوث طفرة في الجين المسؤول عن الموقع الخاص لإرتباط المضاد الحياتي, أو تغير في آليات المقاومة التي تمتلكها هذه البكتيريا (السلامي, 2005 ; Rofail, 2002 ). أظهرت نتائج التحليل الإحصائي إن هناك فرقاً معنوياً P.v >0.05.




**الشكل (4-3) النسب المئوية لمقاومة بكتيريا *E.coli* لمضادات الحياة**

**جدول (4-9) النسب المئوية لحساسية بكتيريا *E.coli* للمضادات الحيوية المختلفة**

| *E.coli* | | | المضادات الحيوية |
|---|---|---|---|
| R | I | S | |
| %100 | 0 | 0 | Augmentin |
| %92 | 0 | %8 | Ampicillin |
| %50 | %15 | %35 | Cefotaxime |
| %20 | 0 | %80 | Tobramycin |
| %38 | % 18 | %44 | Gentamicin |
| %67 | %9 | %24 | Nitrofourantoin |
| %59 | %6 | %35 | Nalidixic acid |
| %86 | 0 | %14 | Chloramphenicol |
| %75 | 0 | %25 | Piperacillin |
| %30 | %22 | %48 | Cefixime |
| %35 | %5 | %60 | Ciprofloxacin |
| %78 | 0 | %22 | Cephalothin |
| % 93 | % 2 | %5 | Aztreonam |
| %41 | %10 | %49 | Ceftazidime |
| %89 | 0 | %11 | Co-trimoxazole |
| 0 | 0 | %100 | Imipenem |

**R: Resistance I: Intermediate S: Sensitive**

## 4-8 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية Multiple Antibiotic Resistance :

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان جميع عزلات بكتيريا *E.coli* تحمل صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (مقاومة لاكثر من مضاد حيوي واحد)، تشير النتائج الى ان العزلة **E82** هي من اكثر العزلات مقاومة للمضادات الحيوية إذ استطاعت هذه العزلة مقاومة 15 مضاداً حيوياً. كما موضح في الجدول (4-10) الذي يوضح العزلات وعدد المضادات التي قاومتها. اما العزلاتان **E23, E51** فهما الاقل مقاومة من بين العزلات إذ إنها قاومت 6 مضادات حيوية فقط لذا يُعدان الأكثر حساسية بين العزلات قيد الدراسة, ويعزى سبب مقاومة البكتريا لمضادات الحياة إلى الاستعمال العشوائي للمضادات وقلة الوعي الصحي, و زيادة الطفرات الوراثية مما يؤدي الى تطور المقاومة عند السلالات البكتيرية المختلفة وظهور سلالات اكثر مقاومة للمضادات (Levy وMarshall, 2004).

تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه الباحث Ibraheem (2006) في بغداد الى إن جميع البكتيريا المعزولة من الإدرار كانت متعددة المقاومة للمضادات الحيوية, كما اوضح الباحث Ibrahim وجماعته (2012) في دراسة اجراها في السودان الى إن 92.2% من عزلات *E.coli* المعزولة من عدة مصادر سريرية كانت متعددة المقاومة للمضادات الحيوية.

كذلك اشار الباحثان Alzahrani وGherbawy (2011) الى ان57.7% من العزلات كانت مقاومة لأكثر من 3 مضادات حيوية.

أشار الباحث Pinto pereria وآخرون(2004) والباحث Chukwuani وآخرون (2002) الى إن أسباب إنتشار المقاومة المتعددة للمضادات في مستشفيات اسبانيا ومستشفى عام في نيجيريا إلى الاستعمال العشوائي وغير المنطقي لهذه المضادات من قبل المرضى المراجعين للمستشفى وكذلك الراقدين فيها.

بصورة عامة ان 90% من المضادات المعروفة غير قادرة على تثبيط نمو الكثير من البكتيريا السالبة لصبغة كرام ومنها *E.coli* وهذا بسبب طبيعة جدارها الخلوي وإمتلاكها للعديد

من آليات المقاومة كأنظمة الدفق الفعال وانتاج انزيمات ESBLs التي تسهم في مقاومة العديد من أنواع المضادات الحيوية (رؤوف, 2013).

لذلك تعد مقاومة العزلات المرضية ولاسيما المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية مشكلة اخذت بالتزايد في العصر الحديث والذي يؤدي الى صعوبة في اختيار العلاج المناسب وبالتالي ازدياد نسبة الوفيات (Karlowsky وآخرون, 2003; Bradford, 2001).

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم ظهور فرقٍ معنويّ .

**جدول (4-10) المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي اظهرتها عزلات بكتريا *E.coli***

| عدد المضادات التي قاومتها العزلات | عدد العزلات | ارقام العزلات |
|---|---|---|
| 6 | 2 | E23,E51 |
| 7 | 11 | E9,E14,E18,E19,E25,E31,E38,E43,E45,E65,E86 |
| 8 | 18 | E4,E5,E7,E13,E20,E22,E24,E54, E55,E56, E57,E58,E60,E72,E76,E78,E79,E85 |
| 9 | 24 | E6,E8,E15,E16,E17,E26,E28,E29,E32,E33,E34,E39, E44,E46,E49,E68,E71,E73,E84,E90,E91,E92,E94,E96 |
| 10 | 14 | E1,E27,E47,E50,E64,E66,E67, E74,E77,E81,E83,E93,E95,E97 |
| 11 | 19 | E3,E10,E30,E35,E36,E41,E42,E48,E53, E61,E63,E69,E80,E87,E88,E89,E98,E99,E100 |
| 12 | 5 | E2,E59,E62,E70,E75 |
| 13 | 4 | E12,E21,E37,E40 |
| 14 | 2 | E11,E52 |
| 15 | 1 | E82 |

تم تقسيم عزلات بكتريا *E.coli* قيد الدراسة على مجموعتين على أساس عدد المضادات التي قاومتها جدول (4-11) اذ وضعت العزلات المقاومة لـ 6-10 مضادات حيوية في المجموعة الاولى أما العزلات المقاومة لـ 11-15 مضاداً حيوياً فقد وضعت في المجموعة الثانية، إذ كانت المجموعة الأولى هي المجموعة السائدة في الدراسة والتي تحتوي على 69 عزلة بكتيرية مقاومة لـ 6-10 مضادات حيوية بنسبة 69% ، بينما كانت أقل نسبة مقاومة متعددة للمضادات الحيوية في ضمن الدراسة الحالية أظهرتها المجموعة الثانية وكانت 31% من العزلات الكلية .

**جدول (4-11) تقسيم العزلات المحلية لبكتريا *E.coli* الى مجموعتين على أساس عدد المضادات التي تقاومها**

| المجموعة | عدد المضادات التي قاومتها | عدد العزلات المقاومة | النسبة المئوية % |
|---|---|---|---|
| 1 | 6 – 10 | 69 | 69 |
| 2 | 11 – 15 | 31 | 31 |
| المجموع | | 100 | 100 |

1- سيادة بكتريا الإشريشيا القولونية وإنتشارها بين النساء الحوامل المصابات بأخماج المجاري البولية .

2- إمتلاك عدد من العزلات البكتيرية قيد الدراسة للأنماط المصلية المتعددة التكافؤ O26 , O55 , O111 , O119 , O126 .

3- إمتلاك بكتريا *E.coli* للعديد من عوامل الضراوة التي تعزز من قدرتها على إحداث الأصابة, ومنها إفراز الهيمولايسين, وإنتاج البكتريوسين والغشاء الحيوي .

4- إحتواء معظم العزلات البكتيرية على أنزيمات البيتالاكتاميز، وإحتواء بعض العزلات على أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وأنزيمات الميتالو بيتالاكتاميز .

5- مقاومة بكتريا الإشريشيا القولونية لمعظم المضادات الحياتية وإمتلاكها صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحياتية, وحساسيتها العالية تجاه مضاد Augmentin و Tobramycin.

1- دراسة عزل بكتريا *E.coli* من وحدات العناية المركزة وأجهزة القسطرة البولية، وأجهزة الغسيل الكلوي، وغيرها من الأجهزة الطبية لمعرفة مدى إنتشار ووبائية هذه البكتريا في أسطح هذه الأجهزة وعليها.

2- دراسة الأنماط المصلية الممرضة والسائدة لجراثيم *E.coli* في محافظات أخرى ومعرفة محدداتها الوراثية وإمراضيتها وبشكل منفرد.

3- إجراء دراسات مماثلة على أنواع أخرى من بكتريا السالبة لصبغة گرام والمسببة لإلتهابات المجاري البولية ومعرفة الأنماط المصلية الأخرى التي تحتويها.

4- إجراء دراسات موسعة عن عوامل الضراوة المهمة لهذه البكتريا من الناحية الوراثية بأستخدام تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) لتحديد العوامل الوراثية لهذه البكتريا.

# المصادر العربية

**1-** أحمد, الاء ميسر. (2008) . تأثير بكتريا *L. acidophilus* على بكتريا *E.coli* المسبب لخمج المجاري البولية داخل وخارج الجسم الحي . رسالة ماجستير, كلية العلوم ، جامعة بغداد.

**2-** الجبوري, رسمية عمر سلطان. (2000). التحري عن انزيمات البتا–لاكتاميز لعدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام المعزولة سريريا وتأثير بعض المركبات الكيمياوية المحضرة على هذه الجراثيم . رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة الموصل.

**3-** الجلبي, عامر يحيى حميد. (2008). دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص زيت الزعتر على جراثيم *Streptococcus bovis , Staphylococcus aureus, Salmonella entritidis, Escherichia coli* مختبريا. كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل .مجلة تكريت للعلوم الصرفة , المجلد 14 , ص 219-225.

**4-** الجمالي, مدركة محمود حسن العليوي.(2005).التهاب المجاري البولية التناسلية لدى نساء مدينة الموصل . رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة الموصل.

**5-** الجميلي, بسام حسين أيوب يونس .(2005). التأثير التثبيطي لبعض المستخلصات النباتية في بعض أنواع الجراثيم المعزولة من المجاري البولية للإنسان. رسالة ماجستير, كلية التربية, جامعة الموصل.

**6-** الحائك, منال فوزي محمد عبد الرحمن (2004). تأثير الخل في بعض أنواع الجراثيم الملوثة للحروق .رسالة ماجستير, كلية التربية ,جامعة الموصل.

**7-** الحسو, محمود زكي و جرجيس, شاكر غازي . (2008). التحري عن انزيمات البتالاكتاميز في العصيات السالبة لصبغة كرام المعزولة من حالات الاسهال لدى الاطفال, مجلة التربية والعلم, 21 (4) :35– 40.

**8-** الحسيني, أنوار علي عبد الله. (2005). دراسة بكتريولوجية ووراثية على البكتريا المسببة لحب الشباب. رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة بابل.

**9-** الحميداوي, حيدر حميد متعب. (2001). دراسة مصلية لبكتيريا .*Shigella spp* . رسالة ماجستير, كلية العلوم , جامعة بابل.

**10-** الحميداوي, طالب فالح حسن. (2005). النشاط الهميولاسيني لبكتريا أشريكيا القولون المسببة لالتهابات المسالك البولية ومقاومتها لمضادات الحياة .أطروحة دكتورا في فلسفة الاحياء المجهرية, كلية العلوم, الجامعة المستنصرية.

**11-** الخفاجي, نور سلمان كاظم .(2010). دراسة بكتريولوجية ومناعية لبكتريا *Citrobacter freundii* في الارنب. رسالة ماجستير, كلية العلوم , جامعة بابل.

**12-** الدليمي, الاء سعيد شيت. (2005). تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي في جرثومة *Escherichia coli* المعزولة من حالات اسهال الأطفال باستخدام الاكرد ينات والريفامبين وتأثير السكريات على نمو الجرثومة. رسالة ماجستير. جامعة الموصل / كلية التربية.

**13-** الرجب, ابراهيم عدنان محمود. (2014). دراسة بكتريولوجية لبكتريا *Proteus mirabilis* المعزولةمن اخماج سريرية مختلفة في مدينة المقدادية.رسالةماجستير,كلية التربية,جامعة ديالى.

**14-** الزنكنة, ايمان علي نور الله .(2012 ). دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا *Klebsiella* spp المعزولة من إصابات مرضية مختلفة . رسالة ماجستير, كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة ديالى.

**15-** السراج, لبنى صلاح الدين.(2007). دراسة تأثير ليزر الدايود على المحتوى البلازميدي وبعض الخصائص لبكتريا *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* المعزولة محليا. رسالة ماجستير, معهد الليزر للدراسات العليا, جامعة بغداد.

**16-** السعدي, لينا عبد الامير سلمان. (2011). دراسة بكتريولوجية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في مدينة بعقوبة وضواحيها. رسالة ماجستير, كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة ديالى.

**17-** السلامي, ميسون عبد الباري عبد الله.(2005). عزل وتشخيص نوعين من البكتيريا المسببة لإلتهاب الجهاز البولي ودراسة تأثير مستخلصات نباتي الحلبة Trigonella foenum L. graecum والسوس Glycyrrhiza glabra L. عليها. رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة الكوفة.

**18-** آل سماعيل , وجيهة عبد الكريم محمد (2007) . البكتيريات المسببة لالتهاب المسالك البولية, خاصة ايشيريشيا كولاي ونمط مقاومتها للمضادات الحيوية في المملكة العربية السعودية , رسالة ماجستير, كلية العلوم ,جامعة الملك سعود .

**19-** الصائغ, رفل جليل جبار .(2005). دراسة لبعض الجوانب السريرية والبكتيرية للمرضى المصابين بالتهاب الكلية المزمن في مستشفى الحلة التعليمي . رسالة ماجستير، كلية الطب، جامعة بابل .

**20-** العبيدي، رغد عبد اللطيف عبد الرزاق. ( 2006 ). دراسة بعض عوامل الضراوة للبكتريا المعزولة من ردهات الأطفال الخدج ومقاومتها لمضادات الحياة والمطهرات. رسالة ماجستير,كلية العلوم ,الجامعة المستنصرية.

**21-** العبيدي، سوسن شوكت عبدالله .(2002). دراسة الالتصاق والتلازن الدموي وعوامل الضراوة الأخرى لبعض أفراد العائلة المعدية والزائفة الزنجارية المسببة لالتهاب السيل البولي. رسالة ماجستير، كلية العلوم, الجامعة المستنصرية.

**22-** العتبي, دعاء عدنان كاظم. (2013). دراسة بكتريولوجية لبعض أنواع العائلة المعوية المعزولة من صالات مستشفى الولادة في مدينة بعقوبة.رسالة ماجستير .جامعةديالى/كلية **التربية.**

**23-** العزاوي, زينب حسين مهدي. (2008). دراسة عوامل الفوعة والاستجابة للمضادات الجرثومية في المكورات المعوية المعزولة من المرضى. رسالة ماجستير,كليةالتربية,جامعة **ديالى.**

**24-** العزاوي, سندس عادل ناجي .(2005 ). دراسة تأثير عسل النحل على البكتريا التي تلوث الحروق وإمكانية استخدامه في العلاج. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة ديالى.

**25**- العلواني, شاكر حماد محمد .(2006). دراسة مستضدية جرثومة Enteropathogen *Escherichia coli* في الأرانب المحلية *Oryctolagus cuniculus*. رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة بابل .

**26**- القصاب، عبد الجبار عمر والخفاجي، زهرة محمود (1992)، تأثير الظروف المختلفة على الفعالية التثبيطية للعصيات اللبنية المعوية تجاه البكتريا المعوية المسببة للإسهال، مجلة العلوم الزراعية العراقية، المجلد3 ، العدد 1.

**27**- المرجاني، محمد فرج . (2011). المضادات الحيوية المقاومة الحيوية البكتيرية للمضادات الحيوية. عمان : دار دجلة.

**28**- النعيمي، ابتهال محمد زاهد . ( 2002 ). الأخماج البولية عند النساء الحوامل. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.

**29**- النقيب, بديع شرف الدين عزيز. (2009). دراسة بعض عوامل الفياعة لبكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من التهابات المجاري البولية. أطروحة دكتوراه, كلية العلوم, الجامعة المستنصرية.

**30**- باقر، عبد الواحد. الحيسني، رعد خليل. الزعاك، علي. (2001). عزل وتشخيص البكتيريا المسببة لألتهاب الجهاز البولي وقابليتها على أنتاج أنزيمي اليوريز واليهمولايسين. مجلة علوم المستنصرية. المجلد (12)، العدد(3)، الصفحة 11-27.

**31**- بلال, الهام جواد كاظم .(2010). التحري عن بعض انزيمات البيتالاكتاميز في العزلات السريرية لبكتريا الزوائف الزنجارية في مدينة النجف. رسالة ماجستير, كلية التربية للبنات, جامعة الكوفة.

**32**- حسين, أحمد عليوي. (2010). دور الإنزيمات المحلله لمضادات البيتالاكتام وبعض عوامل الضراوة في مقاومة البكتريا المسببة لالتهاب الأذن الوسطى القيحي المُزمن في محافظة النجف. رسالة ماجستير, كلية العلوم , جامعة بابل .

**33-** خضر, ايمان محمود .(2013). التحري عن قدرة بعض الأنواع البكتيرية على إنتاج المادة المخاطية Slime layer. مجلة علوم الرافدين. 24 (1): 36-49.

**34-** خورشيد, پري أحمد .(2005). دراسة جرثومية لبعض مسببات أخماج المسلك البولي للمرضى في مستشفى آزادي العام في مدينة كركوك . رسالة ماجستير, كلية التربية , جامعة تكريت .

**35-** دخيل, خلود حامد و تكتوك, نهاد خلاوي.(2009). عزل وتشخيص بعض الأنواع البكتيرية المرافقة لإلتهابات المجاري البولية عند النساء الحوامل المصابات بالسكري Type2 ومقاومتها لبعض المضادات الحيوية. مجلة الهندسة والتكنلوجيا. 27: (12).

**36-** رؤوف, علي محمد نجاتي .(2013).مقاومة الايشريكيا القولونية السريرية والبيئية للمضادات الحيوية وتحييد محتواها من الدنا البلازميدي.رسالة ماجستير,كليةالعلوم,**جامعة كركوك**.

**37-** زهران، حامد عبد السلام 1995 . م .علم نفس النمو –الطفولة والمراهقة .الطبعة الخامسة،عالم الكتب –القاهرة، ص 84.

**38-** طعمة, منير عبد الرسول.(2006). دراسة في التهاب المجاري البولية عندالأطفال دون سن الخامسة من العمر في مستشفى الأطفال في كربلاء.رسالة ماجستير,كليةالطب,جامعة بابل.

**39-** عدوس, سلمان عزيز. (2005). دراسة الاستجابة المناعية في المرضى المصابين بالتهاب الاذن الوسطى البكتيري المزمن. اطروحة دكتوراه, كلية العلوم, جامعة بابل.

**40-** علي, شيماء عبد محمد. (2010). تحديد مقاومة بعض الجراثيم المعزولة من أخماج في مستشفى تكريت التعليمي للمضادات الحيوية وعلاقتها بالبلازميدات. رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة تكريت.

**41-** غني, زينب عادل. (2011). عزل وتوصيف المسبحيات المعوية المقاومة للفانكومايسين والمعزولة من المجاري البولية للمرضى الراقدين في مستشفيات مدينة الحلة. رسالة ماجستير, كلية الطب, جامعة بابل.

**42-** فلفل, عادل عبادي . (2010). بعض المؤشرات الجرثومية والمناعية لدى مرضى الفشل الكلوي المزمن. رسالة ماجستير, كلية العلوم , جامعة بابل.

## المصادر الأجنبية

***Abd-Al sattar,** M . (2004). Partial purification of type-1 pili extracted from *E. coli* and its role in infection . Ph.D. Thesis. College of science. University of Baghdad . Baghdad .

***Abdullah** , A.A. and Al-Moslih, M.I. (2005). Prevalence of asymptomatic bacteriuria in pregnant woman in Sharjah, United Arab Emirates. Eastern Mediterranean Health Journal. Vol. 11, No. 5/6, pp. 1045- 1049.

***Abe**, C.M.; Salvador, F.A.; Falsetti, I.N.; Vieira, M.A.; Blanco, J.E.; Blanco, M.; Machado, A.M.; Elias, W.P.; Hernaudes, R.T.; Gomes, T.A. (2008).Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic E.coli. FEMS Immunol Med Microbiol . 12(3):397-406.

***Agersew**, A.; Feleke, M.; Yitayal, S.; Ketema, T.; Afework, K.; Belay, A. and Abebe, A.(2012). Bacterial profile and drug susceptibility pattern of Urinary tract infection among pregnant women at University of Gondar Teaching Hospital, North West Ethiopia. BMC.J. Vol. 5, No. 8: 197-199.

***Ahmad** , A.A.(2000). Urinary tract caliculi and its bacterial correlation. MSc. Thesis. Univ. of Salahaddin .

***Al-Chalabi**, R . ;Al- Ibadi, M. and Al –Ubaidy, A .(2010). Detection of Urovirulence Genes (*eae,E-hly,α-hly*) of Uropathogenic *Escherichia coli* by Specific PCR. *Journal of Biotechnology Research Center* (special edition). Vol.4, No.1.pp.

***Al-Charrakh** and Al-Muhana .( 2010). Prevalence of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* (VTEC) in Najaf, Iraq. J Microbiol .2(3): 130–136.

***Al-Charrakh**[a],A .H .; Yousif ,S .Y .and Al- Janabi ,H .S.(2011). Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocins from *Klebsiella* isolates from Hilla/Iraq. *J.Microbial* .Vol . 2,Nuo.5,:pp.1-11.

***AL- Dhumaina**,T . F. H.(2005). Extraction and Purification of Colison produce Byes Echerichi Coli Isoleted From Urinary Tract Infection . Nassiria Technical Institute, Thi-Qar .

***Al-Gosha'ah**, F. A. S.(2005).Studying the Effect of Inhibitory Substances Produced by Saccharomyces boulardii on Virulence Factors Of Some Enteric Bacteria. Degree of Doctorate College of Science Council, Al-Mustansiriyah .

***Alhason**, H.F.A.A. (2010). Characterization and Partial Purification of Hemolysin Produced by Uropathogenic *Escherichia coli*. M.sc. Thesis, College of Medicine, University of Babylon.

***Al_Hemidawi**, T. F. H. (2005). Hemolytic activity of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections and it's resistance to antibiotics Ph.D. Thesis. College of Science, University of Al-Mustansiriya.

***Al-Hilali**, S.A.M.H. (2010).Occurrence and Molecular Characterization of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serotypes isolated from children with diarrhea in Najaf. M.Sc. Thesis, College of Medicine, University of Kufa.

***Al-Jasser**, A. M. (2006). Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs):A Global Problem. *KMJ.* Vol.38 ,No. 3 :pp. 171-185.

***Al- Jubouri** , A . S. ; Mahmood, Y. A.R ; AL-Salihi. S. Sh.(2012). Pathogenicity of Klebsiella pneumoniae isolated from diarrheal cases among children in Kirkuk city. Tikrit Journal of Pure Science Vol. 17 ,No. 4 .pp.

***Al- Marjani**, M . F.; Jafere .F . N. ; Abdul Hussain, M . T.; Mezeal .E .A.; Sahtte Z . A. ; Hamza. A . H. ; Shanuor. K . J. and Maeswn H.(2008). Study Of ß-lactamases Producing *Enterobacteria* isolated from German cockroach (*Blatella germanica*) in hospitals. Diala , Jour , Vol. 29.

***Al Mudena**, B.; Belén, R.; Ana, R.; Emilia, C.; Marta, R.; Emilio, B.; and Dongsheng, Z . (2014). Gram-Stain Plus MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) for a Rapid Diagnosis of Urinary Tract Infection. 9(1): e86915.

***AL-Ouqaili** ,M. T. S. (2005).Genetic aspects of Ambler class c, extended spectrum and metallo-beta-lactamases among beta-lactam resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J .Al-Anbar Medical* Vol.5 , No.l .

***Al-Saati**, T.M.S., Al-Emadi, M.A. and Habra, N.(2009). Effect of some antibiotic on *Escherichia coli* isolates from broiler chicks in some regions of Syria. Iraqi Journal of Veterinary Science, 23(2):521-525.

***Al- Salamy,** A. K. (2012). Detection of extended spectrum- beta Lactamase enzymes producting *E .coli* that isolated from urine. Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences ., 3(1):55-66.

***AL - Salayi** , T.S.(2002). Common bacterial causes of urinary tract infections in children below five years of age in Maternity and pediatrics Hospital – Erbil . MSc. thesis. University of Salahaddin .

***Al- Salihi**, S.Sh; Mohmood.Y.A; Al-Jubouri .(2012). Pathoeal genicity of *Klebsiella Pneumoniae* isolated from dirrheal Cases among children in KirKuk City.*TiKrit journal of pure Science* Vol .17,No. 4 .pp. 17-25.

***Al- Sayigh,** H.A.; Al-Hasson, H.F. ; and Ali, J.A.(2013). Effect of some Antibiotics on Uropathogenic *Escherichia coli* and Detection of some virulent factors. Medical Journal of Babylon. Vol.10. No.3.

***Al zahrani**, A. M. and Gherbawy, Y. A. (2011). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from water springs in Al-Ahsa Region. Afr. J. Microbiol. Res., 5(2) :123-130.

***AL-Zubaidy**, A. M. H. (2005). Transferring Plasmids of *Sinorhizobium meliloti* Bacteria to *Escherichia coli* Bacteria by Bacterial Conjugation and Transformation Methods and its Role in Root Nodules Formation, M.Sc. Thesis, College of Education, University of Mosul.

***Ami**, V.; Nikhil, K.; Manasi, K.; Pallavi, B.; Jyotsana, D.(2008). Incidence of metallo beta Lactamase production Pseudomonas aeruginosa in ICU patients. Indian J Med Res 127,pp 398-402.

***Anathan**, S. and Subha, A. (2005).cefoxitin resistance mediated by loss of a porin in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *E.coli*. Indian J Med Microbiol. 23:20-23.

***Antão**, E.M.; Wieler,L.H. and Ewers,C. (2009). Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. Gut. Pathog., 1:22.

***Ankur**, G.; Amit, P.; Sapna, G.; Ujjala, G.; Archana, A. and Prasad, K.N.(2009). Extended spectrum B-lactamases in *Escherichia coli* & Klebsiella Pneumoniae & associated risk factors Indian J Med Res 129,pp 695-700.

***Ashish**, p.; Salesh, P.; Kalpana, M.; Ragini, M. and Cecilia,S. (2013). Frequency and factors associated with carriage of multi-drug resistant commensal *Escherichia coli* among Women attending antenatal clinics in Central India. BMC.J. Vol. 13, No. 1:199- 202.

***Atlas**,R.M.; Brown,A.E.; and Parks,L.C.(1995).Laboratory Manual Experimental Microbiology. 1th ed. *Mosby Yearbook*, Inc. pp: 888.

***Ausubel**, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Smith, J. A.; Seidman, J. D. and Struhi, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, *Inc. New York*.

***Backer**,F.J.and Silverton,R.E. (1985). Introduction of Medical Laboratory Technology.6th ed. Butterworths.pp:45-61.

***Baron**, E.J. and Finegold, S.M. (1994). Microorganisms Encountered In Urinary Tract in Baily & Scott's Diagnostic Microbiology. (9th) ed. Mosby Company U.S.A.

***Belanger**, L.; Garenaux, A.; Haral, J.; Boulianne, M.; Nadean, E. and Dozois, C.M. (2011). *Escherichia coli* from animal reservoirs as potential source of human extraintestinal pathogenic E.coli FEM.S Immunol Med Microbiol. 62: 1_10 .

***Benson**, H.J. (2002). Microbiological application Laboratory Manual in General Microbiology. 8th ed . McGraw – Hill. Co. USA., P:196, 436, 185- 188.

***Bhalerao**, D. S.; Roushani, S.; Kinikar, A. G. and Akhter, I. (2010) ; Study of Metallo-beta lactamase producing Pseudomonas aeruginosa in Pravara Rural Hospital. *Pravara Med Rev;*pp.1-5.

***Biyikli**, N.; Harika, A.; Ozek, E. ; Akman, I. And Bilgen, H. (2004). Neonatal urinary trect infection: Analysis of the patient and recurrences. Black Well Synergy. Pediatrics International. 46(1):21.

***Bouallegue**, O.; Saidani, M.; Ben Mohammed,S. and Mzoughi, R. (2004). Bacteriologic particularities of urinary tract infections in children in Sousse area(Tunisia).Tunis Med;82(8):742-6.

***Bradford**, P.A. (2001). Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st century: Characterization, Epidemology, and detection of this important resistance threat. Clin.Microbiol.Rev.14: 933-951.

***Braunwald**, F.; Fauci, A.; Kasper, E.; Hauser, C.; Longo, W. and Jameson, B. (2001). Harrison's Principles of Internal Medicine 2001, 15th edition , Volume 3, London., pp: 1620-1626.

***Brenner**, D.J.; O'Hara, C.M.; Grimont, P.A.D.; Janda, J.M.; Falsen, E.; Aldova, E.; Ageron, E.; Schindler, J.; Abbot, S.H. and Steigerwalt, A.G. (1999).Bacterial isolated from urinary tract infections in Pregnance women. J. Microbiology 10(3):Pp88-93.

***Brooks**, G. F., Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology 22th ed . McGraw- Hill. U.S.A. pp. 197-202.

***Brooks** , G.F. ; Butel , J.S. and Morse , S.A. (2004) . Jawtz , Melnick and Adelberg's , Medical Microbiology . 23th ed . MCGrow – Hill . New York .

***Brooks** , G. F.; Butel , J. S.; Carroll, K. C. and Morse, S. A. (2007) . Jawetz , Melinick , J.L. and Adleberg's Medical Microbiology . 24th ed. A lange medical book.

***Brooks** , G. F.; Carroll, K. C.; Butel , J. S. & Morse, S. A. (2010) . Jawetz and Melinick and Adleberg's Medical Microbiology . 25th ed. Lange MCGrow – Hill . USA .,Pp:250-252 .

***Brown**, A.E. (2007). Benson`s, Microbiological applications Laboratory Manual in General Microbiology. 10th ed . McGraw – Hill comp. Inc., USA., P.102-263.

***Cedric**, M.; Hazel, M.; Richard, V.; Goering, I.; Van, R.; Derek,W. and Mark, z. (2004). Medical Microbiology. 3rd ed. Mosby company. USA.

***Chambers**, H.F. (2001). Chemotherapeutic drugs in Basic and Clinical Pharmacology. Katzung, B.G. 8th ed . Lange Medical Books, McGraw-Hill. USA.

***Charan**, J.; Mulla, S.; Ryavanki, S.; Naresh, K. N. (2012). New Delhi Metallo-beta lactamase-1 containing Enterobacteriaceae: Origin, Diagnosis, Treatment and Public health concern. *pan african medical journal*. 11(1): 1-7.

***Cheesbrough**, M. (2006). District Laboratory Practice in Tropical Countries part 22nd ed. USA. Pp; 225-235.

***Chigbu**, C.O. and Ezeronye, O.U. (2003). Antibiotic resistance *Staphylococcus aureus* in Abia State of Nigeria. Afican Journal of Biotechnology, 2(10): 374-378.

***Chukwuani**,**C**.M. ; Onifade, M. and Sumonu,K. (2002). Survey of drug practices and antibiotic prescribing pattern at a general hospital inNigeria. Pharm.*World Sci*. Vol.24,No. 5 :pp.188-195.

***Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI.**(2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty first informational supplement M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, wayne, USA.

***Collee** , J. G. ; Fraser , A. G. ; Marmion , B. P. and Simmons , A.(1996). Mackie and McCartney`s practical medical microbiology . 14thed. Churchill Livingston . pp.173-174.

***Cucarella**, C. ; Tormo, M.A. ; Ubed, C. ; Trotonda, M.P. ; Monzon, M. ; Peris, C. ; Amorena, B. ; Lasa, I. and Penades, J.R. (2004). Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. Infect. *Immun.* 72(4) : 2177-2158.

***Dadawala**,A.I.; Chauhan, H.C.; Chandel, B.S.; Ranaware, p.; patelsandip,S.; Khushboo, S.; Rathod, P.H.; Shadh, N.M. and Kuer, H.N. (2010). Assessment of *Escherichia coli* isolates for in vitro biofilm production, Veterinary World Vol.3(8):364-366.

***Daniel**, J.and Wurpel , S. A. (2013) .Beatson, makrina Totsika, Nicola K. Petty, and Mark A. Schembri . Chapterone -Usher Fimbriae Of *Escherichia coli* 8(1):e52835.

***Debasrita**, C.; Saikat, B.and Satadal, D.(2010). A Study on Infections Caused by metallo beta Lactamase producing Gram Negative Bacteria in Intensive Care Unit patients American Journal of Infectious Diseases 6(2):34-39.

***Deep** , A.; Childiyal , R.; Kandian , S. and Shinker , N. (2004) . Clinical and microbiology profile of nosocomial infection in the pediatric intensive care unit (PICU) . Indian Pediatrics . , 41 : pp.1238 – 44.

***Delgado**,A.; Brito,D.; Fevereiro, P.; Peres,C. and Marques, J.F.(2001). Antimicrobial activity of *L.plantarum* , isolated from atraditional lactic acid fermentation of table olives .INRA.EDP.Science .Lait ., 81:203–215.

***Devanand,** P. and Ramchandra, S. (2013); Distribution and Antimicrobial susceptibility pattern of Bacteria Pathogens Causing Urinary tract infection in Urban Community of Meerut City,India. ISRN Microbiol. 4(1):15-23.

***Dhakal** ,B . K.and Mulvey . M . A.(2012 ). The UPEC Pore-Forming Toxin α-Hemolysin Triggers Proteolysis of Host Proteins to Disrupt Cell Adhesion, Inflammatory, and Survival Pathways. *Cell Host & Microbe*, Vol.11, No. 1, pp.58-69.

***El Kholy**, A. A. ; Gomma, H. E.; Younan, M. A.; Thabet, E. H.; Haleim, M. M. A.; El Anany, M. G. and Hendeya, A. A. S.(2011). Extended spectrum b-lactamase-producing *Klebsiellapneumoniae* and *Escherichia coli* strains in a pediatric teaching hospital in Egypt. *Medical Research. J.*,Vol 10 No 1:27–31.

***Elmanama**, A. A., Elkichaoui. A.Y. and Mohsin, M. (2006). Contribution of Hospital Wastewater to the spread of antibiotic resistance in comparison to non- health institution . J. Al-Aqsa Unv., 10(S.E.):108-121.

***Elouennass**, M. ; Zohoun, A. ; El Ameri, A. ; Alem, N. ; Kasouati, J.; Benlahlou, Y.; El Yaagoubi, I.; Frikh, M.; Lemnouer, A. and Benouda, A. (2012). In vitro activities of ertapenem and imipenem against clinical extended spectrum beta-lactamase-producing *enterobacteriaceae* collected in military teaching hospital mohammed v of rabat. hindawi publishing Corporation. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases., p.1-5.

***Enayat** ,K.;Sohili, F.;Salimi,H.; Soltan, D.and Mohammad, M .(2011). Frequency antimicrobial susceptibility and plasmid profiles of *Escherichia coli* pathotypes obtained from children with acute diarrhea. *JJM*.Vol. 4, No. 1 :pp. 23-28.

***Endale**, T.; Million, T.; Yared, M.; Belayhun, K. and Techalew, Sh. (2014). Asymptomatic Urinary tract infection among pregnant women attending the antenatal clinic of Hawassa Referral Hospital, Southern Ethiopia. BMC.Res. 7:155.

***Ennahar**, S.; Sashihara ,T.; Sonomoto, K. and Ishzaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol. Rev 24: 85-106.

***Ewers** , C.; Li, G.; Wilking, H.; Kiessling, S.; Alt, K.; Antao, E-M.; Laturnus, C.; Diehl, I.; Glodde, S.; Homeier, T.; Bohnke, U.; Steinruck, H.; Philipp, H.C. and Wieler, L.H. (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis – causing *Escherichia coli*: How closely related are they? Int J. Med Microbiol., 297(3): 163-176.

***Forbes**, B. A. ;Sahm, D. F. and Wessifeld, A. S. (2002) . Bailey and Scotts' diagnostic microbiology . 9th ed . Mosby . U.S.A. Vol.1:509.

***Forbes**, B. A. ;Sahm, D. F. and Wessifeld, A. S. (2007). Bailey and Scotts' diagnostic microbiology . 12th ed . Mosby .Inc St. Louis. U.S.A., pp:166-167.

***Freeman**, D.J.; Falkiner,F.R. and Keane,C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci**.** *J. Clin. Pathol*. 42:pp.872-874.

***George**, M.; Garrity, D.J; Brenner,S.A.; Noel, R.E. and James, R. Staley (2007). Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology. Vol .2: .

***Gillor** ,O.; Nigro,L.M. and Riley, M .A .(2005). Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials .Genetically Engineered Bacteriocins . Vol .15:1-9 .

***Glantz**,S.A. (1987). "Brimer of Biostatistics".2nd ed.NewYork.McGraw Hill.pp: 287-330.

***Gordon**, D.M. and O'Brien, C.L. (2006). Bactreiocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *E.coli*. Microbiology. 152: 3239-3244.

***Guilfoile**, P. G.; Alcamo, E. and Heymann, D. (2007) ; Antibiotic – Resistance bacteria. Chelsea House Publishers. pp. 53-62.

***Hammami** , R.; Zouhir, A ; Lay, C.h. ; Hamida , J . B. and Flis ,I. (2010) . BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*.

***Han**, J. S. ; Jang, I.Y. ; Ryu, H.S.and Kim, W.Y.(2010). Similarity with the Yersinia pestis Plasmid pCRY and Integrative Conjugative Elements. *J. Korean Soc*. Appl. Biol. Chem.pp. 401-406.

***Han**,B.;Yu,Z.; Liu,B.;Ma ,Q. and Zhang ,R .M .(2011).Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* YJG, isolated from the mucosa of the gut of healthy chickens . J. Microbiology Research .Vol .5,No. 10 :pp.1147-1155.

***Harley**, J.P. and Prescott, L.M . (1996) .Labratory Exercises in Microbiology . 3rded .McGraw –Hill publishing company . New York.

***Hassan**, A. ; Usman, J.; Kaleem, F.; Omair, M.; Khalid, A.; and Iqbal, M. (2011). Detection and antibiotic susceptibility pattern of biofilm producing gram positive and gram negative bacteria isolated from a tertiary care hospital of Pakistan. *Malaysian J. Microbiol.*, Vol.7,No.(1),pp. 57-60.

***Holt**,J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.A.; and Williams, S.T.(1994). Bergy, s Manual Of Derminative Bacteriology. (9th) ed. Williams & Wilkins.

***Hooper**, D.C. (2002). Target Modification as a Mechanism of antimicrobial resistance. In Lewis, K. et al., editors ; Bacterial resistance to antimicrobials , New York, 2002, Marcel Dekker, p161.

***Howland**, R.D. and Mycek, M.J. (2006). Pharmacology .3th ed. Lipincott Williams and Wilkins. U.S.A. Pp:77-79.

***Hsueh**, P. P. ; Chen, W. H. and Luh, K. T. (2005). Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram – Negative bacteria causing nosocomial infections from 1991 – 2003 at a UniversityHospital in Taiwan. *Int. J. Antimicro. Agents.* 26(6): 463-472.

***Ibraheem**, A.K. (2006). A study on the possible Involvement of Antibiotic Resistant plasmids in adherence of uropathogenic *E.coli* to ueoepithelial cells . M.sc. Thesis, College of Science , University of Al-Nahrain.

***Ibrahim**, M.E.; Bilal, N.E. and Hamid, M.E.(2012); Increased multi-drug resistant *Escherichia coli* from hospitals in Khartoum state, Sudan. Afr Health Sci.12 (3):368-375.

***Jabbar**,A .D. (2011). Phenotypic and Genotypic Detection of Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBL) among *Escherichia coli* Isolated from Symptomatic Female's Genital Tract InfectionCollege of Science ,University of Wassit.

***Jain**, A.; Roy, I.; Gupta, M.K.; Kumar, M. and Agarwal, S.K. (2003). Prevalence of extended spectrum betalactamase producing GramNegative bactria in septicaemic neonates in atertarycar hospital. *J. MedMicrobiol* . Vol. 52,No. 5 :pp. 421-5.

***Japoni**, A., Gudaezi, M., Farshad, S., Basiri, E., Ziyaeyan, M., Alborzi, A., Rafaatpour, N. (2008). Assay for integrons and pattern of antibiotic resistance in Clinical *Escherchia coli* strain by PCR- RFLP in Southern Iran. Jpn. J.Infect . Dis., 61, 85-88.

***Jarjees**, R.K. (2006). Bacteriological study on the incidence of genitourinary tract infection in diabetic Women in Erbil. MSc thesis. College of Science, University of Salahaddin, Erbil - Iraq.

***Jarlier**, V.; Nicolas, M.; Fournier,G. and Philippon, A.(1988). Extended broad-spectrum β-Lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis*. Vol.10,No. 4 :pp. 867-78.

***Jawetz**, M.; Adelber, K.; Geo, F.; Brooks, A.; Janet, S.; Butel and Stephen, A.M. (2004). Medical immunology, 23 ed. International Edition. McGraw-Hill comp. Inc, USA.

***Johnson**, J.M.; Weagant, S.D.; Jinneman, K.C.and Bryant, J.L. (1995). Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Epidemiological Study of *Escherichia coli* O157:H7 during a Food-Borne Outbreak. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:7: 2806-2808.

***Johnson**, J. R.; Russo, T.A. (2005). Molecular epidemiology of Extraintestinal pathogenic(uropathogenic ) *Escherichia coli*. Int J Med Microbial., 295(6-7): 383-404.

***Jwan**, A.A. (2012). Hemolysin and Bacteriocin production of *E.coli* isolated from urinary tract infection. Journal of Babylon University / pure and Applied sciences / No.(5) / Vol.(20).

***Kako**, A. N.(2010). Isolation of Bacteria from Urinary Tract Infection in Erbil Hospitals and Comparison the Efficacy of Antimicrobials from Different Origins. Higher Diploma . Thesis. College of Education / Scientific. University of Salahaddin .

***Karim**, G.F. (2007). Identification of Nosocomial *E.coli* Isolated from UTI by using phenotypic Markers and DNA Markers Based on PCR . M.Sc. Thesis. College of Science, University of Suleiman.

***Karlowsky**, J.A.; Jones, M.E.; Thornsberry, C.; Friedland, I.R.and Sahm, D.F.(2003).Trends in antimicrobial susceptibilities among *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in United States from 1998 to 2001. Antimicrobial. Agents . Chemother. May; 47(5): 1672-80.

***Katzung** , B.G. (2004) . Chemotherapeutic drug . basic and clinical pharmacology . 9th ed : pp.733 –81 .

***Kfoury**, J.N.S. and Araj, G.F.(2003) Recent developments in β-Lactamases and extended spectrum β —Lactamases**.** *Braz. J. Microbiol*. 327: 1209 - 12 13.

***Khan**, F. ; Shukla, I. ; Rizvi, M. ; Mansoor, T. and Sharma, S. C. (2011). Detection of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* .Does it have a role in treatment of MRSA infections ?. *Trends in Med. Res. Academic J.*, Vol .6,No. 2 . pp.116-123.

***Koneman,** E.W; Allen, S.D; Janda, W.M; Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C.J.(1992). Color Atlas and Textbook Of Diagnostic Microbiology. (4th) ed. *J.B.Lippincott Company*. Philadelphia.

***Kumarasamy**, K.K.; Toleman, M.A.; Walsh, T.R.; Bagaria, J.; Butt,F. and Balakrishnan, R.(2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan and the UK: amolecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis. 10(9): 597-602.

***KriengKauyKiat**, J.; Porter, E.; Lomovskaya, O.and Wong -Beringer, A. (2005). Use of an efflux pump in hibitor to determine the prevalence of efflux pump mediated flouroquinolone resistance and multidrug resistance in *pseudomonas aeruginosa .Antimicrob. Agents. Chemother.* 49(2): 565-570.

***Labormbardi**, V. J. (2007). The emergence of the KPC carbapenemases: clinical and laboratory issues. Rev. Med. Microbiol., 18(2):29-34.

***Leone**, S. ; Silipo, A.; Nazarenko, E.L.; Lanzetta, R.; Parrilli, M. and Molinaro, A. (2007). Molecular Structure of endotoxins from gram-negative marine bacteria : an update . Mar. Dru ., 5:85-112.

***Levinson** ,W. and Jawetz ,E . (2000) . Medical Microbiology and Immunology examination and board review . Appleton and lange U.S.A .

***Levinson**, W. (2008). Review of Medical Microbiology and Immunology . 10th ed. McGraw-Hill comp. Inc, USA.

***Levy**, S.B. and Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature Med., 10, S122-S129.

***Li**, X.; Yan, Z .; and Xu, J. (2003). Quantitative variation of biofilm among strain in natural populations of Candida albicans. Microbiol., 149:353-362.

***Li,** X.; Lockatel, C.V.; Johnson, D.E.; Lane, M.C.; Warren, J.W. and Mobley, H.L.T.(2004). Development of intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by *Proteus mirabilis.* Infect. Immun. Jan.Vol. 72,No. 1 : pp.66-75.

***Liu**, B.; Knirel ,Y.A.; Feng, L.; Perepelov, A.V.; Senchenkova, S.N.; Wang, Q.; Reeves, P.R. and Wang, L.(2008). Structure and genetics of *Shigella* O antigens.FEMS Microbiol . 12(4):627-653.

***Livermore**, D.M. and Brown, D.F. (2001). Detection of B -lactamase-mediated resistance. J. Antimicrob. Chemother., 48:59-64.

***Livermore**, D. M.; Canton, M.; Gniadkowski, P.; Nordmann, G.M.; Rossolini, G.; Arlet, J.; Ayala, T.M.; Coque, I.; Kern- Zdanowicz, F.; Luzzaro, L. ;Poirel,S. and Woodford,N. (2007). CTX-M : changing the face of ESBLs in Europe. J. Antimicrob. Chemother., 59:165-174.

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

***Mahon**, R. and Manuselis, G. (2000). Diagnostic Microbilogy 2nd ed. Saunders company U.S.A.

***Mahon** ,C.R.;Lehman ,D.C. and Manuselis ,G.(2007). Text book of Diagnostic Microbiology . 3th. ed. , Saunders , Elsevier . Pp:255-260.

***Makia**, R. S.; Ismail, M. Ch.and Fadhil, A. M. (2013). Biofilm production as a virulence factor in Uropathogenic bacteria and yeasts.*Journal of Biotechnology Research Center.* 7(1): 29-34.

***Maulood**, K. K. (2008).Construction of *Escherichia coli* K-12 MG1655 ΔsmpBΔ ssrA strain by PCR-Based Mutagenesis. M.Sc. Thesis. Science Education College . University of Salahaddin.

***Martinez**, J.L. and Baquero, F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: Pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. Clin. Microbiol. Rev., 15(4):647-679.

***Mathur**, T.; S. Singhal; S. Khan; D.J. Upadhyay; T. Fatma; and A. Rattan. (2006). Detection of Biofilm Formation among The Clinical Isolates of Staphylococci: An Evaluation of Three Different Screening Methods. *Indian J. Med. Microbiol*. Vol .24,No. 1 :pp.25-29.

***Melvin,** B. and Heyman, C. (2006). Lactose intolerance in infants , children and adolescents. Pediatrcis., 118(3):1279-1286.

***Merode**,A.E.; Mei, H.C.; Busscher, H.J and KromB.P. (2006).Influence of culture heterogeneity in cell surface chare on adhesion and biofilms formation by *Enterococcus faecalis.* J. Bacteriol.,188:2421-2426.

***Meshram**, L.; Patidar, R.K.; Khare, M.; Bagde, S.; Sahare, K.N.and Singh, V.(2012).Comparative analysis between biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. Asiatic Journal of Biotechnology Resources, 3(10) 1441- 1446.

***Mochen**, A. B.; Garner, O. B.; Hindler, J. A.; Krogstad, P.; Ward, K. W.; Rasheed, J. K.; Anderson, K. F.; Limbago, B. M. and Humphries, R. M. (2011). New Delhi Metallo-β-Lactamase (NDM-1)-Producing Klebsiellapneumoniae: Case Report and Laboratory Detection Strategies. *J. Clin. Microbiol.* 49(4): 1667-1670.

***Mulvey**, M.R.; Grant, J.M.; Plewes, K.; Roscoe, D.and Boyd, D.A. (2011). New Delhi metallo -B-Lactamase in Klebsiella pnemoniae and *Escherichia coli,* Canada. Emerg Infect Dis.

***Nanakaly**, Z.G.A. (2010). Characterization of Plasmid DNA Content and Antimicrobial Effect of Bile Salts on *Esherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infection of Pregnant Woman. Higher Diploma . Thesis. College of Education / Scientific. University of Salahaddin .

***National Committee For Clinical Laboratory Standareds** (NCCLS). (2002). Perfomance Standared for antibiotic susceptibility testing; Villanova P.A.

***National Committee for Clinical Laboratory Standards** (NCCLS). (2007) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; seventeenth informational supplement . M100 - S17. USA .

***Nazmukry**, S. ; Ahmad, A. and Khan , S. (2010). Screening and partial characterization of Hemolysin from *Bacillus sp*. : strain S128 and S144 are Hemolysin B(HBL) producers . Pak.J.Bot.,42(1) 463-472.

***Nerino**, A.; Michele, M.; Mikhail, F. and Carmine, D .(2013). *Escherichia coli* in Europe. 10(12): 6235–6254.

***Nester**, E. W.; Roberts, C.E. ; Pearsall, N.N. ; Anderson, D.G. and Nester, M.T. (2004). Microbiology aHuman perspective 4th ed. WCB. McGraw- Hill Companies., Pp:599-604.

***Nubia,** L.; Musa, S.; Dang, T.; Corinna, K.; Fred, K.; Florence, M. and Annelie, B.(2012).Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from pregnant women in Different Countries. J Clin Microbiol .50(11): 3569-3574.

***Olowe**,O.A.; Ogungbamigbe, T.O.; Kolawole, S.O.; Olowe, R.A. and Olayemi, A.B.(2008).Hemolysin production and resistance to fluoroquinolones among clinical isolates of *Escherichia coli* in Osogbo Metropolis, Southwest , Nigeria . *New York Science Journal*, Vol 1, ISSN 1554-0200.

***Onoh,** R.; Umeora, O.; Egwuatu, V.; Ezeonu, P. and Onoh, T. (2013). Antibiotic sensitivity pattern of uropathogens from pregnant women with Urinary tract infection among in Abakaliki, Nigeria. Infect Drug Resist,6:225-233.

***Ozbakir**, G.; Avcioglu, N.H. and Bilkay, I. S. (2010). Determination of antibiotics resistance and plasmid DNA profiles of *Escherichia coli* strains isolated from clinical materials. Int. J. Agric. Biol., 12:724-728.

***Parvin**, U.S.; Hossain, M.A.; Musa, A.K.; Mahamud, C.; Islam, M.T.; Haque, N.; Muhammed, N,; Khan, S.I. and Mahmud, N.U. (2009). Pattern of aerobic bacteria with antimicrobial susceptibility causing community acquired urinary tract infection. Mymensingh Medical Journal, 18(20):148-53.

***Paterson**, D.L; Bonomo, R.A.( 2005). Extended-spectrum, beta-lactamases: a clinical update. ClinMicrobiol Rev. 18: 657-686.

***Piddock**, L. J. V.(2006). Multi drug efflux pumps – not just for resistance. Nature Rev. Microbiol., 4,629-636.

***Pinto pereria**,L.M. ; Phillips,M. ; Ramlal,H. ;Teemul,K. and Prabhaker, A. (2004). Third generation cephalosporin use in a tertiary hospital in part of Spain,Trinidad : need for antibiotic policy.B.M.C. Infect.Dis.Vol.4,No. 1 :59.

***Pitout**, J.D.(2010). Infections with extended-spectrum beta - lactamase-producing *Enterobacteriaceae* : changing epidemiology and drug treatment choices. Drugs, 70:313-333.

***Poirel**, L.; Thomas, I.; Naas, T.; Karim, A. and Nordmann, P.(2000) Biochemical sequence analysis of GES-1 a novel class A, extended – spectrum 13-Lactamase, and the class 1 integron in 52 from Klebsiellapneumoniac. *Antimicrob. Agents Chemother*. 44(3): 622-632.

***Poirel**,L.; Rotimi ,V.;Bernabeu,S.; Jamal, W. and Nordmann, P. (2005). Explosive emergence of CTXM-15 extended-spectrum beta lactamase in *Enterobacteriaceae* in Kuwait. 17th European Congress of clinical Microbiology and Infectious Diseases ICC, Munich, Germany Abstract Number., 1733-527.

***Poirel**, L.; Lagrutta, E.; Taylor, P.; Pham, J.and Nordmann, P.(2010). Emergence of metallo -B- Lactamase NDM-1- Producing Multidrug resistant Escherichia coli in Australia. Antimicrob Agents Chemother.; 54(11):4914-6.

***Poole**, K.(2005)Aminoglycoside ResistanceIn*Pseudomonas aeruginosa*. *Anti. Agn. Chemo.*49(2):479-487.

***Prescott**, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. (2005). Microbiology. 6th ed. McGraw. Hill companies Inc. New York., Pp:2719-2725.

***Rachel**, R. ;Spurbeck, J.; Alteri, D.; Himpsl, and Harry, L. (2013). The Multifunctional Protein YdiV Represses P Fimbria-Mediated Adherence in Uropathogenic *Escherichia coli* 195(14): 3156–3164.

***Raka**, L.; Mulliqi,-Osmani, G.; Berisha, L.; Begolli, L.; Omeragiq, S.; Parsons, L.; Salfinger, M.; Jaka, A.; Kurti, A.and Jakupi, X. (2004). Etiology and susceptibility of urinary tract isolates in Kosova. *Int.J.Antimicrob.Agents.* 23(1): 2-5.

***Reddy**, K.R. (2010). Microbiology &Parasitology .4th ed. Paras Medical Puplisher. New Delhi.

***Riley**, M. and Chavan, M.(2007). Bacteriocins ecology and evolution .Springer-Verlag ,London ,United kingdom .

***Rofail**, S. K.; Elham, A. Y. and Daoud , A.M. (2002). Veterinary Serum and Vaccine Research Institute, Agricul tural Research Center, Ministry of Agriculture , Giza , Egypt. Abstract.

***Ryan**, K. J. and Ray, C. G. (2004). Sherris Medical Microbiology. 4th ed. McGraw Hill, ISBN 0.8385-85: 9-9.

***Salah**, H.F.(2007). Effect of some Medicinal plant Extracts on Antibiotic Resistance by plasmids of *Esherichia coli* Isolated from different Sources. M.Sc. Thesis. Science Education College . University of Salahaddin .

***Salih**, M . T. and AL-Ani, N . F. (2013) .Microbiological Aspects in Biofilm Produced by some Uropathogens Isolated from Patients with Indwelling Bladder Catheters. *Raf. J. Sci.*, Vol. 24, No.1. pp. 1-16.

***Salyers**, A.A. and Whitt, D.D.(2002). Bacterial pathogenesis, 2nd ed. American Society for Microbiology.

***Samie**,A and NKgau.T.F.(2012).Biofilm production and antibiotic Susceptibility Profile of *Escherichia coli* isolates from HIV and AIDS patients in The Limpopo province .*Africian Journal Biotechnology* Vol.11,No. 34 :pp.8560-8570.

***Sandoe**,J.A. ; Witherden,I.R. ; Cove,J.H. ; Heritage,I. and Wilcox,M.H. (2003). Correlation between enterococcal biofilms formation *In vitro* and medical-device related-infection *In vitro*.*J.Med.Microbiol*.2:pp.547-550.

***Sarika**,A.R.; Lipton ,A .P .and Aishwarya ,M .S.(2010). Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus*GP1 under Different Culture Conditions .*J. Food Science and Technology* . Vol .2,No. 5 :pp.291-297.

***Sarojamma**, V. and Ramakrishna, V. (2011) ; Prevalence of ESBL-Producing *Klebsiellapneumoniae* Isolates in Tertiary Care Hospital. International Scholarly Research Network . *ISRN Microbiology*.pp.1-5.

***Schweizer**, H.P. (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria : unanswered questions. Genet Mol Rev., 2:48- 62.

***Seeley**, R.; Stephens T. and Tate, P. (1992). Anatomy & Physiology. 2nd ed. Mosby yearbook. London., pp. 214-220.

***Shahab**, M. and Navideh, N .(1997). *Bacterial etiologic agents of urinary tract infection in children in the Islamic Republic of Iran*. Eastern Mediterranean Health Journal. Volume 3, Issue 2,page 290-295.

***Sharma**, A . and Grover, P. (2004). Application of whonet for the surveiallance of antimicrobial resistance. Indian .J. Med. Microbiol., 22(2):115-118.

***Sharma** , K.K.; Soni, S.S.and Meharchandani, S. (2006). Congo red dye agar test as an indicator test for detection of invasive bovine *E. coli.* Vet. Arhiv., 76, 363-366.

***Sharma**, S.; Bhat, G. and Shenoy, S. (2007). Virulence factors and drug resistance in *Escherichia coli* isolated from extraintestinalinfections. Indian *J. Med. Microbiol.* Vol.25, No. 4 : pp.369-373.

***Shirazi**, M.; Sadeghifard, N.; Ranjbar, R.; Daneshyar, E.and Ghasemi, A. (2006). Incidence of asymptomatic bacteriuria during pregnancy. Pak. J. Biol . Sci., 9: 151-4.

***Siddiquie**, S. (2003). *Proteus mirabilis* and urinary tract infection. J.Pediater , 39 (8):40-70.

***Singh** , J . and Banerjee , N. (2008). Transcriptional Analysis and Functional Characterization of a Gene Pair Encoding Iron-Regulated Xenocin and Immunity Proteins of *Xenorhabdus nematophila* .*J.Bacteriology* . Vol .190,No. 11 : pp.3877-3885.

***Smajs**, D.; Adam, S. and Sarem, H. (2010). Bacteriocin Synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: Colicin E1 is a potential virulence factor. BMC Microbiology.10:288.

***Smarda**, J., and Obdrzalek, V., (2001). Incidence of colicinogenic strains among *E.coli* .J. Basic Microbiol. 41:367-374.

***Soheila**,S.A.; Henry,L.T.and Amar,H.J.(2009). Serotyping of *E.coli* isolated from UTI. J. Microbiology.20:pp.109-112.

***Solnik**, J. V. (2003). Antibiotic mechanisms of resistance. Div.Infect.Dis.,
530:752-1333.

***Soloaga**, A. ; Veiga, M.; Garciasegura, L.; Ostolaza, H.; Brasseur, R. and Goni, F. (1999). Insertion of *Escherichia coli* alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: Prediction and experiment. *Mol*. *Microbiology,* 198: 1013-1024.

***Spanu**, T.; Luzzaro, F.; Perilli, M.; Amicosanti, G.; Toniolo, A. and Fadda, G.(2002). Occurance of extended-spectrum-B. lactamas and other antimicrobial drug. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*. Jun. Vol .46 ,No. 1:pp. 196-202.

***Subramanian**, P.; Umadevi, S.; Kumar, S. and Stephen, S. (2012). Determination of correlation between biofilm and extended spectrum β lactamases producers of Enterobacteriaceae. *Scho. Res. J.* 2(1): 2-6.

***Sujatha**, R. and Manju, N. (2014); Prevalence of Asymptomatic Bacteriuria and its Antibacterial susceptibility pattern Among pregnant women Attending the Antenatal clinic at Kanpur, India. J Clin Diagn Res.8(4):1-3.

***Suleiman**, A. M. (2008) . Bacteriological and Genetical Study of GBS and *E.coli* Isolated from Birth Canal at delivery time. M.Sc. Thesis. College of Science, University of Tikrit.

***Stamm**, W.E.; Hooton, T.M.; Johnson, J.R.; Johnson, C.; Stapheton, A.; Robert, P.L.; Moseley, S.L. and Fihn, S.D. (1989). Urinary tract infection: From pathogenesis to treatment. J. Infect. Dis., 159(3): 400-405.

***Tazebew**, E.; Getenet, B.; Wondewosen, T. and Silabat, M. (2013). Associated risk factors of Urinary tract infection among pregnant women at Felege Hiwot Referral Hospital, Bahir Dar, North West Ethiopia. BMC. Res. Vol 10 No 2:11-12.

***Tenover**, F.C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. American Journal of Infection Control., 34:3-10.

***Todar**, K. (2002). Bacteriology home page: mechanisms of bacterial pathogenicity : Endotoxins.

***Todar**, K. (2008). Pathogenic E.coli University of Wisconsin – Madison department of Bacteriology. Today's online text book of bacteriology .Pp: 16-20.

***Todorov**,S. D.(2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*-Production, Genetic Organization and mode action .J. Microbiology. 40:pp.209-221.

***Toroglu**, S.; Dincer, S .and Cenet, M. (2005). Distribution of phenotypes Related to Beta-Lactamase production in *Enterobacteriaceae*. KSU. Journal of Science and Engineering. 8(2).

***Tortora**, G.J.; Funke, D.R. and Case, C.L.(2007). Microbiology . 3rd ed . pearson Education Inc. USA.

***Tortora**, G.J. ;Funke, D.R. and Case, C.L.(2010). Microbiology An introduction . 10th ed . ;pearson Benjamin Cummings U.S.A .Pp:355-402.

***TuQuoc**, P.; Genevaux,P.; Pajunen, H.; Savilahti, C.; Georgopoulos, J. Schrenzel,S. and Kelley, W. (2007). Isolation and Characterization of Biofilm Formation-Defective Mutants of *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 75(3):1079-1088.

***Turner**, P.J.(2005). Extended- spectrum B-lactamases. Clin. Infect. Dis., 41(4) : S273-S275.

***Turpin,** C.; Bridget, M.; Danso, K. and Frimpong, E. (2007). Asymptomatic Bacteriuria in pregnant women Attending antenatal clinic at Komfo Anokye Teaching Hospital, Kumasi, Ghana. GMJ.41(1):26-29.

***Vandepitte**, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuck, G. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO Switzerland.

***Venturi**, V. (2006). Regulation of quorum sensing in pseudomonas. FEMS Microbiol. Rev., 30, pp.274-291.

***Walsh,** C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature. 406:775–81.

***Wax**, R.G.; Lewis K.; Salyers A.A. and Taber, H. (2008). Bacterial Resistance to Antimicrobials 2nd ed. CRC Press: Taylor & Francis Group, NW.

***World Health Organization WHO**. (1978). Techniques for the detection of β – Lactamase producing strains *ofneisseriagonorrhoeae*. 616:pp. 137 – 143.

***Winn**, W. ; Allen, S. ; Koneman, W.; procop, G.; Schreckenberger, P. and Woods, G. (2006). Koneman`s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Lippincott, Williams & Wilkins. Pp: 277-285.

***Yamanoto**, S.(2007). Molecular epidemiology of Uropathogenic *Escherichia coli*. JInfect Chemother.12(2):68-73.

***Yasmeen**, K.; Sneha ,K.; shobha, D.; Halesh, L. and Chnder, M. (2009). Virulence factors serotypes and antimicrobial susceptibility pattern of *E.coli* in Urinary tract infections. Alamen J.Med. Sci.2(1):47-51.

***Yedekci**, S. ; Erac, B. and Limoncu, M. (2012). Detection of the efflux pump-mediated quinolone resistance in esbl positive *Escherichia coli* and *klebsiellapneumoniae*isolates by phe-arg-βeta-naphthylamide. *Turk J. Pharm. Sci. 67-74.*

***Yong**, D.; Toleman,M.; Giske,C.; Cho, H.; Sundman, K. and Lee, K. (2009). Characterization of a new metallo-β-Lactamase gene, blaNDM-1, and a novel Erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother.53(12):504-546.

***Zapun**, A.; Conters- Martel,C. and Vernet, T.(2008). Penicillin- binding proteins and B-lactam resistance. FEMS Microbiol. Rev., 32,361-385.

***Zarfel**, G.; Hoenigl , M.; Leitner, E.; salzer, H.; Feierl, G.and Masoud, L.( 2011). Emergence of New Delhi metallo -B-Lactamase, Austria. Emerg Infect Dis.

## ملحق (1) إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى

الإستمارة الإستبيانية :

1- إسم المريض :

2- العمر :

3- السكن : ريف..... ، مدينة .....

4- الحالة الإجتماعية : متزوجة ( ) ، غير متزوجة ( )

5- عدد مرات الحمل :

6- التحصيل الدراسي :

7- تاريخ أخذ العينة :

8- الإصابة بداء السكري / / نوعه /

**ملحق (2) جهاز VITEK 2 المستعمل لتشخيص البكتريا**

**ملحق (3) أشرطة التشخيص بجهاز VITEK2 والمكون من 64 اختبار كيموحيوي**

## ملحق (4) حساسية بكتيريا *E.coli* للمضادات الحياتية

| Imipenem | Co-trimoxazole | Ceftazidime | Aztreonam | Cephalothin | Ciprofloxacin | Cefixime | Pipracillin | Chloramphenicol | Nalidixic acid | Nitrofuration | Gentamicin | Tobramycin | Cefotaxiem | Ampicillin | Augmentin | المضاد / رقم العزلة |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | R | R | R | S | R | S | R | R | R | S | R | S | I | R | R | E1 |
| S | R | R | R | R | R | I | R | R | R | S | R | S | R | R | R | E2 |
| S | R | R | R | R | S | S | R | S | R | R | R | S | R | R | R | E3 |
| S | R | S | R | R | S | S | R | R | S | R | S | S | R | S | R | E4 |
| S | R | I | R | R | S | I | R | R | S | R | S | S | I | R | R | E5 |
| S | R | S | R | R | S | R | R | R | R | S | S | S | I | R | R | E6 |
| S | R | S | R | R | I | R | S | R | S | S | S | S | R | R | R | E7 |
| S | R | S | R | S | S | R | R | R | R | S | I | S | R | R | R | E8 |
| S | R | I | R | R | S | I | S | R | R | S | S | S | S | R | R | E9 |
| S | R | R | R | R | S | R | R | R | S | R | R | S | S | R | R | E10 |
| S | R | R | R | R | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | E11 |
| S | R | R | R | R | S | R | R | R | R | S | R | R | R | R | R | E12 |
| S | R | R | R | R | S | R | S | S | R | S | S | S | S | R | R | E13 |
| S | R | S | I | R | S | R | R | R | I | S | S | S | S | R | R | E14 |
| S | R | S | R | R | S | I | R | R | R | S | S | S | R | R | R | E15 |
| S | R | S | R | R | S | R | R | R | R | S | S | S | I | R | R | E16 |
| S | S | S | R | S | S | R | R | R | R | S | R | S | R | R | R | E17 |
| S | R | S | S | R | S | S | S | R | R | I | R | S | S | R | R | E18 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | R | S | R | R | R | S | R | R | I | S | I | S | S | S | R | E19 |
| S | R | R | R | R | S | S | S | R | R | S | S | S | S | R | R | E20 |
| S | R | R | R | R | R | S | R | R | R | R | R | S | R | R | R | E21 |
| S | S | I | R | S | S | R | R | R | R | I | S | R | I | R | R | E22 |
| S | R | S | R | S | R | I | S | S | S | R | S | S | S | R | R | E23 |
| S | R | S | R | S | S | I | R | R | S | R | S | S | R | R | R | E24 |
| S | R | S | R | S | R | S | S | R | S | S | R | S | I | R | R | E25 |
| S | R | R | R | R | R | S | R | R | S | S | S | S | I | R | R | E26 |
| S | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S | S | S | R | R | R | E27 |
| S | R | S | R | R | S | S | R | R | R | S | S | S | R | R | R | E28 |
| S | R | S | R | R | I | S | R | R | R | S | S | S | R | R | R | E29 |
| S | R | S | R | R | R | S | R | R | R | R | R | S | S | R | R | E30 |
| S | R | S | S | S | R | S | S | S | R | R | S | R | S | R | R | E31 |
| S | R | I | R | R | R | S | R | R | R | R | S | S | S | S | R | E32 |
| S | R | S | R | S | R | I | R | R | S | R | S | S | R | R | R | E33 |
| S | S | R | R | R | R | S | S | R | R | R | I | S | S | R | R | E34 |
| S | R | R | R | R | R | S | R | R | S | R | S | S | R | R | R | E35 |
| S | R | R | R | R | S | R | R | S | R | R | S | S | R | R | R | E36 |
| S | R | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | E37 |
| S | S | I | R | S | S | R | S | R | I | R | S | S | R | R | R | E38 |
| S | R | R | R | R | R | I | S | R | R | I | S | S | S | R | R | E39 |
| S | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | S | R | R | R | R | E40 |
| S | R | S | R | R | R | I | R | R | R | R | R | S | I | R | R | E41 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | R | S | R | R | R | I | R | S | S | R | R | R | R | R | E42 |
| S | R | S | R | S | S | S | S | R | R | R | S | S | S | R | R | E43 |
| S | R | I | R | R | S | S | R | R | R | R | S | S | R | S | R | E44 |
| S | S | S | R | S | S | R | R | R | S | R | S | S | S | R | R | E45 |
| S | R | S | R | R | S | I | R | R | R | I | R | S | S | R | R | E46 |
| S | R | S | R | S | S | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | E47 |
| S | R | S | R | R | S | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | E48 |
| S | R | S | I | R | S | R | R | R | S | R | S | S | R | R | R | E49 |
| S | R | S | R | R | I | R | S | R | S | R | S | R | R | R | R | E50 |
| S | R | S | S | S | S | I | S | R | S | R | R | S | S | R | R | E51 |
| S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | R | R | R | E52 |
| S | R | S | R | R | R | R | S | R | R | R | S | S | R | R | R | E53 |
| S | S | S | R | S | R | R | S | R | S | R | S | S | R | R | R | E54 |
| S | R | I | R | R | S | S | R | R | S | R | S | S | S | R | R | E55 |
| S | R | S | R | R | S | S | R | R | S | R | S | S | I | R | R | E56 |
| S | R | S | R | R | S | S | R | S | R | I | R | S | I | R | R | E57 |
| S | R | S | R | S | S | I | R | S | R | R | R | S | S | R | R | E58 |
| S | R | R | R | R | S | I | R | R | R | R | S | R | R | R | R | E59 |
| S | R | R | R | R | S | I | R | R | S | R | S | S | S | S | R | E60 |
| S | R | R | R | R | S | S | R | R | S | R | R | S | R | R | R | E61 |
| S | R | R | R | R | R | S | R | R | S | R | R | S | R | R | R | E62 |
| S | R | R | R | R | R | S | R | R | S | R | S | S | R | R | R | E63 |
| S | R | I | R | S | R | S | R | R | R | R | S | R | S | R | R | E64 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | R | R | R | R | R | S | S | R | I | I | S | S | S | S | R | E65 |
| S | R | R | R | R | R | S | R | S | S | R | R | S | S | R | R | E66 |
| S | R | R | R | R | S | I | R | R | S | R | S | R | I | R | R | E67 |
| S | S | R | R | R | S | S | R | R | S | S | R | S | R | R | R | E68 |
| S | R | R | R | R | R | S | R | R | S | R | I | S | R | R | R | E69 |
| S | R | S | R | R | R | S | R | S | R | R | R | R | R | R | R | E70 |
| S | R | I | R | S | I | S | R | R | S | R | S | R | R | R | R | E71 |
| S | R | S | R | S | S | R | S | R | I | R | R | S | S | R | R | E72 |
| S | R | S | R | R | S | R | R | S | R | I | S | S | R | R | R | E73 |
| S | R | S | R | R | R | R | R | R | S | R | S | S | I | R | R | E74 |
| S | R | S | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | E75 |
| S | R | S | S | S | R | S | R | R | R | R | S | S | S | R | R | E76 |
| S | R | S | R | R | S | S | R | R | R | R | R | S | S | R | R | E77 |
| S | R | S | R | R | S | S | S | R | S | S | R | S | R | R | R | E78 |
| S | S | S | R | R | S | S | R | S | R | R | I | R | R | S | R | E79 |
| S | R | S | R | R | S | I | R | R | R | R | I | R | R | R | R | E80 |
| S | R | I | R | R | S | R | R | R | R | I | R | S | I | R | R | E81 |
| S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | E82 |
| S | R | S | R | R | I | S | R | R | R | R | R | S | S | R | R | E83 |
| S | R | S | S | R | S | S | R | R | S | R | R | R | S | R | R | E84 |
| S | S | S | R | S | R | S | R | R | S | R | R | R | S | R | R | E85 |
| S | R | S | R | R | S | I | S | S | S | I | R | R | S | R | R | E86 |
| S | R | S | R | R | S | R | R | R | R | R | I | R | S | R | R | E87 |

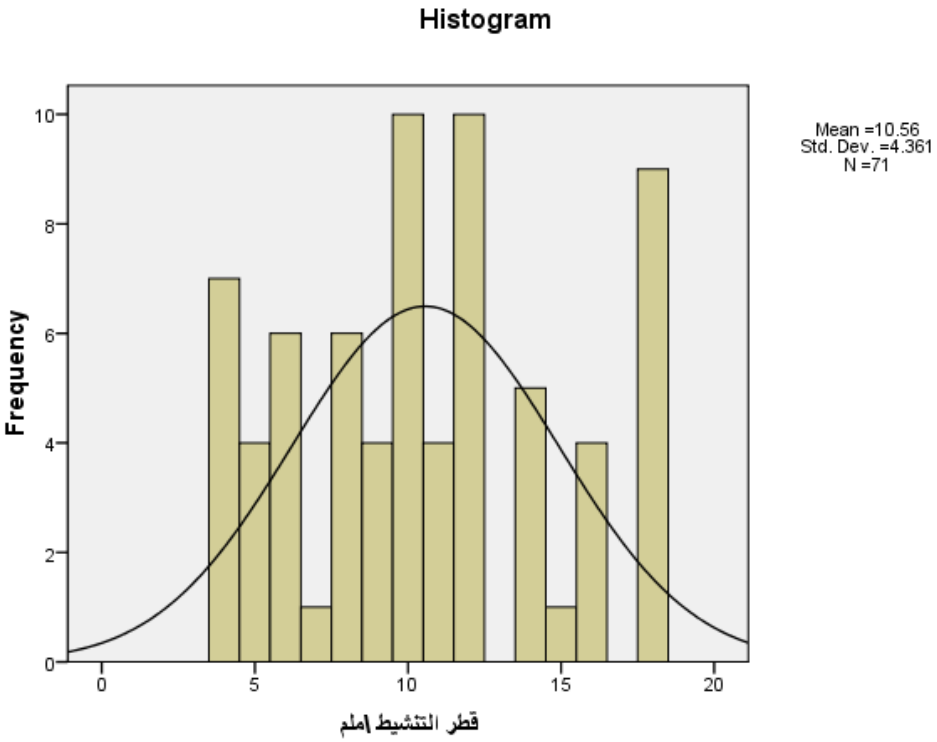
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | R | R | R | S | S | R | R | R | S | R | R | S | R | R | R | E88 |
| S | R | R | R | R | S | I | S | R | R | R | R | S | R | R | R | E89 |
| S | R | R | R | R | S | I | R | R | S | S | I | S | R | R | R | E90 |
| S | R | R | R | R | S | S | R | R | S | R | S | S | S | R | R | E91 |
| S | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S | S | R | S | S | R | E92 |
| S | S | R | R | R | S | S | R | R | R | R | S | S | R | R | R | E93 |
| S | S | R | R | R | S | S | R | R | R | R | I | S | I | R | R | E94 |
| S | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | S | S | R | R | R | E95 |
| S | R | R | R | R | S | S | R | R | I | R | S | S | I | R | R | E96 |
| S | R | R | R | R | S | S | R | S | R | R | R | S | S | R | R | E97 |
| S | R | R | R | R | R | I | S | R | R | S | R | S | R | R | R | E98 |
| S | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | S | S | R | R | R | E99 |
| S | R | R | R | R | R | S | S | R | R | R | I | S | R | R | R | E100 |

**R: Resistance.**

**I: Intermediate.**

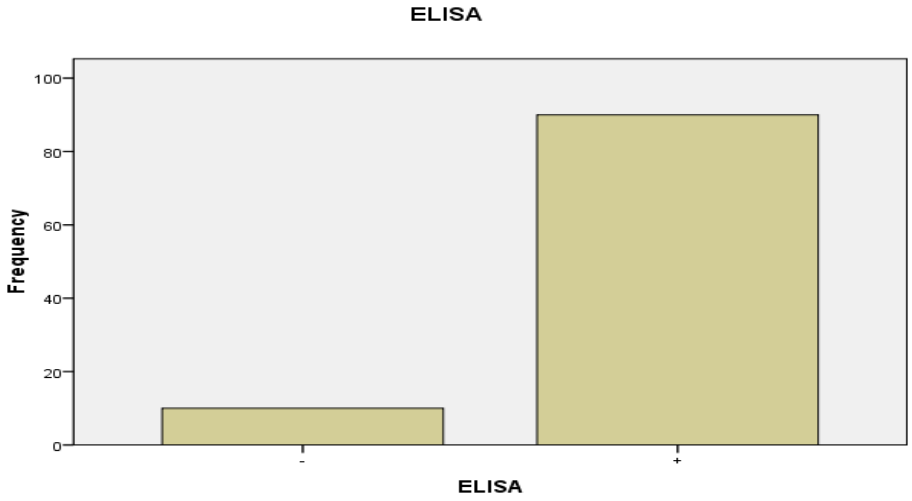
**S: Sensitive.**

## ملحق (5) إنتاج بكتيريا *E.coli* للبكتيريوسين

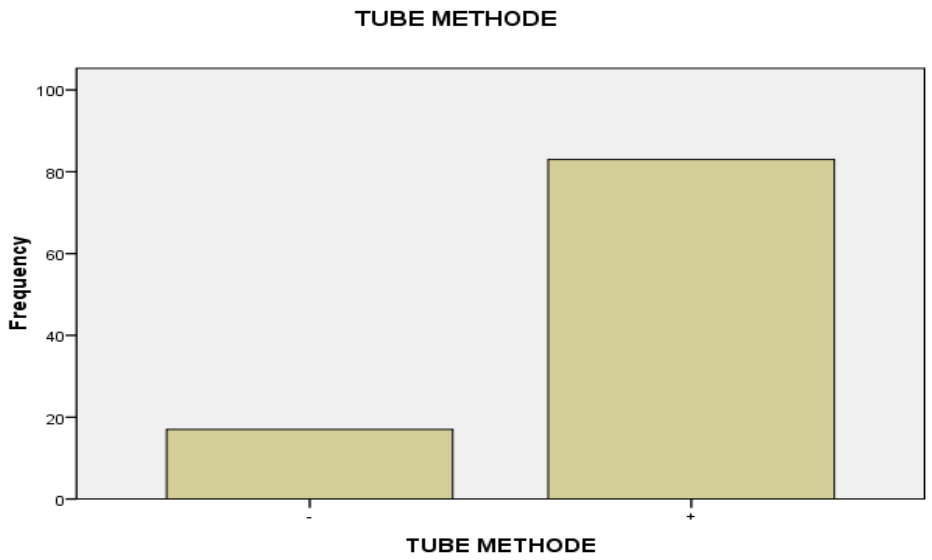



## ملحق (6) إنتاج بكتيريا *E.coli* للغشاء الحيوي بالطرائق الثلاث

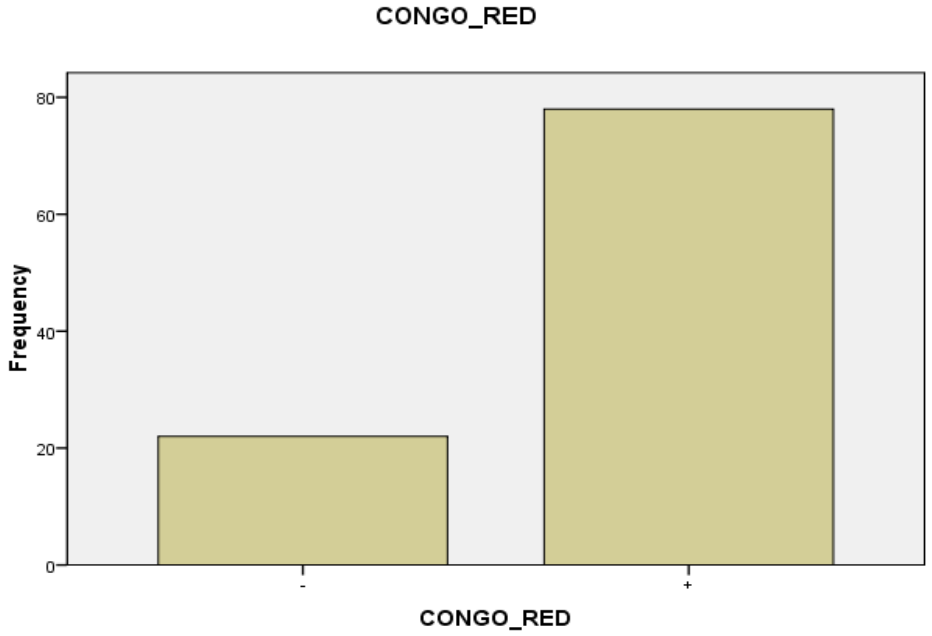
## -1



**-2**


TUBE METHODE
Frequency
100
80
60
40
20
0
-
+
TUBE METHODE

**-3**


CONGO_RED
Frequency
80
60
40
20
0
-
+
CONGO_RED

The study was included 350 samples of Mid-stream urine and which has been obtained 100 isolates of *Escherichia coli* from women with Urinary Tract Infections in Khanaqin General Hospital and Baaquba Teaching Hospital and Al–Batool Hospital in Diyala Province. All samples were collected from 15/10/2013 to 18/2/2014. All bacterial isolates were identified by the biochemical cultural, serological teast and microbial characteristics and confirmed by VITEKA2, API-20E system.

The serological test was performed by slide agglutination test for the urine isolates and 19 of them 19% gave positive results for the polyvalent antisera O26 , O55 , O111 , O119 , O126 .

The results showed the susceptibility 57 bacterial isolates to produce hemolysin with percentage 57%, and production of bacteriocin Form71%.

The production of biofilm by local isolates were detected in three ways, isolates of *Escherichia coli* has shown its ability to produce biofilm by a manner ELISA, adhesion Surface methods, and a Congo – red methods as apercentage 90%, 83%, 78% respectively.

The results showed that 88% from *Escherichia coli* isolates were able to produce β-lactamase enzymes by rapid iodometric method, and 4% of isolates have the ability to produce of the Extendended spectrum β-Lactamase enzyme by using disc Approximation, while 2% of isolates have the ability to produce of Metalo β-lactamase enzymes by using the Imp-EDTA combination dis casmanaged .

The sensitivity of these isolates were tested against (16) antibiotics, the results induct that *E.coli* had resistance to the antibiotics: Augmentin , Aztreonam , Ampicillin , Co−trimoxazole , Chloramphenicol with the rates 100%, 93 %, 92%, 89 % and 86% respectively.

The isolates were more sensitive to Ceftazidime, Gentamycin, Ciprofloxacin, and Cefixime with resistance rate 41%, 38%, 35% and 30% respectively.

The antibiotics Imipenem and Tobramycin were more sensitive with sensitive rate 100% and 80% respectively.

Multiple resistance pattern for antibiotic divided into two groups , first included 69 isolates 69% which were resistant to 6-10 antibiotics, while second included 31 isolates 31% were resistant to11-15antibiotics.