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

دراسة بكتريولوجية لبعض أنواع العائلة المعوية المعزولة من صالات مستشفى الولادة في مدينة بعقوبة

رسالة مقدمة الى

كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الأحياء المجهرية

من قبل

دعاءعدنان كاظم العتبي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى 2010– 2011

بإشراف

أ.د. عدنان نعمة عبدالرضا العزاوي أ.م.د. هادي رحمن رشيد الطائي

1434هـ 2013م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ قُلْ لَوْ كَانَ الْبَحْرُ مِدَادًا لِكَلِمَاتِ رَبِّي لَنَفِدَ الْبَحْرُ قَبْلَ أَنْ تَنْفَدَ كَلِمَاتُ رَبِّي وَلَوْ جِئْنَا بِمِثْلِهِ مَدَدًا ﴾

صَدَقَ اللَّهُ العَظِيمْ

من سورة الكهف

الآية(109)

الإهداء

إلهي لايطيب الليل إلا بشكرك ولايطيب النهار إلا بطاعتك .. ولاتطيب اللحظات إلا بذكرك .. ولا تطيب الآخرة إلا بعفوك .. ولا تطيب الجنة إلا برؤيتك

الله جل جلاله

إلى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة .. ونصح الأمة .. إلى نبي الرحمة ونور العالمين..

سيدنا محمد "صلى الله عليه وسلم"

إلى ملاكي في الحياة .. إلى معنى الحب وإلى معنى الحنان والتفاني .. إلى بسمة الحياة وسر الوجود

إلى من كان دعاؤها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي إلى أغلى الأحبة

أمي الحبيبة

إلى من كلله الله بالهيبة والوقار .. إلى من علمني العطاء بدون انتظار .. إلى من أحمل اسمه بكل افتخار .. أرجو من الله أن يمد في عمرك لترى ثماراً قد حان قطافها بعد طول انتظار وستبقى كلماتك نجوماً أهتدي بها اليوم وفي الغد وإلى الأبد..

والدي العزيز

الى... من هو أغلى علي من نفسي

من كان عونا لي في شدتي

تاج رأسي ونبراس دربي ...

زوجي ألغالي

الى من أشد بهم أزري

إخوتي وأخواتي

الى شمس العلم المضيئة على مر الزمان ..

أساتذتي

الى كل قلب خفق حباً ووفاءً لي ... أهدي ثمرة جهدي وفاءً وعرفاناً بالجميل

دعاء

إقرار المشرفين على الرسالة

نشهد أنّ إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافنا 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. عدنان نعمة عبدالرضا العزاوي
اللقب العلمي : أستاذ
كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى
التاريخ : / / 2013

التوقيع :
المشرف : د.هادي رحمن رشيد الطائي
اللقب العلمي : أستاذ مساعد
كلية العلوم / جامعة ديالى
التاريخ : / / 2013

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :
الأسم : د. نجم عبدالله الزبيدي
اللقب العلمي : أستاذ مساعد
رئيس لجنة الدراسات العليا – رئيس قسم علوم الحياة
التاريخ : / / 2013

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (**دراسة بكتريولوجية مقارنة لبعض أجناس العائلة المعوية المعزولة من صالات الولادة في بعض مستشفيات مدينة بعقوبة**) التي قدمتها طالبة الماجستير(دعاء عدنان كاظم العتبي) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الأسم:

التأريخ:

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار الخبير اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ **(دراسة بكتريولوجية مقارنة لبعض أجناس العائلة المعوية المعزولة من صالات الولادة في بعض مستشفيات مدينة بعقوبة)** التي قدمتها طالبة الماجستير **(دعاء عدنان كاظم العتبي)** 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 ألتعبير.

التوقيع:

الأسم:

التأريخ:

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة ,نشهد أننا قد اطلعنا على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية بدرجة (أمتياز) .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الأسم : د.عباس عبود فرحان

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2013

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم : د.حميد مجيد جاسم

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2013

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم : د.منعم رضوان علي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2013

عضو اللجنة المشرف

التوقيع :

الأسم : د.عدنان نعمة عبدالرضا العزاوي

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2013

عضو اللجنة المشرف

التوقيع :

الأسم : د.هادي رحمن رشيد الطائي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2013

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع :

الأسم : د. عباس عبود فرحان

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2013

المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
الفصل الاول : المقدمة		
1	**المقدمة**	**1**
الفصل الثاني : استعراض المراجع		
2	**استعراض المراجع**	**3**
1.2	العائلة المعوية Enterobacteriaceae	**3**
2.2	بكتيريا أيشيريكيا القولون *Escherichia coli*	**3**
1.2.2	الوبائية Epidemiology	**4**
2.2.2	ألامراضية Pathogenicity	**4**
3.2	جنس الكلبسيلا *Klebsiella*	**5**
1.3.2	الوبائية Epidemiology	**5**
2.3.2	ألامراضية Pathogenicity	**6**
4.2	جنس المتقلبات *Proteus*	**7**
1 .4.2	الوبائية Epidemiology	**7**
2 .4.2	ألامراضية Pathogenicity	**8**
5.2	جنس الانتيروباكتر *Enterobacter*	**8**
1.5.2	الوبائية Epidemiology	**9**
2.5.2	ألامراضية Pathogenicity	**9**
6.2	بعض عوامل الضراوة للأجناس والأنواع البكتيرية قيد الدراسة	**10**
1.6.2	إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production	**10**
2.6.2	البكتريوسين Bacteriocin	**11**
3.6.2	إنتاج السايدروفور Siderophore production	**12**
4.6.2	إنتاج اليوريز Urease production	**13**
5.6.2	حركة العج (الإنثيال) Swarming motility	**14**
6.6.2	الغشاء الحيوي Biofilm	**14**

1.6.2	ميكانيكية تكون الغشاءالحيويMechanismof Biofilm Formation	15
1.1.6.2	تكوين الغشاء التكيفي Conditioning Film Formation	16
2.1.6.2	الارتباط Attachment	16
3.1.6.2	تكوين المستعمرات المجهرية ونضج الغشاء الحيوي	17
4.1.6.2	الانفصال Detachment	17
7.2	مصادر التلوث الجرثومي في المستشفيات	18
8.2	المضادات الحيوية Antibiotics	19
1.8.2	مضادات البيتالاكتام β –Lactam antibiotic	19
1.1.8.2	البنسلينات Penicillins	19
2.8.2	السيفالوسبورينات Cephalosporins	20
3.8.2	مجموعة الكربابنيم Carbapenems	21
4.8.2	مجموعة المونوباكتام Monobactams	21
5.8.2	مجموعة المضادات الامينوكلايكوسيدية Aminoglycosides	22
6.8.2	الكوينولونات Quinolones	22
7.8.2	السلفوناميد والتراي مثبريم Sulfonamides & Trimethoprime	22
8.8.2	النيتروفيوانتوين Nitrofuantoin	22
9.2	آليات مقاومة البكتريا لمضادات الحياة	23
10.2	أنزيمات البيتالاكتاميز β–Lactamase enzyme	24
1.10.2	فعالية أنزيمات البيتالاكتاميز	24
2.10.2	انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended Spectrumβ–Lactamases	25
3.10.2	انزيمات البيتالاكتاميزالمعدنية Metallo – β– Lactamase	25
11.2	خلط المضادات Combination of Antibiotics	26
12.2	النسق البلازميدي plasmid profile	27
13.2	تحييد البلازميدات Plasmids Curring	28
الفصل الثالث:المواد وطرائق العمل		
1.2.3	تحضير المحاليل والكواشف	37
1.1.2.3	المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline	37

2.1.2.3	محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland Standard	37
3.1.2.3	محاليل المضادات الحيوية	38
4.1.2.3	محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز	38
1.4.1.2.3	محلول النشأ Starch Solution	38
2.4.1.2.3	محلول اليود Iodine Solution	38
3.4.1.2.3	محلول البنسلين جي (Penicillin G Solution)	39
5.1.2.3	محلول الفورمالديهايد (10%)	39
6.1.2.3	محلول البلور البنفسجي Crystal violet	39
7.1.2.3	محلول صبغة السفرانين Safranin stain	40
8.1.2.3	محلول EDTA	40
9.1.2.3	محاليل عزل الدنا البلازميدي	40
10.1.2.3	محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions	41
2.2.3	ألكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا	41
1.2.2.3	كاشف أنزيم الكاتاليز Catalase Reagent	41
2.2.2.3	كاشف ألاوكسيديز Oxidase reagent	41
3.2.2.3	كاشف كوفاك Kovac`s reagent	42
4.2.2.3	كاشف أحمر المثيل Methyl red reagent	42
5.2.2.3	كاشف فوكس بروسكور Voges–Proskauer reagent	42
3.2.3	الاوساط الزرعية Culture Media	42
1.3.2.3	وسط أكار الدم Blood base agar	43
2.3.2.3	وسط أكار اليوريا Urea base Agar	43
3.3.2.3	وسط ماء الببتون Pepton water medium	43
4.3.2.3	وسط الحركة Motility medium	43
5.3.2.3	وسط الكونكوريد اكار Congo–red agar medium	44
6.3.2.3	وسط إنتاج السايدروفور M_9 المدعم(M_9 minimal medium)	44
7.3.2.3	وسط التربتكيز صويا اكار Trypticase Soy agar (TSA)	45

8.3.2.3	وسط نزع مجموعة الكاربوكسيل من الحامض الاميني اللايسين	45
9.3.2.3	وسط حفظ العزلات	45
10.3.2.3	إدامة العزلات البكتيرية	46
3.3	جمع العينات Collection of Samples	46
4.3	زرع العينات Samples culture	46
5.3	تشخيص العزلات البكتيرية	47
1.5.3	التشخيص المظهري	47
2.5.3	الصفات المجهرية	47
3.5.3	الفحوصات الكيموحيوية	47
4.5.3	تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص Api 20E Kit	50
6.3	التحري عن بعض عوامل الضراوة في البكتريا	50
1.6.3	التحري عن إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production	50
2.6.3	التحري عن إنتاج السايدروفور Sidrophores	50
3.6.3	اختبار إنتاج البكتريوسين Bacteriocin	50
4.6.3	أختيار ظاهرة الأنثيال Swarming	51
5.6.3	اختبار إنتاج أنزيم اليوريز Urease test	51
6.6.3	إختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm	51
7.3	فحص الحساسية للمضادات الحيويةAntibiotic suscepitibility test	53
8.3	التحري عن إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز β–Lactamase Production	54
1.8.3	تحضير العالق البكتيري	54
2.8.3	استخدام طريقة اليود القياسية السريعة Rapid Iodometric	54
3.8.3	التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف(ESBLs)	55
4.8.3	التحري عن قابلية البكتريا لانتاج انزيم الميتالوبيتالاكتميز بأستخدام طريقة اتحادالمضاد الحيوي EDTA – IPM	55
9.3	قياس التركيز المثبط الادنى Minimal – Inhibitory Concentration	56
10.3	خلط المضادات Combination of Antibiotics	57
11.3	إستخلاص الدنا البلازميدي Extraction DNA Plasmid	57

12.3	الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي في هلام الاكاروز	59
13.3	تحييد الدنا البلازميدي Curing of Plasmid DNA	59
14.3	التحليل الاحصائي	60
	الفصل الرابع : النتائج والمناقشة	
1.4	عزل وتشخيص بعض انواع بكتريا العائلة المعوية	61
1.1.4	العزل Isolation	61
1.2.4	التشخيص Identification	62
1. 3.4	توزيع العزلات حسب مصدر العزل	63
2.4	التحري عن بعض عوامل الضراوة المهمة للبكتريا قيد الدراسة	65
1.2.4	إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production	65
2.2.4	الحركة المتموجة (الأنثيال) Swarming	66
3.2.4	إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm production	67
4.2.4	إنتاج أنزيم اليوريز Urease production	71
5.2.4	التحري عن أنتاج السايدروفورات Siderophores	72
6.2.4	إنتاج البكتريوسين Bacteriocin production	74
3.4	التحري عن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز	76
4.4	التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف	77
5.4	التحري عن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميزالمعدنية	80
6.4	إختبار حساسية البكتريا لمضادات الحياة بطريقة الأقراص Bauer–Kirby	81
7.4	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية Multiple Antibiotic Resistance	89
8.4	تحديد التراكيز المثبطة الدنيا (MIC_s) لعدد من المضادات الحيوية	91
9.4	تأثير خلط مضادات الحياة في العزلات قيد الدراسة	95
10.4	النسق البلازميدي Plasmid Profile	106
11.4	تحييد البلازميدات Plasmids curing	107
	الاستنتاجات والتوصيات	
الاستنتاجات		110
التوصيات		111

المصادر		
المصادر العربية		112
المصادر الاجنبية		117

قائمة الأشكال

التسلسل	العنوان	الصفحة
2.4	النسبة المئوية لأنواع البكتيريا المعزولة من اخماج الجروح والمسحات المهبلية.	64
3.4	النسبة المئوية للانواع البكتريا المعزولة من بيئات صالات الولادة.	65
4.4	النسبة المئوية لطرائق التحري عن انتاج الغشاء الحيوي .	68
5.4	طرائق الكشف عن إنتاج الغشاء الحيوي.	69
6.4	النتيجة السالبة والموجبة لاختبار إنتاج انزيم اليوريز .	72
7.4	أختبار التحري عن إنتاج انزيمات البيتالاكتاميز .	77
8.4	اختبار التحري عن إنتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف.	79
9.4	النسبة المئوية لمقاومة العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية المختلفة.	89
10.4	النسب المئوية للتأثير التأزري المتزايد عند خلط مضادCiprofloxacin مع Cefotaxime مع اختلاف النسب المستخدمة في عملية الخلط .	104
11.4	النسب المئوية للتأثير التأزري المتزايد عند خلط **مضاد** مضاد Streptomycin مع Cefotaxime مع اختلاف النسب المستخدمة في عملية الخلط .	104
12.4	الترحيل الكهربائي للعينات قبل وبعد التحيد بمادة الاكردين البرتقالي .	109

قائمة الجداول

التسلسل	العنوان	الصفحة
1.1.3	الاجهزة والمواد المستعملة	30
2.1.3	المواد الكيميائية والبايولوجية	31
3.1.3	الاوساط الزرعية ألمستخدمة	34
4.1.3	ألصبغات المستخدمة	35
1.5.1.3	اقراص المضادات الحيوية المستخدمة واقطار منطقة التثبيط القياسية	35
2.5.1.3	مساحيق المضادات الحيوية	36
1.4	النسبة المئوية للعزلات الموجبة التابعة للعائلة المعوية والمعزولة من مصادر سريرية وبيئية مختلفة.	61
3.4	أعداد ونسب العزلات المنتجة للهيمولايسين .	66
4.4	قابلية العزلات على انتاج الغشاء الحيوي والنسب المئوية لكل نوع بكتيري .	70
5.4	أعداد ونسب العزلات المنتجة لأنزيم اليوريز.	72
6.4	أعداد ونسب العزلات المنتجة للسايدروفور.	73
7.4	قابليةعزلات البكترياعلى إنتاج البكتريوسين.	75
8.4	أعداد ونسب العزلات المنتجة لانزيم البيتالاكتاميز .	77
9.4	أعداد ونسب العزلات المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف .	79
10.4	أعداد ونسب العزلات المنتجة لانزيمات الميتالوبيتالاكتاميز المعدنية.	81
11.4	يوضح النسب المئوية لحساسية العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية المختلفة.	86
12.4	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية للعزلات قيد الدراسة .	90
13.4	تقسيم العزلات المحلية للبكتريا قيد الدراسة الى مجموعتين على أساس عددالمضادات التي قاومتها.	91
14.4	قيم التراكيز المثبطة الدنيا لبعض المضادات الحيوية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة.	93
15.4	تأثير خلط مضادCiprofloxacin مع Cefotaxime بنسبة (1:0.5) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.	96
16.4	تأثير خلط مضادCiprofloxacin مع Cefotaxime بنسبة (1:1) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.	97
17.4	تأثير خلط مضادCiprofloxacin مع Cefotaxime بنسبة (1:2) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.	98

18.4	تأثير خلط مضادCiprofloxacin مع Cefotaxime بنسبة (1:3) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.	**99**
19.4	تأثير خلط مضاد Streptomycin مع Cefotaxime بنسبة (1:0.5) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.	**100**
20.4	تأثير خلط مضاد Streptomycin مع Cefotaxime بنسبة (1:1) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.	**101**
21.4	تأثير خلط مضاد Streptomycin مع Cefotaxime بنسبة (1:2) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.	**102**
22.4	تأثير خلط مضاد Streptomycin مع Cefotaxime بنسبة (1:3) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.	**103**
23.4	حساسية العزلات لمضادات الحياة المختلفة قبل وبعد التحيد .	**108**

قائمة ألمختصرات ألواردة في ألرسالة

Abbreviation	Key
API	Analytical Profile Index
β-Lactamase	Beta Lactamase
BV	Bacterial vaginosis
CRA	*Congo_Red Agar*
DNA	Deoxy Ribo Nucleic acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ELISA	*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
EPS	Exopolymeric substances
ESBLs	Extended Spectrum β – Lactamases
FIC	Fraction Inhibitory Concentration
KIA	Kligler's Iron Agar
LPS	*Lipopolysaccharid*
MIC	Minimal Inhibitory Concentraion
MTP	*Microtiter Plate*
NCCLs	National Committee for Clinical Laboratory Standard
PBPs	Penicillin – Binding Protiens
PCR	Polymerase Chain Reaction
P.mirabilis	*Proteus mirabilis*
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SHV	*Sulfohydro variable*
TBE	Tris-Boric acid-EDTA
TEM	*Temonera*
UTI	Urinary Tract Infection
WHO	World Health Organization
YV	*Yeast vaginitis*

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف المرسلين سيدنا محمد وعلى آله وصحبه أجمعين . وبعد ..

يسعدني ويشرفني وأنا أنهي كتابة رسالتي أن أتقدم بخالص شكري وتقديري وعرفاني بالجميل الى أستاذيّ الفاضلين الدكتور عدنان نعمة عبدالرضا العزاوي، والدكتور هادي رحمن رشيد الطائي لآقتراحهما موضوع البحث ومتابعتهما المتواصلة وتوجيهاتهما السديدة لي طوال مدة البحث داعيةً الله أن يوفقهما لما يحبه ويرضاه .

كما أتقدم بوافر شكري وتقديري الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة المتمثلة بالأستاذ الدكتور عباس عبود فرحان ورئاسة قسم علوم الحياة ومنتسبيه ، وأخص بالذكر الدكتور نجم عبد الله الزبيدي, و م.م إنتصار مهدي , وم.م أسماء حسيب , وم.م آفاق رشيد سلمان لماقدموه لي من العون والمساعدة.

كما أتوجه بوافر الشكر والأمتنان الى عمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة ومنتسبيه، وأخص بالذكر م.عصام حامد , و م.م إيمان عباس علي , لما قدموه من دعم وإسناد.

وأتوجه بشكري وتقديري الى مدير مختبر الصحة المركزي في بعقوبة السيد هادي علي حمودي و منتسبي مختبر الصحة المركزي كافة وأخص بالذكر الدكتور داوود سلمان والبكتريولوجي رامي حميد, والكيمياوية فاتن مهدي غائب كما يدعوني الوفاء أن أشكرمنتسبي شعبة البكتريولوجي /مستشفى بعقوبة العام وأخص بالذكر السيدة ثريا كاظم، والسيدة الاء محمد محمود ومنتسبي ردهة صالات النسائية والتوليد كافة ومختبرات مستشفى البتول لما قدموه لي من العون والمساعدة وتعاونهم معي.

ولايفوتني ان أشكر زميلاتي وزملائي طلبة الدراسات العليا, وأخص بالذكر الطالبة /انوار علي كاظم داعيةً الله لهم بدوام النجاح والموفقية.

كما اقدم شكري العميق الى عائلتي داعيةً من الباري (عزوجل) أن يمنَ عليهم بالصحة والعافية وأخيراً اتقدم بخالص شكري وإمتناني الى كل من مدّ يد العون لي ولو بكلمة أشعلت في طريقي نور الأمل لإتمام هذه الرسالة,والتمس العذر ممن فاتني أن أشكرهم ,جزاهم الله عني خير الجزاء.

دعاء

الخلاصة

شملت الدراسة 300 مسحة جمعت من صالات الولادة ومن مصادر سريرية وبيئية متنوعة تضمنت 100عينة من مسحات المهبل ، و 75 عينة من مسحات جروح العمليات ، 80 عينة من مسحات بيئة المستشفى ، و 45 عينة من العاملين ,من مستشفى البتول للولادة والاطفال للفترة من 2012/8/27 الى1 /2012/12.

أظهرت نتائج الزرع البكتيري على أوساط أكار الماكونكي وأكار الدم ووسط المثيلين الازرق والتشخيص المظهري والفحوصات الكيموحيوية وتأكيد التشخيص باستخدام نظام api 20E أن 40 عزلة تعود لبكتريا العائلة المعويةEnterobacteriaceae وبواقع 15 عزلة (37.5%) *Escherichia coli* , 10 عزلات (25%) *Enterobacter cloacae*, 9 عزلة (22.5%) *Proteus mirabilis* ، 6 عزلات (15%) *Klebsiella pneumoniae* .

أوضحت نتائج التحري عن بعض عوامل الضراوة للعزلات ومنها قابليتها على إنتاج الهيمولايسين ,حيث كانت عزلات *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* منتجة لهذا الانزيم بنسبة (46.7%),(88.89%) على التوالي,في حين لم تظهر عزلات *Klebsiella pneumoniae* و *Enterobacter cloacae* قدرتها على انتاج هذا الانزيم.
تم الكشف عن قابلية البكتيريا على إنتاج الغشاء الحيوي بثلاث طرائق فقد أظهرت عزلات *Escherichia coli* قدرتها على انتاج الغشاء الحيوي بنسبة (93.33%) بطريقة الاليزا و (86.66%) بطريقتي احمر الكونغو والالتصاق بالسطوح اما *Enterobacter cloacae* فقد كانت منتجة للغشاء الحيوي بنسبة (90%) بطريقتي احمرالكونغو والاليزا و(80%) بطريقة الالتصاق بالسطوح,أماعزلات *Proteus mirabilis* فأنتجت بنسبة(66.66%)بطريقة احمرالكونغو و(77.77%) بطريقة الالتصاق بالسطوح و(88.88%) بطريقةالاليزا , في حين اظهرت عزلات *Klebsiella pneumoniae* قابلية انتاج بنسبة(100%) بطريقتي احمر الكونغو والاليزا وبنسبة (83.33%) بطريقة الالتصاق بالسطوح.

تم الكشف عن قابلية العزلات على إنتاج أنزيم اليوريز إذ كانت عزلات *Klebsiella pneumoniae* , *Proteus mirabilis* منتجة بنسبة (100%) بينما اظهرت النتائج أن عزلات *Escherichia coli* و *Enterobacter cloacae* غير قادرة على إنتاج هذا الانزيم.

أظهرت عزلات *Proteus mirabilis* قابليتها على إحداث الانثيال Swarming وبنسبة(100%).

درست قابلية العزلات على إنتاج السايدروفور إذ كانت عزلات *Klebsiella pneumonia* و *Enterobacter cloacae* بنسبة (100%) بينما اظهرت عزلات *Escherichia coli* قدرتها على انتاج السايدروفور بنسبة (53.3%) , و*Proteus mirabilis* بنسبة (11.11%).

أظهرت نتائج إنتاج البكتريوسين أن عزلات *Escherichia coli* منتجة بنسبة (73.3%) و *Enterobacter cloacae* بنسبة (70%) و*Proteus .mirabilis* بنسبة (66.66%) و *Klebsiella pneumoniae* بنسبة (50%).

أما بخصوص إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز فقد أظهرت كل من *Escherichia coli* و *Enterobacter cloacae* و*Proteus mirabilis* و*Klebsiella pneumoniae* نسب إنتاج (73.33%) , (60%),(55.55%),(50%)على التوالي. كما أظهرت قابلية العزلات على إنتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بأستخدام طريقة الاقراص المتاخمة Disc (Approximation) فقد أعطت كل من و*Enterobacter cloacae* و *Proteus mirabilis* و *Klebsiella pneumoniae* نسب انتاج (6.66%) ,(10 %), (22.22%),(16.66%) على التوالي.

كما تم آختبار قابليتها على إنتاج أنزيمات البيتالاكتميز المعدنية Metallo β-Lactamase وباستخدام طريقة IMP-EDTA combination disc فقد أعطت كل من *Enterobacter cloacae*و *Klebsiella pneumoniae* نسب إنتاج (10%),(33.33%)على توالي في حين لم تظهر عزلات *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* قدرتها على انتاج هذه الانزيمات.

أظهرت العزلات البكتيرية تفاوتاً في نسب مقاومتها للمضادات قيد الدراسة ,إذ أظهرت عزلات *Escherichia coli* اعلى مقاومة وبنسبة 93.3% لمضاد Piperacilline وعزلات *Enterobacter cloacae* اعلى مقاومة وبنسبة 90% لمضادي Cefixime و Tobramycin, وعزلات *Proteus mirabilis*اعلى مقاومة وبنسبة 100% لمضاد Ampicillin ,بينما أظهرت عزلات *Klebsiella pneumoniae* اعلى مقاومة لمضادي Ampicillin و Cefixime وبنسبة 83.33%, وأظهرت النتائج ان المضاد الحيوي

Imipenem هو الاكثر تاثيراً على العزلات البكتيرية قيد الدراسه وبنسبة (100%)، فيما اظهرت العزلات البكترية مقاومة متباينة لباقي المضادات الحيوية.

في حين أظهرت37 عزلة وبنسبة (92.5 %) نمط المقاومة المتعددة , وقسمت العزلات الى مجموعتين إعتماداً على مقاومتها للمضادات الحيوية ضمت المجموعة الاولى (13) عزلة مقاومة لـ (6-2) مضاد بينما المجموعة الثانية فقد ضمت (24) عزلة مقاومة لـ (11-7) مضاداً ، وأشارت النتائج إلى أن المجموعة الثانية هي السائدة .

وحُدد التركيز المثبط الادنى (MIC) لـ 5 من مضادات الحياة وهي Amoxicillin و Cefotaxime و Ciprofloxacin و Streptomycin و Nalidixic acid وقد تراوحت هذه القيم للمضادات مابين (64- 1024<) , (32- 1024<),(2- 1024) , (128- 1024),(8- 1024<) مكغم/ مل على التوالي.

أظهرت نتائج خلط المضادين Ciprofloxacin و Streptomycin مع Cefotaxime حدوث انخفاض كبير في مديات MIC للمضادات بعد عملية الخلط مما هي عليه في حالة استعمال كل مضاد وحده. كما وأظهرت النتائج ان نسبة الخلط (1:3) تعدّ الافضل بين النسب الاخرى حيث بينت جميع العزلات قيد الدراسة تأثيرا تأزريا ل(26) عزلة من مجموع (27)عزلة قيد الدراسة وبنسبة (96.29%) عند خلط مضاد Streptomycin مع Cefotaxime وأظهرت (22)عزلة من مجموع (27) عزلة وبنسبة (81.48%)عند خلط مضاد Ciprofloxacin مع Cefotaxime.

بينت نتائج المحتوى البلازميدي للعزلات 21*Escherichia coli* و 1 *Enterobacter cloacae* و 17*Klebsiella pneumoniae* على حزمتين بلازميديتين إحداهما كبيرة والأخرى صغيرة,اما15 *Proteus mirabilis* احتوت على حزمة بلازميدية كبيرة وحزمتين بلازميديتين صغيرتين ايضا.

أوضحت نتائج تحييد الدنا البلازميدي أن ال Acridin orange نجحت في التحييد عند التركيز 64 مايكروغرام/مل لل 21*Escherichia coli*, و1024مايكروغرام/مل ل1 *Enterobacter cloacae* و2500 مكغم/مل لعزلات 17*Klebsiella pneumoniae* و15 *Proteus mirabilis*.

أظهرت جميع العزلات المحيدة مقاومتها لمضادي Co-Trimoxazol, Ciprofloxacin . في حين فقدت هذه العزلات مقاومتها للمضادات Augmentin, Amikacin , Ampicillin , Cefotaxime , Gentamycin.ماعداعزلة17 *Klebsiella pneumoniae* لم تفقد مقاومتها لمضاد Augmentin.

المقدمة

Introduction

استعراض المراجع

Literature Review

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods

النتائج و المناقشة

Results& Discussion

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions

&

Recommendations

المصادر

References

الملاحق

Appendix

المقدمة

1. المقدمـــة Introduction:

يعدّ تلوث صالات العمليات الجراحية احد اهم المصادر المهددة لحياة المرضى الراقدين في المستشفيات.حيث إنّ الالتهابات بعد العملية الجراحية عادة ماتكون مكتسبة بعد الجراحة وهذه الالتهابات أو الإصابات تتغير، أو تتنوع فعلياً، بوساطة المستشفى أو العاملين بها كالمضمد والممارس أو الجراح، وهؤلاء جميعاً يمكن أن يؤثروا بشكل كبير في حدوث أو بروز هذه الالتهابات إذ إنهم على احتكاك مباشر مع المصاب الراقد في المستشفى(Zangana,2004) .

تضم العائلة المعوية أعداداً كبيرة من اجناس بكتيرية ذات صفات مشتركة منها السالبة لملون غرام،وعصوية الشكل،وهوائية او لاهوائية أختيارية,وتعد أمعاء الإنسان والحيوان الموطن الطبيعي لها (Brooks *et al.*,2007) .

تمتلك بكتريا العائلة المعوية العديد من عوامل الضراوة التي تعد السبب الرئيس في إحداث الإصابات ومن أهمها الهيمولايسين واليوريز وكذلك البكتريوسينات وهي مواد ذوات طبيعة بروتينيه وتمتلك فعالية ضد مايكروبية قاتلة أو مثبطة لنمو الأنواع المختلفة قريبة الصلة للكائن المنتج (Al-Charrakh *etal* .,2011).

تعدّ أجناس بكتريا العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) ذات قابلية كبيرة على تكوين الأغشية الحيوية لامتلاكها العديد من العوامل التي تمكنها من تكوين الأغشية، مثل احتوائها على وسائل الحركة وانتاجها للسيليلوز اللذين يلعبان دورا هاماً في التصاق الخلايا بالسطوح غير الحية والتفاعلات بين الخلايا (Solano *et al.*, 2002),وهذه الاغشية هي مجتمعات بكتيرية مرتبطة بالأسطح إذ تتواجد داخل قالب من بوليمرات خارج خلوية و تبدي أنماطًا مظهرية متغايرة للنمو والتعبير الجيني وإنتاج البروتين، ويمكن أن تؤدي إلى عواقب طبية واقتصادية(Mariana *et al* ,2009).

تحصل العديد من أجناس البكتريا المعوية على الحديد المرتبط ببروتينات المضيف من خلال صنع حاملات الحديد وافرازها Siderophores التي هي مركبات عضوية واطئة الوزن الجزيئي عالية الإلفة للارتباط بالحديد اذ تتنافس مع خلايا المضيف لجذب الحديد من بروتينات المضيف (ClarKe *etal*., 2001).

أشارت العديد من الدراسات الى ظهور سلالات مقاومة من البكتريا المعوية لأكثر من مضاد حياتي ، والتي تعد مشكلة من الناحية الطبية لصعوبة السيطرة على الامراض نتيجة عدم اختيار العلاج المناسب والاستخدام المتزايد والعشوائي لمضادات الحياة (العبيدي,2006) .

أشار العديد من الباحثين من خلال الدراسات التي أجريت في علاج الالتهابات البكتيرية بآنّ استخدام عملية خلط المضادات تعتبر مهمة في الحصول على التاثير التأزري إذ تعمل على زيادة فعالية المضاد وتقليل سميته وسرعة العلاج ومنع ظهور المقاومة وتوفر طيف فعالية افضل للمضاد مما لواستخدم لوحده (Olajuyigbe and Afolayan,2012;AdiKwu *etal*,2010) .

لذلك جاءت هذه الدراسة لتهدف الى تحديد الأنواع البكتيرية المعوية المتواجدة في صالات الولادة في مستشفى البتول جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على ما يأتي :

1. عزل وتشخيص الانواع البكتيرية المعوية الأكثر شيوعا في صالات الولادة لمستشفى البتول .
2. إجراء دراسة مقارنة بين عوامل الضراوة للأنواع البكتيرية المعوية المختلفة .
3. دراسة حساسية العزلات المرضية للمضادات الحيوية الحديثة المختلفة وتأثير التوليفات الدوائية المختلفة على استجابة البكتريا للمضادات الحيوية .
4. تحديد صفة المقاومة للمضادات الحيوية بلازميدية كانت أم كروموسومية.
5. تحييد الانواع البكتيرية المعوية بمادة الاكردين البرتقالي .

استعراض المراجع

1-2 العائلة المعوية Enterobacteriaceae :

تتصف البكتريا العائدة إلى هذه العائلة بكونها عصيات سالبة لملون غرام متحركة بوساطة أسواط محيطية أو غير متحركة ، غير مكونة للابواغ، تنمو في الأوساط الزرعية الاعتيادية، جميعها تخمر سكر الكلوكوز مع أو بدون إنتاج الغاز، هوائية ولاهوائية اختيارية ، العديد منها ممرضات معوية (Intestinalpathoge) أو قد تكون تعايشية (Commensals)، في حين تكون القلة منها رمية (Saprophytic)، كما تتوافر في التربة والماء (Baron and Finegold, 1994) وتحتوي على تراكيب مستضدية معقدة وتنتج أنواعاً مختلفة من السموم وعوامل الضراوة (Brooks *et al.*,2007).وتضم العديد من الاجناس ومن أهمها:

2-2 بكتيريا أيشيريكيا القولون *Escherichia coli* :

وصفت هذه البكتيريا لأول مرة من قبل العالم Theoder Echerich عام 1885 في ألمانيا وسميت آنذاك Bacterium coli وهي معروفة الآن بآسم *Echerichia coli*,إذ عزلت من براز أطفال أصحاء لذا عدت غير مرضية آنذاك Non pathogenic(Cookes, 1985) . تمتاز هذه البكتيريا بكونها عصيات صغيرة الحجم(0.5–1.3 مايكرون) سالبة لملون غرام ، تتحرك بوساطة أسواط محيطية ،وقد تمتلك بعض سلالاتها محفظة ، غير مكونة للابواغ ،هوائية او لاهوائية اختيارية ولها درجة حرارة نمو مثلى هي37م° لكنها تستطيع النمو في مديات حرارية واسعة بين 15– 45م°(Jawetz *etal,* 2004), تخمر اللاكتوز مع انتاج غاز خلال 48ساعة وعند حرارة 35م° ,موجبة لاختبار الاندول والمثيل الاحمر تنمو على الاوساط الزرعية التفريقية وسط(EMB) Eosin methyline blue تعطي بريقاً معدنياً لماعاً يسمى metallic sheen (الجلبي,2008).تتوافر هذه البكتريا بصورة تعايشية في امعاءالانسان ولكن عندما تدخل موقعاً غير طبيعي يمكن ان تسبب العديد من الامراض كالتهاب المجاري البولية والسحايا وتصيب الانسجة الرخوة لذلك تعد من البكتريا الانتهازية (Sharma *etal* ,2007).

1-2-2 الوبائية Epidemiology:

تنشأ البكتيريا المعوية في القناة الهضمية بصورة طبيعية بعد أيام قليلة من الولادة مؤلفة النبيت الطبيعي(Normal flora) في الأمعاء وتعد أيشريكيا القولون الجزء الرئيس منها .بعض سلالاتها لها القابليةعلى أن تصبح آنتهازية وتسبب أمراضاً مختلفة عند مغادرتهاالموضع الأصلي (الأمعاء) ووصولها الى أعضاء أخرى مثل القناة البولية وقناة الصفراء أو أي عضو في التجويف البطني وخاصة عند توافر الظروف المناسبة مثل ضعف المناعة (Bischoff *et al*., 2002) لذلك تعد من المشاكل الرئيسيه في إصابات المستشفيات فهي تسبب المرض عند دخولها الى أشخاص في دور النقاهة (Jawetz *et al*., 2004)،وخاصة الأشخاص الذين يعانون من ضعف المناعة وسوء التغذية وهذه تكثر في وحدات العناية المركزة لخصوصية الأمراض التي يعانون منها مما يضطرهم الى أخذ كمية كبيرة من المضادات مؤدية الى نشوء بكتيريا مقاومة للمضادات الحيوية (Deep *etal*., 2004) . تتوافر هذه الجراثيم بصورة طبيعية في أمعاء الإنسان والحيوان وتعد أكثر أفراد العائلة المعوية أهمية فهي جراثيم انتهازية لهاالقدرة على إحداث العديد من الإصابات مثل التهاب المعدة والأمعاء (Gastroenteritis) الذي يصيب الأطفال الرضع والتهاب الغشاء المساريقي (Peritonitis) والتهاب القناة الصفراوية (Cholecystitis)(الحائك،2004).

2-2-2 ألامراضية Pathogenicity

إن سبب امراضية جرثومة الاشيريكية القولونية يعود الى امتلاكها للعديد من عوامل الامراضية,منها احتواء الجدار الخلوي على السكريات المتعددة الدهنية Lipopolysaccarides أو المحفظة وتسمى أيضاً بالمستضد (K) او (B) التي تكون غير ثابتة بالحرارة Heat labile ، ويتداخل هذا المستضد مع مستضد آخر هو المستضد الجسمي (O) والذي يكون ثابتا بالحرارة Thermostable ، كذلك تمتلك هذه الجرثومة المخامل او الاهداب (pili or fimbriae)(Virella, 1997) او المستضد (F) الذي يكون غير ثابتا بالحرارة . هذا إلى جانب احتواء هذه الجرثومة على الاسواط المحيطية peritrichous flagellae او المستضد (H) وهذه الاخيرة هي المسؤولة عن عملية الالتصاق Adherence , وتكون من النوع غير الثابت بالحرارة ، وهذه التراكيب الاخيرة هي المسؤولة عن الامراضية واحداث الاصابة

بهذه الجرثومة (Todar,2002). تزيد نسبة اصابة النساء بالتهاب المسالك البولية عن الرجال بهذا النوع البكتيري (Todar, K., 2007).تعد بكتريا *E.coli* واحدة من اكثر الاسباب شيوعا للامراض والوفيات في الاطفال الذين يعانون من الاسهال في جميع انحاء العالم خصوصا في الدول المتقدمة (Enayat *etal* ,2011) , فقد تلتصق الممرضات المعوية في النسيج الطلائي أو تغرزه أو ربما تنتج سموماً خارجية، هذا وإن الالتصاق بالخلايا الطلائية لبطانة القناة الهضمية هي صفة تشفر لها بجينات تتموضع على البلازميدات، فضلا عن السموم وعندما تكون دفاعات المضيف غير كافية فإن بكتريا *E.coli* تصل إلى مجرى الدم وتسبب التسمم الدموي، كما تعد بكتريا *E.coli* والمكورات المسبحية من المجموعة B من المسببات الرئيسة لآلتهاب السحايا عند الأطفال (Al-Gosha'ah .,2005).

2-3جنس الكلبسيلا *Klebsiella* :

عرفت بكتريا الكلبسيلا بانها ممرض رئوي منذ اكثر من 120 سنة ماضية ، اذ شخصت هذه البكتريا لاول مرة من قبل العالم Friedlander عام 1882 ومنها جاءت تسميتها بعصيات فريد لاندر Friedlander Bacilli، وكانت تعد المسبب الشائع لذات الرئة البكتيري انذاك(Ko*etal*.,2002).تتميز هذه البكتريا بخلاياها العصوية المحاطة بالمحفظة (capsule) وقد تظهر بشكل ثنائيات سالبة لملون غرام وتتراوح أقطارها بين 0.3-1 مايكروميتر وأطوالها 0.6-6 مايكروميتر (Talaro,2002) وتكون هذه البكتريا غير متحركة ولاهوائيةاختيارية (Facultatively anaerobic) مخمرة لسكر الكلوكوز و تنتج غاز CO2 (Don *etal* ,2005). ،وتمتازهذه البكتريا بأنها غير محللة الدم ولا تنتج غاز H2S وتظهر مستعمراتها كبيرة ملساء مخاطية وردية اللون على وسط الماكونكي الصلب كذلك إن قسماً منها له القدرة على استهلاك اليوريا (Sharmeen *et al*.,2012) .

1-3-2 الوبائية Epidemiology:

تنتشر هذه البكتريا بشكل واسع في الطبيعة , فهي تمتلك نوعين من المواطن الشائعة (common habitats),الموطن الأول يمثل البيئة إذ تتوافر في المياه السطحية والمجاري والتربة وعلى سطوح الفواكه والحبوب والخضراوات والموطن الآخر هو بيئات المستشفيات

والسطوح المخاطية في اللبائن ، وتعد الأمعاء أهم الأماكن لوجود هذه البكتريا بشكل طبيعي (Vincent ,2004) . تمتاز بكتريا *Klebsiella* بقدرتها على الاستيطان في أماكن مختلفة من الجسم ولاسيما القناة المعوية المعدية، لذلك برز دورها في إحداث الإصابة المكتسبة في المستشفيات باعتبار المرضى والعاملين في المستشفى المستودع الرئيس لهذه البكتريا.

وتشكل بكتريا *Klebsiella* 22% من الإصابات السريرية المختلفة وتعد من بين أهم ثمانية أنواع مرضية في المستشفيات (Sahly *etal* .,2008).أدى الاستعمال الواسع لمضادات حيوية واسعة الطيف بصورة غير منتظمة إلى ظهور سلالات من بكتريا *Klebsiella* تملك مقاومة متعدد للمضادات ،وقد يكون احد الأسباب هو إنتاجها إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (Rajeshwari *etal* .,2010).

2-3-2 الامراضية Pathogenicity:

تعد بكتريا *Klebsiella* من الممرضات الانتهازية (Opportunistic pathogens) وهذه الخاصية متعلقة بامتلاكها محفظة مقاومة لعملية البلعمة (Antiphagocytosis capsule) (Umhe *et al* .,2006).تسبب بكتريا *Klebsiella* مجموعة من الإمراض المكتسبة في المستشفيات (Nosocomial infection) مثل التهاب القناة البولية والقناة التنفسية وجروح العمليات(surgical wound) والسحايا (Mengitis) وتسبب هذه البكتريا إصابة الإذن الوسطى وكذلك تسبب إصابة الأغشية المخاطية الطرية فضلا عن إصابة الرئتين والسحايا (Kumar andTalwar ,2010),كما تسبب الإصابة بتجرثم الدم (Bacteremia) (Brisse *etal* .,2009) .

تسبب أيضاً خُراج الكبد القيحي Pyogenic Liver abscesses، وأن 60-80% من عزلات *K.pneumoniae* المسببة لهذا المرض تحتوي على كبسول من نوع K1 capsular type وأن من10-14% منها تحتوي على K2 capsular type(Hsieh*et al.*,2012).تعد بكتريا *Klebsiella pneumoniae* أكثر أنواع جنس *Klebsiella* أهمية من الناحية الطبية, إذ يكثر وجودها في فضلات الإنسان والتربة وعلى النباتات ،وقد أشار كل من((2010) . Rajeshwari *et al*) إلى أن النوع *Klebsiella pneumoniae* يمتلك

صفة المقاومة المتعددة لمضادات الحيوية ولهذه الصفة دور كبير في حدوث الإصابات المكتسبة وانتشارها في المستشفيات، وتعد بكتريا *Klebsiella pneumoniae* من الممرضات الانتهازية إذ ترافق الأشخاص الذين يعانون من مرض الكبح المناعي وكذلك الذين يعانون من مختلف إصابات التهاب المجاري البولية.

2-4 جنس المتقلبات *Proteus* :

يعد العالم Hauser أول مكتشف لبكتريا المتقلبات *Proteus* وذلك عام 1885 م عندما عزلها أول مرة من البراز ومياه المجاري والمواد العضوية المتحللة وأطلق عليها تسمية المتقلبات لامتلاكها ظاهرة تعدد الأشكال (Pleomorphism) (O'hara *etal.,* 2000).

جنس المتقلبات *Proteus* عصيات قصيرة سالبة لملون غرام ذات طول(1-3) مايكرون وعرضاً من(0.8-4) مايكرون (Toth and Emody 2000), يمتاز بظاهرة تعدد الأشكال إذ إنها تظهر بأشكال مختلفة منها عصيات كروية قصيرة وعادة تكون غير متحركة أو بشكل خيطي طويل يمتاز بحركة نشطة وتمتلك بكتريا المتقلبات *Proteus* أسواطا" محيطية (Peritrichous flagella) تساعدها على الحركة بسرعة وتظهر الحركة بصورة واضحة على سطح الأوساط الزرعية الصلبة وبشكل دوائر متحدة المركز وهذه الحركة تكون بشكل أمواج وهو ما يعرف بظاهرة الأنثيال (Swarming) الشبيهة بالسباحة (Liaw *et al.*,2003) .

2-4-1 الوبائية Epidemiology:

تشكل البكتريا المشكلة الرئيسة في اصابات المستشفى بوصفها انتهازية عند ضعيفي المناعة والاشخاص في دور النقاهة (Jawetz,2004) . تنتقل هذه البكتريا عن طريق تناول الطعام الملوث بها وكذلك عند تلوث الادوات المستعملة في ردهات العمليات وردهات العناية المركزة وردهة الخدج وخاصةً عند تلوث منطقة الحبل السري نتيجة استعمال ادوات ملوثة في قص الحبل السري مما يؤدي الى التهاب السحايا ومن ثم الموت (Krieg and Holt , 1984).

2-4-2الامراضية Pathogenicity:

تمتلك هذه الجرثومة أغشية بلازمية خارجية تتألف من طبقة دهنية (Lipid layer) وبروتينات دهنية وعديد سكريد (Polysaccharides) وعديد السكريد الدهني وتشترك بهذه الصفة مع الجراثيم السالبة لملون غرام الأخرى (Beveridae, 1999). على الرغم من كونها نبيتاً طبيعياً في القناة الهضمية المعوية للاشخاص الاصحاء إلا انها تكون رمية (Saprophytes) بينما تكون بعض أنواعها انتهازية مسببة انواعاً عديدة من الاخماج عند مغادرتها مكانها الطبيعي (Quinu *et al.*,1998), إذ تعد من مسببات العديد من الالتهابات كالتهاب المجاري البولية والتهاب المثانة وتكوين الحصى وكذلك اخماج الجروح والحروق والتهاب الاذن الوسطى الحاد وذات الرئة (Scavon *et al.*,2004) .

ذكر Swierzko وجماعته (2001) أن لهذه البكتريا القدرة على غزو مجرى الدم مما يؤدي الى حصول حالة الانتان الدموي (Speticemia) وتحدث هذه الحالة خاصة بعد تطور اصابات المجاري البولية أو بسبب القثطرة ، وتعد من مسببات زيادة معدل الاصابات والوفيات في الاطفال حديثي الولادة والخدج وأيضاً تسبب فقدان الجنين وقد تم عزلها من المصابين بالتهاب الكلية وضمور البروستات (Iwalokun *et al.*,2004) .

2-5جنس الانتيروباكتر *Enterobacter*:

هي بكتريا سالبة لملون غرام ,عصوية الشكل ,متحركة ,غير مكونة للسبورات سالبة لفحص الاندول (Indole) ,سالبة لفحص المثيل الأحمر,موجبة لفحص فوكس بروسكاور,لها القدرة على استغلال الستريت (أي أنها موجبة لفحص السايمون ستريت) ,مذيبة الجيلاتين(Liquefy gelatin) وهي تنتج غازاً من تخمر سكر الكالكتوز (Murray *et al*, 2002). تنمو البكتريا على وسط الماكونكي.إذ تكون مستعمراتها وردية اللون مخاطية ولكنها أقل لزوجة (مخاطية) مما هو عليه في بكتريا *Klebsiella*, البكتريا مخمرة للمانيتول وتنتج غازاً من تخمر بعض السكريات وتتوافر هذه البكتريا في التربة والماء وفي القناة الهضمية للإنسان (Rollins and Joseph,2000).

2-5-1الوبائية Epidemiology:

يوجد جنس *Enterobacter* في القناة المعوية ويعد نبيتا طبيعيا ولكنه مرضي عند تحركه من القناة المعوية المعدية ويصبح من العوامل المرضية المكتسبة المهمة ويسبب الخمج في وحدة الحروق (Clementino*etal*.,2001).هناك حوالي (16) نوعاً يعود الى جنس *Enterobacter* التي تتوافر في الماء والتربة والخضراوات ويعدهذا الجنس من الممرضات المشتركة والمترابطة مع العديد من الاصابات في وحدات العناية المركزية (Mohammed .,2010)

تعد بكتريا *E.clocacae* اكثر الانواع التابعة لجنس *Enterobacter* التي تعزل من العينات السريرية بشكل متكرر تليها بكتريا *E.aeruginose* و *E.agglomeranse*(حسين وفليح, 2009)، لذلك فإن بكتريا *E.clocacae* تعد مسؤولة عن 65–75 % من مجموع الاصابات المتسببة عن بكتريا *Enterobacter* بشكل عام ,وكذلك تشكل نسبة 5–10 % من مجموع الاصابات التي تسببها البكتريا السالبة لملون غرام (Kasper *etal*,2004).

2-5-2الامراضية Pathogenicity:

تعد بكتريا ال*Enterobacter* من الممرضات الانتهازية التي تصيب الانسان وتسبب العديد من الامراض ومن اهمها التهاب السحايا والتهاب المرارة والتهاب نقي العظم وتصيب الاطفال حديثي الولادة وايضا تصيب التهاب المجاري البولية(Brian, 2008).وتمتلك البكتريا العديد من عوامل الامراضية التي هي السبب الرئيس في إحداث الإصابات , والعامل الاول هو المحفظة إذ إنها تحوي مستضداً(antigen M)أو مستضد اللزوجة (Slime antigen) , أما العامل الآخر فهو امتلاك البكتريا أنزيمات منها أنزيم البيتالاكتاميز beta–lactamase الذي له الدور الكبير في مقاومة البكتريا لتأثير مضادات الحياة ,إذ إن أكثر من (90%) من سلالات البكتريا تكون مقاومة لتراكيز عالية من طيف واسع من مضادات الحياة التي تشمل المضادات الحياتية Cefoxitin,Cefadroxil,Cephlothin وغيرها(حسين وفليح, 2009).

تعد *Enterobacter cloacae* من اهم انواعها التي تسبب العدوى في المستشفيات بسبب مقاومتها العالية للمطهرات والعوامل المضادة للجراثيم (Ren *etal*,2010). يصيب النوع *Enterobacter cloacae* اي فئة عمرية وخصوصا صغار وكبار السن وتحدث الاصابة في اي موقع من الجسم عند انتقالها اليه إذ تسبب اصابات المسالك التنفسية والقناة المعدية والمعوية

والجروح والحروق وتجرثم الدم والعمليات الجراحية والسحايا لاسيما المرضى الذين يعانون من نقص المناعة او الذين يتناولون ادوية تكبح المناعة لذلك تعد من المسببات المرضية المهمة للاصابات المكتسبة من المستشفى (Nosocomial infections) (Chow *etal* ,1994).

6-2 بعض عوامل الضراوة للأجناس والأنواع البكتيرية قيد الدراسة:

2-6-1 أنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production:

يعد إنزيم الهيمولايسين ذو طبيعة بروتينية يفرز من أنواع عديدة من البكتريا السالبة والموجبة لملون غرام(Benz *et al*., 1989). ويصنف الهيمولايسين الى ثلاثة أنواع إعتماداً على قابليته لتحلل كريات الدم الحمر وإحداث الإمراضية، النوع الأول يحلل الأغشية ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع بيتا(β – haemolysis)،أما النوع الثاني فهو يكون الثقوب في الغشاء الخلوي، وتظهر منطقة ذات لون أخضر حول المستعمرة ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع (α– Haemolysis)،أما النوع الثالث فإنه يحطم جدار الخلية ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع كاما ،وهناك بعض الأنواع لاتظهر تحللا حول المستعمرات توصف بالبكترياغير المحللة للدم – Non) haemolytic)(Han *etal*.,2010).

إن آلية عمل الهيمولايسين في إحداث الامراضية تكون إما بصورة مباشرة عن طريق تحليل كريات الدم الحمر وهذا يسبب تحرر الهيموكلوبين الذي يُعد مصدراً مهماً للنمو وتكاثر البكتريا او عن طريق التداخل مع العمليات الدفاعية داخل الجسم.يمتلك الهيمولايسين مدى واسعاً من التاثيرات فهو يهاجم الخلايا المناعية للمضيف ولكن من دون ان يحفز تحللها ولكنه بالمقابل يمنعهامن اداء وظيفتها (Goni and Ostolaza.,1998).

يمكن ان يعدّ الهيمولايسين عاملاً منخراً ساماً خلوياً (Cytotoxic necrotising factor) اذ يسبق الالتهاب مؤدياً الى افراز الانترلوكين –6 (IL–6) InterLeukin–6 مما يمهد للاصابة بالعديد من الامراض الكلوية (Raksha *et al*.,2003). يعد الأنزيم الحال للدم من عوامل الفوعة المهمة في جرثومة *P.mirabilis* (Liu*etal*.,2012) حيث يدمر الغشاء الخلوي لكريات الدم الحمراء،ويعد وجوده عاملاً مهماً في تزويد الجراثيم بالحديد تتميز *E.coli* بقدرتها على إنتاج انزيم الهيمولايسين الذي يلعب دوراً مهماً في امراضيتها (Dhakal and Mulvey

(2012)(, تستطيع هذه البكتريا انتاج العديد من انواع الهيمولايسين منها بروتينات خارج خلوية تتضمن (α–hemolysin) وبروتينات مرتبطة بالخلية من نوع (β–haemolysis)

. (AL–Chalabi etal,2010)

2-6-2 البكتريوسين Bacteriocin:

البكتريوسينات مواد بروتينية تنتجها بعض أنواع البكتريا ذات وزن جزيئي عالٍ لها القابلية على قتل أو تثبيط الأجناس والأنواع القريبة منها (Pils and Braun, 1995) أحيانا تمتلك هذه البكتريوسينات فعالية واسعة الطيف ضد الأنواع المختلفة من البكتريا الموجبة أوالسالبة لملون غرام (Sarika*et al.*,2010). تختلف تسمية البكتريوسين تبعاً للبكتريا المنتجة لها لذلك أشار(Hammami *etal* ,2010) إلى آنّ البكتريوسين الذي تنتجه بكتريا *E.coli* يسمى Colicin ويطلق مصطلح بايوسين (Pyocin) على المادة المنتجة من قبل جنس*Pseudomonas aeruginosa*.هناك أربع مجاميع من البكتريوسين المنتج من بكتريا *Klebsiella* هي (A, B ,C, D) (Chavan *etal.*, 2005). أشار Riley and Chavan (2007) إلى آنّ البكتريوسين المنتج من بكتريا *Klebsiella pneumoniae* يسمى Klebocin والبكتريوسين المنتج من بكتريا *Serretia marcescens* يسمى Marcescens.

ويسمى البكتريوسين المنتج من بكتريا *Enterobacter cloacae* (Singh Cloacins and Banerjee ,2008) .

تشفر لإنتاج البكتريوسينات ثلاثة جينات محمولة بلازميدياً أولها جين إنتاج البكتريوسين (Bacteriocin gene) ثم جين يشفر لبروتين المناعة (Immunity gene) لمنع تأثر الخلية بالبكتريوسين المنتج من قبلها فضلاً عن جين التحلل (Lysis gene) الذي يشفر لبروتين محلل يساعد في عملية تحرر البكتريوسين من الخلية المنتجة (Riley, 1998).إن تأثير البكتريوسين في الخلايا البكترية الحساسة يكون قاتلا(bacteriocidal) ; (Al–Charrakh *et al.*,2011 Todorov ,2009)أومثبطاللنمو(bacteriostatic) (Sarika *et al.*,2010). تتشابه آليات عمل البكتريوسين في تأثيرها في الخلية الهدف مع آليات عمل مضادات الحيوية فقد تعمل على الجدار الخلوي أو الغشاء السايتوبلازمي (Han *et al.*,2011)، وبعضها يتداخل مع

الفعاليات الايضية التي سيطرت عليها المادة الوراثية ، وبعضها الآخر يثبط صنع البروتين . أشار الباحث (Sarika *etal*,2010) إلى آنّ البكتريوسين المنتج من بكتريا *Lactobacillus rhamnosus* فعال تجاه بكتريا *E.coli*, *B.subtilis*, *B.pumilus* ,*Bacillus brevis* *Pseudomonas aeruginosa* , *Staphylococcus aureus* and *Vibrio harveyi*.

3-6-2 إنتاج السايدروفور Siderophore production:

السايدروفور هي مركبات مخلبية (Iron chelating) لها القدرة على سحب الحديد من مركباته، وهي ذات أوزان جزيئية واطئة لها ألفة عالية جداً للحديد إذ يفرز من الخلية ويرتبط بمركبات الحديد الترانسفرين (Transferrin) واللاكتوفرين (Lactoferrin) التي تعمل على توفير عنصر الحديد لخلايا المضيف مع تحديد وتقليل الحديد الحر للميكروبات المرضية ويكون الارتباط على سطح الخلية ثم يعود إلى داخل الخلية (Payne *et al*., 1988) .

يعد الحديد عنصراً ضرورياً ومحدداً لنمو البكتريا والاحياء المجهرية الاخرى اذ تُستخدم عاملاً مؤكسداً redox catalyst في البروتينات التي تساهم في عمليات نقل الالكترون في السلسلة التنفسية كذلك يعد من اهم العناصر للبكتريا لغرض احداث الإصابة اذ يشارك في العديد من الوظائف الايضية (Jawetz etal., 2004) إن الكثير من الأنزيمات يحتاج إلى الحديد وذلك لزيادة فاعليتها وإن البكتريا التي تفتقد أنظمة سحب الحديد يختزل فيها معدل النمو بصورة كبيرة مؤدية أحياناً إلى حدوث تغيرات شكلية كثيرة, كما آنّ هذه الخلايا التي تفتقد لهذه الأنظمة قد يتوقف فيها تصنيع الحامض النووي (DNA) ويتوقف فيها انقسام الخلية ولهذا فإن الخلايا البكتيرية تحتوي في الأقل على نظام واحد للحصول على هذا العنصر المهم مثل نظام السايدروفورات(السعدون ,2007).

أصبح التنافس على الحديد أحد العوامل التي تحكم العلاقة بين البكتريا والمضيف ولذلك تعدّ من الوسائل التي تستخدمها البكتريا للحصول على الحديد (الزعاك ، 1994). وجد أن بكتريا العائلة المعوية تنتج نوعين من السايدروفور وهيالانتيروبكتين(Enterobactin)هومن المركبات الفينولية الحاوية على حلقة (2, 3 dihydroxybenzoic acid)التي يرتبط بها الحديد تنتج Enterobactin بوساطة أكثرمن 90 %من البكتريا المعوية (Mokracka *et al*.,2004).

الايروبكتين (Aerobactin) يتكون من حامض Hydroxymatic acid (Podschun and Ullmann, 1998). تكون الجينات المسؤولة عن إنتاج الايروبكتين محمولة على بلازميد كبير الحجم وزنه الجزيئي (180) كيلو قاعدة (Nassif and Sansonetti, 1986)، وأظهرت الدراسات الجزيئية أن هناك اربعة جينات تشفر لإنتاج الايروبكتين وهي(iucD, iucC, iucB, iucA)(السعدون,2007).إن البكتريا تحتاج إلى الحديد عاملاً أساساً في الفعاليات الحيوية المختلفة، وهذه البكتريا إمّا أن تكون قادرة على إنتاج الهيمولايسين أو على إنتاج السايدروفور للحصول على الحديد فمثلاً سلالات بكتريا المكورات المسبحية التي تنتج معظمها الهيمولايسين هي غير قادرة على إنتاج السايدروفور بالمقابل نجد أن البكتريا السالبة لصبغة كرام خاصة أفراد العائلة المعوية ليس لهاالقدرة على إنتاج الهيمولايسين (الزبيدي,2012)، وقد وجد أنّ العائلة المعوية تنتج ثلاثة أنظمة للسايدروفور هي Aerobactin و Enterobactin و Yersiniabactin (Saharan and Nehra ,2011) .

4-6-2 إنتاج اليوريز Urease production:

تشير الدراسات الحديثة الى أهمية اليوريز بوصفه مسبباً مرضياً وعامل ضراوة للعديد من أنواع البكتريا وينتج من قبل العديد من الاجناس البكتيرية المسببة لخمج المجاري البولية مثل *Proteus , Klebsiella , Pseudomonas* (Ahmed*etal.*,2003) إذ يلعب دوراً مهماً في عملية الاستعمار (Colonization) وتحصي الكلية (Nephrolithiasis) وكذلك في تطور التهابات حويض الكلية (Dattelbaum *et al.*, 2003). تتحلل اليوريا بوساطة أنزيم اليوريز الى جزيئة أمونيا وكاربامات تتحلل بدورها لتنتج حامض الكاربونيك وجزيئة أمونيا أخرى ولأنزيم اليوريز دور كبير من الناحية الطبية لتسببه في حصى الكلية والتهاب حويض الكلية وله علاقة بتسمم الدم بسبب أرتفاع نسبة اليوريا بالدم كذلك يلعب دوراً في منع تنشيط المتمم الرابع C4 وبسبب قاعدية الأدرار يؤدي الى تحلل كريات الدم البيضاء المتواجدة في المنطقة (Li *etal.*,2004).أظهرت الدراسات المتخصصة بالتنظيم الوراثي لمجاميع الجينات ذات العلاقة بإنتاج اليوريز بان إنتاجها يخضع لنوعين من الجينات تعرف الاولى بالجينات التركيبية Structural genes وهنالك جين اخر يسيطر على الاستنساخ Transcription يعرف بالجين التنظيمي Regulatory gene ويرمز له *Urer* (Mulrooney and Husinger,2003).

تنتشر الأحياء المجهرية المنتجة لإنزيم اليوريز في الطبيعة بشكل كبير وتختلف في قابليتها على تحلل مركب اليوريا وان زيادة فعالية اليوريز في التربة يدل على نشاط تلك الأحياء ألمجهرية في أنتاج اليوريز (Abed *etal* ,2012).

2-6-5 حركة العج (الإنثيال) Swarming motility:

الأنثيال هو حركة البكتريا بشكل أمواج ابتداءاً من حافة المستعمرة الأصلية بوساطة الأسواط Flagella وتلاحظ ظاهرة الأنثيال بوضوح على الأسطح الصلبة الأعتيادية،ويمتازجنس المتقلبات *Proteus* بهذه الظاهرةعن بقية أجناس العائلة المعوية Enterobacteriaceae (Gue *etal*,2001),وهذه الظاهرة ناتجة عن هجرة مجموعة من الخلايا البكتيرية بعد تمايزها في الوسط مكونة طبقة رقيقة لحلقات ممتدة المركز (AL–mansouri , 2005). إن الحركة توفر إستمرارية البقاء للجراثيم تحت ظروف بيئية مختلفة ، وتساعد الجراثيم للاستجابة لظروف بيئية مناسبة أوغير مناسبة والتنافس بنجاح مع غيرها من الجراثيم،إذ تمتلك الجراثيم المسوطة نظام تمييز متطور للحركة في السائل أو على السطح، وهذا التمييز مهم في الاستجابة للنمو على السطوح أو السوائل اللزجة (Harshey, 2003). تعد الأسواط أعضاء سطحية معقدة ومسؤولة عن حركة الجراثيم نحو بيئات مختلفة والمساهمة في فوعة الممرضات الجرثومية (Merino *et al*., 2006).إن فائدة الأسواط هي الحركة وتجنب دفاعات المضيف، ثم الإرتباط بخلايا المضيف ، فضلاً عن كون ظاهرة الإنثيال توسع من مساحة الاستعمار (Colonization)إذ يُسهم في تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm) على السطوح المختلفة مثل(Microtiter plates) (Gavin *etal*., 2003). إن الجراثيم غير المسوطة غير قادرة على ظاهرة الإنثيال (Jones *etal*, 2004)،والتي تدعى أيضاً بظاهرة دينس(Dienes phenomenon) والتي استخدمت في تصنيف أنواع جراثيم المتقلبات *Proteus* Sosa *et al*., 2006).

2-6-6الغشاء الحيوي Biofilm:

عرف الغشاء الحيوي على أنه مجتمعات معقدة من الكائنات المجهرية التصقت بسطوح داخلية أو بينية ، وتتكون غالبا من نوع واحد أو أنواع بكتيرية عدة تتداخل مع بعضها ومع البيئة

التي تعيش فيها (O'Toole *et al.*, 2000).أما Deibel (2000) فتصفه بأنه خليط من الكائنات المجهرية مع مواد مغذية إضافة إلى مواد بوليميرية خارج خلوية منتجة من تلك الكائنات . يساعد الغشاء الحيوي البكتريا في البقاء حية في الظروف القاسية داخل المضيف وتعد مسؤولة عن الإصابات المزمنة والمستعصية ومن هذه الأمراض التهاب شغاف القلب، التليف الكيسي، التهاب الأذن الوسطى، الإصابات المتعلقة بالأدوات الطبية.إصابات القثاطر، التهاب اللثة وتسوس الأسنان وغيرها (Khan *et al.*, 2011). تبدي البكتريا في الأغشية الحيوية درجة عالية من المقاومة للعوامل المضادة للجراثيم وجهاز مناعة المضيف (Dadawala *et al.*, 2010). تتوافر الاغشية الحيوية على أنواع مختلفة من السطوح متضمنة الأنسجة الحية, العدد الطبية, مينا الأسنان, السطوح الداخلية لأنابيب توزيع المياه, وأسطح الصخور المحاذية لمجاري الأنهار (Donlan,2002).تكون معظم البكتريا السالبة لملون غرام قادرة على تكوين الأغشية الحيوية وتلوث الاجهزة الطبية ومنها، *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Proteus mirabilis* (Salih and AL-Ani,2013). تتواصل البكتريا مع بعضها في الغشاء الحيوي بوساطة إشارات كيميائية تدعى محفزات ذاتية auto inducersوتدعى عملية التواصل الكيميائية بظاهرة الإحساس بالزحمة (Qourum sensing)وهي تسمح للبكتريا بالتحكم بالبيئة وتغيير التصرف استجابة لتغيرات مجتمع الغشاء الحيوي (Hassan *et al.*, 2011;Venturi, 2006).

2-6-1 آلية تكوين الغشاء الحيوي Mechanism of Biofilm Formation

يضمن الغشاء الحيوي حدوث تغيرات في الشكل والوظيفة للبكتريا ويقوم بتنظيم مسار حياتها لذلك فإنه يعد مرحلة تطورية في علم البكتريا. تشمل عملية تكوين هذا الغشاء عدة مراحل توجز بأنها تبدأ بانجذاب الخلايا نحو السطح والتصاقها وبناء المستعمرات المجهرية وإنتاج EPS ومن ثم النضج (Chmielewski and Frank, 2003). اشار Zottola (2001) الى أن هنالك خمس مراحل متسلسلة في بنائه هي انتقال المغذيات العضوية وغير العضوية الى السطح الصلب وامتزازها وتكوين الغشاء المتكيف ومن ثم التصاق البكتريا بهذا الغشاء والنمو وحدوث

فعاليات ايضية وأخيراً الانفصال والانتشار ويتم هذا بتفاعلات عكسية وغير عكسية(Azize ,2004)

2-6-1-1تكوين الغشاء التكيفي Conditioning Film Formation :

هناك رأي عام يرى أنّ السطوح الصلبة النظيفة سرعان ما تغطى بغشاء تكيفي مكون من جزيئات عضوية ولاعضوية تسهل ارتباط البكتريا لهذه السطوح وتستغرق هذه العملية ثوانٍ أو دقائق (Donlan, 2002) وهذه الجزيئات تكون كبيرة أو صغيرة ذات صفات كارهة للماء مفرزة من كائنات حية أو ناتجة من تحللها تنجذب هذه الجزيئات وتمتز على السطح وتساهم في تبديل شحناته وطاقتة الحرة وتكون بمثابة مصدر مغذٍ عالٍ الطاقة للبكتريا الملتصقة (Marshall, 1997).

2-6-1-2 الارتباط Attachment:

يعد الارتباط او الالتصاق اول خطوة في تكوين الغشاء الحيوي وهو عملية معقدة تنظم بفعل الخصائص المختلفة لوسط النمو والمغذيات وسطح الخلايا تسمح الأسواط للبكتريا بالحركة نحو المكان المناسب للالتصاق ومن ثم تحصل تغيرات فسيولوجية لسطح الخلية مثل تكون الأهداب وتصنيع EPS وتجمع الخلايا ويحصل الالتصاق خلال مدة 5-30 ثانية وعلى مرحلتين عكسية وغير عكسية(Abed *etal*,2012) .

-الارتباط العكسي تفاعل أولي ضعيف بين الخلايا والسطح تتوسطه قوى الاتزان الكهربائي وتفاعلات كارهة للماء وفي اثناء هذه المرحلة تبقى البكتريا متحركة حركة ارتعاشية وتزال بسهولة بأي ضغط او جهد معتدل .

- الارتباط غير العكسي ينتج من غرس الزوائد وإنتاج مواد متعددة خارجية (Exopolysubstances) وتتوسطه أواصر تساهمية وايونية وهدروجينية وتفاعلات ثنائية القطب (Chmielewski and Frank, 2003).

2-6-1-3 تكوين المستعمرات المجهرية ونضج الغشاء الحيوي:

Formation of Microcolonies and Maturation of Biofilm

أشار O'Tool وجماعته (2000a) الى أنّ المستعمرات المجهرية في الغشاء الحيوي تتكون بعد ساعات قليلة من الالتصاق في حين أكد (Chmielewski and Frank,2003) على أنها تتكون بعد الارتباط غير العكسي تحت الظروف الملائمة للنمو وهي ناتجة من ترافق تجمع ونمو البكتريا و تكمل بإنتاج EPS وانجذاب بكتريا أخرى نتيجة الاتصال بين الخلايا الذي يعرف بعملية تحسس النصاب(Quorum sensing).وجد إنّ الغشاء الحيوي المتعدد الأنواع يكون اسمك واكثر استقراراً من ذلك المتكون من نوع بكتيري واحد (Sutherland, 2001).

تحتاج هذه العملية مدة كافية لتتطور الى مرحلة النضج إذ إنّ المستعمرات المجهرية تزداد حجماً في البداية ثم تلتحم لتكون طبقة من الخلايا تغطي السطح (Costerton *et al.,* 1999). تتميز بكتريا الغشاء الحيوي الناضج بمقاومتها للمضادات الحيوية والأشعة فوق البنفسجية وزيادة التعبير الجيني والقدرة على التحطيم الحيوي وزيادة المنتجات الايضية الثانوية (O'Toole *et al.,* 2000a).

2-6-1-4 الانفصال de attachment :

تعد عملية الانفصال إشارة لنهاية عملية بناء الغشاء الحيوي القديم وبداية عملية بناء غشاء حيوي جديد إذ تنفصل قطع صغيرة من الغشاء القديم وتنتقل الى مناطق جديدة تستعمرها وتبني فيها غشاء جديد (Azize , 2004).هنالك أسباب عدة تبرر حصول الانفصال منها زيادة سمك الغشاء وقوى الضغط والشد والجهد واشارات جينية وإنزيمات والتآكل والانسلاخ وحركة السوائل وحدوث تغيرات داخل الغشاء (Deibel, 2000) بسبب قلة الأغذية أو نتيجة إفراز إنزيمات كما في *P.aeruginosa* (O'Toole *et al.,* 2000a). كما ان الخلايا المنفصلة قد تسبب التهابات عديدة اعتماداً على جهاز المضيف المناعي، ومن جهة اخرى يمكن السيطرة على هذه الخلايا باستخدام المضادات الحيوية، و/أو دفاعات جهاز المضيف المناعي (Ryder, 2005).

2-7مصادر التلوث الجرثومي في المستشفيات :

ميزت أنواع العدوى المكتسبة عن طريق المستشفيات قبل أكثر من قرن على انها مشكلة حرجة تؤثر على نوعية الرعاية الصحية المقدمة في المستشفيات إذ يمكن تجنب % 20 من هذه العدوى (Harbath *etal* ,2003) يستخدم مصطلح الاصابة المكتسبة من المستشفى لأي اصابة يكتسبها المريض في اثناء رقوده في المستشفى سواء اكان مصدر الجرثومة مريضآ اخر أي أخماج متصالبة (Cross – infections) أم مصدر الجرثومة هو البيئة المحيطة بالمريض أي اصابة خارجية المنشأ (Exognenous) أم يكون مصدر الجرثومة ذاتيآ أي يحملها المريض في موقع آخر من جسمه غير موقع الاصابة الحالية فتدعى اصابة ذاتية المنشأ (Autoinfection) أو داخلية المنشأ (Endogenous) (Donskey, 2004).

أشار الباحث (2001) Carmeli *et al*, الى أن الممرضات العشرة الأكثر تسبباً في هذا النوع من الاصابات التي يكون مصدرها مريض آخر هي : *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella Enterobacter spp. ، Escherichia coli ، Enterococcus spp. Pseudomonas ، Citrobacter spp ، Serratia spp. ، Proteus spp. ، spp. aeruginosa ، Stenotrophomonas maltophila* .اما الخارجية المنشأ فمن مسبباتها أنها قد تكون الارضية وتمثل عاملاً مهماً للتلوث لماتحملة من اتربة التي تكون مصدراً لنقل العدوى. وتعد فرش الراقدين من مسببات العدوى وانتشار الخمج في المستشفيات لما تحمله في طياتها من جراثيم نتيجة التماس مع المريض وقد يكون قيحاً أو افرازات جروح العمليات (Taguchi *et al*.,1993) قديكون الكادر الطبي هو المسؤول عن التلوث وذلك بحكم عملهم إذ يكونوا بتماس مباشر مع مصدر العدوى (المريض المصاب) ،وبحكم توافر البكتريا الطبيعية على جلد الكادر الطبي قد ينتقل من ايدي الاطباء أو الجراحين أو العاملين في الردهات الى جلد المريض الحساس ضعيف المناعة عن طريق التلامس المباشر أو عند حصول ثقوب في الكفوف الجراحية وكذلك عدم غسل وتعقيم الايدي خلال الانتقال من مريض الى اخر يكون سبباً لأنتشار التلوث (Wont *et al*., 2004).

وقد ذكر Trick وجماعته (2003) بأن الادوات المستخدمة في وحدات العناية المركزة سبب رئيس لأنتشار المرض ويعد عاملاً يقي ايدي الكادر الطبي من البكتريا الممرضة عند التعامل مع الجروح الخطيرة الملوثة.

2-8المضادات الحيوية Antibiotics:

تعرف المضادات الحيوية بإنها من النواتج الايضية الثانوية الخاصة أو المحورة والتي تمتلك فعالية ضد مجاميع مختلفة من الاحياء المجهرية ، كذلك تعرف بأنها مواد كيمياوية عضوية تنتج من قبل الاحياء المجهرية المختلفة (Prescott *et al*., 2005) .

2-8-1مضادات البيتالاكتام β -Lactam antibiotic وتقسم الى :

2-8-1-1البنسلينات Penicillins :

تقسم البنسلينات اعتماداً على نوعية السلسلة الجانبية والفعالية ضد الميكروبية إلى مجاميع عدة.

- **بنسيلينات محددة الطيف Narrow spectrum antibiotics** وتشمل :

أ- **البنسيلينات الطبيعية Natural Penicillins**

تشمل البنسلينات الطبيعية بنسلين جي (Penicillin G)، وبنسلين في (Penicillin V). ويكون الأول حساس للعصارة المعوية، بينما يتصف الثاني بمقاومته وثباته (المرجاني, 2011).

ب-**بنسيلينات ضدالمكورات العنقودية AntiStaphylococcal Penicillins** وتشمل: Cloxacillin و Methicillin و Flucloxacillin و Dicloxacillin و Nafcillin (Katzung, 2004) .

- **بنسيلينات واسعة الطيف Broad spectrum penicillins**

يطلق على هذه المحموعة من المضادات Aminopenicillin وتضم كل من Ampicillin و Amoxicillin فضلاً عن المشتقات الأخرى مثل Helacillin و Bacampicillin و Cyclacillin (Alwan and Abou, 1998) .

- **البنسيلينات ضد الزوائف Anti Pseudomonal Penicillin**

_ البنسلينات الكاربوكسيلية (Carboxy penicillins):

تضم الكاربنسلين (Carbenicillin)، والتكراسلين (Ticracillin) الفعالين ضد بكتريا *Ps.aeruginosa* و*E.coli* ولكن تقل هذه الفعالية ضد البكتريا المنتجة للأنزيمات المحللة لها ولاسيما *K.pneumoniae* (Mandell *et al*., 1995).

_مجموعة اليوريدوبنسلين Ureido Pencillins:

تضم هذه المجموعة مضادات الازلوسيلين (Azlocillin) ، والميزلوسلين (Mezlocillin) ، والببراسيلين (Piperacillin) (Katzung, 2001).

2-8-2 السيفالوسبورينات Cephalosporins :

تتألف مضادات السيفالوسبورينات من حلقة البيتالاكتام متصلة مع حلقة Dihydrothiazine مكونة نواة تدعى (7amino cephalosporanic acid) مع توافر سلسلتين جانبيتين متغيرتين R1، R2 تبعاً لنوع المشتق (Katzung,2004). تقسم هذه المضادات اعتماداً على تركيبها الكيميائي ونوع السلسلة الجانبية وفعاليتها ضد المكروبية ، وطبيعة مقاومتها لإنزيمات البيتالاكتاميز الى عدة اجيال وهي :

- **سيفالوسبورينات الجيل الاول First Generation Cephalosporins**

تضم مجموعة من المضادات الحيوية التي تؤخذ بشكل زرق (Injection) أمثال Cephlothin, Cethazolin، Cephapirin ومنها ما يؤخذ فموياً(Orally) مثل Cephalexin، Cefaclor، Cephradine (Tierney *etal*,1999).

- **سيفالوسبورينات الجيل الثاني Second Generation Cephalosporins**

تدعى بالمضادات واسعة الطيف (Broad spectrum) وتضم مجموعة من المضادات تؤخذ أغلبها بشكل زروق مثل: Cefoxitin, Cefotetan, Cefprozil, Cefonocid, Cefmetazole, Ceforanide, Ceftiam(Katzung, 2001).

_سيفالوسبورينات الجيل الثالث Third Generation Cephalosporins

تضم مجموعة من المضادات ومنها Ceftriaxone , Cefixime , Ceflibutien Cefoperazone and Ceftazidime , Cefotaxime (Brooks *et al.*,2007) .

- **سيفالوسبورينات الجيل الرابع Fourth Generation Cephalosporins**

تشمل كل من Cefepime و Cefpirome ، تمتلك القدرة على إختراق الغشاء الخارجي للبكتيريا بشكل أفضل من باقي الأجيال ، يستعمل Cefpirome لعلاج حالات تسمم الدم الناتج عن *P.aeurginosa* المقاومة لمضاد Ceftazidime (Brooks *et al.*,2007).

_سيفالوسبورينات الجيل الخامس Fifth Generation Cephalosporins

ومثالها مضاد Ceftobiprole ذو الفعالية ضد بكتيريا *S.aureus* المقاومة للمثسلين (MRSA) وبكتريا *Streptococcus pneumonia* المقاومة للبنسلين ، يعطى بالحقن لعلاج اصابات الجلد والانسجة الرخوة (المرجاني ،2011).

2-8-3مجموعة الكربابنيم (Carbapenems) :

تضم مجموعة من المضادات منها Imipenem ومضادMeropenem فضلاً على المجموعة الحديثة التي تشمل Faropenem الذي يعطى عن طريق الفم ., Dalhoff *etal* (2003;Ueda and sunagawa,2003).

2-8-4 مجموعة المونوباكتام Monobactams :

يعدالازترونام (Aztreonam) أول مضاد لهذه المجموعة وله فاعلية قاتلة ضد أنواع من البكتريا السالبة لملون غرام , ولها فعالية مثبطة لأفراد العائلة المعوية ,Baron *et al.*) (1999. ومضاد Aztreoname يشبه مضاد الـ Ceftazidime في فعاليته ضد العصيات السالبة لصبغة غرام ولكن ليس له فعالية ضد البكتريا الموجبة لملون غرام و البكتريا اللاهوائية (Brooks *et al.*, 2007).

2-8-5 مجموعة المضادات الامينوكلايكوسيدية Aminoglycosides:

هي مجموعة من المضادات القاتلة للبكتريا (Bacteriocidal) تعمل على تثبيط عملية تصنيع البروتين داخل الخلية البكتيرية لقدرتها على الارتباط مع الوحدة الرايبوسومية الصغيرة (30S) بطريقة تتسبب في دخول تسلسلات خاطئة من الأحماض الأمينية مؤدية إلى إنتاج بروتينات غير طبيعية متراكمة داخل الخلية البكتيرية وبالتالي توقف نمو البكتريا (Heritage, 2003).تضم مجموعة من المضادات منها Streptomycin, Neomycin, Amikacin , Tobramycin, Gentamicin , Kanamycin, Sisomicin ,Netilmicinوهي تتشابه في الخواص الحركية والدوائية والتركيبية والسمية (Katzung,2001;المرجاني,2011).

2-8-6 الكوينولونات Quinolones:

تعمل هذه المجموعة على تثبيط تخليق الـDNA البكتيري عن طريق إعاقة أنزيم DNA gyrase إذ تثبط عملية اللف الفائق Super coiling لشريطي الدناDNA (Hardy *etal* 2000, ومن العقارات المهمة التابعة لهذه المجموعة Ciprofloxacin, Ofloxacin, Nalidixic acid ويمثل مضاد Nalidixic acid الجيل الاول، ويعد من الكوينولونات القديمة (Katzung,2001).أما مضادCiprofloxacin , Ofloxacin يمثلان الجيل الثاني (Forrest *etal.*,1988).

2-8-7 السلفوناميد والتراي مثبريم Sulfonamides & Trimethoprime:

يعمل هذا المضـاد على تثبيط المسار الأيضـي وعرقلتـه من خلال تثبيط أنزيم (DHFR) Dihydrofolate reductaseالضروري في صنع حامض الفوليك (Folic acid) المهم في صناعة الأحماض الأمينية والنيوكلوتيدات الداخلة في تكوين الأحماض النووية (Laurence *et al.*, 1997).

8-8-2 النيتروفيوانتوينNitrofuantoin:

استخدم منذ زمن بعيد بوصفه مضاداً فعالاً في علاج التهابات المجاري البولية إذ له فعالية ضد العديد من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وتزداد فعاليته عند الرقم الهيدروجيني pH 5.5 (Katzung,2001).

2-9آليات مقاومة البكتريا لمضادات الحياة:

من الآليات التي تستطيع من خلالها الأحياء المجهرية ان تظهر مقاومة لمضادات الحياة ما يأتي :-

أولاً - إنتاج الأنزيمات المثبطة لمضادات الحياة:

تنتج الأحياء المجهرية أنزيمات تحطم العقار على سبيل المثال تنتج بكتريا *Staphylococci* المقاومة لبنسلين G انزيم β-Lactamase الذي يحطم العقار وكذلك تنتج العصيات السالبة لملون غرام المقاومة لمجموعة Aminoglycosideأنزيمات مثبطة لهذه المجموعة وهي (Acetylating , Phosphorylating enzyme , Adenylating enzyme) (enzyme) (Brook *et al*., 2001).

ثانياً - تغير في حاجز النفاذية:

تمتلك البكتريا السالبة لملون غرام الغشاء الذي يعد حاجزاً قوياً محباً للماء (Brook *et al*., 2001) ، ان التغير في التركيب الكيمياوي للغشاء أو الاختزال في عدد الثقوب الموجودة فيه يؤدي الى تغير في نفاذيته وبالتالي تصبح البكتريا مقاومة للمضاد (Jacoby and Sutton, 1985) فضلاً عن توافر بروتينات (Penicillin Binding Proteins (PBPs)) الموجودة في الغشاء السايتوبلازمي ذات الطبيعة الانزيمية التي تدخل في التخليق الحيوي للبيتيدوكلايكان والتي لها القابلية على الارتباط تساهمياً بمضادات البيتالاكتام.(Pfeifle *et al*., 2000) .

ثالثاً - تغير في موقع الهدف:

ان حدوث طفرة وراثية في موقع الهدف يؤدي إلى التقليل من أُلفة المضاد لهذا الهدف وبالتالي تتحول 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 (Levinson and Jawetz, 2000).

***رابعاً* - تغير في المسارات الايضية:**

تظهر بعض البكتريا مقاومة لعمل المضاد من خلال تغير في مسارها الكيموحياتي وكذلك تُطور انزيمات متغيرة تؤدي وظيفة ايضية واقل تأثراً بالعقار فأنزيم(Dihydrofolic acid reductase) الذي تنتجه البكتريا المقاومة لـ Trimethoprimاقل تثبيطاً بـ Erimethoprim من البكتريا الحساسة لمضاد Trimethoprim (Brook *et al.*, 2001).

2-10أنزيمات البيتالاكتاميز β-Lactamase enzyme:

تعد أنزيمات البيتالاكتاميز من الأنزيمات الدفاعية المهمة التي تنتجها الأجناس البكتيرية للتغلب على تأثير مضادات البيتالاكتام وحماية خلاياها من التحلل بوساطة مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات (Valverde *et al.*, 2004).تنتمي أغلب أنزيمات البيتالاكتاميز الى عائلة السيرين التي تحتوي على الحامض الأميني السيرين في الموقع الفعال للأنزيم، وهي تشبه أنزيمات البروتينات المرتبطة بالبنسلين (PBPs)، لذا من المحتمل أن تكون أنزيمات البيتالاكتاميز مشتقة من أحد هذه الأنزيمات والداخلة في تصنيع الجدار الخلوي، وبعضها الآخر ينتمي لمجموعة أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية التي تتضمن أيونات معدنية مثل الزنك الضرورية لفعاليتها كما هو الحال في أنزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من بكتريا *Bacillus sereus* (Livermore and Yuan,2004) .

تحطم هذه الأنزيمات في البكتريا الموجبة والسالبة لملون غرام أصرة الأمايد amide bond في حلقة البيتالاكتام جاعلة منها جزيئات غير فعالة بايولوجياً ; Al-Jasser , 2006) Al-Jubori *etal*,2012).وتدعى الجينات المشفرة لهذه الانزيمات *bla* genes وقد تكون محمولة بلازميديا او كروموسوميا (Fluit *etal.*, 2001).

2-10-1 فعالية أنزيمات البيتالاكتاميز:

تعمل أنزيمات البيتالاكتاميز على تثبيط عمل مضادات البيتالاكتام من خلال كسرها لأصرة الأمايد (Amide bond) المتوافرة في حلقة البيتالاكتام (β -Lactam ring) (Hall *et al.*, 2004) مؤدية إلى تحطيم جزيئة المضاد، يتحول بعدها المضاد إلى مركب فاقد الفاعلية . يطلق على المركب الناتج من تحطيم البنسلينات أسم حامض البنسلويك Penicilloic acid ويحتوي على مجموعتين حامضيتين في حين هناك مجموعة واحدة في المركب الأصلي ويكون المركب الجديد مستقراً (Livermore, 1995)، بينما ينتج مركب وسط غير مستقر يدعى

حامض السيفالوسبوريك Cephalosporic acid من تكسير السيفالوسبورينات ،وسرعان ما يتفكك الى جزيئتين غير فعالة(Livermore, 1995).

2-10-2انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف:

Extended Spectrumβ-Lactamases (ESBLS)

شهد العقدان الأخيران من القرن الماضي ظهور نمط جديد من المقاومة لمشتقات البيتالاكتام سيما السيفالوسبورينات بين سلالات العائلة المعوية، والزوائف، ويعود سبب هذه المقاومةلإنتاج أنزيمات تشفر أغلبها من قبل بلازميدات قادرة على تحطيم مجاميع مضادات البيتالاكتام الحديثة مثل السيفتازيديم والسيفوتاكسيم والسفترياكسون والازترونام والسيفوكسيتين والسيفوتيتان والأميبينيم (Chaudhary and Aggarwal, 2004).هي أنزيمات لها القابلية على تحليل البنسلينات والجيل الأول والثاني والثالث والرابع من Cephalosporins, Monobactam Aztreonan، أما Cephamycins مثل Cefoxitin والـCarbapenems مثل الـMeropenem, Imipenemلاتتأثربهذه الأنزيمات (Paterson *etal.*,2005).

2-10-3انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo – β– Lactamase:

الكاربابنيمCarbapenem صنف من المضادات الحيوية تتألف منImipenem ، meropenem،Ertapenem،Doripenem التي تعد الملاذ الآمن والمؤثر للعلاج من الإصابات التي تحدث بوساطة البكتريا السالبة لصبغة كرام ذات المقاومة المتعددة (الزنكنة,2013).

مقاومة البكتريا للكاربابنيم تحدث بآليات عدة منها إنتاج أنزيمCarbapenemases والوصف الحديث له هو أنزيم Newdelhimetallo–β– Lactamase (NDM–1) الذي يتوافر على عناصر جينية متحركة والتي تمنح المقاومة لكل مضادات البيتالاكتام (Wayne,2010). وهذه العناصر الجينية المتحركة عبارة عن خيط من الـ DNA لها القابلية على الإنتقال من بكتريا الى أخرى بواسطة بلازميد أو ترانسبوزون وعادة ماتمنح هذه الجينات

المقاومة لكل من Fluoroquinolones, Aminoglycosides, Trimethoprim–Sulfamethoxazole (Pillai *etal.*,2011).

2-11 خلط المضادات Combination of Antibiotics:

يشار الى عملية خلط المضادات بأنها اخذ مضادين أو أكثر من المضادات الحيوية لغرض المعالجة وملاحظة مدى تأثيرها على الكائنات الممرضة الاسباب التي دعت الى استخدام خليط من مضادين اواكثر بدل من استخدام المضاد وحده (Jawetz *etal.,*2001):

1- تقليل التأثير السمي للمضادات في حالة كون أحد المضادين أو كليهما ذي تأثير سمي؛ وذلك لأن الجمع (Combination) يعزز ويقوي تأثير المضاد بتركيز أقل للوصول إلى التأثير المطلوب.

2- الإفادة منه في علاج الاخماج التي يسببها أكثر من نوع من الميكروبات (الاصابات المختلطة) التي يكون فيها العلاج بأستخدام مضاد حيوي واحد غير فعال .

3- تأخير ظهور الطفرات الجرثومية المقاومة من استخام المضاد وحده في الإصابات المزمنة.

4- لإعطاء العلاج الفوري للمرضى المصابين بأمراض ماسة او يشتبه في وجود التهابات خطيرة لديهم .

تبلغ قدرة المضاد الحيوي ذروتها عند استعماله بأقصى مقاديره , ولايمكن زيادة تلك القدرة , الا إذا اشترك معه مضاد آخر (العبدلي,2010).

-أن نتائج الخلط بين المضادات الحيوية يمكن ان توصف بالحالات الاتية

(Jawetz*etal*,2001; Meletiadis*etal.*,2010; Al-Nassiry,2005; Hemaiswarya *etal* ,2008) .

- التآزر (Synergism) : في هذه الحالة تكون حصيلة التأثير على الميكروب أكثر من فعالية المضادين الحياتيين كلا على انفراد أي يعزز من قدرة المضاد ضد المايكروبات .

- الاضافة (Addition) : تأثير الجمع للمضادين على الميكروب يساوي مجموع فعالية المضادين الحيويين .
- التضاد (Antagonism) : ويشير إلى ان فعالية أحد المضادين تقل بوجود المضاد الاخر.
- غير مؤثر (Indifference) : ان التأثير الناتج من جمع المضادين لايفوق تأثير المضاد الاكثر فعالية لو استعمل لوحده .

12-2النسق البلازميدي plasmid profile :

البلازميدات عبارة عن جزيئات حلقية مغلقة من DNA وتكون صغيرة نسبياً مقارنةً مع كروموسوم الخلية وتدعى بالدنا خارج كروموسوم Extra chromosomal وهي تتضاعف ذاتياً داخل الخلية وتحتوي الجينات الضرورية لصيانة وظائف البلازميد كبدء التضاعف والسيطرة عليه(الطائي ,2005).

يمكن للبلازميدات إن تحمل جينات الضراوة التي تشفر للذيفانات أو البروتينات الأخرى التي تزيد من أمراضية البكتريا ، وعلى سبيل المثال فان السلالات الضارية من بكتريا *E. coli* المسببة للإسهال قد تنتج نوعين مختلفين من الذيفانات المعوية و ربما يكون احدهما أو كلاهما بلازميدي الموقع (Poston and Naidoo , 1983) وصفة إنتاج الكبسولة في بكتريا *Klebsiella pneumoniae* تكون الجينات المسؤولة عنها محمولة على بلازميد (Pinskyetal.,2009).كذلك فان حمل البلازميدات لجينات المقاومة المتعدد (multiresistance) يضيف بعدا آخر إلى الخطورة الصحية التي تشكلها بلازميدات الضراوة (Kumar and Talwar ,2010).

للبلازميدات قابلية على التضاعف الذاتي بدون الإعتماد على كروموسوم المضيف لأحتوائها على منشأ التضاعف تدعى Replicon , كذلك يتميز البلازميد بأنه مستقر وراثياً ويحتوي على جينات من (300−1) جين ويوجد في بدائية النواة Prokaryotes مثل البكتريا وكذلك في حقيقية النواة Eukaryotes مثل الخمائر والفطريات وتكون الجينات المحمولة على البلازميد غير ضرورية لحياة وتكاثر الخلية البكتيرية والبكتريا الفاقدة للبلازميد تكون طبيعية في وظائفها (Prescott *et al* ., 2005).

تستطيع بعض البلازميدات الانتقال بين الخلايا البكتيرية فتسمى بالبلازميدات الاقترانية (Conjugative plasmids)فيما لايمتلك بعضها الآخر قدرة الانتقال بين الأنواع البكتيرية المختلفة ويطلق عليها بالبلازميدات غير الاقترانية (Non conjugative plasmids) (المرجاني,2011).

أشارت دراسات متعددة الى كون جينات مقاومة كل من مضادات البيتا لاكتام ، الأمينوكلايكوسايد ، الكلورامفينيكول ، الناليديكسيك أسيد ، الأرثرومايسين ، التتراسايكلين و انتاج السموم محمولة على البلازميدات في البكتريا السالبة لملون غرام ، أما جينات مقاومة مضاد التراي ميثوبريم فقد تكون محمولة على البلازميدات أو على الكروموسوم (Tenover *et al.*,1989). ذكرت Yah واخرون (2007) في دراسة عن الانتشار الواسع لجينات المقاومة البلازميدية بين انواع ال *Proteus* أن 44% من المقاومة للمضادات الحيوية كانت بوساطة البلازميد، 32٪ بوساطة كروموسوم،في حين أن 24٪ من نمط المقاومة للمضادات الحيوية غيرمؤكد (Karim .,2010).

13-2 تحييد البلازميدات Plasmids Curring :

يعرف التحييد بأنه عملية فقدان العزلات البكتيرية للبلازميد ويمكن ان يكون فقدان البلازميد ذاتياً Spontaneous من خلال فشل نسخة البلازميد في الانتقال الى الخلية الجديدة او بأستعمال عوامل كيميائية Chemical agent وعوامل فيزيائية Physical agents ((Prescott *et al* , 2005, كذلك استعملت بعض مضادات الحيوية في التحييد مثل Novobiocin و Rifampicin (Raja and Selvam,2009;Chin *etal,*2005) وكذلك Mitomycin– C (Trevorse,1986) أوبأستعمال مستخلصات نباتية Plant extract (Reuter and Sendel,1994) وقد أشارت Ahmed (2010) ان الزيت الاساس لنبات الروزماري (اكليل الجبل) له القابلية على تحييد البلازميدات من خلال الترحيل الكهربائي لدنا البلازميدي والكشف عن فقدان الصفة المظهرية لمقاومة للمضادات الحيوي في بكتريا *Ecoli*. إن آلية عمل هذه المواد في التخلص من البلازميد متعلقة بأحداث ضرر في DNA البلازميد الذي يؤدي بالتالي الى المنع من عملية تضاعفه الأعتيادي بدون التأثير على تضاعف الكروموسوم (Kalkarni and Kanekar,1998) .

يمكن اجراء تحييد البلازميدات بوساطة عوامل فيزياوية متمثلة بتغيير درجة الحرارة المثلى لنمو البكتريا و تغيير الحموضة pH (Patwardhan *et al.*,2008)الا ان هذه الطريقة ذات تأثير جزئي وكفاءتها أقل اذا ما قيست بالطريقة المعتمدة على استخدام العوامل الكيمياوية وتشمل المواد الكيميائية مادة SDS (Lavanya *et al.*,2011 ;Elbanna *et al.*,2010) واليوريا UREA ،والأكردين البرتقالي Acridine Orange، وبروميد الأثيديوم Ethidium bromide (Lee *et al.*,2009 ;Patwardhan *et al.*,2008) .

إن آلية التحييد بالأكردين البرتقالي تكون بتثبيط تضاعف البلازميد عن طريق تخلله بين قواعد الـ DNA وان استعمال التراكيز العالية منه تثبط تضاعف الكروموسوم (Friefeder,1987). تكمن أهمية التحييد في تحديد الصفات المحمولة على البلازميدات ، اذ تفقد البكتريا قابليتها على اظهار تلك الصفات بعد إفراغها من البلازميدات ،وهذه الطريقة يمكن استخدامها عند عدم وجود وسائل متاحة في تحديد تلك الصفات (1972, and Baldwin Sonstein).

ألمواد وطرائق العمل

3.المواد وطرائق العمل

3- 1 المواد

3-1-1 الاجهزة والمواد المستعملة

أستعملت الاجهزة المدرجة في القائمة أدناه:

الجهاز		الشركة المصنعة والمنشأ
حاضنة	Incubater	Memmert (Germany)
فرن كهربائي	Oven	Memmert
حمام مائي	Water bath	Memmert
ماصات دقيقة بأحجام مختلفة	Micropipettes	Brand (Germany)
مصدر الأشعة فوق البنفسجية	UV-Transilluminator	Herolab(Germany)
جهاز نبذ مركزي صغير	Microfuge	Heraeus (Germany)
دوارة	Vortex	Labcco (Germany)
جهاز نبذ مركزي	Centrifuge	Gallenkamp (England)
المرشحات الدقيقة	Millipore filter	Gallenkamp
جهاز التقطير	Distillatar	Gallenkamp
حمام مائي هزاز	Shaking water bath	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)
جهاز الترحيل الكهربائي	Gel electrophoresis apparatus	Helena(USA)
كاميرا رقمية نوع	Sony	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

BDH	Potassium iodide	يوديد البوتاسيوم
BDH	H_2SO_4	حامض الكبريتيك
BDH	NaCl	كلوريد الصوديوم
BDH	Ethanol	إيثانول
BDH	Tris – base	ترس قاعدي
BDH	Ethidium bromide	بروميد الأثيديوم
BDH	Potassium phosphate	فوسفات البوتاسيوم
BDH	Glucose	كلوكوز
Oxoid (England)	Hydrogen peroxide	بيروكسيد الهيدروجين
Oxoid	Peptone	ببتون
Merck (Germany)	Urea	يوريا
Merck	Boric acid	حامض البوريك
Fluka (Switzer land)	Yeast extract	خلاصة الخميرة
Fluka		EDTA
Sigma (U.S.A)	Agarose	أكاروز
Difco (U.S.A)	Tryptone	تربتون
Sandox (Australia)	Penicillin G	بنسلين جي
BDH (England)	$MgSO_4$	كبريتات المغنيسوم
BDH	Crystal violet stain	صبغة البنفسجي المتبلور

هيدروكسيد الصوديوم NaOH	Fluka (Switzerland)
كلكوز Glucose	Fluka
سكروز Sucrose	Fluka
2-2 دايبيريديل dipyridyl 2-2	Sigma
ثايمين Thymine	معمل أدوية سامراء
كلوريد الكالسيوم CaCl2	BDH
صبغة الكونكوريد Congo red stain	BDH
رباعي المثيل بارافنيلين ثنائي الأمين هيدروكسيد tetramethyl-P-phenylene-diamine dihydrochloride	BDH
فورمالديهايد Formaldehyde	BDH
أسيتون Aceton	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
الأحماض الأمينية الكازينية Casamino acids	BDH

3-1-3 الاوساط الزرعية ألمستخدمة:

الوسط		الشركة المجهزة والمنشأ
أكارماكونكي	MacConkey agar	Himedia (India)
أكارالدم الاساس	Blood base agar	Himedia
وسط مرق صويا تربتون	Tryptone Soya broth	Oxoid (England)
أكار اليوريا الاساس	Urea agar base	Himedia
وسط سترات السايمون	Simmon Citrate agar	Himedia
أكار المغذي	Nutrient agar	Oxoid
وسط MR/VP	Methyle Red/Vogas proskaur	Oxoid
أكارمولرهنتون	Muller-Hinton agar	Oxoid
وسط المرق المغذي	Nutrient broth	Oxoid
وسط نقيع القلب والدماغ	Brain-heart infusion broth	Oxoid
وسط كليغلر	Kligler's iron agar	Merseyside (U.K)
وسط الايوسين مثيلين الازرق	Eosin Methylene Blue	Himedia
أكار-أكار	Agar-Agar	Difco (USA)
ماء الببتون	Pepton water	Oxoid

3-1-4الصبغات المستخدمة :

ت	اسم الصبغة	المنشأ
1	البلور البنفسجي (Crystal violet)	Himedia (India)
2	ايودين (Gram's Iodine)	Himedia
3	سفرانين (Safranin)	Himedia

3- 1- 5 المضادات الحيوية :

3-1-5-1: اقراص المضادات الحيوية المستخدمة واقطار منطقة التثبيط القياسية (NCCLs,2007)

المضاد الحيوي	الرمز	تركيز القرص µg/ml	المنشأ
Ampicillin	Amp	30	Oxoid(England)
Imipenem	IMP	10	Bioanalyse(Turkey)
Aztreonam	ATM	30	Bioanalyse
Cefixime	CFM	5	Bioanalyse
Cefotaxime	CTX	30	Bioanalyse
Augmentin	AMC	10	Oxoid
Nitrofourantoin	NIT	300	Oxoid
Amikacin	AK	30	Bioanalyse(Turkey)
Ceftazidime	CAZ	30	Bioanalyse

Oxoid	10	TB	Tobramycin
Oxoid	10	GEN	Gentamicin
Oxoid	5	CIP	Ciprofloxacin
Bioanalyse	100	PRL	Piperacillin
Bioanalyse	25	SXT	Co-trimoxazol

3-1-5-2 مساحيق المضادات الحيوية Antibiotics Powders

المضاد	الشركة المجهزة والمنشأ
ستربتومايسين Streptomycin	GMBH-Germany
ناليديكسك اسد Nalidixic Acid	الشركة العربية لصناعة الأدوية/الأردن
سيفاتوكسيم Cefotaxime	Barcelona_Spain
أموكسيلين Amoxicillin	معمل ادوية سامراء
بنسلين جي Penicillin G	Sandox (Astralia)

3-1-6 مواد متفرقة أخرى:

1 .عدة تشخيص api 20E kit مجهزة من قبل شركة Bio'Mereux (France)

2. عدةأستخلاص الدنا DNA purification Kit مجهزة من قبل شركة(Promega (USA

3. دم بشري صنف (AB) مجهز من مصرف الدم/ ديالى

3-2 طرائق العمل :

3-2-1 تحضير المحاليل والكواشف :

حضرت المحاليل والكواشف والصبغات المستخدمة في الدراسة ، عقمت تلك التي تحتاج الى تعقيم باستخدام جهاز الموصدة Autoclave عند درجة حرارة 121 م ولمدة 15 دقيقة وتحت ضغط 15 باوند/ انج2 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. اما المواد الزجاجية فقد عقمت بالفرن عند درجة حرارة 180مْ ولمدة ساعتين.

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

حضر المحلول الملحي الفسلجي بحسب ما جاء في (Forbes *et al.*,2002) وذلك لاستعماله في اجراء التخافيف بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 90 مل ماء مقطر ثم اكمل الحجم الى 100مل ، عقم بالموصدة ، وحفظ بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال.

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

حضر المحلول حسب ما جاء في (Baron & Finegold, 1994)كما يلي:

(محلول آ) :حامض الكبريتيك 1% حضر باضافة (1) مل من حامض الكبريتيك المركز الى كمية من الماء المقطر ثم اكمل 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 انبوبة نظيفة وجافة وذات غطاء محكم لمنع التبخر وتحفظ بالظلام. تمزج محتويات الأنبوبة جيدا قبل كل استعمال.

3-2-1-3 محاليل المضادات الحيوية :

حضرت محاليل خزينة (Stock solutions) بتركيز نهائي مقداره 10 ملغم/مل حسب ما ورد في (NCCLs , 2002) لكل من المضادات الاتية:-

Amoxicillin , Cefotaxime , Nalidixic acid, Streptomycin

بإذابة 1 غم من المضاد في 90 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى 100مل، أما المضاد Nalidixic acid يذوب في 40 مل من الاسيتون النقي ويكمل الحجم الى 100مل بأضافة الماء المقطر ،عقمت هذه المحاليل بالترشيح بوساطة مرشحات دقيقة ذات ثقوب بقطر 0.22 مايكروميتر وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال .

3-2-1-4 محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز :

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

3-2-1-4-1محلول النشأ Starch Solution

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

3-2-1-4-2محلول اليود Iodine Solution

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

3-2-1-4-3 محلول البنسلين جي (Penicillin G Solution)

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

المحلول (أ):- اذيب (0.907) غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين K_2HPO_4 في كمية من الماء المقطر ، اكمل بعدها الحجم الى (100) مل .

المحلول (ب):-اذيب (0.946) غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na_2HPO_4، و (1.19) غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين (المائية) $Na_2HPO_4.2H_2O$ في كمية من الماء المقطر ، أكمل بعدها الحجم بالماء المقطرالى (100) مل، بعد ذلك أُخذ (87.6)مل من محلول (أ) و(12.4) مل من محلول(ب) خلطامعاً وضبط الرقم الهيدروجيني الى (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 الاستعمال.

3-2-1-5 محلول الفورمالديهايد (10 %):

حضر حسب ما ورد في (Backer & 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 الاستخدام.

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

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

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

حضر آنياً بأذابة 0.1 غم من صبغة السفرانين في 100 مل من الماء المقطر وعقم المحلول بطريقة الترشيح وحفظ في قنينة زجاجية معتمة وخزن في درجة حرارة الغرفة .

3-2-1-8 محلول EDTA:

حضر بأذابة 186,1غم في 1000مل من الماء المقطر مع ضبط الاس الهيدروجيني 8 pH باضافة NaOH قبل التعقيم بالمؤصدة وبعدها برد الوسط الى 45 م° (Bhalerao *et al*,2010).

3-2-1-9 محاليل عزل الدنا البلازميدي :

أستخدمت محاليل عزل الدنا البلازميدي المجهزة من قبل الشركة Promega (U.S.A) وتضم المحاليل الآتية :

1. Cell lysis buffer (CLB).
2. Neutralization Solution (NSC).
3. Endotoxin Removal Wash (ERB).
4. Column Wash Solution (CWC).
5. Elution Buffer (EBB).

Kit name : Pure Yield™ Plasmid Miniprep System .

3-2-1-10 محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions

حضرت محاليل الترحيل الكهربائي وحسب ماورد في(Maniatis *et al.*,1982) وكما يأتي :

❖ دارئ الترس بوريت TBE

حضر بتركيز نهائي (0.089) مولار ترس قاعدي (Tris – base) ، (0.089) مولار من حامض البوريك (Boric acid) و (0.002) مولار من مادة EDTA ، اكمل الحجم الى 1 لتر من الماء المقطر، ضبط الاس الهيدروجيني الى (8) وعقم بالموصدة .

❖ صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide

حضر محلول خزين تركيزه (5) ملغم/مل، بإذابة (5) ملغم من صبغةبروميد الاثيديوم في (1) مل من الماء المقطر المعقم، وخفف عند الاستعمال للحصول على تركيز نهائي مقداره (0.5%) مايكروغرام/مليلتر .

❖ دارئ التحميل Loading Buffer

حضر من (30%) كليسيرول ، (50%) TBE، (20%) ماء مقطر ، (25 .0%) صبغة بروموفينول الازرق.

3-2-2 ألكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا:

3-2-2-1 كاشف أنزيم الكاتاليز Catalase Reagent

حضر من خلط (1) مل من بيروكسيد الهيدروجين المركز (30%) مع (9) مل من الماء المقطرللحصول على تركيز 3% بيروكسيد الهيدروجين، وحفظ في الثلاجة في عبوة داكنة ، استعمل للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على انتاج انزيم الكاتاليز(Collee *et al.*, 1996).

3-2-2-2 كاشف ألاوكسيديز Oxidase reagent :

حضر آنيا من أذابة (1) غم من رباعي الميثيل بارافينيلين ثنائي الأمين ثنائي هيدوكلوريك Tetramethyl-P-phenylene diamino dihydrochloride في (90) مل من الماء

المقطر المعقم ومن ثم اكمل الحجم الى (100) مل. أستخدم هذا الكاشف للكشف عن انتاج انزيم الأوكسيديز من قبل البكتريا (Koneman *et al.*,1992).

3-2-2-3 كاشف كوفاك Kovac`s reagent:

حضر الكاشف من إذابة (10) غم من باراثنائي ميثيل امين بنزالدهايد P-dimethyl aminobenzal dehyde في (150) مل كحول ايزواميلي ثم اضيف (50) مل من حامض الهيدروكلوريك المركز ببطء حتى يكون الكاشف بلون اصفر شاحب، حفظ الكاشف في قنينة معتمة، وأستخدم للكشف عن تكوين الإندول (Koneman *et al.*,1992).

3-2-2-4 كاشف أحمر المثيل Methyl red reagent :

حضرباذابة (0.1) غم من مسحوق احمر المثيل في (300) مل من الكحول الأثيلي (95%) ثم أضيف (200) مل من الماء المقطر.

3-2-2-5 كاشف فوكس بروسكور Voges-Proskauer reagent :

يتكون هذا الكاشف من جزئين:

الجزء الأول: من أذابة (5) غم مادة الفا نفثول α-naphthol في (100) مل من الكحول الأثيلي المطلق.

الجزء الثاني:من إذابة (40)غم هيدروكسيدالبوتاسيوم في ماء مقطر،اكمل الحجم الى(100) مل.

3-2-3 الاوساط الزرعية Culture Media:

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

3-2-3-1 وسط أكار الدم Blood base agar:

حضرت قاعدة الدم الاساس بحسب التعليمات المذكورة على العبوة وعقمت بالموصدة، بعدها تركت لتبرد بدرجة حرارة 45-50 م° ثم اضيف صنف الدم AB بنسبة 5% ، ومزج جيداً بعدها صب الوسط في اطباق معقمة ، وترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، حفظ بدرجة 4 م° لحين الاستعمال ، أستخدم للعزل الاولي للبكتريا المنتجة لأنزيم Hemolysin الحال لكريات الدم الحمر.

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

حضر 950 مل من وسط اكار اليوريا الاساس Urea Base agar حسب التعليمات الواردة من الشركة المصنعة وبعد تعقيمه بالموصدة وتبريده الى 45 م° اضيف اليه 50مل من محلول 40% يوريا معقمة بالترشيح باستخدام اغشية الترشيح الدقيقة (Millipore Filter)، ثم صب بصورة مائلة في أنابيب معقمة ذات اغطية محكمة، أستخدم الوسط لغرض الكشف عن قابلية العزلات على إنتاج انزيم اليورييز (Li *et al* .,2004).

3-2-3-3 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 الاس الهيدروجيني الى 7 ، أستخدم هذا الوسط في التحري عن إنتاج الاندول (Koneman *et al*.,1992).

3-2-3-4 وسط الحركة Motility medium

حضر وفق ماورد في (Harley and Prescott ,1996) وذلك بأذابة 10غم من التربتون و5 غم من كلوريد الصوديوم و 5غم من اكار اكار في 1 لتر من الماء المقطر ,ثم عقم بالموصدة بعد ضبط الاس الهيدروجيني عند(7.2).

3-2-3-5 وسط الكونكوريد اكار Congo-red agar medium

اذيب 37غم من وسط المرق المغذي و 50 غم سكروز و10 غم من وسط اكار اكار في 900 مل من الماء المقطر , وعقم الوسط بالمؤصدة اما صبغة الكونكوريد فقد اذيب 0.8 غم منه في 100مل من الماء المقطر وعقمت بالمؤصدة ,وبعدها اضيفت الى الوسط بعد تبريده الى (55م°) وصبت في اطباق معقمة, هذا الوسط يستخدم للكشف عن قابلية البكتريا في انتاج الطبقة المخاطية slime layar(Freeman *et al*,1989).

3-2-3-6 وسط إنتاج السايدروفورM_9 المدعم (M_9 minimal medium)

حُضر الوسط الأساس وفق طريقة Sambrook *et al*. (1989) كما يأتي:

فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين	Na_2HPO_4	12.8 غرام
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	KH_2PO_4	3 غرام
كلوريد الامونيوم	NH_4Cl	1 غرام
كلوريد الصوديوم	NaCl	0.5 غرام
ماء مقطر مزال الايونات	Deiouzied H_2O	960 مليلتر

أضيفت المواد الآتية (بتركيز الخزين) المحضرة والمعقمة بالترشيح باستعمال مرشحات ذات ثقوب بقطر 0.22 مايكروميتر لكل دورق وفق ماأشار اليه Nassif and Sansonetti (1986).

الأحماض الأمينية الكازينية	Casamino acids	0.5 غرام/مليلتر
كلوكوز	Glucose	0.2 غرام/مليلتر
ثايمين (مادة قياسية) (معمل أدوية سامراء)	Thymine	5ملي غرام/مليلتر
كبريتات المغنيسيوم	$MgSo_4$	2 مولر
كلوريد الكالسيوم	$CaCl_2$	0.5مولر

حُضر وسط الحد الأدنى M_9 المدعم وأضيف اليه (2) غرام اكار لكل (100) مليلتر من الوسط ثم أضيف(0.2) ملي مولر من مادة (2.2) ثنائي بايريديل(2.2 dipyridyl) المعقمة بالترشيح خلال مرشحات دقيقة ذات ثقوب بقطر (0.22) مايكروميتر (Nassif and Sansonetti (1986)).

3-2-3-7وسط التربتكيز صويا اكار (Trypticase Soy agar (TSA:

حظر هذا الوسط باذابة 19 غم من TSA في 500مل من الماء المقطر بحسب تعليمات الشركة المصنعة ,واضيف اليه 3 % من خلاصة الخميرة وعقمت بالمؤصدة ,استخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج البكتريوسين (القصاب والخفاجي ,1992).

3-2-3-8 وسط نزع مجموعة الكاربوكسيل من الحامض الاميني اللايسين

Lysine decarboxylase broth

حُضِرَ وفقاً لما ورد في (1975) ,.Cruickshank *et al* وذلك بإذابة (2.5) غم من الببتون و(1.5) غم مستخلص الخميرة و(0.5) غم دكستروز و(0.01) غم من صبغة البرموكريسول الارجواني و(2.5) غم من الحامض الأميني اللايسين في (500) مل من الماء المقطر المعقم ثم عقم بالمؤصدة بعد ضبط الأس الهيدروجيني إلى (7).

3-2-3-9 وسط حفظ العزلات (حفظ طويل ألامد 8 -12 شهر) :

حُضر الوسط المستخدم لحفظ العزلات البكتيرية , بإضافة (15) مل من الكليسرول إلى(85) مل من مرق نقيع الدماغ والقلب (Brain heard 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 الوسط الاكار المغذي باستخدام الناقل (Loop) , وحفظت القناني في درجة حرارة (20 - م°) بعد حضانتها لمدة (24) ساعة في درجة حرارة (37م°) استخدمت هذه الطريقة في الحفظ الدائم (Ausubel *el al*., 1987) .

3-2-3-10 إدامة العزلات البكتيرية(حفظ متوسط ألامد 4 أشهر):

لقحت الانابيب الحاوية على وسط الآكار المغذي المائل (Nutrient agar slant) بالعزلات البكتيرية ثم حضنت في درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة بعدها حفظت في درجة حرارة 4 م° لحين الاستخدام وتمت عملية ادامة العزلات بشكل دوري شهرياً , وذلك بتنشيطها على الوسط المغذي السائل , ثم إعادة زراعتها على وسط مائل جديد لضمان بقاء العزلات بشكل نشط طيلة مدة الدراسة .

3-3 جمع العينات Collection of Samples:

جمعت 300 عينة تحت الاشراف الطبي المختص من النساء في صالات الولادة وبيئة المستشفى وتضمنت 100عينة من مسحات المهبل ، و 75 عينة من مسحات جروح العمليات ، 80 عينة من مسحات بيئة المستشفى (الادوات الجراحية ,الارضية والجدران ,اسرة المرضى) ، و 45 عينة من العاملين ، بإستعمال Disposable Cotton Swabs تم جمع العينات من مستشفى البتول للولادة والاطفال ، للفترة بين 27/ 8 / 2012 ولغاية 1 /12 /2012 إذ سجلت المعلومات المتعلقة بالمريض من المصدر والعمر وتاريخ أخذ المسحة وأمراض اخرى في استمارة خاصة (ملحق 1)، زرعت النماذج مباشرة بعد أخذ العينة لغرض التشخيص.

3-4 زرع العينات Samples culture :

زرعت العينات (المسحات المهبلية ،ومسحات الجروح ، ومسحات البيئة والعاملين) بشكل فوري على وسط اكار الدم ووسط اكار الماكونكي ووسط الايوسين مثيلين الازرق ، وتم تنقية العزلات على وسط الماكونكي اكار بطريقة التخطيط وحضنت كافة الاطباق هوائياً بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ، أجري بعدها عدد من الفحوصات التشخيصية المظهرية والكيموحيوية للبكتريا المعنية بالدراسة.

3-5 تشخيص العزلات البكتيرية:

3-5-1 التشخيص المظهري :

شخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على ما ورد في (Holt *et al.*,1994) إذ شخصت المستعمرات مبدئياً اعتماداً على الصفات المظهرية وتضمنت شكل المستعمرات ولونها وقوامها ورائحتها وحجمها على وسط أكار الماكونكي وأكار الدم ووسط الايوسين مثيلين الازرق Eosin methylene blue الصلب لتفرقة *Klebsiella* عن بكتريا *E.coli* ذات البريق المعدني.

3-5-2 الصفات المجهرية :

أخضعت العزلات الى الفحص المجهري بإستخدام صبغة كرام للتعرف على شكل البكتريا وترتيبها وتفاعلها مع ملون غرام.

3-5-3 الفحوصات الكيموحيوية:

1_إختبار أنزيم الكاتاليز Catalase test:

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم الكاتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين الى ماء ويتحرر غاز الاوكسجين بشكل فقاعات هوائية ، إذ نقل جزء من المزروع البكتيري الى شريحة زجاجية نظيفة وأضيف اليها بضع قطرات من3% كاشف بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بإستخدام ماصة باستور، يعد ظهور فقاعات غاز الاوكسجين دليل على ايجابية الفحص (Koneman *et al.*,1992).

2- إختبار أنزيم الاوكسيديز Oxidase test:

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم السيتوكروم اوكسيديز (Cytochrome oxidase) ، إذ شبعت ورقة ترشيح بقطرات من كاشف الاوكسيديز، وبوساطة أعواد خشبية معقمة نقلت مستعمرة من العزلة قيد الدراسة الى ورقة الترشيح ، تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون البنفسجي خلال (10) ثوانٍ من ملامسة الخلايا البكتيرية لكاشف الاوكسيديز على الورقة (Koneman *et al.*,1992).

3-إختبار الاندول Indole test:

استخدم للكشف عن وجود الاندول ، الذي يعد أحد نواتج أيض الحامض الاميني التربتوفان نتيجةً لامتلاك البكتريا لانزيم 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 لانبوبة الاختبار، تعد النتيجة موجبة عند ظهور حلقة حمراء خلال ثوان من إضافة الكاشف (Koneman *et al.*,1992).

4 _ إختبار احمر المثيل Methyl red test:

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج كميات كبيرة من احماض 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 احمر المثيل ، تعد النتيجة موجبة عند تغيير اللون الى احمر (Koneman *et al.*,1992).

5_ اختبار فوكس بروسكاور Voges –Proskaur test:

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج استيل مثيل كاربينو (اسيتوين) Acetoin إذ لقح مرق MR/VP بمزروع العزلة قيد الدراسة ، حضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 48-72 ساعة.نقل (1) مل من العالق الى أنبوبة إختبار نظيفة ، أضيف اليها (0.6) مل من محلول الفانفثول (كاشفVp1) متبوعاً (0.2) مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 40% (كاشف Vp2) مع رج الانبوبة بلطف ، تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون الاحمر بعد حوالي 15 دقيقة (Koneman *et al.*,1992).

6_ إختبار استهلاك 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 الاخضر الى الازرق لاستهلاك السترات.

7- إختبار التنمية على وسط حديد ثلاثي السكر Triple sugar iron agar (TSI):

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط (TSI) (فقرة 3-2-3-7)، بالطعن والتخطيط على المائل بالعزلات المراد تشخيصها،حضنت بدرجة (37)م° لمدة (24) ساعة. قرأت النتيجة بملاحظة تخمير سكريات الوسط من عدمه بوساطة تغير لون الكاشف الفينول الاحمر الى اللون الاصفر دليل على ان العزلات مخمرة للسكريات الثلاث فيما دلّ ظهور الفقاعات وتكسر الوسط دليل على ان العزلات منتجة لغاز CO_2. فضلاً عن تكون راسب اسود يدل على إنتاج غاز H_2S.

8_اختبار الحركة Motility test:

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط اختبار الحركة (فقرة 3-2-3-4)، بطريقة الطعن على ان تكون مسافة الطعنة مايقارب (3) سنتيمتر مع مراعاة عدم دخول الطعنة الى قعر الانبوب ، حضنت الانابيب بدرجة (37)م° لمدة (24) ساعة. النتيجة الموجبة تدل على ظهور تضبب حول الطعنة أي أن البكتريا لها القابلية على الحركة.

9_اختبار إنتاج أنزيم نزع مجموعة الكاربوكسيل من الحامض الاميني اللايسين Lysine decarboxylase

استخدم هذا الاختبار لتشخيص بكتريا *Enterobacter spp.* إذ لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي السائل Lysine decarboxylase broth بالعزلات البكتيرية وغطيت الأنابيب بشمع البرافين (وذلك للتخلص من الهواء وجعل وسط التفاعل حامضيا ولمنع حدوث أي أكسدة القلوية التي تؤدي إلى نتائج خاطئة) ثم وضعت الأنابيب في الحاضنة بدرجة (37)م° ولمدة (1-4) أيام وفي حالة إنتاج البكتيريا لأنزيم نزع مجموعة الكاربوكسيل من الحامض الأميني اللايسين مما يؤدي إلى رفع قيمة الآس الهيدروجيني وتغير لون الكاشف إلى البنفسجي مما يدل على إيجابية الاختبار(العزاوي ,2005).

3-5-4 تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص api 20E Kit :

استخدمت عدة Api 20E Kit الجاهزة وحسب تعليمات الشركة المصنعة (Bio Merieux) ذلك لزيادة التأكد من عملية تشخيص العزلات الى مستوى النوع (Species) والتي تتضمن (20) اختباراً كيموحيوياً ولجميع العزلات .

3-6 التحري عن بعض عوامل الضراوة في البكتريا:

3-6-1التحري عن إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production:

تم الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على إنتاج الهيمولايسين البكتيري بزرع هذه العزلات على وسط اكار الدم ، حضنت الاطباق بعد التلقيح في درجة حرارة 37م° ولمدة 24 (Atlas *et al.*,1995).

3-6-2 التحري عن إنتاج السايدروفور Sidrophore:

زرعت العزلات المراد تشخيصها على وسط الحد الأدنى M9 المدعم (فقرة 3-2-3-6). حضنت الأطباق بدرجة (37)م° ولمدة (48)ساعة. ظهور النمو البكتيري دليل على قدرة البكتريا على إنتاج السايدروفور (Nassif and Sanosonetti, 1986).

3-6-3 اختبار إنتاج البكتريوسين Bacteriocin :

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

زرعت البكتريا المنماة مسبقا في وسط نقيع القلب والدماغ وبعمر 24 ساعة بطريقة النشر على وسط اكار TSA المحظر في الفقرة (3-2-3-7) ثم حظنت الاطباق بدرجة (37) م° لمدة (24) ساعة. وبعدالحضن عملت اقراص بواسطة الثاقب الفليني في هذا الوسط ووضعت على سطح الاكار المغذي والمنشور عليه بالناشر مقدار (0,1) مل من مزروع كل من عزلات الاختبار البكتيرية المذكورة بعد مقارنتها مع محلول ماكفرلاند القياسي المحظر ثم حضنت

الأطباق بدرجة (37)م° لمدة (24) ساعة.سجلت النتائج وهي توافر مناطق تثبيط حول قطعة الاكار الحاوي على السلالة المنتجة.

3-6-4أختيار ظاهرة الأنثيال Swarming :

استخدم هذا الأختبار للكشف عن قابلية العزلات قيد الدراسة على أمتلاكها ظاهرة الأنثيال وأجري هذا الفحص باستخدام طريقة الاوساط الزرعية الصلبة واتبعت طريقة Liaw وجماعته (2000) وكما يأتي :

أ-لقح وسط اكار الدم الحاوي بطريقة البقع , اذ لقح مركز الطبق بـ (10) مايكروليتر من العالق البكتيري.

ب-حضنت الاطباق بدرجة 37م° ولمدة 18ساعة .

ج-ظهور حركة التموج (الانثيال) تدل على ان النتيجة موجبة .

3-6-5 اختبار إنتاج أنزيم اليوريز Urease test:

لقحت الانابيب الحاوية على وسط اكار اليوريا (فقرة 3-2-3-2)، بطريقة الطعن والتخطيط على المائل ثم حضنت بدرجة (37)م° لمدة (24) ساعة. دل تحول لون الوسط الى الوردي على إيجابية الاختبار.

3-6-6 إختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm :

أ- طريقة احمر الكونغو Congo-red Method

نقلت مستعمرة مفردة نقية على وسط اكار الماكونكي الى انبوبة اختبار حاوية على 5مل من محلول الملح الفسلجي المحظر 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 الكونكوريد المحظر في الفقرة (3-2-3-5) وحضنت الاطباق في درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 -48 ساعة ،النتيجة موجبة عندما تظهر المستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة ,اما النتيجة السالبة فتبقى المستعمرات وردية اللون(Freeman *et al*, 1989 ,. Mathur *etal,* 2006) .

ب_طريقة الانابيب Tube Method

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

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

3-تفرغ صبغة السفرانين وتقلب الانابيب على قطعة شاش نظيفة الى ان تجف بدرجة حرارة الغرفة .

4- تعد النتيجة موجبة على اساس وجود تصبيغ في قعر الانبوب وعلى الجدران وتعد النتيجة خاطئة في حالة وجود قطرات مائية اوهوائية ملتصقة على الجدار(Freeman *et al*., 1989).

ج - إختبار تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الاليزا:

أجري هذا الإختبار بحسب الطريقة التي أشار إليها Sandoe *et al*. (2003) وكالآتي:-

1- نقلت (3-4) مستعمرات من البكتريا.بعمر (24-48) ساعة ، ثم لقحت بأنابيب حاوية على (5-10) مللتر من مرق نقيع القلب-الدماغ 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 (180) مايكروليتر من مرق نقيع القلب-الدماغ في (Flat-bottomed tissue culture plate)، وخصصت لكل عزلة حفرتين ثم أضيف (20) مايكروليتر من المعلق الجرثومي المحضر إلى الحفر المخصصة لكل عزلة. وتركت 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 (37º) م لمدة (24) ساعة.

5- أزيل الوسط المتوافر في الحفر بوساطة ماصة دقيقة (Micropipette) مثبتة عند (200) مايكروليتر ثم غسلت الحفر مرة واحدة باستخدام المحلول الملحي الفسيولوجي وبمعدل (300) مايكروليتر وباستخدام 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 باستخدام ماصة دقيقة مثبتة عند (200) مايكروليتر.

7- قلب الطبق على قطعة شاش نظيفة ووضع بشكل مقلوب إلى اليوم الآتي في درجة 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 باستخدام قارىء منظومة الاليزا (ELISA reader) عند طول موجي (590) نانوميتر.

3-7 فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic suscepitibility test

أستخدمت طريقة Bauer & Kerby القياسية لاختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية (Vandepitte *et al.*,1991) وكالاتي :

- لقح 5 مل من وسط المرق المغذي بـ 3-2مستعمرات من مزارع بكتيرية نقية بعمر 24 ساعة .
- رجت الانابيب جيداً، وحضنت بالحاضنة بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة .
- قورنت عكورة النمو بعكورة المحلول ثابت العكرة القياسي لاعطاء عدد تقريبي مساوي 1.5×10^8 خلية / مل.
- نقل 0.1 مل من العالق البكتيري ونشر على وسط اكار مولر هنتون، ترك الطبق لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لحين جفاف المزروع .
- نقلت اقراص المضادات الحيوية الى سطح الوسط الزرعي بوساطة ملقط معقم بمعدل 6-7 اقراص لكل طبق .

- حضنت الاطباق بدرجة 37 م° لمدة 18-24 ساعة قيست بعدها اقطار مناطق التثبيط حول كل قرص،عدت البكتيريا حساسة (S) او مقاومة (R)اومتوسط (I)intermediate حسب المواصفات القياسية الواردة في (2007) NCCLs.

3-8 التحري عن إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز β-Lactamase Production:

3-8-1 تحضير العالق البكتيري

لقحت أنابيب إختبار تحوي كل منها على (5) مل من محلول الملح الفسلجي بـ (150) مايكروليتر 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 حسب الفقرة (3-2-1-2) وإجراء العدد الحي للخلايا في المحلول .

3-8-2 أستخدام طريقة اليود القياسية السريعة Rapid Iodometric:

أستخدمت هذه الطريقة للكشف عن قابلية العزلات قيد الدراسة على أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز وذلك حسب ما ورد في WHO (1978) ، وكما يأتي :

1. حضرت مزارع للعزلات البكتيرية بعمر 24 ساعة .
2. نقلت المستعمرات البكتيرية بوساطة العروة الى أنابيب صغيرة حاوية على (100) مايكرولتر من البنسلين جي (فقرة 3-2-1-4-3) . حضنت الانابيب لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 37 مْ.ثم أضيف الى كل انبوبة 50مايكروليتر من محلول النشأ ومزجت جيدا .
3. أضيف الى كل انبوبة في أعلاه (20) مايكروليتر من محلول اليود(فقرة 3-2-1-4-2) أذ يتحول لون المحلول الى أزرق غامق نتيجة تفاعل اليود مع النشأ . مزجت محتويات الأنابيب جيدا لمدة دقيقة واحدة.
4. أحتسبت النتيجة موجبة عند حصول تغير لوني سريع من اللون الأزرق الى اللون الأبيض خلال دقيقة واحدة فقط من أضافة الكاشف (اليود), أعيد الفحص بظهور نتيجة موجبة متأخرة (أكثر من خمس دقائق) .

3-8-3التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) :

استخدمت طريقة الأقراص المتاخمة Disc approximation للتحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وذلك حسب ما جاء في (Jarlier *etal*, 1988) وكالاتي:

1. حضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة وفق الفقرة (3-8-1) ونشر 0.1من العالق البكتيري بوساطة المسحة القطنية Swab المعقمة على أطباق حاوية على وسط مولر هنتون 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 أتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي وواحد أو أكثر من الأقراص المذكورة دليل على النتيجة الموجبة أي أنتاج العزلة للأنزيم.

3-8-4التحري عن قابلية البكتريا لانتاج انزيم الميتالوبيتالاكتميز بأستخدام طريقة اتحادالمضاد الحيوي IPM -EDTA:

1_حضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة وفق الفقرة (3-8-1)ونشر المزروع بوساطة المسحة القطنية swab المعقمة على اطباق حاوية على وسط مولر هنتون بصورة كاملة, وتركت الاطباق لمدة 10 دقائق لتجف .

2-وضع قرصين من المضاد الحيوي (10mg) Imipenem في وسط الطبق الزرعي الملقح على ان تكون المسافة بينهما3 سم .

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

4-حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 م° لمدة (18-24)ساعة

5-بعد ملاحظة مناطق التثبيط فاعن زيادة منطقة التثبيط عن 7ملم حول قرص ال Imipenem مع EDTA مقارنة مع قرص ال Imipenem لوحده تعد النتيجة موجبة وان البكتريا تعد منتجة لانزيم الميتالو بيتا لاكتميز Metallo_ Beta Lactamase MBL (Bhalerao *et al* , 2010).

3-9 قياس التركيز المثبط الادنى Minimal - Inhibitory Concentration

استخدمت طريقة التخافيف المضاعفة المتسلسلة Two Fold Dilution Method لحساب التركيز المثبط الادنى لعدد من المضادات الحياتية اعتماداً على ما ورد في Stock and Ridgway(1987) وكما يلي :

- حضرت تراكيز متسلسة متضاعفة تراوحت بين 0.5-1024 مايكروغرام/ مل لكل من المضادات الحيوية :

Amoxicillin , Cefotaxime , Nalidixic acid, Streptomycin , Ciprofloxacin

بإضافة نسب مختلفة من هذه المضادات من محاليلها الخزينة المحظرة في (الفقرة 3-2-1-3) الى وسط أكار مولر- هنتون المعقم والمبرد الى 45 م° .

- حضرت التخافيف العشرية وأختير التخفيف (10^{-2}) لمزارع البكتريا بعمر 24 ساعة بإستعمال المحلول المحلي الفسلجي المعقم .
- سحب 5 مايكروليتر من التخفيف اعلاه بوساطة ماصة دقيقة كلا على حدة ، ولقحت كقطرة واحدة على أوساط المضادات.
- كررت العملية للمزارع كافة بالتسلسل مكررين للتركيز الواحد، وتركت الاطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لحين جفاف القطرات قبل قلب الاطباق ، حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة .
- احتسب التركيز المثبط الادنى بأنه اقل تركيز يمنع ظهور النمو البكتيري بعد حضانة 18-24 ساعة بدرجة حرارة 37 م°.

تم مقارنة النتائج مع نقطة التوقف Break point ويمثل اقل تركيز يمكن ان يصله المضاد في المصل ليعطي اعلى فعالية وبعده يصبح مقاوماً.

3-10 خلط المضادات Combination of Antibiotics

يعتمد هذا الاختبار اساسا على الجمع بين مضاد السيفوتاكسيم(Cefotaxime) مع كل من الستربتومايسين(Streptomycin) والسبروفلاكسين (Ciprofloxacin) وتجربة الخلط بعدة نسب من خلال تحضير تراكيز متسلسلة من المضادات الحيوية من (0.5الى 1024) مايكروغرام/مل , ويتم التحري عن خلط كل مضادين بأستخدام البكتيريا التي أظهرت مقاومة للمضادات في الدراسة الحالية وقد أُجري الاختبار باتباع الطريقة الاتية :

- **طريقة رقعة الشطرنج Checker Board Assay**

استخدم في هذا الاختبار وسط زرعي صلب وحضرت تراكيز من مضاد السيفوتاكسيم مماثلة للتراكيز التي حضرت للمضادات الحيوية. بعدها تم حساب قيم المعامل الجزئي لتثبيط التركيز (Fractional inhibitory concentration) لاختبار جيكربورد من خلال المعادلة :

$$\text{FIC} = \frac{\text{MIC للمضاد في الخليط}}{\text{MIC للمضاد لوحدة}}$$

ومعامل FIC يمثل المجموع الجبري لقيم FIC لكلا المادتين أو اكثر والنتائج تعدّ تأزرا , اضافة, غير مؤثرة, متضادة اذا كانت قيم معامل FIC تساوي **0.5> ,1>-0.5, 2>-1, 2<**على التوالي(Koneman *et al* ,1992) .

3-11إستخلاص الدنا البلازميدي Extraction DNA Plasmid :

تم إستخلاص الدنا البلازميدي بإتباع الخطوات الآتية إعتماداً على تعليمات الشركة المجهزة (Promega U.S.A):

1.نقل 600 مايكروليترمن المزروع البكتيري بعمر18 ساعة الى أنبوبة ابندروف (1.5 مل).

2.اضيف 100 مايكروليتر من الداريء المحلل للخلايا Cell Lysis Buffer ، ومزج الخليط عن طريق تقليب الانبوبة 6 مرات .

3.اضيف 350 مايكروليتر من محلول التعادل المبرد(4-8C°) Cold Neutralization Solution ومزجت المحتويات بالتقليب عدة مرات.

4.نبذ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق .

5. نقل الراشح تقريباً 900 مايكروليتر الى عمود تنقية Pure Yield Minicolumn وأهملت الحبيبة اللزجة المتكونة .

6.وضع عمود التنقية داخل انبوبة الجمع Collection Tube ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 15 ثانية .

7.تم ازالة الراسب المتكون في أنبوبة الجمع ، وإرجاع عمود التنقية داخلها.

8.أضيف 200 مايكروليتر من محلول Endotoxin Removal Wash الى عمودالتنقية Minicolumn ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 15ثانية .

9.اضيف 400 مايكروليتر من محلول Column Wash Solution الى عمود التنقية Mincolumn ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة / دقيقة بالمنبذة الصغيرة لمدة 30 ثانية
10.نقل عمود التنقية Minicolumn الى أنبوبة إبند روف نظيفة سعة 1.5 مل ، ثم أضيف 30 مايكروليتر من محلول Elution Buffer مباشرة الى أنبوبة عمود التنقية وترك المزيج لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة .

11.نبذ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة لمدة 15 ثانية ،ثم غلقت انبوبة إبندرف الصغيرة باحكام ،وحفظ الدنا البلازميدي المستخلص بدرجة 20C°- وقد اصبح جاهزاً للترحيل الكهربائي.

3-12 الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي في هلام الاكاروز

Gel Electrophoresis

أجريت عملية الترحيل الكهربائي لفصل خليط الدنا المستخلص وفحصه :

1. تم اذابة 0.7 غم من الاكاروز في 100 مل من دارئ TBE وترك الهلام ليبرد وتصل حرارته 50 م° ، اضيف 5 مايكروليتر من محلول بروميد الايثيديوم بتركيز 5 مكغم/ مل ومزج جيداً.
2. حضر قالب صب الهلام (Tray) وذلك باحاطة حافتي القالب بالشريط اللاصق وثبت مشط تكوين الحفر (Comb) على بعد واحد سنتمتر من احدى حافتي القالب، ثم صب الهلام داخل القالب الموضوع في وضع افقي تماماً وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة وفيما بعد رفع المشط والشريط اللاصق برفق ووضع القالب داخل حوض الترحيل الكهربائي المحتوي على دارئ TBE بحيث يغمر هلام الاكاروز .
3. أجريت عملية تحميل عينات الدنا في حفر الهلام بعد مزج 10 مايكروليتر من محلول الدنا مع 3 مايكروليتر من دارئ التحميل (Loading buffer).
4. رحلت كهربائياً تحت فرق جهد قدرة 75 فولت وبمعدل مرور للتيار 20 ملي امبير ولمدة 90 دقيقة.
5. تم فحص الهلام بوساطة جهاز UV-Transilluminator بطول موجي مقداره 336 نانوميتر ، ثم صور بوساطة الكاميرا (O'Connell,1984).

3-13 تحييد الدنا البلازميدي Curing of Plasmid DNA:

أستخدمت مادة الاكردين البرتقالي Acridin orange كمادة محيدة وبالاعتماد على (Trevors,1986) وكالآتي :

- تم عمل تخافيف مختلفة للمادة المحيدة أعلاه للحصول على التراكيز (16 , 32 , 64 , 128, 256 , 512 , 3000,2500,2000,1024 مايكروغرام/مل) .
- لقحت الأنابيب الحاوية على هذه التراكيز بـ (0.1) مل من البكتيريا المنماة في المرق المغذي بعمر 18 ساعة.

- حضنت الانابيب بدرجة 37 م° ولمدة 24 ساعة ، بعدها لوحظت كثافة النمو في الانابيب مع المقارنة بأنبوب السيطرة ، وحدد تأثير المادة المحيدة على نمو البكتيريا .
- تم تحديد التركيز المثبط الادنى للمادة المحيدة من خلال تحديد اقل تركيز له عمل على تثبيط نمو البكتيريا .
- عملت تخافيف عشرية للانبوب الحاوي على أعلى تركيز للعامل المحيد الذي عنده أستمرت البكتيريا بالنمو(يسمى هذا الانبوب Subminimal inhibitory concentration).
- اخذ (0.1) مل من أنابيب التخفيف (10^{-4}) الى (10^{-8}) ونشرت على وسط الأكار المغذي وحضنت بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة .
- تم ترحيل العزلات المحيدة بالاكاروز للتحري عن فقدانها للحزم البلازميدية التي تمتلكها العزلة الاصلية .
- تم اختبار العزلات الفاقدة للبلازميد من مقاومتها للامبسلين والاموكزاسلين والكوتراموزاول والجنتامايسين والاميكاسين والسبروفلاكسين والسيفوتاكسيم .

3-14 التحليل الإحصائي

تم تحليل النتائج إحصائياً بإستعمال إختبار (t-test)عند مستوى معنوية 1% بإستخدام النظام الإحصائي SPSS (2010) لتحليل المعلومات الخاصة بقيم MIC قبل الخلط وبعده مع المضادات (Glantz, 1987) .

النتائج والمناقشة

4.النتائج والمناقشة

4-1 عزل وتشخيص بعض انواع بكتريا العائلة المعوية

Isolation and Identification of *Some Enterobacteriacea*e

4-1-1 العزل Isolation

بلغ العدد الاجمالي للعينات 300 مسحة، اظهرت 115 عينة (38.3%) نموا سالبا للزرع البكتيري و185عينة (61.7%) نمواً موجباً للزرع البكتيري, تم الحصول على (40) عينة من بكتريا العائلة المعوية من مجموع (185) عينة سريرية وبيئية اظهرت نمواً موجباً للزرع البكتيري من مصادر عزل متنوعة هي (مسحات المهبل و الجروح وايدي العمال وسرير المريض والادوات الجراحية والارضية والجدران) وتوزعت العزلات وفق ماذكر في الجدول(4-1).جمعت من صالات مستشفى الولادة في مدينة بعقوبة للمدة من 2012/8/27لغاية2012/12/1.

جدول (4-1) النسبة المئوية للعزلات الموجبة التابعة للعائلة المعوية والمعزولة من مصادر سريرية وبيئية مختلفة.

مصدر العزل	عدد العزلات الكلية	العزلات الموجبة والتابعة للعائلة المعوية	النسبة المئوية %
مسحات مهبلية	100	13	13
جروح	75	9	12
ايدي العاملين	40	3	7.5
الارضية والجدران	10	2	20
سرير المريض	40	7	17.5

الادوات الجراحية	35	6	17.1
المجموع الكلي	300	40	13.33

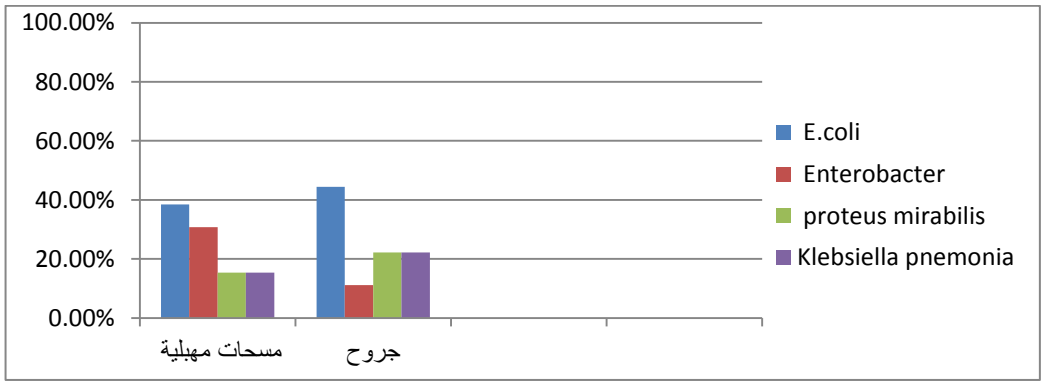
2-1-4 التشخيص Identification

تم التشخيص بالاعتماد على الفحوصات الزرعية والمجهرية بوصفه تشخيصاً أولياً إذ اعتمد شكل وقوام المستعمرات وهيأتها فضلاً عن قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز على وسط الماكونكي. اظهرت مستعمرات *E.coli* بلون وردي نتيجة تخميرها لسكر اللاكتوز ، جافة ، متوسطة الحجم ، محدبة و منتظمة و سالبة لاختبار الاوكسديز وتنمو بشكل مستعمرات ذات بريق اخضر معدني على الوسط الزرعي الايوسين مثيلين الازرق. في حين ظهرت مستعمرات *klebsiella*وردية نتيجة تخميرها لسكر اللاكتوز وبهيئة مخاطية غير منتظمة ويرجع ذلك بسبب تكوينها المحفظة . تشترك بكتريا *Enterobacter* cloacae مع النوعين السابقين بصفة ظهورها بلون وردي لقابليتها على تخمير سكر اللاكتوز ، لكن حجم المستعمرات اصغر وتكون شبة مخاطية .أما فيما يخص بكتريا *P. mirabilis* فكانت مستعمرات شاحبة اللون على وسط اكار الماكونكي بوصفها غير قادرة على تخمر سكر اللاكتوز أعطت نتيجة سالبة لاختبار الاوكسديز وموجبة لاختبار اليوريز (Urease) وتميزت هذه البكتريا بظاهرة الحركة الزاحفة (الانثيال) Swarming, اما عن الفحص المجهري فقد ظهرت جميع العزلات السابقة الذكر سالبة لملون غرام عصوية. تم الاعتماد على الأختبارات الكيموحيوية والمجهرية والزرعية لغرض تميز الانواع والتأكيد على التشخيص الاولي وكما موضح في الجدول (4−2) ملحق (2) ولكل الانواع المعزوله وفقا لما ورد في المصادر (Cruickshank *et al* .,(1976);Baron *et al* ., (1994);Holt *etal* (1994)) .، وللتأكد من تشخيص عزلات بكتريا العائلة المعوية التي تم عزلها فقد تم استخدام عدة التشخيصapi_20E التي تمتاز بالسهولة والسرعة في التشخيص لتأكيد نتائج التشخيص الكيموحيوي ، شكل(4−1) ملحق (3). وتوزعت العزلات بعد التشخيص بواقع 15 عزلة وبنسبة (37.5%) *E.coli*, 10 عزلة وبنسبة (25%)*cloacae* *Enterobacter*, 9عزلة وبنسبة (22.5%) *P.mirabilis* ، 6 عزلات وبنسبة (15%) *K.pneumoniae*.

4-1-3 توزيع العزلات بحسب مصدر العزل :

Distribution of isolates according to source of isolate

تضمنت العزلات الموجبة التابعة للعائلة المعوية والمعزولة من المسحات المهبلية13عزلة وبنسبة (13%)وتتضمن 5عزلة(38.5%) *E.coli* و4عزلة (30.8%) *Enterobacter cloacae* و2عزلة (15.4%) *proteus mirabilis* و2عزلة (15.4%) *Klebsiella pneumoniae* وجاءت هذه النتائج مقاربة الى ماتوصل اليه الجمالي(2005) بالنسبةلانواع الجراثيم المعزولة من الـ UTIs والـBV و YV اذ كانت افراد النوع *E.coli* هي السائدة من بين انواع الجراثيم ، وعزلت بنسبة (33.6%) وبكتريا *K . pneumoniae* كانت بنسبة (10.8%) ثم *P.mirabilis* بنسبة (6.9%) ، قد يعزى ذلك لأختلاف ظروف العزل وحجم العينة وطبيعة الظروف البيئية في المستشفى.كما يزداد حدوث التهاب المهبل البكتيري BV بعد حدوث العمليات القيصرية وهذا يؤكد ما أشار اليه الباحث Hendrickson سنة (2003) اذ أن ادخال القثاطر البولية Urinary Catheters التي هي عبارة عن انابيب رفيعة وضيقة تثبت في المثانة او الاحليل لطرح الادرار من المثانة إلى خارج الجسم بعد العملية القيصرية وبقائه لفترات طويلة يساعد على نمو الجراثيم ، واحياناً تكون جراثيم مخصصة للنمو في المجاري البولية ، وتزداد الخطورة كلما ازدادت مدة بقاء القثاطر. اما بالنسبة لمسحات الجروح 9 (12%) وتتضمن 3عزلة (44.44%) *E.coli* و1عزلة(11.11%) *Enterobacter cloacae* جاءت هذه النتائج مقاربة مع ما توصل اليه Alsaadi وزملائه (2012) والذين أوضحوا أن أعلى نسبة إصابة بالجروح هي بكتريا *E.coli* وبنسبة(37.14%) بينما شخصت بكتريا *Enterobacter cloacae*بنسبة (14.28%) و2عزلة(22.2%) *Klebsiella pneumoniae* وجاءت هذه النسبة متوافقة مع دراسة محلية أجراها(AL-Charrakh[b] *etal.*,2011)على عزلات العائلة المعوية كانت عزلات *K.pneumoniae* هي السائدة في عينات الجروح بنسبة (24%) و *Proteus mirabilis* (22.22%) وقاربت هذه النسبة النتائج التى توصل اليها Merdaw (2011) إذ وجد ان نسبة ال *Proteus mirabilis* المعزولة من اخماج الجروح في مستشفيات بغداد هي (13.7%) .ويوضح الشكل **(4-2)** النسب المئوية لانواع البكترية المعوية المعزولة من اخماج الجروح والمسحات المهبلية.

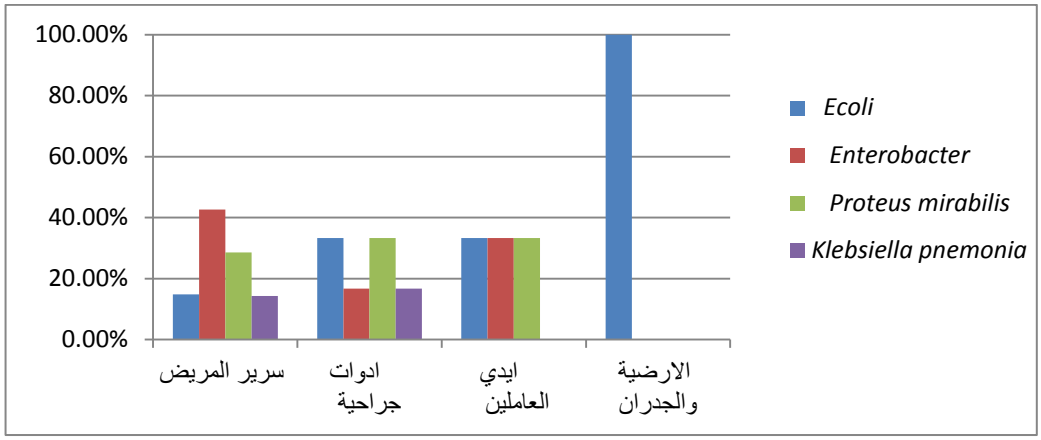


شكل (4-2) النسبة المئوية لأنواع البكتيريا المعزولة من اخماج الجروح والمسحات المهبلية.

اما بالنسبة للعينات المعزولة من بيئة صالات الولادة شكلت *E.coli* اعلى نسبة تلوث في جميع مصادر العزل وبنسبة (37.5%) وعزلت من سرير المريض (14.2%) والارضية والجدران (100%) وايدي العمال (33.3%) والادوات الجراحية (33.3%).وهذا يتفق مع ماتوصل اليه AlZarkani (2010) بان بكتريا *Ecoli* *هي الاكثر في مسحات ارضية وجدران الصالة بالنسبة لبقية الانواع* .وشكلت بكتريا*Enterobacter cloaca* بنسبة (25%) وعزلت من سرير المريض (42.8%) والارضية والجدران لم تظهر اي نسبة تلوث وايدي العاملين (33.33%) والادوات الجراحية (16.6%) وجاءت نسبتها الكلية مقاربة للدراسة التي اجراها (Shareef and Noore ;2005).

شكلت *Enterobacter cloaca*e نسبة (11.33%) من مجموع البكتريا السالبة لملون غرام المعوية المعزولة من اماكن عزل مختلفة من صالات العمليات . اما بالنسبة لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* فقد بلغت نسبتها (15%) وعزلت من سرير المريض بنسبة (14.28%) والارضية والجدران وايدي العاملين لم تظهر نسبة تلوث والادوات الجراحية بنسبة (16.66%) وجاءت نسبتها الكلية متوافقة للدراسة التي اجراها (Shareef and Noore 2005;) إذ شكلت بكتريا *Klebsiella* (15%) من مجموع البكتريا السالبة لملون غرام المعوية المعزولة من اماكن عزل مختلفة من صالات العمليات. شكلت *P.mirabilis* نسبة تلوث (22.5%) وعزلت من سرير المريض (28.5%) والارضية والجدران لم تظهر اي نسبة تلوث والادوات الجراحية(33.3%) وايدي العمال (33.33%) وجاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة تقريباً لما توصلت إليه العبيدي (2006)إذ وجدت أن نسبة التلوث *P.mirabilis* (13.5%) في

ردهة الخدج . ويوضح الشكل (4-3) النسبة المئوية للانواع المعزولة من بيئات صالات الولادة ومصادر العزل المختلفة.



الشكل (4-3) النسبة المئوية لانواع البكتريا المعزولة من بيئات صالات الولادة.

4-2 التحري عن بعض عوامل الضراوة المهمة للبكتريا قيد الدراسة

إن قابلية البكترياعلى احداث الخمج يعود لامتلاكها عدداً من عوامل الضراوة ، بعضها يلعب دوراً مباشراً والبعض الاخر له دور غير مباشر فإذا ما اجتمعت هذه العوامل فإنها ستكون المسؤولة عن إحداث الضرر في جسم المضيف ، أخضعت جميع العزلات البالغة(40) عزلة لدراسة هذه العوامل وقد كانت النتائج كما يأتي :

4-2-1 إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production

اختبرت قابلية عزلات البكتريا قيد الدراسةعلى إنتاج الهيمولايسين من خلال تنميتها في وسط أكار الدم الحاوي على 5% دم الانسان نوع AB ، وقد أظهرت النتائج الموضحة في جدول (4-3) إن عدد عزلات بكتريا *E.coli* المنتجة لانزيم الهيمولايسين 7 عزلة مما يشكل نسبة (46.7%)، تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليه العبيدي (2002) التي وجدت ان (51.4%) من عزلات *E.coli* كانت لها القابلية على انتاج الهيمولايسين, كذلك جاءت هذه النتيجة مقاربة لما توصلت اليه العزاوي (2005) الذي وجد ان 50% من عزلات *E.coli* كانت لها القابلية على انتاج الهيمولايسن . بينما كان إنتاج الهيمولايسين في بكتريا *P.mirabilis* 8عزلة ممايشكل نسبة (88.89%) , تتفق هذه النتيجة مع ماتوصل اليه الطائي (2005) الذي

وجد أن (43) عزلة من مجموعة (46) عزلة أي بنسبة (93.4%) اعطت نتائج موجبة لفحص أنتاج الهيمولايسين.أما العزلات الأخرى كانت غير منتجة للهيمولايسين بشكل تام وهي *Klebsiella pneumoniae* , *Enterobacter cloacae* ويعود سبب عدم إفرازها التام إلى إنها تمتلك أنظمة خاصة لسحب الحديد وهضمه وتمثيله في الأنسجة ويسمى هذا النظام Aerobactin إذ يعد إنتاج الهيمولايسين المسار البديل عند غياب جينات الـ Aerobactin (Opal *et al.*,1990) .

جدول (4-3) أعداد ونسب العزلات المنتجة للهيمولايسين

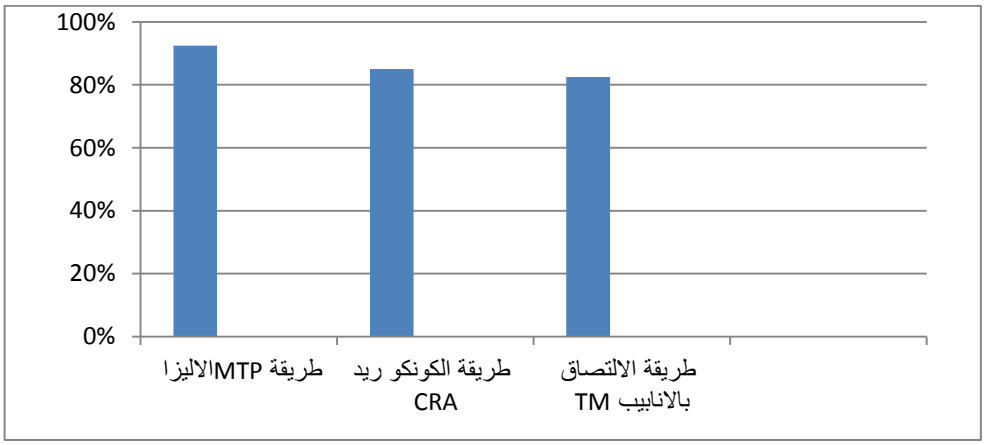
نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات الموجبة المنتجة للهيمولايسين	النسبة المئويةللعزلات المنتجة للهيمولايسين
E.coli	15	7	% 46.7
Enterobacter cloacae	10	0	%0
P.mirabilis	9	8	% 88.89
K.pneumoniae	6	0	%0

4-2-2 الحركة المتموجة (الأنثيال) Swarming

أظهرت نتائج الدراسة أن جميع عزلات *Proteus mirabilis* الـ (9) أي بنسبة (100%) قادرة على أحداث الحركة التموجية ولاسيما أنها نامية على وسط فيه نسبة الأكار أعتيادية (2-1.5%). ظهرت هذه الحركة بشكل أمواج متسلسلة ذات مركز واحد ، و تطابقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه Liaw وجماعته (2003) عندما قاموا بتنمية بكتريا *Proteus mirabilis* على وسط زرعي حاو (1.5) أكار لاحظوا ظاهرة الأنثيال من قبل هذه البكتريا , كما اتفقت مع نتائج الطائي (2005) الذي وجد ان 46 عزلة وبنسبة (100%) قادرة على احداث الحركة التموجية .

4-2-3إنتاج الغشاء الحيوي (Biofilm production):

تم التحري عن انتاج المادة المخاطية بثلاث طرائق وهي استخدام وسط احمر الكونغو(CRA) وطريقة التصاق بالانابيب وطريقة الاليزا MTP كما موضح في الشكل (4-4) واظهرت النتائج بان طريقةالاليزا هي افضل الطرائق في الكشف عن الغشاء الحيوي كانت عدد العزلات الموجبة 37 عزلة بنسبة(92.5%) ومن ثم طريقة احمر الكونغو 34 عزلة وبنسبة (85%) ومن ثم طريقة الالتصاق بالانابيب 33 عزلة وبنسبة (82.5%) وجاءت هذه الدراسة متوافقة مع ماتوصلت اليه خضر(2013) بان طريقة طبق microtiter اكثر حساسية في التحري عن انتاج المادة المخاطية اذا بلغت نسبة العزلات الموجبة 51.429% بالمقارنة مع طريقة احمر الكونغو 31.429%. بينت دراسة Nkgau و Samie (2012) أن طريقة طبق ال microtiter تعد الأكثر حساسية وسهولة في الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي بين سلالات *E.coli* وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية وان الكشف عن إنتاج المادة المخاطية يعتمد على عوامل عديدة مثل طريقة التحري المستخدمة، نوع الوسط المستخدم وظروف التحضين. كما وتعد طريقة الطبق microtiter افضل من طريقة الالتصاق بالانابيب tube methode حيث بلغت نسبة العزلات الموجبة المنتجة للغشاء الحيوي في الطريقة الاولى 92.5% بينما بلغت نسبتها في طريقة الانابيب 82.5% وتتفق الدراسة الحالية مع توصل اليه Moteeb (2008) الذي لاحظ ان عزلات ***Klebsiella*** و ***Pseudomonas*** منتجة للغشاء الحيوي وبكلا الطريقتين ولكن زادت نسبة انتاج الغشاء الحيوي في الطريقة الكمية (المطياف الضوئي) مقارنة مع طريقة الالتصاق بالانابيب وكانت اكثر دقة في تحديد الالتصاق البكتيري.

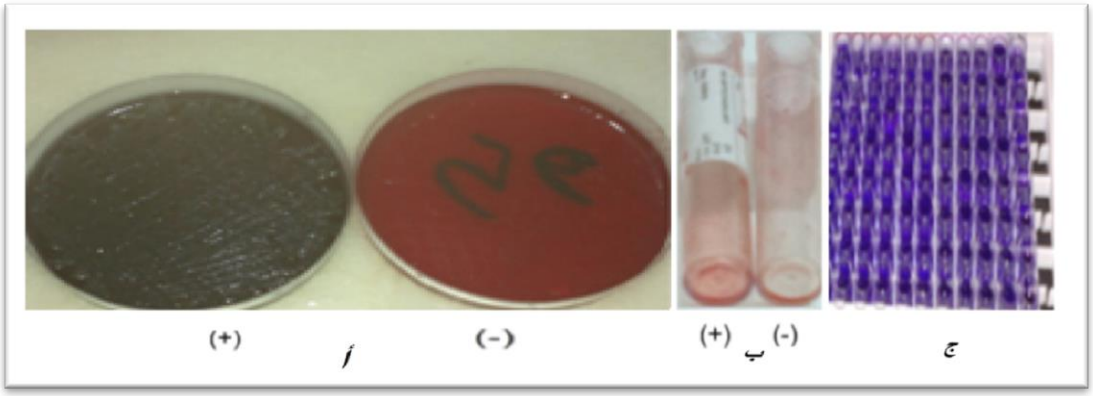


شكل (4-4)النسبة المئوية لطرق التحري عن تكوين الغشاء الحيوي .

بلغت نسبة انتاج الغشاء الحيوي في بكتريا ال*E.coli* بطريقة احمرالكونغو 86.66% وطريقة الTube method 86.66% وطريقة الاليزا 93.33% وخالفت هذه النسب ماتوصل اليه NKgau و Samie (2012) في دراسة اجراها في محافظة لومبوبو جنوب افريقيا إذ وجد ان نسبة انتاج بكتريا ال *E.coli* للغشاء الحيوي بطريقة Mtp وطريقة احمرالكونغو بنسبة 41.7%, 40.3 % على التوالي , وقاربت الدراسة الحالية ماتوصل اليه Al-chalabi و اخرون (2010) فقد بلغت نسبة انتاج الغشاء الحيوي بطريقة الTube method 90.9% مع اختلاف في سمك الطبقة المتكونة باختلاف العزلات .وبلغت نسبة ال *Enterobacter cloacae* بطريقة احمر الكونغو والTube method والاليزا 90%, 80 %, 90% على التوالي وقاربت الدراسة الحالية ماتوصلت اليه Bunyan واخرون (2013) وجدوا ان نسبة انتاج الغشاء الحيوي بطريقة الاليزا 70.8%. اما بالنسبة لنتائج بكتريا *K.pneumoniae* وجد ان لها القابلية على إنتاج الغشاء الحيوي وبنسبة 100% حسب طريقة أحمر الكونغو ،إذ ظهرت جميع المستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة وهذه هي النتيجة الموجبة شكل (4-5 أ)،وجاءت هذه النسبة متوافقة مع ما توصلت إليه الزنكنة (2013) اذا بلغت نسبة إنتاج *K.pneumoniae* للغشاء الحيوي 100%،والخفاجي (2008) إذ بلغت نسبة إنتاج *K.pneumoniae* للغشاء الحيوي وبكميات كبيرة 97.3%، ولم تتفق مع ما توصلت إليه البلداوي (2005) إذ بلغت نسبة عزلاتها المنتجة للغشاء الحيوي وبكميات كبيرة 52%, وكذلك خالفت ماتوصل اليه Al-Salihi واخرون (2012) اذا بلغت نسبة انتاج *K.pneumoniae*

للغشاء الحيوي 22.9%. وبلغت نسبتها 83.3% حسب طريقة ال Tube methode واتفقت هذه الدراسة مع ماتوصلت اليه Moteeb(2008) اذا بلغت نسبة إنتاج *K.pneumoniae* للغشاء الحيوي بهذه الطريقة 82.35%.بينما بلغت نسبتها 100% بطريقة الاليزا ,اما بالنسبة لبكتريا *p. mirabilis* اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان نسبة انتاجها بطريقة احمر الكونغو كانت 66.66%,وطريقة Tube methode 77.77% وطريقة الاليزا 88.88% وجأت النتائج متقاربة مع ماتوصل اليه Al- kubaisy و Al-Ouqaili (2008) اذا بلغت نسبة إنتاج *p.mirabilis* للغشاء الحيوي بطريقة Tube method 100%,وتوافقت ايضامع ماتوصلت اليه سلمان (2008) بلغت نسبة انتاج الغشاء الحيوي بطريقة الاليزا 91.7%.ويوضح الجدول (4-4) قابلية البكتريا على انتاج الغشاء الحيوي والنسب المئوية لكل نوع بكتيري .

هناك عوامل بيئية عدة ممكن أن تؤثر على إنتاج الطبقة المخاطية للبكتريا بأستعمال هذه الطريقة منها الأوكسجين، درجة الحرارة، وظروف أخرى ممكن أن تعطي نتائج مغايرة (Götz,2002).



شكل (4-5) طرائق الكشف عن انتاج الغشاء الحيوي أ-طريقة الكونكوريد,ب-طريقة الالتصاق بالانابيب,ج-طريقة الاليزا.

*يوضح (+)نتيجة موجبة,(-)نتيجة سالبة.

جدول (4-4)قابلية العزلات على انتاج الغشاء الحيوي والنسب المئوية لكل نوع بكتيري .

نوع العزلة / رقم العزلة	انتاج الغشاءالحيوي بطريقة Congo_red	انتاج الغشاء الحيوي بطريقة Tube methode	انتاج الغشاء الحيوي بطريقة ELISA
E13	+	+	+
E18	+	-	+
E20	+	+	+
E21	+	+	+
E38	+	+	+
E9	-	+	+
E16	+	+	+
E28	+	+	+
E32	+	+	+
E36	+	+	+
E2	+	+	+
E31	+	+	+
E37	+	+	+
E23	-	-	-
E26	+	+	+
النسبة المئوية	%86.66	% 86.66	%93.33
En6	+	-	+
En40	+	+	+
En29	+	+	+
En24	+	+	+
En35	+	+	+
En1	_	-	-
En 4	+	+	+
En30	+	+	+
En10	+	+	+
En19	+	+	+
النسبة المئوية	%90	%80	% 90
P8	+	+	+
P27	+	-	+
P34	+	+	+
P5	+	+	+
P12	-	-	-
P14	-	+	+
P 15	+	+	+

P33	-	+	+
P39	+	+	+
النسبة المئوية	% 66.66	%77.77	% 88.88
K7	+	+	+
K11	+	+	+
K22	+	+	+
K25	+	+	+
K17	+	+	+
K3	+	-	+
النسبة المئوية	%100	% 83.33	%100

K:*Klebsiella pneumoniae* ,P: *Proteus miabilis*,En: *Enterobacter cloacae*,E:*E.coli*

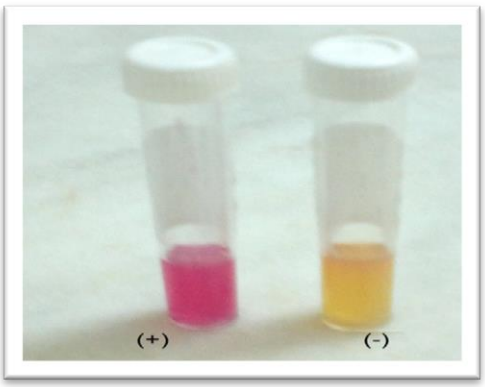
4.2.4 إنتاج أنزيم اليورييز(Urease production) :

تعد قابلية البكتيريا على أنتاج أنزيم اليوريز عاملاً من عوامل ضراوة البكتيريا إذ يعمل الأنزيم على تحليل اليوريا وتحرير الأمونيا القاعدية التي تعمل على رفع الأس الهيدروجيني للوسط مما يؤدي الى تغيير لون الكاشف احمر الفينول الى اللون الوردي في حالة أنتاج البكتيريا لهذا الأنزيم (Friedrich *et al.*, 2005) . تختلف قابلية البكتيريا في أنتاجها لهذا الأنزيم إذ وجد أن بكتيريا *K.pneumoniae* , *Proteus mirabilis* لها القابيلة على أنتاج هذا الأنزيم ، في حين لم تنتج *E.coli* , *Enterobactercloacae* هذا الأنزيم. أجري الفحص على وسط اليوريا وقراءة النتائج بعد مرور 24 ساعة للتعرف على قابلية العزلات لأنتاج الأنزيم .يوضح الجدول(4-5) قابلية عزلات البكتيريا على أنتاج الأنزيم،إذ نلاحظ ان بكتريا *K.pneumoniae*, *P. mirabilis*اعطت نتيجة موجبة للانزيم بنسبة 100% , وتتفق النتائج مع ما توصل إليه أسماعيل (2004) ، إذ كانت جميع عزلات *P.mirabilis* منتجة (100%) لهذا الأنزيم.واتفقت ايضا مع الطائي (2005) إذ كانت جميع عزلات *P.mirabilis* منتجة (100%) لهذا الأنزيم ايضا.واتفقت نتائج الدراسة ايضا مع ماتوصلت اليه علي (2011) إذ كانت جميع عزلات *K.pneumoniae*منتجة لهذا الأنزيم بنسبة (100%).كانت عزلات *E.coli* غير منتجة لهذا الإنزيم وهذا ايضاً يتفق مع ما توصل إليه Friedrich وجماعته (2005) إذ تم عزل عزلة واحدة فقط من مجموع 58 عزلة كانت منتجة للأنزيم وأوضح أن الأنتاج الضئيل لهذا الأنزيم غير معروف السبب.واتفقت ايضا مع ماتوصلت اليه العبيدي (2006) إذ كانت جميع عزلات *E.coli* غير منتجة لهذا الانزيم . وكانت عزلات *Enterobacter cloacae* غير منتجة لهذا

الانزيم واتفقت هذه النتيجة مع ماتوصل اليه برهان الدين واخرون (2012).وتوضح النتيجة الايجابية للاختبار في الشكل (4-6).

الجدول (4- 5) أعداد ونسب العزلات المنتجة لأنزيم اليوريز

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات الموجبة المنتجة لانزيم اليوريز	النسبة المئويةللعزلات المنتجة لأنزيم اليوريز
E.coli	15	0	%0
Enterobactercloacae	10	0	%0
P.mirabilis	9	9	%100
K.pneumoniae	6	6	% 100



الشكل (4-6)النتيجة السالبة والموجبة لاختبار أنتاج انزيم اليوريز .

يوضح (+)نتيجة موجبة, (-)نتيجة سالبة

4-2-5 التحري عن أنتاج السايدروفورات Siderophores

أظهرت النتائج والموضحة في جدول (4-6) أذ وجد ان نسبة انتاج بكتريا ال *E.coli* للسايديروفور 53.3% وكانت هذه النسبة مقاربة مع ماتوصل اليه Bnyan واخرون (2010) ان نسبة انتاج هذه البكتريا للسايدروفورات بلغت 76.6% .وبلغت نسبة انتاج ال

Enterobacter cloacae للسايدروفور 100% ووافقت هذه النسبة ماتوصل اليه Mokracka واخرون (2004) حيث كان انتاج بكتريا(99%) *E. cloaceae* ,(100%)*E. aerogenes* ,(100%) *E. sakazakii* وبلغت نسبة انتاج السايدروفور في بكتريا *K.pneumoniae* (100%) ووافقت النتائج مع ماتوصلت اليه Al-Salihi واخرون (2012) إذ بلغت نسبة انتاج السايدروفور 100% وكذلك اتفقت مع ماتوصل اليه خلف وجرجيس (2011) الذين اشارو الى قابلية جميع العزلات على انتاج حاملات الحديد مما يؤكد دورها في امراضية هذه الجراثيم .وبلغت نسبة انتاج بكتريا *Proteus mirabilis* للسايدروفور 11.11% .ان اجناس العائلة المعوية تقسم الى مجموعتين اعتمادا على قدرتها على انتاج Aerobactin المجموعة الاولى تضم السلالات ذات المعدل الواطىء لانتاج Aerobactin وتضم اجناس *Proteus,Serratia,Salmonella*, والمجموعة الثانية تضم السلالات ذات المعدل العالي لانتاج Aerobactin وتضم جنس *Ecoli*.

مما تجدر الإشارة إليه هنا ان العزلات القادرة على تكوين نظام السايدروفور جميعها غير قادرة على إنتاج الهيمولايسين على وسط اكار الدم ويبدو واضحاً من ذلك ان هناك علاقة بين إنتاج الهيمولايسين وتكوين السايدروفور, وهذا يؤكد نتيجة نمو العزلات على وسط أكار الدم وعدم إنتاجها للهيمولايسين إذ تلجأ البكتريا المعوية غير المنتجة للهيمولايسين الى إنتاج السيدروفورات لكي تتمكن من سحب الحديد من مركباته لحاجتها الضرورية له.

الجدول (4- 6) أعداد العزلات المنتجة للسايدروفور ونسبها

نوع العزلات	عدد العزلات الكلية	عدد العزلات الموجبة المنتجة للسايدروفور	النسبة المئويةللعزلات المنتجة للسايدروفور
E.coli	15	8	% 53.3
Enterobacter cloacae	10	10	% 100
P.mirabilis	9	1	%11.11
K.pneumoniae	6	6	% 100

4-2-6إنتاج البكتريوسينBacteriocin production

بينت النتائج وكما هو واضح في الجدول (4-7) بأن عدد عزلات بكتريا *E.coli* المنتجة للبكتريوسين 11(73.3%) وبكتريا*Enterobacter cloacae* 7 (70%) وبكتريا *P. mirabilis* 6(66.66%) وبكتريا *K.pnemunia* 3(50%) وجاءت هذه النتائج متقاربة جزئيا مع ماتوصل اليه AL- Dhumaina(2005) ,إذ اشار ان نسبة انتاج بكتريا *E.coli* , *Enterobacter spp*, *P.mirabilis* , *K.pneumoniae* ,52.01%, 92.6% ,67.9 %, 70.1% على التوالي. وكانت النسبة متقاربة مع ماتوصلت اليه الزنكنة (2013) اذ بلغت نسبة إنتاج *K.pneumoniae* للبكتريوسين (40,9%).وخالف AL-Hamadan واخرون (2007) نسبة انتاج البكتريوسين في بكتريا ال *Proteus* spp التي بلغت(20%).إن اختلاف نسب العزلات المنتجة بين دراسة وأخرى يعتمد على عزلات الاختبار بصورة أساسية، قد تكون عزلة الاختبار متحسسة لنوع معين من البكتريوسين لكن إظهار الفعالية القاتلة يعزى إلى افتقارها للمستقبلات الخاصة بنقلة ، أو قد ينتج لكن بكميات قليلة لا تتمكن من قتل الخلية الحساسة (Tagg *et al*. ,1976) ، كما قد تتعرض البكتريا إلى طفرات معينة لسبب أو لأخر مما قد ينتج عنه فقدان المستقبلات الخاصة للبكتريوسين, وبالتالي تصبح عزلة الاختبار مقاومة ، فقد أشار Cursino *et al*. (2002) إلى إن حدوث تحوير المستقبلات الخاصة للبكتريوسين نتيجة حدوث طفرات تؤدي إلى إن تكون العزلات مقاومة .وقد يعزى السبب ايضا إلى عدم وجود عزلة متحسسة أو إلى عدم إنتاج البكتريوسين أصلاً، كما أظهرت الخلايا المنتجة مناعة ضد البكتريوسين المنتج من قبلها، وغالباً ما تشفر لإنتاج البكتريوسينات مجموعة جينية تحمل عادة على بلازميد وتتكون من ثلاث جينات: جين إنتاج البكتريوسين Bacteriocin Gene وجين يشفر لبروتين المناعة Immunity Gene ويؤدي إلى عدم تأثر الخلية المنتجة بالبكتريوسين وجين التحلل Lysis Gene الذي يشفر لبروتين محلل يساعد في عملية تحرر البكتريوسين من الخلية المنتجة، لاتعد البكتريوسينات من عوامل الضراوة المباشرة , وإنما تدعم نمو البكتريا وتكاثرها في البيئات التي تتواجد فيها كالأمعاء مثلاً (Riley, 1998). أُستخدمت في الدراسة الحالية الوسط الصلب TSA مضافا إليه خميرة

بنسبة (1%) إذ أشار الباحث Riley *et al.*,2003 أن إضافة خلاصة الخميرة يزيد من انتاج البكتريوسين.

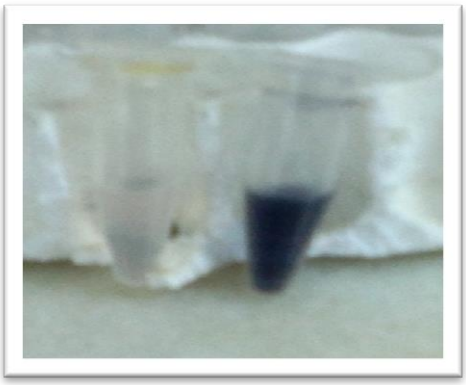
جدول(4-7) قابليةعزلات البكتریاعلى إنتاج البكتريوسين .

نوع العزلة	قطرالتثبيط / ملم	نوع العزلة	قطرالتثبيط / ملم
E13	(18)ملم	En6	(4)ملم
E18	-	En40	(6)ملم
E20	(15)ملم	En29	(16)ملم
E21	(12)ملم	En24	(11)ملم
E 38	(8)ملم	En35	(8)ملم
E9	(11)ملم	En1	_
E16	(10)ملم	En4	_
E28	(14)ملم	En30	(10)ملم
E32	(8)ملم	En10	_
E36	-	En19	(18)ملم
E2	-		
E31	(12)ملم		
E37	-		
E23	(6)ملم		
E26	(14)ملم		
النسبة المئوية	%73.3	النسبة المئوية	%70
P8	-	K7	-
P27	(20)ملم	K11	(20)ملم
P34	(18)ملم	K22	(22)ملم
P5	_	K25	-
P12	(15)ملم	K17	(15)ملم
P14	(18)ملم	K3	-
P 15	_		
P33	(14)ملم		
P39	(12)ملم		
النسبة المئوية	%66.66	النسبة المئوية	%50

4-3التحري عن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز Detection of β-Lactamase production

يتضح من الجدول (4-8) شكل(4-7) ان نسبة إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز كانت (%50,%55.55,%60,%73.33) *E.coli* , *En.cloacae* , *P.mirabilis*, *K.pneumoniae* على التوالي .

تدل هذه النسبة العالية على أنتشار المقاومة الأنزيمية بين عزلات العائلة المعوية والتي اشار إليها المسيري (2002) إذ كانت عزلاته منتجة وبنسبة 72% لأنزيمات البيتالاكتاميز، وقد اشار Wenzel وجماعته (2003) الى زيادة مقاومة البكتيريا السالبة لملون غرام المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز المعزوله من مستشفيات كندا لمضادات البنسيلينات ومضادات السيفالوسبورينات .وتقاربت نتائج هذه الدراسة مع ماتوصل اليه الباحث Jain وجماعته (2003) عند عزلها من حالات تسمم الدم في ردهة العناية المركزه للأطفال الخدج حيث كانت نسبة انتاج *E.coli* لهذا الإنزيم 63.3%, ولم توافق مع ماتوصلت اليه العزاوي (2005) الى ان نسبة إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز كانت (16.66,%33.33%) لبكتريا *E.coli*, *En.cloacae* على التوالي.واتفقت مع ماتوصلت اليه العبيدي (2006) فقد كانت نسبة عزلات *P.mirabilis* المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز 55% واتفقت ايضا مع ماتوصل اليه Al-Hamadan واخرون (2007) كانت نسبة عزلات *Proteus* spp المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز بنسبة (40%), ولم توافق الجميلي (2001) الذي اشار ان عزلاته كانت منتجة بنسبة 15.9%.واتفقت نتائج الدراسة مع ماتوصلت اليه Kandela(2011) حيث بلغت نسبة انتاج *K.pneumoniae* للانزيم (50%) وتتفق ايضا مع دراسة قام بها (السعدون,2007) إذ بلغت نسبة إنتاج *K.pneumoniae* لهذا الأنزيم (50%) ولم تتفق مع ماتوصلت اليه الزنكنة (2013) حين اظهرت نتائج دراستها ان (19) عزلة من مجموع (22) عزلة من بكتريا *K.pneumoniae* أعطت النتيجة موجبة للفحص وبنسبة (86.4%).إن توافر بعض العزلات التي أعطت نتيجة سالبة لفحص البيتالاكتاميز ومقاومتها لمضاد واحد أو أكثر يدل على توافر آليات مقاومة أخرى غير البيتالاكتاميز مثل تغيير بروتينات الغشاء الخارجي بوصفها خطوة لتغيير موقع الهدف (Poirel*et al.*,2000)، أو أمتلاك حاجز النفاذية (Rice *et al.*,2000) بأعتبار إن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز ليست الآلية الوحيدة في مقاومة مضادات البيتالاكتاميز.



الشكل (4-7) أختبار التحري عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز .

الجدول (4- 8) أعداد العزلات المنتجة لانزيم البيتالاكتاميز ونسبها

نوع العزلات	عدد العزلات الكلية	عددالعزلات الموجبة المنتجة لانزيم البيتالاكتاميز	النسبة المئويةلانتاج البيتالاكتاميز
E.coli	15	11	% 73.33
Enterobacter cloacae	10	6	% 60
P.mirabilis	9	5	% 55.55
K.pneumoniae	6	3	% 50

4.4 التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Detection of Extended Spectrum β-Lactamase Enzyme :

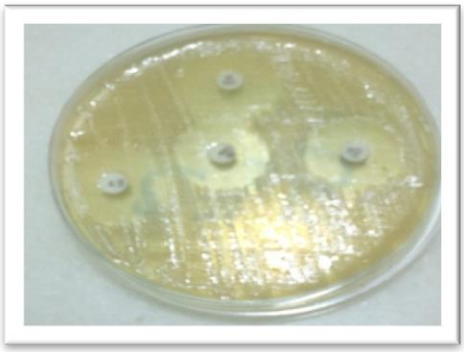
أستخدمت في هذه الدراسة طريقة الأقراص المتاخمة Disk approximation للتحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعةالطيفExtended-spectrumβ-Lactamase(ESBLs)،وهي من الطرائق السهلة والدقيقة , وتعد النتيجة موجبة عند حدوث أتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي الحاوي على خليط الأموكزاسلين/ حامض الكلافيولنك وواحد أو أكثر من المضادات الأخرى امثال Cefotaxime , Ceftazidime، Piperacillin شكل (4-8).

أخضعت جميع العزلات قيد الدراسة والبالغ عددها (40) عزلة للكشف عن انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وبلغت نسبة انتاج العزلات الكلية (12.5%) وتقاربت هذه النسبة مع ماتوصل اليه Al-Marjani واخرون (2008) إذ اشاروا الى ان عزلتين من مجموع 30 عزلة تحت الدراسة كانت منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وبنسبة (6.66%) ولم تتفق مع ماتوصلت اليه Al-Salihi وآخرون (2012) إذ اظهرت النتائج ان هنالك 28 عزلة موجبة من مجموع 48 (58.33%) بواقع 19 و3 و 6 عزلات لكل من*Ps.aeruginosa* , *P.mirabilis* , *E.coli* على التوالي .وقد أشارت النتائج في الجدول (4-9) الى أن بكتريا *E.coli* كانت منتجة للانزيم بنسبة 6.66% وجاءت هذه النسبة متوافقة مع ماتوصل اليه Kadhium واخرون (2011) اظهرت نتائجهم ان نسبة انتاج هذا الانزيم في بكتريا *E.coli* 4.8% , ولم توافق ماتوصل اليه Jabbar (2011) إذ بلغت نسبة عزلات *E.coli* مقدرتها على انتاج انزيمات بيتالاكتاميز واسعة الطيف 100%,وبلغت نسبة انتاج بكتريا *Enterobacter cloacae* 10% واتفق جزئيا مع ماشارت اليه الاسدي (2009) فقد اظهر جدول النتائج الخاص بالانزيمات واسعة الطيف ان بكتريا *Enterobacter cloacae* لم تكن منتجة لهذا الانزيم .وبلغت نسبة انتاج بكتريا *P.mirabilis* 22.22% ووافقت هذه النسبة ماتوصل اليه الطائي (2005) الذي أشار الى أن 12 عزلة من مجموع (46) عزلة أعطت نتيجة موجبة لأختبار أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs أي بنسبة (26.08%) , وتقاربت نتائج الدراسة الحالية ايضا مع النتائج التي توصل اليها Luzzaro واخرون (2006)إذ وجدوا أن نسبة إنتاج جرثومة *P.mirabilis* لأنزيمات (ESβLs) بالنسبة للمرضى المراجعين للمستشفى (39.2%)،ولم توافق ماتوصل اليه خلف وكاظم (2009) إذ اثبتت دراستهم ان نسبة انتاج عزلات *P.mirabilis* لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف 100%.واظهرت نتائج دراستنا الحالية ان نسبة انتاج *K.pneumoniae* لانزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف بلغت (16.66%) وتقاربت نتائج *K.pneumoniae* مع دراسة اجراها الباحثان Aruna and Mobashshera (2012) إذ بلغت نسبة إنتاج البكتريا لهذا الأنزيم (27.5%) ولم تتوافق هذه النسبة مع دراسة أجراها الباحثون Shakib واخرون (2012) على عزلات*K.pneumoniae*المنتجة لهذه الأنزيمات،إذ بلغت نسبة إنتاجها حوالي (42.3%).

أشار الباحث Winokur (2001) إلى أن تشفير هذه الأنزيمات يكون بوساطة بلازميدات كبيرة الحجم تتراوح بين 80 الى 300 كيلو زوج قاعدة تنتقل بين الأنواع البكتيرية المختلفة، وفضلا" على ذلك فأنها تحمل جينات تشفر إلى مقاومة مضادات بيتالاكتام أخرى.أكد الباحثان (2011) Sarojamma and Ramakrishna إن إنتشار السلالات البكتيرية المنتجة للأنزيمات الواسعة الطيف في أي مستشفى 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.

الجدول (4-9) أعداد العزلات المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ونسبها

نوع العزلات	عدد العزلات الكلية	عددالعزلات الموجبة المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف	النسبة المئويةلانتاج انزيماتالبيتالاكتاميز واسعة الطيف
E.coli	15	1	% 6.66
Enterobacter cloacae	10	1	%10
P.mirabilis	9	2	% 22.22
K.pneumoniae	6	1	%16.66



الشكل (4-8)اختبار التحري عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف .

4-5التحري عن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميزالمعدنية-Detaction of Metalloβ Lactamase Production :

أظهرت نتائج هذه الدراسة إن اعلى نسبة لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية كانت في *K.pneumoniae* حيث أنتجت 2 عزلة من عزلات البكتريا قيد الدراسة والبالغة (6) عزلات هذا الأنزيم وبنسبة 33.33 % (جدول 4-10) ، وجاءت هذه النسبة متوافقة نسبيا مع دراسة قام بها Patel *etal.*,(2008) إذ بلغت نسبة إنتاج البكتريا لهذا الانزيم 40% , ولم تتفق مع ماتوصل اليه Charan واخرون (2012) إذ بلغت نسبة إنتاج *K.pneumoniae* لهذا الانزيم من 71.9-50%.وتليها بكتريا *En.cloacae* وبنسبة 10% في حين لم تظهر عزلات *Ecoli* *P.mirabilis,* قدرتها على انتاج الانزيم .واتفقت نتائج الدراسة مع حسين (2010) حيث اشار الى ان *E.coli* اظهرت نتيجة سالبة في انتاج الانزيم ولم تتفق معه في ان إنتاج *K.pneumoniae* للانزيم فقد اشار النتيجة السالبة لها ولم تتفق معه ايضا في انتاج ال *P.mirabilis* للانزيم فقد اشار الى قدرة 5 عزلات على انتاج الانزيمات المعدنية وبنسبة 71.85% في حين اظهرت دراستنا نتيجة سلبية لها .

اما الدراسة التي اجراها Castanheira واخرون (2011) على 39 عزلة من العائلة المعوية كانت مقاومة لمضاد الكاربابينيم وبنسبة 2.7% لكل من *K. , En. cloacae, E. coli, pneumoniae* معزولة من الهند كانت 15 عزلة تحمل جينات blaNDM-1 و10 عزلات تشفرلجينات مقاومة الكاربابنيم ,OXA-48 تدعى blaOXA-181 وايضا تمتلك blaVIM-5. وفي دراسة أجراها الباحثون Mochon*etal.*, (2011) وجدوا ان انزيمات (MBLs) تمنح المقاومة لكل مضادات البيتالاكتام عدا مضاد Aztreonam، ووجد الباحثون Mulvey*et al.*,(2011) أن حساسية البكتريا المنتجة لهذا الانزيم لمضاد Aztreonam يكون بسبب عدم قابلية الأنزيم صنف Bعلى تحليل هذا الدواء .

وفي دراسة اجريت من قبل الباحث Al-Ouqaili (2005) اشار الى بروز عزلة واحدة مقاومة لمضادات البيتالاكتاميز ومنتجة لهذا الانزيم كانت محمولة على بلازميد اقتراني . وقد يكون سبب عدم انتاج عزلات الدراسة لهذا الانزيم بوصفها حساسة لمضاد الاميبينيم بدرجة كبيرة.

أشار الباحثون (2012),.Charanetal أن أستخدام إتحاد المضادينColisten،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، أما مثبطات أنزيمات الـ MBL هي NXL104.

الجدول (4-10) أعداد ونسب العزلات المنتجة لانزيمات الميتالوبيتالاكتاميز المعدنية.

نوع العزلات	عدد العزلات الكلية	عددالعزلات الموجبة المنتجة لانزيمات الميتالوبيتالاكتاميز المعدنية	النسبة المئويةلانتاج انزيمات الميتالوبيتالاكتاميز المعدنية
E.coli	15	0	%0
Enterobacter cloacae	10	1	%10
P.mirabilis	9	0	%0
K.pneumoniae	6	2	% 33.33

6-4 إختبار حساسية البكتريا لمضادات الحياة بطريقة الأقراص Bauer-Kirby

اختبرت حساسية العزلات قيد الدراسة لـ 14 مضادا توزعت ما بين مضادات مجموعة البيتالاكتام التي شملت Cefixime و Ceftazidime و Piperacillin وCefotaxime و Imipenem و Aztreonam ومن مجموعة الامينوكلايكوسيدية Gentamycin و Amikacin و Tobramycin و Ampicillin والكوينولونات Ciprofloxacin ومضادات جرثومية Nitrofourantoin وCo-Trimoxazol , ومضاد Augmentin وهو خليط من مثبط الانزيم (Clavulanic acid وAmoxcillin) , واعتمد على قياس قطر منطقة التثبيط ومقارنة ذلك مع ماورد في (NCCLs, 2007) . ملحق رقم (4). لقد أظهرت النتائج تباين واضح في مدى أستجابة العزلات قيد الدراسة للمضادات المستعملة جدول (4-11). ان جميع عزلات بكتريا *E.coli* مقاومة لمضاد Piperacillin وCefixime و Ceftazidimeو Cefotaxime و Aztreonam وAmpicillin بنسبة(93.3%),(66.66%), (46.6%),(53.3 %) ,(60 %) , (73.33%) على التوالي, واتفقت نتائج الدراسة مع

ماتوصل اليه الحميداوي (2005) إذ اشار الى نسبة مقاومة البكتريا لمضاد Ampicillin 61.1% ومضاد Cefotaxime 42.8% ولم تتفق النتائج مع ماأشار اليه Bonomo *et al.* (2003) أن نسبة مقاومة البكتريا لمضاد Cefotaxime 13.3% ويعود 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 *et al.*, 2002).

اما بالنسبة لمضادات المجموعة الامينوكلايكوسيدية Gentamycin و Amikacin و Tobramycin (40%),(13.33%) , (13.33%) على التوالي واتفقت نتائج دراستنا فيما يخص مضاد Amikacin مع ماأشار اليه Deep وجماعته (2004) الى الحساسية العالية للبكتيريا المعزولة من ردهة العناية المركزة تجاه هذا المضاد ، وفي دراسة Tankhiwal وجماعته (2004) كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد هي 14.3% واتفقت نتائج مضاد Gentamycin مع ماتوصلت اليه العبيدي (2006) إذ بلغت نسبة مقاومة العزلات لهذا المضاد 57.8% , اما بالنسبة لمضادات مجموعة الكوينولينات Ciprofloxacin (33.3%) وافقت دراستنا ماتوصل اليه المحمداوي (2000) أبدت عزلات أيشركيا القولون مقاومة لمضاد Ciprofloxacin 47.3% وأتفقت نتائج الدراسة بخصوص مضاد Ciprofloxacin مع دراسة النداوي (2005) إذ كانت عزلاتها مقاومة وبنسبة 10.5%, اما بالنسبة للمضادين Augmentin و Co-Trimoxazol فقد بلغت نسبة المقاومة لهما (73.33%),(80%) على التوالي ووافقت نتائج الدراسة مع ماتوصلت اليه العبيدي (2006) إذ بلغت مقاومة بكتريا*E.coli*, لمضادAugmentin و97.3% وأتفقت نتائجنا ايضا مع نتائج الموسوي (2003) إذ كانت نسبة مقاومة أيشركيا القولون المعزولة من حالات تسمم الدم لدى الأطفال حديثي الولادة هي 63.6% وكانت نسبة مقاومة مضاد Trimethoprim مقاربة تقريباً لما توصلت إليه النداوي (2005) إذ كانت عزلاتها مقاومة وبنسبة 84% . من جهة أخرى كان المضادان Nitrofurantoin و Imipenem الأكثر فعالية ضد بكتريا *E.coli*, فقد كانت نسبة المقاومة للمضاد Nitrofurantoin بنسبة (6.66%) وتتفق هذه النسبة مع العبدلي(2010) فقد كانت نسبة المقاومة للمضاد (15%).

اما بخصوص مضاد Imipenem فلم تظهر أية عزلة مقاومة له فقد كانت (100%) حساسة, وهذه النسبة جاءت متفقة مع ما توصلت إليه(الغراوي,2009).

أما فيما يخص حساسية بكتريا*Enterobacter cloacae* فقد كانت المقاومة لمضادات Cefixime و Ceftazidime وCefotaxime و Aztreonam وPiperacillin وAmpicillin بنسبة (90%), (80%), (70%), (80%) ,(80%),(80%) على التوالي واتفقت النتائج مع ماتوصلت اليه العزاوي(2005) إذ اشارت الى ان نسبة مقاومة Cefotaximeبلغت (77.14%) ومضاد Ampicillin (94.28%) .اما بالنسبة لمضادات المجموعة الامينوكلايكوسيدية Gentamycin وAmikacin و Tobramycin فقد كانت نسبة المقاومة (30%),(10%),(10%) على التوالي واختلفت نتائج الدراسة مع ماتوصلت اليه العزاوي (2005) التي أظهرت نتائج الدراسة ان المقاومة لمضاد Amikacin, Gentamycin Tobramycin, كانت(71.42%,79.28%,94.28%) على التوالي.اما بالنسبة لمضادات مجموعة الكوينولينات Ciprofloxacin بلغت نسبة المقاومة(10%),اما بالنسبة للمضادين Augmentin وCo-Trimoxazol فقد بلغت نسبة المقاومة (50%) لكليهما,من جهة أخرى اظهر المضادين Nitrofurantoin وImipenem فعالية عالية ضد البكتريا فقد كانت حساسة بنسبة 90%,100%على التوالي.

أما فيما يخص حساسية بكتريا *P.mirabilis* فقد كانت المقاومة لمضادات Cefixime و Ceftazidime وCefotaxime و Aztreonam و Piperacillin وAmpicillin بنسبة (88.88%),(66.66%),(77.77%),(77.77%),(77.77%),(100%)على التوالي وتتفق النتائج مع ماتوصل اليه الطائي(2005) الذي اشار الى ان نسبة مقاومة البكتريا لمضاد الامبسلين كانت 100% واتفق Subha وجماعته (2003) في دراسة قاموا بها على اطفال في الهند يعانون من ألتهابات المسالك البولية وجدوا أن مقاومة عزلاتهم للسيفوتاكسيم كانت بنسبة 81%.

اما بالنسبة لمضادات المجموعة الامينوكلايكوسيدية Gentamycin و Amikacin وTobramycin و فقد كانت نسبة المقاومة (33.33%),(22.22%),(11.11%),على التوالي, واقفت نسبة مقاومة البكتريا لمضاد Gentamycin أسماعيل (2003) إذ بلغت نسبة المقاومة 22.5% ولم تتفق مع نتائج النداوي (2005) بخصوص إذ كانت نسبة المقاومة 50 %, اما بالنسبة لمضاد Tobramycin فأن هذه النتيجة تتفق مع ماتوصل أليه Winokur

وجماعته (2001) الذين لاحظوا أن نسبة المقاومة لمضاد التوبرامايسين بلغت33.3 % من قبل بكتريا *Proteus mirabilis* معزولة من مرضى مصابين بألتهابات المجاري البولية في كندا.

اما بالنسبة لمضادات مجموعة الكوينولينات Ciprofloxacin بلغت نسبة المقاومة (13.33%) وتتفق النتائج مع الباحثين Karlowsky وجماعته (2003) و Mutnick وجماعته (2002) وling وجماعته (2003) الذين توصلوا الى أن بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من مرضى مصابين بألتهابات المجاري البولية كانت مقاومة للسبروفلوكساسين بنسبة 11.4%، 14%، 12.3 % على التوالي.,اما بالنسبة للمضادين Augmentin وCo-Trimoxazol فقد بلغت نسبة المقاومة (77.77%) ,(55.55%)على التوالي وتتفق النتائج مع ماتوصل إليه Raka وجماعته (2004) , Abu-shaqra (2000) الى مقاومة عزلات *Proteus mirabilis* قيد الدراسة مضاد الكوتريموكزازول هي 48.7 % ، 48 % على التوالي, وتقاربت النتائج جزئيا نسبة مقاومة مضادAugmentin مع ماتوصلت اليه العبيدي (2006) حيث بلغت نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد100% .اما بالنسبة لمضاد Nitrofurantoin فقد بلغت نسبة المقاومة 11.11% واتفقت نسبة المقاومة مع ماتوصل اليه الطائي (2005) إذ بلغت نسبة المقاومة 27.02 % وهذه النتيجة لا تتفق مع ما توصل أليه Lazarevic وجماعته (1998) إذ وجد أن نسبة المقاومة له كانت 90%. من جهة أخرى اظهر المضاد وImipenem فعالية عالية ضد البكتريا فقد كانت حساسة بنسبة 100%.

أما فيما يخص حساسية بكتريا *K. pneumoniae* كانت المقاومة لمضادات **Cefixime** و **Ceftazidime** و**Cefotaxime** و **Aztreonam** و **Ampicillin** و**Piperacillin** بنسبة (83.33%),(50%),(66.66%),(66.66%),(50%),(83.33%)على التوالي وتقاربت نتائج الدراسة مع ماتوصلت اليه الزنكنة (2013) إذ بلغت نسبة مقاومة عزلات البكتريا لمضاد الامبسلين 100% واتفقت النتيجة مع ماتوصلت اليه Al-Husseini (2010) حيث اشارت الى ان البكتريا قاومت مضاد ال **Ampicillin** بنسبة (83.33%) تتفق ايضا مع ماتوصلت اليه علي (2011) التي اشارت الى ان جميع العزلات قيد الدراسة قاومت مضاد الامبسلين بنسبة عالية .اما بالنسبة لمضاد الببراسلين فقد اتفقت مع النعيمي (2002) حيث بلغت نسبة مقاومة العزلات لمضاد **Piperacillin** بنسبة 50%, وتتفق هذه النتائج مع ماتوصل إليه

(SikarwarandBatra,2011) إذ بلغت نسبة مقاومة *K.pneumoniae* لمضاد **Cefotaxime** 76%.ولم تتفق النتائج مع ما توصلت إليها الملا (2003) إذ كانت نسبة مقاومة العزلات لمضاد Cefixime 53.4%. واتفقت دراستنا مع دراسة قام بها (Sarogamma and Ramakrishna,2011) إذ بلغت نسبة مقاومة عزلاته لمضاد**Aztreonam** 70%.

اما بالنسبة لمضادات المجموعة الامينوكلايكوسيدية **Gentamycin** و **Tobramycin** فقد كانت نسبة المقاومة (16.66%),(11.11%) على التوالي , ولم تتفق دراستنا مع ماتوصلت اليه الزنكنة (2013) إذ اشارت الى انه بلغت نسبة المقاومة لمضاد **Gentamycin** للعزلات قيد الدراسة 63.3%،اما بالنسبة لمضادات مجموعة الكوينولينات **Ciprofloxacin** لم تظهر مقاومة فقد كانت حساسة بنسبة 66.66% ومتوسطة 33.33% وتتفق هذه النسبة مع ما توصل إليه الباحثون (Yedekci*et al.*,2012) إذ بلغت نسبة حساسية عزلاته لهذا المضاد 66.6%.اما بالنسبة للمضادين **Augmentin** و **Co-Trimoxazol** فقد بلغت نسبة المقاومة (33.33%) , (66.66%)على التوالي وتتفق هذه النسبة مع ما وجدته النعيمي إذ كانت العزلات مقاومة بنسبة 35% لمضاد **Augmentin** , من جهة أخرى اظهرت المضادات **Nitrofurantoin** و**Imipenem** و**Amikacin** فعالية عالية ضد البكتريا فقد كانت حساسة بنسبة 100% لكافة المضادات وتتفق مع النعيمي (2002) إذ بلغت الحساسية لمضاد**Amikacin** 85% وتتفق ايضا مع مااشار اليه Alwan واخرون (2011) الذي اشار ان مضاد**Amikacin** كان مؤثرا ضد الكثير من العزلات المدروسة. وتتفق هذه النتائج مع دراسة قام بها الباحثون (Benenson*et al.*,2011) حول حساسية العائلة المعوية ومنها *K.pneumoniae* لمضاد **Imipenem** إذ بلغت نسبة حساسية البكتريا 100% ولم تتفق النتائج مع ماتوصلت اليه الزنكنة(2013) فقد اشارت الى ان نسبة مقاومة البكتريا لمضاد**Nitrofurantoin** 50% بينما اظهرت عزلاتنا حساسية عالية وبنسبة 100% .

الجدول (4-11) يوضح النسب المئوية لحساسية العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية المختلفة.

K.pnumniae			*P.mirabilis*			*Enterobacter cloacae*			*Ecoli*			*المضادات الحيوية*
R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	
%83.33	0	%16.66	%100	0	0	%80	%10	%10	%73.33	0	%26.6	Ampicillin
0	0	%100	0	0	%100	0	0	%100	0	0	%100	Imipenem
%66.66	0	%33.33	77.77 %	%11.11	%11.11	%80	0	%20	%60	0	%40	Aztreonam
%83.33	0	%16.66	%88.88	0	%11.11	%90	0	%10	%66.66	%13.33	%20	Cefixime
%66.66	%16.66	%16.66	%77.77	0	22.22%	%70	%10	%10	%53.3	%13.33	% 33. 3	Cefotaxime
%33.33	%16.66	%50	%77.77	0	22.22%	%50	%20	%30	%73.3	%20	%6.66	Augmentin
0	0	%100	%77.77	%11.11	%11.11	0	%10	%90	%86.66	%6.66	%6.66	Nitrofourantoin
0	0	%100	22.22%	%11.11	%66.66	%10	0	%90	%13.33	%6.66	80%	Amikacin
%50	%16.66	%33.33	%66.66	%11.11	22.22%	%80	0	%20	%46.6	%6.66	%46.6	Ceftazidime
0	0	%100	%11.11	0	%88.88	%90	0	%10	%13.33	0	%86.66	Tobramycin
%16.66	0	%83.33	%33.33	0	%66.66	%30	0	%70	%40	%13.33	%46.6	Gentamicin
%66.66	%33.33	0	%11.11	22.22%	%66.66	%10	%30	%60	%33.33	%6.66	60%	Ciprofloxacin
%50	0	%50	%77.77	0	%22.22	%80	0	%20	% 93.3	0	%6.6	Piperacillin
%66.66	0	%33.33	%55.55	0	%44.44	%50	0	%50	%80	0	%20	Co-trimoxazole

أتضح من خلال النتائج المتعلقة بمقاومة المضادات أن العزلات البكتيرية جميعاً تمتلك المقاومة لاغلب المضادات المستخدمة في هذه الدراسة وبنسب متباينة , أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن أغلب العزلات البكتيرية كانت مقاومة لمجموعة البنسلينات والمتمثلة بمضاد **Ampicillin** و **Piperacillin** فقد كانت نسبة مقاومتهما(82.5%),(80%) على التوالي من مجموع العزلات الكلية اما مضادات السيفالوسبورينات والمتمثلة و**Cefixime** و **Ceftazidime** و**Cefotaxime** فكانت نسبة مقاومتها (82.5%),(60%),(65%) على التوالي من مجموع العزلات الكلية, إذ تعمل هذه المضادات على تثبيط عملية تصنيع الجدار الخلوي للجراثيم من خلال تداخلها مع عملية تصنيع طبقة الببتيدوكلايكان، وربماتعود أسباب هذه المقاومة إلى إفراز الجراثيم لأنزيم البيتالاكتميز الذي يعمل على إبطال فعالية مضادات البيتالاكتام عن طريق كسر

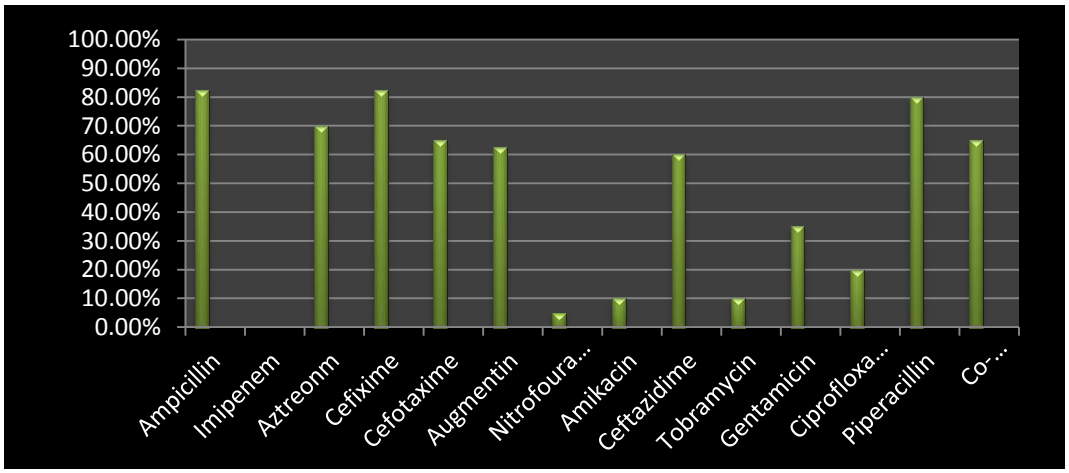
لحلقة البيتالاكتام في مجموعة البنسلينات و السيفالوسبورينات ; Gupta *et al.,* 2001) (Anderwes *et al.,* 2002.اما مضاد الازترونام Aztreonam من مضادات البيتالاكتام الحديثة فقد بلغت نسبة المقاومة له (70%) من مجموع العزلات الكلية وتقاربت النتائج مع ماتوصل اليه العبدلي (2010)إذ بلغت نسبة مقاومة العزلات لهذا المضاد 50% واشار الى ان سبب المقاومة المعتدلة للعزلات قيد الدراسة للازترونام قد يعود الى انتاج انزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف (ESβLs) التي تعمل لوحدها او مع انزيمات البيتالاكتاميز المشفر لها بلازميديا والمنتشرة بين العديد من الجراثيم السالبة لصبغة كرام والتي تعمل على مقاومة مضادات البيتالاكتام مثل السيفوتاكسيم والسيفوتازيديم والازترونام (Hamed,2004) يعد انتاج انزيمات البيتالاكتاميز(β-lactamases) هو الآلية الاساسية لمقاومةهذه المضادات ,.Fluit *et al*) (2001; Valverde *et al*., 2004 وتدعى الجينات المشفرة لهذه الانزيمات *bla* genes وقد تكون محمولة بلازميديا او كروموسوميا ,.Poirel *et al*., 1999; Marchandin *et. al*) (2000; Fluit *et al*., 2001 . تتوافر أنواع عديدة من هذه الأنزيمات منها نوع VEB-1 الذي تنتجه بكتريا *E.coli* وبكتريا *K. pneumoniae*، والمشفر من قبل الجين *bla VEB-1* المحمول على بلازميد حجمه الجزيئي 100 كيلو قاعدة (Poirel *et al*., 1999).

كذلك نوع TEM المنتج من بكتريا *K. pneumoniae* وتكون الجينات المشفرة لهذا النوع محمولة بلازميديا (Bermudes *et al*., 1999) كما وجد ان نفس البكتريا احتوت على نوعين اخرين من هذه الانزيمات هما VIM-1 و SHV-5 باستخدام تقنية التفاعل التسلسلي لأنزيم بلمرة DNA (PCR) يشفران بوساطة جينين محمولين على بلازميدين مختلفين، في عدة سلالات معزولة من احدى مستشفيات فرنسا وهي مشابهة لسلالات عزلت في اليونان ايضاً (Kassis-Chikhani *etal*., 2006) .بينما كانت مقاومة مضادات مجموعة **Aminoglycoside**والمتضمنة بمضاد **Gentamycin** و**Amikacin** و **Tobramycin** بنسبة(35%),(10%),(10%) وقد يعزى سبب مقاومة البكتريا لمضادات الأمينوكلايكوسيدات بثلاث آليات هي : تحوير جزيئة المضاد بوساطة الإنزيمات المحورة ,Adenylating (Acetylating , Phosphorylating) او حدوث طفرة كروموسومية مثل طفرة في الجين المشفر للبروتين الهدف في تحت الوحدة الرايبوسومية (30S) مسببة بذلك فقدان المضاد ألفته

للأرتباط بالبروتين الهدف وتقليل نفاذية الخلية البكتيرية للمضاد (Levinson and Jawetz,2000).

اما مقاومة العزلات البكتيرية قيد الدراسة للمضادات الكوينولينات التي شملت مضادات **Ciprofloxacin** (20%) ان سبب المقاومة للعزلات قيد الدراسة قد يعود الى حدوث تغيير في موقع الهدف لارتباط المضاد على الانزيم ، اذ يحدث التغيير في (GyrA) الذي يعد من الوحدات البنائية لانزيم (DNA gyrase) (Fluit *et al.*,2001) .

اما بالنسبة للمقاومة مضاد **Co-Trimoxazol** فقد بلغت (65%). اما بالنسبة للمقاومة لمضاد **Augmentin** فقد بلغت نسبة المقاومة له (62.5%) من مجموع العزلات الكلية وتتفق هذه النسبة مع ماتوصل اليه العبدلي (2010) الذي اشار الى ان نسبة مقاومة العزلات الكلية قيد الدراسة لمضاد Augmentin بلغت (62%) ويعدّ المضاد خليطاً من مثبط الانزيم Amoxcillin+Clavulinic acid ، ويعود سبب المقاومة الى انتاج البكتريا انزيمات البيتالاكتاميز المحفزة كروموسومياً التي لاتثبط بـ Clavulinicacid Karlowsky *et al.*(2002).ان الانزيمات المقاومة Clavulinic acid هي TEM-1 و SHV-5 ، فضلاً عن وجود انزيمات AmpC والتي تكون مسؤولة عن المقاومة المتعددة للمضادات وأيضا له دور مهم في مقـاومة هذا المضاد(KaderandKumar,2004) .اما مقاومة العزلات البكتيرية قيد الدراسة لمضاد النايتروفيورانتين فقد بلغت (5%) واظهر فعالية عالية للعزلات فقد بلغت نسبة حساسيةالعزلات لهذا المضاد(87.5%).اما بالنسبة للمضاد **Imipenem** الذي ينتمي للمجموعة **Carbapenems** فقد اظهرت العزلات حساسيتها الكبيرة وبنسبة 100% ويعد العلاج الاكثر فعالية مقارنة مع بقية المضادات المستخدمة. يعد مضاد الاميبينيم العلاج الأمثل للمرضى المصابين ببكتريا الكلبسيلا المقاومة لمضادات الجيل الثالث ومثبطات البيتالاكتام، إلا انه عزلت سلالات مقاومة لهذاالمضاد لامتلاكها الأنزيم البلازميديMetalo-β-Lactamaseالذي يكسرحلقةالبيتالاكتام في السيفالوسبورينات القديمة والجديدة فضلاً عن مضادات الكاربابنيم (Horh et al., 1993; Martinez-Martinez et al., 1999).



شكل (4-9) **النسبة المئوية لمقاومة العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية المختلفة.**

4-7المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية Multiple Antibiotic Resistance :

أصبح إنتشار الجينات التي تحمل المقاومة للمضادات الحيوية مشكلة تهدد الصحة العالمية وتساهم البلازميدات في إنتشار هذه المقاومة بوساطة البكتريا الممرضة (Bistue*et al.*,2008).تم تحديد مديات المقاومة لمضادات الحياة للعزلات قيد الدراسة إذ اظهرت النتائج 37 عزلة وبنسبة (92.5%) تحمل صفة المقاومة المتعددة من مضادين الى 11 مضاد من مجموع المضادات الكلية البالغ عددها14مضاد واظهرت عزلات *P.mirabilis* اعلى نسبةللمقاومة المتعددة100%,تليها *Ecoli* وبنسبة93.3%,ومن ثم*En.cloacae* واقل نسبة *K. pneumoniae* 83.3% .ويوضح الجدول (4–12)كل عزلة وعدد المضادات التي قاومتها . إتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتيجة دراسة Raka واخرون (2004) إذ وثقوا أن معظم عزلات *P. mirabilis* كانت مقاومة لثلاثة مضادات جرثومية أو أكثر.واتفقت مع سلمان (2008) حيث كانت جميع عزلات *P. mirabilis* تحمل صفة المقاومة المتعددة.ولم تتفق نتائج الدراسة مع ماتوصلت اليه الزنكنة (2013) إذ اشارت الى ان جميع عزلات *K. pneumoniae* تحمل صفة المقاومة المتعددة لمضادات الحياة.

وثق Piéboji *et al*. (2004) إنتشار نمط المقاومة المتعددة للمضادات الجرثومية بين الجراثيم السالبة لصبغة كرام المعزولة من المرضى الراقدين في المستشفى (Inpatients) مقارنة مع الجراثيم المعزولة نفسها من المرضى المراجعين إلى المستشفى (Outpatients) وبفارق معنوي إحصائياً (P<0.05).

عزى Pinto pereria *et al*. (2004) و Chukwuani *et al*. (2002) 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. إن مقاومة بكتريا الفلورا الطبيعية في الأمعاء جاءت نتيجة اكتسابها للبلازميدات ذات المقاومة المتعددة من البكتريا المجاورة لها في الأمعاء عن طريق عمليات الاقتران البكتيري والتحويل الوراثي والتوصيل (Martinez-Martinez *et al*., 1998). قد يكون سبب مقاومة البكتريا تجاه مضادات الحياة إلى الاستعمال العشوائي للمضادات الذي فسح المجال لزيادة المقاومة البكتيرية تجاه المضادات المختلفة (Laurence *et al*., 1997) .

جدول (4-12)المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية للعزلات قيد الدراسة .

عدد المضادات التي قاومتها العزلات	عدد العزلات	ارقام العزلات ونوع العزلة
2	1	E31
3	4	P 12,K22 , En 40, E37
4	4	K 7, En 10, E2,13
5	2	P5 , E18
6	2	P 14 ,E38
7	5	K 3,11,P 33, En30,4
8	7	P 39,En19,24,35, E20,32,36
9	9	K17, P8,27,34 , En6 ,E 26,28, 9,23
10	2	P15 , En 1
11	1	E21
النسبةالمئوية		K(83.3%), P (100%) ,En(90 %) , E (93.3%)

❖ K:*Klebsiella Pneumoniae ,P: Proteus miabilis ,En: Enterobacter cloacae ,E:E.coli*

تم تقسيم العزلات قيد الدراسة الى مجموعتين على أساس عدد المضادات التي قاومتها جدول (4–13) إذ وضعت العزلات المقاومة (6–2) مضادات حيوية في المجموعة الأولى، أما العزلات المقاومة (11–7) مضاداً حيوياً في المجموعة الثانية وكانت المجموعة الثانية هي المجموعة السائدة في الدراسة إذ إحتوت على 24 عزلة بكتيرية من مجموع 37 عزلة وبنسبة (64.86%) ، بينما كانت أقل نسبة مقاومة متعددة للمضادات

الحيوية ضمن الدراسة الحالية أظهرتها المجموعة الاولى 13 عزلة وبنسبة (35.14%) من العزلات الكلية.

جدول (4-13) تقسيم العزلات المحلية للبكتريا قيد الدراسة الى مجموعتين على أساس عددالمضادات التي قاومتها.

المجموعة	عددالمضادات التي قاومتها	عددالعزلات المقاومة	النسبةالمئوية (%)
1	2-6	13	% 35.14
2	7-11	24	% 64.86
المجموع		37	% 100

8.4 تحديد التراكيز المثبطة الدنيا (MIC_s) لعدد من المضادات الحيوية

تشيرالنتائج في الجدول (4–14) الى أن قيم التراكيز المثبطة الدنيا لمضاد Amoxicillin تراوحت ما بين (1024–1024>) مايكروغرام/مل لكل من *En.cloacae* , *P.mirabilis*, *K. pneumonia*, وتراوحت ما بين (64–1024>) مايكروغرام/مل لعزلات *E.coli* . واتفقت النتائج جزئيا مع ماتوصل اليه العبدلي (2010) الذي اشار الى ان الى أن قيم التراكيز المثبطة الدنيا لمضاد Amoxicillin تراوحت ما بين (1024–1024>) مايكروغرام/مل للعزلات *Enterobacter spp., Klebsiella spp. , E.coli*.

ولم تتفق دراستنا مع ماتوصلت اليه العبيدي (2006) إذ اشارت الى ان قيم MIC_S لمضاد Amoxicillin ما بين 1024–4 مايكروغرام/مل و 1024 مايكروغرام/مل لكل منُ *E.coli* *P.mirabilis*, بحسب التعاقب.

ان النسبة العالية لمقاومة مضادات البنسلينات التي تشمل الاموكسسلين تعود مقاومتها طبيا لأحدى هذه الآليات وهي تحطيم المضاد بوساطة انزيمات البيتالاكتاميز او فشل المضاد في الاختراق والوصول الى موقع الهدف .(penicillin binding protein PBPs) المستهدفة , او خفض ألفة ارتباط المضاد بالـ(PBPs) (Mandell *et al.*,1995).

سجلت قيم MIC_S لمضادCefotaxime مابين (32–1024>) مايكروغرام/مل للعزلات *E.coli* , *Enterobactercloacae* , *P.mirabilis* ,*K. pneumoniae* ولم تتفق النتائج مع

ماتوصل اليه العبدلي (2010) الذي اشار الى ان قيم MIC_S لمضاد Cefotaxime مابين (1024-1024<) لعزلات *E.coli* و(512-1024<) مايكروغرام/مل لبكتريا *Klebsiella spp.* و(1024-8) مايكروغرام/مل لبكتريا.*Enterobacter cloacae*, واتفقت جزئيا مع ماتوصلت اليه مجيد (2004) تراوحت قيم التركيز المثبط الادنى للمضاد السيفوتاكسيم للعزلات *Proteus spp., Klebsiella spp., E.coli* مابين {(32-256) ،(1024-<1024) ،(32-1024) } مايكروغرام/مل على التوالي يعزى سبب المقاومة لمضادات السيفالوسبورينات الى الضغط المستمر لأستعمال المضادات والذي ينتج عنه تطور صفة المقاومة وخاصة عن طريق موقع الهدف أوعن طريق أنظمة الدفق،وكل هذه اليات يشفر لها كروموسوميا(Ruiz,2003) . ويمكن ان يعزى سبب ارتفاع قيم التركيز المثبط الادنى للعزلات قيد الدراسة لمضادات البيتالاكتام (السيفوتاكسيم) الى وجودعدة ميكانيكيات للمقاومة في مقدمتها انتاج انزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية مثل OXA-(4,OXA-5,OXA-6,OXA-7,OXA-10)(Gutmann *et al*.,1990; Danel *et al*., 1999).

سجلت قيم MICS لمضادStreptomycin مابين(1024-128) مايكروغرام/مل لعزلات*E.coli* *Enterobacter cloacae* ,*K. pneumoniae* ,*P.mirabilis*(512-128)مايكروغرام/مل ولم تتفق النتائج مع ماتوصل اليه السعدون (2007) الذي اشار الى ان قيم MICS لعزلات *K. pneumoniae* مابين (512-16) مايكروغرام/ مل .ولم تتفق نتائج الدراسة مع ماتوصل اليه Akindle and Rotilu (2000) اللذان وجدا أن عزلاتهما حساسة لهذا المضاد وان قيمةالـMIC كانت (256≥ -4≥). مايكروغرام/ مل.أخذت المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسايدية (الستربتومايسين) بالتزايد بشكل ملحوظ في الآونة الأخيرة وهذه المقاومة قد تكون ناتجة عن إنتاج أنزيم من قبل البكتريا المقاومة للمضاد والذي يقوم بتحوير المضاد وبالتالي يفقد فعاليته أو تأتي نتيجة لفقدان بعض بروتينات الغشاء الخارجي البكتيري مما يقلل في نفاذية المضاد إلى داخل البكتريا (الموسوي، 2000).

سجلت قيم MIC_S لمضاد Ciprofloxacin لعزلات *E.coli* ,*Enterobactercloacae* , *K. pneumoniae* ,*P.mirabilis* مابين (512-2), (1024-2), (128-2), (64-2) مايكروغرام/مل على التوالي، وتتفق هذه النتائج جزئيا مع العبيدي (2006) اذ بلغت قيم MIC_S لهذا المضاد مابين (1024-4) مكغم/ مليليتر لعزلات *E.coli* واتفقت قيم MIC_S لعزلات*Enterobacter cloacae* مع العبدلي(2010) حيث اشار انها مابين (1024-2)

مكغم/ مليليتر واتفقت ايضا مع السعدون (2007) اذ بلغت قيم MICs لهذا المضاد (64-2) مكغم/مليليتر لعزلات *K. pneumoniae* ، وتتفق هذه النتائج جزئيا مع ما توصل إليه (Kumar,2011) إذ بلغت قيم MICs لهذا المضاد(32) مكغم/ مليليتر. ولم تتفق مع ماشارت اليه سلمان (2008) إذ بلغت قيم MICs لهذا المضاد (64-8) مكغم/ مليليتر لعزلات *P.mirabilis* .

سجلت قيم MICs لمضاد Nalidixic acid مابين(8-1024<) لعزلات *E.coli* , *Enterobacter cloacae* ومابين (1024<-128)مكغم/مليليتر لعزلات *P.mirabilis,* *K.pneumoniae* مايكروغرام/مل على التوالي، وتتفق هذه النتائج جزئيا مع ماتوصلت اليه مجيد (2004) تراوحت قيم التركيز المثبط الادنى لحامض النالدكسك للعزلات *Proteus spp.,* *Klebsiella spp., E.coli* ما بين {(32-256)، (64-<1024)، (64-1024) } على التوالي ولم تتفق مع سلمان (2008)التي توصلت الى ان قيمMICs لعزلات *P.mirabilis* تراوحت مابين (256-4). فقد ذكر Ribera واخرون (2004) في اسبانيا ان المقاومة للكوينولونات لها علاقة بحدوث طفرات في جينات parC وgyrA .تفسر مقاومة العزلات المحلية في هذه الدراسة للكوينولينات الى تعرض هذه العزلات الى حصول طفرات في الجينات المسؤولة عن تصنيع انزيمات (DNA gyrase)، او عن طريق الية الدفق المعتمد على الطاقة (Nakano *et al.*,1997).

جدول (4-14) **قيم التراكيز المثبطة الدنيا لبعض المضادات الحيوية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة.**

المضاد / العزلة	AX	CTX	CIP	Na	S
نقطة التوقف	**≥16**	**≥64**	**≥4**	**≥32**	**≥32**
E.2	**<1024**	**1024**	**2**	**8**	**512**
E.9	**<1024**	**<1024**	**2**	**<1024**	**512**
E.13	**1024**	**32**	**2**	**256**	**256**
E.16	**1024**	**32**	**2**	**256**	**256**
E.18	**1024**	**256**	**16**	**<1024**	**256**

256	<1024	128	<1024	1024	*E.20*
512	<1024	128	<1024	1024	*E.21*
128	<1024	512	<1024	64	*E.23*
256	<1024	128	<1024	1024	*E.26*
512	<1024	128	512	1024	*E.28*
128	1024	4	32	1024	*E.31*
1024	256	4	32	1024	*E.32*
1024	1024	2	<1024	1024	*E.36*
128	<1024	16	32	<1024	*E.37*
512	<1024	8	1024	<1024	*E.38*
512	<1024	64	1024	<1024	*Ent. 1*
128	8	16	<1024	<1024	*Ent. 4*
256	128	8	256	<1024	*Ent. 6*
256	<1024	2	32	<1024	*Ent. 10*
256	<1024	1024	<1024	1024	*Ent. 19*
512	<1024	128	<1024	1024	*Ent.24*
256	<1024	2	32	1024	*Ent.29*
512	512	16	512	1024	*Ent.30*
128	1024	2	<1024	1024	*Ent.35*
512	<1024	512	<1024	<1024	*Ent.40*
128	256	64	128	<1024	*P.5*
1024	512	16	512	<1024	*P. 8*
512	1024	2	128	1024	*P. 12*
256	512	2	128	1024	*P. 14*
512	1024	16	<1024	1024	*P.15*
256	<1024	128	512	1024	*P.27*
128	128	4	32	1024	*P.33*
512	1024	32	128	1024	*P.34*
128	<1024	16	256	<1024	*P.39*
1024	<1024	2	<1024	<1024	*K.3*
128	128	8	32	<1024	*K.7*
1024	<1024	2	1024	1024	*K.11*
1024	1024	16	512	1024	*K.17*
1024	<1024	2	32	1024	*K. 22*
256	<1024	64	128	1024	*K. 25*

9-4 تأثير خلط مضادات الحياة في العزلات قيد الدراسة

تمت دراسة الخلط بين المضادات الحيوية باستعمال طريقة رقعة الشطرنج والموصوفة من قبل Mandal *et al.*(2004) بحساب معامل التركيز المثبط (FIC) لـ 27 عزلة بكتيرية من كل نوع قيد الدراسة وتم انتقائها وفقاً لمقاومتها للمضادات الحيوية المستخدمة في الاختبار. في هذه الدراسه تم خُلط مضاد Ciprofloxacin و Streptomycin مع Cefotaxime . وقد تمت تجربة خلط المضادات الحيوية بنسبة (1:0.5,1:1,1:2,1:3) ومضاد ال Cefotaxime يمثل المادة الفعالة الثابتة التركيز في جميع نسب الخلط وتم تحديد نسبة الخلط الافضل, فقد وجد ان نسبة خلط مضاد Ciprofloxacin/ Cefotaxime ,Streptomycin/ Cefotaxime بنسبة 1:3 هي الافضل , من خلال ملاحظة نوع التأثير الناتج من نسبة الخلط على العزلات قيد الدراسة , وتبين الجداول(4-15),(4-16),(4-17),(4-18),(4-19),(4-20),(4-21) ,(4-22) حدوث انخفاض كبير في مديات MIC للمضادات بعد عملية خلط مضاد Ciprofloxacin وStreptomycin مع Cefotaxime مما هي عليه في حالة استعمال كل مضاد وحده . اذ كان تأثير خلط مضاد Ciprofloxacin مع Cefotaximeبنسبة (1:0.5) تأثيراً تآزريا (Synergy) على (5) عزلات وبنسبة (18.5%), (9) عزلات كانت غير متأثرة (Indiffernce) بهذا الخليط , و(4)عزلات أظهرت تاثير الاضافة (Addition) للخليط ,(9)عزلات متضادة (Antagonism) وكما موضح في الجدول (4-15) , وسجلت (10) عزلات تأثيرا تأزريا(Synergy) وبنسبة (37.03%) ,(8) عزلات كانت غير مؤثرة ,(4)عزلات اضافة,(5)عزلات متضادة عند الخلط بنسبة (1:1) جدول (4-16)،بينما اظهرت (14) عزلة تأثيرا تأزريا وبنسبة (51.85%) و(12) عزلة اضافة وعزلة واحدة تأثير متضادة عند الخلط بنسبة (1:2) جدول(4-17),اما عند خلط المضادين بنسبة (1:3) جدول (4-18) اظهرت (22) عزلة من مجموع (27)عزلة قيد الدراسة تأثيرا تأزريا وبنسبة (81.48%) وعزلتان كانت

اضافة واخرى متضادة بينما اظهرت عزلة واحدة فقط تأثيرا غير مؤثر. ويبين الشكل (4-10) النسب المئوية للتأثير التأزري المتزايد مع اختلاف النسب المستخدمة في عملية الخلط .

جدول (4-15) تأثير خلط مضاد Ciprofloxacin **مع** Cefotaxime **بنسبة (1:0.5) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.**

العزلات	قيم MIC بتركيز (1:0.5)				
	CTX لوحدة مايكروغرام/مل	CIP لوحدة مايكروغرام/مل	الخليط مايكروغرام/مل	FIC Index	نوع التأثير
E2	1024	2	32	16.03	متضادة
E 13	32	2	2	1.06	غيرمؤثر
E16	32	2	16	1.06	غيرمؤثر
E 18	256	16	8	0.53	اضافة
E 28	512	128	64	0.62	اضافة
E31	32	4	4	0.37	تأزري
E 32	32	4	2	0.56	اضافة
E 37	32	16	4	0.37	تأزري
E38	1024	8	8	1.01	غيرمؤثر
Ent1	1024	64	128	2.12	متضادة
Ent6	256	8	16	2.06	متضادة
Ent10	32	2	4	2.12	متضادة
Ent29	32	2	64	3	متضادة
Ent30	512	16	16	1.03	غيرمؤثر
P 5	128	64	16	0.37	تأزري
P8	512	16	32	2.06	متضادة
P12	128	2	2	1.01	غيرمؤثر
P14	128	2	2	1.01	غيرمؤثر
P27	512	128	32	0.31	تأزري
P33	32	4	2	0.56	اضافة
P34	128	32	64	2.5	متضادة
P39	256	16	8	4.25	متضادة
K7	32	8	16	2.5	متضادة
K11	1024	2	2	1.01	غيرمؤثر
K17	512	16	16	1.03	غيرمؤثر

غيرمؤثر	1.06	32	2	32	***K22***
تأزري	0.04	4	64	128	***K_{25}***

جدول (4 - 16)تأثير خلط مضاد Ciprofloxacin **مع** Cefotaxime **بنسبة (1:1) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.**

العزلات	قيم MIC بتركيز (1:1)				
	CTX لوحدة مايكروغرام/مل	CIP لوحدة مايكروغرام/مل	الخليط مايكروغرام/مل	FIC Index	نوع التأثير
E2	1024	2	8	4	متضادة
E 13	32	2	1	1.03	غيرمؤثر
E16	32	2	2	1.06	غيرمؤثر
E 18	256	16	1	0.06	تأزري
E 28	512	128	2	0.01	تأزري
E31	32	4	2	0.56	اضافة
E 32	32	4	1	0.28	تأزري
E 37	32	16	2	0.18	تأزري
E38	1024	8	4	0.5	اضافة
Ent1	1024	64	32	0.53	اضافة
Ent6	256	8	8	1.03	غيرمؤثر
Ent10	32	2	8	4.25	متضادة
Ent29	32	2	2	0.09	تأزري
Ent30	512	16	4	0.25	تأزري
P 5	128	64	16	0.37	تأزري
P8	512	16	16	1.03	غيرمؤثر
P12	128	2	1	1.01	غيرمؤثر
P14	128	2	1	1.01	غيرمؤثر
P27	512	128	2	0.01	تأزري
P33	32	4	2	2.06	متضادة
P34	128	32	2	0.07	تأزري
P39	256	16	16	1.06	غيرمؤثر
K7	32	8	16	2.5	متضادة
K11	1024	2	4	2	متضادة
K17	512	16	8	0.51	اضافة

غيرمؤثر	1.06	2	2	32	***K22***
تأزري	0.04	2	64	128	K_{25}

جدول (4-17) **تأثير خلط مضاد**Ciprofloxacin **مع** Cefotaxime **بنسبة (1:2) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة**

العزلات	قيم MIC بتركيز (1:2)				
	CTX لوحدة مايكروغرام/مل	CIP لوحدة مايكروغرام/مل	الخليط مايكروغرام/مل	FIC Index	نوع التأثير
E2	**1024**	**2**	**8**	**4**	متضادة
E 13	**32**	**2**	**1**	**0.5**	**اضافة**
E16	**32**	**2**	**1**	**0.5**	**اضافة**
E 18	**256**	**16**	**1**	**0.06**	**تأزري**
E 28	**512**	**128**	**1**	**0.01**	**تأزري**
E31	**32**	**4**	**1**	**0.28**	**تأزري**
E 32	**32**	**4**	**1**	**0.28**	**تأزري**
E 37	**32**	**16**	**1**	**0.09**	**تأزري**
E38	**1024**	**8**	**2**	**0.25**	**تأزري**
Ent1	**1024**	**64**	**32**	**0.53**	اضافة
Ent6	**256**	**8**	**4**	**0.51**	اضافة
Ent10	**32**	**2**	**1**	**0.53**	اضافة
Ent29	**32**	**2**	**1**	**0.04**	تأزري
Ent30	**512**	**16**	**4**	**0.25**	تأزري
P 5	**128**	**64**	**8**	**0.18**	**تأزري**
P8	**512**	**16**	**8**	**0.51**	**اضافة**
P12	**128**	**2**	**1**	**0.5**	**اضافة**
P14	**128**	**2**	**1**	**0.5**	**اضافة**
P27	**512**	**128**	**1**	**0.01**	**تأزري**
P33	**32**	**4**	**1**	**0.28**	**تأزري**
P34	**128**	**32**	**1**	**0.03**	**تأزري**
P39	**256**	**16**	**4**	**0.56**	**اضافة**
K7	**32**	**8**	**4**	**0.62**	**اضافة**
K11	**1024**	**2**	**1**	**0.5**	**اضافة**
K17	**512**	**16**	**4**	**0.25**	**تأزري**
K22	**32**	**2**	**1**	**0.53**	**اضافة**
K_{25}	**128**	**64**	**1**	**0.02**	**تأزري**

FIC: Fractional lnhibitory Concentration

جدول (4-18) **تأثير خلط مضاد**Ciprofloxacin **مع** Cefotaxime **بنسبة (1:3) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.**

العزلات	قيم MIC بتركيز (1:3)				
	CTX لوحدة مايكروغرام/مل	CIP لوحدة مايكروغرام/مل	الخليط مايكروغرام/مل	FIC Index	نوع التأثير
E2	1024	2	8	4	متضادة
E 13	32	2	1	1.03	غيرمؤثر
E16	32	2	1	0.53	اضافة
E 18	256	16	0.5	0.03	تأزري
E 28	512	128	0.5	0.004	تأزري
E31	32	4	0.5	0.14	تأزري
E 32	32	4	0.5	0.14	تأزري
E 37	32	16	0.5	0.04	تأزري
E38	1024	8	1	0.13	تأزري
Ent1	1024	64	16	0.26	تأزري
Ent6	256	8	4	0.26	تأزري
Ent10	32	2	4	2.12	متضادة
Ent29	32	2	0.5	0.02	تأزري
Ent30	512	16	0.5	0.03	تأزري
P 5	128	64	4	0.09	تأزري
P8	512	16	4	0.25	تازري
P12	128	2	0.5	0.25	تأزري
P14	128	2	0.5	0.25	تأزري
P27	512	128	0.5	0.004	تأزري
P33	32	4	0.5	0.14	تأزري
P34	128	32	0.5	0.019	تأزري
P39	256	16	2	0.13	تأزري
K7	32	8	4	0.37	تأزري
K11	1024	2	0.5	0.25	تأزري
K17	512	16	1	0.064	تأزري
K22	32	2	1	0.53	اضافة
K_{25}	128	64	1	0.023	تأزري

اما بالنسبة لمضادات المجموعة الامينوكلايكوسدية التي شملت مضاد Streptomycin فقد أظهرتأثيرالخلط مع Cefotaxime بنسبة (1:0.5) جدول (4-19) تأثيراً تآزريا ل (14)عزلة بكتيرية وبنسبة (51.85%) ,(6) غير مؤثرة ,(5) عزلات اضافة ,وعزلتان متضادتان .وأظهرت نسبة الخلط (1:1) تأثيراً تآزريا ل (14)عزلة بكتيرية ايضا وبنسبة (51.85%) ,(11) عزلة اضافة ,وعزلة واحدة متضادة وواحدة غير مؤثرة جدول (4-20),أما عند خلط المضادين بنسبة (1:2) جدول (4-21) فقد أظهرت (19) عزلة تأثيرا تأزريا (70.37%) ,(6) عزلات اضافة وعزلتان فقط كانت غيرة مؤثرة .اما عند الخلط بنسبة (1:3) وكانت النسبة الافضل فقد اظهرت جميع العزلات قيد الدراسة تأثيرا تأزريا ل(26) عزلة من مجموع (27)عزلة قيد الدراسة وبنسبة (96.29%) ماعداعزلة واحدة فقط اظهرت تأثير اضافة جدول (4-22). ويبين الشكل (4-11) النسب المئوية للتأثير التأزري المتزايد مع اختلاف النسب المستخدمة في عملية خلط المضادين .

جدول (4-19) **تأثير خلط مضاد** Streptomycin **مع** Cefotaxime **بنسبة (1:0.5) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.**

العزلات	قيم MIC بتركيز (1:0.5)				
	CTX لوحدة مايكروغرام/مل	S لوحدة مايكروغرام/مل	الخليط مايكروغرام/مل	FIC Index	نوع التأثير
E2	1024	512	32	0.09	تأزري
E 13	32	256	8	0.28	تأزري
E16	32	256	32	0.125	تأزري
E 18	256	256	32	0.25	تأزري
E 28	512	512	512	2	متضادة
E31	32	128	8	0.312	تأزري
E 32	32	1024	32	1.03	غيرمؤثر
E 37	32	128	32	1.25	غيرمؤثر
E38	1024	512	128	0.375	تأزري
Ent1	1024	512	64	0.187	تأزري
Ent6	256	256	32	0.25	تأزري
Ent10	32	256	32	1.125	غيرمؤثر
Ent29	32	256	32	0.625	اضافة
Ent30	512	512	256	1	غيرمؤثر

اضافة	0.5	32	128	128	***P 5***
اضافة	0.75	256	1024	512	***P8***
تأزري	0.312	32	512	128	***P12***
تأزري	0.187	16	256	128	***P14***
تأزري	0.375	64	256	512	***P27***
اضافة	0.625	16	128	32	***P33***
متضادة	5	512	512	128	***P34***
تأزري	0.375	32	128	256	***P39***
غيرمؤثر	1.25	32	128	32	***K7***
تأزري	0.25	128	1024	1024	***K11***
اضافة	0.75	256	1024	512	***K17***
غيرمؤثر	1.03	32	1024	32	***K22***
تأزري	0.375	32	256	128	K_{25}

جدول (4-20) تأثير خلط مضاد Streptomycin **مع** Cefotaxime **بنسبة (1:1) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.**

العزلات	قيم MIC بتركيز (1:1)				
	CTX لوحدة مايكروغرام/مل	S لوحدة مايكروغرام/مل	الخليط مايكروغرام/مل	FIC Index	نوع التأثير
E2	1024	512	32	0.09	تأزري
E 13	32	256	16	0.56	اضافة
E16	32	256	16	0.56	اضافة
E 18	256	256	32	0.25	تأزري
E 28	512	512	256	1	غيرمؤثر
E31	32	128	16	0.625	اضافة
E 32	32	1024	8	0.257	تأزري
E 37	32	128	16	0.625	اضافة
E38	1024	512	64	0.187	تأزري
Ent1	1024	512	32	0.09	تأزري
Ent6	256	256	16	0.125	تأزري
Ent10	32	256	16	0.56	اضافة
Ent29	32	256	16	0.312	تأزري
Ent30	512	512	128	0.5	اضافة
P 5	128	128	32	0.5	اضافة
P8	512	1024	256	0.75	اضافة

اضافة	0.625	64	512	128	**P12**
تأزري	0.187	16	256	128	**P14**
تأزري	0.187	32	256	512	**P27**
تأزري	0.312	8	128	32	**P33**
متضادة	2.5	256	512	128	**P34**
تأزري	0.187	16	128	256	**P39**
اضافة	0.625	16	128	32	**K7**
تأزري	0.125	64	1024	1024	**K11**
اضافة	0.75	256	1024	512	**K17**
تأزري	0.257	8	1024	32	**K22**
تأزري	0.187	16	256	128	**K_{25}**

FIC: Fractional Inhibitory Concentration

جدول (4-21) تأثير خلط مضاد Streptomycin مع Cefotaxime بنسبة (1:2) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.

العزلات	قيم MIC بتركيز (1:2)				
	CTX لوحدة مايكروغرام/مل	S لوحدة مايكروغرام/مل	الخليط مايكروغرام/مل	FIC Index	نوع التأثير
E2	1024	512	8	0.023	تأزري
E 13	32	256	16	0.56	اضافة
E16	32	256	8	0.28	تأزري
E 18	256	256	32	0.25	تأزري
E 28	512	512	128	0.5	اضافة
E31	32	128	32	1.25	غيرمؤثر
E 32	32	1024	2	0.62	اضافة
E 37	32	128	8	0.31	تأزري
E38	1024	512	32	0.092	تأزري
Ent1	1024	512	16	0.046	تأزري
Ent6	256	256	16	0.125	تأزري
Ent10	32	256	16	0.56	اضافة
Ent29	32	256	32	0.625	اضافة
Ent30	512	512	128	0.5	اضافة
P 5	128	128	16	0.25	تأزري
P8	512	1024	128	0.375	تأزري

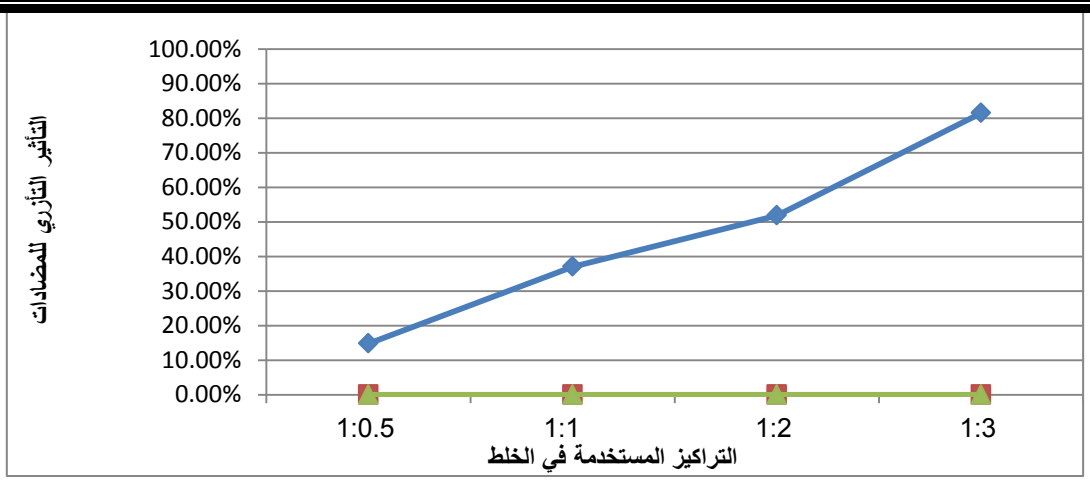
تأزري	0.312	32	512	128	***P12***
تأزري	0.187	16	256	128	***P14***
تأزري	0.046	8	256	512	***P27***
تأزري	0.156	4	128	32	***P33***
غيرمؤثر	1.25	128	512	128	***P34***
تأزري	0.187	16	128	256	***P39***
تأزري	0.312	8	128	32	***K7***
تأزري	0.062	32	1024	1024	***K11***
تأزري	0.375	128	1024	512	***K17***
تأزري	0.064	2	1024	32	***K22***
تأزري	0.046	4	256	128	K_{25}

FIC: Fractional lnhibitory Concentration

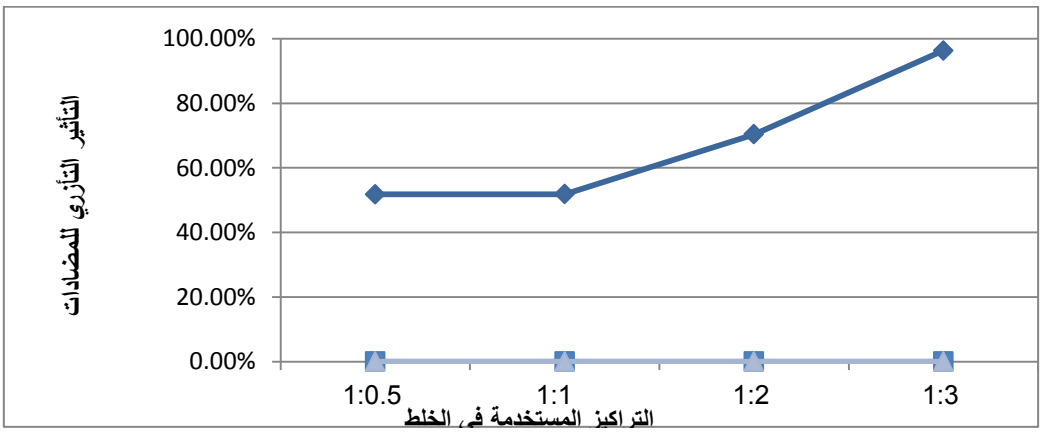
جدول (4-22) تأثير خلط مضاد Streptomycin **مع** Cefotaxime بنسبة (1:3) في قيم التراكيز المثبطة الدنيا للعزلات قيد الدراسة.

العزلات	قيم MIC بتركيز (1:3)				
	CTX لوحدة مايكروغرام/مل	S لوحدة مايكروغرام/مل	الخليط مايكروغرام/مل	FIC Index	نوع التأثير
E2	1024	512	2	0.005	تأزري
E 13	32	256	0.5	0.01	تأزري
E16	32	256	0.5	0.01	تأزري
E 18	256	256	16	0.12	تأزري
E 28	512	512	64	0.25	تأزري
E31	32	128	0.5	0.004	تأزري
E 32	32	1024	0.5	0.016	تأزري
E 37	32	128	0.5	0.26	تأزري
E38	1024	512	16	0.046	تأزري
Ent1	1024	512	16	0.04	تأزري
Ent6	256	256	8	0.06	تأزري
Ent10	32	256	16	0.56	اضافة
Ent29	32	256	16	0.31	تأزري
Ent30	512	512	32	0.125	تأزري
P 5	128	128	2	0.03	تأزري
P8	512	1024	32	0.09	تأزري

تأزري	0.004	0.5	512	128	***P12***
تأزري	0.005	0.5	256	128	***P14***
تأزري	0.18	32	256	512	***P27***
تأزري	0.019	0.5	128	32	***P33***
تأزري	0.312	32	512	128	***P34***
تأزري	0.023	2	128	256	***P39***
تأزري	0.078	2	128	32	***K7***
تأزري	0.015	8	1024	1024	***K11***
تأزري	0.187	64	1024	512	***K17***
تأزري	0.016	0.5	1024	32	***K22***
تأزري	0.046	4	256	128	K_{25}



الشكل (4-10) النسب المئوية للتأثير التأزري المتزايد عند خلط **مضاد**Ciprofloxacin **مع** Cefotaxime مع اختلاف النسب المستخدمة في عملية الخلط.



الشكل (4-11) النسب المئوية للتأثير التأزري المتزايد عند خلط **مضاد** Streptomycin مضاد مع Cefotaxime مع اختلاف النسب المستخدمة في عملية الخلط.

وجاءت هذه النتائج متفقة مع كل من Farjadian واخرون (1996) واتفقت ايضا مع Fish واخرون (2002) اللذين بينوا اهمية استعمال مضادCiprofloxacin مع Ceftazidime والذي اعطى فعالية عالية في علاج مختلف اصابات جراثيم الزوائف الزنجارية.واتفقت نتائج الدراسة مع ماتوصلو اليه Abdullah واخرون (2010) حيث اشارو الى انه مشاركة اي من مضادات مجموعة البيتالاكتاميز ومضادات المجموعة الامينوكلايكوسيدية مع احد مضادات مجموعة الكويلينات المفلورة الى فعالية عالية ضد جراثيم الزوائف الزنجارية .

وأتفقت النتائج مع ماتوصلو اليه Fish واخرون (2002) اللذين اشارو الى أن استعمال مضاد من مجموعة البيتالاكتام مع مضاد من مجموعة الامينوكلايوسيدية أو مضاد من مجموعة الكويلينات المفلورة يكون ذا فعالية عالية ضد الجراثيم السلبية والايجابية الغرام بدلا من اعطاء كل منها بشكل منفرد .

بينت الدراسات ان خلط مضاد من المجموعة الامينوكلايكوسدية مع آخر من مجموعة البيتالاكتام يكون ذا فعالية عالية ضد البكتريا وخاصة تلك التي تظهر مقاومة عالية للمضادات الحيوية (Ribera *et al.*,1996) لكون مجموعة مضادات البيتالاكتام تؤثر في الجدار الخلوي للخلية البكترية في حين مضادات المجموعة الامينوكلايكوسيدية يكون تأثيرها على مواقع تصنيع البروتينات في الخلية (Mcgrath *et al.*, 1992) .

إذ ان السيفالوسبورينات التي تعمل على تثبيط الجدار الخلوي (مضاد سيفوتاكسيم المستخدم في دراستنا) ربما عزز دخول مضاد الستربتومايسين (وهو من مضادات المجموعة الامينوكلايكوسيدية) التي تعمل على تثبيط تصنيع البروتينات في البكتريا السالبة لملون كرام وهذا ينتج التأثير التأزري (Brook etal;2001).

تقاربت نتائج الدراسة مع ماتوصل ال Al-Nassiry (2005) إذ أشار الى ان نسبة التأثير التآزري لخلط سيفالوسبورينات الجيل الثالث مع مضاد الجنتامايسين والسبروفلاكساسين (71-100%). إذ ان آلية عمل الكوينولينات على تثبيط أنزيم DNA gyrase خلال الارتباط بموقع ATP للوحدة B لأنزيم DNA gyras .

وأشار Gradels واخرون (2001) وChamot واخرون (2003) الى ان أعطاء مجموعة من المضادات يقلل من الآثار الجانبية والسمية للمضاد وتوضح الملاحق (9,8,7,6,5, 12,11,10,) القيمة التائية للمضادات قبل الخلط وبعده .

4 -10 النسق البلازميدي Plasmid profile

تم التحري عن المحتوى البلازميدي لـ(4)عزلات من بكتريا *Enterobacter ,E.coli cloaca., P.mirabilis K. pneumoniae* بأستخدام Pure Yield™ Plasmid Miniprep Kit المجهز من قبل شركة Promega (U.S.A) وتميزت هذه العزلات بأنها مختلفة في مصادر عزلها وفي انتاجها لعوامل الضراوة المختلفة وأنتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز واكثر العزلات مقاومة للمضادات الحياتية وهذه العزلات هي (E21 , En1, P15, K 17) ، وبعد عزل الدنا البلازميدي وترحيل الدنا المستخلص على هلام الأكاروز وجد ان جميع العزلات حاوية على بلازميد كبير و اختلفت البلازميدات الصغيرة في اعدادها، كما موضح في الشكل(4-13) .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أحتواء جميع عزلات *K.pneumoniae, En.cloacae, E.coli* على حزمتين بلازميديتين واحدة كبيرة واخرى صغيرة.اما *p.mirabilis* احتوت على حزمة بلازميدية كبيرة وحزمتين بلازميديتين صغيرتين ايضا.

واتفقت نتائج الدراسة مع مأأشارت اليه Al-Ismail(2007) ضمن نتائجها بانه امتلكت7عزلات وبنسبة (28%) من *E.coli* من اصل (25) عزلة مختبرة لبلازميدين, وأشارت ايضا ضمن نتائجها امتلاك النوع 8 *Enterobacter cloacae* لبلازميدين.

واتفقت مع ما توصل اليه Lukomski وجماعته (1993) من أن غالبية عزلات *Proteus mirabilis* الخاضعة لدراستهم كانت تحتوي على ثلاث حزم بلازميدية.

وتتفق هذه النتيجة مع ماتوصل اليه الطائي (2005) حيث أظهرت نتائج الدراسة أحتواء غالبية عزلات *p.mirabilis* على أكثر من حزمة بلازميدية واحدة . وأشار الباحث Hoffaman

وجماعته (1998) الى أن جميع عزلات *Proteus mirabilis* الخاضعة لدراستهم تحتوي على أكثر من حزمة بلازميدية واحدة .

واتفقت مع ماشارت اليه Kandela (2011) امتلاك *K. pneumoniae* على حزمتين بلازميدتين مختلفة في الموقع والحجم .وتتفق أيضا مع ما وجده (Al-Charrakh[c]*et al.*,2011) بأن عزلات *K.pneumoniae* ذات حجوم مختلفة وبعض منها يحتوي على Mega Plasmid الذي يُشفر للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية والمعادن الثقيلة .

ولم تتفق النتائج مع ماتوصلت اليه صلاح (2005) التي اشارت الى ان نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز أظهرت احتواء جميع عزلات البكتريا السالبة لصبغة غرام على حزمة بلازميدية صغيرة واحدة متغيرة الموقع في الهلام.

4-11تحييد البلازميدات Plasmids curing

تم إجراء تجربة تحييد الدنا البلازميدي في محاولة لربط المحتوى البلازميدي للبكتريا قيد الدراسة ومقاومتها لبعض المضادات الحيوية ، إذ تم استخدام مادة Acridine orange بوصفها مادة محيدة ثم نميت العزلات (E21 , En1, P15, K 17) المراد تحييدها في أوساط سائلة تحتوي على هذه المادة بتراكيز (16 , 32 , 64 , 128 , 256 , 512 , 1024 , 2000 , 2500 , 3000)مكغم/مل . فقدت E2 الحزم البلازميدية عند التركيز 64 مايكروغرام/مل و En1 عند التركيز1024مكغم/مل و P15 , K 17 عند التركيز2500 مكغم/مل .وأشار حبيب (2009) عند استخدام مادة Acridine orange فقدت عزلات *K. pneumoniae* الحزم البلازميديةعند التركيز 512 مايكروغرام/مل الشكل(4-13),واتفقت نتائجنا جزئياً مع ما توصلت اليه المحمداوي (2006) عند اجراء تجربة تحييد الدنا البلازميدي لبكتيريا *P.aeruginosa* بالمادة نفسها فقدت الحزم البلازميدية عندالتركيز 1024 مايكروغرام/مل.وبعدها تم أجراء اختبار للعزلات المحييدة من حيث مقاومتها لبعض المضادات الحيوية جدول (4-24).فقد أظهرت جميع العزلات المحيدة مقاومتها لمضادات Ciprofloxacin ,Co-Trimoxazol . في حين فقدت العزلات المحييده مقاومتها للمضادات الاخرى التي شملت Ampicillin , Cefotaxime , Gentamycin , Amikacin , Augmentin. ماعدا

عزلة17 K لم تفقد مقاومتها لمضاد الاوكمنتين (Augmentin) ويتضح من ذلك ان الجينات المسؤولة عن مقاومة مضادات Co−Trimoxazol, Ciprofloxacin قد تكون محمولة على الكروموسوم وكذلك مقاومة عزلة K17 لمضاد الاوكمنتين قد تكون كروموسومية ,أما الجينات المسؤولة عن مقاومة المضادات الاخرى قد تكون محموله على البلازميد.

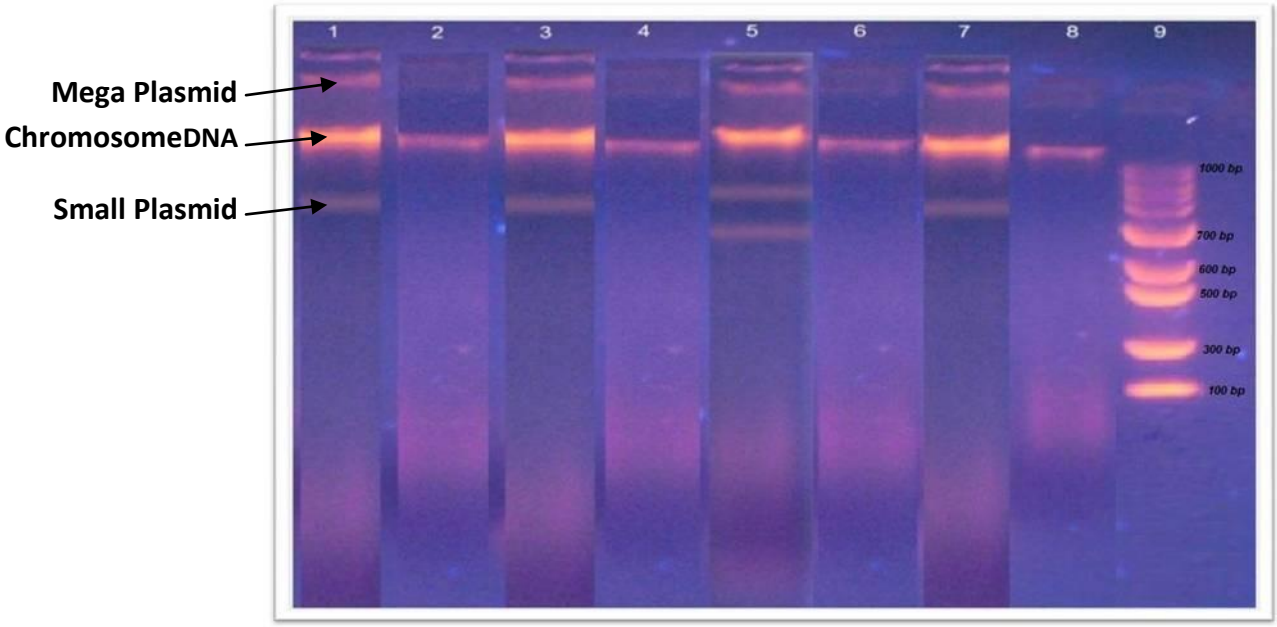
و بالنسبة لمضادي Gentamycin و Ampicillin فقد اتفقت نتائجنا مع Rasool *et al*. (2003) الذي فقدت عزلاته مقاومتها لهذين المضادين بعد تحييدها بمادة Acridine orange

واتفقت دراستنا جزئيا ايضا مع ماتوصلو اليه Faraj و Ghanima (2010) بأن عزلات*Klebsiella pneumoniae* بعد التحيد فقدت المقاومة لمضادات الببراسيلين، اموكسيسيلين، بنسلين ج، سيفاليكسين، سيفالوثين،سيفتازديم، تتراسايكلين، جنتامايسين وتوبرامايسين مما يدل على ان صفة مقاومة هذه المضادات الحيوية محمولة على البلازميد في حين لم تفقد مقاومة مضادات الامبيسيلين، سبروفلوكساسين، ارثرومايسين وستربتومايسين مما يدل على ان المورثات التي تشفر لمقاومتها محمولة على الكروموسوم.

جدول (4-23)حساسية العزلات لمضادات الحياة المختلفة قبل التحيد وبعده .

نوع العزلة	AMP		AK		AMC		CTX		CIP		COT		GEN	
	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد
E21	R	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	S
En1	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	S
P15	R	S	S	S	R	S	R	S	I	I	R	R	R	S
K17	R	S	S	S	R	R	R	S	I	I	R	R	R	S

,GEN:Gentamycin ,AK:Amikacin , COT: Co-Trimoxazol ,CIP: Ciprofloxacin
CTX:Cefotaxime , AMC:Augmentin ,AMP:Ampicillin



الشكل (4-12) الترحيل الكهربائي للعزلات قبل وبعد التحييد باستعمال مادة الاكردين البرتقالي

الترحيل الكهربائي باستعمال هلام الاكاروز بتركيز 0.7%، 75 فولت / سم لمدة 90 دقيقة.

المسار(1): المحتوى البلازميدي لل *E.coli* 21 قبل التحييد.

المسار (2):المحتوى البلازميدي لل *E.coli* 21 بعد التحييد .

المسار(3):المحتوى البلازميدي لل *Enterobacter cloacae* 1 قبل التحييد.

المسار (4): المحتوى البلازميدي لل *Enterobacter cloacae* 1 بعد التحييد.

المسار (5):المحتوى البلازميدي لل *Proteus mirabilis 15* قبل التحييد.

المسار (6):المحتوى البلازميدي لل *Proteus mirabilis 15* بعد التحييد.

المسار (7):المحتوى البلازميدي لل*Klebsiella pneumonia* 17 قبل التحييد.

المسار (8): المحتوى البلازميدي لل *Klebsiella pneumonia* 17 بعدالتحييد.

المسار (9):Ladder DNA(100bp).

الاستنتاجات Conclusions

1.أن االأنواع البكتيرية *Escherichia coli* و*Enterobacter cloacae* و *Proteus mirabilis* و *Klebsiella pneumoniae* هي الأكثر شيوعا في صالات الولادة ضمن بكتريا العائلة المعوية.

2. امتلكت معظم العزلات قيد الدراسة على عدد من عوامل الضراوة مثل البكتريوسين ، السايدروفور ، الغشاء الحيوي ,الهيمولايسين واليوريز.

3. احتواء العزلات على أنزيمات البيتالاكتاميز، وأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وأنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية في حين لم تظهر عزلات *E.coli* , *P.mirabilis* قدرتها على انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية.

4. أثبت المضاد الحيوي Imipenem هو الأكثر فعالية على تثبيط نمو العزلات البكتيرية المحلية قيد الدراسة.

5. لوحظ أن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية كانت شائعة بين العزلات المحلية قيد الدراسة.

6.لوحظ ان نتائج خلط مضاد Streptomycin مع Cefotaxime و Ciprofloxacin مع Cefotaxime بنسبة (1:3) تعتبرالافضل بين نسب الخلط الاخرى حيث أظهرت المضادات قيد الدراسة تأثير تأزري كبير.

7. تحتوي جميع العزلات قيد الدراسة على بلازميد كبير(Mega plasmid).وان مادة Acridin orange عامل محيد جيد للعزلات قيد الدراسة.

8. أظهرت جميع العزلات المحيدة مقاومتها لمضادات Co-Trimoxazol, Ciprofloxacin .

التوصيات Recommendations

1. إجراء دراسات موسعة عن خلط مضاد السيفوتاكسيم مع كل من مضاد الستربتومايسين والسبروفلاكساسين ,والعمل على إيجاد توليفات جديدة بين المضادات الحيوية لمعالجة الألتهابات المختلفة .
2. دراسة المسببات المرضية الاخرى غير بكتريا العائلة المعوية المتواجدة في صالات الولادة.
3. استخدام تقنية PCR لمعرفة الجينات المسؤولة عن إنتاج السايدروفور .

المصـادر العربيــة

1- أسماعيل ، سعيد محمد عوض . (2004) . دراسة أستخلاص وتوصيف أنزيم اليوريز من بكتيريا المتقلبات المعزولة من مرضى خمج المجاري البولية في اليمن . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

2- برهان الدين,سناء ; الجنابي ,سهيلة داوود سلمان وسلمان ,شذى .(2012) . عزل البكتريا الهوائية المعزولة من الجهاز الهضمي للصرصر الامريكي وتعين صفاتها الفسلجية والوظيفية . مجلة جامعة النهرين للعلوم.المجلد15.العدد (3) .ص 51-58.

3- الاسدي, فرقان محمد حسين. (2009). دراسة بكتريولوجية عن البكتريا المعوية المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف والمعزولة من الأطفال المصابين بتجرثم الدم في مدينة الحلة. رسالة ماجستير ,كلية الطب, جامعة بابل.

4- البلداوي، ميسم سامي عبد الكريم .(2005). دراسة التصاق ومقاومة البكتريا الهوائية المخمجة للمواد البديلة ومواد التثبيت الداخلي والخارجي المستعملة في جراحة العظام والكسور. رسالة ماجستير,كلية العلوم , جامعة بغداد.

5- الجعاز،ابتسام ثامر,مجهول ايناس محمد.(2010) .عزل وتشخيص بعض المسببات المرضية من حالات التهاب الاذن الوسطى الحاد عند الاطفال في مدينة الديوانية واختيار حساسيتها الدوائية تجاه بعض مضادات الحياة مختبريا . كلية التربية، جامعة القادسية .المجلة العراقية للعلوم، المجلد ٥١ ، العدد ٣ ,ص 351-359 .

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

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

8- الجميلي ، بان عباس فاضل . (2001) . دراسة الفعالية الانزيمية للبروتيس المعزولة من مختلف الأصابات وعلاقتها بمضادات الحياة . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

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

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 , مروى حميد مطشر .(2008) . تكون الغشاء الحيوي بوساطة *Klebsiella pneumoniae* الملوثة للمثبتات الخارجية ومقاومته لمضادات الحياة.رسالة ماجستير ,كلية العلوم .جامعة بغداد.

12- الزبيدي، محمد مهدي عبد المحسن (2012). دور البلازميدات في إنتاج البكتريوسين من بكتريا *Klebsiellaspp* المعزولة من عينات سريرية .رسالة ماجستير, معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الأحيائية ,جامعة بغداد.

13-الزعاك، علي (1994)، البايولوجي الجزيئي لضراوة البكتريا، الطبعة الأولى، جامعة بغداد.

14- الزنكنة,ايمان علي نور الله .(2013). دراسة بكتريولوجية ووراثية لبكتريا *Klebsiella* spp المعزولة من إصابات مرضية مختلفة . رسالة ماجستير, كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة ديالى.

15-السعدون، صلاح مهدي حسن. (2007). دراسة وراثية وجزيئية لعزلات محلية مرضية من بكتريا *Klebsiellaspp* المقاومة للمعادن الثقيلة والمنتجة لأنزيم β–Lactamase .رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية .

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

17-الطائي ، هادي رحمن رشيد . (2005) . دراسة بكتريولوجية كيموحيوية وجزيئية لبكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من التهابات المجاري البولية في بعض مستشفيات مدينة بغداد ، رسالة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

18-العبدلي, ياسر عادل جبار.(2010).إستخلاص وتنقية مركب الكاتشين من الشاي الأخضر (Camellia sinesis) وتأثيره التآزري على البكتيريا المسببة لالتهابات المجاري البولية .رسالة ماجستير, كلية العلوم ,الجامعة المستنصرية.

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

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 عبد الله .(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- الغراوي , رباب صالح محمد .(2009). تأثير مستخلصات قلف الدارسين *Cinnamomum zeylanicum* وبذور الكرفس *Apium graveolens L.* على البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية المعزولة من التهابات المجاري البولية عند الإناث. رسالة ماجستر ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

23- 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، المجلد 3، العدد 1.

24- المحمداوي ، خولة جبر خلف . (2000) . دراسة علاقة بكتيريا إلتهاب عيون الأطفال حديثي الولادة مع تلك المعزولة في أمهاتهم وحساسيتها للمضادات الحيوية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

25- المحمداوي ، خولة جبر خلف .(2006) .دراسة كيموحيوية للبروتين A المنتج من العزلة المحلية لبكتريا *pseudomonas* .اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ،الجامعة المستنصرية.

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

27- المسيري ، محمد فضل سالم . (2002) . دراسة بكتريولوجية وراثية وبائية عن عصيات القولون في عدن . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

28- الملا، حواء محمد ناصر. (2003). تأثير مركبات السالسيلات في جراثيم الكلبسيلا المعزولة من إصابات سريرية مختلفة، رسالة ماجستير، كلية العلوم ,الجامعة المستنصرية.

29- الموسوي، بتول كاظم سلمان (2000).عزل وتشخيص بعض البكتريا السالبة لصبغة كرام من خمجات جروح العمليات الجراحية ودراسة التأثير الخلطي للمضادات الحيوية (دراسة وراثية) .رسالة ماجستير، كلية العلوم ,الجامعة المستنصرية.

30- الموسوي ، يعقوب عبد الواحد صالح . (2003) . التحري عن البكتيريا السالبة لصبغة غرام والخمائر كمسببات للتسمم الدموي في الأطفال وحديثي الولادة . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

31- النداوي ، تحرير هادي . (2005) . دراسة تأثير بعض المطهرات على بعض أنواع البكتيريا المعزولة من مرضى وصالات العمليات الجراحية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

32- النعيمي، ابتهال محمد زاهد.(2002).الأخماج البولية عند النساء الحوامل.رسالةماجستير، كلية العلوم ,الجامعة المستنصرية.

33- حبيب، علاء سالم حمزة .(2009). دراسة وراثية للبكتريوسين المنتج من بكتريا *Klebsiellaspp* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة . كلية العلوم, الجامعة المستنصرية.

34- حسين,احمد 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.

35- حسين, نغم شاكر محمد وفليح, مي طالب.(2009).استخلاص الجدار الخلوي لبكتريا *Enterobacter cloacae* ودراسة سميته.مجلة بغداد للعلوم .مجلد 7,العدد 1 .

36-خلف, صبحي حسين و جرجيس , شاكر غازي .(2011). التحري عن حاملات الحديد المعزولتين *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia* في جرثومتي من حالات التجويف الانفي.جامعة الموصل , مجلة أبحاث كلية التربية الأساسية ,مجلد 11,العدد2.

37- خضر ,أيمان محمود. التحري عن قدرة بعض الأنواع البكتيرية على إنتاج المادة المخاطية . مجلة علوم الرافدين، المجلد 24 ، العدد1 ، ص 49-36.

38- خلف,صبحي حسين و كاظم ,بشرى علي .(2009).عزل ودراسة مرضية لجرثومة *Proteus mirabilis* . مجلة بغداد للعلوم ,مجلد ,7 العدد1 .

39- سلمان, افاق رشيد .(2008) .فوعة بعض أنواع المتقلبات .*Proteus* spp المعزولة من خمج الأذن الوسطى في بعقوبة وضواحيها. رسالة ماجستير, كلية التربية, جامعة ديالى.

40- صلاح,داليا (2005) .دراسة وراثية بكتريلوجية للبكتريا السالبة لصبغة كرام المتواجدة على العدد الطبية.رسالة ماجستير.كلية التربية,جامعة بابل .

41- علي,منى جلال .(2011). دراسة عوامل الضراوة للجراثيم المسببة لالتهاب المهبل البكتيري لدى النساء.مجلة ديالى للعلوم الصرفة. مجلد 1,العدد7 ,ص1992-784.

42- مجيد, هدى زهير.(2004). العوامل المؤثرة على انتاج انزيم الهيمولايسين من بكتريا مرضية معزولة من ادرار مرضى السكري و تحديد مقاومتها لبعض المضادات الحيوية.رسالة ماجستير,كلية العلوم ,جامعة بغداد.

المصادر الاجنبية

A

*Abed,I.A.;Abood,A.D.andTurky,A.M.(2012).IsolationUrease producing Bacteria from Different ecological Sources and Studying Some Factors Influencing its Activity. ***Anbar Journal of Agricultural Sciences*** Vol. 10,No . 1 .pp.185-197.

*Abdullah, R.M. ; Samaan, S.F. and AL-Shwaikh, A.M.(2010). Study the effect of antibiotic combination of beta-lactam and aminoglycoside with another group of antibiotics and their synergism effect . ***Journal of Arab Board of Health Specializations*** , Vol .11,No. 1 .pp.62-68.

*Abu Shaqra, Q. (2000). Occurance and antibiotic sensitivity of *Enterobacteriaceae* isolated from a group of Jordanian patients with community acquired urinart tract infections. Cytobios. Vol. 101,No.396: pp. 15-21.

*Adikwu,M; Jackson.C and Esimone.C.(2010). Evaluation of in vitro antimicrobial effect of combinations of erythromycin and Euphorbia hirta leaf extract against *Staphylococcus aureus* Research In Pharmaceutical Biotechnology,Vol.2,No.2, pp. 22-24.

*Ahmed ,Sh.J.(2010). Plasmid curing by using essential oil of Rosmarinus officinalisMedical ***.Journal of Babylon***.Vol .7,No. 1.pp.

*Ahmed, V.U.; Hussain, J.; Hussain, H.; Jassbi, A.R.; Ullah, F.; Lodhi, M.A.; Yasin, A. and Choudhary, M.I. (2003). First natural urease inhibitor from *Euphorbia decipiens*. ***J.Chem. Pharm***. Bull. Vol .51,No. 6 : pp.719-23.

*Akindele, J.A. and Rotilu,I.O.(2000). Outbreak of neonatal Klebsiella septicaemia: Areview of antimicrobial sensitivities. ***Afr.J. Med.Sci***. Vol. 26,No. 1 :251–3.

*Al-Chalabi, R . ;Al- Ibadi, M. andAl –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[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-Charrakh[b],A.H. , Alwash,M.S. and Al-Husaini,W.K (2011); Antibiotic Susceptibility of Enterobacteria Isolated from one Hospital in Hilla,Iraq.***J. ofBabylon University*** /Pure and Applied Sciences / Vol. 19 ,No. 1.

*Al-Charrakh[c], A. H. , Yousif, S. Y.and Al-Janabi, H. S. (2011) ; Occurrence and detection of extended-spectrum β-lactamases in *Klebsiella* isolates in Hilla, Iraq. *Afri*. ***J. of Biotechnology*** Vol. 10,No. 4 . pp. 657-665.

*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 .

* AL- Hamadan, A . H;Hussein. A . N and AL-Nashaa'. A . A.(2007). Curing of plasmid contents of *Proteus* spp. isolated from urinary tract infections in AL- Diwaniyah city***. Al-Qadisiah Medical Journal*** .Vol. 1, No.3.pp. 160-169.

*Al-Hussaini,J.A.A.S.(2010).Comparative study of the inhibitory efficacy of some medicinal plant oils on the growth of pure isolates from a group of pathogenic microorganisms *in vitro*. ***Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*** Vol. 1 , No. 1 .pp.153-165.

*Al-Ismail,W.A.M.(2007).Bacteria Causing Urinary tract infections ,Particularly E.coli ,and Their pattern of antibiotic resistance in Saudia Arabia.collage of Science, King Saud University.

* 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.

Allison**, C; Lia, H .C; Hughes ,C. (1992) .Co-ordinate experession of virulence genes duringswarming –cell differentiation and population migration of proteus mirabilis ,Mol.Microbial***.,Vol.6;pp:1583-91.

*** 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- Mansouri,** S. ; Amari, A. and Asad, A. G. (2005). Inhibition effect of some medical plants from Iran on swarming motility of *Proteus* rods . ***J. med. Sci. , Vol. 5,No. 3 :pp. 216-221.

*** Al-Nassiry**, M.S. (2005). Bacteriological Study on The Detection of The Extended-Spectrum β-Lactamases of Some Members of The Family Enterobacteriaceae Against Cephalosporines. M.S.C. Thesis. College of Medicine . University of Mustansiriyah.

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-Ouqaili** ,M.T.S;Al—Kubaisy.Sh.H.M.(2008).Crystalline biofilm produced by *Proteus mirabilis*:an overview on theirformation assays and antimicrobias interaction. ***J. of al-anbar university for pure science***. Vol 1.p:33-42.

*** 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.

***Alwan,** A.A.S and Abou, Y.Z. (1998). Guide to chemotherapy and chemoprophylaxis in bacterial infection. W.H.O. regional publications, Eastern Mediterranean series.

Alwan** ,M . J.; Lafta. I . Jand Hamzah. A. M.(2011). Bacterial isolation from burn wound infections and studying their antimicrobial susceptibility. ***Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences Vol. 2 , No. 1.

Al-Zirkani**,K; M.B.Ch.B, F.I.C.M.S. (2010). Microbiological Survey Of Orthopedic Theatre In Nassyriha. ***KufaMed.Journal. VOL. 13. No.2. pp.196-202.

Andrews,** S. J. ; Brooks, P. T. and Hanbury, D. (2002).Ultrasonography and abdominal radiography versus intravenous urography in investigation of urinary tract infection in men : Prospective incident cohort study**.** ***BMJ 324 – 454.

Arakawa**, Y.; Ohta, M.; Kido,N.; Mori,M.; Ito,H.; Komatsu,T.; Fujti,Y.; and Kato, N.(1984).Chromasomalβ– Lactamase of *Klebsiellaoxytoca*, anew class A enzyme that hydrolyzes broad spectumβ – Lactam antibiotic**.** ***Antimicrob. AgentsChemother. VOL .33,No. 1 : 63 – 70.

Aruna**, K. and Mobashshera, T. (2012) ; Prevalence of extended spectrum beta-lactamase production among uropathogens in south mumbai and its antibiogram pattern. ***EXCLI .J*.;pp363-372.*

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. &Struhi, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, ***Inc. New York.

***Azize**, H .W .(2004). Study of Bacteria That Contaminate and Forms Biofilm in Milk Containers. Degree of Master,Science College, University of Babylon.

B

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

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

*** Benenson,**S. , Temper,V. , Cohen,M.J. , Schwartz,C. , Carlos Hidalgo-Grass,C. and Colin Block,C.(2011); Imipenem Disc for Detection of KPC Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*in Clinical Practice**.** ***J.of clinical microbiology,***Vol. 49, No. 4. pp. 1617–1620 .

***Benz**, R. ;Schmid ,A. and Dihanich, M. (1989). Pores from mitochondrial outer membranes of yeast and a porin-deficient yeast mutant: a comparison. ***J Bioenerg Biomembr* 21: pp.**439-450.

*** Bermudes**, H.; Jude, F.; Chaibi, E.; Arpin, C.; Bebear, C.; Labia, R. and Quentin, C. (1999). Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17) , a novel inhibitor - resistant TEM- derived β- Lactamase in a clinical isolates of Klebsiella oxytoca. ***Antimicrob. Agents. Chemother***. VOL. 43, No .7 : pp.167 - 1661 .

*** Beveridge**, T.J. (1999). Structure of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. ***Americans Socie. Microbiol***. VOL .181,No. 16 : 4725-4733.

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.

*** Bischoff**, K.M.; White, D.G.; Mcdermott, P.F.; Zhao, S.; Gaines, S.; Maurer, J.J. and Nisbet, D.J. (2002) . Characterization of chloromphenicol resistant in Beta-Hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swin. ***J. of Clinical Microbiology*** . VOL .40 ,No. 2 : 389-94.

Bistue**, A. J. C. S. , Birshan, D. , Tomaras, A. P. , Dandekar, M. ,Tran, T. , Newmark, J. , Bui, D. , Gupta, N. , Hernandez, K. , Sarno, R. , Angeles Zorreguieta, A. , Actis, L. A. , Marcelo E. and Tolmasky, M. E. (2008) ; KlebsiellapneumoniaeMultiresistance Plasmid pMET1:Similarity with the Yersinia pestis Plasmid pCRY and Integrative Conjugative Elements. PLoS ONE 3(3): doi:10.1371/journal.pone***.0001800. Vol. 3 . pp.1-9.

Bnyan**.I. A.; AL-Saeed.M .S; Al-saad.N f. Biofilm Formation by Bacterial Isolates from Burn Infected Patients.(2010). ***Medical Journal of Babylon-Vol. 9- No. 3.pp.517-525.

*** Bonomo** , R.A.; Donskey , C.J.; Blumer , I.L; Hujer , A.M.; Hoyenm , C.K.; Jacob , M.R.; whalen , G.G. and Salata, R.A. (2003) . Cefotaxime resistant bacteria colonizing older people a dmitted to an acute care hospital . (2003) .***J. AM. Geriatr*** . Soc . Vol. 51 ,No. 4 : 519 –22 .

Bordi**, C. and De Bentzmann. S. (2011) ; Hacking into bacterialbiofilms : a new therapeutic challenge. ***Annals of Intensive **Care** , 1:19.pp.2-8.

Bradford**,P.A. (2001). Extended –spectrum β-Lactamase in the 21st century : characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat.Clin.Microbiol.Rev***.14:pp.933-951.

*** Brian,** F.(2008). The Gram-Negative Bacilli of Medical Importance. Welcome to the microbiowiki book: chapter 20 . publication by Wikis websites .

***Brisse ,S**. ; Fevre ,C. ; Passet ,V. ; Issenhuth-Jeanjean , S. ; Tournebize, R. ; Diancourt , L. and Grimont ,P.(2009). Virulent Clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and Evolutionary Scenario Based on Genomic and Phenotypic Characterization. Vol.4,No. 3 : pp.4982.

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

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

*** Bunyan** ,I. A. ;Abdul-Razzaq .M.S;Al-Dahmosh,H. and Kadhim .N . S.(2013) .Investigation of Fim H Adhesin among *Enterobacter* spp isolates and There Role in Biofilm Formation **.** ***International Journal of Pharmaceutical Invention*** , Vol. 1 , ISSUE 1.

*** Bush**, K.; Jacoby, G.A.; and Medeirose, A.A.(1995). A Functional classification scheme for β -lactamase and its correlation with molecular structure**.** ***Antimicrob. Agents. Chemother***. Vol. 39,No. 6 : 1211-1233.

C

***Cartera**, E.L. , Fluggaa,N. ,Boerb J.L., Mulrooneya, S. B. and Hausinger, R. P.(2009) ; Interplay of metal ions and urease.Published in final edited form as: *Metallomics.* Vol . 1;No. 3: pp.207–221.

Carmeli,** Y. ; Julio, C. ; George ; M.E. and Matthew, H.S. (2001). Clinical isolation and resistance patterns of and super infection with 10 nosocomial pathogens after treatment with ceftriaxone versus ampicillin-sulbactam. Antimicrob**.** ***Agents Chemother. Vol. 45,No.(1):pp. 275-279.

*** Castanheira**, M.; Deshpande, L.M.; Mathai, D.; Bell, J.M.; Jones, R.N.and Mendes, R.E. (2011).Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-2007**).** ***Antimicrob Agents Chemother***. Mar; Vol .55,No. 3 :pp.1274-8. This article on PubMed.

Chamot,** E.;EL-Amari, E.B. and Rohner, P. (2003).Effectiveness of combination antimicrobial therapy for *Pseudomonas aerruginosa* bacteremia .Antimicrob Agents chemother***. Vol .47,No. 9 :pp.2756-64.

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

Chaudhary**,U.; and Aggarwal, R.(2004).Extended spectrum β - Lactamases (ESBL) an emerging threat to clinical therapetics. ***Ind.J. Med. Microbiol. Vol. 22,No. 2 : 75 - 80.

*** Chavan**, M .;Rafi,H.; Wertz ,J.;Goldstone,C. and Riley. (2005) . Phage associated bacteriocins reveal a novel mechanism for bacteriocin diversification in *Klebsiella*.***J.Mol.E***.Vol.,60:pp.546-556.

Chin** , S .C .;Abdullah , N .; Siang ,T.W. and Wan,H .Y.(2005). Plasmid Profiling and Curing of Lactobacillus Strains isolated from the Gastrointestinal Tract Chicken . ***J. Microbiology .Vol .43,No.3 ,:pp. 25 -256.

Chmielewski,** R.A. and Frank, J.F .(2003). Biofilm formation and control in food processing facilities**.** ***J. Crfs. **2**: pp.22 – 32.

***Chow**,J.w.;Yu,V.L.andShales,D.M.(1994).Epidemiological perspectives for the prepration of bacterial Lipopolysaccharide .Can .J.Microbial. 22:pp.29-34.

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.

Clarke**, T. E., Tari, L. W. and Vogel, H. J. (2001). Structural biology of Bacterial iron uptake systems. ***Curr Top Med Chem., Vol .1,No. 1 :pp. 7 -30.

*** Clemention** , M.M; Filippis , I. ; Vascimentto , C.R.; Branquinho , R.; Rocha , C.L. ; and Martins , O.B. (2001) .***J.Clinice* . *Misrobiol*** . 39:pp. 3865 – 3870.

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

*** Cookes**, E.M. (1985) . *E.coli* an over view **.** ***J. HYG. Camb***. 95 : 523-30.

*** Costerton**, J.W.; Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. ***Sci. J***. *284(5418):* pp.1318-1322.

***Cruicshank** , R.; Ouguid , J.P. ; Marmion , B.P. ; and Swain , H.A . (1975) . Medical Microbiology . 12th ed . Great Britain.

*** Cursino**,L.; Smarda,J.;Chartone,E. and Nascimento,A. (2002). Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae Braz.***J. Microbiol***. 33 : 196-217.

D

*** Dadawala**, A.I. ; Chauhanm, H. C. ; Chandelm, B. S. ; Ranaware, P. ; Patel, S. S. ; Khushboo, S. ; Ratod, P. H.; Shah, N. M. ; Kher, H. N. (2010). Assessment of *Escherichia coli* isolates for in virto biofilm production.Vol. 3,No. 8 . pp.364-366.

*** Dalhoff**, A.; Nasu, T. and Okamoto, K. (2003). Beta-lactamase stability of faropenem. Chemotherapy. Sep. Vol .49, No. 5 :pp. 229-36.

*** Danel**,F.;Hall,L;Duke,B;Gur,D. and Livremore,D.(1999) . OXA-17, a further Extnded Spectrum Variant of OXA-10 B-Lactamase isolated from *Ps.aeruginosa* . ***J. Anti.microbial. Agents Chemother***. 43:pp.1362-1366 .

*** Dattelbaum**; J.D.; Lockatell, C.V.; Johanson, D.E.and Mobley, H.L.T. (2003).The transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in expermintal urinary tract infections***. Infect. Immun.*** Feb. Vol.71 ,No. 2 : 1026-30.

***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 .

*** Deibel**, V. (2000). Biofilms. Interest J. of Food Safety. 1:pp. 6 – 7.

***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.

***Don**, J.; Noel, R. and James, T.(2005). Bergey's Manual_ OF Systematic Bacteriology. 2scd ed. With ContributionsS From 339 Colleagues .

*** Donlan**, R.M.(2002). Biofilm: microbial life on surfaces. J. Emereging Infectious Diseases. Vol. *8*,No. 9 *:* 881-890.

* **Donskey**, C.J. (2004). The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. ***Clin. Infect. Dis***. 39: pp.219-226.

E

*** Elbanna** , K. ; Hassan , G . ; Khider , M .l. and Mandour , R.(2010). Safe Biodegradation of Textile Azo Dyes byNewly Isolated Lactic Acid Bacteria and Detection of Plasmids Associated With Degradation **. *J . Bioremed and Biodegrad*** . Vol .1:pp.2-6.

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.

***Eny**, R.H.K.; Cherubin, C.; Smith, S.M.; Buccim. (1985) . Inoculum effect of β — Lactam antibiotics on enterobacteriaceae. J.Antimicrob. AgentsChemother.28:pp. 601 – 616.

F

*** Farjadian**, S.;Kaviani, M.J.and Ghaderi, A. (1996).Molecular analysis of *Pseudomonas aerruginosa* Strians isolated from hospitalized patients in Shiraz, Iran.JMed Sci ;21 (3and 4):118.

FiSh**,D.N.;Choi,M.K.andJung,R .(2002). Synergic activity of Cephalosporin plus Fluoroquinolones against Pseudomonas aerruginosa With resistance to one or both drugs .J Antimicrob Chemother*** ;50:1045-9.

***Fluit**, A.C.; Visser, M.R.; Schmitz, F.J. (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews. Oct. 836-71.

*** 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.

Forrest**, A.; Weir, M.; and Plaisance, I.K. (1988). Relation between renal function and disposition of oral ciprofloxacin. ***J. Antimicrob. Agents Chemother.:pp. 1537-1540.

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.

Friedrich** , A.W.; Koch , R.; Bielasz ewska , M.; Zhang , W.; Karch , H. and mathys , W. (2005) . Distribution of the urease gene cluster among and urea activity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 lsolateds from humans **. *J. of Clinical Microbiology .Vol.43,No. 2 : pp.546-50 .

***Frifelder**. D. (1987). Molecular Biology- (2^{nd}) ed. Yones and Barttorr. Boston.

G

Gavin,R**. ; Merino,S. ; Altarriba,M. ; Canals,R. ; Shaw,J.G. . (2003). Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. ***FEMS Microbiol.Lett.224:pp.77-83.

*** Ghanima**, K. K. and Faraj ,D. N . (2010). Plasmid Curing Of Local Isolates Of *Klebsiella Pneumoniae* Isolated From Urinary Tract Infections And It's Role In Multi Drug Resisance.***Iraqi Jornal of Science*** .Vol.,51,No.3:pp.415-421.

Girlich** , D.;Naas,T.;Beuars,S.; Poirel , L.; Karrim, A.and Nord mann , P.(2000). Biochemical Gentic of expression of Acc-1- like . chromosome borne cephalosporine from Hafnia alvei. ***J. Antimicrob .Agent . Chemother . 44: 1478.

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

Goni** ,F.M. and Ostolaza,H.(1998).*E.coli* alpha hemolysin :a membrane-active protein toxin .Brazilian ***J.Med.Biological.Res.,31:pp.1019-1034.

Götz**, F. (2002) . *Staphylococcus* and biofilms. ***Mol. Microbiol. Vol.43,No.(6):pp.1367-1378.

Gradels**,K. E.;Valera, L.and Bonner, D. (2001).Synergistic activites of gatifloxacin in combination with other antimicrobial agents *Pseudomonas aerruginosa*And related Species .Antimicrob Agent Chemother***.Vol.45,No. 11 :3220-2.

***Gue**, M.; Duport, V.; Dufour, A.; Sire, O. (2001). Bacterial swarming: a biochemical time-resolved FTIR-ATR studt of *Proteus mirabilis* swarm-cell differentiation. Biochemistry. Oct. Vol.40,No. 39 : 11938-45.

Gupta,** K. ; Hooton, T. M. and Stamm, W. E. (2001). Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community acquired urinary tract infections. ***Am. Intern. Med. 135 :pp. 41 – 50.

*** Gutman**,L.; Kitzis,M.D. and Acar, J.F. (1990). Evolution of enzymatic mechanisms of resistance among B-Lactam antibiotics. ***J. Inter. Mod.Res.***, 18:pp.37-47.

H

*** Hall**-stoodley,L. ; Costerton,J.W. and Stoodley,P. (2004). Bacterial biofilm : From the natural environment to infections diseases.Nat.Rev. Microbiol.2:pp.95-108.

Hamed**,S.L.(2004). Multiple drug resistance of some gram negative bacteria isolated from patients with UTI. Al-Mustansiriya ***J. Sci. , Vol.15 ,No.3.

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

*** 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.

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.

*__Harbath__ S, Sax H, Gastmeier P. The preventable proportion of nosocomial infections: an overview of published reports***. *J.Hos .Infect*** . (2003);. 54-258.

Hardy**, D.; Amsterdam, D.; Mandell, L.A. and Rolstein, C. (2000). Comparative in vitro activities of Ciprofloxacin, Gemifloxacine, Grepafloxacine, Maxifloxacin, Ofloxacin, Sparfloxacin, Trovalfloxacin and other antimicrobial agent blood stream isolates of Gram-posativecocci. ***Antimicrob. Agent. Chemother. 44:802-5.

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

*** Harshy**,R.M. (2003). Bacterial motility on a surface : many ways to acommon goal.Annu.Rev.Microbiol.57:pp.249-273.

***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.

***Hemaiswarya**, S.; Kruthiventi, A.K.and Doble ,M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious disease. Phytomedicine .15:pp.639-652.

***Hendrickson**, G. (2003). Catherter Association UTIwebsitewww .pennhelth .com/ency/article/000483.htm-20-cached.

***Heritage**, J. (2003). Antibiotics. University of Leeds.

***Hoffmann**, G.; Gajdes, G.; Czako, M.; Toth, V. and Tomcsanyi, T. (1998). Diversity among clinical isolates of *Proteus penneri* detected by random amplified polymorphic DNA analysis. Zentralbi- Bakteriol. 288:pp.351-60. (Abs).

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

*** Horh**, T.; Arakawa, Y.; Ohta. M.; Ichiyama, S.: Wacharotayantum. B. ; and Kato, N.(1993). Plasmid mediated Amp C - type β - Lactamase isolated from *Klebsiella pneumoniae* Confer resistance to broad - spectrum β- Lactam, including moxalactam. ***Antimicrob. Agents Chemother***.Vol.37,No.5:pp.984-990.

Hsieh**,P-F. , Lin,T-L. , Yang,F-L. , Wu,M-C. , Pan,Y-J. , Wu,S.H. and Wang,J-T. (2012). Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in Klebsiellapneumoniae Causing Pyogenic Liver Abscess ***Journal .pone.pp1-5.

I

Iwalokun**, B.,Olukosi, Y.,Adejoro, A.,Olaye, J., and Fashade, O.,(2004). Comparative biochemical and molecular evaluation of Swarming of *proteus* and effects of anti-swarm agent, ***Aft.J. Biotecnol .(3): pp.99-104.

J

* **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 ofScience ,University of Wassit.

***Jacoby**, G.A. & Sutton, L. (1985). β -Lactamases and β-Lactam resistance in *E . coli* Antimicrob. Agents. Chemother, 28(5): 703-705.

*** 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 hospitale. ***J. MedMicrobiol*** . Vol. 52,No. 5 :pp. 421-5.

Jain**.S.A,T.V,V.R,C.D.B,Sampath.A,G.K.S,N.VandI.R.(2011).Antibioti c synergy Test Cheach broad Method on MultiDrug Resistanet *Psedomonas Aeruginosa* .VishwanathaTEtal ***IRJP .Vol.2,No. (12): pp.196-198.

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,** Melnick & Adelberg, S. (1998). Medical Microbiology. (2^{nd}) ed. Middle East Edition, Lebanon.

***Jawetz**, E. ; Brook, G.F. ; Butel, J.S. and Mores, S.A. (2001). Jawets, Melnik and Adelberg's Medical Microbiology. 22^{th}.ed. Appelton and Land, New York.

***Jawetz**, E., Brooks, G. F., Butel, J. S. and Morse, S. A. (2004). Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 23rd ed. McGraw Hill Com., Singapore.

*** Jesaitis**, A.J. ; Franklin, M. J. ; Berglund, D. (2003). Compromised host defense on*Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Characterization of neutrophil and biofilminteractions**. *J. Immunol***., 171,pp. 4329-4339.

Jones**,B.V. ; Young,R. ; Mahenthiralingam,E. and Stickler,D.J. (2004). Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection ***.Infect. Immun. 72:pp.3941-3950.

Josenhans**,C. and Suerbaum,S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria.Int.J.Med.Microbiol***.29:pp.605-614.

K

Kader**, A. A. and kumar, AK. (2004). Prevalence of extended spectrum beta-Lactamase among multidrug resistant gram-negative isolates from a general hospital in Saudi Arabia ***J. Saudi Med.Vol. 25,No. 5 :pp. 570-574.

* **Kadhim**,*S .R.; Hassan, A . M and Shoukat, D . S. (2011).*Antimicrobial susceptibility patterns against Escherichia coli and prevalence of extended–spectrum β-lactamases. |***Mustansiriya Medical Journal***. Vol 10 ,No. 1.

Kalkarni**, R.S. and Kanekar .(1998). Effects of some curing agents on phenotyping stsbility in *Pseudomonas putida* degrading epsilon – caprolocam. ***J. Microbiology and Biotechnology . Vol.14,No. 2 :pp.255-257.

Karim**,G.F.(2010).Plasmid mediated multidrug resistant of uropathogenic *Proteus mirabilis.* ***College of Nursing University of Kirkuk .

*** Karlowsky**, J.A.; Kelly, L.J.; Thornsberry, C.; Jones, M.E. and Sahm, D.F.(2002).Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. ***Antimicrob Agents Chemother*** Vol.46,No. 8 :pp.2540-2545.

*** Karlowsky**, J.A.; Jones, M.E.; Thornsberry, C.; Friedland, I.R.& Sahm, D.F. (2003). Trends in antimicrobial susceptibilities among *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in United States from 1998 to 2000. ***Antimicrobial. Agents . Chemother.*** Vol. 47,No. 5 :pp. 1672-80.

*** Kandela**, N.J. (2011). Detection of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and Klebocin Production from *Klebsiella pneumoniae* Local Isolates from Urinary Tract Infections. ***AJPS***, Vol. 9, No.1.pp.21-42.

***Kasper**,D.L;Broundwold,E.;Fauci,A.S;Hauser,L.S.;Longo,D.L.and Jameson,J.L.(2004).Harrision's principles of internal Medicine 16 th ed.pp.883-884.McGrow Hall .New Yourk.

*** Kassis-Chikhani**, n.; Decre, D.; Gautier, V.; Burghoffer, B. (2006). First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla* VIM-1 and *bla* SHV-5 in a French university hospital**. J. Antimicrob Chemother**. Vol. 57,No. 1 :pp.142-145 .

***Katzung**, B.G. (2001). Basic and Clinical Pharmacology. (8^{th}) ed. Lange Medical Books. McGraw-Hill. New York.

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

Khan**, F. ; Shukla, I. ; Rizvi, M. ; Mansoor, T. ; 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.

Ko**, W. C. ; Paterson , D. L. ; Sagnimeni, A. J. ; Hansen , D. S. ; Gottberg, A. V. ; Mohapatra, S. ; Casllas. J. M. ; Gossens, H. ; Mulazimoglu, L.; Trenholme , G.; Klugman , K. P.; McCrmack, J. G. and Yu, V. L. (2002). Community- Acquired *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Global differences in clinical patterns. ***Emerg. Infect. Dis. Vol.8,No. 2:pp.160-166.

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. (4^{th}) ed. ***J.B.Lippincott Company. Philadelphia.

***Krieg**, N.R. and Holt, J.G. (1984) . Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins . Baltimore , London .

***Kumar** ,A. and Talwar ,A ,(2010). Antimicrobial Resistance Patterns of *Klebsiella spp*. Isolated from Raw Milk of Doon Valley. Microbiology and Molecular Biology .Vol .1,No.1,:pp.21-35.

***Kumar**, V. , Sun, P. , Vamathevan, J. , Li, Y. , Ingraham, K. , Palmer, L. , Huang, J. and Brown, J. R. (2011) ; Comparative Genomics of *Klebsiellapneumoniae*Strains with Different Antibiotic Resistance Profiles. **Antimicrobial agents andchemotherapy**,Vol. 55,No. 9. pp. 4267–4276.

L

***Laurence,**D.R. ; Bennett, P.N. and Brown, M.J. (1997). "Clinical Pharmacology".8^{th} ed. Churchill Livingstone,. London.

***Lavanya** , B .; Sowmiya , S.; Balaji , S. and Muthuvelan , B .(2011). Plasmid Profiling and Curing of *Lactobacillus* Strains Isolated from

Fermented Milk for Probiotic Applications .***J .Food Science and Technology*** .Vol.3,No. 2 :pp.95-101.

*__Lazarevic__, G.; Petreska, D.; & Povlovic, S. (1998). Antibiotic Sensitivity Of Bacteria Isolated From The Urine Of Children With U.T.I. From 1986-1995. Srp-Arch-Celok-Lek. 126:pp. 423-9 (Abstract).

*** Lee** , S .S .; Oh , T .J .; Kim , J .; Kim , J .B . and Lee ,H.S .(2009) .Bacteriocin from Purple Nonsulfur Phototrophic Bacteria, *Rhodobacter capsulatus* . J. Bacteriology and Virology .Vol .39 :pp.269 -276.

*__Levin, S. and Karakusis, P. H.(1986).__ Future trends in aminoglycoside therap. Am. J. Med. 80 (S6B): pp.190-194 .

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

* __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.

*__Liaw,__ S.J.; Lai, H.C.; Ho, S.W.; Luh, K.T.& Wang, W.B.(2000). Characterization of *p*-nitrophenylglycerol-resistant *Proteus mirabilis* super-swarming mutants. J. Med. Microbiology. 50:pp. 1039-48.

*__Liaw,__ S.J., Lai, H.C.; Ho, S.W.; Luh, K.T.& Wang, W.B. (2003). Role of RsmA in the regulation of swarming motility and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. Journal of Medical.Microbiology. 52:pp. 19-28.

* __Livermore__, D.M. (1995). β-lactamases In Laboratory and Clinical Resistance. Clin.Microbiol.Review . Vol.8,No.(4): 560.

Livermore**, D.M.; and Yuan, M.(2004) β – Lactamases and extended spectrum β – Lactamases. *Braz. J. Microbiol***. 214:pp.1 – 20.

* **Ling**, J.M.; Lam, A.W.; Chan, E.W.& Cheng, A.F. (2003). What have we learn from community-aquired infections in Hong Kong? ***J.Antimicrob.Chemother***. Apr. Vol 51,No. 4 : pp.895-904.

*** Liu,** M.C, Lin S-B, Chien H-F, Wang W-B, Yuan Y-H, et al. (2012). 109(Z),139(E)-Heptadecadienylhydroquinone Inhibits Swarming and Virulence Factors and Increases Polymyxin B Susceptibility in Proteus mirabilis. PLoS ONE .Vol.7,No.(9): 45563. doi:10.1371/***journal.pone.*** 0045563 Mikael Skurnik, University of Helsinki, Finland.

Lukomski**, S., Pytlos. M; Serwecinska, L.; Sidor Czyk, B. & Jaworski, A. (1993). Anaysis of antibiotic resistance determind minants in *Proteus Penneri* Eur. ***J. Clin- Microb. Microbial. Infect. Dis. Vol.12,No.(6):pp. 467-469.

*** Luzzaro**,F. ; Mezzatesta,M. ; Mugnaioli,C. ; Perilli,M. ; Stefani,S. ; *et al.* (2006). Trends in production of extended spectrum β-Lactamases among Enterobacteria of medical interest : report of the second Italian nationwide suvey.***J.Clin. Microbiol.*** Vol.44,No .5 :pp.1659-1664.

M

***Mandell**, G.L.; Bennet, J.E.; and Dolim. R.(1995). Principles and practice of infections disease. 4th ed. Charchill. Living stone. Int.

Mandal** S, Mandal MD, and Pal, N.K. (2004). Evaluation of combination effect of ciprofloxacin and cefazolin against *Salmonella enterica* serovar *typhi* isolates by in vitro methods. ***Calicut Med J. Vol.2,No. 2 .

*** Maniatis**, T.; Fritsch, E.F.; &Sambrook, J.(1982) Molecular cloning Fourth ed. Cold spring Harbor Laboratory. New York. Book.

Mariana**, N. S. ; Salman, S. A.; Neela, V. ; Zamberi, S. (2009). Evaluation of modified congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillinresistance *Staphylococcus aureus*. ***Afr. J. Microbiol. Res.Vol.3,No. 6 : pp.330-338.

Marshall**, K.C. (1997). Colonization, Adhesion and Biofilms. In: Manual of Environmental Microbiology. Hurst, C.J.; Knudesn, G.R.; McInerney, M.J.; Stetzenbach, L.D. and Walter, M.V. (eds). ***American Society for Microbiology. Washington, D.C. USA. pp: 358-362.

*Martinez- Martinez ,L; Pascual, A and Jacoby, G.A . (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet. 351:pp. 797-799.

* Martinez- Martinez, L.; Pascual, L.; Alles, S.H.; Diaz, D.A.; Suarez, A.L.; Tran,J.; Benedi, V.J.; and Jacoby, G.A .(1999). Roles of β – Lactamases and porins in activities of carbapenemes and cephalosporins against Klebsiella pneumoniae. ***Antimicrob. Agents Chemother***. Vol .43;No. 7 :pp. 1669-1673.

*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.

* Marchandin, H.; Jean, H.; Champs, C.; Sirt, D.; Darbas, H.; Perigauit, P. and Carriere, C. (2000). Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum β-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob. ***Agents Chemother***. 44:pp.213-216.

*Marques, M.B.; Brookings, E.S.; Moser, S.A.; Sonke, P.B. and Waites, K.B. (1997). Comparative in Vitro Antimicrobial Susceptibities of Nosocomial Isolates of *Acinetobacter baumannii* and Synergistic activities of Nine Antimicrobial combinations. ***Antimicrob. Agents. Chemother.*** Vol. 41,No. 5 :pp. 881-885.

* Mcgrath, B. J.; Bailey, E.M.; Lamp, K. C. and Rybak, M. (1992). Pharmacocodynamics of once –daily amikacin in various combination with cefepine, aztreonam and ceftazindine against PS.aeruginosa in vitro infection model. ***Antimicrob. Agents. Chemother***.Vol.36,No. 12 : pp.2741-2746.

*Meletiadis, J.; Pournaras, S. ;Roilides,E. and Walsh ,T . J.(2010). Defining Fractional Inhibitory Concentration Index Cutoffs for Additive Interactions Based on Self-Drug Additive Combinations, Monte Carlo Simulation Analysis, and *In Vitro-In Vivo* Correlation Data for Antifungal

Drug Combinations against *Aspergillus fumigates*. ***J.Antimicrobial Agnnts and Chemotherapy*** , Vol. 54, No. 2.pp. 602–609.

*Merdaw.M .A. (2011). Postoperative Wound Infections and the Antimicrobial Susceptibility in Baghdad Hospitals. ***Iraqi J Pharm Sci***, Vol.20,No. 2.pp.59-65.

*** Merino**,S. ; Shaw,J.G. and Tomas,J.M. (2006). Bacterial lateral flagella : an inducible flagella system . ***FEMS Microbiol.Lett***.263:pp.127-135.

*** Mobley**, H.L.T.; &Belas, R.(1995). Swarming and Pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. ***Trends in Microbiology***. Vol. 3,No. 7 :pp. 280-4.

Mochon**, A. B. , Garner, O. B. , Hindler, J. A. , Krogstad, P.and 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.*Vol. 49, No.* 4, pp. 1667–1670.

*Mohammed ,S .M.(2010). Modification of the three-dimensional method for the detection of AmpC β-lactamase in Enterobacter spp. and Escherichia coli**.** ***J. of university of anbar for pure science*** *: Vol.4,NO.2* .

*Mokracka, J., Koczura, R. & Kaznowski, A. (2004**).** Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of Enterobacter spp. and Citrobacter spp. ***FEMS Immunol Med Microbiol*** 40, 51–55.

Moteeb**, Sh. H .(2008). Quantitative and Qualitative Assayes OF Bacterial Biofilm Produced By *Pseudomonas aeruginosa* AND *Klebsiella* spp. ***J. of al-anbar university for pure science *: Vol.2: No.3* .

***Mulrooney**, S.B.; and Hausinger, R.P. (2003). Nickel uptake and utilization by microorganisms. FEMS Microbiology Reviews. 27:pp. 239-61.

***Mulvey**, M.R; Grant ,J.M.;Plewes, K. Roscoe, D. and Boyd, D.A.(2011). New Delhi metallo -beta- lactamase in Klebsiella pneumonia and Escherichia coli, Canada. Emerg Infect Dis.17:pp103-106.

* **Murray**, P.R, Rosenthal, KS, Kobayashi, GS, and Pfaller, MA (2002). Medical Microbiology, 4th Edition. Mosby, St. Louis, MO. Pp. 266-280

***Murray**, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C. & Yolken, R.H. (1999). Manual Of Clinical Microbiology. (7th)ed. American Society Of Microbiology. Washington, U.S.A.

Mutnick**, A.H.; Turner, P.J.& Jones, R.N.(2002). Emerging antimicrobial resistance among *Proteus mirabilis* in Europe: report from the MYSTIC Program (1997-2001), Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection**. *J.Chemother. Jun. . Vol .14,No. 3 :pp. 253-8.

N

*** Nakano**, M.; Degnchi, T.; Kawamura, T.; Yasuda, M.; Kimura, M.; Okano,Y. and Kawada , Y. (1997) . Mutation the gyrA and parC gene in fluroquinolone resistant clinical isolates of Pseudomonas *aeruginosa.* ***J. Antimicrob. Agent chemother*** . 41 :pp. 2289 – 2291 .

***Nassif,X**. and Sansonetti, P.J.(1986). Correlation of the virulence of Klebsiella pneumoniae KI and K2 with the presence of plasmid encoding Aerobactin. Infec. Immun. . Vol .54,No. 3 :pp. 603 - 608.

***National Committee** For Clinical Laboratory Standareds .(2002). Perfomance Standared For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS. Villanova P.A.

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

***Neu,** H.C. (1991). Therapy and Prophylaxis Of Bacterial Infections. P: 478-93. In Harrison's Principles Of Internal medicin By Wilson, J.D.; Braundwold, E.; Martin, J.B.; Fauci, A.S.; & Root, R. (12^{th}) ed. V1.Mac - Graw. Hill. New York.

O

***O'Connell**,M.(1984). Genetic Transfer in prokaryotes transformation, transduction and conjugation.: 2 -13 in Advanced Molecular Genetic by publisher, A. and Timmis. K. Springer verlug -Berlin.

*ỎHara,C.M. ; Brenner,F.W. and Miller,J.M.(2000). Classification ,identification ,and clinical significance of *Proteus* , *Providencia,* and *Morganella*.***Clin.Microbiol.Rev***. Vol. 13,No. 4 :pp.534-546.

Olajuyigbe**, O. O and Afolayan, A. J.(2012). Synergistic Interactions of Methanolic Extract of *Acacia mearnsii* De Wild. with Antibiotics against Bacteria of Clinical Relevance. ***Int. J. Mol. Sci .*13*, pp.8915-8932; doi:10.3390/ijms13078915. ISSN: 1422-0067.

* **Opal**, S.M; Cross, A.S; Genski, P. and Lyhte, L.W.(1990) . Aerobactin and hemolysin as virulence determinants in *Eschericha coli* Isoated from human blood, Urine and stool***. J. Infect , Dis***. 161 : pp.794-796.

O` Toole**, G.; Keplan, H.B .and kolter, R. (2000). Biofilms formation as microbial development. ***Annu. Rev. Microb. 54: pp.49 – 79 .

P

Patel** G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. (2008) ; Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiellapneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. ***Infect Control Hosp Epidemiol.*;2*9:pp.1099-106.

Paterson,**D.L. and Bonomo,R.A. (2005). Extended-Spectrum β-Lactamase : a clinical update.Clin.Microbiol.Rev***. Vol .18,No. 4:pp. 657-686.

* **Patwardhan** , R.B .; Dhakephalkar , P.K. ; Niphadkar , K.B. and Chopade , B.A. (2008) .A study on nosocomial pathogens in ICU with special reference to multiresistant *Acineobacter baumannii* harbouring multiple plasmids ***.J . Med res*** .128:pp.178-187.

* **Payne**, John W., James R. Bettman, and Eric J. Johnson. (1988). "Adaptive Strategy Selection in Decision Making," ***Journal of Experimental Psychology****: Learning, Memory & Cognition,*Vol. 14,No. (3), pp.534-52.

***Pelezar**, M.J.; Chan, E.G. and Hrieg, N.R . (1986). Microbiology. 5^{th} ed. McCraw-Hill book company.

Pfeifle** , D. ; Janas , E. and Wiedemann , B. (2000).Role of penicillin – binding proteins in the initation of the Ampc –β– lactamase expression in *Enterobacter cloaceae* **. *J. Antimicrob . Agent . Chemother . 44: pp.169-172.

Piéboji**,J.G. ; Koulla-Shiro,S. ; Ngassam,P. ; Adiogo,D. ; Njine,T.; (2004). Antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli isolates from inpatients and outpatients at Yaounde Central Hospital, Cameroon.Int.J.Infect.Dis***. Vol. 8,No. 3 :pp.147-154.

***Pillai**, D. R., McGeer, A. and Low, D. E. (2011) ; New delhi metallo-lactamase-1 in enterobacteriaceae:emerging resistance. *CMA* . Vol 183,No.1.

Pils**.H.;andBroun,V.(1995).Evidence that the Immunity protein inactivates colicin 5 immediately prior to the formation of the transmembrane channel. ***J. Bacteriol. Vol. 177,No. 12 :pp. 6966 - 697.

Pinsky**,B.A., Baron,E.J., Janda,J.M. and Banaei,N.(2009). Bartholdi's abscess caused by hypermucoviscous*Klebsiellapneumoniae.* ***J . Medical Microbiology .58 :pp.671-673.

***Pinto pereria**,L.M. ; Phillips,M. ; Ramlal,H. ; Teemul,K. and Prabhaker (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.

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. Vol. 44,No. 3 : pp.622-632.

***Poston** , S.M; and Naidoo , J.L . (1983). Genetic and antimicrobial drug resistance in the Staphylococci . pp. 63-199 in C.S.F.

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

Q

***Quinu**, P.J.; Carter, M.E. and Marky, B.K. (1998). Clinical veterinary microbiology. Mosby. Philadelphia.

R

* **Raja** , C .E and Selvam ,G . S .(2009). Plasmid profile and curing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* metal resistant . ***J.Environ*** . Vol .6,No. 2 :pp.259-266.

***Rajehwari** ,H. ; Nagaveni ,S .; Oli , A. and Chandrakanth ,K.(2010). Multiple Antibiotic Resistance and Esbl Producing *Klebsiella pneumonia* isolated from clinical Urine Samples . Vol .5,No. 1 :pp. 89-91.

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

Raksha**,H.; Srinivasa ,H. and Macaden,R.S .(2003). Occurrence & characterization of uropathogenic *E.coli* in UTI.Indian**.** ***J.Med.Microbiol. Vol.21,No. 2 :pp.102-107.

***Rasool**,S.A.; Ahmed ,A.; Khan ,S.& Wahab,A.(2003).Plasmid borne antibioticresistancefactorsamongindigenousKlebsiella.Puk.J.Bot.Vol. 35,No. 2 :pp.243-248.

* **Ren**.Y. Ren Yi, Zhou,Z , Guo Xi, Li Y , Feng Lu, 5 and Wang L .(2010) Complete Genome Sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* Type Strain ATCC 13047**.** ***J. Of Bacteriollogy*** , pp. 2463–2464. Vol. 192, No. 9.

* **Reuter,** H.D. and Sendel, A. (1994). *Allium sativum* and *Allium ursinus* :chemistry , pharmacology and medicinal application-London Academic Press. 6: pp.55-113.

* **Ribera,** A.; Fernandez- Cuenca, F.; Beceiro, A.; Bou, G.; Martnez, L.; Pascual, A.; Cisneros, J.M. and Vila, J.(2004). Antimicrobial

susceptibility and mechanisms of resistance to Quinolones and ß-Lactamase in *Acinetobacter* genospecies[3] **. *Ant. Microb. Agent***. Chem. Vol. 48,No. 4 : pp.1430-1432.

*** Ribera**, E.; Gomez-Jimenez, J.; Cortes, E.; Valle, O. D.;Planes, A.; Gonzalez-Alujas, T.; Almirante, B.and Ocana, I. (1996). Effectiveness of cloxacillin with gentamicin in shot-term therapy for right sides *Staphylococcus aureus* endocarditis. ***Annals of Internal Medicine***. Vol .125,No. 12 : pp.969-974.

Rice**, L. B. , Carias, L. L. , Hujer, A. M. , Bonafede, M. , Hutton, R. , Hoyen, C. and Bonomo, R. A. (2000) ; High level expression of chromosomally encoded SHV-1β- lactamases and an outer membrane protine change confer resistance to ceftazidime andpipracillinetazobactam in clinical isolation of *Klebseillapneumoniae* . Anfimmicrob. ***Agents and chemothe. Vol. 44,No. 2 :pp.362-367.

***Riley**, M.A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution.

Annu. Rev.Genet. 32 :pp. 255–278.

* **Riley** ,M .A .; Goldstone , C .M ; Wertz ,.J .E and Gordon .D.(2003). A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. ***J. Evol.Biol***.16:pp.690-697.

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

***Rollins**,D.M. and Joseph, S.W. (2000) . Enterobacteriaceae Summary.

of Pathogenic Microbiology, university of Maryland.

* **Ruiz**, J. (2003). Mechanisins of resistance to quinolones target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 51 :pp. 1109-1117.

*** Ryder,** M.A. (2005). catheter – Related Infections: It's All About Biofilm. Advanced practice nursing . Vol .5,No. 3 :pp. 1-15.

S

* **Saharan** , B .S .and Nehra , V.(2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review .Life Sciences and Medicine Research :pp.1-30.

* **Sahly** , H. ; Navon -venezia , S. ; Roesler ,L. ; Hay , A. ;Carmell , Y. ; Podschun , R. ; Hennequin , C. ; Forestier , C. and Ofek , I. (2008). Extended spectrum B -Lactamase production is associated with an increase in cell Invasion and expression of fimbrial adhesion in *Klebsiella pneumoniae*. ***Antimicrobial agent and Chemotherapy,*** Vol. 52,No. 9 :pp.3029-3034.

*** 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.

***Sambrook,** J; Fritsch, E; Maniatis, T. (1989). Molecular clouinga Laboratory manual. Cold spring harbor Laboratory. New York.

Samie**,A;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.

* **Scavon**, P.; Sosa, V.; Pollegrino, R.; Galvalisi, U.; Zunino, P. (2004) . Mucosal vaccination of mice with recombinant *Proteus mirabilis* structural fimbrial proteins . Microbes and Infection ,pp. 853-60.

*__Schiappa,__ D.A.; Hayden, M.K; Matushek, M.G.; Hashemia, F. N.; Sulivan, J.; Smith, K.Y.; Miyashiro, D.; Quinn, J.P.; Weinstein, R.A. and Trenholme, G.M. (1996). Cefzidime resistant *Klebsiella pneumoniae* and *E.coli* blood strain infection : A case control and molecular epidemiologic investigation***. *J. Infec Dis***. 173:pp. 259-536.

*__Shareef__ ,A . Y. ; Noore ,H . S. (2005).Isolation and Identification of Bacteria Contaminating the Operating Theatres.***J.alrafedian Science***. Vol.16,No. 8 :pp. 250-237.

* **Shakib**, P. , Ghafourian, S. , Zolfaghary, M. R. , Hushmandfar, R. , Ranjbar, R. and Sadeghifard, N. (2012) . Prevalence of OmpK35 and OmpK36 porin expression in beta-lactamase and non-betalactamase-producing *Klebsiella pneumonia*. Biologics: ***Targets and Therapy***:pp. 1–4.

* **Sharma**, S.; Bhat, G. K.; 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.

* **Sharmeen**, R. , Hossain, N. , Rahman, M. , Foysa, J. and Miah, F. (2012) ; *In-vitro* antibacterial activity of herbal aqueous extract against multi-drug resistant *Klebsiella*sp. isolated from human clinical samples . ***International CurrentPharmaceutical .J.,*** Vol .1,No.(6):pp. 133-137.

*** 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.

*__Solano__, C. ; and Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. Mol. Microbiol. **43**: pp.793 – 808.

*__Sonstein,__ S.A. and Baldwin, J.N. (1972). Loss of the penicillinase plasmid after treatment of *Staphylococcus aureus* with sodium dodecyl sulphate . Bacteriol. Vol .109,No. 1 :pp.262-265.

* **Sosa**,V. ; Schlapp,G. and Zunino,P.(2006). *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice.Microbiol.152:pp.2149-2157.

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

*__Stocks__, E.J.; and Ridway, G.L.(1987).Handling clinical specimens for microbiological studies 5th ed. Churchil living stone. (Cited). Pp.173–201.

* **Subha**, A.; Devi, V.R.& Ananthana, S. (2003). Amp C beta-lactamase producing multidrug resistant strains of *Klebsiella spp*. & *Escherichia coli* isolated from children under five in Chennai. Indian ***J.Med.Res.*** Jan; 117: pp.13-8.

*__Sutherland,__ I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework***.** ***J. Microbiol***. 197: pp.3-9.

Swierzko,** A.ST.; Kirikae, T.; Kirikas, F.M.; Cedzynski, M.; Ziolkowski, A.; Hira, Y.; Kusumoto, S.; Yokochi, T. and Nakano, M. (2001). Biological activities of lipopoly saccharide of Proteus Spp. and their in teraction with polymyxin B and an 18-K Dacationic antimicrobial protein (CAP-18). Derived peptide. ***J. Med. Microbiol. 49: pp.127-38.

*__Sykes__, R.B.and Mathew, M.(1976). The β-Lactamases of Gram negative bacteria and their role in resistance to β-Lactam antibiotic.***J, Antimicrobial Chemotherapy***.2 : pp.115-157.

T

* **Tagg**, S.R. ; Dajani ,A.S. and Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocin of gram positive bacteria. ***Bacteriol.Rev***., 40 : pp.722–756.

*__Talaro__,T.(2002).Foundations in Microbiology .4th.Ed. The McGraw-Hill Companies ,USA.

*__Tanaka__, T.; Kawase, M.; Tani, S.(2003).Urease inhibitory activity of simple α, β-unsaturated ketones. Life Sciences. 73: 2985-90.

*__Taguchi,__ F.; Sito, T. T.; Okudo, S.; Aoki, M. Mastuzaki, T.; Tomioka .(1993). Proposal for nosocomial infection, Control of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*__". Japan. *J. Bacterio*__.pp. 120-129__.__

*__Tankhiwale__, S.S.; Valgaonnkar, S.V.; Ahamad, S. and Hassani, U. (2004) . Evaluation of extended spectrum beta lactamace in urinary isolates . ***Indian J. Med Rs***. 120 : 553-6 .

*__Tenover__, F.C.; Phillips, K.L.; Gilbert, T.; Lockhart, P.; O'Hara, P.J. and Plorde, J.J.(1989).Development of DNA probe from the deoxyribonucleotide sequence of a 3-N-aminoglycoside acetyle teansferase[AAC(3)-I] resistance gene . ***Antimicrob. Agents. Chemother***. 33 :pp. 551 - 559 .

* **Tierney**, L.M.Jr.; Mcphee, S.J. and Papadakis, M.A. (1999). Current medical diagnosis and treatment. (38th) ed. Appleton & Lange U.S.A.

*__Todar__, K. (2002_a). Pathogenic *E. coli* . ***J. of Becteriology,***33:pp. 340-350.

*__Todar,__K.(2007).The mechanism of bacterial Pathogenicity ‘‘Klebsiella’’. Todaŕs Textbook of bacteriology.Wisconin-Madison Inc.USA.

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

Toguch**, F. Saito, T.T. Okudo, S. Aoki, M. Matsuzaki, T. Tomioka, M. Kikuno, R. and Lee, S.M. (1993) . Proposal for nosocomial infection control of methecillin resistant *Staphylococcus aureus* (abs.) . ***Japan J. Bactriol. Vol .47,No. 6 :pp. 767-75.

*__Toth,__ V.; Emody, L. (2000). *Proteus* virulence: involvement of the pore forming alpha-hemolysin. ***Acta.Microbiol.Immunol.Hung***. Vol .47,No.(4): pp.457-70.

***Trevorse**, J.T. (1986) . Plasmid curing in bacteria . FEMS. Microbiol . Rev . 32 : pp.149–157.

*__Trick__ ,.W.E; Verhon ,. M.O; Hayes , R.A; Nathan ,.G; Rice,.T.W; Peterson ,.B.J. and Segrti,.J.(2003) . Impact of ring wearing on hand contamination and comparsion of hand hygiene a gent .

U

* **Ueda,** Y. & Sunagawa, M.(2003). In vitro and in vivo activity of novel 2-(thiazol-2-ylthio)-1-beta-methylcarbapenemeswith potent activity against multiresistant gram-positive bacteria. ***Antimicrob. Agents Chemother***. Aug. Vol .47 ,No.(8): pp.2471-8.

*__Umhe__ , O.; Berkowitz, L . ; Shepp ,D. ;Talavera ,F.;King, J. ;Mylonakia,E. and Cunha , B. (2006). Infectious disease, *Klebsiella* Infection ***.J . Mdicine***.Vol .27,No. (1).

V

**** Valverde**, A.; Coque, t.M.; Sanchez-Moreno, M.P.; Rollan, A.; Baquero, F. and Canton, R. (2004). Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended– spectrum β-lactamase – producing Enterobacteriaceae during non outbreak situations in Spain. ***J. Clin. Microbiol***. Vol. **42**,No. 10 :pp.4769-4775 .

*__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.

*__Vincent__ ,W.(2004). Infections caused by member of the Genus *Klebsiella* . Infectious disease Update. Vol .11,No. 5 :pp.28-33.

* **Virella**, G. (1997). Microbiology infections diseases. Williams and Wilkins company. U.S.A.

W

*__Wayne__,P.A. (2010) . Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement update M100-S20-U.

*__Wenzel__, R.P; Sahm, D.F, Thornsberry, C.; Draghid, C.; Jones, M.E.; Karlowsky, J.A. (2003). Invitro susceptibilities of gram-nagative bacteria isolated from hospitalized patients in four European countries, Canada, and the United State in 2000-2001 to extanded spectrum cephalosporins and comparator antimicrobials implications for therapy . ***Antimicrob Agent chemo Ther.*** 47: pp.3089-98.

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

*__Winokur__, P.L.; Canton, R.; Casellas, J-M.; Legakis, N.(2001). Variations in the performance of strains expressing an extended-spectrum β - Lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. ***Clinical Infections*** Diseases. 32(Suppl 2):pp. 94-103.

*__Wont,__ S.P.; Chou, H.C.; Hsieh, W.S.; Chen, G.Y.; Huang, S.M.; Tsou, K.I. and Tsao, P.N. (2004). Hand washing program for the prevention of nosocomial infection in a neonatal intcusive care unit-, infect – control. Hosp-epidemiol. Vol .25,No. 9 :pp. 742-6.

Y

*Yah, S. C, Eghafona, N. O, Oranusi, S. and Abouo A. M.(2007). Widespread plasmid resistance genes among Proteus Species in diabetic wounds of patients in the Ahmadu Bello university teaching hospital (ABUTH) Zaria. ***African J. of Biotech***.Vol. 6 ,No. 15.pp. 1757-1762.

* **Yedekci**, S. , Erac, B. and Limoncu, M. H. (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***. *pp.67-74.*

Z

* **Zangana**,P.M .M.(2004). Isolation And Identification Of Aerobic Bacteria Before And After Sterilization In The Theatres And Wards Of Tikrit Teaching Hospital. THE Degree of Master ,College of Education ,Women University of Tikrit.

*Zottola, E.A. (2001). Reflections on *Salmonella* and other wee beasties in foods. ***J. Food Tech***. Vol .55,No. 9 : pp.60-67.

ملحق (1) إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى

رقم العينة .

اسم المريض .

العمر .

السكن .

نوع العينة .

تاريخ جمع العينة .

مكان العزل .

إستمارة المعلومات الخاصة بالبيئة

رقم العينة .

تاريخ جمع العينة .

نوع العينة .

مكان العزل .

ملحق (2) جدول (4-1) الأختبارات الكيموحيوية لتشخيص انواع العائلة المعوية المعزولة من صالات الولادة.

نوع البكتريا / نوع الاختبار	*Escherichia coli*	*Klebsiella pneumoniae*	*Enterobacter cloacae*	*Proteus mirabilis*
التصبيغ بصبغة كرام	-	-	-	-
اختبار أنتاج أنزيم الكاتاليز	+	+	+	+
اختبار أنتاج أنزيم الاوكسديز	-	-	-	-
الكشف عن أنتاج الاندول	+	-	-	-
اختبار المثيل الأحمر	+	-	-	+
اختبار فوكاس – بروسكاور	-	+	+	-
فحص قابلية البكتريا على استغلال الستريت	-	+	+	-/+
فحص الحركة	+	-	+	+
فحص اليوريز	-	+	-	+
اختبار استهلاك السكريات الثلاثية وإنتاج H2S (TSI)	A/A -H_2S +gas	A/A -H_2S + gas	A/A - H_2S -gas	K /A + H_2S +gas
اختبار تخمر اللاكتوز	+	+	+	-
اختبار إنتاج أنزيم نزع مجموعة الكاربوكسيل من الحامض الاميني اللايسين	.	.	+	.

+: دلالة على ايجابية الفحص ,-: دلالة على سلبية الفحص,+/ - : نتيجة متغايرة, 0: لم يجرى لها الاختبار,

A = acid , K = alkaline

(نتائج تشخيص بكتيريا *E.coli*)

(نتائج تشخيص بكتيريا*K.pneumoniae*)

(نتائج تشخيص بكتيريا*Proteus mirabilis*)

(نتائج تشخيص بكتريا *Enterobacter cloaca*e)

ملحق (3) شكل(4-2) نتائج تشخيص البكتريا بنظام api20E

ملحق (4) مقاومة عزلات البكتريا قيد الدراسة للمضادات الحيوية المختلفة.

AMC	CIP	IMP	COT	PI	CTX	CAZ	GEN	TOB	CFM	AT	AK	NIT	AMP	رقم العزلة
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	1
R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	2
I	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	3
R	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	4
R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	I	R	S	R	5
R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	6
R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	7
R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	8
R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	9
R	I	S	S	R	I	S	S	S	R	S	S	S	R	10
S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	11
S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	12
I	S	S	R	R	S	S	R	S	I	S	S	S	R	13
S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	14
R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	15
S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	16
R	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	17
R	R	S	R	R	I	S	S	S	R	S	I	S	S	18
S	I	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	19
R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	20
R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	21
S	I	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	22
R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	23
R	I	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	24
I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	25
R	R	S	R	R	R	R	I	S	R	R	S	S	R	26
R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	27
R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	28
I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	29
R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	I	30
I	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	31
R	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R	32

33	R	I	S	S	R	R	I	S	R	R	R	S	S	R
34	R	R	R	S	R	R	S	I	R	R	S	S	R	R
35	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	I
36	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	I	R
37	R	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	S	R	I
38	R	I	I	S	R	R	S	I	R	R	S	S	R	R
39	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R
40	S	R	S	S	R	I	S	S	R	R	S	S	S	S

ملحق (5) يوضح القيمة التائية بين Cefotaxime , Ciprofloxacin **و**Cefotaxime + Ciprofloxacin **بتركيز (1:0.5).**

عند مستوى الدلالة 1%

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائيةt	Sig	مستوى الدلالة
Cefotaxime	27	310.5185	350.2968	26	4.606	.000	0.01
Ciprofloxacin	27	23.3333	35.7297	26	3.393	.002	
Ciprofloxacin+Cefotaxime	27	22.0741	28.7079	26	3.995	.000	
FIC	27	1.8389	3.0004	26	3.185	.004	

ملحق (6)يوضح القيمة التائية بين Cefotaxime , Ciprofloxacin **و**Cefotaxime + Ciprofloxacin **بتركيز (1:1).**

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائيةt	Sig	مستوى الدلالة
Cefotaxime	27	310.518	350.296	26	4.606	.000	0.01
Ciprofloxacin	27	23.3333	35.7297	26	3.393	.002	
Ciprofloxacin+Cefotaxime	27	6.1111	7.3082	26	4.345	.000	
FIC	27	0.9870	1.1172	26	4.575	.000	

ملحق(7)يوضح القيمة التائية بين Cefotaxime , Ciprofloxacin **و**Cefotaxime + Ciprofloxacin **بتركيز(2 :1).**

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائيةt	Sig	مستوى الدلالة
Cefotaxime	27	310.5185	350.2968	26	4.606	.000	0.01
Ciprofloxacin	27	23.3333	35.7297	26	3.393	.002	
Ciprofloxacin+Cefotaxime	27	3.5185	6.1479	26	2.974	.006	
FIC	27	0.45630	0.7379	26	3.213	.003	

ملحق(8)يوضح القيمة التائية بين Cefotaxime , Ciprofloxacin **و**Cefotaxime + Ciprofloxacin **بتركيز(1:3).**

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائيةt	Sig	مستوى الدلالة
Cefotaxime	27	310.5185	350.2968	26	4.606	.000	0.01
Ciprofloxacin	27	23.3333	35.7297	26	3.393	.002	
Ciprofloxacin+Cefotaxime	27	2.1667	3.3195	26	3.392	.002	
FIC	27	0.4113	0.8365	26	2.555	.017	

ملحق(9) **يوضح القيمة التائية بين** Streptomycin ، Cefotaxime و Streptomycin + Cefotaxime **بتركيز (1:0.5)** .

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائيةt	Sig	مستوى الدلالة
Cefotaxime	27	310.5185	350.2968	26	4.606	.000	0.01
Streptomycin	27	436.1481	318.0430	26	7.126	.000	
Cefotaxime + Streptomycin	27	98.9630	140.3844	26	3.663	.001	
FIC	27	0.7659	0.9597	26	4.146	.000	

ملحق(10) **يوضح القيمة التائية بين** Streptomycin ، Cefotaxime و Streptomycin + Cefotaxime **بتركيز (1:1)** .

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائيةt	Sig	مستوى الدلالة
Cefotaxime	27	310.5185	350.2968	26	4.606	.000	0.01
Streptomycin	27	436.148	318.0430	26	7.126	.000	
Cefotaxime + Streptomycin	27	63.1111	85.8000	26	3.822	.001	
FIC	27	0.4790	0.4721	26	5.272	.000	

ملحق(11) **يوضح القيمة التائية بين** Streptomycin ، Cefotaxime **و** Streptomycin + Cefotaxime **بتركيز** **(1:2)** .

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائية t	Sig	مستوى الدلالة
Cefotaxime	27	310.5185	350.2968	26	4.606	.000	0.01
Streptomycin	27	436.1481	318.0430	26	7.126	.000	
Cefotaxime + Streptomycin	27	36.8888	45.3510	26	4.227	.000	
FIC	27	.3468	0.3215	26	5.603	.000	

ملحق (12) **يوضح القيمة التائية بين** Streptomycin ، Cefotaxime **و** Streptomycin + Cefotaxime **بتركيز** **(1:3)** .

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائية t	Sig	مستوى الدلالة
Cefotaxime	27	310.5185	350.2968	26	4.606	.000	0.01
Streptomycin	27	436.148	318.043	26	7.126	.000	
Cefotaxime + Streptomycin	27	13.6481	18.2934	26	3.877	.001	
FIC	27	0.1045	0.1339	26	4.054	.000	

SUMMARY

This study included collection 300 samples of clinical and environmental sources (vaginal swabs , wounds , hands of the workers, patients bed , surgical tools , floor and walls) from hospitals of Baquba city for the period from 27/08/2012 to 1/12/2012.

The results refer that 22 isolates are belonging to bacteria of Enterobacteriaceae 15 (37.5%) *Escherichia coli* ,15 (25%) *Enterobacter cloacae* , 9 (22.5%) *Proteus mirabilis* and 6(15%)*Klebsiella pneumoniae* by using diagnostic phenotypic ,biochemical tests and confirm the diagnosis using regular API20E.

The results of the investigation of some virulence factors showed the isolates of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* produce of haemolysin with percentage (46.7%) and (88.89%) respectively ,while *Klebsiella pneumoniae and Enterobacter cloacae* have not ability to produce this enzyme.

The production of biofilm by local isolates were detected in three ways, isolates of *Escherichia coli* has shown its ability to produce biofilm by (93.33%) in a manner ELISA and(86.66%) in a Congo–red and adhesion Surface methods, while *Enterobacter cloacae* were produce biofilm with percentage (90%,80%,90%) respectively were detected by Cong –red method , adhesion surface and ELISA method. *Proteus mirabilis* produced biofilm with (66.66%,77.77%,88.88%) respectively were detected by Cong –red method , adhesion surface , and ELISA method ,while *Klebsiella pneumoniae* showed potential production of (100%) Congo-red and the ELISA methods ,(83.33%) adhesion surface .

The results showed that all isolates of *Klebsiella pneumoniae and Proteus mirabilis* were produced urease by (100%),while the results detect that the isolates of *Escherichia coli and Enterobacter cloacae* are not able to produce this enzyme.
Proteus mirabilis showed ability to produce swarming with (100%).

Siderophore production by *Klebsiella pneumoniae,*and *Enterobacter cloacae* was (100%) , while the isolates of *Escherichia coli and Proteus mirabilis* showed ability to production Siderophore by (53.3%), (11.11%) respectively.

Results of bacteriocin production refer to isolates of *Eschrichia coli, Enterobacter cloacae, Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* produce bacteriocin with percentage (73.3%,70%,66.66%,50%) respectively.

SUMMARY

The production of β-lactamase from each of *Eschrichia coli*, *Enterobacter cloacae* , *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* (73.33%) , (60%) ,(55.55%) ,(50%) respectively, also have the ability to produce the Extendended spectrum β-Lactamase enzyme by using disc Approximation ,It's production from each of*Eschrichia coli, Enterobacter cloacae , Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* (6.66%), (10%), (22.22%) ,(16.66%) respectively.

The results of Metalloβ-Lactamase by using the Imp-EDTA combination dis casmanaged inducted that *Enterobacter cloacae* and *K.pneumoniae* were produced ratios (10%) and (33.33%) respectively, while *E.coli* and *P.mirabilis* doesn't have ability to produce these enzymes.

The results showed a variance as far as their resistance to these antibiotics. Isolates of *E.coli* showed highest resistance rate % 93.3 for Piperacilline while isolates of *Enterobacter cloacae* resistan with 90% for Cefixime and Tobramycin. *P.mirabilis* higher resistant Ampicillin by100%, while *K.pneumoniae* showed higher resistance to Ampicillin and Cefixime percentage83.33%.Imipenem is the most effective antibiotic by (100%).

Multiple resistance pattern for antibiotic divided into two groups , first group included (13) isolates which were resistant to (2-6) antibiotics , while second group included (24) isolates were resistant to (7-11) antibiotics . Results indicated that the second group was dominant.

The minimum inhibitory ioncentration (MIC) for 5 antibiotics, that Amoxicillin,Cefotaxime,Ciprofloxacin, Streptomycin, Nalidixic acid was determined .
The MIC values of these antibiotics ranged between (64-1024>) , (32-1024>), (2-1024) ,(128-1024) ,(8-1924>) µg\ml, respectively.

The results showed that the combination among Ciprofloxacin ,Streptomycin and Cefotaxime ratio (1:3) is considered the best among other ratios, the combination between Cefotaxime and Ciprofloxacin showed synergistic effects by (96.29%), when combination , Streptomycin with Cefotaxime showed rate of (81.48%) .

The results showed that plasmid profile for isolates (*E.coli21* , *Enterobacter cloacae*1 and *K.pneumoniae17*) contain two plasmid bands one mega plasmid and one small plasmid, *P.mirabilis* 15 contained one mega plasmid band and two Small plasmid bands.

SUMMARY

Curing was conducted by use of acridin orange, plasmids were lost at concentration(64)µg / ml for *E.coli 21*,(1024) µg / ml for *Enterobacter cloacae* 1 ,(2500) µg / ml for *P.mirabilis 15* and *K.pneumoniae17*.

The investigation about ability curing isolates were resistant to some antibiotics, all isolates showed resistance to antibiotics Ciprofloxacin and Co-Trimoxazol, while lost resistance of Amikacin, Augmentin Ampicillin, Gentamycin and Cefotaxime except isolate K17 does not lose their ability to resistant Augmentin.