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

صدق الله العلي العظيم

فاطر (٢)

دراسة بكتريولوجية ووراثية على عزلات بكتريا *Plesiomonas shigelloides* في مدينة الحلة

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم-جامعة بابل

وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة علوم

في علوم الحياة-الاحياء المجهرية

من

إلهام عباس بنيان الساعديّ

ذي الحجة ١٤٢٦ كانون ثاني ٢٠٠٦

Bacteriological and Genetical Studies on Some Isolates of *Plesiomonas shigelloides* in Hilla City

A Thesis

Submitted to the Council of College of Science, University of Babylon, in Partial Fulfillment of the Requirements for the award of the Degree of Doctor of Philosophy in Biology/Microbiology

By

Ilham Abbas Bonyan AL-Saedi

The Al-Heja ١٤٢٦ **January** ٢٠٠٦

Abstract

Sixteen isolates of *Plesiomonas shigelloides* were isolated and identified out of ٣٠٠ samples of stool taken from out and in patients admitted to Maternity and children and healthy centers in Hilla province at the period ٣/٥/٢٠٠٤ to ١/٨/٢٠٠٤ .

All isolates were cultured and biochemical tests performed to confirm diagnosis.

Also out of ٦٠ fish specimens two isolates of *Plesiomonas* were isolated from gills and flesh of the fresh fishes of the Hilla river.

١- Most strains were able to produce the β-haemolysin ٨٨.٨٪ while only two isolates were able to produce siderophores ١١.٢٪.

٢- All strains showed resistant to the beta-lactam antibiotics . The percentage of resistance was very high against Ampicillin, Amoxycillin and Ampiclox ١٠٠٪ pipracillin ٥٠٪ , Cefotaxime ٣٨.٨٨٪, and Ceftizoxime ١١.١١% whereas the resistance for Erythromycin, Tetracycline ٨٣.٣٣٪ Trimethoprime and Rifampicin ٣٨.٨٨%, and Streptomycin ٣٣.٣٣%, Gentamycin ٢٧.٧٧%, for each Ciprofloxacin and Chloramphinicol ٢٢.٢٢٪.

٣- All strains showed their ability to produce the Colonization Factor Antigen (CFA/I and CFA/III) ١٠٠٪. All strains showed the ability to produce (CFA/III) in the presence of tannic acid or high concentration of Ammonium sulfates.

٤- It was found that ١٦.٦٪ of isolates showed ability to produce lipase in presence of (Tween ٨٠) where ٢٧.٧٪ of isolates showed ability to produce lecithinase. Extra cellular protease or gelatinase was not seen by any isolates of *Plesiomonas*, but all isolates showed ability to produce β- galacto sidase.

٥- The results of the plasmid DNA isolation indicated that isolates possessed at least one plasmid which unability to transfer by conjugation. The transformed strains has commen plasmid causing resistance to each of Ampicillin and Trimethoprime.

٦- The possibility of using some compounds to cure the plasmids content of the bacteria was studied and the results showed that Parahydroxy benzoic acid had only a partial effect on the curing of the plasmids content, unlike sodium dodocyle sulfate, which had a complete curing on the plasmids content, all bacterial isolates entirely lost plasmids content.

اقرار المشرف

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أشهد بأن إعداد هذه الأطروحة جرى تحت اشرافي في جامعة بابل وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة علوم في علوم الحياة-الاحياء المجهرية.

التوقيع:
المشرف على الأطروحة: د. محمد صبري عبد الرزاق السعيد
التاريخ:
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: جامعة بابل-كلية الطبّ

توصية رئيس قسم علوم الحياة
استناداً إلى التوصيات المتوافرة، أرشح هذه الأطروحة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:
الاسم: د. علي شعلان
المرتبة العلمية: أستاذ
التاريخ : / / ٢٠٠٥

اقرار لجنة المناقشة

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

نشهد بأننا اعضاء لجنة التقويم والمناقشة اطلعنا على هذه الأطروحة وقد ناقشنا الطالبة فيها وفيما له علاقة بها ووجدناها جديرة بالقبول لنيل درجة دكتوراه فلسفة علوم في علوم الحياة-الأحياء المجهرية.

رئيساً
التوقيع:
الاسم:د. محمد شمخي جبر
الدرجة العلمية:استاذ

عضواً
التوقيع:
الاسم: د. حبيب صاحب نهر
الدرجة العلمية: استاذ

العنوان: جامعة بغداد-الكلية التقنية الطبية

عضواً
التوقيع:
الاسم:د. عدنان حمد الحمداني
الدرجة العلمية:استاذ
العنوان: جامعة القادسية-كلية الطب

عضواً
التوقيع:
الاسم:د. حسن فاضل ناجي
الدرجة العلمية:استاذ مساعد
العنوان: جامعة بابل-كلية العلوم

العنوان: جامعة بابل-كلية الطب

عضواً
التوقيع:
الاسم: د. عدنان مهران اوانيس
الدرجة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: جامعة الكوفة-كلية الطب

عضواً (المشرف)
التوقيع:
الاسم:د. محمد صبري عبد الرزاق
الدرجة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: جامعة بابل-كلية الطب

مصادقة عمادة كلية العلوم

التوقيع:
الاسم:
المرتبة العلمية:
العنوان: كلية العلوم-جامعة بابل
التاريخ:

الإهداء

إلى : من شاركني حُلُم الدراسات العليا... وغادر
ابن أختي الشهيد المهندس علي (رحمه الله)
إلى: أبناء بلدي، الشموع التي تتساقط كل يوم كي أكون.. شهداء الوطن الغالي...
إلى: رفيق عمري.. زوجي ... الغالي نصير
إلى: فرحة عمري أطفالي أميم ودنيا وأمد
والدي الغالي والدتي الحبيبة
أخواتي وأخوتي ... سندي في الحياة....

أهدي ثمرة جهدي المتواضع

إلهام

شكر وتقدير

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

الحمد لله رب العالمين والسلام على سيد المرسلين محمد الامين وعلى آله الطيبين وصحبه أجمعين.

وبعد:

يطيب لي وأنا أُنهي كتابة أطروحتي أن اتقدم بجزيل الشكر وعظيم الامتنان الى استاذي الفاضل الدكتور محمد صبري عبد الرزاق السعيد لاقتراحه موضوع الاطروحة وجهوده السخية في الإشراف العلميّ المباشر والمتابعة طيلة مدة الدراسة والبحث داعية له بالخير والنجاح الدائم.

وأجد من الوفاء تقديم الشكر والامتنان إلى الأستاذ الفاضل الدكتور مفيد جليل عوض والدكتورة رباب عمران راضي الجيلاوي لما أبدوه من مساعدة في أثناء البحث.

شكري وتقديري الى رئاسة جامعة بابل وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة لإتاحتهم الفرصة لإكمال دراستي العليا. كما أتقدم بالشكر الجزيل الى عمادة كلية الطب جامعة بابل لمنحهم الفرصة لإكمال دراستي العليا.

خالص شكري وامتناني إلى إدارة مستشفى الولادة والأطفال ووحدة البكتريولوجي لما أبدوه من عون ومساعدة.

ولايفوتني أن أتقدم بخالص شكري وامتناني إلى زملائي وزميلاتي من طلبة الدراسات العليا في قسم علوم الحياة وأخص بالذكر الصديقات أزهار عمران وفريال جميل ومهدي وجاسم محمد وأنوار وإسراء وزميلتي في كلية الطبّ الدكتورة زينب حمود مع تمنياتي للجميع بالنجاح والموفقية.

الباحثة

الخلاصة

تم عزل وتشخيص ١٦ عزلة عائدة الى بكتريا *Plesiomonas shigelloides* من مجموع ٣٠٠ نموذج اسهال من المراجعين الى مستشفى بابل للولادة والاطفال والمراكز الصحية في المحافظة وللفترة من ٢٠٠٤/٥/٣ ولغاية ٢٠٠٤/٨/١، ومن مجموع ٦٠ عينة سمك تم الحصول على عزلتين عزلت من غلاصم ولحم اسماك البني التي تم الحصول عليها من نهر مدينة الحلة وكانت نتائج هذه الدراسة الآتي:

١- ان ٨٨.٨% من العزلات منتجة للهيمولايسين بيتا بطريقة كساء الاغار المحورة وان ١١.٢% من العزلات فقط قادرة على انتاج السايدروفورات.

٢- اظهرت العزلات كافة مقاومة عالية لمضادات البيتالاكتام (البنسلينات والسيفالوسبورينات) فقد كانت نسبة المقاومة للامبسلين والاموكسيسلين والامبكلوكس ١٠٠% وكانت نسبة المقاومة للببراسلين ٥٠% اما نسبة المقاومة للسيفوتاكسيم فكانت ٣٨.٨٨% وان اقل نسبة مقاومة لهذه المجموعة كانت للمضاد الحيوي السفتزوكسيم ١١.١١% اما نسبة المقاومة لباقي المضادات الحياتية فكانت كالاتي: الارثرومايسين والتتراسايكلين ٨٣.٤%، ، التراي مثبرم والريفادين ٣٨.٨٨%، بينما كانت المقاومة للستربتومايسين ٣٣.٣٣% وللجنتامايسين ٢٧.٧٧% والسبروفلوكساسين والكلورامفينيكول ٢٢.٢٢%.

٣- اظهرت كافة العزلات نتائج موجبة في فحص تلازن كريات الدم الحمراء للانسان صنف (A) بوجود سكر المانوز مما يشير الى احتمال احتواء العزلات المحلية على مستضد عامل الاستعمار الاول (Colonization Factor Antigen/I) كما ان العزلات كافة ١٠٠% اعطت نتائج موجبة في فحص تلازن كريات الدم الحمراء للانسان فصيلة (A) بوجود حامض التانيك (Tannic acid) مما يشير الى احتمال امتلاك العزلات على عامل الاستعمار الثالث (Colonization Factor

(Antigen/III، كما اظهرت العزلات كافة ١٠٠% نتائج موجبة عند الكشف عن عامل الاستعمار الثالث باستخدام اختبار التجمع الملحي (Salt aggregation test) باستخدام تركيز عالٍ من ملح كبريتات الامونيوم (٤ مولار).

٤- اظهرت النتائج ان ١٦.٦% كانت قادرة على انتاج انظيم اللايبيز المحلل للدهن بوجود مادة (Tween ٨٠) في حين ٢٧.٧% من العزلات كانت قادرة على انتاج انظيم الليسينثنيز، كما ان جميع العزلات ١٠٠% كانت قادرة على انتاج انظيم تحلل سكر الكالاكتوز باستخدام مادة ONPG.

٥- بينت نتائج عزل الدنا البلازميدي ان العزلات تحتوي على بلازميد كبير واحد على الاقل في كل عزلة، واظهرت نتائج الاقتران البكتيري على عدم امكانية انتقال البلازميدات بين عزلات *Plesiomonas* الواهبة والسلالة *E. coli* MM٢٩٤ المستلمة، اما نتائج التحول البكتيري فقد وجد ان السلالات المتحولة تحتوي على بلازميد مشترك يمنح صفة المقاومة لكل من المضاد الحيوي الامبسلين والتراي مثبرم.

٦- درست امكانية استخدام بعض المركبات في تحييد المحتوى البلازميدي للبكتريا واظهرت النتائج ان para-hydroxy-benzoic acid له تأثير جزئي في تحييد المحتوى البلازميدي على العكس من ذلك اظهر مركب Sodium Dodocyl Sulphate تأثيراً كلياً على المحتوى البلازميدي اذ فقدت العزلات البكتيرية جميعها المحتوى البلازميدي.

الاسم : إلهام عباس بنيان الساعديّ

بكالوريوس علوم – علوم حياة -جامعة بغداد

ماجستير علوم -احياء مجهرية-جامعة بابل

دكتوراه علوم-احياء مجهرية-جامعة بابل

دراسة بكتريولوجية وراثية على عزلات بكتريا *Plesiomonas shigelloides* في مدينة الحلة

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم-جامعة بابل

وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة علوم

في علوم الحياة-الاحياء المجهرية

الخلاصة

تم عزل وتشخيص ١٦ عزلة عائدة الى بكتريا *Plesiomonas shigelloides* من مجموع ٣٠٠ نموذج اسهال من المراجعين الى مستشفى بابل للولادة والاطفال والمراكز الصحية في المحافظة وللفترة من ٢٠٠٤/٥/٣ ولغاية ٢٠٠٤/٨/١، ومن مجموع ٦٠ عينة سمك تم الحصول على عزلتين عزلت من غلاصم ولحم اسماك البني التي تم الحصول عليها من نهر مدينة الحلة وكانت نتائج هذه الدراسة الآتي:

١- ان ٨٨.٨% من العزلات منتجة للهيمولايسين بيتا بطريقة كساء الاغار المحورة وان ١١.٢% من العزلات فقط قادرة على انتاج السايدروفورات.

٢- اظهرت العزلات كافة مقاومة عالية لمضادات البيتالاكتام (البنسلينات والسيفالوسبورينات) فقد كانت نسبة المقاومة للامبسلين والاموكسيسلين والامبكلوكس ١٠٠% وكانت نسبة المقاومة للببراسلين ٥٠% اما نسبة المقاومة للسيفوتاكسيم فكانت ٣٨.٨٨% وان اقل نسبة مقاومة لهذه المجموعة كانت للمضاد الحيوي السفتزوكسيم ١١.١١% اما نسبة المقاومة لباقي المضادات الحياتية فكانت كالاتي: الارثرومايسين والتتراسايكلين ٨٣.٤%، ، التراي مثبرم والريفادين ٣٨.٨٨%، بينما كانت المقاومة للستربتومايسين ٣٣.٣٣% وللجنتامايسين ٢٧.٧٧% والسبروفلوكساسين والكلورامفينيكول ٢٢.٢٢%.

٣- اظهرت كافة العزلات نتائج موجبة في فحص تلازن كريات الدم الحمراء للانسان صنف (A) بوجود سكر المانوز مما يشير الى احتمال احتواء العزلات المحلية على مستضد عامل الاستعمار الاول (Colonization Factor Antigen/I) كما ان العزلات كافة ١٠٠% اعطت نتائج موجبة في فحص تلازن كريات الدم الحمراء للانسان فصيلة

(A) بوجود حامض التانيك (Tannic acid) مما يشير الى احتمال امتلاك العزلات على عامل الاستعمار الثالث (Colonization Factor Antigen/III)، كما اظهرت العزلات كافة ١٠٠% نتائج موجبة عند الكشف عن عامل الاستعمار الثالث باستخدام اختبار التجمع الملحي (Salt aggregation test) باستخدام تركيز عالٍ من ملح كبريتات الامونيوم (٤ مولار).

٤- اظهرت النتائج ان ١٦.٦% كانت قادرة على انتاج انظيم اللايبيز المحلل للدهن بوجود مادة (Tween ٨٠) في حين ٢٧.٧% من العزلات كانت قادرة على انتاج انظيم الليسينثنيز، كما ان جميع العزلات ١٠٠% كانت قادرة على انتاج انظيم تحلل سكر الكالاكتوز باستخدام مادة ONPG.

٥- بينت نتائج عزل الدنا البلازميدي ان العزلات تحتوي على بلازميد كبير واحد على الاقل في كل عزلة، واظهرت نتائج الاقتران البكتيري على عدم امكانية انتقال البلازميدات بين عزلات *Plesiomonas* الواهبة والسلالة *E. coli* MM٢٩٤ المستلمة، اما نتائج التحول البكتيري فقد وجد ان السلالات المتحولة تحتوي على بلازميد مشترك يمنح صفة المقاومة لكل من المضاد الحيوي الامبسلين والتراي مثبرم.

٦- درست امكانية استخدام بعض المركبات في تحييد المحتوى البلازميدي للبكتريا واظهرت النتائج ان para-hydroxy-benzoic acid له تأثير جزئي في تحييد المحتوى البلازميدي على العكس من ذلك اظهر مركب Sodium Dodocyl Sulphate تأثيراً كلياً على المحتوى البلازميدي اذ فقدت العزلات البكتيرية جميعها المحتوى البلازميدي.

Abstract

Sixteen isolates of *Plesiomonas shigelloides* were isolated and identified out of ٣٠٠ samples of stool taken from out and in patients admitted to Maternity and children and healthy centers in Hilla province at the period ٣/٥/٢٠٠٤ to ١/٨/٢٠٠٤ .

All isolates were cultured and biochemical tests performed to confirm diagnosis.

Also out of ٦٠ fish specimens two isolates of *Plesiomonas* were isolated from gills and flesh of the fresh fishes of the Hilla river.

١- Most strains were able to produce the β-haemolysin ٨٨.٨٪ while only two isolates were able to produce siderophores ١١.٢٪.

٢- All strains showed resistant to the beta-lactam antibiotics . The percentage of resistance was very high against Ampicillin, Amoxycillin and Ampiclox ١٠٠٪ pipracillin ٥٠٪ , Cefotaxime ٣٨.٨٨٪, and Ceftizoxime ١١.١١% whereas the resistance for Erythromycin, Tetracycline ٨٣.٣٣٪ Trimethoprime and Rifampicin ٣٨.٨٨%, and Streptomycin ٣٣.٣٣%, Gentamycin ٢٧.٧٧%, for each Ciprofloxacin and Chloramphinicol ٢٢.٢٢٪.

٣- All strains showed their ability to produce the Colonization Factor Antigen (CFA/I and CFA/III) ١٠٠٪. All strains showed the ability to produce (CFA/III) in the presence of tannic acid or high concentration of Ammonium sulfates.

٤- It was found that ١٦.٦٪ of isolates showed ability to produce lipase in presence of (Tween ٨٠) where ٢٧.٧٪ of isolates showed ability to produce lecithinase. Extra cellular protease or gelatinase was not seen by any isolates of *Plesiomonas*, but all isolates showed ability to produce β- galacto sidase.

٥- The results of the plasmid DNA isolation indicated that isolates possessed at least one plasmid which unability to transfer by conjugation. The transformed strains has commen plasmid causing resistance to each of Ampicillin and Trimethoprime.

٦- The possibility of using some compounds to cure the plasmids content of the bacteria was studied and the results showed that Parahydroxy benzoic acid had only a partial effect on the curing of the plasmids content, unlike sodium dodocyle sulfate, which had a complete curing on the plasmids content, all bacterial isolates entirely lost plasmids content.

فهرس المحتويات

الموضوع	الصفحة
الخلاصة	أ-ب
قائمة المختصرات	ج-د
الفهرس	هـ-ل
الفصل الاول	١-٢٩
١-١ المقدمة	٢
١-٢ استعراض المراجع	٥
١-٢-١ التسمية والتصنيف	٥
١-٢-٢ العلاقة بين جنس *Plesiomonas* و *Shigella spp.*	٦
١-٢-٣ الخصائص الوظيفية لبكتريا *P. Shigelloides*	٨
١-٢-٤ دور بكتريا *P. Shigelloides* في الاخماج المختلفة	١١
١-٢-٥ تشخيص جنس *P. shigelloides*	١٤
١-٢-٦ عوامل الضراوة	١٥
١-٢-٦-١ الهيمولايسين المحلل للدم نوع بيتا	١٥
١-٢-٦-٢ عوامل الالتصاق والاستيطان	١٨
١-٢-٦-٣ إنتاج السايدروفورات	٢٠
١-٢-٦-٤ عوامل الضراوة الأخرى	٢١
١-٢-٧ المقاومة للمضادات الحياتية	٢٢
١-٣ البلازميدات البكتيرية وأهميتها من الناحية المرضية والوبائية	٢٦
الموضوع	**الصفحة**

١-٣-١ تحييد البلازميدات	٢٨
الفصل الثاني –الموادّ وطرائق العمل	**٣٠-٦٦**
٢-١ الموادّوالأجهزة المختبرية	٣١
٢-١-١ الأجهزة المختبرية	٣١
٢-١-٢ المواد الكيمياوية والبايولوجية	٣٣
٢-١-٣ المحاليل والأوساط الزرعية	٣٤
٢-١-٤ الكواشف	٤١
٢-٢ جمع العينات	٤٣
٢-٢-١ طريقة الزرع	٤٣
٢-٢-١-١ اختيار المستعمرات	٤٣
٢-٢-٢ التشخيص البكتريولوجيّ	٤٤
٢-٢-٣ التشخيص المصليّ	٤٤
٢-٢-٤ الاختبارات الكيموحيوية للعزلات	٤٤
٢-٢-٤-١ التشخيص الكيموحيوي للعزلات	٤٦
٢-٢-٥ المقاومة للمضادات الحياتية	٤٨
٢-٢-٥-١ اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحياتية بطريقة Kirby -Baur method	٤٨
٢-٢-٥-٢ اختبار مقاومة العزلات للمضادات على الوسط الزرعيّ الصلب.	٥٠
٢-٢-٦ اختبارات إنتاج بعض عوامل الضراوة لبكتريا *P. shigelloides*	٥٠
٢-٢-٦-١ التحري عن إنتاج إنظيم تحلل الدهن	٥٠
الموضوع	**الصفحة**
٢-٢-٦-٢ التحري عن إنتاج الإنظيم المحلل لليسيثين	٥١

٢-٢-٦-٣ التحري عن إنتاج الهيمولايسين البكتيريّ	٥١
٢-٢-٦-٤ التحري عن الإنظيم المحلل للجيلاتين	٥٢
٢-٢-٦-٥ التحري عن إنتاج الإنظيمات الخارجية المحللة للبروتين	٥٣
٢-٢-٦-٦ التحري عن إنتاج إنظيم تحلل سكر الكلاكتوز	٥٣
٢-٢-٧ تعيين مستضدات عوامل الاستعمار أو الاستيطان	٥٤
٢-٢-٧-١ التحري عن عامل الاستعمار الاول CFA/I بطريقة تلازن دم الإنسان بوجود سكر المانوز	٥٤
٢-٢-٧-٢ التحري عن عامل الاستعمار الثاني CFA/II بطريقة تلازن دم الدجاج بوجود سكر المانوز	٥٥
٢-٢-٧-٣ التحري عن عامل الاستعمار الثالث CFA/III بطريقة تلازن دم الإنسان بوجود حامض التانيك	٥٥
٢-٢-٧-٤ تعيين مستضدات عوامل الاستعمار بطريقة التلازن الملحيّ	٥٦
٢-٢-٨ التحري عن إنتاج السايدروفور	٥٦
٢-٢-٩ التحري عن المحفظة البكتيرية	٥٧
٢-٣ عزل الدنا البلازميدي	٥٧
٢-٣-١ طريقة التحلل بالقاعدة	٥٧
٢-٣-٢ عزل الدنا البلازميدي بطريقة Salting out	٥٨
٢-٣-٣ الترحيل الكهربائيّ للدنا البلازميديّ على هلام الأغاروز	٦٠
الموضوع	**الصفحة**
٢-٣-٤ عملية التحييد	٦١
٢-٣-٤-١ التحييد باستخدام SDS	٦١
٢-٣-٤-٢ التحييد باستخدام para-hydroxy benzoic acid	٦٢

٢-٣-٥ التحول الوراثيّ	٦٣
٢-٣-٥-١ عزل الدنا البلازميديّ من الخلايا المؤهلة	٦٤
٢-٣-٦ الاقتران البكتيريّ	٦٥
الفصل الثالث: النتائج والمناقشة	**١١٢-٦٧**
٣-١ العزل والتشخيص	٦٨
٣-١-١ التشخيص المصلي	٧٥
٣-٢ التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا *P. shigelloides*	٧٨
٣-٢-١ الفعالية الانزيمية	٧٨
٣-٢-٢ التحري عن افراز الهيمولايسين	٨١
٣-٢-٣ إنتاج السايدروفور	٨٤
٣-٢-٤ عوامل الاستعمار والاستيطان	٨٧
٣-٣ تأثير بعض المضادات الحياتية في بكتريا *P. shigelloides*	٩٠
٣-٤ التحري عن وجود الدنا البلازميديّ	٩٥
٣-٥ تحييد البلازميدات	١٠٠
٣-٦ التحول الوراثيّ	١٠٧
٣-٧ الاقتران البكتيريّ	١١١
الموضوع	**الصفحة**
الاستنتاجات والتوصيات	**١١٤-١١٢**
٤-١ الاستنتاجات	١١٣
٤-٢ التوصيات	١١٤
المصادر	**١٤٦-١١٥**

المصادر باللغة الانجليزية	١١٦
المصادر باللغة العربية	١٤٦
الملاحق	١٤٧
ملحق ١	١٤٨
الخلاصة باللغة الانجليزية	A-B

قائمة الجداول

الرقم	العنوان	الصفحة
١	سلالات البكتريا والبلازميدات القياسية المستخدمة في الدراسة	٤١
٢	المضادات الحيوية المستخدمة في اختبار الحساسية	٤٩

٣	الاختبارات التشخيصية لبكتريا *P. shigelloides*	٧٠
٤	ألاماكن التي تم فيها العزل والنسب المئوية لعدد العزلات	٧٥
٥	قابلية بكتريا *P. shigelloides* على إفراز الإنظيمات على الاوساط الزرعية الصلبة	٨٠
٦	قابلية بكتريا *P. shigelloides* على افراز الهيمولايسين والسايدروفورات	٨٦
٧	قابلية بكتريا *P. shigelloides* على انتاج عوامل الاستيطان	٨٩
٨	ملخص لنسب المقاومة والحساسية للمضادات الحياتية	٩٤
٩	نمط مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية	٩٨
١٠	النسق البلازميديّ وعدد البلازميدات في العزلات البكتيرية	١٠٣
١١	تأثير Parahydroxy benzoic acid في تحييد البلازميدات لبكتريا *P. shigelloides*	١٠٤
١٢	تأثير SDS في تحييد البلازميدات لبكتريا *Plesiomonas*	١٠٩

قائمة الاشكال

الرقم	العنوان	الصفحة
١-A و B	الترحيل الكهربائي لمحتوى الدنا البلازميديّ لعدد من عزلات *P. shigelloides*	٩٩
٢	المحتوى البلازميديّ لعزلات *P. shigelloides* المعاملة بمادة parahydroxy benzoic acid	١٠٥

٣	المحتـــــوى البلازميـــــدي لعـــــزلات بكتريـــــا *P. shigelloides* المعاملة بمادة SDS	١٠٦
٤	الترحيـل الكهربـائيّ لمحتـوى دنـا العـزلات الواهبـة *P. shigelloides* والسـلالة المسـتلمة *E. coli* MM٢٩٤ في عملية التحول الوراثيّ	١١٠

قائمة المخططات

الرقم	العنوان	الصفحة
١	المخطط المتبع لتشخيص بكتريا *P. shigelloides*	٤٥

الفصل الأول

المقدمة واستعراض المراجع

Chapter One

الفصل الأول

Chapter One

١-١ المقدمة Introduction

تعّد بكتريا*Plesiomonas shigelloides* أحد الممرضات التي تشترك في احداث أخماج عديدة في الإنسان وأهمها أخماج الجهاز الهضميّ والعصبيّ وحالات التجرثم الدمويّ وغيرها. وتنتشر هذه البكتريا في بيئات واسعة ولاسيما المياه العذبة كالأنهار والمصبات التي تعّدموطنها الأصلي، كذلك توجد في الترسبات الطينية والحيوانات المائية مثل الأسماك والنواعم والقشريات.

(Arai *et al.*, ١٩٨٠; Miller and Koburger, ١٩٨٥; Aldova *et al.*, ١٩٩٩).

عزلت بكتريا *P. shigelloides* من الخضار الطازجة مثل الكرفس والبقدونس والكزبرة (Rafeal *et al.*, ١٩٩٨; Monge *et al.*, ١٩٩٨) .

أشار Wong وجماعته (٢٠٠٠) إلى إمكانية عزل هذه البكتريا من مصادر مختلفة مثل التربة والمياه والحيوانات ذات الدم البارد والدم الحار والحيوانات الأليفة مثل القطط والكلاب.

ترتبط هذه البكتريا بإحداث نوعين من الأخماج السريرية الأولى هي الالتهاب المعدي المعويّ (gastroenteritis) إذ تم عزلها من حالات وبائية لمرض الإسهال في مناطق مختلفة من العالم مثل أمريكا الشمالية واليابان والمناطق الاستوائية وشبه الاستوائية بضمنها بنغلادش، إذ تعد *Plesiomonas* المسبب الاساس الرابع للأخماج المعوّية بعد *Vibrio cholerae* و *Shigella* spp. و *Aeromonas* spp. . (Islam *et al.*, ١٩٩١; Rahim *et al.*, ١٩٩٢).

ومن أهم أعراضها المرضية هي آلام البطن وحمى مع تقيّؤٍ أو بدون تقيؤ والإسهال الدمويّ في بعض الحالات فضلاً عن حصول الجفاف في بعض الحالات المرضية الشديدة (Scott *et al.*, ٢٠٠١).

أما النوع الثاني فهي الأخماج التي هي خارج الأمعاء (Extraintestinal infections) مثل تجرثم الدم (Bacterimia) والتهاب السحايا في الاطفال وان نسبة الموت في هذه الحالات تصل إلى ٩٠% (Faul *et al.*, ١٩٩٠; Laura *et al.*, ١٩٩٩; Woo *et al.*, ٢٠٠٥) .

وتسبب هذه البكتريا أخماجاً أخرى في مناطق متعددة من جسم الإنسان إذ تم عزلها من العقد اللمفاوية (lymph nodes) والتهاب المرارة (cholecytitis) والتهاب الدماغ الداخليّ (endophathalmitis) والتهاب المفاصل (Septic arthritis) والتهاب النسيج الخلويّ (Cellulitis). (Claesson *et al.*, ١٩٨٤; Brenden *et al.*, ١٩٨٨) .

إن حالات الإسهال في الإنسان الذي تسببه هذه البكتريا قد يحدث بعد تناول الأطعمة البحرية مثل المحار الطازج أو المطبوخ في صورة غير جيدة أو الأسماك أو بوساطة المياه الملوثة (Center for Disease Control and Preventation; ١٩٨٩).

ولكون الإسهال أحد الأمراض الشائعة الذي تسببه ممرضات عديدة سواء كانت بكتيرية أو طفيلية أو فايروسية ولندرة الدراسات بخصوص هذه البكتريا في العراق ولأهميتها الوبائية فقد جاء هدف دراستها من الناحية الوراثية ودراسة تقاربها المستضديّ مع بكتريا *Shigella* حيث تضمنت الدراسة عدة محاور هي:

١- عزل بكتريا *Plesiomonas shigelloides* وتشخيصها من المرضى الراقدين والمراجعين إلى بعض مستشفيات ومراكز الصحة في الحلة الذين يعانون من الإسهال الشديد كذلك عزلها من أسماك المياه العذبة في مدينة الحلة.

٢- عزل بكتريا *Shigella* وتشخيصها من حالات الإسهال ودراسة التشابه المستضديّ بينها وبين *P. shigelloides*.

٣- دراسة بعض عوامل الضراوة لبكتريا *P. shigelloides* مثل إنتاج السايدروفور وعوامل الاستعمار والالتصاق وإنتاج الإنظيمات المختلفة ودراسة حساسية العزلات للمضادات الحياتية شائعة الاستخدام والحديثة.

٤- دراسة النمط البلازميديّ لعزلات البكتريا.

٥- دراسة دور البلازميدات في نقل المقاومة للمضادات الحياتية بطريقتيّ الاقتران البكتيريّ والتحول الوراثيّ.

١-٢ استعراض المراجع **Literature Review**

١-٢-١ التسمية والتصنيف

قـــــام بعـــــزل هـــــذه البكتريـــــا وتوصـــــيفها لأول مـــــرة Ferguson و Henderson (١٩٤٧) إذ تم عزلها من عينة براز شخص مصاب بحالـة إسـهال وأطلقـا عليهـا paracolon C٢٧ وعُـدّت فـرداً مـن العائلـة المعويـة Enterobacteriaceae (Aldova, ١٩٨٥).

قام Bader (١٩٥٤) بتصنيف هذه البكتريا ضمن الجنس *Pseudomonas* ووضعت تحت اسم *Pseudomonas shigelloides* اعتماداً على ظهور حزمة أسواط قطبية (Lophotrichous) في أحد طرفي خلية البكتريا.

اقتـــرح Cowan (١٩٥٦) اســـماً آخـــر لهـــذه البكتريـــا وهـــو *Escherichia sonnei* أسوة بـ *Shigella sonnei* .

أظهرت دراسة Sakazaki وجماعته (١٩٥٩) وجود بعض سلالات بكتريا C٢٧ التي لاتحمل مستضداً جسمّياً من الطور الأول لبكتريا *Shigella sonnei*، لذا قام Ewing وجماعته (١٩٦١) بنقل هذه البكتريا إلى الجنس *Aeromonas* وسميت بـ *Aeromonas shigelloides* وذلك على أساس تفاعل الأوكسديز الموجب.

أمـــا الاســـم الحـــاليّ *Plesiomonas* فقـــد أطلقـــه علـــى هـــذه البكتريـــا Habs و Schubert (١٩٦٢) لكونها لم تظهر بعض الخصائص المهمة لبكتريا *Aeromonas* وبكتريا *Vibrio* ودعم هذا الاقتراح بدراسة الحامض النووي الـ DNA الذي درسه Sebald و Veron (١٩٦٣) إذ أوضحا أن النسبة المئوية للقواعد النتروجينية سايتوسين + كوانين (C+G) كانت ٥١% وهذا يختلف عن محتـــوى G/C للـــ *Aeromonas* الـــذي يتـــراوح بـــين ٥٧-٦٣% وللـــ *Vibrio* يتـــراوح بـــين ٤٠-٥٠%، لـــذا بقـــي اســـم البكتريـــا *Plesiomonas shigelloides* المذكور في الطبعة التاسعة لكتاب بركي لتصنيف البكتريا(Bergy's Manual For determinative bacteriology) (Holt *et al.*, ١٩٩٤)، وكانت قد وضعت ضمن عائلة Vibrionaceae التي تضم الأجناس

(Eddy and Carpenter, *Plesiomonas* و *Aeromonas* و *Vibrio* spp. ١٩٦٤).

كما اقترح Hendri وجماعته (١٩٧١) نقل النوع *P. shigelloides* إلى جنس *Vibrio* وذلك لأن صفاته المظهرية أقرب إلى جنس *Vibrio* من *Aeromonas*.

أشارت بعض المصادر إلى تحويلها إلى العائلة المعوية اعتماداً على ترتيب الوحدات الصغيرة لجزيئة rRNA لسلالات مرجعية للـ *P. shigelloides* وبعد التحليل الوراثيّ وجد أن *P. shigelloides* مرتبطة بالعائلة المعوية Enterobacteriaceae (Ruimy *et al.*, ١٩٩٤) فيما بعد وضع الجنسان *Aeromonas* و *Plesiomonas* في عائلة Vibrionaceae وذلك لأنها تتقارب مع الـ *Vibrio* من الناحيتين التطورية والوراثية، وبكتريا *Plesiomonas* عبارة عن عصيات سالبة لصبغة غرام ومتحركة بوساطة أسواط قطبية، لاهوائية اختيارية، غير محفظة، كما أنها موجبة لفحص الأوكسيديز، وتستهلك D-glucose كمصدراً كاربوّنياً أساساً للطاقة. وتمتلك محتوى كوانين+ سايتوسين ضمن المدى ٣٨-٦٣% (Popoff, ١٩٨٤; Martinez-Murica *et al.*, ١٩٩٢; Carlos, ٢٠٠٣).

١-٢-٢ العلاقة بين جنس *Plesiomonas* و *Shigella spp.*

تشترك بكتريا *P. shigelloides* مع بكتريا *Shigella spp.* بعدة صفات مثل التشابه بالصفات المزرعية والكيمياء الحياتية والتفاعل العرضيّ المصليّ (Shimad and Sakazaki, ١٩٩٤).

إذ يكون شكل مستعمرات *P. shigelloides* على الأوساط الزرعية متشابهاً مع المستعمرات التي تكونها أنواع *Shigella*، فضلاً عن أن لبعض سلالتها القابلية على النمو في وسط Salmonell-shigella Agar الخاصّ بـ *Salmonella* و *Shigella* مما يشير إلى أن هناك تشابهاً في المتطلبات الغذائية (Sakazaki and Balows, ١٩٨١).

ظهر أن بكتريا *P. shigelloides* تتفاعل عرضياً مع *Shigella* خاصة مع *S. sonnei* من الناحية المصلية (Batta *et al.*, ١٩٩١).

وانتبه الباحثون إلى هذه العلاقة منذ عدة سنين فقد استخدم Bader (١٩٥٤) سلالة *P. shigelloides* لتحضير مصل مضاد لـ *Shigella*.

إن التفاعل العرضيّ لـ *P. shigelloides* مع مصل مجاميع *Shigella* خاصة مجموعة D لـ *S. sonnei* قد يؤدي في بعض الأحيان إلى تشخيص أوليّ خاطئ لـ *P. shigelloides* على أنها *Shigella* (Abbott *et al.*, ١٩٩١).

ذكر Sayeed وجماعته (١٩٩٢) أنه على الرغم من التشابه الذي تظهره كلّ من *P. shigelloides* وبكتريا *Shigella* فإن هناك اختلافاً في ظهور البلازميدات فالسلالة *P. shigelloides* (O ١) التي تشابه *S. sonnei* وتتفاعل معها عرضياً تختلف في الصور الجانبية للبلازميد (منحني البلازميد) واستطاع Albert وجماعته (١٩٩٣) تشخيص سلالات *P. shigelloides* بأنها تشترك بمستضد معين مع *Shigella flexneri* مجموعة ٦ ومستضد المجموعة المعروفة بـ ١ مع *S. flexneri* و *S. dysentriae* إذ وجد الباحث بأن ثلاث سلالات مع *P. shigelloides* المعزولة من مرضى الإسهال تتلازن مع الأجسام المضادة الوحيدة النسيلة (monoclonal antibodies) للمجموعة المعروفة بالمستضد ١ المشترك بين النوع المصليّ *S. flexeneri* و *S. dysenteriae* نوع ١ وكذلك اظهرت المشاركة في قابلية التحفيز المستضدي (Antigenicity) باختبار ELIZA.

كما وجد Sack وجماعته (١٩٩٤) تناقص الخمج بـ *S. sonnei* التي تحتوي على متعدد السكريات الدهني Lipopolysaccharide متماثلاً مع *P. shigelloides* النمط المصلي O ١٧ وفسر ذلك على أن المجموعة السكانية التي تشرب الماء الملوث بـ *P. shigelloides* تتولد لديهم مناعة ضد *S. sonnei*.

١-٢-٣ الخصائص الوظيفية لبكتريا *P. shigelloides*

إن بكتريا *P. shigelloides* عبارة عن عصيات سالبة لصبغة غرام غير حاوية على المحفظة، تظهر بالتصبيغ في شكل خلايا مفردة أو ازواج أو سلاسل قصيرة متحركة بوساطة ٢-٥ أسواط قطبية في احد طرفي الخلية، وهذه البكتريا موجبة لإنظيم الأوكسيديز والكاتاليز وتفاعل النتريت وتخمر الكلكوز D-glucose وبعض الكاربوهيدرات الأخرى وتنتج الحامض بدون انتاج غاز (Lambert *et al.*, ١٩٨٣; Czaja *et al.*, ٢٠٠٠).

ذكر Schubert (١٩٨٤) بأن هذه البكتريا تنمو ضمن مدى حراريّ واسع بين ٨-٤٤°م والنمو المثالي بين ٣٧-٣٨°م، كما ذكر Sakazaki و Balows (١٩٨١) أنها غير محبة للملوحة. أشار Zajic-Satler وجماعته (١٩٧٢) إلى وجود سلالات قليلة منتجة لإنظيم الهيمولايسين في وسط اغار الدم في حين أشار Schubert (١٩٨٤) إلى ظهور مستعمرات لامعة لهذه البكتريا على أغار الدم بعد ٢٤ ساعة من الحضن في ٣٧°م محدبة الشكل ذات مركز مرتفع قليلاً وحافة ملساء وغير محللة لكريات الدم الحمراء في وسط اغار الدم.

ذكر Jeppesn (١٩٩٥) أن أغلب سلالات هذه البكتريا حساسة للمادة المثبطة لبكتريا الهيضة ١٢٩/O Vibriostatic agent.

بين Brenden وجماعته (١٩٨٨) أن بكتريا *P. shigelloides* تنمو في المياه العذبة وتزداد اعدادها في الاشهر الدافئة وتوجد عادةً في المياه ذات المناخ الاستوائي بسبب كونها لاتنمو في المدى الحراريّ بين ٠-٨° م وهي تفضل المياه العذبة ومياه المصبات على البيئة البحرية.

ذكر كلّ من Medema و Schetes (١٩٩٣) أن بكتريا *P. shigelloides* متوطنة أصلاً في الماء العذب ولم يتمكنا من عزلها من ماء البحر واشارا إلى أنها موجودة في المياه العذبة في فصل الاصطياف والسباحة مما ينتج عنها التهابات معوية بين السباحين.

تم عزل هذه البكتريا من الأسماك والمحار خاصة تلك الأسماك التي يكون وجودها مرتبطاً مع وجود الطين أو الترسبات إذ إن الطين مكان مثاليّ لنموها وبقائها حية حيث إن الطين يحتوي مغذيات كافية (Janada *et al.*, ١٩٩٥; Knebel *et al.*, ٢٠٠١).

فضلاً عن ذلك فقد عزل Miller و Koburger (١٩٨٦) البكتريا من براز الحيوانات ذات الدم البارد التي لاتحمل اعراضاً مرضية كذلك من ذوات الدم الحارّ بما في ذلك القطط والكلاب. إذ تعد هذه الحيوانات مضائف حاملة للمرض Carriers.

ظهر أن تردد بكتريا *P. shigelloides* كان عالياً في التربة والماء اللذين يكونان مستودعاً لهذه البكتريا كما وجد أن ترددها أقل في الغذاء البحريّ، ولم يتمّ عزلها من الماشية والحيوانات الداجنة (Abbey *et al.*, ١٩٩٣) .

وتمكن Twiddy و Reilly (١٩٩٥) من عزل البكتريا بنسبة مرتفعة من عينات أسماك البلطيّ المصريّ (Nile tilpia) وسمك الجريّ (cat fish) والأسماك الطائرة من مزارع لتربية الأسماك في جنوب شرق اسيا ولم يتمكنا من عزلها من مياه تلك المزرعة ورواسبها.

تمكن Sugita وجماعته (١٩٩٣) من عزل ٧٤ سلالة من بكتريا *P. shigelloides* من المياه وأمعاء الأسماك وذئب البحر الأسود وثعبان الماء الياباني وأشارا إلى أن الأخيرين يحملان كثافة عالية من هذه البكتريا.

إن وجود البكتريا لم يقتصر على المياه العذبة فقد تمكن De-Mondino وجماعته (١٩٩٥) من عزلها من المياه المالحة إضافةً إلى المياه العذبة في مدينة ريو دي جانيرو كما تمكن Aldova و Schubert (١٩٩٦) من عزل عدد كبير جداً (٦٣٨) سلالة من البكتريا عندما قاما بدراسة على بركة صغيرة حيث تم عزل هذه السلالات من المياه السطحية والوحل والماء القريب من القاعدة إضافة إلى حشرات الماء إذ عزلت (١٢٨) سلالة من يرقة الرعاشات (dragon fly larvae) وسلالة واحدة من البعوض (*Culex pipiens*) .

أمـــا Nedoluha و Westhoff (١٩٩٣) فقـــد اجريـــا مســـحاً للفلـــورا المايكروبايولوجية على سمك الذئب المخطط الهجين وذلك بأخذ عينات من الجلد والغلاصم والأمعاء وظهرت أعلى نسبة وأكثر تنوع للأحياء في درجة حرارة ٢٢°م وكانت بكتريا *P. shigelloides* من بين الأنواع البكتيرية المعزولة وأشارا إلى أن أسماك البرك السطحية ذات مخاطر اكبر للامراض المحمولة بالغذاء.

ذكـر Holmberg وجماعتـه (١٩٨٦) أن أشـهر طعـام بحـريّ لـه علاقـة بالأخماج المعوية هو المحار الطازج أو المطبوخ في صورة غير جيدة، والوساطة الثانية للنقل تشمل شرب الماء غير المعالج.

أما Twiddyو Reilly (١٩٩٥) فقد تمكنا من عزل البكتريا من الأسماك وأوضحا أن هذه البكتريا ربما تدخل السلسلة الغذائية الواسعة التي تصل للإنسان وتشكل مخاطر للصحة.

ذكـر Brenden وجماعتـه (١٩٨٨) و Clark و Janda (١٩٩١) ان اهـم الأعراض المعروفة المرتبطة بـ *P. shigelloides* هو انتان الدم Septicemia الذي غالباً مايتطور إلى التهاب السحايا وأن أغلب حالات التهاب السحايا المسجلة بسبب هذه البكتريا وجدت في الأطفال الحديثي الولادة الذين كانت ولاداتهم عسرة نتيجة لانفجار أغشية الأمّ.

١-٢-٤ دور بكتريا *P. shigelloides* في الأخماج المختلفة

يحدد الخمج الذي يعزى إلى بكتريا *P. shigelloides* إلى نوعين:

أولاً: الأخماج المعدية المعوية (Gastroentritis Infections) والشكل الاكثر شيوعاً لهذه الأخماج هو مرض الإسهال.

ثانياً: الأخماج التي هي خارج الامعاء (Extraintestinal Infections) وأكثر الأعراض المعروفة بهذه الأخماج هو انتان الدم (Septicemia) ويرافقه التهاب السحايا غالباً، فضلاً عن عدد من الأخماج الخطيرة الأخرى المسجلة حديثاً(Faul, *et al.*, ١٩٩٠; Henderson *et al.*, ٢٠٠١).

أولاً: الأخماج المعدية المعوية Gastroentritis Infections

تشير الدراسات إلى زيادة الاهتمام بهذه البكتريا بعد ان ظهرت حالات وبائية لمرض التهاب معوي وكانت فيها بكتريا *P. shigelloides* هي العامل الوبائي المحتمل.

ففي دراسة في الولايات المتحدة استطاع كلّ من Kain و Kelly (١٩٨٩a) من الحصول على ٣١ عزلة من *P. shigelloides* وأثبتا أن لها دوراً في حدوث الإسهال المكتسب وإسهال المسافرين مما يزيد من احتمالية كون هذه البكتريا المسبب للإسهال كما تمكن Eko و Ustalo (١٩٩١) من عزل هذه البكتريا في نيجيريا خلال الأشهر الممطرة من حالات الإسهال.

وفي دراسة لـ Rahim وجماعته (١٩٩٢) في بنغلادش عدت بكتريا *P. shigelloides* المسبب الاساس الرابع للأخماج المعوية.

وتمكن Rautelin وجماعته (١٩٩٥) من الحصول على ٢٠ عزلة من مرضى الإسهال في فنلندا ظهر جزء منها في مزارع نقية وأخرى مختلطة مع ممرضات معوية أخرى.

وفي دراسة اجريت لمدة ٤ سنوات أجراها Vernkar وجماعته (١٩٩٥) عزلت ٧ سلالات من بكتريا *P. shigelloides* بالمقارنة مع ٦٦ سلالة من بكتريا *Aeromonas*، وفي دراسة مشابهة أجراها Wong وجماعته (٢٠٠٠) في هونغ كونغ تم عزل ١٦٧ سلالة من *P. shigelloides* من حالات الإسهال في أشهر الصيف الحارة.

اما الدراسة التي أجراها Obi وجماعته (١٩٩٥) في نيجيريا لعزل بكتريا *Aeromonas* و *P. shigelloides* فقد أعطت نتائج مشابهة لما سبق إذ تم عزلها من أشخاص مصابين بحالات الإسهال ولم تعزل من حالات السيطرة مما يدعم كونها ممرضة.

بيّنMahon و Manuselis (٢٠٠٠) ان بكتريا *Plesiomonas* تشترك مع عدد آخر من البكتريا مثل *Aeromonas* و *Campylobacter* و *Vibrio* في إحداث الأخماج المعوية.

اشار Nizar و Ramzan (٢٠٠١) إلى أن الأخماج المعوية التي تصيب المسافرين عبر البحار تشكل فيها بكتريا *P. shigelloides* نسبة ٥% من بين الأنواع البكتيرية الأخرى.

وقد لوحظ ايضاً أن كلاً من *Aeromonas hydrophila* و *P. shigelloides* تسببان الأخماج المعوية خاصة بعد تناول الأطعمة البحرية أو تسبب حالة الإسهال في السفر بعد استعمال المياه الملوثة (Aqueel, ٢٠٠١; O'ryan *et al.*, ٢٠٠٥).

كما اشار Sherloune (٢٠٠٣) إلى أن الأطفال يصابون بالالتهابات المعوية خاصة في السنوات الثلاث الأولى من العمر ومن بين مسببات هذا النوع من الإسهال بكتريا *P. shigelloides* التي تسبب فحدوث حالة الجفاف لدى الأطفال المصابين.

وبين Khan وجماعته (٢٠٠٤) أن المسبب الرئيس لحالات الإسهال في أطفال بنغلادش تحت سن الخامسة من العمر هو بكتريا *P. shigelloides* المسببة للجفاف والإسهال بنوعيه المائيّ والدمويّ، وهذه النسبة العالية من الأخماج يكون مصدرها المياه الملوثة.

ثانياً: الأخماج الخارج معوية Extraintestinal Infections

تم عزل بكتريا *P. shigelloides* من الدم وسائل النخاع الشوكيّ (CSF) منذ ١٩٧١ (Ewing *et al.*, ١٩٧١) . إن أغلب الأخماج التي هي خارج الأمعاء وصفت في مرضى موهنين مناعياً (Immunocompromized patients) فقد وصفت حالات عديدة لانتان الدم (Septicemia) من هؤلاء المرضى، كما تم عزلها من الاطفال الحديثي الولادة ومرضى فقر الدم المنجلي والمرضى الذين تم

استبدال صمام الأبهر إضافة إلى مرضى (Hemodialysis) (Clark and Janda, ١٩٩١).

وتمكن Korner وجماعته (١٩٩٢) من عزل بكتريا *P. shigelloides* من أخماج انتان الدم حيث تشير هذه الأخماج إلى وباء انتان دمويّ بهذه البكتريا بين المرضى الموهنين مناعياً.

أما Terpeluk وجماعته (١٩٩٢) فقد سجل حالة انتان دموي والتهاب غشاء السحايا (meningoencephalitis) في طفل حديث الولادة سببتها بكتريا *P. shigelloides* ولم يتمكن من تحديد مصدر الخمج.

كما تمّ عزل هذه البكتريا من الزائدة الدودية الغنغرينية (Appenicitis gangreanosa) ومن قيح التهاب البريتون العامّ (Peritonitis diffusa) ومن كيس المرارة (Gall bladder) ومن قيح التهاب النسيج الضام (Phlegmona) (Aldova, ١٩٩٤).

وتمكن Delforge وجماعته (١٩٩٥) من تسجيل حالة انتان دموي كان المسبب فيها *P. shigelloides* من مريض مصاب بـ (Primary homochormatosis).

كما سجل Gupta (١٩٩٥) حالة أخرى هي التهاب المفاصل المتعدد المتنقل (المهاجر) (Mijoratory polyartheritis) لدى طفل مصاب بالتهاب الاقنية المعوية بسبب بكتريا *P. shigelloides*. كما استطاع Riley وجماعته (١٩٩٦) من تسجيل حالة تجرثم الدم (Bacterimia) بسبب *P. shigelloides* في طفل مصاب بسرطان الدم (Leukemia).

إضافة إلى ذلك فقد أشار Woo وجماعته (٢٠٠٥) إلى أن بكتريا *P. shigelloides* هي المسبب لحالات التجرثم الدمويّ للمرضى الذين يعانون من أمراض أخرى مثل التهاب قناة الصفراء والمرضى المصابين بأورام خبيثة (malignancies) حيث سجلت حالاتٍ جديدةٍ.

١-٢-٥ تشخيص جنس *P. shigelloides*

يشمل تشخيص بكتريا *P. shigelloides* ثلاثة اختبارات تتضمن تفاعل الأوكسيديز، طريقة Hugh و Liefson لأيض الكلوكوز والحساسية للمادة المثبطة لبكتريا الهيضة ١٢٩/O.(٢,٤-diamino ٦,٧-di isopropyl pteridine) سوية مع ظهور الحركة أو غيابها (Aldova, ١٩٩٤) .

إن هذه الاختبارات يمكن أن تميز أفراد العائلة *Enterobacteriaceae* وعائلة *Psudomonadaceae* من جهة أخرى. فاختبار الأوكسيديز يفصل العائلة المعوية عن العائلتين *Psudomonadaceae* و *Vibrionaceae* وإن الأخيرة يمكن أن تميز عن *Psudomonadaceae* التي لاتخمر الكلوكوز بطريقة Hugh و Liefson وبذلك يتم الفصل للعائلتين. تبقى المشكلة ضمن العائلة *Vibrionaceae* (Lee *et al.*, ١٩٧٩).

وللتفريق ضمن العائلة *Vibrionaceae* ذكر Janda وجماعته (١٩٩٤) أن عزلات *Plesiomonas* و*Aeromonas* و *Vibrio* يجب ان تشخص اعتماداً على حساسيتها للمادة المثبطة لبكتريا الهيضة ١٢٩/O Vibriostatic agent في كلا التركيزين ١٠ و ١٥٠ مايكروغراماً، ولو أن هناك بعض الصعوبات في التشخيص بسبب ظهور سلالات *Vibrio cholerae* الواسعة في العالم المقاومة لـ ١٢٩/O.

ان تشخيص *P. shigelloides* ليس مشكلة ضمن العائلة *Vibrionaceae* فإضافة إلى الصفات الكيموحيوية غير الاعتيادية لهذه البكتريا مثل سحب جذر الكاربوكسيل من اللايسين والأورنثين وتحلل الارجنين ربما تكون ذات قيمة في تفريق هذه السلالات إضافة إلى تخمر الانوسيتول فان فقدان انتاج الغاز من الكلوكوز، الحساسية لـ ١٢٩/O(جميعها موجبة لهذه البكتريا) تفيد في تفريق *P. shigelloides* عن *Vibrio* و *Aeromonas*.

١-٢-٦ عوامل الضراوة Virulence Factors

١-٢-٦-١ الهيمولايسين نوع بيتا β-hemolysin

يعد الهيمولايسين أحد أنواع البروتينات المحللة لكريات الدم الحمر التي تنتجها بعض البكتريا وهي ذات تركيب جزيئي يختلف من بكتريا إلى أخرى، وغالباً مايرتبط انتاجه بالبكتريا المعزولة من حالات مرضية لذا يعد من العوامل المساهمة في الإمراضية (Nassif and Sansonetti, ١٩٨٧) وجد ان الهيمولايسين لايؤدي دوراً مهماً في الإمراض بالبكتريا التي تسبب أخماجاً معويةً مثل الاشريشيا القولونية (*E. coli*) وضمات الكوليرا لأنها في مثل هذه الحالات غالباً ماتكون منتجة للذيفانات ولاتخترق الأنسجة بنفسها، إلا أن دورها قد يكون مهماً عندما تغزو هذه البكتريا الانسجة تحت المخاطية لتصل إلى الدم (Ketyi, ١٩٨٤).

أشار Daskalerose وجماعته (١٩٩١) إلى ان عزلات *P. shigelloides* قادرة على انتاج الهيمولايسين من نوع بيتا وهذا الهيمولايسين ربما يحتوي فعالية سمية كالموجودة في *Aeromonas* أو ربما يساعد في تحرير الحديد من كريات الدم الحمر.

اكد Janda و Abbott (١٩٩٣) النتيجة التي أشار إليها Daskalerose وجماعته (١٩٩١) من أن أغلب سلالات *P. shigelloides* تنتج هيمولايسين بيتا الذي ربما هو عامل ضراوة مهم له علاقة بالممرضات المعوية المهمة، حيث وجد الباحثان Janda و Abbott (١٩٩٣) أن أكثر من ٩٠% من *P. shigelloides* المختبرة تنتج بروتين يظهر بانه مرتبط بالخلية تحت ظروف الزرع الروتينيّ ولايتحرر خارج الخلية بكميات وافية ويمكن تحديده باختبار كساء الإغار Agar overlay في دقائق قليلة من الحضن في ٣٥°م .

كما وجد الباحثان عند استخدام سلالات مختلفة وكميات حديد محدودة وظروف متنوعة لم تكن *P. shigelloides* قادرة على انتاج هيمولايسين خارج خلويّ في وسط لايحتوي الحديد.

ان الهيمولايسين الذي تنتجه *P. shigelloides* ليس فعالاً ضد كريات الدم الحمر لخنازير غينيا. هذه النتيجة لـ Janda و Abbott (١٩٩٣) ربما تكون لها

علاقة بعدد الجزيئات الموجودة على سطح الخلية والمستقبلات الرابطة (التداخل بين كريات الدم الحمر والهيمولايسين) والفعالية المتوارثة للإنظيم نفسه.

وذكر Clark و Janda (١٩٩١) و Brenden وجماعته (١٩٨٨) ان الهيمولايسين لايعدّ عاملاً ضراوة مهماً في الأخماج الجهازية لان *P. shigelloides* نادراً ماتغزو الانسجة. ولكن أشار Sansontti وجماعته (١٩٨٦) إلى أن الهيمولايسين ربما يلعب أحد الأدوار المتعددة المهمة في الإمراض إذ ربما يعمل ذيفاناً معوياً في الامعاء.

وذكر Daskalerose وجماعته (١٩٩١) و Gardner وجماعته (١٩٨٧) أن التنوع في الفعالية الانزيمية ربما تكون منظمة بالحديد وفي حالة هيمولايسين بيتا *P. shigelloides* فان فعاليته ربما لها علاقة باختزال الأوكسجين، أو الوظيفة الخلوية، أو الاتصال بين هذا الهيمولايسين وغشاء كريات الدم الحمر وقد تساعد الدراسات اللاحقة في تمييز هذا الهيمولايسين أو تشخيصه ودوره في الإمراض الذي يبدو ممكناً على أساس تردد ظهوره في هذه البكتريا، في حين لم يشر Amine وجماعته (١٩٩٢) إلى الهيمولايسين والتلازن الدموي في السلالات المختبرة في دراسته لتحديد شدة ضراوة *P. shigelloides*.

أشار Santos وجماعته (١٩٩٩) إلى أن سلالات *P. shigelloides* تمتلك القابلية على إنتاج الهيمولايسين كما تزداد قابليتها على إنتاج Elastase جنباً إلى جنب مع إنتاج الهيمولايسين عند نموّ هذه البكتريا في ظروف يقل فيها وجود الحديد كما أنها تفقد هذه القابلية في درجة حرارة ١٠٠°م لمدة ١٠ دقائق.

اشار Henderson وجماعته (٢٠٠١) إلى أن هناك عدداً من الجينات التي تشفر لتنظيم عملية إنتاج الهيمولايسين في بكتريا *P. shigelloides* وأن هذه الجينات يمكن نقلها إلى بكتريا الايشريشيا القولونية ١٢ -K *E. coli* اذ مكنتها من استعمال الحديد بوساطة إنتاجها للهيمولايسين كما أوضح Gibotti وجماعته (٢٠٠٠) ان أحد عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا *P. shigelloides* هي

قابليتها على انتاج الهيمولايسين فقد اتضح أن جميع عزلات هذه البكتريا قادرة على انتاج الهيمولايسين بالاعتماد على مختلف الاختبارات.

ان قدرة *P. shigelloides* على احداث الإمراض يعتمد على قدرتها على إنتاج عدد من الإنظيمات والبروتينات ومن بين أهم هذه البروتينات هو قدرتها على إنتاج الهيمولايسين نوع بيتا الذي يساعدها على غزو الأنسجة. (Ciznar *et al.*, ٢٠٠٤).

لايمكن عدّ الهيمولايسين عامل ضراوة مباشراً أو غير مباشر ولكن من العوامل التي تشترك في الإمراض في حالات أخماج معينة وفي مواضع مرضية معينة ومع ذلك فان وجوده يعد عاملاً مهماً في تزويد البكتريا بالحديد إضافةً إلى قدرته على تدمير الخلايا وتحرير اللايسوزايم أو تدمير كريات الدم البيض (Luck *et al.*, ٢٠٠١).

١-٢-٦-٢ عوامل الالتصاق والاستيطان

Adhesions or Colonization Factors

تعّد قابلية البكتريا على الالتصاق واستيطان الأغشية المخاطية هي أول مرحلة من مراحل تطور الخمج. ولكي تستوطن البكتريا الطبقات المخاطية فان على البكتريا ان ترتبط بالخلايا الطلائية لتلك الأنسجة أوّلاً، وقد وجد أن الأهداب pili هي التي تقوم بمهمة الارتباط الأوليّ بالخلايا الطلائية تتوسطها موادّشبيهة باللكتين أو متخصصة بسكر المانوز موجودة على سطح البكتريا التي ترتبط مع مستقبلات شبيهة بالمانوز (Mannose-like receptors) تقع على سطح الخلايا المخاطية (Ofek *et al.*, ١٩٧٧).

وفي البكتريا السالبة لصبغة غرام، تقوم الاهداب بمهمة الارتباط بالخلايا الطلائية وهذا ما لوحظ بدرجة كبيرة في بكتريا الايشريشيا القولونية والبروتيس (*Proteus*) ويتوسط هذا الارتباط وجود مستقبلات على سطح الخلايا الطلائية، اما في البكتريا الموجبة لصبغة غرام فقد وجد ان البكتريا المسبحية التابعة لنوع *S.*

pyogenes المهمة في اخماج البلعوم لها القدرة على الالتصاق بسطح البلعوم بوساطة البروتين M (وهو أحد البروتينات الموجودة في جدار هذه البكتريا) المحتوي زغباً (Fuzz) (Nolte, ١٩٩٢)، في حين أشار Ofek وجماعته (١٩٧٧) إلى أن حامض التكويك الدهنيّ (Lipotechoic acid) هو المسؤول عن الالتصاق في هذه البكتريا.

إن أول عامل هدبيّ تم اكتشافه من سلالات مرضية لبكتريا الايشريشيا المعزولة من الإنسان أطلق عليه CFA/I (Colonization factor Antigen-١) وهذا العامل يسبب تلزن كريات الدم الحمر من صنف (A) بالنسبة للإنسان وكذلك الابقار والدجاج. بعدها تم اكتشاف عامل هدبي آخر اطلق عليه CFA/II الذي يسبب تلزن دم الأبقار والدجاج وهذان العاملان (CFA/II, CFA/I) لايثبطان بوجود سكر المانوز ويتميزان بثابتهما النسبيّ على الأوساط الصلبة للزرع البكتيريّ ويتوقف التعبير الوراثيّ لهما تحت درجة ١٨°م، كما أن لهذين العاملين خصوصية مضيفية (الزعاك، ١٩٩٤).

أشار Faruque وجماعته (١٩٩٨) إلى ان عائلة *Vibrionaceae* وبضمنها *Plesiomonas* تمتلك جينات تشفر لعوامل الاستيطان يطلق عليها (TCP) toxin-coregulated pilus هي المسؤولة عن التصاق البكتريا بالطبقة الطلائية للأمعاء والتي تعدّالخطوة الأساس في إحداث الخمج، كما أشار الباحث نفسه إلى إمتلاك الأنواع البكتيرية العائدة الى *Vibrio*و *Aeromonas* و *Plesiomonas* على جينات مساندة تشفر لعوامل الالتصاق والاستيطان أطلق عليها (ACF) Accessory Colonization Factor gene cluster ويطلق عليها ايضاً جزر الإمراض Pathogenicity Islands (PI) كما بينّ Jiang وجماعته (٢٠٠٢) إلى امتلاك عائلة *Vibrionaceae* عدداً من عوامل الالتصاق والاستيطان حيث أشار إلى امتلاكها عامل الالتصاق الأول AAF/I وعامل الالتصاق الثاني AAF/II والتي تشفر لانتاجها بلازميداً كبير الحجم يبلغ ٦٥ ميكادالتون والتي تسمح لبكتريا *P. shigelloides* بالالتصاق بالطبقة المخاطية للأمعاء.

١-٢-٦-٣ انتاج السايدروفورات Siderophores Production

يعدّ الحديد احد العناصر الضرورية لنمو البكتريا، غير ان الحديدفي شكله الحرّ غير متوفر في جسم المضيف بل يوجد في شكل رئيس ضمن الخلايا الجسمية أو يكون مرتبطاً مع بروتينات عالية الاتحاد مثل الترانسفرين (Transferrin) في المصل واللاكتفرين (Lactiferrin) في الافرازات الجسمية. وتكون هذه البروتينات غير مشبعة لمنع نمو الاحياء المجهرية في السوائل الجسمية لهذا تحتاج البكتريا إلى تطوير آلية تستطيع بوساطتها الحصول على الحديد والنمو وإحداث الخمج (Infection) (الزعاك، ١٩٩٤).

وتعدّ السايدروفورات إحدى الوسائل التي تستخدمها البكتريا للحصول على الحديد حيث اشار Payne (١٩٨٨) إلى أن الكثير من الإنظيمات تحتاج إلى الحديد لزيادة فاعليتها وان البكتريا التي تفتقد انظمة سحب الحديد يختزل معدل نموها (growth rate) في صورة كبيرة وقد يقود إلى تغيرات شكلية كثيرة (Morphological changes) كما أن الخلايا الفاقدة لهذه الانظمة قد يتوقف فيها تصنيع الحامض النووي (DNA) كما يتوقف فيها انقسام الخلية. لذا فإن خلايا البكتريا تحتوي في الأقل على نظاماً واحداً للحصول على هذا العنصر المهم مثل نظام السايدروفور وهي مركبات خلابية (Iron chelating agents) لها القدرة على سحب الحديد من مركباته وهي ذات أوزان جزيئية واطئة لها ألفة عالية جداً للحديد حيث يفرز من الخلية ويرتبط بمركبات الحديد على سطح الخلية ثم يعود إلى داخل الخلية وهذه المركبات تصنع في حالة وجود تراكيز قليلة من الحديد في الوسط الذي تنمو فيه البكتريا.

أشار Chigo وجماعته (١٩٩٧) إلى ان الحديد الذي تحتاجه البكتريا عنصراً أساساً في النموّ لايتوفر دائماً في صورة حرة فهو في خلايا الفقريات يخزن في شكل داخل خلويّ (Intracellular) في شكل Ferritin أو كحديد بشكل Protporphyrin ring أو حديداً مرتبطاً مع مركبات أخرى مثل الهيموغلوبين، كما بّن أن البكتريا السالبة لصبغة غرام تمتلك نظاماً للحصول على الحديد خاصة عندما تكون نسبة الحديد قليلة جداً في الوسط وهذا النظام يطلق عليه السايدروفور

وهي مركبات صغيرة لاعضوية خلابية للحديد، وأشار الباحث إلى أن هناك جيناً مسؤولاً للتشفير عن هذا النظام الذي يمكن نقله إلى انواع بكتيرية أخرى بعملية التحول الوراثيّ.

إن عائلة *Vibrionaceae* تمتلك نظاماً لسحب الحديد تعتمد عليه عندما تكون كمية الحديد في الوسط الذي تنمو فيه قليلة جداً حيث أشار Wyckoff وجماعته (١٩٩٩) إلى أن Catechol Siderophore Vibriobactin هو نظام نقل الحديد في البكتريا التي تعود إلى هذه العائلة وأن هذا النظام يسيطر عليه بوساطة اربعة جينات هي *viu* P و *viu* D و *viu* G و *viu* C التي تشفر لناتج ببتيدي مهمته التنشيط ونقل السايدروفور خلال غشاء السايتوبلازم إلى منطقة (periplasm) ثم نقله من منطقة (periplasm) إلى الغشاء الخارجيّ الذي يتمّ نقله إلى خارج جسم البكتريا.

إضافة إلى ذلك فقد بيّن Mills و Payne (١٩٩٥) أن بكتريا *Shigella dysenteriae* وبكتريا *P. shigelloides* تمتلكان القدرة على انتاج واحد أو اكثر من السايدروفور وهو النظام الذي بوساطته تستطيع هذه البكتريا سحب الحديد الحرّ أو المرتبط مع مركبات أخرى وتعتمد في عملية نقل الحديد على وجود مستقبلات خاصة تحمل على الغشاء البروتيني الخارجي وعلى بروتينات منطقة (periplasm) وعلى بروتينات الغشاء الداخليّ التي تشكل مع بعضها معقداً من خلاله يتم نقل الحديد إلى داخل الخلية البكتيرية.

١-٢-٦-٤ عوامل الضراوة الأخرى

هناك بعض العوامل المكتشفة في بكتريا *P. shigelloides* التي ربما تكون لها علاقة بضرأوة البكتريا، فقد اشار Miyahara وجماعته (١٩٩٦) إلى قدرة هذه البكتريا على انتاج إنظيمات محددة Restriction endonuclease (ENase) من عدد كبير من سلالات بكتريا *Plesiomonas* وهذا النوع من الإنظيمات غالباً مايعزل من الجراثيم المرضية مثل *Salmonella* و *Vibrio parahaemolyticus*.

وتمكن Sharma وجماعته (١٩٩٦) من عزل سلالات *P. shigelloides* من مياه نهر يقع قرب مصنع للفوسفات ذي أس هيدروجينيّ ٥ وكانت هذه السلالات قادرة على إنتاج إنظيمات Acidic amylases وهي من عوامل الضراوة المعروفة.

١-٢-٧ المقاومة للمضادات الحياتية

إن ظهور المقاومة للمضادات الحياتية وتطورها في البكتريا تعزى لأسباب كثيرة ومن اهمها انتقال جينات المقاومة وانتشارها بين أنواع البكتريا المختلفة. وتساهم البلازميدات ولاسيما الاقترانية منها والعاثيات في نقل هذه الجينات من خلية إلى أخرى، فضلاً عن كونها نواقل ملائمة للعناصر الوراثية القافزة (Transposable elements). كذلك ساهمت الطفرات الناتجة عن سوء استخدام المضادات الحياتية أو تكرار استخدامها لمعالجة الأخماج المختلفة في الجسم في تطور بعض السلالات المقأومة لمضاد واحد أو اكثر (Philippon *et al.*, ١٩٨٩; Chang *et al.*, ١٩٩٢).

تميزت بعض سلالات *P. shigelloides* بإنتاجها أنواعاً مختلفةً من إنظيمات البيتالاكتاميز ولهذه السلالات القابلية على احداث اخماج متوطنة أو وبائية في المستشفيات التي تبدأ من وحدات العناية المركزة ثم تنتشر إلى بقية اقسام المستشفى، وهذه الإنظيمات مسؤولة عن مقاومة البكتريا لاجيال مختلفة من مضادات السيفالوسبورينات والبنسلينات لاسيما الامبسلين والكاربنسلين (Avison *et al.*, ٢٠٠٠; Stock & Wiedemann, ٢٠٠١).

يعدّإنتاج إنظيمات البيتالاكتاميز الآلية الاساس الذي تستعمله البكتريا لمقاومة مضادات البيتالاكتام ويؤدي ذلك إلى تحويل المضاد إلى صورة غير فاعلة قبل وصوله إلى الهدف (Pfeifle *et al.*, ٢٠٠٠).

وأظهرت الدراسات وجود علاقة بين نمط المقاومة المتعددة للمضادات الحياتية ووجود بلازميد كبير يشفر لهذه المقاومة في بعض سلالات بكتريا *P. shigelloides* (Bravo *et al.*, ١٩٩٨).

كما تشير الدراسات إلى أن أغلب سلالات *P. shigelloides* مقاومة للامبسلين وحساسة تجاه التتراسايكلين ومجموعة من الامينوكلايكوسايد والامبسلينات عند ارتباطها مع مثبطات إنظيمات البيتالاكتاميز beta-Lactamase Inhibitors ، كما ان بعض السلالات تكون مقاومة للستربتومايسين والارثرومايسين والريفامبسين بينما تظهر حساسية اتجاه الببراسلين /تازوباكتام و Aztreonam (Stock and Wiedemann, ٢٠٠١).

أشار Yeh و Tsai (١٩٩١) إلى أن بكتريا *P. shigelloides* تكون حساسة لكثير من المضادات الحياتية لكنها تظهر مقاومة تجاه Ampicillin، Carbenicillin، Clindomycin، Oxacillin، Penicillin و Vancomycin .

تظهر سلالات *P. shigelloides* المعزولة من أسماك الكارب الازرق حساسيتها تجاه المضادات الحياتية Gentamycin و naldixic acid و tetracycline بينما تكون مقاومة للمضادات الحياتية Ampicillin و Carbenicillin و Kanamycin و Streptomycin ان هذه المقاومة تجاه Streptomycin مسؤول عنها بلازميدات صغيرة الحجم تتراوح حجومها ٢.٥ كيلوقاعدة و ٣.٨ كيلوقاعدة و ٥.٣ كيلوقاعدة (Marshall *et al.*, ١٩٩٦).

لاحظ Visitsunthorn و Komolpis (١٩٩٥) أن بكتريا *P. shigelloides* المسببة لحالات الإسهال في الأطفال كانت مقاومة للمضادات الحياتية من مجموعة quinolones والسيفالوسبورينات Cephalosporins وان ٩% فقط حساسة للامبسلين Ampicillin كما أظهرت حساسية عالية تجاه المضادات Co-trimoxazele و gentamycin و Chloramphenicol و naldixic acid.

إن سلالات *P. shigelloides* المعزولة من المياه العذبة والمالحة تظهر حساسية تجاه المضادات الحياتية السيفالوسبورينات Cepalosporins و Penicillins المرتبطة مع مثبط إنظيمات البيتالاكتاميز والامينوكلايكوسايد و imipenem و norfloxacin و tetracycline و Chloramphinicol و Trimethoprim-sulfamethoxazole بينما كانت نفس العزلات مقأومة للبنسلينات. (De-Mondino *et al.*, ١٩٩٥).

أما ماقام به Wong وجماعته (٢٠٠٠) لدراسة الحساسية للمضادات الحياتية لعزلات *P. shigelloides* فقد كانت حساسة للـ ofloxacin و Levofloxacin و Cftriaxone أو مقاومة في صورة جزئية تجاه Ampicillin و tetracycline و Co-trimoxazole و Chloramphinicol.

لقد اقترحت عدة دراسات أن Quinolonesو Sulfamethaxazole-trimethoprim ربما تعد افضل مضادات تعطى عن طريق الفم لعلاج الحالات غير المعقدة من الإسهال المتسببة عن *P. shigelloides* وأن دراسة Kain و Kelly (١٩٨٩) أكدت على أن علاج الأخماج المعوية التي تسببها هذه البكتريا بموادمضادة للأحياء المجهرية مناسبة تقصر مدة الإسهال مقارنة مع اخماج غير معالجة أو العلاج بمضادحياتيّ تكون البكتريا غير حساسة له فضلاً عن ذلك فقد سجل Clark (١٩٩١) أن هذه البكتريا حساسة لمضادات البيتالاكتام الأخرى مثل Imipenem و Aztreonum وكذلك Netilimicin أما صنف البنسلين فإنه يظهر فعالية أ قل ضدّهذه البكتريا فضلاً عن أن أغلب العزلات المقاومة للامبسلين تكون مقاومة كذلك للـ Pipracillin و Ticarcillin و Mezlocillin اما البنسلين فانه يكون فعالاً ضدّهذه البكتريا عندما يرتبط مع مثبط للبيتالاكتام مثل Sulbactam و Tazobactam و Clavulanic acid.

أشار Obi وجماعته (١٩٩٥) إلى أن استخدام Gentamycin و Naldixic acid و Nitrofurantion ربما يكون مناسباً لعلاج الأخماج المعوية بـ *P. shigelloides* في الوقت الذي تكون فيه هذه العزلات مقاومة للامبسلين

والستربتومايسين. اما Rautelin وجماعته (١٩٩٥) فقد استخدموا مضادات حياتية أخرى واثبتوا أن البكتريا حساسة لها مثل Doxycyclin و Cephalexin و Ceftriaxone و Cefixime إضافة إلى Ciprofloxacin و Trimethoprim و Gentamycin.

وجد Reina و Serra (١٩٩٤) أن المضادات Cotrimaxazole و Ciprofloxacin تنفع لعلاج أشخاص مصابين بأخماج معوية حادة بسبب *P. shigelloides* ، أما Penn وجماعته (١٩٨٢) فقد وجدوا أن tetracycline كان فعالاً في علاج حالة اسهال بسبب *P. shigelloides* وتبعه Van Loon وجماعته (١٩٨٩) الذين استخدموا أيضا tetracycline في علاج حالة إسهال بسبب *P. shigelloides* التي اظهرت مقاومة تجاه المضادات Metrandazole و Tinidazole و Furazoldone و Ampicillin.

١-٣ البلازميدات البكتيرية وأهميتها من الناحية المرضية والوبائية

البلازميدات عبارة عن مكررات دنا في سايتوبلازم الخلية أي خارج الكروموسوم يتّم توارثها بثبات في الغالب من جيل لآخر ويمكن أن توجد في أشكال مختلفة حلقية مغلقة أو مفتوحة أو خطية. يمكن ان تشفر البلازميدات إلى فعاليات خلوية مختلفة غالباً ما تكون غير ضرورية لحياة البكتريا أي إنها توفر لها فائدة انتخابية في الوسط الذي تعيش فيه حيث يمكن للبلازميدات أن تحمل جينات ضراوة

البكتريا مثل انتاج الذيفانات ومقاومة المضادات الحياتية المتنوعة وكذلك انتاج المضادات نفسها (Bravo *et al.*, ١٩٩٨).

هناك بعض البلازميدات لها قابلية على الانتقال بطريقة الاقتران ويطلق عليها بالبلازميدات الاقترانية (Conjugative plasmids) وبعضها الآخر غير قادر على الانتقال بطريقة الاقتران يسمى بلازميدات غير اقترانية Non- conjugative plasmids.

تنتقل البلازميدات إضافة إلى عملية الاقتران بطرائق أخرى كالتحويل الوراثي (Transformation) والتوصيل (Transduction) . ان حصول بكتريا ذات ضراوة قليلة على بلازميد يحمل جينات لعوامل ضرأوة يمكن ان يزيد من ضراوة البكتريا التي استلمت ذلك البلازميد (الزعاك، ١٩٩٤).

تأتي علاقة البلازميدات بالإمراض من خلال ملاحظة احتواء بعض البلازميدات جينات المقاو مة لاكثر من مضادحيويّ واحد كذلك تحتوي بالاضافة إلى ذلك على جينات لعوامل الضراوة لان هذه العوامل تقوم بدور مباشر أو غير مباشر في الإمراض وإن انتقالها عن طريق البلازميد إلى بكتريا أخرى غير مرضية يزيد من إمراض الاخيرة.

أما من الناحية الوبائية فإن انتشار البلازميدات بين السلالات العائدة إلى النوع البكتيريّ نفسه والمسببة للأخماج نفسها يمكن أن يكون مؤشراً وبائياً عند وجود تماثل بين هذه البلازميدات وبالتالي تميز هذه البكتريا بنسق بلازميدي (Plasmid profile) واحد (Threfall & Frost, ١٩٩٠).

يعتمد النسق البلازميديّ للبكتريا بدرجة كبيرة على عدد البلازميدات المعزولة من السلالات المرضية وحجمها وان وجود التشابه في عدد البلازميدات أو حجومها يعطي مؤشراً على مدى انتشار هذا البلازميد بين السلالات المرضية وقد استخدمت هذه الوسيلة في حالات التسمم الغذائيّ الذي تسببه بكتريا الكلوستريديا *Closteridia* المعزولة من الأغذية الملوثة، ووجد أنها تحتوي نسقاً بلازميدياً متشابهاً (الزعاك، ١٩٩٤).

كـذلك اسـتخدم Sayeed وجماعتـه (١٩٩٢) هـذه الطريقـة فـي التحـري عـن بلازميـدات التـي تشـفر جيناتهـا لعوامـل الضـراوة فـي بكتريـا *P. shigelloides* ودراسـة مـدى التشـابه بينهـا وبـين جينـات بكتريـا *Shigella sonnei* إذ وجـد أن السلالات المعزولة تشترك في وجود بلازميد متماثل من حيث الحجم الجزيئي.

كمـا وجـد Marshall وجماعتـه (١٩٩٦) ان النسـق البلازميـدي لبكتريـا *P. shigelloides* المعزولة من أسماك الكارب الازرق تشترك في بلازميد واحد ذي وزن جزيئـيّ ٣.٥ كيلـو زوج قاعـدي مسـؤول عـن مقأومتهـا للمضـاد الحيـوي Streptomycin.

إن هذه الطريقة تصبح ذات جدوى أكثر إذا اقترنـت بطريقـة أخرى مكملـة لهـا وهـي البصـمة البلازميديـة (Plasmid finger printing) وفـي هذه الطريقـة يتم استخدام واحد أو أكثر من الإنظيمات القاطعة لملاحظـة تماثل الحجم الجزيئـي لقطـع الـدنا نفسـها بعـد تجزئتهـا وترحيلهـا إلـى هـلام الاكـاروز كهربائيـاً (Threfall & Frost, ١٩٩٠).

وقد لاحظ Shepherd وجماعته (٢٠٠٠) ان هناك بلازميداً كبيراً يشترك في عدد من سلالات *P. shigelloides* حجمـه الجزيئـيّ ٦٥ كيلو زوج قاعدي أظهر تماثلاً كبيراً عند تقطيعه بالإنظيمات القاطعة مما يعّدمؤشراً وبائياً على مدى انتشار البكتريا التي تميزت بمقاومتها للمضادات الحياتية المختلفة.

اضـافة إلـى ذلـك فقـد اشـار Gibotti وجماعتـه (٢٠٠٠) إلـى أن النسـق البلازميديّ لبكتريا *P. shigelloides* اظهر تشابهاً من حيث انها تمتلك بلازميداً كبير الحجم يكون مسؤول عن حمل بعض جينات الضرأوة لهذه البكتريا.

إضـافة إلـى مـا تقـدم فقـد أشـارت الدراسـات الكثيـرة إلـى وجـود الكثيـر مـن البلازميدات التي لايعرف لها صفات مظهرية ولهذا يطلق عليها اسم البلازميدات الخفيةCryptic plasmids (Avison *et al.*, ٢٠٠١).

إن العديـد مـن السـلالات المعزولـة لبكتريـا *P. shigelloides* تظهـر نسـقاً بلازميدياً متشابهاً وإن عدداً من هذه البلازميدات مسؤول عن نقل العديد من عوامل

الضـــراوة إلـــى أنـــواع بكتيريـــة أخـــرى بعمليـــة التحـــول الـــوراثيّ (Bravo *et al.*, ١٩٩٨) .

١-٣-١ تحييد البلازميدات (Plasmid Curing)

يحصل لبعض البلازميدات انعزال تلقائي وبالتالي فقدان من الخلية البكتيرية، وفي الوقت نفسه تمتاز معظم البلازميدات بثباتها، لذلك يتطلب استخدام عوامل تحييد تزيد من نسبة الانعزال وبالتالي يسهل عملية فقدان البلازميد أو استئصاله نهائياً.

إن أهمية تحييد البلازميدات تكمن في التخلص من الصفات التي تضيفها إلى البكتريا كصفة المقاومة للمضادات الحياتية أو وجود الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة وغيرها.

ان المواد المستخدمة في تحييد البلازميدات بعضها يسبب تثبيطاً لعملية تكرار البلازميدات مثل الاكردين البرتقاليّ وبعضها يثبط عمل إنظيم بوليميريز الرنا كالمضاد الحيوي الريفامبسين(Johnston & Richmond, ١٩٧٠)، كما استخدمت صبغة بروميد الاثيديوم في تحييد البلازميدات وخاصة بلازميدات البكتريا المعوية والمكورات الذهبية وقد وجد أنها كفوءة أكثر من صبغة الاكردين البرتقاليّ من خلال تثبيط تكرار البلازميدات (Rubin & Rosenbium, ١٩٧١)، كذلك وجد ان Sodium Dodocyl Sulphate (SDS) يستطيع أن يحيد بعض البلازميدات إذ إن بعض الخلايا الحأوية على بلازميد تكون حساسة بدرجة كبيرة للـ SDS ويكون استخدام هذا المركب أفضل من بروميد الاثيديوم في بعض البكتريا. (Shehane & Sizemore, ٢٠٠٢).

كما تستخدم الطريقة المعتمدة على رفع درجة حرارة نموّ البكتريا، فقد وجد ان تأثيرها جزئيّ في تحييد البلازميدات وكفاءتها اقل من استخدام المواد الكيميائية (May *et al.*, ١٩٦٤) على الرغم من خطورة الاخيرة والحذّوالحذر من

استخدامها مثل المايتوسين (Mitomycin C) والاكريفلافين (Acriflavin) (Shehane & Sizemore, ٢٠٠٢).

إن مادة Para-hydroxy benzoic acid هي عبارة عن مزيج من مركب كيمياويّ يتألف من methylparaben مع propylparaben وهذه المادة لها كفاءة عالية في منع نموّ البكتريا (bacteriostatic) لذا تستعمل مع المراهم الطبية (Ointments) مواد حافظةً (preservatives) وهذه المادة الكيمياوية الحامضية قد يكون لها تأثير في نفاذية غشاء البكتريا التي تؤدي بالتالي إلى خروج البلازميدات إلى خارج الخلية. (Mycek, *et al.*, ٢٠٠٠).

إن استخدام طرائق تحييد البلازميدات تقنية من تقنيات الهندسة الوراثية له فائدة في تحديد الصفات المحمولة على البلازميدات، حيث تفقد البكتريا قابليتها على إظهار تلك الصفات بعد إفراغها من البلازميدات وهذه الطريقة يمكن استخدامها عند عدم وجود وسائل متاحة في تحديد تلك الصفات.

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

Chapter Two

Materials and Methods

الفصل الثاني

Chapter Two

الموادّ وطرائق العمل **Materials & Methods**

٢-١ المواد والأجهزة المختبرية

٢-١-١ الأجهزة المختبرية

الأجهزة المختبرية المستخدمة:

اسم الجهاز	الشركة المجهزة
حاضنة Incubator	Gallenkamp, England
حاضنة هزازة Shaking Incubator	Gallenkamp, England
حمام مائي Water bath	Memmert, Germany
جهاز تقطيرDistillator	Ogawa Seiki, Japan
فرن كهربائي Oven	Gallenkamp, England
جهاز النبذ المركزيّ Centerfuge	Hermle, Germany
جهاز النبذ المركزيّ الدقيق Eppendrof Centerfuge	Hermle, Germany
موصدةAutoclave	National, Japan
جهاز الترحيل الكهربائيّ gel electrophoresis apparatus Mini sub (Tm) DNA cell/ ١٠٠٠ VDC	Shadon, Scientific Co. LTD England
باعث للاشعة فوق البنفسجية Ultra Violet	San.Gabrid, USA

Transilluminator	
ميزان Balance	Sartorius, Germany
ميزان الكترونيّ حساس Sensitive electronic balance	Mettler, Switzerland
مجهر ضوئيّ Light microscope	Olympus, Japan
مقياس الأس الهيدروجينيّ pH meter	Hoeleze & Cheluis, KG Germany
ماصات دقيقة بأحجام مختلفة Micropipttes	Oxford, USA
كاميرا	
ثلاجة	
مجمدة	
الخلاط المنضديّ Vortex-Genien	Scientific Industries Inc. USA
المرشحات الدقيقة Millipore filter type ٠.٤٥, ٠.٢٢ µm	Sartorius membrane filter Gm w. Germany

٢-١-٢ الموادّ الكيمياوية والبايولوجية

اسم المادة	الشركة المصنعة
المواد الكيمياوية كلوريد الصوديوم، هيدروكسيد الصوديوم، فوسفات الصوديوم، خلات البوتاسيوم، حامض البوريك، أحمر المثيل، الفانفثول، برومو فينول الأزرق، كلوريد البوتاسيوم، كلوريد الكالسيوم، dipyridyl، حامض الخليك الثلاثيّ الكلور، كلوريد الامونيوم، إيثر، كبريتات دودوسيل الصوديوم، SDS، EDTA-Na٢، EDTA، ايثانول، كلوروفورم، فينول، الأغاروز، كلكوز، اللاكتوز، السكروز، المانيتول، الانوسيتول، كليسرول، حامض التانيك، كبريتات الأمونيوم، كبريتات المغنيسيوم، كلوريد الأمونيوم، كلوريد الكالسيوم، كلوريد الزئبق، فوسفات البوتاسيوم أحادية وثنائية الهيدروجين، كلوريد الهيدروجين.	B.D.H.
بروميد الأثيديوم، سكر المانوز	Ajax
اللايسين، الاورنثين، خلاصة الخميرة	Fluka

٢-١-٣ المحاليل والأوساط الزرعية

أولاً: المحاليل والدواريء

١- محاليل المضادات الحياتية

حضـــرت محاليـــل المضـــادات الحياتيـــة حســـب مـــا ورد فـــي (Nassif *et al.*, ١٩٨٩; Baron and Fingold, ١٩٩٠) . وعقمت المحاليل المائية بالمرشحات الدقيقة (Millipore filters ٠.٢٢μm) وحفظت عند درجة حرارة ٤ م° لحين الاستعمال.

المضادالحياتيّ/ الرمز	تركيز المحلول الخزين (ملغم/مليلتر)	التركيز النهائيّ للمضادّ في الوسط الزرعيّ (مايكروغرام/مليلتر)	المذيب المستخدم لإذابة المضادّ الحياتيّ	الشركة المصنعة
الامبسلين AMP	١٠	١٠٠	الماء المقطر	Sigma
الكلورامفينكول Cl	٢.٥	٥٠	الاسيتون او الكحول الاثيليّ	
الريفامبسين Rif	٢.٥	١٠٠	الكحول الاثيليّ	
الستربتومايسين S	١٠	١٠٠	الماء المقطر	
التتراسايكلين Tc	٢	٢٠	الكحول الاثيليّ	
التراي مثبريم Tm	٥	٥٠	الاسيتون	
السيفوتاكسيم CTX	١٠	١٠٠	الماء المقطر	
السبروفلوكاسينCIP	٢.٥	١٠٠	الاسيتون	

٢-محلول ٢,٢-dipyridyl

حضر المحلول الخزين بتركيز ٠.٢ مولار من المادة في الماء المقطر المزالة ايوناته وعقّم بالترشيح (Nassif and Sansonetti, ١٩٨٧).

٣-محلول Saline-EDTA

حضر المحلول بإذابة ٠.١٥ مول من كلوريد الصوديوم و ٠.١ مول من EDTA في الماء المقطر، وعدل الرقم الهيدروجينيّ إلى ٨ وأكمل الحجم إلى لتر ثم عقّم بالموصدة (Murmur, ١٩٦١).

٤- محلول SDS (٢٥%)

حضر المحلول بإذابة ٢٥ غراماً في ١٠٠ مل من Saline-EDTA وعدل الرقم الهيدروجينيّ إلى ٨ وعقّم بالترشيح وحفظ في درجة حرارة ٤ م° .

٥- دارئ TE

حضر بإذابة ٠.٠١ مول من Tris-base و ٠.٠٠١ مول من EDTA في الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجينيّ إلى ٨ واكمل الحجم إلى اللتر ثم عقم بالموصدة (Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

٦- محلول ١٥% سكروز SET

يتكون من ١٠ ملي مولار EDTA و ٢٥ ملي مولار Tris-base ثم أضيف إليه السكروز بنسبة ١٥% وعدل الرقم الهيدروجينيّ إلى ٨ وعقم بالترشيح (Brinbiom & Dolly, ١٩٧٩).

٧- محلول الفينول المشبع بالدارئ Tris

حضر المحلول باذابة الفينول عند درجة حرارة ٦٨ °م وأضيف إليه ٠.١% من المادة المضادة للاكسدة 8-hydroxyquinoline ثم أضيف اليه حجم مساوٍ من محلول الدارئ ٠.٥ مولار من Tris-base (PH ٨). ثم مزج جيداً بالمازج الميكانيكيّ وبعدها ترك المحلول ليستقر وتنفصل طبقتان العليا الطبقة المائية والطبقة السفلى هي الفينول، وتمّ التخلص من الطبقة المائية بسحبها بماصة باستور. ثم اعيدت المعاملة السابقة ولكن بإضافة حجم مساوٍ من محلول ٠.١ مولار من Tris-base (pH ٨) إلى الفينول وتكرر هذه العملية إلى أن يصبح الرقم الهيدروجيني للفينول اكثر من ٧.٨. وحفظ محلول الفينول تحت طبقة من دارئ الـ Tris في قنينة معتمة لمدة هي أكثر من شهر (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

٨- محلول الفينول: الكلوروفورم: الكحول الايزواميلي

مزج محلول الفينول والكلوروفورم والكحول الايزواميلي بنسبة ٢٥:٢٤:١ على التوالي وحفظ تحت طبقة من محلول ٠.١ مولار من Tris-base (pH ٨) في قنينة معتمة في درجة حرارة ٤° م وبقي المحلول صالحاً للاستعمال لمدة هي أكثر من شهر (Sambrook *et al.*, ١٩٨٩).

٩- دارئ TBE

حضر بإذابة ٠.٠٨٩ مول من Tris-base و ٠.٠٨٩ مول من حامض البوريك و ٠.٠٠٢ مول من Na_2-EDTA في الماء المقطر. وعدل الرقم الهيدروجينيّ إلى ٨ وأكمل الحجم إلى اللتر وعقّم بالموصدة (Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

١٠- محلول بروميد الاثيديوم Ethedium bromide

حضر المحلول الخزين بإذابة ٠.٢٥ غم من بروميد الاثيديوم في ٥٠مل من الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي ٥ ملي غرامات/ مليلتر (Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

١١- دارئ التحميل Loading buffer

حضر بتركيز ٤٠% من السكروز و ٠.٢٥ % من ملون البروموفينول الأزرق في الماء المقطر وحفظ عند درجة حرارة ٤ م لحين الاستعمال (Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

١٢- محلول كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$

حضر بتركيز ٠.١ مولار من كلوريد الكالسيوم في الماء المقطر المزالة أيوناته وعقّم بالموصدة وحفظ عند درجة حرارة (-١٠) م لحين الاستعمال (Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

١٣- محلول دارئ الفوسفات Phosphate Buffer Saline

حضر بإذابة ٠.١٥ مول من كلوريد الصوديوم و ٠.١ مول من محلول KH_2PO_4 في الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجينيّ بوساطة هيدروكسيد الصوديوم إلى ٧.٢ وأكمل الحجم إلى لتر، ثم عقّم بالموصدة.

ثانياً: الأوساط الزرعية

أ- الأوساط الزرعية التركيبية

١-وسط الحدّ الأدنى للنمو M٩ المدعم

حضر الوسط باذابة ٩ غم من فوسفات ثنائي الصوديوم الهيدروجينية Na_2HPO_4 و ٠.٥ غم من كلوريد الصوديوم NaCl و ١ غم من كلوريد الامونيوم NH_4Cl في ٩٨٨ مل من الماء المقطر المزالة ايوناته برقم هيدروجيني ٧.٤ وعقّم بالموصدة ثم أضيف ٢ مل من محلول ١ مولار من كبريتات المغيسيوم $MgSO_4$ و ١٠ مل من محلول الكلوكوز تركيزه ٢٠% و ٠.١ مل من ١ مولار كلوريد الكالسيوم التي عقّمت بالترشيح كلّ على انفراد وأكمل الحجم إلى ١٠٠٠مل وأضيف ٢% أغار إلى الوسط عند استخدامه كوسط صلب (Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

٢-وسط إنتاج السايدروفور

حضر الوسط بإضافة ٠.٢ ملي مولار من محلول ٢,٢-dipyridyl المعقم بالترشيح إلى ١٠٠ مل من وسط M٩ المدعم (Nassif and Sansonetti, ١٩٨٧).

٣- وسط مرق لوريا برتاني Loria-Bertani medium

حضر الوسط باذابة مكوناته في ٩٥٠ مل من الماء المقطر وهي ١٠غرامات من التربتون و ٥ غرامات من مستخلص الخميرة و ١٠ غرامات من كلوريد الصوديوم وعدل الرقم الهيدروجينيّ إلى ٧، ثم أكمل الحجم إلى ١ لتر بالماء المقطر وعقّم بالموصدة(Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

٤- وسط SOC

حضر الوسط بإذابة ٢ غم من التربتون و ٠.٥ غم من مستخلص الخميرة و ٠.٠٥ غم من كلوريد الصوديوم في ٩٠ مل من الماء المقطر المزالة ايوناته ثم أضيف إليه ١ مل من محلول ٠.٢٥ مولار من كلوريد البوتاسيوم، ثم عدل الرقم الهيدروجينيّ إلى ٧ وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل وعقّم بالموصدة وقبل استخدامه أضيف إليه ٠.٥ مل من محلول ٢ مولار من كلوريد المغنسيوم المعقّم بالترشيح وواحد مليلتر من محلول ٠.٢٥ مولار من الكلكوز المعقم بالترشيح وفي حالة استخدام الوسط بالحالة الصلبة أضيف إليه الأغار بنسبة ٢% (Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

٥- وسط SOB

حضر بإذابة المكونات آلاتية في ٩٥٠ مل من الماء المقطر ، ١٠غم تربتون و ٥غم مستخلص الخميرة و ٠.٥ غم كلوريد الصوديوم، بعد الاذابة يضاف ١٠ مل من محلول ٢٥٠ ملي مولار من كلوريد البوتاسيوم ثم يكمل الحجم إلى ١٠٠٠ مل ويعقّم بالموصدة. وقبل استخدامه يضاف اليه ٥مللترات من محلول ٢ مولار من كلوريد المغنسيوم المعقّم بالترشيح (Miniatis *et al.*, ١٩٨٢).

٦-وسط احمر المثيل والفوكس بروسكور MR-VP medium

حضر الوسط بإذابة ٥ غم من الببتون و ٥ غم من K_2HPO_4 في ١٠٠٠مل ماء مقطر، اذيبت المكونات بوساطة حمام مائيّ وعدل الأس الهيدروجيني إلى ٧.٥ وعقمت بالموصدة، برد الوسط إلى ٥٠ °م وأضيف اليه ٥٠ مل من المحلول ١٠ % كلوكوز الذي عقّم بالترشيح ووزع الوسط في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة (McFadden, ٢٠٠٠). استخدم الوسط للكشف عن التحلل الكامل او الجزئي للسكريات وتكوين الحامض أو الأستيل مثيل كاربون.

٧-وسط نزع مجموعة الكاربوكسيل COOH من الاحماض الامينية:-

حضر الوسط باذابة ٥ غم ببتون و ٣ غم مستخلص الخميرة (Yeast extract) و ١ غم كلكوز في ١٠٠٠ مل من الماء المقطر، وعدل الاس الهيدروجيني إلى ٦.٧ ثم أضيف ١٠ مل من دليل (Bromothymol blue)

المحضر بتركيز ٠.٢%. خلطت المواد جيداً وعقّم الوسط بالموصدة ثم أضيف محلول الأحماض الأمينية (اللايسين) و (الاورنثين) والمحضر بتركيز ٠.٥% والمعقمة بالترشيح ووزع الوسط في أنابيب اختبار نظيفة ومعقمة (Collee *et al.*, ١٩٩٦). استخدم الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على ازاحة مجموعة الكاربوكسيل من الأحماض الأمينية.

٨-وسط الإغناء Alkaline Pepton Water

حضر الوسط باضافة ١٥ غم من ماء الببتون Pepton Water المحضر الى لتر واحد من الماء المقطر وعدل الأس الهيدروجينيّ باستخدام NaOH إلى ٨.٦ ثم عقّم بجهاز الموصدة.

٩- وسط العزل Inositol-Brilliant-green bile salt Agar

حضر هذا الوسط مختبرياً باضافة ١٠غم من بروتيز الببتون، ٥غم من خلاصة لحم العجل beef extract، ٥ غم كلوريد الصوديوم، ٢.٥ غم من سكر الانوسيتول، ٨.٥غم من Birilliant-green bile salt ، ١.٥ غراماً صبغة الأحمر المتعادل Neutral red، ٢٠غم أغار إلى لتر من الماء المقطر، عدل الأس الهيدروجينيّ للوسط إلى ٧.٢ ثم عقّم بجهاز الموصدة. ترك الوسط ليبرد ثم صب في أطباق بتري معقمة وترك ليتصلب (Schubert, ١٩٧٧).

١٠-اوساط الحفظ Semisolid media

حضر هذا الوسط شبه الصلب (semisolid) باضافة ٣.٥-٥ غم من الأغار إلى الوسط المغذي السائل (Nutrient broth) المحضر بإضافة ١٣غم من الوسط الجاهز إلى لتر من الماء المقطر ووزع في أ نابيب محكمة السّدScrew-Capped) tube) وعقم في جهاز الموصدة.

ب-الأوساط الزرعية الجاهزة

حضرت الأوساط الزرعية المستخدمة في هذه الدراسة حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة وتم تعقيمها بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١°م (بما يعادل ضغط ١٥ بار/انج^{٢}) لمدة ١٥ دقيقة.

الاغار المغذي	Nutrient agar	Difco
المرق المغذي	Nutrient broth	Difco
أغار ماكونكيّ الأساس	MacConkey's agar	Difco
أغار الدم الاساس	Blood agar base	Oxoid
أغار مولر-هنتون	Mueller-Hinton agar	Oxoid
أغار الحديد ثلاثيّ السكر	Triple Sugar Iron agar	Oxoid
أغار تربتك الصويا	Tryptic Soy agar	Difco
نقيع القلب والدماغ السائل	Brain heart Infusion broth	Oxoid
أغار البيض	Egg-yolk Agar	Oxoid

ج-السلالات القياسية المستعملة في الدراسة

جدول ١. سلالات البكتريا والبلازميدات القياسية المستخدمة في هذه الدراسة.

اسم السلالة أو البلازميد	التركيب الوراثيّ والصفة المظهرية	المصدر
E. coli MM ٢٩٤	end AI , Leu^{-}, Pro^{-}, thr^{-}, gal^{-}, $Lact^{+}$, $recA^{-}$, Rif^{+}, $hsdR^{-}$, $hsd\ M^{+}$	معهد الهندسة الوراثية والتقنية الأحيائية-كلية العلوم-جامعة بغداد

pBR ٣٢٢	tra^-, Ap^+, Tc^r	نفس المصدر السابق

hsdR: فاقد نظام التقييد

$hsd\ M^+$: وجود نظام التحوير

end AI: فاقدة لفعالية Endonuclease I

Pro^-, thr^-: الحاجة إلى الثايمين والبرولين

Rif^+: مقاومة للريفامبسين

Tc^r: مقاومة للتتراسايكلين

Ap^+: مقاومة للإمبسلين

tra^-: فاقدة للجينات المسؤولة عن الاقتران

٢-١-٤ الكواشف

١- كاشف كوفاكس Kovacs reagent

حضر الكاشف باذابة ١٠ غم من P-Dimethyl aminobenzaldehyde (DMAB) في ١٥٠ مل من amylalcohol ثم أضيف ٥٠ مل من حامض الهيدروكلوريك المركز تدريجياً إلى المزيج، خزن المحلول في قنينة معتمة ورجّ بلطف قبل الاستعمال. استخدم هذا الكاشف للكشف عن حلقة الإندول (McFadden, ٢٠٠٠).

٢- كاشف احمر المثيل Methyl red reagent

حضر الكاشف بإذابة ٠.١ غم من صبغة أحمر المثيل في ٣٠٠ مل من ٩٥% كحول اثيلي وأكمل الحجم إلى ٥٠٠ مل باستخدام الماء المقطر (McFadden, ٢٠٠٠).

٣- كاشف فوكاس بروسكاور Voges-Proskauer reagent

حضر على وفق ما جاء في (Colle *et al.*, ١٩٩٦) وعلى النحو التالي:

A- كاشف الفانفثول (Alpha-nephthol) الذي حضر باذابة ٥ غم من المادة في ١٠٠ مل من الكحول المطلق.

B- محلول هيدروكسيد البوتاسيوم الذي حضر بإذابة ٤٠ غم من المادة في ١٠٠ مل من الماء المقطر.

٤- كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent

يحضر الكاشف انياً عند الاستخدام بإذابة ٠.١ غم من Tetramethyl-P-phenylene diamine dihydrochloride في ١٠ مل من الماء المقطر (Baron & Fingold, ١٩٩٥). وضع الكاشف في قنينة معتمة واستخدم للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج انظيم الأوكسيديز.

٥- كاشف الكاتليز Catalase reagent

حضر الكاشف بإذابة ٣ مل من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في ١٠٠ مل من الماء المقطر المعقّم وحفظ في قنينة معتمة (Baron & Fingold, ١٩٩٥). استخدم هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج إنظيم الكاتليز.

٦- كاشف فريزر Freizer's reagent

يحضر الكاشف بإضافة ١٥ غم كلوريد الزئبق $HgCl_2$ ، ٢٠ مل كلوريد الهيدروجين HCl إلى ١٠٠ مل ماء مقطر (Macfadden, ٢٠٠٠).

٢-٢ جمع العينات Sampling

تم جمع ٣٠٠ عينة خروج (Stool) من أشخاص مصابين بالإسهال راقدين في مستشفى بابل للولادة والأطفال وأيضا من عينات الأشخاص المراجعين للمراكز الصحية في محافظة بابل، كما تم جمع ٦٠ عينة (غلاصم ولحم) الاسماك التي تم الحصول عليها من نهر مدينة الحلة. جمعت العينات في قناني عقّمت مسبقاً ثم نقلت مباشرة إلى المختبر لزرعها على الأوساط الزرعية المناسبة.

٢-٢-١ طريقة الزرع

لقحت عينات الخروج أولاً في وسط الإغناء Alkaline Pepton water (APW) وحضنت هوائياً عند درجة ٣٥-٣٧ ºم لمدة ٢٤ ساعة. ثم أخذ ملء الناقل المعقّم (Loop full) من المزارع النامية وزرع بطريقة التخطيط (Streaking) على الوسط الانتقائيّ (IBBA). حضنت الأطباق هوائياً عند درجة حرارة ٣٥-٣٧ ºم لمدة ٢٤ ساعة اخرى. نقيت بعدها المستعمرات بإعادة زرعها على الاوساط الأغار المغذي أو ماكونكي أو كلكر وحضنت هوائياً عند درجة حرارة ٣٥-٣٧ ºم لمدة ٢٤ ساعة.

٢-٢-١-١ اختيار المستعمرات

سجل الباحثون Miller و Koburger (١٩٨٦) أشكالاً متعددة لظهور مستعمرات بكتريا *P. shigelloides* على الوسط الانتقائيّ IBBA وكما يأتي:

١- مستعمرات بيضاء تحمل القليل أو الكثير من اللون الورديّ في أطرافها.

٢- مستعمرات بيضاء إلى وردية.

٣- حمراء إلى وردية.

٤- بيضاء صغيرة في الأطباق المزدحمة.

٢-٢-٢ التشخيص البكتريولوجيّ

تؤخذ مستعمرة واحدة نقية من كلّ نموّ موجود على الأوساط الزرعية الخاصة بالزرع الأوليّ وتشخص مبدئياً اعتماداً على الصفات الشكلية المتضمنة حجم المستعمرات ولونها وحافاتها وارتفاعها ثم دراسة صفات الخلايا تحت المجهر الضوئي بعد تصبيغها بصبغة غرام (Gram's stain) والمتضمنة شكل الخلايا ولونها وتجمعها.

بعد ذلك شخصت العزلات اعتماداً على كتاب برجي الخاص بتشخيص البكتريا (Bergy's manual for determinative bacteriology) ، (Holt *et al.*, ١٩٩٤).

وكـذلك بالاعتمـاد علـى مـا اشـار اليـه Collee وجماعتـه (١٩٩٦) و McFadden (٢٠٠٠) حـول الطرائـق المسـتخدمة والمـواد والاوسـاط الزرعيـة المهمة في تشخيص البكتريا.

٢-٢-٣ التشخيص المصليّ

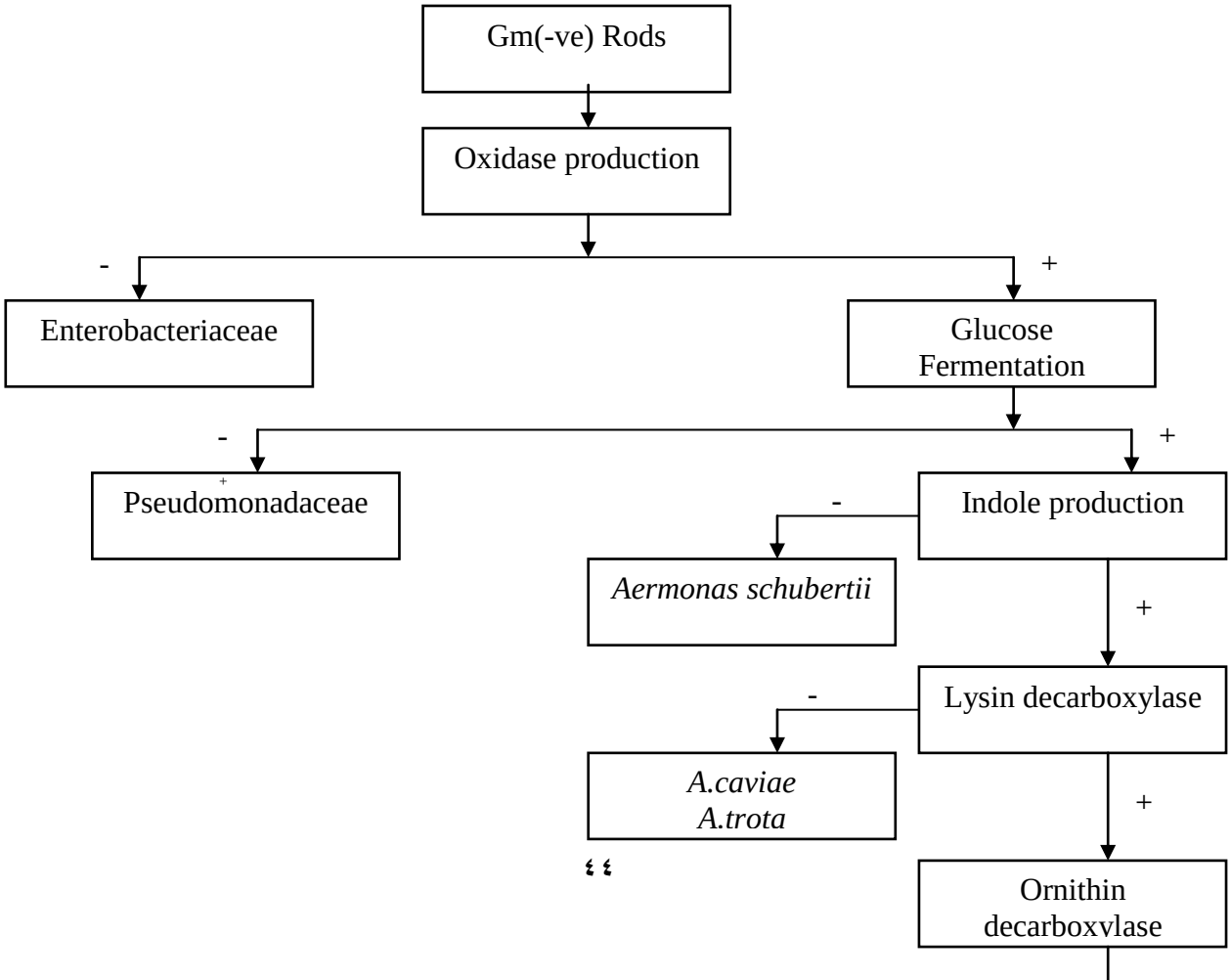
ا سـتخدم المصـل المضـادّ(*Shigella* antisera) فـي تشـخيص بكتريـا *P. shigelloides* وذلـك لتشـابه التركيـب المستضـديّ لكـلا الجنسـين حيـث تـم استعمال الـ Antisera آلاتية:

-Anti-*Shigella* type III.

-Anti-*Shigella flexeneri*.

٢-٢-٤ الاختبارات الكيموحيوية للعزلات

إجريت عدد من الاختبارات على المستعمرات المعزولة من الوسط الانتقائيّ المنقاة والنامية على وسط Neutrient agar لمدة ٢٤-٤٨ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ ºم لتشخيص بكتريا *P. shigelloides* وباتباع المخطط التصنيفي التالي:-



شكل (١) المخطط المتبع لتشخيص بكتريا *P. shigelloides*

(Holt *et al.*, ١٩٩٤).

٢-٢-٤-١ التشخيص الكيموحيويّ للعزلات

١- الكشف عن إنظيم الأوكسيديز Oxidase test

اجري الفحص بنقل كمية من النموّ البكتيريّ بوساطة العيدان الخشبية المعقمة إلى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف المحضر آنياً، تلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجيّ دلالة على أن النتيجة الموجبة (Collee *et al.*, ١٩٩٦).

٢- الكشف عن إنظيم الكاتليز Catalase test

تم اجراء الفحص بنقل كمية قليلة من النموّ البكتيريّ النامي على الوسط الزرعي بعمر ٢٤ ساعة بوساطة العيدان الخشبية المعقّمة إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ثم أضيف لها قطرة من ٣% بيروكسيد الهيدروجين

(H_2O_2)، إن ظهور الفقاعات الغازية دلالة على النتيجة الموجبة (Collee *et al.*, ١٩٩٦).

٣- اختبار الاندول Indole test

جرى تلقيح وسط ماء الببتون بالبكتريا المراد اختبارها وبعد مدة حضانة ٤٨ ساعة، أضيف ٠.٥ مل من كاشف كوفاكس (Kovac's reagent) إلى الوسط ورجت الانبوبة بهدوء، تكون اللون الاحمر في شكل حلقة دائرية بين الوسط والكاشف الكحوليّ التي ترتفع إلى الأعلى دلالة على إيجابية الاختبار (Macfadden, ٢٠٠٠).

٤- الكشف عن تخمر السكريات الثنائية وتكوين غاز كبريتيد الهيدروجين

تم التحري عن قابلية البكتريا على تخمير الكاربوهيدرات وإنتاج كبرتيد الهيدروجين اذ خطط المستنبت الفتيّ بعمر ٢٤ ساعة في وسط كلكر Kliger's Iron Agar (KIA) وتمّ حضن الوسط عند درجة حرارة ٣٧ °م ولمدة ٢٤ ساعة. قرأت التغيرات في الدالة الحامضية (pH) في القعر والسطح المائل للوسط، لوحظ التخمر بوساطة تغير لون كاشف أحمر الفينول من الأحمر إلى الأصفر، أما تكون الغاز فكان غالباً على شكل فقاعات اسفل الوسط الصلب اما البكتريا المنتجة لكبريتيد الهيدروجين فكونت راسباً أسودَ في قعر الأنبوب (Macfadden, ٢٠٠٠).

٥- اختبار أحمر المثيل Methyl Red test

اجري الفحص بتلقيح الانابيب الحاوية على الوسط الزرعيّ MR-VP Medium بالمزروع البكتيري وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة بعد ذلك تتم اضافة ٥ قطرات من كاشف احمر المثيل، ان ظهور اللون الاحمر في الأنبوبة بعد ١٥ دقيقة دلالة على تخمر الكلكوز الكامل أي ان الفحص موجب (Collee *et al.*, ١٩٩٦).

٦- فحص الفوكس بروسكور Voges Proskaur test

اجـري الفحـص بتلقـيح الوسـط الزرعـي MR-VP Medium بـالمزروع البكتيري وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة بعد ذلك تم إضـافة ٠.٦ مل من كاشف الفانفثول و ٠.٢ مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم إلـى كلّ انبوبة. ان ظهور اللون الورديّ خلال ٢-٥ دقائق دلالـة علـى النتيجـة الموجبـة التـي تشـير إلـى التحلـل الجزئـيّ للسـكر وإنتـاج مركـب إسـتيل مثيـل كاربونيـل (Acetyl methyl-carbonyl) (Collee *et al.*, ١٩٩٦).

٧- اختبار إزالة مجموعة الكاربوكسيل (COOH) من الاحماض الامينية:

أجـري هـذا الاختبـار بتلقـيح وسـط الحـامض الأمينـي اللايسـين والأورنثـين بالمزروع البكتيريّ المراد فحصه ثم حضن عند درجـة حـرارة ٣٧ °م لمـدة ٤ ايـام، ان تحـول لـون الوسـط مـن الأصـفر إلـى الأزرق دلالـة علـى أن النتيجـة موجبـة أمـا النتيجة السالبة فأستدل عليها ببقاء اللون الأصفر (Collee *et al.*, ١٩٩٦).

٨- تخمر السكريات

أُتبعـت طريقـة Hugh و Liefson (١٩٥٣)، Aldova (١٩٩٤) . حضـر الوسط الخاص بتخمر السكريات باضافة ٢ غم ببتون، ٥ غم من كلوريد الصوديوم، ٠.٣ غم من K_2HPO_4، ٣ مل من ١% البروموثايمول الازرق، ٣غم أغـار، ١% من السكر المعنـي إلـى لتر مـن المـاء المقطـر. اذيبـت المـواد بالتسـخين وعـدل الاس الهيدروجينيّ إلى ٧.١ وزعت في أنابيب، انبوبتين لكلّ عزلة كل انبوبة تحـوي علـى ٥مل من الوسط ثم عقّمت بجهـاز الموصـدة. لقحت الأوسـاط بعد ذلـك بـالعزلات ثـم وضعت طبقة من البارافين السائل النقي والمعقّم لتغطـي سـطح الوسـط وذلـك لتـوفير ظروف غير هوائية للتخمر وترك أنبوب آخـر بـدون بـرافين لتـوفير ظـروف هوائيـة للأكسدة. حضنت الاوساط بعدها هوائياً عند درجة ٣٧ م° وروقبـت لفتـرة ١٤ يومـاً. سجلت النتائج موجبة بتغير الوسط إلى اللون الأصفر (Macfadden, ٢٠٠٠).

السكريات المستخدمة الانوسيتول، المانيتول، السكروز، الكلكوز.

٢-٢-٥ المقاومة للمضادات الحياتية

٢-٢-٥-١ إختبار مقاومة العزلات للمضادات الحياتية بطريقة Kirby –Bauer method (١٩٦٦)

اجري اختبار الحساسية للمضادات الحياتية بطريقة الانتشار باستخدام أقراص المضادات الحياتية الجاهزة جدول ٢. فقد تم زراعة البكتريا المراد اختبار الحساسية لها على وسط أغار مولر-هنتن بطريقة التخطيط ووضع القرص على سطح الطبق، ثم حضنت عند درجة حرارة ٣٥ °م لمدة ١٨ ساعة، وفيما بعد سجلت النتائج على وفق قطر منطقة التثبيط المتكونة حول القرص (Baron and Fingold, ١٩٩٠). واعتماداً على المسافات القياسية لقطر منطقة التثبيط المعتمدة في المصدر (Jones *et al.*, ١٩٨٤).

جدول ٢. المضادات الحياتية المستخدمة في اختبار الحساسية.

اسم المضادالحياتيّ*	الرمز	التركيز لكل قرص µg/ml
Erythromycin	E	١٥
Amoxylin	AM	٢٥
Gentamycin	CN	١٠
Tetracyclin	Te	٣٠
Ampiclox	Ax	٣٠
Ampicillin	AMP	١٠
Streptomycin	S	١٠
Cefotaxime	CTX	٣٠ l
Ceftizoxime	ZOX	٣٠

١٠٠	PRL	Pipracillin
٥	CIP	Ciprofloxacin
٢٠	SXT	Sulphmethaxazole-trimethoprim
٣٠	RD	Rifadin
٣٠	C	Chloramphenicol

* المضادات الحيوية مجهزة من قبل شركة Oxoid

٢-٢-٥-٢ اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية

حضر وسط الأغار المغذي وعقم بالموصدة، ثم برد لدرجة حرارة ٥٠ °م وأضيف إليه أحد محاليل المضادات الحياتية المحضرة سابقاً وبالتركيزات المذكورة في الفقرة٢-١-٣ وتم صبّ أوساط المضادات الحياتية في أطباق معقّمة وتركت لتتصلب ووضعت في الحاضنة عند درجة ٣٥°م لمدة ٢٤ ساعة للتأكد من خلوها من التلوث. زرعت البكتريا على هذه الأوساط بتقنية Picking and Patching مع وجود سيطرة موجبة وسالبة على كلّ طبق.

وحضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٥ °م لمدة ٢٤ ساعة، ثم سجلت النتيجة بوجود النمو (+) أو عدمه (-) (Nassif *et al.*, ١٩٨٩ a). واستخدمت هذه الطريقة للتحري عن (المقاومة للمضادات) في هذه الدراسة.

٢-٢-٦ اختبارات إنتاج بعض عوامل الضراوة لبكتريا *P. shigelloides*

٢-٢-٦-١ التحري عن انتاج إنظيم تحلّل الدهن

حضر الوسط Tween ٨٠ medium باضافة ١٠غم ببتون، ٥غم من كلوريد الصوديوم NaCl، ٠.١ غم كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$، ٢٠غم أغار إلى لتر من الماء المقطر. أذيبت المواد بالتسخين ثم عدل الاس الهيدروجيني إلى ٧.٤. أضيف مقدار ١٠ مل من ٨٠ Tween المعقّم بالموصدة ليصبح التركيز النهائي ١% ثم وزع في أطباق بتري معقمة. لقحت العزلات على الوسط وحضنت الاطباق هوائياً عند درجة ٣٧ °م وسجلت النتيجة الموجبة بعد فترة حضانة ٥ أيام بظهور هالة معتمة حول المستعمرات المنتجة للإنظيم والتي تم متابعتها يومياً (Cowan and Steel, ١٩٧٥).

٢-٢-٦-٢ التحري عن إنتاج الإنظيم المحلل لليسيثين

استخدم الوسط Egg-Yolk Agar الجاهز وذلك بإضافة ٢٨ غم من الوسط إلى لتر من الماء المقطر، عقّم الوسط بالموصدة ووزع في أطباق بتري المعقّمة.

لقح الوسط بالعزلات وحضنت الاطباق لمدة ٤٨ ساعة عند درجة ٣٧ °م وسجلت النتيجة الموجبة بظهور منطقة معتمة حول النموّ (Cruickshank, ١٩٧٥).

٢-٢-٦-٣ التحري عن إنتاج الهيمولايسين البكتيري

A- الطريقة الاعتيادية

لقحت العزلات في وسط Blood Agar Base (B.A.B.) الجاهز وذلك باضافة ٣٣ غم من الوسط إلى لتر من الماء المقطر بعد أن عقّم الوسط ترك ليبرد حتى تصل درجة حرارته إلى ٥٠-٥٥ °م ثم أضيف إليه ٧% من دم الأغنام أو ٥% من دم الإنسان. حضنت الأطباق هوائياً عند درجة ٣٧ °م لمدة ٢٤-٤٨ساعة. التحلل الكامل حول المستعمرة هو تحلل من نوع β ، أما التحلل الجزئيّ مع ظهور

لون أخضر هو من نوع α، عدا ذلك سجل عدم القدرة على التحلل (Baron and Fingold, ١٩٩٤).

B- طريقة كساء الأغار Agar Overlay Assay (AO)

وضع مقدار ٣ مايكروليتر من معلق الخلايا النامية لمدة ٢٤ ساعة في وسط التربتون السائل (المحضر من اضافة ١٠ غم تربتون إلى لتر من الماء المقطر) من كلّ عزلة قي شكل بقعة على سطح الوسط Loria-Agar (المحضر من إضافة ١% تربتون، ٠.٥% خلاصة الخميرة Yeast extract، ٠.٠٥% كلوريد الصوديوم، ١.٥% أغار) حضن الوسط لمدة ١٨ ساعة وبعد الحضن غمرت المزارع بـ٥ مل من معلق الأغار الرقيق (المحضر من المحلول الملحيّ المنظم Phosphate buffer saline (PBS) المذاب فيه ٠.٠٦٥% أغار حاوية على ١% كريات دم حمراء للانسان فصيلة A مغسولة (تم الحصول عليه بسحب ٥ مل من الدم فصيلة A ووضع في أنابيب جاهزة حاوية على مادة مانعة للتخثر EDTA إذ وضعت في أنابيب معقّمة وطردت مركزياً ٣٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٥ دقائق باستخدام جهاز الطرد المركزي وغسلت بالمحلول الملحيّ، أجريت عملية الغسل ثلاث مرات وفي المرة الثالثة أخذ منه مقدار ١ مل). تركت بعدها الطبقة السطحية لتتصلب، حضنت الأطباق مرة أخرى لمدة ٤ ساعات إضافية أخرى. قرئت النتيجة خلال كل ساعة برؤيتها بالعين المجردة لتسجيل فيما اذا حصل التحلل أم لا (Abbott *et al.*, ١٩٩١).

٢-٢-٦-٤ التحري عن الإنظيم المحلل للجيلاتين

استخدم الوسط Gelatine Agar المحضر مختبرياً بإضافة ٤ غم جيلاتين، ٠.٠٥ غم كلكوز، ٠.٥ فوسفات البوتاسيوم KH_2PO_4، ١.٥ غم فوسفيت البوتاسيوم K_2HPO_4، ١١ غم أغار إلى لتر من الماء المقطر.

أ ذيبت الموادبالتسخين وعدل الأس الهيدروجينيّ إلى ٧ ثم عقّم لمدة ٣٠ دقيقة بالموصدة وبعد أن برد الوسط وزع في أطباق بتري معقّمة وترك ليتصلب.

لقح الوسط بالعزلات وحضنت الأطباق هوائياً لمدة ٤٨ ساعة عند درجة حرارة ٣٧°م. بعدها غمرت المزارع النامية على الوسط بكاشف فريزر Freizer's reagent، سجلت النتيجة موجبة عند تكون المناطق الشفافة حول المستعمرات المنتجة للإنظيم (Cowan and Steel, ١٩٧٥).

٢-٢-٦-٥ التحري عن إنتاج الإنظيمات الخارجية المحللة للبروتين Extracellular Proteases

تم التحري عن إنتاج الإنظيمات المحللة للبروتين باستخدام وسط M٩ الصلب المضاف اليه ٢% أغار والذي عقّم بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ °م مدة ١٥ دقيقة، بعدها تم تبريد الوسط لغاية ٥٠ °م ثم أضيف إليه ٠.٢% سكر الكلكوز المعقّم بالترشيح باستخدام مرشحات دقيقة كما دعم الوسط بالكازائين ١% ووزع في اطباق معقمة، بعدها زرعت الأطباق بالسلالات البكتيرية وبعد مدة حضن ٢٤-٤٨ ساعة عند درجة حرارة ٣٧°م، أضيف لكل طبق ٣ مل من ٥% حامض الخليك الثلاثي الكلور (Trichloro acetic acid) لغرض ترسيب البروتين غير المتحلل والكشف عن المناطق الشفافة حول كلّ مستعمرة للاستدلال على إنتاج الإنظيمات المحللة للبروتينات الخارجية (Piret *et al.*, ١٩٨٣).

٢-٢-٦-٦ التحري عن إنتاج انظيم تحلل سكر الكالاكتوز β-Galactosidase

حضر الوسط مختبرياً بإضافة ١.٥ غم ماء البيتون، ٠.١٥ غم كاشف ONPG (O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosidase) إلى ١٠٠ مل من الماء المقطر، عدل الأس الهيدروجينيّ إلى ٧.٢ ثم وزع على انابيب اختبار صغيرة بواقع ١ مل لكلّ أنبوب وعقّم بالموصدة لمدة ١٠ دقائق.

لقحت الأنابيب بالعزلات وحضنت لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ ºم وسجلت النتيجة موجبة بتغيير لون الوسط إلى اللّون الأصفر. (Wilson and Miles, ١٩٧٥).

٢-٢-٧ تعيين مستضدات عوامل الاستعمار أو الاستيطان

٢-٢-٧-١ التحري عن عامل الاستعمار الأول (CFA/I) بطريقة تلازن دم الإنسان بوجود سكر المانوز Assay for colonization factor Antigen by mannose resistant Hamagglutination

تم استخدام طريقة تلازن كريات الدم الحمراء بوجود سكر المانوز لاختبار وجود مستضدات عامل الاستعمار الأول CFA/I في العزلات البكتيرية. زرعت السلالات على وسط Tryptic Soy agar وحضنت الأطباق عند درجة ٣٧ ºم مدة ٢٤ ساعة.

حضر عالق كريات الدم الحمراء للإنسان فصيلة (A) وذلك بغسل هذه الكريات بعناية ثلاث مرات باستخدام دارئ الفوسفات الفسيولوجي (Phosphate buffer saline) المعقّم والمحضر سابقاً وحضر بعدها عالق ٣% (حجم/حجم) من كريات الدم الحمراء. حضر عالق البكتريا بأخذ نصف النموّ البكتيريّ ولكلّ سلالة من فوق سطح وسط Tryptic Soy agar والموجود في طبق بتري وخلط جيداً في مللتر واحد ٠.١٥ مولار NaCl ولغرض تعيين فحص تلازن كريات الدم الحمراء والتحري عن وجود مستضّدعامل الاستعمار الأول، خلطت على شريحة زجاجية نظيفة وعلى جهة منها قطرة واحدة (١٠ مايكروليتر) من عالق خلايا البكتريا مع قطرة واحدة من محلول ٠.١ مولار D-Mannose في ٠.١٥ مولار NaCl، وعلى الجهة الثانية من الشريحة نفسها خلطت قطرة من

عالق خلايا البكتريا نفسها مع قطرة من عالق كريات الدم الحمراء وقطرة من محلول ٠.١٥ مولار NaCl بدون سكر المانوز. لوحظ حدوث تلازن كريات الدم الحمراء على جهة الشريحة في درجة حرارة الغرفة وخلال نصف دقيقة إلى دقيقتين (Symth, ١٩٨٢).

٢-٢-٧-٢ التحري عن عامل الاستعمار الثاني CFA/II بطريقة تلازن دم الدجاج بوجود سكر المانوز:

ولتعيين مستضدات عامل الاستعمار الثاني تتبع الخطوات نفسها السابقة باستبدال دم الإنسان (فصيلة A) بدم الدجاج حيث إن عامل الاستعمار الثاني يسبب تلزن كريات الدم الحمراء للدجاج والأبقار (الزعاك، ١٩٩٤).

٢-٢-٧-٣ التحري عن عامل الاستعمار الثالث CFA/III بطريقة تلازن دم الإنسان بوجود حامض التانيك: Assay for colonization factor Antigen by Tannic acid Hamagglutination

تم استخدام طريقة تلازن كريات الدم الحمراء بوجود حامض التانيك (Tannic acid) لاختبار وجود العامل الثالث CFA/III في السلالات البكتيرية. زرعت السلالات على وسط Tryptic Soy agar وحضنت الاطباق عند درجة ٣٧ °م مدة ٢٤ ساعة.

حضر عالق كريات الدم الحمراء للإنسان من فصيلة (A) وذلك بغسل هذه الكريات بعناية ثلاث مرات باستخدام دارئ الفوسفات الفسيولوجي Phosphate buffer saline (٠.١ M) المعقّم وحضر عالق ٣% (حجم/حجم) من كريات الدم الحمراء. حضر عالق البكتريا بأخذ نصف النموّ البكتيريّ ولكلّ سلالة من فوق سطح وسط Tryptic Soy agar والموجود في طبق بتري وخلط جيداً في مللتر واحد من محلول ٠.١٥ مولار NaCl ولغرض تعيين فحص تلازن

كريات الدم الحمراء وبالتالي احتمال و جود مستضدّ عامل الاستعمار الثالث، خلطت على شريحة زجاجية نظيفة (وعلى جهة واحدة منها) قطرة واحدة (١٠ مايكروليتر) من عالق كريات الدم الحمراء للإنسان مع قطرة واحدة من محلول ٠.١ مولار Tannic acid في ٠.١٥ مولار NaCl، وعلى الجهة الثانية من الشريحة نفسها خلطت قطرة من عالق البكتريا مع قطرة من عالق كريات الدم الحمراء وقطرة من محلول ٠.١٥ مولار NaCl بدون حامض التانيك ثم يلاحظ حدوث تلازن كريات الدم الحمراء على جهة الشريحة في درجة حرارة الغرفة وخلال نصف دقيقة إلى دقيقتين.

٢-٢-٧-٤ تعيين مستضدّ ات عوامل الاستعمار بطريقة التجمع الملحي
Salt aggregation test for detection CFA/III

تمّ اعتماد طريقة Tonado وجماعته (١٩٨٤) للكشف عن عوامل الاستعمار التي تنتمي للنوع الثالث باستخدام طريقة التلازن الملحيّ حيث يستخدم تركيز عالٍ من ملح كبريتات الأمونيوم.

زرعت العزلات على وسط Tryptic Soy agar المائل وحضنت عند درجة ٣٧ °م مدة ٢٤ ساعة. حضر عالق البكتريا بأخذ النموّ من على وسط المائل وخلط جيداً مع ٠.٠٠٢ مولار من دارئ الفوسفات الفسيولوجيّ (٦.٨ pH) خلطت على شريحة زجاجية نظيفة وبحجوم متساوية قطرة من عالق البكتريا (١٠مايكروليتر) مع قطرة من ملح كبريتات الامونيوم (٤ مولار) والمعلق في دارئ الفوسفات الفسيولوجيّ ثم يلاحظ حدوث التلازن عند درجة حرارة الغرفة خلال نصف دقيقة إلى دقيقتين.

٢-٢-٨ التحري عن إنتاج السايدروفور Siderophores production

حضر الوسط الملحيّ M_9 المضاف إليه ٢% أغار وعقّم بالموصدة ثم برد إلى درجة حرارة ٥٠ °م، اضيف إليه ٠.٢٥ مل سكر الكلوكوز المعقّم بالترشيح

كما يضاف dipyridyl (٢٠٠ مايكرومل) على وفق ما أشار إليه Nassif وجماعته (١٩٨٩)، ثم فحصت قابلية السلالات البكتيرية على النموّ بوجود dipyridyl وحضنت عند درجة ٣٧ °م مدة ٢٤ ساعة وسجلت النتائج على أساس وجود النموّ (+) وعدم النموّ (-).

٢-٢-٩ التحري عن المحفظة البكتيرية باستعمال طريقة التصبيغ السالب (Negative staining method)

تمّ اتباع طريقة المسحة الرطبة وذلك بوضع قطرة من الحبر الهنديّ على سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة وبوساطة ناقل (Loop) تمّ نقل جزء من المستنبت البكتيريّ الفتيّ بعمر ١٨-٢٤ ساعة والنامي في وسط نقيع الدماغ والقلب ومزج المستنبت مع الحبر مزجاً جيداً ثم وضع غطاء الشريحة وضغط برفق بين ورقتي ترشيح لبعثرة تكتلات الخلايا الجرثومية، ثم فحصت الشريحة تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئيّ.

٢-٣ عزل الدنا البلازميديّ Plasmid DNA Isolation

٢-٣-١ طريقة التحلل بالقاعدة Lysis by alkali

(Brinboim & Dolly, ١٩٧٩) وتضمنت هذه الطريقة الخطوات الآتية:

١- نشرت الخلايا البكتيرية على طبق يحتوي على الوسط المغذي الصلب وذلك لغرض الحصول على مستعمرات منفردة، اخذت مستعمرة بكتيرية بواسطة عروة ناقلة لتلقيح ١٠مل من وسط لوريا السائل وحضنت في حاضنة هزازة لمدة ١٨ ساعة عند درجة ٣٧ °م.

٢- رسب عالق الخلايا بجهاز النبذ المركزيّ بسرعة ٨٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق.

٣- علّق راسب الخلايا في ٠.١ مل من محلول SET ووزع العالق في أنابيب ابندروف معقمة.

٤- اضيف ٠.٢ مل من محلول ١% SDS القاعديّ مع قلب الأنبوبة مرتين وبهدوء ثم وتركت لمدة ٥ دقائق في حمام ثلجيّ.
٥- اضيف ٠.١٥ مل من محلول ٥ مولارا خلات البوتاسيوم المبرد لدرجة الانجماد ثم قلبت الأنبوبة عدة مرات وتركت بعدها لمدة ٥ دقائق في حمام مائيّ ثلجيّ.
٦- ينبذ الخليط مركزياً بجهاز النبذ المركزيّ نوع ابندروف بمعدل ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ٥ دقائق.
٧- نقل الراشح إلى أنبوب ابندروف جديد ومعقّم ويعامل مع دارئ الفينول-كلوروفورم ويمزج جيداً ثم ينبذ مركزياً بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٢ دقيقتين.
٨- نقلت الطبقة العليا إلى أنبوب ابندروف جديد وأضيف إليها ضعفاً الحجم من الايثانول المطلق مزجت جيداً وتركت عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة بعدها نبذ الخليط مركزياً بجهاز النبذ المركزيّ نوع ابندروف بمعدل ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة عشر دقائق.
٩- تمّ التخلص من الكحول الاثيليّ المطلق وغسل الراسب بملي لتر واحد من ٧٠% كحول اثيلي مبرد. ثم نبذ مركزياً بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق.
١٠- أزيل الكحول الاثيليّ ٧٠% وتركت الأنابيب بوضع مقلوب على ورق نشاف في درجة حرارة الغرفة لكي تجف.
١١- اذيب الراسب في ٥٠ مايكروليتراً من دارئ TE وحفظت عند درجة حرارة -٢٠ °م لحين الاستخدام.

٢-٣-٢ عزل الدنا البلازميديّ بطريقة Salting out

اتبعت طريقة Kado و Liu (١٩٨١) المتضمنة الخطوات الآتية:-
١- نشرت الخلايا البكتيرية على طبق يحتوي الوسط المغذي الصلب وذلك لغرض الحصول على مستعمرات منفردة، اخذت مستعمرة بكتيرية بوساطة عروة

ناقلة لتلقيح ٣٠ مللتراً من وسط لوريا السائل وحضنت في حاضنة هزازة لمدة ١٨ ساعة عند درجة ٣٧ °م.

٢- رُسب عالق الخلايا بجهاز النبذ المركزيّ بسرعة ١٠٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة (١٠) دقائق.

٣- علّق راسب الخلايا في ٥ مللترات من محلول SET .

٤- اضيف ٦٠٠ مايكروليتر من SDS بتركيز ٢٥% والمذاب في Salin EDTA (pH ٨).

٥- مزج الخليط بالتقليب ثم حضن المزيج في حمام مائي عند درجة حرارة ٥٥ °م ولمدة ٥ دقائق.

٦- اضيف (٢) مل من ٥ مولار NaCl، مزج بالتقليب وترك ليبرد حتى درجة ٣٧°م.

٧- اضيف (٥) مل من محلول فينول-كلوروفورم-ايزواميلو الكحول (٢٥: ٢٤: ١) حجم/حجم.

٨- خلط المزيج بالتقليب المستمر لمدة ٣ دقائق عند درجة حرارة ٢٠°م.

٩- نبذ الخليط بسرعة ٤٥٠٠ دورة/دقيقة لمدة (١٥) دقيقة وعند درجة حرارة ٢٠°م.

١٠- نقل الراشح الحاوي على الدنا البلازميديّ إلى أنبوب جديد، واضيف له ٠.٦مل حجم من الايزوبروبانول لكل ١ مل.

١١- خلط المزيج بالتقليب ولّف الدنا البلازميديّ بعد مرور ثلاث دقائق بوساطة ماصة باستور.

١٢- غسل شريط الدنا بـ (٥) مل من ٧٠% ايثانول وجفف في الهواء وذوب في (١-٢) مل من بفر TE وحفظ عند درجة حرارة ٢٠- °م لحين الاستخدام.

٢-٣-٣ الترحيل الكهربائيّ للدنا البلازميديّ على هلام الاغاروز

Agarose gel electrophoresis

اتبعت طريقة Sambrook وجماعته (١٩٨٩)، إذ تعدّعملية إمرار تيار كهربائيّ خلال هلام الأغاروز واحدة من الطرائق المستخدمة لفصل خليط من قطع الدنا ذات الأوزان الجزيئية المختلفة زيادة على أن هذه التقنية تسهل عملية حساب موقع الدنا أو مكانها في الهلام في صورة مباشرة.

بدأت عملية تحضير الهلام بإذابة ٠.٧ غم من الأغاروز في ١٠٠ مل من دارئ (١X TBE) وتمّت الإذابة باستخدام حمام مائي عند درجة ١٠٠ °م وبرد بعد ذلك إلى درجة حرارة ٥٠ °م ثم يضاف اليه ١٠ مايكروليتر من محلول ٥ملغم/مل من صبغة بروميد الاثيديوم، حضرت صفيحة اسناد الأغاروز (Tray) وتحاط حافاتها بشريط لاصق وفي شكل جيد لمنع تسرب الهلام الذائب بعد صبه. صب الاغاروز بكمية مناسبة ثم غمس مشط تكوين حفر (Comb) قرب إحدى نهايتي الصفيحة، وترك ليتصلب لمدة نصف ساعة، يرفع مشط تكوين الحفر من الاغاروز المتصلب ورفع الشريط اللاصق ثم تثبت الصفيحة على مساندها في وحدة الترحيل ثم يغطي هلام الاغاروز بارتفاع واحد مللتر بدارئ TBE. بدأت عملية اضافة نماذج الدنا في حفر الهلام اذ مزج ١٠مايكروليتر من الدنا البلازميدي مع ٣ مايكروليترات من محلول صبغة البروموفينول الأزرق (Loading buffer) ثم نزل مزيج الدنا والصبغة في حفر الأغاروز وتبدأ بعد ذلك عملية الترحيل الكهربائيّ الذي تختلف متطلباته تبعاً لنوع الدنا وحجمها، اذ استخدم فرق جهد واطئ ٦ فولت/سم وبمعدل مرور للتيار ٢٠ملي امبيراً ولمدة زمنية ١-٣ ساعات بعد ذلك يتمّ تقصي الحزم المصبوغة للدنا البلازميديّ بعد كشفها بالأشعة فوق البنفسجية بوساطة باعث الاشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator بطول موجيّ ٣٠٢ نانومتر.

٢-٣-٤ عملية التحييد Curing

٢-٣-٤-١ التحييد باستخدام SDS

١- حضرت تراكيز نهائية هي ١%، ١.٥%، ٢%، ٤% من الـSDS في وسط L. broth، في أنابيب معقمة، ثم لقحت الانابيب بنقل ٠.١ مل من المزروع البكتيريّ وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ ºم لمدة ٢٤ ساعة.

٢- حضنت الأنابيب الحاوية على الوسط عند درجة حرارة ٣٧ ºم لمدة ٢٤ ساعة، ثم لوحظ كثافة النموّ للخلايا المعاملة ومقارنتها بالخلايا غير المعاملة لتحديد التركيز المثبط الأدنى للـSDS.

٣- بعد مقارنة كثافة النموّ في الأنابيب ينشر ٠.٢ مل من مزروع السيطرة والمزروع المعامل بـSDS وبتركيزات أوطأ أو مقاربة للتركيز المثبط للتركيز المثبط الأدنى على وسط اغار المغذي الذي حضن عند درجة حرارة ٣٧ ºم لمدة ٢٤ ساعة.

٤- قورن العدد الحيّ للخلايا في مجموعتي السيطرة والمعاملة. ويتم اختيار تركيزات الـSDS التي سبقت التراكيز المثبط الأدنى لاختبار التحييد.

٥- وبعد تعريض الخلايا إلى عوامل التحييد وعزل المستعمرات النامية على الأغار المغذي تمّ التحري عن الخلايا المحيدة بانتخاب ١٠٠ مستعمرة ونقلت جميعها بوساطة عيدان خشبية وبطريقة (Picking and Patching) إلى أوساط الأ غار المغذي المضاف له المضادّالحياتيّ الملائم.

٦- كررت العملية نفسها للسلالات جميعها ولكن باستخدام الأغار المغذي المضاف له المضادّالحياتيّ الملائم ثم لوحظ نمو المستعمرات المنقولة فعند عدم ظهور النموّ على الوسط المضاف له المضادّوظهوره في الوسط الخالي يعني أن الخلية فقدت صفة المقاومة لذلك المضادّ.

٢-٣-٤-٢ التحييد باستخدام Curing with Para-hydroxy benzoic acid

١- حضرت تركيزات ١%، ١.٥%، ٢%، ٤%من Para-hydroxy benzoic acid في وسط L. broth.

٢- تم تهيئة L.broth ووزع في أنابيب معقّمة تحوي كلّ أنبوبة ١٠ مل من الوسط.
٣- أضيف حامض الباراهايدروكسيّ بنزويك إلى الأنابيب الحاوية على الوسط بحيث يكون التركيز النهائيّ حسب التراكيز السابقة في (١).
٤- تلقيح الأنابيب بنقل ٠.١ مل من المزروع البكتيري وحضنت عند درجة حرارة ٣٧°م مدة ٢٤ ساعة.
٥- تمّ تعيين التركيز المثبط الأدنى للحامض عند التركيز الذي ينعدم فيه النمو، ثم بعد ذلك يتم نشر ٠.٢ مل من التراكيز القريبة آو الأوطأ من التراكيز المثبطة الدنيا للنمو على وسط الأغار المغذي إذ حضنت عند درجة حرارة ٣٧°م مدة ٢٤ ساعة.
٦- بعد ذلك تم التحري عن الخلايا المحيدة بانتخاب ١٠٠ مستعمرة معاملة بالحامض ونقلت إلى أوساط الأغار المغذي المضاف له المضاد الحياتي الملائم بوساطة عيدان خشبية وبطريقة (Picking and Patching) وحضنت لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٧°م.
٧- لوحظ النموّ للمستعمرات المنقولة فعند عدم ظهور النموّ على وسط المضاف له المضادوظهوره في الوسط الخالي يعني أ ن الخلية فقدت المقاومة لذلك المضاد.

٢-٣-٥ التحول الوراثيّ Transformation

أجريت عملية التحول الوراثيّ (Transformation) حسب ما ورد في Sambrook وجماعته (١٩٨٩). واتبعت هذه الطريقة بإجراء التحول الوراثيّ إلى الخلايا المؤهلة من بكتريا *E.coli* MM٢٩٤ المقاومة للريفامبسين والحساسة للامبسلين (وهي الصفات المتضادة مع العزلات الواهبة) وتضمنت الخطوات الآتية:-

تحضير الخلايا المؤهلة

١- نميت الخلايا المستلمة (*E.coli* MM٢٩٤) الخالية من البلازميدات في ٥ مل من الوسط السائل SOC وحضنت عند درجة ٣٧ °م في الحاضنة الهزازة بسرعة ٦٠ دورة/دقيقة ولمدة ١٨ ساعة، لغرض تنشيط البكتريا.

٢- لقح ٥٠ مل من الوسط السائل SOC بواحد مل من المستنبت المنشط وحضنت البكتريا بالظروف الآنفة الذكر لمدة ٣ ساعات حتى تصل الامتصاصية الضوئية إلى ٠.٣ على طول موجي ٥٥٠ نانومتراً.

٣- وزع مستنبت البكتريا في أنابيب اختبار معقّمة بعد انتهاء مدة الحضن ثم بردت في حمام ثلجيّ لمدة ١٠ دقائق.

٤- نبذت خلايا البكتريا مركزياً بسرعة Xg ٦٠٠٠ لمدة ١٠ دقائق عند درجة حرارة ٤ °م. أخذ راسب الخلايا وعلق في ٢٠ مل من ٠.١ مولار من محلول كلوريد الكالسيوم المعقم والمبرد لدرجة الصفر المئويّ ثم حضن في الحمام الثلجيّ لمدة ٣٠ دقيقة.

٥- نبذت خلايا البكتريا بسرعة Xg ٦٠٠٠ لمدة ١٠ دقائق عند درجة حرارة ٤°م ثم اخذ راسب الخلايا وأعيد تعليقها في ١ مل من محلول كلوريد الكالسيوم ثم وزعت الخلايا المؤهلة في أنابيب ابندروف معقّمة ومبردة بواقع ٢٠٠ مايكروليتر من عالق الخلايا لكلّ أنبوب وحفظت عند درجة حرارة ٤ °م لمدة ١٢-١٨ ساعة لحين استعمالها.

٢-٣-٥-١ عزل الدنا البلازميديّ من الخلايا المؤهلة

١- أخذت أنابيب ابندروف تحتوي الخلايا المؤهلة ووضعت في حمام ثلجي لمدة ١٥ دقيقة.

٢- أضيف للأنبوب الأول ١٠ مايكروليترات من الدنا البلازميديّ المراد تحويله الذي تركيزه ٠.٥ مايكروغرام/مايكرولتر وأضيف للأنبوب الثاني ١٠مايكروليتر من دنا البلازميد pBR ٣٢٢ بالتركيز نفسه لاستخدامه سيطرةً موجبةً وأضيف للأنبوب الثالث ١٠ مايكروليتر من دارئ TE سيطرةً سالبةً ومزج الخليط بهدوء وترك في حمام ثلجيّ لمدة ٤٥ دقيقة.

٣- عرضت البكتريا المؤهلة لدرجة حرارة ٤٢ °م لمدة ٩٠ ثانية ثم أعيدت إلى الحمام الثلجيّ لمدة ٣ دقائق ثم أضيف إلى كلّ أنبوب ٠.٨ مل من الوسط السائل SOC، وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٤٥ دقيقة.

٤- تم تخفيف النماذج الثلاثة عشرياً (10^{-1}-10^{-4}) نشرت على الاوساط الانتقائية التي تحتوي المضادات الحياتية بواقع ٠.١ مل لكلّ طبق وفيما بعد حضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة.

٥- حسب عدد المستعمرات المتحولة (Transforments) والعدد الكلي للخلايا المؤهلة لحساب تردد التحول Transforming frequency :

$$\text{تردد التحول} = \frac{\text{عدد الخلايا المتحولة/ تركيز الدنا البلازميديّ بالمايكروغرام}}{\text{العدد الكليّ للخلايا المؤهلة}}$$

وللتأكد من ثبوت البلازميدات المنتقلة في الخلايا المتحولة واستمرار توارثها تمّ إعادة عزلها وتنميتها على الأوساط الزرعية الانتقائية مع وجود سيطرة سالبة وموجبة. وفيما بعد نميت المستعمرات المتحولة على كلّ المؤشرات الأخرى المدروسة (المقاومة للمضادات الحياتية كافة) لمعرفة الانتقال المتزامن (Co-transfer) للمؤشرات المدروسة.

٢-٣-٦ الاقتران البكتيري Bacterial conjugation

أجريت عملية الاقتران البكتيريّ بطريقتين هما استخدام الوسط السائل والثانية استخدام الوسط الصلب.

أ- الاقتران البكتيريّ في الوسط السائل

١-نميت كلّ من السلالة الواهبة (Donor strain) التي تحتوي البلازميد المراد نقله، والسلالة المستلمة (Recipient strain) التي تمثل *E.coli* MM٢٩٤ rif^r الخالية من أي بلازميد كل على حده في ٥ مل من وسط لوريا السائل وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ °م بالحاضنة الهزازة وبسرعة ٦٠ دورة/دقيقة لمدة ١٨ ساعة.

٢- مزج ١.٥ مل من مستنبت الخلايا الواهبة مع ٠.٥ مل من مستنبت الخلايا المستلمة في أنبوب ابندروف معقمة وحضنت عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ١-٢ ساعة بدون تحريك.

٣- تمّ رج مزيج الخلايا الواهبة والمستلمة بعد انتهاء مدة الحضن لمدة دقيقة واحدة لفصل الخلايا عن بعضها. نميت الخلايا الناتجة من عملية الاقتران في الاوساط الانتقائية التي تحتوي مضادين أحدهما المميز للخلايا المستلمة والآخر المميز للبلازميد المراد نقله.

٤- نشر ٠.١ مل من المستنبت الاصلي للخلايا الواهبة والمستلمة على الأوساط الزرعية الانتقائية لتحديد نسبة الخلايا الطافرة تلقائياً.

٥- حضنت الأطباق جميعها عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة وفيما بعد تم حساب عدد الخلايا المقترنة والطافرة والعدد الكليّ لحساب تردد الاقتران ولضمان ثبوت البلازميدات المنتقلة واستمرار توارثها اعيد التقاط المستعمرات الناتجة وزرعها على الوسط الانتقائيّ نفسه مع وجود سيطرة موجبة وسالبة ثم حضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة لتحديد المستعمرات المكتسبة للبلازميد فعلاً (O'connell, ١٩٨٤).

ب- الاقتران البكتيريّ في الوسط الصلب

١- نميت الخلايا المستلمة في أحد جهات الطبق المحتوي على الوسط المغذي فقط وفي الجهة المقابلة نميت البكتريا الواهبة (Donor strain) وفي وسط الطبق مزجت الخلايا المستلمة والواهبة وحضنت عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة.

٢- علق مزيج الخلايا الواهبة والمستلمة في محلول التخفيف الفسلجي ثم نشر ٠.١ مل منه في الوسط الانتقائيّ الذي يحتوي المضادين احدهما المضاد المميز للسلالة المستلمة والآخر المضادالمميز للبلازميد المراد نقله لغرض تنمية الخلايا المقترنة فقط وحضنت الأطباق عند درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٢٤-٤٨

ساعة وأكملت التجربة باتباع الخطوات السابقة نفسها في الطريقة الاولى (Miller, ١٩٧٢; Pembertea and Don, ١٩٨١).

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Chapter Three

الفصل الثالث

Chapter Three

النتائج والمناقشة Results and Discussion

٣-١ العزل والتشخيص Isolation & Identification

تم عزل وتشخيص ١٦ عزلة لبكتريا *Plesiomonas shigelloides* من مجموع ٣٠٠ عينة خروج لحالات الإسهال من فئات عمرية مختلفة ولكلا الجنسين، وكانت أماكن جمع النماذج هي مستشفى بابل للولادة والاطفال وبعض المراكز الصحية في محافظة بابل وللفترة من ٢٠٠٤/٥/٤ لغاية ٢٠٠٤/٨/١. كما تم الحصول على عزلتين من مجموع ٦٠ نموذجاً تمّ عزلها من غلاصم ولحم أسماك المياه العذبة.

تمّ الاعتماد في عزل هذه البكتريا على الوسط التفريقيّ والانتقائيّ Inositol-Brilliant green-Bile salt Agar (IBBA) حيث شجع نمو بكتريا *P. shigelloides* بتزويدها بسكر الانوسيتول مصدراً كاربونياً وحيداً، وتظهر مستعمراتها حمراء إلى وردية على هذا الوسط ولكن في الاطباق التي تحتوي عدة أنواع (Mixed culture) يمكن ان تظهر صغيرة وبيضاء. ومع ذلك فان الوسط IBBA يعطي أحياناً القليل من العزلات الموجبة الخاطئة وذلك لان بعضاً من البكتريا المعوية تنمو سويةً مع *P. shigelloides* حيث يمكن ان تستغل سكر الانوسيتول مصدراً للكاربون وحينئذ قد تظهر على IBBA خضراء إلى وردية يضاف إلى ذلك أن نسبة عزل هذه البكتريا من الإسهال قليلة لذا استخدمت طريقة الزرع غير المباشرة لتلافي فقدان العزلات وذلك باستخدام ماء الببتون القاعديّ لمدة ٢٤ ساعة وفي الطريقة الثانية لمدة ٢-٦ ساعات بعدها يتمّ الزرع على وسط IBBA، وقد أظهرت الطريقة الأولى كفاءة أكثر من الثانية إذ لم نتمكن من عزلها في الطريقة الثانية. إن الأس الهيدروجينيّ القاعديّ لماء الببتون (٨.٦) ربما يكون

وسطَ إغناء لانتقاء نموّ *P. shigelloides* من عينات الخروج حيث يمكنه تثبيط نمو العديد من البكتريا المعوية التي تخمر الانوسيتول عند نموّها على الوسط الصلب IBBA وبذلك تفسح المجال لنمو البكتريا المحتملة لهذا الأس الهيدروجينيّ مثل *Plesiomonas* و .*Aeromonas* spp و .*Pseudomonas* spp وبالتالي سهولة الحصول على العزلات قيد البحث. وبعد تنقية المستعمرات المختارة استخدم عدد من الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص *P. shigelloides* والتي اظهرت ان جميع العزلات (المعزولة من الإنسان والأسماك) كانت موجبة لاختبار الاوكسيديز والكاتليز واختبار الاندول كما أنها مخمرة لسكر الانوسيتول وسكر الكلوكوز وغير مخمرة للسكروز والمانيتول، كما انها قادرة على سحب جذر الكاربوكسيل من الاحماض الأمينية اللايسين والاورنثين إضافة إلى عدم قدرة هذه البكتريا على إنتاج هيمولايسين بيتا على أغار الدم حيث تمثل هذه الاختبارات الحدّالأدنى من الاختبارات المهمة والكافية لتشخيص هذا الجنس.

كما اظهرت نتائج الفحص المجهريّ أن هذه البكتريا عصوية سالبة لصبغة غرام غير مكونة للمحفظة إضافة إلى ذلك فقد اتصفت البكتريا بكونها موجبة لفحص أحمر المثيل وغير منتجة للاسيتل مثيل كاربونيل وغير منتجة لليوريز.

جدول ٣. الاختبارات التشخيصية لبكتريا *P. shigelloides*

ت	رقم العزلة	المصدر	انتاج	سحب جذر الكاربوكسيل	V.P	MR.	تخمر السكريات

M	S	I			O	L	Urease	Ind	cat	oxi			
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	٢	١
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	٤	٢
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	٥	٣
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الغلاصم	٦	٤
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	١١	٥
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	١٣	٦
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	١٥	٧
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	٢١	٨
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	٢٥	٩
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	٢٦	١٠
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	لحم الأسماك	٣٠	١١
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	٥٠	١٢
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	٦٠	١٣
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	٧٦	١٤
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	٩٠	١٥
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	٩٨	١٦
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	١٢١	١٧
-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	الإسهال	٢٠١	١٨

اختبارأحمر المثيل: MR **الاورنثين:O**

اختبار فوكس بروسكاور: VP **اللايسين: L**

اختبار الاوكسيديز: oxi **المانيتول:M**

اختبار الاندول:Ind **السكروز:S**

الاونسيتول : I

عند مقارنة نسبة العزل المستحصلة في هذه الدراسة (٥.٣%) نجدها مقاربة لما هو مسجل في بقية بلدان العالم خاصة في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية فهي اعلى بقليل من النسبة المسجلة في دراسة لـ Obi وجماعته (١٩٩٥) حيث تمكن من عزل هذه البكتريا بنسبة ٢.٣% (١٤ عزلة من مجموع ٦٠٠ عينة) كما سجل

Al-Sallami (١٩٨٩) في مدينة عدن اليمنية نسبة عزل ٢% (٢١ عزلة من مجموع ١٠٥٦ عينة) للعائلة Vibrionaceae وذكر أن أعلى نسبة للإصابة ضمن العائلة المذكورة هي من نصيب البكتريا *P. shigelloides* .

وفي دراسة أخرى تمّ عزل ١٢ عزلة من بكتريا *P. shigelloides* من مجموع ٨٨٠ عينة خروج والتي تشكل نسبة ١.٤% من حالات الإسهال في نيجيريا (Eko & Ustalo, ١٩٩١).

كما انها عزلت بنسب ضئيلة جداً في بلدان اخرى فقد سجل Verenkar وجماعته (١٩٩٥) نسبة عزل ضئيلة ٠.٢% (٧ عزلات من مجموع ٣٤٨٤ عينة خروج)، وكذا الحال في فنلندا حيث عزلت عام ١٩٩٥ بنسبة ضئيلة جداً لا تتجاوز ٠.١٥% (Rautelin *et al.*, ١٩٩٥). اما في بنغلادش فقد سجل Rahim وجماعته (١٩٩٢) نسبة اعلى من الدراسة الحالية حيث بلغت نسبة العزل ٦.٤% (٨٣٨ عزلة من مجموع ٣١٤٢ عينة). وفي جنوب الصين تمّ عزل هذه البكتريا بنسبة (٦.٥%) من الجنود المصابين بحالات الإسهال وسجلت أعلى اصابة بعد بكتريا *E. coli* حيث شكلت *Plesiomonas* نسبة إصابة ٣٥% وهذه النسبة عالية إذا ما قورنت بنتائج العزل للدراسة الحالية ويعود السبب في هذه النسبة العالية إلى اعتماد المصابين على الأسماك والقشريات غير المطبوخة في شكل جيد (Bai *et al.*, ٢٠٠٤).

إن نسبة عزل بكتريا *P. shigelloides* واطئة مقارنةً مع بقية الأنواع البكتيرية الأخرى المسببة للاسهال وقد يعود السبب في اختلاف النسب إلى التنويع الجغرافي والفصلي ذي الأهمية الكبيرة في اختلاف نسبة العزل من الاشخاص المصابين، كما أنّ لنوع الوسط المستخدم في العزل أهميةً في زيادة نسبة عزل هذه البكتريا ويتوقع زيادة هذه النسبة في حالة توفر وسط مثاليّ لهذه البكتريا (Aldova, ١٩٩٤).

ويمكن عدّ السبب الأكثر أهمية في النسبة الواطئة لعزل *P. shigelloides* هو التشابه المصليّ لها مع بكتريا *Shigella* spp. الذي أشار إليه العديد من الباحثين فقد اشار كلّ من Aldova، (١٩٨٥) و Abbott وجماعته (١٩٩١) و Sheperd وجماعته (٢٠٠٠) إلى أن *P. shigelloides* تتقاسم نفس التركيب المستضديّ مع بكتريا *Shigella* spp. وهي تتفاعل عرضياً مع المصل المضادلل *S. soneii* (group D). وبما أن الإصابة ببكتريا *Shigella* عالية جداً خاصة لدى الأطفال إذ قدر أن ٥٠% من الإسهال الدمويّ للأطفال يعود إلى *Shigella* spp. (Huilan, ١٩٩١; Stall, ١٩٨٢). فيمكن القول إن هذه الإصابة قد حفزت على توليد مناعة لدى هؤلاء ضد الاصابة ببكتريا *P. shigelloides* والذي يدعم هذا الافتراض هو ما ذكره Holmberg (١٩٨٦) أن المرضى الذين يصابون بسلالة من *Plesiomonas* تحمل مستضدات تتفاعل عرضياً مع *Shigella* spp. لا يعانون من امراض معوية كثيرة. أما السبب الأخير فهو أن الإصابة بالإسهال بفعل بكتريا *P. shigelloides* غالباً ما يسجل في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية وتحديداً دول شرق أسيا ومنها اليابان (Von-Graeventiz & Bucher, ١٩٨٣). كما ظهر ان نسبة عزل بكتريا *P. shigelloides* بين المسافرين عبر البحار تكون عالية اذا ما قورنت بالأنواع البكتيرية الاخرى فقد بلغت نسبة الإصابة بهذه البكتريا ٥٩.٩% بين العامين ١٩٩٢ و ١٩٩٤ تبعتها بكتريا *Vibrio parahaemolyticus* بنسبة ١٥.٦% (Ueda *et al.*, ١٩٩٦ ; Medema & Schetes, ١٩٩٣).

وفي هذه الدراسة ايضاً تم عزل عزلتين وتشخيصهما من بكتريا *P. shigelloides* من أسماك المياه العذبة من اصل ٦٠ عينة تم عزلها من غلاصم الأسماك ولحمها وهي تشكل ٣.٢% من نسبة العزل، ان امكانية عزلها من أسماك المياه العذبة التي تعّدمصدراً غذائياً مهماً قد يشير إلى احتمال كونها مصدراً للعدوى وانتقال هذه البكتريا إلى الإنسان وقد تكون مسبباً لحالات الإسهال في

العراق حيث ان وجودها في الأسماك يشير إلى احتواء المياه العذبة المتمثلة بالأنهار لهذه البكتريا.

وعند مقارنة نسبة العزل المستحصلة من أسماك المياه العذبة نجدها تختلف لما هو مشار إليه في بقية بلدان العالم وقد يعود السبب إلى أن عدد العينات التي تمّ اعتمادها في هذه الدراسة كان قليلاً، كما أن أشهر العزل تختلف من مكان إلى اخر اضافة إلى صعوبة التشخيص خاصة أن الأسماك تحتوي أنواعاً بكتيرية مختلفة. ففي دراسة لـ Wang (١٩٩١) تمكن من عزل هذه البكتريا بنسبة ٢٩.٢٢% من أسماك المياه العذبة حيث كان مجموع العينات ٣٩٨ عينة.

كما أشار Levy وجماعته (١٩٩٩) إلى ان نسبة عزل هذه البكتريا من أسماك المياه العذبة هي ٩.١ % وبّين أن نسبة كبيرة من الإصابة بالإسهال في الولايات المتحدة تعود إلى اعتماد هؤلاء المصابين في غذائهم على هذا النوع من الأسماك.

أما في المناطق الباردة فقد تمّ عزلها من أسماك المياه العذبة تحت الظروف الباردة وشكلت نسبة عزل ١٨.١% من بين الأنواع البكتيرية الأخرى التي تمّ عزلها من مياه البحيرات والأنهار (Krovacek *et al.*, ٢٠٠٠).

بّين كلّ من Mendoza و Herandez (١٩٩٩) في دراسة مفصلة عن عزل *P. shigelloides* من اجزاء مختلفة في الأسماك أن نسبة عزل هذه البكتريا من أمعاء الأسماك كانت ٦٠% بينما شكلت نسبة ٣٦.٧% من الجلد كما ظهرت بنسبة ٢٦.٦٧% من الغلاصم أما نسبة عزل بكتريا *P. shigelloides* من بين الأنواع البكتيرية الأخرى كانت ٤١.٦٧%. كانت نسبة ظهور بكتريا *P. shigelloides* من بين الانواع البكتيرية المعزولة من جلد أسماك المياه العذبة وغلاصها وامعائها هي ٧% (Nedoluha & Westhoff, ١٩٩٣).

ان نتائج الدراسة الحالية كانت مقاربةً للنتائج التي حصل عليها من قبل Bardon(١٩٩٩) فقد عزل هذه البكتريا من أسماك المياه العذبة بنسبة ٢.٦٣% حيث كان عدد العينات الكليّ ٥٥ عينة وهو ما يشكل نسبة جيدة لعزل هذه البكتريا مقارنة بالانواع البكتيرية الاخرى. كما اشارت البحوث الحديثة إلى أن نسبة عزل بكتريا *P. shigelloides* تكون كبيرة إذا ما قورنت بأنواع بكتيرية أخرى معزولة من أسماك المياه العذبة حيث بالامكان عدّها مصدراً مهماً للإصابة بالإسهال خاصةً عند عدم طبخ هذه الأسماك في شكل جيد. وهذا ما اشار إليه Maluping وجماعته (٢٠٠٤) حيث بيّنوا أن هذه البكتريا هي من بين أكثر الأنواع استيطاناً في أسماك المياه العذبة وتعدّمسبباً رئيساً لحدوث الإسهال في مناطق تايلند والفلبين.

جدول ٤. الاماكن التي تمّ فيها العزل والنسب المئوية لعدد العزلات.

اماكن العزل	عدد العينات	عدد عزلات *Plesiomonas*	النسبة المئوية %
١- مستشفى بابل للولادة والاطفال	٥٠	٢	٠.٦٦
٢- مركز السادة الصحي- الطريق السياحي	٦٠	٥	١.٦٦
٣- مركز البومساعد الصحيّ – الطريق السياحيّ	٥٥	٣	١.٠
٤- مركز انتفاضة الاقصى- مركز الحلة	٥٠	١	٠.٣٣
٥- مركز محمد الدرة – ابو غرق	٤٥	٢	٠.٦٦
٦- مركز الدولاب الصحيّ – الطريق السياحيّ	٤٠	٣	١.٠

٧- عينات الأسماك/ الغلاصم	٤٥	١	١.٦
٨- عينات الأسماك/ اللحم	١٥	١	١.٦

٣-١-١ التشخيص المصلي Serologic Identification

يعدّالتشخيص المصلي واحداً من الاختبارات الناجحة في تشخيص بكتريا *P. shigelloides* وفي معرفة التقارب المستضديّ بينها وبين بكتريا *Shigella* spp.، وفي هذه الدراسة تمّ إجراء التفاعل العرضيّ أو التصالبي (cross reaction) بين بكتريا *P. shigelloides* وبين المصل المضاد antisera لبكتريا *Shigella* حيث تمّ استخدام Antisera المتوفرة والمتمثلة بالنوعين Anti-*shigella* type III و Anti-*shigella flexeneri* حيث أعطت جميع العزلات (السريرية وعزلات الأسماك) تفاعلاً موجباً مما يشير إلى التقارب المستضدي بينهما. ولم يتمّ إثبات أن العكس صحيح.

إن هذا التفاعل يعدّمن أهم التفاعلات المصلية التي يعتمد عليها في تشخيص بكتريا *P. shigelloides* وذلك لشدة التشابه المستضدي بينها وبين *Shigella* spp. (Aldova & Shimada, ٢٠٠٠). إن التشابه المستضدي الكبير بين بكتريا *P. shigelloides* وبكتريا *Shigella* spp. قد يفيد في حدوث التمنيع ضدّ الإصابة بأحد الجنسين عند الإصابة بالآخر، وهذا ما أشار إليه Sack وجماعته (١٩٩٤) أن بعض الدول المتقدمة التي قد تكون شعوبها ممنعة طبيعياً ضد الزحار Shigellosis نتيجة تناولهم مياهاً حاوية على بكتريا *P. shigelloides* حيث يمتلك الجنسان تركيباً مستضدياً متشابهاً إلى حد كبير، كما بين الباحث نفسه أن بكتريا O١٧ *P. shigelloides* تشابه بكتريا *Shigella sonnei* بالمستضدّالجسميّ Phase I-O Antigen كما أن الأنماط المصلية الثلاثة H١١ :O١١ وO٢٢:H٣ و O٩٣:H٢ العائدة لبكتريا

P. shigelloides تتفاعل عرضياً مع الأنماط المصلية العائدة لبكتريا *S. dysenteriae* ٨ و٧ و٦ على التوالي، كما أن النمط المصليّ O٢٣:H١a١c لبكتريا *Plesiomonas* يتفاعل عرضياً مع النمط المصلي لبكتريا *Shigella boydii* ١٣ .

أشار Sayeed وجماعته (١٩٩٢) إلى أن الأرانب التي يتمّ تلقيحها عن طريق الفم ببكتريا *P. shigelloides* O١٧ تمنع الإصابة ببكتريا *S. sonnei* ، إضافة إلى ذلك فقد طور كلّ من Taylor وجماعته (١٩٩٣) لقاحاً ضدّ Shigellosis باستخدام *P. shigelloides* التي تتفاعل عرضياً مع النمط المصليّ العائد لبكتريا *S. flexneri* . إن نتائج الدراسة الحالية تتوافق مع ما توصل اليه الكثير من ا لباحثين، فقد بيّن Czaja وجماعته (٢٠٠٠) أن بكتريا *P. shigelloides* التي تمتلك ١٠٢ مئةٌ نوع مصليٍّ واثنين مصلياً عائد إلى المستضدّالجسميّ تتفاعل عرضياً مع Antisera العائدة لبكتريا *S. sonnei* و *S. boydi* و *S. dysenteriae* و *S. flexneri* كما وجد الباحث نفسه ان بكتريا *Plesiomonas* تتقاسم التركيب نفسه للمستضدّالجسميّ مع تلك الموجودة في بكتريا *S. dysenteriae* و *S. flexeneri* .

ان التشابه المستضديّ بين الجنسين يشير إلى وجود تشابه جيني يشفر لهذا التشابه المستضديّ بينهما، فقد أشار Chida وجماعته (٢٠٠٠) إلى أن الجين المسؤول عن التشفير للتركيب المستضديّ O١٧ لبكتريا *Plesiomonas* يشابه الجين المسؤول عن التشفير للتركيب المستضدي O-I-Antigen لبكتريا *S. sonnei* ، كما أنه من الجدير بالذكر أن بكتريا *Plesiomonas* تمتلك مستضدات مشابهة لما هو موجود في بكتريا *Aeromonas hydrophila* (Gonzalez-Rey *et al.*, ٢٠٠٤; Shimada & Sakazaki, ١٩٩٤).

ومن خلال هذه الدراسة ظهر أن عزلات الأسماك هي الأخرى تعطي تفاعلاً موجباً مع المصل المضادلبكتريا *Shigella* مما قد يشير إلى حقيقة التشابه الجينيّ بين عزلات الأسماك والعزلات السريرية وقد تعود جميعها إلى نفس السلالة وقد

يؤكد هذا التفاعل أن المياه العذبة والأسماك هي مصدر الإصابة بالإسهال في العديد من الحالات.

أشار Bardon (١٩٩٩) إلى أن عزلات *Plesiomonas* المعزولة من أسماك المياه العذبة تمتلك التركيب المستضديّ $O^{٢٣}$ و $O^{٦٠}$ وهي تتفاعل عرضياً مع المصل المضادلبكتريا *Shigella* العائدة إلى *S. flexeneri* و *S. sonnei* وهذا يؤكد التقارب بين عزلات *Plesiomonas* السريرية وتلك المعزولة من الأسماك حيث إنها جميعاً تتفاعل عرضياً مع المصل المضادلبكتريا *Shigella* وهذا يشير إلى احتمال امتلاك بكتريا *Plesiomonas* المعزولة من الحيوانات والإنسان التركيب المستضدي نفسه.

٣-٢ التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا *P. shigelloides*

٣-٢-١ الفعالية الانزيمية Enzymic activity

يوضح الجدول ٨ نتائج الاختبارات الخاصة بإفراز الإنظيمات إذ استطاعت ثلاث عزلات فقط ١٦.٦% من إفراز إنظيم اللايبيز المحلل للدهن بوجود مادة (Tween ٨٠) ولم تتمكن أية من العزلات من إفراز إنظيم الجيلاتينيز او البروتيز في حين تمكنت خمس عزلات ٢٧.٧% من إفراز إنظيم الليسيثنيز كما اظهرت النتائج أن جميع العزلات ١٠٠% قادرة على إفراز إنظيم تحلل سكر الكالاكتوز β-galactosidase باستخدام مادة (ONPG).

أشار Krovacek وجماعته (٢٠٠٠) إلى قابلية بعض عزلات *P. shigelloides* على انتاج إنظيم اللايبيز وإنظيم الليسيثنيز في حين لم يشر إلى قابلية هذه العزلات على إنتاج إنظيمات البروتيز. كما بين Ciznar وجماعته (٢٠٠٤) أن سلالات *Plesiomonas* غير قادرة على إنتاج إنظيمات البروتيز وان نسبة قليلة منها قادرة على انتاج إنظيمات Elastase والتي تعدّ نوعاً من

إنظيمات البروتييز وأن هذه الإنظيمات تعدّمهمة بالنسبة لكثير من الانواع البكتيرية حيث تمكنها من الحصول على الأحماض الأمينية التي تحتاجها في الفعاليات المختلفة.

لاحظ Penn وجماعته (١٩٨٢) قابلية عزلات *Plesiomonas* على إنتاج إنظيم الكالاكتوسايديز مشيراً إلى أن جميع العزلات لها القابلية على استغلال هذا السكر بقدرتها العالية على إنتاج هذا الإنظيم. وهذا ما اثبت في نتائج الدراسة الحالية حيث أظهرت جميع العزلات (السريرية والمعزولة من الأسماك) القابلية على انتاج هذا الإنظيم.

كما أن هذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه كل من Kain و Kelly (١٩٨٩) أن بكتريا *P. shigelloides* لها القابلية على انتاج مجموعة من الإنظيمات تساعدها في الإ صابة والغزو حيث بيّن الباحثان قابلية هذه البكتريا على إنتاج إنظيمات β-galactosidase وDNAase و Lecithinase و Phenylalanine deaminase كما أشارا إلى أن بعض سلالاتها لها القابلية على إنتاج إنظيم اللاييبز. وقد تختلف قابلية هذه البكتريا على إنتاج الإنظيمات بسبب اختلاف ظروف الحضن من درجة حرارة وأس هيدروجينيّ وغيرها وهذا يتطابق بعض الشيء مع ما توصل إليه Sharma وجماعته (١٩٩٦) حيث بينّوا أن الأس الهيدروجينيّ الحامضيّ يزيد من قابلية *P. shigelloides* من انتاج بعض الإنظيمات مثل إنظيم الاميليز الحامضيّ.

أشار Von-Gravenitz (١٩٨٠) إلى عدم قابلية بكتريا *Plesiomonas* المعزولة من الحالات السريرية والمعزولة من الحيوانات على إنتاج إنظيمات الجيلاتينيز أو البروتييز وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية حيث ان جميع العزلات لم تتمكن من إنتاج هذه الإنظيمات ، وتعدّهذه الإنظيمات واحدة من بين اهم الإنظيمات التي تشترك في الاخماج المرضية حيث تعمل على تحليل المركبات

البروتينية ولذلك فمن الضروريّ ان تجد سبلاً اخرى للحصول على هذه المركبات وقد يكون السبب في عدم قابليتها على انتاج هذه الإنظيمات هي المادة الاساس (Substrate) المستخدمة في الوسط حيث إن عمل الإنظيمات يعتمد على التخصص (Specifity) وقد يكون لقابليتها على انتاج Elastase الذي يعـّدنوعاً من هذه الإنظيمات هو البديل في الحصول على المركبات البروتينية.

جدول ٥. قابلية بكتريا *P. shigelloides* على افراز الإنظيمات على الاوساط الزرعية الصلبة بطريقة plate assay

ت	رقم العزلة	Lipase	Galatinase	Protease	Lecithinase	ONPG
١	٢	-	-	-	-	+
٢	٤	-	-	-	-	+
٣	٥	-	-	-	-	+
٤	٦	-	-	-	-	+
٥	١١	-	-	-	-	+
٦	١٣	-	-	-	-	+
٧	١٥	+	-	-	+	+
٨	٢١	-	-	-	-	+
٩	٢٥	-	-	-	-	+
١٠	٢٦	+	-	-	+	+
١١	٣٠	-	-	-	+	+
١٢	٥٠	-	-	-	-	+
١٣	٦٠	-	-	-	+	+
١٤	٧٦	-	-	-	-	+

١٥	٩٠	+	-	-	-	+
١٦	٩٨	-	-	-	+	+
١٧	١٢١	-	-	-	-	+
١٨	٢٠١	-	-	-	-	+

ONPG: β-galactosidase

إنظيم تحلل سكر الكالاكتوز

٣-٢-٢ التحري عن افراز الهيمولايسين

Detection of Haemolysin production

تـمّ التحـري عـن قابليـة عـزلات بكتريـا *P. shigelloides* علـى افـراز الهيمولايسين البكتيريّ ولم تتمكن أية من العزلات من انتاج الهيمولايسين باستخدام طريقة الزرع الروتينيّ على وسط اغار الدم الصلب (Blood agar) الحاوي على دم الإنسان أو الحاوي دم الخراف، ولكن عند استخدام الطريقة المحورة كساء الاغار Agar overlay ظهر أن ١٦ عزلة ٨٨.٨% تنتج الهيمولايسين نوع بيتا خلال أربع الساعات المخصصة لقراءة النتيجة إذ كانت جميع العزلات عدا عزلتين لم تكن قادرة على إفرازه، وأن اربع عزلات كانت غير منتجة له في الساعة الاولى من القراءة وبعد الحضن لفترة أطول ظهر التحلل في الساعة الثانية (جدول ٦).

إن نموّ هذه البكتريا خلال ٢٤ ساعة في وسط يخلو من الحديد يزيد من فاعلية افراز الهيمولايسين ولذا كان ظهور التحلل من نوع بيتا بعد اضافة كريات الدم الحمراء وحضانتها لمدة ٤ ساعات إضافية، ان هذا يشير إلى أن هذه البكتريا كانت قد انتجت الهيمولايسين خلال ٢٤ ساعة الأولى من الحضانة عندما يكون الحديد في الوسط ضئيلاً ولذا كان ظهوره خلال الساعات الأربع التالية من الحضانة واضحاً ُكما لوحظ ان درجة الحرارة المثلى لإفراز الهيمولايسين هي ٣٠-٣٥ ºم

كما يتأثر إنتاج الهيمولايسين بهذه الطريقة بكمية النمو حيث يتناسب مع كثافة النموّ طردياً.

أشار Baratéla وجماعته (٢٠٠١) إلى أن قدرة بكتريا *Plesiomonas* على إفراز الهيمولايسين يتحدد بعدد من العوامل فوجود عنصر $Ca^{+٢}$ في الوسط الزرعيّ يزيد من فاعلية هذه البكتريا على إفراز الهيمولايسين بينما يثبط EDTA فاعلية إفرازه ، كما بّين الباحث أن نقص عنصر الحديد في الوسط يحّدمن كثافة هذه البكتريا ويزيد فاعلية انتاج الهيمولايسين للحصول على الحديد وهذا يتفق مع نتائج هذه الدراسة.

كما أن نتائج الدراسة تتفق مع ما ذكره Schubert (١٩٨٤) حيث ذكر أن إفراز الهيمولايسين في بكتريا *P. shigelloides* لا يمكن أن يتمّ باستخدام طريقة الزرع الروتينيّ باستخدام طريقة أغار الدم الصلب واشار إلى وجود طرائق بديلة للتحري عن افرازه.

إن أكثر من ٩٠% من سلالات *P. shigelloides* قادرة على افراز الهيمولايسين البكتيريّ بطريقة كساء الأغار وغير قادرة على افرازه بطريقة الزرع الروتينيّ حيث إن ظروف الزرع الروتينيّ لا تمكن هذه البكتريا من زيادة فاعلية إفرازه وإن نقص الحديد يزيد من قدرة هذه البكتريا على اظهار هذه الفاعلية (Daskelarose *et al.*, ١٩٩١; Janda, ١٩٩٣; Abbott *et al.*, ١٩٩١).

كما أوضح Baratéla وجماعته (٢٠٠١) أن جميع عزلات *P. shigelloides* المعزولة من حالات الإسهال قادرة على إفراز الهيمولايسين بطريقة كساء الأغار في أوساط زرعية مختلفة شملت وسط لوريا الصلب، وسط نقيع القلب والدماغ الصلب ووسط ترتبك سوي الصلب وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية كما تتفق مع ما أشار إليه Santos وجماعته (١٩٩٩) أشاروا إلى قدرة بكتريا *Plesiomonas* على زيادة إفراز الهيمولايسين وإنظيم Elastase في الأوساط التي يقلّ فيها الحديد، كما أن هذه القابلية على الافراز تفقد في درجة

حرارة ١٠٠°م لمدة ١٠ دقائق وأن هذه الإنظيمات واحدة من بين أهم عوامل الضراوة لهذه البكتريا.

إن عدم ظهور الهيمولايسين الذي هو عبارة عن بروتين قد يعزى لكونه لا يتحرر خارج الخلية في كميات كافية تحت ظروف الزرع الروتينيّ (Abbott *et al.*, ١٩٩١). كما أن الجنتامايسين الذي هو عبارة عن Aminoglycoside يثبط فعاليته أيضاً، وهذا الهيمولايسين يعدّمن عوامل الضراوة المهمة فهو فعال ضد رتب واسعة من كريات الدم الحمر في عدد من الفقريات وربما يقوم بواحد من الأدوار المتعددة منها مثلاً امكانية البكتريا للحصول على حديد الهيموغلوبين عن طريق تحليل كريات الدم الحمر، أو يعمل كـCytotoxin (Sansontti *et al.*, ١٩٨٦). إن ميكانيكية إفراز الهيمولايسين في بكتريا *P. shigelloides* غير واضحة فقد أشارت الدراسات إلى أن هذا النظام يحتاج إلى وجود مستقبلات خاصة على سطح غشاء الخلية تمكنها من الارتباط بالحديد وإفراز الهيمولايسين ومن هنا تظهر اهمية وجود المستقبلات HugA التي تعمل على نقل الحديد من خارج الوسط إلى داخل الخلية (Henderson *et al.*, ٢٠٠١). أشار Gardner وجماعته (١٩٩٠) إلى أن ميكانيكية إفراز الهيمولايسين في بكتريا *P. shigelloides* يتضمن عدة احتمالات فقد يكون وجود الحديد في الوسط مثبطاً لفاعلية إفراز هذا البروتين أو بالعكس تركيز الحديد الضئيل في الوسط يزيد من قابلية هذه البكتريا على الافراز والذي يعدّمن بين أهم عوامل الضراوة في هذه البكتريا في أثناء الإصابة والغزو.

ومن خلال هذه الدراسة ظهر أن عزلات الأسماك (٦، ٣٠) قادرة على افراز الهيمولايسين البكتيريّ الذي يساعدها في اختراق الأنسجة فهو مهمّ في عملية غزو الأنسجة.

وهذه النتيجة تتفق مع ما أشار إليه Gibotti وجماعته (٢٠٠٠) أن بكتريا *Plesiomonas* المعزولة من أسماك المياه العذبة والمعزولة من البيئة المائية

قـادرة علـى إفـراز الهيمولايسـين البكتيـري إضـافة إلـى قـدرتها علـى إنتـاج Cytotoxins.

٣-٢-٣ إنتاج السايدروفور Siderophores production

تمكنت عزلتان فقط (١١.٢%) من النموّ على وسط (M٩) المدعم بمادة dipyridyl ٢,٢ وبتركيز ٠.٢ ملي مولار جدول (٦) إذ تعمل هذه المادة على سحب الحديد من وسط النموّ والارتباط به (مادة خلابية للحديد). في حين لم تتمكن باقي العزلات على النمو في هذا الوسط مما يشير إلى احتواء بكتريا *P. shigelloides* نظاماً بديلاً لنظام الهيمولايسين في الحصول على الحديد وهو نظام السايدروفور الذي يقوم بسحب الحديد من المركبات المرتبطة به مثل مادة dipyridyl ٢,٢ أو البروتينات المرتبطة بالحديد مثل الترانسفرين المصلي واللاكتوفرين في الافرازات الجسمية ونقله إلى داخل خلية البكتريا لتستفيد منه في النموّ والتكاثر.

أشار Payne (١٩٨٨) إلى أن البكتريا السالبة لصبغة غرام قادرة على انتاج السايدروفورات من خلال نموها على بعض المركبات الكلابية لعنصر الحديد مثل بروتينات الترانسفرين ومركب Dipyridyl.

ومما تجدر الإشارة إليه هنا أن السلالات القادرة على إنتاج السايدروفور غير قادرة على انتاج الهيمولايسين على وسط اغار الدم ويبدو واضحاً من ذلك أن هناك علاقة بين انتاج الهيمولايسين وانتاج السايدروفور. فقد لاحظ Valvano وجماعته (١٩٨٦) أن ٩٩% من سلالات الايشريشيا القولونية غير المنتجة للايروبكتين قادرة على إنتاج الهيمولايسين الذي يوفر الحديد للبكتريا عند غزوها للدم وحصول حالات التعفن الدموي.

ان عائلة Vibrionaceae التي هي بكتريا ممرضة تمتلك نظاماً خاصاً لسحب الحديد من مركبات tranferrin و lactoferrin و hemopexin أو haptoglobin. هذا النظام الذي يسمى Vibriobactin أو Enterobactin قادر على سحب الحديد إما مباشرة من مركباته او بإنتاج جزئيات صغيرة من السايدرفورات القادرة على الانتقال خارج الخلية والارتباط مع مركبات الحديد والعودة داخل الخلية (Wyckoff *et al.*, ١٩٩٩).

لكن هذه النتيجة تختلف مع ما وصل إليه Daskaleros وجماعته (١٩٩١) حيث انه لم يتمكن من تشخيص نظام آخر بديل عن الهيمولايسين في بكتريا *P. shigelloides* وهذا ما اشار اليه ايضاً Baratéla وجماعته (٢٠٠١) أن بكتريا *P. shigelloides* تعتمد على نظام الهيمولايسين في الحصول على الحديد، بينما أوضح Milis و Payne (١٩٩٥) ان بكتريا *V. cholerae* و *P. shigelloides* و *Yersinia enterocolitica* و *Shigella* spp. تمتلك اكثر من نظام لنقل الحديد حيث أوضح أنه إضافة إلى الهيمولايسين فان هذه البكتريا تمتلك اكثر من نوع من السايدروفورات وأن هذه البكتريا تفقد هذا النظام عند تعرضها لطفرة حيث يسيطر على هذا النظام مجموعة من الجينات المحمولة على البلازميدات.

وبهذا يمكن القول إن هذه البكتريا تمتلك نظاماً متخصصاً في الحصول على الحديد وأن قابليتها على إنتاج السايدرو فور يعّدمن عوامل الضراوة غير المباشرة التي تزيد من إمراض هذه البكتريا بوجود عوامل الضراوة الأخرى.

ومن خلال النتائج ظهر أن عزلات الأسماك تعتمد على نظام الهيمولايسين في الحصول على الحديد حيث انها غير قادرة على النمو في وسط M٩ المدعم dipyridyl ٢,٢ وهذا يشير إلى اعتمادها على الهيمولايسين عاملاً مهماً في غزو الأنسجة.

جدول ٦. قابلية بكتريا *P. shigelloides* على إفراز الهيمولايسين والسايدروفورات.

التسلسل	رقم العزلة	الطريقة الاعتيادية		طريقة كساء الاغار				القابلية على انتاج السايدروفورات
		دم الانسان	دم الخراف	الساعة الاولى	الساعة الثانية	الساعة الثالثة	الساعة الرابعة	
١	٢	-	-	+	+	+	+	-
٢	٤	-	-	+	+	+	+	-
٣	٥	-	-	+	+	+	+	-
٤	٦	-	-	+	+	+	+	-
٥	١١	-	-	-	+	+	+	-
٦	١٣	-	-	+	+	+	+	-
٧	١٥	-	-	-	-	-	-	+
٨	٢١	-	-	+	+	+	+	-
٩	٢٥	-	-	-	-	-	-	+
١٠	٢٦	-	-	-	+	+	+	-
١١	٣٠	-	-	+	+	+	+	-
١٢	٥٠	-	-	-	+	+	+	-
١٣	٦٠	-	-	+	+	+	+	-
١٤	٧٦	-	-	+	+	+	+	-
١٥	٩٠	-	-	+	+	+	+	-
١٦	٩٨	-	-	+	+	+	+	-
١٧	١٢١	-	-	+	+	+	+	-
١٨	٢٠١	-	-	-	+	+	+	-

٣-٢-٤ عوامل الاستعمار أو الاستيطان

Colonization factors Antigen

تم اختبار جميع عزلات *P. shigelloides* بخصوص احتوائها عوامل الالتصاق ووجد أن جميع العزلات تمتلك مستضد عامل الاستعمار الأول CFA/I الذي يلزن كريات الدم الحمراء للإنسان صنف A بوجود سكر المانوز Mannose resistance heamagglutination. مما يشير إلى احتواء السلالات جميعها على عامل الاستعمار الأول CFA/I.

اشار Jiang وجماعته (٢٠٠٢) إلى أن البكتريا الممرضة والمسببة للاسهال Enteroaggregative pathogenic bacteria والمتضمنة *Shigella* spp. و *Salmonella* spp و *Vibrio* spp. و *E. coli* و *P. shigelloides* و *Aeromonas* spp. و *Campylobacter jejuni* وغيرها تمتلك بلازميداً كبيراً (٦٠-٦٥ ميگادالتون) يشفر لعدد من عوامل الضراوة والمتضمنة الاهداب AA (AA Fimbria) التي تصنف إلى AAF/I أو AAF/II وهي التي تساعد هذه البكتريا على الالتصاق بالطبقة المخاطية للأمعاء.

ويعّد وجود عوامل الالتصاق من النوع الأول من عوامل الضراوة المباشرة التي تساعد البكتريا على الالتصاق بالأغشية المخاطية المبطنة للمسالك التنفسية والبولية والأمعاء وتساعدها على استيطان الأنسجة في موقع الخمج (Gerlach *et al.*, ١٩٨٩; Podschun and Ullmann, ١٩٩٨). كما تمّ التحري عن امتلاك العزلات أيضاً لعامل الاستعمار الثاني CFA/II اعتماداً على طريقة تلزن كريات الدم الحمراء للدجاج، وظهر ان جميع العزلات ١٠٠% لا تمتلك هذا العامل مما يشير إلى أنها تعتمد على العوامل الأخرى في عملية الالتصاق.

أشار Gibotti وجماعته (٢٠٠٠) إلى عدم قدرة بكتريا *P. shigelloides* على تلزين كريات الدم الحمر للدجاج والخيول وخنازير غينيا مما يشير إلى عدم

امتلاك هذه البكتريا لعامل الاستيطان الثاني وهو ما يتوافق مع نتائج الدراسة الحالية.

كما تمّ التحري عن عامل الاستعمار الثالث الذي يلزن كريات الدم الحمراء للانسان صنف (A) بوجود حامض التانيك Tannic acid وظهر أن العزلات جميعها ١٠٠% تعطي نتيجة تلزن موجبة مع كريات الدم الحمراء للانسان بوجود حامض التانيك مما يدلّ على احتواء العزلات المحلية جميعها عامل الاستعمار الثالث.

ولم تشِر البحوث السابقة إلى احتواء هذه البكتريا أو عدم احتواءها هذا العامل الذي يعدّضرورياً في عملية استيطان أنسجة الأمعاء في موقع الخمج.

إضافة إلى ذلك فقد تمّ الكشف عن عوامل الاستعمار التي تنتمي إلى النوع الثالث باستخدام طريقة التلزن الملحيّ (Salt aggregative test) حيث يستخدم هنا تركيز عالٍ من ملح كبريتات الامونيوم (٤ مولار) وظهر أن العزلات كافة تعطي نتيجة تلزن موجبة مما يشير إلى امتلاك جميع العزلات المحلية هذا العامل، وهذا يعني أن اختبارات التحري لهذا العامل بالطريقتين كانت متوافقة أي إن الطريقتين أثبتتا وجود عامل الاستعمار الثالث CFA/III، ويشترك وجود هذا العامل مع عوامل الضراوة الأخرى في الاستيطان وإحداث الإمراض في جسم المضيف (Jett *et al.*, ١٩٩٤).

ومن نتائج الدراسة الحالية ظهر أن عزلات البكتريا التي تم عزلها من أسماك المياه العذبة تمتلك مستضد عامل الاستعمار الأول والثالث بنوعيه ولا تمتلك مستضدات عامل الاستعمار الثاني أي ان نتائجها متطابقة مع العزلات السريرية وهذا يشير إلى أن مصدر الإصابة للإنسان هي المياه العذبة وان سلالات هذه البكتريا في العراق التي تستوطن أمعاء الإنسان أو المعزولة من الأسماك ذات أصل مشترك.

إن بكتريا *P. shigelloides* المعزولة من المياه العذبة والمسببة لحالات الإسهال تمتلك عدداً من عوامل الضراوة حيث إنها تمتلك عوامل الاستيطان التي

تساعدها في الالتصاق بالمادة المخاطية للأمعاء، كما أن بعض سلالاتها قادرة على الالتصاق بخلايا Hela و HEP-٢ ثم تبدأ عملية الغزو (Gibotti *et al.*, ٢٠٠٠).

جدول ٧. قابلية *P. shigelloides* على إنتاج عوامل الاستيطان.

التسلسل	CFA			
	CFA I	CFA II	CFA III	Salt aggregation
١	+	-	+	+
٢	+	-	+	+
٣	+	-	+	+
٤	+	-	+	+
٥	+	-	+	+
٦	+	-	+	+
٧	+	-	+	+
٨	+	-	+	+
٩	+	-	+	+
١٠	+	-	+	+
١١	+	-	+	+
١٢	+	-	+	+
١٣	+	-	+	+
١٤	+	-	+	+
١٥	+	-	+	+
١٦	+	-	+	+
١٧	+	-	+	+
١٨	+	-	+	+

CFA: Colonization factor Antigen

٣-٣ تأثير بعض المضادات الحياتية في بكتريا ***P. shigelloides*** .

Effect of some antibiotics on *P. shigelloides*

تم اختبار قابلية عزلات *P. shigelloides* لمقاومة او حساسية المضادات الحياتية المدونة في الجدول (٨) واظهرت العزلات تبايناً في نمط مقاومتها للمضادات الحياتية المستخدمة كما اظهرت العزلات مقاومة لأكثر من مضادّحياتيّ واحد.

ويشير الجدول إلى أن جميع العزلات ١٠٠% تشترك في صفة المقاومة للامبسلين والاموكسيسلين والامبكلوكس كما أن ٥٠% من العزلات كانت مقاومة للببراسلين في حين أن ٣٨.٨٨% من العزلات كانت مقاومة للسيفوتاكسيم وأظهرت ١١.١١% فقط من العزلات مقاومة للمضاد الحياتي السفتزوكسيم.

ان هذه النتائج تتفق مع ما أشار إليه Avision وجماعته (٢٠٠٠) أن هذه البكتريا لها القابلية على إنتاج إنظيمات البيتالاكتاميز ذات المدى الواسع في تحطيم مجموعة البيتالاكتام، كما تتفق هذه النتائج مع ما أشار إليه Bush وجماعته (١٩٩٥) فقد أوضح الباحث أن الاستعمال المكثف للمضادات الحياتية من مجموعة البيتالاكتام لمدة طويلة في معالجة الاخماج المختلفة أدى إلى ظهور السلالات المنتجة لإنظيمات البيتالاكتاميز وتطورها؛ كذلك وجد أن لبعض السلالات الوبائية القابلية على إنتاج أكثر من نوع واحد من هذه الإنظيمات ويعود سبب ذلك إلى حدوث الطفرات أو وجود العناصر القافزة Transposons. وأظهرت النتائج أن لبكتريا *Plesiomonas* القابلية على مقاومة الجيل الثالث من السيفالوسبورينات مثل السيفوتاكسيم والسفتزوكسيم والببراسلين وهذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه Stock و Wiedemann (٢٠٠١) أن بكتريا *Plesiomonas* تبدي مقاومة لمضادات البيتالاكتام حديثة الاستعمال اذا ما قيست بمضادات البيتالاكتام التي تعود إلى الجيل الأول والثاني وهذا يشير إلى قابلية هذه البكتريا على إنتاج إنظيمات جديدة محورة.

ومن نتائج الدراسة وجد أن ٨٣.٣٣% من عزلات *Plesiomonas* مقاومة للمضادّالحياتيّ التتراسايكلين وهذه النتيجة لا تتفق مع ما أشار إليه Janda وجماعته (١٩٩٤) حيث ذكر أن عزلات *Plesiomonas* تكون حساسة لهذا

المضادّ، كما ذكرRahim وجماعته (١٩٩٢) أن ٨٩% من العزلات كانت حساسة لهذا المضاد، اما Kain و Kelly (١٩٨٩) فقد ذكرا أن ٤٢.١% من العزلات مقاومة للامبسلين مع التتراسايكلين في حين ان Twiddy وRielly (١٩٩٥) أشارا إلى وجود عزلات مقاومة للتتراسايكلين وبدرجة مقاومة اعلى من Sulphomethaxazole trimethoprime مما يتفق مع الدراسة الحالية.

إن أسباب المقاومة لهذا المضادّ قد تكون من جراء الاستخدام المتكرر للمضاد أو كنتيجة وجود بلازميدات مسؤولة عن المقاومة.

وبفعالية مشابهة للتتراسايكلين ظهر المضادّالحيويّ الارثرومايسين حيث كانت نسبة المقاومة ٨٣.٣٣ % وهذه النتيجة لا تتفق مع Hossain و Hossain (١٩٩٤) حيث كانت جميع العزلات حساسة لهذا المضادّإلا أن الباحثين أشارا إلى أن هذه الفعالية يمكن ان تختلف من وقت لآخر نتيجة اختلاف مصدر العزلات. لكن نتائج الدراسة تتفق مع نتائج Stock و Wiedemann (٢٠٠١) حيث إن عزلات *P. shigelloides* تظهر مقاومة عالية للمضادّالحياتيّ الارثرومايسين.

وأظهرت الدراسة الحالية أن المضادات الحياتية من مجموعة الامينوكلايكوسايد ذات فعالية جيدة في تثبيط نموّ هذه البكتريا فقد أظهرت العزلات نسبة مقاومة ٢٧.٧٧ % تجاه المضادّالحياتيّ الجنتامايسين ونسبة مقاومة ٣٣.٣٣ % تجاه المضادّالحياتيّ الستربتومايسين الذي يعود إلى نفس المجموعة.

وقد عدّت الكثير من الدراسات أن الجنتامايسين أفضل علاج للمصابين ببكتريا *P. shigelloides* حيث يظهر فعالية تثبيطية كبيرة تجاه هذه البكتريا (Rautilen *et al.*, ١٩٩٥; Hostacka & Ciznar, ٢٠٠٣).

ذكر Van-Loon وجماعته (١٩٨٩) و Clark و Janda (١٩٩١) أن المضادّالحياتيّ الستربتومايسين له فعالية تثبيطية جيدة تجاه بكتريا *P. shigelloides* وهذا يتفق مع نتائج الدراسة وقد يعود سبب ذلك إلى ندرة وجود الجينات التي تشفر لهذا المضادّعلى بلازميدات مقترنة أو قابلة للانتقال يحول دون انتشار مثل هذه المقاومة.

أشار Kain و Kelly (١٩٨٩) إلى أن بكتريا *Plesiomonas* تظهر مقاومة لمجموعة الامينوكلايكوسايد التي تشمل الاميكاسين والجنتامايسين والتبرومايسين في حين أوضح Clark وجماعته (١٩٩١) أن عدداً قليلاً من سلالات *Plesiomonas* تكون مقاومة للجنتامايسين والتبرومايسين بينما تكون حساسة للاميكاسين. وبيّن Stock و Wiedemann (٢٠٠١) ان سلالات هذه البكتريا تظهر مقاومة لعدد آخر من مجموعة الامينوكلايكوسايد مثل الستربتومايسين وليفيدومايسين (Lividomycin) كما أشارا إلى أن السلالات المعزولة من الإنسان والحيوان تكون مقاومة للابرامايسين (apramycin) الذي يعود إلى نفس المجموعة.

إن آلية مقاومة *P. shigelloides* للامينوكلايكوسايد غير معروفة بشكل دقيق الا ان معظم الباحثين يوصي به علاجاً جيداً لهذه البكتريا (Sakazaki & Balows, ١٩٨١).

لقد ظهر أن البكتريا المقاومة لمجموعة الامينوكلايكوسايد تمتلك مجموعة من الإنظيمات المحورة (aminoglycoside modifying enzymes) وأن هذه المجموعة من الإنظيمات تقلل من ارتباط هذه المضادات بالرايبوسوم وبالتالي لايتمّ تثبيط عملية تصنيع البروتين حيث إن عمل هذه المجموعة من المضادات يعتمد على تثبيط تصنيع بروتين البكتريا (Stock and Wiedemann, ٢٠٠١)

ومن نتائج الدراسة ظهر أن للكلورامفينيكول فعاليةً تثبيطية مقاربة للجنتامايسين إذ بلغت نسبة المقاومة ٢٢.٢٢% وتتفق هذه النتيجة مع أغلب الدراسات بخصوص فعالية هذا المضاد تجاه بكتريا *P. shigelloides* لقدرته العالية على تثبيط تصنيع البروتين (Visitsunthorn & Komolpis, ١٩٩٥; De-Modino *et al.*, ١٩٩٥).

كما أ ظهر المضادالحياتيّ Sulphmethaxazole trimethoprime نسبة مقاومة متوسطة نسبياً حيث بلغت ٣٨.٣٣% وهذه النتيجة لا تتفق مع ما ذكره

Clark و Janda (١٩٩١) و Janda وجماعته (١٩٩٥) الذين أشاروا إلى أن جميع عزلات هذه البكتريا تكون حساسه لهذا المضاد في صورة عامة .

إلا أن نتائج الدراسة بخصوص هذا المضادتتفق مع ما ذكره في مايخصّ ظهور عدد من عزلات *Plesiomonas* والمعزولة من مزارع تربية الأسماك مقاومة لهذا المضادوالذي تعدمؤشراً لاحتمالية ظهور سلالات مقاومة جديدة.

إن مجموعة الكونيولات (quinoles) ذات فاعلية تثبيط جيدة فقد بلغت نسبة المقاومة بين العزلات للمضادالسبروفلوكساسين نسبة ٢٢.٢٢% وهو من المضادات التي لا تستعمل في صورة دائمة في حالات الإسهال وهذا يفسر نسبة المقاومة القليلة تجاه هذا المضاد.

ومن خلال هذه الدراسة تمت ملاحظة تأثير المضادالحياتيّ الريفامبسين في عزلات الدراسة حيث بلغت نسبة المقاومة له ٣٨.٨٨% ومن المعروف أن هذا المضادنادر الاستخدام في العلاجات المختلفة ويوصف عادةً لعلاج مرض التدرن الرئويّ وبعض إصابات المجاري البولية، لذلك أظهرت عزلات الدراسة حساسية تجاه هذا المضاد وأن الدراسات الجزيئية تشير إلى أن الجينات المسؤولة عن المقاومة تجاه الريفامبسين تكون عادة محمولة على الكروموسوم ونادراً ما تكون موجودة على البلازميدات لذلك فإن احتمال انتقال صفة المقاومة لهذا المضادمن بكتريا لأخرى قليل جداً (السعيد، ١٩٩٧).

ان سبب المقاومة المتعددة للمضادات الحياتية إضافة إلى قدرتها على إنتاج الإنظيمات المحللة للمضادات الحياتية قد يعود إلى حصول الطفرات بفعل الاستخدام المتكرر لتلك المضادات أو نتيجة لاحتواء البكتريا عناصر لاكروموسومية (بلازميدات) تحمل جينات المقاومة لهذه المضادات، كما قد تكون الجينات المسؤولة عن المقاومة محمولة على عناصر وراثية قافزة أي ترانسبوزونات، كما أن بعضها قد يقوم بتثبيط تصنيع المستقبلات الخاصة لهذه المضادات في حين أن بعضها يمتلك القدرة على إفراز موادتغير من سمية المضاد الحياتي وبذلك تصبح هذه المضادات غير مؤثرة في هذه البكتريا.

جدول ٨. نسب مقاومة المضادات الحياتية لعزلات *P. shigelloides.**

المضاد الحياتي	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية للمقاومة %
Erythromycin	١٥	٨٣.٣٣
Amoxycillin	١٨	١٠٠
Gentamycin	٥	٢٧.٧٧
Tetracyclin	١٥	٨٣.٣٣
Ampiclox	١٨	١٠٠
Ampicillin	١٨	١٠٠
Streptomycin	٦	٣٣.٣٣
Cefotaxime	٧	٣٨.٨٨
Ceftizoxime	٢	١١.١١
Pipracillin	٩	٥٠
Ciprofloxacin	٤	٢٢.٢٢
Trimethoprime	٧	٣٨.٨٨
Rifampicin	٧	٣٨.٨٨
Chloramphenicol	٤	٢٢.٢٢

*** عدد العزلات الكلية هو ١٨ عزلة.**

٣-٤ التحري عن وجود الدنا البلازميديّ

Screening for plasmid content

تمّ التحري عن المحتوى البلازميديّ لـ(٧) عزلات (٥ عزلات سريرية وعزلتان من الأسماك) من بكتريا *Plesiomonas* وباستخدام تقنية Salting out (Kado & Liu, ١٩٨١). وبعد ترحيل الدنا البلازميدي على هلام الأغاروز أظهرت نتائج النسق البلازميديّ لعزلات *Plesiomonas* احتواء جميع العزلات واحداً أو أكثر من البلازميدات المختلفة الحجم، كما وجد ان جميع العزلات

تحوي بلازميداً متقارباً في الحجم مما يؤكد مدى التقارب بين هذه العزلات وكأن العزلات تعود إلى سلالة واحدة كما يعطي مؤشراً لانتشار هذه البكتريا، ومن الشكل(١-A و B) تبين احتواء جميع العزلات (٢-٤) حزم في الأقل جدول (٩).

اشارت العديد من الدراسات الجزيئية إلى احتواء هذه البكتريا عناصر وراثية لاكروموسومية كالبلازميدات بأعداد مختلفة، فقد اشار Holmberg (١٩٨٦) و Holmberg و Farmer (١٩٨٤) إلى احتواء بكتريا *Plesiomonas* المعزولة من حالات الإسهال بلازميداً كبيراً وزنه الجزيئيّ ٢٠٠ ميگادالتون. كما بينّ Herrington وجماعته (١٩٨٧) احتواء عزلات *Plesiomonas* بلازميدات صغيرة الحجم يتراوح عددها بين ١-٣، ولاحظوا أن هذه العزلات تشترك بامتلاكها بلازميداً كبيراً يبلغ وزنه الجزيئي ١٢٠ ميگادالتون الذي يعتقد أنه يزيد من قابلية البكتريا على غزو القناة المعوية.

لاحظ Fisher وجماعته(١٩٨٨) احتواء عزلات *Plesiomonas* بلازميدات صغيرة الحجم يتراوح عددها بين ١-٢، إضافة إلى احتوائها بلازميداً كبيراً يقدر وزنه الجزيئي بـ ١٨٢ ميگادالتون (حجمه الجزيئي ٢٨٠ كيلو قاعدة) مسؤولاً عن التشفير لعدد من عوامل الضراوة في هذه البكتريا.

كما بين Nolte وجماعته (١٩٨٨) أن النسق البلازميديّ لبكتريا *Plesiomonas* يختلف باختلاف مناطق العزل ومع ذلك فإن معظم سلالاتها تشترك في الأقل في وجود بلازميد كبير وزنه الجزيئيّ أكثر من ١٠٠ ميگادالتون يشفر لعدد من عوامل الضراوة كما يشفر لمقاومة المضادات الحياتية ومن ناحية أخرى، أشار Olsivik وجماعته (١٩٩٠) إلى أن النسق البلازميدي لبكتريا *Plesiomonas* تمتلك عدداً من البلازميدات الصغيرة يتراوح عددها بين ١-٦ كما أنها تشترك في وجود بلازميد كبير الحجم يبلغ ٢٠٠ ميگادالتون.

كما بـّينAlabi و Odugbemi (١٩٩٠) ان سلالات *Plesiomonas* تمتلك نسقاً بلازميدياً متشابهاً حيث أشارا إلى أن جميع السلالات المعزولة (١٦ سلالة) تمتلك واحداً أو أكثر من البلازميدات الصغيرة التي يبلغ وزنها الجزيئي بين

١٦.٨-٢.٤ ميگادالتون وأشارا إلى أن هذه البلازميدات مسؤولة عن التشفير لبعض عوامل الضراوة.

ولاحظ Abbott وجماعته (١٩٩١) في دراسة للمحتوى البلازميدي لـ (١٠) عزلات من أصل (١٦) عزلة والمعزولة من حالات الإسهال امتلاك العزلات بلازميدات متعددة تتراوح اوزانها الجزيئية بين (٢ -٨) ميگادالتون في حين تشترك (٦) عزلات في وجود بلازميد كبير الحجم يقدر وزنه الجزيئي بـ ١٢٠ ميگادالتون.

ذكر Sayeed وجماعته (١٩٩٢) أن سلالة ٠١ SVC *P. shigelloides* المعزولة من حالة إسهال في السويد والتي تعطي تفاعلاً عرضياً موجباً مع *S. sonni* تظهر نسقاً بلازميدياً يختلف عن السلالات المعزولة في بنغلادش كما تعطي نسقاً بلازميدياً يختلف عن *S. sonni* ولكنها في الأقل تشترك في وجود بلازميد واحد بين سلالاتها في حين أن Albert وجماعته (١٩٩٣) لم يتمكنوا من عزل بلازميد ذي وزن جزيئيّ عالٍ من ثلاث سلالات من *P. shigelloides* وذكر أنه لا يوجد تماثل بين بلازميد *Plesiomonas* وبلازميد الغزو المستخلص من بكتريا .*Shigella* spp.

بـّينMarshal وجماعته (١٩٩٦) أن بكتريا *P. shigelloides* تمتلك بلازميدات مسؤولة عن مقاومتها للمضادّالحياتيّ الستربتومايسين وأن سلالات هذه البكتريا المعزولة من أسماك الكارب الازرق تشترك في وجود ثلاثة بلازميدات صغيرة في الأقل تبلغ حجومها الجزيئية ٢.٥ و ٣.٨ و ٥.٣ كيلو قاعدة وأشاروا إلى أن هذه البلازميدات مسؤولة عن قدرة هذه البكتريا على غزو الانسجة. اما Bravo وجماعته (١٩٩٨) فقد لاحظوا أن سلالات *Plesiomonas* تمتلك عدداً من البلازميدات الصغيرة يتراوح بين ١-٢ وأكدوا أنه عند إصابة الخنازير بسلالات محيدة من البلازميدات فإن هذه الخنازير لا تمرض وأن هذه البلازميدات مسؤولة عن عملية الغزو.

كما أشار الباحث نفسه إلى أن النسق البلازميّدلهذه البكتريا يختلف باختلاف مناطق العزل لكنها في الأقل تشترك بوجود ١-٣ بلازميدات متشابهة بالوزن الجزيئيّ.

كما بـّن كلٌ من Gibotti وجماعته (٢٠٠٠) و Baratéla وجماعته (٢٠٠١) أن سلالات *Plesiomonas* تشترك بوجود بلازميد كبير الحجم يبلغ وزنه الجزيئيّ ١٢٠ ميگادالتون إضافة إلى عدد من البلازميدات الصغيرة المسؤولة عن التشفير لمقاومة المضادات الحياتية.

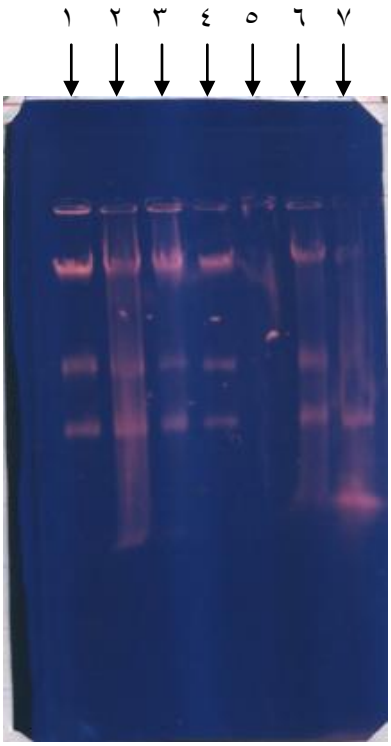
ومن خلال هذه الدراسة ظهر ان المحتوى البلازميديّ لعزلات الأسماك مشابه للمحتوى البلازميديّ للعزلات السريرية وهذا قد يشير إلى أن هذه البكتريا في العراق تعود إلى نفس السلالة وان مصدر العدوى في الإصابات السريرية ربما يكون مياه الأنهار وأسماك المياه العذبة.

ان تقنية النسق البلازميديّ تعدّ واحدة من التقنيات الجزيئية المستخدمة في علم الوبائيات الجزيئيّ التي من خلالها يتمّ معرفة مدى التقارب بين العزلات المعزولة من حيث المنشأ او مصدر العدوى وكذلك من خلال هذه التقنية يمكن معرفة مدى انتشارها في البيئات المختلفة، وقد أكدت نتائج هذه الدراسة أن هناك بلازميدات مشتركة في كافة العزلات مما يدلّ على انتشار هذه البلازميدات بين العزلات قيد الدراسة ومع ذلك فان هذه التقنية لم تعد كافية ما لم تدعم بتقنيات اخرى مثل تقنيات بصمة البلازميد والتهجين التي تثبت أن البلازميدات ذات النسق الواحد متماثلة من حيث الحجم الجزيئيّ وعدد النيكليوتيدات وكذلك نوع الجينات الموجودة فيها.

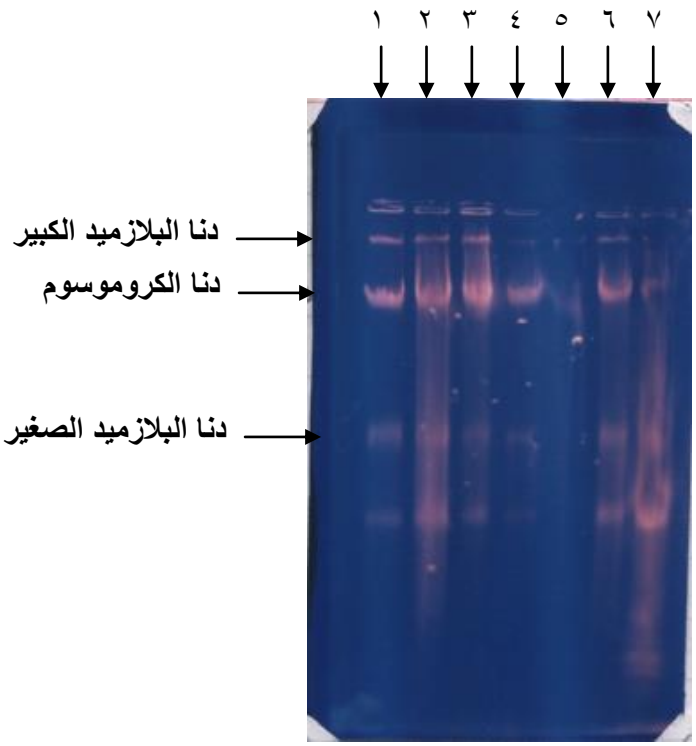
جدول ٩. النسق البلازميديّ وعدد البلازميدات في العزلات البكتيرية.

التسلسل	رقم السلالة	مصدر العزلة	عدد الحزم
١	٢	الإسهال	٣

٢	٦	الأسماك (الغلاصم)	٣
٣	٢١	الإسهال	٣
٤	٢٦	الإسهال	٣
٥	٣٠	الأسماك (اللحم)	٢
٦	٧٦	الإسهال	٣
٧	٩٠	الإسهال	٤



الشكل (١-A)



الشكل (١-B)

(بعد مرور ساعة ونصف) **(بعد مرور ثلاث ساعات)**

الترحيل الكهربائيّ لمحتوى الدنا البلازميديّ لعدد من عزلات *P. shigelloides*

المسار الاول: المحتوى البلازميديّ لعزلة *Plesiomonas* رقم ٢

المسار الثاني: = = = = = ٦

المسار الثالث:= = = = = ٢١

المسار الرابع:= = = = = ٢٦

المسار الخامس:= = = = = ٣٠

المسار السادس:= = = = = ٧٦

المسار السابع:= = = = = ٩٠

٣-٥ تحييد البلازميدات **Plasmid Curing**

تمّ إجراء تحييد البلازميدات التي تمّ الكشف عنها في بعض عزلات بكتريا *Plesiomonas* وذلك بطريق استخدام بعض المركبات الكيميائية مثل (SDS) (Sodium dodocyl Sulphate) والمركب الكيمياويّ (Para-hydroxy benzoic acid)، إذ تمّ انتخاب ٥ عزلات من بكتريا *Plesiomonas* الحاوية على بلازميدات وعوملت بالمركبات الكيمياوية المذكورة آنفاً كلٌّ على انفراد وتمّ تحديد التركيز الأمثل الذي أدى إلى تحييد البلازميدات في كل عزلة من العزلات المستخدمة في الدراسة، بعد ذلك تمّ تنمية العزلات على وسط T.S.A. ، وتمّ انتخاب ١٠٠ مستعمرة من كلّ عزلة ونقلت إلى أوساط زرعية انتقائية حاوية على المضادات الحياتية بتقنية (Picking & Patching) كما في الجدولين (١٠ و ١١).

وتشير النتائج إلى أن تركيز SDS المثبط لنمو العزلات هو ٤% وتركيز Para-hydroxy benzoic acid المثبط لنمو العزلات هو ٤% أيضاً.

ومن هذه النتائج يمكن القول إن مادة Para-hydroxy benzoic acid هي مادة كفوءة في تحييد البلازميدات مقارنة بمادة SDS المعروفة بقدرتها العالية في

التحييد، وقد لوحظ أن العزلات المعاملة بـ Para-hydroxy benzoic acid حصل لها فقدان جزئيّ للبلازميدات (شكل ٢) أما العزلات المعاملة بـ SDS فقد حصل لها فقدان كامل للبلازميدات كما في (شكل ٣) ومن نتائج الترحيل يلاحظ أن مادة SDS كان تأثيرها أكبر من حيث فقدان البلازميدات، وقد تعود قابلية Para-hydroxy benzoic acid إلى تأثيره في فعالية الإنظيمات في الفسحة الموجودة في الغشاء السايتوبلازميّ وقد يكون

تأثيره مشابهاً لبعض المركبات الكيمياوية الحامضية وذلك بقابليته على سحب الأيونات الموجبة الثنائية التكافؤ المهمة في ثباتية الغشاء الخارجيّ للبكتريا وبالتالي حدوث تغيير في نفاذية الغشاء الامر الذي يمكن أن يسرب البلازميدات إلى خارج الخلية (السعيد، ١٩٩٧). ومن نتائج التحييد باستخدام مادة Para-hydroxy benzoic acid لوحظ عدم حصول تحييد في العزلات ٢ و٢٦ و ٧٦ حيث إنها لم تنمُ على هذه المادة، أما العزلة رقم ٦ المعاملة بالمادة المذكورة آنفاً فقد ظهرت حساسيتها لكلّ من المضادات الحياتية الامبسلين والسيفوتاكسيم والتراي مثبرم والجنتامايسين، مما قد يشير إلى أن البلازميدات المحيدة تكون مسؤولة عن مقاومتها لهذه المضادات وتشير هذه النتيجة إلى احتمال أن صفة المقاومة لهذه المضادات محمولة على بلازميد واحد.

أما العزلة رقم ٢١ المعاملة بنفس المادة فان عدداً من مستعمراتها أظهرت حساسيتها تجاه المضادات الامبسلين والتراي مثبرم والجنتامايسين بينما لم تفقد صفة المقاومة للمضادالحياتيّ السيفوتاكسيم وقد تكون صفة المقاومة لهذا المضاد بنسختين محمولتين على البلازميد والكروموسوم، كما أظهرت نتائج التحييد باستعمال هذا الحامض أن له القابلية على تحييد البلازميدات الصغيرة التي قد تكون مسؤولة عن حمل صفة المقاومة لبعض المضادات الحياتية كما أن البلازميدات الكبيرة لم تتأثر بهذا المركب الكيمياويّ.

أما نتائج التحييد باستخدام SDS فتشير إلى أن جميع العزلات المستخدمة في الدراسة قد فقدت محتواها البلازميديّ في شكل كامل وفي تركيز ٤% (٠.٠٤ غرام/مل)، إذ تمّ ملاحظة ذلك من خلال الترحيل الكهربائيّ للدنا المستخلص كما في (شكل ٣) كذلك لوحظ هناك تغير في مقاومة العزلات تجاه

المضادات الحياتية (جدول ١١). إضافة لذلك فقد لوحظ أن المستعمرات العائدة للعزلات ٢ و ٦ و ٢٦ المعاملة بمادة SDS بالتركيز السابق قد فقدت صفة المقاومة للمضادات الحياتية الامبسلين والسيفوتاكسيم والتراي مثبرم والجنتامايسين، وظهر أن العزلة ٢١ قد فقدت مقاومتها للمضادات الامبسلين والتراي مثبرم والجنتامايسين ولكنها لم تفقد المقاومة للمضادالحياتيّ السيفوتاكسيم وهذه النتيجة تطابق ما حصل لنفس العزلة باستخدام مادة Para-hydroxy benzoic acid مما يؤكد احتمال وجود جينات المقاومة لهذا المضادبنسختين على البلازميد وعلى الكرموسوم.

أما بالنسبة للعزلة ٧٦ فقد لوحظ أنها لم تفقد صفة المقاومة للمضادات الامبسلين والسيفوتاكسيم والتراي مثبرم والجنتامايسين بعد معاملتها بـ SDS على الرغم من فقدانها البلازميدات التي تمتلكها وهذا يشير إلى احتمال امتلاك هذه العزلة آلية أخرى لمقاومة المضادات الحياتية ومنها التغيير في نفاذية الغشاء البلازمي تجاه المضادات او انتاج إنظيمات محورة لأحد هذه المضادات لها القابلية على تغيير عمل المضاد أو تثبيطه، أو تكون الجينات المسؤولة عن المقاومة بنسختين (على البلازميد وعلى الكرموسوم) أو أن صفة المقاومة للمضادات الحياتية تقع على جين قافز، أو تكون هذه المقاومة للمضادات الحياتية بعد تعرضها للمادة المحيدة نتيجة حدوث طفرة.

جدول ١٠. تأثير Para-hydroxy benzoic acid في تحييد البلازميدات لبكتريا *Plesiomonas*.

رقم العزلة	عدد المستعمرات النامية في الاوساط الانتقائية بعد استخدام الزرع بوجودها في Para-hydroxy benzoic acid			
	AMP	CN	CTX	Tm
٢**	لا يوجد نمو	لا يوجد نمو	لا يوجد نمو	لا يوجد نمو
٦	١٠٠*/٥٧	١٠٠/٧٨	١٠٠/٥١	١٠٠/٥٧
٢١	١٠٠/٦٤	١٠٠/٨١	١٠٠/١٠٠	١٠٠/٧٧
٢٦**	لا يوجد نمو	لا يوجد نمو	لا يوجد نمو	لا يوجد نمو
٧٦**	لا يوجد نمو	لا يوجد نمو	لا يوجد نمو	لا يوجد نمو

* تم زرع (١٠٠) مستعمرة ونقلت بتقنية (Picking & Patching) إلى الاوساط الانتقائية الحاوية على المضادات الحياتية الملائمة.

** العزلات التي لم تنمُ على المادة المحيدة.

AMP: الامبسلين (١٠٠ مايكروغرام/ مل)

CN: الجنتامايسين (١٠٠ مايكروغرام/ مل)

CTX: السيفوتاكسيم (١٠٠ مايكروغرام/ مل)

Tm: التراي مثبرم (٢٥ مايكروغرام/ مل)

جدول ١١. تأثير SDS في تحييد البلازميدات لبكتريا *Plesiomonas*.

رقم العزلة	عدد المستعمرات النامية في الأوساط الانتقائية بعد استخدام الزرع بوجود مادة SDS			
	AMP	CN	CTX	Tm
٢	١٠٠*/٣٥	١٠٠/٧٤	١٠٠/٤٤	١٠٠/٨٣
٦	١٠٠/٢٢	١٠٠/٤٣	١٠٠/٧١	١٠٠/٦٤
٢١	١٠٠/٥٨	١٠٠/٥٥	١٠٠/١٠٠	١٠٠/٦٥
٢٦	١٠٠/٨٩	١٠٠/٨٢	١٠٠/٩٠	١٠٠/٧٨
٧٦	١٠٠/١٠٠	١٠٠/١٠٠	١٠٠/١٠٠	١٠٠/١٠٠

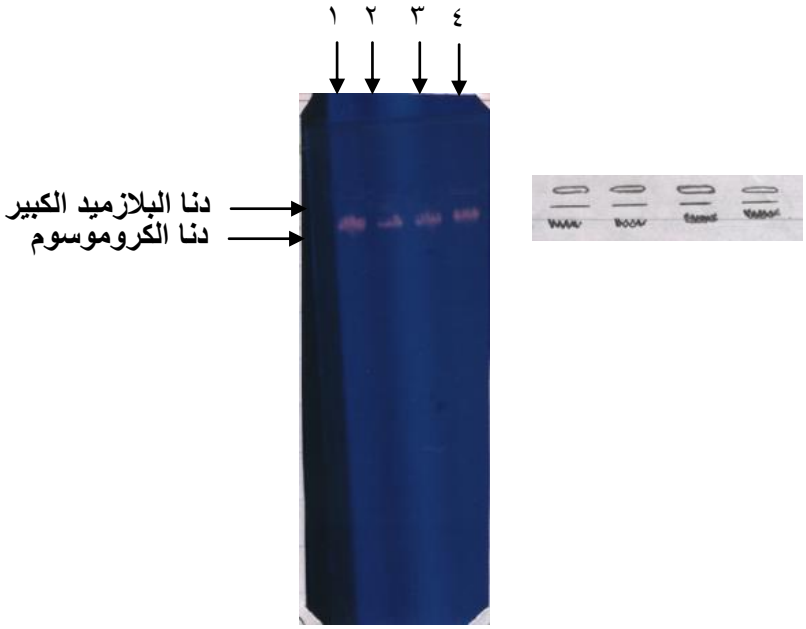
* تمّ زرع (١٠٠) مستعمرة ونقلت بتقنية (Picking & Patching) إلى الاوساط الانتقائية الحاوية على المضادات الحياتية الملائمة.

AMP: الامبسلين (١٠٠ مايكروغرام/ مل)

CN: الجنتامايسين (١٠٠ مايكروغرام/ مل)

CTX: السيفوتاكسيم (١٠٠ مايكروغرام/ مل)

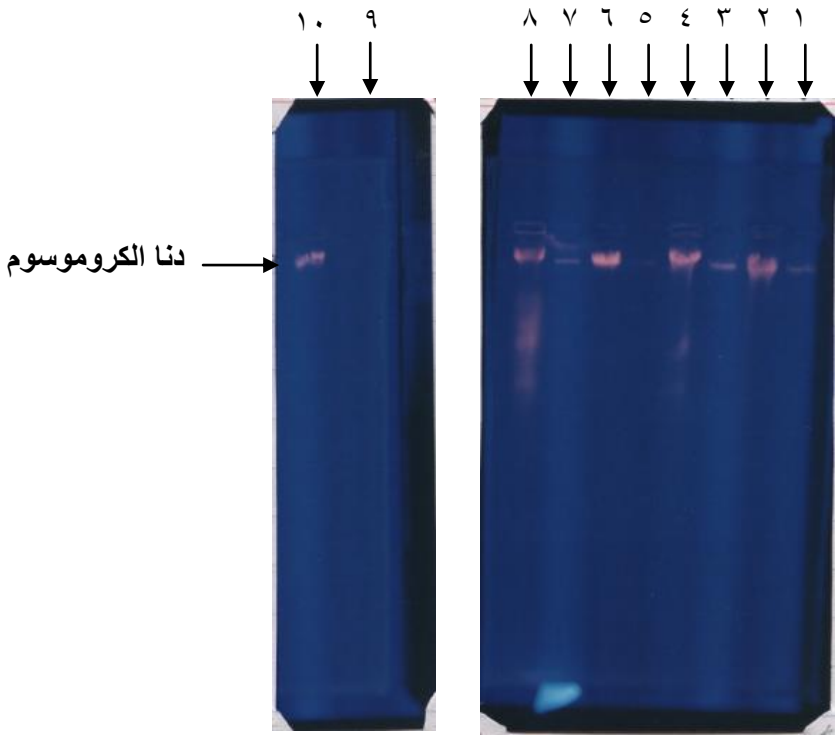
Tm: التراي مثبرم (٢٥ مايكروغرام/ مل)



الشكل (٢) المحتوى البلازميديّ لبعض عزلات *P. shigelloides* المعاملة بمادة Para-hydroxy benzoic acid (بعد مرور ثلاث ساعات)

المسار الأول والثاني: المحتوى البلازميديّ للعزلة رقم (٦) بعد عملية التحييد (يلاحظ اختفاء البلازميدات الصغيرة ووجود البلازميد الكبير)

المسار الثالث والرابع: المحتوى البلازميديّ للعزلة رقم (٢١) بعد عملية التحييد (يلاحظ اختفاء البلازميدات الصغيرة ووجود البلازميد الكبير)



الشكل (٣) المحتوى البلازميديّ لعزلات *P. shigelloides* المعاملة بمـادة SDS (بعد مرور ثلاث ساعات)

المسار الاول: المحتوى البلازميديّ للعزلة ٢ بعد عملية التحييد (يلاحظ اختفاء البلازميدات)

المسار الثاني: المحتوى البلازميديّ للعزلة ٢ قبل عملية التحييد

المسار الثالث: المحتوى البلازميديّ للعزلة ٦ بعد عملية التحييد

المسار الرابع: المحتوى البلازميديّ للعزلة ٦ قبل عملية التحييد

المسار الخامس: المحتوى البلازميديّ للعزلة ٢١ بعد عملية التحييد

المسار السادس: المحتوى البلازميديّ للعزلة ٢١ قبل عملية التحييد

المسار السابع: المحتوى البلازميديّ للعزلة ٢٦ بعد عملية التحييد

المسار الثامن: المحتوى البلازميديّ للعزلة ٢٦ قبل عملية التحييد

المسار التاسع: المحتوى البلازميديّ للعزلة ٧٦ بعد عملية التحييد

٣-٦ التحول الوراثيّ **Transformation**

تم اختيار العزلات ٢ و٦ و٢١ و ٢٦ و ٧٦ من بكتريا *P. shigelloides* سلالة واهبةً للبلازميد، إذ تمّ استخلاص الدنا البلازميديّ بتقنية Salting out (Kado & Liu, ١٩٨١). ثم اجريت تجربة التحول الوراثيّ للدنا البلازميديّ إلى الخلايا المؤهلة من بكتريا *E. coli* MM٢٩٤ الخالية من البلازميدات والمقاومة للريفامبسين مع استعمال البلازميد pBR ٣٢٢ المشفر لمقاومة الامبسلين والتتراسايكلين سيطرة موجبةً.

وقد امكن الحصول على مستعمرات متحولة Transforments على الاوساط الانتخابية المحتوية أحد المضادات الحياتية المميزة للسلالة الواهبة (الامبسلين والتتراسايكلين و التراي مثبرم والريفامبسين والسيفوتاكسيم)، وقد تراوح تردد الانتقال بين ١٧.٦×١٠$^{-٢}$ – ٣٣.١× ١٠$^{-٢}$ لكل مايكروغرام من الدنا البلازميديّ.

ويوضح الجدول (١٢) نتائج التحويل الوراثيّ وقد أظهر البلازميد المشترك الذي تمّ تحويله إلى البكتريا المؤهلة صفة المقاومة للمضادالحياتيّ الامبسلين والتراي مثبرم (ما عدا العزلة ٧٦) فقد أظهرت الخلايا المتحولة منه المقاومة للامبسلين فقط أي امكن التعبير عنه في بكتريا الايشريشيا بشكل مماثل للـ *Plesiomonas*. وهذا يشير إلى أن كافة العزلات تشترك في الأقل بوجود بلازميد يمنحها صفة المقاومة للمضادات الحياتية الامبسلين والتراي مثبرم مما يؤكد نتائج التحييد السابقة كما يشير إلى أن عزلات *Plesiomonas* تشترك في الأقل بوجود بلازميد واحد في الأقل مما يدل على انها قد تعود إلى سلالة واحدة كما لوحظ أن عزلة الأسماك قد اعطت نتائج مشابهة للعزلات السريرية مما يؤكد ان عزلات *Plesiomonas* المعزولة من الأسماك والسريرية تعود إلى سلالة واحدة وأن

مصدر الإصابة قد يكون المياه الحاوية هذه البكتريا أو الأسماك. وتتفق هذه النتائج مع ما أشار إليه Gibotti وجماعته (٢٠٠٠) و Baratéla وجماعته (٢٠٠١) بخصوص احتواء بكتريا *Plesiomonas* بلازميداً يشفر لمقاومة المضادالحياتيّ الامبسلين والتراي مثبرم الذي وجد انه مشترك في السلالات التي تمت دراستها.

إن معدل حدوث ظاهرة التحول في هذه البكتريا أعلى من معدل حدوث ظاهرة الاقتران البكتيريّ وهذه النتيجة تتفق مع ما اشار اليه Shepherd وجماعته (٢٠٠٠) حيث اشار إلى أن ظاهرة التحول في بكتريا *P. shigelloides* عالية اذا ما قيست بظاهرة الاقترا ن كما بيّن أن للتحول الوراثيّ في هذه البكتريا دوراً مهماً في نقل صفة المقاومة للمضادات الحياتية بين عزلات *Plesiomonas* والخلايا المتحولة وإلى أهميته في الطبيعة وظهور سلالات جديدة مقاومة للاجيال الجديدة من المضادات الحياتية.

ومن نتائج الدراسة الحالية كما تظهر في الشكل (٤) أن الخلايا المتحولة قد اكتسبت البلازميدات الصغيرة الحجم مما يشير إلى أن هذه البلازميدات هي المسؤولة عن صفة المقاومة للمضادات الحياتية وهذا يتفق مع ما أشار إليه Sato وجماعته (٢٠٠٥) من أن ظاهرة التحول الوراثيّ مهمة جداً في نقل صفة المقاومة للمضادات الحياتية وأشار الباحث إلى أن عملية نقل البلازميدات بعملية التحول الوراثي لا تكون مقتصرة على نقل البلازميدات الصغيرة التي يتراوح حجمها الجزيئي ٢.٣ كيلو زوج قاعدي بل يشمل التحول ايضاً انتقال البلازميدات الكبيرة التي يبلغ حجمها الجزيئي (١٠٠) كيلو قاعدة والتي تكون مسؤولة عن التشفير لعدد من عوامل ضراوة البكتريا. كما بين Ray و Nielsen (٢٠٠٥) أهمية عملية التحول الوراثيّ حيث أشار الباحثان إلى أنها الطريقة الأهم في انتقال الجينات المختلفة بين السلالات البكتيرية الذي يؤدي إلى ظهور سلالات بكتيرية جديدة تمتلك عدداً من عوامل الضراوة المختلفة ومقاومة للمضادات الحياتية الجديدة كما أشارا إلى أن البكتريا السالبة لصبغة غرام مثل *Acinetobacter* وبكتريا *Plesiomonas* يحدث فيها التحول الوراثيّ بتردد أعلى من حدوث الاقتران البكتيري.

جدول ١٢. نتائج التحول البكتيريّ والدلائل المنقولة خلال العملية.

رقم السلالة	عدد البلازميدات في العزلة الواهبة	عدد البلازميدات في العزلة المنقولة	* تردد التحول	الدلائل المنقولة
٢	٣	٢	٢٢.٥×١٠^{-٢}	Tm^+, Amp^+
٦	٣	٢	١٧.٦×١٠^{-٢}	Tm^+, Amp^+
٢١	٣	٢	٣٣.١×١٠^{-٢}	Tm^+, Amp^+
٢٦	٣	٢	٣٢.٢×١٠^{-٢}	Tm^+, Amp^+
٧٦	٣	٢	٢١.١×١٠^{-٢}	Amp^+

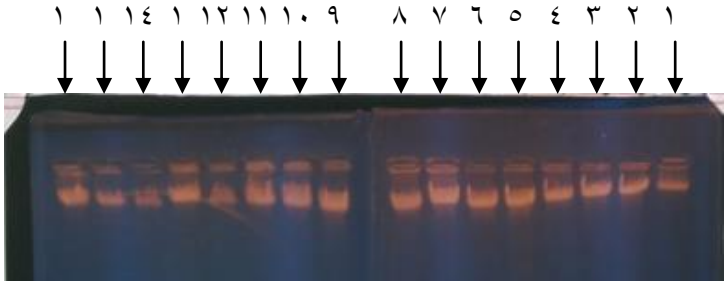
حيث إن

Amp^+ : يمثل انتقال صفة المقاومة للمضادالحياتيّ الامبسلين إلى الخلية المستلمة خلال عملية التحول.

Tm^+ : يمثل انتقال صفة المقاومة للمضادالحياتيّ التراي مثبرم إلى الخلية المستلمة خلال عملية التحول.

* تردد التحول = عدد الخلايا المتحولة/ تركيز الدنا البلازميديّ بالمايكروغرام/ العدد الكلي للخلايا المؤهلة

** تركيز الدنا البلازميديّ = الكثافة الضوئية عند ٢٦٠ نانومتر × عامل التخفيف × ٥٠ مايكروغرام



الشكل (٤) الترحيل الكهربائيّ لمحتوى دنا العزلات الواهبة *P. shigelloides* والسلالة المستلمة MM٢٩٤ في عملية التحول الوراثي

المسار الاول: محتوى الدنا للسلالة المستلمة *E. coli* MM٢٩٤

المسار الثاني: محتوى الدنا للعزلة الواهبة Plesiomonas رقم ٢

المسار الثالث: محتوى الدنا البلازميديّ للبكتريا المتحولة والمكتسبة لصفة مقاومة الامبسيلين

المسار الرابع: محتوى الدنا البلازميديّ للبكتريا المتحولة والمكتسبة لصفة مقاومة التراي مثبريم

المسار الخامس: محتوى الدنا البلازميديّ للعزلة الواهبة رقم ٦

المسار السادس: محتوى الدنا البلازميديّ للبكتريا المتحولة والمكتسبة لصفة مقاومة الامبسيلين

المسار السابع: محتوى الدنا البلازميديّ للبكتريا المتحولة والمكتسبة لصفة مقاومة التراي مثبريم

المسار الثامن: البلازميّ PBR٣٢٢(استخدام سيطرة موجبة حيث يشفر لمقاومة الامبسلين والتتراسيكلين)

المسار التاسع: محتوى الدنا البلازميديّ للعزلة الواهبة رقم ٢١

المسار العاشر: محتوى الدنا البلازميديّ للبكتريا المتحولة والمكتسبة لصفة مقاومة الامبسيلين

المسار الحادي عشر: محتوى الدنا البلازميديّ للبكتريا المتحولة والمكتسبة لصفة مقاومة التراي مثبريم

المسار الثاني عشر: محتوى الدنا البلازميديّ للعزلة الواهبة رقم ٢٦

المسار الثالث عشر: محتوى الدنا البلازميديّ للبكتريا المتحولة والمكتسبة لصفة مقاومة الامبسيلين

المسار الرابع عشر: محتوى الدنا البلازميديّ للبكتريا المتحولة والمكتسبة لصفة مقاومة التراي مثبريم

المسار الخامس عشر: محتوى الدنا البلازميديّ للعزلة الواهبة رقم ٢٦

المسار السادس عشر: محتوى الدنا البلازميديّ للبكتريا المتحولة والمكتسبة لصفة مقاومة الامبسيلين

٣-٧ الاقتران البكتيريّ **Bacterial conjugation**

لغرض توصيف البلازميد المشترك بين عزلات *Plesiomonas* اجري الاقتران البكتيريّ لخمس عزلات ٢ و٦ و٢١ و٢٦ و ٧٦، استخدمت كل عزلة منها كسلالةً واهبة للبلازميد إلى سلالة ايشريشيا القولون *E. coli* MM٢٩٤ الخالية من البلازميدات والمقاومة للريفامبسين كسلالة مستلمة وبعد اجراء الانتخاب على الأ وساط الانتقائية المحتوية المضادالحياتيّ الريفامبسين مع أحد المضادات الحياتية المميزة للسلالة الواهبة (الامبسلين او السبروفلوكساسين او التتراسايكلين او التراي مثبرم) أكدت النتائج عدم الحصول على اية مستعمرة مقترنة (Transconjucant) ويدلّ ذلك على عدم حصول الاقتران في الوسط السائل وفي الوسط الصلب، وتمّ تكرار هذه العملية ثلاث مرات في كل وسط وهذا قد يشير إلى احتمال كون البلازميد المشترك بين العزلات ٢ و٦ و٢١ و٢٦ و ٧٦ غير قادر على الانتقال بهذه الطريقة بسبب أن أحد الجينات المسؤولة عن تكوين جسر الاقتران تكون جينات غير فاعلة مما يؤدي أخيراً إلى عدم حدوث الاقتران.

وفي الدراسات الجزيئية لم يكن هناك اشارة واضحة بخصوص عملية الاقتران لهذه البكتريا مع سلالات مماثلة أو مختلفة، كما أشارت بعض الدراسات إلى حدوث عملية التحول الوراثي فقط، ومن المحتمل ان تكون هذه البلازميدات قابلة للنقل بطرائق اخرى غير الاقتران المباشر مثل التحريك أو التحول الوراثيّ فقد اشارت بعض الدراسات إلى إمكانية إجراء التحول الوراثيّ للبلازميدات الكبيرة التي يبلغ حجمها ٦٦ كيلو زوجاً قاعدياً المستخلصة من بكتريا مختلفة (Hanahn, ١٩٨٣).

كما أن نتائج هذه الدراسة اشارت سابقاً إلى نجاح عملية التحول الوراثيّ في بكتريا *Plesiomonas* العملية التي تمّ من خلالها نقل بلازميدات المقاومة للمضادات الحياتية إلى سلالة *E. coli* MM ٢٩٤ .

الاستنتاجات والتوصيات

٤- الاستنتاجات والتوصيات

٤-١ الاستنتاجات Conclusions

من خلال هذه الدراسة نستنتج الآتي:

١- أن بكتريا *P. shigelloides* واحدة من بين مسببات الإسهال البكتيرية المهمة وأن ظهورها بتردد قليل ربما يعود الى عدم وجود وسط زرعيّ ذي كفاءة عالية لعزل هذه البكتريا من الاسهال لذا يجب البحث عن وسط جديد اكثر ملائمة لعزل هذه البكتريا ولذلك يعدّ الوسط IBBA هو المفضل لعزل هذه البكتريا بعد الإغناء في APW.

٢- أن هذه البكتريا يمكن عزلها من أسماك المياه العذبة التي تعدّ مصدر الخمج للانسان وحدوث الإسهال خاصة عند استعمال المياه الملوثة، لذا يجب غلي الماء خاصة للأطفال للحدّ من انتقال هذه البكتريا.

٣- أظهرت جميع عزلات الدراسة مقاومة عالية لمضادات البيتالاكتام والسيفالوسبورينات بمختلف الأجيال وأن أعلى نسبة مقاومة كانت للمضادات الامبسلين والاموكسيسلين والامبكلوكس إذ بلغت ١٠٠% وأن أقلّ نسبة مقاومة كانت للمضادّ Ceftizoxime إذ بلغت ١١.١١%.

٤- وجد أن بكتريا *P. shigelloides* تمتلك أكثر من مستضد لعامل الاستيطان أو الاستعمار، فقد أظهرت الدراسة أن هذه البكتريا قادرة على الاستيطان في أنسجة المضيف المختلفة حيث إنها تمتلك عامل الاستعمار الاول والثالث.

٥- إن ظهور الهيمولايسين في أكثر من ٨٨% من عزلات هذه البكتريا بالطريقة المحورة (كساء الأغار) وعدم ظهوره بطريقة الزرع الروتينيّ يعد مؤشراً لوجود عوامل ضراوة اخرى كامنة في هذه البكتريا يمكن أن تظهر تحت ظروف معينة. كما أشارت الدراسة الى اعتماد هذه البكتريا على نظام بديل عن الهيمولايسين لنقل الحديد بطرائق انتاج السايدروفورات.

٦- تشترك جميع العزلات باحتوائها بلازميداً كبيراً لايحدث فيه الاقتران بينما أظهرت الدراسة كفاءة العزلات البكتيرية في عملية التحول البكتيريّ.

٧- نجاح عملية التحييد باستخدام بعض المركبات الكيمياوية، حيث وجد ان مادة para-hydroxy benzoic acid التي تستعمل مادةً حافظة في المراهم الطبية قادرة على تحييد البلازميدات جزئياً.

٤-٢ التوصيات Recommendation

١-عمل مسح وبائيّ للأخماج التي تشترك فيها بكتريا *P. shigelloides*.

٢- استعمال المضادات الحياتية الجديدة وعدم استخدامها لأوقات طويلة لاستبعاد خلق اجيال من بكتريا المقاومة لهذه المضادات خاصة أن السلالات المقاومة التي تكون مقاومتها محمولة على البلازميد تعدّ مستودعاً جينياً لأن إمكانية انتقال صفات المقاومة المحمولة على البلازميد سهلة عادة ودراسة الفعل التآزريّ للمضادات الحياتية.

٣- استخدام التقنيات المتطورة للتحري عن مصدر عدوى الإصابات الناجمة عن هذه البكتريا.

٤- وتوصي هذه الدراسة بالاستمرار في التحليل الجزيئيّ ودراسة الصفات الجينية المسؤولة عن التشفير لعوامل ضراوة هذه البكتريا.

المصادر

References

References

Abbey, S.D; Emerinwe, N.P.; Pill, M. and Amadi,E.N. (١٩٩٣). Ecological survey of *Plesiomonas shigelloides*. J. Food. Protect. ٥٦:٤٤٤-٤٤٦.

Abbott,S.L.; Kokka,R.P. and Janda,J.M. (١٩٩١). Laboratory investigations of the low pathogenic potential of *Plesiomonas shigelloides.* J. Clin-Microbial. ٢٠(٣): ١٤٨-١٥٣.

Alabi, S.A.; and Odugbemi, T. (١٩٩٠). Plasmid screening amongst *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides* isolated from subjects with diarrhea in Lagos. Afr. J. Med. Sci. ١٩(٤): ٣٠٣-٣٠٦.

Albert,M.J.; Ansaruzzaman,M.; Qadry,F.; Hossain,A.; Kibriya, A.K.; Haider,K.; Nahar, S.; Faruque, S.M. and Alam, A.N. (١٩٩٣). Characterization of *Plesiomonas shigelloides* strain that share type-specific antigen with *Shigella flexneri* ٦ and common group ١ antigen with *Shigella flexneri* and *Shigella dysenteriae* ١. J. Med. Mecrobial. ٣٩ (٣): ٢١١-٢١٧.

Aldova, E. (١٩٨٥). Experiences with serology of *Plesiomonas shigelloides* ١-O-antigenic structure. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol and Immunol. ٢٨(١): ٢٠١-٢١٠.

Aldova,E. (١٩٩٤). Serovar of *Plesiomonas shigelloides*. ZbI. Bakt. ٢٨١:٣٨-٤٤.

Aldova,E. and Schubert,R.H. (١٩٩٦).Serotyping of *Plesiomonas shigelloides*. A tool for understanding ecological relationships. Med. Microbiol. ٥:٣٣-٣٩.

Aldova,E. and Shimada,T.(٢٠٠٠). New O and H antigens of the international antigenic schem for *Plesiomonas shigelloides* Folia. Microbiol. ٤٥:٣٠١-٣٠٤.

Aldova,E.; Melter,O.; Chyle,P.; Slosarek,M. and Kodym,P.(١٩٩٩). *Plesiomonas shigelloides* in water and fish.Center. Eur. J. Publ. Hlth.٧:١٧٢-١٧٥.

Al-Sallami,S. (١٩٨٩). *Shigella* and Vibrionaceae species as a cuse of diarrhea among children in Aden. J. Egypt. Public-Health. Associ. ٦٤ (٥-٦): ٣٨١-٣٨٩.

Amine, I.I.; Hossain, M.A.; Hossain, M.; Miah, M.R.; Rahman, Z. and Rahman, K.M. (١٩٩٢). Studies on virulence determinants of *Plesiomonas shigelloides.* Bangladesh. Med. Res. Counc. Bull. ١٨(١): ١٢-٢٢.

Aqueel, A.(٢٠٠١). Water born microorganisms and their relationship to disease. Food and Microbiology services Norwest Labs, Calgary.

Arai, T.; Ikejimal,N.; Itoh,T.; Sakai,S. and Shimada,R. (١٩٨٠). A survey of *Plesiomonas shigelloides* from aquatic

environmental, domestic animals, Pets and humans. J. Hyg. Cumb. ٨٤:٢٠٣-٢١١.

Avison,B.M; Peter, M. and Walsh, T.R. (٢٠٠٠). β-lactamase expression in *Plesiomonas shigelloides.* J. Antimicrob. Chemother. ٤٥: ٨٧٧-٨٨٠.

Avison, B.M; Walsh, T.R.; and Bennett, P.M. (٢٠٠١). pUB٦٠٦٠: Abroad-Host-Range, DNA polymerase-I. Independent CoIE٢-like plasmid. Plasmid. ٤٥(٢):٨٨-١٠٠.

Bader,B.E. (١٩٥٤). In Experinces with serology of *Plesiomonas shigelloides* ١-O-antigenic structure. J.Hyg. Epidemoid. Microbiol. And Immunol. ٢٨:٢٠١-٢١٠.

Bai,Y; Dai, Y.C.; Li, J.D., Nei, J.; Chen,O.; Wang, H.; Rui, Y.Y.; Zhang,YL.; and Yu, SY. (٢٠٠٤). Acute diarrhea during army field exercise in southern China. World. J. Gastroeterol. ١٠ (١):١٢٧-١٣١.

Baratéla,K.C.; Saridakis,H.O.; Gaziri,L.C.; and Pelayo,J.S. (٢٠٠١). Effect of medium composition, calcium,iron and oxygen on haemolysin production by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. J.Appl. Microbiol. ٩٠(٣): ٤٨٢-٤٨٧.

Bardon, J. (١٩٩٩). *Plesiomonas shigelloides* ١ and its serovars in animals in the Czecl-Republic-region Moravia. Cent. Eur. J. Public. Health. ٧(١): ٤٧-٤٩.

Baron, E.J. and Fingold, S.M. (١٩٩٠). Baily and Scott's Diagnostic microbiology. ٨th ed. The C.V. Mosby. Company, Missouri, ١٧١-١٨٦, ٣٦٣-٣٧٦.

Baron, E.J. and Fingold, SM. (١٩٩٤). Diagnostic microbiology- ٩th ed. The C.V. Mosby. Company, Toronto, Canada.

Baron, E.J.; Peterson, LR. and Fingold S.M. (١٩٩٥). Baily and Scott's Diagnostic microbiology. ٩th edition. The C.V. Mosby. Company U.S.A.

Batta, G.; Lipták, A.; Schneerson,R.; and Vince. I.M. (١٩٩٧). Conformational stabilization of the altrauronic acid residue in the O-specific polysaccharide of *Shigella sonnei* / *Plesiomonas shigelloides* . Research group for antibiotics, Hungarian Academy of sciences. ٣٠٥(١): ٩٣-٩٩.

Bravo, F.L.; De-Paula, A.S.; and Maester, M.J. (١٩٩٨). The antimicrobial sensitivity and plasmid isolation in *Plesiomonas shigelloides* . Rev. Cubana. Med.Trop. ٥٠(٣):٣٠٣-٣٠٦. (Abs.).

Brenden, R.A.; Miller, M.A. and Janda, J.M. (١٩٨٨). Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides* infections in human. Rev. Infect. Dis. ١٠:٣٠٣-٣١٦.

Brinboim, H. and Dolly,J. (١٩٧٩). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA, Nucleic acid. Rec. ٧:١٥١٣-١٥٢٣.

Bush, K.; Jacobsy, G.A. and Medeiros, A.A. (١٩٩٥). A functional classification scheme for β-Lactamases and its correlation with molecular structure. Am.Soc. Microbiol. ٩(٢): ١٢١١-١٢٣٣.

Carlos, G.R. (٢٠٠٣). Studies on *Plesiomonas shigelloides* isolated from different environments. Acta. Uni. Agri. Suecial. Veterinariae. ١٥٦:١٤٠١-٦٢٥٧.

Center for disease control and preventation. (١٩٨٩). Aquarium-associated *Plesiomonas shigelloides* infection. Missouri. Microbiol. Mortal weekly. Rep.

Chang, S.F.; Chang, L.L.; Chow, T.; Wu, W.J. and Chang,J.C. (١٩٩٢). Prevalence of transposons encoding kanamycin, ampicillin and trimethoprim resistance in isolates from urinary tract infections detected using DNA probes. Kaohsiung.J.Med. Sci. ٨:١٤١-١٤٧.

Chigo, J.M.; Létoffé ,S.; and Wandersman,C. (١٩٩٧). A new type of Homophore-dependent heme a cquisition system of *Serratia* marcescens Reconstitutea in *Escherichia coli* . J. Bacteriol. ١٧٩(١١): ٣٥٧٢-٣٥٧٩.

Chida,T.; Okamura, N.; Ohtani,K.; Yoshida,Y.; Arakawa,E.; and Watanabe, H. (٢٠٠٠). The complete DNA sequence of the O antigen gene region of *Plesiomonas shigelloides* serotype O١٧ which is identical to *Shigella sonni* from I antigen. Microbiol. Immunol. ٤٤:١٦١-١٧٢.

Ciznar,I.; Hostacka,A.; Gonzalez-Rey,C.; and Krovacek,K. (٢٠٠٤). Potential virulence-associated properties of *Plesiomonas shigelloides* strains. Folia. Microbiol. ٤٩(٥): ٥٤٣-٥٤٨.

Claesson, B.E.; Holmlund,D.W.; Lindhagen,C.A.; and Matzsch, T.W. (١٩٨٤). *Plesiomonas shigelloides* in acute cholecystitis: a case report. J. Clin. Microbiol. ٢٠(٥): ٩٨٥-٩٨٧.

Clark, R.B. (١٩٩١). *In vitro* susceptibilities of *Plesiomonas shigelloides* to ٢٤ antibiotics and antibiotic-beta lactamase- Inhibitor combination. Antimicrob. Agent. Chemother. ٤٣: ١٥٩-١٦٠.

Clark, R.B. and Janda, J.M. (١٩٩١). *Plesiomonas* and human disease. Clin Microbiol. ١٣:٤٩-٥٢.

Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmian, B.P. and Simmon, S.A. (١٩٩٦). Mackie and McCartney. Practical Medical Microbiology ١٤th ed. The Churchill Livingstone. Inc. U.S.A.

Cowan, S.T. (١٩٥٦). Taxanomic rank of *Enterobacteriaceae* group. J.General. Microbiol. ١٥: ٣٤٥-٣٤٨. In: The prokaryote a handbook on habitats isolation and identification of bacteria, edited by M.P. Starr; H. Stolp; H.G. Truper; A. Balows and H.G. Schlegel. Vol. ٢ p.١٢٨٥ Springer. Verlay, Berlin.

Cowan, S.T. and Steel, K.J.(١٩٧٥). Manual for the identification of medical bacteria. ٢nd ed., Cambridge university press. Cambridge, London.

Cruickshank ,R.; Duguie, G.P.; Marmion, B.P. and Swain, R.H.A. (١٩٧٥). Medical microbiology. Vol.٢. ١٢th ed. Churchille, Livingstone, Edinburgh. London.

Czaja, J.; Jachymek,W.; Niedziela,T.; and Kenne,L. (٢٠٠٠). Structural studies of the O-specific polysaccharide from *Plesiomonas shigelloides* strain CNCTC ١١٣/٩٢. Eur.J. Biochem. ٢٦٧(٦): ١٦-٧٢.

Daskalerose, P.A.; Stoebner,J.A. and Payan,S.M. (١٩٩١). Iron uptake in *Plesiomonas shigelloides*: Cloning of the genes for the heme-iron uptake system. Infect. Immun. ٥٩(٤): ٢٧٠٦-٢٧١١.

Delforge, M.L.; Devriendt,J.; Glupczynski,Y.; Hansen,W. and Donate,N. (١٩٩٥). *Plesiomonas shigelloides*

septicemia in patient with primary homochromotosis. Clin. Infect. Dis. ٢١(٣):٦٩٢-٦٩٣.

De-Mondino, S.S.; Nunes, M.P.; and Ricciardi, I.D. (١٩٩٥). Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in water environments of Rio de Janeiro city Mem. Inst. Aswal do.Cruz. ٩٠(١): ١-٤.

Eddy, P.B. and Carpenter, K.P. (١٩٦٤). J. Appl. Bacteriol ٢٧:٩٦-١٠٩ In: the prokaryote. A handbook on habitats isolation and identification of bacteria edited by Starr, M.P.; Stolp H.; Truper, G.; and Sclegel, H.G. (١٩٨١). Vol.٢ p.١٢٨٥. Springer. Verlay. Berlin.

Eko, F.O. and Ustalo, S.J. (١٩٩١). Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* associated diarrhea in Calabar, Nigeria. East. Afr. Med. J. ٦٨(٧):٥٦٢-٥٦٦.

Ewing, W.H.; Hugh, R. and Johnson, J.G. (١٩٦١). USDpt. Hlth-Educ., Welfor, PHS, CDS, Atlanta, Ga. Jan. In: the prokaryote. A handbook on habitats isolation and identification of bacteria, edited by Starr, M.P. ; Stolp, H.; Truper, G.; and Sclegel, H.G. (١٩٨١). Vol.٢ p.١٢٨٥. Springer. Verlay. Berlin.

Faruque, S.M.; Albert, M.J.; and Mekalanos, J.J. (١٩٩٨). Epidemiology, Genetics and Ecology of Toxigenic

Vibrio cholerae. Microbiology. Mol. Bio. ٦٢(٤):١٠٩٢-٢١٧٢.

Faul, R.; Siitonen,A.; and Kärkkäinen. (١٩٩٠). *Plesiomonas shigelloides* bacterimia in a healthy girl with mild gastroenteritis. J. Clin. Microbiol. ٢٨(٦):١٤٤٥-١٤٤٦.

Fisher, K.T.; Chakraborty, H.H.; Kivchner and Wamsler, O. (١٩٨٨). Pseudo appendicitis caused by *Plesiomonas shigelloides*. J. Clin. Microbiol. ٢٦(٤): ٢٦٧٥-٢٦٧٧.

Gardner, S.E.; Flowlston,S.E.; and Georg, W.L.(١٩٨٧). *In vitro* production of toxin like activity by *Plesiomonas shigelloides*. J. Infect. Dis. ١٥٦:٧٢٠-٧٢٢.

Gardner, S.E.; Fowlston, S.E. and George, L. (١٩٩٠). Effect of Iron on production of a possible virulence factor by *Plesiomonas shigelloides*. J. Clin. Microbiol. ٢٨(٤): ٨١١-٨١٣.

Gerlach, G.; Clegg, S. and Allen, B.L. (١٩٨٩). Identification and characterization of the genes encoding the type ٣ and type ١ Fimbrial Adhesions. J. Bacterial. ١٧١ (٣): ١٢٦٢-١٢٧٠.

Gibotti,A.; Saridakis, H.O.; Pelayo, J.S.; Tagliari, K.C.; and Fulcao, D.P. (٢٠٠٠). Prevalence and virulence properties of *Vibrio cholerae* non ٠١, *Aeromonas* spp.

and *Plesiomonas shigelloides* isolated from Cambe stream (state of Parana, Brazil).

Gonzalez-Rey,C.; Svenson, S.B.; Bravo, L.; Siitonen,A.; Pasquale, V.; Dumontet, S.; Ciznar, I.; and Krovacek, K. (٢٠٠٤). Serotypes and anti-microbiol susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* isolates from humans, animals and aquatic environment in different countries. Comp. Immunal. Microbiol. Infect. Dis. ٢٧(٢): ١٢٩-١٣٩.

Gupta,S. (١٩٩٥). Migratory polyarthritis associated with *Plesiomonas shigelloides* infection. Scand. J. Rheumatol. ٢٤ (٥): ٣٢٣-٣٢٥.

Habs, H.; and Schubert, R.H. (١٩٦٢). Zbl. Bakt. Parasitol. Infect. And Hyg. Abt. ١-Orig. ١٨٦:٣١٦-٣٢٧ In: the prokaryote. A handbook on habitats isolation and identification of bacteria, edited by Starr, M.P. ; Stolp, H.; Truper,G.; and Sclegel, H.G. (١٩٨١). Vol.٢ p.١٢٨٥-Springer-Verlay- Berlin.

Hanahn, D. (١٩٨٣). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. J. Mol. Biol. ١٦٦:٥٥٧-٥٨٠.

Henderson, D.P.; Wyckoff, E.E.; Rashid, C.E.; Verlei, H.; and Oldham,L. (٢٠٠١). Characterization of the *Plesiomonas*

shigelloides genes encoding the heme iron utilization system. J. Bacteriol. ١٨٣(٩):٢٧١٥-٢٧٢٣.

Hendri, M.S.; Shewan,J.M. and Veron, M. (١٩٧١). *Aeromonas shigelloides* (Bader) Ewing *et al*: A proposal that it be transferred to the genes *Vibrio*. Int. J. System. Bacteriol. ٢١:٢٥-٢٧.

Herrington, D.A.; Tzipori,S.; Robins-Brown, R.M.; Tall,B.D. and Levin,M.M.(١٩٨٧). *In vitro* and *in vivo* pathogenecity of *Plesiomonas shigelloides.* Infect. Immun. ٥٥:٩٧٩-٩٨٥.

Holmberg, S.D. (١٩٨٦). *Plesiomonas* enteric infection in the united states. An. Intern. Med. ١٠٥:٦٩٠-٦٩٤.

Holmberg, S.D. and Farmer, J.J. (١٩٨٤). *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as a causes of intestinal infections. Rev. Infect. Dis. ٦: ٦٣٣-٦٣٩.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath,P.H.; Staley,J.T. and Williams,S.T. (١٩٩٤). Bergey's manual of determinative bacteriology. ٩th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.

Hossain, M.S. and Hossain, A. (١٩٩٤). Effect of antibiotics on serum bacteriocidal action on *Plesiomonas shigelloides.* ZbI. Hyg. Abt. ٢٥٢:٥٢٥-٥٣٤.

Hostacka,A.; and Ciznar,I.(٢٠٠٣). Some properties of *Plesiomonas shigelloides* treated with aminoglycosides. Folia. Microbiol. ٤٨(٥): ٦٥٩-٦٣.

Huilan,S. (١٩٩١). Etiology of acute diarrhea among children in developing countries multicenter study in five countries. Bull WHO ٦٤:٥٤٩-٥٥٥ In the management of bloody diarrhea in young children edited by WHO (١٩٩٤).

Islam,MS.; Alam,MJ.; and Khan,SI. (١٩٩١). Distribution of *Plesiomonas shigelloides* in various components pond ecosystems in Dhaka. Bangladesh. Microbiol. Immunol. ٣٥(١١):٩٢٧-٣٢.

Janda, J.M.; and Abbott,S.L. (١٩٩٣). Expression of hemolytic activity by *Plesiomonas shigelloides*.J. Clin. Microbiol. ١٥(١):١٢٠٦-١٢٠٨.

Janda, J.M.; Abbott,S.L. and Morris,G.J. (١٩٩٥). *Aeromonas* and *Plesiomonas* and *Edwardsiella*. J. Infect. the Gastro. tract. Chapter. ٦٠(٣): ٩٠٥-٩١٧.

Janda, J.M.; Abbott,S.L.; and Carnban, A.M. (١٩٩٤). *Aeromonas* and *Plesiomonas* chapter ٣٦:٤٤٧-٤٥٢ In manual of clinical microbiology edited by Murray, P.R.; Baron E.J.; Tenover, F.C. ٦th ed. American society for microbiology. Washington, D.C.

Jeppesn,C. (١٩٩٥). Media for *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp. For food and environment. Int. J. Food. Microbiol. ٢٦:٢٥-٤١.

Jett, B.; Huycke,M.; and Gilmore,M. (١٩٩٤). Virulence of *Enterococci*. Clin. Microbiol. REV. ٧(٤):٤٦٢-٤٧٨.

Jiang, Z.D; David,G.; James,P.N.; Robert,S. and Herbert,L.D. (٢٠٠٢). Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. J. Clin. Microbiol. ٤٠(١١): ٤١٨٥-٤١٩٠.

Johanston, J. and Richmond,M. (١٩٧٠). The increased rate of loss of pencillinase plasmid from *Staphylococcus aureus* in the presence of rifampcin. J. Gen. Microbiol. ٦٠:١٣٧-١٣٩.

Jones, R.N.; Barry, A.L.; Gavan,T.L.; Hackall, J.L.; Lane, A.L.; Mollering, R.C.; Norton, R.A.; Preston, D.A.; Reller, L.B.; and Waitz, J.A. (١٩٨٤). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. ٣rd ed. The National committee for clinical laboratory standards (NCCLS).

Kado, C. and Liu, F.C. (١٩٨١). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. ١٤٥(٣): ١٣٦٥-١٣٧٣.

Kain, K.C. and Kelly,M.T. (١٩٨٩). Clinical feathures, epidemiology, and treatment of *Plesiomonas shigelloides* diarrhea. J. Clin. Microbiol. ٢٥(٦): ٩٩٨-١٠٠١.

Ketyi, I. (١٩٨٤). Non-toxin virulence factors of bacterial pathogens. Acta. Microbiol. Hung. ٣١(٩):١-٢٥.

Khan, A.M.; Faruque, A.S.; Hossain, M.S.; Sattar, S.; Fuchs, G.J.; and Salam, M.A. (٢٠٠٤). *Plesiomonas shigelloides* associated diarrhoea in Bangladeshi children: a hospital-based surveillance study. J. Trop. Pediatr. ٥٠(٦):٣٥٤-٣٥٦.

Kirby, J.C. and Bauer, A.W., and (١٩٦٦). Antibiotic susceptibility testing by standardized single method. Am. J. Clin. Pathol. ٤٥: ٤٩٣-٤٩٦.

Knebel, U.I; Sloot, N.; Eikenberg, M.; Borsdorf, H.; Hoffer, U.; and Riemann, JF. (٢٠٠١). Gastroenteritis due to *Plesiomonas shigelloides*-rare cases in the western world. Med. Klin. ٩٦(٢):١٠٩-١١٣.

Korner, R.J.; MacGowan,A.P. and Warner,B. (١٩٩٢). The isolation of *Plesiomonas shigelloides* in polymicrobial septiceamia originating from the billary tree. Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis. ٢٧٧(٣): ٣٣٤-٣٣٩.

Krovacek, K.; Eriksson, L.M.; Gonzalez, R.C.; and Ciznar, I. (٢٠٠٠). Isolation, biochemical and serological characterization of *Plesiomonas shigelloides* from fresh water in Northern Europe. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dus. ٢٣(١): ٤٥-٥١.

Lambert, M.A.; Hickman-Breuner, F.W.; Farmer, J.J. and Moss, C.W. (١٩٨٣). Differentiation of vibrionaceae species by their cellular fatty acid composition. Int. J. Sys. Bacteriol. ٣٣(١):٧٧٧-٧٩٢.

Laura, B.; Roberto,C.; Margarita,R.; Alina,L.; Anabel,F.; and Raul, F. (١٩٩٩). Fatal *Plesiomonas shigelloides* in New born. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. ٩٤(٥):٦٦١.

Lee, J.V.; Hendrie,M.S.; and Shewan,J.M. (١٩٧٩). Identification of *Aeromonas*, *Vibrio* and related organisms In: Identification methods for microbiologists ٢nd edited by: F.A. Skinner and D.W. Lovelock. Academic press.

Levy, D.A.; Bens,MS.; Craun,G.F.; and Herwaldt, B.L. (١٩٩٩). Surveillance for water born disease outbreaks united state. Mor. Mortal. Wkly. Rep. CDC. Surveill. Sum. ٤٧(٥):١-٤٣.

Luck, S.N.; Turner, S.A. and Adler,B. (٢٠٠١). Ferric dicitrate transport system (Fec) of *Shigella flexneri* ٢ a YSH٦٠٠٠ is encoded on a novel pathogenicity island

carrying multiple antibiotic resistance genes. Infect. Immun. ٦٩(١٠):٦٠١٢-٦٠٢١.

MacFadden, J.F. (٢٠٠٠). Biochemical test for identification of medical bacteria. ٣rd ed. The Williams and Wilkins-Baltimor. USA.

Mahon and Manuselis. (٢٠٠٠). *Aeromonas*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Plesiomonas*. Text book of Diagnostic Microbiology, Chapter ١٧.

Maluping, R.P.; Lavilla-Pitogo, C.R.; Defaola, A., Janda, J.M.; and Krovacek, K. (٢٠٠٤). Occurrence, characterization, and detection of potential virulence determinants of emerging aquatic bacterial pathogens from the Philippines and Thailand. New. Microbiol. ٢٧(٤): ٣٨١-٣٨٩.

Marshall, D.L.; Kim, J.J.; and Donnelly, S.P.(١٩٩٦). Antimicrobial susceptibility and plasmid mediated Streptomycin resistance of *Plesiomonas shigelloides* isolated from blue crab. J. Appl. Bacteriol. ٨١(٢):١٩٥-٢٠٠.

Martinez-Murica,A.J.; Beulloch,S. and Collins,M.D. (١٩٩٢). Phylogenetic interrelationship of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by ١٦٥ ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with

results of DNA-DNA hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. ٤٢:٤١٢-٤٢١.

May, J.; Hougthon,R. and Perret,C. (١٩٦٤). The effect of growth at elevated temperature on some heritable properties of *Staphlococcus aureus* . J. Gen. Microbiol. ٣٧:١٥٧-١٦٩.

Medema, G. and Schetes,C. (١٩٩٣). Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in surface water; relationship wlth faecal pollution and trophic state. ZbI. Hyg. Unweltmed. ١٩٤(٤):٣٩٨-٤٠٤.

Mendoza, C.; and Herandez, P. (١٩٩٩). Incidence of *Plesiomonas shigelloides* in tilapia tetrahibrids. Arch Latinoam. Nutr. ٤٩(١):٦٧-٧١.

Miller, M.L. (١٩٨٨), *Plesiomonas shigelloides* plasmids. J. Food. Protect. ٤٩: ٢٧٤-٢٧٧.

Miller, M.L. and Koburger,J.A. (١٩٨٥). *Plesiomonas shigelloides*: an apportunistic food and water borne pathogen. J. Food. Protect. ٤٨:٤٤٩-٤٥٧.

Miller, J.H. (١٩٧٢). Episome transfers: Direct selection. In: " Experiments in molecular genetics" Cold spring Harbor Laboratory. New York. pp. ٨٢-٨٥.

Miller, M.L. and Koburger,J.A. (١٩٨٦). Evaluation of inositol brilliant green-bile salts and *Plesiomonas* agar for recovery of *Plesiomonas shigelloides* from aquatic

sample in a seasonal survey of the Suw annee river estuary. J. Food. Protect. ٤٩:٢٩٤-٢٧٧.

Mills, M. and Payne,S.M. (١٩٩٥). Genetic and regulation of heme iron transport in *Shigella dysenteriae* and detection of an analogous system in *Escherichia coli* O١٥٧: H٧. J. Bacteriol. ١٧٧(١١): ٣٠٠٤-٣٠٠٩.

Miniatis, T.; Fritsch,E. and Sambrook,J. (١٩٨٢). Molecular cloning; a laboratory manual. Cold spring Harbour Laboratory, New York.

Miyahara, M.; Matsushita, S.; Shimada, T.; and Mise, K. (١٩٩٦). Isolation and characterization of restriction endonuclease in *Plesiomonas shigelloides* and Aeromonas species. Biol. Pharm. ١٩(١١): ١٥٠٦-١٥٠٧.

Monge, R.; Arias-Echandi,M.L. and Utzinger,D. (١٩٩٨). Presence of cytotoxic *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides* in fresh vegetables. Rev. Biomed. ٩:١٧٦-١٨٠.

Mori, M.; Sakagami, Y.; Ishii, Y.; Isogai, A.; Kitada, C.; Fujino, M.; and Suzuki,A. (١٩٨٨). Structure of cCF١٠, apeptide sex pheromone which in transfer of the *Streptococcus faecalis* tetracycline resistance plasmid. J. Bacteriol. Chem. ٢٦٣: ١٤٥٧٤-١٤٥٧٨.

Murmur,J. (١٩٦١). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. J. Mol. Biol. ٣(١): ٢٠٨-٢١٨.

Mycek, M.J.; Harvey, R.A.; and Champe, P.C. (٢٠٠٠). Lippincott's and Wilkins Pharmacology. ٢nd ed. The Wolters Kluwer company, Philadelphia, ٢٨٩-٢٩١.

Nassif, X.; Fournier, J.; Arnodel, J. and Sansonett, A. (١٩٨٩). Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid encoded virulence factor. J. Infect. Immun. ٥٧(٢): ٥٤٦-٥٥٢.

Nassif, X.; and Sansonetti, P.J. (١٩٨٧). Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K١ and K٢ with the presence of a plasmid encoding a erobactin. Infect. Immun. ٥٤(٣):٦٠٣-٦٠٨.

Nedoluha, P.C. and Westhoff, D. (١٩٩٣). Microbiological flora of aquacultured hybrid striped bass. J. Food. Protect. ٥٦(١٢): ١٠٥٤-١٠٦٠.

Nizar, N.; and Ramzan, M.D. (٢٠٠١). Traveler's diarrhea. Gastro. Clinics. ٣٠(٣): ٢٢١-٢٢٣..

Nolte, W. (١٩٩٢). Oral microbiology with basic microbiology and immunology. ١٤th. ed. the C.V. Mosby company ST. Louis. Toronto, London.

Nolte, F.S.; Poole, R.M.; and Panner, B .J. (١٩٨٨). Proctitis and fatals septicemia caused by *Plesiomonas shigelloides* in bisexual man. J. Clin. Microbiol. ٢٦: ٣٨٨-٣٩١.

Obi, C.L.; Coker, A.O.; Epoke, J. and Ndip, R. (١٩٩٥). *Aeromonas* and *Plesiomonas* species as bacterial agents of diarrhea in urban and rural areas of Nigeria: antibiogram. J. Bacteriol. ٢٥(٣) : ٣٣٥-٣٣٧.

O'connell, M. (١٩٨٤). Genetic transfer in prokaryotes: transformation, transduction and conjugation. In " A. Auhler and K. Timmis (eds.), pp. ٢-١٣. Advanced molecular genetics. " Sipringer Varlage, Berlin".

Ofek, I.; Mirelmen, D. and Sharon, N. (١٩٧٧). Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. Nature. ٢٦٥:٦٢٣-٦٢٥.

Olsvik, K.W.; Kay, B.; Birkness, K.A.; Yi, A. and Sack, B. (١٩٩٠). Laboratory observations on *Plesiomonas shigelloides* strains children with diarrhea in Peru. J. Clin. Microbiol. ٢٨(٥): ٨٨٦-٨٨٠.

O'ryan, M.; Prado, V.; and Pickering, L.K. (٢٠٠٥). Amillennium update pediatric diarrheal illness in the developing world. Semin. Pediatr. Infect. Dis. ١٦(٢): ١٢٥-٣٦.

Payne, S. (١٩٨٨). Iron and virulence in the family Enterobacteriaceae. CRC. Crit. REV. Microbiol. ١٦١(٢):٨١-١٠٤.

Pembertea, Y.M. and Don, R.H. (١٩٨١). Bacterial plasmid of agricultural and environment importance. Agric. Environ. ٥(٣):٢٣-٣٢.

Penn, R.G.; Giger, D.K. ; Knoop, F.C. and Preheim, L.C. (١٩٨٢). *Plesiomonas shigelloides* overgrowth in the small intestine. J. Clin. Microbiol. ٨(١):٨٧٢-٨٩٨.

Pfeifle, D.; Janas, E.; and Wiedemann, B. (٢٠٠٠). Role of penicillin-binding proteins in the initiation of the AmpC-β-lactamase expression in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents. Chemother. ٤٤(١):١٦٩-١٧٢.

Philippon, A.; Labia, R. and Jacoby, G. (١٩٨٩). Extended-spectrum β-Lactamase. Antimicrob. Agents. Chemother. ٣٣(٨): ١١٣١-١١٣٦.

Piret, J.; Millet, J. and Demain, A. (١٩٨٣). Production of inteacellular proteas during sporulation of *Bacillus brevis*.ur. J. App. Microbiol. Biotechnol. ١٧(٢): ٢٢٧-٢٣٦.

Podschun, R. and Ullmann, U. (١٩٩٨). *Klebsiella spp.* As nosocomial pathogens epidemiology, taxonomy, typing

methods and pathogenicity factors. Clin. Microb. Rev. ١١(٤):٥٨٩-٦٠٣.

Popoff, M. (١٩٨٤). Genus III *Aeromonas kluyver* and Niel ١٩٣٦. p. ٥٤٥-٥٤٨. In Bergey's manual of systemic bacteriology edited by N.R.; Krieg and J.G. Holt. Vol. I. Wiliams and Wikins Co., Baltimore.

Rafael, M.; Marial, L.; Arias, E.; and Dagmar, U. (١٩٩٨). Presence of cytotoxic *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides* in fresh vegetable. Rev. Biomed. ٩:١٧٦-١٨٠.

Rahim, Z.; Ali, A. and Kay, B.A. (١٩٩٢). Prevalence of *Plesiomonas shigelloides* among diarrheal patient in Banladesh. Eur. J. Epidemiol. ٨:٧٥٣-٧٥٦.

Rautelin, H.; Sivonen, A.; Kuikka, A.; and Penkoneu, O.V. (١٩٩٥). Enteric *Plesiomonas shigelloides* infections in Finnish patients. Scand. J. Infect. Dis. ٢٧(٥): ٤٩٥-٤٩٨.

Ray, J.L.; and Nielsen, KM. (٢٠٠٥).Expermental methods for assaying natural transformation and inferring horizontal gene transfer. ٣٩٥(١٨): ٤٩١-٥٢٠.

Reina, j. and Serra, A. (١٩٩٤). Chronic gastreenteristis caused by *Plesiomonas shigelloides* in adult patients. Report of ٣ cases. Rev. Clin. Esp. ١٩٤(١):١٧-١٩.

Riley, P.A.; Parasakthi, N. and Abdullah, W.A. (١٩٩٦). *Plesiomonas shigelloides* bacteremia in child with leukemia. Clin. Infect. Dis. ٢٣(١)٢٠٦-٢٠٧.

Rubin, S. and Rosenbium, E. (١٩٧١). Effect of ethidium bromide on growth and on loss of pencillinase of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. ١٠٨(١٢):١٢٠٠-١٢٠٤.

Ruimy, R.; Breittmayer, V.; Elbaze, P.; Lafay, B. and Christen, R. (١٩٩٤). Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small subunit rRNA sequence. Int. J. Syst. Bacteriol. ٤٤(٣): ٤١٦-٤٢٦.

Sack, D.A.; Shamsul-Hoque, A.T.; Huq, A.; and Etheridge, M. (١٩٩٤). Is protection against Shigellosis induced by natural infection with *Plesiomonas shigelloides* ? Lancet. ٣٤٣:١٤١٣-١٤١٥.

Sakazaki, R. and Balows, A. (١٩٨١). The genus *Vibrio,Aeromonas* and *Plesiomonas* In the prokaryotes. A hand book on habitate. Isolation and Identification of bacteria. Edited by: M.P. Starr; Stlop, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel. Vol.٢.p. ١٢٨٧. Springer, Verlag, Berlin.

Sakazaki, R.; Namioka, S.; Nakaya, R. and Fukumi, H. (١٩٥٩). Jpn. Med. Sci. Biol. ١٢:٣٥٥-٣٦٣. In experiences with serology of *Plesiomonas shigelloides* .١.O-antigenic

structure edited by E.Aldova (١٩٨٥). J. Hyg. Epidemiol. Microbiol and Immunal. ٢٨(٦):٢٠١-٢١٠.

Sambrook, J. ; Friegan, E.; and Miniatis, T. (١٩٨٩). Molecular cloning a laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory. New York.

Sansontti, P.J.; Pyter, A.; Clerc, P.; Mauredic, A.T. and Monnier, J. (١٩٨٦). Multiplication of *Shigella flexneri* within Hela cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid mediated contact hemolysis. Infect. Immun. ٥١:٤٦١-٤٦٩.

Santos, J.A.; Gonzalez, C.J., Lopez, T.M.; Otero, A.; and Garcia-Lopez M.L. (١٩٩٩). Hemolytic and elastolytic activities influenced by iron in *Plesiomonas shigelloides*. J. Food. Prot. ٥٢(١٢):١٤٧٥-١٤٧٧.

Sato, Y.; Kumazawa, N.; Yoshikawa, K.; and Kurusu, Y. (٢٠٠٥). Transformation of *Escherichia coli* mediated by natural phospholipids. Biosci. Biotechnol. Biochem. ٦٩(١): ٢٣٥-٢٣٧.

Sayeed, S.; Sack, D.A.; and Qadri, F. (١٩٩٢). Protection from *Shigella sonni* infection by immunization of rabbits with *Plesiomonas shigelloides* (SVCO١). J. Med. Microbiol. ٣٧(٨):٣٨٢-٣٨٤.

Sayeed, S.; Sack, D.A.; and Qadri, F. (١٩٩٢). Occurrence of a large plasmid in strain of *Plesiomonas shigelloides* with cross-reactivity against *Shigella sonnei*. Indian. J. Med. Res. ٩٥(٢٤): ٢١-٢٢.

Schubert, R.H.W. (١٩٧٧). Uber den Nackweis von *Plesiomonas shigelloides*. Habs and Schubert, ١٩٦٢. In the prokaryote. A hand book on habitate. Isolation and Identification of bacteria. Edited by: M.P. Starr; Stlop, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel. Vol.٢.p. ١٢٨٧. Springer, Verlag, Berlin.

Schubert, R.H.W. (١٩٨٤). Genus IV. *Plesiomonas* . Habs and Scubert, ١٩٦٢, ٣٢٤. p.٥٤٨-٥٥٠. Inkrieg, N.R. and Holt, S.G. (ed.), Bergey's manual of systemic bacteriology. Vol. ١ Williams & Wilkins Co. Baltimore.

Scott, D.; Lee, M.D.; Christina, M.; and Surawicz, M.D. (٢٠٠١). Infectious causes of chronic diarrhea Gasteroenterology clincs. ٣٠(٣).

Sebald, M. and Veron, M. (١٩٦٣). Ann. Inst. Past, ١٠٥:٨٩٧-٩١٠. In: Experience with serology of *Plesiomonas shigelloides* ١-O-antigenic structure edited by E.Aldova (١٩٨٥). J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. And Immunol. ٢٨:٢٠١-٢١٠.

Sharma, A.; Ball, B.; Gill, R. and Hasija, S.K. (١٩٩٦). Production of extracelllar proteases and amylases by some acidophilic and alkalophilic bacteria Indian. J. Exp. Biol. ٣٤(٣): ٢٣٢-٢٣٤.

Shehane, S.D. and Sizemore, R.K. (٢٠٠٢). Isolation and preliminary characterization of bacteriocins produced by *Vibrio vulnificus* . J. Appl. Microbiol. ٩٢(٢): ٣٢٢-٣٣٢.

Shepherd, G.J.; Wang, L.; and Reeves, R.P. (٢٠٠٠). Comparsion of O-antigen gene clusters of *E. coli* (*Shigella*) *sonnei* and *Plesiomonas shigelloides* O١٧: *sonnei* gained its current plasmid-borne O-antigen genes from *Plesiomonas shigelloides* in recent event. American society for microbiology. ٦٨(١٠):٦٠٥٦-٦٠٦١.

Sherloune, N.S. (٢٠٠٣). Gastroentritis and dehydration. Case based pediatrics for medical students and residents. Chapter IX.٣.

Shimada, T. and Sakazaki, R. (١٩٩٤). New O and H antigens of *Plesiomonas shigelloides* and theire o antigenic relation to *Shigella boydii.* Current. Microbiol. ٢٨:٣٥١-٣٥٤.

Sinnottiv, J.T.; Turnquest, P.G. and Milam, M.W. (١٩٨٩). *Plesiomonas shigelloides* gastroenteritis. Clin. Microbiol. News. Lett. ١١(٤):١٠٣-١٠٤.

Stock, I.; and Wiedemann, B. (٢٠٠١). Natural antimicrobial susceptibilities of *Plesiomonas shigelloides* strains. J. antimicrob. Chemother. ٤٨(٦):٨٠٣-١١.

Stall, B.J. (١٩٨٢). Epidemiologic and clinical features of patients infected with *Shigella* who attended a diarrheal diseases hospital in Bangladesh. J. Infect. Dis. ١٤٦:١٧٧-١٨٣. In: The management of bloody diarrhea in young children edited by WHO. (١٩٩٤).

Sugita, H.; Nakamura, T. and Deguchi, Y. (١٩٩٣). Identification of *Plesiomonas shigelloides* isolated from fresh water fish with the microplate hybridization methods. J. Food. Protect. ٥٦(١١):٩٤٩-٩٥٣.

Symth, C.J. (١٩٨٢). Two mannose resistant hemagglutinins on enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O٦:K١٥:H١٦ OH-Isolated from traveler's and infantile diarrhaea. J. Gene. Microbiol. ١٢٨:٢٠٨١-٢٠٩٦.

Taylor, D.W.; Trofa, A.C.; Sadoff, J.; Chu, C.; and Egan, W. (١٩٩٣). Synthesis, characterization, and clinical evalution of conjugate vaccines composed of the O-specific polysaccharides of *Shigella dysenteriae* type ١,

Shigella fiexneri type ٢a and *Shigella sonnei* (*Plesiomonas shigelloides*) bound to bacterial toxoids. Infect. Immun. ٦١(١٥):٣٦٧٨-٣٦٨٧.

Terpeluk, C.; Goldmann, A.; Bartman, P. and Pahlandt, F. (١٩٩٢). *Plesiomonas shigelloides* species and meningoencephalitis in aneonate. Eur. J. Pediatr. ١٥١(٧):٤٩٩-٥٠١.

Threlfall, E. and Frost, J. (١٩٩٠). The identification, typing and epidemiological applications. J. Appl. Bacteriol. ٦٨(١): ٥-١٦.

Tanado, *et al.*, (١٩٨٤). Salt aggregation test for detection CFA-type IIII Infect. Immun. ٤٣: ٩٥٩-٩٦٥.

Twiddy, D.R. and Rielly, P.J.A. (١٩٩٥). Occurrence of antibiotic resistant human pathogens in integrated fish farms. Asean. Food. J. ١٠(١):٢٣-٣٧.

Ueda, Y.; Suzuki, N.; Mori, H.; Miyagi, K.; Nada, K.; and Takegeki, Y. (١٩٩٦). Bacteriological studies of travellar's diarrhea. Analysis of enterophathogenic bacteria at Osak airport Quarantine station from January ١٩٩٢ through September ٣rd , ١٩٩٤. Kansenshogaka-Zasshi. ٧٠(١): ٢٩-٤١.

Valvano, M.; Silver, R. and Croza, J. (١٩٨٦). Occurrence of chromosome or plasmid-mediated aerobactin iron transport systems and hemolysin production among

clonal groups of human invasive strains of *Escherichia coli* K١. Infect. Immun. ٥٢(٩):١٩٢-١٩٩.

Van-Loon, F.P.L.; Rahim, Z.; and Rahman, S.A. (١٩٨٩). Case report of *Plesiomonas shigelloides* associated persistent dysentery and *Pseudomonas colitis*. J. Clin. Microbiol. ٢٥(٣): ١٩١٣-١٩١٥.

Vernkar, M.; Naik, V.; Rodrignes, S. and Singh, T. (١٩٩٥). *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides* in diarrhea in Goa. Indian. J. pathol. Microbiol. ٣٨(٢):١٦٩-١٧١.

Visitsunthorn, N.; and Kemolpis, S. (١٩٩٥). Antimicrobiol therapy in *Plesiomonas shigelloides* associated diarrhea in Thai children. Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health. ٢٦(١):٨٦-٩٠.

Von-Graevenitz, A. (١٩٨٠). Aeromonas and Plesiomonas. ٢٢٠-٢٢٥ In :manual of clinical microbiology, ٣rd edited by E.H. Lennette; and I.P. Truaunt American society for microbiology. Washington, D.C.

Von-Graevenitz, A. and Bucher, C. (١٩٨٣). Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* and *Plesiomonas spp.* From human feces. J. Clin. Microbiol. ٢٢(٣): ١٦-٢١.

Wang, S. (١٩٩١). A study of ecology of *Plesiomonas shigelloides* . Chung. Hua. Liu. Hsing. Ping. Hsueh. Tsa.Chih. ١٢(٥):٢٩٥-٨. (Abs.).

Wilson, G. and Miles, A. (١٩٧٥). Topley and Wilson's principles of bacteriology, Virology and Immunity. ٦th ed. Edward Arnold.

Wong, H.Y.; Tsui; M.K. So, J.Y., and Tse, T.K. (٢٠٠٠). *Plesiomonas shigelloides* infection in Hong Kong: respective study of ١٦٧ Laboratory-confirmed cases. HKMJ. ٦:٣٧٥-٨٠.

Woo, P.C.; Lau, S.K.; and Yuen, K.Y. (٢٠٠٥). Biliary tract disease as a risk factor from *Plesiomonas shigelloides* bacteremia: anine-year experience in Hong-Kong hospital and review of the literature. New. Microbiol. ٢٨(١):٤٥-٥٥.

Wyckoff, E.E.; Vall, M.; Smith, S.L.; and Payne, S.M. (١٩٩٩). A multifunctional ATP-binding cassette transporter system from *Vibrio cholerae* transports vibriobactin and enterobactin. J. Bacteriology. ١٨١(٢٤): ٧٥٨٨-٧٥٩٦.

Yeh, T.J.; and Tsia, W.C. (١٩٩١). *Plesiomonas shigelloides* associated diarrhea. Chung. Hua. I. Hsueh. Chin. Taipei. ٤٧(٥):٣٦٢-٣٦٨.

Zajic-Satler, J.; Dragas, A. and Kunulj, M. (١٩٧٢). ZbI. Bakt. I. Orig. A ٢١٩: ٥١٤-٥٣١ In : experiences with serology of *Plesiomonas shigelloides* ٢-H-antigenic structure edited by E. Aldova. (١٩٨٧). J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. and Immunol. ٣١(٨): ٧٥-٨١.

المصادر العربية

الزعاك، علي (١٩٩٤). البايولوجي الجزيئي لضراوة البكتريا، الطبعة الاولى. جامعة بغداد.

السعيد، محمد صبري (١٩٩٧). النسق الوراثي لبكتريا الجهاز التنفسي الهوائية. اطروحة دكتوراه، جامعة بغداد-كلية العلوم.

قائمة المختصرات

٢,٤-diamino-٦,٧-di isopropyl pteridine	O/١٢٩
AA-Fambria	AAF
Accessary Colonization Factor gene	ACF
Adenosine triphosphate	ATP
Agar Ovelay	AO
Alkaline Pepton Water	APW
CerbroSpinal Fluid	CSF
Colonization Factor Antigen	CFA
Ethylen Diamine tetra acetic Acid	EDTA
Inositol-Brilliant-green bile Salt Agar	IBBA
Loria –Bertani medium	LB
Methyl red-Voges Proskauer media	MR-VP
MicroInhibitor Concentration	MIC
O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosidase	ONPG
Pathogenicity island	PI
P-dimethyl aminobenzaldehyde	DMAB
Phosphate Buffer Saline	PBS
Sodium Dodocyl Sulphate	SDS
Sucros-EDTA-Tris base	SET
Toxin-Coregulated Pilus	TCP
Transposon	Tn

Trichloro acetic acid	TCA
Tris base-Boric acid-Na_2 EDTA	TBE
Tris base-EDTA	TE