دراسة بكتيريولوجية - وراثية لتقييم
مدى علاقة مياه الصرف الصحي للمستشفيات
بأنتشار البكتيريا المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية

إلى

مجلس كلية العلوم في جامعة بابل

وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة (Ph. D)

في

علوم الحياة من قبل

أحلام كاظم نعيم الياسين

رجب 1425هـ

أيلول 2004 م

إِقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ ۞

خَلَقَ الإِنسَانَ مِنْ عَلَقٍ ۞

إِقْرَأْ وَرَبُّكَ الأَكْرَمُ ۞

الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ ۞

عَلَّمَ الإِنسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ ۞

العلق (الآية 1 – 5)

الإهداء

إلى روح والدي الطاهــرة ❋❋❋

إلى روح والدتي الطاهرة ❋❋❋

إلى روح أخـــي الطاهرة ❋❋❋

يرحمكم الله ويسكنكم فسيح جناته

إلــى سندي وقرة عينـــي ❋❋❋

أخواتي وأخواني.

إلــى شريكي في هذه الحياة ❋❋❋

زوجي الغالي.

إلى فلذة كبدي وزهرة عمري ❋❋❋

ولدي الحبيب ذوالفقار.

أهدي جهدي المتواضع

أحــلام

Bacteriological and Genetical Study to Evaluate the Relationship between Hospital Effluent and Distribution of Multiple Antibiotic Resistant Bacteria

A Thesis
Submitted to the College of Science
University of Babylon
In Partial Fulfillment of Requirements
For the Degree of Ph.D.
In Biology- Microbiology

By

Ahlam Kadhm Naeem Al- Yasseen

2004 1425

شكـــر و تقــديـــر

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمـد لله والصـلاة والسـلام على أفضـل خلـق الله محمـد سيـد المرسـلين وخاتـم النبييـن وعلى أهل بيتـه الطيبيـن الطاهريـن.

إمـا بعد فـإني أتقدم بخالـص شكـري وتقـديري إلى أستـاذتي الفـاضلـة الدكتورة (ســامره يونــس يوســف) لما قدمتــه لـي من توجيهـات سـديدة ونصــائح وإرشـادات قيّـمه خـلال فتـرة الدراســة والبحـث. وأتقـدم بالشكـر الجزيـل إلـى أستــاذي الفـاضل الدكتـور (عبد اللـه كاظـم هنـدي) لمسـاعدتـه لي في إنجـاز البحـث.

كما أتقـدم بفـائق الشكـر والتقـدير إلى الأستـاذ الدكتـور (إبراهيـم محمـد سعيـد شنــاوه) لمـا قدمـه لي من دعـم علمي وتربـوي خلال فتـرة الدراسـة.

شكـري وتقـديري إلى رئاسـة جامعـة بابـل وعمـادة كليـة العـلوم وقسـم علـوم الحيـاة من أسـاتذة وتدريسيين لمنحهـم إياي مقعداً دراسياً ورعايـة كريمـة أثنـاء مـدة دراستـي في القسـم.

كما أتقدم بوافـر شكـري وتقـديري إلى قسـم التقنيـات الحياتيـة في كليـة العـلوم- جامعـة بغـداد من أسـاتذة وطلبـة دراسـات عليـا. كما أقـدم شكـري وتقـديري لكـل من مـدّ يـد العـون من أسـاتذة قسـم الكيميـاء في كليـة العـلوم - جامعـة بابـل وخصـوصـاً الدكتـور (داخـل ناصـر) والدكتـور (عبـاس نـور) ، وأتقـدم بجزيـل الشكـر والامتنـان إلـى الأستـاذ الدكتـور (دايخ عبـد علي) لرعايتـه العلميـة والتربوية.

ولا يفوتنـي أن أتقدم بالشكر والعرفـان لجميـع زملائـي من طلبـة الدراسـات العليـا في قسـم علـوم الحيـاة وخصوصـاً (أمـال مرزه) و(بهـاء العميـدي) و(وسـام عبـد الزهـراء).

وأخيـراً أتقـدم بالشكـر الجزيـل لكـل من ساهـم فـي إعـداد هذه الدراســة وأسـال اللـه أن يوفـق الجميـــــع.

والحمــد لله رب العـالميـــن

أحـــــلام

توصية الأستاذ المشرف

أشهد أن إعداد هذه الأطروحة جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة علوم في علوم الحياة/ الأحياء المجهرية.

التوقيع:

أسم المشرف: د. سامرة يونس يوسف

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: قسم التقنيات الإحيائية/ كلية العلوم/ جامعة بغداد

التاريخ:

توصية رئيس القسم

إشارة إلى التوصية أعلاه التي قدمها الأستاذ المشرف أحيل هذه الأطروحة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

أسم رئيس القسم: د. كريم حميد رشيد

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل

التاريخ:

قائمـة الجداول

رقم الجدول	الموضوع	الصفحة
1-2	تراكيز المحاليل الخزينة والنهائية للمضادات الحيوية المضافة إلى الأوساط الزرعية.	57
1-3	العدد الكلي للأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام.	65
2-3	العدد الكلي للأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة غرام.	66
3-3	العدد الكلي لعزلات الأنواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة غرام المعزولة من مياه الصرف الصحي لمستشفيات محافظة بابل.	68
4-3	النسبة المئوية لمقاومة المضادات الحيوية فى الانواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام.	71
5-3	النسب المئوية لمقاومة مضادات البنسلينات وعقاقير السلفا فى الانواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام.	72
6-3	النسبة المئوية لمقاومة المضادات الامينوكلايكوسيدية والبوليببتيدات والكلورامفينيكول فى الانواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام.	75
7-3	نتائج تجارب الاقتران البكتيري لبعض عزلات الأنواع السالبة والموجبة لصبغة غرام (كسلالات واهبة) مع السلالة القياسية ***E. coli*** HB101 strep^r (كسلالة مستلمة).	88
8-3	نتائج تجارب الأقتران والتحول الوراثي.	89
9-3	نتائج تجارب التحول الوراثي باستخدام الـ DNA البلازميدي لبعض عزلات الأنواع السالبة والموجبة لصبغة غرام (كسلالات واهبة) مع السلالة القياسية ***E. coli*** HB101 strep^r (كسلالة مستلمة).	93
10-3	نتائج تجارب التحييد.	93

قائمة الأشكال

رقم الشكل	الموضوع	الصفحة
1-3	الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع السالبة لصبغة غرام.	82
2-3	الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع السالبة لصبغة غرام.	82
3-3	الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع السالبة لصبغة غرام.	85
4-3	الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع السالبة لصبغة غرام.	85
5-3	الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية الواهبة السالبة لصبغة غرام والسلالة المستلمة والسلالات المقترنة.	91
6-3	الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية الواهبة السالبة لصبغة غرام والسلالة المستلمة والسلالات المقترنة.	91
7-3	الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية الواهبة السالبة لصبغة غرام والسلالة المستلمة والسلالات المتحولة.	95
8-3	الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية الواهبة السالبة لصبغة غرام والسلالة المستلمة والسلالات المتحولة.	95
9-3	الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام والسلالات المحيدة.	98
10-3	الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام والسلالات المحيدة.	99
11-3	الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام والسلالات المحيدة.	100

قائمة المحتويات

رقم الفقرة	الموضوع	الصفحة

	الخلاصـة العـربيـة	I
	المحتويات	III
	قائمـة الجـداول	VI
	قائمـة الأشكـال	VII
	قائمـة المختصـرات	VIII
الفصـل الأول/المقدمـة واستعراض المـراجـع		
	المقدمــة	1
1	استعراض المراجـع	3
1-1	مجاميـع المضـادات الحيـويـة	3
1-1-1	مضـادات السـلفونـاميـد (عقـاقيـر السـلفا)	3
2-1-1	مضـادات البيتـالاكتـام	4
3-1-1	مضـادات المـاكروليـد	5
4-1-1	مضـادات الكـوينـولين	6
5-1-1	المضـادات الأمينـوكلايكـوسيـدية	7
6-1-1	المضـادات المتعـددة الببتيـد	9
7-1-1	مضـادات أخـرى شـائعـة الأستخـدام	9
2-1	الأسـاس الـوراثـي للمقـاومـة	10
1-2-1	المقـاومـة الكروموسـوميـة	11
2-2-1	المقـاومـة البـلازميـديـة	13
1-2-2-1	بلازميـدات المقـاومـة	14
2-2-2-1	بلازميـدات الضـراوة	16
3-2-2-1	البـلازميـدات الأيضيـة	17
3-2-1	المقـاومـة التي تتواسـطها العـوامل القـافزة	17
3-1	آليـات انتقال جينـات المقـاومـة	19
1-3-1	الأقتـران البكتيـري	19
2-3-1	التحـول البكتيـري	20
4-1	الـوبائيــة	22
1-4-1	وبـائيـة البكتيـريـا السـالبة لصبغـة غـرام	22
2-4-1	وبـائيـة البكتيـرياالموجبـة لصبغـة غـرام	26
الفصـل الثـاني/المـواد وطـرائـق العمـل		
1-2	الأجهـزة والمـواد المستخـدمـة	28
1-1-2	الأجهـزة المستخـدمـة	28
2-1-2	المـواد المستخـدمـة	29

1-2-1-2	المـواد الكيميـائيــة	29
2-2-1-2	الأنـزيمـات	31
3-2-1-2	المضـادات الحيـويـة	31
A-3-2-1-2	أقـراص المضـادات الحيـويـة	31
B-3-2-1-2	مسـاحيـق المضـادات الحيـويـة	32
4-2-1-2	الأوسـاط الـزرعيـة الجـاهـزة	34
5-2-1-2	العـدة التشخيصيــة	37
2-2	السـلالات البكتيـريـة والبـلازميـدات	35
3-2	طـرائـق العمـل	36
1-3-2	جمـع العينـات	36
2-3-2	العـزل الأولـي للبكتيـريـا	36
3-3-2	تشخيـص العـزلات البكتيـريـة	37
1-3-3-2	التشخيـص المظهـري	37
2-3-3-2	الفحـوصـات الكيمـوحيـويـة	38
4-3-2	حفـظ و إدامة السـلالات	47
5-3-2	الحسـاسيــة الـدوائيــة	48
6-3-2	أختبـار قابليـة العـزلات على أنتـاج أنـزيمـات البيتـالاكتـاميـز	49
7-3-2	أستخـلاص الـ DNA البـلازميـدي	50
8-3-2	الترحيـل الكهـربائـي على هـلام الأكـاروز	54
9-3-2	الأقتــران البكتيــري	56
10-3-2	التحــول الوراثي	58
11-3-2	تحييــد البـلازميـدات	62

الفصـل الثـالث/النتـائج والمنـاقشــة		
1-3	العـزل والتشخيـص	65
2-3	المقـاومـة للمضـادات الحيـويـة	69
3-3	أختبـار القابليـة على إنتاج أنزيمات البيتـالاكتـاميــز	80
4-3	دراسـة النسـق البــلازميـدي	80
5-3	الاقتران البكتيــري	86
6-3	التحــول الوراثي	92
7-3	تحييــد البـلازميـدات	96
	الاستنتاجات	101

	التـوصيـات	102
	المصـــادر	103
	الملاحـــق	
	الخـلاصـة باللغـة الإنكليزية	

الفصـــــــل الأول
المقدمة
واستعراض المراجع

المقدمة:

يعتبر نشوء المقاومة للمضادات الحيوية من المشاكل البارزة لدى الأطباء والمعنيين بالصحة العامة ،فبالرغم من أن الأساس الجزيئي للمقاومة الميكروبية معروف جيداً إلا أن عملية السيطرة على المقاومة ومنع ظهورها مازال حجر عثرة في طريق المجتمع الطبي.إن مشكلة المقاومة للمضادات الحيوية لم تقتصر على المستشفيات فحسب،وإنما قد يستمر الأشخاص الراقدين في المستشفيات بحمل السلالات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية مما يؤدي إلى نشرها في المجتمع عندما يفسح المجال لها **(Cox *etal*.,1995; Kelly & Chivers,1996)**

توضح مفهوم المقاومة لأول مرة عام 1944، عندما لوحظ أن مدى الكائنات المقاومة للمضادات الحيوية وخصوصاً البكتيريا السالبة لصبغة غرام قد يزداد مع زيادة استخدام مضادات البنسلين والسلفوناميد لمعالجة الإصابات الناتجة عن البكتيريا الموجبة لصبغة غرام،كما أن الاستخدام الواسع لمضادات البنسلين أدى إلى ظهور سلالات بكتيريا ***S.aureus*** المقاومة لهذا المضاد.**(Miles, 1944 ; Gorzynsk *etal*., 1989).** أثبتت مخاطر نشوء المقاومة للمضادات الحيوية بعد ثلاث سنوات عندما أكد العالم Florey أن جروح الكلم (Traumatic wound) المعالجة في المستشفيات قد تستعمر من قبل بكتيريا القولونيات (Coliforms) ، وفي عام 1950 وبدايات عام 1960 لوحظ ظهور سلالات بكتيريا ***S.aureus*** المقاومة للفانكومايسين ، في عام 1980 حدث انتشار واسع لبكتيريا المكورات العنقودية المقاومة للبنسلينات ، وإن هذا الانتشار لم يشمل المستشفيات فقط وإنما تبين أن ما يقارب 60-90 %من تلك السلالات المقاومة كانت موجودة في بيئات المجتمع **. (Milatovic, 1986; Manuel & Ziad, 2000; Reese *etal*.,2000)**

تنشأ المقاومة للمضادات الحيوية نتيجة للتغيرات اللاوراثية التي يعتمدها الكائن المجهري فأما أن يلجأ إلى إحاطة نفسه بتجاويف الخراج ،أو تلجأ بعض البكتيريا وتحت ظروف خاصة إلى فقدان تراكيب خاصة يعمل عليها المضاد ولعدة أجيال ، وأحيانا قد يصيب الكائن المجهري المضيف بمواقع لا يعمل عليها المضاد أو قد ينحجز المضاد في الخلية البيضاء (Leukocyte) أو كريات الدم الحمر ويقل تركيزه في الدم المحيطي مما يعكس عدم فاعلية الدواء في الكائن الحي **(Neu,1986; Brooks *etal*.,1998)**. كما تنشأ المقاومة للمضادات الحيوية نتيجة للتغيرات الوراثية في الخلية البكترية كحصول طفرات

وراثية تلقائية في المواقع المسيطرة على الحساسية الدوائية للمضادات الحيوية والتي تؤدي إلى ظهور المقاومة الكروموسومية لهذه المضادات ،أو قد تحمل جينات المقاومة للمضادات الحيوية على البلازميدات أو العوامل القافزة **(Macrina *etal*.,1978 ; Gay *etal*.,1985 ;Grinsted & Bennett, 1986,)** تلعب البلازميدات دوراً مهماً في انتقال صفة المقاومة للمضادات الحيوية من البكتيريا المقاومة إلى البكتيريا الحساسة وذلك عن طريق الاتصال المباشر بين خلية وأخرى وتدعى مثل هذه البلازميدات ببلازميدات المقاومة ، وتعد البكتيريا الحاملة لهذا النوع من البلازميدات المسبب الرئيسي للإصابات الناتجة في المستشفيات (Hospital born infections) **(Brooks *etal*.,1998)** .تنتقل بلازميدات المقاومة في البيئات الخارجية مثل مياه الصرف الصحي ،ونظراً لقلة الدراسات حول مياه الصرف الصحي للمستشفيات لتحديد العلاقة بينها وبين انتشار المقاومة للمضادات الحيوية ارتأينا القيام بهذه الدراسة والتي شملت :

1-عزل وتشخيص بعض الأنواع البكتيرية السائدة في مياه الصرف الصحي لمستشفيات محافظة بابل (مرجان العام، المستشفى الجراحي، ومستشفى الولادة والأطفال).

2-دراسة نمط الحساسية الدوائية للعزلات المشخصة تجاه مجموعة من المضادات الحيوية المستخدمة سريرياً.

3-دراسة النسق البلازميدي لبعض العزلات المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية والمنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز وملاحظة مدى التشابه والاختلاف بين عزلات الأجناس المختلفة.

4-أجراء تجارب التحول والاقتران البكتيري للتعرف على نوع البلازميدات ودورها في انتقال المقاومة بين الأجناس المختلفة.

5-تحييد البلازميدات للتعرف على مواقع مورثات المقاومة سواء كانت بلازميدية أم كروموسومية.

الفصل الأول:

1-استعراض المراجع

1-1 مجاميع المضادات الحيوية Antibiotic Groups

1-1-1 مضادات السلفوناميد (عقاقير السلفا)

Sulfonamides antibiotics (Sulfa drugs)

تمتلك هذه المضادات فعالية عالية تجاه البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام ويعد المضاد Trimethoprime Sulphamethoxazole من المضادات الشائعة الاستخدام لمعالجة اخماج المجاري البولية المزمنة **(Brown,1975; Rubin & Swartz, 1980)**.

تعمل مضادات السلفوناميد على تثبيط بناء الأحماض النووية للخلية البكتيرية وذلك من خلال تثبيط عملية بناء حامض الفوليك Folic acid (البادئ المهم لبناء الأحماض النووية)،حيث تمتلك هذه المضادات تركيباً كيمياوياً مشابهاً لحامض PABA الذي يدخل في بناء حامض الفوليك ،فتدخل هذه المضادات إلى التفاعل بدلاً من حامض PABA وتتنافس على الموقع الفعال لأنزيم Dihydropteroate synthetase بينما يعمل المضاد Trimethoprimeعلى تثبيط عمل إنزيم Dihydrofolic reductase الذي يختزل dihydrofolic acid إلى tetrahydrofolic acid وهي الخطوة المهمة التي تؤدي إلى بناء البيورينات في الحامض النووي DNA وبالتالي تثبيط بناء الأحماض النووية والذي يؤدي إلى موت الخلية البكتيرية **(Rubin & Swartz,1980; O`Brien,1987; Brooks *etal.*,1998)**

أدى الاستخدام الواسع لمضادات السلفا إلى ظهور سلالات مقاومة لها القابلية أما على إنتاج كميات كبيرة من حامض PABA مما يؤدي إلى ترجيح كفة التنافس على الإنزيم أو لها القابلية على استهلاك حامض الفوليك المتكون سابقاً كما هو الحال في الخلايا اللبنية **(O'Brain,1987; Manuchair ,2000)**. إن تثبيط إنزيم Dihydrofolic reductase يكون اقل كفاءة في البكتيريا المقاومة للمضاد ترايميثوبرايم مما هو عليه في البكتيريا الحساسة له وذلك بسبب قابليتها على تطوير إنزيمات بديلة لها القابلية على أداء الوظيفة الطبيعية للأنزيم ولكنها اقل تأثراً بالمضاد الحيوي **(Brooks *etal.*,1998)**. كما تنشأ المقاومة لمضادات السلفوناميد أما عن وجود بلازميد يشفر إلى نظام النقل الذي يعمل على منع المضاد من الدخول إلى داخل الخلية أو إلى حدوث طفرات وراثية في الجين المشفر لأنزيم Dihydropteroate

Syuthetase مما يؤدي إلى اختزال ألفة الارتباط للمضاد الحيوي **(Reese *etal.*,2000; Murray *etal*,1985).**

1-1-2 مضادات البيتالاكتام β-Lactam antibiotics

تشمل هذه المجموعة مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات والمونوباكتام والكاربابنيم وهي من المضادات ذات الطيف الواسع من الاستخدام والتي تتميز باحتوائها على حلقة البيتالاكتام ويعتبر الميثسلين أحد أهم مشتقات مجموعة البنسلينات والذي يمتاز بمقاومته العالية لأنزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من قبل الأنواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة غرام **(Finch,1981; Goth, 1984; Neu, 1991).**

تبدي مضادات البيتالاكتام تأثيراتها على الخلية البكتيرية من خلال تثبيط عملية بناء الجدار الخلوي لذلك فهي تعتبر من المضادات القاتلة للنمو البكتيري ،فقد أشارت العديد من الدراسات إلى أن البنسلينات والسيفالوسبورينات تظهر تأثيراتها من خلال الارتباط إلى مستقبلات خاصة في الجدار الخلوي تدعى البروتينات الرابطة للبنسلين (PBPs) وهي عبارة عن إنزيمات نقل مجاميع الببتيد Transpeptidation enzymes. وان هذا الارتباط يؤدي إلى تثبط عملية نقل المجاميع الببتيدية وبالتالي تحطيم طبقة الببتيد وكلايكان ،كما تعمل على إزالة أو منع إنزيمات التحلل الذاتي Autolysin من أداء وظيفتها مما ينتج عنه تحلل وموت الخلية **(Brooks *etal.*,1998; Reese *etal.*,2000; Manuchair,2000)**

تعزى آلية المقاومة لمضادات البيتالاكتام إلى مقدرة العديد من الأنواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة غرام على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز β-Lactamase (البنسلينيز Penicillinase والسيفالوسبورينيز Cephalosporinase) التي تحطم حلقة البيتالاكتام في المضاد الحيوي مما يؤدي إلى تثبيط فعل المضادات **(Finch,1981;Moellering,1993).** تختلف إنزيمات البيتالاكتاميز في مجموعة البكتيريا الموجبة لصبغة غرام عن تلك الموجودة في البكتيريا السالبة منها ،تكون إنزيمات المجموعة الأولى من الإنزيمات الخلوية الخارجية(Extracellular enzyme) حيث يتم إفراز كميات كبيرة من الإنزيم إلى خارج الخلية لتحلل المضاد في الوسط المحيط بها كما هو الحال في بكتيريا ***B.cerus*** و ***S.aureus*** بينما تكون إنزيمات المجموعة الثانية من النوع المرتبط

بالخلية Cell-bound enzyme إذ تحطم مضادات البيتالاكتام داخل الخلية البكتيرية وعليه فإن تراكيز قليلة من الإنزيم كفيلة لحماية البكتيريا من تأثير المضاد كما هو الحال في بكتيريا

P.aeruginosa **و** ***E.coli*** **(Brown,1975; Jacoby & Sutton, 1985)** تنتج معظم أنواع البكتيريا السالبة لصبغة غرام إنزيمات البيتالاكتاميز المحللة للبنسلينات والسيفالوسبورينات وتأتي في المقدمة أفراد العائلة المعوية والزوائف ، فقد أشارت العديد من الدراسات إلى أن إنزيم TEM-1 هو الأكثر شيوعاً بين أفراد العائلة المعوية يليه إنزيم TEM-26 الذي يمتاز بقابليته على تحليل تراكيز عالية من المضاد الحيوي سفتازيديم بينما يسود إنزيم SHV-1 وهو من إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) بين سلالات بكتيريا ***K.pneumoniae***

(Wiedeman *etal.*,1989; Urban *etal.*, 1994; Thomson,1995) ترتبط المقاومة الكرموسومية لمضادات البيتالاكتام مع فقدان أو تغيير في البروتينات الرابطة للبنسلين PBP **(Donowitz & Mandell, 1988; Gustaferro & Steckelberg,1991)** كما أن ظهور مستوى عالي من المقاومة لمضادات البيتالاكتام قد يعود أحيانا إلى النفاذية الضعيفة لهذه المضادات **(Jawetz *etal.*, 1980)**. إن تغيير نفاذية الغشاء الخلوي الخارجي يؤدي إلى تحديد مقدرة المضاد من الوصول إلى الموقع الهدف إذ تميزت سلالات مطفرة من بكتيريا ***E.coli*** **و** ***P.aeruginosa*** بافتقارها لقنوات الانتشار عبر الغشاء Ttansmembrane diffusion والتي تسهل عملية مرور المضاد من خلال غشاء الخلية مما يؤدي إلى زيادة مقاومة هذه البكتيريا إلى تراكيز عالية من المضادين سيفازولين وسيفوكستين **(Sawai *etal.*,1982)**.

1-1-3 مضادات الماكروليد Macrolides antibiotics

يعتبر المضاد الحيوي Erythromycin أول مشتقات هذه المجموعة وهو من المضادات ذات الطيف الواسع كما تعتبر من المضادات القاتلة للعديد من الأنواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة غرام.

تعمل مضادات الماكروليد على تثبيط بناء البروتينات من خلال الارتباط بالوحدات الفرعية 50S للرايبوسوم مما يؤدي إلى التداخل مع تكوين معقد الابتداء Initiation complex اللازم لبناء السلسلة الببتيدية أو قد يتداخل مع تفاعل ترجمة aminoacyl

وبالتالي منع عملية بناء السلسلة الببتيدية, فمثلاً يبدي Erythromycin تأثيراته من خلال الارتباط بالوحدة 23S للرنا الرايبوسومي الموجودة على الوحدة الفرعية 50S للرايبوسوم مما

يؤدي إلى منع ترجمة aminoacyl وبالتالي منع عملية بناء السلسلة الببتيدية **(Brooks *etal.*, 1998; Manuchair, 2000)**

تنشأ المقاومة لمضادات الماكروليد نتيجة لامتلاك البكتيريا المقاومة لمستقبلات بديلة على الوحدة الفرعية 50S للرايبوسوم ناتجة عن إضافة مجموعة مثيل Methylationعلى الوحدة الفرعية 23S للرنا الرايبوسومي ،حيث تنشأ المقاومة للمضاد Erythromycin عن وجود بلازميد يشفر إلى إنزيمات خاصة تعمل على إضافة مجموعة مثيل للوحدة الفرعية 23S للرنا الرايبوسومي مما يؤدي إلى منع ارتباط المضاد مع للوحدة الفرعية 50S للرايبوسوم البكتيري **(Arbuthnot,1984;Brooks *etal.*,1998)**. كما أن اغلب الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام تمتلك مقاومة حقيقية لمضادات الماكروليد وذلك بسبب عدم قابلية تلك المضادات على اختراق الغشاء الخارجي للخلية البكتيرية بسبب تثبيط وظيفة النقل الفعال للغشاء الخلوي **(Reese *etal.*,2000).**

1-1-4 مضادات الكوينولين Quinolone antibiotics

تضم هذه المجموعة أربعة أجيال من المضادات الحيوية ، يعتبر الجيل الأول والثاني من الأجيال التقليدية القديمة بينما يعتبر الجيل الثالث والرابع من الأجيال ذات الطيف الواسع من الاستخدام ،تمتلك جميع هذه الأجيال فعالية عالية ضد العصيات والمكورات السالبة لصبغة غرام بينما تختلف فعاليتها تجاه بكتيريا ***P.aeruginosa*** **(Turnridge, 1995; Reese *etal.*, 2000) .**

تعمل مضادات الكوينولين على تثبيط بناء DNA البكتيري وذلك من خلال تثبيط إنزيم DNA-gyrase المسؤول عن فك الالتفاف الحلزوني للـ DNA ويضمن تباعدها عن بعضهما أثناء عملية استنساخ DNA**(Turnridge, 1995; Brooks *etal.*, 1998)**.

أدى الاستخدام الواسع لمضادات الكونيولين إلى ظهور وتطور البكتيريا المقاومة لها إذ تشمل آلية المقاومة لهذه المضادات مقدرة البكتيريا على تقليل القابلية النفوذية للمضاد الحيوي وذلك من خلال تثبيط عملة النقل الفعال **(Reese *etal.*,2000; Walker *etal.*, 1999)**

تنتج المقاومة الكروموسومية لمضادات الكونيولين عن حدوث طفرات وراثية في الـ DNA الكروموسومي والتي تؤدي أما إلى تغيير الوحدة الفرعية A في إنزيم DNA gyrase مما يؤدي إلى تغيير تركيب هذا الأنزيم الذي يعتبر الموقع الهدف لعمل المضاد, أو أن تؤدي تلك

الطفرات إلى تثبيط عملية النقل الفعال للغشاء الخلوي مما يمنع المضاد من الدخول إلى داخل الخلية وأداء وظيفته (**Brooks *etal.*,1998**). أدى الاستخدام الطويل الأمد لمضادات الكونيولين أدى إلى ظهور سلالات من بكتيريا ***P.aeruginosa*** مقاومة له ،كما لوحظ انتشار واسع للمقاومة بين عزلات ***N.gonorrhoeae*** وسلالات ***K.pneumoniae*** (**Kohler *etal.*,1999; Reese *etal.*, 2000**). تقل فعالية مضادات الكوينولين تجاه السلالات البكتيرية المتعددة المقاومة لبقية الأنواع من المضادات الحيوية فمثلاً تكون مضادات الكوينولين عديمة الفعالية تجاه بكتيريا ***S.aureus*** المقاومة للميثسلين (MRSA) أو سلالات Enterococci المقاومة للفانكومايسين (VRE) **Fujita *etal.*, 1998; Cui *etal.*, 2000)**.

1-1-5 المضادات الامينوكلايكوسيدية Aminoglycoside antibiotics

وهي من المضادات ذات التأثير القاتل للبكتيريا ،لها فعالية عالية ضد أنواع عديدة من البكتيريا الهوائية السالبة لصبغة غرام ولها تأثير قليل تجاه بعض الأنواع الموجبة لصبغة غرام مثل بكتيريا المكورات العنقودية لذا لا يفضل استخدامها لوحدها في مثل هذه الحالات ،كما تعتبر من المضادات الشائعة الاستخدام في معالجة اخماج المستشفيات المكتسبة (Hospital acquired infection) وخصوصاً تجاه بكتيريا ***P.aeruginosa*** (**Edson & Terrell, 1991; Reese *etal.*, 2000**).

تعتبر المضادات الامينوكلايكوسيدية من المضادات الفعالة في معالجة العديد من الحالات المرضية بسبب قلة ظهور أو تطور المقاومة البكتيرية لها ،وقابليتها على اختزال حالات الإسهال الناتجة عن بكتيريا ***C.difficle*** وكذلك بسبب المخاطر القليلة الناتجة عن تفاعلات الحساسية ،إضافة إلى معرفة سمية هذه المضادات (**Reese *etal.*, 2000**) .

تمتلك هذه المضادات القابلية على قتل النمو البكتيري من خلال مقدرتها على اختراق الجدار والغشاء الخلوي والارتباط بشكل كبير إلى الوحدة الفرعية 30S للرايبوسوم محدثة

اضطراب في وظيفة الرايبوسوم المهمة في بناء البروتين أثناء ترجمة الشفرة الوراثية وبالتالي بناء إنزيمات غير فعالة (**Silver & Bostian,1993**). كما تعمل المضادات الامينوكلايكوسيدية على تثبيط معقد الابتداء مما يؤدي أما إلى عدم تكوين أواصر ببتيدية بين وحدات monosome أو أنها تحدث خطأ في قراء الشفرة الوراثية لـ mRNA مما يؤدي إلى

إدخال أحماض أمينية غير فعالة إلى البروتين وبالتالي تثبيط عملية بناء البروتينات (**Edson & Terrell,1991**). ينتج عن تثبيط بناء البروتينات نضوح الأحماض الأمينية والبوتاسيوم والصوديوم خارج الخلية وبالتالي موتها (**Cruickshank *etal*., 1975; Kunin, 1993**) .

ترتبط المقاومة الكروموسومية للمضادات الامينوكلايكوسيدية مع فقدان أو تغيير في بروتينات خاصة في الوحدات الفرعية 30S للرايبوسوم والتي تعمل كمواقع ارتباط في البكتيريا الحساسة فظهور صفة المقاومة للمضاد الحيوي ستربتومايسين تنتج عن بناء البروتين المطفر في الوحدة الفرعية 30S للرايبوسوم (**Shaw *etal*., 1993; Brooks *etal*., 1998; Levy, 1998**) .كما أن تغيير نفاذية الغشاء الخلوي تلعب دوراً إضافيا لإظهار صفة المقاومة للمضادات الامينوكلايكوسيدية حيث أن مقاومة المسبحيات لهذه المضادات تعود إلى فقدان القابلية النفوذية لتلك المضادات والناتجة عن تغيير في الغشاء الخارجي للخلية وبالتالي إحداث الضرر في عملية النقل الفعال (**Handwerger & Tomasz,1985**) كما أن مقدرة العصيات السالبة لصبغة غرام على مقاومة تأثير هذه المضادات يعود إلى قابليتها على إنتاج إنزيمات phosphor transferase أو adeny transferase أو acety transferase المحطمة لهذا المضادات (**Edson & Terrell,1991**).أشارت العديد من الدراسات إلى أن المقاومة للمضادات الامنيوكلايكوسيدية تنشأ عن واحد أو اكثر من الآليات التالية:-

- التداخل مع نقل المضاد إلى داخل الخلية وذلك من خلال تثبيط عملية النقل الفعال للغشاء الخلوي (**Brooks *etal*., 1998**).
- حذف المستقبلات على الوحدة الفرعية 23S للرايبوسوم والتي تعمل كمواقع استقبال المضاد في البكتيريا الحساسة مما يؤدي إلى منع المضاد من الارتباط وأداء وظيفته (**Manuchair ,2000**).
- مقدرة البكتيريا على التحويل البايولوجي للمضاد إلى أشكال غير فعالة **(Reese *etal*.,2000)**
- نظراً لكون عملية النقل الأولي للمضاد إلى داخل الخلية البكتيرية تعتمد أساسا على الأوكسجين لذلك فان البكتيريا التي تنمو تحت ظروف الهوائية تبدي مقاومة عالية لتلك المضادات (**Brooks *etal*.,1998; Manuchair,2000**).

1-1-6 المضادات المتعددة الببتيد Polypeptide antibiotics

تبدي المضادات متعددة الببتيد تأثيراتها القاتلة للنمو البكتيري أما من خلال تثبيط الجدار الخلوي أو تثبيط وظيفة الغشاء الخلوي ،إذ يعمل المضاد باستراسين على منع عملية حذف مجموعة الفسفور Dephosphorylation من الدهون المفسفرة التي تحمل وحدات الببتيد وكلايكان خلال الغشاء الخلوي مما يؤدي إلى منع إعادة تكون حاملات الدهون وبالتالي تثبيط بناء الجدار الخلوي (**Jawetz *etal*.,1980; Dinah & Christinee ,2000**) .تمتلك هذه المضادات القابلية على تحطيم وظيفة النقل الفعال للغشاء الخلوي من خلال ارتباطه بالغشاء الخلوي الغني ب Phosphatidylethanolamine مما يؤدي إلى تحطيم حواجز النفاذية الطبيعية للمضاد وبالتالي تحطيم الغشاء الخلوي (**Brooks *etal*.,1998**).

1-1-7 مضادات أخرى شائعة الاستخدام Other predominant antibiotics

تضم هذه المجموعة المضادات كلورامفينكول وتتراسايكلين وريفامبين ،تعمل هذه المضادات أما على تثبيط بناء البروتين من خلال الارتباط بالوحدات الفرعية 30S و 50S للرايبوسوم أو تثبيط بناء الأحماض النووية (**Brooks *etal*.,1998**) يبدي المضاد كلورامفينكول تأثيراته المضادة للأحياء المجهرية من خلال الارتباط بالوحدات الفرعية 50S للرايبوسوم مما يؤدي إلى تثبيط عمل إنزيم peptidyl transferase وبالتالي منع بناء أواصر ببتيدية جديدة (**Arbuthnott ,1984**).إن ارتباط المضاد تتراسايكلين بالوحدة الفرعية 30S للرايبوسوم يؤدي إلى تثبيط عملية ارتباط Aminoacyl tRNA إلى مواقع الارتباط الموجودة على mRNA وبالتالي تثبيط بناء البروتين (**Manuchair ,2000**).كما يعمل المضاد ريفامبين على تثبيط بناء الأحماض النووية من خلال تثبيط بناء الـmRNA إذ

يعمل المضاد على تثبيط DNA-dependent –RNA-Polymerase وبالتالي تثبيط عملية بناء RNAالبكتيري (**Reese *etal*., 2000**).

تميل البكتيريا إلى مقاومة فعل هذه المضادات بعد آليات ،فقد تلجأ إلى بناء إنزيمات محطمة للمضادات مثل إنزيم Chloramphenicol acetyl transferase الذي يحطم المضاد كلورامفينكول, وتحمل الجينات المشفرة لهذا الإنزيم على بلازميدات اقترانية كما أن تثبيط وظيفة النقل الفعال للغشاء الخلوي تؤدي إلى منع المضاد من التجمع داخل الخلية كما هو الحال في السلالات المقاومة للمضاد تتراسايكلين إذ تقع هذه العملية تحت سيطرة جينات محمولة على

بلازميدات لها القابلية على الانتقال أما بطريقة الاقتران أو بطريقة النقل بالعاثي البكتيري Transductions ،في حين تنتج المقاومة للمضاد ريفامبين عن حدوث طفرات كروموسومية في الجين المسؤول عن الوحدة الفرعية B لإنزيم RNA- Polymerase البكتيري مما ينتج عنه ارتباط غير فعال للمضاد **(Esezobo & Hamilton - Offiong, 1986; Miller,1990 ; Gold & Moellering ,1996)**

1– 2 الأساس الوراثي للمقاومة Genetic Origin of Antibiotic Resistance

يتطلب فعل المضاد الحيوي عادة التضاعف الفعال للبكتيريا لذلك يتميز الكائن المجهري غير الفعال أيضا بمقاومة العالية للمضادات الحيوية فمثلاً تعيش بكتيريا Mycobacteriumفي الأنسجة لعدة سنوات متخفية عن دفاعات الجسم بسبب عدم تضاعفها مما يؤدي إلى مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية **(Brooks *et at.*,1998).**

توصف مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية بأنها ذات مستوى عالي عندما لا يوجد أي تأثير للمضاد الحيوي المستخدم على البكتيريا أو أنها ذات مستوى جزئي عند بقاء نسبة عالية من الخلايا البكتيرية عالية الفعالية تقسم المقاومة للمضادات الحيوية إلى نوعين **(Dinah &Christinee ,2000)**

1-المقاومة الحقيقية Intrinsic resistance وهي صفة ملازمة للكائن المجهري تحدد بتركيب الجدار الخلوي إذ تعتبر البكتيريا الموجبة لصبغة غرام اكثر حساسية من البكتيريا السالبة للصبغة وذلك بسبب طبيعة الجدار الخلوي الذي يكون اقل تعقيداً مما هو عليه في البكتيريا السالبة للصبغة.

2-المقاومة المكتسبة Acquired resistance وهي المقاومة الناشئة أما عن حدوث طفرات كروموسومية تلقائية أو نتيجة لانتقال مؤشرات وراثية قد تكون بلازميدية أو عناصر قافزة.

أشارت العديد من الدراسات إلى وجود نوعين مهمين من المقاومة المكتسبة يعرف النوع الأول بالمقاومة الداخلية (Endogenous resistance) وهي المقاومة التي تنشأ في المزارع النقية كتغير أو فقدان في الوظيفة ،مثل تغيير في تركيب إنزيمات معينة أو فقدان فعالية هذه الإنزيمات أو أن يحدث تغيير في نفاذية بعض الجزيئات بضمنها المضادات الحيوية ،كما أن

ظهور هذا النوع من المقاومة يكون مضراً للكائن الحي في حالة غياب المضاد الحيوي لان ذلك يؤدي إلى حدوث تغيرات سلبية في الموقع الذي يعمل عليه المضاد ،وهذا التغيير يعمل على تقليل كمية المغذيات الداخلة للخلية فيبطئ نموها مما يضعها في حال تنافسي ضعيف ،بينما يعرف النوع الثاني من المقاومة بالمقاومة الخارجية (Exogenous resistance) وهي المقاومة الناتجة عن بناء إنزيمات تعمل على إزالة سمية المضادات الحيوية وليس التغيير في تركيب الإنزيمات الموجودة أصلا ولا يظهر هذا النوع من المقاومة في المزارع النقية عموماً **(Steinbrecher,1981; Grahn *etal.*, 1987; Cohen *etal.*,1988;Bryan, 1989; Hamilton –Miller, 1990)**

تنشأ المقاومة المكتسبة لعديد من المضادات الحيوية كنتيجة للتغيرات الوراثية الحاصلة في الخلية البكترية وعلى هذا الأساس تقسم هذه المقاومة إلى عدة أنواع (**Jawetz *etal.*, ,1980**)

1-2-1 المقاومة الكروموسومية Chromosomal resistance

هي المقاومة الناتجة عن حدوث طفرات تلقائية في المواقع المسيطرة على الحساسية الدوائية للمضادات الحيوية ،حيث أن وجود المضاد الحيوي يعمل على كبح السلالات الحساسة وتحفيز نمو الطافرات المقاومة (**Okek *etal.*, 1999**) إن حدوث طفرة وراثية في الجينات الكروموسومية تؤدي إلى التغيير أما في الموقع الهدف للمضاد أو في نظام النقل في الأغشية والذي يسيطر على عملية اخذ المضاد, فحدوث، طفرة وراثية في تركيب الجين المسيطر على تركيب بروتين P_{12} الموجود على الوحدة الفرعية 23S للرايبوسوم البكتيري

والذي يعمل كمستقبل لارتباط المضاد الحيوي السترتبومايسين يؤدي إلى إظهار صفة المقاومة لهذا المضاد **(Brooks *etal.*, 1998)**. ينتج المقاومة لمضادات البيتالاكتام عن حدوث طفرات وراثية تؤدي إلى فقدان البروتينات الرابطة للبنسلين (PBPs) حيث يتراوح تردد هذه الطفرات التلقائية بين 10^{-7}-10^{-9} والذي يعتبر اقل تردداً من المقاومة الناتجة عن اكتساب البلازميدات **(Wright & Wilkowske,1991; Nathwani & Wood , 1993)** . كما أشارت العديد من الدراسات إلى أن المقاومة الكروموسومية لمضادات البيتالاكتام تنتج عن قابلية معظم أنواع البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام على إنتاج نوعين من إنزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية . يعرف النوع الأول بالإنزيمات الكروموسومية منتظمة التكوين والذي يصنع في الخلية البكتيرية دون الحاجة إلى تحفيز المادة الأساس (متمثلة بمضادات البيتالاكتام)،بينما يعرف النوع الثاني بالإنزيمات المحفزة والتي من الممكن زيادة إنتاجها بوجود محفز

(Brown, 1975 ; Sykes & Mattew, 1976; Sanders *etal.*, 1988; Arakawa *etal.*,1984).يشفر للإنزيمات المحفزة بواسطة جينات تركيبية Structural genes المسيطر عليها جينات سيطرة (Control genes) من خلال كابح (Repressor) ، لذا فان حدوث طفرة وراثية في جينات السيطرة أو تثبيط الكابح يؤدي إلى زيادة استنساخ الجينات التركيبية وبالتالي ازدياد إنتاج هذه الإنزيمات **(Sanders *etal.*,1993)** .تتراوح نسب حدوث الطفرات التلقائية بمعدل خلية واحدة لكل 10^{7}-10^{6} خلية وتزداد خطورة هذه الخلايا الطافرة عندما يتحول إنتاجها الإنزيمي من النوع المحفز إلى النوع منتظم التكوين **(Sanders,199**2) .أكدت العديد من الدراسات أن المقاومة الكروموسومية لمضادات البيتالاكتام في المكورات العنقودية المقاومة للميثسلين (MRSA) تنتج عن وجود ***mec A gene*** المحمول على كروموسوماتها والذي يشفر عن إنتاج البروتينات الرابطة للبنسلين (PBP2a) ذو الألفة القليلة للارتباط بهذه المضادات ،ويعتبر هذا الجين من الجينات الواسعة الانتشار بين أنواع مختلفة من جنس المكورات العنقودية **(Hartman & Tomasz,1984; Reynolds &Fuller,1986; Chambers, 1987; Hiramatsu *etal.*,1990)** . تشير تسلسلات النيوكليوتيدات وتسلسل الأحماض الأمينية المتوقعة لـ ***mecA gene*** أن هذا الجين ينشأ عن انشطار المنطقة المنظمة لجين البنسلينيز (Pcase) المركبة مع الجين التركيبي للـ PBP غير معروف الأصل لذلك فبالرغم من أن

mec A gene يكون محمول على الكروموسوم إلا أن تنظيمه يتم بواسطة بلازميد البنسلينيز المتواجد في اغلب سلالات MRSA

.(Chamber *etal.*, 1985; Ubukata *etal.*, 1985; Song *etal.*, 1987)

1-2-2 المقاومة البلازميدية Plasmidial resistance

تعرف البلازميدات على أنها جزيئات DNA صغيرة الحجم ،خارج كروموسومية (Extrachromosomal) ، ثنائية الشريط ،دائرية مرتبطة تساهمياً Covalently – Closed Circular**(CCC)** **. (Grinsted & Bennett, 1986; Perry & Staley, 1997)** تمتلك الخلية البكتيرية واحدة أو اكثر من البلازميدات المختلفة التي لها القابلية على التضاعف ذاتياً دون الاعتماد علىDNA الكروموسومي **(Ausubel *etal.*,1989)** . تحمل البلازميدات الجينات المسؤولة عن العديد من الخصائص المظهرية للبكتيريا مثل المقاومة للمضادات الحيوية ،عوامل الضراوة أو الفعاليات الأيضية أو قد تحمل الجينات المسؤولة عن بعض الخصائص

المظهرية غير المحددة ،وتدعى مثل هذه الجينات بـ Cryptic genes (**Woodford & Johnson,1998)** .تمتلك البلازميدات القابلية على الانتقال إلى سلالات أو أنواع بكتيرية مختلفة وتدعى مثل هذه البلازميدات بالبلازميدات المنتقلة ذاتياً (Transferable plasmids) أو البلازميدات المقترنة (Conjugational plasmids) حيث تحمل مثل هذه البلازميدات جينات خاصة مسؤولة عن عملية الانتقال تدعى جينات النقل ***tra genes*** **(Grinsted &Bennett, 1986).** هنالك أنواع أخرى من البلازميدات ليس لها القابلية على الانتقال الذاتي ولكنها تمتلك القابلية على الانتقال بواسطة جينات النقل المحمولة على البلازميدات الاقترانية الموجودة في نفس الخلية البكتيرية وتدعى مثل هذه البلازميدات بالبلازميدات المتحركة (Mobilizing plasmids) .

تختلف البلازميدات في أحجامها ويتراوح حجمها عموماً بين عدة مئات إلى عدة آلاف زوج قاعدي (**Leach,1995**) .صنفت البلازميدات اعتماداً على حجمها إلى نوعين يضم الأول بلازميدات كبيرة الحجم ذات وزن جزيئي 60 مليون دالتون وهي بلازميدات اقترانية تحتوي الجينات المشفرة إلى خطوات الانتقال بينما يضم النوع الثاني بلازميدات صغيرة الحجم ذات وزن جزئي 10 مليون دالتون وهي بلازميدات غير اقترانية وتحتوي على جينات

المقاومة فقط (**Perry & Staley,1997**).كما صنفت البلازميدات وفقاً للمعلومات الوراثية التي تشفر إليها الجينات المحمولة عليها إلى ما يلي (**Brooks *etal.*, 1998**):

1- 2-2-1 بلازميدات المقاومة Resistant plasmids

هي واحدة من أهم أنواع البلازميدات وتدعى R-Factor أو R-plasmid ، تحمل الجينات المسؤولة أما عن بناء إنزيمات محطمة للمضادات الحيوية أو التي تعمل على تغيير تركيب الغشاء الخلوي مما يؤدي إلى منع المضاد الحيوي من الدخول إلى داخل الخلية البكتيرية والوصول إلى الموقع الهدف أو أنها تحمل الجينات التي تعمل على تحوير الموقع الهدف مما يؤدي إلى المقاومة للمضادات الحيوية (**Old & Primrose, 1994**) .تمتاز بلازميدات المقاومة بقابلية انتقالها الذاتي (Self-transmissible plasmid) لاحتوائها على نوعين من الجينات ،يساعد النوع الأول في عملية الاتصال الفعال عبر تكوينه الأهداب الجنسية Sex pili ويساعد النوع الثاني المسمى ***tra gene*** على انتقال البلازميدات من الخلايا الواهبة (الذكرية)إلى الخلايا المستلمة(الأنثوية) عبر الجسور الرابطة (**Tait, 1997**) .تمتلك هذه البلازميدات وظائف متعددة إذ تنتقل من جنس إلى آخر وبين أفراد العائلة المعوية ،بين أفراد

العائلة المعوية وبكتيريا ***P.aeruginosa*** **(Datta & Hedges ,1972)** .إضافة إلى انتقالها إلى أنواع أخرى مثل بكتيريا ***Acinetobacter spp*** **(Towner & Vivian, 1976)** وبكتيريا ***Erwnia spp*** (**Cho *etal.*,1975**) وبكتيريا ***S.aureus*** **(McDonnell *etal.*,1983).**

تلعب البلازميدات دوراً مهماً في إظهار صفة المقاومة للعديد من المضادات الحيوية إلى الأنواع البكتيرية المختلفة مما يزيد من فرص انتشارها ووبائيتها للإنسان إذ أشارت العديد من الدراسات إلى أن البلازميدات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضادات الحيوية الامينوكلايكوسيدية تحمل الجينات المشفرة لبناء إنزيمات إضافة مجاميع , Phosphoryl adenyl و acetyl مما يؤدي إلى تثبيط عمل بناء هذه المضادات **(Edson & Terrell, 1991;Dinah&Christine, 2000;Manuchair, 2000)**. كما أكدت دراسات أخرى أن المقاومة لمضادات الجنتامايسين والتوبرامايسين والكنامايسين التي أبدتها العزلات السريرية للمكورات العنقودية تحمل جيناتها بواسطة مجموعة من البلازميدات

(Archer & Johnston ,1983; Asch *etal.*,1983; Byrne *etal.*,1990) يعزي ظهور نفس نمط المقاومة للمضادات الحيوية الكنامايسين والتتراسايكلين والسيفالوريدين والامبسلين والكاربنسلين في عدد من السلالات السريرية المختلفة إلى وجود بلازميد المقاومة الذي يحمل جينات هذه المقاومة المشتركة المترابطة والتي أطلق عليها نمط TKCACe نسبة للمضادات آنفة الذكر (**Ayliffe *etal.*,1972**) .تحمل بلازميدات المقاومة للمضاد الحيوي الكلورمفينكول الجينات المسؤولة عن إنتاج إنزيم Acetyl transferaseالذي يحطم المضاد الحيوي (**Gold & Moellering ,1996).**

تقع إنتاجية اغلب أنزيمات البيتالاكتاميز تحت سيطرة البلازميدات التي معظمها تكون بلازميدات اقترانية**(Vuye *etal.*,1989;Papanicolaou *etal.*, 1990)**.يحمل البلازميدات الذي يحدد صفة المقاومة لمضادات البنسلين والسيفالوسبورين الجينات المسؤولة عن بناء أنزيمات البيتالاكتاميز ،حيث تعتبر البلازميدات الحاملة لجينات المقاومة للامبسلين من أهم البلازميدات المنتشرة بين أفراد العائلة المعوية وتعرف هذه البلازميدات ببلازميدات R-TEM-1 وتتراوح نسبته بين 70-100%(**Brodn,1979;Moellering ,1993**), بعد ذلك يأتي بلازميد المقاومة للكاربنسلين في بكتيريا ***P.aeruginosa*** المعروف بـRP_1 والنوع الثاني المقارب له يدعى RP_4 اللذان يشفران لأنزيم TEM-2 **(Date &Smith,1971; Grinsted *etal.*,1972)** أما البلازميد الثالث فهو البلازميد الخاص بمقاومة الامبسلين في

بكتيريا ***Klebsiella*** والمشفر لأنزيم SHV-1 **(Sykes & Mattew, 1976)** .يعزى سبب المقاومة العالية لمضادات الازترونيم والسيفوكستين والسيفوتيتان إلى أنزيم أطلق عليه MTR-1 وكانت مشفراً له من قبل بلازميد اقتراني كبير الحجم معزول من قبل بعض سلالات بكتيريا ***K.pneumoniae*** **(Papanicolaou *etal.*,1990)** .تحمل الجينات المشفرة لإنتاج البروتينات الرابطة للبنسلين (PBP2a) والمسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للميثسلين في بكتيريا ***S.aureus*** على البلازميدات ،وتمتلك هذه الجينات عوامل إدخال هي IS257,IS431 والتي غالباً ما تكون مماثلة تقريباً إلى عوامل الإدخال الموجودة في ***mec A gene*** المحمولة على الكروموسوم البكتيري **(Barberis-Maino *etal.*,1987; Rouch *etal.*,1989; Rouch & Skurray ,1989)**

1-2-2-2 بلازميدات الضراوة Virulence Plasmids

هي البلازميدات الموجودة في البكتيريا المرضية والتي تحمل الجينات المشفرة إلى عوامل الضراوة التي تحتاجها تلك البكتيريا فمثلاً تحمل بكتيريا ***E.coli*** المسؤولة عن إحداث مرض الإسهال في الإنسان بلازميدات كبيرة الحجم تحمل الجينات المسؤولة عن نوعين من السموم ،وان نفس هذه البلازميدات قد تحمل الجينات المسؤولة عن التشفير لجزيئات الالتصاق (Adhesion molecules) وهي الجزيئات السطحية الضرورية لإحداث عملية الاستعمار للأغشية المخاطية**(Walter *etal.*,1979; Perry & Staley,1997).**

تحمل بلازميدات الضراوة الجينات المشفرة إلى كلا من عوامل التحليل hemolytic factor وهي البروتينات المحطمة للعديد من أغشية الخلايا بضمنها خلايا كريات الدم الحمراء وكذلك جزيئات السيدروفور (Siderophores) وهي الجزيئات المسؤولة عن الأخذ الجيد للايرون وهي المواد التي عادة ما تحدد في الأنسجة المصابة **(Perry & Staley, 1997)**.تمتلك الأنواع الموجبة لصبغة غرام البلازميدات الحاملة للجينات المسؤولة عن بناء السموم مثل البلازميدات المشفرة لسموم بكتيريا ***B.anthracis*** **(Perry & Staley,1997)** وكذلك مجموعة السموم المبيدة للحشرات المفرزة من قبل بكتيريا ***B. thuringiensis*** **(Brooks *etal.*,1998)** ،والسموم العصبية المفرزة من قبل بكتيريا ***Clostridium Yersinia, Salmonella, Shigella*** **(Schleif, 1993)**.كما تمتلك الأجناس البكتيرية بلازميدات خاصة تحمل الجينات المسؤولة عن اجتياح الخلية في مرحلة من مراحل حدوث الإصابة **(Perry & Staley, 1997)**.

هنالك مجموعة أخرى من بلازميدات الضراوة لها القابلية على البناء المباشر للبروتينات الحاملة لصبغة السمية لأنواع أخرى من البكتيريا وعادة ما تسمى هذه البلازميدات بأسماء البروتينات السمية التي تشفر لإنتاجها ،فمثلاً تدعى البروتينات القاتلة لأنواع أخرى من البكتيريا بالبكتيريوسين Bacteriocin أما البلازميد المشفر عنها فيدعى Bacteriocinogenic plasmid(**(Brooks *etal.*,1998**.تمتلك بكتيريا ***E.coli*** بلازميد يدعى Colicinogenic plasmid وهو المسؤول عن إنتاج بروتين الكوليسين Colicinالذي يعمل على قتل أنواع أخرى من البكتيريا بالعديد من الآليات المختلفة تبدأ من التحطيم المباشر للغشاء الخلوي وصولاً إلى تحطيم الرايبوسومات **(Perry & Staley, 1997)**

تحمي البكتيريا الحاملة للبلازميدات المسؤولة عن بناء البروتينات السمية نفسها من التأثيرات السمية لهذه البروتينات بالتعبير عن محددات مناعية يتم التشفير لها بواسطة جينات محمولة على نفس تلك البلازميدات.

3-2-2-1 البلازميدات الأيضية Metabolic plasmids

هناك وظائف أيضية متخصصة يمكن التشفير عنها بواسطة البلازميدات ،فمثلاً تمتلك بكتيريا ***P.aeruginosa*** بلازميدات كبيرة الحجم تحمل الجينات المشفرة للمسارات الهدمية للمركبات الاليفاتية والاروماتية مثل التولوين والنيفثالين والاوكتان والديكان **(Li & Poole,1999)** تعمل مثل هذه البلازميدات على التشفير إلى بناء أنزيمات لها القابلية على تحليل النيفثالين وتحويله إلى بايروفين واستيل الديهايد ،لذا فان مثل هذه البلازميدات المحللة تسمح للبكتيريا باستخدام المركبات العضوية غير المألوفة كمصدر وحيد للكاربون والطاقة **(Perry & Staley,1997)** .ولكون العديد من الملوثات البيئية عبارة عن جزيئات عضوية معقدة التركيب لذلك فان البكتيريا الحاملة للبلازميدات المحللة هي من أول المرشحات للاستخدام في عمليات المعالجة الحيوية Bioremediation**(Gould, 1997).**

3-2-1 المقاومة التي تتواسطها العوامل القافزة Transposons mediated resistance

تعرف العوامل القافزة Transposonsبأنها جينات لها القابلية على الانتقال أما داخل أو بين القطع الكبيرة للـ DNA مثل الكروسوم البكتيري أو البلازميد.تتألف هذه العوامل من ثلاث جينات يرتبط بها على كل جانب تسلسلات DNA قصيرة والتي هي عبارة عن سلسلة من قواعد الإدخال تتوسط التفاعل بين العوامل القافزة وقطع الـ DNA الكبيرة **(Hall &**

(**Stokes, 1993; Hall & collis, 1995**) .تشفر الجينات الثلاثية للعوامل القافزة إلى أنزيم Transposaseوالذي يحفز استئصال وإعادة تكوين العوامل القافزة ،والى الكوابح التي تنظم عملية بناء أنزيم Transposase، كما أنها تشفر إلى جينات المقاومة للمضادات الحيوية **(Brooks *etal.*, 1998).**

تمتلك العوامل القافزة القابلية على الانتقال من بلازميد إلى أخرى ومن بلازميد إلى الكروموسوم وبالعكس محدثة طفرة وراثية بعد انغرازها في موقع و تسلسلات معينة تدعى

بتسلسلات الهدف Target sequences(**Gay *etal.*,1985**). تحتوي العوامل القافزة على جينات المقاومة لعدد من المضادات الحيوية مثل الامبسلين والتتراسايكلين والكنامايسين وان اكثر هذه الجينات انتشاراً هي تلك التي تعود إلى العائلة Tn3 المشفرة لأنزيمي TEM-2,TEM-1 (**Ogawara *etal.*, 1993; Jacoby,1995**).كما تحتوي العوامل القافزة العائدة للعائلة Tn4001جينات المقاومة للمضادات الامينوكلايكوسيدية وهي شائعة الانتشار بين عزلات بكتيريا ***S.aureus*** **(Lyon *etal.*, 1984; Lyon *etal.*,1987) .**
تكون العوامل القافزة العائدة للعائلة Tn4001 سائدة عموماً على البلازميدات المتعددة المقاومة من عائلة pSK1 حيث أن هذا النوع من البلازميد يكون مسؤول عن إظهار صفة المقاومة للبنسلين عن طريق إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز المحمولة على العوامل القافزة Tn4002 **(Lyon & Skurray ,1987; Gillespie *etal.*,1988; Skurray *etal.*,1988)** .
تعزى المقاومة العالية لمضادات الترايميثوبرايم إلى الإنتاجية العالية لأنزيم Dihydrofolate reductase الذي يشفر عنه بواسطة العوامل القافزة Tn4003 **(Rouch *etal.*,1989).**
يسبب انغراز الجينات القافزة في مواقعها الجديدة إلى ظهور صفات على حساب اختفاء أخرى إذ أن انغراز الجين القافز Tnc الحامل لصفة المقاومة للستربتومايسين والترايميثوبرايم في البلازميد RP_4 المشفر لمقاومة الامبسلين والتتراسايكلين والكانامايسين يؤدي إلى اختفاء المقاومة للمضادين التتراسايكلين والكانامايسين ،إضافة إلى تعطيل قابلية الانتقال الذاتي في البلازميد المذكور وبالمقابل ظهور صفة المقاومة للسترتبومايسين والترايمثيوبرايم عليه **(Brath *etal.*, 1978).** إن ظهور الجينات المشفرة لأنزيمات البيتالاكتاميز على البلازميدات وأحيانا على الكروموسوم البكتيري ربما يفسر أن هذه الجينات تكون محمولة على عوامل قافزة ولكنه من الصعب توضيح العلاقة بين أنزيمات البيتالاكتاميز SHV-5 وبين هذه العوامل القافزة **(Jacoby & Sutton ,1991; Venezia *etal.*,1995).**

3-1 آليات انتقال جينات المقاومة The mechanism of Gene Resistance Transfer

1-3-1 الاقتران البكتيري Bacterial Conjugation

هي عملية انتقال أحادي الجانب للمادة الوراثية بين الخلايا البكتيرية العائدة لنفس الجنس أو الأجناس المختلفة ،وتعتبر البلازميدات من العوامل الوراثية التي تنتقل بطريقة الاقتران وبتردد عالي جداً ،إذ تتطلب عملية الانتقال هذه وجود نوع من الجينات تدعى ***tra* genes** تكون محمولة على البلازميدات المنتقلة ذاتياً (**Greenwalt & Whiteside,1975**) .تتميز بعض البلازميدات المنتقلة ذاتياً بقابليتها على تحريك بلازميدات أخرى غير منتقلة ذاتياً (Non-transmissible plasmids) أو قطع من الكروموسوم لغرض نقلها إلى الخلايا المستلمة وذلك بسبب مقدرة ***tra* gene** على أداء الوظيفة الوراثية المهمة لغرض النقل (**Brooks *etal.*, 1998**) .تتطلب عملية الاقتران البكتيري التماس المباشر بين الخلية الواهبة (Donor cell) والخلية المستلمة (Recipient cell) حيث تمتاز الخلية الواهبة باحتوائها على عامل الخصوبة (F^+) (Fertility factor) (**Clewell, 1994**) .تنتقل البلازميدات وغيرها من قطعDNA من خلال النبيبات البروتينية المتكونة بين الخليتين المتصلتين من الخلية الواهبة إلى الخلية المستلمة ،وهكذا فان سلسلة من الجينات المحددة للمقاومة لواحد أو اكثر من المضادات الحيوية قد تنتقل من الخلايا المقاومة إلى الحساسة ،وان هذا النوع من الانتقال يكون غير حساس لفعالية أنزيم DNase مما يميزه عن عملية النقل بالعاثي (Transduction) أو عملية التحول الوراثي (Transformation) (**Jacob & Hobbs,1974; Old & Primrose, 1994**) . تعتبر هذه الطريقة من الطرق الشائعة لانتقال صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية بين الأجناس المختلفة للعصيات السالبة لصبغة غرام والأجناس الموجبة للصبغة (**Perry & Staley, 1994; Okeke *etal.*, 1999; Dinah & Christine, 2000**) .يتم في بعض الأحيان انتقال بلازميدات أخرى اصغر حجماً من البلازميدات الاقترانية وتنتقل بترددات قليلة جداً وغير محسوسة في حالة غياب البلازميدات الاقترانية وتدعى مثل

هـذه البلازميـدات بالبلازميـدات غيـر المقترنـة **(Mc Donnell *etal.*, 1983; Naidoo,1984)**

اتسعت قابلية انتقال صفة المقاومة للمضادات الحيوية بين أنواع البكتيريا حيث أن انتقالها عن طريق الاقتران البكتيري يعد من اكثر الطرق شيوعاً في انتشار المقاومة للمضادات الحيوية بين البكتيريا التي تعيش في بيئة واحدة إذ يعمل التماس الخلوي على نقل البلازميدات الاقترانية أو نقل مورثات لبلازميدات غير اقترانية وذلك بارتباطها بالبلازميدات الاقترانية وهي الأكثر شيوعاً بين بلازميدات البكتيريا المعوية **(Willets,1985)** .أشارت العديد من الدراسات التي أجريت في أواخر عام 1970 وبدايات عام 1980 إلى أن انتقال بلازميدات المقاومة للمضاد الحيوي الجنتامايسين بين سلالات النوع الواحد والأنواع المختلفة من المكورات العنقودية يتم بتردد عالي بطريقة الاقتران البكتيري **(Naidoo & Noble,1978; Naidoo & Noble,1981; Forbes & Schaberg, 1983)** .كما أن انتقال البلازميدات الاقترانية المسؤولة عن صفة المقاومة للمضادات الامينوكلايكوسيدية والعائدة للعائلة pU3626 وpSk41 وكذلك البلازميدات غير الاقترانية العائدة للعائلة pSH6 يتم بطريقة الاقتران البكتيري بين عزلات بكتيريا ***S.aureus*** **(Byrene *etal.*, 1990)**. كما بينت الدراسات الوراثية إمكانية انتقال البلازميدات المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحيوية التتراسايكلين والستربتومايسين والسلفوناميد من نوع إلى آخر في جنس بكتيريا ***Shigella*** بطريقة الاقتران حيث أن لأغلب بلازميدات هذا الجنس صفة الانتقال الذاتي التي تنتقل من خلالها البلازميدات من خلية إلى أخرى ماعدا البلازميدات الكبيرة الحجم والتي يتراوح وزنها الجزيئي بين 120-140 ميكا دالتون.

1-3-2 التحول البكتيري Bacterial transformation

هي عملية الانتقال المباشرللـ DNA البكتيري يؤدي إلى تغيير المادة الوراثية للخلية المستلمة ،وتعتمد هذه العملية على قابلية الخلية المستلمة على التأهل لاستلام DNA الغريب**(Waltson *etal.*,1983)**.إن الظهور الطبيعي لهذا النوع من الانتقال يعتبر حالة نادرة بين الأنواع البكتيرية وان بعض السلالات تمتلك القابلية على التحول فقط في حالة وجود عوامل الكفاءة (Competence factors) والتي تنتج فقط عند مرحلة خاصة من مراحل دورة النمو البكتيري **(Brooks *etal.*,1998)**.إن عملية التحول البكتيري هي خطوات فعالة

ونشطة جداً ،تتطلب وجود أنزيمات خاصة تنتج من قبل الخلايا المستلمة ،وتعتمد كفاءة الخلايا البكتيرية المستلمة على وجود بعض الأحماض الأمينية مثل الارجنين

وحامض الكلوتاميك وظهور مستحضرات خاصة على الخلايا تدعى عوامل التأهل وهي مواد بروتينية صغيرة الوزن الجزيئي ذات شحنات موجبة لتسهل ارتباط جزيئاتDNA السالبة الشحنة **(Stent & Galendar, 1978;Tait, 1997)**.من الممكن إجبار الخلايا التي لا تمتلك القابلية على التحول الطبيعي لاستلام الـ DNA بلازميدي بتعريضها إلى صدمة حرارية وتراكيز عالية من كلوريد الكالسيوم المبرد لان هذه المعاملة تزيد من كفاءة التأهل

تمتلك جزيئات DNA بشكلها الفيزياوي المعزول أو الناتج عن تحلل بكتيريا أخرى تعيش في نفس البيئة قابلية الانتقال بهذه الطريقة حيث أن عملية اخذ DNA الحر أو الطليق من قبل الخلية يؤدي إلى تغير في تركيبة المورثات لتلك الخلية ومنحها صفات إضافية محمولة على تلك القطعة ،وقد تندمج تلك القطع مع كروموسوم الخلية المستقبلة في حالة وجود تماثل بين القطعتين وتصبح جزء من كروموسوم الخلية

(Miller,1972 ; Hanahan,1983). تعاني الخلايا الواهبة تغيرات أخرى في جدرانها وأغشيتها ،حيث تفتح الثغرات في الجدران نتيجة زيادة فعالية الأنزيمات المحللة ذاتياً وبالتالي نضوح العديد من الأيونات إلى خارج محيط الخلايا مما يؤدي إلى زيادة فعالية تحلل الـ DNA عند سطح الخلايا ،بينما تعمل أغشية الخلايا المستلمة عكس ذلك إذ تزداد الأجسام الغشائية الوسطية mesosomes والتي لها القدرة على الارتباط بالـ DNA والعمل على نقله إلى داخل الخلايا المستلمة **(Lamanna *etal.*, 1973; Greenwalt & Witeside ,1975; Pelczar *etal.*, 1977)**

1-4- الوبائية Epidemiology

1-4-1 وبائية البكتيريا السالبة لصبغة غرام

Epidemiology of Gram-Negative Bacteria

تعزى المقاومة للمضادات الحيوية في الأنواع المختلفة من البكتيريا السالبة لصبغة غرام إلى الانتشار الواسع لبلازميدات المقاومة بين الأنواع المختلفة،كما أن الاستخدام الواسع والعشوائي للمضادات الحيوية وخصوصاً عن الأشخاص الراقدين في المستشفيات يؤدي إلى اختزال الكائنات الحساسة للمضادات الحيوية وتحفيز نمو وظهور البكتيريا المقاومة لها **(Shooter *etal.*,1971 ; Rahal *etal.*,1997 ; Reyes *etal.*, 1997).**

تعتبر بكتيريا ***E.coli*** المخمرة لسكر اللاكتوز من بين أفراد العائلة المعوية والتي تعزل من التربة والمياه والمجاري كما أنها تتواجد كنبيت طبيعي في الأمعاء .تصبح هذه البكتيريا مرضية عند انتقالها إلى غير مكان تواجدها الطبيعي فهي مسؤولة عن 75% من حالات اخماج المجاري البولية **(Worth, 1982)**،كما أنها تسبب حالات التجرثم الدموي عند عبورها من المجرى البولي إلى المجرى الدموي **(Jawetz *etal.*,1980)**.تمتلك بعض العزلات القابلية على إنتاج ذيفانات معوية (Enterotoxins) مستقرة حرارياً (ST) وغير مستقرة حرارياً (LT) ومشفرة من قبل بلازميدات اقترانية حيث تدعى هذه العزلات Enterotoxigenic ***E.coli*** (ETEC) وتسبب الإسهال الصيفي عند الرضع **(الجزراوي, 1996)** .

تمتاز بكتيريا ***E.coli*** بمقاومتها العالية للمضادات الحيوية إذ أبدت العديد من سلالات هذه البكتيريا مقاومة عالية للمضاد أمبسلين مع زيادة في قيم MICs المحسوبة كما أن مقدرة هذه البكتيريا على إنتاج أنزيم البنسلينيز أدى إلى زيادة نسب مقاومتها لمضادات البيتالاكتام **(Atkinson & Lorian ,1984; Arstila *etal.*,1991).**

بينت العديد من الدراسات الوبائية أن تردد اخماج المرضى الراقدين في المستشفيات والناتج عن أنواع بكتيريا ***Klebsiella*** قد ازداد تدريجياً خلال السنوات العشرين الأخيرة (**Levin Whitfield, 1995; *etal.*, 1995; Reese *etal.*, 2000).** تعتبر بكتيريا ***K.pneumoniae*** واحدة من أهم المسببات لأخماج المرضى الراقدين في المستشفيات وخصوصاً عند المرضى الضعفاء وأنها مسؤولة عن حالات قليلة من حالات ذات الرئة التي عادة ما يصعب معالجتها **(Levin *etal.*,1993; Levin *etal.*,1995).**كما أنها تسبب

أخماج المجاري البولية والتجرثم الدموي (**Brooks *etal.*,1998**) . تعد هذه البكتيريا من الممرضات الانتهازية السالبة لصبغة غرام ، تبدي اغلب عزلاتها مقاومة للعديد من المضادات الحيوية إذ تمتلك هذه البكتيريا العديد من عوامل الضراوة التي تزيد من إمراضيتها مثل قابليتها على إنتاج المحافظ والأهداب ومقاومتها للمصول إضافة إلى إنتاجيتها العالية لطبقة متعدد الببيتد الشحمي والسيدروفور (**Roantree, 1967; Maskell & Allen, 1997**) . تمتاز هذه البكتيريا بمقاومتها العالية لأغلب المضادات الحيوية وعلى الخصوص المضادات الامينوكلايكوسيدية (**Brooks *etal.*, 1998**). ترتبط مقاومة هذه البكتيريا لمضادات البيتالاكتام مع قابليتها على إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز SHV-5 الذي يشفر إليه بواسطة جينات محمولة على بلازميدات اقتراني يعود إلى عائلة pACM1 (**Karen *etal.*,1997**) . أبدت العديد من عزلات بكتيريا ***K. pneumoniae*** مقاومة للمضادات الامينوكلايكوسيدية والسيفالوسبورينات نتيجة لقابلية هذه البكتيريا على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف المشفرة على نفس البلازميدات المسؤولة عن المقاومة للمضادات الامينوكلايكوسيدية (**Wallace *etal.*, 1995**).كما بينت العديد من الدراسات الوراثية المقاومة العالية التي أبدتها سلالات هذه البكتيريا لمضادات سيفتازيديم وازوترنيم ومضادات السيفالوسبورين الواسعة الطيف (**Legakis *etal.*, 1995; Burwen *etal.*, 1994**) .

تضم العائلة المعوية كذلك بكتيريا ***Proteus*** بأنواعها المختلفة مثل ***P. vulgaris*** و ***P. mirabilis*** وتتواجد في التربة ومياه المجاري وأمعاء الإنسان ونادراً ما تعتبر الغازي الأول ومع ذلك فإنها تسبب حالات التهابية مثل التهاب الأذن الوسطى والالتهابات الجلدية (**Schabery & Turck, 1991**)، كما أنها تعتبر من ممرضات الجهاز البولي ويساعد بذلك إفرازها أنزيم (اليوريز) المحطم لليوريا وتسبب حالات التجرثم الدموي عند وصولها إلى مجرى الدم أما عن طريق المجرى البولي أو من الجروح العميقة أو حتى من التهابات الأذن المزمنة (**Prescott *etal.*,1990**).

يعد التهاب الأمعاء –المعدي (Gastro-enteritis) واحد من اكثر المظاهر السريرية الخاصة بأخماج بكتيريا ***Salmonella*** (**Miller *etal.*,1995**) .تسبب الإصابات بهذه البكتيريا سلسلة من الإصابات الثانوية التي قد تؤدي إلى الوفاة خصوصاً عند مرضى العوز المناعي (Immunocompromised patients) (**Hook,1961**).

تعد بكتيريا ***S. typhimurium*** المسبب الرئيسي للإسهال والتجرثم الدموي لدى الأشخاص

المصابين بمرض نقص المناعة الفيروسي HIV (**Glaser *etal.*,1985**). أبدت عزلات هذه البكتيريا مقاومة عالية لمضادات البيتالاكتام بسبب مقدرتها على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز نوع OXA,TEM,CARB في حين أن مقاومتها لمضادات البنسلين تعود إلى تغيير نفاذية الغشاء الخلوي (**Gallardo *etal.*, 1999**). أشارت العديد من الدراسات إلى أن المحددات الوراثية المسؤولة عن مقاومة بكتيريا ***S. typhimurium*** للمضادات سيفتازيديم واميكاسين وستربتومايسين وتتراسايكلين وتلك المسؤولة عن عوامل الضراوة المسؤولة عن إحداث الإصابة في هذه البكتيريا تكون محمولة على نفس البلازميدات الاقترانية (**D'Aoust, 1991; Gows & Brozel , 2000**) ، وأوضحت دراسات أخرى أن المقاومة المشتركة التي أبدتها عزلات هذه البكتيريا للمضادات أمبسلين وكلورامفينكول وستربتومايسين وسلفوناميد وتتراسايكلين تكون محدداتها الوراثية محمولة على نفس العلب الجينية المعزولة من هذه البكتيريا في مناطق مختلفة من العالم (**Casin *etal.*, 1999; Ridley & Threlfall, 1998**)

تعد بكتيريا .***Shigella* spp** المسبب الرئيسي للزحار البكتيري في اغلب الدول المتقدمة ، كما أنها تعتبر مشكلة كبيرة للعديد من الدول النامية والفقيرة (**Makino *et al.*,1988**). تمتلك هذه البكتيريا العديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من إحداث الإصابة مثل مقدرة خلاياها على الاختراق والتضاعف داخل نسيج الخلايا الطلائية في الإنسان إضافة إلى قابليتها على إفراز الذيفانات الخلوية مثل ذيفات الشيكلا والذيفات المعوية والذيفانات الخارجية (**Simmons, 1971; Freeman, 1985; Rowe & Gross, 1986**). وجد خلال الفترة 1950-1957 في اليابان أن نسبة قليلة من سلالات هذه البكتيريا كانت مقاومة لواحدة أو اكثر من المضادات الحيوية المستخدمة وازدادت هذه النسبة خلال عام 1960 إذ لوحظت مقاومة عالية للعديد من المضادات الحيوية وأصبحت صفة المقاومة المتعددة من أهم مميزات هذه البكتيريا (**Hardy ,1987**). تحمل المورثات المسؤولة عن المقاومة المتعددة لهذه البكتيريا على بلازميدات اقترانية حيث أشارت العديد من الدراسات إلى احتواء بكتيريا ***Shigella*** على بلازميدات صغيرة وكبيرة الحجم ،تكون البلازميدات الكبيرة

مسؤولة عن ضراوة البكتيريا بينما تكون البلازميدات الصغيرة مسؤولة عن نقل المقاومة للمضادات الحيوية وقد تكون مسؤولة عن ضراوة البكتيريا في بعض عزلات ***S. dysenteriae*** (**Wantanabe & Timmis, 1984; Freeman , 1985; Brooks *etal.*, 1998**).

تعد بكتيريا ***S. marcescens*** مسبباً للإصابات المتكررة في غرف الأطفال الخدج وحديثي الولادة وفي وحدات العناية المركزة **(Sleigh ,1983)** ،كما أن لهذه البكتيريا القدرة على إحداث اخماج المجاري البولية الحادة في الإنسان وحالات التجرثم الدموي **(Franczek *etal.*, 1986; Palomar *etal.*, 1993)**. تمتلك هذه البكتيريا قدرة متزايدة على مقاومة الأجيال الحديثة من المضادات الحيوية وهذا ما أهلها لتكون مسبباً خطيراً للأوبئة والإصابات المرضية التي تصيب الإنسان **(Arakawa *etal.*, 2000; Queenan *etal.*,2000)** . كما تمتلك العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها على إحداث الإصابة مثل إنتاج الأنزيمات الخارج خلوية مثل البروتيز والكايتينيز والنيوكلييز والهيمولايسين إضافة إلى أنزيمات البيتالاكتاميز المحللة للعديد من المضادات الحيوية إذ أبدت هذه العزلات مقاومة عالية لمضادات البنسلين والسيفالوسبورين بسبب قابليتها على إنتاج أنزيم TEM الذي يشفر له بواسطة جينات بلازميدية **(Perilli *etal.*, 1997)** ،أما مقاومتها لمضادات البيتالاكتام الحديثة مثل كاربابنيم واميبنيم فتعزى إلى مقدرتها على إنتاج أنزيم TMP-1 **(Goto *etal.*, 1997; Queenan *etal.*,2000)**.إن لهذه البكتيريا المقدرة على مقاومة المضادات الامينوكلايكوسيدية من خلال إنتاجها أنزيم AAC(6)TV الذي يشفر له بواسطة جينات بلازميدية **(Katoh-Kanno *etal.*,1986)**.تحمل اغلب جينات المقاومة للمضادات الحيوية في هذه البكتيريا على بلازميدات اقترانية مما يزيد من فرص انتشار المقاومة بين الأنواع المختلفة وبالتالي زيادة خطورة هذه البكتيريا **(Arakawa *etal.*,1995; Hedges,1980)**.

أما بالنسبة لبكتيريا ***P. aeruginosa*** فهي من الممرضات الانتهازية للإنسان والمعروفة بمقاومتها العالية للعديد من المضادات الحيوية المختلفة التركيب **(Li & Pool, 1999)**. تعتبر هذه البكتيريا من ملوثات المستشفيات المعروفة والتي اصبح وجودها من المشاكل الرئيسية التي يعاني منها الكادر الطبي كما أنها تعتبر من الممرضات

الانتهازية الثانوية ،وتزداد نسبة الإصابة بها في حالات نقص المناعة والأورام السرطانية وبعد عمليات نقل الأعضاء وفي حالات الإصابة المختلطة **(Schabery&Turck, 1991)**.تسبب هذه البكتيريا الالتهابات الجلدية وتحت الجلدية الحادة عند المصابين بحروق خطيرة وقد تتطور الحالة إلى التجرثم الدموي **(Brooks *etal.*,1998)**.تنتج هذه البكتيريا العديد من العوامل الضراوة الخارج خلوية مثل السموم الخارجية نوع SoA وعدد من الأنزيمات مثل بروتيز وليسيثنيز وهيمولايسين والاستيز **(Woods &**

(Iglewski,1983;Vasil,1986) .تمتلك بكتيريا ***P.aerugiuosa*** مدى واسع من المقاومة للعديد من المضادات الحيوية وقد شخصت هذه الخاصية على أنها نتيجة لفعالية نظام تدفق Effleux system عالي الخصوصية للمضادات الحيوية بالإضافة إلى النفاذية القليلة للغشاء الخلوي **(Lee *etal.*, 1994 ; Nikaidio, 1996)** .أبدت العديد من عزلات هذه البكتيريا مقاومة عالية لمضادات الفلوروكوينولين والكاربابنيم والمضادات الامينوكلايكوسيدية وخصوصاً المضاد اميكاسين **(Senda *etal.*, 1996)** ،حيث وجد أن العزلات السريرية العائدة لهذه البكتيريا تمتلك مقاومة مكتسبة لهذه المضادات **(Arakawa, 2000)**. كما بينت الدراسات أن اغلب عزلات هذه البكتيريا تمتلك الجينات المشفرة لأنزيمات البيتالاكتاميز وان هذه الجينات ممكن أن تنتقل إلى أنواع أخرى من البكتيريا السالبة لصبغة غرام (**Brooks *etal.*,1998; Reese *etal.*, 2000).**

2-4-1 وبائية البكتيريا الموجبة لصبغة غرام

Epidemiology of Gram-Positive Bacteria

تعد المكورات العنقودية Staphylococci واحدة من أهم الممرضات التي تصيب الإنسان فهي مسؤولة عن العديد من الإصابات التي تتراوح من ظهور الدمامل على الجلد وحتى حالات التجرثم الدموي **(Thomson-Carter *etal.*, 1992)** ، تعد بكتيريا ***S. aureus*** واحدة من اخطر الممرضات التي تصيب الإنسان فهي المسؤولة عن العديد من حالات الالتهابات الجلدية ،التسمم الغذائي الستافيلي،اخماج القناة البولية ،التهابات بطانة القلب، إصابات العين والأذن والتهاب صمام القلب الولادي **(Kloos & Bannerman, 1995)**.تمتلك هذه البكتيريا العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها في إظهار مرضيتها مثل إنتاج الأنزيمات الخارج خلوية مثل هيالورونيديز

وستافيلوكينيز وأنزيم التجلط والكاتليز إضافة إلى عدد من الذيفيات الداخلية والخارجية مثل الهيمولايسين و ذيفان متلازمة الصدمة - 1 (TSS-1) (Toxic shock syndrome) والاكسوفلافنيت وليوكوسيدين والذيفانات المعوية نوع (A-E) فضلاً عن إنتاجيتها للطبقة المخاطية الخارج خلوية (ESS) (Extracellular slime substances) **(Wilcox *etal.*, 1991)**.

تعد بكتيريا ***S.aureus*** المقاومة للميثسلين (MRSA) والمشخصة في العديد من المستشفيات المسؤول الأول عن الزيادة العددية في اخماج المرضى الراقدين في المستشفيات **(Wenzell *etal.*, 1991)**. تمتلك هذه البكتيريا القابلية على مقاومة مضادات البيتالاكتام وذلك

بسبب قابليتها على إنتاج كميات كبيرة من أنزيم البنسلينيز الذي يعمل على التحليل الجزئي لهذه المضادات مما يؤدي إلى ظهور صفة المقاومة لها **(McDougal & Thornsberry,1986; Hiramatsu, 1995)** ،كما تتميز هذه البكتيريا بمقاومتها العالية للعديد من المضادات الحيوية الأخرى ،فقد أشارت العديد من الدراسات إلى المقاومة التي أبدتها سلالات هذه البكتيريا للمضاد ميوبيروسين وتايكوبلاتين وان جينات المقاومة لهذه المضادات كانت محمولة على بلازميد اقتراني **(DelBene *etal.*,1986; Rahman *etal.*, 1987 ; Kenny *etal.*, 1991; Dyke *etal.*, 1991 ; Rahman *etal.*,1994)** . كما بينت دراسات أخرى أن المقاومة العالية التي تبديها سلالات المكورات العنقودية ***S. aureus*** بضمنها السلالات المقاومة للميثسلين (MRSA) تجاه مضادات البيتالاكتام تعود إلى قابلية هذه السلالات على إنتاج كميات كبيرة من البروتينات الرابطة للبنسلين (PBP2a) التي تعمل على تقليل ألفة الارتباط لتلك المضادات إضافة إلى قابليتها على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز **(Hayes *etal.*, 1981 ; Hartman & Tomasz, 1984 ; Utsui & Yokota, 1985 . ; Kloos & Bannerman, 1995)**

الفصـــــل الثانـــــي
المواد
وطرائق العمل

المواد وطرائق العمل:

2- 1- الأجهزة والمواد المستخدمة:

2-1-1**الأجهزة المستخدمة:**

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة

-1	موصدة Autoclave	WEBECO GmbH-Germany
-2	ماصات دقيقة Automatic micropipette	ORGANON TEKNIKA-Belgium
-3	ميزان Balance	SARTORIOUS-U.K.
-4	جهاز تقطير Distiller	H-JURGENS CO.-Germany
-5	منبذة عالية السرعة Eppendrof centrifuge	HERMLE Z22q-Germany
-6	وحدة ترحيل كهربائي Gel electrophoresis unit	SANDON SCIENTIFIC CO. London
-7	حاضنة Incubator	GALLENKAMK-England
-8	مجهر ضوئي Light microscope	OLYMPUS-Japan
-9	فرن كهربائي Oven	MEMMERT-Germany
-10	جهاز قياس الحموضة pH-meter	PHILIPS-Holand
-11	ثلاجة Refrigerator	ISHTAR-Iraq
-12	ميزان إليكتروني حساس Sensitive electronic balance	SARTORIOUS-U.K.
-13	حاضنة هزازة Shaking incubator	MEMMERT-Germany
-14	جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer	SPECTRONIC 21 Bausch & Lomb
-15	مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV-Trans illuminator	SAN GABRIEL CA 91778-U.S.A.
-16	دوّارة Vortex	GRIFFIN &GEORGE Ltd-U.K.
-17	حمام مائي Water bath	MEMMERT-Germany

2-1-2 **المواد المستخدمة**

1- المواد الكيميائية:

ت	اسم المادة	الشركة المصنعة
-1	أثيلين-ثنائي أمين-رباعي حامض الخليك-ثنائي الصوديوم Na_2 –EDTA	BDH - Engla

-2	هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide (NaOH)	
-3	كلوريد الصوديوم Sodium Chloride (NaCl)	
-4	كبريتات دوديسيل الصوديوم Sodium dodecyl Sulphate (SDS)	
-5	خلات الصوديوم Sodium acetate	
-6	حامض الخليك الثلجي Glacial Acetic acid	
-7	كلوروفوم Chloroform	
-8	2-بروبانول 2-Propanol	
-9	حامض الهيدروكلوريك Hydrochloric Acid	
-10	حامض البوريك Boric acid	
-11	كلوريد البوتاسيوم Potassium Chloride	
-12	يوديد البوتاسيوم Potassium Iodide	
-13	كلوريد الكالسيوم Calsium Chloride	
-14	ايودين Iodine	
-15	اكاروز Agarose	
-16	خلات البوتاسيوم Potassium acetate	
-17	فينول Phenol	

-18	كحول اثيلي مطلق	Absolute ethanol	BDH –England
-19	كحول ايزواميلي	Isoamyl alcohol	
-20	لايسين	Lysin	
-21	ارجنين	Arginine	
-23	فنيل-الانين	Phenyl alanine	
-24	سكر الكلوكوز	D-Glucose	
-25	سكر السكروز	D-Sucrose	
-26	سكر الزايلوز	D-Xylose	
-27	سكر الرايبوز	D-Ribose	
-28	سكرالارابينوز	D-Arabinose	
-29	سكر المالتوز	D-maltose	
-30	سكر الساليسين	Salicin	
-31	سكر التريهالوز	Trehalose	
-32	صبغة البروموكريسول الارجوانية	Bromocresol purple	
-33	صبغة البروموفينول الزرقاء	Bromophenol blue	
-34	صبغة احمر المثيل	Methyl red	
-35	كلوريد المغنيسوم	Magnisium chloride	Tabb Laboratories England
-36	سكر المانيتول سكر الرامينور	D-Mannitol Rhaminose	DIFCO-U.S.A
-37	ترس القاعدي	Tris –base	FLUKA-Switzerland

-38	البلورات البنفسجية	Crystal violete	SIGMA-U.S.A
-39	بروميد الايثديوم	Ethidium bromide	
-40	صبغة الفينول الأحمر	Phenol red	
-41	صبغة السفرانين	Safranin-O	

2- الانزيمات

ت	اسم المادة		الشركة المصنعة
1	لايسوزايم	Lysozyme	BDH-England

3- المضادات الحيوية

A-أقراص المضادات الحيوية

ت	اسم المضاد		الرمز	التركيز ملي غرام/قرص	الشركة المصنعة
-1	سلفاميثاكسازول	Sulphamethoxazole	RL	25	OXOID-England
-2	كاربنسلين	Carbenicillin	CAR	100	
-3	كلوكساسلين	Cloxacillin	OB	5	
-4	بنسلينG	Penicillin G	P	10	
-5	سيفوتاكسيم	Cefotaxime	CTX	30	
-6	توبرامايسين	Tobramycin	Tob	10	
-7	نيومايسين	Neomycin	N	30	
-8	لينكومايسين	Lincomycin	MY	2	
-9	كلندامايسين	Clindamycin	DA	10	
-10	كلورامفينكول	Chloramphenicol	C	30	
-11	كوليستين	Colistin	CT	10	

-12	اموكسيسلين	Amoxycillin	AML	25	AL-RAZZI-Iraq
-13	امبسلين	Ampicillin	AMP	10	
-14	جنتامايسين	Gentamicin	J	10	
-15	سترتبومايسين	Streptomycin	S	10	
-16	ارثرمامايسين	Erythromycin	E	15	
-17	تتراسايكلين	Tetracycline	Te	30	
-18	ريفامبين	Rifampin	RD	5	
-19	ترايميثوبرايم-سلفاميثاكسزول	Trimethoprim-Sulphamethamethoxazole	SXT	25	BIO-ANALYSE
-20	امبيكلوكس	Ampiclox	AX	30	BECCHAM RESEARCH

B-مساحيق المضادات الحيوية

ت	اسم المضاد		الشركة المصنعة
-1	ارثرومايسين	Erythromycin	S.D.I-Iraq
-2	كلوكساسلين	Cloxacillin	
-3	اموكسيسيلين	Amoxycillin	
-4	لينكومايسين	Lincomycin	
-5	كلنداميسين	Clindamycin	
-6	تتراسايكلين	Tetracyclin	

-7	امبسلين	Ampicillin	KIMADIA-Iraq
-8	كاربنسلين	Carbenicillin	

-9	كوليستين Colistin	SIGMA-U.S.A
-10	ترايميثوبرايم-سلفاميثوكسزول Trimethoprime -Sulphamethoxazole	
-11	كلورامفينكول Chloramphenicol	
-12	سيفوتاكسيم Cefotaxime	
-13	ريفامبين Rifampin	
-14	جنتامايسين Gentamicin	Arab pharmaceutical - Manufacturing - Company Ltd. Sult, Jordan.
-15	نيومايسين Neomycin	
-16	بنسلين Penicillin	Wyeth-Holand
-17	ستربتومايسين Streptomycin	S. D. I. Iraq
-18	امبيكلوكس Ampiclox	

4- الأوساط الزرعية الجاهزة

ت	اسم الوسط	الشركة المصنعة

-1	الوسط المغذي الصلب Nutrient agar	OXOID-England
-2	وسط المرق المغذي Nutrient broth	
-3	وسط اساس الدم الصلب Blood agar base	
-4	وسط مولر-هنتون الصلب Mueller-Hinton agar	
-5	وسط اساس اليوريا الصلب Urea agar base	
-6	وسط ماكونكي الصلب MacConkey agar	DIFCO-U.S.A
-7	وسط كليكلر-ايرون الصلب Kligler's –iron agar	
-8	وسط سالمونيلا-شيكلا الصلب Salmonella-Shigella agar	BIOLIFE-Italy
-9	وسط تي سي بي اس الصلب TCBS agar	
-10	وسط احمر المثيل-فوكس بروسكاور السائل Methyl red-Vogas Proskauer broth	
-11	وسط سيمون –سترات الصلب Simmon Citrate agar	MEREK
-12	وسط خلاصة الخميرة –الترتبون الصلب Trypton-yeast Extract agar	APHA-U.S.A.
-13	جيلاتين Gelatin	Koch-light labora-tories LTD-England
-14	نشأ Starch	

5- العدة التشخيصية

استخدمت أشرطة نظام api-20E system و أشرطة نظام api-Staphylococcus system المصنع من قبل شركة Bio-Merieux الفرنسية لغرض التشخيص النهائي للعزلات قيد الدراسة.

2- 2- السلالات البكتيرية و البلازميدات.

ت	اسم السلالة البكتيرية	التركيب الوراثي والصفات	المصدر

		المظهرية	
1	***Escherichia coli* HB101**	F^-,gal^- ,$hsds^-$,LacY ,pro^- ,$recA^-$, repL ,SupE ,Sm^r	قسم التقنيات الإحيائية –كلية العلوم /جامعة بغداد
2	***Escherichia coli* MM294**	End A ,hsd M^+, hsd R^- ,SupE, th^{-r},Rif^r	
3	البلازميد **pBR322**	Am^r ,Tet^r , tra^-	

الرموز:

F^- عدم القابلية على عملية الاقتران

Gal^- عدم القابلية على تخمير سكر الكالاكتوز

$LacY^-$ طفرة في احد المورثات الواقعة في اوبرون اللاكتوز

Pro^- الحاجة إلى البرولين

recA- عدم القدرة على إعادة الارتباط

Repl طفرة في المورثات المشفر للوحدة الفرعية 30S لرايبوسومات البروتين L12.

SupE كتب شفرة امبير Amber

End A عجز كفاءة الاندونيوكليز

$Hsd\ M^+$ وجود أنظمة التحوير

Hsd R- عدم وجود أنظمة التقيد

Rif^r مقاومة للريفامبين

Amr مقاومة للامبسلين

Tetr مقاومة للتتراسايكلين

tra- عدم القابلية لانتقال DNA

2- 3- طرائق العمل

2- 3- 1- جمع العينات

جمعت 90 عينة من مياه الصرف الصحي لبعض مستشفيات محافظة بابل،والتي شملت مستشفى مرجان العام والمستشفى الجراحي ومستشفى الولادة والأطفال للفترة من1-8-2001م ولغاية 1-2-2002م ،بواقع 30 عينة لكل مستشفى وبمعدل 3-5 عينات شهرياً .تم جمع العينات وذلك بسحب 10 ملي لتر من مياه الصرف الصحي بواسطة محقنة طبية معقمة وإضافتها إلى 90 ملي لتر من المحلول الملحي الفسلجي المعقم . جمعت العينات داخل قناني ذات سدادات محكمة ومعقمة بالموصدة .

2- 3- 2- العزل الأولي للبكتيريا:

2- 3- 2- 1- المحاليل المستخدمة:

1- المحلول الملحي الفسلجي Normal saline

حضر بإذابة 0.85غرام من كلوريد الصوديوم NaCl في 100 ملي لتر من الماء المقطر .عقم بالموصدة بدرجة حرارة 121م وضغط1جو ولمدة 15دقيقة.

2-3-2-2 الأوساط الزرعية المستخدمة

1-وسط الدم الصلب

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة ،وبعد تعقيمه بالموصدة بدرجة 121مْ وضغط 1جو ولمدة 15 دقيقة،تم تبريده إلى درجة 55مْ ثم أضيف إليه دم الإنسان بنسبة 7 %، وزع الوسط على اطباق بتري وترك ليتصلب ثم حفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

2-الوسط المغذي الصلب

حضر الوسط حسب مواصفات الشركة المصنعة ، ثم عقم بالموصدة.

3-وسط ماكونكي الصلب

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة ، ثم عقم بالموصدة.

4-وسط سالمونيلا-شيكلا الصلب

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة ثم تم تسخينه لدرجة الغليان لغرض الإذابة الكلية لمحتويات الوسط ولغرض تعقيمه ،وبعد تبريده إلى درجة 55م تم صبه في إطباق بتري.

5-وسط TCBS الصلب

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة ثم عقم بالتسخين لدرجة الغليان.

2-3-2-3- طريقة العزل الأولي:

أجريت سلسلة من التخافيف لكل عينة من العينات المجموعة (10^{-1}-10^{-6})،ثم نشر 0.1 ملي لتر من كل تخفيف على الأوساط الزرعية المحضرة وذلك باستخدام ناشر زجاجي معقم Spreader، حضنت الأطباق بدرجة 37 مْ ولمدة 24-48 ساعة .درست الخصائص المظهرية للمستعمرات النامية على كل وسط ثم تم حساب إعداد الخلايا في كل عينة حسب المعادلة التالية.

$$\text{Colony Forming Unit (CFU) /ml} = \frac{\text{No. of colony X Volume}}{\text{Dilution}}$$

نقّيت المستعمرات وذلك بالتقاط مستعمرة مفردة لكل نوع وزرعها بطريقة التخطيط باستخدام ناقل حلقي معقم على الوسط الزرعي المغذي الصلب.كررت هذه العملية للتأكد من نقاوة المستعمرات المعزولة.

2- 3- 1- تشخيص العزلات البكتيرية:

بعد التأكد من نقاوة المستعمرات المعزولة أجريت مجموعة من الفحوصات المجهرية والبابوكيميائية لتشخيص الأنواع البكتيرية المعزولة وفقاً لما جاء في مصنف بيركي **. (Sneath *et al.*, 1986; MacFaddin, 2000)**

2-3-3-1- التشخيص المظهري:

شخصت المستعمرات النامية على الأوساط الزرعية مبدئياً اعتماداً على شكل المستعمرة وحجمها.اجري الفحص المجهري لكل مستعمرة لدراسة إشكال الخلايا واصطباغها وذلك بنقل جزء من المستعمرة بواسطة ناقل حلقي معقم إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وضعت عليها قطرة من المحلول الملحي الفسلجي(0.85%)،ونشرت على مساحة من سطح الشريحة .ثبتت باللهب وصبغت بصبغة غرام وفحصت مجهرياً.

2-3-3-2-الفحوصات البايوكيميائية.

1-المحاليل والكواشف المستخدمة:

- **محاليل السكريات الخزينة بتركيز(10%).**

تم إذابة 10 غرام من السكر المراد التحري عن قابلية البكتيريا على تخميره في 80 ملي لتر من الماء المقطر مع الرج الجيد لإتمام الإذابة ،ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر .عقمت

بطريقة الترشيح عبر مرشحات غشائية ذات قطر ثقوب 0.22 مايكروميتر إلى داخل قناني معقمة وحفظت في الثلاجة.

❖ **كاشف نيسلير. Nesseler's reagent (Cowan,1974)**

حضر بإذابة5 غرام من يوديد البوتاسيوم في 5 ملي لتر من الماء المقطر الخالي من الامونيا, ثم أضيفت قطرات من محلول كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ المشبع البارد إلى أن يبدأ تكون راسب قليل بعد عملية الرج .خفف المحلول إلى 100 ملي لتر بالماء المقطر الخالي من الأمونيا وحفظ في قناني معقمة تجنباً لتعرضه للضوء .يترك المحلول لمدة 24ساعة قبل الاستعمال.

❖ **كاشف كوفاكس Kovac's indole reagent (Baron &Finegold ,1990)**

حضر الكاشف بإذابة 10غرام من p-Dimethyl-aminobenzaldehyde (DMAB) في 150 ملي لتر من الكحول الأيزواميلي،قد تحتاج عملية الإذابة إلى القليل من التسخين ،ثم يضاف 50 ملي لتر من حامض الهيدروكلوريك HCLالمركز تدريجياً بحيث يصبح الحجم النهائي للكاشف 200 ملي لتر.

❖ **كاشف الأحمر المثيلي Methyl Red reagent**

حضر بإذابة 0.025 غرام من الأحمر المثيلي في 75 ملي لتر من الكحول الأثيلي (95%) ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر من الماء المقطر .حفظ الكاشف في قناني محكمة لحين الاستخدام.

❖ **كاشف النترات Nitrate reagent**

يتكون الكاشف من محلولين هما:

المحلولA: وحضر بإذابة 0.8 غرام من حامض السلفانيليك في 100 ملي لتر من حامض الخليك عياريته (5N).

المحلول B: وحضر بإذابة 0.5 غرام من α-naphthylamine في 100 ملي لتر من حامض الخليك (عيارتيه 5 N).

❖ **كاشف الاوكسديز Oxidase reagent(Blazevic &Ederer,1975)**

حضر الكاشف أنيا عند الاستخدام بإذابة 0.05 غرام من tetramethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride (TPD) في 10ملي لتر من الماء المقطر في قنينة معتمة.

❖ **كاشف كلوريد الحديديك المائي Aqueous ferric chloride**

حضر بإذابة 10 ملي غرام من كلوريد الحديديك $FeCl_3$ في 80 ملي لتر من الماء المقطر ثم يكمل الحجم إلى 100 ملي لتر ،حفظ في قناني ذات سدادات محكمة لحين الاستخدام.

❖ **كاشف غرام-ايودين المائي Aqueous Gram's iodine (Branson ,1972)**

حضر الكاشف بإذابة 0.25غرام من حبيبات الأيودين I_2 و 0.5 غرام من يوديد البوتاسيوم KI في 75 ملي لتر من الماء المقطر .رجت المحتويات جيداً لإتمام الإذابة ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر ثم رشحت من خلال ورق الترشيح Whatman No.3 وحفظ الكاشف في قناني معقمة لحين الاستخدام.

❖ **كاشف باريت Barritts reagent**

يتكون الكاشف من محلولين:-المحلول A: وحضر بإذابة 5 غرام منα- naphthol في 100 ملي لتر من الكحول الأثيلي المطلق.

المحلول B: وحضر من إذابة 40 غرام من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في 100 ملي لتر من الماء المقطر.

2- الأوساط الزرعية المستخدمة:

1-وسط اختبار تخمر السكريات Carbohydrate fermentation medium

يتكون الوسط من

Trypton	1 gm
Yeast extract	0.1 gm
Bromocresol purple	0.004 gm
Agar	0.2 gm

أذيبت هذه المكونات في 80 ملي لتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى(7) ثم أكمل الحجم إلى 90 ملي لتر بالماء المقطر .عقم الوسط بالموصدة ،وبعد تبريده إلى درجة 55 مْ أضيفت إليه 10 ملي لتر من المحلول الخزين للسكر المراد التحري عن قابلية البكتيريا على تخميره والمحضر في الفقرة (2-3-3) . أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر ليكون تركيز السكر النهائي في الوسط (1%) ماعدا سكر الساليسين فان تركيز السكر النهائي في الوسط هو (0.5%). وزع الوسط على أنابيب زجاجية معقمة ذات سدادات محكمة وبواقع 5 ملي لتر لكل أنبوبة.

2-وسط خلاصة الخميرة –التربتون الصلب Tryptone-Yeast Extract agar

حضر الوسط حسب مواصفات منظمة الصحة الأمريكية العامة(APHA, 1984).عقم الوسط بالموصدة وصب في إطباق بتري وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

3-وسط سيمون –ستريت الصلب Simmons Citrate agar (Ewing ,1986)

حضر الوسط حسب مواصفات الشركة المصنعة وزع الوسط على أنابيب زجاجية نظيفة ذات سدادات محكمة وعقمت بالموصدة .ترك الوسط ليتصلب على هيئة أوساط زرعية مائلة.

4- وسط فالكوز السائل Falkows decarboxylase base (Cowan,1974)

يتكون الوسط من :

Peptone	0.5 gm
Yeast extract	0.3 gm
Dextrose	0.1 gm
Lysine	0.5 gm
Bromocresol purple	0.002 gm

أذيبت مكونات الوسط في 90 ملي لتر من الماء المقطر عدل الرقم الهيدروجيني ،أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر .وزع الوسط على أنابيب اختبار نظيفة محكمة الغلق ،ثم عقم بالموصدة .استخدم الوسط أيضا في حالة الحامضين الأمينين الارجنين والأورنثين.

5-وسط الجيلاتين المغذي Nutrient gelatine stab (Becton ,1988)

يتكون الوسط من

Beef extract	0.3 gm
Peptone	0.5 gm
Gelatine (12%)	12 gm

أذيبت مكونات الوسط في 75 ملي لتر من الماء المقطر مع التسخين لدرجة 50مْ لإذابة محتوياته كلياً ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر ثم وزع على أنابيب اختبار نظيفة ذات سدادات محكمة وعقم بالموصدة ترك الوسط ليتصلب بوضع أفقي.

6-وسط الترتبوفان السائل Trytophan both (Baron & Finegold ,1990)

يتكون الوسط من

Tryptone	1 gm
NaCl	0.5 gm
D.W.	100 mL

وزع الوسط بعد تحضيره على أنابيب اختبار نظيفة ثم عقم بالموصدة .

7-وسط كليكلر –أيرون الصلب Kligler's iron agar (KIA)

حضر الوسط حسب مواصفات الشركة المجهزة ،وبعد تسخينه إلى درجة الغليان لإتمام إذابة محتوياته وزع على أنابيب اختبار نظيفة ثم عقم بالموصدة .ترك الوسط ليتصلب على هيئة أوساط زرعية مائلة.

8-وسط احمر المثيل –فوكس بروسكاور السائل

Methyl red-Vogous Proskauer broth (MR/VP)

حضر الوسط حسب مواصفات الشركة المصنعة ثم وزع على أنابيب اختبار وعقم بالموصدة.

9-وسط اختبار الحركة Motility test medium (Ewing ,1986)

يتكون الوسط من:

Peptone	0.1 gm
Beef extract	0.3 gm
NaCl	0.5 gm
Agar	0.4 gm
D.W.	100 mL

سخن الوسط لدرجة الغليان لإتمام إذابة محتوياته ،وزع على أنابيب اختبار نظيفة ،عقم بالموصدة وترك الوسط ليتصلب بوضع أفقي.

10-وسط النترات الصلب Nitrate agar (Difco,1984)

حضر الوسط من إذابة 2 غرام من الوسط المغذي الصلب و 0.1 غرام من نترات البوتاسيوم KNO_3 في 80 ملي لتر من الماء المقطر .سخن الوسط لإتمام الإذابة ثم عدل الرقم الهيدروجين إلى(6.8) ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر من الماء المقطر .وزع الوسط على أنابيب اختبار نظيفة ،ثم عقم بالموصدة وترك ليتصلب على هيئة أوساط زرعية مائلة.

11-وسط الكشف عن إنزيم دي امينيز

(Cowan ,1974) Deaminase test medium

يتكون الوسط من:

Phenylalanine	0.2 gm
Yeast extract	0.3 gm
NaCl	0.5 gm
$Na_2 HPO_4$	0.1 gm
Agar	1.2 gm
D.W.	100 mL

أذيبت مكونات الوسط بالتسخين ،وزع على أنابيب نظيفة ،وعقم بالموصدة ترك ليتصلب على هيئة أوساط زرعية مائلة.

12-وسط الكشف عن إنزيم ألفا-أميليز

(Finegold &Baron,1986) α-Amylase trst medium

حضر الوسط على مرحلتين:

المرحلة الأولى: تمت إذابة المكونات التالية في 50 مليلتر من الماء المقطر :

Peptone	0.5 gm
Beef exteact	0.3 gm
NaCl	0.5 gm
Agar	2 gm

المرحلة الثانية: تم فيها إذابة 20 غرام من النشأ في 50 مليلتر من الماء المقطر، ثم مزج محلول المرحلتين ثم وزع على أنابيب اختبار نظيفة ،عقم بالموصدة وترك الوسط ليتصلب على هيئة أوساط زرعية مائلة.

13- وسط اليوريا الصلب Urea base agar (Ewing ,1986)

حضر الوسط حسب مواصفات الشركة المصنعة وعقم بالموصدة .ترك ليبرد لدرجة حرارة 50مْ ثم أضيف إليه محلول اليوريا المعقم الجاهز وبنسبة 2% ،رج الوسط جيداً ثم وزع على أنابيب اختبار معقمة ذات سدادات محكمة وترك ليتصلب على هيئة أوساط زرعية مائلة.

3-طرائق العمل:

1- اختبار تخمر السكريات هوائياً

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط تخمر السكريات المحضر في الفقرة (2-3-3) بجزء من مستعمرة حديثة النمو للبكتيريا المراد اختبار قابليتها على تخمير السكريات هوائياً وبواقع مكررين لكل عزلة بكتيرية ،ترك أحد الأنابيب بدون تلقيح لاستخدامه كسيطرة سالبة .حضنت الأنابيب بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة . إن تغير لون الوسط من البنفسجي إلى الأصفر يعد نتيجة موجبة.

2-الكشف عن إنزيم الكاتليز(Garcia *etal*.,1980) نميت العزلات المراد اختبار قابليتها على إنتاج إنزيم الكاتليز بطريقة التخطيط على وسط خلاصة الخميرة –التربتون

الصلب المحضر في الفقرة (2-3-3) وحضنت الأطباق بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة.بعد ظهور النمو تم تغطية سطح الوسط بطبقة من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 تركيز (3%) ، أن ظهور فقاعات الأوكسجين يعتبر نتيجة موجبة.

3-اختبار استهلاك السترات.

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط سيمون –ستريت الصلب المحضر في الفقرة (2-3-3) بجزء من مستعمرة فتية من البكتيريا المراد اختبار قابليتها على استهلاك السترات كمصدر وحيد الكاربون .حضنت الأنابيب بدرجة 37 م لمدة 24-48 ساعة ،وفي حالة عدم ظهور النتيجة تترك لمدة 4 أيام تغير لون الوسط إلى الأزرق يعتبر نتيجة موجبة.

4-الكشف عن إنزيم الديكاربوكسليز

نقلت البكتيريا المراد اختبار قابليتها على إنتاج انزيم Decarboxylase إلى الأنابيب الحاوية على وسط فالكوز السائل المحضر في الفقرة (2-3-3) .حضنت الأنابيب بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة ، وفي حالة عدم ظهور النمو تترك الأنابيب لمدة 4 أيام .ينقل مقدار مليء ناقل

حلقي من النمو الظاهر إلى 0.5 ملي لتر من الماء المقطر الخالي من الأم ونيا ثم تضاف إليه قطرة من كاشف نيسلر المحضر في الفقرة(2-3-3). إن ظهور اللون البني يعتبر نتيجة موجبة.

5-الكشف عن انزيم الجيلاتينيز.

طعنت الأنابيب الحاوية على وسط الجيلاتين المغذي المحضر في الفقرة (2-3-3) ولعمق ½ انج بمستعمرة حديثة العمر من البكتيريا المراد اختبار قابليتها على إنتاج إنزيم الجيلاتينيز .حضنت الأنابيب بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة -14 يوم تفحص الأنابيب كل 24ساعة وذلك بوضع الأنابيب في حمام ثلجي لمدة ساعتين .إن تميؤ الجيلاتين وعدم تجمد الوسط يعتبر نتيجة موجبة.

6-اختبار الأندول:

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط التربتوفان السائل المحضر في الفقرة (2-3-3)بجزء من مستعمرة فتية من البكتيريا المراد اختبار قابليتها على فصل الاندول من الترتبوفان حضنت الأنابيب بدرجة 37مْ لمدة 24-48 ساعة.أضيفت 5قطرات من كاشف كوفاكس المحضر في

الفقرة (2-3-3) إلى النمو الظاهر في الأنابيب ورجت الأنابيب جيداً.إن ظهور حلقة الاندول الحمراء يدل على نتيجة موجبة .

7-اختبار كليكر –ايرون

نقل جزء من مستعمرة فتية للبكتيريا المراد دراسة مدى قابليتها على الارتباط بسكريات خاصة موجودة في الوسط مع أو بدون إنتاج غاز ومدى قابليتها على إنتاج كبريتيد الهيدروجين H_2S إلى الأنابيب الحاوية على وسط كليكر –ايرون المحضر في الفقرة (2-3-3).حضنت الأنابيب بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة . أن تحول لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر يعتبر نتيجة موجبة .

وتقرأ النتائج من أعلى الأنبوب إلى أسفله وكالتالي:

Alkaline /Alkaline	،	Acid / Acid
Acid / Alkaline	،	Alkaline / Acid

كما أن تشقق الوسط أو ارتفاعه عن موضعه دلاله على إنتاج الغاز في حين أن ظهور اللون الأسود على سطح الوسط يعتبر دلالة على إنتاجية غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S.

8-اختبار احمر المثيل

نقل جزء من مستعمرة فتية للبكتيريا المراد اختبار مدى قابليتها على إنتاج والمحافظة على النواتج الحامضية النهائية الناتجة من تخمر السكريات إلى وسط MR/VP المحضر في الفقرة (2-3-3) .حضنت الأنابيب بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة وبعد ظهور النمو تم إضافة 5قطرات من كاشف احمر المثيل المحضر في الفقرة (2-3-3) مباشرة إلى النمو .إن تحول لون الوسط إلى الأحمر يعتبر نتيجة موجبة.

9-اختبار قابلية البكتيريا على الحركة

طعنت الأنابيب الحاوية على وسط اختبار الحركة المحضر في الفقرة(2-3-3) بجزء من مستعمرة حديثة العمر للبكتيريا المراد اختبار قابليتها على الحركة ولعمق ½ انج .حضنت الأنابيب بوضع أفقي بدرجة 37مْ ولمدة 24-48 ساعة .يعد انتشار النمو البكتيري نتيجة موجبة.

10-اختبار اختزال النترات:

نقل جزء من مستعمرة فتية من البكتيريا المراد تحديد قابليتها على اختزال النترات NO_3 إلى نتريت NO_2 أو إلى غاز النتروجين الحر $N_2\uparrow$ إلى وسط اختزال النترات السائل المحضر في الفقرة (2-3-3) .حضنت الأنابيب في حمام مائي بدرجة 37 مْ ولمدة 24 ساعة. أضيف كاشف النترات المحضر في الفقرة (2-3-3) **[** 5 قطرات من المحلول A ثم 5 قطرات من المحلول B**]**.إن ظهور اللون الأحمر يعتبر نتيجة موجبة.

11-الكشف عن إنزيم الاوكسديز

وضعت قطرة من كاشف الاوكسديز المحضر في الفقرة (2-3-3) على ورقة ترشيح بيضاء ، ثم نقل جزء من مستعمرة فتية للبكتيريا المراد تحديد قابليتها على إنتاج إنزيم الاوكسديز إلى موضع القطرة بواسطة ناقل خشبي معقم .إن تغير لون الكاشف إلى اللون البنفسجي يعتبر نتيجة موجبة.

12-الكشف عن إنزيم الدي امينيز

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط الكشف عن إنزيم الدي امينيز المحضرة في الفقرة (3-2-3) بجزء من مستعمرة فتية من البكتيريا المراد اختبار قابليتها على إنتاج إنزيم الدي امينيز.حضنت الأنابيب بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة .أضيفت 4-5 قطرات من كاشف كلوريد الحديديك المائي المحضر في الفقرة (2-3-3) مباشرة إلى النمو .يعد ظهور اللون الأخضر خلال 1-5 دقائق نتيجة موجبة.

13- الكشف عن إنزيم الالفا-أميليز

نقل جزء من مستعمرة حديثة العمر للبكتيريا المراد تحديد قابليتها على إنتاج انزيم ألفا-امينيز الى وسط الكشف عن التحليل المائي للنشاً المحضر في الفقرة (2-3-3) . حضنت الأنابيب بدرجة 37 مْ لمدة 24-48 ساعة .بعد ظهور النمو أضيفت قطرات قليلة من كاشف غرام-ايودين المائي المحضر في الفقرة (2-3-3) .رجت الأنابيب بهدوء لضمان انتشار الكاشف في الوسط إن ظهور اللون الأزرق يعتبر نتيجة موجبة.

14-الكشف عن إنزيم اليوريز

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط أساس اليوريا الصلب المحضر في الفقرة (2-3-3) بجزء من مستعمرة فتية من البكتيريا المراد اختبار مدى قابليتها على إنتاج إنزيم اليوريز.حضنت الأنابيب بدرجة 37مْ لمدة 6-24 ساعة .تم فحص الأنابيب في نهاية كل ساعة حيث أن تحول لون الوسط إلى الأحمر يعتبر نتيجة موجبة.

15- اختبار فوكس - بروسكاور

نقل جزء من مستعمرة فتية للبكتيريا المراد اختبار قابليتها على إنتاج النواتج النهائية المتعادلة مثل الأسيتون والاستيل مثيل كاربنيول من تخمر السكريات إلى وسط MR/VP المحضر في الفقرة (2-3-3) .حضنت الأنابيب بدرجة 37مْ لمدة 24ساعة .بعد ظهور النمو أضيفت قطرات من كاشف باريت المحضر في الفقرة (2-3-3) [6 قطرات من المحلول A ثم قطرتين من المحلول B] إن ظهور حلقة وردية اللون يعتبر نتيجة موجبة.

2-3-3-3- التشخيص التأكيدي باستخدام عدة

aِpi 20 –E ,api-Staphylococcus

لغرض التأكد النهائي للتشخيص استخدمت العدة التشخيصية الجاهزة api 20 –E , api Staphylococcus المجهزة من قبل شركة Bio Merieux حيث تم نقل عدد من المستعمرات المفردة من العزلات المراد تأكيد تشخيصها إلى أنبوبة معقمة حاوية على 5 ملي لتر من المحلول الملحي الفسلجي المعقم مع مزجها جيداً للحصول على عالق بكتيري ،حضنت في درجة 37مْ لمدة نصف ساعة .تم ملء حفر الشريط الخاص بالعدة بواسطة معلق البكتيريا وحضنت الأشرطة بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة .قرأت النتيجة والتي على ضوءها حدد رقم متسلسل يشير إلى نوع البكتيريا قيد التشخيص بالرجوع إلى الكتاب الخاص المجهز من قبل الشركة المصنعة.

2-3-4-حفظ وإدامة السلالات

أولاً : الحفظ قصير الأمد

نميت العزلات البكتيرية على الوسط المغذي الصلب ووسط TCBS الصلب وحضنت الأطباق بدرجة 37مْ ولمدة 24 ساعة ثم حفظت في الثلاجة بعد أحاطتها بشريط (Para film).

ثانياً:-الحفظ لمدة ثلاثة اشهر

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب بجزء من مستعمرة فتية للبكتيريا قيد الدراسةوحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة,ثم حفظت في أكياس نظيفةووضعت في الثلاجة.

ثالثاً:-الحفظ طويل الأمد

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي السائل بجزء من مستعمرة فتية من البكتيريا قيد الدراسة وحضنت الأنابيب بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة ثم حفظت بالكليسرول تركيز 15 % وبدرجة - 20 مْ.

2-3-5-الحساسية الدوائية (Bauer *etal.*,1966).

أجرى اختبار الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة تجاه 20 نوع من المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام في المستشفيات المحلية والموضحة في الفقرة (2-1-2-3) .تم أجراء الاختبار بطريقة الأقراص (Agar disk diffusion method)

2-3-5-1-الأوساط الزرعية المستخدمة :

1-وسط مولر – هنتون الصلب

حضر الوسط حسب مواصفات الشركة المصنعة وعقم بالموصدة.

2-3-5-2-طريقة العمل:

1-تم زراعة العزلات المراد اختبارها على الوسط المغذي الصلب وبطريقة التخطيط وحضنت بدرجة 37 مْ ولمدة 18 ساعة .

2-نقلت 2-3 مستعمرات من طبق الاكار المغذي إلى أنبوبة معقمة حاوية على 5 ملي لتر من المحلول الملحي الفسلجي(الفقرة 2-3-2-1).رجت الأنبوبة جيداً حتى تم الحصول على عالق بكتيري متجانس .قرأت الكثافة الضوئية للعالق باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) وعلى طول موجي 540 نانوميتر .تم تعديل قراءة الكثافة

الضوئية إما بإضافة مستعمرات جديدة أو بتخفيف العالق بالمحلول الملحي الفسلجي المعقم حتى نصل إلى كثافة ضوئية مقدارها 0.1

3-نشر 0.1 ملي لتر من العالق البكتيري على وسط مولر هنتون الصلب باستخدام ناشر زجاجي معقم وترك الطبق لمدة 1-2 دقيقة.

4-نقلت أقراص المضادات الحيوية بواسطة ملقط معقم إلى سطح وسط مولر –هنتون الصلب المزروع وبواقع5-6 أقراص لكل طبق .حضنت الأطباق بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة .

5-تم قياس مناطق التثبيط المتكونة حول كل قرص من أقراص المضادات الحيوية بواسطة المسطرة ومقارنتها مع الجداول القياسية لتحديد حساسية أو مقاومة العزلات البكتيرية وفقاً لما ورد في (NCCl,1990).

2-3-6-اختبار قابلية العزلات على إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز

استخدمت طريقة اليود القياسية السريعة (Rapid iodomeetric method) في الكشف عن قابلية البكتيريا قيد الدراسة على إنتاج إنزيم البيتالاكتاميز β-Lactamase .

2-3-6-1-المحاليل المستخدمة.

1-محلول داري الفوسفات : ويتكون من محلولين:

المحلول A: حضر بإذابة 3.12 غرام من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين المائية ($NaH_2PO_4.2H_2O$) في 90 ملي لتر من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى 100 ملي لتر

المحلول B :حضر بإذابة 2.84 غرام من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين (Na_2HPO_4) في 90 ملي لتر من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر.

مزج 28 ملي لتر من محلول A مع 72 ملي لتر من المحلول B لغرض تحضير دارئ الفوسفات ذي الرقم الهيدروجيني 7.2 ثم أكمل الحجم إلى 200 ملي لتر .

2-محلول بنسلين G:

حضر المحلول أنيا وذلك بإذابة 0.6غرام من مسحوق المضاد الحيوي البنسلين G في 60 ملي لتر من دارئ الفوسفات المحضر في الفقرة السابقة وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر .عقم المحلول بالترشيح عبر مرشحات غشائية ذات قطر ثقوب 0.22 مايكروميتر إلى داخل قنينة زجاجية معقمة ومعتمة.

3-محلول النشا الذائب:

حضر المحلول انياً بإذابة 1 غرام من مسحوق النشا في 90 ملي لتر من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر .وضعت القنينة في حمام مائي بدرجة 100 مْ لمدة 10 دقائق مع الرج لإتمام الإذابة.

4-محلول كاشف اليود:

حضر بإذابة 2.03 غرام من اليود (Iodine) و5.32 غرام من يوديد البوتاسيوم (KI) في 90 ملي لتر من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر .حفظ الكاشف في قنينة معتمة بدرجة 4 مْ.

2-3-6-2-طريقة العمل:

1-تم نقل عدد من المستعمرات الفتية النامية على الوسط المغذي الصلب بواسطة ناقل معقم إلى أنابيب ابندروف حاوية على 100 مايكروليتر من محلول بنسلين G المحضر في الفقرة (2-1-6-3-2) .حضنت الأنابيب بدرجة 37 مْ لمدة 30 دقيقة.

2-أضيف 50 مايكروليتر من محلول النشا المحضر في الفقرة (2-3-6-1) ورجت الأنابيب جيداً.

3-أضيف 20 مايكروليتر من محلول كاشف اليود المحضر في الفقرة (2-3-6-1) ورجت الأنابيب جيداً لضمان تجانس محتويات الأنبوبة .ينتج عن هذه الإضافة ظهور لون ازرق غامق بسبب تفاعل اليود مع النشا.

4-إن التغير اللوني السريع من الأزرق إلى الأبيض يعتبر نتيجة موجبة.

2-3-7-استخلاص الـ DNA البلازميدي (Sambrook *etal.*,1989)

استخدمت طريقة التحليل بالقاعدة (Alkaline lysis) لاستخلاص الـ DNA البلازميدي لثلاث عزلات عائدة لكل نوع من الأنواع البكتيرية قيد الدراسة والتي تميزت بمقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية المدروسة.

2-3-7-1-المحاليل والأوساط الزرعية المستخدمة :

1-دارئ الكلوكوز Glucose buffer

Glucose	0.05 M
Tris-HCL	0.025 M
Na_2-EDTA	0.01 M

يتكون من:

عدل الأس الهيدروجيني إلى (8) باستخدام (NaOH) وعقم بالموصدة.

2-محلول 1%ٍ SDS القاعدي و0.2M هيدروكسيد الصوديوم .

حضر المحلول انياً قبل الاستعمال وذلك بإذابة 0.5 غرام من SDS في 40 ملي لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.2M (NaOH) ثم اكمل الحجم إلى 50 ملي لتر من المحلول.

3-محلول خلات البوتاسيوم (Potassium acetate 5 M)

يتكون من :

Potassium acetate 5M	60 ml
Glacial acetic acid	11.5 ml
D.W	28.5 ml

عدل الأس الهيدروجيني إلى (5.8) باستخدام (NaOH).

4-دارئ Tris-EDTA

يتكون من :

Tris –base	0.05 M
Na_2-EDTA	0.001 M

عدل الأس الهيدروجيني إلى(7) باستخدام HCL وعقم بالموصدة.

5-محلول Saline –EDTA

يتكون من :

NaCl	0.15 M
Na_2-EDTA	0.1 M

عدل الأس الهيدروجيني إلى (8) باستخدام (NaOH) وعقم بالموصدة.

6-محلول إنزيم اللايسوزايم

حضر انياً قبل الاستعمال بإذابة 5 ملي غرام من الإنزيم في 1 ملي لتر من دارئ الكلوكوز (التركيز النهائي 5ملغم /ملي لتر).

7-محلول الفينول:

أذيب وزن مناسب من بلورات الفينول داخل قنينة معقمة وذلك بوضعها في حمام مائي بدرجة 68 مْ.سحب 100 ملي لتر من الفينول ونقل إلى قنينة معقمة نظيفة حيث أضيف إليه 0.1 غرام من المادة المضادة للأكسدة 8-hydroxyquinoline ومزجت جيداً بالرج .أضيف حجم مساو من محلول Tris-HCL 0.5 M(PH8) إلى الفينول ومزج جيداً بجهاز الدوارة (Vortex) وبدرجة حرارة الغرفة ثم ترك المزيج فترة مناسبة ليستقر وينفصل إلى طبقتين ،الطبقة المائية إلى الأعلى وطبقة الفينول إلى الأسفل .سحبت الطبقة العليا بواسطة ماصة باستور وأهملت وأضيف حجم مماثل من Tris-HCL 0.1 M(PH 8) إلى الفينول وأعيدت العملية عدة مرات مع مراعاة قياس الرقم الهيدروجيني لطبقة الفينول بواسطة ورق قياس الرقم الهيدروجيني (pH-paper) لحين وصولها إلى الرقم الهيدروجيني (7.8) .حفظ المحلول في قنينة في الثلاجة.

8-مزيج الفينول – الكلورفورم – الكحول الايزواميلي:

حضر المحلول بمزج محلول الفينول – الكلورفورم – الكحول الايزواميلي بنسبة (1:24:25) وحفظ تحت طبقة من محلول Tris –HCL 0.1 M في عبوة زجاجية معتمة وبدرجة 4مْ.

9-وسط يوريا – بيرتاني السائل:

يتكون الوسط من:

Trypton	10 gm
Yeast extract	5 gm
NaCl	5 gm

أذيبت هذه المكونات في 90 ملي لتر من الماء المقطر .عدل الأس الهيدروجيني إلى (7.2) باستخدام HCL ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر من الماء المقطر وعقم بالموصدة .

2-7-3-2-طريقة العمل:

1-لقح الوسط المغذي الصلب بمستعمرة بكتيرية مفردة من البكتيريا قيد الدراسة ونشرت بطريقة التخطيط وحضنت الأطباق بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة.

2-تم نقل جزء من مستعمرة مفردة من المستعمرات البكتيرية النامية على سطح الوسط المغذي الصلب إلى أنبوبة اختبار حاوية على 2 ملي لتر من الوسط لوريا السائل المحضر في الفقرة (2-3-7-1) والحاوي على المضاد الحيوي الملائم .حضنت الأنابيب بدرجة 37مْ في حاضنة هزازة ولمدة 24 ساعة.

3- نقل 250 مايكروليتر من المزروع البكتيري أعلاه لتلقيح 250 ملي لتر من وسط لوريا السائل المعقم الحاوي على المضاد الحيوي الملائم .حضنت الدوارق في حاضنة هزازة بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة.

4-وزع المزروع على أنابيب سعة 25 ملي لتر ثم رسب عالق الخلايا بجهاز النبذ المركزي المبرد بسرعة 7000دورة /دقيقة ولمدة 10دقائق.

5-أهمل الرائق وعلق راسب الخلايا في 10 ملي لتر من دارئ الكلوكوز المحضر في الفقرة (2-3-7-1)

[ملاحظة: في حالة الأنواع الموجبة لصبغة غرام يعلق راسب الخلايا في 10 ملي لتر من دارئ الكلوكوز المضاف إليه محلول اللايسوزايم المحضر في الفقرة (2-3-7-1) .

أما في حالة بكتيريا ***K.pneumoniae*** فقد علق راسب الخلايا في 10 ملي لتر من محلول Saline –EDTA المحضر في الفقرة (2-3-7-1) وأعيد نبذها .كررت هذه العملية مرتين قبل إضافة دارئ الكلوكوز].

6-أضيف 10 ملي لتر من محلول 1% SDS القاعدي و 0.2 مولر هيدروكسيد الصوديوم المحضر في الفقرة (2-3-7-1)وقلب عدة مرات لمزج محتويات الأنبوب ثم ترك في حمام ثلجي لمدة 10دقائق.

7-أضيف 7.5 ملي لتر من محلول 5 مولر خلات البوتاسيوم المحضر في الفقرة (2-3-7-1)والمبرد لدرجة الانجماد وقلب عدة مرات لمزج محتويات الأنبوب جيداً ثم أعيد إلى الحمام الثلجي وترك لمدة 15 دقيقة.

8-وزع المحلول على أنابيب ابندورف معقمة ونبذ بجهاز النبذ المركزي (Eppendorf centrifuge) بسرعة 15000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق.

9-نقل الرائق إلى أنابيب جديدة ومعقمة سعة 25 ملي لتر ،ثم أضيف إليه 0.6-0.7 حجم من 2-propanol.

ومزجت جيداً ،وتركت الأنابيب لمدة 24 ساعة في درجة الصفر المئوي إذ نلاحظ ترسب خيوط DNA في المحلول.

[ملاحظة: في حالة بكتيريا ***K.pneumoniae*** تم نقل 0.5 ملي لتر من الرائق وأضيف إليه حجم مساو من محلول الفينول –الكلوروفورم –الكحول الايزواميلي المحضر في الفقرة (1-2-3-7) ومزج جيداً ثم نبذ مركزياً كما في الفقرة السابقة ،نقلت الطبقة العليا إلى أنبوب ابندورف جديد ومعقم وتركت الطبقتان الوسطى والسفلى .كررت هذه العملية عدة مرات ثم أضيف محلول 3 مولر خلات الصوديوم الثلجي المحضر في الفقرة (2-3-7-1) والمبرد لدرجة الانجماد بنسبة 1:10 إلى الراشح الحاوي على الـ DNA البلازميدي ومزج جيداً ثم أضيفت مادة 2-Propanol].

10-نبذ الخليط مركزياً بسرعة 15000دورة /دقيقة لمدة 10 دقائق .أهمل الرائق وغسل راسب الـ DNA بواحد ملي لتر من 70% كحول اثيلي وتركت الأنابيب بوضع مقلوب على ورق نشاف نظيف وفي درجة حرارة الغرفة لكي تجف.

11-أذيب راسب الـ DNA في 50 مايكرولتير من دارئ Tris-EDTA المحضر في الفقرة (2-3-7-1) وحفظ بدرجة حرارة 20مْ لحين الاستخدام.

2-3-8 الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز:

استخدمت طريقة (**Sambrook *etal.*,1989**) لفحص الـ DNA المحضر سابقاً.

2-3-8-1-المحاليل والصبغات المستخدمة:

1-محلول خزين لدرايء TBE (Tris-borate-EDTA)

حضر هذا المحلول بتركيز مضاعف عشر مرات (10X)عن التركيز المستخدم في عملية الترحيل الكهربائي.

حضر المحلول من المكونات التالية:

Tris-base	0.089M
Boric acid	0.089 M
Na_2 -EDTA	0.002M

أذيبت هذه المكونات في 900 ملي لتر من الماء المقطر .عدل الرقم الهيدروجيني إلى (8) باستخدام NaOH ثم أكمل الحجم إلى 1000ملي لتر .عقم بالموصدة وحفظ في الثلاجة.

2-دارئ التحميل Loading buffer (**Maniatis *etal.*, 1982**)

يتكون من:

Sucrose	40%
Bromophenol blue	0.25%

مزج المحلول وحفظ في قنينة معقمة بدرجة حرارة الغرفة .

3-صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide

حضر المحلول الخزين بتركيز 5 ملغم /ملي لتر وذلك بإذابة 0.05 غرام من مسحوق الصبغة في 10 ملي لتر من الماء المقطر داخل قنينة معقمة. مزج المحلول جيداً بواسطة جهاز الـ (Vortex) لإتمام الإذابة .غلفت القنينة بواسطة ورق ألمنيوم.

2-3-8-2-طريقة العمل:

تم الكشف عن المحتوى البلازميدي للسلالات قيد الدراسة بعملية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز وكما يلي:-

1-حضر محلول (1X)TBE [بتخفيف المحلول TBE المحضر في الفقرة (2-3-8-1-1) بنسبة 10:1 وذلك بأخذ 10 ملي لتر من محلول (10X)TBE وإكمال الحجم إلى 100 ملي لتر باستخدام الماء المقطر.

2-حضر هلام الاكاروز بتركيز 0.8% وذلك بإذابة 0.8 غرام من مسحوق الاكاروز في 100 ملي لتر من محلول TBE(1X) المحضر أعلاه .ترك ليبرد لدرجة 50 مْ ثم أضيف إليه 2 مايكرولتير من محلول صبغة بروميد الاثيديوم .

3-تم تهيئة قالب صب الهلامي (Tray) وذلك بإحاطة حافتاه المفتوحتان بواسطة شريط لاصق عريض مع تثبيت المشط (Comb) قرب أحد نهايتيه وعلى بعد (1 سم) من طرف القالب وذلك لغرض تكوين الحفر (Wells) .افرغ الهلام في قالب الصب بهدوء لمنع تكون فقاعات هوائية في القالب مع مراعاة وضع القالب على سطح مستوي لضمان تجانس سمك الهلام وترك لكي يتصلب.

4-رفع المشط بعناية بعد التأكد من تصلب الهلام ،ورفع الشريط اللاصق من جوانب قالب الصب ،نقل القالب إلى حوض جهاز الترحيل الكهربائي (Tank) الذي سبق وان ملئ بمحلول TBE(1X) بحيث يغمر سطح الهلام كلياً ويرتفع عنه بسمك قدره 1 ملي متر.

5-حضر نموذج DNA المراد تحميله وذلك بمزج 15 مايكروليتر من نموذج DNA مع 3 مايكروليتر من دارئ التحميل المحضر في الفقرة (2-3-8-2) ونقل إلى أحد حفر الهلام.

6-رحلت نماذج DNA في البداية باستخدام قوة فولتيه منخفضة لحين خروج صبغة التحميل من حفر هلام الاكاروز ثم رفعت الفولتية.

7- بعد مرور حوالي ساعة ونصف تم فحص مواقع حزم الـ DNA المستخلص باستخدام صندوق الأشعة فوق البنفسجية (U.V.-Transilluminator) عند طول موجي مقداره 350 نانوميتر.

8-تم تصوير الهلام باستخدام كاميرا نوع كانون مزودة بفلاتر وأفلام نوع كوداك .

2- 3- 9- الاقتران البكتيري:

تم اعتماد طريقة (**O'connel,1984**) لدراسة قابلية العزلات المنتخبة قيد الدراسة العائدة للأنواع السالبة والموجبة لصبغة غرام على نقل مورثاتها المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضادات الحيوية بطريقة الاقتران البكتيري إلى بكتيريا-9-1- ***E.Coli* HB101Sm^r**

2-3الأوساط الزرعية المستخدمة:

1-وسط لوريا –بيرتاني السائل:

حضر الوسط كما ورد في الفقرة (2-3-7-1-9).

2-الأوساط الزرعية الانتخابية الحاوية على المضادات الحيوية.

تم تحضير وسط مولر –هنتون الصلب حسب تعليمات الشركة المصنعة ووزع على دوارق مخروطية سعة 250 مل .عقم الوسط بالموصدة ثم ترك ليبرد لدرجة 50مْ. أضيفت محاليل المضادات الحيوية المبينة تفاصيل تحضيرها في الجدول رقم (2-1)+ محلول المضاد Streptomycin بتركيز نهائي 100 مايكروغرام /مل .مزجت الأوساط جيداً ثم وزعت على اطباق بتري وبواقع 20 ملي لتر لكل طبق مع مراعاة تعليم الأطباق.

جدول رقم (2-1) يمثل تراكيز المحاليل الخزينة والنهائية للمضادات الحيوية المضافة إلى الأوساط الزرعية.

ت	المضادات الحيوية	المذيب المستخدم	تركيز المحلول الخزين(ملغم/ملي لتر)	التركيز النهائي المستخدم (مايكروغرام /ملي لتر)
-1	Trimethoprim-Sulphamethoxazole	Acetone	5	50
-2	Carbenicillin	Distilled water	10	50
-3	Cloxacillin	Distilled water	10	100
-4	Amoxycillin	Distilled water	10	100
-5	Penicillin G	Distilled water	10	50
-6	Ampicillin	Distilled water	10	100
-7	Cefotaxime	Distilled water	10	50
-8	Neomycin	Distilled water	10	50
-9	Gentamicin	Distilled water	10	100
-10	Streptomycin	Distilled water	10	100
-11	Erythromycin	Absolute Ethanol	5	100
-12	Lincomycin	Distilled water	5	100
-13	Clindamycin	Distilled water	10	100
-14	Tetracyclin	Absolute Ethanol	5	20
-15	Chloramphenicol	Absolute Ethanol	5	100
-16	Colistin	Absolute Ethanol	10	50
-17	Rifampin	Acetone	10	100

2-3-9-2-طريقة العمل:

1- نميت الخلايا الواهبة Donor cells الحاوية على البلازميد المراد نقله والخلايا المستلمة (Recipient cells) التي تمثل خلايا بكتيريا ***E.coli*** **HB101 Sm^r** الخالية من أي بلازميد كلاً على حدة في 5 ملي لتر من وسط لوريا السائل .حضنت الانابيب في حاضنة هزازة بدرجة 37 مْ بسرعة 60 دورة /دقيقة لمدة 18 ساعة.

2- نقل 1.5 ملي لتر من مزروع الخلايا الواهبة و 0.5 ملي لتر من مزروع الخلايا المستلمة إلى أنبوبة معقمة ومزجتا معاً، وحضنت بدرجة 37مْ لمدة ساعتين مع مراعاة عدم تحريك الأنبوبة إثناء الحضن.

3-لغرض حساب العدد الكلي للخلايا المستلمة ،أجريت تخافيف عشرية من مزروع الخلايا المستلمة، ثم نقل 0.1 ملي لتر من التخافيف (10^{-5}-10^{-8}) إلى سطح وسط مولر –هنتون الصلب، ونشر بواسطة ناشر زجاجي معقم .حضنت الأطباق بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة.

4-رج مزيج الخلايا الواهبة والخلايا المستلمة بعد انتهاء فترة الحضن لمدة دقيقتين لإنهاء عملية الاقتران وفصل الخلايا عن بعضها .نقل 0.1 ملي لتر من مزروع الخلايا الناتجة عن عملية الاقتران إلى الأوساط الانتقائية المحتوية على المضادين (المميز للخلايا الواهبة مع المميز للخلايا المستلمة)، ونشر بواسطة ناشر زجاجي معقم .حضنت الأطباق بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة .تم حساب إعداد الخلايا المقترنة.

5-تم حساب تردد الاقتران من المعادلة التالية:

$$\text{تردد الاقتران} = \frac{\text{عدد الخلايا المقترنة}}{\text{عدد الخلايا المستلمة}}$$

6- نميت الخلايا المقترنة (Transconjugants)على الأوساط الانتقائية المناسبة للحفاظ على ثبوتية البلازميدات المنتقلة إليها واستمرار توارثها.

7-نشر 0.1 ملي لتر من المزروع الأصلي للخلايا الواهبة والخلايا المستلمة كلاً على حدة على الأوساط الانتقائية الحاوية على المضادات الحيوية وذلك كسيطرة موجبة وسالبة.

8-تم استخلاص DNA البلازميدي من الخلايا المقترنة وكذلك من الخلايا الواهبة والمستلمة كما ورد في الفقرة (2-3-7) وترحيله كهربائياً كما ورد في الفقرة (2-3-8).

2- 3- 10- التحول البكتيري:

اعتمدت الطريقة المثبة في (**Sambrook *etal.*,1989**)لإجراء عملية التحول البكتيري.

2-3-10-1-المحاليل المستخدمة:

1-محلول الكلوكوز (1 M)

حضر بإذابة 1.8 غرام من سكر الكلوكوز في 90 ملي لتر من الماء المقطر والمعقم ثم اكمل الحجم إلى 100 ملي لتر .عقم بالترشيح عبر مرشحات غشائية ذات قطر ثقوب 0.22 ملي لتر.

2-محلول كلوريد المغنيسيوم ($MgCl_2$ 0.02 M)

حضر بإذابة 0.4 غرام من كلوريد المغنيسيوم المائي $MgCl_2.6H_2O$ في 90 ملي لتر من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى 100 ملي لتر. عقم بالموصدة.

3-محلول كلوريد البوتاسيوم (KCl 0.25 M) حضر بإذابة 1.86 غرام من كلوريد البوتاسيوم في 80 ملي لتر من الماء المقطر .عدل الأس الهيدورجيني إلى (7)بواسطة NaOH ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر من الماء المقطر.

4-محلول كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$ 0.1 M):

حضر بإذابة 1.47 غرام كلوريد الكالسيوم في 90 ملي لتر من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر .عقم بالموصدة وحفظ في قنينة ذات سدادة محكمة بدرجة -20 مُ لحين الاستخدام.

2-3-10-2-الأوساط الزرعية المستخدمة :

1-وسط SOB السائل:

يتكون من:

Tryptone	2.0 gm
Yeast extract	0.5 gm
NaCl	0.05 gm

أذيبت هذه المكونات في 90 ملي لتر من الماء المقطر ثم أضيف إليه 1 ملي لتر من محلول كلوريد البوتاسيوم (KCl 0.25 M) .عدل الأس الهيدروجيني إلى (7) باستخدام NaOH ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر من الماء المقطر وعقم بالموصدة .ترك ليبرد ثم أضيف إليه 1 ملي لتر من محلول المضاد الحيوي الملائم و 0.5 ملي لتر من محلول كلوريد المغنيسيوم ($MgCl_2$ 2M) المعقم قبل الاستعمال.

2- وسط SOC السائل:

يتكون من:

Trypton	2 gm
Yeast extract	0.5 gm
Glucose (1M)	2 ml
NaCl	0.05 gm

أذيبت هذه المكونات في 90 ملي لتر من الماء المقطر ثم أضيف إليه 1 ملي لتر من محلول كلوريد البوتاسيوم (KCL 0.25 M).عدل الأس الهيدروجيني إلى (7) باستخدام NaOH ثم أكمل الحجم إلى 100 ملي لتر من الماء المقطر وعقم بالموصدة .

[ملاحظة : لتحضير وسط SOB الصلب ووسط SOC الصلب يضاف الاكار بنسبة 2% قبل التعقيم].

3-الوسط الزرعي الحاوي على المضاد الحيوي:

حضر وسط مولر-هنتون الصلب المضاف إليه المضاد ستربتومايسين بتركيز نهائي 100 ملغم/ملي لتر ،كما حضر وسط مولر-هنتون الصلب المضاف إليه محاليل المضادات الحيوية المحضرة في الجدول رقم (2-1) كل على حدة.

2-3-10-3-طريقة العمل:

أولاً: تأهيل خلايا بكتيريا *E.coli* HBl0l Sm^r لاستخدام الـ DNA البلازميدي.

1-نميت السلالة القياسية ***E.coli*** **HBl0l** Sm^r الخالية من البلازميد على الوسط المغذي الصلب الحاوي على المضاد الحيوي ستربتومايسين والمحضر في الفقرة (2-2-10-3)وزرعت بطريقة التخطيط .حضنت الأطباق بدرجة 37 مْ لمدة 18 ساعة .تم نقل جزء من مستعمرة مفردة إلى أنبوبة اختبار حاوية على 2 ملي لتر من وسط لوريا السائل المحضر في الفقرة(2-3-7) ، وحضنت بدرجة 37مْ لمدة 18 ساعة.

2-نقل 1 ملي لتر من النمو الظاهر في وسط لوريا السائل أعلاه إلى 50 ملي لتر من وسط SOB السائل المحضر في الفقرة (2-3-10-2) . حضن بدرجة 37مْ لمدة 3 ساعات في حاضنة هزازة بسرعة 80 دورة /دقيقة.

3-بعد انتهاء فترة الحضن تم قراءة الامتصاصية للمزروع أعلاه بجهاز المطياف الضوئي وعلى طول موجي 600 نانوميتر بحيث تكون القراءة 0.3-0.5 . يراعي في حالة عدم

الوصول إلى هذه القراءة إعادة المزروع إلى الحاضنة لفترة زمنية أطول ،وتخفيف النمو في حالة تجاوز القراءة عن هذه الحدود.

4-وزع المزروع على أنابيب معقمة سعة 15 ملي لتر ذات سدادات محكمة وبواقع 10 ملي لتر لكل أنبوبة .رسب عالق الخلايا بجهاز النبذ المركزي المبرد لدرجة 4مْ ولمدة 5 دقائق بسرعة 4000 دورة /دقيقة.

5-أهمل الرائق وتركت الانابيب بوضع مقلوب على ورق نشاف معقم لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة لغرض التخلص من بقايا الرائق.

6-علق راسب الخلايا في 4 ملي لتر من محلول كلوريد الكالسيوم المبرد ($CaCl_2$ 0.1M) المحضر في الفقرة (2-3-10-1).وضعت الانابيب في حمام ثلجي لمدة 30 دقيقة ثم نبذ المزيج مركزيا بسرعة 4000 دورة /دقيقة ولمدة 5 دقائق.

7-أهمل الرائق وتركت الأنابيب بوضع مقلوب على ورق نشاف معقم للتخلص من بقايا الرائق.

8-علق راسب الخلايا المؤهلة أعلاه ب 0.4 ملي لتر من محلول كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$ 0.1 M) المحضر في الفقرة (2-3-10-1-4) .حفظت الأنابيب الحاوية على الخلايا المؤهلة بدرجة 4مْ لمدة 42-72 ساعة.

ثانياً: التحول البكتيري:

1-نقل عالق الخلايا المؤهلة إلى ثلاثة أنابيب ابندورف معقمة وبواقع 0.2 ملي لتر لكل أنبوبة .أضيف إلى الأنبوب الأول 10 مايكروليتر من DNA البلازميدي المعزول كما ورد في الفقرة (2-3-7)،والى الأنبوب الثاني 10 مايكروليتر من DNA البلازميد pBR322 المبين في الفقرة (2-2)كسيطرة موجبة والى الأنبوب الثالث 10 مايكروليتر من دارئ Tris-EDTA المحضر في الفقرة (2-3-7-1) كسيطرة سالبة .حضنت الأنابيب في حمام ثلجي لمدة 30 دقيقة.

2-تعريض الأنابيب إلى صدمة حرارية تم وضعها في حمام مائي بدرجة 42 مْ لمدة دقيقتان ثم نقلت إلى حمام ثلجي لمدة دقيقتين .أخرجت من الحمام الثلجي ثم أضيفت إلى كل أنبوب 0.8 ملي لتر من وسط SOC السائل المحضر في الفقرة (2-3-10-2) .حضنت الأنابيب في حاضنة هزازة بسرعة 60 دورة /دقيقة بدرجة 37 مْ لمدة 60 دقيقة.

3-أجريت تخافيف عشرية لمزارع الخلايا أعلاه (10^{-1}-10^{-6}).نشر 0.1 ملي لتر من كل تخفيف على وسط SOB الصلب المحضر في الفقرة (2-3-10-2)باستخدام ناشر زجاجي معقم .حضنت الأطباق بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة.

4-تم انتقاء الهجائن اعتماداً على صفة مضاد الحيوي الملائم باستعمال تقنية العيدان الخشبية للإنسان (Pick & Patch) حيث نقلت مستعمرات منفردة بواسطة عيدان خشبية معقمة إلى أوساط زرعية انتخابية حاوية على المضادات الحيوية ووسط حاوي على المضاد الحيوي الستربتومايسين والمحضر في الفقرة (2-3-10-2-3) ووسط بدون مضاد حيوي .حضنت الأطباق بدرجة 37 مْ ولمدة 24 ساعة.

5-تم حساب أعداد المستعمرات المتحولة (Transformants) والعدد الكلي للخلايا المؤهلة لغرض حساب تردد التحول حسب المعادلة التالية:

$$\text{تردد التحول} = \frac{\text{عدد الخلايا المتحولة}}{\text{العدد الكلي للخلايا المؤهلة}}$$

6-تم استخلاص الـ DNA البلازميدي للخلايا المتحولة كما ورد في الفقرة (2-3-7)ورحل كهربائياً كما ورد في الفقرة (2-3-8).

2- 3- 11- تحييد البلازميدات (Trevor ,1986)

تم استخدام مادتي كبريتات دودوسيل الصوديوم (Sodium Dodecyl Sulphate) (SDS) وحامض السالسليك (Salicylic acid) كعوامل محيدة (Curing agents)

2- 3- 11- 1- المحاليل المستخدمة:

1-محلول مادة SDS

حضر محلول خزين لمادة SDS بتركيز نهائي 16% وذلك بإذابة 16 غم من مادة SDS في 90 ملي لتر من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى 100 ملي لتر ،وضع في قناني معقمة ذات سدادات محكمة وحفظ بدرجة حرارة الغرفة.

2-محلول حامض السالسليك

حضر محلول خزين بتركيز نهائي 20 ملغم /ملي لتر من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى 100 ملي لتر .عقم بالترشيح عبر مرشحات غشائية ذات قطر ثقوب 0.22 ملي متر إلى قناني معقمة وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

2- 3- 11- 2- الأوساط الزرعية المستخدمة:

1-الأوساط الانتخابية الحاوية على المضادات الحيوية

حضر وسط مولر-هنتون الصلب حسب تعليمات الشركة المصنعة ووزع على دوارق مخروطية، وعقم بالموصدة ثم ترك ليبرد لدرجة 50 مْ .أضيف إلى كل دورق أحد محاليل المضادات الحيوية المبينة تفاصيل تحضيرها في الجدول رقم(2-1) ،ثم وزعت هذه الأوساط الحاوية على محاليل المضادات الحيوية على إطباق بتري وبواقع 20 ملي لتر لكل طبق (مع

مراعاة تعليم كل مجموعة من الأطباق الحاوية على مضاد حيوي معين بعلامة دالة) . كما حضرت إطباق زجاجية حاوية على وسط مولر –هنتون الصلب بدون إضافة أي مضاد حيوي إليه لاستخدمها كسيطرة سالبة.

2-وسط لوريا-بيرتاني السائل الحاوي على العوامل المحيدة.

A: تم تحضير أنابيب معقمة حاوية على 5 ملي لتر من وسط لوريا –بيرتاني السائل المحضر في الفقرة (2-3-7-1) والمضاف إليه محلول كبريتات دوديسيل الصوديوم SDS المحضر في الفقرة (2-3-11-1) وبتراكيز نهائية

% 0.4	% 0.2	% 0.1	% 0.05
% 2	% 1	% 0.8	% 0.6
% 16	% 8	% 6	% 4

B:تم تحضير أنابيب معقمة حاوية على 5 ملي لتر من وسط لوريا- بيرتاني السائل المضاف إليه حامض السالسليك المعقم المحضر في الفقرة (2-3-11-1-2) وبالتراكيز النهائية (ملغم/ملي لتر)المبينة أدناه:

0.6	0.4	0.2	0.1	0.05
8.0	4.0	2.0	1.0	0.8

2- 3- 11- 3- طريقة العمل:

1-تم نقل جزء من مستعمرة مفردة للسلالة المراد تحييدها إلى 10 ملي لتر من الوسط المغذي السائل .حضنت الأنابيب بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة.

2-نقل 0.1 ملي لتر من المزروع أعلاه إلى الأنابيب الحاوية على 5 ملي لتر من وسط لوريا-بيرتاني السائل الحاوي على تراكيز مختلفة من مادة SDS والمحضر في الفقرة (2-3-11-2) إضافة إلى أنابيب السيطرة ، كما نقل 0.1 ملي لتر من ذلك المزروع إلى الأنابيب الحاوية على 5 ملي لتر من وسط لوريا-بيرتاني السائل الحاوي على تراكيز مختلفة من حامض السالسليك والمحضر في الفقرة (2-3-11-2) إضافة إلى أنابيب السيطرة ، ويراعي في هذه المرحلة تعليم الأنابيب لكل تركيز مستخدم ولكل مادة .حضنت الأنابيب بدرجة 37 مْ ولمدة 24 ساعة.

3-قورنت كثافة النمو في الأنابيب المعاملة مع كثافة النمو في أنبوبة السيطرة وتم تعيين التركيز المثبط الأدنى للمادة المحيدة على انه اقل تركيز ينعدم فيه النمو كلياً.

4-أجريت تخافيف عشرية من الأنابيب المنتخبة وكذلك من مزروع السيطرة حيث تم نشر 0.1 ملي لتر من التخافيف (10^{-4}-10^{-7}) على إطباق الوسط المغذي الصلب باستخدام ناشر زجاجي معقم .حضنت الأطباق بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة.

5-انتخبت 300 مستعمرة منفردة من المستعمرات النامية على سطح الوسط المغذي الصلب ونقلت بواسطة العيدان الخشبية المعقمة للإنسان Pick & Patch إلى إطباق الأوساط الزرعية الانتخابية الحاوية على المضادات الحيوية والمحضرة في الفقرة(2-3-11-2) إضافة إلى وسط مولر – هنتون الصلب الخالي من المضاد والذي استخدام كأطباق مرجعية (Master plates). حضنت الأطباق بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة .تم ملاحظة النمو بعد انتهاء فترة الحضن حيث يدل ظهور النمو البكتيري على الأطباق المرجعية وعدم ظهوره على أحد الأطباق الزرعية الحاوية على أحد المضادات الحيوية إلى فقدان البكتيريا المعاملة بمادة SDS أو بحامض السالسليك لصفة المقاومة لهذا المضاد الحيوي.

6-تم استخلاص الـ DNA البلازميدي للخلايا المحيدة كما ورد في الفقرة (2-3-7)وترحيله كهربائياً كما ورد في الفقرة (2-3-8).

الفصل الثالث

النتائج و المناقشة

3- النتائج والمناقشة

3-1 العزل والتشخيص

تمت زراعة 90 عينة من مياه الصرف الصحي لمستشفيات محافظة بابل (مستشفى مرجان العام ،مستشفى الولادة والأطفال والمستشفى الجراحي) على أوساط زرعية مختلفة تضمنت الوسط المغذي الصلب ،وسط ماكونكي الصلب ،وسط سالمونيلا –شيكلا الصلب ووسط TCBS الصلب حيث تمت دراسة الصفات المظهرية والمجهرية للعزلات ،كما أجريت الفحوصات الكيموحيوية لتشخيص العزلات اعتماداً على مصنف بيركي **(Sneath *etal.*, 1986; Murray *etal.*, 1999; MacFaddin, 2000)** وكما موضح في الملاحق (3-1) لغاية (3-9)حيث تم عزل الأجناس التالية

Haemophilus ,Escherichia ,Enterobacter ,Aeromonas, Salmonella, Pseudomonas ,Moraxella ,Klebsiella Streptococcus, Staphylococcus ,Serratia

كما تم تحديد الأنواع البكتيرية المنتمية إلى هذه الأجناس ورقمت العزلات اعتماداً على اسم الجنس والنوع حيث يتضح من الجدولين (3-1) و (3-2) أن عدد عزلات مياه الصرف الصحي لكل المستشفيات المشمولة بالدراسة بلغ 230 عزلة بكتيرية توزعت ضمن 14 نوعاً

جدول (3-1): العدد الكلي لعزلات الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام.

الانواع البكتيرية	رمز العزلة	رقم العزلة	العدد الكلي	الانواع البكتيرية	رمز العزلة	رقم العزلة	العدد الكلي
A. salmonicidia	AS	11-1	11	***K. pneumoniae***	KPN	93-82	12
E. aerugenes	EA	21-12	10	***M.catarrhalis***	MC	103-94	10
E. coli	EC	66-22	45	***P.aeruginosa***	PA	128-104	25
H. haemolyticus	HH	72-67	6	***S.typhimurium***	ST	140-129	12
K. oxytoca	KO	75-73	3	***S.grimisii***	SG	143-141	3
K. planticola	KP	81-76	6	***S.marscesence***	SM	150-144	7
المجموع الكلي (النسبة المئوية)							150 %(65.6)

جدول (3-2): العدد الكلي لعزلات الأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة غرام.

الأنواع البكتيرية	رمز العزلة	رقم العزلة	العدد الكلي

25	175-151	SA	***S.aureus***
15	190-176	SM	***S.mitis***
20	210-191	SMI	***S.mutans***
20	230-211	SS	***S.salivaris***
80 %(34.7)			**المجوع الكلي (النسبة المئوية)**

أوضحت النتائج المبينة في الجدولين (3-1) و(3-2) أن أعلى نسبة عزل كانت للأنواع السالبة لصبغة غرام مقارنة من الأنواع الموجبة للصبغة حيث بلغت 65.6% للأنواع السالبة في حين كانت 34.7% للأنواع الموجبة لصبغة غرام وقد جاءت هذه النتائج متفقة مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى عزل هذه الأنواع من بيئات مختلفة **(محمود 1988 ; الحسيني 1996 ;Chitnis *etal.*,2000; صبري وجماعته , 2001a)** كما أوضحت النتائج المبينة في الجدول (3-2) أن النوع ***E. coli*** هو أكثر الأنواع تواجداً في بيئة المستشفيات قيد الدراسة بالنسبة للبكتيريا السالبة لصبغة غرام تلته الأنواع ***S. typhimurium*** ، ***K. pneumoniae*** و ***P.aeruginosa*** أما بالنسبة للأنواع الموجبة لصبغة غرام فقد كانت السيادة للنوع ***S.viridans*** مقارنة مع النوع ***S.aureus*** . إن هذا التنوع في نسب التلوث البكتيري يعود إلى الاختلاف في الصفات الفسيولوجية والوراثية بين الأنواع البكتيرية المختلفة حيث تمتلك الأنواع السالبة والموجبة لصبغة غرام العديد من عوامل الضراوة التي تزيد من امراضيتها وتؤهلها إلى التواجد في بيئات مختلفة مثل إنتاج الإنزيمات التي تعمل على تحطيم المركبات العضوية المعقدة التركيب وتحويلها إلى مواد بسيطة مثل إنتاج إنزيمات الديكاربوكسيليز واليوريز والجيلاتينيز والكاتليز والسترتيز والاوكسيديز **(Oberhofer ,1985 ; Howard *etal.*,1987; Baron & Finegold, 1990)** . كما تمتلك تلك الأنواع قابلية عالية على تحمل مديات مختلفة من الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة والأوكسجين المذاب **(Mara,1974; Whitton,1980; Hazen&Toranzos,1990)** بينت نتائج الجدول (3-3) أن اقل نسبة عزل كانت للأنواع ***A . salmonicidia*** , ***M. catarrhalis*** , ***H. haemolyticus*** ,***E. aerugenes*** وأنواع جنس ***Serratia*** إذ تتميز تلك الأنواع بحساسيتها للمواد الكيمياوية والمطهرات المستخدمة في المستشفيات كما يتطلب تواجدها ظروف بيئية خاصة من درجة حرارة ورقم هيدروجيني **(Brooks *etal.*, 1998)** . جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى عزل هذه الأنواع من بيئات مختلفة ففي دراسة محلية للتلوث البكتيري في نهر الفرات تجاوز إعداد

البكتيريا القولونية 10×10^3 خلية /100 ملي لتر في العديد من محطات الدراسة على طول نهر الفرات ،كما تجاوزت إعداد البكتيريا القولونية البرازية في هذه المحطات 2×10^2خلية /100ملي لتر وهو مؤشر لتلوث المياه **(محمود ،1988 ; صبري وجماعته a 2001)**. بلغت أعلى كثافات للبكتيريا القولونية والقولونية البرازية والمسبحيات البرازية $12.5 \times 10^3 \times 10^6$, 24, و 6×10^6 خلية /100ملي لتر وعلى التوالي في نهر دجلة منطقة بغداد **(نعوم, 1998)** . وبينت دراسة محلية أخرى أن أعلى كثافات لتلك البكتيريا بلغ 21.5×10^3 و 1.5×10^6 و 0.075×10^6 خلية /100 ملي لتر وعلى التوالي في نهر صدام القاطع الشمالي **(صبري وجماعته b 2001)** .كما أشارت بعض الدراسات إلى أن المصدر الرئيسي لتلوث مياه الأنهر هو مياه الصرف الصحي التي تصرفها المدن الرئيسية وأكدت تلك النتائج أن مصدر البكتيريا هو مياه الصرف الصحي أي أن منشأها إنساني وليس براز الحيوانات**(Geldreich, 1967; صبري وجماعته a 2001)** . كما أكدت دراسات أخرى أن العديد من الحالات المرضية تنتج عن تلوث مياه الشرب بأنواع بكتيريا ***Salmonella*** ، ***E.coli*** و ***Shigella*** **(Ford , 1993 ; Ford ,1999)**. وأشارت دراسات أخرى إلى ازدياد نسبة الإصابة بالعديد من الحالات المرضية الناتجة عن تلوث مياه الشرب في الولايات المتحدة وبعض الدول ببكتيريا ***S. typhimurium*** **(Angulo *etal.*, 1997 ; Boriraj *etal.*, 1997)** .أوضحت العديد من الدراسات إمكانية عزل أنواع جنس ***Serratia*** من عينات مياه متفرقة بضمنها مياه البحر وكانت ***S. marcescnce*** تمثل 50% من مجموع العزلات (**Grimont *etal.*, 1977 ; بطرس , 2000)** . وبينت دراسات أخرى عزل بكتيريا ***S. marcesence*** من ردهات المستشفيات (**Wright *etal.*, 1976**) أو من المراجعين أو الممرضات أو طاقم المستشفى تحت التدريب **(Rutala *etal.*, 1981 ; Svensson *etal.*, 1987)** . كما أكدت عدد من الدراسات عزل أنواع من جنس ***Aeromonas*** من عينات مياه الشرب **(Borrell *etal.*, 1998; Gavriel *etal.*, 1998)** ، وهي من الممرضات الانتهازية المسؤولة عن العديد من حالات التهابات الجروح الناتجة عن التعرض إلى المياه الملوثة **(Gold & Salit , 1993)**. كما تم عزل

العديد من الممرضات الانتهازية من محطات تجهيز مياه الشرب وتشمل أنواع بكتيريا ***Klebsiella*** ، ***Moraxella*** ، ***Acinetobacter*** و***Pseudomonas*** **(Ford , 1999)**

جدول (3-3) : العدد الكلي لعزلات الأنواع البكتيرية السالبة و الموجبة لصبغة غرام المعزولة من مياه الصرف الصحي لمستشفيات محافظة بابل .

الأنواع البكتيرية	مستشفى مرجان العام	مستشفى الولادة والأطفال	المستشفى الجراحي	العدد الكلي للأنواع
A. salmonicida	3	4	4	11
E. aerugenes	3	3	4	10
E. coli	15	10	20	45
H. haemolyticus	1	4	1	6
K. pneumoniae	3	4	5	12
K. planticola	2	1	3	6
K. oxytoca	1	1	1	3
M. catarrhalis	3	4	3	10
P. aeruginosa	9	8	8	25
S. typhimurium	6	2	4	12
S. grimessi	-	2	1	3
S. marcescens	3	2	2	7
S. aureus	8	7	10	25
S. viridans	18	7	30	55
المجموع الكلي للأنواع السالبة والموجبة	**75**	59	96	230

كما أوضحت نتائج الدراسة الحالية المبينة في الجدول (3-3) أن أعلى نسبة تلوث بالأنواع السالبة والموجبة لصبغة غرام كانت في عينات مياه الصرف الصحي المأخوذة من المستشفى الجراحي حيث بلغت 41.7% تلتها مستشفى مرجان العام بنسبة 32.6% ثم مستشفى الولادة والأطفال بنسبة 25.6% ، كما بينت النتائج تماثلاً في أنواع العزلات البكتيرية من كل مستشفى ، وجاءت هذه النتائج متوافقة مع العديد من الدراسات التي أكدت إمكانية انتقال هذه الأنواع البكتيرية من مستشفى إلى أخرى عن طريق نقل المرضى حيث أن لهذه الأنواع المقدرة على التأقلم مع بيئة المستشفى والتمركز فيها **(Taylor, 1970; Wright *etal.*, 1976; Ford, 1993)** . كما أشارت العديد من الدراسات إلى أن معظم أفراد العائلة المعوية مسؤولة عن

العديد من الحالات المرضية كإخماج المجاري البولية والتهاب المهبل كما تعتبر بكتيريا ***P. aeruginosa*** المسبب الرئيسي لأخماج الإذن في حين كانت بكتيريا ***H. haemolyticus*** مسؤولة عن بعض حالات أخماج القناة التنفسية العليا عند الأطفال **(Worth,1982; Baranit, 1983; Brooks *etal*., 1998)** .

2-3 المقاومة للمضادات الحيوية

تم اختيار عشرة عزلات من كل نوع من الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة غرام لدراسة نمط حساسيتها تجاه 20 نوع من المضادات الحيوية باستخدام أقراص المضادات الحيوية والأوساط الزرعية كما ورد في الفقرة (2-3-5-1) . أن الغاية الأساسية من هذا الاختبار هو دراسة العلاقة بين المقاومة للمضادات الحيوية والمحتوى الوراثي للعزلات ، ومدى علاقة مياه الصرف الصحي في انتشار البكتيريا المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية وذلك من خلال دراسة مدى التشابه والاختلاف في نمط المقاومة بين عزلات الأنواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام.

أظهرت نتائج اختبار الحساسية المبينة في الملاحقة (3-10) لغاية (3-19) ارتفاع مستويات المقاومة بين عزلات الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة غرام لأغلب مضادات البيتالاكتام التي تشمل البنسلينات مثل الكاربنسلين ، الامبيكلوكس ، الكلوكساسلين ، الاموكسيسلين ، بنسلين G والامبسلين ومضادات السلفا مثل السلفاميثاكسزول وترايميثوبرايم – سلفاميثاكسزول ، وكذلك مضادات الأرثرومايسين ، اللينكومايسين ، الكلندامايسين والتتراسايكلين . في حين تباين نمط مقاومتها للمضادات الامينوكلايكوسيدية والكلورامفينكول ، وانخفضت مستويات مقاومتها للمضادات الكوليسين والسيفوتاكسيم والريفامبين .

أوضحت النتائج المبينة في الجدول (3-4) أن نسبة مقاومة الأنواع الموجبة لصبغة غرام لمضادات البنسلينات كانت أعلى من نسبة مقاومة الأنواع السالبة حيث بلغت 85.8% و 94.9% وعلى التوالي . كما بينت نتائج الجدول (3-5) أن عزلات بكتيريا ***S. viridans*** و ***S. aureus*** شكلت نسبة مقاومة عالية لمضادات البنسلينات بلغت 98.3% و 91.6% وعلى التوالي ، بينما كانت نسبة المقاومة لهذه المضادات في الأنواع السالبة لصبغة غرام هي 100% بالنسبة لبكتيريا ***P. aeruginosa*** ، 98.3% بالنسبة لبكتيريا ***M. catarrhalis*** و 85% ، 70% ، 91.6% ، 80% ، 81.6%، 80% بالنسبة للأنواع ***E. aerugenes , A. salmonicida , E. coli , K. pneumoniae , S. typhimurium*** وجنس ***Serratia*** وعلى التوالي.

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (3-5)أن نسبة مقاومة عزلات بكتيريا ***S. aureus*** و ***S. viridans*** لمضادات السلفا والتي شملت السلفاميثاكسزول والترايميثوبرايم – سلفاميثاكسزول بلغت 85% و70% وعلى التوالي ، بينما كانت نسب المقاومة لهذه المضادات في الأنواع السالبة لصبغة غرام 100% للنوعين ***M. catarrhalis*** و***P. aeruginosa*** ، 90% لبكتيريا ***K. pneumoniae*** في حين كانت نسب المقاومة للأنواع ***E.coli*** , ***S. typhimurium*** وجنس ***Serratia*** هي 80% ، 70% و 60% وعلى التتالي ، بينما أبدت الأنواع ***E. aerugenes*** ***A. salmonicidia*** نسبة مقاومة منخفضة بلغت 55% و 50% وعلى التوالي . عموماً يمكن الاستنتاج أن نسب المقاومة لمضادات البيتالاكتام وعقاقير السلفا بين عزلات الأنواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام عالية وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى ارتفاع نسب المقاومة لهذه المضادات في تلك الأنواع **(Khalil *etal.*, 1998; Levy,1998; McFeters & Camper, 1998; Hill *etal.*, 1999)** حيث وجد أن النسبة العالية من المقاومة لمضادات البيتالاكتام تعود إلى قابلية هذه الأنواع البكتيرية على إنتاج أنواع مختلفة من إنزيمات البيتالاكتام الكروموسومية أو البلازميدية المنشأ **(Jacoby, 1994; Fraimow & Abrutyn , 1995; Arakawa, 2000)** ، إذ قد تحمل المحددات الوراثية المسؤولة عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف على بلازميد اقتراني **(Bell *etal.*, 1985; Petit *etal.*, 1990; Sirot *etal.*, 1991)** .

تلعب البلازميدات المسؤولة عن إنتاج إنزيم البنسلينيز دوراً مهماً في زيادة مقاومة بكتيريا ***S. aureus*** لمضادات البيتالاكتام ، فقد أشارت العديد من الدراسات إلى أن هذه البلازميدات

جدول(3-4):النسبة المئوية لمقاومة المضادات الحيوية في الانواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام.

المضادات الحيوية	النسبة المئوية للمقاومة في الأنواع البكتيرية	
	الموجبة لصبغة غرام	السالبة لصبغة غرام
بنسلينات	94.9	85.8

ستربتومايسين	100	100
توبرامايسين	65	58.7
نيومايسين	65	65
جنتامايسين	20	37.5
لينكومايسين	100	100
كلندامايسين	100	100
كوليستين	85	63.7
تتراسايكلين	100	100
ريفامبين	40	22.5
سيفوتاكسيم	45	41.25
كلورامفينيكول	45	65

جدول(3-5):النسبة المئوية لمقاومة مضادات البنسلينات وعقاقير السلفا في الانواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام.

الانواع البكتيرية	**النسبة المئوية لمقاومة المضادات الحيوية**

	البنسيلينـات	عقاقير السلفا
A. salmonicida	85	55
E. aerugenes	70	50
E. coli	91.6	80
K. pneumoniae	80	90
M. catarrhalis	98.3	100
P. aeruginosa	100	100
S. typhimur ium	81.6	70
S. marcescens	80	60
S.aureus	91.6	85
S.viridans	98.3	70

تشفر عن إنتـاج البروتينـات الرابطـة للبنسلين (PBPs) **(Reynolds & Brown, 1985; Ubukata *etal.*, 1985)**. كمـا أكدت دراسـات أخرى أن هذه البلازميدات تخفي مواقع الإدخـال الثابتـة للعوامل القـافزة المسؤولة عن إظهـار صـفة المقاومـة لهـذه المضـادات **(Neu, 1985; Trees & Iandolo, 1988; Hiramatsu *etal.*, 1990)**. أن كميـة البروتينـات الرابطـة للبنسـلين لا تـرتبط كليـاً بالمقاومـة لمضـادات البيتالاكتـام فقد بينـت بعض الدراسات أن وجود الجين ***mec A*** الذي يشفر إلى إنتاج البروتينات الرابطـة للبنسلين (PBPs) التي تعمل على تقليل ألفة ارتبـاط مضـادات البيتالاكتـام يعتبـر العامل الأساسـي فـي زيـادة نسـب المقاومـة لمضـادات البيتالاكتـام **(Berger –Bachi *etal.*, 1986; Murakami *etal.*, 1987; Murakami & Tomasz ,1989; Hiramatsu , 1995)** .

أكد **(Arakawa , 2000)** أن 90 % من عزلات بكتيريا ***M. catarrhalis*** أبدت مقاومة لمضادات البيتالاكتام بسبب قابليتها على إنتاج إنزيمات البنسلينيز و50% من عزلات ***P. aeruginosa*** ذات مقامة مكتسبة للأميكاسين والكاربابنيم والفلوروكوينولين والمضادات الأمينوكلايكوسيدية . أشارت عدد من الدراسات إلى أن الاستخدام الواسع لمضادات الكاربابنيم والسيفومايسين أدى إلى ظهور عزلات ***K. pneumoniae*** و***E. coli*** المنتجة لإنزيم SHV و SHV-12 والمقاومة لمضادات البيتالاكتام **(Ishii *etal.*, 1995; Yagi *etal.*, 1997; Nakamura *etal.*, 2000; Yagi *etal.*, 2000)**

بينت العديد من الدراسات وجود أكثر من 40 نوع من جينات المقاومة للمطهرات ومضادات البيتالاكتام والتي تحتوي على قواعد إدخال لها القابلية على التفاعل مع جينات الخلية البكتيرية **(Recchia & Hall, 1995; Mark & Edith, 1997)** ، إذ ترتبط المقاومة التي أبدتها عزلات ***S. typhimurium*** للمضاد ترايمثيوبرايم مع وجود الجين Ia المشفر لإنزيم DHFR **(Goldstein *etal.*,1986; Amyes,1989; Agodi *etal.*, 1995)** ، كما وجد ان 52% من عزلات بكتيريا ***E. coli*** تمتلك انتيكرونات من الصنف الأول محمولة على بلازميداتها وتشفر للمقاومة لمضادات البيتالاكتام والامينوكلايكوسيدات والكلورامفينكول والترايميثوابرايم والارثرومايسين **(Chang *etal.*,2000) .**

إن المقاومة للبنسلينات في الأنواع السالبة والموجبة لصبغة غرام تكون ذاتية نتيجة لحدوث طفرات وراثية أو نتيجة لاستلام عناصر وراثية من خلال انتقال البلازميدات أو الجينات القافزة وان هذه المقاومة تنتج عن تغيير في إنتاج البروتينات الرابطة للبنسلين (PBPs) والتي تكون ذات ألفة واطئة للارتباط بمضادات البيتالاكتام - **(Murray & Mederski Samovaj, 1983; Ubukata *etal.*,1985; Hiramatsu *etal.*, 1990; William *etal.*, 1998)**

قد تكون المقاومة للبنسلينات مكتسبة حيث وجد أن البلازميدات المشفرة لإنزيمات Staphylococcal penicillinase منتشرة في المكورات المعوية وخاصة النوع***E. faecalis*** **(Murray *et al.*,1990)**

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (3-4) تبايناً في نمط مقاومة الأنواع السالبة والموجبة لصبغة غرام للمضادات الامينوكلايكوسيدية (التوبرامايسين والنيومايسين والجنتامايسين والستربتومايسين) فقد شكلت جميع العزلات نسبة مقاومة عالية للمضاد ستربتومايسين بلغت 100% في حين أن نسبة المقاومة للمضاد توبرامايسين في الأنواع الموجبة لصبغة غرام كانت أعلى (65%) مما هي عليه في الأنواع السالبة للصبغة (58.7%) بينما تساوت نسبة مقاومتهما

للمضاد نيومايسين حيث بلغت 65% لكل منها . كما أوضحت النتائج المبينة في الجدول (3-6) تبايناً في نمط مقاومة الأنواع الموجبة لصبغة غرام للمضادين توبرامايسين ونيومايسين فقد بلغت أعلى نسبة مقاومة للمضادين في بكتيريا ***S. viridans*** 90% في حين ان اقل نسبة مقاومة للمضادين كانت في بكتيريا ***S. aureus*** حيث بلغت 40% ،أما في الأنواع السالبة لصبغة غرام فقد بلغت أعلى نسبة مقاومة للمضادين في بكتيريا ***E. coli*** 85% تلتها بكتيريا ***P. aeruginosa*** وجنس ***Serratia*** بنسبة 75% لكل منهما ثم بكتيريا***S. typhimurium*** ، ***K. pneumoiae*** و ***M. catarrhalis*** بنسبة 65% ، أما اقل نسبة مقاومة للمضادين فقد أبدتها بكتيريا ***E. aerugenes*** و ***A. salmonicidia*** إذ بلغت 45% و20% وعلى التتالي . أبدت الأنواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام نسبة مقاومة منخفضة جداً للمضاد الحيوي جنتامايسين بلغت 20% و37.5% وعلى التوالي وكما مبين في الجدول (3-4) و(3-6) فقد شكلت عزلات بكتيريا ***S. aureas*** و ***S. viridans*** نسبة مقاومة بلغت 30% و10% وعلى التوالي ، في حين أن أعلى نسبة مقاومة أبدتها عزلات الأنواع السالبة لصبغة غرام كانت لبكتيريا***E. coli*** و ***K. pneumoniae*** حيث بلغت 90% لكل

جدول(3-6):النسبة المئوية لمقاومة المضادات الامينوكلايكوسيدية والبوليببتيدات والكلورامفينيكول في الانواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام.

الانواع البكتيرية	النسبة المئوية لمقاومة المضادات الحيوية				
	توبرامايسين	نيومايسين	جنتامايسين	كوليستين	كلورامفينيكول
A. salmonicida	10	30	0	60	60
E. aerugenes	50	40	20	40	40
E. coli	90	80	90	70	50
K. pneumoniae	80	50	90	80	70
M. catarrhalis	40	90	0	70	90
P. aeruginosa	60	90	0	70	80
S. typhimurium	60	70	60	70	10
S. marcescens	80	70	40	60	60
S.aureus	30	50	30	30	80

9	60	10	80	100	***S.viridans***

منهما تلتها بكتيريا ***S. typhimurium*** بنسبة 60 % ، في حين أبدت بكتيريا ***Serratia*** و ***E. aerugenes*** نسبة مقاومة منخفضة بلغت 40 % و20 % وعلى التوالي ، بينما لم تبد الأنواع البكتيرية ***P. aeruginosa*** ، ***A. salmonicidia*** و ***M. catarrhalis*** أية مقاومة للمضاد جنتامايسين .كانت هذه النتائج متوافقة مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى انتشار واسع للمقاومة لأغلب المضادات الامينوكلايكوسيدية بين الأنواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام **(Hancock ,1981; Gillespie *etal.*, 1987; Silver & Bostian, 1993; Fraimow & Abrutyn, 1995)** .

أشارت العديد من الدراسات إلى أن المقاومة للمضادات الامينوكلايكوسيدية ترتبط مع وجود العوامل القافزة ***Tn 4001*** التي غالباً ما تتواجد على البلازميدات **(Gillespie *etal.*,1987; Lyon etal., 1987; Lyon & Skurray, 1987)** ، ولكنها قد تحمل على الكروموسوم أيضاً **(Gillespie *etal.*, 1987)** ، كما لوحظ وجود عناصر وراثية لها أحجام مماثلة لحجم ***Tn 4001*** وتشفر للمقاومة لهذه المضادات عن طريق (6`) AAC و APH (2``) المحورة لفعالية المضادات الامينوكلايكوسيدية وان هذه العوامل غالباً ما تحمل على كروموسوم بكتيريا ***S. aureus*** **(Storres *etal.*, 1988; Thomas & Archer, 1989)**

، وقد أكد **(Byrne *etal.*, 1990)** أن مثل هذه العوامل تلعب دوراً مهماً في نشر المقاومة للمضادات الامينوكلايكوسيدية بين العزلات السريرية الموجبة لصبغة غرام.

بين **(Levesque *etal.*, 1995)** أن 75% من الأنواع السالبة لصبغة غرام ذات المقاومة للمضادات الامينوكلايكوسيدية تمتلك الأنتيكرونات من الصنف الأول ، وأوضحت عدد من الدراسات أن تسلسل النيوكليوتيدات في البلازميدات المشفرة للمقاومة للجنتامايسين في بكتيريا ***E. faecalis*** كان مماثلاً إلى تسلسل النيوكليوتيد في العوامل القافزة ***Tn 4001*** وان هذا التماثل يشمل المحددات الوراثية المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة لهذا المضاد إضافة إلى قواعد الإدخال ***IS 256*** **(Ferretti *etal.*, 1986; Rouch *etal.*, 1987; Byrne *etal.*, 1990)** كما وجد أن إنزيمات 2-phosphotransferase 6-acetyl transferase هي التي تسبب المقاومة للجنتامايسين والتوبرامايسين والكنامايسين **(Wurtz *etal.*, 1991)** .

أوضحت العديد من الدراسات أن انتشار وتطور المقاومة للستربتومايسين قد يكون إما بسبب طفرات كروموسومية تعمل من خلال تبديل مواقع الارتباط في الرايبوسوم أو بسبب وجود بلازميدات كبيرة تعمل على نشوء المقاومة التأزرية بين المضادات الأمينوكلايكوسيدية والبنسلين **(Krogstad *etal.*, 1978; Horodnicean *etal.*, 1982; William *etal.*, 1998)** . كما وجد أن السلالات التي تتملك إنزيمات Streptomycin adenyl transferase تكون مقاومة للستربتومايسين وحساسة للجنتامايسين **(Herman & Gerding, 1991)**.

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (3-4) ارتفاع عالي في نسبة مقاومة الأنواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام للمضادين لينكومايسين وكلنداميسين بلغت 100% لكل منهما وقد تم عزل مثل هذه السلالات في أنحاء مختلفة من العالم حيث يعتقد أن المقاومة لمثل هذه المضادات هي مقاومة مكتسبة تحمل محدداتها الوراثية على بلازميدات اقترانية تنتقل بين الأنواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام **(Sallen *etal.*, 1995; William *etal.*, 1998)** .كما أظهرت نتائج الجدول (3-4) أن المقاومة للمضادين إرثرومايسين وتتراسايكلين في الأنواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام شكلت نسبة عالية بلغت 100% لكل منهما وهذا يتفق مع ما ذكرته تقارير منظمة الصحة العالمية**(WHO, 1994; 1997)** حول تطور وانتشار المقاومة للتتراسايكلين والأرثرومايسين في الأنواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام.

أكد **(Schwarz & Noble, 1994)** أن المحددات الوراثية المسؤولة عن المقاومة للتتراسايكلين في الأنواع الموجبة لصبغة غرام وخصوصاً عزلات بكتيريا Staplylococci ذات المنشأ البشري تحمل على بلازميد اقتراني صغير الحجم في حين أن محددات هذه

المقاومة تكون محمولة على بلازميد اقتراني ذو حجم اكبر في العزلات ذات المنشأ الحيواني (جلد الخنزير). وأوضحت دراسات أخرى أن المحددات الوراثية للمقاومة للتتراسايكلين أيضا تحمل على بلازميد اقتراني كبير الحجم **(Petit *etal.*, 1990; Sirot *etal.*, 1991)** . كما أكدت دراسات أخرى أن المحددات الوراثية المسؤولة عن إظهار المقاومة للتتراسايكلين والجنتامايسين والتوبرامايسين تكون محمولة على بلازميد ذو حجم 80Kb مسؤول عن زيادة التركيز المثبط الأدنى لهذه المضادات **(Edson & Terrel, 1991; Preston *etal.*, 1997)** .كما يلعب الجدار الخلوي دوراً مهماً في زيادة مقاومة الأنواع البكتيرية لهذه المضادات فقد بينت العديد من الدراسات أن تجهيز الوسط بالأحماض الأمينية اللازمة لبناء الجدار الخلوي مثل الألنين والكلوتاميت ، والسكريات مثل الكلوكوز

و N-acetyl glucosamine يساعد الخلية على بناء جدار خلوي سميك يساعدها على إظهار مستوى عالي من المقاومة **(Cui *etal.*, 2000; Kuroda *etal.*, 2000)** .

أوضحت النتائج المبينة في الجدول (3-4) تبايناً في نمط مقاومة الأنواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام للمضادين كلورامفينكول وكوليستين حيث أظهرت الأنواع السالبة لصبغة غرام نسبة مقاومة عالية للمضاد كلورامفينكول بلغت 65% مقارنة مع الأنواع الموجبة للصبغة والتي بلغت 45% حيث يبدو من الجدول (3-6) أن أعلى نسبة مقاومة للمضاد كلورامفينكول أبدتها عزلات بكتيريا ***K. pneumoniae*** بلغت 80% تلتها بكتيريا ***E. coli*** ، ***S. typhimurium***، ***P. aeruginosa*** و ***M. catarrhalis*** بنسبة 70% لكل منها ثم بكتيريا ***Serratia*** و ***A. salmonicidia*** بنسبة 60% ، بينما أبدت عزلات بكتيريا ***E. aerugenes*** اقل نسبة مقاومة لهذا المضاد بلغت 40% . أما في الأنواع الموجبة لصبغة غرام والتي تمثلت بالنوعين ***S.aureus*** و ***S.viridans*** فقد بلغت نسبة مقاومتهما للمضاد كلورامفينكول 30% و60% وعلى التوالي .أما في حالة المضاد كوليستين فقد أظهر الجدول (3-4) أن الأنواع الموجبة لصبغة غرام شكلت نسبة مقاومة عالية بلغت 85% مقارنة مع الأنواع السالبة للصبغة والتي شكلت 63.7% حيث أظهر الجدول (3-6) أن أعلى نسبة مقاومة لهذا المضاد أبدتها عزلات بكتيريا ***S.viridans*** بلغت 90% تلتها عزلات بكتيريا ***S.aureus*** بنسبة 80% في حين أن أعلى نسبة مقاومة للمضاد في الأنواع السالبة لصبغة غرام كانت لبكتيريا ***M .catarrhalis*** حيث بلغت 90% تلتها بكتيريا ***P.aeruginosa*** بنسبة 80% ثم ***K. pneumoniae*** بنسبة 70% أما الأنواع ***E. aerugenes*** ، ***E.coli*** ، ***S. typhimurium*** ، جنس ***Serratia*** و ***A.salmonicidia*** فقد بلغت نسبة مقاومتها 40% ، 50% ، 10% و 60% وعلى التوالي. جاءت هذه النتائج متفقة مع العديد من الدراسات التي

أشارت إلى امتلاك العزلات المقاومة للكلورامفينكول القابلية على إنتاج إنزيم Chloramphenical acetyl transferase الذي يعمل على تحوير جزيئة المضاد **(Norris *etal*., 1995; Pawa *etal*., 2000)** . كما أشارت دراسات أخرى إلى أن فقدان الجين Omp F في بعض العزلات يلعب دوراً مهماً في زيادة مستوى المقاومة لهذا المضاد **(Toro *etal*., 1990; Gallardo *etal*., 1999)**. كما أكد **(Udo *etal*., 1997)** أن محددات المقاومة للمضاد كلورامفينكول تحمل على بلازميدات صغيرة ممكن أن تنتقل بواسطة بلازميدات المقاومة للمضاد ميوبيروسين في عزلات بكتيريا ***S. haemolyticus*** .كما أكدت دراسات عديدة أخرى أن مثل هذه البلازميدات ممكن أن تنتقل بواسطة بلازميدات المقاومة للجنتامايسين **(McDonnell *etal*., 1983; Naidoo, 1984; Pawa *etal*., 2000)**

أوضحت النتائج المبينة في الجدول (3-4) أن المقاومة للمضاد ريفامبين شكلت نسبة منخفضة جداً مقارنة مع المضادات الأخرى حيث أن العزلات المقاومة لأغلب المضادات الحيوية كانت حساسة لهذا المضاد إذ بلغت نسبة المقاومة في الأنواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام 40% و 22.5% وعلى التوالي وهذا لا يتفق مع العديد من الدراسات التي أكدت أن نسبة المقاومة لهذا المضاد كانت عالية جداً بسبب سهولة انتقاء الطافرات المقاومة له **(Gill *etal*., 1983; Traub & Bauer, 1987; Arathoon *etal*., 1990; Anonymous ,1991; Walsh *etal*., 1993)**

من الصعوبة تحديد العلاقة بين استخدام المضادات الحيوية وظهور المقاومة له فاستخدام المضادات الحيوية للأغراض السريرية لوحدة لا يفسر السيادة العالية للكائنات المقاومة في العديد من الدول المتقدمة **(Col & O'connor ,1987; Kunin *et al* ., 1990)** لذا فان الاستخدام السريري الواسع للمضادات الحيوية يؤدي إلى الزيادة العالية في نسبة المقاومة وخصوصاً عند الأشخاص الراقدين في المستشفيات **(O'keke *etal*., 1999)** . عموماً أوضحت نتائج الدراسة الحالية المبينة في الجداول (3-4)لغاية (3-6) تماثلا في نمط المقاومة التي أبدتها عزلات الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة غرام لأغلب المضادات الحيوية ويعزي السبب في ذلك إلى أن جينات المقاومة لأغلب هذه المضادات لها القابلية على الانتقال بين الأنواع المختلفة من البكتيريا السالبة والموجبة للصبغة والتكامل مع جينات هذه البكتيريا مما يؤدي إلى نشر المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية في بيئة المستشفيات **(Mark & Edith, 1997)** ، كما اقترحت بعض الدراسات أن بعض الأنواع البيئية لها القابلية على إدخال علب جينية مفردة ضمن مادتها الوراثية مقارنة مع الأنواع السريرية التي لها القابلية على تجميع العديد من العلب الجينية التي تزيد من مقاومتها للمضادات الحيوية **(Bissonnette &**

Roy, 1992; Hall & collis, 1995; Martinez-freijo *etal.*, 1999; Rosser & Young, 1999 ;Chang *etal.*, 2000) . كما أشارت العديد من الدراسات أن استخدام المضادات الحيوية من قبل الإنسان لا يؤدي إلى ظهور مقاومة متعددة في نوع واحد من البكتيريا مثل ***S. typhimurium*** و إنما ينتج عنه زيادة عالية في نسب المقاومة المتعددة في أنواع أخرى **(Ling *etal.*, 1987; kariuki *etal.*, 1996; Davis *etal.*, 1999)** واحتمالية أن المحددات الوراثية لعوامل الضراوة والمقاومة ممكن أن تظهر على نفس البلازميد يزيد من أمراضية هذه الأنواع **(Samonis *etal.*, 1994; Fica *etal.*, 1996; Thong *etal.*, 1996)**

3-3 اختبار القابلية على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز

اعتمدت طريقة اليود القياسية لغرض اختبار مقدرة الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة غرام على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز . تعتمد هذه الطريقة على تفاعل صبغة اليود مع النشأ لتكوين المعقد اللوني الأزرق ، ففي حالة إنتاج البكتيريا لإنزيم البيتالاكتاميز يقوم هذا الإنزيم بتحليل بنسلين G إلى حامض البنسلويك (Penicilloic acid) وهو مركب غير فعال بايولوجياً ولكنه يمتلك خصائص مستضدية إذ يقوم باختزال اليود إلى اليوديد الذي لا يمتلك قابلية التفاعل مع النشا لتكوين المعقد اللوني فيتحول اللون إلى الأبيض **(Atlas, 1984; Collee *etal.*, 1996)**

أعطت أغلب عزلات الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة غرام نتيجة موجبة سريعة للفحص مما يدل على قابلية تلك الأنواع على إنتاج كميات كبيرة من إنزيمات البيتالاكتاميز وكانت هذه النتائج متوافقة مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى مقدرة الأنواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة غرام على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز البلازميدية والكروموسومية المنشأ **(Brown,1975; Moellering ,1993; Gold & Moellering, 1996)**

امتازت طريقة اليود القياسية بسهولة أجرائها وقصر الفترة الزمنية للحصول على النتيجة وكذلك سهولة الحصول على المواد اللازمة لعمل الاختبار وتمثل هذه الطريقة مسحاً شاملاً لكافة أنواع إنزيمات البيتالاكتاميز الموجودة ، حيث أن وجود المضاد بنسلين G في الاختبار يعمل كمادة أساس لجميع إنزيمات البيتالاكتاميز بنوعيها البنسلينيز والسيفالوسبورينيز **(Bush *etal.*, 1995)** .

3-4 دراسة النسق البلازميدي

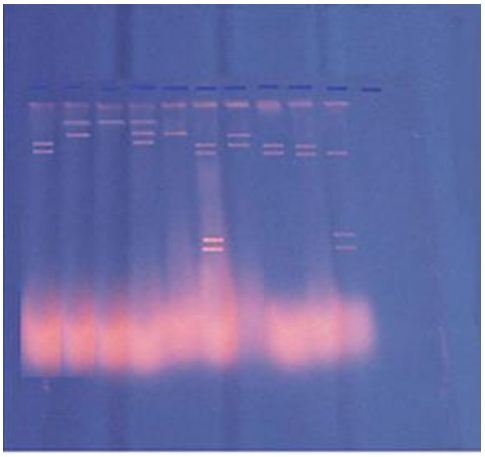
تم التحري عن المحتوى البلازميدي لـ 24 عزلة بكتيرية للأنواع السالبة لصبغة غرام والتي شملت ***A.Salmonicida,E.aerugenes,E.coli,K.pneumoniae***

M.catarrhalis,P.aerugenosaS.typhimurium,S.marscesence, وبواقع 3 عزلات لكل نوع ,كما شملت الدراسة ستة عزلات عائدة للأنواع الموجبة لصبغة غرام وهي ***S.aureus , S.viridans*** وبواقع 3 عزلات لكل نوع وذلك لغرض التعرف على الدور الذي تؤديه البلازميدات في منح صفة المقاومة للمضادات الحيوية . تم اختيار هذه العزلات بناءً على نمط المقاومة المتعددة التي أبدتها تجاه المضادات الحيوية المستخدمة إضافة إلى قابليتها على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز .

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز الشكل (3-1) لمستخلص ألـ DNA لعزلات بكتيريا ***E.aerugene*** ,***P*.aerugenosa**, ***E.coli***, احتوائها على 2-4 حزم بلازميدية متباينة الحجوم والتي قد تمنحها صفة المقاومة للمضادات الحيوية .كما بينت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لمستخلص DNA البلازميدي لعزلات بكتيريا ***A.salmonicida,S.typhimurium,S.marscesence*** والمبينة في الشكل (3-2) احتوائها على2-6 حزم بلازميدية ذات أحجام متقاربة ومرتبة على مسافات قريبة من DNA الكروموسوم مما يدل على تقارب أوزانها الجزيئية من الوزن الجزيئي لـ DNA الكروموسوم .

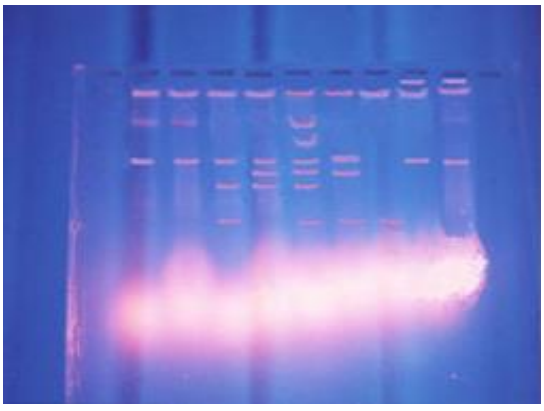
تطلبت عملية الترحيل الكهربائي لعزلات بكتيريا ***K.pneumonia*** فترة زمنية طويلة بسبب احتوائها على حزم بلازميدية ذات أوزان جزيئية كبيرة فقد أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لمستخلص DNA البلازميدي لعزلات هذه البكتيريا والمبينة في الشكل (3-3) احتوائها على 3-6 حزم بلازميدية استلزم ترحيلها فترة زمنية مقدارها 5-7 .أما في حالة بكتيريا ***M.catarrhias*** فقد أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز الشكل (3-4) احتوائها على 2-4 حزم بلازميدية متباينة الحجوم . أما بالنسبة للأنواع الموجبة لصبغة غرام فقد أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز احتوائها عزلات بكتيريا ***S.aureus,Sviridan*s** على2-3 حزم بلازميدية تم رؤيتها بالعين المجردة ولكنها لم تظهر بصورة واضحة أثناء التصوير .

اتفقت نتائج عزل الـDNA البلازميدي لعزلات الأنواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام في هذه الدراسة مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى احتواء هذه الأنواع على العديد من البلازميدات المتباينة الحجوم والتي قد تمنحها صفة المقاومة للمضادات الحيوية فقد بينت بعض الدراسات احتواء بكتيريا ***E.coli*** على بلازميدات متعددة تتراوح



شكل(3-1): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع السالبة لصبغة غرام.

مسلك رقم (1): نموذج DNA البلازميد القياسي pBR322
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة EC 22
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة EC 25
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة EC 29
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة EA 12
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة EA 16
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة EA 18
مسلك رقم (8): نموذج DNA المستخلص من السلالة PA 53
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة PA 54
مسلك رقم (10): نموذج DNA المستخلص من السلالة PA 60



شكل(3-2): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع السالبة لصبغة غرام.

مسلك رقم (1): نموذج DNA المستخلص من السلالة AS 4
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة AS 7
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة AS 10
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة ST 62
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة ST 69
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة SM 73
مسلك رقم (8): نموذج DNA المستخلص من السلالة SM 74
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة SM 76

200-23 كيلو قاعدة (**Paul *etal*., 1989; Araque *etal*., 1997; Chang *etal*,2000**) واشارت دراسات أخرى امتلاك بكتيريا ***S.typhimurium*** العديد من البلازميدات ذات أوزان جزيئية قد تصل إلى 60 ميكا دالتون (**Darwin & Miller, 1999; Gillian *etal*., 2000**) . كما أكدت العديد من الدراسات احتواء بكتيريا ***K.pneumoniae*** على العديد من البلازميدات ذات مدى واسع من الحجوم قد يصل إلى 150 كيلو قاعدة (**Petit *etal*, 1988; Eisen *etal*., 1995; Burnside & Groot-Obbink, 1996; Araque *etal*., 1997**). واوضحت دراسات أخرى احتواء بكتيريا ***P.aeruginosa*** العديد من البلازميدات ذات أحجام قد تصل إلى اكثر من 23 كيلو قاعدة (**Tenover,1991; Johnson &Woodford, 1993; الجبوري ,1997**)

كما أشارت العديد من الدراسات إلى احتواء بكتيريا ***S.viridans,S.aureus*** العديد من البلازميدات الصغيرة الحجم (**Hiramatsu *etal*.; 1990, Hiramatsu, 1995; Katia *etal*., 1999; Kuroda *etal*., 2000**)

أشارت نتائج عزل DNA البلازميدي إلى أن عزلات بكتيريا ***E.coli*** كانت الأفضل في تحللها تلتها بكتيريا***S.typhimurium*** مقارنة مع عزلات بكتيريا ***K.pneumonia***, ***P.aerugenosa*** التي استلزم تحللها معاملتها بدارئ Saline –EDTA ويرجع السبب في ذلك إلى طبيعة جدار هذه البكتيريا الممتلك لطبقات مخاطية إضافية (**الجبوري ، 1997**) أن وجود السكروز في المحلول يوفر ضغطاً اوزموزياً مساويا الى الخارج ويمنع السفيروبلاست (Spheroplast) من الانفجار (**Roland *etal*.; 1993**) .

يتحلل السفيروبلاست بفعل وجود SDS بتركيز 1% الذي يعمل على إخراج كلاً من DNA الكروموسومي والبلازميدي معاً إلى المحلول. كما لوحظ أن حضن عالق الخلايا على الثلج مدة 15 دقيقة كان افضل من استعمال الحضن بدرجة 37 مْ ,كما ويمكن فصل ألـ DNA البلازميدي عن الـDNA الكروموسومي عن طريق الطرد المركزي (15000دورة/دقيقة) حيث يترسب ألـ DNA الكروموسومي وبقية المحتويات ويبقى الـ DNA البلازميدي في الرائق. أن إضافة محلول خلات البوتاسيوم برقم هيدروجيني 4.8 يعمل على ترسيب ألـ DNA الكروموسومي الذي يمسخ بفعل وجود SDSويصبح بشكل خيوط مفردة , كما أن معقد SDS-RNA ومعقد SDS-Protein اللذان يتكونان عند إضافة SDS % 1 يترسبان عند وجود محلول خلات البوتاسيوم (**Tait, 1997; Woodford & Johnson, 1998**) .

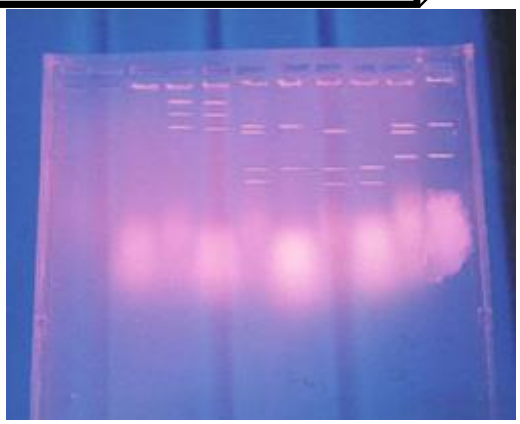
استخدمت صبغة بروميد الاثيديوم لفحص ألـ DNA البلازميدي أثناء عملية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لكونها من الصبغات التي لها القابلية على الارتباط بالـ DNA

من خلال إدخال نفسها بين القواعد المتكدسة (Stacked bases) في مركز حلزون الـ DNA ويكون ارتباط الصبغة بالـ DNA الخيطي اكبر من ارتباطها بالـ DNA المغلق تساهمياً . (**Tait; 1997**)

أشارت العديد من الدراسات إلى أن عملية تنقية ألـ DNA البلازميدي هي عملية معقدة في اغلب الأحيان وتعتمد على الاختلافات في الخصائص الفيزياوية بين جزيئات ألـ DNA الدائرية والخطية حيث تتعرض البلازميدات إلى ضغوط وعوامل عديدة سواء إثناء تحضيرها أو عند إزالة ألـ DNA الكروموسومي ونتيجة لذلك يظهر البلازميد باشكال مختلفة يتخذ كلاً منها موقعه أثناء عملية الترحيل الكهربائي (**Brodn,1979; Tait,1997; Woodford & Johnson, 1998**)

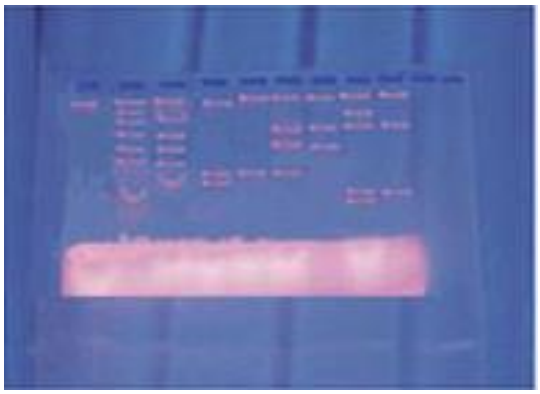
من الأشكال المتوقع مشاهدتها أثناء عملية الترحيل الكهربائي الشكل الدائري المغلق تساهمياً (Covalently Closed Circular) (CCC) ويعرف أيضاً بفائق اللف (Super coiled) حيث يسير في المقدمة تاركاً خلفه الشكل الخطي (Linear Form) ويليه الشكل الدائري المفتوح (Open Circular) (OC) , وقد يظهر البلازميد بشكل مثنوي (Dimer) والذي ينتج عن بقاء البلازميدات متصلة مع بعضها بعد تضاعفها (**Kado & Liu, 1989; Perry & Staley, 1997; Woodford & Johnson, 1998**)

يتم التفريق بين هذه الأشكال من الحزم البلازميدية أما باستخدام المجهر الإلكتروني (**Brodn,19**79) أو اعتماد طريقة الفصل في متدرج الكثافة(Density gradient) بوجود كلوريد السيزيوم /بروميد الاثيديوم وذلك للتفريق بين شكلي CCCوOC (**Currier&Nester;1976;Roberston *etal*,1997**).



شكل(3-5): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية الواهبة السالبة لصبغة غرام والسلالة المستلمة والسلالات المقترنة.

مسلك رقم (1): نموذج DNA المتخلص من السلالة المستلمة EC HB101
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة EC 29
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة EA 16
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة PA 60
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة
مسلك رقم (8): نموذج D NA المستخلص من السلالة الواهبة AS 10
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة



شكل(3-6): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية الواهبة السالبة لصبغة غرام والسلالة المستلمة والسلالات المقترنة.

مسلك رقم (1): نموذج DNA المتخلص من السلالة المستلمة EC HB101
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة ST 64
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة SM 73
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة KP 31
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة
مسلك رقم (8): نموذج D NA المستخلص من السلالة الواهبة MC 42
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة

5-3 الاقتران البكتيري

تم انتخاب عزلة واحدة لكل نوع من العزلات البكتيرية التي درس محتواها البلازميدي في الفقرة (3-4) كخلايا واهبة لكونها تمتلك صفة المقاومة للعديد من المضادات الحيوية إضافة إلى إنتاجها لإنزيمات البيتالاكتاميز وذلك لغرض التعرف على موقع هذه المورثات سواء كانت بلازميدية أم كروموسومية . تم انتخاب السلالة القياسية ***E. coli*** HB101 strep^r كخلايا مستلمة وذلك لحساسيتها لجميع المضادات المستخدمة ما عدا المضاد الحيوي ستربتومايسين.

أن انتشار البكتيريا المقاومة لمختلف المضادات الحيوية أثار اهتمام العديد من الباحثين في الوقت الحاضر لدراسة أسباب حصول هذه المقاومة سواء في البكتيريا الموجبة لصبغة غرام أو السالبة لها . هدفت هذه التجربة إلى دراسة انتقال المورثات البلازميدية بين البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام عن طريق آلية الاقتران البكتيري لإثبات انتقال المورثات عبر البيئات المختلفة.

لقد كان اهتمام الباحثين سابقاً يتركز على دراسة طرائق انتقال المورثات بين أجناس البكتيريا السالبة لصبغة غرام أو بين الأجناس المختلفة الموجبة لصبغة غرام **(Malke, 1979 ;Engel *etal.*, 1980 ;Horodniceanu *etal.*, 1982)** ، بينما تركزت الدراسات منذ العقد الأخير من القرن الماضي على انتشار المقاومة بين البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام والعكس بالعكس **(Bertram *etal.*, 1991)** . أظهرت النتائج المبينة في الجدول (3-7) نجاح عملية الاقتران البكتيري لجميع العزلات المختبرة حيث بلغ تردد الاقتران للأنواع الموجبة لصبغة غرام $1x10^{-2}$ لعزلات بكتيريا ***S. aureus*** و 5.5×10^{-4} لعزلات بكتيريا ***S. viridans*** في حين تراوح تردد الاقتران للأنواع السالبة لصبغة غرام بين 10^{-2} x 3 لعزلات بكتيريا ***E. coli*** الى 2×10^{-2} لعزلات بكتيريا ***S. typhimurium*** و ***S. marcescens*** . وقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع العديد من الدراسات التي أكدت أن انتقال الجينات بين سلالات البكتيريا من أجناس مختلفة يحدث في الطبيعة وبتردد عالي بين الأجناس المتشابهة ولكنه يحدث بتردد أوطأ بين الأنواع والأجناس المختلفة **(Duval –Iflahy *etal.*, 1994)** .

اختيرت المضادات الحيوية الأمبسلين ، الأموكسلين ، ترايميثوبرايم –سلفاميثاكسزول ، الكلورامفينكول ، التتراسايكلين ، الجنتامايسين ، النيومايسين ، التوبرامايسين ، الكوليستين ، الريفامبين و اللينكومايسين كمؤشرات وراثية لانتقال صفة المقاومة في هذه التجربة ، وأوضحت النتائج المبينة في الجدول (3-8) انتقال المورثات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة لجميع المضادات الحيوية ما عدا مضادات التوبرامايسين ، النيومايسين ، الجنتامايسين

والكوليستين من السلالات الواهبة إلى السلالة المستلمة مما يدل على أن المقاومة لهذه المضادات ربما تحمل مورثاتها على بلازميدات غير اقترانية أو إنها كروموسومية الموقع فقد أشارت العديد من الدراسات إلى أن المورثات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضادات الامينوكلايكوسيدية مثل إنتاج الإنزيمات المحطمة لهذه المضادات قد تحمل على العوامل القافزة ***Tn 4001*** الكروموسومية الموقع أو محمولة على بلازميد غير اقتراني **(Lyon *etal*., 1987; Byrne *etal*., 1990; Rahman *etal*., 1990; Layton *etal*., 1993)** . أثبت **(LeBlance *etal*., 1978)** أن بلازميد pAMB1 المسؤول عن المقاومة للأرثرومايسين واللينكومايسين له القدرة على الانتقال بين أنواع بكتيرية مختلفة مظهرياً من بكتيريا lactic acid مثل ***Lactobacillus casei*** و***Streptococcus*** عن طريق آلية الاقتران البكتيري . كما وجد أن انتقال جينات المقاومة للفانكومايسين مرتبط مع انتقال جينات المقاومة للأرثرومايسين وليس مع جينات المقاومة للتتراسايكلين وان هنالك ارتباطاً بين المقاومة للكلايكوببتيدات والماكروليدات **(Leclercq *etal*., 1988)** . كما أثبت وبشكل تام في دراسة استمرت 15 عام قام بها **(Jacob & Hobbs, 1974)**أن المقاومة للكلورامفينكول تتوسطها جينات محمولة على بلازميدات اقترانية ،وقد عينت هذه البلازميدات في ثلاث مجاميع من المكورات المعوية **(Clewell *etal*., 1974; VanEmbden *etal*., 1977; LeBlance *etal*., 1978)** . كما أظهرت نتائج الاقتران البكتيري أن انتقال المقاومة للتتراسايكلين والكلورامفينكول ومضادات البيتالاكتام كان مترافقاً في أغلب الحالات مما يشير إلى أن الجينات المسؤولة عن المقاومة لهذه المضادات موجودة وبشكل متلازم على نفس البلازميد الاقتراني مما يؤدي إلى اكتساب صفة المقاومة لعدد من هذه المضادات **(Brown,1975; Sirot *etal*., 1991; Bauernfeing *etal*., 1996)** .

اتفقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة أثبت فيها أن بلازميدات المقاومة للمضادات الحيوية في المسبحيات والمكورات المعوية تنشأ في القناة الهضمية للإنسان والحيوان وأن هذه البكتيريا تكون مستودعاً لجينات المقاومة ليس في البكتيريا الموجبة لصبغة غرام فقط وإنما البكتيريا السالبة لها **(Murray & Mederski- Samovaj, 1983; Stotzky & Babich, 1986)** .

جدول (3-7): نتائج الأقتران البكتيري لبعض العزلات السالبة والموجبة لصبغة غرام (كسلالات واهبة) مع السلالة القياسية *E. coli* HB101 strep^r (كسلالة مستلمة).

أرقام العزلات المستخدمة في الأقتران البكتيري	العدد الكلي للخلايا المستلمة/ مل	أعداد المقترنات/مل	تردد الأقتران
AS7	4×10^{9}	3×10^{7}	7.5×10^{-3}
EA18	9×10^{9}	4×10^{7}	4.4×10^{-3}
EC29	1×10^{9}	3×10^{7}	3.0×10^{-2}
KP38	2×10^{9}	9×10^{6}	4.5×10^{-3}
MC42	5×10^{9}	2×10^{6}	4.0×10^{-4}
PA60	2×10^{9}	5×10^{6}	2.5×10^{-3}
ST62	4×10^{9}	2×10^{7}	5.0×10^{-3}
SM77	4×10^{9}	2×10^{7}	5.0×10^{-3}
SA81	1×10^{9}	1×10^{7}	1.0×10^{-2}
SV96	9×10^{9}	5×10^{5}	5.5×10^{-4}

جدول (3-8): نتائج تجارب الاقتران البكتيري و التحول الوراثي.

العزلات الواهبة ومؤشراتها الوراثية	المؤشرات الوراثية للمقترنات	المؤشرات الوراثية للمتحولات

أرقام العزلات	مؤشراتها الوراثية		
AS7	AMP AX SXT N TOB CT RD DA Te	AMP AX SXT RD DA S Te	AMP AX CT RD DA S Te
EA18	AMP AX SXT C J N DA Te	AMP AX SXT C DA S Te	AMP AX RD DA S Te
EC29	AMP AX SXT C J TOB CT RD DA Te	AMP AX SXT C RD DA S Te	AMP AX CT RD DA S Te
KP38	AMP AX SXT C J N TOB RD DA Te	AMP AX SXT C RD DA S Te	AMP AX RD DA S Te
MC42	AMP AX SXT C N TOB CT DA Te	AMP AX SXT C DA S Te	AMP AX CT DA S Te
PA60	AMP AX SXT C N TOB CT RD DA Te	AMP AX SXT C RD DA S Te	AMP AX CT RD DA S Te
ST62	AMP AX SXT C J N TOB DA Te	AMP AX SXT C DA S Te	AMP AX DA S Te
SM77	AMP AX SXT J N TOB DA Te	AMP AX SXT DA S Te	AMP AX DA S Te
SA81	AMP AX SXT C J N CT RD DA Te	AMP AX SXT C RD DA S Te	AMP AX CT RD DA S Te
SV96	AMP AX SXT C J N TOB CT RD DA Te	AMP AX SXT C RD DA S Te	AMP AX CT RD DA S Te

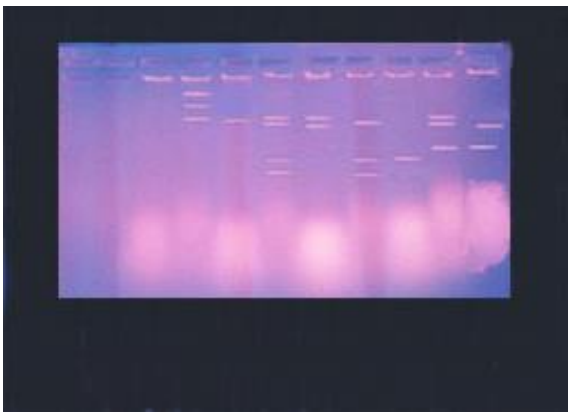
*** أستخدمت السلالة القياسية *E. coli* HB101 strep^r كسلالة مستلمة.**

AMP= امبسلين SXT= ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسازول J= جنتامايسين CT= كوليستين
AX= أمبيكلوكس TOB = توبرامايسين C= كلورامفينيكول DA = كلندامايسين
S= ستربتومايسين N= نيومايسين RD= ريفامبين Te= تتراسايكلين

أظهر الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز امتلاك المقترنات حزم بلازميدية لم تكن موجودة في الخلايا المستلمة وكما موضح في الشكل (3-5) و (3-6) . أن مقدرة البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام على الاقتران مع السلالة القياسية يؤكد وجود عدة مظائف لهذه البلازميدات حيث يطلق عليها البلازميدات المختلطة **(Date & Smith, 1971; Datta & Nugent, 1984; Perry & Staley, 1997)** . كما بينت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز المبينة في الشكل (3-5) و (3-6) تفاوت في أعداد الحزم البلازميدية المنتقلة بطريقة الاقتران البكتيري وأن هذه الاختلاف في نمط انتقال البلازميدات يعود إلى طبيعة وتركيب هذه البلازميدات حيث تدعى البلازميدات القادرة على الانتقال بالبلازميدات الاقترانية (Conjugative plasmids) **(Frifelder, 1987; Perry & Staley, 1997; Tait, 1997)** . كما أوضحت عدد من الدراسات إمكانية انتقال بلازميدات اقترانية بوجود بلازميدات منتقلة ذاتياً وتسمى العملية التي يتم فيها انتقال بلازميد غير اقتراني بمساعدة بلازميد اقتراني منتقل ذاتياً بعملية العطاء Donation أو ما تعرف بالتحريك Mobilization

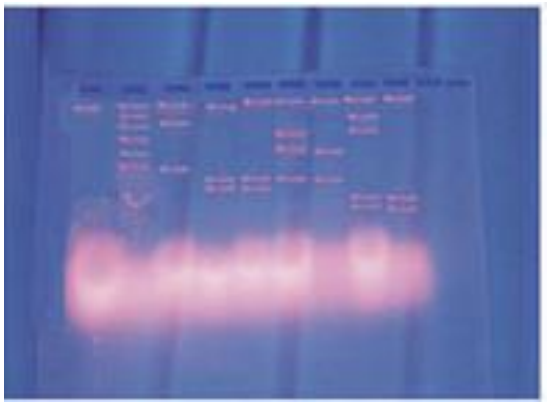
(Frifelder, 1987; Tait, 1997; Perry & Staley, 1997) . من هنا تأتي خطورة هذه البلازميدات الاقترانية المنتقلة ذاتياً بسبب ما تحمله من مقاومة متعددة لأكثر من مضاد ويمكن القول أن أغلب الإحصائيات المدونة في المستشفيات كان سببها سلالات حاوية على هذا النمط من البلازميدات المشفرة للمقاومة المتعددة **(Wiedman *etal.*, 1989; Sanders, 1992)** . أن فشل انتقال بعض الحزم غير الاقترانية بالرغم من وجود تلك المقترنة معها ربما يعزي إلى حصول طفرة وراثية أو فقدان في الجينات المشفرة للإنزيمات القاطعة لأحد شريطي الـ DNA ، كما أن حصول طفرة وراثية في الموقع المحدد لعمل الإنزيمات القاطعة يمنع البلازميد غير الاقتراني من الانتقال **(Frifelder, 1987)** .

أن عملية الاقتران البكتيري من التقنيات المهمة التي تكشف عن تغيرات جينات المقاومة للمضادات الحيوية التي تنتقل باستمرار من البكتيريا الموجبة لصبغة غرام إلى البكتيريا السالبة للصبغة ، وبشكل دقيق بوجود المكورات المعوية Enterococci والمسبحيات Streptococci المقاومة للمضادات الحيوية مثل المقاومة للأرثرومايسين التي يكون الجين ***ermB*** مسؤولاً عنها في عدد كبير من البكتيريا التي تنتمي إلى العائلة المعوية التي تعزل من المرضى الذين يتعالجون باستعمال هذا المضاد عن طريق الفم **(Arthur *etal.*, 1987; Duval-Iflahy *etal.*, 1994)** .



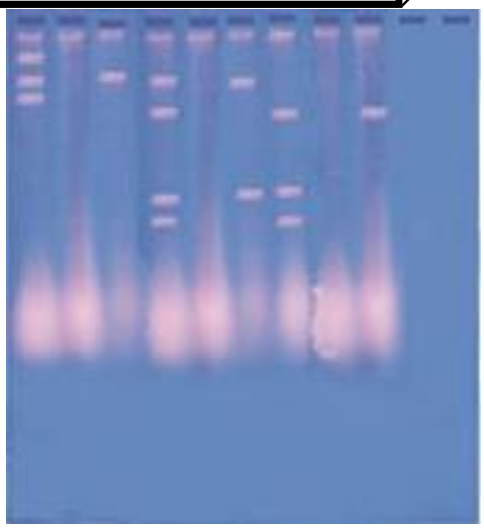
شكل(3-7): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية الواهبة السالبة لصبغة غرام والسلالة المستلمة والسلالات المتحولة.

مسلك رقم (1): نموذج DNA المتخلص من السلالة المستلمة EC HB101
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة EC 29
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة EA 16
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة PA 60
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة
مسلك رقم (8): نموذج D NA المستخلص من السلالة الواهبة AS 10
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة



شكل(3-8): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية الواهبة السالبة لصبغة غرام والسلالة المستلمة والسلالات المقترنة.

مسلك رقم (1): نموذج DNA المتخلص من السلالة المستلمة EC HB101
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة ST 64
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة SM 73
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة KP 31
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة
مسلك رقم (8): نموذج D NA المستخلص من السلالة الواهبة MC 42
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة



شكل(3-9): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام والسلالات المحيدة.

مسلك رقم(1): نموذج DNA المستخلص من السلالة EC 29
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة EC 29 باستخدام SDS
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة EC 29 باستخدام SA
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة EA 16
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة EA 16 باستخدام SDS
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة EA16 باستخدام SA
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة PA 60
مسلك رقم (8): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة PA 60 باستخدام SDS
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة PA 60 باستخدام SA

3-6 التحول الوراثي

بينت نتائج الاقتران البكتيري انتقال الحزم البلازميدية الحاملة لصفة المقاومة لأغلب المضادات الحيوية والمشفرة لإنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز من السلالات الواهبة إلى المستلمة في حين لم تنتقل صفة المقاومة للمضادات الامينوكلايكوسيدية والكوليستين بطريقة الاقتران لذا لابد من أجراء تجارب التحول الوراثي لمعرفة موقع المورثات المشفرة لتلك المضادات فيما إذا كانت كروموسومية أو إنها محمولة على بلازميدات غير اقترانية .

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (3-9) نجاح عملية التحول الوراثي لجميع العزلات المختبرة حيث بلغ أعلى تردد للانتقال في الأنواع الموجبة لصبغة غرام 7.7×10^{-5} لعزلات

بكتيريا ***S.viridans*** في حين بلغ أعلى تردد للانتقال في الأنواع السالبة لصبغة غرام x8.5 10^{-2} لعزلات بكتيريا ***E.coli*** . تم معاملة الخلايا بتراكيز عالية من ملح كلوريد الكالسيوم المبرد حيث تسبب هذه المعاملة انتفاخ الخلية فتصبح لها القابلية على الارتباط بأية جزيئة DNA **(Sambrook *etal.*, 1989; Tait ,1997)** . أن تعريض الخلايا إلى حمام ثلجي يؤدي إلى تقلص الخلايا وبالتالي اخذ أية جزيئة DNA مرتبطة بها، أما عند تعريضها إلى صدمة حرارية لمدة ثواني فان ذلك سيسهل من عملية دخول الـ DNA البلازميدي إلى هذه الخلايا **(Cohen *etal.*, 1972; Tait, 1997)** . بين **(Hanahan, 1983)** إمكانية زيادة كفاءة التحول من 15-20 مرة باستخدام مواد مثل : Dithiotheritol Hexamin cobalt Trichloride و DMSO إضافة إلى وجود أيونات مثلMn^{+2} و Ca^{+2} .

أختيرت المضادات الحيوية المستخدمة في تجربة الاقتران البكتيري كمؤشرات وراثية لانتقال صفة المقاومة في هذه التجربة ، حيث أوضحت النتائج المبينة في الجدول (3-8) عدم انتقال المورثات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضادات الحيوية التتراسايكلين ، الكلورامفينكول و ترايميثوبرايم –سلفاميثاكسزول مما يدل على أن مورثاتها محمولة على بلازميدات اقترانية تنتقل طبيعياً في بيئاتها لكنها تفشل في إتمام الانتقال مختبرياً، فقد أشارت العديد من الدراسات إلى أن المورثات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة لهذه المضادات تحمل عوامل قافزة محمولة على بلازميدات اقترانية ممكن أن تنتقل من سلالة إلى أخرى في بيئاتها الطبيعية **(Hall & Collis,1995; Bass *etal.*,1999; Martinez-freijo *etal.*, 1999; Chang *etal.*, 2000)** .

جدول (3-9): نتائج التحول الوراثي باستخدام DNA البلازميدي من بعض العزلات السالبة والموجبة لصبغة غرام (كسلالات واهبة) مع السلالة القياسية *E. coli* HB101 strep^r (كسلالة مستلمة).

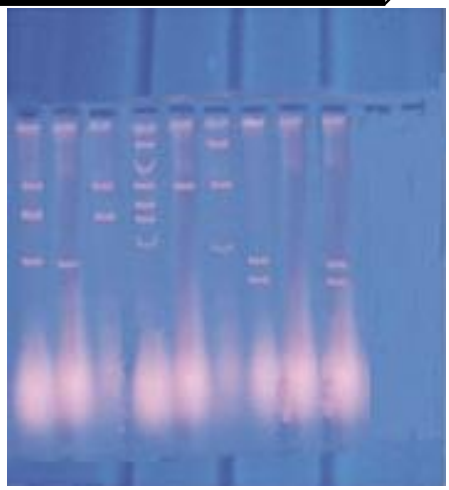
مصدر DNA البلازميدي المستخدم في التحول	العدد الكلي للخلايا المستلمة/ مل	اعداد المتحولات/ مل	تردد التحول
AS7	**2×10^9**	**5×10^6**	**2.5×10^{-3}**
EA18	**18×10^8**	**2×10^6**	**1.1×10^{-3}**
EC29	**14×10^8**	**12×10^7**	**8.5×10^{-2}**
KP38	**23×10^8**	**3×10^6**	**1.3×10^{-3}**
MC42	**12×10^8**	**1×10^7**	**8.3×10^{-3}**
PA60	**17×10^8**	**1×10^6**	**5.8×10^{-2}**
ST62	**47×10^8**	**9×10^7**	**1.9×10^{-2}**

SM77	**10×10^8**	**8×10^7**	**8.0×10^{-2}**
SA81	**17×10^8**	**8×10^4**	**4.7×10^{-5}**
SV96	**9×10^8**	**7×10^4**	**7.7×10^{-5}**

كما بينت نتائج الجدول (3-8) عدم انتقال المورثات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضادات الأمينوكلايكوسيدية (التوبراماسين والنيومايسين والجنتامايسين) بطريقتي الاقتران والتحول البكتيري مما يشير إلى أن مورثاتها ربما تكون كروموسومية الموقع ، فقد بينت العديد من الدراسات أن المحددات الوراثية المسؤولة عن بناء الإنزيمات المحطمة لهذا المضادات تحمل على عوامل قافزة ***Tn 4001*** كروموسومية الموقع **(Lyon *etal.*, 1984; Skurray *etal.*, 1988; Murry *etal.*, 1990)** . كما أظهرت النتائج المبينة في الجدول (3-8) و(3-9) عدم انتقال المورثات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضاد كوليستين بطريقة الاقتران البكتيري ولكنها انتقلت بطريقة التحول الوراثي مما يشير إلى أن مورثاتها ربما تحمل بلازميدات غير اقترانية .

أوضحت نتائج الاقتران و التحول البكتيري انتقال صفة إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز إلى السلالات المقترنة والمتحولة مما يشير إلى أن صفة إنتاج هذه الإنزيمات تحمل مورثاتها على بلازميدات اقترانية ، فقد أكدت العديد من الدراسات أن مقدرة الأنواع البكتيرية على مقاومة مضادات البيتالاكتاميز تعزى إلى قابليتها على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز من النوع SHV-1 و TEM التي تحمل مورثاتها على بلازميدات اقترانية **(Sykes & Mattew, 1976; Bush, 1989; Philipon *etal.*, 1989; Chaibi *etal.*, 1996)** . كما أظهرت نتائج الاقتران والتحول البكتيري عدم انتقال صفة إنتاج الصبغة الخضراء المميزة لبكتيريا ***P.aeruginosa*** إلى الخلايا المستلمة مما يدل على صفة إنتاج الصبغة هي صفة كروموسومية **(Mekalanos, 1992)** .

أظهر الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز المبينة في الشكل (3-7) و(3-8) حزم بلازميدية لم تكن موجودة في الخلايا المستلمة ، كما بينت النتائج تفاوتاً في أعداد الحزم البلازميدية المنتقلة بطريقة التحول مقارنة مع تلك المنتقلة بطريقة الاقتران البكتيري ، حيث تعتمد كفاءة التحول على تحضير الخلايا الكفؤة (Competence cells) التي لها القابلية على استقبال أية جزيئة DNA مرتبطة بها مقارنة مع عملية الاقتران البكتيري التي ترتبط ارتباطاً وثيقاً بالظروف الطبيعية المحيطة بالخلايا **(Sambrooks *etal.*, 1989; Tait, 1997)**



شكل(3-10): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام والسلالات المحيدة.

مسلك رقم(1): نموذج DNA المستخلص من السلالة AS 10
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة AS 10 باستخدام SDS
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة AS 10 باستخدام SA
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة ST 64
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة ST 64 باستخدام SDS
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة ST 64 باستخدام SA
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة SM 73
مسلك رقم (8): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة SM 73 باستخدام SDS
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة SM 73 باستخدام SA

تحييد البلازميدات

أجريت عملية تحييد البلازميدات لعزلات الأنواع البكتيرية المنتخة والمتميزة بمقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية وإنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز . تم اختيار مادتي حامض السالسليك(SA) وكبريتات دودسيل الصوديوم (SDS) كمواد محيدة لكونها مواد غير مطفرة ولها القابلية على التأثير على جدار الخلية البكتيرية مما يؤدي إلى فقدان ارتباط البلازميدات بالجدار أثناء الانقسام الخلوي وفشل البلازميدات في الانتقال إلى الخلايا البنوية الجديدة وبالتالي فقدان هذه البلازميدات (**Trevors, 1986; Hardy, 1987; Sawai *etal.*, 1987**; **Ochs *etal.*, 1999**) .

أظهرت نتائج تحييد البلازميدات المبينة في الجدول (3-10) أن استخدام مادة SDS كعامل محيد أدى إلى فقدان المورثات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضادات الأمينوكلايكوسيدية ، ترايميثوبرايم - سلفاميثاكسزول ، الكلورامفينكول ، التتراسايكلين ، الريفامبين ، اللينكومايسين والكوليستين لجميع عزلات الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام في حين فقدت المورثات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضادات الأمينوكلايكوسيدية ، التتراسايكلين ، الكوليستين ،الريفامبين و ترايميثوبرايم –سلفاميثاكسزول بالنسبة للأنواع الموجبة لصبغة غرام . أما في حالة استخدام حامض السالسليك كعامل محيد فقد أظهرت النتائج المبينة في الجداول (3-10) فقدان المورثات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضادات الأمينوكلايكوسيدية والكلورامفينكول والريفامبين بالنسبة للأنواع السالبة لصبغة غرام وفقدان المورثات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضادات الكوليستين ، اللينكومايسين ، الريفامبين والمضادات الأمينوكلايكوسيدية بالنسبة للأنواع الموجبة لصبغة غرام . أن الحساسية العالية التي أبدتها العزلات المحيدة لأغلب المضادات الحيوية قد تعزى إلى زيادة نفوذية جدران خلايا هذه الأنواع البكتيرية لتلك المضادات بسبب تأثير مادتي حامض السالسليك و SDS على طبقة LPS وبورينات الجدار مما يسمح بمرور كميات كبيرة من جزيئات المضادات الحيوية إلى داخل الخلية البكتيرية **(Slouch & Silhavy, 1989; Todt *etal.*, 1992; Palomar *etal.*, 1993; Pratt *etal.*, 1996; Adewoye & Worobec,1999)** .

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز المبينة في الشكل (3-9) ، (3-10) و(3-11) اختفاء جميع الحزم البلازميدية من الخلايا المحيدة المعاملة بمادة SDS في حين أظهرت النتائج بقاء حزمة بلازميدية واحدة إلى حزمتين في الخلايا المحيدة المعاملة بمادة حامض السالسليك مما يشير إلى أن مادة SDS كانت أكثر كفاءة في تحييد البلازميدات ، وربما يعزي السبب في ذلك إلى أن إضافة حامض السالسليك إلى الوسط الزرعي يؤدي إلى زيادة مستوى التعبير عن أوبرون البورين والقليل من بروتينات الغشاء الخلوي مما يؤدي إلى زيادة نفاذية بعض المركبات من ضمنها المضادات الحيوية **(Martinez-Freijo *etal.*, 1998; Adewoye & Worobec, 1999)**

جدول (3-10): نتائج تجارب التحييد.

أرقام العزلات المستخدمة في التحييد ومؤشراتها الوراثية		المؤشرات الوراثية للعزلات المحيدة باستخدام مادة SDS	المؤشرات الوراثية للعزلات المحيدة باستخدام مادة حامض السالسليك
أرقام العزلات	مؤشراتها الوراثية		
AS7	AMP AX SXT N TOB CT RD DA Te	AMP AX	AMP AX SXT CT DA Te
EA18	AMP AX SXT C J N DA Te	AMP AX	AMP AX SXT DA Te
EC29	AMP AX SXT C J TOB CT RD DA Te	AMP AX	AMP AX SXT CT DA Te
KP38	AMP AX SXT C J N TOB RD DA Te	AMP AX	AMP AX SXT RD
MC42	AMP AX SXT C N TOB CT DA Te	AMP AX	AMP AX SXT CT DA Te
PA60	AMP AX SXT C N TOB CT RD DA Te	AMP AX	AMP AX SXT CT DA RD Te
ST62	AMP AX SXT C J N TOB DA Te	AMP AX	AMP AX SXT DA Te
SM77	AMP AX SXT J N TOB DA Te	AMP AX	AMP AX SXT DA Te
SA81	AMP AX SXT C J N CT RD DA Te	AMP AX C DA	AMP AX SXT Te
SV96	AMP AX SXT C J N TOB CT RD DA Te	AMP AX C DA	AMP AX SXT Te

AMP= امبسلين　　SXT= ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسازول　　J= جنتامايسين　　CT= كوليستين
AX= أمبيكلوكس　　TOB = توبرامايسين　　C= كلورامفينيكول　　DA = كلندامايسين
S= ستربتومايسين　　N= نيومايسين　　RD= ريفامبين　　Te= تتراسايكلين

شكل(3-11): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام والسلالات المحيدة.

مسلك رقم(1): نموذج DNA المستخلص من السلالة KP 31
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة KP 31 باستخدام SDS
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة KP 31 باستخدام SA
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة MC 42
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة MC 42 باستخدام SDS
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة MC 42 باستخدام SA

قائمة المختصرات

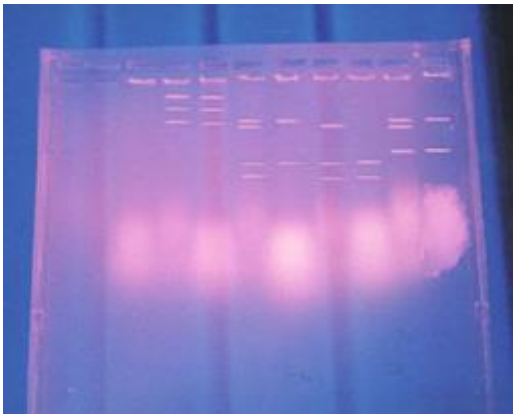
الرمز	الاســـم
A. salmonicida	***Aeromonas salmonicida***
B. cerus	***Bacillus cerus***
C. difficle	***Clostridium difficle***
E. aerugenes	***Enterobacter aerugenes***
E. faecalis	***Enterococcus faecalis***
E.coli	***Escherichia coli***
H. haemolyticus	***Haemophilus haemolyticus***
K. oxytoca	***Klebsiella oxytoca***
K. planticola	***Klebsiella planticola***
K. pneumoniae	***Klebsiella pneumoniae***
M. catarrhalis	***Moraxella catarrhalis***
N. gonorrhoeae	***Nisseria gonorrhoeae***
p. mirabilis	***Proteus mirabilis***
p. vulgaris	***Proteus vulgaris***
P. aeruginosa	***Pseudomonas aeruginosa***
S. typhimurium	***Salmonella typhimurium***
S. grimesii	***Serratia grimesii***
S. marcescens	***Serratia marcescens***
S. dysenteriae	***Shigella dysenteriae***
S. aureus	***Staphylococcus aureus***
S. viridans	***Streptococcus viridans***
S. mitis	***Streptococcus mitis***
S. mutans	***Streptococcus mutans***
S. salivarius	***Streptococcus salivarius***
B-lactamase	Beta- lactamase
DHFR	Dihydrofolic Acid Reductase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylene Di-amine Tetra-acetic Acid
Na_2-EDTA	Ethylene Di-amine Tetra-acetic Acid- disodium
ESBL	Extended Specrum Beta Lactamase
ETEC	Enterotoxigenic ***Escherichia coli***
LPS	Lipopolysaccharid
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MRSA	Methicillin-Resistant ***Staphylococcus aureus***
PABA	***para-*** amino benzoic acid
PBPs	Penicillin Binding Proteins
SA	Salicylic Acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate

الاستنتاجات

- بلغت أعلى نسبة عزل للأنواع السالبة لصبغة غرام وقد كان النوع ***E. coli*** هو أكثر الأنواع شيوعاً تلاه النوع ***P. aeruginosa*** أما أعلى نسبة عزل للأنواع الموجبة لصبغة غرام كانت للنوع ***S. viridans*** تلاه النوع ***S. aureus*** .
- أظهرت جميع عزلات الأنواع السالبة والموجبة لصبغة غرام تشابهاً كبيراً في طرز المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.
- وجود تشابه كبير في نسق الحزم البلازميدية بين عزلات الأنواع السالبة والموجبة لصبغة غرام من حيث الموقع والحجم.
- أثبتت نتائج الاقتران والتحول الوراثي انتقال المورثات المسؤولة عن المقاومة لأغلب المضادات الحيوية وبعض المورثات والمسؤولة عن إنتاج بعض إنزيمات البيتالاكتاميز بين الأنواع المتشابهة وغير المتشابهة من البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام.
- تعتبر مادة SDS من العوامل المحيدة الجيدة مقارنة مع مادة حامض السالسليك.

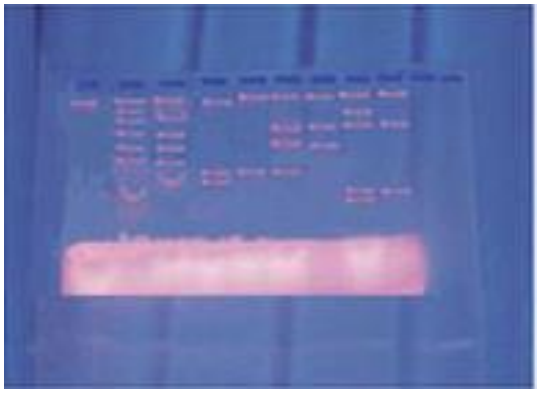
التوصيات

- ❖ إصلاح منظومات وحدة معالجة مياه الصرف الصحي في المستشفيات وذلك للحد من انتشار الأنواع البكتيرية المرضية في البيئة.
- ❖ الاستمرار في مراقبة ظهور الأنواع البكتيرية المرضية ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية سواء المعزولة من المرضى أو من الأصحاء في المستشفيات وكذلك البكتيريا المعزولة من بيئات مختلفة عن طريق أجراء دراسات إحصائية موسعة لها.
- ❖ دراسة موسعة عن الجينات القافزة الاقترانية المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحيوية التي تمتلكها الأنواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة غرام والتي تلعب دوراً مهماً في العديد من الإصابات.
- ❖ أجراء المزيد من الدراسات حول العوامل المحيدة وإمكانية استخدامها كمواد مطهرة وذلك للحد من انتقال العوامل الوراثية بين الأنواع البكتيرية.



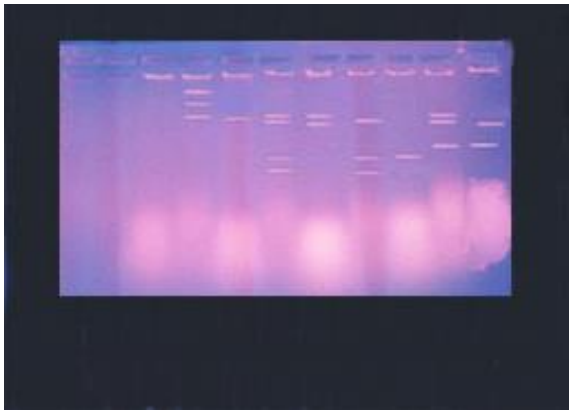
شكل(3-5): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية الواهبة السالبة لصبغة غرام والسلالة المستلمة والسلالات المقترنة.

مسلك رقم (1): نموذج DNA المتخلص من السلالة المستلمة EC HB101
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة EC 29
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة EA 16
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة PA 60
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة
مسلك رقم (8): نموذج D NA المستخلص من السلالة الواهبة AS 10
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة



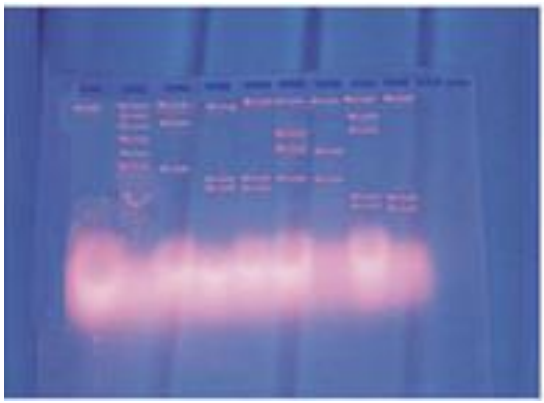
شكل(3-6): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية الواهبة السالبة لصبغة غرام والسلالة المستلمة والسلالات المقترنة.

مسلك رقم (1): نموذج DNA المتخلص من السلالة المستلمة EC HB101
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة ST 64
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة SM 73
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة KP 31
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة
مسلك رقم (8): نموذج D NA المستخلص من السلالة الواهبة MC 42
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة المقترنة



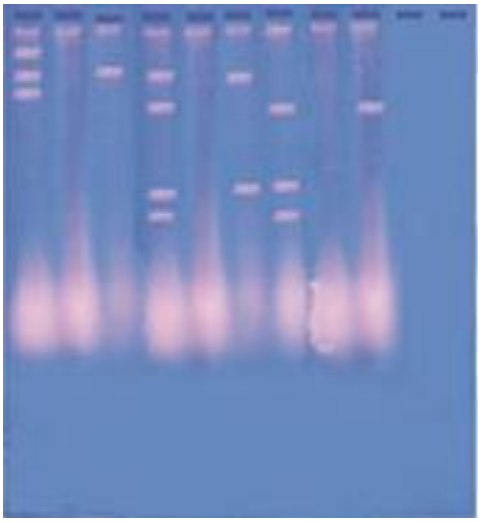
شكل(3-7): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية الواهبة السالبة لصبغة غرام والسلالة المستلمة والسلالات المتحولة.

مسلك رقم (1): نموذج DNA المتخلص من السلالة المستلمة EC HB101
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة EC 29
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة EA 16
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة PA 60
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة
مسلك رقم (8): نموذج D NA المستخلص من السلالة الواهبة AS 10
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة



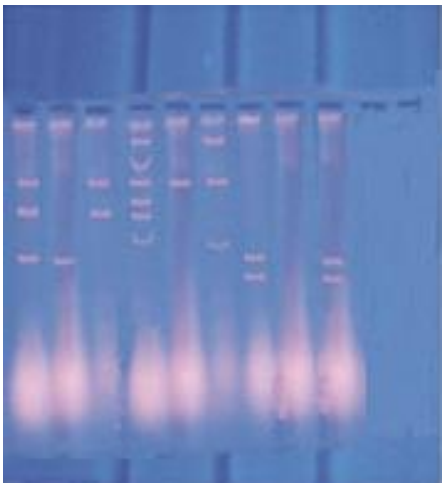
شكل(3-8): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية الواهبة السالبة لصبغة غرام والسلالة المستلمة والسلالات المقترنة.

مسلك رقم (1): نموذج DNA المتخلص من السلالة المستلمة EC HB101
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة ST 64
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة SM 73
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة الواهبة KP 31
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة
مسلك رقم (8): نموذج D NA المستخلص من السلالة الواهبة MC 42
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة المتحولة



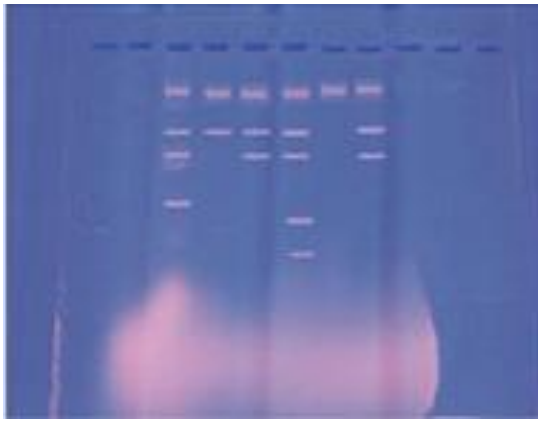
شكل(3-9): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام والسلالات المحيدة.

مسلك رقم(1): نموذج DNA المستخلص من السلالة EC 29
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة EC 29 باستخدام SDS
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة EC 29 باستخدام SA
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة EA 16
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة EA 16 باستخدام SDS
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة EA16 باستخدام SA
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة PA 60
مسلك رقم (8): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة PA 60 باستخدام SDS
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة PA 60 باستخدام SA



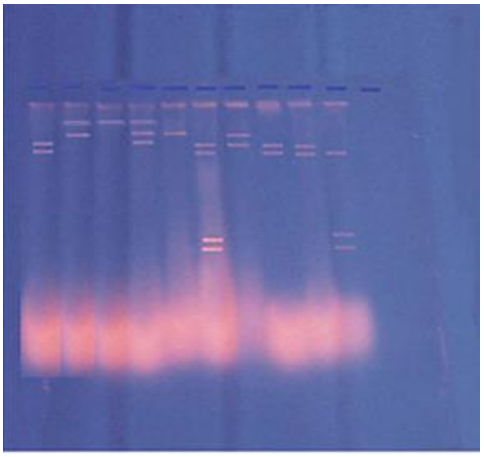
شكل(3-10): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام والسلالات المحيدة.

مسلك رقم(1): نموذج DNA المستخلص من السلالة AS 10
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة AS 10 باستخدام SDS
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة AS 10 باستخدام SA
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة ST 64
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة ST 64 باستخدام SDS
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة ST 64 باستخدام SA
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة SM 73
مسلك رقم (8): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة SM 73 باستخدام SDS
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة SM 73 باستخدام SA



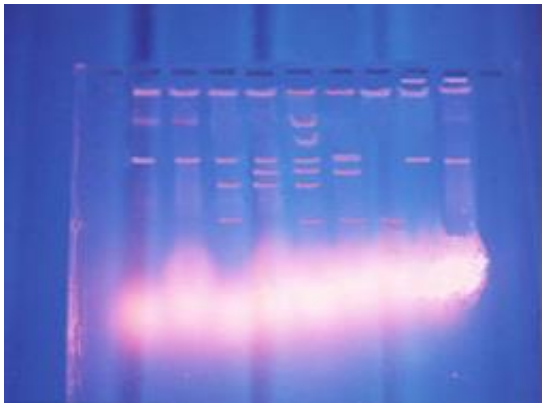
شكل(3-11): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام والسلالات المحيدة.

مسلك رقم(1): نموذج DNA المستخلص من السلالة KP 31
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة KP 31 باستخدام SDS
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة KP 31 باستخدام SA
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة MC 42
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة MC 42 باستخدام SDS
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة المحيدة MC 42 باستخدام SA



شكل(3-1): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع السالبة لصبغة غرام.

مسلك رقم (1): نموذج DNA البلازميد القياسي pBR322
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة EC 22
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة EC 25
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة EC 29
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة EA 12
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة EA 16
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة EA 18
مسلك رقم (8): نموذج DNA المستخلص من السلالة PA 53
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة PA 54
مسلك رقم (10): نموذج DNA المستخلص من السلالة PA 60



شكل(3-2): الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز يوضح النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع السالبة لصبغة غرام.

مسلك رقم (1): نموذج DNA المستخلص من السلالة AS 4
مسلك رقم (2): نموذج DNA المستخلص من السلالة AS 7
مسلك رقم (3): نموذج DNA المستخلص من السلالة AS 10
مسلك رقم (4): نموذج DNA المستخلص من السلالة ST 62
مسلك رقم (5): نموذج DNA المستخلص من السلالة ST 64
مسلك رقم (6): نموذج DNA المستخلص من السلالة ST 69
مسلك رقم (7): نموذج DNA المستخلص من السلالة SM 73
مسلك رقم (8): نموذج DNA المستخلص من السلالة SM 74
مسلك رقم (9): نموذج DNA المستخلص من السلالة SM 76

الخلاصة :

أجريت دراسة بكتيريولوجية – وراثية على 90 عينة من مياه الصرف الصحي جمعت من مستشفيات محافظة بابل والتي شملت مستشفى مرجان العام ،مستشفى الولادة والأطفال والمستشفى الجراحي وذلك للتعرف على الأنواع البكتيرية الشائعة الانتشار فيها.

أظهرت نتائج الفحوصات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية عائدية 151 عزلة بكتيرية للأنواع السالبة لصبغة غرام و80 عزلة بكتيرية للأنواع الموجبة للصبغة .تضمنت الأنواع السالبة لصبغة غرام 11 عزلة عائدة للنوع ***Aeromonas salmonicidia*** ، 10 عزلات للنوع ***Enterococcus aerugenes*** ، 45 عزلة للنوع ***Escherichia coli*** ، 6 عزلات للنوع ***Haemophilus haemolyticus*** ،21 عزلة لانواع بكتيريا ***Klebsiella*** ، 10 عزلات للنوع ***Moraxella catarrhalis*** ، 25 عزلة للنوع ***Pseudomonas aeruginosa*** ، 12 عزلة للنوع ***Salmonella typhimurium*** ، 10 عزلات عائدة لأنواع بكتيريا ***Serratia*** في حين تضمنت الأنواع الموجبة لصبغة غرام 55 عزلة عائدة للنوع ***Streptococcus viridans*** و 25 عزلة عائدة للنوع ***Staphylococcus aureus***.

اختبرت حساسية عشرة عزلات من كل نوع تجاه 20 مضاداً حيوياً شملت تقريباً معظم المضادات الحيوية المعروفة والمتداولة سريرياً أظهرت معظم هذه العزلات تشابهاً في نمط مقاومتها لأغلب المضادات الحيوية حيث كانت ذات مقاومة عالية للمضادات أرثرومايسين ، تتراسايكلين ، لينكومايسين ، كلندامايسين وستربتومايسين وبنسبة 100% كما إنها كانت ذات مستويات عالية من المقاومة لمضادات البيتالاكتام بلغت 80.7% للأنواع السالبة لصبغة غرام و86.2% للأنواع الموجبة للصبغة .

أبدت معظم عزلات الأنواع السالبة والموجبة لصبغة غرام قابلية عالية على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز حيث بلغت نسبة العزلات الموجبة والسالبة لصبغة غرام والمنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز 22.2% و 66.6% وعلى التتالي.

تمت دراسة النسق البلازميدي لبعض عزلات الأنواع السالبة والموجبة لصبغة غرام إذ أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز أن معظم السلالات السالبة والموجبة لصبغة غرام تمتلك حزم بلازميدية متشابهة في الموقع والحجم تقريباً وإن أغلب تلك الحزم البلازميديةهي من النوع الاقتراني حيث أشارت نتائج الاقتران والتحول الوراثي والتحييد

أن مورثات المقاومة لمضادات البيتالاكتام ، التتراسايكلين ، الاثرومايسين ، الكلورامفينكول ، اللينكومايسين ، الكلندامايسين والريفامبين هي بلازميدية الموقع في حين أن مورثات المقاومة للمضادات الأمينوكلايكوسيدية هي كروموسومية الموقع حيث إنها لم تنتقل من السلالات الواهبة إلى السلالة المستلمة بطريقتي الاقتران والتحول الوراثي .كما بينت النتائج أن المورثات المسؤولة عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز هي بلازميدية الموقع.

أظهرت نتائج تجارب التحييد فعالية مادة SDS في تحييد البلازميدات مقارنة مع مادة حامض السالسليك وأكدت نتائج تجارب التحييد باستعمال مادة SDS فقدان المورثات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضادات الأمينوكلايكوسيدية ، ترايميثوبرايم - سلفاميثاكسزول ، الكلورامفينكول ، التتراسايكلين ، الريفامبين ، اللينكومايسين والكوليستين لجميع عزلات الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام في حين فقدت المورثات المسؤولة عن إظهار صفة المقاومة للمضادات الأمينوكلايكوسيدية ، التتراسايكلين ، الكوليستين ،الريفامبين و ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسزول بالنسبة للأنواع الموجبة لصبغة غرام . كما بينت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز أن المعاملة بمادة SDS أدت إلى فقدان جميع الحزم البلازميدية من الخلايا المحيدة مقارنة مع مادة حامض السالسليك.

ملحق(3-1): نتائج الأختبارات الكيموحيوية التي أجريت لعزلات النوع *E.coli*

ت	الأختبارات الزرعية و الكيموحيوية	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
1	الكتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	الأوكسديز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	اختزال النترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	كليكلر-أيرون	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
5	فصل الأندول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	أحمر المثيل	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	فوكس بروسكاور	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	فحص السترات	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
9	تحلل الأرجنين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	تحلل اللايسين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	اليوريز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12	الفنيل الانين دي- أمنيز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	تحلل الجيلاتين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	الكلوكوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	اللاكتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	السكروز	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	الأرابينوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	المانيتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	المالتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	الراميتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	السالسين	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
22	التريهالوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+
23	الزايلوز	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
24	الهيمولايسين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25	اختبار الحركة	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ملحق(3-2): نتائج الأختبارات الكيموحيوية التي أجريت لعزلات الجنس *Klebsiella*

K. oxytoca			*K. planticola*						*K. pneumoniae*												الأختبارات الزرعية و الكيموحيوية	ت
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الكتاليز	1
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	الأوكسديز	2
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	اختزال النترات	3
A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	كليكلر-أيرون	4
+	+	+	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–	+	+	+	–	–	–	+	–	فصل الأندول	5
–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+	+	–	+	+	–	+	أحمر المثيل	6
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	فوكس بروسكاور	7
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	فحص السترات	8
–	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+	+	تحلل الأرجنين	9
–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	تحلل اللايسين	10
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	اليوريز	11
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	الفنيل الانين دي- أمنيز	12
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	تحلل الجيلاتين	13
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الكلوكوز	14
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	اللاكتوز	15
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	السكروز	16
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الأرابينوز	17
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	المانيتول	18
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	المالتوز	19
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الرامينوز	20
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	السالسين	21
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	التريهالوز	22
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	الزايلوز	23
–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	الهيمولايسين	24
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	اختبار الحركة	25

ملحق(3-3): نتائج الأختبارات الكيموحيوية التي أجريت لعزلات النوع *P. aeruginosa*

ت	الأختبارات الزرعية و الكيموحيوية	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	الكتاليز	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
2	الأوكسديز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	اختزال النترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	كليكلر-أيرون	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A
5	فصل الأندول	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	أحمر المثيل	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	فوكس بروسكاور	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	فحص السترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	تحلل الأرجنين	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	تحلل اللايسين	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11	اليوريز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	الفنيل الانين دي- أمنيز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	تحلل الجيلاتين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	الكلوكوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	اللاكتوز	–	–	+	+	+	+	–	+	–	+	+	–	–	–	+	+	–	+	–	+	–	+	+	+	–
16	السكروز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	الأرابينوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	المانيتول	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
19	المالتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	الراميتوز	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
21	السالسين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
22	التريهالوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
23	الزايلوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	الهيمولايسين	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β
25	اختبار الحركة	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ملحق(3-4): نتائج الأختبارات الكيموحيوية التي أجريت لعزلات *S. typhimurium*

ت	الاختبارات الزرعية و الكيموحيوية	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	الكتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	الأوكسديز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	اختزال النترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	كليكلر-أيرون	ALK/ A/ H_2S	ALK/ A/ H_2S	ALK /A/ H_2S	ALK/A / H_2S	ALK/A / H_2S	ALK/A / H_2S	ALK/A / H_2S	ALK/A / H_2S	ALK/A / H_2S	ALK/A / H_2S	ALK/A / H_2S	ALK/A / H_2S
5	فصل الأندول	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	أحمر المثيل	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	فوكس بروسكاور	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	فحص السترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	تحلل الأرجنين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	تحلل اللايسين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	اليوريز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12	الفنيل الانين دي- أمنيز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	تحلل الجيلاتين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	الكلوكوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	اللاكتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
16	السكروز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
17	الأرابينوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	المانيتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	المالتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20	الراميتوز	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+
21	السالسين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
22	التريهالوز	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	–
23	الزايلوز	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+
24	الهيمولايسين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25	اختبار الحركة	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ملحق(3-5): نتائج الأختبارات الكيموحيوية التي أجريت لعزلات *Serratia*

ت	الأختبارات الزرعية و الكيموحيوية	*S. marcescens*								*S. grimessi*		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	الكتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	الأوكسديز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	اختزال النترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	كليكلر-أيرون	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A	ALK/A
5	فصل الأندول	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	أحمر المثيل	+	–	+	+	+	+	–	–	+	+
7	فوكس بروسكاور	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	فحص السترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	تحلل الأرجنين	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+
10	تحلل اللايسين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	اليوريز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12	الفنيل الانين دي- أمنيز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	تحلل الجيلاتين	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+
14	الكلوكوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	اللاكتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
16	السكروز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	الأرابينوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	المانيتول	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
19	المالتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20	الراميزوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
21	السالسين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	التريهالوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	الزايلوز	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+
24	الهيمولايسين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25	اختبار الحركة	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ملحق(3-6): نتائج الأختبارات الكيموحيوية التي أجريت لعزلات *A. Salmonicida* و *E. aerugenes*

ت	الأختبارات الزرعية و الكيموحيوية	*A. salmonicida*										*E. aerugenes*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	الكتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	الأوكسديز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	اختزال النترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	كليكلر-أيرون	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
5	فصل الأندول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	أحمر المثيل	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	فوكس بروسكاور	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	فحص السترات	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	تحلل الأرجنين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–
10	تحلل اللايسين	+	–	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	اليوريز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12	الفنيل الانين دي- أمنيز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	تحلل الجيلاتين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	الكلوكوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	اللاكتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	السكروز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	الأرابينوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	المانيتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	المالتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	الراميتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	السالسين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	التريهالوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	الزايلوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	الهيمولايسين	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25	اختبار الحركة	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ملحق(3-7): نتائج الأختبارات الكيموحيوية التي أجريت لعزلات *H. Haemolyticus* و *M. catarrhalis*

ت	الأختبارات الزرعية و الكيموحيوية	*H. haemolyticus*						*M. catarrhalis*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	الكتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	الأوكسديز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	اختزال النترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	كليكلر-أيرون	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
5	فصل الأندول	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	أحمر المثيل	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	فوكس بروسكاور	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	فحص السترات	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	تحلل الأرجنين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	تحلل اللايسين	–	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	اليوريز	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12	الفنيل الانين دي- أمنيز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	تحلل الجيلاتين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	الكلوكوز	+	+	+	+	+	+	–	–	+	–	+	+	–	–	–	–
15	اللاكتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
16	السكروز	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
17	الأرابينوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	المانيتول	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
19	المالتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20	الرامينوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
21	السالسين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
22	التريهالوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
23	الزايلوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24	الهيمولايسين	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α	α
25	اختبار الحركة	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

ملحق(3-8): نتائج الأختبارات الكيموحيوية التي أجريت لعزلات *S. aureus*

ت	الأختبارات الزرعية و الكيموحيوية	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	الكتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+
2	الأوكسديز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	اختزال النترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	كليكلر-أيرون	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
5	فصل الأندول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	أحمر المثيل	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	فوكس بروسكاور	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	فحص السترات	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	–	–	+	+	+	+	–	+	–	+	–
9	تحلل الأرجنين	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
10	تحلل اللايسين	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
11	اليوريز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	الفنيل الانين دي- أمنيز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	تحلل الجيلاتين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	الكلوكوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	اللاكتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	السكروز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	الأرابينوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	المانيتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	المالتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20	الراميتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
21	السالسين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
22	التريهالوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	الزايلوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24	الهيمولايسين	α	β	β	β	β	β	β	β	β	β	β	α	α	α	β	β	β	β	β	β	β	β	β	α	β
25	اختبار الحركة	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ملحق(3-9): نتائج الأختبارات الكيموحيوية التي أجريت لعزلات *S.viridans*

ت	الأختبارات الزرعية و الكيموحيوية	*S. mitis*															*S. mutans*														
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**
1	الكتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	الأوكسديز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	اختزال النترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	كليكلر-أيرون	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
5	فصل الأندول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	أحمر المثيل	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	فوكس بروسكاور	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	فحص السترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	تحلل الأرجنين	–	–	–	+	–	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	+	+	V	–	V	–	V	+	+	+
10	تحلل اللايسين	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11	اليوريز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	الفنيل الانين دي- أمنيز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	تحلل الجيلاتين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	الكلوكوز	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
15	اللاكتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	السكروز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	الأرابينوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	المانيتول	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	المالتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20	الرامينوز	+	+	+	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	السالسين	+	–	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	التريهالوز	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	الزايلوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24	الهيمولايسين	α	α	α	α	–	α	–	–	–	α	α	–	–	–	α	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
25	اختبار الحركة	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
26	**Optochin**	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ملحق(3-9): نتائج الأختبارات الكيموحيوية التي أجريت لعزلات *S. viridans* (يتبع).

ت	الأختبارات الزرعية و الكيموحيوية					*S. salivaris*																				
		31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
1	الكتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	الأوكسديز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3	اختزال النترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	كليكلر-أيرون	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
5	فصل الأندول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	أحمر المثيل	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7	فوكس بروسكاور	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
8	فحص السترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	تحلل الأرجنين	V	–	V	+	V	–	+	–	–	+	–	+	–	+	–	+	–	–	–	+	+	V	+	+	v
10	تحلل اللايسين	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11	اليوريز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	الفنيل الانين دي- أمنيز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	تحلل الجيلاتين	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	الكلوكوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
15	اللاكتوز	+	+	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+		+		+	+	+		+	+	+	+
16	السكروز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	الأرابينوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	المانيتول	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
19	المالتوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
20	الراميتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	السالسين	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	التريهالوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	الزايلوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
24	الهيمولايسين	–	–	–	–	–	α	α	–	–	α	–	–	α	–	α	α	α	α	–	–	–	–	–	–	–
25	اختبار الحركة	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
26	Optochin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

ملحق(3-10): الحساسية الدوائية لعزلات بكتيريا *A. salmonicida*

RD	C	CT	CTX	DA	MY	Te	E	S	J	N	TOB	AMP	P	AML	OB	AX	CAR	SXT	RL	أرقام العزلات
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	**AS1**
S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**AS2**
S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**AS3**
R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	**AS4**
R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	**AS5**
S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	**AS6**
R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	**AS7**
S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	**AS8**
R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	**AS9**
R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	**AS10**
50	60	60	40	100	100	100	100	100	00	30	10	80	80	100	90	80	80	60	50	**النسبة المئوية للمقاومة**

RL = سلفاميثاكسازول
SXT = ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسازول
CAR = كاربنسلين
AX= أمبيكلوكس

OB= كلوكساسلين
AML= اموكسيسلين
P = بنسلين G
AMP= امبسلين

TOB = توبرامايسين
N= نيومايسين
J= جنتامايسين
S= ستربتومايسين

E= ارثرومايسين
Te= تتراسايكلين
MY= لينكومايسين
DA = كلندامايسين

CTX= سيفوتاكسيم
CT= كوليستين
C= كلورامفينيكول
RD= ريفامبين

ملحق(3-11): الحساسية الدوائية لعزلات بكتيريا *E. aerugenes*

RD	C	CT	CTX	DA	MY	Te	E	S	J	N	TOB	AMP	P	AML	OB	AX	CAR	SXT	RL	أرقام العزلات
S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	**EA 11**
R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	**EA 12**
R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	**EA 13**
S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	**EA 14**
S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	**EA 15**
S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**EA 16**
R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	**EA 17**
S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**EA18**
S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	**EA19**
R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	**EA20**
40	40	40	70	100	100	100	100	100	20	40	50	60	60	80	80	80	60	50	50	**النسبة المئوية للمقاومة**

OB= كلوكساسلين
SXT= ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسازول
CAR = كاربنسلين
AX= أمبيكلوكس

OB= كلوكساسلين
AML= اموكسيسلين
P= بنسلين G
AMP= امبسلين

TOB = توبرامايسين
N= نيومايسين
J= جنتامايسين
S= ستربتومايسين

E= ا رثرومايسين
Te= تتراسايكلين
MY= لينكومايسين
DA = كلندامايسين

CTX= سيفوتاكسيم
CT= كوليستين
C= كلورامفينيكول
RD= ريفامبين

ملحق(3-12): الحساسية الدوائية لعزلات بكتيريا *E. coli*

RD	C	CT	CTX	DA	MY	Te	E	S	J	N	TOB	AMP	P	AML	OB	AX	CAR	SXT	RL	أرقام العزلات
S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	**EC21**
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**EC22**
R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	**EC23**
S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**EC24**
R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	**EC25**
R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	**EC26**
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	**EC27**
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	**EC28**
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**EC29**
S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**EC30**
40	70	50	40	100	100	100	100	100	90	80	90	80	90	90	100	100	90	80	80	**النسبة المئوية للمقاومة**

RL = سلفاميثاكسازول OB= كلوكساسلين TOB = توبرامايسين E= ا رثرومايسين CTX= سيفوتاكسيم

SXT= ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسازول AML= اموكسيسلين N= نيومايسين Te= تتراسايكلين CT= كوليستين

CAR = كاربنسلين P= بنسلين G J= جنتامايسين MY= لينكومايسين C= كلورامفينيكول

AX= أمبيكلوكس AMP= امبسلين S= ستربتومايسين DA = كلندامايسين RD= ريفامبين

ملحق(3-13): الحساسية الدوائية لعزلات بكتيريا *K. pneumoniae*

RD	C	CT	CTX	DA	MY	Te	E	S	J	N	TOB	AMP	P	AML	OB	AX	CAR	SXT	RL	أرقام العزلات
S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**KP31**
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**KP32**
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	**KP33**
S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	**KP34**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	**KP35**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**KP36**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**KP37**
R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**KP38**
S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	**KP39**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	**KP40**
10	80	70	50	100	100	100	100	100	90	50	80	60	80	100	90	80	70	90	90	**النسبة المئوية للمقاومة**

RL = سلفاميثاكسازول OB= كلوكساسلين TOB = توبرامايسين E= ا رثرومايسين CTX= سيفوتاكسيم

SXT= ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسازول AML= اموكسيسلين N= نيومايسين Te= تتراسايكلين CT= كوليستين

CAR = كاربنسلين P= بنسلين G J= جنتامايسين MY= لينكومايسين C= كلورامفينيكول

AX= أمبيكلوكس AMP= امبسلين S= ستربتومايسين DA = كلندامايسين RD= ريفامبين

ملحق(3-14): الحساسية الدوائية لعزلات بكتيريا *M. catarrhalis*

RD	C	CT	CTX	DA	MY	Te	E	S	J	N	TOB	AMP	P	AML	OB	AX	CAR	SXT	RL	أرقام العزلات
S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	**MC41**
S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**MC42**
S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**MC43**
S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**MC44**
S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**MC45**
S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**MC46**
S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**MC47**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**MC48**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**MC49**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**MC50**
00	70	90	70	100	100	100	100	100	00	90	40	100	100	100	90	100	100	100	100	**النسبة المئوية للمقاومة**

RL = سلفاميثاكسازول OB= كلوكساسلين TOB = توبرامايسين E= ا رثرومايسين CTX= سيفوتاكسيم

SXT= ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسازول AML= اموكسيسلين N= نيومايسين Te= تتراسايكلين CT= كوليستين

CAR = كاربنسلين P= بنسلين G J= جنتامايسين MY= لينكومايسين C= كلورامفينيكول

AX= أمبيكلوكس AMP= امبسلين S= ستربتومايسين DA = كلندامايسين RD= ريفامبين

ملحق(3-15): الحساسية الدوائية لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa*

RD	C	CT	CTX	DA	MY	Te	E	S	J	N	TOB	AMP	P	AML	OB	AX	CAR	SXT	RL	أرقام العزلات
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**PA51**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**PA52**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**PA53**
S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**PA54**
S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**PA55**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**PA56**
S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**PA57**
S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**PA58**
S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**PA59**
R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**PA60**
10	70	80	00	100	100	100	100	100	00	90	60	100	100	100	100	100	100	100	100	**النسبة المئوية للمقاومة**

RL = سلفاميثاكسازول OB= كلوكساسلين TOB = توبرامايسين E= ا رثرومايسين CTX= سيفوتاكسيم

SXT= ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسازول AML= اموكسيسلين N= نيومايسين Te= تتراسايكلين CT= كوليستين

CAR = كاربنسلين P= بنسلين G J= جنتامايسين MY= لينكومايسين C= كلورامفينيكول

AX= أمبيكلوكس AMP= امبسلين S= ستربتومايسين DA = كلندامايسين RD= ريفامبين

ملحق(3-16): الحساسية الدوائية لعزلات بكتيريا *S. typhimurium*

RD	C	CT	CTX	DA	MY	Te	E	S	J	N	TOB	AMP	P	AML	OB	AX	CAR	SXT	RL	أرقام العزلات
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	**ST61**
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**ST62**
S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	**ST63**
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	**ST64**
R	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	**ST65**
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	**ST66**
S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	**ST67**
S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	**ST68**
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**ST69**
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	**ST70**
10	70	10	10	100	100	100	100	100	60	70	60	50	80	100	90	90	80	80	60	**النسبة المئوية للمقاومة**

RL = سلفاميثاكسازول OB= كلوكساسلين TOB = توبرامايسين E= ا رثرومايسين CTX= سيفوتاكسيم
SXT= ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسازول AML= اموكسيسلين N= نيومايسين Te= تتراسايكلين CT= كوليستين
CAR = كاربنسلين P= بنسلين G J= جنتامايسين MY= لينكومايسين C= كلورامفينيكول
AX= أمبيكلوكس AMP= امبسلين S= ستربتومايسين DA = كلندامايسين RD= ريفامبين

ملحق(3-17): الحساسية الدوائية لعزلات بكتيريا *S. marcescens*

RD	C	CT	CTX	DA	MY	Te	E	S	J	N	TOB	AMP	P	AML	OB	AX	CAR	SXT	RL	أرقام العزلات
S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**SM71**
S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	**SM72**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**SM73**
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**SM74**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	**SM75**
R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	**SM76**
S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**SM77**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	**SM78**
R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	**SM79**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	**SM80**
20	60	60	50	100	100	100	100	100	40	70	80	80	70	100	100	60	70	60	60	**النسبة المئوية للمقاومة**

RL = سلفاميثاكسازول OB= كلوكساسلين TOB = توبرامايسين E= ا رثرومايسين CTX= سيفوتاكسيم

SXT= ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسازول AML= اموكسيسلين N= نيومايسين Te= تتراسايكلين CT= كوليستين

CAR = كاربنسلين P= بنسلين G J= جنتامايسين MY= لينكومايسين C= كلورامفينيكول

AX= أمبيكلوكس AMP= امبسلين S= ستربتومايسين DA = كلندامايسين RD= ريفامبين

ملحق(3-18): الحساسية الدوائية لعزلات بكتيريا *S. aureus*

RD	C	CT	CTX	DA	MY	Te	E	S	J	N	TOB	AMP	P	AML	OB	AX	CAR	SXT	RL	أرقام العزلات
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**SA81**
S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	**SA82**
S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	**SA83**
S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	**SA84**
R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	**SA85**
S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**SA86**
S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**SA87**
R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	**SA88**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**SA89**
R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	**SA90**
40	30	80	50	100	100	100	100	100	30	50	30	100	90	100	80	80	100	90	80	**النسبة المئوية للمقاومة**

RL = سلفاميثاكسازول OB= كلوكساسلين TOB = توبرامايسين E= ا رثرومايسين CTX= سيفوتاكسيم
SXT= ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسازول AML= اموكسيسلين N= نيومايسين Te= تتراسايكلين CT= كوليستين
CAR = كاربنسلين P= بنسلين G J= جنتامايسين MY= لينكومايسين C= كلورامفينيكول
AX= أمبيكلوكس AMP= امبسلين S= ستربتومايسين DA = كلندامايسين RD= ريفامبين

ملحق(3-19): الحساسية الدوائية لعزلات بكتيريا *S. viridans*

RD	C	CT	CTX	DA	MY	Te	E	S	J	N	TOB	AMP	P	AML	OB	AX	CAR	SXT	RL	أرقام العزلات
S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	**SV91**
S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**SV92**
R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**SV93**
S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**SV94**
R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	**SV95**
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**SV96**
R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	**SV97**
S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	**SV98**
S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**SV99**
S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	**SV100**
40	60	90	40	100	100	100	100	100	10	80	100	100	100	100	100	100	90	60	80	**النسبة المئوية للمقاومة**

RL = سلفاميثاكسازول
OB= كلوكساسلين
TOB = توبرامايسين
E= ا رثرومايسين
CTX= سيفوتاكسيم

SXT= ترايميثوبرايم – سلفاميثاكسازول
AML= اموكسيسلين
N= نيومايسين
Te= تتراسايكلين
CT= كوليستين

CAR = كاربنسلين
P= بنسلين G
J= جنتامايسين
MY= لينكومايسين
C= كلورامفينيكول

AX= أمبيكلوكس
AMP= امبسلين
S= ستربتومايسين
DA = كلندامايسين
RD= ريفامبين

References

Adewoye,L.O., and Worobec,E.A. (1999). Multiple environmental factors regulate the expression of the carbohydrate-selective Oper Bporin of *Pseudomonas aeruginosa.* Can. J. Microbiol. 45: 1033- 1042.

Agodi,A., Marrazano,M., Jones,C.S., and Threlfall E.T.(1995). Molecular characterization of trimethoprim resistance in *salmnella* isolated insicily, 1985-1988. Eur. J. Epidemiol. 1: 33-38.

American Public Health Association (APHA). (1984).Standard methods for the examination of Water and waste water.15thed. American Public Health Association.WASHINGTON.DC

Amyes,S.G.B. (1989). The success of plasmid-encoded resistance genes in clinical bacteria. J. Microbiol .28:73-83.

Angulo,F.J., Tippen,S., Sharp,D.J., Payne,B.J., Collier,C., Hill,J.E., Barrett, T.J., Clark,R.M., *etal.* (1997). A community water-borne outbreak of salmonellosis and the effectivness of a boil water order. Am. J. Publ- ic Health. 87: 580- 584.

Anonymous. (1991).Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberc- ulosis among HIV-infected persons in Florida and New York from 1988- 1991. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 40: 585- 591.

Arakawa,Y., Ohta,M., Kido,N., Mori,M., Ito,H., Komatsu,T.A., and Kato,N. J. (1984). Chromosomal β-lactamase of *Klebsiella oxytoca.* New class A enzyme that hydrolyzes broad- soectrum β-lactam antibiot- ics. Antimicrob. Agents Chemother. 33(1): 63- 70.

Arakawa,Y., Ohsuka,S., Wacharotayankun,R., Kato,N., and Ohta,M. (1995). Plasmimediated dissemination of the metalo- β-lactamase gene *bla* IMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens.* Antimicrob. Agents Chemother. 39: 824.

Arakawa,Y., Shibata,N., Shibayama,K., Kurokawa,H., Yagi,T.,Fujiwara,H., and GoTo,M. (2000). Convenient test for screening metallo β-lactamase producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. J. Clinical Microbiology. 38(1): 40.

Arakawa,Y. (2000). Trends in antimicrobial drug- resistance in Japan. Eme- rging Infectious Disease. 6 :572- 4.

Arathoon,E., Hamilton,J.R., Hench,C.E., and stevens,D.A. (1990). Efficacy of short courses of oral novobiocin-rifampin in eradicating the car- rier state of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and in vitro killing studies of clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1655- 1659.

Araque,M., Nieves,B., Ruiz,O., and Daert,M. (1997). Characterización de plámiodes que median la resistencia a múltiples antibióticos en bacterias gram negativas de origen nosocomial. Enferm.Infect. Microbiol. Clin. 15: 299- 305.

Arbuthnott,J.P. (1984). The impact of the microbe in medicine, In;Kelly, DP and Carr, NG (eds.): The microbe prokaryotes and eukaryotes. Vol. 11. The Society of General Microbiology. Cambridg University Press. London. pp: 283- 296.

Archer,G.L., and Johnston,T.L. (1983). Self- transmissible plasmids in staphylococci that encode resistance to aminoglycosides. Antimicrob. Agents Chemother. 24: 70-77.

Arstila,T., Huovinen,S.A., and Huovinen,P. (1991). Analysis of β -lactamase production in ampicillin resistant *Escherichia coli* isolated from blood culture from 1983-1989. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.Dis.10 (12): 1068- 1070.

Arther,M., Andremont,A., and Couurvalin,P. (1987). Distribution of erythromycin esterase and rRNA methylase genes in members of the family Enterobacteriaceae highly resistant to erythromycin. Antimicrob. Agents Chemother. 13: 404- 409.

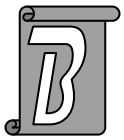
Asch,D.K., Goering,R.V., and Ruff,E.A. (1983). Isolation and preliminary characterization of a plasmid mutant derepressed for conjugal transfer in Staphylococcus aureus. Plasmid. 12: 197- 202.

Atlas,R.M.(1984). Microbiology: Fundamentals and applications. 1st ed.Mac-millan. New York.

Atkinson,B.A., and Lorian,V. (1984). Antimicrobial agent susceptibility patterns of bacteria in hospital from 1971-1982.J. Clin. Microbiol. 20 (4): 791- 796. (Abstract).

Ausubel,F.M., Brent,R., Kingston,R.E.,Moor,D.D., Seidman,J.G.,Smith,J.A., and Struhl,K. (1989). Current protocols in molecular biology. Vol. 2. John Wiley & Sons. New York.

Ayliffe,G.A., Lowbary,E.J., and Roe,E. (1972). Transferable carbnicillin resistance in Pseudomonas aeruginosa. Nature. 235: 141- 143.



Baranit,H.N.(1983). Urinary tract infection following lower urinary tract surgery catheterisation. Arab. J. Med. 2(5): 9-12.

Barberis-Maino,L., Berger-Bachi,B., Weber,H., Beck,W.B., and Kayser,F.H. (1987). *IS 431*, a staphylococcal insertion sequence- like element related to *IS 26* from *Proteus vulgaris.* Gene. 59: 107- 113.

Baron,E.J., and Finegold,S.M. (1990). Bailey & Scott`s Diagnostic Microbiology, 8th ed. CV Mosby. Philadelphia

Bass,L., Liebert,C.A., Lee,M.D., *etal.*(1999). Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multipledrug resistance in avian Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2925-2929.

Bauer,A.W., Kirby,W.M.M., Sherris,J.C., and Turck,M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standarized single disc method. Am. J. Clin. Pathol. 45: 493-6.

Bauernfeing,A., Jungwirth,R., and Glamarellou,H.C.(1996). Characterization of the plasmid β-lactamase CMY-2 which is responsible for cephamycin resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 40(1): 221-224.

Becton Dickinson. (1988). Manual of BBL products and laboratory procedures.6th ed. Cockeysville. Becton Dickinson Microbiology Systems.

Bell,S.M., Pham,J.N., and Lazarone,J.Y. (1985). Mutation of *Pseudomonas aeruginosa* to pipracillin resistance mediated by β-lactamase production. J. Antimicrob. Chemother. 15: 665-670.

Berger-Bachi,B., Strassle,A., and Kayser,F.H. (1986). Characterization of an isogenic set of methicillin resistant and susceptible mutants of Staphylococcus aureus. Eur. J. Microbiol. 5: 697- 701.

Bertram,J., Stratz,M., and Durre,P. (1991). Natural transfer of conjugative transposon Tn 916 between gram-positive and gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 173: 443-448.

Bissonnette,I., and Roy,P.H.(1992).Characterization of InO of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposon of gram- negative bacteria. J.Bacteriol. 174: 1248- 1257.

Blazevic,D.J., and Ederer,G.M. (1975). Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology. John Wiley & Sons. New York.

Boriraj,V., Bangtrakulnonth,T., Pornruengwong,S., and Saitanu,K. (1997). Demographic data on *Salmonella enteritidis* infection in Thailand, 1990-1995. SE Asian. J. Trop. Med. Public Health. 28: 774- 780.

Borrell,N., Figueras,M.J., and Guarro,J. (1998). Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources. Can. J. Microbiol. 44: 103- 108.

Branson,D. (1972). Methods in clinical bacteriology. Spring field, IL: Charles Thomas.

Brath,P.T., Grinter,N.J., and Bradley,D.E. (1978). Conjugal transfer system of plasmid RP4 analysis by transposon 7 insertion. Molec. Genet. 133 (1): 43- 52.

Brodn,P. (1979). Plasmids. 1st ed. WH. Freeman Company. Oxford.San Francisco.

Brooks,G.F., Butel,J.S., and Morse,S.A.(1998).Antimicrobial chemotherapy, In; Medical microbiology. (21ed). Typo Press. Lebanon.

Brown,M.R. (1975). Resistance of *Pseudomonas aeruginosa.* 1st ed. John Wiley & Sons.

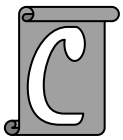
Bryan,L.E. (1989). Tow forms of antimicrobial resistance: bacterial peresistance and positive function resistance. J. Antimicrob. Chemother. 23: 817- 823.

Burnside,J.M., and Groot Obbink,D.J. (1996). Plasmid pDGO 100 contains a second integron with the trimethoprim resistance gene *dfrA7* as the inserted cassette. Plasmid. 35: 76- 70.

Burwen,D.R., Banerjee,S.N., Gaynes,R.P., and the National Nosocomial Infections Surveillance System. (1994). Ceftazidime resistance among selected nosocomial gram-negative bacilli in the United States. J. Infect. Dis. 170: 1622- 1625.

Bush,K., Jacoby,G.A., and Medeiros,A.A. (1995). A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39(6): 1211-1233.

Byrne,M.E., Gillespie,B.E., and Skurray,R.A. (1990). Molecular analysis of a gentamicin-resistance transposons like element on plasmids isolated from North American *Staphylococcus aureus* strains.Antimicrob. Agents Chemother. 34 2106- 2113.



Casin,I., Breuil,J., Brisabois,A., Moury,F., Grimont,F.,and Collatz,E.(1999). Multidrug resistant human and animal *Salmonella typhimurium* isolates in France belong predominantly to a DT104 clon with the chromosom and integron-encoded β -lactamase PSE-1. J. Infect. Dis. 179: 1173- 82.

Chaibi,E.B., Sedigheh,F., Peduzzi,J.,and Labia,R.(1996). An additional ionic bond suggested by molecular modelling of TEM-2 might induce a slight discrepancy between catalytic properties of TEM-1 and TEM-2-β-lactamases. FEMS. Microbiol.Lett. 143: 121- 125.

Chambers,H.F., Hartman,B.J., and Tomasz,A. (1985). Increased amount of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. J. Clin. Invest. 76: 325 - 331.

Chambers,H.F. (1987). Coagulase- negative staphylococci resistant to β - lactamase antibiotics in vivo produce penicillinbinding protein 2a. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1919- 1924.

Chang,C-Y, Chang,L-L, Chang,Y-H, Lee,T-M, and Chang,S-F.(2000). Characterization of drug resistance gene cassettes associated with class 1 integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* from Taiwan. ROC. J. Med. Microbiol. 49: 1097- 1102.

Chitnis,V., Chitnis,D., Patil,S., and Ravikant. (2000). Hospital effluent:A sourse of multiple drug resistant bacteria. Current Science. 79(7): 989- 991.

Cho,J.J., Panopoulos,N.J., and Schroth,M.N. (1975). Genetic transfer of *Pseudomonas aeruginosa* R- factors to plant pathogenic *Erwinia* species. J. Bacteriol. 122(3): 192- 198.

Clewell,B.,D., Gibson,E., and Giuffrida,A. (1974). Evidence for extrachromosomal elements in *Lactobacilli.* J. Bacteriol. 127: 1576-1578.

Clewell,B.D. (1994). Bacterial conjugation. TIG. 10(5): 178-9.

Cohen,S.,N., Chang,A.C., and Hus,L. (1972). Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R- factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 96(8): 2110-2114.

Cohen,S.P., L.M.,McMurry, and S.B.,Levy.(1988). *mar* A locus causes decr-eased expression of Omp F porin in multiple antibiotic resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli.* J. Bacteriol. 170: 5416- 5422.

Col,N.F., and O`Connor,R.W. (1987). Estimating worldwide current antibio-tic usage: report of Task Force 1. Rev. Infect. Dis. 9(Suppl.3): S232- 43.

Collee,J.G., Fraser,A.G., Marimon,B.P., and Simmons,A. (1996). Culture tests and media.In; Macki and MacCantney. Practical Medical Microbiology (eds.). Chuchill Livingston. 14th ed.

Cowan,S.T.(1974). Cowan & Steel`s manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. Cambridge. Cambridge University Press.

Cox,R.A., Mallaghan,E., and Conquest,E. (1995). Epidemic methicillin resi-stant *Staphylococcus aureus*: controlling the spread outside hospital. Journal of Hospital Infection. 29: 107- 19.

Cruickshank,R., Duguid,J.P., Marmion,B.P., and Swain,R.H. (1975). Medical Microbiology.Vol.2, 12th ed. Churchill Livingstone, Edinurgh, London.

Cui,L., Murakami,H., Kuwahara- Arai,K., Hanaki,H., and Hiramatsu,K. (2000). Contribution of a thickened cell wall and its glutamine non amidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. Antimicrob. Agents Chemother. 44(9): 2276- 2285.

Currier,T.C., and Nester,E.W. (1976). Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. Anal. Biochem. 76:431-441.

د

D`Aoust,T.Y. (1991). Pathogenicity of food borne *Salmonella.* Int. J. Food Microbiol. 12: 17- 40.

Darwin,K.H., and Miller,V.L. (1999). Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with intestinal mucosa. Clin. Microbiol. Rev. 12: 405- 428.

Date,J.W., and Smith,J.T. (1971). The purification and properties of the β-lactamase specified by the resistance factor R-1818 in *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis.* J. Biochem. 123: 493- 500.

Datta,N., and Hedges,R.W.(1972). Host ranges of R- factors. J. Gen. Microbiol. 70: 453- 460.

Datta,N., and Nugent,M. (1984). Characterization of plasmids in wild strains of bacteria. In; Puhler, A, and Timmis, KN.(eds). Advanced molecular genetics. Springer Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. Tokyo.

Davis,M.A., Hancock,D.D., Besser,T.E., Rice,D.H., Gay,J.M., Gay,C., Gea-rhart,L., and Digiacomo,R. (1999). Chang in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* isolates from human and cattle in the Northwestern United States,1982-1997. Emerg. Infec. Dis. 5(6): 802- 6.

DelBene,V.E., John,J.F., Jwitty,J.A., and Lewis,J.W. (1986). Anti-staphylococcal activity of teicoplanin, vancomycin, and other antimicrobial agents: the significance of methicillin resistance. J. Infect. Dis. 154: 349- 352.

Difco manual. (1984). 10 ed. Detriot, Difco Laboratories.

Dinah,G., and Christine,B. (2000). Applied microbiology for nurses. Macmillan Press LTD. London.

Donowitz,G.R., and Mandell,G.L. (1988). Drug therapy. β -lactamase antibiotics (two parts). N. Engl. J. Med. 318: 419- 490.

Duval-Iflahy, Gainche,I., Ouriet,M., and Hubert,J. (1994). Recombinant DNA transfer to *Escherichia coli* of human faecal origin in vitro and in digestive tract of gnotobiotic mice. FEMS Microbiol. Lett. 15: 79-88.

Dyke,K.G.H., Curnock,S.P., Golding,M., Noble,W.C. (1991). Cloning of the gene conferring resistance to mupirocin in *Staphylococcus aureus.* FEMS Microbiol. Lett. 77: 195- 198.

ع

Edson,R.S., and Terrel,C.L.(1991). The aminoglycosides.Mayo.Clin. Proc. 66:1158.

Eisen,D., Russel,E.G., Tymms,M., Roper,E.J., Grayson,M.L., and Turnidge, J. (1995). Random amplified polymorphic DNA and plasmid analyses used in investigation of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae.* J. Clin. Microbiol. 33: 712- 717.

Engel,H.W.,Soedirman,N., Rost,J.A., VanLeeuwen,W.J.,and VanEmuden, J.D.A. (1980). Transferabilities of M-L-S resistance between group A, B, and D streoticocci, *Streptococcus pneumoniae* and *Staohylococcus aureus.* J. Bacteriol. 142: 407- 413.

Esezobo,E., and Offiong,E. (1986). In vitro studies on some brands of oxytetracycline capsules available in Nigeria. Nigerian Journal of Pharmacology. 17: 24- 8.

Ewing,W.H. (1986). Edwards and Ewing`s identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. New York. Elsevier.

Ferretti,J.J., Gilmore,K.S., and Courvalin,P.I. (1986). Nucleotide sequence analysis of the bifunctional 6``-aminoglycoside acetyltransferase 2``-aminoglycoside phosphotransferase enzyme in *Staphylcoccuc faecalis* and identification and cloning of gene regions specifying the two activities. J. Bacteriol. 167: 631- 638.

Fica,A.E., Part-Miranda,S., Fernandez-Ricci,A., D`Ottone,K., Cabello,F.C. (1996). Epidemic typhoid in childe: analysis by molecular and conventional methods of *Salmonella typhi* strain diversity in epidemic(1997 and 1981) and non epidemic(1990) years. J. Clin. Microbiol. 34: 1701-1707

Finch,R.C. (1981). Antibacterial chemotherapy. International Medicin. 1(3): 96- 101.

Finegold,S.M., and Baron,E.J. (1986). Bailey and Scott`s Diagnostic Microbiology. 7th ed. St. Louis: C.V. Mosby Company. USA.

Flory,M.E., Ross,R.W., and Turton,E.C. (1974). Infection of wounds with gram-negative organisms: clinical manifesation and treatment. Lancet. 2: 855- 61.

Forbes,B.A., and Schaberg,D.R. (19).Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus:* evidence for conjugative exchange of resistance. J. Bacteriol. 153: 627- 634.

Ford,T.E. (1993). The Microbial ecology of water distribution and outfall systems. In; Ford,T.E.(eds.), Aquatic microbiology: an ecological approach. Boston. Blackwell. 455- 482.

Ford,T.E.(1999). Microbiological safety of drinking water: United States and global perspectives. Environmental Health Perspectives. 107(1): 191-226.

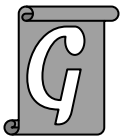
Fraimow,H.S., and Abrutyn,E. (1995). Pathogenes resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular, mechanisms, and management. Infect. Dis. Clin. North Am. 9: 497- 530.

Franczek,S.P., Williams,R.P., and Hull,S.I. (1986). A survey of potential virulence factors in clinical and environmental isolates of *Serratia marcescens.* J. Med. Microbiol. 22: 151.

Freeman,B.A. (1985). Text book of medical bacteriology. 2nd ed.W.B. Seunders Co. Philadelphia. London.

Frifelder,D. (1987). Molecular biology. 2nded. Yones and Barttett. Boston.

Fujita,N., Yoshimura,M., Komori,T., Tanimoto,K., and Ike,Y. (1998). First report of the isolation of high-level vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from a patient in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 24: 2150.



Gallardo,F., Ruzi,J., Marco,F., Jowner,K.J., and Vila,J. (1999). Increase in incidence of *Salmonella* serotype *typhimurium* with investigation of molecular of resistance to ampicillin , chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates epidemiology and mechanisms of resist-ance. J.Med. Microbiol. 48: 367- 374.

Garcia,M.L., Moreno,B., and Bergdol,M.S. (1980). Characterization of staphylococci isolated from mastitis cows. Appl. Environ. Microbiol. 39: 548- 553.

Gavriel,A.A., Landre,J.P., and Lamb,A.J. (1998). Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in northeast Scotl. and J. Appl. Microbiol. 84: 383- 392.

Gay,P., Goq,L., Steinmetz,M., Berkelman,T., and Kado,I. (1985). Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram- negative bacteria. J. Bacteriol. 164(2): 918- 921.

Geldreich,E.E.(1967). Fecal coliform concepts in stream pollution.Water and Sewage Workers. 114: R98- R109.

Gill,V.J., Selepark,S.A., and Williams,E.C.(1983). Species identification and antibiotic susceptibilities of coagulase negative staphylococci isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 18: 1314- 1319.

Gillespie,M.T., Lyon,B.R., Messerotti,L.J., and Skurray,R.A.(1987). Chromsome and plasmidmediated gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus* encoded by *Tn 4001.* J. Med. Microbiol. 42: 139- 144.

Gillespie,M.T., Lyon,B.R., and Skurray,R.A. (1988). Structural and evolutionary. relationships of β- lactamase transposons from *Staphylococcus aureus.* J. Gen Microbiol. 134: 2857- 2866.

Gillian,D.M., Chart,H., Threlfall,E.J., Morgan,E., Lodge,J.M., Brown,N.L., and Stephen,J. (2000). Invasiveness of *Salmonella* serotypes *typhimurium* and *enteritidis* of human gastroenteritic origin for rabbit ileum: role of LPS, plasmids, and host factors. J. Med. Microbiol. 49: 1011- 1021.

Glaser,J.B., Morton- Kute,L., and Berger,S.R. (1985). Recurrent *Salmonella typhimurium* bacteremia associated with the acquired immunodeficiency syndrome. Ann. Intern. Med. 102: 189- 193.

Gold,H.S., and Moellering,R.C.Jr. (1996). Antimicrobial drug resistance.N. Engl. Med. 335: 1445.

Gold,W.L., and Salit,I.E. (1993). *Aeromonas hydrophila* infections of skin and soft tissue: report of 11 cases and review. Clin. Infect. Dis. 16: 69-74.

Goldstein,F.W., Papadopoulou,B., and Acar,J.F.(1986).The changing pattern of trimethoprim resistance in Paris with a review of world wide experience. Rev. Infect. Dis. 8: 725- 737.

Gorzynski,E.A., Amesterdam,D., Beam,T.R.,and Rotstein,C. (1989). Comp arative in vitro activities of teicoplanin, vancomycin, oxacillin, and other antimicrobial agents against bacteremic isolates of gram - positive cocci. Antimicrob. Agents Chemother.33: 2019- 2022.

Goth,A. (1984). Medical pharmacology, principles and concepts.11th ed. The C.V. Mosby Company. Toronto.

GoTo,M., Takahashi,T., Yamashita,F., Koreeda,A., Mori,H.,Ohta,M., and Arakawa, Y. (1997). Inhibition of the metallo β -lactamase produced from *Serratia marcescence* by thiol compounds. Biol. Pharm. Bull. 20 (11): 1136.

Gould,D. (1997). Giving infection control a big hand. Community Nursing Notes. 15: 3-6.

Gouws,P.A., and Brozel,V.S. (2000). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates associated with retail chicken and a poultry abattoir. South African Journal of Science. 96(Issue 5): 254- 3.

Grahn, E, Holm, SE, and Roos, K. (1987). Penicillin tolerance in β - streptococci isolated from patients with tonsillitis. Scand. J. Infect. Dis. 19:421- 426.

Greenwalt, JW, and Whiteside, Tl. (1975).Mesosomes; Membranous bacterial organelles. Bacteriol. Rev. 39:405- 63.

Grimont,A.D., Grimont,F., Duloug de Rosuary, H.L.C., and Sueath,P.H.A. (1977). Taxonomy of the genus *Serratia.* J. of General Microbiolgy. 98: 39.

Grinsted, J, Sanders, JR, Sykes, R, and Richmond, M. (1972). Properties of an R- factor which originated in *Pseudomonas aeruginosa.* J. Bacteriol. 110(2): 529-537.

Grinsted,J.,and Bennett,P.M. (1986).Introduction in methods in microbiology, In;Grinsted,J. and Bennett,P.M.(eds.),Plasmid technology. Vol.21,(2nd ed.). Academic Press. London. pp. 1- 10.

Gows,P.A, and Brozel,Vs. (2000). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates associated with retail chicken and a poultry abattoir. South African Journal of Science. 96 (Issue 5): 254- 3.

Gustaferro, CA, and Steckelberg, JM. (1991). Cephalosporin antimicrobial Agents and related compounds. Mayo. Clin. Proc. 66: 1073.

Hall,R.M.,and Stokes,H.W. (1993). Integrons: novel DNA elements which capture genes by site specific recombination. Genetica. 90: 115-132.

Hall,RM, and Collis,CM. (1995). Mobile gene cassettes and Integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol. Microbiol. 15:593-600.

Hamilton-Miller,J.M. (1990). The emergence of antibiotic resistance: myths and facts in clinical practice. Intensive Care Med. 16(Suppl. 3): S206- S211.

Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of *Esherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-80.

Hancock,R.E. (1981). Aminoglycoside uptake and mode of action with special reference to streptomycin and gentamicin. J. Antimicrob. Chem-other. 8: 429- 445.

Handwerger,S., and Tomasz,A. (1985). Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria.Rev. Infect. Dis. 7: 368.

Hardy,K. (1987). Bacterial plasmids. (2nded.)American Society for Microbiology. U. S. A.

Hardy,K. (1987). Plasmid apractical approach. IRL. Press. Oxford Washington. DC. U.S.A.

Hartman,B.J.,and Tomasz,A. (1984). Low- affinity penicillin binding protein associated with β -lactamase resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 158: 513- 516.

Hayes,M.V., Curtis,N.A.C., Wyke,A.W., and Ward,J.B. (1981). Decreased affinity of a penicillin binding protein for β-lactamase antibiotics in clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. FEMS Microbiol. Lett. 10: 119- 122.

Hazen,T.C., and Toranzos,G.A. (1990). Tropical source water. In; McFeters, G.A.(wds.). Drinking water microbiology. Springer. New York.

Hedges,R.W. (1980). R-factor of *Serratia*. In: Graevenitz,A &Rubin,SJ (eds.), the genus *Serratia*.Pp:139. CRC Press. Floida.

Herman,D.J., and Gerding,D.N.(1991). Screening and treatment of infections caused by resistant enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 215-219.

Hill,K.E., Fry,J.C., and Weightman,A.J. (1999). Gene transfer in the aquatic environment: persistance and mobilization of the catabolic recombinant plasmid pD10 in the epilithon. Microbiology. 140: 1555- 1563.

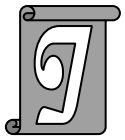
Hiramatsu,K., Suzuki,E., Takayama,H., Katayama,Y., and Yokota,T. (1990). Role of penicillinase plasmids in the stability of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.* Antimicrob. Agents Che-mother. 34(4): 600- 604.

Hiramatsu,K. (1995). Molecular evolution of MRSA. Microbiol. Immunol. Role of penicillinase plasmids in the stability of the mec *A* gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.Antimicrob. Agents Chemother. 34: 600- 604. 39(8): 531- 543.

Hook,E.W. (1961). Salmonellosis: certain factors influencing the interaction of *Salmonella* and the human host. Bull NY Acad. Med. 37: 499- 512.

Horodniceanu,T., Buu-Itoi,A., LeBouguenec,C., and Bieth,G. (1982). Plasmid,8,199. High-level aminoglycosid resistance in groupA, B , G, D (*Streptococcus bovis*) and viridans streptococci. Antimicrob. Agents Chemother. 21: 176- 179.

Howard,B.J., Klaas,J.H., and Rubin,S.J. (1987). Clinical and pathogenic microbiology. C.V. Mosby. St. Louis.



Ishii,Y., Ohno,A., Taguchi,H., Imajo,S., Ishiguro,M., and Matsuzawa,H.(1995). Cloning and sequence of gene encoding ceftoxame hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli.* Antimicrob. Agents Chemother. 39:2269-75.

Jacob,A.E., and Hobbs,S.J. (1974). Conjugal transfer of plasmid-borne multiole antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* Var. *zymogenes.* J. Bacteriol. 117: 360- 372.

Jacoby,G.A., and Sutton,l. (1985). β- lactamases and β-lactam resistance in *Escherichia coli.*Antimicrob. Agents Chemother. 28(5): 703- 705.

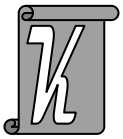
Jacoby,G.A., and Sutton,L. (1991). Properities of plasmids responsible for production of extended spectrum β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 35(1): 164- 169.

Jacoby,G.A. (1994). Genetics of extended spectrum β-lactamases. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Supplement 1: 2- 11.

Jacoby,G.A. (1995). Upon a letter received at 25-7-1995.

Jawetz,E., Melnick,J.L., and Adelberg,E.A. (1980). Review of medical microbiology. 14th ed. Langemedical Publications. California.

Johnson,A., and Woodford,N. (1993). Bacterial antibiotic resistance. Curr. Opin. Infect. Dis. 6: 515- 519.



Kado,C.I., and Liu,S.T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. 145: 1365-1373.

Khalil,K., Khan,S.R., Mazhar,K., Kaijser,B., and Lindblom,G.B. (1998). Ocurrence and susceotibility to antibiotics of *Shigella* species in stool of hospitalized children with bloody diarrhea in Pakistan. Am.J. Trop. Med. Hyg. 58: 800- 803.

Karen,E.P., Marilyn,A.K., Ronald,J.L., Wendy,A.A., and Richard,A.V. (1997). The resistance and integrase genes of pACM1, a conjugative multipleresistance plasmid from *Klebsiella oxytoca.* Plasmid. 37:105- 118.

Kariuki,S., Gilks,C., Corkill,J., Kimari,J., Benea,A.P., and Hart,C.A. (1996). Multidrug-resistant non typhi *Salmonella* in Kenya. J. Antimicrob. Chemother. 38: 425- 34.

Katia,R., Santos,N., Lucia,M., Teixeira,G., Leal-Leila,S., Fonseca,S., and Gontijo-Filo,P.P. (1999). DNA typing of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. J. Med. Microbiol. 48:17- 23.

Katoh- Kanno,R., Kimura,M., Ikeda,T., and Kimura,S. (1986). Survey of modifying enzymes and plasmids in amikacin- resistant *Serratia marcescences.* Microbiology & Immunology. 30(60):509.

Kelly,J., and Chivers. (1996). Built in resistance. Nurcing Times. 92(2): 50- 4.

Kenny,M.T., J.K., Dulworth, and M.A.,Brackman. (1991). Comparative in vitro activity of teicoplanin and vancomycin against United State teicoplanin clinical trial isolates of gram- positive cocci. Diag.Microbiol. Infect. Dis. 14: 22- 31.

Kloos,W.E., and Bannerman,T.L.(1995). *Staphylococcus & Micrococcus* ,In: Balows,A., Housler,W.J., Herrman,K.L., Isenberg,H.D.,and Shadomy, H.J.(eds.). manual of clinical microbiology. 6thed.American Society for Microbiolgy. Washington.

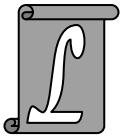
Kohler,T., Epp,S.E., Curty,L.K., and Pechere,J.C. (1999). Characterization of MexT, the regulator of the MexE- MexF- OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa.* J. Bacteriol. 181(20): 6300- 5.

Krogestad,D.J., Korfhagen,T.R.,Moellering,R.C., Wennersten,J.C., and Swartz, M.N. (1978). Plasmid-mediated resistance to antibiotic synergism in enterococci. J. Clin. Invest. 601: 1645- 1653.

Kunin,C.M., Juhansen,K.S., Worning,A.M., and Daschner,F.D. (1990). Report of a symposium on use and abuse of antibiotics worldwide. Rev. Infect. Dis. 12: 12- 9.

Kunin,C.M.(1993). Resistance to antimicrobial drugs: a worldwide calamity. Ann. Intern. Med. 118: 557- 61.

Kuroda,M., Kuwahara-Arai,K.,and Hiramatsu,K.(2000).Identification of the up-and down-regulated genes in vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu 3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. Biochem. Biophys. Res. Commun. 269



Lamanna,C., Mallette,M., and Zimmerman,F. (1973). Basic Bacteriology. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.

Layton,M.C., Perez,M., Heald,P., and Patterson,J.E. (1993). An outbreak of Mupirocin resistant *Staphylococcus aureus* on a dermatology ward associated with an environmental reservoir. Infect.Control.Hosp. Epidemiol. 14: 369- 375.

Leach, D.R.F. (1995). Genetic Recombination. Cambridge,MA. Blackwell Science.

LeBlance,D.J., Cohen,L., and Jensen,L. (1978). Transformation of group F streotococci by plasmid DNA. J. Gen. Microbiol.106: 49-54.

Leclercq,R., Derlot,E., Duval,J., and Courvalin,P. (1988). Plasmidmediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium.* N. Engl. J. Med. 319: 157- 161.

Lee,L.A., Puhr,N.D., Maloney,E.K., Bean,N.H., and Tanxe,R.V.(1994). Increase in antimicrobial resistant *Salmonella* infections in the United States, 1989-1990. J. Infect. Dis. 170: 128- 134.

Legakis,N.J., Tzouvelekis,L.S., Hatzoudis,G., Tzelepi,E., Gourkou,A., Pitt, T.L., and Vatopoulos,A.C. (1995). *Klebsiella pneumoniae* infection in Greek hospitals. Dissemination of plasmids encoding an SHV-5 type β - lactamase. J. Hosp. Infect. 31(3): 177- 87.

Levesque,C., Pich,L., Laros,C., and Roy,P.H. (1995). PCR mapping pf integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 185- 191.

Levin,J., Alving,C.R., Munford,R.S., and Stotz,P.L. (1993). Bacterial endotoxin; recognition and effector mechanisms.Vol 2. Endotoxin Research Series. Elsevier Science Publishers. BV.

Levin,J., Alving,C.R., Munford,R.S., and Redl,H. (eds.).(1995).Bacterial endotoxins.Lipopolysacharides from genes to therapy.Progress in clinical and biological research.Vol. 392. New York. John Wiley & Sons Inc.

Levy,S.B. (1998). Multidrug resistance a sign of the times. N. Engl. J. Med. 338: 1376- 1378.

Li,X-Z, and Pool,K. (1999). Organic solvent- tolerant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* display multiple antibiotic resistance. Can. J. Microbiol. 45: 18- 22.

Ling,J.,Chau,P.Y.,and Rowe,B.(1987). *Salmonellae*; serotypes and incidence of multiply-resistant *Salmonellae* isolated from diarrhoeal patients in Hong Kong from 1973- 1982. Epidemiol. Infect. 99: 295- 306.

Lyon,B.R., May,J.W.,and Skurray,R.A. (1984). *Tn4001*: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus.* Mol. Gen. 193: 554- 556.

Lyon,B.R., Gillespie,M.T., Byrne,M.E., May,J.W., and Skurray,R.A.(1987). Plasmid-mediated resistance to gentamicin in *Staphylococcus aureus*: the involvement of a transposon. J. Med. Microbiol. 23:101-110.

Lyon,B.R., and Skurray,R.A. (1987). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus,* genetic basis. Microbiol. Rev. 51: 88- 134.

MacFaddin,J.F.(2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. 3ed ed. Lippicott Williams &Wilkins Awalters Kluwer Company. Philadelphia, Baltimore, New York. London. Hong kong. Sydney. Tokyo.

Macrina,F.L., Kopecko,D.J., Jones,K.R., Ayers,D.J.,and McCowen,S.M. (1978). A multiple plasmid containing *Escherichia coli*: a convenient source of plasmid size reference molecules. Plasmid. 1: 417-420.

Makino,S., Sasakawa,C., and Yoshikawa,M. (1988). Genetic relatedness of the basic replicon of the virulence plasmid in *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli.* Microbial Pathogenesis. 5: 267.

Malke,H. (1979). Conjugal transfer of plasmid determining resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin-B type antibiotic among group A,B,D, and H streptococci. FEMS. Micrpbiology Letters. 5: 335- 338.

Maniatis,T., Fritsch,E.F., and Sambrook,J. (1982). Molecular cloning :A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring. New York.

Manuchair,E. (2000). Antimicrobial chemotherapy, In; Pharmacology, 3ed ed.

Manuel,W.M., and Ziad,A.M. (2000). Antibiotic resistance: an imperding cr-Isis. Saudi Medical Journal. 21(12): 1125- 1129.

Mara,D.D. (1974). Bacteriology for sanitary engineers. Churchill, Living Press.

Mark,J., and Edith,P. (1997). Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. Lancet.349(Issue 9067): 1742 -1745.

Martinez-Freijo,P., Fluit,A.C., Schmitz,F.J., Grek,V.S., Verhoef,J.,and Jones , M.E. (1998). Class 1 integrons in gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. J.Antimicrb.Chemother. 42: 689-696.

Martinez-Freijo,P., Fluit,A.C., Schmitz,F.J., Verhoef,J., and Jones,M.E. (1999). Many class 1 integrons comprise distinct stable structures occuring in different species of Enterbacteriaceae isolated fro m widespread geographic region in Europe. Antimicrob.Agents Chemother. 43: 686- 689.

Maskell,D., and Allen,A. (1997). Molecular biology of lipopolysaccharid biosynthesis in *Salmonella* and *Bordetella.* Biochem. Soc. Trans. 25: 850-856.

McDonnell,R.W., Sweeney,H.M., and Cohen,S. (1983). Conjugational Transfer of gentamicin resistance plasmids intra- and inter- specifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis.* Antimicrob.Agents Chemother. 23: 151- 160.

McDougal,L.K., and Thornsberry,C.(1986). The role of β-lactamase in staphylococcal resistance to penicillins and cephalosporins. J. Clin. Microbiol. 23: 832-839.

McFeters,G.A., and Camper,A.K. (1998). Distribution and viability of bacterial pathogenes in biofilms . 98th General Meeting, American Society for Microbiology, 17-21 May, 1998, Atlanta,Georgia. Washington: ASM Press.

Mekalanos,J.J. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. J. Bacteriol. 174: 1- 7.

Milatovic,D.(1986). Vancomycin for treatment of infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: are there alternatives? Eur. J. Clin. Microbiol. 5: 689- 692.

Miles,A.A. (1944). Epidemiology of wound infection. Lancet. 809- 14.

Miller,J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour. New York.

Miller,S.I., Hohmann,E.L., and Pegues,D.A. (1995). *Salmonella* (including *Salmonella typhi*), In; Mandell,G.L., Bennett,J.E., and Dolin,R. (eds.) Mandell, Douglas and Bennett`s principles and practice of infectious disease. vol.2, 4th ed. Churchill Livingstone. New York. 2013-2033.

Moellering,R.C.Jr. (1993). Meeting the challenges of β-lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 31(Suppl. A): 1.

Murakami,K., Nomura,K., Doi,M., and Yoshida,T. (1987). Production of low-affinity Penicillin binding protein by low and high- resistance groups of methicillin resistant *Staphylococcus aureus.* Antimicrob. Agents Chemother.31:1307- 1311.

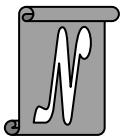
Murakami,K.,and Tomasz,A.(1989).Involvment of multiple genetic determ- inants in high- level methicillin resistance *Staphylococcus aureus.* J. Bacteriol. 171: 847- 879.

Murray,B.E., Alvarado,T., Kim, K.H., and Vorachit,M. (1985). Increasing resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole among isolates of *Escherichia coli* in developing countries. J. Infect. Dis. 147: 724- 8.

Murray,B.E., Mathewson,J.J., Dufont,H.L., Ericsson,C.D., and Reves,R.R. (1990). Emergence of resistant fecal *Escherichia coli* in traveler not taking prophylactic antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chem- other. 34: 515- 8.

Murray,R., Baron,J.,O., Pfaller,A., Tenover,C., and Yolken,H. (1999). Manual of clinical microbiology. 7th ed.

Murray,B.E., and Mederski-Samovaj,B. (1983). Transferable β -lactamase: a new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis.* J.Clin. Invest. 72: 1168- 1171.



Naidoo,J.(1984).Interspecific co-transfer of antibiotic resistanc plasmids in staphylococci in vivo.J.Hyg.(camb)93:59-66

Naidoo,J., and Noble,W.C.(1978). Transfer of gentamicin resistance between strains of *Staphylococcus aureus* on skin. J. Gen. Microbiol. 107:391 -393 .

Naidoo,J., and Noble,W.C.(1981). Transfer of gentamicin resistance between coagulase-negative and coagulase positive staphylococci on skin. J. Hyg. 86: 183- 187.

Nakamura,T., Uchida,S., Heijyo,H., and Masuda,M. (2000). A SHV-derived extended- spectrum β - lactamase (SHV-12) produced by an *Escherichia coli* recovered from wound abscess in post operative case with reetal carcinoma. Kansenshogaku Zasshi.74: 112- 9.

Nathwani,D., and Wood,M.J. (1993). Penicillin. A current review of their clinical pharmacology & therapeutic use. Drugs.45: 866.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1990). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2nded. A pproved standard, NCCLS document M7- A2. National Committee for clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

Neu,H.C. (1985). Contribution of β beta-lactamases to bacterial resistance and mechanisms to inhibit β-lactamases. Am. J. Med. 79(Suppl. 5B): 2- 14.

Neu,H.C. (1986). The pharmacology and toxicology of antimicrobial agents. In; Brnade,A.(eds.). Infections disease and medical microbiology. 2nded. W.B. Sanders. Philadephia. 219- 235.

Neu,H.C.(1991). Therapy and prophylaxis of bacterial infections. In; Wilson, J.D., Braunwold,E.,Isselbacher,K., Martin,J.B., Fauci,A.S.,and Root, R. Harrison`s principles of internal medicin. 12thed. V1. p: 478- 493. MacCraw-Hill. New York. Sanfrancisco. Mexico. New Dalhi. Paris. Tokyo. Sao Paulo. Toronto. London .

Nikaido,H. (1996). Multidrug efflux pumps in gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 178: 5853- 5859.

Norris,A.H., Reilly,J.P., Edenstein,P.H., Brennon,P.J.,and Schuster,M.G. (1995). Chloramphenicol for the treatment of vancomycin resistant enterococcal infections. J. Clin. Infect. Dis. 20: 1137- 1144.

O`Brien,T.F.(1987). Resistance of bacteria to antibacterial agents. Rev.Infec. Dis. 9(Suppl. 3): S244.

Oberhofer,T.R. (1985). Manual of non fermenting gram-negative bacteria. New York. John Wiley & Sons.

Ochs,M.M., McCusker,M.P., Bains,M., and Hancock,R.E. (1999). Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin Opr D selective for imipenem and basic amino acids. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 1085- 1090.

O`connell,M.(1984).Genetic transfer in prokaryotes transformation, transduction and conjugation, In: Puhler,A, and Timmis,K. Advanced molecular genetics P:2-13. Spring Verlug. Berlin.

Ogawara,H., Kuma,K., and Mryata,T. (1993). Gene transfer of a part of a β-lactamase. J. Gen. Microbiol. Immunol. 37(5): 399- 403.

Okek,I., Lamikanara,A., and Edelman,A.(1999). Socioeconomic and behavioral factors leading to aquired bacterial resistance to antibiotics in developing counteries. J. Emer. Infect. Dis. 5 (1): 10- 18.

Old,R.W., and Primrose,S.B. (1994). Principles of gene manipulation. Cambridge, MA. Blackwell Science.

Palomar,J., Montilla,R., Fustte,M.C., and Vinas,M. (1993). The role of antigen in susceptibility of *Serratia marcescens* to non-immune serum. Microbios.76: 189.

Papanicolaou,G.A., Medeiros,A.A., and Jacoby,G.A. (1990). Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino and ∝-methoxy β-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae.* Antimicrob. Agents Chemother. 34(11): 2200-2209.

Paul,C., Gerbaud,G., Bure,A., Phillipon,A.M., Pangon,B., and Courvalin,P. (1989). TEM-4 a new plasmidmediated β- lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins in a clinical isolates of *Escherichia coli.* Antimicrob. Agents Chemother. 33(11): 1958-1961.

Pawa,A., Noble,W.C., and Howell,S.A. (2000). Co-transfer of plasmids in association with conjugative transfer of mupirocin or mupirocin and penicillin resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus.* J. Med. Microbiol. 49: 1103- 1107.

Pelczar,M.J., Reid,R.D., and Chan,E.S. (1977). Microbiology. 4th ed. TATA McGraw-Hill Publishing Company, LTD. New York.

Perilli,M.,Felici,A.,Franceschini,N.D.E., Samtis,A., Pagani,L., Luzarro,F., Orator,A., Rossolini,G.M., Knox,J.R., and Amicosante,G.(1997). Cha- racterization of anew TEM-derived β-lactamase produced in a *Serratia marcescens* strain.Antimicrob.Agents Chemother. 41(11): 2374.

Perry,J.J., and Staley,J.T. (1997). Dynamic and Diversity. Saunders College Publishing. Forth Worth. Austin. Philadelphia. San Diego. New York. Orlando. San Antonio. Toronto. Monteral. London. Sydney. Tokyo .

Petit,A., Sirot,D., Chanal,C., Sirot,J., Labia,R., Gerband,G., *etal.* (1988). Novel plasmidmediated β-lactamase in clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad spectrum cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 626- 630.

Petit,A., Gerband,G., Sirot,D., Courvalin,P.,and Sirot,J. (1990). Molecular epidemiology of TEM-3 (CTX) β-lactamase.Antimicrob. Agents Chemother. 34: 219- 224.

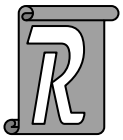
Phillipon,A., Labia,R., and Jacoby,G.A. (1989). Extended spectrum β-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 33(8): 1131- 1136.

Pratt,L.A., Hsing,W., Gibson,K.E., and Silhavy,T.J. (1996). From acids to *osmZ*; multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli.* Mol. Microbiol. 20: 911- 917.

Prescot,L.M., Harley,J.P., and Klein,D.A. (1990). Microbiology.1st ed. W.M. C. Brown Publishers. New York.

Preston,K.E., Kacica,M.A., Limberger,R.J., Archinal,W.A., and Venezia,R. A. (1997). The resistance and integrase gene of pACM1, a conjugat- ive Multiple resistance plasmid from *Klebsiella oxytoca.* Plasmid. 37(2): 105- 18.

Queenan,A.M.,Torres-Viera,C.,Gold,H.S., Carmeli,Y., Eliopoulos,G.M., Moellering, R.C., Quinn,J.P., Hindler,J., Mederios,A.A.,and Bush, K.(2000). SME-type carbapenem hydrolyzing class A β-lactamase from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. Antimicrob. Agents Chemother. 44(11): 3035.



Rahal,K.,Wang,F., Schindler,J., Rowe,B., Cookson,B.,and Hovinen,P. (1997). Reports on surveillance of antimicrobial resistance in individual countries. J. Clin. Infect. Dis. 24(Suppl. 1): S196- 75.

Rahman,M., Noble,W.C., and Cookson,B. (1987). Mupirocin resistant *Staphylococcus aureus.* Lancet. 2: 387.

Rahman,M., Connolly,S., Noble,W.C., Cookson,B., and Phillips,I. (1990). Diversity of staphylococci exhibiting high-level resistance to mupirocin. J. Med. Microbiol. 33: 97-100.

Rahman,M., Connolly,S., and Noble,W.C. (1994). The diversity of plasmids bearing mupirocin resistance genes in staphylococci of human origin, In; Mollby-Folook, Nord, Christensson (eds.), staphylococci and staphylococcal infection. 7thed. International Symposium, Stockholm.P: 249- 252.

Recchia,G.D., and Hall,R.M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. icrobiology. 141: 3015-3027.

Reese,R.E., Betts,R.F., and Gumustop,B. (2000). Handbook of antibiotics. 3eded. Lippincott Williams &Wilkins.

Reyes,H.,Guiscafre,H., Munoz,O., Perez-Cuevas,R., Martinez,H., and Gutierrez, G. (1997). Antibiotic non compliance and waste in upper respiratory infections and acute diarrhea. J. Clin. Epidemiol. 50: 1297-304.

Reynolds,P.E., and D.F.,Brown. (1985). Penicillin binding proteins of β-lactamase resistant strains of *Staphylococcus aureus.* FEBS Lett. 192:28-32.

Reynolds,P.E., and Fuller,C. (1986). Methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* presence of identical additional penicillin binding protein in all strains examined. FEMS (Letter). 33: 251-254.

Ridley,A., and Therlfall,E.J. (1998). Molecular epidemiology of antibiotic resistance gene in multiresistant epidemic *Salmonella typhimurium* DT104. Microb. Drug Resist. 4: 113- 8.

Roantree,R.J. (1967). *Salmonella* O-antigens and virulence. Annu. Rev. Microbiol. 21: 443- 466.

Roberston,D., Shore,S., and Miller,D.M. (1997). Manipulation and expression of recombinant DNA: a laboratory manual. Academic Press. San Diego. London. Boston. New York. Sydney. Tokyo. Toronto.

Roland,K.L., Martin,L.E., Esther,C.R., and Spitznagel,J.K. (1993). Spontaneous *pmrA* mutanys of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new component regulatory system with a posible role in virulence. J.Bacteriol. 175: 4154- 4164.

Rosser,S.J., and Young,H.K. (1999). Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from aquatic environment. J. Antimicrob. Chemother. 44: 11- 18.

Rouch,D.A., Byrne,M.E., Kong,Y.C., and Skurray,R.A. (1987). The aacA-aphD gentamicin and kanamycin resistance determinant of *Tn 4001* from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotid sequence analysis. J. Gen. Microbiol. 133: 3039- 3052.

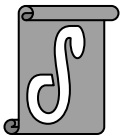
Rouch,D.A., Messerotti,L.J., Loo,S.L., Jackson,C.A., and Skurray,R.A. (1989). Trimethoprim-resistance transposon *Tn4003* from *Staphylococcus aureus* encoding genes for a dihydrofolate reductase and thym- idylate synthetase flanked by three copies of *Is257.* J. Mol. Microbiol. 3: 161- 175.

Rouch,D.A., and Skurray,R.A. (1989). *IS257* from *Staphylococcus aureus*: member of an insertion sequence superfamily prevalent among gram-positive and gram-negative bacteria. Gene. 76: 195- 205.

Rowe,B., and Gross,R.J.(1986). Genus 11 *Shigella.*pp.423-7. In; Krieg,N.R., and Holt,J.G.(eds.). Bergey`s manual of systematic bacteriology. Baltimore, M.D. 21202. USA.

Rubin,R.H., and Swartz,M.N.(1980).Trimethopim-sulfamethoxazole. N. Engl. J. Med. 303: 425.

Rutala,W.A., Kenney,V.A., Loflin,H.B., and Sarubbi,F.A. (1981). *Serratia marcescens* nosocomial infections of the urinary tract associated with urin measuring containers. American J. Med. 70: 659.



Sallen,B., Rajoharison,A., Desvarenne,S., and Mabilat,C. (1995).Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae. Microb. Drug Resist. 1:195-202.

Sambrook,J.F., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual.Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.

Samonis,G., Elting,L., Skoulika,E., Maraki,S., and Tselentis,Y. (1994). An utbreak of diarrhoeal disease attributed to *Shigella sonnei*. Epidemiol. Infect. 112: 235- 245.

Sanders,C.C. (1992). β-lactamase of gram-negative bacteria: new Challenges for new drug. Clin. Infect. Dis. 14: 1089- 1099.

Sanders,C.C., Gates,M.L., and Sanders,W.E.Jr. (1988). Heterogenicity of class 1 β -lactamase expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa.* 31(12): 1893- 1895.

Sanders,C.C., Thomson,K.S., and Bradford,D.A. (1993). Problems with the detection of β-lactam resistance among non fastidious gram-negative bacilli J. Infect. Dis. Clin. North Am. 7(2): 411- 424.

Sawai,T., Hiruman,R., Kawana,N., Kaneko,M., and Inani,A. (1982). Outer membrane permeation of β -lactame antibiotics in *Escherichia coli, Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae.*Antimicrob. Agents Che- mother. 22(11): 585- 592.

Sawai,T.S., Hirano,S., and Yamaguchi,A. (1987). Repression of porin synth- esis by salicylate in *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae,* and *Serratia marcescens.* FEMS Microbiol. Lett. 40: 233- 237.

Schabery,D.R., and Turck,M. (1991). Diseases caused by gram-negativ enteric bacilli. Pp:600-606. In; Wilson,J.D., Braunwald,C., Isselbacher, K., Martin,J.B., Fauci,A., and Roof,R.(eds.). Harrison`s principles of internal medicin. 12th ed. vol1. MacCraw-Hill. NewYork. Sanfrancesco. Mexico. New Dalhi. Paris. Tokyo. Toronto. Madrid. London.

Schleif,R.(1993).Genetics and molecular biology.2nd ed. Baltimore. Johns Hopkins Press.

Schwarz,S., and Noble,W.C. (1994). Tetracycline resistance genes in staphyococci from the skin of pigs. J. Appl. Bacteriol. 76: 320- 326.

Senda,K., Arakawa,Y., Nakashima,K., Ito,H., Ichiyama,S., Shimokata,K. (1996). Multifocal autbreaks of metalo- β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum β-lactamase, including carbapenems. Antimicrob. Agents. Chemother. 40: 349- 53.

Shaw,K.J., Rather,P.N., Hare,R.S., and Miller,G.H.(1993). Molecular genetic of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside modifying enzymes. Microbiol. Rev. 57: 138- 163.

Shooter,R.A., Falers,M.C., Cooke,E.M., and O`farsel,S.A. (1971). Isolation of *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa,* and *Klebsiella* from food in hospital canteens and schools. Lancet. ii: 390- 392.

Silver,L.L., and Bostian,A.K. (1993). Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 377- 383.

Simmons,A. (1971). Immunochemistry of *Shigella flexneri* O-antigens: a study of structural and genetic aspects of the biosynthesis of cell surface antigens. Bacteriol. Rev. 35(2):117-148.

Sirot,D., Dechamps,C., Chanal,C., Labia,R., Darfeuille-Michaud,A., Perroux ,R., and Sirot,J. (1991). Translocation of antibiotic resistance determinants including an extended spectrum β-lactamase between conjugative plasmids of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli.* Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1576- 1581.

Skurray,R.A., Rouch,D.A., Lyon,B.R., Gillespie,M.T., Tennent,J.M., Byrne, M.E., Messerotti,L.J., and May,J.W. (1988). Multiresistant *Staphylococcus aureus*: genetic and evolution of epidemic Australian strains . J. Antimicrob. Chemother. 21(Suppl. C): 19- 83.

Sleigh,J.D. (1983). Antibiotic resistance in *Serratia marcescens* . British Medical J. 287: 1651.

Slouch,J.M., and Silhavy,T.J.(1989). Genetic analysis of the switch that controls porin gene expression in *Escherichia coli* K-12. J. Mol. Biol. 210: 281- 292.

Sneath,P.H.A., Mair,N.S., Sharpe,M.E., Holt,J.G.(eds.). (1986). Bergey`s Manual of Systemic Bacteriology,vol 2. Baltimore: Williams &Wilkins.

Song,M.D., Wachi,M., Doi,M., Ishino,F., and Matsuhashi,M. (1987). Evolution of an inducible penicillin target protein in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS Lett. 221: 167- 171.

Steinbrecher,U.P. (1981). Serious infection in an adult due to penicillin-tolerant group B *Streptococcus.* Arch. Intern. Med. 141: 1714- 1715.

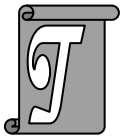
Stent,G.S., and Galendar,R. (1978). Molecular genetics. Freeman Company. San Francisco.

Storres,M.J., Courvalin,P., and Foster,T.J. (1988). Genetic analysis of gentamicin resistance in methicillin and gentamicin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Dublin hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1174- 1181.

Stotzky,G., and Babich,H. (1986). Survival and genetic transfer by genetically engineered bacteria in natural environments. Adv. Appl. Microbiol. 31: 93- 138.

Svensson,O., Parment,P.A.,and Blomgren,G.(1987). Orthopaedic infections by *Serratia marcescens*: A report of seven cases. Scand. J. Infect. Dis. 19: 96.

Sykes,R.B., and Mattew,M. (1976). The B-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 2:1-157.



Tait,R.C. (1997). An introduction to molecular biology. Horizon Scientific Press.

Taylor,G.F. (1970). Survival of gram-negativ bacteria on plastic compounded with hexachlorophene. Applied Microbiology. 19(1): 131.

Tenover,F.C. (1991). Novel and emerging mechanisms of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens. Am. J. Med. 91(Suppl. 3B): 76-81.

Thomas,W.D.Jr., and G.L.,Archer. (1989). Mobility of gentamicin resistance genes from staphylococci isolated in the United States:identification of *Tn4031*, a gentamicin resistance transposon from *Staphylococcus epidermidis.* Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1335- 1341.

Thomson-Carter,F.M., Purcell,T.M., Carter,P.E.,and Pennington,T.H.(1992). Genomic DNA analysis of staphylococcal populations. Zbl. Bakt. 26: 91-96.

Thomson,K.S.(1995). β -lactamases: new challenges for the clinical laboratory infections diseases in clinical practics. 3(6): 463-471.

Thong,K.L., Cordano,A.M., yassin,R.M., and Pang,t. (1996). Molecular analysis of environmental and human isolates of *Salmonella typhi.* Appl. Environ. Microbiol. 62: 271- 274.

Todt,J.C., Rocque,W.J., and McGroarty,E.J. (1992). Effects of PH on bacterial porin function. Biochemistry. 31: 10471- 10478.

Toro,C.S.,Lobos,S.R.,Galderon,I., Rodriguez,M.,and Mora,G.C.(1990). Clinical isolate of a porinless *Salmonella tphi* resistant to high levels of chloramphenicl. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1715-1719.

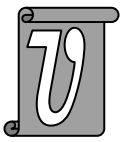
Towner,K.J., and Vivian,A. (1976). RP4- mediated conjugation in *Acinetob-acter calcoaceticus*. J. Gen. Microbio. 93: 355-360.

Traub,W.H.,and Bauer,D.(1987). Outer membrane protein alterations in *Serratia marcescens* resistant against aminoglycoside and β-lactamase antibiotics. Chemotherapy. 33(3): 172.

Trees,D.L., and Iandolo,J.J. (1988). Identification of *Staphylococcus aureus* transposon (*Tn 4291*) that carries the methicillin resistance gene(s). J. Bacteriol. 170: 149-154.

Trevors,T.J.(1986). Plasmid curing in bacteria. FEMS. 32: 144-154.

Turnridge,J. (1995). Epidemiology of quinolone resistance. Eastern hemisphere. Drugs. 49: 43- 7.

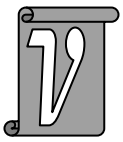


Ubukata,K., Yamashita,N., and Konno,M.(1985). Occurence of a β-lactaminducible penicillin- binding protein in methicillin resistant staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 27: 851-857.

Udo,E.E., Jacob,L.E., and Mokadas,E.M. (1997). Conjugative transfer of high-level mupirocin resistance from *Staphylococcus haemolyticus* to other staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 693-695.

Urban,C., Meyer,K.S., Mariano,N., Rahal,J.J., Flamm,R., Rasmussen,B. A.,and Bush,K. (1994). Identification of TEM-26 β- lactamase responsible for amajor outbreak of ceftazidime resistant *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 392-395.

Utsui,Y., and Yokota,T. (1985). Role of an altered penicillin- and cephalosporin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob.Agents Chemother. 28: 397-403.

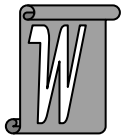


Van Embden,J.D.A., Engel,H.W.B., and Van Klingeren,B. (1977).Drug resistance in group D streptococci of clinical and non-clinical origin: prevalence transferability and plasmid properties. Antimicrob. Agents Chemother. 11: 925-932.

Vasil,M.L. (1986). *Pseudomonas aeruginosa.*Biology mechanisme of virulence, epidemiology. J. Pediatrics. 108(5): 800-805.

Venezia,R.A., Scarano,F.J>, Preston,K.E., Steel,L.M., Root,T.P., Limberger, R., Archinal,W., and Kacica,M.A. (1995). Molecular epidemiology of an SHV-5extended spectrum β-lactamase in Enterobacteriaceae isolated from infants in a neonatal intensive care unit. Clin. Infect. Dis. 21: 915- 923.

Vuye,A., Verschraegen,G., and Claeys,G. (1989). Plasmid-mediated β-lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* resistant to ceftazidime. Antimicrob. Agents Chemother. 33(4): 489-497.



Walker,S.L., Sojka,M., Dibb-Fuller,M.,and Woodward,M.J.(1999). Effect of PH, temerature and surface contact on the elaboration of fimbriae and flagella by *Salmonella* serotype *enteritidis*. J. Med. Microbiol. 48: 253- 261.

Wallace,M.R., Johnson,A.P.,Daniel,M., Malde,M.,and Yousif,A.A.(1995). Sequential emergence of multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Bahrain. J. Hosp. Infect. 31(4): 247-52.

Walsh,T.J., Standiford,H.C., Reboli,A.C., John,J.F., Mulligan,M.E., Ribner, B.S.,*etal.* (1993). Randomized double-blinded trial of rifampin with either novobiocin or trimethoprim-sulfamethoxazole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization: prevention of antimicrobial resistance and effect of host factors on outcome. Antimicrob. Agents Chemother. 37: 1334- 1342.

Walter,S.D., Michael,G., and Stanley,F. (1979). Cistrons encoding *Escherichia coli* heat-labile toxin. J. Bacteriol. 139: 850- 858.

Waltson,J.J., Tooze,J., and Kurty,D.T. (1983). Recombinant DNA: a short course. New York. WH. Freeman.

Wantanabe,H.,and Timmis,K.N.(1984). A small plasmid in *Shigella dysenteriae* I specifics one or more functions essential for O- antigen production . Bacterial Infect. Immun. 43: 391-6.

Wenzel,R.P., Nettleman,M.D., Jones,R.N.,and Pfaller,M.A.(1991). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: implication for the 1990s and effective control measures. Am. J. Med. 91(Suppl. 3B): 221S-227S.

Whitfield,C. (1995). Biosynthesis of lipopolysaccharid O-antigen. Trends Microbiol. 3: 178-185.

Whitton,B.A. (1980). River ecology. Blackwell Science. Publishing. Oxford.

WHO. (1994). Scientific working group on monitoring and management of bacterial resistance to antimicrobial agents.WHO/ CDS/ BVI/ 97.7. Geneva. Switzerland.

WHO. (1997). The medical impact of the use of antimicrobials in food animals. Report of a meeting. Berlin, Germany, 13-17 October 1997. Geneva World Health Organization.

Wiedeman,B., Kliebe,C.,and Kresken,M. (1989).The epidemiology of β-lactamase. J. Antimicrob. Chemother. 24(Suppl.B): 1-22.

Wilcox,M.H., Hussain,M., Faulkner,M.K., White,P.J.,and Spencer, R.C. (1991). Slime production and adherence by coagulase-negative staphylococci. J. Hosp. Infect. 18: 327-331.

Willets,N. (1985). Plasmid. Pp. 16-9.in; Scaife,J, Loeach,D, and Galizzi,A. (eds.), Genetic of bacteria. Academic Press. London.

William,J., William,M.D., James,E., Alan,L., and Bisno,M.D. (1998). Enterococcal resistance. Infect .Dis. V.IV, Issue 3.

Woodford,N., and Johnson,A.P.(1998). Plasmid analysis. In; Molecular Bacteriology: protocols and clinical applications. Humana Press.

Woods,D.E., and Iglewski,B.H. (1983). Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. Rev. Infect. Dis. 5(S4): S715- S722.

Worth,W.J. (1982). Urinary tract infection and reflux nephropathy in adults. Inter. Med. 1(24): 1095-1100.

Wright,A.J., and Wilkowske,C.J. (1991). The penicillins. Mayo. Clin. Proc. 66: 1047.

Wright,C., Kominos,S.D., and Yee,R.B. (1976). Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. Appl. Envir. Microbio. 31(3): 453.

Wurtz,R., Sahm,D., and Flaherty,J. (1991). Gentamicin resistant, streptomycin-susceptible *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* bacteremia. J. Infect. Dis. 163: 1393-4.

ي

Yagi,T., Kurokawa,H., Senda,K., Ichiyama,S., Ito,H., and Ohsuka,S. (1997). Nosocomial spread of cephem-resistant *Escherichia coli* strain carring multiple Toho-1-like β -lactamase genes. Antimicrob. Agents Chem-other. 41: 2606-11.

Yagi,T., Kurokawa,H., Shibata,N., Shibayama,K., and Arakawa,Y.(2000). A preliminary survey of extended spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan.FEMS Microbial Lett. 184: 53-6.

المصادر العربية

الجبوري , سوسن ساجد محمد علي. (1997). دراسة وراثية جزيئية لأنزيم البيتالاكتاميز المنتج من البكتيريا السالبة لغرام المعزولة محليا. رسالة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

الجزراوي , سمير فتح الله. (1996). أسهال الأطفال: تحليل وراثي , جزيئي لذيفانات بكتيريا أيسشريشيا القولون المرضية. رسالة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

الحسيني , رعد خليل عزيز. (1996). عزل وتشخيص بكتيريا التهابات الجهاز البولي وقابليتها على أنتاج الهيمولايسين ومقاومتها للمضادات الحيوية.رسالة دكتوراه.كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

بطرس , وميض منذر. (2002). دراسة بكتيريولوجية ووراثية على المعزولة من بكتيريا ***Serratia marcescens*** عينات سريرية وبيئية

صبري , أنمار وهبي و محمد حسن يوسف و حسن هندي سلطان. (2001a). التلوث البكتيري في نهر الفرات. مجلة أبحاث البيئة والتنمية المستدامة.المجلد الرابع - العدد الأول.

صبري, أنمار وهبي و زينب حسين علي و محمد حسن يونس و حسن هندي. (2001b).أنتشار البكتريا في الجزء الشمالي لنهر صدام. المجلة العلمية لمنظمة الطاقة الذرية.العدد(3). قيد الطبع.

محمود, ثامر أحمد. (1988). علوم هندسة البيئة. مطبعة جامعة الموصل. ص 109-128.

نعوم, شيماء البير أبراهيم. (1998). نوعية الماء في نهر دجلة في بغداد أطروحة ماجستير. الجامعة المستنصرية. كلية العلوم. قسم علوم الحياة.

Summary

A total of hospital effluent samples were collected from different hospitals in Hilla city which involved Mergan, Al-welada wa Al-atfal & Surgical hospital in order to explain the role of hospital effluent in bacterial dispersal in the environment.

Results from morphological & biochemical characterization tests showed that a total of 230 isolates were obtained. 150 isolates were Gram- negative bacteria, and 80 isolates were Gram- positive bacteria. Among Gram- negative bacteria there are 11 isolates of *A. salmonicidae*, 10 isolates of *E. aerugenes*, 45 isolates of *E.coli*, 6 isolates of *H. haemolyticas*, 21 isolates of *Klebsiella* spp., 10 isolates of *M. catarrhalis*, 25 isolates of *P. aeruginosa*, 12 isolates of *S. typhimurium*, & 10 isolates belong to *Serratia* spp. Where as Gram positive bacteria involved 55 isolates belonging to *S. viridans* and 25 isolates of *S. aureus*.

The antibiotic susceptibility of 10 isolates on of each species were tested towards 20 antibiotics which include different antibiotic groups used clinically. Results revealed the presence of a similarity in antibiotic resistance patteren between Gram negative and Gram positive isolates in which 100%of these isolates were resistant to erythromycin, tetracycline, lincomycin ,clindamicin ,& streptomycin, whereas 80.7%of Gram negative and 86.2% of Gram positive isolates were resistant to beta lactam antibiotics.

About 66.2% of Gram negative isolates and 66.6% of Gram positive isolates showed high ability to produce beta lactamase enzymes.

Results from agarose gel electrophoresis showed that most Gram negative and Gram positive isolates harbour plasmid DNA similar in size & position.

Results from conjugation and transformation experiments revealed that the genes encoding beta lactam, tetracycline, erythromycin, chloramphenicol, lincomycin, clindamycin, and rifampin resistance were located on a conjugative plasmid where as the gene encoding aminoglycosid and colistin resistance were located on a chromosomal DNA because it cannot transfer from donor to recipient cell by conjugation and transformation. Also these results showed that the gene encoding beta lactamase were located on plasmid DNA.

Results from plasmid curing revealed that SDS is a best curing agents than salicylic acid which play an important role in losing of antibiotic resistance.

The result from plasmid curing by using SDS showed that the gene encoding antibiotic resistance to aminoglycoside, trimethoprim-sulfamethoxazol, chloramphenicol, tetracycline, rifampin, lincomycin and colistin from all Gram-negative isolates was lost whilest the gene encoding antibiotics resistance to aminoglycoside, tetracycline, rifampin, colistin and trimethoprim-sulfamethoxazl of Gram-positive isolates was lost. The results from agarose gel electrophoresis showed that using SDS was lead to loss all plasmid bands from curing cells in comparison with using salicylic acid.