جامعة القادسية
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التحري عن جينات المقاومة لمضادات البيتالاكتام من البكتريا المعزولة من بعض الاصابات السريرية في مدينة الديوانية

رسالة قدّمها

عمر حسين حران

بكلوريوس علوم - علوم حياة/ جامعة القادسية (٢٠٠٩)

إلى

مجلس كلية العلوم / جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة / أحياء مجهرية

إشراف

م.د. ميثم غالي يوسف

صفر ١٤٣٣هـ   كانون الثاني ٢٠١٢م

إقرار لجنة المناقشة

نشهد إننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ(**التحري عن جينات المقاومة لمضادات البيتالاكتام من البكتريا المعزولة من بعض الاصابات السريرية في مدينة الديوانية**)

وناقشنا الطالب **عمر حسين حران** في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ ١٦ / ٢ /٢٠١٢ وإنها جديرة لنيل درجة الماجستير علوم / علوم الحياة / أحياء مجهرية.

التوقيع:

رئيس اللجنة

الاسم: أ.د. حبيب صاحب نهر

اللقب العلمي:استاذ

العنوان: كلية الطب/ جامعة بابل

التاريخ: / / ٢٠١٢

التوقيع :

عضو اللجنة

الاسم: أ.م.د. زياد متعب الخزاعي

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم/جامعة القادسية

التاريخ: / / ٢٠١٢

التوقيع:

عضو اللجنة

الاسم:أ.م.د. علي محسن المحنة

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

العنوان:كلية الطب/جامعة الكوفة

التاريخ: / / ٢٠١٢

التوقيع:

عضو اللجنة (المشرف)

الاسم: د. ميثم غالي يوسف

اللقب العلمي: مدرس

العنوان: كلية العلوم – جامعة القادسية

التاريخ: / / ٢٠١٢

إقرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية العلوم بجلسته .... المنعقدة في / / ٢٠١٢ وقرر منحه شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة / أحياء مجهرية

التوقيع:

الاسم: د. نجم عبد الواحد عبد الخضر الحساني

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

التاريخ: / / ٢٠١٢

قائمة المحتويات

الموضوع	الصفحة
الفصل الأول / المقدمة Introduction	١-٣
الفصل الثاني / استعراض المراجع Literatures Review	٤-٣٢
٢-١: بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	٤
٢-٢: بكتريا *Klibsiella pneumoniae*	٥
٢-٣: بكتريا *Escherichia coli*	7
٢-٤: مضادات البيتا لاكتام B-lactam antibiotics	9
٢-٤-١: البنسلينات Penicillins	10
٢-٤-٢: السيفالوسبورينات Cephalosporins	١٠
٢-٤-٣: مضادات المونوباكتام Monobactams antibiotics	١٢

٢-٤-٤: مضادات الكاربابينيم Carbapenem antibiotics	١٢
٢-٥: مثبطات البيتالاكتاميز β-lactamase inhibitors	١٢
٢-٥: الية عمل مضادات البيتالاكتام	١٣
٢-٦: اليات المقاومة لمضادات البيتا لاكتام: Bacterial resistance to β-lactam antibiotics	١٥
٢,٦,١: التحلل المائي للمضادات الحيوية بواسطة انزيمات البيتا لاكتاميز: Antibiotic hydrolysis by β-lactamases	١٥
٢-٦-٢: تقليل الفة المضاد الحيوي لاستهداف البروتينات الرابطة للبنسلين : **Decreased affinity of target pencillin binding proteins**	١٥
٢-٦-٣: انخفاض النفاذية في الغشاء الخارجي Low permeability of outer membrane:	١٦
٢-٦-٤: انظمة الدفق Efflux pump system	١٦
٢-٧: انزيمات البيتالاكتاميز β-Lactamase enzymes	١٧
٢-٧-١: نشوء وتطور انزيمات البيتالاكتاميز Development of β-Lactamase	١٨
٢-٧-٢: الية عمل انزيمات البيتالاكتاميز Mechanism of β-lactamase action	١٩
٢-٧-٣: تصنيف أنزيمات البيتا-لاكتاميز Classification of β-lactamases	٢١
٢-٧-٤: العوامل الوراثية المسؤولة عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز	٢٢
٢-٧-٤-١: انزيمات البيتالاكتام الكروموسومية Chromosomal β-lactamases	٢٢
٢,٧,٤,٢: المقاومة البلازميدية Transferable resistance	٢٣
٢,٧,٥: انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended spectrum β-lactamase	٢٤
٢,٨: اصناف انزيمات البيتالاكتاميز المهمة سريرياً	٢٥

٢,٨,١: انزيمات الصنف الجزيئي A:	٢٥
٢,٨,١,١: انزيمات الـ TEM	٢٥
٢,٨,١,٢: انزيمات الـSHV	٢٦
٢,٨,١,٣: انزيمات الـCTX-M	٢٧
٢,٨,٢: انزيمات الـCarbapenemases صنفA	٢٨
٢,٨,٣: انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C	٢٩
٢,٨,٤: انزيمات البيتالاكتاميز صنف D	٣٠
٢,٨,٥: انزيمات البيتالاكتاميز المعدنيةMetallo β-lactamases	٣٠
٢,٩: انزيمات البيتالاكتاميز المقاومة للمثبط Inhibitor resistant β-lactamases	٣١
الموضوع	**الصفحة**
الفصل الثالث / المواد وطرائق العمل	٣٢- ٥٧
٣-١: المـواد Materials	٣٢
٣-١-١: الأجهـزة والأدوات المختبرية Equipment	٣٢
٣-١-٢ : المـواد الكيـمياويـة Chemical materials	٣٣
٣-١-٣: الأوساط الزرعية الجاهزة والمحضرة مختبرياً Ready and prepared media	٣٥
٣-١-٤: الأوساط الزرعية الزرعية المحضرة مختبرياً prepared media	٣٥

Laboratory	
٣-١-٥ : المضادات الحيوية Antibiotics	٣٦
٣-١-٥-١: أقراص المضادات الحيوية Antibiotics disks	٣٦
٣-١-٦ : العدد الجاهزة	٣٧
٣-١-٦-١: المزيج الرئيس الاخضر (Green master mix 2X)	٣٧
٣-١-٦-٢: بادئات الدنا (DNA primers): التي قامت بتجهيزها شركة (Bioneer):	٣٧
٣-١-٦-٣: العدة التشخيصية Api 20 E	٣٧
٣-١-٧: سلالة البكتريا القياسية: (Standard bacterial strain)	٣٧
طرائق العمل	٣٨
٣-٢: طرائق التعقيم Sterilization methods	٣٨
٣-٢-١-١: التعقيم بالحرارة	٣٨
٣-٢-١-٢: التعقيم بالترشيح	٣٨
٣-٣: تحضير الأوساط الزرعية Culture media	٣٨
٣-٣-١: وسط اغار الماكونكي MacConkey agar medium	٣٨
٣-٣-٢: وسط مولر هنتون الصلب Muller-Hinton agar	٣٨
٣-٣-٣: وسط الاغار المغذي Nutrient agar medium	٣٨
٣-٣-٤: وسط المرق المغذي Nutient broth medium	٣٩

٣-٣-٥: وسط الدم الصلب Blood agar medium	٣٩
٣-٣-٦: وسط ماء الببتون Peptone water	٣٩
٣-٣-٧: وسط غراء سيمون ستريت Simmons citrate agar	٣٩
٣-٣-٨: وسط اليوريا الصلب Urea agar medium	٣٩
٣-٣-٩: وسط اختبار الحركة Motility media	٤٠
٣-٣-١٠: وسط غراء الايوسين المثيلن الأزرق Eosin methylene blue	٤٠
٣-٣-١١: وسط المالونيت Malonate broth	٤٠
٣-٣-١٢: وسط غراء كلكلر Kligler’s iron agar	٤٠
٣-٣-١٣: وسط احمر المثيل والفوكس بروسكور M.R.V.P Medium	٤٠
٣-٣-١٤: وسط الفنيل الانين Phenylalanine medium	٤٠
٣-٣-١٥: وسط اختزال النترات Nitrate reduction medium	٤١
٣-٣-١٦: وسط تخمر الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation medium	٤١
٣-٣-١٧: وسط الجيلاتين المغذي Nutrient gelatin medium	٤٢
٣,٣,١٨: وسط مرق نقيع القلب و الدماغ Brain-Heart infusion broth	٤٢
٣-٣-١٩: وسط مقاومة البيتالاكتام β-lactam resistant media	٤٢
طرائق العمل	٤٢
٣-٤: محاليل الصبغات والكواشف Stains and reagents solutions	٤٢

٣-٤-١: محاليل صبغة كرام Gram stain solutions	٤٢
٣-٤-٢: المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline solution	٤٢
٣-٤-٣: المحلول الدارئ الفوسفاتي الملحي Phosphate buffer saline (PBS)	٤٣
٣-٤-٤: أنبوبة ماكفرلاند القياسية No. (0.5) McFarland tube standard	٤٣
٣-٤-٥: كاشـف الكتاليز Catalase reagent	٤٣
٣-٤-٦: كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent	٤٤
٣-٤-٧: كاشف فوكس بروسكاور Voges proskauer reagent	٤٤
٣-٤-٨: كاشف احمر المثيل Methyl red reagent	٤٤
٣-٤-١-٩: كاشف اختزال النترات Nitrate reduction reagent	٤٤
٣-٤-١٠: كاشف فرازير Frazier's reagent	45
٣-٤-١١: كاشف كلوريد الحديديك FeCl3	٤٥
٣-٤-١٢: كاشف كوفاكس Kovac's reagent	٤٥
٣-٥-١: خصائص الصفات المظهرية والزرعية Morphological and cultural characteristics	٤٥
٣,٥,٢: التشخيص باستخدام نظام العدة التشخيصية API 20E	٤٥
٣-٥-٣: الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests	٤٦
٣-٥-٣-١: الكشف عن إنزيم الكاتيليز Catalase test	٤٦
٣-٥-٣-٢: الكشف عن انزيم الاوكسيدز Oxidase test	٤٦

٣-٥-٣-٣: الكشف عن انتاج الهيمولايسين Haemolysin production	٤٦
٣-٥-٣-٤: الكشف عن كبريتيد الهيدروجين Production of hydrogen sulfite	٤٦
٣-٥-٣-٥: فحص اختزال النترات Nitrate reduction test	47
٣-٥-٣-٦: اختيار استهلاك السترات Citrate utllization test	47
٣-٥-٣-٧: اختبار قابلية الحركة Motility test	47
٣-٥-٣-٨: فحص تخمير الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation test	47
٣-٥-٣-٩: الكشف عن انتاج ألا ندول Indol test	47
٣-٥-٣-١٠: اختبار احمر المثيل Methyl red test	٤٧
٣-٥-٣-١١: اختبار الفوكس بروسكور Vogues pros-kauer test	٤٨
٣-٥-٣-١٢: الكشف عن انزيم اليوريز Urease test	٤٨
٣-٥-٣-١٣: استهلاك المالونيت Malonate utilization test	٤٨
٣-٥-٣-١٤: الكشف عن انزيم Phenyl alanine deaminase	٤٨
٣-٥-٣-١٥: اختبار تحلل الجيلاتين Gelatin hydrolysis test	٤٨
٣-٥-٣-١٦: التحري عن انتاج البيتا لاكتاميز باستخدام اقراص النايتروسيفين	٤٨
٣,٦: جمع العينات Samples collection	٤٩
٣,٦,١: حفظ وإدامة العزلات البكتيرية Preservation and maintenance of bacterial isolates	٤٩

٣,٦,١,١: الحفظ قصير الأمد	٤٩
٣,٦,١,٢ : وسط الحفظ طويل الأمد Maintenance medium	٤٩
٣,٦,٢: التحري عن مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية (طريقة الانتشار بالقرص)	50
٣-٦-٣: اختبار التحري عن مقاومة مضادات البيتا لاكتام Screening test for B-lactam resistance	٥٠
٣-٦-٤: التحري عن أنزيمات البيتا-لاكتاميز واسعة الطيف Detection of extended-spectrum β-lactamases	٥٠
٣-٦-٤-١: اختبارالتحري الاولي عن البيتالاكتاميز Initial screening test	٥٠
٣-٦-٤-٢: فحص التاكيد المضهري (طريقة القرص التأزري المزدوجة) Phenotypic (confirmatory test (Double disc synergy method	٥١
٣-٦-٦: التحري عن أنزيمات الـDetection of AmpC enzymes	٥١
٣-٦-٦-١: اختبار التحري الأولي عن أنزيمات الـAmpC nitial screening test for AmpC enzymes	٥١
٣-٧: تصميم بادئ جديد ومتخصص لجين الـAmpC	٥٢
٣-٨: طريقة جزيئية بإتباع تقنية سلسلة التفاعل الجزيئي المتبلمر (PCR)	٥٢
٣-٨-١: المحاليل المستعملة في استخلاص الدنا الكلي وتنقيته بطريقة التمليح Salting out method	٥٢
٣-٨-١-١: محلول كلوريد الصوديوم (٥ مولار)	٥٢
٣-٨-١-٢: محلول %SDS (25)	٥٢

٣-٨-١-٣: محلول الفينول Phenol solution	٥٢
٣-٨-١-٤: مزيج الكلوروفورم: آيزوأميل الكحول	٥٢
٣-٨-١-٥: مزيج الفينول: كلوروفورم: آيزوأميل الكحول:	٥٣
٣-٨-١-٦: دارئ Buffer (TE) EDTA - Tris	٥٣
٣,٨,١,٧: دارئ Saline - Tris –EDTA (STE)	٥٣
٣-٩: المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي	٥٣
٣-٩-١: محلول صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide solution	٥٣
٣-٩-٢: محلول (TBE) Tris-Borate EDTA	٥٣
٣-٩-٣: محلول التحميل Loading buffer	٥٤
٣-٩-٤: إستخلاص DNA الكلي DNA Extraction	٥٤
٣-٩-٥: تحضير مزيج انزيم سلسلة التفاعل الجزيئي المتبلمر (PCR)	٥٥
٣-٩-٦: ضبط ظروف سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة (PCR)	٥٥
٣-٩-٧: الترحيل الكهربائي بالهلام Agarose gel electrophoresis	٥٦
٣-٩-٨: ترحيل نواتج سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة (PCR)	٥٧
الفصل الرابع / النتائج	٥٨-٨٨
٤: النتائج Results	٥٨
٤-١: العزل والتشخيص	٥٨

٤-١-١: ألتشخيص التأكيدي لبعض البكتريا المعزولة باستخدام عدة التشخيص Api 20E	٥٩
٤-٢: اختبار التحري عن العزلات المقاومة للبيتالاكتام Screening test of β-lactam resistant	٥٩
٤-٣: اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility test	٦٠
٤-٤: التحري عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز Detection of β-lactamases	٦٨
٤-٤-١: اختبار قرص النايتروسيفين للتحري عن انتاج إنزيمات البيتالاكتاميز Detection of β-lactamases with cefinase disc	٦٨
٤-٤-٢: التحري عن قابلية انتاج انزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف Detection of (extended spectrum β-lactamases (ESBL	٧٠
٤-٤-٢-١: اختبار التحري الأولي Initial screening test	٧٠
٤-٤-٢-٢: فحص الأقراص المزدوجة التازري Double disk synergy test	٧١
٤-٥: دراسة النسق البلازميدي للعزلات قيد الدراسة: Plasmid profile	٧٣
٤-٦: تقنية التفاعل الجزيئي المتبلمر (Polymerase chain reaction (PCR	٧٤
٤-٧: إنتاج إنزيمات AmpC بيتا لاكتاميز AmpC β-lactamase production	٨٢
٤-٧-١: فحص التحري الاولي عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز من النوع AmpC	٨٢
٤-٧-٢: التحري عن مورثاتblaAmpC في عزلات بكتريا*Ps. aeruginosa*	٨٤
٤-٧-٣: مقارنة بين بادئ *bla*AmpC المصمم والبادئ الجاهز	٨٤
٤-٧-٤: التحري عن مورثات*bla*AmpC بين عزلات بكتريا *K. pneumoniae , E. coli*	٨٨

	الموضوع
٨٩-١٢٤	**الفصل الخامس / المناقشة Discussion**
٨٩	٥-١: العزل والتشخيص
٨٩	٥-٢: اختبار التحري عن العزلات المقاومة للبيتالاكتام Screening test of β-lactam resistanc
٩٣	٥-٣: اختبار الحساسية للمضادات الحيوية بطريقة لانتشار بالاقراص
١٠١	٥-٣-١: حساسية عزلات بكتريا *Ps.aeruginosa* للمضادات الحيوية بطرقة الاقراص
١٠١	٥-٣-٢: حساسة عزلات بكتريا ال*E.coli* للمضادات الحيوية بطريقة الانتشار بالاقراص
١٠٣	٥-٣-٣: حساسية عزلات بكتريا *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية بطريقة الاقراص
١٠٧	٥-٤: اختبار قرص النايتروسيفين للتحري عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز Detection of β-lactamases with Cefinase disc
١٠٩	٥-٥: التحري عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز
١٠٩	٥-٥-١: اختبار التحري الاولي Initial screening test
١١٣	٥-٥-٢: فحص الاقراص المزدوجة التأزريDouble disk synergy test
١١٦	٥-٦: المحتوى البلازميدي Plasmid profile
١١٨	٥-٧: تقنية سلسلة تفاعل انزيم البلمرة Polymerase chain reaction
١٢٢	٥-٨: نتائج التحري عن انزيمات البيتا لاكتاميز من النوع AmpC

٥-٩: نتائج التحري عن مورثات AmpC بين العزلات البكتيرية *K.pneumoniae, E. coli*	١٢٣
٥-١٠: مقارنة بين بادئ *bla*AmpC الجاهز والمصمم	١٢٤
الموضوع	**الصفحة**
الاستنتاجات والتوصيات Conclusion & Recommendation	١٢٥
الاستنتاجات Conclusions	١٢٥
التوصيات Recommendations	١٢٦
المصادر References	١٢٧-١٧٨
المصادر العربية	١٢٧
المصادر الأجنبية	١٢٨

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
(٤-١)	مصادر وأعداد العزلات البكتيرية المأخوذة من ٣ حالات التهابية مختلفة والنسب المئوية.	٥٨
(2-4)	النسب المئوية لعزل البكتريا السالبة لصبغة غرام	٥٩
(٤-٣)	البكتريا السالبة لصبغة غرام والمقاومة لمضادات البيتالاكتام	٥٩
(٤-٤)	المقاومة الكلية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة للمضادات الحيوية	٦١
(٤-٥)	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لعزلات *Ps. aeruginosa*	٦٣
(٤-٦)	مقاومة عزلات *K. pneumoniae* للمضادات الحيوية	٦٥
(7-4)	مقاومة عزلات *E. coli* للمضادات الحيوية	٦٧
(8-4)	العزلات التي اظهرت نمط المقاومة المتعددة	٦٨
(9-4)	إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز بطريقة قرص النايتروسيفين للعزلات البكتيرية قيد الدراسة:	٦٩
(10-4)	جدول يوضح نتائج التحري الأولي للعزلات المدروسة	٧٠
(11-4)	العدد الكلي للعزلات المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف	٧٠
(٤-١٢)	قابلية إنتاج العزلات للإنزيمات واسعة الطيف بطريقة تآزر القرص المزدوج	٧١
(13-4)	يبين العزلات المنتجة للبيتالاكتاميز حسب مصادر عزلها	٧١
(14-4)	توزيع مورثات إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بين العزلات قيد الدراسة	٧٤
(٤-١٥)	توزيع مورثات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بين عزلات *Ps. aeruginosa*	٧٥
(٤-١٦)	توزيع مورثات إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف والنسب المئوية بين عزلات *K. pneumoniae*	٧٧
(17-4)	توزيع انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بين عزلات *K. pneumoniae*	٧٨
(18-4)	توزيع مورثات الإنزيمات واسعة الطيف والنسب المئوية بين عزلات *E. coli*	٨١
(٤-١٩)	النسب المئوية للعزلات المنتجة لإنزيمات الـ*AmpC* باستخدام اختبار التحري الأولي	٨٣
(٤-٢٠)	جدول توزيع مورثات الـ*bla*AmpC بين عزلات بكتريا *Ps. aeruginosa* حسب البادئ الجاهز	٨٣
(٤-٢١)	العزلات الحاملة لكلا النوعين من المورثات والتي مصدرها مسحات الحروق والإدرار	٨٤
(22-4)	النسبة المئوية للمقارنة بين البادئ المصمم والبادئ الجاهز لبكتريا *Ps. aeruginosa*	٨٤
(٤-٢٣)	: مقارنة بين البادئ الجاهز والبادئ المصمم	٨٤
	عدد عزلات *Ps. aeruginosa* المنتجة لانزيمات AmpC و ESBL حسب	

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
(٢-١)	الية استر السيرين المستخدمة من قبل انزيمات البيتالاكتاميز في تحطيم حلقة البيتالاكتام	٢٠
(٢-٢)	العلاقة بين المجاميع التركيبية والوظيفية لأنزيمات البيتا-لاكتاميز (Bush, 1997)	٢٢
(٤-١)	قرص النايتروسيفين للتحري عن العزلات المنتجة للبيتالاكتاميز	٦٩
(٤-٢)	اختبار التحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز بطريقة القرص التازري المزدوج لبكتريا *K.pneumoniae*	٧٢
(3-4)	اختبار التحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز بطريقة القرص التازري المزدوج لبكتريا *E. coli*	٧٢
(4-4)	الترحيل الكهربائي للـ DNA الكلي المستخلص من عزلات الـ *Ps.aeruginosa*	٧٣
(5-4)	الترحيل الكهربائي للـ DNAالكلي المستخلص من عزلات الـ*K.pneumoniae*	٧٣
(6-4)	الترحيل الكهربائي للـ DNAالكلي المستخلص من عزلات الـ *E.coli*	٧٤
(A,B ٤-٧)	الترحيل الكهربائي لمورث bla_{TEM} المتضاعف باستخدام تقنية (PCR) لعزلات بكتريا *Ps. aeruginosa*	٧٥
(A ٤-8)	الترحيل الكهربائي لمورث bla_{SHV} المتضاعف باستخدام تقنية (PCR) لعزلات بكتريا *Ps. aeruginosa*	٧٦
(A ١١-9)	الترحيل الكهربائي لمورث bla_{TEM} المتضاعف باستخدام تقنية(PCR) لعزلات بكتريا *K. pneumoniae*	٧٨
(A 4-١٠)	الترحيل الكهربائي لمورث bla_{SHV} المتضاعف باستخدام تقنية (PCR) لعزلات بكتريا *K. pneumoniae*	٨٦
(٤-١١):	الترحيل الكهربائي لمورثbla_{TEM} المتضاعف باستخدام تقنية (PCR) لعزلات الـ *E. coli*	٧٧
(12-4)	الترحيل الكهربائي لمورث bla_{SHV} المتضاعف باستخدام تقنية (PCR) لبكتريا*E. coli*	٨٢
(13-4 (A,B	الترحيل الكهربائي لمورث bla_{AmpC} المتضاعف باستخدام تقنية (PCR) لبكتريا *Ps. aeruginosa*	٨٦
(14-4)	الترحيل الكهربائي لمورث *bla* $_{AmpC}$* المتضاعف باستخدام تقنية (PCR) لعزلات بكتريا *Ps. aeruginosa*	٨٧
(15-4)	الترحيل الكهربائي لمورث *bla* $_{AmpC}$ المتضاعف باستخدام تقنية (PCR) لعزلات بكتريا *E. coli*	

قائمة المختصرات

المختصر	تعريفه
AMC	Amoxicillin-clavulanic acid
AmpC	Ampicillin-hydrolyzing class C β-lactamase
bla gene	β-Lactamase gene
CAZ	Ceftazidime-hydrolyzing β-lactamase
CIAT	Ceftazidime-imipenem antagonism Test
CTX-M	Cefotaxime-hydrolyzing β-lactamase
DDST	Double disc synergy test
CLSI	Clinical and laboratory standard institutes
β	Beta
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
ESBLs	Extended-spectrum β-lactamases
IMP	Imipenem-hydrolyzing β-lactamase
KPC-	*Klebsiella pneumoniae*-carbapenemase
LPS	Lipopolysaccharides
MBLs	Metallo-β-lactamases
MDR	Multidrug resistant
NCCLS	National committee for clinical laboratory standards
OXA	Oxacillin-hydrolyzing β-lactamase
PABLs	Plasmid-mediated AmpC β-lactamases
PBPs	Pinicillin binding proteins
PCR	Polymerase chain reaction
PER	Pseudomonas extended resistant and also the initials of its discoverers: Patric, Esthel, and Roger
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SHV	Sulfa-hydral variant β-lactamase
TBE	Tris-borate-EDTA buffer
TE buffer	Tris EDTA buffer

TEM	Temoera (Patient name)
UTIs	Urinary tract infections
VEB	Vietnam extended-sSpectrum β-lactamase
VIM	Verona integron-encoded metallo-β-lactamases

الخلاصة

تم جمع ٥١٦ عينة سريرية من مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى الولادة والاطفال التعليمي للمدة من تشرين الاول ٢٠١٠ لغاية اذار ٢٠١١ وذالك لغرض التحري عن بكتريا *Ps. aeruginosa*، *E. coli*، *K. pneumoniae* اذ شملت عينات مصادرها (الحروق ٦١ عينة)، (الجروح ٣١٥ عينة) ،الادرار ١٤٠ عينة) اظهرت الفحوصات والاختبارات الزرعية والكيموحيوية عائدية ٣١ عزلة لبكتريا *Ps. aeruginosa*، ٦٦ لبكتريا الـ*K.pneumoniae*، ٧٥ لبكتريا الـ*E.coli*.

تم التحري عن العزلات المقاومة للبيتالاكتام وذالك بزرعها على وسط مولر هنتون اغار المزود بالـAmpicillinوالـAmoxicillin اذ اظهرت النتائج من بين ١٧٢ عزلة من الانواع البكتيرية المذكورة انفاً فان ١٤٥ منها كانت مقاومة لهذه المضادات وبنسبة ٨٤,٣%، اذ كان عدد العزلات المقاومة لبكتريا الـ *Ps. aeruginosa*، *K.pneumoniae*، *E.coli* هي ١٨%،٣٨,٤%، ٤٣,٦% على التوالي، اذ انتقيت العزلات المقاومة واخضعت لاختبار الحساسية الدوائية.

اجري فحص الحساسية الدوائية لـ ١٤٥ عزلة بكتيرية اظهرت مقاومتها لمضادات البيتالاكتام في اختبار التحري الاولي عن المقاومة تجاه ١٧ مضاداً حيوياً بطريقة انتشار القرص لكيربي –باور اذ اظهرت جميع العزلات مقاومتها على الاقل لثلاثة اصناف من المضادات الحيوية، لذلك عدت من ذوات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية Multi-drug resistant (MDR).

اختبرت قابلية ١٤٥ عزلة بكتيرية للتحري عن قابلية انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز باستخدام اقراص النايتروسيفين (Cefinase) اذ اظهرت جميع عزلات الـ *Ps. aeruginosa*قابليتها على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز وبنسبة ١٠٠%، اما الـ*K.pneumoniae*, *E.coli* فكانت نسب انتاجها لهذه الانزيمات هي ٥٧,١% و٣٥,٩% على التوالي بينما بلغت النسبة الكلية لانتاج هذه الانزيمات هي ٥٦,٦%.

تم التحري عن انزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف باستخدام اختبار التحري الاولي اذ وجد ان افضل دليل على احتمالية انتاج انزيمات البيتالاكتاميز هو الحساسية لسيفالوسبورينات الجيل الثالث Aztreonam اذ كانت نسبة المقاومة لمضادات الـ Ceftazidime، Cefotaxime ،Ceftriaxone اذ اظهرت نسبة مقاومة لهذه المضادات هي ٧٢,٦%، ٧٦,٦%، ٧٤,٤% اما الـAztreonam جاءت نسبة المقاومة له ٦٨,٣%.

اختبرت ١٤٥ عزلة بكتيرية مشخصة للتحري عن قابليتها لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف باستخدام اختبار (Double disc synergy test) حيث اظهرت نتائج الدراسة عدم فاعلية هذا الاختبار في الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف في بكتريا الـ *Ps. aeruginosa* اذ كانت نتائج الاختبار سالبة لجميع العزلات وبنسبة ١٠٠%، اما الـ *K.pneumoniae*، *E.coli* اذ كانت نسب انتاجها لهذه الانزيمات هي ٣٧,٥%، ١٤,١% على التوالي.

استخدمت تقنية الـPolymerase Chain Reaction للتحري عن امورثات الـbla_{TEM} و bla_{SHV} للعزلات التي اظهرت قابليتها على انتاج الانزيمات الواسعة الطيف بأختبار تأزر القرص المزدوج حيث اظهرت بكتريا *Ps. aeruginosa*، *K. pneumoniae* ، *E. coli* احتوائها على مورث الـ bla_{TEM} وبنسبة ٢٨%، ١٤,٣%، ٦,٧% على التوالي، اما مورث الـbla_{SHV} فكانت نسب احتوائها على هذا المورث هي ٥٦%، ٣٣,٣%، ٦,٧%.

تم التحري عن قابلية العزلات قيد الدراسة على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز من الصنف C من خلال الكشف المظهري باستخدام الفحص الاولي للـCefoxitin اذ اختبرت ٧٦ تعود للانواع البكتيرية قيد الدراسة اذ اظهرت ٦٤,٥% منها مقاومة لهذا المضاد وبواقع ٣٢,٩%، ٢٢,٤%، ٩,٢% على التولي.

اظهرت النتائج ان جميع العزلات قيد الدرس كانت مقاومة للـCefoxitin وبنسبة (١٠٠%) اذ اخضعت جميع العزلات لاختبار الـ(PCR) للتأكد من احتواء العزلات قيد الدرس على المورث bla_{AmpC} وقد وجد ان ١٨(٧٢%) من العزلات تحتوي على هذا المورث،اما بكتريا الـ *K.pneumoniae* اظهرت عدم احتوائها على هذا المورث اما الـ *E.coli* اظهرت عزلة واحدة فقط احتوائها على هذا المورث.

اظهرت النتائج ان بادئ الـ bla_{AmpC} المصمم قد اعطى نسبة ٨٨% في التحري عن هذا المورث اما البادئ الجاهز فقد اعطى اقل نسبة ٧٢%.

ان التحري المظهري لايكون كافياً للكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز الا ان االنتائج تكون اكثر ايجابية باستخدام الطرق الجزيئية، كما ان تصميم البادئ للسلالات قيد الدراسة يعطي نتائج ايجابية عالية مما لو استخدم البادئ الجاهز خاصة لمورث *bla*$_{AmpC}$ في عزلات *Ps. aeruginosa*.

١. المقدمة Introduction

عرفت المضادات الحيوية، بانها مركبات عضوية تنتج من قبل انواع معينة من الاحياء المجهرية بصورة طبيعية او مصنعة وتستطيع هذه المواد وبتراكيز قليلة قتل او تثبيط احياء مجهرية اخرى (Bradford, 2001; Hodgson and Kizior, 2003)، اذ يتركز عمل المضاد الحيوي على الخلية البكتيرية في جانبين رئيسين، احدهما اعاقة التكامل البنائي، حيث يمنع تكوين كل من الجدار الخلوي والغشاء البلازمي والاخر منع او اعاقة الايض الوضيفي مثل منع او اعاقة تكوين البروتين، والاحماض النووية، ومواد ايضية اخرى مثل حامض الفوليك والتي تلعب دوراً مهماً في حياة الخلية البكتيرية (Malion and Manuselis., 1995).

البيتالاكتام عبارة عن مجاميع كبيرة من المضادات الحيوية تشترك جميعها باحتوائها على حلقة البيتا لاكتام (β-lactam ring) وتضم هذه المضادات اربع مجاميع رئيسية هي: البنسلينات (Penicillin) والسيفالوسبورينات (Cephalosporins) والكاربابينيم (Carbapenems) والمونوباكتام (Monobactams) (Samaha-Kfoury and Araj, 2003). اذ تعد هذه المضادات الأكثر شيوعا في العلاج السريري للاخماج البكتيرية وذلك لقلة تكلفتها وتأثيرها العالي وأثارها الجانبية القليلة وكذلك تخصصها وسميتها المنخفضة لخلايا الإنسان (Bradford, 2001; Goo and Sim, 2010; Lupoli *et al*., 2011).

عرفت مقاومة المضادات الحيوية بانها واحدة من المشاكل الصحية الرئيسية الهامة في جميع انحاء العالم، ولغرض السيطرة عليها اذ لابد من رصد مستويات المقاومة البكتيرية وبشكل مستمر ومن قبل انظمة مراقبة فعالة لغرض التعرف على نمط المقاومة (Bradford, 2001)، اذ تعد مقاومة البكتريا الممرضة للمضادات الحيوية من اخطر الظواهر الوبائية والعلاجية على الصحة العامة للإنسان في جميع أنحاء العالم (الجبوري، ١٩٩٠).

ازدادت مقاومة مضادات البيتا-لاكتام بصورة ملحوظة خلال الربع الأخير من القرن الماضي كما أن ظهور المقاومة السريع بين المسببات المرضية شكل تهديدا خطيرا لعلاج الامراض المتسببة منها, ومن أهم ميكانيكيات المقاومة هي انتاج انزيمات البيتا لاكتاميز والتي تمثل خط الدفاع الرئيسي في البكتريا (Mathor *et al*., 2005).

تعد الأنزيمات واسعة الطيف هي الاكثر انتشارا بين الانواع البكتيرية المختلفة والتي تمتاز بقدرتها على تحليل سيفالوسبورينات الجيل الثالث اضافة الى البنسلينات والسيفالوسبورينات الاولى، الا انها تبقى حساسة لمضادات الـ Cephamycins كما انها تثبط بحامض الكلافيولين (Clavulanic acid) وهذا ما ساعد في التحري عنها (Bou *et al*., 2000; Vinod Kumar and Neelagund, 2004; Colodner and Raz, 2005). اما انزيمات البيتا لاكتاميز التي تنتمي الى الصنف الجزيئي (C) او ما يطلق عليها بإنزيمات الـ(AmpC) فهي عادة ما يتوسطها الكروموسوم البكتيري وتمتاز بامتلاكها قدرات تحليلية اوسع من الانزيمات واسعة الطيف، حيث أنها تتمكن من تحليل مضادات الـ(Cephamycins) اضافة الى سيفالوسبورينات الجيل الثالث ولا تثبط بحامض الكلافيولين (Philippon *et al*., 2002; Hanson, 2003) .

تعد أنزيمات البيتا-لاكتاميز المعدنية (Met alo-β-lactamases) القادرة على تحطيم مضادات الطيف الواسع من الأنواع المهمة رغم قلة أنواعها مقارنة مع الإنزيمات الأخرى، اذ انها تتميز بقدرتها على تحليل معظم مضادات البيتا-لاكتام (Patel and Bonomo., 2011 and Vella *et al*., 2011) كما انها لاتثبط بحامض الكلافيولانيت اذ انها اكثر أنواع الإنزيمات البيتا لاكتام خطورة وأشدها تحليلا لهذه المضادات بمختلف أنواعها (Ho *et al*., 2002; Crespo *et al*., 2004; Yatsuyanagi *et al*., 2004).

يعد التحري عن أنزيمات البيتا لاكتاميز من الأمور المهمة والضرورية للسيطرة على العزلات المنتجة لها والحد من انتشارها. اذ بالرغم من كثرة الطرق المستخدمة لهذا الغرض لاتوجد طريقة كفوءة وشاملة للتحري عن جميع أنواع إنزيمات ألبيتالاكتاميز في الأنواع البكتيرية المختلفة، وهذا ما يعزى إلى كثرة أنواعها وتباين خصائصها التحليلية والتثبيطية (Tenover *et al*., 2001; NCCLS, 2003a; 2004; Qin *et al*., 2004)، ومما يزيد الامر تعقيدا هو احتمالية امتلاك العزلة البكتيرية على أكثر من نوع من هذه الإنزيمات (Cao *et al*., 2000; Yigit *et al*., 2001; Alvarez *et al*., 2004).

لقد تناولت الابحاث المحلية السابقة وجود صفة المقاومة المتعددة وانتاج انزيمات البيتالاكتاميز (Al-Charrakh، ٢٠٠٥; الحسو، ٢٠٠٦; Hadi ، ٢٠٠٨; Al-Hilli، ٢٠١٠; Al-Shamarty، ٢٠١٠; Al-Hilali، ٢٠١٠; Al-Asady ، ٢٠١٠; Al-Muhannak، ٢٠١٠; بلال، ٢٠١٠) على بعض الانواع البكتيرية الشائعة.

بالنظر لاهمية الموضوع ولعدم وجود دراسات متخصصة ومعمقة على مستوى جزيئي في مدينة الديوانية لتحديد وجود هذه الانزيمات والجينات المسؤولة عنها باستخدام التفاعل الجزيئي المتبلمر والطرق المظهرية (Phenotypic) اذ أن معظم الدراسات التي تناولت موضوع مقاومة البكتريا للبيتالاكتام قد اقتصرت على فحوصات الحساسية التقليدية والتحري عن إنزيمات البيتالاكتاميز بشكل عام باستخدام طريقة البقعة الايودية وغيرها، فقد جاءت الدراسة الحالية محاولة لتحقيق الاهداف الاتية:

١. عزل وتشخيص بعض الاجناس البكتيرية السالبة لصبغة غرام.
٢. التحري عن إنزيمات ألبيتا-لاكتاميز باستخدام الطرق المظهرية والجزيئية باستخدام التفاعل الجزيئي المتبلمر (PCR).
٣. دراسة صفة لمقاومة من خلال تحديد جينات الـ *bla*$_{TEM}$ ، *bla*$_{SHV}$، الـ *bla*$_{AmpC}$ باستخدام التفاعل الجزيئي المتبلمر.
٤. تصميم بادئ جديد (Primer) متخصص لمورث الـ *bla*$_{AmpC}$ ومقارنته مع بادئ الـ *bla*$_{AmpC}$ الجاهز.

٢: استعراض المراجع Literatures review

1.2: بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

ينتمي هذا النوع إلى عائلة *Pseudomonadaceae*, خلاياه عصوية سالبة لصبغة غرام هوائية إجبارية، تتحرك خلايا هذا النوع بواسطة أسواط قطبية وهي موجبة لاختباريّ الكاتاليز والأوكسديز، (Holt *et al.*, 1994; Koneman *et al.*, 1997) وتتميز هذه البكتريا بإنتاجها للصبغات، مثل صبغة Pyocyanin الزرقاء، وصبغة Pyoverdin الصفراء، وصبغة Pyorubin الحمراء وغيرها (Baron *et al.*, 1994; Koneman *et al.*, 1997).

تعد بكتريا *Ps. aeruginosa* من الممرضات الانتهازية Opportunistic pathogens) كما انها واحدة من اهم الانواع البكتيرية المسببة لما يعرف بالاصابات المكتسبة بالمستشفيات (Nosocomial infections) كما تتواجد هذه البكتريا في التربة والمياه وغيرها, اذ يمكنها أن تسبب الأمراض للإنسان والحيوان والنبات (Prescott *et al*., 1996; Ash *et al*., 2002; Greenwood *et al*., 2007) اذ تسبب حالات مرضية مختلفة ولاسيما بعد العمليات الجراحية، واصابات الحروق ثم تنتشر الاصابة مؤدية إلى تجرثم الدم، كما تسبب التهابات الجهاز البولي (De Miguel Martinez *et al*., 2005; O'neill *et al*., 2006).

اوضحت الكثير من الدراسات ان بكتريا *Ps. aeruginosa* تعد من المسببات الاساسية لاخماج الجروح (الناتجة من العمليات او الناتجة من الاصابات الخطرة) فضلا عن الجروح الناتجة من الحروق (Trengove *et al* .,1996; Haneke, 1997) لقد تبين ان الانواع البكتيرية الهوائية الموجودة ضمن اخماج الجروح مثل *Ps. aeruginosa* لها القدرة على انتاج كثير من عوامل الضراوة التي لها تأثير في عملية الشفاء (Healing).

تمتلك السلالات العائدة لهذ النوع العديد من عوامل الضراوة التي تساعدها على الغزو والاستيطان واحداث الضرر النسيجي، وكذلك غزو مجرى الدم، والانتشار في مناطق الجسم المختلفة (Todar, 2008) ومن اهم هذه العوامل هي الهيمولايسين او حال الدم، وانزيم الايلاستيز، وغيرها (Ryan and Ray, 2004). تعد بكتريا *Ps.aerugnosa* من اخطر المسببات المرضية التي تصيب الانسان بسبب قدرتها على مقاومة مدى واسع ومتنوع من المضادات الحيوية (Hsueh *et al*., 2005) اذ تستخدم اليات متنوعة في المقاومة، ومن اهمها هي انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي، او مضخات الدفق متعددة العقاقير، او انتاج انزيمات البيتالاكتاميز β-lactamases.

إن آلية أنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز تعد من اهم اليات المقاومة، والتي تم اكتشافها في البكتريا السالبة لصبغة غرام، اذ وجد ان المورثات التي تشفر لهذه الانزيمات محمولة اما على الكروموسومات او على البلازميدات واحياناً على العوامل القافزة (Transposons) (Jacoby and Bush, 2009). لذلك فهي تمتلك حساسية قليلة ومقاومة عالية تجاه معظم مضادات الحياة المستعملة في العلاج الطبي، مما جعلها تشكل خطراً شديداً على صحة الإنسان (Livermore, 2001; Livermore, 2002).

2.2: بكتريا الـ *Klibsiella pneumoniae*

ينتمي هذا النوع الى العائلة المعوية *Enterobacteriaceae*، وهي عصيات سالبة لصبغة غرام، غير متحركة، لاهوائية اختيارية، غير مكونة للسبورات، سالبة لاختبار الاوكسيديز، وموجبة لاختبار الكتاليز، الدرجة المثالية للنمو هي بدرجة حرارة (٣٧) مْ، تظهر مستعمراتها على وسط الماكونكي وردية اللون مخاطية ولزجة القوام (Koneman *et al*., 1994).

يضم نوع *K. pneumoniae* ثلاثة تحت النوع هي: *K.pneumoniae* subsp . *pneumoniae* و *K. pneumoniae* subsp *ozaeinae* و *K. pneumoniae* subsp . *rhinoscleromatis* (Holt *et al*., 1994).

تعد الكلبسيلا من البكتريا المعايشة او من النبيت الطبيعي (Commensal) في امعاء الانسان والحيوان ولا تسبب الاصابة الا في حالة الضعف المناعي وبذلك فهي ممكن ان تكون ممرضات انتهازية كما انها قادرة على الانتقال الى اماكن اخرى واحداث انواع مختلفة من الاصابات مثل انتان الدم وتجرثمه، التهاب السحايا، التهاب القناة التنفسية، والمعوية، والبولية وكذلك الجروح والحروق(Brooks *et al*., 2001).

عزلت بكتريا الـ*K. pneumoniae* لاول مرة من قبل فريدلاندر (Friedländer) من التهاب الرئة في عام ١٨٨٢ وعرفت مسبباً مرضياً للاخماج الوبائية والمتوطنة (Epidemic and endemic infections) في المستشفيات في الخمسينيات من القرن العشرين وعزلت فيما بعد من اخماج مختلفة مثل اخماج المسالك البولية (UTI) والتهاب البلعوم واللوزتين والتهاب الرئة الفصي والقناة الصفراوية كما عزلت من التهابات الجروح والحروق والعمليات الجراحية وحالات تجرثم الدم ونتوثتهِ في المرضى الذين يعانون من امراض مزمنة او يعالجون بالادوية الكابحة للمناعة(Podschun and Ullmann, 1998).

يعتمد حدوث الخمج بالكلبسيلا الرئوية على الحالة الصحية للشخص او المضيف وعلى ضراوة البكتريا. اذ تشترك عوامل عدة في الامراضية (Pathogenicity) التي لها أثر مباشر او غير مباشر وهذه تعمل بشكل متلازم في إحداث الخمج وفقدان اي عامل منها سيقلل من إمراضيتها، واهم هذه العوامل هي المحفظة (Capsule) وزيادة انتاجها يكسب البكتريا الصفة المخاطية (Mucoid phenotype) وانتاج السايدروفور (Siderophores) ومتعدد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharide: LPS) وتسهم المحفظة مع أهداب الالتصاق من النوع الاول (Type I fimbrial adhesions) وبروتينات الغشاء الخارجي في التصاق البكتريا على الخلايا الظهارية واستيطان الانسجة المخاطية المبطنة لمواقع الخمج.

يزيد من امراضية هذه البكتريا اشتراك عوامل الضراوة غير المباشرة ولاسيما المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية مثل مقاومة مجموعة البيتالاكتام بسبب انتاجها لمدى واسع من البيتالاكتميز (Extended spectrum–ß–lactamases: ESBLs)، (Podschun and Ullmann, 1998).

ان حالات ذات الرئة المتسببة من هذه البكتريا تكون شديدة الخطورة نظراً لمقاومتها للمضادات الحيوية بشكل واسع ومن اهم هذه ألاليات هو انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف والتي عادتاً مايتوسطها البلازميد البكتيري والتي تثبط مدى واسع من المضادات الحيوية منها البنسلينات (Pencillins)، والسيفالوسبورينات (Cephalosporins)، (Lautenbach *et al*., 2001). كما اظهرت بعض الدراسات ان الانزيمات واسعة الطيف هي اكثر انتشارا في الكلبسيلا بعد الـ *Enterobacter cloacae*، والـ *E. coli* (Pagani *et al*., 2000).

ان من اسباب انتشار السلالات المقاومة بين المرضى هي القابلية العالية للبكتريا على تحمل الجفاف ومقاومتها للمطهرات (Livermore and Yuan, 1996), اذ انها تمتلك قابلية على انتاج انزيمات عديدة، وكذلك انزيمات البيتالاكتميز واسعة الطيف التي تمنح البكتريا القدرة على مقاومة مضادات السيفالوسبورينات ومضادات البيتالاكتام، (Chanal *et al*., 1996). لقد لوحظ ان بكتريا *K. pneumoniae* المنتجه لانزيمات البيتالاكتميز واسعة الطيف تمتلك مقاومة عالية لمضادات الكوينولونات والامينوكلايكوسيدات قياساً بالبكـــتريا غير المنتجة لهذه الانزيــمات.

3.2: بكتريا *Escherichia coli*

ينتمي هذا النوع الى العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* (Holt, 1994)، وهي بكتريا عصوية سالبة لصبغة غرام، مفردة أو مزدوجة، متحركة او غير متحركة اذ تتحرك بواسطة أسواط محيطية (Peritrichous flagella) لا تكون سبورات، لاهوائية اختيارية ولقسم من سلالاتها القدرة على تكوين الاغلفة أو المحافظ كما ذكر الجبوري (١٩٩٠).

يضم النوع *E. coli* أكثر من ٩٩% من الايشريكية المعزولة (Lennette *et al*., 1985)، اذ تم عزل هذه البكتريا لاول مرة من قبل البكتريلوجي الالماني Theoder Escherich عام ١٨٨٢ من براز الاطفال حديثي الولادة (Merchant and Packer, 1967; Moffet, 1980).

توجد هذه البكتريا بشكل طبيعي في امعاء الانسان والحيوانات وهي توجد في التربة والمياه السطحية (Surface water) (فيربرذر، ١٩٨٣) ولها القدرة لاحداث عدد من الاخماج الانتهازية (Opportunistic infections) كالاصابات المتقيحة في التهابات المجاري البولية (Urinary tract infections) وتسبب حدوث التهابات المثانة (Cystitis)، والتهاب حويض الكلية (Pyelonephritis)، (Cruickshank *et al.*, 1975)، فضلاً عن دورها في احداث التهاب الغشاء المساريقي (Peritonitis)، وإنتان الدم (Septicemia) والتهاب السحايا (Meningitis) والتهاب القناة الصفراوية (Cholecystitis) والتهاب الرئة (Pneumonia) وإخماج الجروح (Wound infections) والتهاب المعدة والامعاء (Gastroenteritis) عند الاطفال الرضع (Jawetz *et al*., 1998; Colee *et al*., 1996; Talaro and Talaro, 1999).

تمثل بكتريا *E.coli* النسبة الاعلى لمسببات اخماج المجاري البولية كما اشار العالم (Hughes *et al*., 1981) وقد عزى (Hughes *et al*, 1981) حالة الامراضية التي تسببها الـ *E. coli* الى ما تمتلكه، من صفات تساعدها في احداث الخمج وتكراره وعوامل فوعة متعددة تمكنها من التموضع والانتشار في المجاري البولية التي يمكن عن طريقها تصنيف البكتريا الى انواع مصلية مختلفة اعتماداً على ما تظهره من دلائل خلوية.

تعود اخماج الجهاز البولي المصاحب للأعراض مثل: التهاب حويض الكلية الحاد واخرى مثل تجرثم البول غير المصاحب للأعراض (Asymptomatic bacteriuria) الى امتلاكها لمستضـــدات السوط والمحفظة والجسم (O,K,H) (Bacheller and Bernstein, 1997) فمستضدات المحفظة (Capsular Ag) من نوع K1 مثلاً تجعلها مقاومة لفعالية التحلل (Lytic activities) بوساطة المصل(Mandell *et al*., 1995).

كما ان وجود المحفظة يجعلها مقاومة لعملية البلعمة بوساطة كريات الدم البيض عديدة اشكال النوى وانتاجها حال الدم (Haemolysin) إذ يوجد عامل فوعة اخر حيث يعمل على تحطيم اغشية كريات الدم الحمر مسبباً تحرر الهيموغلوبين ليكون مصدراً للحديد الذي تحتاجه البكتريا (Prescott *et al*., 1996).

لقد وجد ان السلالات المنتجة لحال الدم اكثر ذيفانية للخلايا الطلائية الانبوبية المكونة للكلية من العزلات غير المنتجة. وذكرت دراسات اخرى ان ذيفانيته تتآتى من تدمير خلايا المجرى البولي، وتحرير الانزيم الحال (Lysozyme) والانزيمات المرتبطة معه، وتدمير

كريـات الـدم البـيض والخلايـا احاديـة النـواة بشـكل خـاص، والحـث علـى صـنع الليوكـوترين (Leukototriene)، وافـراز الهسـتامين وغيرهـا مـن الوسـائط الالتهابيـة (Lennette *et al.*, 1985).

هناك عوامل فوعة اخرى مشتركة في امراضية اخماج المجاري البولية مثل عوامل الالتصاق كالأهداب (S,I,P). ويعد الهدب نوع P عامل فوعة مهم في عزلات *E. coli* التي تصيب حويض الكلية، والهدب نوع H الحساس للمانوز له دور في امراضية الـ *E. coli* في المجاري البولية.

يعد انتاج السايديروفور (Siderophore) وهي مجموعة من الحركيات التي لها الفة عالية للحديد وذات اوزان جزيئية واطئة وتمتلك الفة كافية لأن تحول الحديد الى حالته السائلة او سحبه من المعقدات الحاوية عليه ثم تسهل عملية نقله الى داخل الخلية البكتيرية بوساطة مستقبلات خاصة. عامل فوعة اخر عن طريقه تستطيع البكتريا الممرضة مقاومة البروتينات الناقلة للحديد داخل جسم المضيف(Livermore, 2001)..

4.2: مضادات البيتا لاكتام β-lactam antibiotics

بدا عهد المضادات الحيوية بعد ان عزلت مضادات البيتالاكتام من مصادر مختلفة، ومن اهمها البكتريا والفطريات (Ibezim, 2005). وفي عام ١٩٢٩ اطلق اسم مضادات البيتا لاكتام على اول مضاد تم اكتشافه من قبل العالم الاسكتلندي Alexander Fleming عندما لاحظ قدرة احد مستعمرات الفطر *Pencillium notatum* على تثبيط نمو مستعمرات البكتريا العنقودية Staphylococci وقد اطلق اسم البنسلين (Pencillin) على راشح النمو الفطري الذي اظهر هذه القدرة التثبيطية. (Prescott *et al*., 1996; Brooks *et al*., 2001; Ibezim, 2005) اذ تمكن هذا العالم من عزل البنسلين من هذا الفطر (Mandell *et al*., 1995) واستمر الحال على ماهو عليه حتى عام ١٩٤١، اذ تمكن الباحثان Chain و Florey وزملائهما من الوصول الى الانتاج التجاري للبنسلين G. وفي عام ١٩٤٨ تم اكتشاف السيفالوسبورينات (Cephalosporins) اذ عزلت ولاول مرة من قبل العالم Giuseppe Brotza من الفطر *Cephalosporium acremonium* (Mandll *et al*., 1995., Murray *et al*., 1999).

وفي سنة (١٩٥٧) تم تصنيع نواة البنسلين وهي مركب 6-aminopencillianic acid وتكون من حلقة β-lactam ring مرتبطة بحلقة 7-Thiozolidine، اذ اصبح بالامكان تصنيع عدد غير محدود من البنسلينات المختلفة من خلال ربط مجموعة الامين الحرة لنواة البنسلين بمجاميع كاربوكسيل حرة لجذور او سلاسل مختلفة يرمز لها (R) لتعطي مضادات متباينة في صفاتها الدوائية وطيفها المضاد للبكتريا، اذ اطلق عليها البنسلينات شبه المصنعه Semi-synthetic (penicillins) (Laurence and Bennett, 1990; Brooks *et al*., 2001) ثم توالت الاكتشافات اذ تم اكتشاف عدد من المضادات الحيوية والتي تختلف في طيف فعاليتها، فهناك المضادات ذات الطيف الضيق (Narrow spectrum antibiotics) والتي يكون تاثيرها على انواع معينة من الاحياء المجهرية، ومنها ذات الطيف الواسع (Broad spectrum antibiotics) والتي تكون ذات تاثير عالٍ ويمثل مدى واسع ومتنوع من الاحياء المجهرية (Edmunds, 2000). كما تم اكتشاف الـClavulanic acid وهو اول مثبط للبيتالاكتاميز والذي ينتج من قبل الـ *Streptomyces clavuligerous* في عام ١٩٧٧ (Reading and Cole, 1977).

تشترك مضادات البيتالاكتام باحتوائها على حلقة البيتا لاكتام (β-lactam ring)، وتشتمل على اربعة مجاميع رئيسية: هي البنسلينات والسيفالوسبورينات، والكاربابينيم، والمونوباكتام، وتختلف فيما بينها حسب طبيعة الحلقة الاضافية المتصلة بحلقة البيتالاكتا (Samaha- Kfoury and Araj, 2003).

ان مضادات المونوباكتام فعالة تجاه البكتريا السالبة لصبغة غرام ولكنها قليلة الفعالية تجاه البكتريا الموجبة لصبغة غرام والبكتريا الاهوائية. اذا ان اول مضاد اصبح تحت الاستخدام هو الازترونام (Azteronam) (Rupp and Fey, 2003). كما يعتبر الاميبينيم اول مضاد من الكاربابينيم والذي يمتاز بفعاليته الجيدة تجاه العصيات السالبة والموجبة لصبغة غرام وكذلك البكتريا الاهوائية (Mandell and Petri, 1996).

1.4.2: البنسلينات Penicillins

تتميز هذه المجموعة من المضادات بكونها محدودة الطيف فهي فعالة ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام وبعض البكتريا السالبة لصبغة غرام، ويعد كلا من البنسلين (G) و (V) من الأمثلة الجيدة للمضادات الحيوية ذات الطيف المحدود (Kiffer *et al*., 2005)، حيث تعمل البنسلينات على تثبيط بناء جدار الخلية من خلال ارتباط البنسلين مع البروتينات القرنية إلى الغشاء السايتوبلازمي، وبذلك يحصل إغلاق للموقع الذي يتم عنده الارتباط العرضي للببتيدات المرتبطة أصلا بمتعدد السكريات، وهذا الارتباط هو الذي يعطي جدار الخلية التركيب الصلب (; Kiffer *et al*., 2005 ٢٠٠٤Rayan and Ray,) يعد بنسلين G أفضل مثال على البنسلين الطبيعي إذ يعد الأكثر استعمالاً، وتشترك جميع البنسلينات بالتركيب الأساس نفسه، وهو حامض البنسيلانك الاميني (6-aminopenicillanic acid) والمتكون من حلقتين الاولى والرئيسية متكونة من خمس ذرات، وتدعى بحلقة الثايزولدين (Thiazolidin ring)، والتي ترتبط مع حلقة البيتالاكتام غير الثابتة المتكونة من اربع ذرات، اذ تعتمد صفات البنسلين على الذرة الجانبية رقم (٦) التابعة لحلقة البيتالاكتام، وتختلف البنسلينات باختلاف السلاسل الجانبية المرتبطة بهذه الذرة (Brooks *et al*., 1998; Samaha-Kfoury and Araj, 2003).

2.4.2: السيفالوسبورينات Cephalosporins

عزلت السيفالوسبورينات لاول مرة سنة ١٩٤٨ من مزارع الفطر *Cephalosporium acremonium* وادت التعديلات التي اجريت عليها الى تطوير مضادات حيوية جيدة مثل السيفالوثين (Cephalothin) (Bradford, 2001). اذ تشتق جميع السيفالوسبورينات من اصل واحد هو السيفالوسبورين C، (Fuda *et al*., 2006)، تتشابه السيفالوسبورينات والبنسلينات تركيبياً الا انها تختلف عنها في التركيب المحوري بسبب احتوائها على السيفالوسبورانك الاميني (7-Aminocephalosporanic acid) وتكون حلقة الثايوزلدين مكونة من ستة ذرات بدلاً من خمسة، اما مجموعة الجذر (R) فتكون موجودة في الذرة رقم (٣). ان مضادات السيفالوسبورين هي مركبات قاتلة للبكتريا، ولها نفس نمط العمل لمضادات البيتالاكتام الاخرى مثل البنسلين (Bush *et al*., 1995).

تصنف السيفالوسبورينات الى اربعة اجيال اعتماداً على فعاليتها المضادة للنمو البكتيري وهي:

١- **سيفالوسبورينات الجيل الاول First generation cephalosporins:**

تشمل السيفالوسبورينات ذات الطيف الضيق، ومن امثلتها مضادات الـCephalothin، Cephaloridin، Cephalexin وتكون فعالة جداً ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام، ولكنها ذات نشاط بسيط نسبياً ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام، ولكن وفي نفس الوقت توجد انواعاً عديدة من بكتريا *E.coli* و *K. pneumonia* تكون حساسة لهذه المضادات (Moya *et al.*, 2010).

٢- **سيفالوسبورينات الجيل الثاني Second generation cephalosporins:**

هي مركبات مستقرة نوعاً ما بوجود انزيمات البيتالاكتاميز، ولها طيف واسع من الفعالية ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام، ولكن ليس *Ps. aeruginosa* ومن امثلتها مضاد Cefuroxime. ومن هذه المضادات Cefotetan و Cefoxitin، (Samaha-Kfoury and Araj, 2003).

٣- **سيفالوسبورينات الجيل الثالث Third generation cephalosporins:**

تضم هذه المجموعة مضادات حيوية ذات نشاط اكثر بكثير من المضادات ذات الطيف الضيق، ولكنها قليلة الفعالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام، الاانها غالباً ما تكون عالية الفعالية ضد معظم البكتريا السالبة لصبغة غرام بما فيها *Ps. aeruginosa* وهي اكثر استقرارا بوجود انزيمات البيتالاكتاميز، وقادرة على عبور الجدار الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة غرام، ومن امثلتها مضادات الـ Ceftazidime، Cefotaxime، Ceftriaxone (Greer, 2006; Moya *et al.*, 2010).

٤- **سيفالوسبورينات الجيل الرابع Fourth generation cephalosporins:**

تظهر هذه المضادات زيادة في الاستقرارية ليس فقط للانزيمات التي تتوسطها الكروموسومات بل حتى للانزيمات التي تكون مورثاتها محمولة على البلازميدات (Yao and Moellering, 2003; Kalai *et al.*, 2005 .)، اذ تتميزهذه المجموعة من المضادات بفعاليتها الجيدة ضد انواع الـspp *Enterobacter*، *Citrobacter* spp المقاومة لمضادات

الجيل الثالث، وكذلك سلالات *Ps. aeruginosa*، ومن امثلتها مضادات الـ Cefepime، Cefpirone (Brooks *et al*., 2001; Perry and Scott, 2004).

3.4.2: مضادات المونوباكتام Monobactam antibiotics

تمتاز مركبات المونوباكتام بامتلاكها حلقة بيتالاكتام مفردة وغير مرتبطة بحلقة اخرى(Marin and Gudiol, 2003)، ولذلك فهي تفتقر للشكل ثنائي الحلقات الموجود في مضادات البيتالاكتام الاعتيادية وتمتاز ايضاً بسهولة تصنيعها (Forssten, 2009)، اذ ان مضادات المونوباكتام فعاله ضد العصيات السالبة لصبغة غرام وفي الوقت نفسه فهي غير فعالة ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام والبكتريا الاهوائية، اذ يعتبر الـAztreonam هو اول مضاد تم استخدامه من هذه المجموعة (Livermore and Williams, 1996; Samaha-Kfoury and Araj, 2003).

4.4.2: مضادات الكاربابينيم Carbapenem antibiotics

ان لمضادات الـCarbapenem تركيب مشابه للبنسلينات، ولكن ذرة الكبريت استبدلت بذرة كربون، اذ تعد هذه المجموعة من اكفأ المضادات لعلاج الاخماج البكتيرية، كما انها تمتاز بفعاليتها المطلقة ضد الغالبية العظمى من البكتريا المنتجة للانواع المختلفة من انزيمات البيتالاكتاميز بضمنها الانزيمات واسعة الطيف (ESBL) وحتى انزيمات الـAmpC التي تظهر تحليلاً بطيئ لهذه المضادات (Livermore, 1992)، وهي واسعة الطيف ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام والبكتريا الاهوائية. من الامثلة على هذه المجموعة هي Meropenem و Ertapenem، ويعد الـImipenem هو اول مضاد من مجموعة (Jacoby and Bush, 2009; Queenan and Bush, 2007).

٥,٤,٢: مثبطات البيتالاكتاميز β-lactamase inhibitors

ان مثبطات البيتالاكتاميز هي مركبات صممت لتثبيط فعالية هذه الانزيمات، فهي ضعية الفعالية ضد البروتينات الرابطة للبنسلين التي تشترك في تصنيع الجدارالخلوي للخلية البكتيرية، ولكن تزداد فعالية هذه المثبطات عند مزجها مع احد مضادات البيتالاكتام (Livermore and Woodford, 2006)، حيث تحتوي هذه المثبطات على حلقة البيتالاكتام والتي تعمل كمثبطات

انتحارية (Suicidal inhibitors) من خلال الفتها القوية للارتباط بانزيمات البيتالاكتاميز بشكل تنافسي وبصورة غير عكسية، الا انها بخلاف مضادات البيتالاكتام تتحرر ببطئ شديد جداً ولاتتحلل بسهولة وبذلك تعمل على عدم ارتباط هذه الانزيمات بمضادات البيتالاكتام، اي تعمل كمثبط تنافسي (Jacobs *et al*., 1986; Laurence and Bennett, 1990; Brooks *et al*., 2001). وهي جداً فعالة ضد انزيمات البيتالاكتاميزصنف A حسب تصنيف امبلر (Ambler)، وخصوصاً انزيمات الـTEM، والـSHV المتوسطة بالبلازميد في بكتريا الـ *E.Coli* و*K. pneumoniae*، ولكنها مثبطات غير جيدة لانزيمات الصنف C والتي عادتاً ماتتوسط كروموسومياً، والتي تفرز من قبل الـ *Enterobacer* والـ *Pseudomonas* (Miro *et al*., 2004). ويعتمد تأثير هذه المثبطات على تفاعلها مع إنزيمات البتالاكتاميز مكونة معقداً يدعى أسيل-إنزيم يتفاعل بصورة غير عكسية، الامر الذي يؤدي الى فقدان الانزيم لفعاليته، وتقسم مثبطات البيتالاكتاميز الى مجموعتين الاولى تضم حامض الكلافيولانيت (Clavulanic acid)، والمجموعة الثانية تظم حامض البنسيلانك سلفونيز(Penicillanic acid sulfonase) (Moya *et al*., 2010). اذ يؤثر حامض الكلافيولانيت بالتازر مع البنسلينات والسيفالوسبورينات في البكتريا السالبة لصبغة غرام والمنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز، وكذلك مجموعة البنسيلانك سلفونيز، مثل Sulbactam، Tazobactam، فهي مركبات ترتبط هيكلياً بالمضاد الحيوي. مثل Sulbactam يتحد معِ Ampicillin، بينما Tazobactam يتحد مع Piperacillinلتكون اكثر فعالية ضد الانزيمات المحللة لمضادات البيتالاكتام (Jacoby and Bush, 2005).

5.2: الية عمل مضادات البيتالاكتام

تعد مضادات البيتالاكتام من المضادات القاتلة للبكتريا (Bactericidal antibiotics) والتي تعمل على تثبيط بناء الجدار الخلوي البكتيري الذي يمتاز باحتوائهِ على طبقة الببتيدوكلايكان (Peptidoglycan layer) ولذلك فان لهذه المضادات سمية انتقائية (Selective toxicity)عالية، اذ ان تاثيراتها على خلايا الانسان تكاد تكون معدومة مقارنة بالمضادات الاخرى، وذلك لعدم احتواء خلايا جسم الانسان على طبقة الببتيدوكلايكان (Prescott *et al*., 1996; Brooks *et al*., 2001) تتكون طبقة الببتيدوكلايكان بصورة عامة من السكريات الامينية (Amino sugars) والتي تكون على نوعين -N

acetylglucoseamine و N-acetylmuramic acid، اذ ترتبط هذه السكريات الامينية بسلاسل ببتيدية قصيرة عادة ماتتكون من اربعة احماض امينية Tetra peptide، اذ يتم بعد ذلك بناء الجسور الببتيدية المستعرضة (Cross-linking interbridges) مثل الـPentaglycine interbridges مابين السلاسل الببتيدية وهذه تعطي الصلابة النهائية للجدار والتي تكون حصيلة تفاعلات يطلق عليها Transpeptidation reactions والتي تحفزها مجموعة من الانزيمات مثل الـTranspeptidases، Carboxypeptidases، Endopeptidases (Koneman *et al*., 1997; Brooks *et al*., 2001).

يقتصر عمل مضادات البيتالاكاتم على الجدر الخلوية المتكونة حديثا وبالتحديد عملية الـTranspeptidation، وتمنع بناء الجسور المستعرضة بين مكونات الببتيدوكلايكان الاخرى، ممايؤدي الى تخلخل طبقة الببتيدوكلايكان وبالتالي تحطمها نتيجة فرق الضغط الازموزي الحاصل مؤدياً الى دخول الماء الى داخل الخلية وانفجارها، كما ان فعالية هذه المضادات تكون فقط ضد البكتريا المنقسمة او النامية، اذ ان البكتريا غير المنقسمة لاتصنع جدراً خلوية جديدة وبالتالي تكون قليلة الحساسية لهذه المضادات (Laurence and Bennett, 1990; Brooks *et al*., 2001).

ان الخطوة الاولية لعمل مضادات البيتالاكتام هي ارتباطها بالمستقبلات الخلوية والتي يطلق عليها البروتينات الرابطة للبنسلين Penicillin binding proteins (PBPs) وذلك نضرا للتشابه التركيبي بين هذه المضادات وبين جزء D-alanyl-D-alanine من طبقة الببتيدوكلايكان حيث يوجد هناك (3-6) انواع من هذه البروتينات تمثل بعضها انزيمات تشترك في عملية الـ Transpeptidation والتي تحفز عملية بناء الجسور المستعرضة لطبقة الببتيدوكلايكان (Brooks *et al*., 2001).

ان لهذه المستقبلات الفات مختلفة، والتي تقع تحت السيطرة الكروموسومية وبالتالي فان حدوث الطفرات يؤدي الى انتاج تغيرات في عدد هذه البروتينات والفتها لمضادات البيتالاكتام (Koneman *et al*., 1997; Brooks *et al*., 2001)، وبالتالي فان ارتباط مضادات البيتالاكتام بالمستقبلات الخلوية (PBPs) يسبب تداخلاً مع بناء الجسور المستعرضة ويثبط عملية الـ Transpeptidation وبالتالي يتوقف بناء الجدار الخلوي، ويعقب ذلك تنشيط انزيمات

التحلل الذاتي (Autolysins) Autolytic enzymes، (Lurence and Bennett, 1990; Brooks *et al*., 2001).

6.2: اليات المقاومة لمضادات البيتا لاكتام: Bacterial resistance to β -lactam antibiotics

ان مقاومة البكتريا لمضادات البيتا لاكتام قد تكون نتيجة اربعة اليات هي :

1.6.2: التحلل المائي للمضادات الحيوية بواسطة انزيمات البيتا لاكتاميز: Antibiotic hydrolysis by β-lactamases

تمتلك الكثير من المضادات الحيوية اواصر كيمياوية حساسة لها القابلية على التحلل المائي، مثل اواصر الاستر والامايد، وقد عرف الكثير من الانزيمات التي لها القابلية على استهداف وكسر هذه الاواصر، اذ تنتج هذه الانزيمات من قبل العديد من البكتريا والتي تعمل على تعطيل عمل المضاد قبل الوصول الى الموقع الهدف داخل الخلية البكتيرية ومنها انزيمات البيتالاكتاميز، اذ تعمل هذه الانزيمات على مجموعة مضادات البيتا لاكتام، وهناك نوع اخر من هذه الانزيمات تدعى بِـ السيفالوسبورينيزز (Cephalosporinases) والتي تحمل صفاتها على الكروموسوم البكتيري. اذ تنتج هذه الانزيمات من قبل البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام(Cavallo *et al*., 2000; Wright, 2005; Picao *et al* ., 2009).

اذ توجد المورثات التي تشفر لانزيمات البيتالاكتاميز على الكروموسوم البكتيري، الحوافظ الجينية (Gene cassete)، وكذلك على البلازميدات البكتيرية (Plasmids) (Walsh, 2003). تفرز انزيمات البيتالاكتاميز في البكتريا السالبة لصبغة غرام خارج الغشاء الخلوي كانزيمات خارجية (Exoenzymes) او تبقى في الفراغ المحيطي (Periplasm) والتي تهاجم المضاد قبل ان يصل الى الموقع الهدف (PBPs) (Samaha-Kfoury and Araj, 2003) ومن اكثر اشكال المقاومة لمضادات البيتالاكتام هي انزيمات البيتالاكتاميز والتي تنشط فعاليتها عن طريق فتح حلقة البيتالاكتام ففي البكتريا الموجبة لصبغة غرام، تفرز انزيمات البيتالاكتاميز

الى الوسط وبالتالي تعمل على تحطيم المضاد خارج الخلية البكتيرية (Albert and Sussman 1998) , اما في البكتريا السالبة لصبغة غرام توجد هذه الانزيمات في الفراغ المحيطي والتي تهاجم المضاد قبل ان يصل موقعه الهدف (Wiedmann *et al*., 1989).

2.6.2: تقليل الفة المضاد الحيوي لاستهداف البروتينات الرابطة للبنسلين Decreased affinity of target pencillin binding proteins :

تمثل مكونات جار الخلية البكتيرية اهدافا انتقائية ممتازة لمضادات البيتالاكتام، ولكن ظهور الطفرات في البروتينات الرابطة للبنسلين (PBPs) يمكن ان ينتج عنه تقليل الالفة تجاه المضاد الحيوي، اضافة الى ان ألية المقاومة هذه تكون مرتفعه في اعداد مهمة سريريا من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام (Livermore, 2002) اذ مكنت هذه الالية البكتريا من تطوير مقاومتها لعدة انواع من مضادات الحياة. اذ ان حدوث طفرات جينية مفردة يمكن ان يؤدي الى تغير موقع الهدف بصورة كاملة، ومن ثم تنخفض الفة المضاد لهذا الموقع، فعلى سبيل المثال تقوم بقية الادنين المفردة (Single adenine residue) في احد مواقع رايبوسوم البكتريا بخفض الفة جميع العقاقير التي تقع ضمن صنف الارثرومايسين تجاه الهدف في الخلية البكتيرية (Walsh, 2000).

ان مقاومة البنسلينات والسيفالوسبورينات ربما تعزى الى تبدل او فقدان البروتينات الرابطة للبنسلين (Piddock *et al*., 1997) او حدوث تغيرات في الفتها، او عدم قدرة المضاد على الوصول الى هذه المستقبلات بسبب تغير حواجز النفاذية الموجودة في الاغشية الخارجية (Outer membranes) في البكتريا السالبة لصبغة غرام والتي تعرف بالبورينات (Porins) (Zimmermann and Rosselet, 1977; Zimmermann, 1980; Livermore, 1992a).

3.6.2: انخفاض النفاذية في الغشاء الخارجي Low permeability of outer membrane

يغلف سطح البكتريا السالبة لصبغة غرام غشاء خارجي (Outer membrane) يمنع ويعيق كثيرا من المركبات السامة الموجودة في المحيط الخارجي من الدخول الى الخلية، وبما ان على البكتريا ان تتبادل الجزيئات مع البيئة الخارجية، لذا فأن الغشاء الخارجي يحتوي على ثغور بروتينية خاصة تعرف بالـ(Porins) مسؤولة عن هذه العملية، وتكون هذه الثغور على شكل

قنوات مملؤة بالماء، وهي تشارك بصورة غير متخصصة في التبادل غير الفعال للايونات والجزيئات المحبة للماء (Yildirim *et al*., 2005). تدخل المضادات مثل البيتالاكتام والفلوركوينولونات (Fluroquinolones) عبر الغلاف الخارجي من خلال البورينات (Nikaido, 2003).

اذ ان من احد ميكانيكيات المقاومة لمضادات البيتالاكتام في العصيات السالبة لصبغة غرام تغير بروتينات البورين في الغشاء الخلوي مسببتا انخفاض النفاذية، وعلى سبيل المثال تفتقر بكتريا الـ *Ps. aeruginosa* للبورينات عالية النفاذية النموذجية وبدلا من ذلك فهي تمتلك بورينات واطئة النفاذية والتي تسمح بمرور الجزيئات الصغيرة فقط (Ferguson, 2007).

4.6.2: انظمة الدفق Efflux pump system

يستهدف هذا النوع من المقاومة طريق الوصول الى الموقع الهدف (Target site) للمضاد الحيوي من خلال طرحه خارج الخلية (Mims *et al*., 2004)، اذ تكمن الية عمل هذه الانظمة من خلال قذف المضاد الحيوي خارج الخلية البكتيرية بعد احتجازه من قبل اغشية بروتينية خاصة يساعدها في ذلك الغشاء الداخلي وفسحة الفراغ المحيطي (Periplasm) (Alekshun and Levy, 1997; Ziha-Zarifi *et al*., 1999; Masuda *et al*., 2000; Lambert *et al*., 2001) اذ يمكن ان تمتلك البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام مضخات مفردة او متعددة في بعض البكتريا وخصوصا الـ*Ps. aeruginosa* يوجد هناك نظام دفق فعال يخفض تراكم المضاد الحيوي داخل الخلية البكتيرية ويسمح لانزيم ذو قابلية تحليلية محدودة على تثبيط المضاد قبل الوصول الى هدفهِ.

كما ان بعض البكتريا تستطيع ان تسلك مسار ايضي بديل وتصبح مقاومة لبعض المضادات عن طريق الـ bypassing من تجاوز تثبيط انزيم معين اذ تدعى هذه الميكانيكية بـِ Target bypassing (Tenover, 2006)، اذ تعتمد هذه الميكانيكية على طبيعة المضاد، الموقع الهدف، وكذلك النوع البكتيري فيما اذا كان يتوسط بالبلازميد او عن طريق طفرة كروموسومية (Dzidic *et al*., 2008).

7.2: انزيمات البيتالاكتاميز β-lactamase enzymes

تعرف انزيمات البيتالاكتاميز على انها انزيمات تعمل على تثبيط فعالية مضادات البيتالاكتام وهي من اكثر وسائل المقاومة شيوعاً للبيتالاكتام اذ توجد في معظم انواع البكتريا سواء كانت سالبة او موجبة لصبغة غرام، كما تم وصف اكثر من (٢٥٠) نوعا منها (Bush *et*

al., 1995; Bush *et al.*, 1997) وهي غالباً ما تكون خارج خلوية (Extracellular) في البكتريا الموجبة لصبغة غرام في حين ان انزيمات الا نواع السالبة لصبغة غرام تتواجد في منطقة الفراغ المحيطي Periplasm (Livermore, 1995; Bush, 1997) وتاتي اهميتها من خلال قدرتها على فتح حلقة البيتالاكتام لكل من البنسلينات والسيفالوسبورينات، وبذلك تكون هذه المضادات غير فعالة ضد البكتريا (Koneman *et al.*, 1992; Lancini and Parenti, 1982).

تم تعريف هذه الانزيمات من قبل لجنة التسمية العالمية في الاتحاد الدولي للكيمياء الحياتية (National Commite of the International Union of Biochemistry) على انها انزيمات محللة للـ Amides ، و الـAmidens وغيرها من اواصر الـ C-N المفصولة اعتماداً على المواد الاساس التي تحللها (Bush *et al.*, 1995)، حيث يكون انتاج انزيمات البيتالاكتاميز اما محفزاً (Inducible)، او كامناً (Constitutive).

تنتج انزيمات البيتالاكتاميز المحفزة فقط عند التعرض لمضادات البيتالاكتام (McDougal and Thornsbery, 1986)، وبمجرد التوقف عن تقديم مضادات البيتالاكتام يتوقف انتاج الانزيمات المحفزة، اما الانزيمات ذاتية المقاومة فهي انزيمات مشفرة يتم انتقالها عبر السلالات وتنتج في حال وجود او عدم وجود المحفز (Koneman *et al.*, 1992).

١,٧,٢: نشوء وتطور انزيمات البيتالاكتاميز Development of β-lactamase

وجدت مقاومة مضادات البيتالاكتام حتى قبل تطوير هذهِ المضادات فانزيمات البيتالاكتاميز ربما تطورت بشكل اولي لحماية بكتريا التربة من مركبات البيتالاكتام المنتجة من قبل الكائنات المجهرية الاخرى في بيئتها، حيث ثبت ان الفطريات والاكتينومايسيتات والبكتريا المتواجدة في التربة لها القدرة على انتاج مركبات البيتالاكتام (Wells *et al.*, 1982; Ghuysen, 1991) وبذلك فان للبكتريا المنتجة لهذه الانزيمات صفة تطورية واضحة على الانواع الاخرى غير المنتجة لهذه الانزيمات (Bush, 1997).

ان مقاومة مضادات البيتالاكتام يمكن ان تتم من خلال اليات مختلفة وحسب النوع البكتيري (Spratt, 1994)، ومن اهمها واكثرها انتشارا هو انتاج انزيمات البيتالاكتاميز. وهناك

حاليا اكثر من ٢٥٠ نوعاً من هذه الانزيمات، العديد منها يتوسطها الكروموسوم لاسيما في البكتريا السالبة لصبغة غرام في حين يوجد اكثر من (100) نوع انزيمي يتوسطها البلازميد وقد انتشر العديد منها بين الانواع البكتيرية المختلفة. (Livermore, 1995; Bush *et al*., 1995) اذ تم تسجيل اول انزيم بيتالاكتاميز من عزلة *E. coli* سنة (١٩٤٠) قبل استخدام البنسلين للعلاج في العيادات الطبية (Abraham and Chain, 1940) وهذا مايدعم نظرية كون انزيمات البيتالاكتاميز موجودة في الخلايا البكتيرية منذو فترة طويلة سبقت استخدام المضادات الحيوية في العلاج السريري. اذ رافق تطور المضادات الحيوية وادخال الانواع الجديدة والواسعة الطيف منها تطور مناظر في انزيمات البيتالاكتاميز اذا ظهرت انزيمات البيتالاكتاميز المرتبطة بالمقاومة السريرية والتي اطلق عليها انزيمات الـ(Pencillinases) من بكتريا *Staph aureus* بعد ادخال مضادات الـ(Benzylpencillin)، وفي نهاية الخمسينات تم التعرف على مركبي 6-aminopenicillianic acid و Cephalosporanic acid كنواتج طبيعية استخدمت كاساس لانتاج وتصنيع مضادات البيتالاكتام شبه المصنعه (Bush, 1997) وفي نفس الوقت بدات انزيمات الـ (Cephalosporinases) وانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (Broad spectrum β-lactamases) في العزلات السالبة والمقاومة لمضادات البيتالاكتام في نفس الوقت مشكلة تحديات جديدة لمضادات البيتالاكتام (Livermore, 1995; Bush, 1997) وفي اواسط الستينات وتزامنا مع الاستخدام المتزايد للسيفالوسبورينات بدا ظهور انزيمات البيتالاكتاميز المتوسطة بالبلازميدات في العصيات السالبة لصبغة غرام ومن هذه الانزيمات هي الـ TEM-1، TEM-2، SHV-1 ولها نسب تحليل متشابهة لكل من الـ Benzylpenicillin والـ Cephaloridine (Bush *et al*., 1995; Bush, 1997).

ان انزيم الـ SHV يمكن ان يكون متوسطاً بالكروموسوم او البلازميد، في حين ان انزيمي TEM-1، TEM-2 تتواجد بشكل عام على البلازميدات، ويمثل الانزيم TEM-1 تهديدا من نوع خاص حيث انه وجد في معظم اجناس البكتريا السالبة لصبغة غرام (Philips, 1976).

٢,٧,٢: الية عمل انزيمات البيتالاكتاميز Mechanism of β-lactamase action

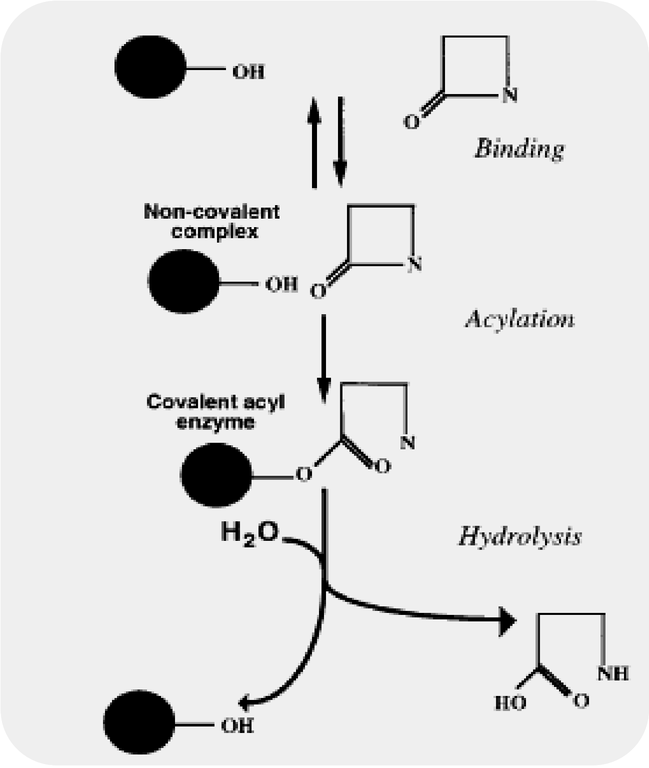
يقوم انزيم البيتالاكتاميز بفتح حلقة البيتالاكتام في ضروف التحلل المائي منتجاً حامض البنسلويك (Pencillioc acid) او حامض الـ(Cephalosporic acid) الخالية من اي فعالية

تجاه البكتريا (Powers and Shoichet, 2002)، اذ تمتاز انزيمات البيتالاكتاميز بتحليلها للاواصر الاميدية (Amide bonds) لحلقة البيتالاكتام ولا سيما (البنسلينات والسيفالوسبورينات)، ونتيجة لذلك تنشا المقاومة للمضادات الحيوية (John *et al*., 1999).

ان غالبية انزيمات البيتالاكتام تعمل على تحطيم مضادات البيتالاكتام باستخدام الية استر السيرين (Serine ester mechanism) الموضحة في الشكل (2-1)، اذ يرتبط الأنزيم أولاً بشكل لا تساهمي مع المضاد لينتج معقداً لا تساهمياً، عندها تهاجَم حلقة البيتالاكتام من قبل الهيدروكسيل الحر على السلسلة الجانبية للسيرين في الموقع الفعال للأنزيم لينتج إستر أسيلي تساهمي (Covalent acyl ester)، يتم بعد ذلك إضافة جزيئة ماء ليحدث التحلل المائي للاستر محرراً في النهاية الأنزيم الفعال والمضاد المحلل مائياً بصورته غير الفعالة.

إن هذه الآلية تستخدم من قبل أنزيمات الأصناف الجزيئية (A,C,D)، في حين تختلف الأنزيمات المعدنية التابعة للصنف (B) في كونها تستهلك أيونات الزنك في الموقع الفعال لمهاجمة وتحطيم حلقة البيتالاكتام (Livermore, 1995).

ومن المعروف أن مضادات البيتالاكتام تستهدف وتثبط في عملها البروتينات الرابطة للبنسلين (PBPs) وهي أنزيمات تحفز الخطوة الأخيرة (تكوين الجسور المستعرضة) في بناء طبقة الببتيدوكلايكان. فإذا لم تتمكن الخلية البكتيرية من ربط المكونات الجديدة للجدار مع الببتيدوكلايكان الموجود عندها سيضعف الجدار الخلوي ويبدأ بالتحلل الذي يُسَرِعهُ فعل أنزيمات إعادة تدوير الببتيدوكلايكان (Peptidoglycan recycling enzymes) التي يطلق عليها المحللات الذاتيـة(Livermore and Williams, 1996) .

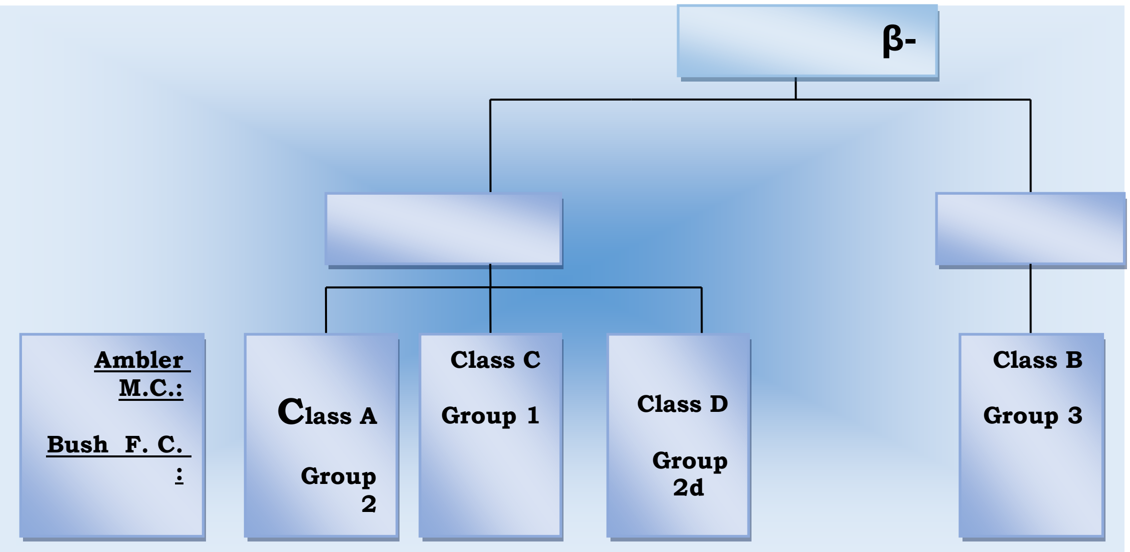


الشكل (2-1): الية استر السيرين المستخدمة من قبل انزيمات البيتالاكتاميز في تحطيم حلقة البيتالاكتام (Waley, 1992)

وهكذا يكون بناء الجدار الخلوي موقعاً مثالياً للسمية الإنتقائية التي تتميز بها مضادات البيتالاكتام، أي أن البروتينات الرابطة للبنسلين تتفاعل مع مضادات البيتالاكتام لتعطي إسترات السيرين ولكنها بخلاف الإسترات المشابهة المتكونة من قبل أنزيمات البيتالاكتاميز لا تتحلل بسهولة (Livermore, 1995). إن لمعظم أنزيمات البيتالاكتاميز على الأقل ثلاث عناصر تركيبية أو وظيفية محفوظة بشكل كبير (Highly conserved elements)، وهذه العناصر تكون محفوظة كذلك ضمن البروتينات الرابطة للبنسيلين ذات العلاقة، وعادة ما يطلق مصطلح البروتينات المتفاعلة مع البنسيلين (Penicillin interactive proteins) على أنزيمات البيتالاكتاميزوالـ(PBPs) سويةً، إذ توجد مناطق متشابهة بين هذه البروتينات (Lamotte- Brasseur, 1994; Bush, 1997). اذ ان الـPenicillin بدلاًمن ارتباطه مع هدفه (PBPs) لتحطيم الجدار الخلوي فإنه يرتبط مع أنزيمات البيتالاكتاميز التي تعمل بدورها على تحطيم حلقة البيتالاكتام وحماية الخلية من تأثيره القاتل. كما لوحظ أن تتابع الأحماض الأمينية في الموقع الفعال يبقى كما هو محافَظ عليه في جميع البروتينات المتفاعلة مع البنسيلين التي تكون مركبات أسيلية مع مضادات البيتالاكتام (Ghuysen, 1979; Ambler, 1979; Bush, 1997) .

3.7.2: تصنيف أنزيمات البيتالاكتاميز Classification of β-lactamases

قسمت أنزيمات البيتالاكتاميز بشكل عام إلى مجموعتين رئيستين اعتماداً على الآلية التي تستخدمها لتحليل مضادات البيتالاكتام وهي؛ الأنزيمات المعدنية (Met allo-β-lactamases) اذ تمتلك متبقي الحامض الاميني السيرين (Serine residue) في الموقع الفعال للانزيم التي وتعتمد هذه الانزيمات على ايون الخارصين ثنائي الشحنة (Zn^2) كعامل مساعد لفعاليتها الانزيمية (Jacoby and Bush, 2009) وأنزيمات السيرين (Serine β-lactamases) التي تستهلك السيرين في الموقع الفعال (Bush, 1997). وقد تم وضع آلية تصنيف تركيبية تعتمد على تتابعات الأحماض الأمينية من قبل Ambler سنة (1980) يطلق عليها آلية تصنيف أمبلر الجزيئية (Ambler molecular classification scheme)، نتج عنها أربعة أصناف تركيبية أو جزيئية هي (A, C, D) وهي من أنزيمات السيرين والصنف (B) الذي يمثل الأنزيمات المعدنية (Ambler, 1980).



تعد آلية Bush وجماعته (١٩٩٥) هي الآلية الأكثر شمولاً حتى وقتنا الحاضر، اذ تعتمد على وضع الأنزيمات في مجاميع وظيفية اعتماداً على نوع المادة الاساس التي يؤثر عليها الانزيم، او صورته التثبيطية، او شحنة الانزيم النهائية او نسبة التحلل المائي وغيرها (Bush *et al*., 1995; Jacoby and Bush, 2009) وكذلك اعتماداً على قابليتها على التثبط بواسطة المثبطات الانتحارية (Suicide inhibitors) الموجهة للموقع الفعال (Active site-directed)، مثل حامض الكلافيولين (Clavulanic acid)، أو بواسطة العوامل المحورة للبروتين مثل EDTA، ρ-chloromercuribenzoate (Ghuysen, 1979; Ambler, 1979; Bush, 1997)

يتألف تصنيف Bush من أربع مجاميع رئيسة أعطيت أرقاماً عربية (Group:1,2,3,4)، وتعتبر المجموعة الثانية أكبر المجاميع على الإطلاق، حيث إنها تضم عدة مجاميع فرعية Subgroups هي (2a,2b,2be,2br,2c,2d,2e,2f). وبالرغم من كون هذه الآلية أكثر ألاليات المتوفرة شمولاً إلا أنه لا توجد آلية أو تصنيف وظيفي يكون ُمرضياً بشكل كامل، لأن أنزيمات البيتالاكتاميز تظهر قدراً كبيراً من التنوع في عدد استبدالات الأحماض الأمينية التي يمكن ان تتحملها، لذا كلما كانت المعلومات المتوفرة حول أنزيم ما أكثر وأشمل كلما كانت عملية تصنيفه أسهل (Bush *et al*.,1995).

الشكل (2-2) العلاقة بين المجاميع التركيبية والوظيفية لأنزيمات البيتالاكتاميز (Bush, 1997)

4.7.2:العوامل الوراثية المسؤولة عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز

1.4.7.2: انزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية Chromosomal β-lactamases

تحتوي العديد من افراد العائلة المعوية على انزيمات البيتالاكتاميز التي يتوسطها الكروموسوم البكتيري. ومنها انزيمات الـAmpC والتي تنتمي للصنف الجزيئي C اذ توجد هذه الانزيمات في بكتريا *Ps. aeuroginosa* ومعظم افراد العائلة المعوية، كما تنتج الـ*E. coli* كميات قليلة منها بغض النظرعن وجود اوعدم وجود مضادات البيتالاكتام، اذ ان هذه الكميات القليلة غير كافية لتثبيط مضادات البيتالاكتام. ان انزيمات الـ AmpC مهمة سريرياً عندما تنتج بافراط كونها تقاوم مدى واسع من مضادات البيتالاكتام مثل الـCefoxitin، Azteronam، وسيفالوسبورينات الجيل الثالث، وتوليفة β-lactam/Clavulanic acid (Shahid *et al*., 2004)، وهناك انواع بكتيرية كالـ *Ps. aeruginosa* والـSPP *Enterobacter* تمتلك انزيمات الـAmpC لذلك تظهر مدى مقاومة كامنة واسع. وفي السنوات الاخيرة ظهر الدليل على وجود انزيمات AmpC البلازميدية، ومثال ذلك البلازميدات التي انتقلت من افراد العائلة المعوية ووصلت الى الـ *K. pneumoniae* (Livermore and Brown, 2001). اما في البكتريا الموجبة لصبغة غرام فقد ذكر Adam وجماعته (1970) بان هناك صنفاً واحداً من الانزيمات تنتجه سلالات *Staph. aureus* المقاومة، في حين اشار Koneman وجماعته (١٩٩٢) الى ان البكتريا العنقودية تنتج ثلاثة انواع مختلفة من الانزيمات، ووجد ان هذه الانواع قد تكون محفزة او ذاتية المقاومة وتكون ذات منشأ بلازميدي، وهذا يتفق مع ماتوصل ألية McDougalو Thornsberry (١٩٨٦)، كما ذكر بان (Oxacillin, Methicillin and Naphithicillincephalothin) هي من اهم انواع المضادات الحيوية القادرة على مقاومة التحلل المائي لانزيمات البيتالاكتاميز.

2.4.7.2: المقاومة البلازميدية Plasmid mediated resistance

تنتقل جينات البيتالاكتاميز بواسطة البلازميدات والجينات القافزة والسلاسل المحشورة والانتكرونات وتعرف البلازميدات على انها جزيئات DNA مزدوجة وحلقية الشكل ومستقلة عن الكروموسوم الرئيسي للبكتريا قادرة على التضاعف التلقائي (Koneman *et al*., 1992)، وتعمل على تشفير المعلومات لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز من قبل مورثات معينة محمولة على البلازميدات وتدعى الايبسومات (Episomes) والتي تحمل صفة المقاومة للعديد من المضادات

الحيوية (Waldvogel, 1990; Madigan and Martinko, 2006; Karah, 2008) ويختلف البلازميد عن الكروموسوم الرئيس للبكتريا من خلال قدرة بعضها على الإنتقال بين الأنواع البكتيرية بواسطة عملية الإقتران البكتيري (Conjugation)، وهذا يفسر إنتشار المقاومة للمضادات الحيوية (Philippon *et al*., 2002; Livermore and Brown, 2005). كذلك تستطيع المورثات المترابطة والمقاومة للكثير من المضادات الحيوية المحمولة على البلازميد أن تنتقل ككتلة واحدة، حيث إنّ DNA البلازميدي بإمكانه الإنتقال من سلالة إلى أخرى، ومن نوع إلى آخر، وأحياناً من جنس إلى آخر. وعلى الرغم من ذلك فان بعض جينات المقاومة للمضادات الحيوية تكون محمولة على الكروموسوم الرئيسي للبكتريا (Rybak and Laplante, 2005) وقد لاحظ Koneman وجماعته (١٩٩٢) ان معظم ألاليات الشائعة لانتقال المورثات المقاومة من بكتريا الى اخرى ممكن ان تحدث عن طريق المورثة القافزة (Transposon) ولاسيما المورثة القافزة الاقترانية. وعلى سبيل المثال تمتلك بعض سلالات الـ *Ps. aeuroginosa* في الاقل على انزيم واحد من انزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية (Jacoby and Bush, 2009).

اذ ان المورثات القافزة (Transposon) هي مورثات لها قابلية على الإنتقال أمّا داخل القطع الكبير للـ DNA، مثل الكرموسوم البكتيري أو البلازميد أو بينها، تتألف هذه العوامل من ثلاثة جينات يرتبط بها على كل جانب تسلسلات من الـDNA والتي هي عبارة عن سلسلة من قواعد الإدخال، تتوسط التفاعل بين العوامل القافزة وقطع الـ DNA الكبيرة (Hall and Stokes, 1993; Hall and Collis, 1995). وتمتلك العوامل القافزة القابلية على الإنتقال من بلازميد إلى آخر، ومن بلازميد إلى كروموسوم وبالعكس محدثة طفرة وراثية بعد انغرازها في مواقع وتسلسلات معينة تدعى بتسلسلات الهدف(Gay *et al*., 1985). إنّ أكثر هذه الجينات إنتشاراً هي تلك التي تعود إلى العائلة Tn_3 المشفرة لإنزيميTEM-1 وTEM-2. أمّا (Integrons) فهي عناصر وراثية تحتوي على كاسيتات الجين (Gene cassette) التي تستطيع الإنتقال من (Intigron) إلى آخر، أو إلى مواقع ثانوية في المورث البكتيري، كما إنّ أكبر كاسيتات الجين المعروفة تشفر إلى مقاومة المضادات الحيوية (Fluit and Schmitz, 1999) إنّ معظم جينات البيتالاكتاميز تتداخل ضمن البلازميدات والجينات القافزة التي لها القابلية على نقل جينات المقاومة بين البكتريا (Bennett and Hawkey, 1991; Bradford, 2001)، كذلك من الممكن أن تتواجد ضمن Intigron كجزء من كاسيتات الجين ذات المقاومة للكثير من المضادات الحيوية مثل الأمينوكلايكوسايد (Aminoglycoside)

والسلفونمايد (Sulfonamide) والكلورامفينيكول (Chloramphenicol) (Medeiros, 1997; Weldhagen, 2004).

٥,٧,٢: انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended spectrum β-lactamase

ان معظم الانزيمات واسعة الطيف ESBLs هي من مشتقات الـTEM، SHV ، اذ يوجد مايزيد عن (90) نوعاً من انزيمات الـTEM واكثر من ٢٥ نوعاً من انزيمات الـSHV (ولمعرفة تتابع الاحماض الامينية لانزيمات الـESBLs يمكن زيارة الموقع الالكتروني http://WWW.lahy.org/studies/web.htm) اذ ان سبب الانماط المظهرية المختلفة هي الطفرات النقطية في مواقع جينية معينة في هاتين المجموعتين من الانزيمات، اذ وجدت هذه الانزيمات في بكتريا الـ*E. coli*، *K. pneumoniae*، وغيرها من اجناس العائلة المعوية (Livermore, 1995; Bradford, 2001).

كما تعرف الانزيمات واسعة الطيف (ESBLs) على انها انزيمات قادرة على تحليل مضادات الجيل الثالث للسيفالوسبورينات وهي تثبط بحامض الـ Clavulanic acid اذ وضعت ضمن المجموعة الوضيفية (2be) والتي تمثل اكبر المجاميع من حيث عدد الإنزيمات التي تضمها (Bush *et al*., 1995). اصبحت مقاومة مضادات البيتالاكتام من قبل أنزيمات البيتالاكتاميز ذات المنشأ الكروموسومي والبلازميدي والمنتجة من قبل البكتريا السالبة لصبغة غرام من اكثر مشاكل المقاومة لمضادات البيتالاكتام (West, 2000)، وفي العقد الثامن من القرن الماضي تم تطوير انواع كثيرة من مضادات البيتالاكتام، الامر الذي ادى الى تفاقم المشكلة. لذلك فان كل صنف جديد من هذه المضادات يستعمل في علاج المرضى سيؤدي الى انبثاق انزيمات بيتالاكتاميز جديدة تسبب المقاومة لذلك المضاد الحيوي (Livermore, 1995; Bradford, 2001; Ryan and Ray, 2004) وتمثل مضادات الجيل الثالث للسيفالوسبورينات احد هذه الاصناف التي استخدمت بشكل كبير في علاج الاصابات الخطيرة الناتجة عن البكتريا السالبة لصبغة غرام، وقد نشأة المقاومة لهذه المضادات عن طريق انزيمات البيتالاكتاميز بسرعه ومن هذه الانزيمات SHV-2 وجد في احدى عزلات *K. ozanae* في المانيا (Kliebe *et al*., 1985) وبسبب طيف فعاليتها الواسع وخصوصاً ضد المضادات واسعة الطيف اطلق على هذه الانزيمات مصطلح الانزيمات واسعة الطيف واعطيت الرمز

(ESBLs)، اذ يتواجد في الوقت الحاضر اكثر من (١٥٠) نوعاً من هذه الانزيمات وقد وجدت في كافة انحاء العالم وفي العديد من اجناس العائلة المعوية وكذلك في الـ*Ps. aeruginosa* (Bush *et al*., 1995; Bradford, 2001).

٨,٢:أصناف أنزيمات البيتالاكتاميز المهمة سريرياً

١,٨,٢:انزيمات الصنف الجزيئي A:

وهي عائلة كبيرة من الانزيمات تتضمن انزيمات الـTEM، SHV، والـ CTX-M بالاضافة الى انزيمات اخرى تمتلك خاصية الطيف الواسع، و هي المجموعة الاكثر شيوعاً من انزيمات البيتالاكتاميز (Bush *et al*., 1995).

١,١,٨,٢: انزيمات الـ TEM

يعتبر الـ TEM-1 هو اول انزيمات البيتالاكتاميز والذي اكتشف لاول مرة سنة ١٩٦٥ في بكتريا الـ*E. coli* وسجل حديثاً كواحد من اكثر انزيمات البيتالاكتاميز انتشاراً في العائلة المعوية (*Enterobacteriaceae*) (Datta and Kontomichalou, 2007).

اذ يتواجد في حوالي (٩٠%) من عزلات الـ *E.coli* المقاومة للامبسيبلين كما يوجد ايضاً في الـ *K. pneumoniae* وافراد العائلة المعوية (Livermore, 1995; Bradford, 2001). يشفر جين bla_{TEM} المحمولة على الجينات القافزة (Transposon) ومنها الـTn3، Tn2 والتي تشفر لانزيمات الـ TEM-1 (Datta and Kontomichalou, 2007) ان هذا الانزيم قادر على تحليل البنسلينات والسيفالوسبورينات الاولى مثل الـ Cephalothin ، Cephaloridine. ويعد الانزيم TEM-2 اول مشتقات الانزيم TEM-1 باستبدال حامض اميني واحد نتج عنه تغير في قيمة نقطة التعادل الكهربائي (PI) من (٥,٤) الى (٥,٦) مع بقاء خصائص المادة الاساس كما هي في الانزيم الاصلي (TEM-1)، اما بالنسبة للانزيم TEM-3 فقد تم تسجيله لاول مرة سنة (١٩٨٩) كأول انزيم يُظهر نمط الانزيمات واسعة الطيف (Sougakoff *et al*., 1988; Venkatachalam *et al*., 1994) وفي السنوات الاخيرة تم وصف اكثر من (٩٠) نوعاً انزيمياً من مشتقات الـ TEM غالبيتها واسعة الطيف (Paltzkill *et al*., 1995; Rasheed *et al*., 2002; Barlow and Hall, 2002)، اذ يوجد حالياً اكثر

من ١٦٥ مغاير لجين الـ*bla*$_{TEM}$ وهي مقاومة للمثبطات مثل الكلافيولانك اسيد (Clavulanic acid) (Jacoby and Bush, 2009) ان استبدالات الاحماض الامينية التي تحدث ضمن انزيم الـTEM تقع في عدد محدد من المواضع، وان مجموع هذه التغيرات في الاحماض الامينية ينتج عنه تغيرات متباينة في الانماط المظهرية للـESBLs مثل القدرة على تحليل انواع معينة من مضادات الجيل الثالث للسيفالوسبورينات كمضاد الـCeftazidime، Cefotaxime (Jacoby and Mederious, 1991; Bush *et al*., 1995) وان هناك عدد من الاحماض الامينية تكون الاستبدالات فيها مهمة بشكل خاص لا نتاج النمط المظهري لانزيمات الـ ESBLs، وهذه تشمل استبدال الحامض الاميني الكلوتاميت بالحامض الاميني اللايسين في الموقع (١٠٤)، والحامض الاميني الارجنين بالحامض الاميني السيرين او الهستدين في الموضع (٢٣٨)، والحامض الاميني الكلوتاميت بالحامض الاميني اللايسين في الموضع (٢٤٠) (Bradford, 2001) لقد تم افتراض ان انزيمات الـ ESBLs المشتقة من الـTEM هي نتيجة للضغط الانتخابي المتذبذب (Fluctuating selective pressure) لعدة انواع من مضادات البيتالاكتام وليس لمضاد مفرد (Blazquez *et al*., 2000)، وبالرغم من تواجد هذه الانزيمات في الـ*E. coli*، والـ *K. pneumoniae* فقد وجدت في انواع اخرى من البكتريا السالبة لصبغة غرام وبترددات متزايدة، اذ سجلت في انواع العائلة المعوية مثل *Morganella morganii*، *PROTEUS. mirabilis*، *Enterobacter aerogenes* (Tessier *et al*., 1998; Bonnet *et al*., 1999; Perilli *et al*., 2000).

٢,١,٨,٢: انزيمات الـ SHV

يعتبر انزيم الـSHV-1 هو اول انزيم اكتشف عام ١٩٧٢ (Pitton, 1972) بينما اكتشف الـSHV-2 في بداية عام ١٩٨٠ (Kliebe *et al*., 1985) ويعتبر انزيم الـ SHV-1 هو الاكثر شيوعاً في بكتريا الـ *K. pneumoniae* وهو مسؤول عن مايزيد عن (٢٠%) من مقاومة الامبسيلين المتوسطة بالبلازميد في هذا النوع (Tzouvelekis and Bonomo, 1999) تتشابه انزيمات الـ TEM والـSHV تركيبياً اذ تشترك مع بعضها وبنسبة ٦٨% من الاحماض الامينية المكونة لها وعادة مايكون الجين المشفر لهذا الانزيم SHV-1 في العديد من سلالات هذا النوع موجوداً على الكروموسوم البكتيري (Livermore, 1995). وعلى اختلاف انزيمات الـTEM فان هناك عدداً قليلاً من مشتقات الـSHV، كما ان التغايرات التي تمت

ملاحظتها في هذا الجين لتعطي المتغايرات الانزيمية تحدث في مواقع اقل ضمن الجين التركيبي (Bradford, 2001) تمتلك غالبية هذه المتغايرات نمطاً مظهرياً من النوع واسع الطيف (ESBLs) وهي تتميز باستبدال الحامض الاميني الكلايسين بالحامض الاميني السيرين في الموقع (٢٣٨)، كما ان عدداً من المتغايرات الانزيمية المرتبطة بالانزيم SHV-5 تمتلك استبدالاً اخر في الموضع (٢٤٠) وهو استبدال الحامض الاميني الكلوتاميت بالحامض الاميني اللايسين، ومن الملفت للنظر ان كلا الاستبدالات تكون متشابهة لتلك الاستبدالات الملاحظة في انزيمات الـTEM. ان الحامض الاميني السيرين في الموضع (٢٣٨) يكون ظرورياً ليظهر الانزيم تحليلاً كفوءاً لمضاد الـCeftazidime وان الحامض الاميني اللايسين في الموضع (٢٤٠) يكون ضرورياً للتحليل الكفئ لمضاد الـCefotaxime (Huletsky *et al*., 1993) حديثاً اشار كل من Jacoby و Bush (٢٠٠٩) بوجود ١٢٠ مغاير للـ SHV عالمياً وان الـ SHV واسع الطيف هو السائد في اوربا خلال عام ١٩٩٠ وساد في الولايات المتحدة الامريكية عند بداية القرن ٢١ ومن اكثر المغايرات شيوعا هي SHV، SHV-5 ، SHV-2 (Paterson *et al*., 2003) اذ تتواجد غالبية انزيمات الـSHV الواسعة الطيف في العائلة المعوية وسجلت ايضاً في بكتريا الـ *Ps. aeruginosa* (Rasheed *et al*., 1997).

٣,١,٨,٢: انزيمات الـCTX-M

اكتشف في عام ١٩٨٨ نوع من انزيمات اليسفالوسبورين واسعة الطيف والتي لاتعود للـ TEMاو الـSHV في احدى عزلات الـ*E.coli* السريرية المقاومة للـCefotaxime (Matsumoto *et al*., 1999) وبعد مدة قليلة ففي عام ١٩٨٩ وجدت سلالات الـ *E.coli* المقاومة للـCefotaxime في كل من المانيا، فرنسا، وكذلك في الارجنتين (Bauernfeind *et al*., 1992) . اذ ان سبب مقاومة الـCefotaxime هو وجود انزيمات الـCefotaximases (CTX-M)، وعلى اية حال تظهر انزيمات الـCTX-M فعالية عالية تجاه الـCefotaxime والـCeftazidime (Humeniuk *et al*., 2002). وفي نهاية عام ١٩٩٠، وصفت سبعة جينات للـ bla_{CTX-M} ولكن سرعان ما ارتفع هذا العدد ليصل اكثر من ٨٠ مغاير انزيمي (acoby and Bush, 2009) .

صنف Olson وجماعته (٢٠٠٥) انزيمات الـCTX-M في خمس مجاميع تحت فرعية وذلك بالاعتماد على التشابه في تسلسل الاحماض الامينية وهي CTX-M-1، CTX-M-

CTX-M-1 كما تظم هذه العائلة انزيم الـ CTX-M-25 و CTX-M-9،CTX-M-8 ،2 الذي كان يطلق عليه سابقاً MEN-1 والانزيم CTX-M-2 (Poupart *et al*., 1991; Bauerfeind *et al*., 1992). وكذلك الانزيمات من CTX-M-3 لغاية CTX-M-10 والمسجلة في انواع بكتيرية كثيرة (Gazouli *et al*., ١٩٩٦)، اضافة الى انزيمي Toho-1، Toho-2 (Ishii *et al*., 1995) ومن الصفات المميزة الاخرى لهذه الانزيمات هي انها تثبط بالتازوباكتام (Tazobactam) افضل من تثبيطها بحامض الكلافيولانيت (Matagne *et al*., 1998; Bradford *et al*., 1998; Sabate *et al*.,2000) وهناك انزيمات بيتالاكتاميز اخرى يتوسطها الكروموسوم البكتيري مثل OXY/K1 والتي تنتج من معظم سلالات *K.oxytoca* وهذه الانزيمات تشترك بنسبة ٧٠-٧٥% مع انزيمات الـCTX-M (Tzouvelekis *et al*., 2000) ان انزيمات الـOXY/K1 تحلل الـPencillins، Cephalosporins، Cefotaxime والـAztreonam ولكنها تثبط بحامض الكلافيولانيت ، مشابهتاً لانزيمات الـ CTX-M والتي يتوسطها البلازميد (Bonnet *et al*., 2003).

٢,٨,٢: انزيمات الـ Carbapenemases صنف A

اكتشفت لاول مرة من قبل Yigi وجماعته (٢٠٠١) اذ ان انزيمات الصنف A لها القابلية على تحليل مدى واسع من المضادات متضمنة الـ carbapenems، cephalosporins، Penicillins، Azteronam وجميعها تثبط بواسطة الـClavulanic acid والـTazobactam. (Queenan and Bush, 2007; Woodford *et al*., 2008) اذ تستخدم هذه المجموعة ايونات الزنك كعامل مساعد، ويطلق عليها انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية (Met allo β-lactamases) (Garau *et al*., 2004) وتنتمي الى الصنف الجزيئي B حسب تصنيف Ambler (Tsakris *et al*., 2000; Lee *et al*., 2003) تثبط هذه المجموعة من الانزيمات بواسطة املاح الـEDTA التي لها القابلية على سحب ايونات الزنك اذ يتنافس هذا المركب مع انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية للارتباط بايونات الزنك (Yan *et al*., 2002) تحتاج هذه الانزيمات الى ذرة خارصين واحدة في الموقع الفعال للانزيم تسهل عملية تحلل الاصرة الاميدية لحلقة البيتالاكتام.

ان مورثات الـbla_{VIM}،و الـ bla_{IMP} مسؤولة عن انتاج انزيمات الـ(MBL) وتكون محمولة على الكروموسوم او البلازميد كما سجلت ثالث مورثة تم تسجيلها في الولايات المتحدة الامريكية يطلق عليها SPM-1 وهي مسؤولة ايضاً عن انتاج هذه الانزيمات، وان هذه المورثات لها القدرة على الانتقال عبر البلازميدات الى انواع واجناس بكتيرية اخرى. كما ان العزلات التي تمتلك مثل هذه الانزيمات قد تحمل ايضاً الجينات المشفرة لمقاومة مضادات اخرى مثل الـAinoglycosides (Riccio *et al*., 2003; Yatsuyanagi *et al*., 2004).

اكتشف في عام ١٩٨٨ نوع من انزيمات السيفالوسبورين واسعة الطيف تدعى بـ CTX-M اذ لاتوجد صلة قرابة بينها وبين الـTEM والـSHV اذ انها تظهر تشابهاً بحدود (٤٠%) فقط مع هذه الانزيمات (Matsmoto *et al*., 1999; Tzouvelekis *et al*., 2000) اذ ان هناك اعتقاد بأن اكثر الانزيمات قرباً لهذه العائلة هي انزيمات السيفالوسبورين (Cephalosporinases) من الصنف (A) والمتوسطة بالكروموسوم والمتواجدة في الانواع *K. oxytoca*، *C. diversus*، *Pr. vulgaris*، *Serratia fonticola* اذ لها نسب تشابه تتراوح بين ٧٣-٧٧%.

٣,٨,٢: انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C

هي مجموعة مهمة من الانزيمات واسعة الانتشار وهي ثاني اكبر مجموعة من بعد انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف اذ تنتمي الى الصنف الجزئي C من انزيمات البيتالاكتاميز وتحتوي على موقع السيرين الفعال (Active serine site) ولها القابلية على مقاومة مجاميع مضادات البيتالاكتام نوع Oxyimino ولا تتاثر بمثبطات البيتالاكتاميز مثل الكلافيولانيت ،السالباكتام والتازوباكتام (Jacoby and Bush, 2009) اذ لاتظهر البكتريا مقاومة لسيفالوسبورينات الجيل الثالث، مالم يكن التعبير الجيني لانزيمات الـAmpC بمستويات مرتفعه، وهذه الانزيمات تكون على نوعين، اما ذات منشأ كروموسومي وبلازميدي او محفزة (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2004). لقد وصفت انزيمات الـAmpC الكروموسومية في العديد من الانواع البكتيرية ومن ضمنها بعض افراد العائلة المعوية و *Ps. aeruginosa* (Bennett and Chopra, 1993; Phillippon *et al*., 2002) ومن الانزيمات المشفرة بلازميدياً والتي تم تسميتها بشكل غير نظامي منها الـCMY من (Cephamycinase) وبعضها اخذت رموز المضادات التي قاومتها مثل الـ Fox من

(Cefoxitin) والـMOX من (Moxalabactam) والـ LAT من (Latamoxef) كما سميت بعض هذه الانزيمات تبعاً للمجموعة مثل انزيمات الـACT من الـ(AmpC-type) والـ ACCمن (Ambler class C)، وسمي البعض الاخر تبعاً لموقع الاكتشاف مثل انزيم MIR-1،(Miriam Hospital……) والانزيم -DHA (Dhram Hospital in Saudi Arabia) واعطي احد الانزيمات الرمز BIL-1 تبعاً لاسم المريض الذي اعطى النموذج الاصلي BILAL (Gazouli *et al*., 1998a; Raskine *et al*., 2002; Philippon *et al*., 2002).

كما ان انزيمات البيتالاكتاميز التي تعود للصنف الجزيئي D تكون مقاومة لمثبطات البيتالاكتاميز مثل الكلافيولانيت (Hanson, 2003). اذ ذكر Philippon وجماعته (٢٠٠٢) ان مقاومة السيفوكستين (Acephamycins) قد تشير الى احتمالية وجود انزيمات الـAmpC، كما يقاوم الـCefepime التحلل بواسطة الـAmpC وبهذه الطريقة يمكن ان يستخدم في التحري عن هذه الانزيمات (Tzouvelekis *et al*., 1999).

٢,٨,٤: انزيمات البيتالاكتاميز صنف D

تعود انزيمات الـOXA طبقا لتصنيف Ambler الى الصنف الجزيئي D والى المجموعة الوضيفة 2d كما تختلف هذه الانزيمات عن انزيمات الـTEM (Woodford *et al*., 2000; Bush *et al*., 1995) تنتج انزيمات الـOXA وبشكل رئيسي من قبل سلالات الـ *Ps. aeruginosa*، و *Acinetobacter sp* وقد عزلت على الاكثر في فرنسا وتركيا (Hall and Stokes, 1993; Naas *et al*., 1998; Mugnier *et al*.,1998; Danel *et al*., 1999; Bou *et al*., 2000; Woodford *et al*., 2000) ومن اول انزيمات الـOXA (ART1) ذو الفعالية المضادة للـCarbapenemases اذ يهاجم الـ(Oxyimino-cephalosporins) ويمتاز بفعاليته التحليلية العالية للـOxacillin، والـCloxacillin (Livermore and Paterson, 2006) وفيما يخص مثبطات البيتالاكتاميز، فبالرغم من ان انزيمات الـOXA تميزت بفقدانها للتثبيط بحامض الكلافيولين فقد اشارت احدى الدراسات الى ان الانزيم OXA-18 يثبط بهذا المركب (Philippon *et al*., 1997).

٢,٨,٥: انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo β-lactamases

تنتمي انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية الى الصنف الجزيئي D والى المجموعة الوضيفية الثالثة، اذ تستخدم الزنك في الموقع الفعال لذلك يطلق عيها هذا الاسم اذ ان لها القابلية على تحطيم كافة مضادات البيتالاكتام ماعدا الـ Monobactams ولها فعالية تجاه الـCarbapenems. تظم هذه المجموعة انزيمات البيتالاكتاميز التي تحلل السيفالوسبورينات والبنسلينات وكذلك مضادات الكاربابينيم وكما تمتاز هذه المضادات ايضاً بكونها ضعيفة التاثر بكل مثبطات البيتالاكتام الحاوية على حلقة البيتالاكتام، في حين انها تثبط ببعض المواد مثل الـ EDTA والتي تعمل على سحب ايونات الزنك من الموقع الفعال للانزيم، وهذه تعتبر النقطة الاساسية التي تميز هذه الانزيمات عن انزيمات البيتالاكتاميز الاخرى (Bush *et al*., 1995). ان هذه الانزيمات عادةٍ ماتشفر لها جينات محمولة على الكروموسوم البكتيري وقد سجل تواجدها في اجناس متعددة موجبة وسالبة لصبغة غرام مثل *Aeromonas hydrophila* وغيرها (Hussain *et al*., 1985; Massida *et al*., 1991)، كما أن البعض الأخر يشفر له بلازميدياً إذ عزلت بعض سلالات الـ*Ps. aeruginosa*، والـ *Serratia marcescens* في اليابان كانت تحتوي على هذه الانزيمات (Minami *et al*., 1993; Osano *et al*., 1994)، تظم انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية نوعين هما الـVIM، IMP وتم اضافة نوع ثالث هو الـSDM الذي سجل لاول مرة سنة ٢٠٠٢(Toleman *et al*., 2004) .

٩،٢: انزيمات البيتالاكتاميز المقاومة للمثبط Inhibitor resistant β-lactamases

هي مجموعة اخرى من انزيمات البيتالاكتاميز والتي تدعى بالانزيمات المقاومة للمثبط (Bradford, 2001) والتي هي في حالة تزايد مستمر، اذ ان انزيمات البيتالاكتاميز المقاومة للمثبط عادةٍ ما تكون مشتقة من انزيمات الـTEM، SHV التقليدية. وقد تم اكتشاف هذا النوع من الانزيمات نهاية القرن الماضي واظهر التتابع النيوكليوتيدي ان هذه الانزيمات هي متغايرات لانزيمات الـTEM-1،TEM_2 (Nicholas-Chanoice, 1997; Bonomo and Rice, 1999).اعطيت هذهِ الانزيمات الرمز(IRT) في البداية كمختصر لمصطلح (Inhibitor resistant TEM)، ثم اعيدت تسميتها واعطيت ارقاماً تسلسلية لمجموعة الـTEM، حيث سجل مالا يقل عن (١٩) نوعاً متميزاً من هذه الانزيمات المقاومة للمثبط. وجدت هذه الانزيمات بشكل رئيسي في العزلات السريرية لبكتريا الـ*E. coli* وكذلك بعض السلالات التابعة للانواع البكتيرية

(Lemozy *et al.*, *C. freundii* ،*Pr. mirabilis* ،*K. oytoca* ،*K. pneumoniae* .1995; Bret, 1996)

3: المواد وطرائق العمل Materials and methods

1.3: المـــواد Materials

١.١.٣: الأجهــزة والأدوات المختبرية Equipment and apparatus

الشركة المصنعة (المنشـــأ)	أســــــم الجـــهاز	
Hiclave (Japan)	Autoclave	موصدة
A& D co. (Japan)	Sensitive electronic alance	ميزان الكتروني حساس
Apel (Japan)	Spectrophotometer	جهاز المطياف الضوئي
Sony (Japan)	Digital camera	كاميرا رقمية
Olympus (Japan)	Compound light microscope	مجهر ضوئي مركب
Gallen kamp (England)	Magnetic stirrer	محرك مغناطيسي
Sigma (England)	Ependorff tubes	انابيب ابندورف
Xpress (England)	Vaccum pump	جهاز التفريغ الهوائي
Gallan Kamp (England)	Hot plate	مسخن حراري
China	Calipers	فيرنيا
Certyfied (Germany)	Automatic micropipettes	ماصات دقيقة
Hettich (Germany)	Cooling centrifuge	منبذة (مبردة)
Kottermann (Germany)	Water bath	حمام مائي
GFL (Germany)	Distiller	جهاز تقطير
Hettich (Germany)	High speed centrifuge	منبذة عالية السرعة

Memmert (Germany)	Incubator	حاضنة
Biometra (Germany)	Gel documentation system	جهاز التوثيق الهلامي
Ino-lab. (Germany)	pH-meter	جهاز قياس الحموضة
GFL (Germany)	Deep freezer	جهاز التجميد العميق
Ependorff / (USA)	PCR tubes	انابيب (PCR)
Lab-line (USA)	Shaker incubator	حاضنة هزازة
Difco (USA)	Millipore filters (0.22µm)	مرشحات دقيقة
Melrosee park (USA)	Vortex mixer	مازج
Eriotti (Italy)	Electric oven	فرن كهربائي
Cruma (Spain)	Laminar flow cabient	كابينة الزرع المجهري
Concord (Lebanon)	Refrigerator	ثلاجة
Himedia (India)	Standard wire loop (1µ)	الناقل الزرعي القياسي
A & B co. (Singapore)	Thermocycler	جهاز الدورات الحرارية
MUV (Taiwan)	UV-transilluminater	مصدر الأشعة فوق البنفسجية
Lab-net (Tiwan)	Electrophoresis unit	وحدة ترحيل كهربائي

2.1.3: المـــواد الكيـمياويـة Chemical materials

الشـــركة المصنعة (المنشـــأ)	أســـــم المـــادة	
Biolife (Italy)	Agarose	أكـــاروز
Fluka (Switzerland)	L-arabinose	أرابينوز

Fluka	Barium chloride	كلوريد الباريوم
Fluka	Nigrosin	نيكروســـين
Fluka	Glycerol ($C_3H_8O_3$)	كليســيرول
Fluka	Sodium hydroxide (NaOH)	هيدروكســيد الصوديوم
Fluka	Sodium monohydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	فوســـفات الصــوديوم أحادية الهيدروجين
Fluka	Sodium dihydrogen phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	فوســـفات الصــوديوم ثنائية الهيدروجين
BDH (England)	α-naphthol ($C_{10}H_8O$)	الفانفثول
Difco (USA)	Beef extract	مستخلص اللحم
BDH	Boric acid	حامض البوريك
BDH	Bromo phenol blue	بروموفينول الأزرق
BDH	D-cellobiose	ســيلوبايوز
BDH	Chloroform	كلوروفورم
BDH	Crystal violet	البلور البنفسجي
BDH	Ethanol (96%)	كحول الايثانول
Sigma (USA)	Ethidium bromide	بروميد الاثيديوم
BDH	Ethylene-diamine- tetra acetic acid (EDTA)	اثيلين - ثنـائي الامين- رباعي حامض الخليك
BDH	Ethylen-diamine-tetra acetic acid-disodium Na_2-EDTA	اثيلـين - ثنــائي الامـين رباعي حامض الخليك - ثنائي الصوديوم
Fluka	Formaldehyde	فورمالديهايد
BB	Gelatin	جيلاتين
Difco	Glucose (C_6 H_{12} O_6)	كلـوكوز
BDH	Hydrochloric acid (HCl)	حامض الهيدروكلوريك
BDH	8-hydroxyquinoline	هيدروكسي كوينولين
BDH	Isoamyl alcohol	آيزواميل الكحول
BDH	Isopropanol	آيزوبروبانول
Mastdiagnostic	Iodine	اليود
BDH	Maltose	مالتوز
BDH	Mannitol	مانيتول
BDH (USA)	Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)	المثيل الاحمر
BDH	Monopotassium	فوسفات البوتاسيوم

	hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	احادية الهيدروجين
BDH	Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)	المثيل الاحمر
BDH	Monopotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين
Difco	Peptone	ببتون
BDH	Phenol	الفينول
BDH	Potassium hydroxide (KOH)	هيدروكسيد البوتاسيوم
BDH	Potassium iodide (KI)	يوديد البوتاسيوم
Sigma	Safranine	سفرانين
BDH	Sodium chloride (NaCl)	كلوريد الصوديوم
BDH	Sodium dihydrogen orthophosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين المائية
BDH	Sodium dodcyl sulphate (SDS)	كبريتات الصوديوم ثنائية الأسيل
Difco	Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	سكروز
BDH	Solubile starch	النشا الذائب
BDH	Sulphuric acid (H_2SO_4)	حامض الكبريتيك
BDH	Tetramethyl-*P*-phenylene diamine dihydrochloride	رباعي المثيل- ثنائي كلوريد الهيدروجين
BBL	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan (Tris-OH)	ترس - (هايدروكسي مثيل) أمينوميثان ترس- قاعدي
BBL	Tris- (hydroxymethyl) hydrochlorid (Tris-HCl)	ترس- (هايدروكسي مثيل) كلوريد الهيدروجين ترس- حامضي
Difco	Trypton	تربتون
Mastdiagnostic	Urea solution	محلول اليوريا
Difco	Yeast extract	خلاصة الخميرة
SDI (Iraq)	Hydrogen peroxide (H_2O_2) (70%)	بيروكسيد الهيدروجين

3.1.3: الأوساط الزرعية الجاهزة Ready media

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم الوسط الزرعي	
Mastdiagnostic (USA)	Brain heart infusion agar	وسط نقيع القلب-الدماغ الصلب
Mastdiagnostic	Brain heart infusion broth	وسط نقيع القلب-الدماغ السائل
Mastdiagnostic	Simmons citrate agar	وسط اغار السترات
BDH (England)	Urea agar base	وسط قاعدة اليوريا
BDH	Pepton water	وسط ماء الببتون
Oxoid	Eosin methylene blue	وسط الايوسين الازرق
Himedia (India)	Triple sugar iron agar	اغار السكريات الثلاثي
Himedia	MacConkey agar	وسط الماكونكي اغار
Himedia	Muller-Hinton agar	وسط مولر- هنتون الصلب
Himedia	Blood agar base	قاعدة اغار الدم
Himedia	Nutrient agar	الوسط المغذي الصلب
Himedia	Nutrient broth	الوسط المغذي السائل
Himedia	Moller decarboxylase broth W/Ornithine	مرق الاورنثين
Himedia	Moller decarboxylase broth W/Lycine	مرق اللايسين
Himedia	Moller decarboxylase broth W/Ariginine	مرق الارجنين
Himedia	Malonate broth	وسط المالونيت

4.1.3: الاوساط الزرعية المحظرة مختبرياً laboratory prepared media

طريقة التحظير	اسم الوسط الزرعي
حضر مختبريا	وسط الحركة Motility
حضر مختبريا	وسط تخمر السكريات Sugar fermentation medium
حضر مختبريا	وسط الجيلاتين Gelatin
حضر مختبريا	وسط مرق النترات Nitrate broth
حضر مختبريا	وسط أكار الفنيل ألنين Phenylalanine agar
حضر مختبريا	المثيل الأحمر- فوكس بروسكاور السائل MR/VP
حضر مختبريا	وسط مرق المالونيت Malonate broth

5.1.3: المضادات الحيوية Antibiotics

1.5.1.3: أقراص المضادات الحيوية (Antibiotic disks) التي جهزتها شركة (Turkey) Bioanalyse

التركيز/مايكروغرام	الرمز	اسم المضاد الحيوي	تحت الصنف للمضاد الحيوي	صنف المضاد الحيوي
١٠٠	PY	Carbenciln e كاربنسيلين	Carboxypenicil lin	Penicillins
75	TIC	Ticarcillin تيكارسيلين		
100	PRL	Piperacillin بيراسيلين	Ureidopeicillin	
20/10	AMC	Amoxicilln -clavulanic acid أموكسسيلين - حامض كلافيولانك		β-lactam/ β-lactamase inhibitor combination
30	FOX	Cefoxitin سيفوكسيتين	Cephamycin	Cephems
30	CTX	Cefotaxime سيفوتاكزايم	Cephalosporin III الجيل الثالث	
30	CRO	Ceftriaxon e سفترياكزون		
30	CAZ	Ceftazidim e سيفتازيديم		

30	FEP	Cefepeme سيفيبيم	Cephalosporin IV الجيل الرابع	
5	CFM	Cefexime سيفيكسم		
30	CL	Cephalexin سيفالكسين		
10	IMP	Imipenem اميبينيم	Carbapenem	Penems
10	MEM	Meropenem ميروبينيم		
30		Aztreonam ازتريونام		Monobactams
30		Amikacin اميكاسين		Aminoglycosides
5	CIP	Ciprofloxacin سسيبروفلوكساسين	Floroquinolones	Quinolones
30	NA	Nalidixic acid ناليديكسك اسيد	Quinolone	

6.1.3: العدد الجاهزة

1.6.1.3: المزيج الرئيس الأخضر (Green master mix 2X): المجهز من قبل شركة Promega (USA) والذي يتكون من المواد الآتية:

أسم المادة	
DNA polymerase enzyme (Taq)	إنزيم بلمرة الدنا (التـاك)
dATP	ديوكسي أدينوسين ثلاثي الفوسـفات
dGTP	ديوكسي كوانوسين ثلاثي الفوسـفات
dCTP	ديوكسي سـايتدين ثلاثي الفوسـفات
dTTP	ديوكسي ثايميدين ثلاثي الفوسـفات
$MgCl_2$	كلوريد المغنيسـيوم
PCR loading buffer	دارئ تحميل الـ (PCR)
PCR reaction buffer (pH 8.3)	دارئ تفاعل الـ (PCR)

2.6.1.3: بـادئـات الـDNA (DNA primers): التي قامت بتجهيزها شركة (Bioneer):

المصدر	حجم (bp) الناتج	العدد	تسـلسـل القواعد النتروجينية (5'-3')		اسم البادئ
Paterson *et al.*,2003 Hujer et al.,2006	**822**	١٧	5'-AAACGCTGGTGAAAGTA-3'	F	*bla*TEM
		١٤	5'-AGCGATCTGTCTAT-3'	R	
Paterson *et al.*,2003 Hujer *et al.*,2006	**753**	٢٠	5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3'	F	*bla*SHV
		٢٠	5'-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA-3'	R	
Paterson *et al.*,2003 Kaczmarek *et al.*,2006	**550**	١٤	5'-ATCAAAACTGGCAG-3'	F	*bla*AmpC
		٢٠	5'-GAGCCGGTTTATGCACCCA-3'	R	
صمم في هذه الدراسة	**٣٤٦**	٢٠	5'-TCTATTCCAACCCGAGCATC-3'	F	*bla*AmpC
		٢٠	5'-TCGCCGACCTTGTAGTAACC-3'	R	

F: Forword البادئ الامامي ، **R** : Reverse البادئ العكسي

3.6.1.3:العدة التشخيصية API 20E

المنشأ	الشركة المصنعة	العدة
France	Biomerieux	Api 20 E

7.1.3: سلالة البكتريا القياسية: (Standard bacterial strain)

المصدر **Source**	الخصائص المختبرية **Laboratory characteristics**	التعريف المختبري **Laboratory identifier**	السلالة القياسية **Standard strain**
فرع الاحياء المجهرية.كلية الطب جامعه الكوفة	سلالة حساسة للامبيسلين ومضادات السيفالوسبورين والجنتامايسين	ATCC 25955	بكتريا القولون *Escherichia coli*

٢,٣: طرائق العمل

1.2.3: طرائق التعقيم Sterilization methods

1.1.2.3: التعقيم بالحرارة

عقمت جميع الأوساط الزرعية الجاهزة، والتركيبية، وأغلب المحاليل المستخدمة التي لاتتأثر بالحرارة بجهاز الموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م° وتحت ضغط ١٥ باوند / انج^{٢} لمدة ١٥ دقيقة، أما

الزجاجيــات فقــد تــم تعقيمهــا بــالفرن الكهربــائي عنــد درجــة حــرارة ١٦٨ مْ لمــدة ســاعتين (MacFaddin, 2000; Ryan and Ray, 2004).

2.1.2.3: التعقيم بالترشيح

عقمت جميع محاليل المضادات الحيوية وبعض المحاليل التي تتأثر بالحرارة مثل السكريات واليوريا باستعمال مرشحات غشائية (Millipore filter) ذات فتحــات دقيقة بقطر(٠,٢٢) مايكرون.

3.3: تحضير الأوساط الزرعية Preparation of culture media

1.3.3: وسط اغار الماكونكي MacConkey agar medium

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 50 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر ثم ضبط الرقم الهيدروجيني الــى 7.2 ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم باستعمال المؤصدة بدرجة حرارة 121 مº لمدة 20 دقيقة، استعمل لعزل البكتريا السالبة لصبغة غرام، والتفريق بين العزلات المخمرة لسكر اللاكتوز عــن غير المخمرة له.

2.3.3: وسط مولر هنتون الصلب Muller-Hinton agar

حُضــر حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 38 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر، وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.4، ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة ١٢١ º م ولمدة 20 دقيقة استخدم لغرض اختبار حساسية العزلات لبعض المضادات الحيوية بطريقة انتشار القرص.

3.3.3: وسط الاغار المغذي Nutrient agar medium

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 28 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر وضبط الرقم الهيدروجيني الى ٧,٢ ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم باستعمال المؤصدة بدرجة حرارة 121 مº لمدة 20 دقيقة، استخدم كوسط عام للتنمية وحفظ العزلات.

4.3.3: وسط المرق المغذي Nutient broth medium

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 13 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر ضبط الرقم الهيدروجيني الـــى 7.2 ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم باستعمال المؤصدة بدرجة حرارة 121 مo لمدة 20 دقيقة. واستعمل لتنشيط وادامة العزلات.

5.3.3: وسط الدم الصلب Blood agar medium

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 40 غرام اغار اساس الدم (Blood agar base) في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر، ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.4، ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مo لمدة 20 دقيقة. واستخدم الوسط لتنمية العزلات الهوائية والاهوائية الاختيارية واختبار قابليتها على تحليل الدم (Baron *et al.*, 1994).

6.3.3: وسط ماء الببتون Peptone water

حضر الوسط من اذابة ٢٠ غرام ببتون و٥ غرام NaCl و ١٠٠٠ مليليتر ماء مقطر ذوبت المكونات بواسطة الحمام المائي ووزع في انابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة. استخدم للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج حلقة ألا ندول.

٧,٣,٣: وسط غراء سيمون ستريت Simmons citrate agar

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 24.2 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر، ضبط الرقم الهيدروجيني الى٤,٧، ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ لمدة 20 دقيقة، استخدم لاختبار قابلية البكتريا على استهلاك سترات الصوديوم كمصدر وحيد للكاربون.

8.3.3: وسط اليوريا الصلب Urea agar medium

حظر حسب تعليمات الشركة المجهزة، باذابة Urea agar base بمقدار ٢,٣ غم في ٩٥ مل من الماء المقطر المعقم، ثم عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة ١٢ مْ لمدة ١٥دقيقة بعدها اضيف (٥مل) من محلول اليوريا ٢٠% (المعقم بالترشيح) بعد تبريد الوسط في الحمام المائي لدرجة (٥٠) مْ، ووزع الوسط على انابيب وضعت بشكل مائل لتتصلب (Deep slop)، استخدم للتحري عن قابلية البكتريا على شطر اليوريا وتكوين جزيئتين من الامونيا بفعل انزيم الـUrease (MacFaddin,

.(2000

9.3.3: وسط اختبار الحركة **Motility media**

حضر هذا الوسط، باذابة 0.5gm من الببتون و0.5gm من ملح كلوريد الصوديوم (NaCl) و0.25gm أغار– أغار (Agar-Agar) في ١٠٠ مل من الماء المقطر، عدل الأس الهيدروجيني PH للوسط إلى ٧، ثم وزع الوسط في أنابيب زجاجية معقمة ثم عقم بالموصدة, وحفظ الوسط في درجة حرارة ٤ مْ لحين الاستعمال.

10.3.3: وسط غراء الايوسين المثيلن الأزرق **Eosin methylene blue**

حُضر حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة 36 غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر، وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2، ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مº لمدة 20 دقيقة. استخدم لتفريق بكتريا *E. coli* عن البكتريا المعوية الأخرى.

11.3.3: وسط المالونيت **Malonate broth**

حُضر حسب تعليمات الشركة المجهزة، استخدم هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على استهلاك المالونيت كمصدر وحيد للكار بون.

12.3.3: وسط غراء كلكلر **Kligler's iron agar**

حُضر حسب تعليمات الشركة المجهزة، استخدم هذا الوسط للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S وكذلك قابليتها على تخمير سكريات الكلوكوز واللاكتوز.

13.3.3: وسط احمر المثيل والفوكس بروسكور **M.R.V.P Medium**

حضر الوسط بإذابة ٥ غرام ببتون و٥ غرام K_2HPO_4 في ١٠٠٠ مليليتر ماء مقطر ذوبت المكونات بواسطة الحمام المائي جيداً وعدل الاس الهيدروجيني إلى ٧,٦ وعقمت بالموصدة، برد الوسط إلى ٥٠ْمْ ثم أضيف أليه ٥٠ مليليتر من محلول ١٠% كلوكوز والذي عقم بالترشيح ووزع الوسط في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة. استخدم الوسط للكشف عن التحليل الكامل أو الجزئي للسكريات وانتاج الحامض أو الاستيل مثيل كاربون (Macfaddin, 2000).

14.3.3: وسط الفنيل الانين **Phenylalanine medium**

حضر الوسط بإذابة ٣ غرام من مستخلص الخميرة و٢ غرام من الفنيل الآنين (D– phenyl alanine) و١ غرام فوسفات ثنائي الصوديوم الهيدروجينية Na_2HPO_4 و٥ غرام كلوريد الصوديوم و ١٢ غرام من الأغار في ١٠٠٠ مليليتر من الماء المقطر ثم عدل الأس الهيدروجيني إلى ٧,٤ ووزع الوسط في أنابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة وترك ليتصلب بشكل مائل، استخدم الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على إفراز إنزيم Phenyl-alanine deaminase وتكوين Phenyl pyruvic acid من Phenyl-alanine (Collee *et al.*, 1996).

15.3.3: وسط اختزال النترات Nitrate reducation medium

حضر الوسط بإذابة ٠,٠٢ غرام من نترات البوتاسيوم KNO_3 و ٥ غرام ببتون في ١٠٠٠ مليليتر من الماء المقطر ذوبت المكونات بواسطة الحمام المائي ووزعت في انابيب اختبار نظيفة وعقمت بالموصدة، استخدم الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على اختزال النترات إلى نتريت (Collee *et al.*, 1996).

16.3.3: وسط تخمر الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation medium

حضر هذا الوسط من المواد الاتية:

A - الوسط الاساس Basal medium

حضرت قاعدة الوسط بإذابة ١٠ غرام ببتون و١ غرام خلاصة اللحم و٥ غرام كلوريد الصوديوم (NaCl) و ٠,٠١٨ غرام كاشف احمر الفينول في ١٠٠٠ مليليتر من الماء المقطر ثم عدل الأس الهيدروجيني إلى ٧,٤ ووزع الوسط في أنابيب زجاجية نظيفة ومعقمة حاوية على انبوبة درهم (Durham tube) للتحري عن إنتاج الغاز. (يجب التأكد من ملئ أنبوبة درهم بالوسط الزرعي أي عدم وجود فقاعة هوائية فيه قبل الزرع)، ثم عقمت الأوساط بالموصدة.

B - المحلول السكري Sugar solution

حضرت محاليل سكريات الكلوكوز D-glucose، لاكتوز Lactose، سكروز Sucrose، فركتوز Fructosc، زايلو Xylose، انوسيتول L-Inositol، كالكتوز Galactose

مانيتول Mannitol، مالتوز Maltose.

بإذابة ١ غرام من السكر في ١٠٠ مليليتر من الماء المقطر المعقم ثم عقمت المحاليل بواسطة ورق الترشيح، ثم اضيف ٠,١ مليليتر من محلول السكر الى كل انبوبة من انابيب الفقرة A الحاوية على ٥ مليليتر من قاعدة الوسط استخدم الوسط لمعرفة قدرة البكتريا على تخمير السكريات المختلفة وانتاج الغاز (MacFaddin, 2000).

17.3.3: وسط الجيلاتين المغذي Nutrient gelatin medium

حضر الوسط بإذابة ١٢٠ غرام من الجيلاتين في ٨٠٠ مل لتر من الماء المقطر، وسخن الى درجة حرارة ٥٠ مْ، وأضيف إليه ٣ غرام من خلاصة اللحم، و ٥ غرام من الببتون، وأكمل الحجم إلى ١٠٠٠ ملي لتر من الماء المقطر، وأعيد تسخينه بالدرجة نفسها، ثم ʼعدّل الأس الهيدروجيني إلى ٧، ووزع الوسط على أنابيب اختبار، وعقم بالموصدة، وترك ليتصلب أفقياً وحفظ في درجة ٤ مْ لحين الاستعمال. استخدم للتحري عن البكتريا المنتجة لإنزيم الجيلاتينيز (MacFaddin, 2000).

18.3.3: وسط مرق نقيع القلب و الدماغ Brain-Heart infusion broth

حُضر الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة، بإذابة ٣٧غرام من الوسط في ٩٥٠ مليلتر من الماء المقطر ثم ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.3 ثم أكمل الحجم الى ١٠٠٠ مليلتر وعقم باستعمال المؤصدة بدرجة حرارة 121م ° لمدة 20 دقيقة، استعمل لتنشيط العزلات (MacFaddin, 2000).

19.3.3: وسط مقاومة البيتالاكتام β-lactam resistant media

حضر وسط مولر هنتون اغار وحسب تعليمات الشركة المجهزة، عقم بالموصدة وترك ليبرد في درجة حرارة ٥٠ مْ، ثم اضيف اليه Amoxicillin و Ampicillin وبصورة منفردة من محاليلها

الخزينة بتراكيز (50 µg/ml و 100 µg/ml) على التوالي, صب الوسط في اطباق بتري بلاستيكية معقمة ونظيفة، وحفظ بدرجة حرارة ٤ مْ، استخدم الوسط في التحري الاولي عن البكتريا المقاومة لمضادات البيتا لاكتام (NCCLS, 2003b).

4.3: محاليل الصبغات والكواشف Stains and reagents solutions

1.4.3: محاليل صبغة كرام Gram stain solutions

تم الحصول على محاليل الصبغة جاهزة واستعملت هذه المحاليل لدراسة الخصائص المظهرية لخلايا البكتريا المعزولة تحت المجهر.

2.4.3: المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline solution

حضر المحلول بإذابة ٠,٨٥ غرام من Nacl في ٩٠ ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر، وعقم بالموصدة. استعمل هذا المحلول في أعداد اللقاح البكتيري المباشر (MacFaddin, 2000).

3.4.3: المحلول الدارئ الفوسفاتي الملحي Phosphate buffer saline (PBS)

حضر بإذابة ٨ غم من (NaCl), ٠,٢ غم من كلوريد البوتاسيوم (KCl), ٠,٢ غم من فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية (KH_2PO_4) و ١,١٥ غم من فوسفات الصوديوم الهيدروجينية (Na_2HPO_4) في ١ لتر من الماء المقطر وعقمت بالمؤصدة (Gruikshank *eta., l*1975.)
.

4.4.3: أنبوبة ماكفرلاند القياسية McFarland tube No. (0.5) standard

حضرت من المحاليل الآتية:

A- محلول كلوريد الباريوم $BaCl_2 . 2H_2O$

حضر المحلول بإذابة ١,١٧٥ غرام في ٥٠ ملي لتر من الماء المقطر المعقم، وأكمل الحجم إلى

١٠٠ ملي لتر للحصول على تركيز ٠,٠٤٨ مول/لتر من $BaCl_2$.

B- محلول حامض الكبريتيك H_2SO_4

حضر المحلول بإضافة ١٨ ملي لتر من حامض الكبريتيك المركز ببطء إلى ٥٠ ملي لتر من الماء المقطر المعقم، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر للحصول على تركيز ٠,١٨ مول/لتر من H_2SO_4.

أضيف ٠,٥ ملي لتر من محلول (**A**) إلى ٩٩,٥ ملي لتر من محلول (**B**) وعدلت قراءة العكورة القياسية إلى (٠,٠٨-٠,١٠) عند طول موجي ٦٢٥ نانومتر وهذه القراءة تمثل ما يقارب عكورة ($1-2 \times 10^8$ Colony forming unit) وحدة تكوين المستعمرة في ملي لتر واحد من البكتريا النامية، ووزع المحلول على أنابيب اختبار معقمة ذات سدادات محكمة بحجم ٤ ملي لتر لكل أنبوبة وحفظ في أماكن معتمة في درجة حرارة الغرفة، استعملت الأنبوبة لغرض مقارنة كثافة النمو البكتيري في اللقاح المستعمل مع كثافة المحلول في الأنبوبة (NCCLS, 2003a).

5.4.3: كاشف الكتاليز Catalase reagent

حضر الكاشف آنياً بإضافة ٢١ ملي لتر من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بتركيز (٧٠%) إلى ٥٠ ملي لتر من الماء المقطر المعقم، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر للحصول على تركيز نهائي (٣٠%)، وحفظ في قنينة معقمة. استعمل هذا الكاشف للاستدلال على البكتريا المنتجة لإنزيم الكتاليز (MacFaddin, 2000).

6.4.3: كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent

حضر الكاشف آنياً بإذابة ٠,١ غرام من رباعي المثيل- بارافنيلين ثنائي أمين ثنائي كلوريد الهيدروجين في ١٠ ملي لتر من الماء المقطر المعقم، وحفظ في قنينة معتمة. استعمل هذا الكاشف في اختبار الأوكسيديز للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الأوكسيديز (MacFaddin, 2000).

7.4.3: كاشف فوكس بروسكاور Voges proskauer reagent

حضر من المحاليل الاتية:

محلول (A) الفانفثول (٥%):

حضر بإذابة ٥ غرام من الفانفثول في ١٠٠ ملي لتر من الكحول الأثيلي بتركيز (٩٦%).

محلول (B) هيدروكسيد البوتاسيوم (٤٠%):

حضر بإذابة ٤٠ غرام من هيدروكسيد البوتاسيوم في حجم من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر. استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز وانتاج الاستيل مثيل كاربينول في اختبار الفوكس- بروسكاور (MacFaddin, 2000).

8.4.3: كاشف احمر المثيل Methyl red reagent

حضر الكاشف بإذابة ٠,١ غرام من صبغة احمر المثيل في ٣٠٠ مليليتر من ٩٥% كحول اثيلي واكمل الحجم الى٥٠٠ مليليتر باستخدام الماء المقطر استخدم للكشف عن التحلل الكامل للسكريات(MacFaddin, 2000).

9.4.3: كاشف اختزال النترات Nitrate reduction reagent

يتكون هذا الكاشف من محلولين:

A- محلول السلفانلك

حضر هذا المحلول بإذابة ٨ غرام من حامض السلفولنك في ١٠٠٠ مليليتر من محلول ٥ عياري حامض الخليك.

B – محلول الفانفثال أمين

حضر هذا المحلول بإذابة ٥ غرام من ألفا – نفثال امين في ١٠٠٠مليليتر من محلول ٥ عياري حامض الخليك، مزج قبل الاستعمال حجمان متساويان من كلا المحلولين لتكوين الكاشف (Collee *et al.*, 1996).

10.4.3: كاشف فرازير Frazier's reagent

حضر الكاشف بإذابة ١٥ غرام من كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ في ٢٠ مليليتر من حامض الهيدروكلوريك المركز HCl ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مليليتر من الماء المقطر، استخدم للكشف عن تحلل الجيلاتين (Collee *et al.*, 1996).

11.4.3: كاشف كلوريد الحديديك $FeCl_3$

حضر الكاشف بإذابة ١٠غرام من كلوريد الحديديك $FeCl_3$ في ١٠٠ مليليتر من الماء المقطر، استخدم للكشف عن أنزيم Phenyl alanine deaminase (Collee *et al.*, 1996).

12.4.3: كاشف كوفاكس Kovac's reagent:

حضر بإذابة ٥ غم من Paradimethyl aminobenzaldehyde في ٧٥ ملليتر من كحول اميلي ثم أضيف له ٢٥ ملليتر من حامض الهيدروكلوريك المركز (Benson, 2002).

5.3: تشخيص البكتريا المعزولة

1.5.3: خصائص الصفات المظهرية والزرعية Morphological and cultural characteristics

تم دراسة الخصائص المظهرية للبكتريا المعزولة من خلال عمل مسحات مباشرة من الأوساط الزرعية والتي صبغت بواسطة صبغة غرام لدراسة الخصائص المظهرية للأنواع البكتيرية المعزولة. كذلك درست الصفات المظهرية لكل من المستعمرات والخلايا البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية المختلفة، شملت دراسة المستعمرات البكتيرية من حيث اللون والشكل و القوام والحواف والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفريقية (Differential media) والانتقائية (Selective media)، أما الصفات المظهرية للخلايا فقد شملت شكل الخلية البكتيرية، انتظام الخلايا البكتيرية مع بعضها وطبيعة تفاعلها مع صبغة غرام.

2.5.3: التشخيص باستخدام نظام العدة التشخيصية API 20E

استخدمت العدة التشخيصية (API 20E) المجهزة من قبل الشركة المصنعة لتشخيص الأجناس: البكتيرية التابعة للعائلة المعوية (*Enterobactericeae*), اذ تم تشخيص البكتريا المعزولة باستخدام طريقة التشخيص المسماة بـ Analytic profile index (API 20E) والمنتجة من قبل الشركة الفرنسية BioMerieux استعملت لغرض التشخيص التاكيدي لبكتريا *E. coli* و *K. pneumoniae* المعزولة وهي عبارة عن شريط مكون من

٢٠ انبوبا دقيقا (Microtube) تحوي مادة اساس مجففة (Dehydrated substance) تم حقن المعلق البكتيري للعزلات في هذه الحفر ولوحظ ظهور النتيجة بتغير الالوان وذلك بسبب انتاج مواد الايض الغذائي الذي يكشف عنها اما باضافة كواشف معينة او التغير التلقائي، تقرأ النتائج بعد حضانة بدرجة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة وبعد اضافة الكواشف ومن خلال شفرة رقمية تقارن مع الملحق Index الذي يحوي ارقاما معينة اذ تعطي من خلال هذه التقنية النسبة المئوية لصحة الفحص البكتيري (Atlas, 1995).

3.5.3: الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

لغرض إجراء هذه الفحوصات تم استخدام المزروع البكتيري النامي على الوسط المغذي الصلب بعمر ٢٤ ساعة وهذه الفحوصات تشمل:-

1.3.5.3: الكشف عن إنزيم الكاتيليز Catalase test

تم إجراء الفحص بنقل كمية قليلة من النمو البكتيري النامي على الوسط الزرعي بعمر ٢٤ ساعة بواسطة العيدان الخشبية المعقمة إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ثم أضيف لها قطرة من ٣% بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) المحضر في الفقرة،إن ظهور الفقاعات الغازية يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al.*, 1996).

2.3.5.3: الكشف عن انزيم الاوكسيدز Oxidase test

تم إجراء الفحص بنقل كمية من النمو البكتيري بواسطة العيدان الخشبية المعقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف المحضر آنياً، تلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجي يدل على النتيجة الموجبة للكشف (Collee *et al.*, 1996).

3.3.5.3: الكشف عن انتاج الهيمولايسين Haemolysin production

تم تنمية المزروع البكتيري على وسط الدم الصلب وحضن بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة، ظهور مناطق التحلل حول المستعمرات النامية يشير إلى قابلية البكتريا على انتاج سموم الهيمولايسين (Deboy *et al.*, 1980).

4.3.5.3: الكشف عن انتاج كبريتيد الهيدروجين Production of hydrogen sulfite

اجري الفحص بتلقيح وسط كلكلر بالمزروع البكتيري المراد فحصه وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ ساعة، أن ظهور الراسب الاسود في الانبوبة يدل على النتيجة الموجبة (MacFaddin, 1979).

5.3.5.3: فحص اختزال النترات Nitrate reduction test

اجري الفحص بتلقيح وسط اختزال النترات بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٩٦ ساعة وبعد انتهاء فترة الحضانة اضيف ١مليليتر من الكاشف المحضر في الفقرة. ظهور اللون الاحمر خلال ٣٠ ثانية يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al.*, 1996).

6.3.5.3: اختبار استهلاك السترات Citrate utllization test

اجري الفحص بتلقيح وسط السترات المائل بالمزروع البكتيري المراد فحصه وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة. ان تحول لون الوسط الاخضر الى الازرق وظهور النمو على خطوط الزرع يدل على النتيجة الموجبة (MacFaddin, 2000).

7.3.5.3: اختبار قابلية الحركة Motility test

اجري الفحص بتلقيح الانابيب الحاوية على الوسط بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة، انتشار النمو خارج حدود الطعنة يدل على النتيجة الموجبة (Finegold and Martin, 1982).

8.3.5.3: فحص تخمير الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط تخمر الكربوهيدرات بالمزروع البكتيري ثم حضنت بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢ - ٥ يوم تحول لون الوسط من الاحمر الى الاصفر وظهور الفقاعات الغازية في انبوبة درهم يدل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 2000).

9.3.5.3: الكشف عن انتاج ألا ندول Indol test

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي بالمزروع البكتيري حضنت بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة، عندها أضيفت بضع قطرات من كاشف كوفاكس إلى

كل أنبوبة مع الرج الجيد، ظهور حلقة حمراء في أعلى الوسط يدل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 1979).

10.3.5.3: اختبار احمر المثيل Methyl red test

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي M.R.V.P Medium بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة عندها تم اضافة ٥ قطرات من كاشف احمر المثيل مع رج الانبوبة ان ظهور اللون الاحمر في الأنبوبة يدل على التحلل الكامل للسكريات وانتاج الحامض (Collee *et al.*, 1996).

11.3.5.3: اختبار الفوكس بروسكور Voges pros-kauer test

اجري الفحص بتلقيح الوسط الزرعي MR-VP Medium بالمزروع البكتيري، وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة بعد ذلك تم إضافة ١ مليليتر من الكاشف إلى كل أنبوبة مع الرج، ان ظهور اللون الوردي خلال ٢ –٥ دقيقة والذي يصبح كرزي غامق خلال ٣٠ دقيقة مع الرج المتواصل يعبر عن النتيجة الموجبة (Collee *et al.*, 1996).

12.3.5.3: الكشف عن انزيم اليوريز Urease test

تم الكشف عن هذا الانزيم بتلقيح وسط اغار اليوريا بالمزروع البكتيري ثم حضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة تتراوح من ٢٤ ساعة ولغاية سبعة ايام، ظهور اللون الوردي يدل على النتيجة الموجبة.

13.3.5.3: استهلاك المالونيت Malonate utilization test

اجري الفحص بتلقيح الوسط الزرعي بالمزروع البكتيري، ثم حضنت بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢-٥ يوم، تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق يدل على النتيجة الموجبة.

14.3.5.3: الكشف عن انزيم Phenyl alanine deaminase

تم الكشف عن هذا الانزيم بتلقيح الانابيب الحاوية على وسط الفنيل الأنين بالمزروع البكتيري، ثم حضنت عند درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢-٥ أيام عندها تم إضافة بعض قطرات من كاشف كلوريد الحديديك المحضر في الفقرة، ظهور اللون الأخضر على طول السطح المائل يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al.*, 1996).

15.3.5.3: اختبار تحلل الجيلاتين Gelatin hydrolysis test

اجري الفحص بتخطيط وسط غراء الجيلاتين بالمزروع البكتيري، ثم حضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٣ – ٧ يوم بعدها غمر الطبق بكاشف فرا زير، اذ ان ظهور المناطق الشفافة حول المستعمرات النامية يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al.*,1996).

16.3.5.3: التحري عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز بطريقة قرص النايتروسيفين Detection of β-lactamases with Nitrocefin

تم وضع اقراص النايتروسفين باستخدام ملقط معقم على سلايد زجاجي.

١. باستخدام ماصة باستور معقمة، رطب كل قرص بقطرة من ماء معقم.

٢. باستخدام الحامل الحلقي (Loop)، وضعت عدة مستعمرات متشابهة من وسط مولر هنتون اغار على سطح القرص.

٣. لوحظ التغير في لون القرص، بعد مرور خمسة دقائق، ان ظهور اللون الوردي المحمر يعد نتيجة موجبة، اما في حالة بقاء لون القرص كما هو اصفر اللون تعد نتيجة سلبية (Murray *et al.*, 1999).

6.3: جمع العينات Samples collection

تم في الدراسة الحالية جمع ٥١٦ عينة سريرية من مستشفى الولادة والاطفال التعليمي، ومستشفى الديوانية التعليمي خلال المدة من تشرين الاول ٢٠١٠- الى اذار ٢٠١١. وذالك باخذ مسحات (Swabs) من حالات التهابات الجروح (٣١٥ عينة) والحروق (٦١ عينة) وعينات من بؤر التهابية اخرى مثل الادرار(١٤٠ عينة) وبعدها نقلت مباشرة الى مختبر كلية العلوم لغرض تنميتها وتشخيصها اذ زرعت على اطباق بتري حاوية على وسط اغار الماكونكي ثم زرعت بطريقة التخطيط (Streaking method) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ١٨-٢٤ ساعة (MacFaddin, 2000).

1.6.3: حفظ وإدامة العزلات البكتيرية Preservation and maintenance of bacterial isolates

1.1.6.3: الحفظ قصير الأمد

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتريا المراد حفظها وحضنت في درجة حرارة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة، ثم حفظت في درجة ٤ م°، وكررت عملية الحفظ لتجديد حيوية العزلات كل شهر، (Collee *et al.*, 1996).

2.1.6.3: وسط الحفظ طويل الأمد **Maintenance medium**

حضر الوسط بإضافة ١٥% من الكليسيرول إلى الوسط نقيع القلب والدماغ السائل المحضر بإذابة ٤ غرام من الوسط في ٥٠ ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى ١٠٠ ملي لتر، وعقم بالموصدة، وترك ليبرد في درجة حرارة ٥٦ مْ باستعمال الحمام المائي، ووزع على أنابيب اختبار معقمة وذات سدادات محكمة وحفظ في ٤ مْ لحين الاستعمال. استعمل هذا الوسط لحفظ البكتريا المعزولة والمشخصة لعدة أشهر في درجة حرارة - ٢٠ مْ (MacFaddin, 2000).

2.6.3: التحري عن مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية (طريقة الانتشار بالقرص)

اجري اختبار الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بالاعتماد على طريقة (Bauer *et al.*, 1966;CLSI, 2010) وذلك بأخذ ٤ -٥ مستعمرات نقية باستعمال عروة الناقل الحلقي إلى أنابيب اختبار حاوية على ٥ مليليتر من الوسط المغذي السائل، وحضنت الانابيب بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢-٨ ساعة او لحين ظهور العكورة عندها تم مقارنة الأنابيب مع أنبوبة ماكفرلاند القياسية (٠,٥) باستخدام المحلول الملحي الفسيولوجي المعقم حيث تم تعديل كثافة الانابيب حتى تساوى كثافة أنبوبة ماكفرلاند و باستعمال مسحة قطنية معقمة نشرت البكتريا بطريقة التخطيط لاكثر من مرتين وباتجاهات مختلفة لغرض التاكد من نشر البكتريا المراد اختبار حساسيتها على وسط غراء مولر هنتون بالتساوي و تركت الاطباق لمدة ١٥ دقيقة في درجة حرارة الغرفة لضمان امتصاص الرطوبة عندها وزعت أقراص المضادات الحيوية بواقع

٧ أقراص للطبق الواحد و بواسطة ملقط معقم وضعت الاقراص على وسط غراء مولر هنتون وحضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة. ثم قرأت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط باستخدام الفيرنيا (Caliper) و مقارنتها بالجداول القياسية المحددة من قبل CLSI (2010) لتحديد البكتريا المقاومة او الحساسة اذ استخدمت سلالة الـ *Escherichia coli* (ATCC 25955) القياسية كدليل سيطرة.

3.6.3: اختبار التحري عن مقاومة مضادات البيتا لاكتام Screening test for β-lactam resistance

لقح وسط مولر هنتون الصلب الحاوي على الامبسلين (100 µg/ml)، وكذالك مولر هنتون الصلب الحاوي على الاموكسلين (50 µg/ml)، وحضن بدرجة حرارة ٣٧ مٍ ولمدة ١٨ ساعه، انتقيت العزلات المقاومة لكلا المضادين او احداهما لاجراء الاختبارات الاحقة (NCCLS, 2003b).

4.6.3: التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

Detection of extended-spectrum β-lactamases

1.4.6.3: اختبارالتحري الاولي عن البيتالاكتاميز Initial screening test

تم التحري عن الانزيمات واسعة الطيف بين العزلات المقاومة لمضادات البيتالاكتام باستخدام طريقة الانتشار من القرص باستخدام مضادات Cefotaxime، Ceftazidime، Ceftriaxone، Aztreonam بتركيز (30 µg) لكل منها اذ وضعت على اطباق وسط مولر هنتون الصلب المزروعة وحسب توصيات الـ(CLSI, 2010) و حضنت بدرجة حرارة

٣٧ م ولمدة ١٨ ساعة، قيست اقطار مناطق التثبيط حول الاقراص باستخدام الفيرنيا (caliper). العزلات التي اضهرت مناطق تثبيط ≤ ٢٧ ملم للسيفوتاكزيم, ≤ ٢٢ ملم للسيفتازيديم, ≤٢٥ ملم للسيفترياكزون, و≤٢٧ ملم للازتريونام يعتقد بانها منتجة لانزيمات الطيف الواسع.

2.4.6.3: فحص التاكيد المضهري (طريقة القرص التأزري المزدوجة) Phenotypic confirmatory test (Double disc synergy method)

تعتمد هذه الطريقة على تأثير حامض الكلافيولين التثبيطي على انزبمات الـESBLs، اذ لقح وسط أغار مولر-هنتون بالمعلقات البكتيرية الفتية، حيث وضع قرص مضاد Amoxicillin-clavulinic acid في وسط الطبق ووضعت اقراص المضادات الحيوية Cefotaxime, Aztreonam، Ceftriaxone، Ceftazidime على بعد (15) ملم من مركز القرص الوسطي. حضنت الأطباق بدرجة حرارة (35)م° لمدة (16-18) ساعة، لوحظ بعدها توسع منطقة التثبيط باتجاه قرص Amoxicillin-clavulinic acid الذي يعد دليلاً على وجود أنزيمات الـESBLs (Sanders *et al.*, 1996; Samaha-Kfoury and Araj, 2003).

6.6.3: التحري عن أنزيمات الـAmpC Detection of AmpC enzymes

1.6.6.3: اختبار التحري الأولي عن أنزيمات الـAmpC
Initial screening test for AmpC enzymes

يعتمد هذا الاختبار على مقاومة البكتريا لمضاد الـCefoxitin بتركيز (30 مايكروغرام/قرص). أجريّ الاختبار بتلقيح وسط مولر-هنتون الصلب بمعلق بكتيري فتي مكافئ في عكارته للأنبوب رقم (0.5) من أنابيب ماكفرلاند القياسية. وضع قرص مضاد

الـCefoxitin في مركز الطبق وحضنت الأطباق لمدة (16-18) ساعة بدرجة حرارة (35) مْ. تم قياس قطر مناطق التثبيط حول القرص ومقارنتها مع قياسات الـ(NCCLS سابقا) CLSI الخاصة بهذا الاختبار, حيث اعتبرت العزلات التي أعطت منطقة تثبيط بقطر (14) ملم أو أقل مقاومة للمضاد وبالتالي موجبة لاختبار التحري الأولي عن أنزيمات الـ AmpC (Coudron *et al.*, 2000; NCCLSa, 2003; 2004;CLSI, 2010).

7.3: تصميم بادئ جديد ومتخصص لمورث الـ$\boldsymbol{bla_{AmpC}}$

ارتأت الدراسة الحالية تصميم بادئ جديد ومتخصص لمورث الـAmpC للتحري عن هذا المورث في عزلات *Ps.aeruginosa* ومقارنته مع بادئ جاهز عالمي، صمم البادئ عن طريق الحصول على التسلسل الجيني من بنك الجينات Gene Bank ثم ادخل هذا التسلسل الجيني في برنامج الـ Primer.3 والذي يوجد على الموقع الالكتروني WWW.Primer3.Com اذ ضبطت الاعدادات الملائمة للبادئ المصمم مثل درجة حرارة الارتباط ونسبة G+C وغيرها من الاعدادات وحسب الحاجة واخيرا اختير البادئ الذي يعتقد بانه هو المناسب.

8.3: طريقة جزيئية بإتباع تقنية سلسلة التفاعل الجزيئي المتبلمر (PCR)

1.8.3: المحاليل المستعملة في استخلاص الدنا الكلي وتنقيته بطريقة التمليح Salting out method

1.1.8.3: محلول كلوريد الصوديوم (5 مولار)

حُضّر المحلول بإذابة 29.21 غرام من NaCl في 50 ملي لتر من الماء المقطر، وأُكمل الحجم إلى 100 ملي لتر، وعقم بالموصدة (Pospiech and Neuman, 1995).

2.1.8.3: محلول SDS (25%)

تم إذابة 25 غرام من SDS في 50 ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر بالماء المقطر، وحُفظ في درجة 4 مْ (Pospiech and Neuman, 1995).

3.1.8.3: محلول الفينول Phenol solution

أذيبت بلورات الفينول من خلال وضعها في حمام مائي بدرجة حرارة 68 مْ، وتم نقل 100 ملي لتر من الفينول الذائب إلى قنينة معقمة، وأضيف إليه (0.1%) من المادة المضادة للأكسدة (8-hydroxiquinilone)، وأضيف إليه حجم مساو من 0.5 مولار Tris-HCl (pH 8) في درجة حرارة الغرفة، ومُزج جيداً بجهاز المازج، ثم ترك من دون تحريك ليستقر وينفصل إلى طبقتين. رُفعت الطبقة المائية بواسطة ماصة باستور، وتم إهمالها وأضيف إليه حجم مساو من 0.1 مولار Tris-HCl (pH8) وكررت العملية لحين وصول الأس الهيدروجيني إلى 8، وحفظ في قنينة معتمة في درجة حرارة 4 مْ (Sambrook *et al.*, 1989).

4.1.8.3: مزيج الكلوروفورم: آيزوأميل الكحول

حضر المحلول بمزج 240 ملي لتر من الكلوروفورم مع 10 ملي لتر من الكحول الآيزوأميلي وبنسبة (24: 1) وتم حفظه في قنينة معتمة في درجة حرارة 4 مْ (Sambrook *et al.*, 1989).

5.1.8.3: مزيج الفينول: كلوروفورم: آيزوأميل الكحول:

تم تحضيره بمزج 250 ملي لتر من محلول الفينول مع 250 ملي لتر من محلول مزيج الكلوروفورم آيزوأميل الكحول وبنسبة (25: 24: 1)، وحفظ تحت طبقة من Tris-HCl بتركيز 0.1 مولار في عبوة زجاجية معتمة بدرجة حرارة 4 مْ (Sambrook *et al.*, 1989).

6.1.8.3: دارئ Tris - EDTA Buffer (TE)

حضر المحلول بمزج 10 ملي مولار من Tris-HCl و 1 ملي مولار من EDTA في 800 ملي لتر من الماء المقطر، وأُكمل إلى 1000 ملي لتر، كما عُدّل الأس الهيدروجيني إلى 8 وعقم بالموصدة، وحفظ في درجة حرارة 4 مْ (Sambrook *et al.*, 1989).

7.1.8.3: دارئ Saline - Tris –EDTA (STE)

حضر الدارئ بمزج 10 ملي مولار من Tris-HCl و100 ملي مولار من NaCl و1 ملي مولار من EDTA في 800 ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل إلى 1000 ملي لتر وعدل الأس الهيدروجيني إلى 8، وعقم بالموصدة، وحفظ بدرجة حرارة 4°م (Sambrook *et al.*, 1989).

9.3: المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي

1.9.3: محلول صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide solution

حُضّر بإذابة 0.05 غرام من صبغة بروميد الاثيديوم في 10 ملي لتر من الماء المقطر المعقم للحصول على تركيز نهائي 5 ملغم/مل، وحُفظ في قنينة معتمة (Pospiech and Neuman, 1995).

2.9.3: محلول Tris-Borate EDTA (TBE)

يتكون المحلول من 0.089 مولار من Tris-OH، و0.089 مولار من حامض البوريك و0.002 مولار من Na_2-EDTA في 800 ملي لتر من الماء المقطر، وعدل الأس الهيدروجيني إلى 8، وأكمل الحجم إلى 1000 ملي لتر، وعقم بالموصدة، وحفظ بدرجة 4 مْ لحين الاستعمال(Sambrook *et al.*, 1989).

3.9.3: محلول التحميل Loading buffer

حُضّر المحلول بإذابة 0.25 غرام من صبغة البروموفينول الأزرق و4 غرام من السكروز في 10ملي لتر من الماء المقطر المعقم، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر، وحفظ بدرجة 4مْ (Sambrook *et al.*, 1989).

4.9.3: إستخلاص DNA الكلي DNA Extraction

إستُخلص DNA الكلي للعزلات قيد الدراسة باستعمال طريقة التمليح على وفق ما ذكره Pospiech وNeuman (1995).

لُقّحت أنابيب الاختبار الحاوية على 30 ملي لتر من وسط مزيج القلب والدماغ السائل بواسطة أخذ مليء ناقل من المزروع البكتيري بعمر 24 ساعة، وحضنت الأنابيب بدرجة 37مْ في حاضنة هزازة مدة 24 ساعة، ونُقل المزروع البكتيري إلى أنابيب بولي أثيلين معقمة، رسبت الخلايا عن طريق نبذ المزروع البكتيري بسرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق وعلق راسب الخلايا البكتيرية بإضافة 5 ملي لتر من دارئ TE، ثم نبذ العالق بسرعة 6000 دورة/دقيقة، وكررت عملية الغسل ثلاث مرات.

عُلّق الراسب المغسول بإضافة 5 ملي لتر من دارئ STE وأضيف 600 مايكروليتر من محلول SDS (25%) المسخن لدرجة حرارة 55 مْ، تم تقليب المزيج بعناية، وترك في الحمام المائي في درجة 55مْ مدة 2 ساعة، تم إضافة 2 ملي لتر من محلول NaCl (5) مولار، وقُلّب المزيج بعناية ثم ترك ليبرد بدرجة حرارة الغرفة، أضيف 5 ملي لتر من مزيج (فينول- كلوروفورم- آيزواميل الكحول)، ومزج بالتقليب لمدة 30 دقيقة، تم نبذ المزيج بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، ثم نُقلت الطبقة المائية الحاوية على DNA إلى أنابيب بولي أثيلين جديدة ومعقمة.

أضيف كحول الآيزوبروبانول المبرد إلى - 20مْ بحجم 0.6 من حجم الرائق، وتم تقليب المزيج بعناية لمدة 3 دقائق. التقط الـDNA ولف بواسطة ماصة باستور زجاجية معقمة، وغسل DNAالـ الملتقط بغمره في الأيثانول (70%) تم نبذ المزيج بسرعة 10000 دورة/دقيقة مدة 10 دقائق وأُزيل الكحول الزائد، ثم ذُوّب DNA في 1مل من دارئ TE، وحفظ بدرجة حرارة – 20مْ لحين الاستعمال.

5.9.3: تحضير مزيج انزيم سلسلة التفاعل الجزيئي المتبلمر (PCR)

تم استخدام جهاز الدورات الحرارية (Polymerase Chaine Reactions) لتضخيم التسلسلات الوراثية المدخلة لبادئات DNA المستخدمة في هذه الدراسة، وحُضّر مزيج PCR حسب ما جاء في تعليمات الشركة المصنعة Promega وكما مبيّن في الجدول (٣-٢):

ذُوّب المزيج الرئيس الأخضر في درجة حرارة الغرفة، ووُضع في المنبذة لكي تتجمع المكونات في قعر الأنبوب وأُعد مزيج التفاعل بالحجم المطلوب، إذ تم أخذ حجم 12.5 مايكروليتر من محلول المزيج الأخضر الرئيس بتركيز نهائي يساوي (1x) و5 مايكروليتر من مستخلص DNA، إذ استُخدم كقالب (Templet)، ولغرض الحصول على تركيز نهائي يساوي ٥٠ بيكامول/ مايكروليتر، لكل باديء أضيف2.5 مايكروليتر للباديء الأمامي (بتركيز يساوي 16 بيكامول/ مايكروليتر) و2.5مايكروليتر (من 16بيكامول / مايكرو ليتر) للباديء العكسي للبادئات الاربعه المذكورة في الفقرة ٢,٦,١,٣ وأكمل الحجم إلى 50 بالماء الخالي من الإنزيم المحلل للDNA Free nuclease water ، وقد تم نبذ مكونات المزيج في المنبذة مدة قدرها ٥ ثواني وكما موضح في الجدول(٣-٣).

جدول (2-1) مزيج سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة حجم 25 مايكروليتر

المكونات		الحجم بالمايكروليتر	التركيز
محلول المزيج الرئيس الأخضر	Green master mix	12.5	1×
محلول البادئ الأمامي	Upstream primer	2.5	1 مايكروليتر
محلول البادئ العكسي	Downstream primer	2.5	1 مايكروليتر
مستخلص الدنا المستعمل كقالب	DNA template	5	أقل من 250 نانوغرام
الماء الخالي من الإنزيم المحلل للدنا	Nuclease free water	2.5	-
الحجم		25	

6.9.3: ضبط ظروف سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة (PCR)

PCR Programs applied in this study:

ضبط جهاز الدورات الحرارية (PCR) وفق نموذج Perkin Elmer model (Rychlik, 1990). وتم تحوير النموذج ليتلائم مع مزيج مكونات الـ Promega، والبادئات المستعملة وكما موضح في الجدول (2-3). إلى درجة 94 م° بعد ضبط حجم التفاعل ٢٥ مايكروليتر قبل عملية البدء لضمان مسخ DNA بشكل تام، ومن ثم وضع مزيج سلسلة تفاعلات إنزيم البلمرة في الجهاز بعد ضبط درجات الحرارة وعدد الدورات.

جدول: (2-2) الظروف المستخدمة في جهاز الدورات الحرارية PCR

المورثات	**الظروف المستخدمة في جهاز الدورات الحرارية**				
	المسخ الأولي (دورة واحدة)	**(35) دورة**			**الاستطالة النهائية (دورة واحدة)**
		المسخ	**التثبيت**	**الاستطالة**	
***bla*TEM**	**94مْ / ٣٠ ثانية**	**94مْ /30ثانية**	**57مْ /30ثانية**	**72مْ /1دقيقة**	**72مْ/ 7دقائق**
***bla*AmpC* *bla*SHV *bla*AmpC**	**94مْ/٣٠ ثانية**	**94مْ/1دقيقة**	**٦٠مْ/ 1دقيقة**	**72مْ / 2دقيقة**	**72مْ/7دقائق**

٣,٩,٧: الترحيل الكهربائي بالهلام Agarose gel electrophoresis

أُجريت عملية الترحيل الكهربائي للعزلات قيد الدراسة، لفصل مستخلص DNA الكلي وفحصه على سطح هلام الأكاروز بالاعتماد على الطريقة التي ذكرت من قبل Maniatis وجماعته (1982) وهي كما يأتي:

حُضّر محلول (TBE 1X) بتخفيف محلول TBE بنسبة 1: 10 بأخذ 10 ملي لتر من محلول TBE 10X، وأُكمل الحجم إلى 100 ملي لتر باستعمال الماء المقطر المعقم، وحُضّر هلام الأكاروز بإذابة 1 غرام من مسحوق الأكاروز في 100 ملي لتر من محلول TBE 1X، تم غليه وترك ليبرد لدرجة حرارة 50مْ، ثم أضيف إليه 5 مايكروليتر من محلول صبغة بروميد الأثيديوم, وحُضّر قالب صب الهلام (Tray) بإحاطة حافتيه المفتوحتين بشريط لاصق عريض، مع تثبيت مشط تكوين الحفر (Comb) قرب إحدى نهايتيه وعلى بعد (1) سم من طرف القالب، ثم صُبّ الهلام في قالب الصب بعناية لمنع تكون فقاعات هوائية، وروعي وضع القالب في وضع أفقي لضمان تجانس سمك الهلام، وترك ليتصلب مدة 30 دقيقة، رُفع المشط بعناية

ونُقل القالب إلى حوض جهاز الترحيل الكهربائي (Tank) الحاوي على دارئ TBE 1X بحيث غمر سطح الهلام بالدارئ كلياً وارتفع عنه ببعد 1 ملي متر، وحضرت عينة DNA لغرض إجراء عملية التحميل (Loading)، وذلك بمزج 5 مايكروليتر من عينة DNA مع ١ مايكروليتر من دارئ التحميل، ونُقلت العينة إلى إحدى حفر الهلام، ورُحّلت عينات DNA بإمرارها على فرق جهد قدره 60 فولت مدة (1.5-2) ساعة، تم فحص مواقع حزم DNA المستخلص عند طول موجي 256 نانو متر، وقد صُوّر الهلام لغرض توثيق النتائج باستخدام جهاز التوثيق الهلامي (Gel-Document system).

8.9.3: ترحيل نواتج سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة (PCR)

تم التحري عن المورثات المسؤولة عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز من خلال ترحيل نواتج الـ PCR على هلام الأگاروز مع استعمال تركيز 5 مايكروليتر من نواتج الـ PCR في حفر هلام الأكاروز، وعدم استعمال دارئ التحميل لاحتواء المزيج الرئيس الأخضر على دارئ التحميل، وتضمنت عملية الترحيل الكهربائي ترحيل النواتج الآتية:

- مزج 5 مايكروليتر من DNA مع1مايكروليتر من صبغة Bromo phenol blue.
- ترحيل ٥ مايكروليتر من نواتج الـ PCR للعزلات البكتيرية قيد الدراسة.

4: النتائج Results

1.4: العزل والتشخيص

تم في الدراسة الحالية عزل 172 عزلة بكتيرية من 516 عينة سريرية والتي شملت 140 عينة من اخماج المجاري البولية، و 315 من اخماج الجروح، و 61 من اخماج الحروق ومن مختلف الاعمار ولكلا الجنسين خلال المدة من تشرين الاول 2010 لغاية اذار 2011 اذ شملت الانواع البكتيرية التالية *Ps. aeruginosa*، *K. pneumoniae*، *E. coli* بنسب عزل هي 18%، 38.4%، 43.6% على التوالي. اذ اقتصرت الدراسة على الانواع البكتيرية المذكورة فقط كما في الجدول (4-1)، في حين كانت نسبة عزل البكتريا السالبة لصبغة غرام بالنسبة الى عدد العينات هي (33.3%) اما بالنسبة لعدد العزلات فقد كانت (100%) جدول (4-2). تم تشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة تشخيصاً أوليا من خلال دراسة بعض الصفات المظهرية، الزرعية والمجهرية ثم اتبعت بالاختبارات الكيموحيوية كما اكدت نتائج تشخيص بعض العزلات المشكوك بها باستخدام العدة التشخيصية (API 20E)، باستثناء عزلات بكتريا *Ps.aeruginosa*، إذ تم اعتماد هذه العزلات لاختبارات المضادات الحيوية وللاختبارات الوراثية اللاحقة.

شكلت أعلى نسبة عزل من الإدرار وبنسبة 42.4%، تلتها الجروح بنسبة 32.6%، اما الحروق فقد شكلت اقل نسبة عزل في الدراسة وبنسبة 25% من مجموع 172 عزلة بكتيرية مشخصة، ويبين الجدول (4-1) الأنواع البكتيرية والنسب المئوية حسب مصادر عزلها.

جدول(4-1): مصادر وأعداد العزلات البكتيرية المأخوذة من 3 حالات التهابية مختلفة والنسب المئوية.

ت	البكتريا	(%) Urine	Wound	Burns	العدد الكلي للعزلات
1	*Ps. aeruginosa*	6(19.3%)	0(0.0%)	25(80.6%)	31(18%)
2	*K. pneumoniae*	28(42.4%)	25(37.9%)	13(19.7%)	66(38.4%)
3	*E. coli*	39(52%)	31(41.3%)	5(6.7%)	75(43.6%)
	المجموع	73(42.4%)	56 (32.6)	43(25%)	172(100%)

جدول (4-2): النسب المئوية لعزل البكتريا السالبة لصبغة غرام

ت	البكتريا	العدد (%)*	العد (%)**
1	***Ps. aeruginosa***	**31(6%)**	**31(18%)**
2	***K. pneumoniae***	**66(12.8%)**	**66(38.4%)**
3	***E. coli***	**75(14.5%)**	**75(43.6%)**
	المجموع	**172(33.3%)**	**172(100%)**

* نسبة إلى عدد العينات البالغ عددها (516) عينة.

** نسبة إلى عدد البكتريا السالبة لصبغة غرام المعزولة في الدراسة والبالغ عددها 172 عزلة.

1.1.4: التشخيص التأكيدي لبعض البكتريا المعزولة باستخدام عدة التشخيص API 20E

شخصت بعض البكتريا المعزولة باستخدام عدة التشخيص API 20E.

2.4: التحري عن العزلات المقاومة للبيتالاكتام Screening test of β-lactam resistant isolates

زرعت جميع العزلات قيد الدراسة على وسط مولر هنتون أغار المزود بالـAmpicillin، Amoxicillin (كلاً على حدة) وبتركيز نهائي 100، 50 ملغم/مل على التوالي، فمن مجموع 172 عزلة اظهرت 145 منها مقاومة للمضادين المذكورين. إذ أظهرت عزلات كل من *Ps. aeruginosa*، *K. pneumoniae*، *E. coli* نسب مقاومة هي 80.6%، 84.8%، 85.3 % على التوالي كما موضح في جدول (4-3).

جدول (4-3): البكتريا السالبة لصبغة غرام والمقاومة لمضادات البيتالاكتام

العزلة	العدد	العدد(%) للعزلات المقاومة للبيتالاكتام
P. aeruginosa	**31**	**25(80.6%)**
K. pneumoniae	**66**	**56(84.8%)**
E. coli	**75**	**64(85.3%)**
المجموع	**172**	**145(84.3%)**

3.4: اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic susceptibility test

تبين من الجدول (4-4) ان هناك مقاومة مرتفعه نسبياً ابدتها العزلات البكتيرية بشكل عام تجاه المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة بصورة عامة ومضادات البيتالاكتام بصورة خاصة حيث بلغت نسبة المقاومة تجاه هذه المضادات والمتمثلة بالبنسلينات، مثل مضادات الـCarbencilline، Ticarcilline، Piperacillin إذ جاءت نسب المقاومة لها 86.1%، 84.1%، 82.1% على التوالي.

اما بالنسبة للجيل الثالث من السيفالوسبورينات والمتمثلة بـ Ceftazidime، Ceftriaxone، Cefotaxime اذ جاءت نسب المقاومة لها 78.6%، 76.6%، 74.5% على التوالي، في حين بلغت نسب المقاومة لمضادات الـCephalexin، Cefixime، Cefepime، Cefoxitin هي 71.7%، 64.1%، 59.3%، 53.1% على التوالي أما بالنسبة لمضاد الـ Azteronam فقد بلغت نسبة المقاومة الكلية لهذا المضاد هي 67.9 %.

أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى أن نسبة المقاومة لمضاد الـAomxi-Clav قد بلغت 81.4%. كما أوضحت النتائج ان نسبة المقاومة الكلية لمضادات الـAminoglycosides منها الـAmikacin قد بلغت 9.7% وهي نسبة منخفضة نسبياً.

كما بلغت نسبة المقاومة لمضادات Quinolones ومنها مضاد الـNalidixic acid 54.5% في حين بلغت المقاومة الكلية لمضادات الـFloroquinolones ومنها الـCiprofloxacin 31%.كما بينت النتائج ان المضاد الحيوي الـImipenem وهو من مجموعة الـCarbapenem هو العلاج الأمثل في علاج الإصابات المتسببة من هذه الانواع البكتيرية بشكل عام حيث بلغت نسبة المقاومة له 0.7% وهي نسبة منخفضة جداً، في حين سجلت النتائج ارتفاعاً ملحوظا في نسبة المقاومة الكلية لمضاد الـMeropenem إذ بلغت 16.2%.

جدول(4-4): المقاومة الكلية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة للمضادات الحيوية

انواع المضادات الحيوية	عدد ونوع العينات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية (%)			عدد العزلات المقاومة(%)
	67 Urine	47 Wound	31 Burns	
Piperacillin	56(83.6%%)	34(72.3%)	29(93.5%)	119(82.1%)
Ticarcilline	57(85.1%)	35(74.5%)	30(96.8%)	122(84.1%)
Carbeniclline	62(92.5%)	41(87.2%)	23(74.2%)	128(86.9%)
Cefotaxime	48(71.6%)	31(66.5%)	29(93.5%)	108(74.5%)
Ceftriaxone	47(70.1%)	37(78.7%)	27(87.1%)	111(76.6%)
Ceztazidime	53(79.1%)	34(72.3%)	27(87.1%)	114(78.6%)
Aztreonam	55(82.1%)	17(36.1%)	25(80.6%)	97(67.9%)
Cefoxitin	39(58.2%)	11(23.4%)	27(87.1%)	77(53.1%)
Cephalexin	51(76.1%)	28(59.6%)	25(80.6%)	104(71.7%)
Cefixime	43(64.1%)	24(51.1%)	26(83.9%)	93(64.1%)
Cefepime	33(49.3%)	28(59.6%)	25(80.6%)	86(59.3%)
Amoxi-clav	59(88%)	29(61.7%)	30(96.9%)	118(81.4%)
Amikacin	1(1.5%)	3(6.4%)	10(32.3%)	14(9.7%)
Ciprofloxacin	27(40.3%)	4(8.5%)	14(45.1%)	45(31%)
Imipenem	1(1.4%)	0(0.0%)	0(0.0%)	1(0.7%)
Meropenem	3(4.3%)	0(0.0%)	21(67.7%)	24(16.2%)
Nalidixic acid	42(62.7%)	16(34%)	21(67.7%)	79(54.5%)

اختبرت حساسية 25 عزلة *Ps. aeruginosa* تجاه المضادات الحيوية المذكورة انفاً للتعرف على مدى انتشار المقاومة بين عزلاتها اذ يبين الجدول (4-7) ان هناك مقاومة عالية نسبياً ابدتها هذه العزلات والمتمثلة بالبنسلينات، مثل مضادات Ticarcillin، Pepracillin، Carbencillin اذ جاءت نسب المقاومة لها 96%، 88%، 64% على التوالي، وللجيل الثالث من السيفالوسبورينات متمثلة بالـCeftazidime و Ceftriaxone اذ جاءت نسب المقاومة لكل منها 96% و 100% لمضاد الـ Cefotaxime، وهي نسب مرتفعه خصوصاً بين العزلات التي مصدرها اصابات الحروق.

اشارت نتائج الدراسة الحالية الى ان نسبة المقاومة التي أبدتها عزلات الـ*Ps. aeruginosa* لمضاد Amxoxi-Clav هي 96%، والذي يعد من مضادات البيتا لاكتام التعاضدية والذي يمتاز بتأثيره الفعال على البكتريا المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز.

بينت الدراسة الحالية ان المضاد الحيوي Imipenem هو العلاج الأمثل حالياً للإصابات التي تسببها هذه البكتريا، فقد جاءت جميع العزلات حساسة بنسبة 100% لهذا المضاد، بينما سجلت النتائج ارتفاعاً ملحوظاً في مقاومة هذه البكتريا لمضاد الـMeropenem وبنسبة 68%.

أظهرت بكتريا *Ps.aeruginosa* مقاومة مرتفعه نسبياً لمضاد الـ Aztreonam إذ بلغت 84%، أما بالنسبة للـCefixime، Cephalexin، Cefoxitin فقد جاءت نسب المقاومة لها 80%، 84%، 100% على التوالي، في حين كانت نسبة المقاومة لمضاد ألـCefepime هي80%. ويتبين من الجدول (4-5) ان العزلات التي مصدرها الادرار كانت حساسة وبنسبة 100%لمضادات الـImipenem، Meropenem، Ciprofloxacin، Amikacin والتي اغلبها اخذت من المرضى الخارجين (Out patients) غير الوافدين. ومما تشير اليه نتائج الدراسة الحالية نجد ان المضادات الحيوية الاتية الـImipenem، Meropenem، Ciprofloxacin، Amikacin هي الافضل من ناحية العلاج للمرضى المصابين بالالتهابات البكتيرية المعزولة قيد الدراسة.

اشارت نتائج الدراسة الحالية إلى إن نسبة مقاومة الـAmikacin كانت 28%. اما بالنسبة لمضادات الـQuinolones اظهرت نتائج الدراسة الحالية زيادة ملحوظة في مقاومة مضاد الـNalidixic acid اذ كانت نسبة المقاومة تجاه هذا المضاد 76%، اما بالنسبة لمضادات الـFloroquinolones ومنها الـ Ciprofloxacin فقد أظهرت فعالية متوسطة ضد عزلا ت الـ*Ps. aeruginosa* وبنسبة 48%.

أظهرت النتائج قابلية عزلات *Ps. aeruginosa* على مقاومة اصناف مختلفة من المضادات الحيوية مثل الـCiprofloxacin، Ceftazidime، Cefepime، Carbencilline وبالتالي أظهرت نمط المقاومة المتعددة Multidrug resistance (MDR) لهذه المضادات جدول (4-10).

جدول (4-5): اختبار الحساسية للمضادات الحيوية لعزلات *Ps. aeruginosa*

انواع المضادات الحيوية	عدد ونوع العينات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية(%)		المجموع % من 25 عزلة
	23 Burns	**2 Urine**	
Piperacillin	21(19%)	1(50%)	22(88%)
Ticarcilline	22(96%)	2(100%)	24(96%)
Carbeniclline	15(56%)	1(50%)	16(64%)
Cefotaxime	23(100%)	2(100%)	25(100%)
Ceftriaxone	22(96%)	2(100%)	24(96%)
Ceztazidime	23(100%)	1(50%)	24(96%)
Aztreonam	19(87%)	2(100%)	23(84%)
Cefoxitin	23(100%)	2(100%)	25(100%)
Cephalexin	20(87%)	1(50%)	21(84%)
Cefixime	19(82.6%)	1(50%)	20(80%)
Cefepime	18(78.3%)	2(100%)	20(80%)
Amoxi-clav	22(96%)	2(100%)	24(96%)
Amikacin	7(30.4%)	0(0.0%)	7(28%)
Ciprofloxacin	12(52.2%)	0(0.0%)	12(48%)
Imipenem	0(0.0%)	0(0.0)	0(0.0%)
Meropenem	17(74.9%)	0(0.0%)	17(68%)
Nalidixic acid	18(78.3%)	1(50%)	19(76%)

* لم تعزل من الجروح