



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

دراسة بكتريولوجية ووراثية على بكتريا *Enterobacter cloacae* المقاومة لمضادات الكوينولونات

رسالة مقدمة الى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة - الاحياء المجهرية

من قبل الطالبة

هناء محمد عبد المگدومي

بكالوريوس علوم الحياة - كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى 2007

بإشراف

أ.د. عباس عبود فرحان الدليمي **أ.د. هادي رحمن رشيد الطائي**

2018 م

1439 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ مَا يَفْتَحُ اللَّهُ لِلنَّاسِ مِنْ رَحْمَةٍ فَلَا مُمْسِكَ لَهَا ﴾

وَمَا يُمْسِكُ فَلَا مُرْسِلَ لَهُ مِنْ بَعْدِهِ وَهُوَ

الْعَزِيزُ الْحَكِيمُ ﴿

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ

السلامة

إلى من زين العقول بنور الايمان كما زين البحار باللؤلؤ والمرجان ورفع السماء بلا عمدان
وعمر الارض بالانسان ومن بالتوكل عليه تتزاح عن القلب الاحزان ... ربي الرحمن

إلى الرحمة المرسله للعالمين إلى شفيعنا يوم الدين سيد الرسل وخاتم الانبياء والمرسلين...
محمد (صلّ الله عليه وعلى آله وصحبه أجمعين).

إلى الذين حملوا ارواحهم على راحتهم وقدموها فداءً لأوطانهم ، و ضحوا بكل غالٍ ونفيس
كي تبقى راية الوطن شامخة وشعبه بفخر يعيش ... شهداء الوطن الغالي

إلى من أطع الآله فيه كما أمر ، وأملأ فؤادي بحبه بكل فخر ، إلى من رباني من عهد
الصغر وكم اتعبناه ولم يضجر ... إلى أبي أغلى البشر

إلى الحياة بعرضها وبطولها إلى الهناء الذي يحل بحلولها إلى من يكمن ربيع العمر في
لمحتها إلى السعادة في جميع فصولها ... امي الغالية

إلى عزوتي وسندي إلى فرحتي وبسمتي إلى من اشد بهم ازري وحبهم دائماً في قلبي ...
إخوتي (صفاء ، أحمد ، ضياء ، مهند ، عبدالسلام) .

إلى شجرة الحب والحنان التي احتمي بحبها وتحتمي بظلي عندما تهب ريح الخوف
والوحشة من هذا الزمن العصيب صاحبة الرقة والطيب ... اختي رجاء

إلى من شاركني الحلو والمر وأحبني في الجهر والسر وانبت في أيامي الريحان واللوز
والعطر ... زوجي الغالي أحمد

إلى فلذة كبدي وقرّة عيني إلى ثمرة الانتظار لسنين طوال ... ابني محمد

إلى النهرين الجاريين الذين أعطوني حباً وحناناً ودلالاً بلا حدود وبلا مقابل فأحسنوا زرع
حبهم في قلبي وأغنوني بلطفهم وغلاوتهم ... أعمامي غني وحسن

إلى كل هؤلاء ...

هنا

تحية عرفان وحب

الشكر والثناء

الحمد لله الذي هدانا لنعمة العلم ، وما كنا لنهتدي لولا ان هدانا الله والصلاة والسلام على سيد المرسلين ، سيدنا محمد وعلى آله وصحبه الطيبين الطاهرين وجميع الانبياء والمرسلين .. أما بعد
لقد منّ الله عليّ بأكمال هذه الرسالة ، لذا فمن دواعي الاعتراف بالجميل أن أتقدم بالشكر الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى ورئاسة قسم علوم الحياة وكافة منتسبيها لإتاحتهم الفرصة لإكمال دراستي العليا، وما قدموه لي من العون والمساعدة .

كما أتقدم بفائق الشكر والتقدير وعرفاني بالجميل إلى أستاذي الفاضل أ.د. عباس عبود فرحان الدليمي و أ.د. هادي رحمن رشيد الطائي لأقتراحهما موضوع البحث ومتابعتهما المتواصلة وتوجيهاتهما السديدة لي طوال مدة البحث والذين كانوا خير عوناً لي في رسالتي ونور يضيء الظلمة التي كانت تقف في طريقي والذين زرعوا النفاؤل في دربي داعيةً الله أن يوفقهما لما يحبه ويرضاه ويجزيهما خير الجزاء . كما أتقدم بالشكر والامتنان الى اساتذتي في السنة التحضيرية لما قدموه من دعم وإسناد طيلة مدة الدراسة.

وما أحراني إلا أن أتقدم بجزيل شكري وامتناني للاستاذ الفاضل الدكتور أحمد عبد الجبار / جامعة الانبار الذي لم يخل علي في مد يد العون والمساعدة اثناء اجراء بحثي فجزاه الله الجزاء الاوفى.

وأتوجه بشكري وتقديري الى مدير مختبر الصحة المركزي في بعقوبة السيد هادي علي حمودي و منتسبي مختبر الصحة المركزي كافة ، وأخص بالذكر الاستاذ رامي حميد ، كما يدعوني الوفاء أن أشكر ادارة ومنتسبي مختبرات مستشفى بعقوبة التعليمي واخص بالذكر الدكتور محمد أحمد الكرخي والسيدة ثريا كاظم ، كما اعبر عن شكري وثنائي للدكتورة الفاضلة انعام فيصل في مستشفى البتول، وأطباء ومنتسبي شعبة المختبر في الاستشارية وأتوجه بشكري وتقديري الى كل من السيد قاسم جابر والسيد خالد حمادي في مستشفى بعقوبة التعليمي لما قدموه لي من العون والمساعدة وتعاونهم معي في جمع العينات فاسأل الله ان يجزيهم عني خير مايجزي به عباده المحسنين. ولايفوتني ان أشكر زميلاتي وزملائي طلبة الدراسات العليا واخص بالذكر الأخوات بان شبيب وإيمان عامر ، داعيةً الله لهم بدوام النجاح والموفقية .

وأتوجه بأرق كلمات الحب والامتنان واسماها الى من كان عوناً لي في جميع أوقاتي عائلتي واخص بالذكر والديّ العزيزين وزوجي الغالي أحمد لتشجيعهم ودعمهم المتواصل وتحملهم معي عناء هذا الجهد وتوفيرهم كل مايمكن أن يساعدي في الوصول إلى هذه المرحلة داعية من الباري (عز وجل) أن يمنّ عليهم بالصحة والعافية انه سميع مجيب .

وأنتقدم بخالص شكري وامتناني إلى الذين وقفوا إلى جانبي يشدون من أزري بحسن تشجيعهم وصائب آرائهم وصادق نصائحهم مما كان لهم أطيّب الأثر لإتمام هذه الرسالة . وأخيراً أقول عذراً لمن لا تسعفني الذاكرة لذكر اسمهم فلهم مني ود جميل وتقدير كبير.... ومن الله التوفيق .

هنا

إقرار المشرفين وترشيح لجنة الدراسات العليا

أشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ " دراسة بكتريولوجية ووراثية على بكتريا *Enterobacter cloacae* المقاومة لمضادات الكوينولونات " التي قدمتها طالبة الماجستير (هناء محمد عبد المگدمي) قد جرت تحت إشرافنا في كلية التربية للعلوم الصرفة/قسم علوم الحياة/ جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في قسم علوم الحياة/ الاحياء المجهرية .

التوقيع :

التوقيع :

الاسم : أ.د. هادي رحمن رشيد الطائي

الاسم : أ.د. عباس عبود فرحان الدليمي

المرتبة العلمية : أستاذ

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2018 م

التاريخ : / / 2018 م

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناء على التوصيات المتوافرة أرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : أ.م. د عمار أحمد سلطان

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

رئيس قسم علوم الحياة كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى/

التاريخ : / / 2018 م

إقرار الخبير العلمي

أشهد أنّ هذه الرسالة الموسومة " دراسة بكتريولوجية ووراثية على بكتريا *Enterobacter cloacae* المقاومة لمضادات الكوينولونات " التي قدمتها طالبة الماجستير (هناء محمد عبد المكي) قسم علوم الحياة / الاحياء المجهرية قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة .

التوقيع :

الاسم : د. محمد خليفة خضير

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة ديالى / كلية العلوم

التاريخ : / / 2018 م

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أنّ هذه الرسالة الموسومة " دراسة بكتريولوجية ووراثية على بكتريا *Enterobacter cloacae* المقاومة لمضادات الكوينولونات " التي قدمتها طالبة الماجستير (هناك محمد عبد المگدمي) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصُحِّح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع :

الاسم : د. سعد جمعة صالح

المرتبة العلمية : مدرس

العنوان : جامعة ديالى / كلية التربية للعلوم الانسانية

التاريخ : / / 2018 م

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن رئيس وأعضاء لجنة المناقشة نقر بأننا اطلعنا على رسالة الماجستير الموسومة بـ
(دراسة بكتريولوجية ووراثية على بكتريا *Enterobacter cloacae* المقاومة لمضادات
الكوينولونات) المقدمة من قبل الطالبة (هناء محمد عبد المگدي) وقد ناقشناها في محتوياتها
وفيما له علاقة بها ونعتقد أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الاحياء
المجهرية بتقدير (امتياز) .

التوقيع :

الاسم : د. حميد مجيد جاسم

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2018 م

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. رنا مجاهد عبد الله

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2018 م

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. كريم ابراهيم مبارك

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2018 م

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. عباس عبود فرحان الدليمي

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2018 م

عضوا ومشرفا

التوقيع :

الاسم : د. هادي رحمن رشيد الطائي

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2018 م

عضوا ومشرفا

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

التوقيع :

أ.م.د. مثنى محمد ابراهيم

عميد كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : / / 2018 م

Summary الخلاصة

تضمنت الدراسة جمع (333) عينة سريرية ومن كلا الجنسين ومختلف الأعمار توزعت ما بين 215 عينة من المرضى غير الراقدين في المستشفى و 118 عينة من المرضى الراقدين في مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى البتول التعليمي والمراجعين للاستشارية التابعة للمستشفى للمدة من شهر شباط لسنة 2017 ولغاية شهر حزيران لسنة 2017 . كانت نسبة عزل بكتريا *Enterobacter* بواقع 33 (16.01%) ، وان 28 (84.84%) عزلة منها تعود الى بكتريا *Enterobacter cloacae* و 5 (15.15%) عزلات منها تعود للنوع *Enterobacter sakazakii* ، حيث كانت نسبة عزلها من اخماج الجروح 3 (9.09%) ومن اخماج المسالك البولية 16 (48.48%) و 14 (42.42%) من الدم ؛ وتم التأكد من تشخيص العزلات باستخدام نظام API20E و جهاز VITEK2 فضلاً عن اجراء الفحوصات الزرعية والمجهريه والكيموحيوية التقليدية والجزئية باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي لجين 16S rRNA ومن ثم قراءة نتائج هذا الجين الذي تم تضخيمه بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) ومطابقتها مع قاعدة بيانات بنك الجينات العالمي NCBI لأربع عينات وتم رسم شجرة التقارب الوراثي بالمقارنة مع العزلات العالمية اذ طابقت بنسبة 99-100% لنوع بكتريا *Enterobacter cloacae* . وتم تسجيل نتائج العينة رقم 1 والحصول على الرقم التسلسلي LC322252 Accession Numbers للعزلة المسجلة في قاعدة البيانات في المركز العالمي NCBI الخاص ببنك الجينات. اختبرت حساسية العزلات تجاه مضادات الكوينولونات حيث اختيرت ستة أنواع من مضادات الكوينولونات وباستخدام طريقة Kerby- Bauer ، لمعرفة حساسية العزلات تجاهها ، اظهرت النتائج أنَّ مضادَي الـ Ofloxacin و Gatifloxacin هما أكثر أنواع مضادات الكوينولونات فعالية تجاه عزلات *Enterobacter cloacae* و *Enterobacter sakazakii* إذ بلغت نسبة

المقاومة 3.03% لكلا المضادين ، اما مضادي Nalidixic acid و Levofloxacin كانت نسبة المقاومة 39.39% و 15.15% على التوالي ، وكذلك قاومت العزلات مضاد Norfloxacin بنسبة 9.09%. اما مضاد Ciprofloxacin فقد قاومته العزلات بنسبة 12.12%. كذلك اظهرت النتائج أنَّ العزلات تظهر مقاومة متعددة تجاه الأنواع المختلفة من مضادات الكوينولونات المستخدمة في الدراسة. تم تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC لمضادي Ciprofloxacin ، Nalidixic acid بطريقة التراكيز المتضاعفة المتسلسلة لخمس عشر من العزلات المقاومة للكوينولونات وقد تراوحت النتائج لقيم التركيز المثبط الأدنى لمضاد Ciprofloxacin بين 2 - 1024 مكغم/مل . اما بالنسبة لمضاد Nalidixic acid فإن قيم MIC له بين 16 - $1024 \leq$ مكغم/مل .

أظهرت نتائج التحري عن عوامل الضراوة لبكتريا *Enterobacter cloacae* المقاومة للكوينولونات ان جميع العزلات لها القابلية على تكوين المحفظة وقدرتها على الالتصاق بسطوح الخلايا الطلائية للإنسان وبنسبة 100% ، بينما كانت 11 عزلة من مجموع 15 عزلة من البكتريا لها القابلية على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة احمر الكونغو وبنسبة 73.3% و 13 عزلة بنسبة 86.6% منتجة بطريقة الالتصاق بالانابيب ، وكانت جميع العزلات منتجة للغشاء الحيوي وبنسبة 100% بطريقة صفيحة المعايرة الدقيقة منها 6 (40%) ذات مستوى عالي لتكوين الاغشية الحيوية في حين شكلت العزلات ذات المستوى المتوسط لتكوين الاغشية الحيوية 9 (60%) من العزلات المكونة للأغشية الحيوية ، اما بالنسبة لمضخات الدفع فإن ثمانية عزلات كانت تمتلك مضخات دفع بكفاءة عالية وبنسبة 53.33% . بينت النتائج قدرة البكتريا على إنتاج البكتريوسين بنسبة 33.3% ، وكذلك انتاج انزيم الهيمولايسين بنسبة 6.6% ، أما فيما يخص انتاج انزيمي اللايباز و البروتياز فان البكتريا غير منتجة لانزيم اللايباز ومنتجة لانزيم البروتياز بنسبة 80% .

أجريت عملية أستخلاص الدنا البكتيري لعزلات بكتريا *Enterobacter cloacae* ثم أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للعزلات المقاومة لمضادات الكوينولونات من خلال أستعمال البوادىء المتخصصة التي تستهدف التسلسل النوعي للجينين *qnrB* و *qnrS* ، حيث أظهرت النتائج ان 13 عزلة من اصل 15 عزلة تمتلك جين *qnrB* ونسبة 86.6% ، اما بالنسبة لجين *qnrS* فقد اظهرت النتائج ان 12 عزلة من اصل 15 عزلة تمتلك هذا الجين ونسبة 80% .

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	الفقرة
الفصل الاول		
1	المقدمة Introduction	1-1
3	أهداف الدراسة Aims of the study	1-2
الفصل الثاني		
4	استعراض المراجع Literature review	2
4	العائلة المعوية : Enterobacteriaceae	1.2
4	الصفات العامة لبكتريا <i>Enterobacter</i> spp.	2.2
6	التصنيف لبكتريا <i>Enterobacter cloacae</i>	3.2
7	الوبائية لبكتريا <i>Enterobacter</i> spp.	4.2
8	الامراضية لبكتريا <i>Enterobacter</i> spp.	5.2
10	عوامل الضراوة لبكتريا <i>Enterobacter</i> spp.	6.2
10	تكوين الغشاء الحيوي : Biofilm Formation	1.6.2
11	الالتصاق : Adhesion	2.6.2
12	أنظمة الدفع : Efflux System	3.6.2
13	البكتريوسينات : Bacteriocin	4.6.2
13	إنتاج الإنزيم المحلل للبروتين : Protease production	5.6.2
14	إنتاج اللايبيز : Lipase production	6.6.2
15	الهيمولايسين البكتيري : Bacterial Hemolysin	7.6.2
15	المحفظة : Capsule	8.6.2
16	المضادات الحيوية : Antibiotics	7.2
16	الكوينولونات : Quinolones	1.7.2
17	آلية عمل الكوينولونات : Mechanism of action	2.7.2

18	Mechanism of resistance : آلية مقاومة البكتريا لمضادات الكوينولونات	3.7.2
20	PMQR محددات مقاومة الكوينولونات بواسطة البلازميد	4.7.2
20	Qnr محددات المقاومة للكوينولونات	5.7.2
24	Reaction Polymerase Chain : PCR تفاعل البلمرة التسلسلي	8.2
27	16S rRNA تقنية التسلسل لمورثة	9.2
28	DNA sequencing : تسلسل الـ DNA	10.2
29	Mutation : الطفرات	11.2
الفصل الثالث		
31	Methods & Materials المواد وطرائق العمل	3
31	Materials المواد	1.3
31	Instruments and tools الأجهزة و الأدوات المستعملة في الدراسة	1.1.3
32	Biological and chemical substance المواد الكيميائية والبيولوجية	2.1.3
33	Culture media الاوساط الزرعية المستعملة في الدراسة	3.1.3
34	Stains الصبغات المستعملة	4.1.3
34	Laboratory Kits العدد المختبرية	5.1.3
36	Antibiotic discs المضادات الحيوية	6.1.3
36	DNA Primers : DNA بادئات الـ DNA	7.1.3
37	الانزيمات المستخدمة في الدراسة	8.1.3
37	Methods طرائق العمل	2.3
37	Sterilization methods طرائق التعقيم	1.2.3
38	preparation of Solutions المحاليل المستخدمة في الدراسة	2.2.3
38	Normal saline Solution المحلول الملحي الفسلجي	1.2.2.3
38	Macfarland Standard محلول ثابت العكرة القياسي	2.2.2.3
38	VITEK 2 محلول ملحي استعمل في جهاز	3.2.2.3

39	Antibiotic Solutions محاليل المضادات الحيوية	4.2.2.3
39	Crystal violet solution محلول صبغة البلور البنفسجي	5.2.2.3
39	Safranin Stain Solution : محلول صبغة السفرائين	6.2.2.3
39	KOH Solution : محلول هيدروكسيد البوتاسيوم	7.2.2.3
40	Gel Electrophoresis Solutions : محاليل الترحيل الكهربائي	8.2.2.3
40	Ethidium Bromide Stock Solution : محلول خزين بروميد الإيثيديوم	A.8.2.2.3
40	Loading buffer x6 : دارئ التحميل	B.8.2.2.3
40	Tris-Boric acid-EDTA (TBE10x) : محلول داريء الترست حامض البوريك	C.8.2.2.3
40	DNA Ladder : محلول الدليل الحجمي	D.8.2.2.3
41	Ethylen diamine tetra acetic acid (0.5 مولات) EDTA محلول	E.8.2.2.3
41	Solutions DNA- Extraction : المحاليل المستخدمة في عزل الدنا البكتيري	9.2.2.3
41	الإنزيمات المستخدمة في عزل DNA البكتيري	10.2.2.3
41	المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة PCR DNA	11.2.2.3
42	Gram Stain محلول صبغة غرام	12.2.2.3
42	الكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا	3.2.3
42	Catalase reagent : كاشف انزيم الكاتاليز	1.3.2.3
43	Oxidase reagent : كاشف الاوكسيديز	2.3.2.3
43	Kovac's reagent : كاشف كوفاكس	3.3.2.3
43	Methyl Red Reagent : كاشف أحمر المثيل	4.3.2.3
43	Voges-Proskauer Reagent : كاشف فوكس بروسكاور	5.3.2.3
44	Preparation of cultural media : تحضير الأوساط الزرعية	4.2.3
44	Ready made media : الأوساط الزرعية الجاهزة	1.4.2.3
44	Laboratory Prepared media : الأوساط الزرعية التحضيرية	2.4.2.3
44	Urea agar medium : وسط أكار اليوريا الصلب	1.2.4.2.3

45	Blood agar medium : وسط أكار الدم	2.2.4.2.3
45	Motility media : وسط اختبار الحركة	3.2.4.2.3
45	Congo- Red Agar (CRA) : وسط اكار احمر الكونكو الصلب	4.2.4.2.3
46	Trypticase Soy Agar (T S A) : وسط التريتكيز الصويا أكار	5.2.4.2.3
46	Pepton Water Media : وسط ماء الببتون	6.2.4.2.3
46	Eosin methylene blue agar : وسط ايوسين المثلين الازرق	7.2.4.2.3
46	Lysine decarboxylase Broth : وسط اللايسين ديكاربوكسيليز	8.2.4.2.3
47	Egg-yolk Agar : وسط أكار صفار البيض	9.2.4.2.3
47	Skim milk agar : وسط انتاج البروتينز (وسط أكار الحليب)	10.2.4.2.3
47	Collection of Samples : جمع العينات	5.2.3
48	Samples culture : زرع العينات	6.2.3
49	identification of bacterial isolates : تشخيص العزلات البكتيرية	7.2.3
49	Morphological Characteristics : الصفات المظهرية	1.7.2.3
49	Microscopical Characteristics : الصفات المجهرية	2.7.2.3
49	Biochemical Tests : الفحوصات الكيموحيوية	3.7.2.3
51	IMViC اختبارات الـ	4.7.2.3
51	Indol test : فحص الاندول	1.4.7.2.3
52	Methyl – Red test : فحص المثل الاحمر	2.4.7.2.3
52	Voges-proskauer test : إختبار فوكس بروسكاور	3.4.7.2.3
52	Citrate utilization test : فحص استهلاك السترات	4.4.7.2.3
53	Triple -Sugar iron : فحص النمو على وسط الحديد – ثلاثي السكر	4.7.2.35
53	Kliglar iron agar test(KIA) : اختبار النمو على وسط كلكلر	4.7.2.3.6
54	: Api-20E تشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام بنظام	5.7.2.3
59	حفظ العزلات البكتيرية وإدامتها	8.2.3

59	الحفظ قصير الأمد : Short period culture	1.8.2.3
59	الحفظ طويل الأمد : Long period culture	2.8.2.3
60	دراسة مقاومة البكتيريا لمضادات الحياة	9.2.3
60	فحص حساسية البكتيريا لمضادات الحياة	1.9.2.3
61	قياس التركيز المثبط الأدنى : Concentration Minimal - Inhibitory	2.9.2.3
62	التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتيريا <i>Enterobacter cloacae</i>	10.2.3
62	الكشف عن إنتاج الهيموليسين : Detection of Haemolysin	1.10.2.3
62	الكشف عن إنتاج إنزيم البروتياز : Detection of Protease	2.10.2.3
62	اختبار إنتاج البكتريوسين : Bacteriocin Production	3.10.2.3
63	التحري عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm	4.10.2.3
65	التحري عن قابلية البكتيريا بالالتصاق بالخلايا الطلائية	5.10.2.3
65	تحضير عالق الخلايا الطلائية للإنسان	1.5.10.2.3
66	إختبار الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية	2.5.10.2.3
67	الكشف المظهري عن مضخات الدفع : Efflex Pump	6.10.2.3
67	الكشف عن المحفظة : Detection of capsules	7.10.2.3
68	التحري عن أنتاج اللايباز : Detection of lipase production	8.10.2.3
68	أستخلاص الحامض النووي الدنا البكتيري : Bacterial genomic DNA extraction	11.2.3
70	قياس تركيز الدنا ونقاوته : DNA concentration and purity Estimation	12.2.3
72	برمجة جهاز PCR : The cycling reactions program	14.2.3
72	الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز : Gel Electrophoresis Agarose	15.2.3
73	طريقة تحليل تسلسل الحامض النووي DNA	16.2.3
الفصل الرابع		
75	النتائج والمناقشة Results and Discussion	4
75	جمع العينات : Collection of Samples	1.4

76	العزل والتشخيص لبكتريا <i>Enterobacter</i> spp.	2.4
78	الصفات المظهرية والزرعية للعزلات البكتيرية	1.2.4
80	التشخيص المجهرى	2.2.4
80	الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص عزلات بكتريا <i>Enterobacter</i> spp.	3.2.4
81	التشخيص باستخدام نظام API-20E	4.2.4
83	التشخيص باستخدام GN Card Identification by GN Card	5.2.4
85	التشخيص الجزيئي للجين 16S rRNA	6.2.4
87	تحديد تتابعات القواعد النروجينية للجين 16S rRNA	3.4
90	توزيع العزلات حسب موضع الاصابة	4.4
93	إختبار حساسية بكتريا <i>E. sakasakii</i> و <i>E. cloacae</i> لمضادات الحياة الكوينولونات	5.4
97	تحديد التركيز المثبط الأدنى	6.4
99	الكشف عن عوامل الضراوة لبكتريا <i>E. cloacae</i>	7.4
100	المحفظة : Capsule	1.7.4
101	الالتصاق : Adherence	2.7.4
102	إنتاج انزيم البروتيز : protease production	3.7.4
103	إنتاج البكتريوسين : Bacteriocin production	4.7.4
105	إنتاج انزيم الهيمولايسين : Hemolysin Production	5.7.4
106	إنتاج انزيم اللايباز : Lipase Production	6.7.4
107	الكشف المظهري عن مضخات الدفع : Efflux Pump	7.7.4
109	تكوين الغشاء الحيوي : Biofilm formation	8.7.4
113	نتائج التحري عن جينات المقاومة <i>qnrS</i> و جين <i>qnrB</i>	8.4
الاستنتاجات و التوصيات		
120	ألاستنتاجات	
121	التوصيات	
المصادر		

122	المصادر العربية	
125	المصادر الأجنبية	
151	الملاحق	

قائمة الجداول

الرقم	العنوان	الصفحة
1-2	التصنيف العلمي Scientific classification	6
1-3	الأجهزة و الأدوات المستعملة في الدراسة	31
2-3	المواد الكيميائية والبايولوجية المستعملة في الدراسة	32
3-3	الأوساط الزرعية	33
4-3	الصبغات المستعملة في الدراسة	34
5-3	العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة	34
6-3	أقراص المضادات الحيوية المستخدمة وأقطار منطقة التثبيط القياسية	36
7-3	مساحيق المضادات الحياتية : Antibiotic Powders	36
8-3	تتابعات البوادي النوعية لجينات 16S rRNA و <i>qnrB</i> و <i>qnrS</i> لبكتريا <i>Enterobacter cloacae</i> وحجم الناتج المتوقع لكل بادئ	37
9-3	مكونات عدة إستخلاص الدنا البكتيري	41
10-3	الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا السالبة لصبغة غرام التي يقوم بها جهاز 2 VITEK	57
11-3	المحتويات اللازمة للتفاعل التضاعفي لكل من الجينات 16S rRNA و <i>qnrB</i> و <i>qnrS</i> .	71
12-3	برمجة جهاز P.C.R	72
1-4	النسب المئوية لتوزيع العينات السريرية ومصادر جمعها .	75
2-4	الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص بكتريا <i>Enterobacter spp.</i>	80
3-4	الاختبارات التشخيصية لبكتريا <i>E.sakazakii</i> و <i>E.cloacae</i> باستخدام نظام API-20E	82

84	الاختبارات التشخيصية لبكتريا <i>E. cloacae</i> و <i>E. Sakazakii</i> باستخدام نظام GN –Card	4-4
89	التقارب الوراثي للعزلات العراقية	5-4
90	التقارب الوراثي للعزلات العراقية وعزلات عالمية من قاعدة بيانات NCBI	6- 4
90	التغيرات في القواعد النروجينية لتتابعات العزلات 1 و 2 و 3 و 4 لبكتريا <i>E. cloacae</i>	7-4
91	أعداد عزلات <i>E. cloacae</i> ونسبها المئوية حسب مواضع العزل	8-4
97	النسب المئوية لحساسية العزلات قيد الدراسة لمضادات الحياة المستخدمة في الدراسة	9-4
98	قيم التركيز المثبط الأدنى MIC لمضادات Nalidixic acid، Ciprofloxacin	10-4
106	قدرة انتاج عزلات بكتريا <i>E. cloacae</i> لبعض عوامل الضراوة	11-4
108	النسب المئوية لعزلات بكتريا <i>E. cloacae</i> المنتجة والغير منتجة لمضخات الدفع pumps Efflux	12- 4
113	نتائج الغشاء الحيوي بالطرق الثلاث	13- 4
117	نتائج التشخيص الجزيئي للعزلات البكتيرية بتضخيم جينات <i>qnrB</i> و <i>qnrS</i>	14- 4

الرقم	العنوان	الصفحة
1-4	النسبة المئوية لبكتريا <i>Enterobacter</i> spp. مقارنة بأنواع بكتيرية أخرى معزولة من المرضى الراقدين والمراجعين في المستشفى.	77
2-4	النسبة المئوية للعينات المعزولة منها بكتريا <i>Enterobacter</i> spp. للمرضى الراقدين والمراجعين في المستشفيات	78
3-4	مظهر مستعمرات بكتريا <i>E.cloacae</i> المنماة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة على A. وسط الماكونكي ، B . وسط الايوسين المثيل الازرق ، C. وسط اكار الدم .	79
4-4	النسبة المئوية للأنواع العائدة لبكتريا <i>Enterobacter</i> spp. المعزولة من المرضى	85
5-4	الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين 16S rRNA في هلام الاكاروز .	86
6-4	شجرة التقارب الوراثي لعزلات بكتريا <i>E.cloacae</i> الاربعة المعزولة من تجرثم الدم للمرضى العراقيين بطريقة (UPGMA) وباستعمال برنامج MEGA6.	88
7-4	الشجرة الوراثية لعزلات بكتريا <i>E.cloacae</i> الاربعة المعزولة المعلمة بالمثلث الاحمر والمعزولة من تجرثم الدم للمرضى العراقيين بالمقارنة مع 8 عزلات محملة من قاعدة البيانات NCBI بطريقة (UPGMA) وباستعمال برنامج MECA6 .	89
8-4	خلايا بكتريا <i>E.cloacae</i> الملتصقة بالخلايا الظهارية للانسان تحت العدسة الزيتية (X100) .	102
9-4	الكشف المظهري عن مضخات الدفع في بكتريا <i>Enterobacter</i> spp. بعد التنمية على وسط TSA الحاوي على صبغة Ethidium bromide.	108
10-4	اختبار الغشاء الحيوي بالكونغو الاحمر: A. مستعمرات البكتريا الغامقة المنتجة للغشاء الحيوي ، B. البكتريا الغير منتجة للغشاء الحيوي .	112
11-4	النسبة المئوية لظهور جيني <i>qnrS</i> و <i>qnrB</i> في 15 عزلة من عزلات بكتريا <i>E.cloacae</i>	118
12-4	الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين <i>qnrB</i> في هلام الاكاروز .	118
13-4	الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين <i>qnrS</i> في هلام الاكاروز .	119

الصفحة	الملحق	الرقم
151	استمارة المعلومات الخاصة بالمرضى	1
152	الدليل الحجمي المستخدم في الدراسة DNA Ladder	2
153	PCR PreMix المستخدم في الدراسة	3
155	الاختبارات الموجودة في نظام Api 20E والنتائج الموجبة والسالبة لكل اختبار.	4
157	نتائج اختبار حساسية المضادات الحيوية لبكتريا <i>Enterobacter spp.</i> والمعلومات الخاصة لكل عزلة	5
158	خصائص البوادي المستعملة	6
158	تتابعات القواعد النتروجينية للجين التشخيصي 16S rRNA لاربع عزلات	7
167	موقع تسجيل العزلة رقم 1	8

List of Abbreviations قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
16S rRNA	16 Svedberg units ribonucleic acid
api	Analytical Profile Index.
Bp	Base pair
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
DNA	Deoxyribose nucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotides Triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetra-acetic acid
EMB	Eosin methylene blue
GD	Genomic DNA
I	Intermediat
ICU	Intensive care unit
mg	Milligram
MIC	Minimum inhibition concentration
Min	Minute
mM	Millie molar
NCBI	National Center for Biotechnology Information.
ng	Nano gram
NI	Nosocomial infection
OD	Optical Density
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potency of hydrogen ions
PMQR	Plasmid – Mediated Quinolone Resisance
Qnr	Quinolone Resistance Protien
qnr gene	Quinolone Resistance gene
R	Resistant
S	Sensitive
spp.	Species
TBE	Tris- Boric acid – EDTA
TEM	Temoneira
TSA	Trypton Soy Agar
TSI	Triple Sugar Iron
UTI	Urinary Tract Infection
UV	Ultra Violate
β	Beta
μg	Microgram
μl	Microliter

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

1. المقدمة Introduction

تُعدّ الاخماج الذي تسببه البكتيريا بصورة عامة أحد الأسباب الرئيسة للوفيات في العالم و يبلغ معدل الوفيات بسبب هذه الأمراض البكتيرية شديدة العدوى حوالي 30% وتقوم المضادات الحيوية بعلاج العديد من الامراض البكتيرية (Paul وآخرون ، 2006) .

هنالك بعض أنواع البكتيريا السالبة لصبغة جرام والتي تمثل مشكلة خطيرة من مشاكل الصحة العامة وذلك لكونها تسبب العديد من الأمراض المعدية عن طريق المجتمع -community-acquired infections ومن أهم هذه الأنواع عائلة البكتيريا المعوية Enterobacteriaceae (Nordmann وآخرون ، 2011) .

أصبحت الممرضات البكتيرية Bacterial pathogens مقاومة أكثر للمضادات الحيوية الشائعة وتعتبر مقاومة المضادات الحيوية مشكلة طبية وصحية كبيرة وذلك لإن المقاومة البكتيرية قد تؤدي إلى فشل العلاج المستخدم ، الأمر الذي قد يسبب مضاعفات كثيرة وخصوصا لدى المرضى المعتمدين على ذلك العلاج المستخدم (Bonomo وآخرون ، 2017) .

إنّ المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية تعد مشكلة خصوصا في العصيات bacilli البكتيرية سالبة صبغة الكرام . وهنالك بعض السلالات البكتيرية التي تظهر مستوى مقاومة عالية لمضادات الامينوكلايكوسايد aminoglycosides وبيتا لكتام β -lactam والكوينولونات quinolones (Pitout وآخرون ، 2005) .

يُعدّ الجنس Enterobacter أحد أجناس العائلة المعوية Enterobacteriaceae إذ إنّ هنالك 14 نوعا تابعا لهذا الجنس أكثرها شيوعا والتي سجّلت أعلى نسب إصابة هي *E. aerogenes* ، *E. cloacae* و *E. Sakazakii* (Zhu وآخرون ، 2017) . هذه الأنواع من

البكتريا خصوصا *E. agglomerans* ، *E. aerogenes* ، *E. sakazakii* ، *E. cloacae* و *E. gergoviae* تعد بكتريا انتهازية opportunistic وهي تسبب الكثير من الأمراض للإنسان والحيوان (Brenner وآخرون ، 2005) .

تمتلك بكتريا *Enterobacter* عددا كبيرا من عوامل الضراوة التي تجعلها مسؤولة عن العديد من الإصابات في البشر، ومن هذه العوامل تكوين الأغشية الحيوية Biofilms وتكوين عوامل الاستيطان وتحتوي على المحفظة capsule وكذلك تنتج السايديروفورات وإنزيم البيبتالاكتاميز والإنزيم المحلل للبروتين والبكتريوسين (Choi وآخرون ، 2008) .

إن مقاومة بكتريا العائلة المعوية وخصوصا المقاومة المتعددة للمضادات الحياتية multi drug resistance أصبحت مشكلة متزايدة مع الزمن (Mollenkopf ، 2012) . إن استخدام المتزايد لمضادات الكوينولونات quinolones أدى إلى زيادة مقاومة البكتريا لهذا النوع من المضادات الحياتية وتظهر المقاومة البكتيرية للكوينولونات عادة كنتيجة للتغيرات alterations في الإنزيمات المستهدفة مثل إنزيم DNA gyrase و إنزيم topoisomerase IV وتظهر المقاومة البكتيرية للكوينولونات كذلك نتيجة التغيرات في طريقة مسار الدواء drug entry وأنظمة الدفع efflux (Jacoby ، 2005) .

أهداف الدراسة Aims of the study

نظرا لأهمية الدراسات الخاصة بتحديد أنواع بكتريا *Enterobacter spp.* المقاومة لمضادات الكوينولونات المسببة لاختلاج سريرية مختلفة بين الراقدين وغير الراقدين في مستشفيات محافظة ديالى جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على ما يلي :

1. عزل بكتريا *Enterobacter cloacae* من اختلاج سريرية مختلفة وتشخيصها باستخدام الطرق الكيموحيوية والجزيئية بالكشف عن جين 16S rRNA بواسطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR .

2. الكشف عن مقاومة العزلات لبعض مضادات الكوينولونات ، وتحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) لبعض هذه المضادات.

3. دراسة عوامل الضراوة المختلفة التي تساعد بكتريا *Enterobacter cloacae* على إحداث الخمج .

4. الكشف عن جينات *qnrB* ، *qnrS* المشفرة لمقاومة الكوينولونات باستخدام تقنية PCR ، والكشف عن تسلسل القواعد النايتروجينية لجين 16S rRNA لبكتريا *Enterobacter cloacae* ومقارنة النتائج من حيث التشابه والاختلاف مع العزلات العالمية الموجود تسلسل قواعدها في قاعدة البيانات لموقع NCBI .

الفصل الثاني

استعراض
المراجع

Literature
Reviews

2. استعراض المراجع Literature review

1.2. العائلة المعوية : Enterobacteriaceae

تتميز أفراد العائلة المعوية بانتشارها في اغلب البيئات مثل التربة ، النباتات ، و مياه الصرف الصحي ، وهي عبارة عن بكتريا عصوية الشكل ، مستقيمة أو منحنية ، سالبة لصبغة جرام ، هوائية أو لاهوائية اختيارية ، متحركة بأسواط محيطية peritrichous أو قد تكون غير متحركة (Tofteland ، 2015). تتراوح أبعادها بين (0.1 X 0.6 ملم) وتضم هذه العائلة 44 جنس و 176 نوع (Brenner وآخرون ، 2005).

تعد العائلة المعوية Enterobacteriaceae من المجاميع البكتيرية الكبيرة والغير متجانسة التي يكون الموطن الطبيعي لها في أمعاء الإنسان والحيوان (Odigie وآخرون ، 2015). لهذه العائلة عدد أجناس بكتيرية مهمة مثل (*Escherichia* ، *Klebsiella* ، *Shigella* ، *Salmonella* ، *Enterobacter* ، *Serratia* و *Proteus*) وغيرها من الأجناس و بعض هذه الأجناس المعوية مثل *Escherichia coli* هي ميكروبات طبيعية و تسبب الأمراض بشكل عرضي و لكن البعض الآخر مثل *Salmonella* و *Shigella* تسبب هذه الأجناس الأمراض للإنسان بشكل منتظم (Jawetz وآخرون ، 2016).

2.2. الصفات العامة لبكتريا *Enterobacter* spp.

General Characteristics of *Enterobacter* spp.

يتميز جنس بكتريا *Enterobacter* بأنها عصيات مستقيمة Straight Rods يبلغ طولها من 1.2 إلى 3 مايكرومتر وعرضها من 0.6 إلى 1 مايكرومتر، تتحرك بواسطة أسواط محيطية Peritrichous (عادة ما يكون عددها من 4 الى 6) ، سالبة لصبغة جرام ، ولا هوائية اختيارية

Brenner) Non spore Forming ، وغير مكونة للأبواغ ، Facultative Anaerobic ، وآخرون ، 2005) .

تتميز هذه البكتيريا بأنها قادرة على أن تنمو بصورة سريعة في الأوساط الاعتيادية Ordinary media . وهي تستهلك كل من الكلوكوز والكربوهيدرات الأخرى وتنتج حامضا وغازا. وتكون سالبة لفحص الاندول ومعظم السلالات موجبة لفحص الفوكس بروسكاور (Vogos-Proskauer) واستهلاك الستريت كمصدر وحيد للكربون ، بينما تكون متغيرة لفحص أحمر الميثيل (Methyl red). درجة الحرارة المثالية للنمو لهذه البكتيريا هي 37 م° وهناك بعض السلالات التي تنتج مستعمرات ذات لون اصفر فاقع عند حرارة 25 م° أو ذات لون اصفر باهت عند درجة حرارة 37 م° بينما تتميز بعض السلالات البيئية بأنها تعطي تفاعلات كيميائية-حياتية متذبذبة وغير مستقرة عند درجة حرارة 37 م° . وهي ذات تغذية كيميائية عضوية Chemo-organo trophic ، تمتلك القدرة على كلا نوعي الايض التنفسي والتخميري ، وتميع الجيلاتين. لا تنتج إنزيمي DNase واللايباز Lipase ، وعدم قدرتها على إنتاج كبريتيد الهيدروجين H₂S (Brenner وآخرون ، 2005) .

تتميز هذه البكتيريا بأن بعض أنواعها ينتج البكتيريوسين والبعض الآخر يستطيع إنتاج سموم معوية Enterotoxins تشبه السموم المعوية التي تنتجها بكتيريا *E.coli* (Ghodhbane وآخرون ، 2015) . هناك بعض من سلالات بكتيريا *E.cloacae* تقوم بإنتاج نوعا من السموم والذي يكون مشابها لسم الشيك Shiga toxin الذي تنتجه بكتيريا *E.coli* (Probert وآخرون ، 2014) .

يمكن التفريق بين جنس *Enterobacter* وبعض الأجناس القريبة منه والتابعة للعائلة المعوية وذلك بالاعتماد على بعض الاختبارات ، إذ يفرق جنس *Enterobacter* عن جنس *Klebsiella* من خلال اختبار الحركة حيث يكون الجنس الاول متحركا أما الثاني فيكون غير

متحرك ، ويفرق عن جنس *Hafinia* اعتمادا على حساسيته للعاثيات *Hafinia* phage حيث يكون جنس *Enterobacter* سالبا لهذا الاختبار. ويفرق عن جنس *Serratia* بالاعتماد على اختبار إنتاج إنزيم الـ DNase إذ إن جنس *Enterobacter* سالبا له ، أما *Serratia* فتعطي نتيجة موجبة (العبيدي ، 2013) .

3.2. التصنيف لبكتريا *Enterobacter cloacae*

Taxonomy of *Enterobacter cloacae*

جدول (1-2) : التصنيف العلمي Scientific classification (Gupta و Alnajjar ، 2017) .

Formal Rank	Example
Kingdom	Bacteria
Division	Proteobacteria
Class	Gamma proteobacteria
Order	Enterobacteriales
Family	Enterobacteriaceae
Genus	<i>Enterobacter</i>
Species	<i>cloacae</i>

حددت الطبعة الثانية من دليل بيرجي لعلم البكتريا Bergey's manual of systematic

bacteriology اثنا عشر نوعا species لجنس *Enterobacter* . أما موقع bacterio.net

وهو موقع متخصص يهدف إلى جمع آخر المعلومات الحديثة حول تصنيف البكتريا فإنه يحدد 34

نوعا لجنس *Enterobacter*. وأوضح كل من Sander و Sander (1997) إن هنالك 14 نوعا من جنس *Enterobacter*.

4.2. الوبائية لبكتريا *Enterobacter* spp. :

Epidemiology of *Enterobacter* spp.

تنتشر بكتريا *Enterobacter* بصورة واسعة في البيئات الطبيعية في الماء والمجاري والخضراوات والتربة ، وتتواجد في امعاء الانسان بوصفها جزءا من المحتوى الميكروبي الطبيعي Normal flora ، إلا إن هذه البكتريا ظهرت اثناء العقود الأخيرة بوصفها من مسببات المرضية المنتقلة في بيئة المستشفيات Nosocomial pathogens ومنها وحدة العناية المركزة intensive care units (ICUs) (Sander و Sander ، 1997) .

بين Lodise وآخرون (2017) ان هذه البكتريا تنتشر بشكل كبير في المستشفيات الأمريكية ولمدة طويلة ، كما انها عزلت من مرضى يعانون من الاورام الخبيثة ومرض السكري والحروق الشديدة ، فضلا عن عزلها من المرضى الذين يعانون من الكبت المناعي . Immunesuppression

أشار Davin-Regli و Pagès (2015) إلى إمكانية عزل *E.cloacae* من بعض الأجهزة والأدوات الطبية في المستشفيات. إضافة إلى ذلك تم عزلها من أيدي العاملين في المستشفيات والسماعات الطبية ومسحات القطن والأجهزة المستخدمة لرصد الضغط داخل الشرايين ، مما يساعد في زيادة التلوث بها لدى الرافدين في المستشفيات (Wang وآخرون ، 2017) .

تكتسب الإصابات ببكتريا *Enterobacter* من مصادر داخلية أو خارجية ، لأنها يمكن أن تتواجد في كل مكان في الطبيعة ومع هذا لا يمكن أن تعزى أكثر الإصابات الانتهازية إلى مصدر

خارجي واحد فأغلب الإصابات الانتهازية ببكتريا *Enterobacter* تنشأ داخليا من المنطقة المعوية لشخص مصاب مسبقا بمرض آخر (Kanemitsu وآخرون ، 2007) . وقد يصاب المرضى بأكثر من نوع واحد من السلالات البكتيرية في أي وقت ولهذا يبدو أن الوهن الشديد الذي يرافق الإصابة مع عدم تأثير المضادات الحيوية على الفلورا الطبيعية يوفر دعما كبيرا للإصابة بأحد أنواع بكتريا *Enterobacter* ويمكن القول بأن الأمراض التي تسبب الوهن الشديد والبقاء المطول في المستشفيات أهم سببين للإصابة ببكتريا *Enterobacter* (Lin وآخرون ، 2006).

بينت الدراسات ان أنواع بكتريا *Enterobacter* الواسعة الانتشار في بيئة المستشفيات تضم : *E.cloacae* ، *E.asburiae* ، *E.hormaechei* ، *E.kobei* ، *E.ludwigii* و *E.nimipressuralis* وبعد النوع *E.cloacae* الأكثر أهمية وانتشارا في المؤسسات الصحية وعلى الصعيد العالمي ، ولاسيما إنها تسبب 5% من حالات تعفن الدم المكتسب عن طريق المستشفيات (Hospital acquired sepsis) (Paauw وآخرون ، 2008) .

5.2. الأمراض لـ *Enterobacter* spp. :

Pathogenicity of *Enterobacter* spp.

تتواجد بكتريا *Enterobacter* في البيئة الطبيعية في الماء والمجاري والتربة. و هذه البكتريا أصبحت مؤخرا من الممرضات الانتهازية الخطرة Pathogens Opportunistic وخصوصا في بيئات المستشفى (Lodise وآخرون ، 2017) ، لهذا السبب اتجه العديد من الباحثين لدراسة وبائية وامراضية هذه البكتريا ، إذ بينت تلك الدراسات إن جنس *Enterobacter* يضم العديد من الأنواع الممرضة ، إلا أن النوعين *E.aerogenes* و *E.cloacae* يعتبران الأكثر ضراوة وشيوعا في هذا الجنس (Kasper وآخرون ، 2004) .

ويعد النوع *E.cloacae* النوع الأهم في هذا الجنس إذ يسبب (65-75)% من الاصابات المتسببة من جنس *Enterobacter* التي تصيب الإنسان (حميد ، 2016) .

تسبب بكتريا *Enterobacter* الكثير من الاخماج منها الخراج الدماغي cerebral abscess وذات الرئة pneumonia والتهاب السحايا meningitis وتسمم الدم septicemia والتهاب المسالك البولية UTI وخصوصا القثطرة البولية والتهابات الأمعاء (Farmer وآخرون ، 2007) .

تسبب هذه البكتريا أيضا الإصابات التي ينتج عنها أمراض كالتهاب شغاف القلب والتهاب المفاصل والتهاب نخاع العظم والتهاب العيون (Brenner وآخرون ، 2005) . أشار الباحثون إلى أن السبب الرئيسي في قابلية هذه البكتريا على إحداث الأخماج وبشكل خاص تلك الاخماج التي تكتسب في المستشفيات يعود إلى قدرتها على مقاومة التراكيز العالية من المضادات الحيوية وكذلك قدرتها على العيش في بيئة المستشفيات ومقاومتها لمحاليل التنظيف والتعقيم في المستشفى ، بالإضافة إلى إنها تمتلك العديد من عوامل الضراوة (Brenner وآخرون ، 2005) . وأوضح الباحثون ان آلية حدوث الخمج المتسببة عن هذه البكتريا مرتبطة بقدرتها على الاستيطان والالتصاق وغزو المضيف وصد دفاعات الجهاز المناعي وهذا مرتبط بقدرتها على إنتاج عوامل الضراوة التي تساعدها في إحداث الخمج ، فضلا عن استخدام المعالجة بالمضادات الحيوية ذات التأثير غير الفعال على هذه البكتريا قد يساعدها على الاستيطان وإحداث الإصابة عن طريق تحفيزها على النمو في القناة الهضمية ، إذ تلتصق بجدار الأمعاء مما يساعدها على الانتقال من تجويف الامعاء الى العقد اللمفاوية المساريقية ومن ثم إلى الاعضاء الأخرى مسببة تجرثم الدم Bacteremia (Kasper وآخرون ، 2004) ، ولاسيما إن الوفيات الحاصلة في حالة تجرثم الدم بسبب الإصابة ببكتريا *E.cloacae* هي الأعلى ضمن الأنواع التابعة للجنس حيث سجلت نسب

عالية من الوفيات المقترنة بهذه البكتيريا في عدة دول (Da silva وآخرون ، 2017 ، Choe وآخرون ، 2017)

6.2. عوامل الضراوة لبكتيريا *Enterobacter* spp. :

Virulence factors of *Enterobacter* spp.

الضراوة هي القدرة الكمية للكائنات المجهرية لإحداث خمج أو مرض أو يمكن تعريفها بأنها درجة الأمراض وتُقاس عادة بأعداد الكائنات المجهرية الضرورية لإحداث خمج في المضيف (Mahon وآخرون ، 2015) .

تعرف عوامل الضراوة بأنها جزيئات تكونها البكتيريا الممرضة تؤثر على الجسم المضيف بطريقة تجعل البكتيريا تنمو وتصبح أكثر فعالية (Brown ، 2013) . تمتلك بكتيريا *Enterobacter* القابلية لإنتاج عوامل ضراوة وهذه العوامل تجعلها مسؤولة عن العديد من الاصابات التي تصيب البشر ومن هذه العوامل :

1.6.2. تكوين الغشاء الحيوي : Biofilm Formation

تعتبر الأغشية الحيوية أنظمة بيئية مجهرية معقدة على شكل بوليمرات عضوية مرتبطة بسطح الخلية، تحتوي على جزيئات من البروتينات ، والدهون ، والدهون الفوسفورية ، والكاربوهيدرات ، والمعادن ، والفيتامينات ، وبالتالي تشكل هذه الجزيئات طبقة والتي تقوم بحماية الكائن المجهر الذي يعيش بداخلها (Soares وآخرون ، 2016) .

يتكون الغشاء الحيوي من تراكم الكائنات الحية الدقيقة ومنتجاتها خارج الخلية لتشكل مجتمع منظم على السطح (Tenke وآخرون ، 2012) . إنّ المراحل المتتالية لتطور الأغشية الحيوية تشمل ارتباط البكتيريا على السطح ، الالتصاق ، النمو البكتيري ، تجمع وتراكم الخلايا

البكتيرية داخل مستعمرات دقيقة ، وأخيرا نضوج الخلايا الأمية وإنفصالها لتكوين مستعمرات جديدة من الأغشية الحيوية (Nakamura وآخرون ، 2008 ؛ Li وآخرون ، 2007) .

أكدت الدراسات قدرة أنواع من بكتريا *Enterobacter* spp. على تكوين الغشاء الحيوي مما يساعدها على الاستيطان وإحداث الخمج ، إذ كشف Zain و Binti (2009) عن قدرة هذه البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي على أنابيب تغذية حديثي الولادة infant feeding tubes . وأشار كل من Jacob و Kim (2010) إلى إمكانية منع الخمج المتسبب ببكتريا *Enterobacter* spp. من خلال تثبيط تكوينها للغشاء الحيوي .

إن القدرة على تكوين الغشاء الحيوي تعد إحدى أكثر العوامل انتشارا وضراوة في البكتريا ، وهذه القدرة من الممكن أن تتواجد في البكتريا التي تعيش في البيئة الخارجية أو الممرضات (Holá وآخرون ، 2006) .

2.6.2. الالتصاق : Adhesion

وصفت عملية الالتصاق بأنها عبارة عن توازن لتفاعلات التجاذب والتنافر ما بين الخلية البكتيرية والسطح وتكون عملية الالتصاق بالسطح من ثلاثة مراحل: النقل Transport ومن ثم عملية الالتصاق الأولي initial adhesion وأخيرا الاستعمار colonization (Sandle و Sandle ، 2013) .

إن طبيعة البكتريا للالتصاق هو ناتج عن وجود عدة ميزات في الغشاء الخارجي للخلية البكتيرية كالأهداب Pilli والاسواط flagella والبروتينات ومتعددات السكر الدهنية lipopolysaccharides (Atabek ، 2006). والأهداب Pilli هي عصيات ذات شكل يشبه الشعرة ذات قدرة لاصقة تبرز من سطح البكتريا. ويطلق عليها مؤخرا بمصطلح الشعيرات

fimbria والتي هي وظيفتها الأساسية جعل البكتيريا تلتصق بالسطح (Pizarro-Cerdá و Cossart ، 2006). وهذه الشعيرات عبارة عن تراكيب خيطية يتراوح قطرها من (2-8) نانوميتر وطولها (0.2 - 20) مايكروميتر وتتكون من مئات الوحدات الثانوية subunit المتكررة من بروتين الهديين Fimbrillin protein أو ما يسمى أيضا ببروتين pilin (Paul و Diana ، 2006) .

يمكن تصنيف الأهداب بحسب الشكل أو تبعا للوظيفة التي تؤديها، وعلى هذا الأساس لوحظت أنواع مختلفة من الأهداب ، مثل : الأهداب من النوع الأول Type I Fimbriae وهي مسؤولة عن التصاق البكتيريا مع الخلايا الظهارية وهي حساسة للمانوز إذ يثبط سكر المانوز عملية الالتصاق. ونوع آخر من الأهداب تكون مقاومة للمانوز وهي تساعد البكتيريا على الالتصاق مع الخلايا الظهارية للمجري البولية uroepithelial cells والفم والأمعاء بشكل رئيس (Grzymajlo وآخرون ، 2017) .

3.6.2. أنظمة الدفع : Efflux Pump System

أنظمة الدفع هي عبارة عن بروتينات تُسهّم في عملية انتقال المواد الأساسية السامة والمضادات الحيوية من الأغشية الخلوية إلى المحيط الخارجي. ويمكن تشخيص وجود أنظمة الدفع مختبريا بواسطة استخدام مثبطات أنظمة الدفع مثل m-Carbonyl cyanide و (CCCP)chlorophenylhydrazine و Phenyl alanine arginyl b-naphtylamide (PABN) (Dimude ، 2013) .

تظهر البكتيريا مقاومة للمضادات الحيوية من خلال آلية أنظمة الدفع والتي تقوم فيها نواقل الأغشية الداخلية والتي تعرف بأنظمة الدفع بمنع تراكم وتكتل الدواء داخل الخلايا البكتيرية . تم

اكتشاف هذه الآلية التي تستخدمها البكتيريا لمقاومة المضادات الحيوية وتم دراستها فسلجيا بالمختبر من قبل Levy (1974) (Andersen وآخرون ، 2015) .

4.6.2. البكتريوسينات : Bacteriocin

البكتريوسينات هي بروتينات أو ببتيديات تمتلك فعالية ميكروبية قاتلة ، أو تكون مثبتة لنمو الأنواع البكتيرية القريبة الصلة للكائن المنتج. وتحمي البكتيريا المنتجة لهذا النوع من السموم نفسها من السم الذي تنتجه وذلك من خلال آليات مناعية خاصة بها (Khan ، 2013) .

تنتج بكتريا *Enterobacter cloacae* البكتريوسين Bacteriocin ويدعى Cloacin. وأصبح مصطلح البكتريوسينات يطلق بصورة أكثر على البكتيريا الموجبة لصبغة جرام بينما يطلق مصطلح الكوليسين على السموم التي تنتجها البكتيريا السالبة لصبغة جرام (Bosák ، 2013) .

5.6.2. إنتاج الإنزيم المحلل للبروتين : Protease production

البروتياز هو من الإنزيمات التي تحلل البروتينات وتقوم بتكسير الأواصر الببتيدية في البروتينات وهي نوعان أما تتكون داخل الخلية Intracellular أو خارجها Extracellular تصنف الإنزيمات المحللة للبروتين إلى سبع مجاميع وتعدّ بكتريا *Enterobacter spp.* منتجة للبروتينات السيرينية Serine protease (Vincent ، 2014) .

تمتلك الإنزيمات المحللة للبروتين صفات مختلفة اعتمادا على فعاليتها وتركيبها ويمكن تصنيفها بحسب الوزن الجزيئي والشحنة التي تحملها أو المادة الأساس التي تعمل عليها أو الموقع الفعال site of action وعادة ما يتم تقسيم الإنزيمات المحللة للبروتينات على قسمين هما: إنزيمات الـ Endopeptidases وإنزيمات الـ Exopeptidases (Vincent ، 2014) .

يعمل Serine protease بشكل متخصص ، ويتراوح وزنه الجزيئي من 15 إلى 35 كيلو دالتون ، ويتميز هذا النوع من الإنزيمات بأنه يمكن تثبيطه باستخدام مثبطات مثل Aprotinin ، phenylmethylsulfonyl (PMSF) ، Diisopropyl phosphorofluoridate (DFP) fluorid (Vincent ، 2014) .

6.6.2. إنتاج اللايباز : Lipase production

اللايباز هو احد الإنزيمات التي تقوم بتحليل الكليسيريدات مائيا لتحرير أحماض دهنية وبالتالي ينتج عن ذلك الكليسيرول . ويتم تصنيف هذا النوع من الانزيمات بحسب :

(1) نوعية المادة الأساس وموقع الانشطار cleavage site

(2) تجانس وتمائل الأحماض الامينية .

تؤدي الإنزيمات المحللة للدهون دورا مهما بوصفها أحد عوامل الضراوة للبكتريا المرضية إذ تقوم بتنشيط البلعمة البكتيرية من خلال البلاعم السنخية alveolar macrophages (Bender و Flieger ، 2010) .

تقوم إنزيمات Lipases بصورة رئيسية بتحليل الدهون الفوسفاتية مائيا والتي تعدّ إحدى المكونات الرئيسية للأغشية الخلوية وهذا يؤدي بالتالي إلى التدمير الكامل للخلية نتيجة لتحلل الخلية المضيفة . وعلى الرغم من ذلك فلا يعدّ تدمير الغشاء الخلوي هو نتيجة تدمير الدهون بل هنالك سبب آخر وهو تراكم النواتج المدمرة للأغشية كإنزيم ليبوبروتين لايباز (LPL) Lipoprotein Lipase (Bender و Flieger ، 2010) .

7.6.2. الهيمولاييسين البكتيري : Bacterial Haemolysin

وهي سموم بكتيرية خارجية Exotoxins تقوم بتحليل كريات الدم الحمر، ويوجد إنزيم الهيمولاييسين على عدة أنواع النوع الاول هو الألفا-هيمولاييسين α -haemolysin الذي يفرز خارج الخلية و النوع الثاني هو بيتا-هيمولاييسين β -haemolysin وهو إنزيم مرتبط بالخلية ولا يمكن فصل فعاليته عن الفعاليات الأيضية للخلية والنوع الثالث γ -Haemolysin والذي يوجد في البكتريا المقاومة للكوينولونات ويحفز إنتاجه حامض النالديكيسك (Nalidixi acid) Lackie ، (2007) .

يعمل الهيمولاييسين من النوع ألفا او النوع بيتا على تحلل خلايا المضيف وذلك بواسطة أنشاء مسامات عبر الغشاء الساييتوبلازمي (الهنداوي ، 2013) .

تنتج بعض سلالات *E. cloacae* إنزيم الهيمولاييسين (Simi وآخرون ، 2003) ، وقد أشار Funfstuck و Stein (1997) إلى إن سلالات *Enterobacter spp.* المعزولة من أخماج الأمعاء Intestinal infections وأخماج المجاري البولية والتهابات البريتون Pretonitis تكون محملة للدم بنسبة 35 % (العبيدي ، 2013) .

8.6.2. المحفظة : Capsule

الكثير من أنواع البكتريا سواء كانت موجبة أو سالبة لصبغة جرام تكون محاطة بغشاء خارجي يتكون من السكريات المتعددة وهذا هو ما يدعى بالمحفظة (المشرقي ، 2003). و المحفظة هي عبارة عن سكريات متعددة بطبيعتها ولكن يمكن أن تتكون من إنزيمات phosphodiesterases وتتكون المحفظة كذلك من تكرار النيوكلويتيدات القليلة لأكثر من مونومر monomer ، وتصنع المحفظة على مستوى غشاء الخلية أو بشكل خارج الخلية

Extracellularly ، ويتميز الأفراد الذين يصابون بالبكتريا المكونة للمحفظة بوجود الأجسام المضادة للمحفظة في مصل الدم لديهم ، وتمنع المحفظة دخول ونفاذ الأصباغ المستخدمة ولهذا لا يمكن صبغها. وتستخدم طريقة التلوين السلبي Negative staining لإظهار وتمييز المحفظة (Kandi ، 2015) .

7.2. المضادات الحيوية : Antibiotics

تعتبر المضادات الحياتية مركبات كيميائية تنتج من قبل احياء مجهرية تحول نمو أحياء مجهرية أخرى بالقتل أو التثبيط (Nahler و Nahler ، 2017) . وهي من النواتج الايضية الثانوية الخاصة أو المحورة والتي تمتلك فعالية ضد مجاميع مختلفة من الأحياء المجهرية.و يمكن تقسيم المضادات الحياتية الى نوعين من المضادات بحسب تأثيرها فأما تكون ذات تأثير قاتل Bacteriocidal مثل البنسلينات أو تكون مثبطة لنمو البكتريا Bacteriostatic مثل التتراسايكلينات (Jacob ، 2015). و كذلك يمكن تقسيم المضادات الحياتية اعتمادا على طيف فعاليتها على مضادات واسعة الطيف Broad spectrum antibiotics مثل مضاد Gentamycin وتعمل على البكتريا السالبة والموجبة لملون جرام أو تكون ضيقة الطيف Narrow spectrum antibiotics مثل Penicillin إذ تقوم بالتأثير على مجموعة محددة من الأحياء المجهرية (Tortora وآخرون ، 2010) .

1.7.2. الكوينولونات : Quinolones .

تعتبر الكوينولونات مضادات حيوية فعالة ويعتبر مضاد حامض الناليديكسك Nalidixic acid من أهم أنواع الكوينولونات المستخدمة في علاج الأمراض التي تسببها العائلة المعوية خصوصا في علاج اخماج القناة البولية Urinary tract ، لان هذا النوع من الكوينولونات يصل

إلى تراكيزه العلاجية الفعالة therapeutically active concentrations فقط في تلك المنطقة من الجسم. (Kocsis، 2012) .

جاءت التحسينات والتعديلات الدوائية على حلقة الكوينولون الأساسية وذلك من خلال إضافة الفلورين fluorin في الموضع رقم 6 من الكاربون وإضافة البيرازينيل piperazynil عند الموضع رقم 7 من الكاربون وبالتالي ظهر ناتج الفلوروكوينولونات Fluoroquinolones. وتقسم مضادات الكوينولونات وذلك حسب فعاليتها إلى أربعة أجيال حيث تقع الكوينولونات الحامضية ضمن الجيل الأول الذي يضم مضاد Nalidixic acid ، بينما يضم الجيل الثاني الفلوروكوينولونات التي تشمل عدة مضادات منها مضادات Ciprofloxacin ، Norfloxacin ، Levofloxacin ، التي أثبتت فعاليتها ضد أنواع بكتريا العائلة المعوية. و يضم الجيل الثالث مضادات Gatifloxacin و Sparfloxacin و Grepafloxacin وتضم مضادات الجيل الرابع مضادات Moxifloxacin و Gemifloxacin و Trorafloxacin (Kocsis ، 2012) .

2.7.2. آلية عمل الكوينولونات : Mechanism of action

تتم هذه الآلية بواسطة تثبيط عمل النوع الثاني من انزيمات Topoisomerase أي انزيمات Topoisomerase IV و DNAgyrase . وهذين الانزيمين هما يكونان من الانزيمات التي تتضمنها عملية تضاعف النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA replication . حيث يقوم انزيم gyrase بتوليد لفات فائقة supercoils سلبية أو الإرخاء الايجابي لا DNA ، بينما يكون انزيم topoisomeraseIV مسؤولا عن فك ارتباط الـDNA بعد عملية التضاعف ، وتتكون مركبات تسبب إعاقة لانزيم الـtopoisomerase IV و gyrase لا DNA وبذلك تمنع من عملية تضاعف الـDNA وهذا بالتالي يؤدي إلى قتل الخلية البكتيرية (Kocsis ، 2012) .

إن إنزيم الـ DNAgyrase يعتبر هو الهدف في البكتريا السالبة لصبغة جرام بينما يعدّ إنزيم الـ topoisomerase-IV هو الهدف في البكتريا الموجبة لصبغة جرام (Andriole ، 2005) . وتقوم الكوينولونات بصورة أساسية بتنشيط إنزيم الـ DNAgyrase في الخلية البكتيرية وهذا يمنع الالتفاف الفائق للـ Supercoiling of DNA حيث تعتبر هذه العملية هي العملية الضرورية والأساس لتثبيت الكروموسومات في الخلية البكتيرية (Bennet و Brown ، 2008) . ومن ناحية أخرى، يقوم إنزيم الـ Topoisomerase- IV وبصورة أولية بمسؤولية فك ارتباط الكروموسومات المتضاعفة، حيث ترتبط الكوينولونات بمعقد DNA لإنزيمات الـ DNAgyrase و إنزيمات الـ Topoisomerase - IV وبالتالي سيكون هذا مسؤولاً عن تنشيط تضاعف الـ DNA (Kocsis ، 2012) .

3.7.2. آلية مقاومة البكتريا لمضادات الكوينولونات : Mechanism of resistance

تنشأ مقاومة الكوينولونات عادة في جنس بكتريا *Enterobacter* نتيجة حصول الطفرات الوراثية في جينات التشفير للنوع الثاني من إنزيمات topoisomerase اومضخات الدفق ولكن بينت بعض الابحاث إن مقاومة الكوينولونات يمكن أن تحدث كذلك بسبب البلازميدات (Poirel وآخرون ، 2006) .

وجدت هنالك آليتان للمقاومة البكتيرية للكوينولونات وإن احد أهم هذه الآليات في العائلة المعوية هو تراكم accumulation الطفرات الوراثية في الجينات المشفرة للإنزيمات البكتيرية التي تستهدفها الكوينولونات أي إنزيمات DNA gyrase و DNA topoisomerase IV (Hooper ، 2003) .

تتحد الكوينولونات بهذه الإنزيمات وبالتالي تعمل على جعل مركب الـ DNA الذي تكون نتيجة هذا الارتباط أكثر استقراراً وتسمح بذلك تجمع أو تراكم أجزاء من الـ DNA ذات السلسلة المضاعفة المميتة والتي لا يمكن إصلاحها (Froelich-Ammon و Osheroff ، 1995) .

وعلى الجين المشفر Coding Gene للإنزيمات المستهدفة (وهذه الجينات هي الآتي: جين *gyrA* ، *gyrB* لإنزيم DNA gyrase و جين *parC* ، *parE* لإنزيم DNA topoisomerase IV) هنالك مناطق تحدد مقاومة الكوينولونات وتسمى بـ (QRDRs) . مثلاً أجزاء من سطح الإنزيم الملتصق بالـ DNA والتي يمكن للأحماض الأمينية المستبدلة أن تقلل من اتحاد أو التصاق الكوينولون. وبصورة عامة فإنه يتطلب حصول طفرات وراثية متعددة لحدوث مقاومة الكوينولونات في العائلة المعوية (Kocsis ، 2012) .

والآلية الثانية هي تراكم الدواء داخل الخلية المنخفض بواسطة زيادة مضخات وأنظمة الدفع الطبيعية . وكذلك انخفاض عدد الثغور porins في الأغشية الخارجية ، والكثير من أنواع العائلة المعوية تمتلك مضخات دفع من نوع AcrAB-TolC و هي من أنواع مضخات دفع resistance-nodulation division (RND) ويعدّ الـ AcrA من البروتينات المدمجة في الغشاء الخارجي membrane fusion protein ويعدّ الـ AcrB مضخة غشائية داخلية والـ TolC هو بروتين غشاء خارجي وكل من هذه تعمل على بناء مضخة دفع والذي يؤدي التدفق الزائد Overexpression فيها إلى مقاومة عالية المستوى لمضادات الكوينولونات (Poole ، 2005) .

4.7.2. محددات مقاومة الكوينولونات بواسطة البلازميد : Plasmid-mediated quinolone resistance determinants

هنالك ثلاث آليات تم الكشف عنها وهي محددات الـ Qnr ومضخات دفع الكوينولونات الخاصة وانزيم aminoglycoside acetyltransferase(6')-Ib-cr وتقع جينات هذه المحددات على البلازميد Plasmid Localized وهي تسبب بصورة فردية مقاومة ذات مستوى واطئ (Kocsis, 2012).

هنالك ثلاث آليات رئيسة التي بواسطتها يستطيع الكائن المجهرى بأن يصبح مقاوما للمضادات الحيوية ، وهذه تشمل انتاج الانزيمات وتغيير في هدف العلاج المستخدم وتغيير قابلية العلاج للدخول او التراكم في الخلية ، والآلية الأولى غالبا ما تتضمن في مقاومة أنواع بكتريا *Enterobacter* لمضادات البيتا-لاكتام والأمينوكلايكوسايد ، بينما الاثنان الاخرتان غالبا ما تتضمن في المقاومة لمركبات الكوينولون quinolones (Bagde و Nirbhavane ، 2017) .

أصبحت أنواع بكتريا *Enterobacter* مقاومة للكثير من المضادات الحيوية بسبب كثرة استخدام هذه المضادات في علاج الإصابات بهذه البكتريا ، إذ إن اكتساب صفة المقاومة لهذه البكتريا ضد مضادات الكوينولون وغيرها من المضادات الحيوية الاخرى نوقشت ووثقت كثيرا في البحوث العلمية (Thiolas وآخرون ، 2005) .

5.7.2. محددات المقاومة للكوينولونات :

Quinolone Resistance determinants (Qnr)

تعود بروتينات الـ Qnr الى عائلة بروتينات pentapeptide-repeat والتي تتميز بوصفها عبارة عن رديف Tandem لتكرار خمسة احماض امينية مع موتيف Motif متكرر [Ser, Thr,

[Gly] [Ser,Thr or Arg] [Leu or Phe] [Asp or Asn] [Ala or Val] والموتيف عبارة

عن تركيب ثانوي في البروتينات يمنح البروتينات وظيفتها .

هنالك اكثر من 500 نوع من البروتينات التي تحتوي على موتيف -Pentapeptide Repeat

ولكن وظيفة جميع هذه البروتينات تقريبا غير معروفة (Vetting وآخرون ، 2006) .

ظهرت عدة أنواع من محددات الـ Qnr وتم تمييزها وتسميتها كـ Qnr A و Qnr B و

S Qnr و Qnr C و Qnr D وتم وصف ودراسة جيناتها في عزلات بكتيرية مأخوذة من عينات

سريرية بشرية في الكثير من الدراسات والأبحاث حول العالم (Robicsek وآخرون ، 2006) .

وأول *qnr* والذي يسمى اليوم بـ *qnrA1* تم اكتشافه لأول مرة عام 1998 من بكتريا *K.*

pneumonia وهنالك سبعة أنواع من جينات الـ *qnr* . واما الـ *qnrS* فقد تم اكتشافه في عام

2005 في بكتريا *Shigella flexneri 2b* و له خمسة أنواع . اما جين *qnrB* فهو يحتوي على

47 اليل مختلف وأولها تم اكتشافه في عام 2006 في بكتريا *K. pneumonia* وتم اكتشاف

النوعين الاخيرين في عام 2009 حيث اكتشف جين *qnrC* في بكتريا *Proteus mirabilis*

وجين *qnrD* في بكتريا *Salmonella enterica* Sero var Kentucky و سالمونيلا

Bovismorbificans (Kocsis ، 2012) . وهنالك جينات *qnr* كروموسومية تم اكتشافها

وتسميتها على اساس الكائنات التي وجدت فيها فمثلا جين *Vvqnr* سمي لانه وجد في بكتريا

Vibrio vulnificans وجين *Efqnr* نسبة لوجوده في بكتريا *Enterococcus faecalis*

(Jacoby وآخرون ، 2008) .

ان التأثير المباشر لجين *qnrA* يأتي من خلال عملية التنشيط العكسي للالتفاف الفائق

لـ DNA والذي يسببه مضاد الـ Ciprofloxacin . يقوم جين *qnrA* المتحد مع انزيم DNA

gyrase او انزيم topoisomerase IV بتنشيط عملية تداخل DNA مع انزيم gyrase وقد يكون على الاقل وبشكل جزئي هو سبب الحماية ضد الكوينولونات وذلك من خلال تقليل الفرص لهذه المواد من ان تجعل مركب الكوينولون DNA وإنزيم gyrase أكثر استقرارا (Robicsek وآخرون ، 2006) .

وفي دراسة لـ Martinez-Martinez وآخرون (1998) وجدوا بان أول بلازميد يحتوي على جين *qnr* الـ (pMG252) كان ممكن انتقاله عبر عملية الاقتران الوراثي conjugation من بكتريا *E.coli* و بكتريا *C. freundii* وبكتريا *S. typhimurium* وبكتريا *P. aeruginosa* وكانت مقاومة الكوينولونات موجودة في جميع السلالات وكان التركيز المثبط الأدنى MIC لمضاد الـ Ciprofloxacin يظهر زيادة من 2 الى 5 مرات على مستوى المقاومة ذات المستوى الواطئ. وظهرت اعلى مقاومة وفي جميع الأجناس البكتيرية في عينة الدراسة كانت مع Nalidixic acid واقلها كانت مع التراكيز المثبطة الدنيا للـ Ciprofloxacin وازدادت معدلات الطفرة الوراثية بنسبة 100 مرة للبكتريا التي كانت تحتوي على البلازميد بالمقارنة مع البكتريا التي لم تحتوي على البلازميد (Kocsis ، 2012) .

ولتفسير هذا النوع من الطفرات لجينات الـ *qnr* التي تحدث على مستوى الكروموسوم فان هذا يكون بسبب تحفيز وإرسال إشارة إنقاذ من الخلايا البكتيرية عندما يحدث ضرر على DNA ، ويكون البروتين LexA هو المنظم المركزي والرئيسي لعملية الاستجابة لإشارة الانقاذ التي ترسلها الخلية البكتيرية والذي يكبح التعبير الجيني للـ *qnrB* (Kocsis ، 2012) .

حدد بروتين QnrB1 في سلسلة طويلة تتكون من 214 من الأحماض الامينية وان *qnrB1* يحتوي على بروتين يتشابه بنسبة 43% و 44% من الأحماض الامينية مع بروتينات جيني *qnrS* و *qnrA* (Jacoby وآخرون ، 2008) . وان اكتشاف جين *qnrB2* بين عزلات

بكتريا العائلة المعوية في الولايات المتحدة ونسخة جين *qnrB2* تختلف عن جين *qnrB1* بخمسة كودونات (Jacoby وآخرون ، 2008) وكذلك في احدى الولايات الامريكية تم التعرف على جين *qnrB3* و *qnrB4* ايضا بين افراد العائلة المعوية وتم تحديد جين الـ *qnrB5* في عزلات السالمونيلا *Salmonella non-typhi* (Gay وآخرون ، 2006) ، شخص جين *qnrB7* في بكتريا *Enterobacter cloacae* وجين *qnrB8* في بكتريا *C.freundii* (Cattoir وآخرون ، 2008) .

اكتشف *qnrB10* في بكتريا *C.freundii* وهو مختلف عن *qnrB1* بخمسة من الأحماض الأمينية وبروتين *qnrB12* موجود في *C.werkmanii* يختلف عن *qnrB1* بثمانية من الأحماض الأمينية ويختلف بخمسة من الصفات عن *qnrB10* (Kehrenberg وآخرون ، 2008) ، و *qnrB11* و *qnrB16* و *qnrB17* و *qnrB18* موجود بين مختلف عزلات بكتريا *C.freundii* (Quiroga وآخرون ، 2007) . عزل جين *qnrC* لأول مرة من بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من مرضى في الصين وهو يسبب مستوى المقاومة الواطنة لمجموعة الكوينولونات والجين المحمول على البلازميد PHS بـ 666bp بعد حصول عملية الاقتران البكتيري لوحظ زيادة MIC لمضاد السبروفلوكساسين (Wang وآخرون ، 2009) .

وكذلك عزل الجين من بكتريا *Providencia stuartii* في مصر أما جين *qnrS* حدد في اليابان وجين *qnrB* عزل من بكتريا في الهند و الولايات المتحدة الامريكية (Robicse وآخرون ، 2004) . ان جينات *qnr* توجد على البلازميدات وتنتقل بالاقتران البكتيري (Nordmann و Poirel ، 2005) .

8.2. تفاعل البلمرة التسلسلي PCR : Polymerase Chain Reaction

يعتبر تفاعل البلمرة التسلسلي طريقة مفيدة للتمييز والتعرف على الأنواع المختلفة لجينات المقاومة وتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction عبارة عن تقنية كيميائية تتضمن تضخيم تتابع من DNA سواء كان هذا التتابع جزءا من الجينوم أو ناتج من عملية الاستنساخ ، تتم هذه العملية بوجود شريط قالب الـ DNA الذي يحتوي على التتابع المطلوب تضخمه والمتكون من عشرات الآلاف من النيوكليوتيدات بوجود Taq DNA polymerase الثابت حراريا وبوجود زوج من البوادئ وهي عبارة عن قطعة تتكون من عدد من النيوكليوتيدات بالإضافة لمحللول الدارء يمثل وسط لإجراء أو حدوث التفاعل والذي يحتوي على القواعد النيتروجينية الاربعة (dNTPS) (Aljawasim ، 2014) .

تم اكتشاف طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل عن طريق العالم الأمريكي Kary Mullis عام 1986 وأصبحت تلك الطريقة التقنية الأساسية في علم الأحياء الجزيئي وعلم الكيمياء الحياتية . ويمكن تعريف هذه التقنية بأنها القدرة على حدوث تضاعف نوعي وكمي لقطعة أو قطع من الـ DNA إنزيميا وللملايين المرات خارج جسم الكائن الحي *in vitro* بوجود البادئات primers وبزمن قصير. وتعد تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي اليوم التقنية الأكثر رواجاً في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع أنحاء العالم والأساس الذي تعتمد عليه الكثير من الدراسات على مستوى الـ DNA لما تمتاز به من خصوصية من حيث قدرتها على التعامل مع أعداد كبيرة من النماذج إضافة إلى أنها لا تتطلب كميات كبيرة من الـ DNA (Domingues ، 2017) .

ويمكن اعتبار تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل ترجمة مبسطة لعملية استنساخ الـ DNA أثناء الانقسام الخلوي . ولكي تتم عملية الاستنساخ هذه يجب توفر مواد معينة تساعد في ذلك وهي كما يلي :

1. البادئات primers : وهي عبارة عن نيوكليوتيدات قليلة Oligonucleotides قادرة على الارتباط مع تسلسل الحامض النووي المراد تضخيمه وذلك في منطقة ذات تسلسل متمم وتعرف بمنطقة عالية الحفظ Highly Conserved Region .

2. كميات كبيرة من النيوكليوسيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الأوكسجين Deoxynucleoside triphosphates .

3. انزيم البوليميريز Polymerase المقاوم للحرارة المرتفعة وأهمها Taq Polymerase الذي يستخلص من بكتريا *Thermus aquaticus* التي تعيش في الينابيع الحارة .

4. محاليل منظمة buffer .

5. ايونات مناسبة ومن أهمها أيون المغنيسيوم الذي يعد عاملا مساعدا لأنزيم البوليميريز .

6. قالب DNA (Template DNA) : الذي يستعمل كقالب من الانزيمات لعمل شرائط DNA جديدة (Domingues ، 2017) .

ولخطورة انتشار جينات المقاومة البكتيرية ولما تسببه من خسائر اقتصادية وطول مدة العلاج للمرضى أدى ذلك إلى استعمال تقنية PCR من اجل دراستها والتحري السريع عنها. واستعملت تقنية الـ PCR في الكشف عن جينات *qnr* في البكتريا السالبة لصبغة جرام المعزولة من مصادر بيطرية أو من البكتريا المعزولة من مصادر بيئية ومن امثلتها

Aeromonadaceae و *Pseudomonadaceae* و *Enterobacteriaceae* و *Xanthomonadaceae* و *Moraxellaceae* و *Shewanellaceae* (الطائي ، 2012) .

كذلك استعملت تقنية الـ multiplex PCR في تحديد جينات *qnrA* و *qnrB* و *qnrS* وعزلت هذه الجينات من أنواع بكتريا من العائلة المعوية في النيجر (Moumouni وآخرون ، 2017) .

وفي دراسة تم إجراؤها في الصين استعملت تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل في تشخيص جينات *qnrA* و *qnrB* و *qnrS* في 179 عزلة من البكتريا السالبة لصبغة جرام وباستعمال بادئات نوعية معروفة التسلسل (Cai وآخرون ، 2011) .

تتكون تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل من ثلاثة مراحل :

1. مرحلة التسخن الحراري Thermal denaturation : وهي فصل الشريط المزدوج ds-DNA الى شريطين منفصلين ss-DNA وتتم هذه المرحلة عند درجة حرارة 90-95 م° .

2. مرحلة التئام البادئات primers Annealing : وهي تمثل ارتباط كلتا البادئتين مع الشريطين المنفصلين عند درجة حرارة 50-68 م° .

3. مرحلة إستطالة البادئات المهجنة Annealed primers extension : ويتم ذلك عن طريق إنزيم البوليميريز وذلك بإضافة dNTPs وتتم هذه المرحلة عند درجة حرارة 68-72 م° .

تعاد هذه الدورة ذات الخطوات الثلاث لعدة مرات مما يؤدي إلى زيادة جزيئات الـ DNA

(Domingues ، 2017) .

9.2. تقنية التسلسل لمورثة 16S rRNA :

Sequencing technique for 16S rRNA gene

إن الرايبوسوم البكتيري 70s يتألف من وحدتين فرعيتين وهما 50s و 30s . حيث أن كل وحدة فرعية تتكون من جزيئتين أو واحدة من جزيئات الرنا الرايبوسومي وعدد من السلاسل الببتايد المتعدد .

تحتوي الوحدة الفرعية الكبرى LSU (Large subunit) 50s على 23S rRNA و 5S rRNA ، أما الوحدة الفرعية الصغرى SSU (Small Subunit) 30s تحتوي على 16S rRNA (Prescott وآخرون ، 2005) . استعمل في العقدين الماضيين تقنية تعتمد على الحمض النووي الرايبي RNA والتي تعتبر ثورة في معرفة التنوع الميكروبي وخصوصا للأحياء المجهرية البيئية (Morris وآخرون ، 2002) . كذلك فقد اُمن استخدام التسلسل الجيني لمورثة 16S rRNA في تشخيص وإيجاد العلاقات التطورية بين سلالات البكتيريا المختلفة وساهمت هذه التقنية في إعادة تصنيف الكثير من الأنواع وُثم التعرف على أنواع بكتيرية جديدة لم يتم التعرف عليها سابقا بالطرق التقليدية (Brenner وآخرون ، 2004) حيث يتم استخدامها لجميع الأنواع البكتيرية سواء كانت موجبة أو سالبة لصبغة جرام (Ferroni وآخرون ، 2002) . يحتوي هذا الجين على عدة مناطق ثابتة تستعمل في تصميم البرايمرات المعتمدة في التصنيف والتي تحتوي على تسع مناطق متغيرة تعتمد في التمييز بين المجاميع التصنيفية والأنواع (Clarridge ، 2004) حيث يبلغ طول جين 16S rRNA في بكتريا *E. coli* 1500 زوج قاعدي وتمتلك معظم الكائنات الحية الأخرى الطول نفسه مع زيادة أو نقصان في 50 زوج قاعدي (حميد، 2016) .

تعتبر عملية تشخيص جين 16S rRNA التي تستخدم لدراسة علم التصنيف والوراثة

البكتيري أحد الطرق الأكثر شيوعا وذلك لعدة أسباب أهمها :

1. يوجد جين الـ 16S rRNA في جميع أنواع البكتيريا .

2. إن وظيفة جين الـ 16S rRNA لم تتغير عبر الزمن وبقيت نفسها رغم التطورات الحاصلة في علم الأحياء الجزيئي .

3. إن جين الـ 16S rRNA يعد ذا حجم كبير لإغراض الدراسة على المستوى الجزيئي .

(Janda و Abbott ، 2007) .

10.2. تسلسل الـ DNA : DNA sequencing

تشير عملية تسلسل الـ DNA الى الطرق والوسائل المتبعة لتحديد قواعد نيوكليوتيدات الـ Adenine والكوانين Guanine والساييتوسين Cytosine والثايمين Thymine في جزيئة الـ DNA . وهناك طرائق عديدة لتحديد تسلسل الـ DNA منها : طريقة ماكسام-كيلبرت Maxam Gilbert Sequencing – وطريقة إنهاء التسلسل Chain-termination وطريقة إنهاء الصبغة Dye-terminator والطريقة الكيمياوية والطريقة الانزيمية Enzymatic method وتعتبر هذه الطريقة من أكثر وأوسع الطرق انتشارا في عملية تحديد تسلسل الـ DNA . واكتشف هذه الطريقة العالم سانجر Sanger (Munshi ، 2012) .

تسلسل الحمض النووي DNA sequencing هو عملية تضخيم قالب DNA باستخدام PCR وبرايمر يرتبط بالمنطقة المراد دراستها. القطعة المضخمة يتم دراسة تتابعها الجيني باستخدام برايمر متالق بطريقة سانجر وهي الأكثر شيوعا يتم تطبيقها بسهولة على سلاسل طويلة من الحمض النووي كذلك جينات كاملة . ويستند هذا الأسلوب على إنهاء سلسلة من قبل دي ديوكسي نيوكليوتيد خلال تفاعلات استطالة Real-Time PCR . يتم الكشف عن لون كل جزء باستخدام شعاع الليزر ويتم جمع المعلومات من قبل جهاز كمبيوتر وبذلك يمكن تحديد تسلسل الحمض

النووي القالب (Kinde وآخرون ، 2011 ؛ Gundry وآخرون ، 2012 ؛ Michael وآخرون ، 2012) .

11.2. الطفرات : Mutation

الطفرات Mutations هي مفهوم مهم جدا في علم الأحياء اليوم . تؤدي الطفرات إلى حدوث اختلافات في الجينات ، هذه الجينات يمكن أن يكون لها تأثير جيد أو سيئ في خصائص الكائن الحي . أيضا تكون هذه الاختلافات مهمة جدا في التطور . وبدون وجود التغيرات لا يمكن حدوث التطور . الطفرة هي أي تغيير وراثي في تسلسل الحمض النووي . قد تؤثر أو لا تؤثر على النمط الظاهري للكائن (Schofield و Hsieh ، 2003 ؛ Jeremy و Simon ، 2010) . إن تغيرات في تسلسل الحمض النووي القالب (الطفرات) يمكن أن تؤثر بشكل كبير على نوع الناتج النهائي للبروتين (Snyder و Champness ، 2003) .

ويسمى الفرد الحامل للطفرة الطافر (mutant) . وقد تشمل الطفرات على عدة أزواج من القواعد النيتروجينية كما تحصل في حذف Deletion قطعة كبيرة من الـ DNA ، أو قد تحدث تغيرا في الشفرة الوراثية بواسطة طفرة نقطية Point Mutations أو طفرة تشمل على قاعدة نيتروجينية مفردة single base mutations . ويمكن تصنيف حالة الطفرة النقطية الى :

A. استبدال النيوكليوتيدات Substitution of a nucleotide : استبدال قاعدة ، وتسمى أيضا الطفرة النقطية Point mutation ، ينطوي على تغيير قاعدة واحدة في تسلسل الحمض النووي . يتم نسخ هذا الخطأ في أثناء التضاعف لإنتاج تغيير دائم .

إذا تم استبدال قاعدة بيورين مع بيورين واحد [A أو G] أو بيريميدين مع بيريميدين [C أو T] يسمى الاستبدال المكافئ Transition. أما إذا استبدال البيورين بالبيريميدين أو العكس ، ويسمى الاستبدال العكسي Transversion ، وهذه الآلية الأكثر شيوعا في حدوث الطفرات .

B. حذف أو إضافة النوكليوتيدات Deletion or addition of a nucleotide : حذف أو إضافة النوكليوتيدات بوساطة تكرار الحمض النووي . عندما ينقل الجين (عناصر القفز) يغرز نفسه في الجينات ، فإنه يؤدي إلى تعطيل الجين الهدف وتسمى طفرات الغرز insertional Mutation (Snyder و Champness ، 2003 ، Najafi و Pezeshki ، 2013 ، Jasim ، 2017) .

الفصل الثالث

المواد وطرائق
العمل

Materials
and Methods

3. المواد وطرائق العمل : Materials & Methods

1.3. المواد : Materials

1.1.3. الأجهزة و الأدوات المستعملة في الدراسة : Instruments and tools

استعملت في هذه الدراسة كل من الاجهزة و الادوات المبينة في الجدول (1.3) .

جدول (1-3) : الأجهزة و الأدوات المستعملة في الدراسة

ت	أسماء الأجهزة و الأدوات	الشركة المصنعة و(المنشأ)
1	مصدر الأشعة فوق البنفسجية	UV- transilluminator Atto (Japan)
2	جهاز تشخيص البكتريا	Vitek 2 compact
3	جهاز قياس الكثافة	McF Densichek plus
4	جهاز نذب مركزي	Centrifuge
5	حمام مائي	Water bath
6	فرن كهربائي	Oven
7	جهاز التقطير	Distillater
8	جهاز ترحيل كهربائي	Gel Electrophoresis Unite
9	مازج	Vortex
10	جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل	PCR
11	جهاز الدوار الحراري	Thermal Cycle
12	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة	Micropipettes
13	جهاز ELISA	Enzyme Linked Immunsorbent Assay
14	جهاز طرد مركزي دقيق	Micro centrifug
15	جهاز نذب صغير	Microfuge
16	جهاز تصوير الهلام	Gel documentation
17	كابينة تعقيم هواء	Laminar flow hood
18	مؤصدة	Autoclave
19	حاضنة	Incubator
20	ميزان الكتروني حساس	Sensitive electronic balance
21	مجهر ضوئي	Light microscope
22	كاميرا رقمية	Digital Camera
23	مقياس الأس الهيدروجيني	pH-meter
24	جهاز مقياس الكثافة الضوئية	Spectrophotometer
25	مسخن حراري ممغنط	Stirrer Plates Hot

2.1.3. المواد الكيميائية والبايولوجية : Biological and chemical substance

استعملت في هذه الدراسة كل من المواد الكيميائية والبايولوجية المبينة في الجدول (2.3)

التالي .

جدول (2-3) : المواد الكيميائية والبايولوجية المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	اسم المادة	ت
BDH (England)	α -Naphthol (C10H8O)	1 الفا - نفثول
	Agarose	2 أكاروز
	Barium chloride (BaCl ₂)	3 كلوريد الباريوم
	Dextrose	4 سكر الدكستروز
	Ethanol	5 كحول ايثيلي 95%
	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid	6 اثيلين داي أمين تتراسيتك اسيد
	Glycerol (C3H8O3)	7 كليسيرول
	Isomyl Alcohol	8 كحول ايزوميلي
	Peptone	9 ببتون
	Potassium Hydroxide (KOH)	10 هيدروكسيد البوتاسيوم
	Sodium Hydroxide (NaOH)	11 هيدروكسيد الصوديوم
	Sulfuric Acid	12 حامض الكبريتيك
	Trypton	13 تريتون
Bioneer (Korea)	PCR water	14 ماء سلسلة البلمرة
Biotech (Canada)	Boric Acid	15 حامض البوريك
	Trise-Base	16 ترس قاعدي
China	Glucose	17 سكر الكلوكوز
Fluka (Switzerland)	Sodium Chloride (NaCl)	18 كلوريد الصوديوم
Italy	Yeast extract	19 مستخلص الخميرة
Lab.Tech (Korea)	DdH2O	20 ماء منزوع الايونات
Merk (Germany)	Sucrose	21 سكروز
Oxoid (England)	Hydrogen peroxide (H2O2)	22 بيروكسيد الهيدروجين
	Agar-Agar	23 اكار - اكار

3.1.3. الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة : Culture media

استعملت في هذه الدراسة كل من الأوساط الزرعية المبينة في الجدول (3.3) .

جدول (3-3) : الأوساط الزرعية

الشركة المجهزة والمنشأ	الوسط	ت
Difco (U.S.A)	Trypticase Soy Broth	1 وسط مرق الصويا
	Triple – Sugar iron	2 وسط الحديد – ثلاثي السكر
Himedia (India)	Semi Solid Media	3 وسط الحركة شبه الصلب
	Urea Agar	4 وسط اليوريا اكار
	Nutrient Agar	5 وسط اكار المغذي
Oxoid (England)	MacConkey Agar	6 اكار الماكونكي
	Muller-Hinton Agar	7 اكار مولر هينتون
	Brain-Heart infusion Agar	8 اكار نقيع القلب والدماغ
	Brain-Heart infusion Broth	9 مرق نقيع القلب والدماغ
	Methyle Red/ Vogas Proskaur	10 وسط MR/VP
	Trypticase Soy Agar	11 وسط اكار الصويا
	Eosin Methylene Blue (EMB)	12 وسط الايوسين مثلين الازرق
	Simmon Citrate Agar	13 وسط سترات السايمون
	Kliglers Iron Agar	14 وسط اكار الحديد ثنائي السكر
	Nutrient Broth	15 وسط المرق المغذي
	Blood Agar Base	16 اكار الدم الاساس

4.1.3. الصبغات المستعملة : Stains

استعملت في هذه الدراسة كل من الصبغات المبينة في جدول (3 . 4) .

جدول (3-4) : الصبغات المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	اسم الصبغة	ت
BDH (England)	Methyl Red stain (C15H15N3O2)	1 صبغة احمر المثل
	Congo red stain	2 صبغة الكونكو الحمراء
Bioneer (Korea)	Loading Dye	3 صبغة التحميل
	Ethidium Bromide	4 بروميد الايثيديوم
China	Bromocresol purple	5 صبغة بروموكريسول الارجوانية
	Phenol red	6 صبغة احمر الفينول
Himedia (India)	Bromophenol blue stain	7 صبغة بروموفينول الازرق
	Crystal Violet Stain Safranin Stain Iodin Ethyl alchol 96%	8 مجموعة صبغة غرام : صبغة البنفسجي البلوري السفرانين الأيودين الكحول الايثيلي
	Indian ink	9 حبر هندي

5.1.3. العدد المختبرية : Laboratory Kits

استعملت في هذه الدراسة كل من العدد المختبرية المبينة في جدول (3 . 5) .

جدول (3-5) : العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	نوع الاستعمال	اسم عدة التشخيص
مصرف الدم / ديالى	تحضير وسط الدم الاساسي الصلب	دم بشري صنف AB
BioMerieux	لتشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام	VITEK- 2 GN card
	لتشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام	: API20E System الذي يضم أشرطة الفحص فضلا عن احتوائه على كل من :

		API Suspension Medium, Mineral Oil, Incubation Boxes و أيضا يضم الكواشف الآتية : VP1,VP2, James , TDA
Bioneer (Korea)	_____	Master Mix PCR
	DNA قياس احجام قطع الموجودة	سلم الحمض (100bp) القياسي النووي
Geneaid (Taiwan)	استخلاص DNA البكتريا	عدة استخلاص الحامض النووي البكتيري DNA Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit حيث تضم المحاليل الكافية لاجراء 100 تفاعل و كل تفاعل بحجم 50 مايكروليتر و هذه المحاليل هي : 1. Pellet cells solutions:- GT Buffer 30 ml Proteinase K 1.1 ml 2. Lyse cells solutions : - GB Buffer 40 ml 3. DNA Binding : - Absolute Ethanol 25 ml . GD Columns 100 . 4. Wash :- W 1 Buffer 45 ml . Wash Buffer 25 ml . 5. Elution :- Elution Buffer 30 ml و كذلك يضم فلاتر GD Columns و انابيب الجمع Collection tubes

6.1.3. المضادات الحيوية : Antibiotic discs

استعملت في هذه الدراسة كل من المضادات الحيوية المبينة في جدول (3-6) و جدول (3-7) .

جدول (3-6) : أقراص المضادات الحيوية Antibiotic Disk المستخدمة وأقطار منطقة التثبيط القياسية (CLSI ، 2016) .

الشركة المجهزة / المنشأ	قطر منطقة التثبيط بالمليمتر			تركيز القرص مكغم/قرص	الرمز	المضاد الحيوي
	حساسية S($\leq$)	متوسطة I	مقاومة R($\geq$)			
Merseyside (U.K.)	19	14-18	13	30	NA	Nalidixic acid
	17	14-16	13	5	LEV	Levofloxacin
Bioanalyse (Turkey)	21	16-20	15	5	CIP	Ciprofloxacin
	18	15-17	14	5	GAT	Gatifloxacin
	16	13-15	12	5	OFX	Ofloxacin
	17	13-16	12	10	NOR	Norfloxacin

جدول (3-7) : مساحيق المضادات الحيوية : Antibiotic Powders

الشركة المصنعة والمنشأ	المضاد
دار الدواء /الأردن	Ciprofloxacin
Julphar (Germany)	Nalidixic acid

7.1.3. بادئات الـ DNA : DNA Primers

استعملت في هذه الدراسة البادئات الخاصة بجين 16S rRNA و المسؤول عن تشخيص بكتريا *Enterobacter cloacae* و كذلك تم استعمال البادئات المسؤولة عن تحديد بعض جينات المقاومة لمضادات الكوينولونات لهذه البكتريا و قد صممت بادئات 16S rRNA و *qnrB*

من خلال استخدام موقع NCB1-Gebank Database و برنامج Primer3plus design اما بادئ *qnrS* وفقا لما ورد في (cano وآخرون ، 2009) .

و تم تجهيز جميع البادئات من خلال شركة Bioneer الكورية .

جدول (8-3) : تتابعات البوادي النوعية لجينات 16S rRNA و *qnrB* و *qnrS* لبكتريا

Enterobacter cloacae وحجم الناتج المتوقع لكل بادئ

ت	البادئ Primer	تتابع البادئ Primer Sequence (5`— 3`)	عدد القواعدbp	درجة الارتباط	حجم الناتج bp	المصدر
1	16S rRNA	F AGTTTGATCATGGCTCAG	18	56 م	1380 زوج قاعدة	This study
		R AGGCCCGGGAACGTATTCAC	20			
2	qnrB	F GACAGAAACCGTTTCACCGGT	21	54 م	595 زوج قاعدة	
		R CAAGTCGCTCCATGAGCAACG	21			
3	qnrS	F TGG AAA CCT ACA ATC ATA CA	20	56 م	599 زوج قاعدة	cano) وآخرون ، (2009
		R TGC AAT TTT GAT ACC TGA TG	20			

F = Forward / R = Reverse

8.1.3. الانزيمات المستخدمة في الدراسة :

استخدم أنزيم Proteinase K في هذه الدراسة المجهز من شركة Bioneer \ Korea .

2.3. طرائق العمل : Methods :

1.2.3. طرائق التعقيم : Sterilization methods :

– التعقيم بالمؤسسة : Autoclave sterilization :

عُقت الاوساط الزرعية والمحاليل والكواشف التي تحتاج الى تعقيم باستخدام جهاز

المؤسسة Autoclave بدرجة حرارة 121 م لمدة 15 دقيقة تحت ضغط 15 باوند/انج² .

- التعقيم بالحرارة الجافة : Dry Sterilization

عُقمت جميع الأدوات الزجاجية المستخدمة في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 180 م° ولمدة ساعتين .

- التعقيم الغشائي : Membrane Sterilization

عُقمت المواد و المحاليل التي تتلف عند تعرضها الى درجات الحرارة العالية كما هو الحال في السكريات واليوريا و المضادات الحيوية بواسطة مرشحات غشائية دقيقة Millipore filters ذات أقطار 0.22 مايكروميتر (Benson ، 2002) .

2.2.3 . المحاليل المستخدمة في الدراسة : preparation of Solutions

1.2.2.3 . المحلول الملحي الفسلجي : Normal saline Solution

حُضر المحلول بإذابة 8.5 غرام من كلوريد الصوديوم NaCl في 1000 مليلتر من الماء المقطر، بعدها عُقم بالمؤصدة بعد ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7 ، ثم حُفظ بدرجة حرارة 4 م° لحين الإستخدام ، استعمل هذا المحلول في التجارب الدراسية لعمل التخافيف واعداد اللقاح البكتيري المباشر ، (Atlas وآخرون ، 1995) .

2.2.2.3 . محلول ثابت العكرة القياسي : Macfarland Standard

أُستعمل المحلول المجهز من شركة France \ Biomérieux ، لمُعيرة عدد الخلايا البكتيرية ، حيث يعطي عددا تقريبا للخلايا وهو $10^8 \times 1.5$ خلية \ مل .

3.2.2.3 . محلول ملحي استعمل في جهاز VITEK 2

حُضر المحلول بإذابة 0.5 غم من كلوريد الصوديوم NaCl في 95 مليلتر ماء مقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مليلتر، وعُقم بالمؤصدة ، ثم حُفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الإستعمال .

4.2.2.3. محاليل المضادات الحيوية : Antibiotic Solutions

حضرت المحاليل الخزينة Stock Solutions بتركيز نهائي مقداره 10 ملغم/ مل وذلك حسب ما ورد في (CLSI ، 2016) . لكل من مضادَي Ciprofloxacin و Nalidixic acid بإذابة 1 غم من المضاد في 90 مل من الماء المقطر، بعدها أكمل الحجم الى 100 مل ثم عقرت المحاليل بالترشيح بواسطة مرشحات دقيقة أقطارها 0.22 مايكروميتر وحفظت بالثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال .

5.2.2.3. محلول صبغة البلور البنفسجي : Crystal violet solution (%1)

حضر هذا المحلول بتركيز 1% حيث اذيب 1غم من Crystal violet في 100مل من الماء المقطر ،وعقم بالترشيح ثم حفظ في قنينة زجاجية معتمة وفي درجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال في كشف العزلات البكتيرية على تكوينها للغشاء الحيوي Biofilm (Namasivayam وآخرون ، 2013) .

6.2.2.3. محلول صبغة السفرانين : Safranin Stain solution (%1)

حضر هذا المحلول بإذابة 0.1 غم من صبغة السفرانين Safranin Stain في 100مل من الماء المقطر، وعقم المحلول بطريقة الترشيح ، ثم حفظ في قنينة زجاجية معتمة ومحكمة الغطاء و في درجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال (Christensen وآخرون ، 1982).

7.2.2.3. محلول هيدروكسيد البوتاسيوم : KOH Solution (%10)

حضر هذا المحلول بإذابة 10 غم من KOH في 100 مل من الماء المقطر، ثم عقم بالمؤصدة (Meng وZhang ، 2014) .

8.2.2.3 . محاليل الترحيل الكهربائي : Gel Electrophoresis Solutions

حُضرت هذه المحاليل وفقا لما ورد في (Sambrook و Russell ، 2001) وكما يأتي :

A.8.2.2.3 . محلول خزين بروميد الإيثيديوم : Ethidium Bromide Stock Solution

حُضر المحلول للحصول على تركيز نهائي مقداره 5 ملغم ١ مل، بإذابة 5 ملغم من صبغة بروميد الإيثيديوم في 9 مل من الماء المقطر، ثم أُكمل الحجم إلى 10 مل بالماء المقطر .

B.8.2.2.3 . دارئ التحميل : Loading buffer 6x

حضر من كليسيرول 30 % ، TBE 50 % ، ماء مقطر 20 % ، صبغة بروموفينول الازرق 0.25 % .

C.8.2.2.3 . محلول داريء الترسي حامض البوريك : Tris-Boric acid-EDTA (TBE10x)

يتكون هذا المحلول من 0.089 مولار من ترسي قاعدي Tris-OH ، و 0.089 مولار من حامض البوريك Boric acid و 0.002 مولار من مادة Na₂-EDTA في 800 مليلتر من الماء المقطر ، وأكمل الحجم إلى 1 لتر، وعقم بالموصدة بعد ضبط الأس الهيدروجيني إلى 8 ، وحفظ بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال.

D.8.2.2.3 . محلول الدليل الحجمي : DNA Ladder

أستعمل هذا المحلول DNA Ladder (100-2000 زوج قاعدة) المحضر والمجهز مسبقا من قبل شركة Bioneer\Korea ، ملحق (2) .

E.8.2.2.3. محلول EDTA (0.5 مولار) Ethylen diamine tetra acetic acid

حضر المحلول باضافة 18.6 غم من الـ EDTA الى 100 مليلتر من الماء المقطر المعقم ، وعقم بالمؤصدة بعد ضبط الاس الهيدروجيني الى 8 باستعمال هيدروكسيد الصوديوم NaOH (Bhalerao وآخرون ، 2010) .

9.2.2.3. المحاليل المستخدمة في عزل الدنا البكتيري : DNA- Extraction Solutions

أستعملت عدة أستخلاص DNA المجهزة من قبل شركة Bioneer \Korea لأستخلاص الـ DNA البكتيري ، حيث تتكون من عدة مكونات كما موضح في جدول (3-9)

جدول (3-9) : مكونات عدة إستخلاص الدنا البكتيري

NO.	Kit Components
1	Pellet cells solutions :- GT Buffer 30 ml Proteinase K 1.1 ml
2	Lyse cells solutions : - GB Buffer 40 ml
3	DNA Binding : - Absolute Ethanol 25 ml . GD Columns 100 .
4	Wash :- W 1 Buffer 45 ml . Wash Buffer 25 ml .
5	Elution :- Elution Buffer 30 ml

10.2.2.3. الإنزيمات المستخدمة في عزل DNA البكتيري :

إنزيم Proteinase K ، حيث حضر بإذابة 11 ملغم في 1.1 مل ماء مقطر منزوع الاستقطاب ddH₂O .

11.2.2.3. المحاليل المستعملة في التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA PCR :

1- محلول PCR Pre Mix

أستعمل محلول PCR PreMix المحضر والمجهز مسبقا من قبل شركة Korea \ Bioneer ، ملحق (3) .

2- محاليل البوداي : Primers Solutions

حضرت المحاليل الخزينة حسب تعليمات الشركة المُجهزة لها Bioneer بإستعمال ddH₂O للحصول على تركيز 100 بيكومول \ مايكروليتر .

حيث تم تحضير محلول كل بادئ بشكل منفصل بتركيز 10 بيكومول \ مايكروليتر ، باخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين لكل برايمر (بادئ) وإضافته الى 90 مايكروليتر من ddH₂O ومُزج جيدا ثم حُفظ لحين الاستعمال في الثلجة ، في حين تم حفظ المحاليل الخزينة للبوداي في درجة حرارة -20 م° مع مُراعاة مزج المحلول بعد اخراجه من الثلجة باستعمال المازج Vortex لمُجانسته قبل الاستعمال . وكما موضح في جدول (3-8) وملحق (6) .

12.2.2.3. محلول صبغة غرام Gram Stain

استعملت الصبغات الجاهزة والمكونة من كل من محلول صبغة الكريستال البنفسجية ، محلول الايودين، الكحول المطلق ومحلول صبغة السفرانين و المجهزة من شركة Himedia/India ، في تصبيغ الشرائح الزجاجية المحضرة من مزارع البكتريا لملاحظة صفاتها المجهرية وتصنيفها الى سالبة وموجبة (Atlas وآخرون ، 1995) .

3.2.3. الكواشف المستخدمة في تشخيص البكتريا : Reagents used to diagnose bacteria

1.3.2.3. كاشف انزيم الكاتليز : Catalase reagent

حضر بتركيز 3 % من بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide ، باذابة 3 مل من H₂O₂ في 100 مليلتر من الماء المقطر ، استعمل في الكشف عن قدرة البكتيريا على إنتاج إنزيم الكاتليز (Harley و Prescott ، 2002) .

2.3.2.3. كاشف الاوكسيديز : Oxidase reagent

حُضر الكاشف آنيا عند الاستعمال وذلك بإذابة 0.1 غرام من مادة N-N-N-N- Tetra methyl para phenylene diamine dihydro chloride في 10 مليلتر من الماء المقطر، وضع الكاشف في قنينة معتمدة . إستعمل للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج أنزيم الاوكسيديز (Forbes وآخرون ، 2007) .

3.3.2.3. كاشف كوفاكس : Kovac's reagent

حُضر الكاشف بإذابة 5 غم من مادة Para-dimethyl amino benzaldehyde في 75 مليلتر من كحول ايزوميلي Isoamyl alcohol ، ثم أُضيف إليه 25 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك المركز HCL ببطء ليصبح لون الكاشف أصفر شاحب . حفظ الكاشف في قناني معتمدة في درجة حرارة 4 م° لحين الإستعمال ، إستعمل للتحري عن قابلية البكتريا على تكوين حلقة الاندول (Brown ، 2005) .

4.3.2.3. كاشف أحمر المثيل : Methyl Red Reagent

حُضر هذا الكاشف بإذابة 0.1 غم من مسحوق صبغة أحمر المثيل في 300 مليلتر من الكحول الايثيلي تركيزه 95% وأكمل الحجم إلى 500 مليلتر بإضافة الماء المقطر ، إستعمل للتحري عن قدرة البكتريا على التحلل الكلي لسكر الكلوكوز (Brown ، 2007) .

5.3.2.3. كاشف فوكس بروسكاور : Voges-Proskauer Reagent

إستخدم الكاشف للتحري عن التحلل الجزئي للسكريات ، وحُضر من جزئين :
A- كاشف ألفا - نفتول α - naphthol : أُذيب 6 غم من مادة α - naphthol في 90 مليلتر الكحول الايثيلي المطلق 95% ومزج جيدا ، ثم أُكمل الحجم إلى 100 مليلتر .

B- كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم KOH : حُضر الكاشف بإذابة 16 غم من KOH في 100 مليلتر الماء المقطر، حُفظت الكواشف في درجة حرارة 4 م° لحين الإستخدام (Brown ، 2005) .

4.2.3. Preparation of cultural media : تحضير الأوساط الزرعية :

1.4.2.3. Ready made media : الأوساط الزرعية الجاهزة :

حُضرت الاوساط الزرعية المذكورة في الجدول (3-3) ، باستثناء بعض الاوساط التي ستذكر لاحقا ، بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوة وبعد ان ضبط الرقم الهيدروجيني بإستخدام جهاز pH-meter ، عُقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 15 باوند/انج² لمدة 15 دقيقة بعدها صبت بالأطباق وحُضنت بالحاضنة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها ، بعدها حُفظت في درجة حرارة 4 م° لحين الإستعمال .

2.4.2.3. Laboratory Prepared media : الأوساط الزرعية التحضيرية :

1.2.4.2.3. Urea agar medium : وسط أكار اليوريا الصلب :

أذيب 2.4 غم من وسط Urea base agar في 95 مل من الماء المقطر ، ثم عقم بالمؤصدة وبعد تبريده الى 45 م° ، أُضيف إليه 5 مل من ساند اليوريا Urea supplement تركيزه 40 % معقم بالترشيح . ثم صب في أنابيب معقة ومحكمة الغطاء ، ترك ليتصلب بشكل مائل ، إستعمل الوسط للكشف عن قدرة البكتريا على أنتاج انزيم اليوريز (Forbes وآخرون ، 2007) .

2.2.4.2.3. Blood agar medium : وسط أكار الدم :

حُضر الوسط وفق تعليمات الشركة المجهزة وعقم بالمؤصدة ، ثم ترك ليبرد بدرجة حرارة 45 م° أُضيف إليه دم الانسان فصيلة AB بتركيز 5 % ومزج جيدا ثم صب في أطباق معقمة ، تركت ليبرد ويتصلب وحفظت لحين الاستعمال بدرجة حرارة 4 م° ، إستعمل الوسط لمعرفة قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج انزيم الهيمولايسين Haemolysin (Brown ، 2005) .

3.2.4.2.3. Motility media : وسط اختبار الحركة :

حُضر الوسط وفقا لما ورد في (Ye وآخرون ، 2015) وكما يلي :
أُذيب 10 غرام من مادة Tryptose و 5 غرام من كلوريد الصوديوم NaCl و 1.5 غرام من مادة الاكاروز Agarose في 1 لتر من الماء المقطر ، ثم عقم بوساطة المؤصدة بعد ضبط الاس الهيدروجيني الى 7 .

4.2.4.2.3. Congo- Red Agar (CRA) : وسط اكار احمر الكونكو الصلب :

حضر الوسط باذابة 37 غرام من وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain – Heart Infusion Broth و 50 غرام سكروز و 10 غرام من الأكار- أكار في 900 مل من الماء المقطر، ثم عقم الوسط بالمؤصدة ، واكمل الحجم الى لتر باضافة الصبغة (صبغة احمر الكونكو) فقد أُذيب 0.8 غم منها في 100 مل من الماء المقطر وعُقمت بالفلتر لكونها محلول مائي وكذلك تم تعقيم السكر لوحده ايضا لاعتباره محلول مائي ، وبعدها أُضيف محلول الصبغة والسكر معا الى الوسط بعد تبريده الى 55 م° ومزج جيدا وصب في أطباق معقمة ، استعمل الوسط للكشف عن قدرة البكتريا في إنتاج الغشاء الحيوي Bioflim (Mathur وآخرون ، 2006) .

5.2.4.2.3. وسط التريكتيز الصويا أكار : Trypticase Soy Agar (T S A)

حضر هذا الوسط وفقا لتعليمات الشركة المجهزة بإذابة 19 غرام من مادة T S A في 500 مل من الماء المقطر و أضيف اليه 3% من خلاصة الخميرة وبعدها عقت بالمؤصدة ، استعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج البكتريوسين (Rammelsberg وآخرون ، 1990).

6.2.4.2.3. وسط ماء الببتون : Pepton Water Media

حضر الوسط بإذابة 2 غرام من الببتون و 0.5 غم من كلوريد الصوديوم NaCl في 100 مل من الماء المقطر ، وبعد ضبط الأس الهيدروجيني إلى 7 عقم بالمؤصدة ، أستخدم هذا الوسط في الكشف عن تكوين حلقة الأندول (Koneman وآخرون ، 1992).

7.2.4.2.3. وسط ايوسين المثلين الازرق : Eosin methylene blue agar

حضر الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة بإذابة 37.4 غرام من الوسط في 1 لتر ماء مقطر واستخدمت الحرارة لإذابة الوسط بشكل كامل وعقم بالمؤصدة بعد ضبط الرقم الهيدروجيني له الى 7.1 ± 0.2 (Unemo ، 2013) .

8.2.4.2.3. وسط اللايسين ديكاربوكسيليز : Lysine decarboxylase Broth

حضر الوسط بإذابة 5 غم من الببتون Peptone و 3 غم من مستخلص الخميرة Yeast extract و 5 غم من اللايسين L-lysine monohydrochloride و 1 غم من سكر الدكستروز Dextrose و 0.02 غم من صبغة البرومو كريسول الارجوانية Bromcresol purple في لتر من الماء المقطر وضبط درجة ال PH الى 6.1 ونقلت الى انابيب بحجم 3 مل عقت بالمؤصدة وحفظت بدرجة 4 م ° لحين الاستخدام (Zimbro وآخرون ، 2009) .

9.2.4.2.3. وسط أكار صفار البيض : Egg-yolk Agar

حضر الوسط وفقا الى Collee وآخرون (1996) من خلال إضافة 15 مل من صفار البيض الى 85 مل من الأكار المغذي المعقم بالموصدة والمبرد الى 50 °م بحيث يكمل الحجم الى 100 مل يمزجان معا و يصب في أطباق . استعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على أنتاج أنزيم اللايباز Lipase .

10.2.4.2.3. وسط انتاج البروتينيز (وسط أكار الحليب) : Skim milk agar

حضر وسط الآكار المغذي Nutrient Agar وفقا لتعليمات الشركة المصنعة ، تم تبريده إلى درجة حرارة 45 - 50 °م. حضر الحليب المقشوط وفقا لتعليمات الشركة المصنعة أيضا ، عقم بالبسترة وتم تبريده الى درجة حرارة مماثلة أو مقاربة لدرجة حرارة الآكار المغذي ، تم اضافة 12.5 مل من الحليب المقشوط المعقم لكل 87.5 مل من وسط الآكار المغذي ، و مزج جيدا ثم صب في أطباق معقمة . استعمل الوسط للتحري على قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج انزيم البروتينيز (Senior ، 1999) .

5.2.3. جمع العينات : Collection of Samples

أجريت هذه الدراسة للمدة من شباط 2017 لغاية حزيران 2017 جمع خلالها 333 عينة من المرضى الراقدين وغير الراقدين اذ كان عدد عينات المرضى الراقدين 118 عينة ، بينما كان عدد عينات المرضى غير الراقدين 215 عينة ، جمعت هذه العينات من حالات سريرية مختلفة اذ تضمنت 45 عينة من مسحات الجروح ، و 20 عينة من مسحات الحروق ، و 9 عينات من الخروج ، و 3 عينات من قشع الالتهابات التنفسية ، و 10 عينات من المسحات المهبلية بأستعمال المسحات المباشرة Disposable Cotton Swabs ، اما عينات الادرار والدم فتضمنت 212 و 34 عينة على التوالي جمعت في قناني و أنابيب اختبار بلاستيكية ومعقمة ، تم جمع العينات من

مستشفى بعقوبة التعليمي و البنول للولادة والاطفال والعيادة الاستشارية . سجلت المعلومات الخاصة بالمريض Questionnaire فيما اذا كان راقدا في المستشفى أو مراجع ومصدر العينة والجنس والعمر والسكن وتاريخ أخذ العينة باستمارة خاصة كما في الملحق رقم 1 ، حيث كان عدد عينات الذكور 145 عينة وعدد عينات الاناث 188 عينة ، زرعت النماذج مباشرة بعد أخذ العينة لغرض التشخيص .

6.2.3. زرع العينات : Samples culture

زرعت عينات الجروح والحروق والخروج والقشع والمسحات المهبلية و الادرار بشكل فوري بعد الجمع على وسط أكار الدم و وسط أكار الماكونكي و اكار الايوسين مثلين الازرق ، وتم تنقية العزلات بطريقة التخطيط streak على وسط أكار الماكونكي وحضنت كافة الاطباق بدرجة 37° لمدة 24 ساعة . أما عينات الدم فجمعت بسحب دم من المريض مقدار 5 مل وزرعت مباشرة في قناني بلاستيكية معقمة تحوي 50 مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل وحضنت عند درجة حرارة 37° لمدة 24 ساعة ، أعيد زرعها بأخذ 0.1 مل من القناني المذكورة اعلاه ونشرها على وسط اكار الدم و وسط اكار الماكونكي وحضنت عند درجة حرارة 37° لمدة 24 ساعة ، شخست البكتريا مظهرها وتم التركيز على المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز على وسط اكار الماكونكي بعدها نقلت الى وسط EMB لتفريقها عن بكتريا *E.coli* إذ تظهر الاخيرة ذات بريق معدني. أجري بعدها عدد من الفحوصات التشخيصية المظهرية ، والكيموحيوية ، والجزيئية للبكتريا المعنية بالدراسة (Macfaddin ، 2000) .

7.2.3. Identification of bacterial isolates : تشخيص العزلات البكتيرية :

1.7.2.3. Morphological Characteristics : الصفات المظهرية :

شخصت العزلات البكتيرية المعزولة مبدئياً بحسب الصفات المظهرية لشكل المستعمرات وقوامها ولونها وحجمها ، فضلاً عن قدرتها على تحليل كريات الدم الحمر على وسط أكار الدم و قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز على وسط الماكونكي (Holt وآخرون ، 1994) .

2.7.2.3. Microscopical Characteristics : الصفات المجهرية :

نقل جزء من المستعمرات النقية النامية بعمر 24 ساعة بواسطة عروة الناقل Loop إلى شريحة زجاجية وضع عليها قطرة من الماء المقطر، ونشرت على مساحة من سطح الشريحة ثبتت وصبغت بصبغة غرام . بعدها فحصت تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي قوة التكبير 100x للتمييز بين شكل الخلايا وسليبيتها أو ايجابيتها لصبغة غرام (Finegold و Martin ، 1982) .

3.7.2.3. Biochemical Tests : الفحوصات الكيموحيوية :

أجريت الفحوصات الآتية اعتماداً على ماورد في (Retty وآخرون ، 2007) .

1- فحص الاوكسيدز : Oxidase test

نقلت مستعمرة مفردة بعمر 24 ساعة منماة على وسط ماكونكي اكار MacConky agar بواسطة عيدان خشبية معقمة ونشرت على سطح ورقة ترشيح مشبعة مسبقاً بكاشف الاوكسيدز، دل ظهور اللون البنفسجي الغامق خلال 5-10 ثانية على ايجابية الفحص ، اما عدم ظهور اللون البنفسجي كان دليل على الفحص السالب وعدم قدرة البكتريا على انتاج انزيم الاوكسيدز .

2- فحص الكاتليز : Catalase test

أجري هذا الاختبار بنقل مستعمرة بكتيرية مفردة بعمر 24 ساعة النامية على وسط ماكونكي اكار MacConky agar الى شريحة زجاجية نظيفة بعدها أضيف لها قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3% ، تعد النتيجة موجبة للاختبار وقدرة البكتريا على انتاج الانزيم بتحرر فقاعات غازية .

3 - فحص إنتاج إنزيم اليوريز : Urease production test

لقت الانابيب الحاوية وسط اختبار اكار اليوريا المائل الصلب فقرة 1.2.4.2.3، بطريقة التخطيط streak بمستعمرة بكتيرية مفردة منماة على وسط ماكونكي اكار وحضنت لمدة 24 ساعة و بدرجة حرارة 37 م°، إن تحول لون الوسط إلى اللون الوردي دل على إيجابية الفحص.

4 - فحص الحركة : Motility test

لقح وسط الحركة شبه الصلب فقرة 3.2.4.2.3 بمستعمرة بكتيرية مفردة منماة على وسط ماكونكي اكار بأبرة ناقلية معقمة بطريقة الطعن stab ، وحضنت الأنابيب لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م° ، إن ظهور التضبيب حول منطقة الطعن وانتشار البكتريا دل على النتيجة الموجبة للفحص .

5 - فحص قابلية النمو في درجات الحرارة المختلفة :

زرعت الاطباق الحاوية على وسط اكار الدم بالعزلات البكتيرية ، وحضنت لمدة 24 ساعة في حاضنات ذات درجات حرارة 37 و 44 م° ، ان ظهور النمو يدل على النتيجة الموجبة للفحص (Koneman وآخرون ، 1992) .

6 - اختبار إنتاج أنزيم نزع مجموعة الكربوكسيل من الحامض الأميني اللايسين :

Lysine decarboxylase

استعمل هذا الاختبار لغرض تشخيص بكتريا *Enterobacter cloacae* ، حيث لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط السائل Lysine decarboxylase broth المحضر بالفقرة 8.2.4.2.3 بالعزلات البكتيرية وأغلقت الأنابيب بإحكام بشمع البرافين (للتخلص من الهواء وجعل وسط التفاعل حامضيا وكذلك لمنع حدوث أي أكسدة قلوية التي بدورها تؤدي إلى نتائج خاطئة وغير صحيحة) ، ثم وضعت هذه الأنابيب في الحاضنة لمدة 1-4 أيام وبدرجة حرارة 37 °م في حالة إنتاج البكتيريا لأنزيم نزع مجموعة الكربوكسيل من الحامض الأميني اللايسين والذي يؤدي إلى رفع قيمة الأس الهيدروجيني وتغير لون الكاشف إلى البنفسجي مما يدل على النتيجة الموجبة للاختبار (العتيبي ، 2013) .

4.7.2.3. اختبارات الـ IMViC :

1.4.7.2.3. فحص الاندول : Indol test

يكشف هذا الاختبار عن قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج انزيم التربتوفانيز tryptophanase الذي يعمل على تحلل الحامض الأميني التربتوفان الى الاندول وحامض البيروفك والامونيا ، حيث لقح وسط ماء البيبتون Peptone water المحضر في الفقرة 6.2.4.2.3 السائل بمستعمرة نقية واحدة منمأة على وسط ماكونكي اكار بعمر 24 ساعة وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة ، بعد ذلك اضيف 2 قطرة من كاشف كوفاكس Kovac's Reagent لكل انبوبة ورجت الانابيب بهدوء ، تعد النتيجة موجبة للفحص بظهور الحلقة الحمراء على سطح الوسط .

2.4.7.2.3. فحص الميثيل الاحمر : Methyl – Red test

أستعمل الاختبار للكشف عن قابلية البكتريا على إنتاجها لكميات كبيرة من أحماض اللاكتيك Lactic acid أو الفورميك Formic acid كنتيجة لأيض الكلوكوز ، اذ لقحت الانابيب الحاوية على وسط مرق (MR-VP) بمستعمرات بكتيرية مفردة منمأة على وسط الماكونكي اكار وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م° ، تضاف في اليوم التالي 5 قطرات من كاشف الميثيل الاحمر MR الى كل انبوبة ورجت بهدوء ، يعد تكون اللون الاحمر دلالة على ايجابية الفحص .

3.4.7.2.3. إختبار فوكس بروسكاور: Voges-proskauer test

استعمل الاختبار للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج استيل ميثيل كاربينول(أسيتون) ، إذ لقحت انابيب حاوية على مرق (MR-VP) بمستعمرات بكتيرية مفردة منمأة على وسط ماكونكي اكار ومن ثم حضنت لمدة 24-48 ساعة وبدرجة حرارة 37 م° ، وبعد انتهاء مدة الحضانة أضيف 6 قطرات من كاشف (A) الفا نفثول (VP1) متبوعا بقطرتين 0.2 من كاشف (B) هيدروكسيد البوتاسيوم (VP2) ومزج الخليط بلطف ، ظهور اللون الاحمر مباشرة أو بعد ترك الأنابيب لمدة 15 دقيقة دليل على ايجابية الاختبار.

4.4.7.2.3. فحص استهلاك السترات : Citrate utilization test

اخذت مستعمرة مفردة منمأة بعمر 24 ساعة على وسط MacConky agar بواسطة Loop معقم وزعت على وسط السايمون ستريت اكار المائل بطريقة التخطيط streak وحضنت الأنابيب لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م° ، عند تغير لون الوسط من الأخضر إلى اللون الأزرق دل على النتيجة الموجبة للفحص (وذلك بسبب وجود كاشف Bromothymol Blue) كدليل على استهلاك السترات كونه المصدر الوحيد للكربون .

5.4.7.2.3. فحص النمو على وسط الحديد - ثلاثي السكر : Triple – Sugar iron

لقح وسط الحديد - ثلاثي السكر المائل بمستعمرة بكتيرية مفردة منمأة على وسط مأكونيكي اكار بطريقة الطعن العميق stab ومن ثم التخطيط streak على السطح المائل ، وحضنت الانابيب لمدة 24 ساعة في 37 م° . ان تحول لون الوسط المزروع من الاحمر الى اللون الاصفر في الجزء العميق دل على تخمر سكر الكلوكوز فقط ، ويعد تحول لون الوسط ككل من اللون الاحمر الى الاصفر فهذا دليل على تخمر السكريات الثلاثة . فيما عدم تغير لون الوسط دل على عدم قدرة العزلة البكتيرية على تخمر أي من السكريات الثلاثة . اما ظهور الفقاعات الغازية في الوسط دلالة على تكوين غاز CO₂ من تخمر السكر، وفي حالة ظهور الراسب الاسود فهي دليل على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H₂S .

6.4.7.2.3. اختبار النمو على وسط كلكر: Kliglar iron agar test(KIA)

انجز الاختبار لغرض تشخيص البكتريا اعتمادا على تخمر الكربوهيدرات وانتاج غاز CO₂ وانتاج كبريتيد الهيدروجين H₂S . اذ تم نقل جزء من المستعمرة البكتيرية المراد اختبارها وزرعت على وسط Kliglar iron agar بأبرة ناقلية معقمة بطريقة الطعن stab والتخطيط streak حضنت الانابيب لمدة (24-48) ساعة بدرجة 37 م° . وسجلت النتائج وفقا لما ورد عن (MacFaddin ، 2000) كالتالي :

Slant/bottom	Colour
Alkaline / acid	Red / yellow
Alkaline / Alkaline	Red / Red
Acid / Acid	Yellow / Yellow
H ₂ S prodection	Black precipitate

5.7.2.3. تشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام بنظام Api-20E :

Identification of Gram negative bacteria by API-20E system

وهو نظام كيميائي حياتي يشمل 20 فحصا ، استعمل لتشخيص العصيات السالبة لصبغة

غرام ، وحسب تعليمات الشركة BioMerieux كما يأتي :

اولا : تهيئة الاشرطة : Preparation of strips

1. حضر صندوق الحضان Incubation المكون من القاعدة والغطاء ووزعت 5 مل من الماء

المقطر المعقم في الحفر Wells داخل القاعدة (حاوية الشريط Tray) لتهيئة جو رطب.

2. وضع الشريط الحاوي على أنابيب مجوفة Microtubes حاوية على المواد الاساس للتفاعل

غير الذائبة .

ثانيا: تحضير عالق البكتريا المراد تشخيصها : Preparation of bacterial suspension

1. وضع المحلول الملحي الفسلجي المعقم والمحضر مسبقا في أنابيب اختبار بحجم 5 مل .

2. تم نقل المستعمرات البكتيرية المنمأة على وسط MacConky agar والمراد تشخيصها الى

الأنابيب الحاوية على المحلول الملحي الفسلجي ، بحيث تكون المستعمرات منفردة ونقية

وبعد الرج الجيد بأستعمال المازج ثم فُورنت عكورته مع عكورة أنبوبة مكفرلاند 0.5 المحضر

في الفقرة 2.2.2.3 ليصبح العالق ذو عكورة كافية لنمو البكتريا ضمن النظام .

ثالثا : تلقيح الاشرطة : Inoculation of strips

1. استعملت ماصة باستور معقمة لملئ الانابيب المجوفة في الشريط بالعالق البكتيري الى

النصف عدا CIT ، VP ، GEL اذ ملئت إلى حافتها النهائية مع مراعاة تجنب حدوث

الفقاعات في أثناء الأضافة .

2. اختبارات H₂S ، URE ، ODC ، LDC و ADH : فقد تم تغطية النصف الباقي من

الانابيب المجوفة الخاصة بهذه الاختبارات في الشريط بوساطة اضافة الزيت المعدني

Mineral Oil ليتم تهيئة ظروف لاهوائية لهذه الاختبارات .

3. اغلقت بغطاء صندوق الحضان Lid ، وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 18 – 24 ساعة .

رابعاً : قراءة النتيجة : Reading of Result

أضيفت الكواشف التالية والمجهزة مع العدة التشخيصية لبعض الانابيب Microtubes

وذلك بعد مرور 18-24 ساعة على الحضان وحسب نوع الاختبار .

1. قطرة واحدة من كاشف الـ TDA الى الانبوبة الخاصة بهذا الفحص إذ تظهر النتيجة بصورة

مباشرة .

2. قطرة واحدة من كاشف الـ VP1 متبوعاً بقطرة من كاشف الـ VP2 الى الانبوبة الخاصة

والتابعة لفحص VP وتظهر النتيجة بعد مرور 10 دقائق .

3. قطرة واحدة من كاشف الاندول JAMES الى الانبوبة التابعة لفحص الاندول IND وتظهر

النتيجة بعد الاضافة بدقيقتين .

4. سجلت النتائج الخاصة بالتفاعلات التلقائية ونتائج الفحوصات بعد اضافة الكواشف في ورقة

التقرير.

خامساً : تشخيص البكتريا : Diagnosis of bacteria

في ورقة التقرير الخاصة سجلت الاختبارات لتكون مفصولة الى مجاميع ثلاثية وكل

مجموعه حاوية على أرقام 1.2.4 وكل رقم يشير الى اختبار معين ، وعند جمع الأرقام الثلاثية

لكل مجموعة تظهر شفرة مكونة من 7 أرقام ، وقرأت في فهرس التحليل profile Analytical

Index تاريخ إصداره (2005 - 2006) ومن خلالها استدل على اسم الجنس للبكتريا المراد تشخيصها ونوعها . والملحق (4) يوضح الاختبارات الموجودة في نظام API 20 E .

6.7.2.3. تشخيص البكتريا بجهاز VITEK 2 Compact system :

استعمل جهاز Vitek المجهاز من قبل شركة Bio Mérieux الفرنسية للتأكد من الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية والحساسية للمضادات ، حيث يتم تشخيص البكتريا بدرجة عالية الدقة اذ يتكون الجهاز من مكونين رئيسين هما الالة Instrument وجهاز الكمبيوتر، ويتضمن الجهاز 64 اختبارا من الاختبارات التي تستعمل لتشخيص البكتريا بحيث درجة دقة التشخيص تصل بهذا الجهاز إلى 99 % ويمكن ايضا بهذا الجهاز إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية (Pincus ، 2011) .

1. المواد المستعملة :

1. VITEK 2 Cassett
2. محلول ملحي فسلجي معقم محضر في الفقرة 3.2.2.3
3. وسط ماکونکی اكار MacConky agar
4. قطعة بلاستيكية تسمى Polystyrene لحمل الأنابيب
5. VITEK 2 GN Card
6. VITEK 2 DENSICHEK
7. مازج Vortex
8. مسحة معقمة
9. VITEK 2 DENSICHEK Power Adapter .

2. طريقة العمل :

1. زرعت البكتريا المراد اختبارها على وسط MacConky agar بطريقة التخطيط streak وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة .
2. اجري فحص العزلة لصبغة جرام لغرض اختيار VITEK 2 Card المناسبة .
3. تم تخفيف مستعمرة نقية من البكتريا في أنبوبة معقمة ومحمولة بحامل خاص بها تحتوي 3 مليلتر من المحلول الملحي .
4. قيست عكورة المستعمرة المخففة بجهاز VITEK 2 DENSICHEK بحيث تكون العكورة مساوية الى 0.5 – 0.63 .
5. تم وضع الانابيب المحتوية على العالق في VITEK 2 Cassette بعدها وضع الكارت الخاص بالبكتريا السالبة داخل الانابيب .
6. نقل VITEK 2 Cassette إلى الجهاز لغرض تشخيص البكتريا عن طريق 64 حفرة Well و كل حفرة تحتوي على وسط مجفف ودليل لوني تجري فيه الفحوصات الكيموحيوية ويعمل الجهاز بتسجيل التغيرات اللونية الحاصلة بفعل نمو البكتريا ، كما في جدول 3-10.
7. ظهرت النتيجة بعد مرور 24 ساعة من وضع العزلة في الجهاز.

جدول (3-10) : الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا السالبة لصبغة جرام التي يقوم بها جهاز 2

VITEK

رقم الحفرة	اسم الاختبار	المختصر	تركيز المركب
2	Ala –Phe-Pro-ARYLAMIDASE	APPA	0.0384 mg
3	ADONITOL	ADO	0.1875 mg
4	L-Pyrrolydonyl –ARYLAMIDASE	PyrA	0.018 mg
5	L-ARABITOL	IARL	0.3 mg
7	D-CELLOBIOSE	dCEL	0.3 mg
9	BETA –GALACTOSIDASE	BGAL	0.036 mg

0.0024 mg	H2S	H2S PRODUCTION	10
0.0408 mg	BNAG	BETA -N -ACETYL - GLUCOSAMINDASE	11
0.0324 mg	AGLTp	Glutamyl Arylamidase Pna	12
0.3 mg	Dglu	D-GLUCOSE	13
0.0223 mg	GGT	GAMMA -GLUTAMYL - TRANSFERASE	14
0.45 mg	OFF	FERMENTATION /GLUCOSE	15
0.036 mg	BGLU	BETA -GLUCOSIDASE	17
0.3 mg	dMAL	D -MALTOSE	18
0.1875 mg	Dman	D-MANNITOL	19
0.3 mg	Dmne	D-MANNOSE	20
0.0324 mg	BXYL	BETA -XYLOSIDASE	21
0.0174 mg	BAlap	BETA-Alanine aryamidase Pna	22
0.0234 mg	ProA	L-Proline ARYLAMIDASE	23
0.0192 mg	LIP	LIPASE	26
0.3 mg	PLE	PALATINOSE	27
0.0276 mg	TyrA	Tyrosine ARYLAMIDASE	29
0.15 mg	URE	UREASE	31
0.1875 mg	dSOR	D-SORBITOL	32
0.3 mg	SAC	SACCHAROSE /SUCROSE	33
0.3 mg	dTAG	D-TAGATOSE	34
0.3 mg	Dtre	D-TREHALOSE	35
0.054 mg	GIT	CITRATE (SODIUM)	36
0.15 mg	MNT	MALONATE	37
0.3 mg	5RG	5-KETO -D -GLUCONATE	39
0.15 mg	ILATK	L-LACTATE alkalipisation	40
0.036 mg	AGLU	ALPHA -GLUCOSIDASE	41
0.15 mg	SUCT	SUCCINATE alkalipisation	42
0.0306 mg	NAGA	Beta -N-ACETYL - GALACTOSAMINIDASE	43
0.036 mg	AGAL	ALPHA-GALACTOSIDASE	44
0.0504 mg	PHOS	PHOSPHATASE	45
0.012 mg	GlyA	Glycine ARYLAMIDASE	46

0.3 mg	ODC	ORNITHINE DECARBOXYLASE	47
0.15 mg	LDC	LYSINE DECARBOXYLASE	48
NA	ODEC	DECARBOXYLASE BASE	52
0.087 mg	IHISa	L-HISTIDINE assimilation	53
0.126 mg	CMT	COURMARATE	56
0.0378 mg	BGUR	BETA –GLUCORONIDASE	57
0.0105 mg	O129 R	O/129 RESISTANCE (comp. vibrio.)	58
0.0576 mg	GGAA	GLU-GLY-Arg-ARYLAMIDASE	59
0.042 mg	IMLTa	L-MALATE assimilation	61
0.03 mg	ELLM	ELLMAN	62
0.186 mg	ILATa	L-LACTATE assimilation	64

8.2.3. حفظ العزلات البكتيرية وإدامتها : Preservation and maintenance of bacterial isolates

1.8.2.3. الحفظ قصير الأمد : Short period culture

بعد التأكد من تشخيص البكتريا لقح وسط الاكار المغذي الصلب والمائل Slant بمستعمرة نقية وحضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 °م ، وحفظت بعدها في درجة حرارة 4 °م بالثلاجة لحين الاستخدام ، إستعملت هذه العزلات للتجارب المطلوبة في العمل اليومي مع مراعاة تجديدها وإدامتها باعادة زراعتها بشكل دوري كل ثلاثة اشهر (Harly و Prescott ، 2002) .

2.8.2.3. الحفظ طويل الامد : Long period culture

حُضر وسط الاكار المغذي والمضاف اليه 20% من الكليسرول ووزع في أنابيب ذات غطاء محكم وعقم بالمؤصدة . بعد تبريد الانابيب لقحت بمستعمرات مفردة نقية من البكتريا المراد حفظها وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 °م وبعدها حُفظ بدرجة -20 °م مع مراعاة تجديدها كل ستة اشهر لضمان المحافظة على نشاط وحيوية البكتريا خلال مدة الدراسة (Atlas وآخرون ، 1995) .

9.2.3. دراسة مقاومة البكتيريا لمضادات الحياة :

1.9.2.3. فحص حساسية البكتيريا لمضادات الحياة : Antibiotic Susceptibility Test

اجري الاختبار لمضادات الحياة المذكورة في جدول (3-6) باعتماد طريقة -Kerby Bauer method على وسط اكار مولر-هنتون Mueller-Hinton agar وبحسب ماورد في CLSI (2016) وكالاتي :

- حضر العالق البكتيري بنقل مستعمرة مفردة بعمر 24 ساعة من البكتيريا المراد اختبارها نامية على وسط ماکونكي اگار الى أنابيب معقمة تحتوي 5 مل من المحلول الملحي الفسلجي ومزج جيداً بوساطة المازج ثم قورنت عكورته مع عكورة محلول ثابت العكورة القياسي (أنبوبة مكفرلاند 0.5) الذي يعطي عدداً مقارباً للخلايا مقداره 1.5×10^8 خلية / مل .
- نشر مقدار 0.1 مل من عالق البكتيريا بوساطة مسحة قطنية معقمة Swab الى سطح الطبق الحاوي على وسط اكار مولر-هنتون Mueller-Hinton agar وتم مسح سطح الوسط بثلاثة اتجاهات ليتم الحصول على نمو بكتيري متجانس ، ثم بعدها تركت لمدة 5 دقائق لتجف بدرجة حرارة الغرفة .
- نقلت أقراص مضادات الحياة بوساطة ملقط معقم (كحول مركز، لهب النار) الى الأطباق بواقع 5-6 أقراص للطبق الواحد مع مراعاة أن تكون مسافة مناسبة 15 ملم بين الأقراص وذلك لتجنب حدوث أي تداخل بين مناطق التثبيط ، حضنت الأطباق لمدة 18-24 ساعة بدرجة حرارة 37 م°.
- بعد انتهاء فترة الحضانة قرأت النتائج وذلك بقياس قطر مناطق التثبيط المتكونة حول أقراص مضادات الحياة بالمليمتر (المسطرة) عدت البكتيريا حساسة Sensitive أو متوسطة

Intermedite أو مقاومة Resistance بحسب المواصفات القياسية الواردة والمعتمدة في (CLSI ، 2016) .

2.9.2.3. قياس التركيز المثبط الأدنى : Minimal - Inhibitory Concentration

حُدِّد التركيز المثبط الأدنى MIC ولكل العزلات البكتيرية بحسب المعايير القياسية (CLSI ، 2016)

- حُضرت تراكيز متسلسلة متضاعفة تراوحت بين 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64 - 128 - 256

- 512 - 1024 مايكروغرام/ مل لمضادات Nalidixic acid ، Ciprofloxacin

بإضافة نسب مختلفة من هذه المضادات من محاليلها الخزينة المحضرة في الفقرة

4.2.2.3 الى وسط مولر - هنتون المعقم والمبرد الى 45 م° بعدها مزجت الوسط جيدا

وصبت باطباق معقمة .

- حُضر العالق البكتيري لكل عزلة بكتيرية وقورنت عكورته مع عكورة المحلول القياسي

. Mc Farland

- سُحب 5 مايكرو لتر من العالق أعلاه باستعمال ماصة دقيقة ، وزرعت بطريقة التقطير

Spotted بصورة قطرة واحدة على وسط مولر - هنتون الحاوي على تراكيز مختلفة من

المضادات .

- كُريت العملية لجميع المزارع بالتسلسل مكررين لكل تركيز، وتركت الأطباق لفترة في

درجة حرارة الغرفة لحين جفاف القطرات بعدها تم قلب الأطباق ، حضنت الأطباق لمدة

24 ساعة بدرجة حرارة 37 م°.

- حُسب التركيز المثبط الأدنى على انه أقل تركيز يمكن أن يمنع ظهور النمو البكتيري

بعد حضن 18-24 ساعة بدرجة حرارة 37 م° .

تمّ مقارنة النتائج مع نقطة التوقف Break point للمضاد والذي يمثل أقل تركيز يمكن أن يصله في المصل ليعطي أعلى فعالية وبعده يصبح المضاد مقاوما (CLSI ، 2016).

10.2.3 التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا *Enterobacter cloacae* :

1.10.2.3 الكشف عن إنتاج الهيموليسين : Detection of Haemolysin Production

تمّ الكشف عن قدرة العزلات البكتيرية قيد الدراسة على إنتاج الهيموليسين بزرعها على وسط الدم المتصلب بمادة الاكار، حُضنت الاطباق المزروعة لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37 °م. وشوهدت مناطق ونوع التحلل المتمثلة بمناطق شفاقة تحيط بالمستعمرات البكتيرية المنتجة للهيموليسين (Kayser وآخرون ، 2005).

2.10.2.3 الكشف عن إنتاج إنزيم البروتيز : Detection of Protease production

لُقِّح وسط Skimmed milk agar المحضر في الفقرة 10.2.4.2.3 بالمستعمرات البكتيرية، حيث تمّ عمل حفر دائرية منتظمة في الوسط وحقن العالق البكتيري في هذه الحفر، حُضنت الأطباق لمدة 24 ساعة بدرجة 37 °م ، وإنّ ظهور الهالة الشفاقة حول الحفر هو دليل على النتيجة الموجبة للاختبار (Benson ، 2002).

3.10.2.3 اختبار إنتاج البكتريوسين : Bacteriocin Production

استعملت طريقة (Rammelsberg وآخرون ، 1990). للكشف عن السلالات المنتجة و السلالات الحساسة للبكتريوسين ، إذ استعملت كافة العزلات بوصفها عزلات منتجة كما تم استعمال نفس العزلات كعزلات حساسة وقد أجرى الاختبار كالاتي :

زرعت البكتريا النامية في وسط نقيع القلب و الدماغ مسبقا" و بعمر 24 ساعة بالنشر على وسط أكار (T S A) المحضر في الفقرة 5.2.4.2.3 بعدها حُضنت الأطباق لمدة 24 ساعة

بدرجة 37 م° . و بعد انتهاء فترة الحضان أخذت أقراص بوساطة الثاقب الفليني في الوسط ووضعت على وسط الأكار المغذي و المنشور عليه بالناشر مقدار 0.1 مل من مزروع كل من العزلات البكتيرية قيد الدراسة بعد ان تم مقارنتها مع محلول ثابت العكرة القياسي (أنبوبة مكفرلاند 0.5) ، ثم حضنت الأطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م°. وسجلت النتائج من خلال وجود مناطق تثبيط حول القرص .

4.10.2.3. التحري عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm

A- طريقة أحمر الكونغو : Congo-red methods

أُخذت مستعمرة مفردة نقية نامية على وسط أكار الماكونكي ونقلت الى أنبوبة اختبار تحتوي على 5 مليلتر من محلول الملح الفسلجي المحضر في الفقرة 1.2.2.3 وبعد الرج الجيد باستعمال المازج فُورنت العكورة للعالق مع محلول ثابت العكرة القياسي بعدها لُفح وسط احمر الكونغو المحضر مسبقا الفقرة 4.2.4.2.3 بعدها حُضنت الأطباق لمدة 24-28 ساعة في درجة حرارة 37 م° ، تكون النتيجة موجبة عند ظهور مستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة ، أما النتيجة السالبة فتبقى المستعمرات وردية اللون (Freeman وآخرون ، 1989 ؛ Mathur وآخرون ، 2006) .

B- طريقة الأنابيب : Tube Method

1. لُفح وسط مرق تربتون صويا الموضوع في أنابيب بحجم 10 مل بالبكتريا المقارنة عكورتها مع مكفرلاند 0.5 وحضنت في الحاضنة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م°.
2. أزيل الوسط بالتفريغ الموجود في الأنابيب ثم بعدها تم اضافة 10مل من صبغة السفرائين المحضرة في الفقرة 6.2.2.3 .

3. إزالة صبغة السفرانين بالتفريغ وتم قلب الأنابيب على قطعة شاش نظيفة إلى أن تجف بدرجة حرارة المختبر.

4. قرئت النتائج على أساس وجود تصبغ في قعر الأنبوب وعلى الجدران مما يدل على النتيجة موجبة وتعد النتيجة خاطئة في حالة وجود القطرات المائية أو الهوائية الملتصقة على الجدار (Freeman وآخرون ، 1989) .

C- طريقة اطباق المعايرة الدقيقة : Microtitration plates method (MTP)

أُستعملت طريقة صفيحة المعايرة الدقيقة Micro Titer Plate (MTP) وفقا لما ورد في (Almeida وآخرون ، 2013) وكالاتي :

1. تمّ حضن العزلات البكتيرية قيد الدراسة على وسط المرق المغذي Nutrient broth لمدة 18-24 ساعة بدرجة حرارة 37 م° تحت ظروف هوائية .

2. نقلت 2-4 من المستعمرات البكتيرية الى وسط Nutrient broth ، ثمّ مقارنة عكورتها مع عكورة محلول ثابت العكرة القياسي Mc Farland .

3. بوساطة ماصة دقيقة Micro pipette نقل 150 مايكرو لتر من العالق لكل العزلات الى حفر الصفيحة المصنوعة من مادة Polystyrene والمكونة من 96 حفرة ، عمل لكل عزلة بكتيرية ثلاث مكررات ، كما أُضيف من المرق المغذي Nutrient broth إلى عدة حفر (ثلاث حفر) وتركّت بدون تلقيح وأُعتبرت بانها حفر سيطرة سالبة ، ثمّ تمّ تغطية الصفيحة وحضنت لمدة 24 ساعة في الحاضنة Incubator .

4. أُزيل غطاء الصفيحة بعد الحضن وأُفرغت الحفر من المزارع برفق ، ثمّ أُزيلت الخلايا غير الملتصقة بالماء المقطر بغسل الحفر 2-3 مرات .

5. تُثبت الخلايا الملتصقة بالجدران للحفر من خلال إضافة 200 مايكرو لتر من كحول

Methanol لمدة 10 دقائق .

6. صُبغت الأغشية الحيوية بصبغة Crystal Violet بإضافة 200 مايكرو لتر منها بتركيز

0.5% لكل حفرة لمدة 15 دقيقة .

7. بعد إنتهاء مدة التصبغ ، أزيلت الصبغة بالغسل 2-3 مرات بالماء المقطر .

8. أُضيف كحول الأيثانول المطلق Ethanol 95 % بمقدار 200 مايكرو لتر لكل حفرة ولمدة

10 دقائق لغرض إزالة الصبغة الملتصقة في الخلايا (Tang وآخرون ، 2011)

9. حُسبت الكثافة الضوئية لجميع الحفر بجهاز قارئ الاليزا عند طول موجي 630 نانومتر

وذلك حسب ماجاء في (Tang وآخرون ، 2011) ، إذ تمت المقارنة بين مقدار

الإمتصاصية للحفر المزروعة مع مقدار الإمتصاصية لحفر السيطرة وكما يلي :

$2 \leq A \leq 2 \cdot A_c$ (أغشية حيوية قوية Strong adherent) ، $A_c \leq A \leq 2 \cdot A_c$ (أغشية حيوية

متوسطة Moderately adherent) ، $A \leq A_c$ (غير مكونة للأغشية الحيوية adherent

Non-) ، حيث إنّ تمثل A بانها الحفر المزروعة بالبكتريا و A_c فتمثل حفر السيطرة

(الوسط الزرعي الذي لا يحتوي على البكتريا) .

5.10.2.3. التحري عن قابلية البكتريا بالالتصاق بالخلايا الطلائية Adhesion with

Epithelial Cells

أُتبعت طريقة Iwahi وآخرون (1983) لمعرفة قابلية البكتريا على الالتصاق بالخلايا

الطلائية وكالاتي :

1.5.10.2.3. تحضير عالق الخلايا الطلائية للإنسان :

حضر العالق بأخذ عينة وسطية من الإدرار Mid stream urine لنساء غير مصابات في

انابيب معقمة ، ثم نبذت العينات لمدة 5 دقائق بسرعة 1500 دورة/ دقيقة . وغسل الراسب الذي

يحتوي على الخلايا الظهارية بمحلول داريء الفوسفات الفسيولوجي وتكررت عملية الغسل 4 مرات، وبعدها علقّت الخلايا بمحلول الملح الفسيولوجي المحضر في الفقرة 1.2.2.3. استخدم هذا العالق في اختبار الالتصاق للخلايا البكتيرية (Hagberg وآخرون ، 1981) .

2.5.10.2.3. إختبار الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية :

- أخذ 0.5 مليلتر من المزروع البكتيري المنماة بعمر 24 ساعة وأضيف الى 0.5 مليلتر من عالق الخلايا الظهارية المحضر في الفقرة السابقة 1. 5.10.2.3 .
- رُجّ الخليط جيدا بعدها حضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة ساعة واحدة مع التحريك المستمر كل (10) دقائق .
- غسلت الخلايا الظهارية بالمحلول الملحي الفسلجي 4 مرات مع الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 1500-2000 دورة /الدقيقة في كل مرة وذلك للتخلص من البكتريا غير الملتصقة .
- سحبت قطرة من العالق النهائي الناتج على شريحة زجاجية نظيفة وتركت لتجف بدرجة حرارة المختبر ثم ثبتت هذه الشريحة بحرارة اللهب وبعدها صبغت بصبغة جرام .
- شوهدت نتائج الالتصاق بإستخدام العدسة الزيتية تحت المجهر الضوئي إذ تظهر النتيجة الموجبة من خلال التصاق البكتريا بهيئة مفردة أو تجمعات على سطح الخلايا الظهارية.
- أستخدم الملح الفسلجي مع الخلايا الطلائية بدون عالق بكتيري كاختبار سيطرة سالبة .

6.10.2.3. الكشف المظهري عن مضخات الدفع Detection of Efflex Pump

اجري الاختبار باستخدام طريقة العجلة الخشبية EtBr-agar Cart Wheel Method

وفقا لما ورد في (Martins وآخرون، 2011). وكما يلي :

1. حضرت تراكيز مختلفة لصبغة بروميد الاثيديوم تتراوح بين 10 ، 20 ، 25 ، 100 ، 200

، 250 مايكروغرام/مل بإضافة نسب مختلفة من هذه الصبغة الى وسط Trypton (TSA)

Soy Agar المعقم والمبرد الى درجة 45 م° .

2. حضر العالق البكتيري للعزلات المراد اختبارها وذلك بنقل مستعمرة مفردة منمأة على وسط

نقيع القلب والدماغ الصلب بعمر 24 ساعة باستخدام المحلول الفسلجي المعقم وقورنت

عكورته مع محلول ثابت العكرة القياسي (أنبوبة مكفرلاند 0.5) .

3. بوساطة ماصة دقيقة سحب 5 مايكروليتر من العالق أعلاه كلا على حدة ، ولقحت كقطرة

واحدة على وسط TSA الذي يحتوي على صبغة برميد الاثيديوم وتركت الأطباق لفترة في

درجة حرارة المختبر لحين جفاف قطرات العالق قبل قلب الأطباق ، حضنت الأطباق

بالحاضنة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .

4. فحصت الاطباق باستخدام مصدر الاشعة فوق البنفسجية U.V. light لمشاهدت شد التألق

، فالمستعمرات البكتيرية التي تعطي تألقا في التراكيز القليلة للصبغة تمتلك مضخات دفع

أعلى فعالية وكفاءة مقارنة بالمستعمرات التي تتألق بالتراكيز العالية للصبغة .

7.10.2.3. الكشف عن المحفظة : Detection of capsules

أتبعت طريقة الصبغة السالبة negative stain method .

• وضعت قطرة من العالق البكتيري في طرف شريحة زجاجية نظيفة ثم أضيف لها قطرة من

الصبغة السالبة Indian ink ومزجت جيدا باستعمال عروة الناقل .

- وضعت شريحة ثانية نظيفة على طرف الشريحة الأولى المستعملة وبصورة مائلة لتسحب معها العالق البكتيري والصبغة الممزوجين ليتم فرش النمو على طول الشريحة .
- ثم فحصت الشريحة بعد جفافها باستخدام العدسة الزيتية للمجهر الضوئي لمشاهدة المحفظة والتي تكون عبارة عن هالة شفافة حول البكتريا غير مصبوعة بالحبر الهندي (Brook وآخرون ، 2004) .

8.10.2.3. التحري عن إنتاج اللايباز : Detection of lipase production

- لقت العزلات البكتيرية قيد الدراسة على وسط Egg-yolk agar المحضر في الفقرة 2-9-4-2-3 وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة ، في حالة ظهور تحلل حول المستعمرات البكتيرية مما يدل على النتيجة الموجبة للاختبار (Collee وآخرون ، 1996) .

11.2.3. أستخلاص الحامض النووي الدنا البكتيري : Bacterial genomic DNA extraction

- استخلص الحامض النووي DNA من بكتريا *Enterobacter cloacae* باستعمال عدة الاستخلاص Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit المجهزة من شركة Geneaid التايوانية ، وتم إجراء الاستخلاص بحسب تعليمات الشركة إذ كانت السرعة المعتمدة في كل خطوات الاستخلاص هي 14000 دورة/ دقيقة وكالاتي :

1. نقل 1 مل من مزروع البكتريا المنماه لمدة 24 ساعة الى أنابيب أيبندروف Eppendorf tube ذات حجم 1.5 مل.
2. نبذت الانابيب مركزيا لمدة دقيقة ، بعدها أهمل الطافي (الراشح) بوساطة الماصة .
3. أضيف 180 مايكروليتر من دارىء GT ثم اعيد تعليق راسب الخلايا ومزجت جيدا بوساطة المازج لمدة 5 ثوان.

4. أضيف 20 مايكروليتر لمحتويات الأنبوبة من أنزيم Proteinase K ثم مزج بوساطة المازج Vortex وحضنت الانابيب بالحمام المائي Water bath الهزاز وبدرجة حرارة 60 م° لمدة 10 دقائق مع مراعاة تحريك الأنابيب كل 3 دقائق لضمان تحلل الخلايا بشكل كامل بالمزيج.
5. أضيف 200 مايكروليتر من دارىء GB وخلطت المحتويات بصورة جيدة بالمازج لمدة 10 ثوان وحضن المزيج بالحمام المائي بدرجة حرارة 70 م° لمدة 10 دقائق مع مراعاة رج الأنابيب كل 3 دقائق أيضا (يحضن دارىء Elution في هذه الأثناء على درجة حرارة 70 م° ليتم تسخينه للوصول إلى خطوة الغسل Elution) .
6. أضيف 200 مايكروليتر كحول الأيثانول المطلق Absolute ethanol ثم خلط المزيج بوساطة المازج Vortex.
7. وضع عامود GD Column في أنابيب الجمع Collection tube بحجم 2 مل ونقل له جميع الخليط الى الفلاتر.
8. طردت الانابيب مركزيا بجهاز Centrifuge لمدة دقيقتين بعدها نقلت المحتويات الموجودة بالفلاتر الى أنبوبة جمع جديدة بحجم 2 مل.
9. أضيف 400 مايكروليتر من دارىء W1 Bufferdd الى عمود GD لغسل الحامض النووي .
10. طردت الانابيب مركزيا لمدة 30 ثانية ، للتخلص من البروتين والـ RNA والحصول على DNA نقي ، ثم وضع عمود GD Column في أنبوبة الجمع .
11. أضيف 600 مايكروليتر من دارىء Wash buffer الى عمود GD الحاوي على الحامض النووي للتخلص من الدهون .
12. طردت الأنابيب مركزيا لمدة 30 ثانية ، ثم وضع عمود GD Column في أنبوبة الجمع .

13. أعيد الطرد المركزي مرة ثانية لمدة ثلاث دقائق لتجفيف العمود .

14. نقل العمود GD Column الى أنبوبة ابيندروف جديدة ومعقمة ذات حجم 1.5 مل .

15. أضيف 50 مايكوليتتر من داريء Elution المسخن مسبقا في الحمام المائي Water bath

ثم طردت الانابيب مركزيا لمدة 30 ثانية لازابة الحمض النووي ونزوله الى داخل الابندروفة.

16. تم التخلص من GD Column والاحتفاظ بانابيب الابندروف المحتوية على DNA النقي

في درجة حرارة -20 م° لحين الاستعمال.

12.2.3 قياس تركيز الدنا ونقاوته : Estimation DNA concentration and purity

تم قياس تركيز DNA من خلال تخفيف العينة بإضافة 495 مايكروليتر من الماء المقطر

إلى 5 مايكروليتر من الدنا DNA المستخلص ، وقراءة امتصاصية العينة للأشعة فوق

البنفسجية بواسطة جهاز Spectrophotometer والذي يستخدم لقياس الكثافة الضوئية O.D

بطول موجي يتراوح بين 260 ، 280 نانوميتر وبتطبيق القانون الاتي :

اولا: تركيز الدنا $\mu\text{g/ml}$ = مقدار الامتصاصية عند الطول الموجي 260 لمل واحد من العينة x

مقلوب التخفيف x 50 .

ثانيا: النقاوة = $\frac{\text{الامتصاصية عند الطول الموجي 260}}{\text{الامتصاصية عند الطول الموجي 280}}$.

وهي تعد احدى المؤشرات على كفاءة الاستخلاص ومدى تلوث الدنا بالبروتين وبالحامض

النووي RNA (Maniatis وآخرون ، 1982) .

13.2.3 تفاعل البلمرة المتسلسل : Polymerase chain Reaction (PCR)

تم فحص العزلات البكتيرية المقاومة لمضادات مجموعة الـ Quinolones بطريقة فحص

الحساسية التقليدي Antibiotics sensitivity ومن خلال النمو في الوسط الزرعي الصلب

المضاف اليه احد المضادات الحيوية Ciprofloxacin ، Nalidixic acid ومن ثم الكشف

عن قيمة MIC ، بعدها تم اختيار العزلات المقاومة لمضادات مجموعة الـ Quinolones للتحري عن وجود جينات تشفر لمقاومة مركبات هذه المجموعة . تم الكشف عن الجينات 16S rRNA و *qnrB* و *qnrS* بأستخدام تقنية PCR وبأتباع الخطوات الآتية :

1- تحضير العينات : Sample preparation

حضر 5 مايكرو لتر من DNA المستخلص في الفقرة 11.2.3 والذي سيضاعف بأستعمال تقنية PCR. يوضح جدول (11-3) المكونات اللازمة لتضعيف الجينات المستعملة بتقنية PCR .

2- تحضير المزيج لسلسلة تفاعل إنزيم البلمرة: PCR Master mixture preparation:

حضر مزيج الـ PCR وفقا لما ورد في تعليمات الشركة المصنعة Bioneer / Korea وبالخطوات الآتية :

A - ذوب PCR PreMix بتعريضه لدرجة حرارة المختبر ، ثم وضع في المنبذة لتتجمع المكونات في قعر الأنبوب .

B - أعد الحجم المطلوب لمزيج التفاعل ، كما موضح في الجدول (11.3) .

جدول 11.3 : المحتويات اللازمة للتفاعل التضاعفي لكل من الجينات 16S rRNA و *qnrB* و *qnrS* .

ت	المحتويات	حجم خليط التفاعل لأنبوبة واحدة للبواي والـ DNA القالب (مايكرو لتر)
1	PCR PreMix	5
2	البادئ الأمامي	2
3	البادئ الخلفي	2
4	قالب الدنا	5
5	ddH ₂ O	6
الحجم النهائي		20

C- نبذت مكونات المزيج في المنبذة مدة قدرها 5 ثواني .

14.2.3 برمجة جهاز PCR : PCR programming

تم إجراء خطوات التضاعف الجيني للتحري عن الجينات 16S rRNA و *qnrB* و *qnrS* ، إذ تمت برمجة جهاز PCR ، كما موضح في الجدول 12-3

جدول 12-3 : برمجة جهاز P.C.R

Type Of Gene	PCR Conditions Temperature / Minute				
	One cycle	30 cycles			One cycle
	Initial denaturation	denaturation	Annealing	Extention	Final Extention
16S rRNA	94C° for 5 min.	94C° for 30 sec.	56 for 30 sec.	72 C° for 1 min.	72 C° for 5 min..
<i>qnrB</i>	94C° for 5 min.	94C° for 30 sec.	54 for 30 sec.	72 C° for 30 sec.	72 C° for 5 min.
<i>qnrS</i>	94C° for 5 min.	94C° for 30 sec.	56 for 30 sec.	72 C° for 30 sec.	72 C° for 5 min.

* نُقل بعد ذلك 5 مايكروليتر من الناتج لكل جين للترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز.

* حُفظ المتبقي الناتج من التضاعف في درجة - 20 م° .

15.2.3 الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز : Gel Electrophoresis Agarose

أُجري الترحيل الكهربائي للـ DNA المستخلص بإستعمال المحاليل المحضرة على وفق

الفقرة 8.2.2.3 وكالاتي :

1. حُضر هلام الأكاروز Agarose Gel باذابة 1.5 غم من الأكاروز في 100 مل من

محلول Buffer 10 x TBE بعد تخفيفه 10 مرات للحصول على Buffer 1x TBE ،

سُخن الأكاروز إلى درجة الغليان وتُترك ليبرد إلى درجة حرارة 55 - 60 م° ، ثم أُضيف إليه

صبغة بروميد الإثيديوم Ethidium bromide بتركيز نهائي 0.5 مايكروغرام \ مل

بإستعمال المحلول الخزين المحضر لهذه الصبغة بعدها مُزج الأكاروز جيدا .

2. تُبَت المشط Comb بشكل جيد في القالب المخصص (صفيحة اسناد الاكاروز Tray)
لصب الاكاروز لتكوين الحفر Wells المُعدة لتحميل العينات ثم صُبَّ الأكاروز بهدوء
لتجنب حدوث فقاعات هوائية Bubbles ، بعدها تُرك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة المختبر
لمدة 30 دقيقة .
3. نُقِل الاكاروز المتصلب مع القالب بعد رَفَع المشط بهدوء إلى حوض الترحيل الحاوي على
حجم مناسب من محلول 1x TBE بحيث يغطي سطح هلام الاكاروز بالكامل .
4. ثم حُمِلت العينات المُعدة للترحيل بأضافة 5 مايكروليتر من خليط التفاعل الي كل حفرة من
حفر الاكاروز المخصصة لها بإستعمال ماصة دقيقة Micropipette وكذلك تم نقل 5
مايكروليتر من الدليل الحجمي (100 bp) DNA Ladder ووضع في الحفرة الاولى والذي
استخدم لتحديد احجام قطع DNA الموجودة . بعدها تم إجراء عملية الترحيل الكهربائي بفرق
جهد مقداره 100 فولت لمدة ساعة .
5. بعد الإنتهاء من عملية الترحيل نُقِل القالب لفحص الهلام بتعريضه إلى مصدر للأشعة
فوق البنفسجية UV-Transilluminator عند طول موجي 312 نانوميتر (Green و
Sambrook ، 2012) .

16.2.3. طريقة تحليل تسلسل الحامض النووي DNA : DNA sequence analysis method

أُجريت طريقة تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية للـ DNA الناتج من تفاعل
PCR لتحديد التسلسل الوراثي للجين التشخيصي للبكتريا rRNA 16S ، وتم تحليل
الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis باستعمال برامج Mega6 وتتابعات
لسلاسل عالمية مسجلة لغرض المقارنة ، إذ تم ارسال 20 مايكروليتر لـ 4 عينات من
ناتج تفاعل PCR لكل عينة مع البادئ الخاص بالجين الى شركة Macrogen

Company في كوريا الجنوبية عن طريق شركة جسر المسيب لتجارة الاجهزة
والمعدات العلمية والمختبرية في بغداد /العراق ، لإجراء تسلسل الحامض النووي
باستعمال جهاز AB DNA Sequencing System .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and
Discussion

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4. جمع العينات : Collection of Samples

تضمنت الدراسة جمع 333 عينة من مصادر سريرية مختلفة، ومن المرضى الراقدين وعددهم 118 وغير الراقدين وعددهم 215 مريضاً وتضمنت العينات 45 عينة من مسحات الجروح و20 عينة من مسحات الحروق و9 عينات من الخروج و3 عينات من قشع التهابات التنفسية و10 عينات من المسحات المهبلية ، اما عينات الإدرار والدم فتضمنت 212 و 34 عينة على التوالي ، وكان عدد عينات الذكور 145 عينة وعدد عينات الإناث 188 عينة وفق ما مذكور في الجدول (1-4).

جدول(1-4) : النسب المئوية لتوزيع العينات السريرية ومصادر جمعها .

حالة المريض	لا يوجد نمو = 127 (38.14%)				وجود النمو = 206 (61.86%)				عدد العينات	المصدر (مكان جمع العينة)
	الذكور		الإناث		الذكور		الإناث			
	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد		
راقد	50.00	2	50.00	2	63.41	26	36.59	15	45	الجروح
راقد	75.00	3	25.00	1	25.00	4	75.00	12	20	الحروق
مراجع	42.16	43	57.84	59	34.04	32	65.96	62	196	الإدرار
راقد	66.67	6	33.33	3	28.57	2	71.43	5	16	
مراجع	0.00	0	0.00	0	55.56	5	44.44	4	9	الخروج
راقد	0.00	0	0.00	0	100.00	3	0.00	0	3	قشع
راقد	0.00	0	100.00	2	0.00	0	100.00	5	7	مسحات مهبلية
مراجع	0.00	0	100.00	2	0.00	0	100.00	1	3	
راقد	50.00	2	50.00	2	60.87	14	39.13	9	27	الدم
مراجع	0.00	0	0.00	0	42.86	3	57.14	4	7	
	44.09	56	55.91	71	43.20	89	56.80	117	333	المجموع

ظهر النمو البكتيري في 206 عينة (61.86%) من العينات الكلية البالغة 333 عينة ولم يظهر النمو البكتيري في 127 رغم جمع العينات من مرضى لديهم الأعراض المرضية وربما يعود السبب في ظهور نتائج الزرع البكتيري السالب الى تناول المرضى المضادات الحيوية قبل اخذ العينات مما ادى الى عدم ظهور البكتريا في العينة (العبدلي ، 2010) . او يكون المسبب فطريات لا تنمو على الاوساط الزرعية المستخدمة أو قد يكون المسبب بكتريا لا تعزل بالطرائق التقليدية المتبعة كالبكتريا اللاهوائية فضلا عن بكتريا *Mycobacterium tuberculosis*، *Leptospira spp.* او اصابات فيروسية وغيرها من الاحياء المجهرية الاخرى التي لا تعزل بالطرق المتبعة في هذه الدراسة (Brooks وآخرون ، 2004) .

2.4. العزل والتشخيص لبكتريا *Enterobacter spp.* : Isolation and Diagnosis of

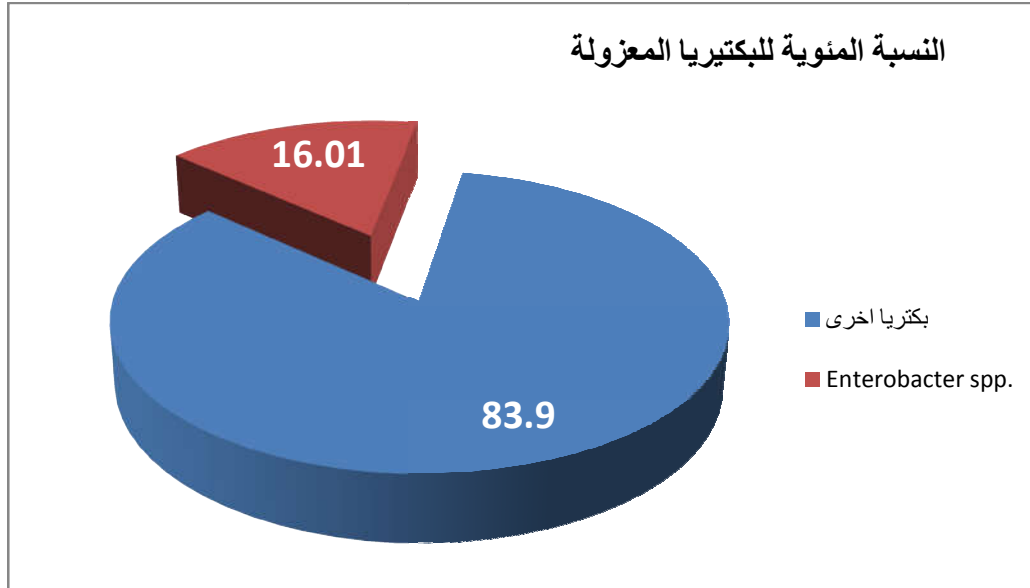
Enterobacter spp.

عزلت بكتريا *Enterobacter spp.* بواقع 33 عزلة بنسبة (16.01%) من اصل 206 من العزلات النامية اذ كانت 173 عزلة بنسبة (83.9%) منها تعود الى أنواع اخرى غير بكتريا *Enterobacter spp.* بعد اجراء التشخيص المظهري والكيموحيوي والجزيئي ، وكما موضح في الشكل (4-1) ، ونسبة العزل هذه لا تتوافق مع Ye وآخرون (2006) الذي عزلها بنسبة 45.2% من المرضى الراقدين في المستشفى الطبي في مدينة انواهى الصينية .

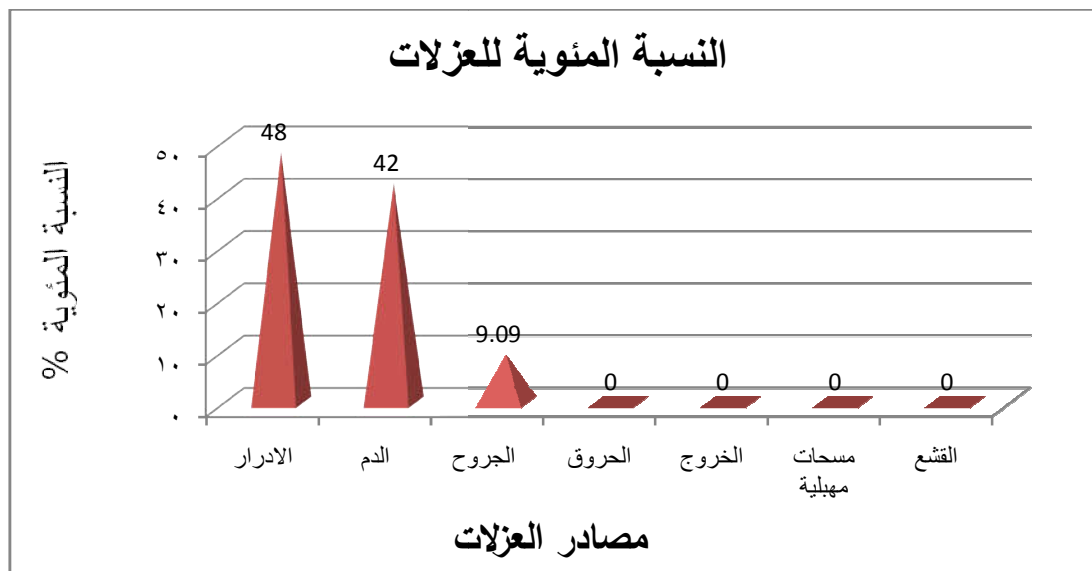
تقدمت عينات الادرار على باقي العينات في امكانية عزل البكتريا منها بنسبة 16 عزلة (48%) من اصل 33 وذلك بسبب العدد الكبير لعينات الادرار بالنسبة لبقية انواع العينات تلتها العزلات المعزولة من الدم بواقع 33/14 (42%) واخيرا 3 عزلات من الجروح (9.09%) كما موضح في

الشكل (4-2). ان العزلات المعزولة من الجروح و 12 عزلة من الدم هي للمرضى الراقدين في المستشفى ، بينما كانت جميع العزلات المعزولة من الادرار وعزلتان للدم هي لمرضى مراجعين في المستشفى كما موضح في الملحق (5) ، ولم يتم عزل البكتريا من المسحات المرضية الاخرى كالقشع والحروق والمسحات المهبلية والخروج كما موضح في الشكل (4-2) ، وهذا يتفق مع (Haghighatpanahal وآخرون ، 2016).

من هذه النتائج يتضح ان هذه البكتريا هي احد اهم مسببات التهاب المسالك البولية وتسمم الدم والتهاب الجروح والتهاب السحايا والغشاء البريتوني في المرضى الراقدين و المراجعين في المستشفيات.



شكل (4-1) : النسبة المئوية لبكتريا *Enterobacter spp.* مقارنة بانواع بكتيرية اخرى معزولة من المرضى الراقدين والمراجعين في المستشفى .



شكل (4-2) : النسبة المئوية للعينات المعزولة منها بكتريا *Enterobacter spp.* للمرضى الراقدين والمراجعين في المستشفيات

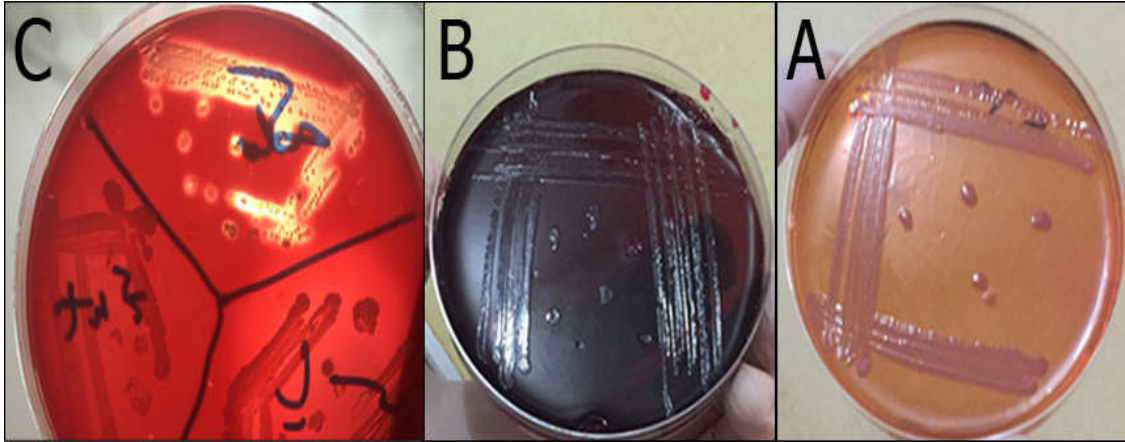
عند مقارنة النسبة المئوية للعزلات المعزولة من الدم نسبة الى عدد عينات الدم الموجبة للنمو والتي تبلغ قيمتها 30/ 14 (46.66%) مع النسبة المئوية للعزلات المعزولة من الادرار نسبة الى عدد عينات الادرار 101/ 16 (15.84%) والنسبة المئوية للعزلات المعزولة من الجروح 41/3 (7.31%). نجد ارتفاع كبير في نسبة اصابة البكتريا للدم وحدثت تجرثم الدم (Bacteremia). كما بينت النتائج ان لجنس المرضى ليس له علاقة بعزل البكتريا اذا كان عدد الاناث 17 والذكور 16 في العينات التي عزلت منها بكتريا *Enterobacter spp.* متقاربا نوعا ما ، (ملحق 5) .

1.2.4. الصفات المظهرية والزربية للعزلات البكتيرية : Morphological and Cultural

Characteristics of of bacterial isolates

ظهرت مستعمرات بكتريا *Enterobacter* المزروعة على وسط اكار الماكونكي وردية مخمرة لسكر اللاكتوز ببطاً ومتوسطة الحجم ودائرية منتظمة الحافات ملساء، وذات قوام مخاطي mucoid

ثم نقلت هذه المستعمرات ونميت على وسط Eosin methylin blue لتمييزها عن بكتريا *E. coli* اذ تعطي الاخيره لونا اخضرا معدنيا براقا على هذا الوسط ، واجري اختبار الحركة لتفريقها عن بكتريا *Klebsiella* إذ كانت العزلات التي اختبرت جميعها متحركة إذ يعد هذا هو الاختبار التفريقي بين بكتريا *Klebsiella* و *Enterobacter*. اما على وسط اكار الدم فظهرت المستعمرات متوسطة الحجم ، دائرية ومنتظمة الحافات ورمادية اللون وغير محللة للدم عدا العزلة رقم 11 اذ كانت محللة للدم من نوع بيتا بنسبة (6.66%) شكل (3-4 C). وذات مستعمرات غامقة بلون وردي ذي مركز اسود داكن وناعمة على وسط الايوسين المثلين الازرق وهذه المواصفات الزرعية متوافقة مع ماورد في (Brenner وآخرون ، 2005 ؛ العبيدي ، 2013 ؛ الهاشمي ، 2013) كما موضح في الشكل (3-4) .



شكل (3-4) : مظهر مستعمرات بكتريا *E. cloacae* المنماة بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة على A. وسط الماكونكي وتظهر المستعمرات الوردية المخمرة لسكر اللاكتوز، B. وسط الايوسين المثل الازرق وتظهر مستعمراتها غامقة اللون ، C . وسط اكار الدم وتظهر المستعمرات غير محللة للدم عدا عزلة واحدة .

2.2.4. Microscopic identification : التشخيص المجهرى

اظهر الفحص المجهرى للبكتريا المصبوغة بصبغة جرام بانها سالبة للصبغة ذات خلايا عصوية الشكل ، مستقيمة ، وهذه الصفات تتوافق مع مواصفات بكتريا *Enterobacter* المذكورة في Brenner وآخرون (2005) . وكما موضح بالجدول (2-4) .

3.2.4. الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص عزلات بكتريا *Enterobacter spp.*

اجريت الاختبارات الكيموحيوية واطهرت النتائج ان جميع عزلات البكتريا كانت سالبة لفحص انتاج انزيم الاوكسيديز وفحص الاندول والمثيل الاحمر وموجبة لفحوصات الكاتليز وفحص فوكاس بروسكاور واستهلاك السترات والحركة ، بينما كانت العزلات متباينة في قدرتها على انتاج انزيم اليوريز واللايسين دي كاربوكسيليز (LDS) Lysin- decarboxylase . بينما اظهرت قدرتها على تخمر السكريات الثلاثة السكروز واللاكتوز والكلوكوز الموجودة في وسط TSI وانتاجها للغاز وعدم قدرتها على إنتاج غاز ثاني كبريتيد الهيدروجين H_2S ، وكما موضح بالجدول (2-4) .

جدول (2-4) : الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص بكتريا *Enterobacter spp.*

النتيجة	الاختبار
-	Gram stain
-	Oxidase
+	Catalase
-	Indol
-	Methyl red
+	Voges –Proskauer
+	Citrate utilization
+/-	Urease
+	Motility
+/-	Lysin- decarboxylase
A/A	TSI
-H ₂ S	H ₂ S Production
+gas	

+ = الفحص الموجب ، - = الفحص السالب ، +/- = نتيجة متغيرة ، A/A = Acid/ Acid

4.2.4. التشخيص باستخدام نظام API-20E : Identification by API-20E system

للتأكد من نتائج التشخيص التقليدي فقد تم استخدام فحص AP20E ، اظهرت نتائج اختبار AP20E مطابقة العزلات للصفات الكيموحيوية للجنس *Enterobacter* ويوضح الجدول (4 - 3) التفاعلات الكيموحيوية التي أبدتها عزلات *E. cloacae* و *E. sakazakii* ، إذ اظهرت النتائج الواردة في الشكل (4-4) ان 33 (16.01%) عزلة من مجموع العزلات البكتيرية المعزولة قيد الدراسة تعود لبكتريا *Enterobacter spp.* ، وان 28 (84.84%) عزلة منها تعود الى بكتريا *E. cloacae* و 5 (15.15%) عزلة تعود للنوع *E. sakazakii* . وهذا يدل على تفوق ظهور نوع بكتريا *E. cloacae* على بقية الأنواع وهذه النتائج تتفق مع ماتوصل اليه الباحث (Al- Tawfiq وآخرون ، 2009) من حيث سيادة هذا النوع مقارنة بالانواع الاخرى والذي عزلها بنسبة 60% ، بينما لا تتفق مع العطار (2007) حيث كانت نسبة العزل لبكتريا *E. cloacae* 4.3% . وايضا لا يتفق مع Al- (2012) Dahmoshi إذ كانت نسبة العزل للبكتريا آنفه الذكر 37.50% ، يتضح مما ذكر اختلاف النسب المئوية لعزل بكتريا *E. cloacae* في الدراسات المحلية والعالمية التي سبقت مقارنة بالدراسة الحالية ، وربما يعود ذلك إلى عوامل عديدة منها اختلاف الموقع الجغرافي لعينات الدراسة واختلاف طرائق وتقنيات العزل ، وقد علل (Fraser وآخرون ، 2010) الى ان ارتفاع معدل تسبب هذه البكتريا بالالتهابات الجلدية والأنسجة الرخوة ربما يعود لاستعمار الجلد من قبل هذه البكتريا كما الفلور الطبيعية وتسببها في العدوى الذاتية . كما ان معظم الالتهابات في المسالك البولية تتجم عن انتقال هذه البكتريا من الامعاء الى المسالك البولية ، وتتسبب في الكثير من الالتهابات للراقيدين في المستشفيات (Grimont و Grimont ، 2006) .

جدول (3-4) : الاختبارات التشخيصية لبكتريا *E. cloacae* و *E. sakazakii* باستخدام نظام

API-20E

Result of isolates <i>E. sakazakii</i>	Result of isolates <i>E. cloacae</i>	Test
+	+	ONPG
+	+	ADH
-	+	LDC
+	+	ODC
+	+	CIT
-	-	H ₂ S
-	-	URE
-	-	TDA
-	-	IND
+	+	VIP
-	-	GEL
Sugars fermentation/Oxidation		
+	+	GLU
+	+	MAN
+	-	INO
-	+	SOR
+	+	RHA
+	+	SAC
+	+	MEL
+	+	AMY
+	+	ARA

5.2.4. التشخيص باستخدام جهاز GN Card : VITEK 2 Compact GN

Identification by GN Card

أظهرت نتائج الفحص التشخيص التأكيدي باستخدام البطاقة السالبة (GN Card) والخاصة بجهاز Vitek 2 Compact بان 28 (84.84%) من العزلات تعود الى بكتريا *E. cloacae* ، و 5 (15.15%) عزلات تعود لبكتريا *E. sakazakii* .

إن استعمال البطاقة الخاصة بالبكتريا السالبة لصبغة جرام يعطي دقة من خلال أجراء 47 اختبار وخلال (5-8) ساعات ، إضافة على انه يحوي اختبارات غير تقليدية لاتحويها عدد التشخيص الأخرى ، مما يتيح تشخيص العزلات خلال وقت قياسي وبدقة عالية ونسبة خطأ قليلة جدا ، إذ يظهر الجهاز نتائج العزلات الضعيفة تجاه تفاعل معين ويرمز لها بالرمز (-) دليلا على تفاعل سالب والرمز (+) على تفاعل موجب ، وتحوي برامجيات الجهاز على قواعد بيانات خاصة تقوم بتحويل نسق ايض البكتريا تحت الاختبار الى عدد حيوي (Bionumber) مكون من 16 رقم ، حيث تعمل الحاسبة المرتبطة بجهاز Vitek 2 على مقارنته معطية التشخيص السريع خلال مده أقصاها ثمانية ساعات ، ويوضح الجدول (4 - 4) التفاعلات الكيموحيوية التي أبدتها عزلات *E. cloacae* و *E. sakazakii* .

وتشير الشركة bioMérieux المصنعة الى إن دقة التشخيص بأستعمال البطاقة السالبة (GN)

Card الخاصة بجهاز Vitek 2 Compact تصل نسبة دقة التشخيص بهذا الجهاز إلى

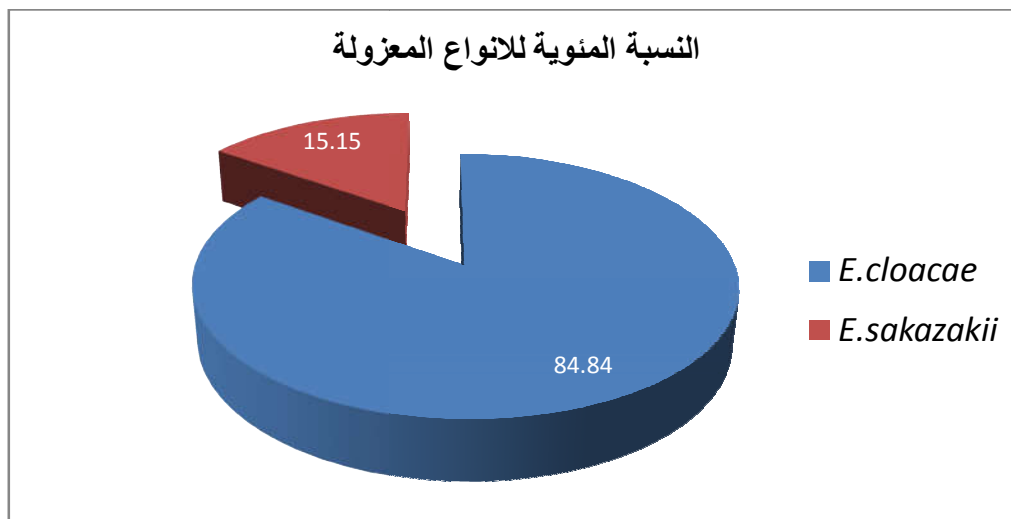
99% (Pincus، 2011) .

جدول (4-4) : الاختبارات التشخيصية لبكتريا *E. cloacae* و *E. sakazakii* باستخدام نظام

GN -Card

Well	Test	Biochmical Detalis		Well	Test	Biochmical Detalis	
		<i>E.cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i>			<i>E.cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i>
2	APPA	-	-	32	dSOR	+	-
3	H2S	-	-	33	SAC	+	+
4	PyrA	-	-	34	dTAG	-	-
5	IARL	-	-	35	dTRE	+	+
7	dCEL	+	+	36	CIT	+	+
9	BGAL	-	+	37	MNT	+	-
10	H2S	-	-	39	5KG	-	-
11	BNAG	+	+	40	ILATK	+	+
12	AGLTp	-	-	41	AGLU		+
13	dGLU	+	+	42	SUCT	+	+
14	GGT	+	-	43	NAGA	+	-
15	OFF	+	+	44	AGAL	+	+
17	BGLU	+	+	45	PHOS	-	-
18	dMAL	+	+	46	GlyA	+	-
19	dMAN	+	+	47	ODC	+	+
20	dMNE	+	+	48	LDC	-	-
21	BXYL	+	+	53	IHISa	-	-
22	BAlap	+	-	56	CMT	-	-
23	ProA	+	-	57	BGUR	-	-
26	LIP	-	-	58	O129R	+	+
27	PLE	+	+	59	GGAA	-	-
29	TyrA	+	-	61	IMLTa	-	-
31	URE	-	-	62	ELLM	-	+
64	ILATa	-	-				

+ = الفحص الموجب ، - = الفحص السالب



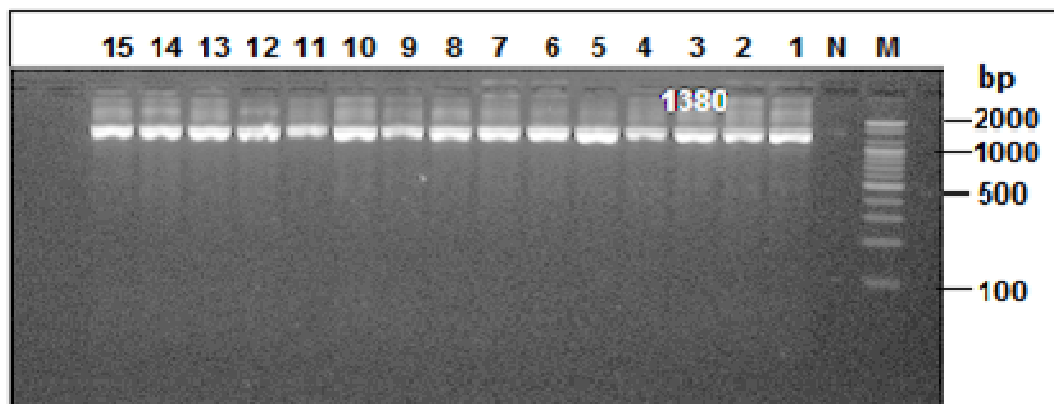
شكل (4-4) : النسبة المئوية لأنواع العائدة لبكتريا *Enterobacter* spp. المعزولة من المرضى .

6.2.4. التشخيص الجزيئي للجين 16S rRNA : Molecular Identification of 16S rRNA gene

تعد الطرق الجزيئية طرائق سريعة وتأكيدية في تشخيص البكتريا وقد تم سابقا في هذه الدراسة التشخيص لمستوى الجنس والنوع باستخدام الطرق المظهرية والكيموحيوية وعرفت العزلات الثلاث والثلاثون على انها تعود إلى الجنس *E. cloacae* و *E. sakazakii* ، ولتأكيد النوع على المستوى الجزيئي صمم زوج بادئات الدنا لتضخيم منطقة في الجين 16S rRNA الرنا الرايبوسومي بإستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي . وقد تم اثناء الدراسة استخلاص الحمض النووي لبكتريا *E. cloacae* والكشف عن نواتج إستخلاص الحامض النووي DNA بإستخدام جهاز Nanodrop و تحديد تركيز الحامض النووي DNA المستخلص ما بين 50-300 نانوغرام /مايكروليتر، وتراوحت نقاوته بين 1.6-1.9 ، وتم تضخيم جين 16S rRNA وقد ظهرت حزمة المنطقة المحيطة Flanking

region بعد ترحيل ناتج التضخيم بحجم 1380 زوج قاعدة بالمقارنة مع الدليل الحجمي DNA Ladder المعروفة احجام حزمه ، وكما موضح في الشكل (4-5) .

بينت نتائج الكشف عن وجود الجين 16S rRNA في العزلات الداخلة في الدراسة وكانت جميعها حاملة للجين (100%) ، اذ بينت نتائج تفاعل البلمرة التسلسلي لجين 16S rRNA انه يمتلك حجم 1380 زوج قاعدة عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder ذي الحزم المعروفة الأحجام الجزيئية والمجهز من قبل شركة Bioneer \ Korea ، لوحظ ان أحجام الحزم مماثلة للحجم المتوقع ، كما في الشكل (4-5). وتم انتقاء اربع عزلات وارسلت الى شركة ماكروجين لقراءة التتابعات .



شكل (4-5). الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين 16S rRNA في هلام الاكاروز وتركيزه 1.5% الحاوي على 0.5 ملغم/مل من صبغة Ethidium bromide في محلول TBE 1X وفولتية 10 فولت /سم ولمدة ساعة وباستعمال DNA Ladder (2000 bp-100bp) . ويظهر في العمود الاول M ويبدأ من 100 زوج قاعدة. المسار N يمثل العينة السالبة . الاعمدة 1-15 حزم الجين وحجمها 1380 زوج قاعدة .

3.4. تحديد تتابعات القواعد النتروجينية للجين 16S rRNA :

Determine of nitrogen bases sequences for the 16S rRNA gene

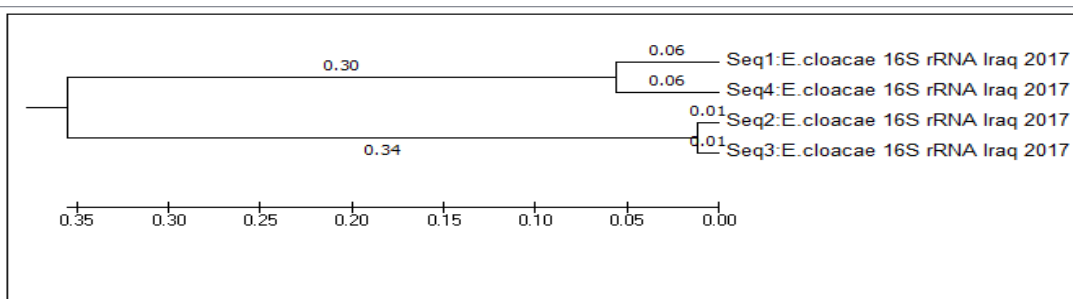
تم اجراء تحديد تتابعات القواعد النتروجينية لاربع عزلات من بكتريا *E. cloacae* ، بعد قراءة تتابعات الدنا للشريط المتقدم والشريط الراجع واعادة جمع الشريطين وحذف القواعد الشاذة في احدهما وتحليلها ومطابقتها بقاعدة بيانات NCBI تبين ان العزلات تعود الى نوع *E. cloacae* ، وتم رسم شجرة التقارب الوراثي بين العزلات المدروسة الاربع واستنتج التاريخ التطوري باستخدام طريقة أوبغما (UPGMA) Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (Sokal و Sneath ، 1973) . أجريت التحاليل التطورية باستعمال برنامج ميغا 6 (MEGA6) ، ملحق (7) .

اتضح ان العزلات 1 و4 متماثلة بنسبة 100% وتقع على نفس البعد الوراثي بمسافة 0.692 وعلى الفرع الاول وان العزلتين 3 و2 متماثلتان وتقعان على نفس البعد الوراثي بمسافة 0.0135 مع بعضهما وعلى الفرع الثاني من الشجرة المحلية بمسافة 0.3335 عن جذر الشجرة وكما مبين في الجدول (4 - 5) و الشكل (4 . 6) ، ولعمل شجرة التقارب الوراثي للعزلات العراقية المشخصة في هذه الدراسة مع العزلات العالمية المنشورة في قاعدة بيانات NCBI تم تحميل تسلسلات نيوكليوتيدات ثماني عزلات لبكتريا *E. cloacae* وتظهر الشجرة المثلى مع مجموع طول الفرع = 15.41046989 ، وبمعدل بعد وراثي 3.652 ، والمقارنة بمقياس الوحدات اسفل الفروع للمسافات التطورية المستخدمة. تم حساب المسافات التطورية باستخدام طريقة الاحتمال المركب الأقصى (Tamura وآخرون ، 2004 ؛ Tamura وآخرون ، 2013) وهي تمثل في الوراثة الجزيئية الاستبدال والاحلال لكل موقع نيوكليوتيدي .

شمل التحليل 12 تسلسل للنوكليوتيدات وكما مبين في الجدول (4 - 6) و الشكل (7.4) ،
وألغيت جميع المواقع التي تحتوي على ثغرات وبيانات ناقصة . وكان هناك ما مجموعه 482 قاعدة
في مجموعة البيانات النهائية .

تبين وجود تغير على مستوى القاعدة المفردة في التتابع الثاني G/C 3294738 وفق الرقم
المرجعي gbICP022158.1 نوع استبدال Transversion وثلاث تغيرات في التتابع الثالث اثنان
G/A 361736 و G/A 361985 نوع انتقال Transition و G 361773 -/G نوع اضافة
Insertion وفق الرقم المرجعي gbICP021896.1 وثلاث تغيرات في التتابع الرابع احدهما G/T
1737732 نوع استبدال واثنان G/A 1737737 و C/T 1737813 نوع انتقال وفق الرقم المرجعي
gbICP021896.1 وكما موضح في الجدول (4-7) .

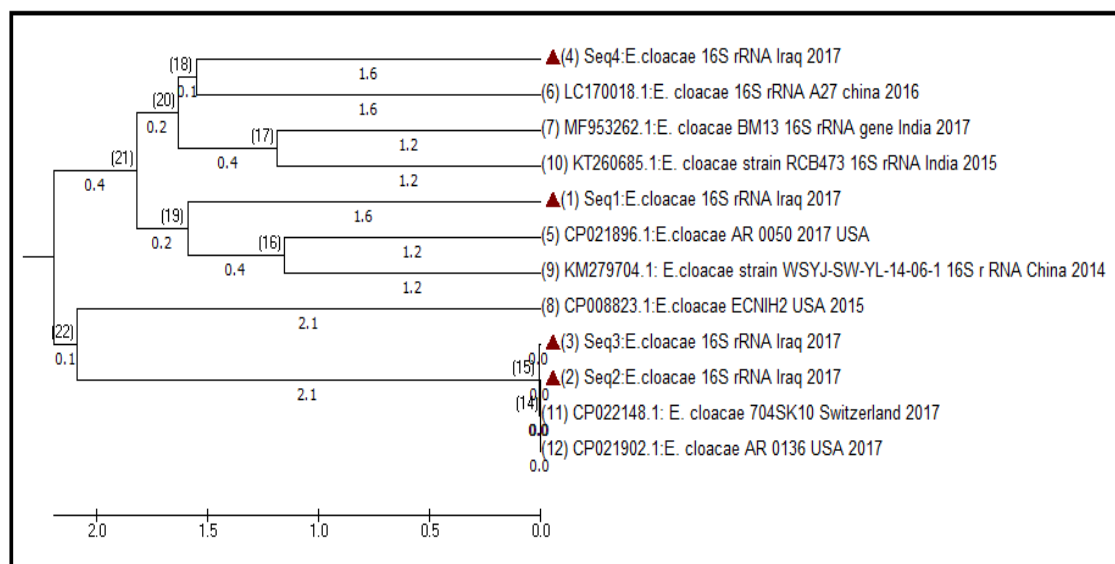
تم نشر تتابعات جين 16S rRNA الجزيئي لتتابع مكون من 499 زوج قاعدة العائد للعزلة E.
MHA cloacae في قاعدة بيانات NCBI تحت الرقم المرجعي ACCESSION
LC322252 للعزلة رقم 1 المسجلة في قاعدة البيانات في المركز العالمي NCBI الخاص ببنك
الجينات بتاريخ 20 ايلول 2017 ، ملحق (8) .



شكل (4-6): شجرة التقارب الوراثي لعزلات بكتريا *E. cloacae* الاربعة المعزولة من تجرثم
الدم للمرضى العراقيين بطريقة (UPGMA) وباستعمال برنامج MEGA6 .

جدول (5-4) : التقارب الوراثي للعزلات العراقية

	1	2	3	4
1. Seq1:E.cloacae 16S rRNA Iraq 2017				
2. Seq2:E.cloacae 16S rRNA Iraq 2017	0.700			
3. Seq3:E.cloacae 16S rRNA Iraq 2017	0.685	0.023		
4. Seq4:E.cloacae 16S rRNA Iraq 2017	0.111	0.727	0.729	



شكل (4-7) : الشجرة الوراثية لعزلات بكتريا *E. cloacae* الاربعة المعزولة المعطمة بالمثلث الاحمر والمعزولة من تجرثم الدم للمرضى العراقيين بالمقارنة مع 8 عزلات محملة من قاعدة البيانات NCBI بطريقة (UPGMA) وباستعمال برنامج MECA6 .

جدول (4 - 6) : التقارب الوراثي للعزلات العراقية وعزلات عالمية من قاعدة بيانات NCBI

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Seq1:E.cloacae 16S rRNA Iraq 2017											
2. Seq2:E.cloacae 16S rRNA Iraq 2017	4.299										
3. Seq3:E.cloacae 16S rRNA Iraq 2017	5.109	0.015									
4. Seq4:E.cloacae 16S rRNA Iraq 2017	3.904	4.026	3.890								
5. CP021896.1:E.cloacae AR 0050 2017 USA	3.692	3.526	3.384	3.137							
6. LC170018.1:E.cloacae 16S rRNA A27 china 2016	3.168	5.666	5.594	3.103	4.133						
7. MF953262.1:E.cloacae BM13 16S rRNA gene India 2017	4.292	5.479	5.402	2.906	3.194	2.731					
8. CP008823.1:E.cloacae ECNIH2 USA 2015	3.692	4.182	4.165	5.206	3.787	3.581	5.486				
9. KM279704.1: E.cloacae strain WSYJ-SW-YL-14-06-1 16S r RNA China 2014	2.665	3.643	3.375	3.832	2.309	3.930	3.849	5.113			
10. KT260685.1:E.cloacae strain RCB473 16S rRNA India 2015	3.252	3.954	3.876	3.551	3.050	3.862	2.370	4.209	3.889		
11. CP022148.1: E.cloacae 704SK10 Switzerland 2017	4.299	0.000	0.015	4.026	3.526	5.666	5.479	4.182	3.643	3.954	
12. CP021902.1:E.cloacae AR 0136 USA 2017	4.299	0.000	0.015	4.026	3.526	5.666	5.479	4.182	3.643	3.954	0.000

جدول (4-7): التغيرات في القواعد النيتروجينية لتتابعات العزلات 1 و 2 و 3 و 4 لبكتريا *E. cloacae*

رقم العينة	نوع الاستبدال	الموقع	النوكليوتيد	مدى القواعد	الرقم المرجعي للتتابع
تتابع 2	Transversion	3294738	G>C	3293899 to 3295001	gb CP022148.1
تتابع 3	Transition	361736	G>A	361412 to 362695	gb CP021896.1
	Insertion	361773	->G		
	Transition	361985	G>A		
تتابع 4	Transversion	1737732	G>T	1737032 to 1738325	gb CP021896.1
	Transition	1737737	G>A		
	Transition	1737813	C>T		

4.4. توزيع العزلات حسب موضع الإصابة :

Distribution of isolates according to source of infection

صنفت العزلات البالغ عددها 33 عزلة وبنسبة (16.01%) بحسب مواضع الإصابة بعد ان

تم تشخيصها بواسطة الطرائق السابقة الذكر، إذ يبين الجدول (4 - 8) عدد العزلات ونسبها حسب

موضع الإصابة ، حيث بلغ عدد العزلات التي حصلنا عليها من الإدرار (16) عزلة بكتيرية من مجموع (101) عينة ونسبة (15.8%) ، بينما كانت العزلات التي حصلنا عليها من الدم (14) عزلة من مجموع (30) عينة ونسبة (46.66%) ، أما عزلات الجروح فقد بلغ عددها (3) من مجموع (41) مسحة ونسبة (7.31%) ، وكانت العزلات التي حصلنا عليها من الجروح الأقل من بين العزلات السريرية .

جدول (4 - 8) : أعداد عزلات *E.cloacae* ونسبها المئوية حسب مواقع العزل

عزلات <i>Ent</i>		عدد العينات الموجبة للنمو	المصدر (مكان جمع العينة)
%	العدد		
7.31	3	41	الجروح
0.00	0	16	الحروق
15.84	16	101	الإدرار
0.00	0	9	الخروج
0.00	0	3	قشع
0.00	0	6	مسحات مهبليّة
46.66	14	30	الدم
16.01	33	206	المجموع

أوضحت نتائج الدراسة الحالية ان إصابة مجرى الدم بلغت 14 عزلة ونسبة 46.66% ، حيث كانت 9 منها تعود لبكتريا *E.cloacae* و 5 عزلات تعود للنوع *E.sakazakii* ، وكانت هذه النسبة متوافقة مع ما توصلت اليه Jasim (2017) في محافظة بغداد التي اوضحت ان اعلى نسبة إصابة ببكتريا *E.cloacae* في العينات السريرية كانت في إصابات مجرى الدم اذ بلغت 24 إصابة بنسبة 68.57% ، كذلك فأن هذه النتيجة كانت مقاربة لما توصلت اليه العزاوي (2005) اذ بينت ان نسبة عزل هذه البكتريا من مجرى الدم كانت 61.54% بواقع 8 عزلات . بينما لم تتوافق نسبة

عزل بكتريا *E.cloacae* مع دراسة الباحثة عبيد (2016) ، اذ حصلت على 8 عزلات وبنسبة 2.86%.

توافقت نسبة العزلات لبكتريا *E.cloacae* التي جمعت من نماذج الإدرار في الدراسة الحالية مع دراسة Jasim التي اجرته عام 2017 ، اذ كانت نسبة العزل من عينات الادرار 17.14 % (Jasim ، 2017) . تقترب نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة كل من الباحثة حسن (2017) في دراستها التي اجرته في الديوانية والباحث Alkhuzae (2017) في بابل ، اذ بلغت نسبة عزلات *E.cloacae* المعزولة من الادرار 13.33% و 12% على التوالي . وتعد نسبة قليلة مقابل مع ما توصل اليه الباحث korean (2013) في مصر ، اذ اشار في دراسته الى ان نسبة عزلات البكتريا المعزولة من الادرار شكلت 22.5% ، كذلك بالنسبة لدراسة في كوريا للباحث Park وجماعته (2007) اذ كانت نسب العزل من الادرار (35%) ، وتعد النسبة اعلى بكثير من النسبة التي حصلت عليها الباحثة الهاشمي (2013) في بغداد اذ كانت نسبة عزلات *E.cloacae* المعزولة من الادرار 5% وكذلك بالنسبة لدراسة عالمية للباحثين Hoffmann و Roggenkamp (2003) والتي كانت نسبة العزل 4 % .

اما بالنسبة لمسحات الجروح فقد بلغت نسبة العزلات قيد الدراسة 7.31% ، وتقترب هذه النتائج مع ما جاء به Al-Saadi وآخرون (2017) اذ كانت نسبة العزل في تلك الدراسة 9.24% من مسحات الجروح ، وكانت هذه النتيجة مقارنة للدراسة التي اجرته الباحثة Jasim (2017) حيث بلغت نسبة العزل 5.71% لعزلتين فقط لبكتريا *E.cloacae* من الجروح ، وكذلك تقترب من نسبة الباحثة العتبي (2013) في بعقوبة اذ بلغت نسبة عزل البكتريا في الجروح 11.11% لعزلة واحدة

فقط . ربما يعود سبب الاختلاف في نسبة العزل الى نوع العينات المأخوذة ، واختلاف الدراسة ، وحجم العينة ، والموقع الجغرافي الذي أخذت منه العينات وموسم جمع العينات .

5.4. إختبار حساسية بكتريا *E. sakazakii* و *E. cloacae* لمضادات الحياة الكوينولونات :

تعتبر مضادات الكوينولونات الأكثر شيوعا في علاج التهابات المسالك البولية الناجمة عن مجموعة البكتريا المعوية (Firoozeh وآخرون ، 2014) .

أُستُخدمت طريقة الأقراص Kirby – Bauer لإجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية للنوعين *E. sakazakii* و *E. cloacae* قيد الدراسة لستة انواع من المضادات الحيوية وهي Ofloxacin ، Norfloxacin ، Ciprofloxacin ، Levofloxacin ، Nalidixic acid و Gatifloxacin وهي الأكثر شيوعا في الاستعمال ضمن مجموعة الكوينولونات واسعة الطيف لعلاج الاخماج المختلفة لمعرفة نوع الاستجابة من خلال قياس قطر منطقة التثبيط حول قرص مضاد الحياة المستعمل و قورنت النتائج وفقا لما ورد في (CLSI ، 2016) .

أوضحت النتائج أن 13 (39.39%) من العزلات كانت مقاومة للمضاد Nalidixic acid و 6 (18.18%) مقاومة للمضاد Levofloxacin و 5 (15.15%) مقاومة للمضاد Ciprofloxacin و 3 عزلات (9.09%) مقاومة للمضاد Norfloxacin وعزلة واحدة (3.03%) مقاومة للمضادين Ofloxacin و Gatifloxacin ، وجميعها تعود لبكتريا *E. cloacae* ، اما عزلات بكتريا *E. sakazakii* فكانت جميع العزلات حساسة لهذه المضادات عدا عزلة واحدة وهي العزلة Ent.25 كانت متوسطة المقاومة لمضاد Nalidixic acid . كما الجدول (4-9) والملحق (5) .

أظهرت نتائج الدراسة مقاومة 13 عزلة من أصل 33 مقاومة كاملة لمضاد Nalidixic acid وبنسبة 39.39% وهي تعد أعلى نسبة مقاومة في الدراسة الحالية وهو من مجموعة الكوينولونات ويعد الجيل الأول ، و هذه النتيجة لا تتفق مع نتائج العبيدي (2013) فقد أظهرت عزلاتها جميعها حساسية لمضاد Nalidixic acid و بنسبة 47.47% ونسبة المقاومة كانت 53% ، وايضا لا تتفق مع نتائج العطار (2007) حيث كانت الحساسية للمضاد بنسبة 75% ، خالفت نسبة المقاومة ماتوصلت اليه الباحثة العابدي (2008) حيث بلغت نسبة المقاومة للمضاد 50% ، تعد نسبة المقاومة لمضاد NA في هذه الدراسة أعلى مما توصل اليه كل من حسن والنعيمي (2017) حيث بلغت نسبة المقاومة للمضاد 29% .

أظهرت العزلات قيد الدراسة مقاومة لمضاد Levofloxacin بنسبة 18.18% وجميعها كانت تعود لبكتريا *E. cloacae* ، لا تتفق هذه الدراسة مع ما توصل اليه AL-Kalifawi (2014) إذ ان نسبة المقاومة لهذا المضاد كانت 46% .

بلغت نسبة العزلات الداخلة في الدراسة المقاومة لمضاد Ciprofloxacin (CIP) 15.15% ، وإنَّ نسبة 12.12% من عزلات الدراسة الحالية كانت متوسطة الحساسية للمضاد ، وأظهرت 72.72% من العزلات حساسيتها للمضاد . توافقت هذه النسبة مع دراسة (Alkhuzaei، 2017)، إذ كانت نسبة عزلات هذه البكتريا المقاومة لمضاد CIP بنسبة 12.5% ، وجاءت نتيجة الحساسية لمضاد Ciprofloxacin مطابقة تقريبا مع نتائج العطار (2007) حيث كانت جميع عزلاتها حساسة بنسبة 75% ، كذلك تقترب نسبة المقاومة لمضاد CIP مع نسبة كل من حسن والنعيمي (2017) ودراسة Abid و AL-Ammar (2015) ؛ وعبد الرزاق (2010) إذ بلغت نسبة مقاومة البكتريا

للمضاد 14% لهذه الدراسات. خالفت نتائج الدراسة لنسبة المقاومة للمضاد لنسبة كل من العبيدي (2013) و Jasim (2017) اذ بلغت نسبة المقاومة لكل من الدراستين 23.5 %، 28.5 % على التوالي ، وقد اشار (Lee وآخرون ، 2004) إلى ان جميع عزلاته كانت حساسة إتجاه المضاد Ciprofloxacin وهي مغايرة لنتائج الدراسة الحالية .

بلغت نسبة المقاومة لمضاد Norfloxacin 9.09 % ، وإنّ نسبة 15.15 % من عزلات الدراسة الحالية كانت متوسطة الحساسية للمضاد ، وأظهرت 75.75 % من عزلات الدراسة الحالية حساسيتها للمضاد وتقترب النتيجة مع نسبة المقاومة لمضاد النورفلوكساسين التي حصل عليها Araujo وآخرون (2011) حيث كانت نسبة مقاومة البكتريا 7.4 % ، وتقترب مع النتيجة التي حصلت عليها عبد الرزاق (2010) وهي 11 % ، وكذلك بالنسبة إلى نتيجة الباحثين Alkhuzae (2017) و Al-Dahmoshi (2012) حيث كانت نسبة المقاومة لمضاد NOR هي 12.5 % لكلا الدراستين. ولا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتيجة دراسة العزاوي (2005) اذ حصلت على نسبة مقاومة 85.71 % لمضاد النورفلوكساسين في حين كانت نسبة حساسية المضاد 53 % في دراسة Hassan وآخرون (2011b) في مصر .

أظهرت بكتريا *Enterobacter* نسب مقاومة في الدراسة الحالية لكل من Ofloxacin و Gatifloxacin فكانت 3.03 % لكلا المضادين ، ونسبة متوسطة الحساسية 9.09 % ، 6.06 % على التوالي ، في حين كانت نسبة الحساسية للمضادين 87.87 % ، 90.90 % على التوالي ، لا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة AL-Kalifawi (2014) في بغداد حيث كانت نسب مقاومة مضاد Ofloxacin في دراسته 32 % ، في حين بلغت نسبة حساسية المضاد 53 % في

دراسة Hassan وآخرون (2011b) في مصر. اما نسبة المقاومة لمضاد Gatifloxacin لم تتوافق مع ماتوصل اليه الباحثين Al-Dahmoshi (2012) في بابل ، و Salmanov (2009) في اوكرانيا حيث كانت نسبة المقاومة لبكتريا *Enterobacter* للمضاد 8.3 % و 11.1 % على التوالي.

تبين من خلال الدراسة الحالية بان اعلى نسبة مقاومة لوحظت في مضاد Nalidixic acid اذ قاومت العزلات جميعها هذا المضاد بنسبة 39.39 % وقد يرجع سبب ذلك لكونه اول مضاد اكتشف من مجموعة الكوينولونات حيث ان كثرة الاستخدام لهذا المضاد جعل من البكتريا تتمكن من مقاومة اما من خلال المقاومة المكتسبة او الذاتية لها وتتفق النتيجة مع دراسة الكعبي (2011) اذ حصلت الباحثة على مقاومة تامة لمضاد Nalidixic acid في دراستها لبعض أنواع البكتريا السالبة لصبغة جرام .

ان ازدياد مقاومة بكتريا *E.cloacae* للعديد من مضادات الحياة قد سجل عالميا ، ويعود السبب إلى الاستعمال الواسع والعشوائي لهذه المضادات في معالجة الاخماج المختلفة (Sanders و Sanders ، 1997 ؛ Jones و آخرون ، 1998) ، ولكون هذه البكتريا من النبيت الطبيعي في الامعاء يؤدي تعرضها المستمر لمضادات الحياة إلى انتخاب السلالات المقاومة لهذه المضادات (Walder وآخرون ، 1996) ، فضلا عن ازدياد فرصة اكتسابها البلازميدات ذات المقاومة المتعددة من بكتريا اخرى موجودة في الامعاء عن طريق عمليات الاقتران والتحول، وان العديد من الانواع البكتيرية ضمنها *E.cloacae* قد طورت اليات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية مما جعلها احدى المسببات في اخماج المستشفيات Gales وآخرون (2000) .

تم تحديد نسق المقاومة للمضادات بالشكل التالي : NA - LEV - CIP - NOR - OFX-

. GAT

جدول (9-4): النسب المئوية لحساسية العزلات قيد الدراسة لمضادات الحياة المستخدمة في الدراسة

عددالعزلات (%)			مضادات الحياة
Sensitive	Intermediate	Resistant	Antibiotic
(30.30) 10	(30.30) 10	(39.39) 13	NA
(78.78) 26	(3.03) 1	(18.18) 6	LEV
(72.72) 24	(12.12) 4	(15.15) 5	CIP
(75.75) 25	(15.15) 5	(9.09) 3	NOR
(87.87) 29	(9.09) 3	(3.03) 1	OFX
(90.90) 30	(6.06) 2	(3.03) 1	GAT

NA= Nalidixic acid ، LEV= Levofloxacin ، CIP= Ciprofloxacin ،

NOR= Norfloxacin ، OFX= Ofloxacin ، GAT= Gatifloxacin

6.4. تحديد التركيز المثبط الأدنى : Determination of Minimal Inhibitory

Concentration

أُخضعت العزلات المقاومة الداخلة في الدراسة لإختبار تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimal

inhibitory concentration لمضادين هما Nalidixic acid و Ciprofloxacin. وحُدِّدَ MIC

بطريقة التراكيز المتسلسلة المتضاعفة في وسط مولر هنتون الصلب لإجراء الإختبار، لكون مكونات

هذا الوسط المستخدم تعد من العوامل المؤثرة على نتائج قيم MIC المحسوبة ، لذلك يفضل استخدام

وسط مولر هنتون الصلب لإحتوائه على كمية قليلة من كلوريد الصوديوم ، ونسب قليلة من أيونات

الكالسيوم والمغنيسيوم (Stocks و Ridgway ، 1987) ، كذلك تم تحديد نتائج هذه العزلات كونها حساسة او مقاومة إعتماًداً على نقطة التوقف Break Point المثبتة في (CLSI ، 2016) كأساس لحساب الإستجابة وتعرف بأنها التركيز الامثل الذي يمكن أن يصله المضاد في المصل بحيث يوفر أعلى حد للمعالجة ، يعد الكائن مستجيباً Susceptible عندما تكون مقادير MIC المحسوبة أقل من نقطة التوقف .

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (4 - 10) الى إن قيم MIC لمضاد Nalidixic acid تراوحت بين 16 - $1024 \leq$ مايكروغرام/مل ، إذ بلغت نسبة العزلات المقاومة للمضاد 86.66% ، أما بالنسبة لمضاد Ciprofloxacin فقد تراوحت قيم MIC له 2-1024 مايكروغرام/مل ، إذ بلغت نسبة العزلات المقاومة للمضاد 40% بالإعتماد على (CLSI ، 2016) .

جدول (4-10): قيم التركيز المثبط الأدنى MIC لمضادات Nalidixic acid ، Ciprofloxacin

المضاد الحيوي / نقطة التوقف (مايكروغرام / مل)		رقم العزلة لبكتريا <i>E.coloucae</i>
NA ≥ 32	CIP ≥ 4	
$1024 \leq$	2	Ent.1
512	2	Ent.2
$1024 \leq$	2	Ent.3
$1024 \leq$	2	Ent.4
$1024 \leq$	2	Ent.5
$1024 \leq$	128	Ent.6
1024	2	Ent.7
$1024 \leq$	8	Ent.8
512	2	Ent.9
16	512	Ent.10
16	1024	Ent.11
1024	2	Ent.12
$1024 \leq$	512	Ent.13
$1024 \leq$	512	Ent.14
$1024 \leq$	2	Ent.15

تقاربت نتائج هذه الدراسة مع ما توصلت اليه الباحثة العتبي عام 2013 في بعقوبة ، إذ تراوحت قيم MIC لمضاد Nalidixic acid تراوحت بين 8 - $1024 \leq$ مايكروغرام/مل ، وتوافقت بالنسبة لمضاد Ciprofloxacin فقد تراوحت قيم MIC له 2 - 1024 مايكروغرام/مل (العتبي ، 2013) ، وتوافقت النتائج بالنسبة لمضاد Ciprofloxacin(CIP) مع دراسة (AL-Taai ، 2016 ، العبدلي ، 2010) حيث بلغت قيم MIC 2-1024 مايكروغرام/مل لكلا الدراستين ، خالفت النتائج مع ماتوصلت اليه الباحثة الهاشمي (2013) وكذلك خالفت نتائج الباحثة عبد الرزاق (2010) إذ تراوحت قيم MIC له 2-64 مايكروغرام/مل لكلا الدراستين . خالفت نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لمضاد NA مع نتائج دراسة (AL-Taai ، 2016) ، إذ تراوحت قيم MIC للمضاد هو 128-1024 مايكروغرام/مل .

إنَّ سبب الاختلاف لقيم التركيز المثبط الأدنى MIC لهذه الدراسة عن الدراسات الاخرى السابقة قد يعود الى امتلاك العزلات طرق مقاومة للمضادات المختلفة من خلال احتوائها على الجينات المحمولة كروموسوميا او بلازميديا او لعدد نسخ البلازميدات داخل الخلية البكتيرية ، أدى الى ظهور المقاومة المتعددة لمضادات الحياة . كذلك قد يكون السبب هو إختلاف آليات المقاومة التي إستعملتها العزلات البكتيرية كمضخات الدفع ، طبيعة الغشاء الخارجي وإنتاج إنزيمات البيتا لكتاميز (Cheng وآخرون ، 1998 ؛ AL-Khazali ، 2002) .

7.4. الكشف عن عوامل الضراوة لبكتريا *E.cloacae* :

Detection of Virulence factors of *E.cloacae*

إن قدرة البكتريا على احداث الاخماج يعود لامتلاكها عددا من عوامل الضراوة ، بعضها يلعب دورا مباشرا والبعض الآخر له دور غير مباشر فإذا ما اجتمعت هذه العوامل فإنها ستكون المسؤولة

عن إحداث الضرر في جسم المضيف، انتخبت 15 عزلة تعود لبكتريا *E.cloacae* والمقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة واستبعدت العزلات الحساسة ومنها عزلات بكتريا *E.sakasakii* لغرض دراسة عوامل الضراوة لهذه العزلات تمهيدا لدراسة الجينات المرتبطة بالمقاومة لمضادات الكوينولونات وقد كانت النتائج كما يأتي :

1.7.4. المحفظة : Capsule

إنتاج عديد السكريد الخارجي Exopolysaccharide من قبل البكتريا المسببة للأمراض هو عامل الضراوة الرئيسية حيث يعمل على حماية البكتريا من دفاعات المضيف . وتعدّ المحفظة من عوامل الضراوة المهمة في البكتريا السالبة لصبغة غرام (Russo وآخرون ، 2010) .

تم الكشف عن احتواء عزلات *E. cloacae* البالغ عددها 15 عزلة على المحفظة Capsule باستخدام تقنية التصبغ السالب ووجد أن جميع العزلات 15 (100%) كانت تحتوي على محفظة تحيط بالخلايا البكتيرية ، وهذه الصفة تتوافق مع مواصفات بكتريا *E.cloacae* المذكورة في (Brenner وآخرون ، 2005). وتتوافق مع Salman (2006) الذي اشار الى ان عزلات هذه البكتريا المعزولة من الادرار امتلكت المحفظة وكذلك تتوافق النتائج مع ماتوصلت اليه كل من الباحثة (Abid ، 2013 ؛ العبيدي ، 2013) حيث كانت جميع العزلات تحتوي على المحفظة وبنسبة 100% كما اتفقت النتائج مع Abid و AL-Ammar ، (2015) الذين وجدوا أن (98%) من بكتريا *E. cloacae* كانت منتجة للمحفظة ، ولاتتفق مع دراسة الباحث (Alkhuzaeه ، 2017) في محافظة بابل حيث وجد ان هذه البكتريا تحتوي على المحفظة بنسبة 75%. وقد تكون النسبة 100 %

التي حصلنا عليها في دراستنا الحالية عالية جدا الا انه قد تختلف هذه النسبة في حالة زيادة اعداد العزلات المجموعة .

تساهم المحفظة في التصاق البكتريا ومقاومة عوامل المضيف الدفاعية ، ولاسيما ان المحفظة هي احدى عوامل الضراوة الاساسية في البكتريا الممرضة ، فهي تحمي البكتريا اثناء عملية الالتهام ثم انها تعد موانع تحول دون ارتباط عوامل الالتهام بالغلاف الخارجي للبكتريا ومن ثم توقف عمل الخلايا البلعمية في جسم المضيف (Quinn وآخرون ، 2011) .

تحتوي سلالات *E.cloacae* على المحفظة مما يجعلها ان تصبح أكثر ملائمة للظروف البيئية مثل درجة الحرارة والجفاف حيث تمكنها من البقاء والاستمرار بالحياة على السطح الحيوي في المستشفى (Murugan وآخرون ، 2011) . جدول (4-11) .

2.7.4. الالتصاق : Adherence

إن التصاق البكتريا بالخلايا الطلائية هو خطوة هامة في تسبب معظم الالتهابات المرضية في الإنسان ومنها التهابات المسالك البولية وذلك بسبب قدرة البكتريا على الالتصاق بالسطوح المخاطية من المسالك البولية . حيث ترتبط البكتريا بالخلايا الطلائية للمثانة والنمو في الادرار مما يسبب الالتهاب للمثانة (Lee وآخرون ، 2006) .

استعملت لغرض اجراء هذا الاختبار الخلايا الطلائية المعزولة بالترسيب من عينة الادرار الوسطي لنساء غير مصابات بالتهاب المسالك البولية ، اذ اظهرت نتائج الدراسة الحالية ان جميع عزلات بكتريا *E. cloacae* لها القابلية على الالتصاق بسطوح الخلايا الطلائية للإنسان وبنسبة 100% شكل (4 - 8) ، جدول (4 - 11) ، جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما توصل اليه الباحث

(Alkhuzaee ، 2017) في بابل اذ بين ان بكتريا *E. cloacae* لها القابلية على الالتصاق بنسبة 100% ، ولاتقترب من نتائج (AL-Dahmoshi وآخرون ، 2012) في الحلة اذ أوضحوا ان بكتريا *E. cloacae* لها القابلية على الالتصاق بالخلايا الطلائية للانسان بنسبة 75%، وهذا مايفسر قدرة البكتريا على استعمار خلايا الانسان واحداث الاصابة اذ تعد عملية التصاق البكتريا على سطوح الخلايا الطلائية مرحلة اولية واساسية لحدوث الاصابة ، ويعود ذلك الى امتلاك البكتريا لاهداب من نوع Type -1- fimbria والتي ترتبط بالمستقبلات نوع Globoceries glycolipid الموجودة على سطوح الخلايا الظهارية (Laragione وآخرون ، 2000)



شكل (4-8) : خلايا بكتريا *E. cloacae* الملتصقة بالخلايا الظهارية للانسان تحت العدسة الزيتية (100X)

3.7.4. انتاج انزيم البروتيز : protease production

يشير protease إلى مجموعه من الانزيمات البروتينية التي تؤدي وظيفتها المحفزة تحليل جزيئات البروتين الكبيرة وتجزئتها إلى بروتينات صغيرة. يتم تصنيف البروتينات وفقا لهيكلها أو خصائص الموقع النشط (Asokan و Jayanthi ، 2010). كما تعد الأنزيمات المحللة للبروتين Protease واحدة من الأنزيمات المهمة التي تساهم في أمراضية البكتريا (Beshay ، 2003) .

أُخبرت قابلية عزلات *E. cloacae* على إنتاج إنزيمات البروتياز باستخدام وسط حليب الفرز (Skimmed Milk)، إذ أعطت 12 عزلة من أصل 15 و بنسبة (80%) نتائج موجبة مقابل 3 عزلات (20%) أعطت نتائج سالبة لإنتاجها للبروتياز، جدول (4-11). تقاربت نسبة العزلات المنتجة للبروتياز في الدراسة الحالية مع ماتوصل اليه Salman (2006) حيث وجد أن 9 عزلات لها القابلية على إنتاج هذا الإنزيم، خالفت نتائج هذه الدراسة نتائج الباحث Fajingbesi وآخرون (2018)، إذ كانت نسبة عزلات بكتريا *E. cloacae* المنتجة للبروتياز 100%، ولا تتطابق نتائج الدراسة مع ماتوصل اليه الباحث Alkhuzae (2017) في بابل وكذلك مماتوصل اليه AL-ammam (2013) حيث كانت جميع العزلات في كلا الدراستين غير منتجة لانزيم البروتياز، خالفت نتائج الدراسة ماتوصل اليه Hassan وآخرون (2011b) إذ بين أن نسبة العزلات المنتجة للانزيم هي 12% وهي تعد نسبة قليلة بالنسبة لنتائج الدراسة الحالية.

4.7.4. إنتاج البكتريوسين : Bacteriocin production

أن الوسط الصلب هو افضل الاوساط لإنتاج البكتريوسين لوجود مستقبلات للخلية البكتيرية في هذا الوسط وعدم وجودها في الوسط السائل (AL-Charraikh وآخرون، 2011). استخدمت في هذه الدراسة وسط أكار الصويا الصلب T S A مضاف اليه خلاصة الخميرة بنسبة 1% إذ أشار الباحث Riley وآخرون (2003) الى أن إضافة خلاصة الخميرة يزيد من قدرة البكتريا على إنتاج البكتريوسين.

ظهر من خلال الدراسة الحالية أن 5 عزلات بنسبة 33.33% لها القدرة على إنتاج المضاد الحيوي البكتريوسين، و 66.66% غير منتجة للمضاد الحيوي البكتريوسين، جدول (4-11). وهذا

لا يتوافق مع دراسة AL-Taai (2016) وكذلك ماتوصلت اليه العتبي (2013) اذ كانت 70% من العزلات لهذه البكتريا منتجة للبكتريوسين ولكلا الدراستين . بينما اشارت نتائج دراستي الباحث (Alkhuzae , 2017) في بابل والباحث (AL-ammam , 2013) في النجف إذ كانت نسبة انتاج البكتريوسين 12.5% و 12% على التوالي وهذه النسبة مخالفة لنتائج الدراسة الحالية . ويعتبر البكتريوسين بروتين ذو فعالية قاتلة للبكتريا بمدى تثبيط ضيق ينحصر بنوع البكتريا المنتجة له التي تمتلك مناعة ضد البكتريوسين المنتج من قبلها ، او الأنواع قريبة الصلة وان الجينات المشفرة له ينبغي أن تكون محمولة على البلازميد في الخلايا الحساسة له (مصطفى ، 2014) . وتتكون من ثلاث جينات : جين إنتاج البكتريوسين Bacteriocin Gene وجين يشفر لبروتين المناعة Immunity Gene ويؤدي إلى عدم تأثر الخلية المنتجة بالبكتريوسين وجين التحلل Lysis Gene الذي يشفر لبروتين محلل يساعد في عملية تحرر البكتريوسين من الخلية المنتجة وقد تصبح البكتريا مقاومة له عند تعرضها إلى طفرات معينة لسبب أو لآخر مما قد ينتج عنه فقدان المستقبلات الخاصة للبكتريوسين ، وبالتالي تصبح عذلة الاختبار مقاومة ، فقد أشار Cursino وآخرون (2002) إلى إن حدوث تحوير المستقبلات الخاصة للبكتريوسين نتيجة حدوث طفرات تؤدي إلى إن تكون العزلات مقاومة . وقد يعزى السبب ايضا إلى عدم وجود عذلة متحسسة أو إلى عدم إنتاج البكتريوسين أصلا ، لاتعد البكتريوسينات من عوامل الضراوة المباشرة ، وإنما تدعم نمو البكتريا وتكاثرها في البيئات التي تتواجد فيها كالأمعاء مثلا (Riley ، 1998) .

5.7.4. انتاج انزيم الهيمولاييسين : Haemolysin Production

طورت البكتريا المسببة للأمراض عددا من الآليات لاكتسابها الحديد من البيئة. واحدى هذه الآليات هي إنتاج الهيمولاييسين، التي تعمل على تحرير الحديد المعقد داخل الخلايا الى حديد وبروتين الهيموغلوبين . يزيد تحلل الهيمولاييسين من شدة الإصابة (Vergis وآخرون ، 2002).

أُختبرت قدرة العزلات البكتيرية الداخلة في الدراسة عن إنتاجها للهيمولاييسين وذلك من خلال تتميتها على وسط الدم الصلب المضاف له 5% من دم الانسان ، وقد وجد من خلال الدراسة الحالية ان معظم عزلات بكتريا *E.cloacae* غير محللة للدم باستثناء عزلة واحدة فقط حلت الدم من نوع بيتا β -hemolysin وبنسبة 6.66% ، إذ ظهر تحلل الدم الكامل على الوسط للعزلة المنتجة ، شكل (C 3-4) جدول (4-11) ، وهذه النتيجة مطابقة لما توصلت اليه العبيدي (2013) اذ اظهرت نسبة العزلات المنتجة للهيمولاييسين 5.8% ، كما بين Hassan وآخرون (2011b) ان هذه البكتريا منتجة للهيمولاييسين بنسبة 18%، وتعد نسبة قليلة مقابل مع ما توصل اليه Ibrahim وآخرون (2015) في بغداد ، إذ اشارو في دراستهم الى ان نسبة عزلات هذه البكتريا المنتجة للهيمولاييسين نوع بيتا شكلت 50% ، ان نتائج الدراسة هذه غير متوافقة لما حصل عليه كل من (Alkhuzae ، 2017 ؛ AL-Taai ، 2016 ؛ العتبي ، 2013 ؛ Abid ، 2013) فقد كانت العزلات جميعها غير قادرة على انتاج الهيمولاييسين . و اشار Stenhouse (2008) ان البكتريا *E.cloacae* غير منتجة للهيمولاييسين على وسط الدم الصلب وهي تعد نتيجة غير مطابقة للدراسة الحالية . يعود عدم افرازها للهيمولاييسين الى انها تمتلك نظام خاص لسحب الحديد وتمثيله يدعى Aerobactin ويعد الهيمولاييسين الطريق البديل عند غياب جينات Aerobactin وفقا لتفسير الباحثين (Opal وآخرون

، (1990) Simi وجماعته (2003) الذين أشارو الى ان بعض العزلات لبكتريا *E. cloacae* السريرية تستطيع انتاج انزيم الهيموليسين ولكن بأوزان جزيئه واطئة ويعتبر هذا الانزيم احد عوامل الضراوة الكامنه لهذه البكتريا.

6.7.4. انتاج انزيم اللايباز : Lipase Production

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان عزلات *E. cloacae* قيد الدراسة كانت جميعها غير منتجة لهذا الانزيم ، إذ لم تظهر منطقة ترسيب بيضاء حول النمو للمستعمرات في الوسط بوصفه مصدرا وحيدا للكربون ، ربما يعود السبب الى اعتمادها على ما مخزون فيها من غذاء لاجل النمو.

النتائج التي حصلنا عليها تشير الى عدم قدرة بكتريا *E. cloacae* على انتاج اللايباز مطابقا لما توصلت اليها العطار (2007) ومطابقة لما موجود في مصنف بريكي لعامي 1986 ، 1994 (Sneath وآخرون ، 1986 ؛ Holt ، 1994). كما اتفقت نتائج الدراسة مع ماتوصل اليه الباحث Ahmed وآخرون (2014) في بغداد ، والباحث Hassan وآخرون (2011b) في مصر ، وكذلك اتفقت مع ماتوصل اليه patel و patel (2016) في الهند . لم تذكر دراسات سابقة عن قدرة هذه البكتريا على إنتاج Lipase ، جدول (4-11) .

جدول (4-11): قدرة انتاج عزلات بكتريا *E. cloacae* لعوامل الضراوة (عدد العزلات 15)

ت	عامل الضراوة Virulence factors	عدد العزلات المنتجة	نسبة الإنتاج %
1	المحفظة Capsule	15	100 %
2	الالتصاق Adherence	15	100 %
3	البروتياز Protease	12	80 %
4	البكتريوسين Bacteriocin	5	33.33 %
5	الهيموليسين Haemolysin	1	6.66 %
6	اللايباز Lipase	0	0 %

7.7.4. الكشف المظهري عن مضخات الدفع Efflux Pump :

أُستعملت طريقة عجلة العربة EtBr-agar Cart Wheel Method ، إذ أُستعملت صبغة Ethidium bromide للكشف عن مضخات الدفع المقاومة للعقاقير وإن هذه الصبغة لا تتجمع داخل الخلية البكتيرية (Patel وآخرون ، 2010) .

أُختبرت 15 عزلة من بكتريا *E. cloacae* الداخلة في الدراسة للكشف عن إمتلاكها لمضخات الدفع ، إذ أُستعمل مصدر الأشعة فوق البنفسجية U.V. light للكشف المظهري ، بلغت نسبة العزلات التي تمتلك مضخات دفع عالية الكفاءة 53.33% ، وإنَّ نسبة 26.67% من العزلات كانت تمتلك مضخات الدفع متوسطة الكفاءة ، في حين إنَّ 20.00% من العزلات البكتيرية اعطت نتيجة سالبة ولم تكن تمتلك مضخات دفع ، وكما مبين في الجدول (4-12) و الشكل (9.4) .

اشار Murielmasi وآخرون (2005) الى ان بكتريا *E. cloacae* تمتلك مضخات دفع MexAB-opr ، AcrAB-Tolc ، كما تساهم انظمة الدفع في نشوء المقاومة المتعددة لمضادات السبروفلوكساسين والنورفلوكساسين (Aurelie وآخرون ، 2008) . تلعب أنظمة الدفع دورا مهما في تطور مقاومة البكتريا السالبة لصبغة كرام للمضادات (Suresh وآخرون ، 2016) ، إذ تعمل أنظمة الدفع على طرح مضاد الحياة خارج الخلية البكتيرية ، وبذلك تمكن الأحياء المجهرية من تنظيم بيئتها الداخلية (Pearson وآخرون ، 1999 ، Kadry ، 2003) .

تعد أنظمة الدفع من الآليات المهمة التي تساهم في مقاومة بكتريا *E. cloacae* للمضادات الحيوية و التكيف للظروف البيئية وتسهم في مقاومة البكتريا للمطهرات والمضادات الحيوية في المستشفيات مما ييسر انتقالها واصابتها للمرضى في المستشفيات ومن خلال الدراسة الحالية فان

معظم العزلات البكتيرية *E. cloacae* التي عزلت من المرضى امتلكت انظمة دفع كفوءة وهذا يتفق مع نتائج Pérez وآخرون (2012) .

أكدت نتائج الدراسة ان معظم العزلات التي أظهرت من خلال الكشف المظهري انها تمتلك مضخات دفع ذو كفاءة عالية كانت لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي وتمتلك صفة المقاومة لمضادات الحياة ، مقارنة مع العزلات التي كانت متوسطة الكفاءة والتي لا تمتلك لمضخات الدفع وهذا يتفق مع Varga وآخرون (2012) و Amaral وآخرون (2014) .

جدول (4-12) : النسب المئوية لعزلات بكتريا *E.cloacae* المنتجة والغير منتجة لمضخات

الدفع Efflux pumps

عدد العزلات المنتجة لمضخات الدفع (%)	كفاءة مضخات الدفع
8 (53.33%)	High efflux pumps كفاءة عالية
4 (26.67%)	Intermediate efflux pumps كفاءة متوسطة
3 (20.00%)	Low efflux pumps لا تمتلك مضخات دفع



شكل (4 - 9) : الكشف المظهري عن مضخات الدفع في بكتريا *Enterobacter cloacae* بعد التتمية على وسط TSA الحاوي على صبغة Ethidium bromide بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة .

8.7.4. تكوين الغشاء الحيوي : Biofilm formation

تم التحري عن انتاج الغشاء الحيوي باستخدام طريقة وسط احمر الكونغو وطريقة الالتصاق بالانابيب وطريقة صفيحة المعايرة الدقيقة (MTP) Micro Titer Plate method (الاليزا).

يتضح من خلال النتائج بان طريقة الاليزا افضل الطرائق في الكشف عن الغشاء الحيوي اذ كانت عدد العزلات الموجبة 15 عزلة بنسبة 100% وإن 40 % من العزلات الداخلة في الدراسة تمتلك خاصية تكوين الأغشية الحيوية بشكل قوي ، وإن نسبة 60% من العزلات كونت الأغشية الحيوية بشكل متوسط . تلتها طريقة الالتصاق بالأنابيب 13 عزلة وبنسبة (86.66%) ومن ثم طريقة احمر الكونغو 11 عزلة وبنسبة (73.3%) تمتلك الغشاء الحيوي كما في الجدول (4-13) ، وجاءت هذه الدراسة متوافقة مع ماتوصلت اليه خضر (2013) بان طريقة صفيحة المعايرة الدقيقة (MTP) اكثر حساسية في التحري عن انتاج الغشاء الحيوي ، وتوافقت نتائج الدراسة مع ماتوصل اليه الباحث (Alkhuzaei, 2017) بالنسبة لطريقة صفيحة المعايرة الدقيقة (MTP) واختلفت النتائج مع الباحث بالنسبة لطريقة احمر الكونغو حيث كانت نسبة تكوين الغشاء الحيوي 100% لكلا الطريقتين .

خالفت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة AL-Taai (2016) حيث كانت النتائج لتكوين الغشاء الحيوي 90% بطريقتي صفيحة المعايرة الدقيقة (MTP) واحمر الكونغو، اما بالنسبة الى نتيجة الالتصاق بالأنابيب فكانت نسبة الانتاج 80% وهي مقارنة للدراسة الحالية . خالفت نتائج الدراسة الحالية نتائج الباحث Soares وآخرون (2016) ، إذ كانت عزلات بكتريا *E. cloacae* المكونة للأغشية الحيوية بطريقة صفيحة المعايرة الدقيقة (MTP) وبشكل قوي 6% ، بينما بلغت نسبة عزلات *E. cloacae* التي كونت الأغشية الحيوية بشكل متوسط 47 % ، وكانت نسبة العزلات غير

المكونة للأغشية الحيوية 47% . كما خالفت نتائج الدراسة الحالية نتائج Al-Dahmoshi (2012) ، إذ بلغت نسبة العزلات المكونة للأغشية الحيوية 70.8% ونسبة 41.6% منها بشكل قوي ، والعزلات المكونة للأغشية الحيوية بشكل متوسط بلغت نسبتها 29.2% ، بينما بلغت نسبة العزلات الغير مكونة للأغشية الحيوية 29.2% . كما بين Hassan وآخرون (2011b) ان هذه البكتريا منتجة للغشاء الحيوي بطريقة الالتصاق بالانابيب بنسبة 94% وهي مخالفة للدراسة الحالية ، ولاتتفق الدراسة الحالية مع ماتوصل اليه Al-saad وآخرون (2012) حيث وجدوا ان نسبة انتاج الغشاء الحيوي بطريقة الاليزا 80%.

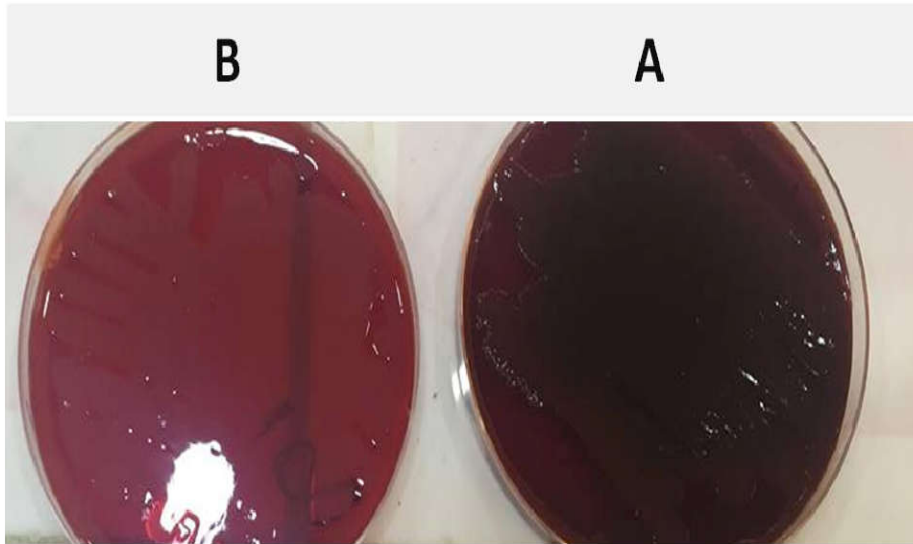
كما اشار Matz وآخرون (2005) بان طريقة أطباق المعايرة الدقيقة للكشف عن قدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي تعد تقنية قياسية لسرعة التصاق الخلايا وتكوين الغشاء الحيوي في البكتريا السالبة لصبغة جرام ، اذ ترتبط الصبغة المستخدمة (البلورات البنفسجية) مع الجزيئات سالبة الشحنة على سطح الخلية البكتيرية من سكريات متعددة فتعطي كامل القياس لتكوين الغشاء الحيوي (Harvey وآخرون ، 2007) . تكون الخطوة الاولى لتكوين الغشاء الحيوي عند التصاق البكتريا على السطح وتكون طبقة احادية الخلايا (Quinn وآخرون ، 2011) ويتبع ذلك تجمع الخلايا وتكوين مستعمرات صغيرة ، كما يتفق مع Bozkurt وآخرون (2009) بان طريقة أكار احمر الكونغو Congo red agar لا ينبغي أن تستخدم كاختبار لقياس تشكيل الغشاء الحيوي لانها تعطي نتائج غير حقيقية ، خصوصا ان هذا الاختبار يقتصر على تحديد القدرة على افراز طبقة slime بدلا من الكشف عن التصاق البكتريا على سطح المادة ، لذلك تعتبر طريقة اطباق المعايرة الدقيقة ادق منها (Samie و Nkgau ، 2012 ؛ Moteeb ، 2008) ، وتدرج البكتريا المنتجة في لون مستعمراتها من الاحمر

الغامق ودرجاته وتكون في البكتريا السالبة للفحص وردية اللون Arciola وآخرون (2002) الذي حدد مقياس لتدرج لون المستعمرات على وسط اكار الكونغو الاحمر، كما في الشكل (4-10)، وان سبب اختلاف النسب بين دراسة واخرى قد يعود الى عدة عوامل بيئية تؤثر على تكوين الغشاء الحيوي وتعطي نتائج متغايرة منها درجة الحرارة، الرطوبة، الاوكسجين وغيرها (Götz، 2002)، وقد يكون سبب اختلاف نتائج الدراسة الحالية عن الدراسات السابقة بالنسبة لطريقة صفيحة المعايرة الدقيقة Micro Titer Plate method (MTP) الى اختلاف مكونات الوسط كأستخدام وسط TSA او LB، تركيز المزرعة البكتيرية، او اختلاف فترة الحضانة (24 ساعة)، إذ تزداد الكثافة الخلوية في الغشاء الحيوي كلما ازدادت فترة الحضانة، كما لتركيز الصبغة المستخدمة دور في اختلاف النتائج، إذ إن التركيز 0.5% يعطي نتائج أفضل بالمقارنة عند استخدام الصبغة بتركيز 1% (Agarwal وآخرون، 2011) او قد يكون سبب اختلاف النتائج هو اختلاف الصفيحة المستخدمة، حيث تعتبر الصفيحة المصنوعة من مادة Polystyrene أكثر كفاءة في التصاق الاغشية الحيوية مقارنة بالصفائح المصنوعة من مواد اخرى كالزجاج او السيتيل او الكرانيت (Sinde و Carballo، 2000؛ Djordjevic وآخرون، 2002). يساهم الغشاء الحيوي في قدرة التصاق الاحياء المجهرية على السطوح الطبية الحيوية ويحميها من الاستجابة المناعية للمضيف والمعالجة بالمضادات الحيوية (Dunne، 2002)، وقد بين Murugan وآخرون (2011) ان تكوين الغشاء الحيوي قد يحفز على الاستعمار ويقود الى زيادة التهاب المجاري البولية واصابات اخرى تصعب معالجتها.

اشار كل من Joseph وآخرون (2001) و Tompkin (2002) الى ان الخلايا في الاغشية الحيوية تظهر مقاومة عالية ومتميزة للمطهرات لذلك ارتبط نشوء اخماج التهاب الغشاء البريتوني

Periodontitis والتهاب الاذن الوسطى otitis media واصابات القناة الصفراء Biliarytract Infection والتهاب شغاف القلب Endocarditis بقدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي .

ان البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي تكون مسؤولة عن العديد من الالتهابات والامراض التي يكون من الصعب معالجتها بسبب صعوبة اختراق المضاد الحيوي للغشاء وكذلك لامتلاك البكتريا صفة المقاومة للعديد من المضادات الحيوية ، ومقاومة الاستساغة Opsonisation والبلعمة Phagocytosis والظروف البيئية المختلفة والغير ملائمة (Bordi و De Bentzmann ، 2011 ؛ Hassan وآخرون ، 2011a) .



شكل (4-10) : اختبار الغشاء الحيوي بالكونغو الاحمر: A. مستعمرات البكتريا الغامقة المنتجة للغشاء الحيوي ، B. البكتريا الغير منتجة للغشاء الحيوي .

جدول (4-13) : نتائج الغشاء الحيوي بالطرق الثلاث

Biofilm			رقم العزلة لبكتريا <i>E.cloacae</i>
الاليزا	الالتصاق بالانابيب	احمر الكونغو	
قوي	+	-	Ent.1
قوي	+	+	Ent.2
متوسط	+	+	Ent.3
متوسط	+	+	Ent.4
متوسط	+	+	Ent.5
متوسط	+	+	Ent.6
قوي	+	+	Ent.7
قوي	+	+	Ent.8
متوسط	+	+	Ent.9
متوسط	-	-	Ent.10
متوسط	-	-	Ent.11
قوي	+	+	Ent.12
متوسط	+	+	Ent.13
قوي	+	+	Ent.14
متوسط	+	-	Ent.15
%100 قوي = 40 % متوسط = 60 %	86.66%	73.3%	النسبة المئوية

8.4 . نتائج التحري عن جينات المقاومة *qnrS* و جين *qnrB* :Results of the detection of resistance genes *qnrS* and *qnrB* gene

اظهرت نتائج التشخيص الجزئي لمحددات المقاومة للكوينولونات (QRDs) quinolone

resistance determinants المتضمنة جيني *qnrS* و جين *qnrB* في عزلات بكتريا *E.cloacae*

باستخدام البادئات المتخصصة تفوق نسبة ظهور جين *qnrB* 13(86%) كما موضح في الشكل 4)

- 12) في العزلات قيد الدراسة على ظهور جين *qnrS* 12(80%) من العزلات المفحوصة كما

موضح في الشكل (4 - 13) وهذه النتائج تتوافق مع دراسة (Park وآخرون ، 2007) إذ وجد ان من بين جميع جينات المقاومة للكوينولونات فان جين *qnrA* هو الاكثر شيوعا يليه جين *qnrB* ثم جين *qnrS* . بوساطة هذه الدراسة تبين ان 11 عزلة (73.3%) منها تحمل كلا الجينين بينما ظهر احد الجينين في 3 (20%) من العزلات والموضحة في الجدول (4 - 14) ، وكانت عزلة واحدة فاقدة لكلا الجينين وهي العزلة رقم 10 بالرغم من ايجابية الفحص بالاقراص لمضادات الكوينولون وهذا يدل على انها قد تكون حاملة لجينات اخرى *qnrA* او *aac (6')-Ib-cr* التي لم يتم الكشف عنها في هذه الدراسة وهذا يتفق مع (Majlesi وآخرون ، 2017) الذي وجد ان هذه الجينات (*aac (6')-Ib-cr*) (محمولة على البلازميد وتشفر للمقاومة المتعددة للمضادات في الاشخاص الاصحاء في مدينة همدان في ايران. وان جينات *qnr* تنتقل بين البلازميدات مختلفة الاحجام . وان جين *qnrS* غالبا مايكون محمول على بلازميدات صغيرة وغير اقترانية وهذا بخلاف جينات *qnrA* و *qnrB* التي تكون محمولة على بلازميدات غالبا ماتكون كبيرة الحجم واقترانية (Garcia وآخرون ، 2009) وان جينات المقاومة ممكن ان تكون جينات متنقلة Transposone gene (المرجاني ، 2011) . مما يدل على ارتفاع نسبة وجود جينات المقاومة للكوينولونات في عزلات هذا النوع البكتيري وفقا للنسب المذكورة وهذا يتفق مع (Huang وآخرون ، 2012) في دراسة مقارنة في الصين ، وقد تبين في دراسات اخرى (Robicsek وآخرون ، 2006) ان هذه الجينات مرتبطة مع جينات مقاومة اخرى محمولة على نفس البلازميد وهي جينات واسعة الطيف للبيتا لاكتيميز β -Extended Spectrum (Lactamase (ESBLs)). في دراسة (George وآخرون ، 2006) في الولايات المتحدة تحرت وجود جينات المقاومة للكوينولون *qnrB* وجد هذه الجينات في بكتريا *Citrobacter koseri* ، *Escherichia coli* و *Enterobacter cloacae* مرتبطة SHV-12 lactamasefive amino

وتشفر لها في منطقة الاطار المفتوح (ORF) Open Reading frame باختلاف في خمسة أحماض امينية عن *qnrB* في العزلات المعزولة من الهند. وفي دراسة (Rezazadeh وآخرون ، 2016) تمت في ايران في مدينتي Qazvin و Zanzan تبين ان عزلات بكتريا *E. coli* امتلكت مقاومة متوسطة للكوينولون المعتمدة على وجود اليل جين *qnrS1* .

من خلال الدراسة الحالية تبين وجود مقاومة لمضادات الكوينولونات بالرغم من عدم وجود احد الجينين او كلاهما موضع البحث وربما يعود هذا الى تمتع العزلات المقاومة بانظمة تدفق حيوي كفاءة والتي تم تقييمها في دراستنا الحالية وكما مذكور في جدول (4 - 12) او ربما قد تعود إلى امتلاك العزلات قابلية تكوين الغشاء الحيوي ويتفق مع ما توصل اليه Høiby وآخرون (2010) من ان قابلية البكتريا على إنتاج الغشاء الحيوي يمثل مشكلة سريرية خطيرة لظهور مقاومة عالية للمضادات الحيوية في الخلايا الناضجة وذلك يعزى الى عدة آليات مسؤولة منها ضعف انتشار المضادات الحيوية من خلال معقد السكريات المكونة للاغشية الحيوية والتغيرات الفسيولوجية التي تطبئ من معدل النمو وتتكيف مع نقص الاوكسجين والمغذيات والتغيير في الشكل المظهري الذي يمنحه الغشاء الحيوي للخلية بالاضافة الى التعبير العالي لمضخات الدفق وخاصة في البكتريا السالبة لصبغة جرام اذ تضخ هذه الأنظمة المواد المذابة خارج الخلية ، وتسمح مضخات الدفق للكائنات الحية الدقيقة بتنظيم بيئتها الداخلية عن طريق إزالة المواد السامة بما في ذلك العوامل المضادة للميكروبات والنواتج الأيضية وتم العثور على دليل على دور مضخات التدفق الحيوي في مقاومة العديد من الكائنات الحية الدقيقة المنتجة للاغشية الحيوية مثل *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* (Soto ، 2013) . تنشأ المقاومة للمضادات الحيوية التي يسببها الإفراط في

استخدام العوامل المضادة للميكروبات من مجموعة متنوعة من الآليات وخاصة نقل الجينات الأفقية والجينات المقاومة للمضادات الحيوية والتي غالبا ما يسهلها تشكيل الغشاء الحيوي .

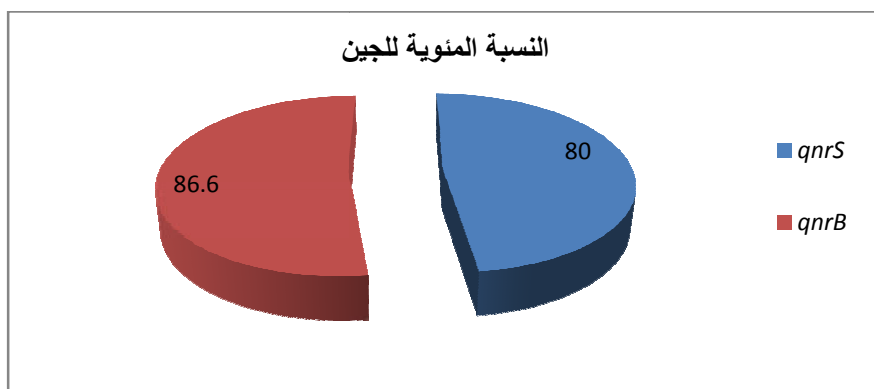
لا يمكن المبالغة في أهمية التغيرات المظهرية التي ينظر إليها في الغشاء الحيوي ، والتي تؤدي إلى تغييرات وراثية ، إن البكتريا المحمية داخل الغشاء الحيوي من البيئة الخارجية تتواصل عبر مسارات نقل الإشارات ، مما يؤدي إلى تغييرات كبيرة في التعبير الجيني ، وتعزيز الفوعة ، والتعجيل بامتلاك المقاومة للمضادات الحيوية ومن الواضح أن زيادة الفوعة وظهور المقاومة للمضادات الحيوية غالبا ما تنشأ في وقت واحد تقريبا ، وإن الكشف عن التفاعلات الجينية الرئيسية بين الفوعة والمقاومة في البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي أمر ضروري لتحديد استهداف آليات جديدة مما يوفر في نهاية المطاف اكتشاف مضادات تسهم في تحسين العلاج للعدوى المزمنة المتكررة والمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (Schroeder وآخرون ، 2017) وربما تعود المقاومة الى فعالية GyrB و topoisomerase IV وهذا يتفق مع ماتوصل اليه (Majlesi وآخرون ، 2017) إذ ان فعالية المضاد الحيوي السبروفلاكسين يرتبط مباشرة DNA gyrase أو topoisomerase IV المحمولان على الكروموسوم البكتيري مما يثبط النمو البكتيري وفي حالة تمكن البكتريا من زيادة فعالية الانزيمين عبر التعبير الجيني لنسخ الجينات المحمولة على البلازميد فانها تتجو من فعل المضاد الحيوي (AliKahani وآخرون ، 2013 ؛ Briales وآخرون ، 2012) . قد وجد Amin و Wareham (2009) ان هناك ثلاث آليات تفسر مقاومة البكتريا التي يتوسطها البلازميد لمضادات الكوينولونات وهي انتاج بروتين qnr الذي يحمي هدف الكوينولونات والية انتاج (aac) Ib-re N- Acetyltransferases الذي يقوم بتحفيز acetyl CoA-dependent acetylation التحوير الانزيمي لمجموعة الامين في مضادات الامينوكلايكوسايد مثل Ciprofloxacin و Norfloxacin

، ان امتلاك بكتريا *E.cloacae* للاغشية الحيوية وآلية تدفق المضخة والذي يرتبط QepA الذي يخرج الفلوروكوينولون الكاره للماء إن الانتشار المرتفع والمتنوع لجينات PMQR يجعل سلالات Enterobacteriaceae مستودعا فعالا للجينات المقاومة للكويبولونات مما تهدد استمرار فائدة هذه الفئة من المضادات الحيوية في هذا المجتمع (Tomasz وآخرون ، 2016) .

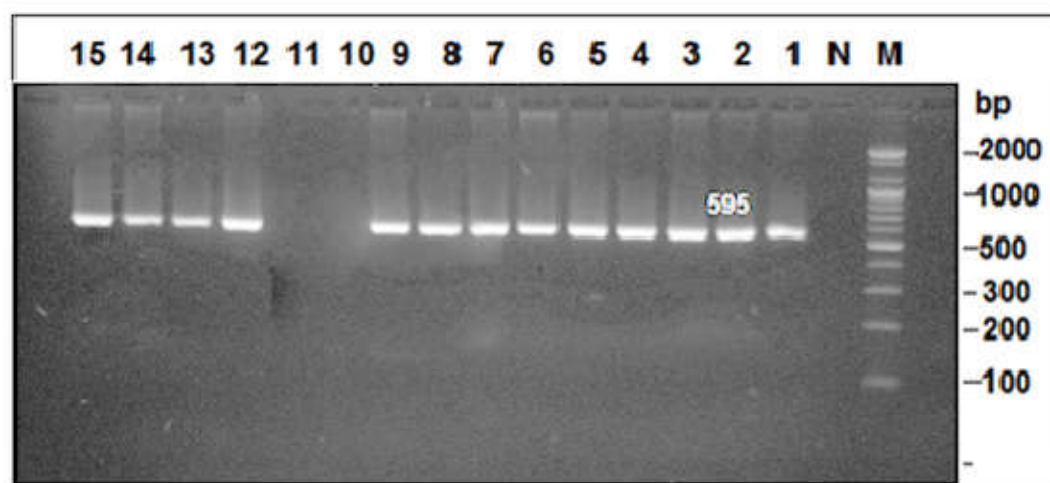
جدول (4- 14) : نتائج التشخيص الجزيئي للعزلات البكتيرية بتضخيم جينات *qnrS* و *qnrB*

رقم العزلة	نوع العزلة	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
Ent.1	<i>E.cloacae</i>	+	+
Ent.2	<i>E.cloacae</i>	+	+
Ent.3	<i>E.cloacae</i>	+	-
Ent.4	<i>E.cloacae</i>	+	+
Ent.5	<i>E.cloacae</i>	+	+
Ent.6	<i>E.cloacae</i>	+	+
Ent.7	<i>E.cloacae</i>	+	+
Ent.8	<i>E.cloacae</i>	+	+
Ent.9	<i>E.cloacae</i>	+	+
Ent.10	<i>E.cloacae</i>	-	-
Ent.11	<i>E.cloacae</i>	-	+
Ent.12	<i>E.cloacae</i>	+	+
Ent.13	<i>E.cloacae</i>	+	-
Ent.14	<i>E.cloacae</i>	+	+
Ent.15	<i>E.cloacae</i>	+	+
النسبة المئوية لظهور الجين		%86.6	%80

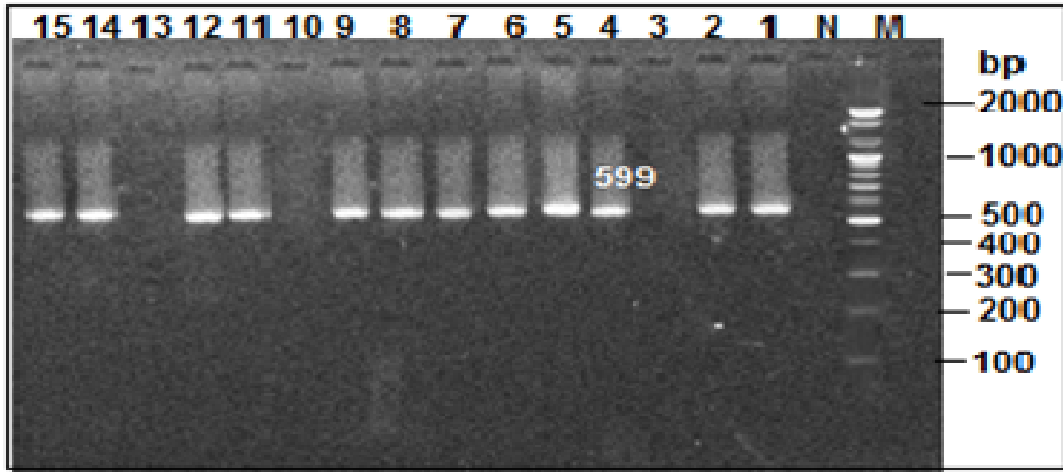
ومن خلال الشكل (4-11) يتضح ان تردد جين *qnrB* هو اعلى قليلا من تردد جين *qnrS* في العزلات العراقية وهو مقارب لما وجدته الباحثة (Majlesi وآخرون ، 2017) في همدان في ايران من ان هذين الجينين ينتشران بشكل واسع في العزلات لنفس البكتريا آنفه الذكر في ايران وينعدم وجود جين *qnrA* فيهم .



شكل (4-11) : النسبة المئوية لظهور جيني *qnrS* و *qnrB* في 15 عزلة من بكتريا *E.cloacae*



شكل (4-12) : الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين *qnrB* في هلام الاكاروز وتركيزه 1.5% الحاوي على 0.5 ملغم/مل من صبغة Ethidium bromide في محلول TBE 1X وفولتية 5 فولت/سم² ولمدة ساعة وباستعمال DNA Ladder (2000 bp-100bp) ويظهر في العمود الاول M ويبدأ من 100 زوج قاعدة ، المسار N يمثل العينة السالبة. الاعمدة 1-15 حزم الجين وحجمها 595 زوج قاعدة . إذ تُبين المسارات 1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5 ، 6 ، 7 ، 8 ، 9 ، 12 ، 13 ، 14 ، 15 وجود الجين *qnrB* ، أما المسارات 10 ، 11 فلا تحتوي على الجين .



شكل (4-13): الترحيل الكهربائي لنواتج تضخيم جين *qnrS* في هلام الاكاروز وتركيزه 1.5% الحاوي على 0.5 ملغم/مل من صبغة Ethidium bromide في محلول TBE 1X وفولتية 5 فولت/سم² ولمدة ساعة وباستعمال DNA Ladder (2000 bp-100bp) ويظهر في العمود الاول M ويبدأ من 100 زوج قاعدة، المسار N يمثل العينة السالبة. الاعمدة 1-15 حزم الجين وحجمها 599 زوج قاعدة. إذ تُبين المسارات 1، 2، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 11، 12، 14، 15 وجود الجين *qnrS*، أما المسارات 3، 10، 13 فلا تحتوي على الجين.

إن ارتباط محددات المقاومة هذه يبعث على القلق، لأنه قد يسهل انتخاب سلالات مقاومة عالية للأدوية المتعددة في بعض المجتمعات، هناك حاجة كبيرة للحصول على معرفة أكثر تفصيلاً عن رابطة جينات المقاومة المختلفة في سلالة المعوية، وينبغي إجراء المزيد من الدراسات المستفيضة في هذا المجال تسهم في وضع استراتيجيات فعالة لمكافحة العدوى والسيطرة الصارمة على العدوى لمنع حدوث تفشي محتمل لسلالات مقاومة في العراق.

الاستنتاجات
والتوصيات
Conclusions
and

الاستنتاجات : Conclusions

- 1- اظهرت النتائج ان اعلى نسبة عزل لبكتريا *Enterobacter cloacae* من عينات الادرار و الدم ، وان معظم عزلات *Enterobacter cloacae* تمتلك عوامل الضراوة المتمثلة بأنتاج الغشاء الحيوي والمحفظة وقدرة الالتصاق على الخلايا الطلائية والبروتيز وامتلاكها مضخات الدفع عالية الكفاءة ، وبعضها لها القدرة على انتاج البكتريوسين والهيموليسين ، كما اظهرت النتائج ان البكتريا غير منتجة لانزيم اللايبيز .
- 2- كانت اقل نسبة مقاومة اظهرتها بكتريا *Enterobacter cloacae* المعزولة من المرضى هي لمضادات Gatifloxacin ، Ofloxacin و Norfloxacin على التوالي، اذ تعد هذه المضادات الافضل فعالية تجاه البكتريا، كما اظهرت بعض العزلات المقاومة المتعددة لمضادات الكوينولونات قيد الدراسة .
- 3- اظهرت الدراسة احتواء اغلب عزلات بكتريا *Enterobacter cloacae* المقاومة لمضادات الكوينولونات على جيني (*qnrB* و *qnrS*) المشفرة لصفة مقاومة الكوينولونات .
- 4- اظهرت نتائج الشجرة الوراثية تشابه الجين التشخيصي لعزلات *Enterobacter cloacae* المحلية مع العزلات العالمية المسجلة في بنك الجينات NCBI .
- 5- تسجيل جديد للتسلسل النيوكليوتيدي للجين التشخيصي 16S rRNA بين عزلات بكتريا *Enterobacter cloacae* على المستوى المحلي والعالمي باستخدام جهاز AB DNA sequencing system وذلك لامتلاكها طفرات وراثية في هذا الجين التشخيصي .

Recommendation : التوصيات

- 1- إجراء دراسة جزيئية موسعة للكشف عن جينات *qnrA* و *qnrC* و *qnrD* المسؤولة عن مقاومة الكوينولونات وغيرها في عزلات بكتريا *Enterobacter cloacae* المرضية والبيئية .
- 2- إجراء دراسة عن انتشار جينات *qnr* في الأنواع البكتيرية الأخرى لاسيما في البكتريا الموجبة لصبغة كرام .
- 3- دراسة التعبير الجيني لجينات *qnr* باستخدام تقنية (RT-PCR) Real time PCR .
- 4- تحديد دور مضخات الدفع Efflux pump في المقاومة لمضادات الكوينولونات .

المصادر

References

- ❖ الطائي، ألاء محمد محمود. (2012). دراسة وراثية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المقاومة لمضاد Ciprofloxacin. رسالة ماجستير. الجامعة المستنصرية.
- ❖ العبادي ، هدف مهدي كاظم . (2008). تأثير بعض مضادات الحياة ومستخلص الثوم على البكتريا الهوائية المعزولة من خمجات الجروح بعد العمليات الجراحية في مستشفى الديوانية التعليمي في مدينة الديوانية . مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري ،المجلد (7)، العدد (2) : 20-14 .
- ❖ العبدلي، ياسر عادل جبار. (2010). استخلاص وتنقية مركب الكاتشين من الشاي الأخضر (*Camellia sinensis*) وتأثيره التآزري على البكتيريا المسببة لالتهابات المجاري البولية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- ❖ العبيدي، رشا حاتم شايع. (2013). علاقة بعض المعايير الكيموحيوية في مصول مرضى الفشل الكلوي بعوامل الامراضية في عزلات لبكتريا *Enterobacter* و *Providencia*. رسالة ماجستير. الجامعة المستنصرية.
- ❖ العتبي، دعاء عدنان كاظم. (2013). دراسة بكتريولوجية لبعض أنواع العائلة المعوية المعزولة من صالات مستشفى الولادة في مدينة بعقوبة. رسالة ماجستير . كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة ديالى.
- ❖ العزاوي، سندس عادل ناجي .(2005). دراسة تأثير غسل النحل على البكتريا التي تلوث الحروق وإمكانية استخدامه في العلاج .رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة ديالى.
- ❖ العطار، نغم شاكر محمد حسين.(2007). دراسة امراضية بكتريا المعزولة من اخماج الجروح في مستشفيات بغداد . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد.

- ❖ **الكعبي** ، مروة حسن عبد علي .(2011). تشخيص جينات *bla SHV / blaTEM* ،
CTX-M-I ،CTX-M-III باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا من بعض
البكتريا السالبة لصبغة كرام . رسالة ماجستير . كلية العلوم – الجامعة المستنصرية .
- ❖ **المرجاني** ، محمد فرج . (2011) . المضادات الحيوية المقاومة الحيوية البكتيرية للمضادات
الحوية . عمان : دار دجلة حسين.
- ❖ **المشرقي** ، جلال حزام سعيد.(2003).دراسة تشخيصية وإمراضية على جرثومة
Enterobacter aerogenes المعزولة من حالات الإسهال عند الأطفال الرضع ضمن
مدينة الموصل.رسالة ماجستير.كلية العلوم .جامعة الموصل.
- ❖ **الهاشمي** ، بشرى صبري مكطاع. (2013). التحري عن جينات *bla_{CTX-M}* ، *bla_{SHV}* و
aac(6')-Ib بين العزلات المحلية لبكتريا *Enterobacter cloacae* و *Klebsiella pneumoniae*
المعزولة من مصادر سريرية مختلفة. رسالة ماجستير . الجامعة المستنصرية.
- ❖ **الهنداوي**، ربيع عبد الاله. (2013). دراسة تشخيصية ومناعية لبكتريا *Enterobacter aerogenes*
في الحيوان المختبري. رسالة ماجستير . جامعة بابل.
- ❖ **حسن** ، عمر نعمة فليح و **النعمي** ، ليث مصلح نجيب .(2017) . تقدير الغشاء الحيوي
المتكون بتقنية الاليزا للبكتريا السالبة لصبغة كرام المعزولة من اخماج الجروح والحروق
ودراسة انتاج الغشاء جزيئيا. مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية . المجلد (30) العدد
(1) : 338-325 .
- ❖ **حسن**، ريام وسام . (2017). دراسة جزيئية للجينات المسؤولة عن انتاج الهيمولايسين في
البكتريا المسببة لاختلاج المسالك البولية ومقاومتها لعوامل السيطرة .رسالة ماجستير . كلية
التربية ، جامعة القادسية.

- ❖ حميد، تقى عبد الكريم. (2016). دراسة مقارنة للمحتوى البلازميدي للبكتريا المخمرة لسكر اللاكتوز التابعة للعائلة المعوية والمعزولة من عينات بيئية وسريية. رسالة ماجستير . كلية التربية للعلوم الصرفة-ابن الهيثم ،جامعة بغداد.
- ❖ خضر ،أيمن محمود.(2013) التحري عن قدرة بعض الأنواع البكتيرية على إنتاج المادة المخاطية . مجلة علوم الرافدين، المجلد 24 ، العدد 1 ، ص 36-49.
- ❖ عبد الرزاق ، رغد عبد اللطيف . (2010). دراسة تأثير الامبرازول (omeprazole) كمثبط لمضخات دفع السبروفلوكساسين والنورفلوكساسين في بعض العزلات البكتيرية المعزولة من المرضى . مجلة ديالى للعلوم الزراعية ،2(2) : 38-43 .
- ❖ عبيد ، هند حسين .(2016) . التحري عن انتاج البكتريوسين وتحفيز انتاجه بوساطة مستخلص نبات Brassica rapa . مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية . المجلد 28 العدد (3) : 234-248 .
- ❖ مصطفى ، دينا نورالدين . (2014) . البكتريوسينات مجلة أسبوط للدارسات البيئية - العدد الأربعون .

- ❖ **Abid**, I. N. and Al-Amaar, M. H. (2015). Bacteriological study of *Enterobacter* spp. that isolated from different clinical specimens Magazin of Al-Kufa University for Biology (7): 1.
- ❖ **Abid**, Intidhaar, N. (2013). Bacteriological and molecular study of *Enterobacter* spp. Isolated from different clinical specimens, PhD dissertation. University of Kufa.
- ❖ **Agarwal**, R.K. ; Singh, S.; Bhilegaonkar, K.N. and Singh, V.P. (2011). Optimization of microtiter plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes .Int.food Res .J. 18 (4):1493-98.
- ❖ **Ahmed**, A. W.; Alzubaidi, F. S., & Hamza, S. J. (2014). Biodegradation of crude oil in contaminated water by local isolates of *Enterobacter cloacae*. *Iraqi Journal of Science*, 55(3A), 1025-1033.
- ❖ **Alammar**, M. H.M. (2013). Molecular study of some virulence factors encoding genes of *Enterobacter* spp. Isolated from different clinical specimens .Magazin of Al-Kufa University for Biology . 5 (2). ISSN: 2073-8854
- ❖ **Al-Charrakh**, A .H .; Yousif ,S .Y .and Al- Janabi ,H .S.(2011). Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocins from *Klebsiella* isolates from Hilla/Iraq. *J.Microbial* . 2(5),:pp.1-11.
- ❖ **Al-Dahmoshi**, H. O. (2012). Detection of Some Virulence Factor Genes of *Enterobacter* spp. Isolated from Patients with Cystitis. Ph. D. Thesis. Babylon University.
- ❖ **AL-Dahmoshi**, H. O. ; Abdul Razzaq, M.S. ; Bunyan, I. A. (2012). Detection of some virulence factor genes of *Enterobacter* spp. Isolated from patients with cystitis. Athesis submitted to the council of the College of Medicine University of Babylon.
- ❖ **Alikhani**, M. Y.; Hashemi, S. H.; Aslani, M. M., & Farajnia, S. (2013). Prevalence and antibiotic resistance patterns of diarrheagenic

- Escherichia coli* isolated from adolescents and adults in Hamedan, Western Iran. ***Iranian journal of microbiology***, 5(1), 42–47.
- ❖ **Aljawasim**, Baker Diwan Getheeth. (2014). "Evaluation of PCR-Based Methods for Rapid, Accurate Detection and Monitoring of *Verticillium Dahliae* in Woody Hosts by Real-Time Polymerase Chain Reaction" Theses and Dissertations--Plant Pathology. 13.
 - ❖ **AL-Kalifawi**, E. J.(2014). Study the Antimicrobial effect of Kombucha tea on bacteria isolated from Diabetic foot ulcer . ***Journal of Biotechnology Research Center*** (Special edition) 8 (4) .
 - ❖ **AL-Khazali**, Khitam ali obaid.(2002).Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Isolated from Burns and Wound Infections to Antibiotics and some Disinfectants. M. Sc. Thesis. University Mustansirya.
 - ❖ **Alkhuzaee**, Qasim A. J. (2017). Molecular and Bacteriological Study of Virulence Factors Among *Enterobacter cloacae* Isolates. M.S.C. thesis, College of Medicine, University of Babylon.
 - ❖ **Almeida**, C.; Azevedo, N. F.; Santos, S.; Keevil, C. W. and Vieira, M. J. (2013). Correction: Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA FISH). PLoS ONE. 8(6): 101-371.
 - ❖ **Alnajar**, S. & Gupta, R. S. (2017). Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family Enterobacteriaceae and support the reclassification of several polyphyletic members of the family. *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 108-127.
 - ❖ **Al-saad**, N.F. ; AL-Saeed,M .S; Bnyan,I. A. Biofilm Formation by Bacterial Isolates from Burn Infected Patients.(2012). ***Medical Journal of Babylon***- 9- (3).pp.517-525.

- ❖ **Al-Saadi**, A. G. M.; Abbas, A. F. and Fazaa, S. A. (2017). The Prevalence of the Gram Positive and Gram Negative Bacteria in Open Fractures and their Resistance Profiles to Antimicrobial Agents. *Journal of Global Pharma Technology*.
- ❖ **AL-Taai** , Hadi R. R. (2016) . Effect of Combination of Antibiotics on *Enterobacter cloacae* isolated from Different Clinical and Environmental Sources in Diyala Province. Department of Biology- College of Sciences- University of Diyala . 12 (3), 2222-8373.
- ❖ **Al-Tawfiq**, A.; Antony, A. and Abed, M.(2009).Antimicrobial Resistance Rates of *Enterobacter* spp.:A Seven years Surveillance Study. Med. Princ Pract., 18:100-104.
- ❖ **Amaral**, L.; Martins, A.; Spengler, G.; and Molnar, J. (2014). Efflux pumps of Gram negative bacteria: what they do, how they do it, with what and how to deal with them. *Front. Pharmacol.* 4:168. doi: 10.3389/fphar.2013.00168.
- ❖ **Amin**, A.K. and Wareham, D.W. (2009). Plasmid-mediated quinolone resistance genes in Enterobacteriaceae isolates associated with community and nosocomial urinary tract infection in East London, UK. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34, 490–491.
- ❖ **Andersen**, J. L. ; He, G. X. ; Kakarla, P. ; KC, R. ; Kumar, S. ; Lakra, W. S., ...& Varela, M. F. (2015). Multidrug efflux pumps from Enterobacteriaceae, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens . *International journal of environmental research and public health*, 12(2), 1487-1547.
- ❖ **Andriole**, V.T. (2005). The quinolones: past, present, and future. *Clin. Infect. Dis.*, 41: 113-119.
- ❖ **Araujo**, S. M.; Mourao, T. C.; Oliveira, J. L.; and daher, E. F. (2011). Antimicrobial resistance of uropathogens in women with acute

- uncomplicated cystitis from primary care settings. *Int. Urol. Nephrol.* 43: 461-466.
- ❖ **Arciola, C. R. ; Campoccia, D. ; Gamberini, S. ; Cervellati, M. ; Donati, M. E. ; Montanaro, L. (2002).**Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus *Biomaterials*, pp. 4233-4239.
 - ❖ **Asokan, S. and Jayanthi, C. (2010).** Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans*. *J. Cell. Tissue. Res.* 10: 2119-2123.
 - ❖ **Atabek, A. (2006).** Investigating bacterial outer membrane polymers and bacterial interactions with organic molecules using atomic force microscopy(Doctoral dissertation, Worcester Polytechnic Institute).
 - ❖ **Atlas, R.M.; Parks, L.C. and Brown, A. E. (1995).** Laboratory manual of experimental microbiology. 1st ed. Mosby, Inc, USA.
 - ❖ **Aurelie, A.; Huet, J. ; Raygada, K.; Rutta, S. ; Seo, and Kaatz, G. (2008).**Multidrug efflux pump overexpression in *X* after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. *Microbiology*(154).3144-3153.
 - ❖ **Bender, J., &Flieger, A. (2010).** Lipases as pathogenicity factors of bacterial pathogens of humans. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 3241-3258). Springer Berlin Heidelberg.
 - ❖ **Bennet , P. and Brown , M. (2008).** Clinical pharmacology , 10th ed . Churchill livingstone , Elsevier .Spain .
 - ❖ **Benson, H.J. (2002).** Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology .8th ed .The McGraw-Hill Companies.USA.
 - ❖ **Beshay, U.(2003).** Production of alkaline protease by *Teredinobacter turnirae* cells immobilized in Ca-alginate beads . *African J. Biotechnol.*, 2(3):60-65.

- ❖ **Bhalerao**, D. S. ; Roushani, S. ; Kinikar, A. G. and Akhter, I. (2010). Study of Metallo-beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pravara Rural Hospital. *Pravara Med Rev.* 2(3): 16-19 .
- ❖ **Bonomo**, R. A. ; Hooper, D. C. ; Kaye, K. S. ; Johnson, J. R. ; Clancy, C. J. ; Thaden, J. T. ; ... & van Duin, D. (2017). Gram-negative bacterial infections: research priorities, accomplishments, and future directions of the Antibacterial Resistance Leadership Group. *Clinical Infectious Diseases*, 64(suppl_1), S30-S35.
- ❖ **Bordi**, C. and De Bentzmann, S. (2011) . Hacking into bacterial biofilms : a new therapeutic challenge . *Annals of Intensive Care* . 19(1): 2-8 .
- ❖ **Bosák**, J. (2013). BacteriocinogenyOfYersinia: Molecular Interactions Of Colicinfy With A Susceptible Bacterial Cell. PhD dissertation. MASARYK UNIVERSITY. Czech Republic.
- ❖ **Bozkurt**, H. ; Kurtoglu, M.G. ;Bayram, Y. ;Kesli , R. and Berktaş , M.(2009). Correlation of slime production investigated via three different methods in coagulase-negative *Staphylococci* with crystal violet reaction and antimicrobial resistance.*J. Int .Med. Res.*,37(121-128).
- ❖ **Brenner**,D.J ; Krieg , N.R ; Staley,J.T. and Garrity, G.M.(2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* . 2nd .ed. Vol. 2. Springer . USA.PP: 514-520.
- ❖ **Brenner**,D.J.; Noel R. Krieg, James T. Staley, George M. Garrity Sc.D., David R. Boone,Paul De Vos , Michael Goodfellow, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer (2004).Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume twoThe *Proteobacteria* Part B The *Gammaproteobacteria*. Publisher Springer USA.
- ❖ **Briales**, A.; Rodrí'guez-Martí'nez, J.M.; Velasco, C.; de Alba, P.D.;Rodrí'guez-Ban~ o, J.; Martí'nez-Martí'nez, L., *et al*, (2012).

- Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(60)-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 39(5): 431–434.
- ❖ **Brook, G.F.** ; Butel , J.S. and Mores , S.A.(2004). Medical Microbiology. Jawetz ,Melnick and Adelberg's.23.th ed . Appleton and Lange USA . Pp:223-261.
 - ❖ **Brown, A. E.** (2005). Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology.McGraw-Hill. New York. companies, Inc., 1221 Avenue of the Americas, New York. 144-146.
 - ❖ **Brown, A.E.** (2007). Benson`s, Microbiological applications Laboratory Manual in General Microbiology. 10th ed . McGraw – Hill comp. Inc., USA., P.102-263.
 - ❖ **Brown, D. W.** (Ed.). (2013). Fusarium. Caister Academic Press.
 - ❖ **Cai, X.**; Congrong, L.; Huang, J. and Li, Y. (2011). Prevalence of plasmid-mediated quinolones resistance *qnr* genes in central China. *African Journal of Microbiology* . 5(8) pp.975-978.
 - ❖ **Cano, M.E.** ; Rodriguez-Martinez, J.M. ; Agüero, J. ; Pascual, A. ; Calvo, J. ; Garcia-Lobo, J.M.; *et al.* (2009).Detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Enterobacter* spp. in Spain. *J. Clin Microbiol.*;47(7):2033–9. doi:10.1128/JCM.02229-08.
 - ❖ **Cattoir, V.**; Nordmann, P.; Silva-Sanchez, J.; Espinal, P. and Poirel, L. (2008). ISEcp1-mediated transposition of *qnrB*-like gene in *Escherichia coli* . antimicrob. Agents chemother 52:2929-2932.
 - ❖ **Cheng, S.S.**; Chen, K.K.; Lin, A.T.; Chang, Y. H.; hsu, T.H.; Wu, H.H.; Chiu, A.W.and chang, L.S. (1998). Complicated urinary tract infection :analysis of 179 patients . Chung . Hua I. Hsueh . Tsa . Chin . Taipei . 61:651-6.

- ❖ **Choe**, Y. M. ; Park, K. M. ; Jeon, Y. S. ; Cho, S. G. ; Hong, K. C. ; Shin, W. Y. & Song, J. H. (2017). *Enterobacter cloacae*–Related Necrotizing Fasciitis After Peritoneal Dialysis in Delayed Graft Function: A Case Report. In Transplantation Proceedings . 49(5), pp. 1189-1191). Elsevier.
- ❖ **Choi**, S.H. ; Lee, J.E. ; Park, S.J. ; Lee, S.O. ; Jeong, J.Y. ; Kim, M.N. ;Woo, J.H. ; Kim, Y.S. (2008). Emergence of antibiotic resistance during therapy for infections caused by Enterobacteriaceae producing AmpC beta-lactamase: implications for antibiotic use. *Antimicrob. Agents Chemother.* ,52 (3): 995-1000.
- ❖ **Christensen**, G. D. ; Simpson, W. A. ; Bison, A. L. and Beachy, H. (1982). Adherence of slime – producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *J. Infect. Immune.* 37: 317 – 326.
- ❖ **Clarridge** , J.E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews.* 17(4) 840-862 .
- ❖ **CLSI**. Clinical and Laboratory Standards Institute.(2016). standards for antimicrobial susceptibility Testing; Twenty-Second informational supplement. CLSI Document M100-S26.Wayne,PA:Clinical and Laboratory Standards Institute .
- ❖ **Collee** , J. G. ; Fraser , A. G. ; Marmion , B. P. and Simmons , A. (1996) . Mackie and McCartney practical medical microbiology . 14thed. Churchill Livingston . 173-174.
- ❖ **Cursino**,L.; Smarda,J.;Chartone,E. and Nascimento,A. (2002). Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae *Braz.J. Microbiol.* 33 : 196-217.
- ❖ **Da Silva**, K. E. ; Varella, T. R. ; dos Santos Bet, G. M. ; Carvalhaes, C. G. ; Correa, M. E. ; Vasconcelos, N. G.; ... &Simionatto, S. (2017). High mortality rate associated with KPC-producing *Enterobacter*

- cloacae* in a Brazilian hospital. *American Journal of Infection Control*.
- ❖ **Davin-Regli, A., & Pagès, J. M. (2015).** *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in microbiology*, 6(392): 1-10.
 - ❖ **Dimude, J. U. (2013).** CTX-M β -lactamases and associated integrons: their dissemination in Gram-negative bacteria.
 - ❖ **Djordjevic, D.; Wiedmann, M. and McLandsborough, L. A. (2002).** Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2950–2958.
 - ❖ **Domingues, L. (2017).** PCR-methods and protocols. Springer. Humana Press.
 - ❖ **Dunne, J.W. (2002).** Bacterial adhesion: seen any good biofilm lately. *Clin. Microbiol. Rev.*; 15:155-166.
 - ❖ **Fajingbesi, A.O.; Anzaku, A.A.; Akande, M.; Emmanuel, I.A. and Akwashiki, O. (2018) .** Production of protease enzyme from fish guts using *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae* and *Bacillus megaterium*. *J Clin Path Lab Med*. 2(1):1-7.
 - ❖ **Farmer, J. J. ; Boatwright, K. D. & Janda, J. M. (2007).** Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical microbiology* (9th ed., pp. 649-669). Washington, DC, USA: ASM press.
 - ❖ **Ferroni, A.; Sermet-Gaudelus, I.; Abachin, E.; Quesne, G.; Lenoir, G.; Berche, P. ; Gaillard, J.L. (2002).** Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of non fermenting Gram negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. *J. Clin. Microbiol.* 40:3793-3797.

- ❖ **Finegold**, S. M. and Martin, W. J. (1982) . Diagnostic Microbiology. 6th ed. Mosby Company. London
- ❖ **Firoozeh**, F. ; Zibaei, M. ; Soleimani-Asl Y.(2014). Detection of plasmid mediated *qnr* genes among the quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates in Iran. **J. Infect Dev Ctries**. 8(7):818-822.
- ❖ **Forbes**, B. A.; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. (2007). Diagnostic Microbiology. 12th ed. Baileyand Scotts'. Mosby Elsevier. China., pp: 93-247.
- ❖ **Fraser** , S. L. ; Arnett , M. and Sinave , C. P. (2010) *Enterobacter* infections . e medicine infectious diseases. Editor , Cunha , B. A. , State university of New York School of Medicine at Stony Brook .
- ❖ **Freeman**, D. J. ; Falkiner, F. R. and Keane, C. T. (1989) . New method for detecting slime production by coagulase negative *Staphylococci*. **J. Clin. Pathol**. 42: 872-874 .
- ❖ **Froelich-Ammon**, S. J., &Osheroff, N. (1995). Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, 270(37), 21429-21432.
- ❖ **Funfstuck**, R. and Stein, G. (1997). Pathogenic Aspects of urinary tract infection. **Wein. Med. Wochenschr.**, 147 (19) : 465 – 469.
- ❖ **Gales**, A. C. ; Jones, R. N. ; Gordon, K. A. ; Sader, H. S. ; Wilke, W. W. ; Beach, M. L. ; Praller, M. A. and Doern, G. V. (2000). Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents tested against urinary tract infection pathogen in hospitalized patients in Latin America. **Antimicrob. Agents Chemother**.45(3):295–303.
- ❖ **Garcia**, F.; Forting, D.; veldman, K. and Carattoli, A.(2009). Characterization of plasmid harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. **J. Antimicrob Chemother**. 63:274-281.

- ❖ **Gay, K.;** Robicsek, A.; Strahilevitz, J.; Jacoby, G. and Hooper, C. (2006). Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin. Infect. Dis. Infect. Dis.* 43:297-304.
- ❖ **George, A. J. ; Kelley, E. W. ; Debra, M. M. ; Victoria, J. W. ; Herin, O. A. and David, C. H.**(2006). *qnrB*, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, p. 1178–1182. 50(4).
- ❖ **Ghodhbane, H. ; Elaidi, S. ; Sabatier, J. M. ; Achour, S. ; Benhmida, J. & Regaya, I.** (2015). Bacteriocins active against multi-resistant gram negative bacteria implicated in nosocomial infections. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 15(1), 2-12.
- ❖ **Götz, F.** (2002) . *Staphylococcus* and biofilms . *Mol. Microbiol.* 43(6): 1367-1378 .
- ❖ **Green and Sambrook** (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed. New York.
- ❖ **Grimont , F. & Grimont , P. A. D.** (2006). The genus *Enterobacter* , *Prokaryotes* , Dol. , 6 : 197 – 214 .
- ❖ **Grzymajlo, K. ; Ugorski, M. ; Suchanski, J. ; Kedzierska, A. E. ; Kolenda, R. ; Jarzab, A. ; ... & Schierack, P.** (2017). The Novel Type 1 Fimbriae FimH Receptor Calreticulin Plays a Role in *Salmonella* Host Specificity. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7: 326. doi: 10.3389.
- ❖ **Gundry, M. and Vijg, J.** (2012). Direct mutation analysis by highthroughput sequencing: From germline to low-abundant, somatic variants. *Mutation Research.* 729:1–15.
- ❖ **Hagberg, L.;** Jodel. U. & Lindberg, U. (1981). Adhesion, Haemagglutination and Virulence of *E.coli* causing U.T.Is. *Infec. Immun*, 31:564-570.

- ❖ **Haghihatpanahet**, M. ; Mozaffari, A. S. ; Mojtahadi, A. ; Mozaffari, N. A. ;Zaighami, H.(2016).Detection of ESBL and plasmid born bla CTX-M and bla TEN genes among clinical strains of E.coli isolater from patients in the north Iran .*J.Global Antimicrob Res.st*.7.110-113.
- ❖ **Harley**, J. and Prescott, L. (2002). Laboratory exercises in Microbiology. 5th. ed. 466 – 7.The McGraw Hill, Companies . New York .
- ❖ **Harvey**, J. ; Keenan, K.P. and Gilmour, A. (2007). Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiol.*; 24:380-392.
- ❖ **Hassan**, A. ; Usman, J. ; Kaleem, F. ; Omair, M. ; Khalid, A. and Iqbal, M. (2011a) . Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates .*The Brazilian Journal of Infectious Diseases* . 15(4): 305-311 .
- ❖ **Hassan**, R. ; EL-Naggar, W. ; EL-Sawy, E. and EL-Mahdy, A. (2011b). Characterization of Som Virulence Factorsthe Associated With Enterobacteriaceae Isolated From Urinary Tract Infections in Mansoura Hospitals .*Egyption Journal of Medical Microbiology*. 20(2): 9-17 .
- ❖ **Hoffmann**, H. and Roggenkamp, A. (2003). Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. *J. Appl. Environ. Microbiol*. 69 (10) : 5306 – 5318.
- ❖ Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 322-332.
- ❖ **Holá**, V. ; Růžicka, F. &Votava, M. (2006). The dynamics of staphylococcus epidermis biofilm formation in relation to nutrition, temperature, and time. *ScriptaMedica*, 79(3), 169-174.

- ❖ **Holt**, J. G. ; Krieg, N. R. ; Sneath, P. H. A. ; Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams and Wilkins. Maryland. USA.
- ❖ **Hooper**, D.C.(2003). Mechanisms of quinolone resistance. In: Hooper DC, Rubenstein E, eds. *Quinolone antimicrobial agents*. 3rd edn. Washington, DC: *American Society for Microbiology Press*, 2003: 41–67.
- ❖ **Huang** ,S.; Dai, W.; Sun, S.; Zhang, X.; Zhang, L. (2012).Prevalence of plasmid Mediated Quinolone Resistance and Aminoglycoside Resistance Determinants among Carbapenem Non-Susceptible *PLOS one* Volume 7 , Issue 10 , e47636.
- ❖ **Ibrahim**, I. A. ; Al-Shwaikh, R. M. & Tawfeeq, M. S. (2015). Pathogenicity Study of a number of Gram-negative bacilli isolated from clinical samples *.Diyala Journal For Pure Sciences* . 11 (4) , ISSN: 2222-8373.
- ❖ **Iwahi**, T. ; Abs, R. ; Nako , M. and Imado, A. (1983). Role of type-1 fimbriae in the pathogenesis of ascending UTI by *E.coli* in mice . *Infec. Immune*. 39: 1307-1315 .
- ❖ **Jacob**, B. M., & Kim, E. (2010). Inhibiting biofilm formation of *Enterobacter* spp. prevented premature withering in cut flowers. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 27(4), 1252-1257.
- ❖ **Jacob**, J. (2015). Antibiotics approved for use in conventional poultry production. Available at: <http://articles.extension.org/pages/66981/antibiotics-approved-for-use-in-conventional-poultry-production>
- ❖ **Jacoby**, G. ; Cattoir, V. ; Hooper, D. ; Martínez-Martínez, L. ; Nordmann, P. ; Pascual, A. ; ...& Wang, M. (2008). *qnr* Gene nomenclature. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(7), 2297-2299.

- ❖ **Jacoby, G. A.** (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41(Supplement_2), S120-S126. https://academic.oup.com/cid/article/41/Supplement_2/S120/307501
- ❖ **Janda, J. M., & Abbott, S. L.** (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- ❖ **Jasim, Lamiaa, M.** (2017). Phenotypic and genotypic detection of AmpC β -lactamase among clinical isolates of *Enterobacter* spp., M.Sc. thesis. College of Science, Al-Mustansiriyah University.
- ❖ **Jawetz, Melnick and delberg's.** (2016). *MEDICAL MICROBIOLOGY*. 27(Edition). American LANGE; 470.
- ❖ **Jeremy, W. D and Simon, F. P.** (2010). Molecular Genetics of Bacteria, 5th edition. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.
- ❖ **Jones, R. N.** (1998). Important and emerging betalactamase –mediated resistances in hospital –based pathogens :The amp C enzymes. *Diag. Microbial .Infect. Dis.*, 31(3):461-466.
- ❖ **Joseph, B.; Otta, SK.; Karunasagar, I. and Karunasagar, I.** (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int. J. Food Microbiol.* 64:367-372.
- ❖ **Kadry, A. A.** (2003). Lack of Efflux Mechanism in a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa* Highly Resistant to Beta-Lactams and Imipenem. *Folia Microbiologica* .48(4): 529-533.
- ❖ **Kandi, V.** (2015). Bacterial capsule, colony morphology, functions, and its relation to virulence and diagnosis. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 8(4), 151-153.
- ❖ **Kanemitsu, K. ; Endo, S. ; Oda, K. ; Saito, K. ; Kunishima, H. ; Hatta, M. ; Inden, K. and Kaku, M.** (2007). An increased incidence of

- Enterobacter cloacae* in a cardio vascular ward. **J. Hosp. Infect.**, 66: 130-134.
- ❖ **Kasper, D.L.**; Broun wold, F.; Fauci, A .S.; Hauser, S.L. ; Longo,D. L. and Jameson, J.L. (2004). *harr Sons principle of Fnternal medicine* 16th ed p:883-884 mcgraw Hill new yourk .
 - ❖ **Kayser, F.H.** ; Bienz, K.A. ; Eckert, J. and Zinkernagel, R.M. (2005) . *Medical Microbiology* . 9th. ed. Thieme Stuttgart . New York .
 - ❖ **Kehrenberg, C.**; Friederichs, A. and Schwarz, S. (2008). Novel variant of the *qnrB* genes, *qnrB12*, in *citrobacter werkmanii*, ***Antimicrob Agents chemother***.52:1206-1207.
 - ❖ **Khan, H.** (2013). Production, characterization and utilization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* B9510. PhD dissertation. Massey University, New Zealand.
 - ❖ **Kinde, I.**; Wu, J.; Papadopoulos, N.; Kinzler, KW. and Vogelstein, B.(2011). Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 108: 9530–9535.
 - ❖ **Kocsis, B.** (2012). Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance in Enterobacteriaceae. Unpublished PhD thesis. University of Verona. Italy.
 - ❖ **Koneman, E.W**; Allen, S.D; Janda, W.M; Schreckenberger, P.C and Winn, W.C.J.(1992). ***Color Atlas and Textbook Of Diagnostic Microbiology***. (4th) ed. J.B.Lippincott Company. Philadelphia
 - ❖ **Korean, J.P.** (2013). Early-onset sepsis in a neonatal intensive care unit in Beni Suef, Egypt: bacterial isolates and antibiotic resistance pattern.***pub med***.56(8):332-7.
 - ❖ **Lackie, J. M.** (Ed.). (2007). *The dictionary of cell & molecular biology*. Academic Press.

- ❖ **Laragione**, R.M.; Cooley, W.A and Wood, M.J. (2000). The role off fimberiae and flagella in the adherence of avian strain of *Escherichia coli* 078: K 80 to tissue, culture cells and tracheal and gutt explants. **J. Med. Microbiol.**49: 327– 338.
- ❖ **Lee**, J. C. ; Koerten, H. ; Van den B. P. and Dijkshoorn, L. (2006). Adherence of *Acinetobacter* strains to human bronchial epithelial cells. *Res. Microbiol.* 157: 360-366.
- ❖ **Lee**, N. C. ; Chen, S. J. ; Tang, P. B. and Hwang, B. T. (2004). Neonatal bacteremia in aneonatal intensive care unit : analysis of causative organisms and antimicrobial susceptibility. **J. Chin. Med. Assoc.** 67 (1) : 15 – 20.
- ❖ **Li**,J. ; Attila ,C. ; Wang , L.; Wood,T. K . ; Valdes , J . J and Bentley ,W.E .(2007).Quorum sensing in *Escherichia coli* is signaled by AI-2/LsrR: effects on small RNA and biofilm architecture. **J .Bacterial.** 189:6011-20.
- ❖ **Lin**, Y. C. ; Chen, T. L. ; Ju, H. L. ; Chen, H. S. ; Wang, F. D. ; Yu, K. W. and Liu, C. Y. (2006). Clinical characteristics and risk factors for attributable mortality in *Enterobacter cloacae* bacteremia. **J. Microbiol. Immun. Infect.**, 39: 67-72.
- ❖ **Lodise**, T. ; Michael, J. Y., & Zhao, Q. (2017). Prevalence of Invasive Infections due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae among Adult Patients across US Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, AAC-00228.
- ❖ **MacFaddin**, J. F. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. 3 rd ed. The Williams and Wilkins . Baltimore , USA.
- ❖ **Mahon**, C. R. ; Lehman, D. C., & Manuselis, G. (2015). *Textbook of Diagnostic Microbiology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.

- ❖ **Majlesi, A. ; Kamali, R. ; Amir, K. ; Mozaffari, S. ; Rasoul, N. ; Mashoufb, Y. ; Rooint, A. ; Abazarie, F. & Youse M.(2017).** Detection of plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of Enterobacteriaceae strains in Hamadan, West of Iran *.Saudi Journal of Biological Sciences* .
- ❖ **Maniatis, T. ; Fritsch, E. F. and Sambook, J. (1982) .** Molecular cloning : A laboratory Manual . Cold Spring Harbor Laboratory . New York .
- ❖ **Martinez-Martinez, L. ; Pascual, A. & Jacoby, G.A.(1998).** Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 1998; 351: 797–99.
- ❖ **Martins, M. ; Viveiros, M. ; Couto, I. ; Costa, S. S. ; Pacheco, T. ; Fanning, S. ; Pagès, J. M. and Amaral, L. (2011) .** Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method . *In Vivo*. 25: 171–78.
- ❖ **Mathur, T. S. ; Singhal, S.; Khan, D.J.; Upadhyay, T. ;Fatma, and A. Rattan. (2006).** Detection of Biofilm Formation among The Clinical Isolates of *Staphylococci*: An Evaluation of Three Different Screening Methods. *Indian J. Med. Microbiol.* 24(1):25-29.
- ❖ **Matz, C.; McDougald, D.; Moreno, A.M.; Yung, P.Y.; Yildiz, F.H. and Kjelleberg, S.(2005).** Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*; 102:16819-16824.
- ❖ **Michael, W.; Scott, R. and Edward, J. (2012).** Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(36): 14508-14513.
- ❖ **Mollenkopf ,D.(2012).**Epidemiology of CTX-M cephalosporinase – bearing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. isolated from US livestock .M.Sc. Thesis , college of science ,Ohio state University.

- ❖ **Morris, R.M;** Rappe, M.S; Connon, S.A; Vergin, K.L; Siebold, W.A; Carlson, C.A and Giovannoni, S.J. (2002). SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature* 420: 806-810.
- ❖ **Moteeb, Sh. H .**(2008). Quantitative and Qualitative Assays OF Bacterial Biofilm Produced By *Pseudomonas aeruginosa* AND *Klebsiella* spp. *J. of al-anbar university for pure science* : 2(3).
- ❖ **Moumouni, A. ;** Diagbouga, S. ; Nadembèga, C. ; Metuor, A. ; Ouattara, K. ; Zohoncon, T. ;... & Simporé, J. (2017). Quinolone Resistance (*qnr*) genes in Fecal Carriage of Extended Spectrum beta-Lactamases producing Enterobacteria isolated from Children in Niger. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 5(1), 953-957.
- ❖ **Munshi, A.** (2012). DNA SEQUENCING – METHODS AND APPLICATIONS. Intech. Croatia.
- ❖ **Murielmasi, J. ,G. ;** Villard and E. Pradel. (2005). The eeFABC multidrug efflux pump operon is repressed by H-NS in *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology* .187(11), P:3894-3897.
- ❖ **Murugan, S.;** Devi, P. U. and John, P. U. (2011). Antimicrobial susceptibility batterns of biofilm producing *E. coli*. Of urinary tract infections. *Curr. Res. Bacterial*. 4(2): 73-80.
- ❖ **Nahler, G., &Nahler, G.** (2017). *Dictionary of pharmaceutical medicine*. Springer Vienna.
- ❖ **Najafi, H. M. B. and** Pezeshki, P. (2013). Bacterial mutation; Types, mechanisms and mutant detection methods: A Review. *European Scientific Journal*. 4: 628-638.
- ❖ **Nakamura, S.;** Higashiyama, Y.; Izumikawa , K.; Seki , M.; Kakeya, H.; Yamamoto, Y. ; Yanagihara , K and Miyazaki, Y.(2008). Release extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61:375-8.

- ❖ **Namasivayam, S.K.R.;** Christo, B.B.; Karthigai Arasu, S.M. Kumar,K.A.M. and Deepak, K. (2013). Anti Biofilm Effect of BiogenicSilver Nanoparticles Coated Medical Devices against Biofilm of Clinical Isolate of Staphylococcus Aureus. Global. *J . Medical research.*, 3: 1-7.
- ❖ **Nirbhavane, H. M. ;** and Bagde, U. S. (2017). Resistance by *Enterobacter spp.* towards several antimicrobial drugs and heavy metals: Areview. *African Journal of Biotechnology*, 16(16), 826-841.
- ❖ **Nordmann, P. ;** Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerging infectious diseases, 17(10).
- ❖ **Nordmann, P.** and Poirel, L.(2005). Emergence of plasmid – mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial chemotherapy*. 56. 463-469.
- ❖ **Odigie, I. E.;** Akinbo, B.D. ; Atere, A.D. ; Idemudia, N.L. and Asuquo A.(2015). Antimicrobial Susceptibility Of Some Members Of Enterobacteriaceae Isolated From Salad Vegetables In Calabar, *New York Science Journal*. 8(2): 1554-0200.
- ❖ **Opal, S.M.;** Cross, A.S.; Genski, P. and Lyhte, L.W. (1990). Aerobactin and hemolysin as virulence determinants in *Escherichia coli* Isoated from human blood, Urine and stool. *J. Infect, Dis.* 161: 794-796.
- ❖ **Paauw, A. ;**Caspers, M.P. and Schuren, F.H. *et al.* (2008). Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. PLoS One3.e3018.
- ❖ **Park, Y.J.,** Yu J.K., Lee S., Oh E.J. and Woo G.J. (2007). Prevalence and diversity of qnr alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia*

- marcescens* : a multicentre study from Korea. **J. Antimicrob. Chemother.**, 60:868-871 doi:10.1093.
- ❖ **Patel** , K. K. and Patel , S.(2016). *Enterobacter* spp.: - An emerging nosocomial infection . **International Journal of Applied Research** .; 2(11): 532-538 .
 - ❖ **Patel**, D.; Kosmidis, C.; Seo, S.M. and Kaatz, G.W.(2010). Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*.**Antimicrob. Agents. Chemother.** 54: 5070- 3.
 - ❖ **Paul**, M. ; Silbiger, I. ; Grozinsky, S. ; Soares-Weiser, K. ; & Leibovici, L. (2006). Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. **Cochrane Database Syst.Rev**, 1 .
 - ❖ **Paul**, S., & Diana, S. (2006). Dictionary of microbiology and molecular biology.
 - ❖ **Pearson**, J.P.; Van Delden, C.and Iglewski, B.H.(1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. **J. Bacteriol** .181(4):1203-10.
 - ❖ **Pérez**, A.; Poza, M.; Fernández, A.; del Carmen Fernández, M.; Mallo, F.S.; Merino, M.; Rumbo-. Feal, S.; Cabral, M.P. & Bou, G.(2012). Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 56(4), 2084-2090.
 - ❖ **Pincus**, D. H. (2011). Microbial Identification Using The Biomérieux Vitek® 2 System . bioMérieux, Inc. Hazelwood, MO, USA . 1: 1-32 .
 - ❖ **Pitout**, J.D.; Nordmann, P.; Laupland, K. B. and Poirel, L. (2005). Emergence of Enterobacteriaceae producing extended spectrumB-lactamases (ESBL) in the community. **Jour. of Antimicrob. Chemother.**10: 1093-1108.

- ❖ **Pizarro-Cerdá, J. ; &Cossart, P. (2006).** Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124(4), 715-727.
- ❖ **Poirel, L. ; Vu Nguyen, T. ; Weintraub, A. ; Leviandier, C. ; &Nordmann, P. (2006).** Plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrS in *Enterobacter cloacae*. *Clinical microbiology and infection*, 12(10), 1021-1023.
- ❖ **Poole, K. (2005).** Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 20-51.
- ❖ **Prescott ,L.M.; Harley ,J.P. ; and Klein,D.A.(2005).** Microbiology. 6th ed McGraw.Hill companies Inc. New York.
- ❖ **Probert, W. S. ; McQuaid, C. ; & Schrader, K. (2014).** Isolation and identification of an *Enterobacter cloacae* strain producing a novel subtype of Shiga toxin type 1. *Journal of clinical microbiology*, 52(7), 2346-2351.
- ❖ **Quinn ,P. J. ; Markey, B. K. ;Leonard , F. C. ; Fitzpatrick , E .S. ; Fanning, S .and Hatigan , P. J.(2011).** Veterinary Microbiology and infectious disease.P144-145. Second edition , Wiley- Blackwell Ltd. UK.
- ❖ **Quiroga, M.P.; Anders, A.; Petroni, A.J. and Zorreguieta, M.(2007).** Complex class 1 integron with diverse variable regions, qnrB10 associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentine Antimicrob Agents chemother. 51:4466-4470.
- ❖ **Rammelsberg, M. ; Muller, E. and Radler, E. (1990).** Caseicin 8: purification and characterization of new bacteriocin *for Lactobacillus casi* . *Acch.Microbiol.*,154:249-252.
- ❖ **Retty, A. F. ; Danil, F. S. and Aice, S. W. (2007) .** Bailey and Scott's of Diagnostic Microbiology. 12th ed. Press, Houston, Texas .
- ❖ **Rezazadeh, M.; Baghchesaraei, H. and Peymani, A.(2016) .**Plasmid-Mediated Quinolone-Resistance (*qnr*)Genes in Clinical Isolates of

- Escherichia coli* Collected from Several Hospitals of Qazvin and Zanjan Provinces, Iran. *Osong Public Health Res Perspect* 7(5), 307-312.
- ❖ **Riley** ,M .A .; Goldstone , C .M ; Wertz ,J .E and Gordon .D. (2003). A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. *J. Evol.Biol.*16:pp.690-697.
- ❖ **Riley**, M.A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev.Genet.* 32 :pp. 255–278.
- ❖ **Robicsek**, A. ; Jacoby, G. A. ; & Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet infectious diseases*, 6(10), 629-640.
- ❖ **Robicsek**, A.; Strahilevitz, J.; Jacoby, G.A.; Macielag, M.;Abbanat, D.; Park, C.H.; Bush, K. and Hooper, D.C.(2006). Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.*, 12:83-88.
- ❖ **Russo**, T. A.; Luke, N. R.; Beanan, J. M.; MacDonald, U. (2010). The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun.* 78(9): 3993-4000.
- ❖ **Salman** , H. D. (2006) . A bacteriological study of local strains of *Enterobacter cloacae* isolated from urine samples .M.Sc. Thesis, college of Medicine, University of Babylon, Iraq.
- ❖ **Salmanov**, A. (2009). Surgical site infections and antibiotic resistance of causal agents in the hospitals of Kiev, Ukraine. *EpiNorth*, 10(3), 120-7.
- ❖ **Samie**, A. ; NKgau, T. F. (2012). Biofilm production and antibiotic Susceptibility Profile of *Escherichia coli* isolates from HIV and AIDS patients in The Limpopo province .*Africian Journal Biotechnology*.11(34) :pp.8560-8570.

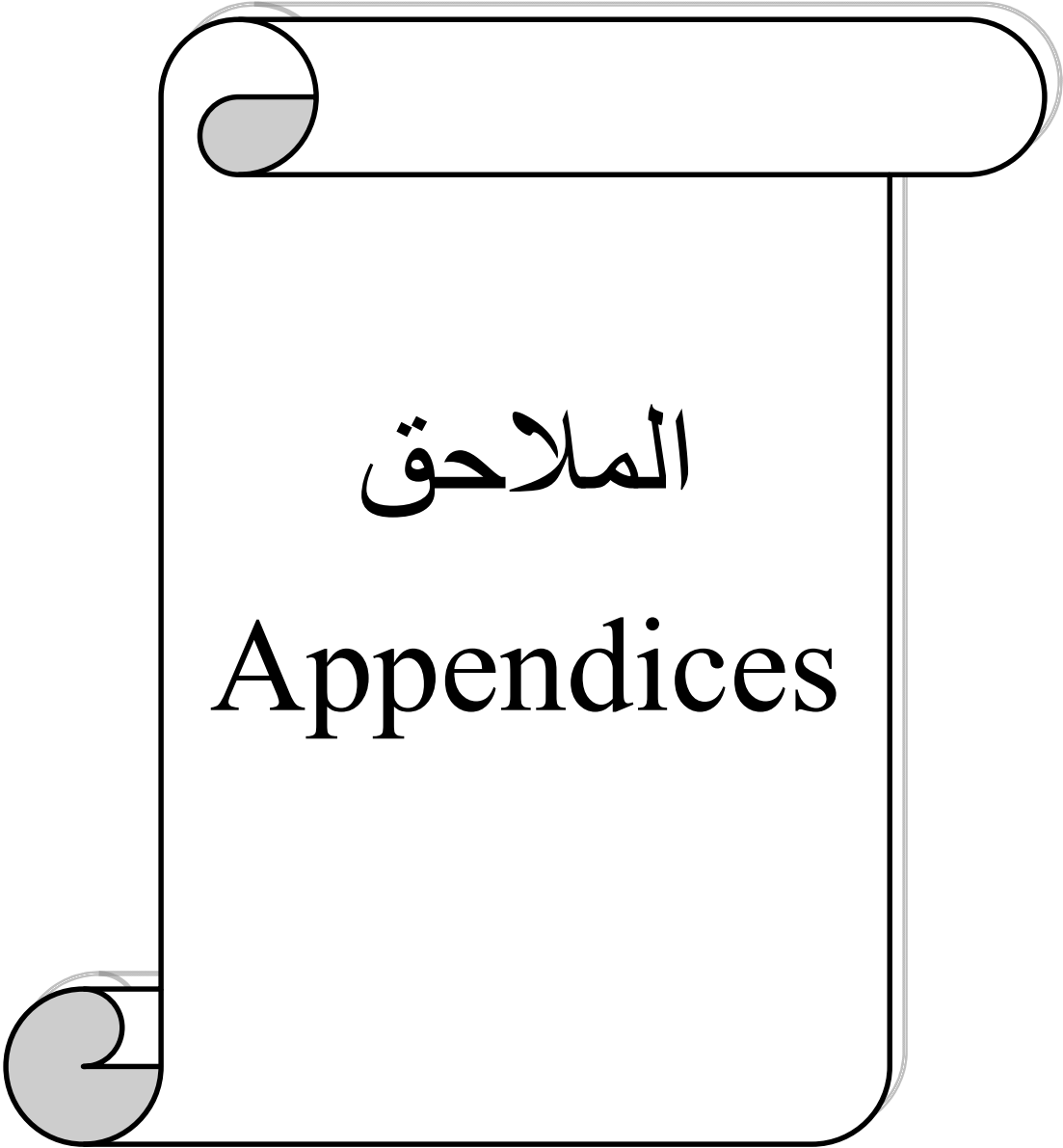
- ❖ Sanders, W. E., & Sanders, C. C. (1997). *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. ***Clinical Microbiology Reviews***, 10(2), 220-241.
- ❖ Sandle, T. and Sandle, T. (2013). *Bacterial Adhesion: An Introduction | IVT - GMP - Microbiology*. [online] Ivtnetwork.com. Available at: <http://www.ivtnetwork.com/article/bacterial-adhesion-introduction> [Accessed 31 Aug. 2017].
- ❖ Schofield, M. J.; Hsieh, P. (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annual Review of Microbiology*. 57: 579–608.
- ❖ Schroeder, M.; Brooks B. D. and . Brooks A. E.(2017). The Complex Relationship between Virulence and Antibiotic Resistance Genes (Basel). 2017 Jan; 8(1): 39.
- ❖ Senior, B.W. (1999). Investigation of the types and characteristics of the proteolytic enzyme formed by diverse strains of *Proteus* species. ***J. Med. Microbiol.*** 48: 623 -628 .
- ❖ Simi, S. ; Carbonell, G. V. ; Darini, A. L. ; Gatti, M. S. V. ; Falcon, R. ; Toyama, M. H. ; Marangoni, S. and Yano, T. (2003). A heat – stable hemolysin from clinical *Enterobacter cloacae* strain. ***J. Vonom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.***, 9 (2) : 527.
- ❖ Simi, S. ; Carbonell, G. V. ; Falcón, R. M. ; Gatti, M. S. ; Joazeiro, P. P. ; Darini, A. L. & Yano, T. (2003). A low molecular weight enterotoxic hemolysin from clinical *Enterobacter cloacae*. ***Canadian journal of microbiology***, 49(7), 479-482.
- ❖ Sinde, E. and Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluoroethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*. 17: 439–447.

- ❖ **Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973).** Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- ❖ **Sneath, P. H. A. ; Mair, N. S. ; Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (1986).** Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Vol.2 Williams and Wilkins. Baltimore.
- ❖ **Snyder, L. and Champness, W. (2003).** Molecular genetics of Bacteria, 2nd edition, Press American Society for Microbiology., Washington DC.
- ❖ **Soares, G. G. ; Costa, J. F. ; Melo, F. ; Mola, R. ; & Balbino, T. C. L. (2016).** Biofilm production and resistance profile of *Enterobacter* spp. strains isolated from pressure ulcers in Petrolina, Pernambuco, Brazil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicinaaboratorial*, 52(5), 293-298.
- ❖ **Soto, S. M. (2013).** Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3), 223-229.
- ❖ **Stenhouse, M. A. (2008).** *Enterobacter* agglomerans as a contaminant of blood. *Transfusion*. 32: 86.
- ❖ **Stocks, E.J. and Ridgway, G. (1987).** Handling clinical specimen for microbiology studies; 5th. ed. Churchill living stone Edinburgh .173-201.
- ❖ **Suresh, M. ; Nithya, N. ; Jayasree, P. R. and Manish, K.PR.(2016).**Detection and prevalence of efflux pump-mediated drug resistance in clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative bacteria from north Kerala , India . *Asian J. Pharma. Clin.Res.*9(3):324-7.
- ❖ **Tamura, K. ; Nei, M. and Kumar, S. (2004).** Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.

- ❖ **Tamura, K. ; Stecher, G. ; Peterson, D. ; Filipski, A. and Kumar S.** (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- ❖ **Tang, J.; Kang, M. ; Chen, H. ; Shi, X. ; Zhou, R. ;Chen, J. and Du, Y.**(2011). The Staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria. *Sci. China. Life.* 54(9):863-9.
- ❖ **Tenke, P.; Köves, B.; Károly ,N. ; Hultgren ,S.J. ; Mendling ,W.; Wullt, B.; Grabe, M.; Wagenlehner, F.M.; Cek, M.; Pickard, R.;Botto, H.; Naber, K.G. and Johansen ,T.E.**(2012). Update on biofilm infections in the urinary tract. *World J. Urol.*, 30:51–57.
- ❖ **Thiolas, A., Bollet, C., La Scola, B., Raoult, D., & Pagès, J. M.** (2005). Successive emergence of *Enterobacter aerogenes* strains resistant to imipenem and colistin in a patient. *Antimicrobial agents and chemotherapy* , 49(4), 1354-1358.
- ❖ **Tofteland, S.** (2015). Extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Norway. Aspects of detection and epidemiology. Retrieved from: <https://munin.uit.no/bitstream/handle/10037/7599/thesis.pdf?sequence=6>
- ❖ **Tomasz, A.; Leski,a.; Michael, G.; Stockelman,a.; Umaru Bangura,b.; Daniel Chae,c. Rashid Ansumana,b.d.; David, A.; Stenger,a.; Gary, J.; Vora,a.; Chris, R. and Tait, a.** (2016). Prevalence of Quinolone Resistance in Enterobacteriaceae from Sierra Leone and the Detection of qnrB Pseudogenes and Modified LexA Binding Sites . *Journal List Antimicrob Agents Chemother.*, 60(11): 6920–6923.
- ❖ **Tompkin, RB.**(2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J. Food Protect.*; 65:709-725.

- ❖ **Tortora**, G. J. ;Funke, D. R. and Case, C.L.(2010). Microbiology An introduction .10th ed . ;*pearson Benjamin Cummings U.S.A.* 355-402.
- ❖ **Unemo**,M.(2013).laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus.WHO:Geneva, Switzerland :244.
- ❖ **Varga**, Z. G.; Armada, A.; Cerca, P.; Amaral, L.; Mior Ahmad Subki, M. A.; Savka, M. A.; *et al.* (2012). Inhibition of quorum sensing and efflux pump system by trifluoromethyl ketone proton pump inhibitors. In Vivo 26, 277–285.
- ❖ **Vergis** ,E.N.; Shankar , N. ; Chow ,J.W.and Hayden , M. K. (2002) . Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase , hemolysin and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis* . Clin. Infect. Dis.35(5): 570-575.
- ❖ **Vetting**, M. W. ; Hegde, S. S. ; Fajardo, J. E. ;Fiser, A. ; Roderick, S. L. ; Takiff, H. E. & Blanchard, J. S. (2006). Pentapeptide repeat proteins . *Biochemistry*, 45(1), 1-10.
- ❖ **Vincent**, H. (2014). “Characterization and applications of two protease enzymes obtained by culture dependent and independent approaches from mangrove sediments. PhD dissertation. Cochin University. India.
- ❖ **Walder**, M. ; Haeggman, S. ; Tullus, K. and Burman, L. G. (1996). A hospital outbreak of high – level β – lactam resistant *Enterobacter* spp. association more with ampicillin and cephalosporin therapy than with nosocomial transmission. *Scand. J. Infect. Dis.* 28 (3): 293-296.
- ❖ **Wang**, H. P. ; Zhang, H. J. ; Liu, J. ; Dong, Q. ; Duan, S. ; Ge, J. Q. ; ... & Zhang, Z. (2017). Antimicrobial resistance of 3 types of gram-negative bacteria isolated from hospital surfaces and the hands of

- health care workers. *American Journal of Infection Control*. 1;45(11):e143-e147. doi: 10.1016.
- ❖ **Wang, M.**; Guo, Q.; Xu, X.; Hooper, D.C. and Wu, S.(2009). New plasmid-mediated quinolones resistance gene, qnrC1, found in a clinical isolates of proteus mirabilis. *Antimicrob. Agents chemother.* 53:1892-1897.
 - ❖ **Ye, Y.**; Li, J. B.; Ye, D. Q. & Jiang, Z. J. (2006). Enterobacter bacteremia: Clinical features, risk factors for multiresistance and mortality in a Chinese University Hospital. *Infection*, 34(5), 252-257.
 - ❖ **Ye, Y.W.** ; Gao,J .; RuiJiao.; HuiLi.; Qingping , W.; Zhang, J. and Zhong, X. (2015). The membrane proteins involved in virulence of *Cronobacter sakazakii* virulent G36 2 and attenuated L3101 isolates. *Frontiers Micro.*, 6: 1-7.
 - ❖ **Zain, M.** & Binti, S. N. (2009). Biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* on three different materials of infant feeding tube: a thesis presented in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Technology in Food Microbiology at Massey University, Palmerston North, New Zealand.
 - ❖ **Zhang, J.**and Meng, O.(2014).Preparation of KOH/Ca/C.Supported biodiesel Catalyst and application process-World *J.Engin.Tech.*,2:184-191.
 - ❖ **Zhu, B.** ; Wang, S. ; Li, O. ; Hussain, A. ; Hussain, A. ; Shen, J. & Ibrahim, M. (2017). High-quality genome sequence of human pathogen *Enterobacter asburiae* type strain . 1497-78 T. *Journal of global antimicrobial resistance*, 8, 104-105.
 - ❖ **Zimbro, M.J.**; Power, D.A.; Miller, S.A.; Wilson, G.E. and Johnson, J.A. (2009). Difco & BBL Manual Manual of Microbiological Culture Media sd2 Printed in the United States of America.



الملاحق

Appendices

ملحق (1) استمارة المعلومات الخاصة بالمرضى

ت	اسم المريض	الجنس	العمر	راقد/مراجع	نوع العينة	مكان العزل	نتيجة الزرع	تاريخ جمع العينة
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								

ملحق (2) الدليل الحجمي المستخدم في الدراسة DNA Ladder

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

100 bp DNA Ladder

DNA Molecular Weight Markers

Headquarters
49-3 Munpyeong-dong,
Daedeok-gu, Daejeon 306-220,
South Korea
Tel: +82-42-930-8777
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501 USA
Toll free: 1-877-264-4300
Fax: 1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Seoul Office
Sansu Building 2nd floor,
6 Yangjae-dong, Seocho-gu, Seoul
137-130, South Korea
Tel: +82-2-598-1094
Fax: +82-2-598-1096

Order
Korea Market only: 1588-9788
E-mail: order@bioneer.co.kr
Website: www.bioneer.com

[Cat. No.]
D-1030

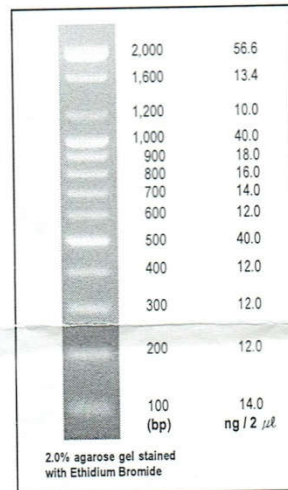
[Lot No.]
1103K

[Volume]
250 μ l

[Concentration]
135 ng/ μ l

• **Description** : 100 bp DNA Ladder is specially designed for determining the size of double strand DNA from 100 to 2,000 base pairs. The DNA Ladder consists of 13 double strand DNA fragments ranging in sizes from 100 to 1,000 bp in 100 bp increments, and additional fragments of 1,200, 1,600, 2,000 bp. The 500, 1,000 and 2,000 bp bands are two to three times brighter for easy identification

• **Application** : Size confirmation of DNA fragments.

• **Features**

- ready-to-use
- Recommended Loading :
1.5 - 2.0 μ l/5 mm lane width
- Typical Loading Number of Lanes :
125 - 166 (5 mm lane width)
- Range (bp) : 100 - 2,000
- Number of Bands: 13

• **Storage Buffer**

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 1 mM EDTA
- 2.5% Ficoll
- 0.005% Bromphenol Blue
- 0.005% Xylene Cyanol

• **Storage Condition**

This product is shipped on dry ice and should be stored at -20°C until use.

• **Quality control assay** : Agarose gel analysis shows that 13 bands are clearly distinguishable. The 500 bp, 1,000 bp and 2,000 bp band must be more intense than any other band.

• **Note**

- The DNA ladder can be applied directly onto an agarose gel.
- Do not heat before loading.
- Repeated freezing and thawing should be avoided.

• **Ordering Information**

[Related BIONEER DNA Molecular Weight Marker Products]

Note

For research use only. Not for Use in diagnostic or therapeutic procedures.

Bioneer shall not in any event be liable for incidental or special damage of any kind resulting from any use except on application(s).

Cat. No.	Products	Cat. No.	Products
D-1010	10bp DNA Ladder, 100 μ l	D-1060	Lambda DNA / EcoR I Markers, 100 μ g
D-1020	25/100 bp Mixed DNA Ladder, 250 μ l	D-1070	Lambda DNA / EcoR I+Hind III Markers, 100 μ g
D-1030	100 bp DNA Ladder, 250 μ l	D-2510	Lambda DNA, 250 μ g
D-1035	100 bp Plus DNA Ladder, 500 μ l	D-1030-1	AccuLadder 100bp 320 μ l x 2
D-1040	1 Kb DNA Ladder, 500 μ l	D-1040-1	AccuLadder 1Kb 500 μ l x 2
D-1050	Lambda DNA / Hind III Markers, 100 μ g		

ملحق (3) PCR PreMix المستخدم في الدراسة

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

AccuPower® PCR PreMix

(V1/2016-02-15)

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu, Daejeon, 34302
Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688 E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300 Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702, 700 Daewangpangyo-ro
Bundang-gu, Seongnam-si Gyeonggi-do, 13488
Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500 Fax: +82-31-628-0555

AccuPower® PCR PreMix is a new, powerful, and ready-to-use PCR reagent optimized for more accurate PCR amplifications

I. Description

The AccuPower® PCR PreMix contains DNA polymerase, dNTPs and reaction buffer in a premixed format that is freeze-dried into an individual packet. Patented chemical stabilizer maintains the activity of the premixture for over 2 years in the freezer.

II. Storage

store at -20°C

III. Application

- Routine PCR
- Primer extension
- TA cloning
- Gene sequencing

IV. Advantages

- Speed : Substantial reduction in PCR setup time.
- Stability : AccuPower® PCR PreMix is the powerful technology for convenient and easy to perform DNA amplification. It contains DNA polymerase, dNTPs, a tracking dye and reaction buffer in a premixed format, freeze-dried into a pellet. The patented chemical stabilizer of this product enables to maintain the activity of pre mixture for over 2 years in the freezer. It ensures superior amplification efficiency with experiment stability and uniform activity of polymerase in the process of PCR.
- Reproducibility and Yield : Batch manufacturing under strict ISO 9001 quality control conditions guarantees reproducibility. Minimal handling during reaction set up provides improved accuracy.
- Simplicity : Each product line contains an application specific enzyme in an easy to re-suspended, lyophilized premix of dNTPs, reaction buffer, a tracking dye, and a stabilizer. The premix is ready to use, thus offering virtually no reaction set up time.

V. Notice to Purchaser

This enzyme is specifically optimized for increasing base incorporation rate by inactivating 5'→3' exonuclease activity. Therefore, this is not recommended to use for Real Time PCR using Taqman® probe.

VI. Trademark

AccuPower is registered trademark of Bioneer Corporation in Korea.

VII. Contents

Reaction size	20 µl reaction	50 µl reaction
Component		
Top DNA polymerase	1 U	2.5 U
dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Each 250 µM	Each 250 µM
Reaction Buffer, with 1.5mM MgCl ₂	1X	1X
Stabilizer and tracking dye		

VIII. Experimental Protocol

The following protocol is suggested as a general guideline when using AccuPower® PCR PreMix in any PCR amplification.

- 1) Add template DNA and primers into AccuPower® PCR PreMix tubes.
- 2) Add distilled water into AccuPower® PCR PreMix tubes to a total volume of 20 µl or 50 µl. Do not calculate the dried pellet.

Ex) Reaction Mix

components	20 µl reaction volume	50 µl reaction volume
Template DNA	Variable(1~10ul)	variable(1~25ul)
Forward Primer (10pmole/ul)	0.5ul~2ul	1ul~5ul
Reverse Primer (10pmole/ul)	0.5ul~2ul	1ul~5ul
D.W.	Variable(6ul~18ul)	Variable(15ul~47ul)
Total volume	20ul	50ul

► Note 1 : Amount of template

Template DNA	Amount of template	
	20ul reaction	50ul reaction
Bacteriophage λ, Plasmid DNA	100fg~200ng	100fg~500ng
Total Genomic DNA	1ng~500ng	1ng~1ug

- 3) Dissolve the lyophilized blue pellet by flick with your finger or pipetting, and briefly spin down.
- 4) (Option) If necessary, overlay mineral oil. This step is unnecessary when using a thermal cycler with top heating.
- 5) Perform the reaction under the following conditions.

• In case of routine PCR

Step	Temperature	Time	Cycles
Pre-Denaturation	95°C	5min	1cycle
Denaturation	95°C	20sec	25~35cycles
Annealing	45~65°C	20sec	
Extension	72°C	30sec ~ 1min/kb	
Final Extension	72°C	Optional. Normally 3~5min	1cycle

- In case Primer's T_m value is more than 65°C or PCR Product size is more than 5kb.

Step	Temperature	Time	Cycles
Pre-Denaturation	95°C	5min	1cycle
Denaturation	95°C	20sec	30~35cycles
Anneal/Extension	68°C	1min/kb	
Final Extension	72°C	Optional. Normally 3~5min	1cycle

- 6) Maintain the reaction at 4°C ~8°C after cycling. The samples can be stored at -20°C until use.
- 7) Load samples on agarose gel without adding a loading-dye mixture, and perform electrophoresis.

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

AccuPower® PCR PreMix

(V1/2016-02-15)

Bioneer Corporation
S: 11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu, Daejeon, 34302
Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688 E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300 Fax: +1-510-865-0350
E-mail: order.usa@bioneer.us.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #8-702, 700 Daewangpangyo-ro,
Bundang-gu, Seongnam-si Gyeonggi-do, 13488
Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500 Fax: +82-31-628-0555

IX. Experimental Data

1) Sensitivity

• PCR Condition

▶ Bioneers' AccuPower® PCR PreMix

Temperature	Time	Cycles
95°C	5min	1 cycle
95°C	20sec	35 cycles
55°C	20sec	
72°C	30sec	
72°C	3min	1 cycle

▶ Others company : Reactions were performed following suppliers' recommendations

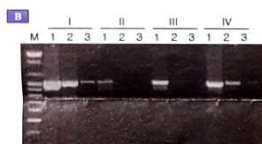


Figure 1. Comparison of sensitivity test for PCR PreMix and other companies' products using serial diluted human genomic DNA. Amplification of A the human Insulin receptor gene and B the DNA cross-link repair 1A gene.

M : 100bp DNA Ladder(Bioneer Cat. No : D-1030)

Lane 1 : Human DNA 10ng Lane 2 : Human DNA 1ng

Lane 3 : Human DNA 100pg Lane 4 : Human DNA 10p

I : AccuPower® PCR PreMix(Bioneer)

II : A company Taq DNA polymerase

III : B company Taq DNA polymerase

IV : C company PCR PreMix

2) Long kb.

• PCR Condition

▶ Bioneers' AccuPower® PCR PreMix

- In case of Lane 1, 2.(3step)

Temperature	Time	Cycles
95°C	5min	1 cycle
95°C	20sec	30 cycles
55°C	20sec	
72°C	30sec	
72°C	3min	1 cycle

- In case of Lane 3, 4.(2step)

Temperature	Time	Cycles
95°C	5min	1 cycle
95°C	20sec	30 cycles
68°C	4min	
72°C	3min	

▶ Others company : Reactions were performed following suppliers' recommendations

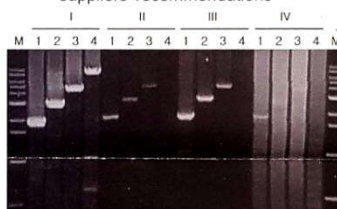


Figure 5. Comparison of long kb test for AccuPower® PCR PreMix and other companies' products using human genomic DNA.

Lane 1: 2kb fragment of human TP53 gene

Lane 2: 3kb fragment of human TP53 gene

Lane 3: 4.5kb fragment of human DCLRE1A gene

Lane 4: 8kb fragment of human HBB region

M: 1kb DNA ladder (Bioneer Cat. No : D-1040)

I : AccuPower® PCR PreMix(Bioneer)

II : A company Taq DNA polymerase

III : B company Taq DNA polymerase

IV : C company PCR PreMix

X. Ordering Information

Tube type	Reaction	Cat.No.	Description
0.2ml Tube	20 ul	K-2012	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
	20 ul	K-2016	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
	50 ul	K-2036	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes / Negative Dye
	50 ul	K-2037	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes / Negative Dye
0.5ml Tube	50 ul	K-2013	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
	50 ul	K-2017	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
96-well	10 ul	K-2011	0.5 ml thin-wall tubes with attached cap / 100 tubes
	20 ul	K-2260-1	thin-wall 96-well flat plate
		K-2260-2	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-3	thin-wall 96-well semi-skirted plate
		K-2260-4	thin-wall 96-well flat plate
	5 ul	K-2260-5	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-6	thin-wall 96-well semi-skirted plate
384-well	5 ul	K-2080-1	thin-wall 384-well full-skirted plate
	10 ul	K-2080-2	thin-wall 384-well full-skirted plate
	20 ul	K-2080-3	thin-wall 384-well full-skirted plate
Master Mix	-	K-2018	1 ml of 2 X Master mix solution
		K-2018-1	10 ml of 2 X Master mix solution

ملحق (4) الاختبارات الموجودة في نظام Api 20E والنتائج الموجبة والسالبة لكل اختبار.

ت	الاختبار المختصر	الاسم الكامل	النتيجة السالبة	النتيجة الموجبة
1	ONPG	Orthonitropheny l- β -D- galactopyranoside	عديم اللون	اصفر
2	ADH	Arginine dihydrolyase	اصفر	احمرا برتقالي
3	LDC	Lysine decarboxylase	اصفر	احمرا برتقالي
4	ODC	Ornithine decarboxylase	اصفر	احمرا برتقالي
5	CIT	Citrate utilization	اخضر شاحبا اصفر	ازرق مخضرا ازرق
6	H ₂ S	Hydrogen sulfide	عديم اللون ارمادي	اسود
7	URE	Urease production	اصفر	وردي
8	TDA	Tryptophan deaminase	اصفر	جوزي
9	IND	Indole production	عديم اللون	حلقة وردية
10	VP	Vogas proskaur	عديم اللون اوردي شاحب	وردي احمر
11	GEL	Gelatin liquefactions	لا يحدث انتشار للصبغة السوداء	يحدث انتشار للصبغة السوداء
تخمير السكريات				
12	GLU	Glucose	أزرق	أصفر

أصفر	أزرق	Mannitol	MAN	13
أصفر	أزرق	Inositol	INO	14
أصفر	أزرق	Sorbitol	SOR	15
أصفر	أزرق	Rhamnose	RHA	16
أصفر	أزرق	Sucrose	SAC	17
أصفر	أزرق	Melibiose	MEL	18
أصفر	أزرق	Amygdalin	AMY	19
أصفر	أزرق	Arabinose	ARA	20

ملحق (5) نتائج اختبار حساسية المضادات الحيوية لبكتريا *Enterobacter spp.*
والمعلومات الخاصة لكل عزلة .

رقم العزلة	NA 30	LEV 5	NOR 10	GAT 5	CIP 5	OFX 5	نوع العزلة	الجنس	العمر	مصدر العينة	حالة المريض
Ent.1	R	I	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	F	20	Blood	راقد
Ent.2	R	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	M	30	Blood	راقد
Ent.3	R	S	I	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	M	20	Blood	راقد
Ent.4	R	S	S	S	I	I	<i>E.cloacae</i>	M	65	Blood	راقد
Ent.5	R	S	S	S	I	S	<i>E.cloacae</i>	M	25	Blood	راقد
Ent.6	R	S	I	S	R	S	<i>E.cloacae</i>	M	25	Blood	راقد
Ent.7	R	R	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	M	43	Urine	مراجع
Ent.8	R	S	S	S	I	S	<i>E.cloacae</i>	F	49	Urine	مراجع
Ent.9	R	S	S	I	S	I	<i>E.cloacae</i>	F	58	Urine	مراجع
Ent.10	I	S	S	S	R	S	<i>E.cloacae</i>	F	44	Urine	مراجع
Ent.11	I	R	R	S	R	S	<i>E.cloacae</i>	F	67	Urine	مراجع
Ent.12	R	R	R	I	S	I	<i>E.cloacae</i>	F	56	Urine	مراجع
Ent.13	R	R	R	R	R	R	<i>E.cloacae</i>	F	52	Urine	مراجع
Ent.14	R	R	I	S	R	S	<i>E.cloacae</i>	M	38	wound	راقد
Ent.15	R	R	I	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	F	42	Urine	مراجع
Ent.16	I	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	F	65	Urine	مراجع
Ent.17	I	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	F	38	Urine	مراجع
Ent.18	I	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	F	50	Urine	مراجع
Ent.19	I	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	M	60	Urine	مراجع
Ent.20	I	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	M	35	wound	راقد
Ent.21	I	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	F	66	Urine	مراجع
Ent.22	S	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	M	30	Blood	مراجع
Ent.23	S	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	M	65	Blood	مراجع
Ent.24	S	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	M	63	Blood	راقد
Ent.25	I	S	S	S	S	S	<i>E.sakazakii</i>	M	44	Blood	راقد
Ent.26	S	S	S	S	S	S	<i>E.sakazakii</i>	F	37	Blood	راقد
Ent.27	S	S	S	S	S	S	<i>E.sakazakii</i>	M	48	Blood	راقد
Ent.28	S	S	S	S	S	S	<i>E.sakazakii</i>	F	27	Blood	راقد
Ent.29	S	S	S	S	S	S	<i>E.sakazakii</i>	M	45	Blood	راقد
Ent.30	I	S	I	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	F	40	Urine	مراجع
Ent.31	S	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	F	54	Urine	مراجع
Ent.32	S	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	M	45	Urine	مراجع
Ent.33	S	S	S	S	S	S	<i>E.cloacae</i>	F	25	wound	راقد

العزلة المقاومة R ، العزلة الحساسة S ، العزلة المتوسطة المقاومة I
 NA= Nalidixic acid , LEV= Levofloxacin , CIP= Ciprofloxacin ,
 NOR= Norfloxacin , OFX= Ofloxacin , GAT= Gatifloxacin

ملحق (6) خصائص البوادي المستعملة

M.W g/mole	TM C°	G≡C Content	Length Mer	Scale Umoles	Total nmole	Pmoles*	ODs	Primers	N+
5529.5	50.9	44.4	18	0.025	11.4	114.3	2.0	16S rRNA/F	1
6126.9	61.3	60.0	20	0.025	10.3	102.9	2.0	16S rRNA /R	2
6415.1	60.1	52.4	21	0.025	14.7	147.1	3.0	<i>qnrB</i> /F	3
6400.1	61.2	57.2	21	0.025	14.9	149.2	3.0	<i>qnrB</i> /R	4
6077.9	50.5	35.0	20	0.025	9.8	97.9	2.0	<i>qnrS</i> /F	5
6121.9	50.8	35.0	20	0.025	10.5	104.6	2.0	<i>qnrS</i> /R	6

ODs : Optical Density

*** : Volume for 100 pmoles \ ul .Picomoles .**

TM : Temperature Melting .

M . W : Molecular weight .

**ملحق (7) نتائج تطابق Blast سكونس للجين التشخيصي 16S rRNA لعزلات
بكتريا *E.cloacae* رقم 1 و 2 و 3 و 4 المعزولة من تجرثم الدم .**

>Seq1 *E. cloacae* 16S rRNA Iraq 2017

```
TAATCGCGCTACCATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAA
TGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCACAAACGTCGCAAGACCAAAG
AGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGG
CGACGATCCCTAGTTGGTCTGAGAGGATGACCTACCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCCC
CTGTGGGGAATATTGCACAGGGGGCACAAGCCTGGTGGAACTTTGTGCGGTGTATGAAGAAGGGATTGGGGTTGTAAA
GTACTTTCAACGAAGCCGAAGGCGACAGGGTTGTGCGGCCCCCCTCAATTTTCTGGGTTTAAACCTTGCTGCCTT
CTTCCCGCGGGGTCCT
```

Enterobacter cloacae gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain
: MHA

Sequence ID: [LC322252.1](#) Length: 499 Number of Matches: 1

Related Information Range 1: 15 to 499

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
896 bits(485)	0.0	485/485(100%)	0/485(0%)	Plus/Plus
Query 1	TAATCGCGCTACCATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAG	60		
Sbjct 15	TAATCGCGCTACCATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAG	74		
Query 61	TGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAA	120		
Sbjct 75	TGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAA	134		
Query 121	CGGTAGCTAATACCGCACAAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCC	180		
Sbjct 135	CGGTAGCTAATACCGCACAAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCC	194		
Query 181	ATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGA	240		
Sbjct 195	ATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGA	254		
Query 241	TCCCTAGTTGGTCTGAGAGGATGACCTACCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCC	300		
Sbjct 255	TCCCTAGTTGGTCTGAGAGGATGACCTACCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCC	314		
Query 301	TACGGGAGGCCCTGTGGGGAATATTGCACAGGGGGCACAAAGCCTGGTGGAACTTTGTCTG	360		
Sbjct 315	TACGGGAGGCCCTGTGGGGAATATTGCACAGGGGGCACAAAGCCTGGTGGAACTTTGTCTG	374		
Query 361	GGTGTATGAAGAAGGGATTGGGGTTGTAAAGTACTTTCAACGAAGCCGAAGGCGACAGGG	420		
Sbjct 375	GGTGTATGAAGAAGGGATTGGGGTTGTAAAGTACTTTCAACGAAGCCGAAGGCGACAGGG	434		
Query 421	TTTGTGCGGccccccTCAATTTTCTGGGTTTAAACCTTGCTGCCTTCTTCCCGCGGG	480		
Sbjct 435	TTTGTGCGGCCCCCCTCAATTTTCTGGGTTTAAACCTTGCTGCCTTCTTCCCGCGGG	494		
Query 481	GTCCT 485			
Sbjct 495	GTCCT 499			

>Seq2 *E. cloacae* 16S rRNA Iraq 2017

CGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACCTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGC
GAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCAT
CCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCTAACCGCTGGCAACAAGGATAAGGGTT
GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCC

GAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAAC
CACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTG
ACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCA
GGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCG
GTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGT
TTCGAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCCGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCCTTTACGCCCAG
TAATTCGGATTAAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCCGTGTCTTCTGCGGGTA
ACGTCAATTGCTGAGGTTATTAACCTCAACACCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCAT
ACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCG
TGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCGTTACCCACCTA
CTAGCTAATCCAT

Enterobacter cloacae strain 704SK10, complete genome

Sequence ID : [CP022148.1](#) Length : 4876946 Number of Matches: 8

Related Information Range 1: 3293899 to 3295001

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2032 bits(1100)	0.0	1102/1103(99%)	0/1103(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGATTCGGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATG	60		
Sbjct 3293899	CGATTCGGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATG	3293958		
Query 61	AGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTA	120		
Sbjct 3293959	AGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTA	3294018		
Query 121	GCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCAATCCACCTTCCTCCAGTTTATCAC	180		
Sbjct 3294019	GCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCAATCCACCTTCCTCCAGTTTATCAC	3294078		
Query 181	TGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCTAACCCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTC	240		
Sbjct 3294079	TGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCTAACCCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTC	3294138		
Query 241	GTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGT	300		
Sbjct 3294139	GTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGT	3294198		
Query 301	CTCAGAGTTCGGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGG	360		
Sbjct 3294199	CTCAGAGTTCGGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGG	3294258		
Query 361	TAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG	420		
Sbjct 3294259	TAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG	3294318		
Query 421	TCAATTCATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTT	480		

Sbjct	3294319	TCAATTCATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTT	3294378
Query	481	AGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGA	540
Sbjct	3294379	AGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGA	3294438
Query	541	CTACCAGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTG	600
Sbjct	3294439	CTACCAGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTG	3294498
Query	601	TCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACA	660
Sbjct	3294499	TCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACA	3294558
Query	661	CCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCCAG	720
Sbjct	3294559	CCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCCAG	3294618
Query	721	GTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCCAG	780
Sbjct	3294619	GTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCCAG	3294678
Query	781	TAATTCGGATTAACGCTTGCAACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCC	840
Sbjct	3294679	TAATTCGGATTAACGCTTGCAACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCC	3294738
Query	841	GTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGCTGAGGTTATTAACCTCAACACCTTCCTCCCC	900
Sbjct	3294739	GTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGCTGAGGTTATTAACCTCAACACCTTCCTCCCC	3294798
Query	901	GCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGC	960
Sbjct	3294799	GCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGC	3294858
Query	961	TTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTC	1020
Sbjct	3294859	TTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTC	3294918
Query	1021	AGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCG	1080
Sbjct	3294919	AGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCG	3294978
Query	1081	TTACCCACCTACTAGCTAATCC	1103
Sbjct	3294979	TTACCCACCTACTAGCTAATCC	3295001

>Seq3 *E. cloacae* 16S rRNA Iraq 2017

CGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGC
GAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCAT
CCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGCCGGACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTT
GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCC
GAAGGCACCAAAACATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTGAGGTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAAC
CACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCAATTTGAGTTTTAACCTTGCGGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGCG
ACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCA
GGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACACTTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCG
GTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGT
TTCGAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCCGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCTGCGTGCCTTTACGCCCAG
TAATTCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGCGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTA
ACGTCAATCGACAGGGTTATTAACCCCTGTGCGCTTCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCAT
ACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCG
TGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCGTTACCCACCTA
CTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGCAAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGTCTTGCAGCGTTATGCGGT
ATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCAGACATTACTCACCCGTCCGCCACTCGTCA
GCGAAGCAGCAAGCTGCTTCCTGTTACCGTTCGACT

Enterobacter cloacae strain AR_0050, complete genome

Sequence ID: [CP021896.1](#) Length: 4700719 Number of Matches: 8

Related Information

Range 1: 361412 to 362695 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2355 bits(1275)	0.0	1281/1284(99%)	0/1284(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATG	60		
Sbjct 361412	CGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATG	361471		
Query 61	AGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTA	120		
Sbjct 361472	AGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTA	361531		
Query 121	GCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCAC	180		
Sbjct 361532	GCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCAC	361591		
Query 181	TGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGGACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTC	240		
Sbjct 361592	TGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGGACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTC	361651		
Query 241	GTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGT	300		
Sbjct 361652	GTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGT	361711		

Query	301	CTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAAAACATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGG	360
Sbjct	361712	CTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAAAACATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGG	361771
Query	361	TGAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG	420
Sbjct	361772	TAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG	361831
Query	421	TCAATTCATTTGAGTTTAACTTGC GGCCGTACTCCCGAGCGGTCGACTTAACGCGTT	480
Sbjct	361832	TCAATTCATTTGAGTTTAACTTGC GGCCGTACTCCCGAGCGGTCGACTTAACGCGTT	361891
Query	481	AGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGA	540
Sbjct	361892	AGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGA	361951
Query	541	CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACACTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTG	600
Sbjct	361952	CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACACTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTG	362011
Query	601	TCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACA	660
Sbjct	362012	TCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACA	362071
Query	661	CCTGGAATTCTACCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCAG	720
Sbjct	362072	CCTGGAATTCTACCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCAG	362131
Query	721	GTTGAGCCCGGGGATTCACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAG	780
Sbjct	362132	GTTGAGCCCGGGGATTCACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAG	362191
Query	781	TAATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCG	840
Sbjct	362192	TAATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCG	362251
Query	841	GTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCGACAGGGTTATTAACCCTGTCGCCTTCCTCCCC	900
Sbjct	362252	GTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCGACAGGGTTATTAACCCTGTCGCCTTCCTCCCC	362311
Query	901	GCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGC	960
Sbjct	362312	GCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGC	362371
Query	961	TTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTC	1020
Sbjct	362372	TTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTC	362431

```

Query 1021 AGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCG 1080
|||||
Sbjct 362432 AGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCG 362491

Query 1081 TTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGCAAGAGGCCCGAAGGTC 1140
|||||
Sbjct 362492 TTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCCGATGGCAAGAGGCCCGAAGGTC 362551

Query 1141 CCCCTCTTTGGTCTTGCGACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCC 1200
|||||
Sbjct 362552 CCCCTCTTTGGTCTTGCGACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCC 362611

Query 1201 TCCATCAGGCAGTTTCCCAGACATTACTCACCCTCCGCCACTCGTCAGCGAAGCAGCAA 1260
|||||
Sbjct 362612 TCCATCAGGCAGTTTCCCAGACATTACTCACCCTCCGCCACTCGTCAGCGAAGCAGCAA 362671

Query 1261 GCTGCTTCCTGTTACCGTTCGACT 1284
|||||
Sbjct 362672 GCTGCTTCCTGTTACCGTTCGACT 362695

```

>Seq4 *E. cloacae* 16S rRNA Iraq 2017

```

AGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCT
GATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCC
TCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGG
TCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA
CAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAG
GAAGGCGACAGGGTTAATAACCTGTGATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGT
GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGG
TGTAAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCATG
TGCAAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGC
CTTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATG
AATTGACGGGGGCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGAC
ATCCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT
GTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACCTCAA
AGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGAT
TGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGATAATCG

```

Enterobacter cloacae strain AR_0050, complete genome

Sequence ID: [CP021896.1](#) Length: 4700719 Number of Matches: 8

Related Information Range 1: 1737032 to 1738325

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2374 bits(1285)	0.0	1291/1294(99%)	0/1294(0%)	Plus/Plus

Query	2	AGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTA	61
Sbjct	1737032	AGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTA	1737091
Query	62	ATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCA	121
Sbjct	1737092	ATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCA	1737151
Query	122	TAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGAT	181
Sbjct	1737152	TAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGAT	1737211
Query	182	GGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG	241
Sbjct	1737212	GGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAG	1737271
Query	242	AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG	301
Sbjct	1737272	AGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG	1737331
Query	302	GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC	361
Sbjct	1737332	GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCC	1737391
Query	362	TTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGACAGGGTTAATAACCCTGTTCGAT	421
Sbjct	1737392	TTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGACAGGGTTAATAACCCTGTTCGAT	1737451
Query	422	TGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA	481
Sbjct	1737452	TGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA	1737511
Query	482	GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTC	541
Sbjct	1737512	GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTC	1737571
Query	542	GGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCGAACTGGCAGGCTAGAGTCT	601
Sbjct	1737572	GGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCGAACTGGCAGGCTAGAGTCT	1737631
Query	602	TGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC	661
Sbjct	1737632	TGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC	1737691
Query	662	CGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA GTGC AAAGCGTGGGGAGC	721
Sbjct	1737692	CGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCA GTGC AAAGCGTGGGGAGC	1737751

Query	722	AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGAGAGTTGTGC 	781
Sbjct	1737752	AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGAGAGTTGTGC	1737811
Query	782	C TTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGC 	841
Sbjct	1737812	C TTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGC	1737871
Query	842	AAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA 	901
Sbjct	1737872	AAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA	1737931
Query	902	TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCAGAGATGG 	961
Sbjct	1737932	TTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCAGAGATGG	1737991
Query	962	ATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTG 	1021
Sbjct	1737992	ATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTG	1738051
Query	1022	AAATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGTTAGG 	1081
Sbjct	1738052	AAATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGTTAGG	1738111
Query	1082	CCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT 	1141
Sbjct	1738112	CCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT	1738171
Query	1142	CATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGC 	1201
Sbjct	1738172	CATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGC	1738231
Query	1202	GACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGC GTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA 	1261
Sbjct	1738232	GACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGC GTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA	1738291
Query	1262	CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG 1295 	
Sbjct	1738292	CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG 1738325	

ملحق (8) موقع تسجيل العزلة رقم 1

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LC322252>

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Nucleotide Nucleotide Search Advanced Help

GenBank Send to: Change region shown Customize view

Enterobacter cloacae gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: MHA

GenBank: LC322252.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ☒

LOCUS LC322252 499 bp DNA linear ECT 20-SEP-2017
 DEFINITION Enterobacter cloacae gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: MHA.
 ACCESSION LC322252
 VERSION LC322252.1
 KEYWORDS .
 SOURCE Enterobacter cloacae
 ORGANISM Enterobacter cloacae
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter; Enterobacter cloacae complex.
 REFERENCE 1
 AUTHORS Al-Mogadami, H.M., Al-Taai, H.R. and Al-Dolaymi, A.A.
 TITLE New strain of Enterobacter cloacae
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 499)
 AUTHORS Al-Mogadami, H.M., Al-Taai, H.R. and Al-Dolaymi, A.A.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (15-SEP-2017) Contact: Hanaa M. Abd Al-Mogadami University of Diyala, Microbiology, Baquba, Diyala 00964, Iraq
 FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..499
 /organism="Enterobacter cloacae"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="MHA"
 /isolation_source="human bacteremia"
 /host="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:580"
 /country="Iraq:Diyala governorate, Baquba city"
 /collection_date="2017-05-14"
 /collected_by="Hanaa M. Abd Al-Mogadami"
 rRNA
 <1..499
 /product="16S ribosomal RNA"
 ORIGIN
 1 aaactaatc agtctaatc cgtacaccg cagtgcagc gtaacaggaa gcagcttgc
 61 gctttgtcga cgaagtcgg acgggtgagt aatgtctgg aaactgcctg atggagggg
 121 ataactactg gaacggtag ctaataccgc acacgtgcg aagaccag agggggacct
 181 tcgggcctct tgcctatcga ttgtccacga tgggattagc tagtaggtgg ggttaacggc
 241 cacttagcgc acgatcccta gttggtctga gaggatgacc taacacactg gaactgagac
 301 acggtccaga ctctacagg aggcctctgt ggggaatatt gcacaggggg cacaagcctg
 361 gtggaaactt gtccgggtga tgaagaaggg attgggggtg taagtgactt tcaacgaagc
 421 cgaaggcgac agggtttgtg cggcccccgc tcaatttttc tgggtttaaa ctttgtctgc
 481 ttcttcccg cgggggtct
 //

Analyze this sequence
 Run BLAST
 Pick Primers
 Highlight Sequence Features
 Find in this Sequence

Related information
 Taxonomy

Recent activity
 Turn Off Clear
 Enterobacter cloacae gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, Nucleotide
 Outer Membrane Protein Changes and Efflux Pump Expression Together May
 Characterization of ertapenem-resistant Enterobacter cloacae in a Taiwanese Published
 Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump Published
 Cloning, Nucleotide Sequencing, and Analysis of the AcrAB-TolC Efflux Pump
 See more...

SUMMARY

The study included 333 clinical samples of both genders and different age groups, distributed among 215 samples of patients who were not in the hospital and 118 samples of patients who were in Baqubah teaching Hospital and Al-Batool Teaching Hospital, from February to June 2017. The percentage of isolation of *Enterobacter* was 33 (16.01%) and 28 (84.84%) isolates were from *Enterobacter cloacae* and 5 (15.15%) isolates of *Enterobacter sakazakii*. The percentage of isolates from the wound was 3 (9.09%) and the urinary tract infections was 16(48.48%) and 14(42.42%) of the blood. The identification of isolates was done by API20E system and VITEK2 device as well as the cultural and microscopic studies and the traditional and molecular phenotypic and molecular tests using the traditional sequence polymerase polymerization of 16S rRNA and then the sequencing of this gene amplified with PCR technology and their compatibility with the NCBI database. For four samples and draw the tree of genetic convergence compared to the global isolates as they corresponded to 99-100% of the species *Enterobacter cloacae*. The sample sequence 1 was recorded and got the serial number LC322252. Accession Numbers for the isolates was recorded in the database at the NCBI World Genebank Center.

The sensitivity of isolates to quinolones was selected. Six types of quinolones were selected using the Kirby-Bauer method to determine the sensitivity of the isolates towards them. The results showed that the Gatifloxacin and Ofloxacin were the most effective types of quinolones against *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter sakazakii* isolates, The resistance was 3.03% While Nalidixic acid and Levofloxacin resistance are 39.39% and 15.15% respectively. Norfloxacin isolates with 9.09% and Ciprofloxacin was 12.12%. The results also showed that isolates showed multiple resistance to the different types of quinolones that used in the study. The minimum inhibitory concentration MIC of Ciprofloxacin, Nalidixic acid was determined by the sequential

clustering method of 15 quinolone-resistant isolates. The results for the Ciprofloxacin were between 2-1024 mg / mL. For Nalidixic acid, MIC values were between 16-1024 mg / mL.

The results of the investigation of the virulence factors of the *Enterobacter cloacae* Resistant to quinolones showed that all isolates had the ability to form the capsule and its ability to adhere to the surfaces of human epithelial cells by 100%, while 11 isolates out of 15 isolated bacteria had the ability to form the red membrane in Congo-red With 73.3% and 13 isolates with 86.6% produced by adhesion to tubes , All isolates were produced from the biomass and 100% by a Micro Titer Plate method, of the isolates was classified into high biofilm former 6 (40%), and moderate biofilm former 9 (60%) of the biosynthetic isolates of the *Enterobacter cloacae*. As for efflux pumps, eight isolates had possessed efflux pumps with high efficiency 53.33%. The results showed that bacteria were able to produce bacteriosin by 33.3% and by hemoglobin production of 6.6%. In the production of lipase and protease, the bacteria were not produced by lipase and Protease produced by 80%.

The bacterial DNA extraction was performed for *Enterobacter cloacae*. The PCR reaction was carried out for the quinolone isolates using the specialized gates targeting the specific sequence of the *qnrB* and *qnrS* genes. The results showed that 13 isolates out of 15 isolates possessed *qnrB* gene, 86.6% For *qnrS* gene, the results showed that 12 isolates out of 15 isolates under study had this gene and 80%.

**Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Diyala
College of Education for Pure Science
Department of Biology**



**Bacteriological and genetic study on
Enterobacter cloacae resistant to quinolones**

**A thesis
Submitted to the Council of College of Education for pure
Science as a Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of M.Sc.in Biology
(Microbiology)**

**By
Hanaa Mohammed Abd Al-Mogadami**

B.Sc. Biology, 2007

Supervised by

Professor Dr.

Professor Dr.

Abbas A.Farhan Al-Dolaymi

Hadi R.Rasheed Al-Taai

2018 A.M

1439 A.H