

إقرار المشرف على الرسالة

أشهد بأن إعداد هذه الرسالة جرى تحت إشرافي في جامعة بغداد/كلية العلوم كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم الحياة (الأحياء المجهرية).

التوقيع:

المشرفة: د.لينة عبد الكريم الأمير

المرتبة العلمية: مدرس

التاريخ: / / ٢٠٠٢

بناءً على التوصيات المتوافرة ارشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: محمد نافع علي العزاوي

المرتبة: أستاذ

التاريخ: / / ٢٠٠٢

رئيس لجنة الدراسات العليا

في قسم علوم الحياة

إقرار لجنة المناقشة

نشهد إننا أعضاء لجنة المناقشة على هذه الرسالة، ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها، ونعقد بأنها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في علوم الحياة (أحياء مجهرية).

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة بغداد/ كلية العلوم

التوقيع:

عضو اللجنة: د. لينة عبد الكريم الأمير

المرتبة العلمية: مدرس

التوقيع:

عضو اللجنة: د. شذى سلمان حسن

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

التوقيع:

عضو اللجنة: د. نزار أحمد ناجي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

التوقيع:

رئيس اللجنة: د. محمد عبد القادر إبراهيم

المرتبة العلمية: أستاذ

مصادقة عمادة كلية العلوم

التوقيع:

الاسم: د. منى حمودي الجبوري

المرتبة العلمية: أستاذ

دراسة تصنيفية وجزئية لبعض

عوامل الضراوة

الإهداء إلى
للبيكتريا الممرضة

ينبوع الحنان الدائم ورمز التضحية

Proteus mirabilis

إلى

روح أخي الطاهرة الشهيد معاذ

رسالة مقلّمة إلى كلية العلوم

أخوتي وأخواتي

جامعة بغداد

وهي بجزءها مهتمات بلبات نيل درجة الماجستير في

أهدي جهدي المتواضع هذا مجهرية

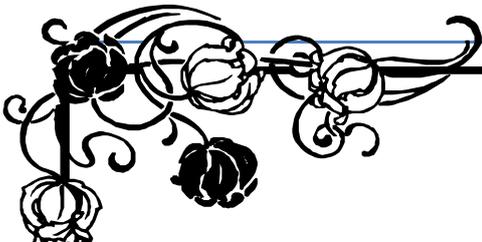
كرامة

من قبل

كرامة تحرير أحمد الطائي

تموز / ٢٠٠٢ م

ربيع الثاني / ١٤٢٣ هـ



الأستاذ



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



(وَمَا مِنْ دَابَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا طَائِرٍ
يَطِيرُ بِجَنَاحَيْهِ إِلَّا أُمَّمٌ أَمْثَلُكُمْ مَا
فَرَّطْنَا فِي الْكِتَابِ مِنْ شَيْءٍ ثُمَّ إِلَى
رَبِّهِمْ يُحْشَرُونَ } #

صدق الله العظيم

الأنعام ٣٨



شكر و تقدير

يطيب لي وأنا أنهى كتابة رسالتي هذه أن أحمده الله سبحانه وتعالى على ما وفقني إليه في إنجاز هذا البحث وأجد من الواجب علي أن أتقدم بوافر الشكر والتقدير لأستاذي الفاضلين:

الدكتور المرحوم **نظام كاظم الحيدري**، والدكتورة **لينة عبد الكريم الأمير** اللذين اقترحا خطة البحث وأشرفا على الرسالة. كما أدعو الله أن يتغمد روح أستاذي الفاضل الدكتور نظام الحيدري الذي وافته المنية في نهاية البحث، وستبقى لمسائه مطبوعة في هذه الرسالة.

كما أتقدم بجزيل الشكر والامتنان لأستاذتي الفاضلة الدكتورة لينة عبد الكريم الأمير التي لم تدخر وسعاً في إسداء توجيهاتها السديدة وأفكارها البناءة وجهودها المخلصة ومتابعتها المستمرة لنتائج البحث ومساعدتها القيمة أثناء البحث وكتابة الرسالة.

كما أتقدم بخالص الشكر والتقدير إلى الدكتور **رشيد محبوب المصلح** والدكتورة **شذى العزاوي** لجهودهما المبذولة خلال مدة البحث.

وأجد من واجب الوفاء تقديم الشكر والتقدير إلى طالبة الماجستير رواء خليل، كما أشكر زميلتي سمية وندى طالبتي الماجستير في قسم التقانة الإحيائية / جامعة صدام، كما أتقدم بجزيل الشكر إلى زينة الحيدري التي كان لها الفضل في طبع هذه الرسالة.

وأرى من الواجب أن أعترف بفضل الذين أسهموا في بحثي بنصيحة وإرشاد والذين كانوا خير عون أثناء هذه الدراسة كما أتقدم بجزيل الشكر إلى والدي وأخوتي أنس وسيف لصبرهم معي طيلة مدة البحث.

وفقنا الله جميعاً لخدمة الوطن

المصطلحات

Bacteriophage	عائي بكتيري
Biogroup	مجموعة حيوية
Biotype	نمط حيوي
Biotyping	تنميط حيوي
Catheterized	المقنطرين
Complement	المتمم
Consolidation phase	طور التماسك
Cross infection	الإصابات المشتركة
Efflux pump	مضخة باعثة
Endogenous infection	الإصابة الداخلية
Exogenous infection	الإصابة الخارجية
Fimbriae	الخملة
Gel electrophoresis	الرحلان الكهربائي
Gene	مورث
Host	المضيف
Mast cell	الخلايا الصارية
Microfuge	جهاز منبذ دقيق
Micropipette	ماصة دقيقة

Millipore Filter unit	وحدة الترشيح الدقيق
Nosocomial infection	إصابات المستشفى
Power supply	مجهز قدرة
Protein Profile	النسق البروتيني
Pyelonephritis	التهاب الكلية والحويضة
	إنزيم بلمرة الرنا
	RNA Polymerase
Serotyping	تنميط مصلي
Simple Matching Coefficient	معامل التشابه البسيط
Urinary tract infection	التهاب المجرى البولي
Vacuum Pump	مضخة تفريغ

المختصرات

AraN	4- amino 4- deoxy-L-ara binosyl
BSA	Bovine Serum Albumin
CLED	Cystine Lactose Electrolyte Deficient Medium
DNA	Deoxy ribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
ESBL	Extended spectrum beta-lactamase
G+C	Guanine + Cytosine
Kb	Kilo base-pair
KDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharide

MR/p	Mannose-resistant Proteus-like
NAF	Non- agglutinating fimbriae
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
O/F medium	Oxidative/Fermentative medium
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PMNs	Polymorphonuclear cells
PNPG	P-nitrophenyl glycerin
P/S	Proticine Production/ Proticine sensitivity
RA	Rheumatoid arthritis
RNA	Ribonucleic acid
SCA	Sickle cell anaemia
SDS	Sodium dodecyl sulfata
Ssm	Simple Matching Coefficient
TEMED	N,N,N,N tetra methyl ethylene diamine
Tris	Tris (hydroxy methyl) methane amine
UTI	Urinary tract infection
UV	Ultra violet
WCPP	Wholl cell protein profile

الخلاصة

جمعت ٥٠ عزلة لبكتريا *Proteus mirabilis* من مصادر سريرية مختلفة (الأذن، الإدرار، الجروح، الحروق، الخروج، وأخرى) لمرضى بمختلف الأعمار ومن كلا الجنسين من المراجعين أو الراقيدين في مستشفى اليرموك التعليمي ومستشفى الرشيد العسكري ومستشفى صدام للأطفال وللمدة من تشرين الأول/٢٠٠٠ والى كانون الثاني/٢٠٠١. وقد تبين أن ٤٢% من العزلات كان مصدرها التهابات الأذن و ٣٨% كان مصدرها الإدرار و ١٠% من الخروج والجروح و ٦% بينما كانت نسبة العزل من الحروق والمسحات المهبلية ٢% ولم يظهر الأنف أي نسبة عزل.

اختبرت العزلات باستخدام ٤١ اختباراً كيموحيوياً واستخرجت نسبة التشابه بالاعتماد على العلاقة الرياضية (معامل التشابه البسيط Ssm) وبالاستعانة بجهاز الحاسوب تم رسم الدندروكرام على أساس نسب التشابه فظهر أن العزلات المختلفة المستخدمة في هذه الدراسة يمكن أن تتوزع على ثلاثة أنماط حيوية Biotype.

وعند التحري عن عوامل الضراوة وجد أن جميع العزلات منتجة لليوريبيز وقادرة على الانتثال كما تبين أن ٩٢% منتجة للبروتيبز على وسط حليب الفرز بينما كانت نسبة الإنتاج لهذا الإنزيم على وسط الكازئين ٨٤% وأظهرت جميع العزلات قدرتها على تحليل الجلاتين ولم تظهر العزلات قدرتها على تحليل الايلاستين (Elastin) والكولاجين. أما الهيموليسين فكانت نسبة الإنتاج ٧٠%.

اختبرت العزلات الخمسين في حساسيتها تجاه ١٩ مضاداً حيوياً. أظهرت النتائج أن السبروفلوكساسين وحامض النالديكسيك والجنتميسين هي أفضل المضادات والأكثر فعالية حيث لم تظهر العزلات أية مقاومة تجاه مضاد السبروفلوكساسين. تم التحري عن إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز في ١٧ عزلة *P.mirabilis* جميعها متعددة المقاومة لمضادات الحياة فوجد أن ٤١,١% كانت منتجة لهذه الأنزيمات.

اختبرت قدرة العزلات في إنتاج المضاد البكتيري البروتيسين (Proticine) فظهر أن (٢٠%) من العزلات كانت منتجة له وعند اختبار حساسية العزلات تجاه العزلات المنتجة للبروتيسين ظهر أن (٢٢%) منها كانت حساسة للبروتيسين كما وجدت ٨ أنماط مختلفة الحساسية تجاه العزلات المنتجة (P/S). وعند استخدام مستخلصات البروتيسين التي تم استخلاصها باستخدام مادة محثة وهي

Mitomycin C وجد ان عدد العزلات الحساسة لمستخلصات البروتسين أصبحت (٢٦%) من مجموع ٥٠ عزلة *P.mirabilis* مختبرة.

تم انتخاب ٢٥ عزلة *P.mirabilis* اعتماداً على مقاومتها لمضادات الحياة وإنتاجها للبروتسين ثم اختبرت باختبار دنيس فظهر أن هنالك ١٢٠ نمطاً مختلفاً من مجموع ٣٠٠ حالة مختبرة.

تم استخلاص الدنا البلازميدي لتسع عزلات انتخبت على أساس مقاومتها لمضادات الحياة وإنتاجها للبروتسين وباستخدام طريقتين في الاستخلاص إحداهما طريقة الغليان والأخرى طريقة التحلل بالقاعدة. حيث أظهرت نتائج ترحيل الدنا البلازميدي بكلا الطريقتين أن المحتوى البلازميدي لأربعة عزلات كان حزماتان بلازميديتان بينما لم تظهر بقية العزلات محتوى بلازميدي.

كما تم التعرف على نسق الهجرة الكهربائية للبروتينات الذائبة لسبع عزلات تمثل المجموعات الثلاث للنمط الحيوي من بكتريا *P.mirabilis* والتي تم تقسيمها وفقاً لنتائج الاختبارات الكيموحيوية. حيث اظهر الدندوكرام الجديد الخاص بنسق هجرة البروتينات الذائبة ان العزلات المختلفة المستخدمة في هذه الدراسة يمكن ان تتوزع إلى أربع تحت مجموعات مختلفة بدلا من ثلاث.

المقدمة:

تعد بكتريا *Proteus mirabilis* من أهم الأنواع التابعة لجنس المتقلبات (*Proteus*) والذي يضم أربعة أنواع ثلاثة منها ذات أهمية سريرية *P.mirabilis* و *P.vulgaris* و *P.penneri* أما النوع الرابع *P. myxofaciens* فإنه يعزل من يرقات العث وليس له دور كمسبب ممرض للإنسان (MacFaddin., 2000).

تأتي بكتريا *P.mirabilis* بعد *E.coli* في إصابات المجرى البولي حيث تسبب التهاب المثانة (Cystitis) والتهاب الكليّة والحويضة (Pyelonephritis) وتجرثم الدم (Bacteremia) (Jones and Mobley., 1988) والفشل الكلوي وحصى الكلى والمثانة (Wray *etal.*, 1986) (Liaw *etal.*, 2000).

كما تسبب ذات الرئة وتسمم الدم وتعزل من إصابات الجروح والحروق والتهاب الأذن الوسطى. وقد ثبت دورها حديثاً بالتهاب المفاصل الرثوي والتهاب العظام (Osteomyelitis) (Collee *etal.*, 1996) (Wilson *etal.*, 1998) كما أن لها دوراً كبيراً في الإصابات المكتسبة من المستشفيات (Nosocomial Infections).

لقد حظي هذا النوع من البكتريا باهتمام الباحثين لما يملكه من عوامل ضراوة مهمة التي تجعله أكثر قدرة على إحداث الإصابة. حيث ينتج النوع *P.mirabilis* إنزيم اليوريز المحلل ليوريا الإدرار والمسؤول عن تكوين حصوى الكلى والمثانة (Jones and Mobley., Page | 1988) والهيمولايسين (Loomes *etal.*, 1990) والبروتين الذي يجزيء البروتينات المختلفة والكلوبيولينات المناعية IgA, IgG بالإضافة إلى الحركة السريعة التي تتميز بها أفراد جنس المتقلبات ما يسمى بظاهرة الانثيال (Swarming) والتي ثبت دورها في إصابات الكلى (Zunino *etal.*, 1999) ووجود السم الداخلي متعدد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharides. LPS) وقدرتها على الالتصاق بسبب وجود الخملة (Fimbriae) وقدرتها على اختراق الخلايا (invasiveness) بالإضافة إلى كل ذلك مقاومتها للعديد من مضادات الحياة المستخدمة في علاج المرضى في المستشفيات (Zunino *etal.*, 1994) (Senior., 1997-b).

وقد استغلّت العديد من الصفات لتنميط سلالات بكتريا *P.mirabilis* المعزولة من العينات السريرية لغرض التمييز بين الإصابات الداخلية (Endogenous) والخارجية (Exogenous) أي ما يسمى بالإصابة المشتركة (Cross Infection). كما يتم التوصل من خلالها إلى وجود مؤشرات وبائية ناتجة عن عزلات متشابهة. ومن هذه الصفات اعتماد الاختبارات الكيموحيوية في التنميط حيث صنفت سلالات *P.mirabilis* إلى أربعة أنماط حيوية (biotypes) (Tracy and Thomson, 1972).

واستغلّت صفة إنتاج البروتسين في التتميط (Proticine typing) حيث استطاع Adler وجماعته (1971) أن يستنبطوا عشر مجموعات رئيسية من مجموع ٤٣ عزلة كما وجد أن هناك نمطين لهما علاقة وثيقة بالسلاطات المنمطة باختبار دنيس وأنماط المقاومة لمضادات الحياة. كما تم التصنيف على أساس اختبار دنيس بالاعتماد على ظاهرة الانثيال (Swarming). وربط هذا النوع من التتميط بالتتميط المصلي (Serotyping) وعند تتميط سلالات جنس *Proteus* على أساس الصفات المستضدية وجد ان هنالك ٤٩ نمطاً للمستضد (O) و ١٩ نمطاً للمستضد H (Senior and Larsson, 1983). كذلك نمطت بكتريا *P.mirabilis* باستخدام صفة التحلل بالعائى أو اعتماد أنماط مقاومتها لمضادات الحياة. أما على المستوى الجزيئي فقد اتجهت الدراسات الحديثة إلى استخدام حجم وعدد البلازميدات أو استخدام الأنزيمات القاطعة لتقطيع الدنا البلازميدي أو الكروموسومي لغرض التتميط وغيرها (Murray et al., 1999).

يستخدم تحليل أنماط البروتين الذائب الكلي للخلية والذي يرمز له Whole Cell Protein Profile (WCPP) في التمييز بين السلالات لنفس النوع أو الأنواع المختلفة. وذلك من خلال ترحيل البروتين على هلام SDS-Polyacrylamide وقد استخدمت بشكل واسع في التصنيف فقد تم تمييز ٢١ نمطاً من مجموع ١٥٠ سلالة *Morganella morganii* بالاسـتـتاد إلـى نسـق بروتينـات الغشـاء الخـارجي (Senior and Voros, 1990). واستخدام التتميط الريبوي (Ribotyping) بين سلالات *Providencia alcalifaciens* المعزولة من حالات الإسهال حيث صنفت على ضوء ذلك إلى مجموعتين رئيسيتين (Guth et al., 1999).

الهدف من الدراسة

نظراً لقلّة الدراسات في العراق حول موضوع الدراسة التصنيفية لهذا النوع *P.mirabilis* جاءت هذه الدراسة لتحقيق:

- ١- التعرف على التغيرات الحاصلة في مقاومة بكتريا *P.mirabilis* المعزولة محلياً تجاه بعض مضادات الحياة العلاجية.
- ٢- التعرف على بعض عوامل الضراوة التي تنتجها بكتريا *P.mirabilis* وأثرها في الأمراض.

- ٣- الكشف عن مدى قابلية العزلات المحلية في إنتاج البروتسين وعلى أساسه يجري التتميط
.Proticine typing
- ٤- إجراء فحص دنيس Dienes test وتتميط العزلات اعتماداً عليه.
- ٥- التعرف على النمط البلازميدي لبعض المجموعات المنمطة من *P.mirabilis*.
- ٦- دراسة النسق البروتيني Protein Profile للبروتين الذائب الكلي للمجموعات المنمطة من العزلات.
- ٧- تطبيق البرامجيات الحاسوبية في إيجاد العلاقة التصنيفية بين العزلات ومحاولة ربط الصفات المظهرية بالصفات الجزيئية.

١-١ اصل وتصنيف بكتريا *P.mirabilis*:

تعتبر بكتريا *P.mirabilis* من أفراد العائلة المعوية Enterobacteriaceae والتي تقع ضمن قبيلة *Proteeae* التي تضم ثلاثة أجناس هي *Proteus* و *Providencia* و *Morganella* والتي بدورها تضم عشرة أنواع حسب مصنف بركي لعام ١٩٨٤، ١٩٩٤ (Krieg and Holt, 1984) (Holt et al., 1994).

وينفرد جنس المنقلبات (*Proteus*) بجملة صفات تميزه عن بقية أفراد العائلة المعوية ومنها إنتاج keto acid من الأحماض الأمينية وظاهرة الانثيال (Singer and Volcan, 1955)، (Krieg and Holt, 1984).

أطلقت تسمية *Proteus* على هذه البكتريا ولأول مرة من قبل Hauser عام ١٨٨٥ وتعني متغايرة الشكل بسبب كون حركتها سريعة وقدرتها على تغيير شكل مستعمراتها وصنفها إلى نوعين *P.mirabilis* و *P.vulgaris* كما هو موضح إليه في الجدول (١-١). وكان يعتقد أن النوع الأول *P.vulgaris* أكثر شيوعاً من النوع الثاني من ناحية عزلها من العينات السريرية أما *Liven* و *Haute* فقد اثبتا عكس ذلك إذ وجدا أن النوع *P.mirabilis* أكثر شيوعاً في العينات السريرية من النوع *P.vulgaris* (Penner ., 1981).

وصف Hauser مستعمرات بكتريا *P.mirabilis* و *P.vulgaris* على إنها مستعمرات دائرية تتغاير إلى مستعمرات غير منتظمة الشكل ذات زوائد تشبه الاميبا تنتشر على أسطح الأوساط الزرعية الصلبة (Breed et al., 1957).

قام Edward و Ewing (١٩٧٢) بدراسة جمع فيها النوعان *P.mirabilis* و *P.vulgaris* في نوع واحد أطلق عليه *P.hauseri*. ولكن ذكر في مصنف بركي للعامين ١٩٥٧ و ١٩٧٤ أن جنس المنقلبات يضم خمسة أنواع هي *P.mirabilis* و *P.vulgaris* و *P.morganii* و *P.rettgeri* و *P.inconstans* (Breed et al., 1957) (Buchanan and Gibbons., 1974) إلا انه تغيرت مواقع هذه الأنواع في بكتريا *P.morganii* والتي عرفت أصلاً *Morgan's bacterium* نسبة إلى مكتشفها Morgan عام ١٩٠٦ نقلت إلى

جنس *Morganella* استناداً إلى الدلائل الوراثية. حيث وجد ان نسبة محتوى الدنا من (G+C) ٥٠% على العكس من أنواع المتقلبات المثلثة الأخرى حيث تكون نسبة (G+C) ٣٩% والتي تشمل الأنواع *P.mirabilis* و *P.vulgaris* و *P.myxofaciens* كما وجد من خلال تهجين الدنا (DNA Hybridization) ان نسبة التشابه بين *M.morganii* وبقية أنواع المتقلبات و جنس *Providencia* لا يتجاوز ٢٠% بالإضافة إلى اختلافها في الصفات المظهرية.

جدول (١-١)

يوضح تحديد الأنواع التي تنتمي إلى جنس الـ *Proteus*

المصدر	الأنواع
Penner, 1981	<i>P.vulgaris</i>
	<i>P.mirabilis</i>
Breed <i>etal.</i> , 1957	<i>P.mirabilis</i>
	<i>P.vulgaris</i>
	<i>P.morganii</i>
Buchanan and Gibbons., 1974	<i>P.rettgeri</i>
	<i>P.inconstans</i>
	<i>P.mirabilis</i>
Krieg and Holt., 1984	<i>P.vulgaris</i>
	<i>P.myxofaciens</i>
	<i>P.mirabilis</i>
Holt <i>etal.</i> , 1994	<i>P.vulgaris</i>
	<i>P.penneri</i>
Mac Faddin., 2000	<i>P.penneri</i>
	<i>P.myxofaciens</i>

أما النوع *P.rettgeri* والتي سميت بهذا الاسم نسبة إلى Rettger مكتشفها عام 1904 (Farmer et al.,1985) فقد نقل إلى جنس *Providencia* ليصبح النوع *P.rettgeri* اعتمد هذا التصنيف على تهجين الدنا وعلى الاختلافات التركيبية في بروتينات معينة بالإضافة إلى الصفات المظهرية (Penner,1981). كما أصبح النوع *P.inconstans* ضمن جنس *Providencia* وقسم إلى نوعين *P.alcalifacien* و *P.stuartii* ولأسباب نفسها المذكورة آنفاً (Farmer et al., 1985).

أما مصنف بركي لعام ١٩٨٤ فقد ذكر ثلاثة أنواع تابعة لجنس المتقلبات وهي *P.mirabilis*، *P.vulgaris* و *P.myxofaciens*.

كان يعتقد أن النوع *P.myxofaciens* والذي وصف لأول مرة عام ١٩٦٦ من قبل Cozanza و Podgwaite مماثل لبكتريا *Erwinia herbical* ولكن تم التفريق بينهما في دراسات أخرى استناداً إلى اختبار ونسبة التهجين في الدنا إذ وجد أن نسبة التشابه لا تتجاوز ١٠% فقط لذا عد *E. herbical* جنساً آخر يختلف عن الـ *Proteus* (Krieg and Holt., 1984).

وذكر مصنف بركي لعام ١٩٩٤ وجود أربعة أنواع للجنس *Proteus* وهي *P.mirabilis* و *P.vulgaris* و *P.penneri* و *P.myxofaciens* والأنواع الثلاثة الأولى ذات أهمية سريرية بسبب إصابتها للإنسان أما النوع الرابع فعزل من فم يرققات العث (Gypsy moths larvae) (Holt et al., 1994) (Macfaddin., 2000).

في عام ١٩٨٢ شخص Hickman ثلاث مجموعات biogroups ضمن النوع *P.vulgaris* على أساس إنتاج الاندول والتحليل المائي للاسكيولين وتخمر السالسين إلا أنه وجد أن المجموعة ١ تعطي سلالاتها كشافاً سالباً للانندول لذا اعتبر أفراد هذه المجموعة نوعاً منفصلاً سمي *P.penneri* بينما بقيت المجموعتان ٢،٣ ضمن نوع *P.vulgaris* وحديثاً قسم النوع *P.vulgaris* إلى ست مجموعات حيوية (biogroups) استناداً إلى تهجين DNA مع DNA (Janda et al., 2001).

٢-١ مصادر عزل بكتريا *P.mirabilis*:

عزلت بكتريا *P.mirabilis* لأول مرة من الغائط ومياه المجاري ومصادر مياه أخرى ومن المواد العضوية المتحللة وذلك من قبل Hauser سنة ١٨٨٥ (Penner., 1981) كما عزلت من البرمائيات (McCoy and Selider., 1973) ومن الكلاب والقطط ومختلف الحيوانات الأخرى (Cruickshant *etal.*, 1975) ويعد النوع *P.mirabilis* من أهم الأنواع التابعة لقبيلة *Proteeae* بسبب شيوعها في إصابات الإنسان.

تعيش بكتريا المتقلبات *P.mirabilis* كنبية طبيعية في الأمعاء وتعزل من إصابات البشر مثل الإدرار والجروح والحروق والدم لقدرتها على غزوا الأنسجة عند توافر الظروف الملائمة لذا تعتبر من الممرضات منتهزة الفرص (Cruickshank *etal.*, 1975) (Murray *etal.*, 1996).

١-٣ الصفات العامة المميزة لجنس المتقلبات *Proteus*:

تمت دراسة صفات المتقلبات الفسلجية التي تميزها عن بقية أفراد العائلة المعوية مثل ظاهرة الانتيال swarming التي ثبت دورها في إصابات الكلى إذ ان لها القدرة على الحركة السريعة ومن النادر ملاحظة المستعمرات على وسط الاغار المغذي أو اغار الدم. إذ بدلاً من ذلك يلاحظ انتشار واحتشاد النموشكل أمواج متوالية مع حلقات نمو كثيف حول موقع التلقيح حيث يغطي النمو أسطح الوسط الصلب (Williams., 1973) (Liaw *etal.*, 2000).

وتمتاز بكتريا المتقلبات بأنها غير مخمرة لسكر اللاكتوز واعتبر Hauser عام ١٨٩٢ *P.mirabilis* تحور عن *P.vulgaris* ولكن تم فصلهما فيما بعد اعتماداً على تخمر سكر المالتوز من قبل *P.vulgaris* والتأخر في تخمير السكروز من قبل *P.mirabilis* (Buchanan and Gibbons., 1974). كما درست قدرتها على أكسدة الأحماض الأمينية والكشف عنها بكواشف لونية خاصة بكل حامض أميني. ويعتبر التريبتوفان أفضلها في التشخيص (Singer and Volcani., 1955) حيث تنتج أفراد جنس المتقلبات صبغة بنية محمرة على وسط الاغار المغذي المضاف له 2% Tryptophan وهي صفة تشخيصية تميزها عن باقي أفراد العائلة المعوية (Penner., 1981) ويعتمد ذلك على فعاليتها الأنزيمية. إذ أنها تستطيع أكسدة الفل النين وتحوله إلى Phenyl-Pyruvic acid.

تمتاز جميع أنواع المتقلبات بقدرتها على النمو بوجود سيانيد البوتاسيوم (Cruickshank *etal.*, 1975) كما أن إنتاجها لأنزيم اليوريز وبمستوى عالٍ صفة تميز أنواع المتقلبات وهي من عوامل الضراوة المهمة المسؤولة عن تكون حصى الكلى والمثانة (Mobley and Hausinger., 1989) (Zunino *etal.*, 1999) وجميع أنواعها منتجة للجلاتينيز وأنزيم اللايبيز وغير مخمرة لسكر المانوز (Farmer *etal.*, 1985).

١-٤ الصفات التشخيصية المميزة لبكتريا *P.mirabilis*:

١-٤-١ صفات الخلايا:

هي عصيات سالبة لملون كرام متحركة بواسطة الأسواط المحيطية. وهي بكتريا لاهوائية مخيرة (Atlas., 1995) (Zhao *etal.*, 1999) طولها حوالي ١-٣ مايكروميتر وعرضها ٠,٤-٠,٨ مايكروميترًا وتكون الخلايا في المرق المغذي قصيرة وعند حركتها في وسط التنمية الصلب تتميز بالانثيال وتتمايز إلى خلايا طويلة كثيرة الاسواط تدعى الخلايا المنثالة (Swarmer cells) (Krieg and Holt., 1984).

تمتاز المتقلبات بأنها متعددة الأشكال (Pleomorphic) لا تكون سبورات ولا كبسولة لكنها تمتلك متعدد سكريد المحفظة كما تتميز برائحة قوية واضحة (Cruickshank *etal.*, 1975).

١-٤-٢ الصفات الكيموحيوية:

تمتاز بكتريا *P.mirabilis* بعدد من الصفات الكيموحيوية المميزة لها عن بقية أنواع المتقلبات. ويظهر النوعان *P.mirabilis* و *P.vulgaris* بدرجة عالية من التشابه في الصفات المظهرية والكيموحيوية ولكن يمكن التمييز بينهما بالاعتماد على ثلاثة فحوصات وهي فحص الاندول الموجب للنوع *P.vulgaris* وفحص الاورنثين السالب وتخمير المالتوز (Senior., 1997-a). أما النوع *P.mirabilis* فان نسبة ٢% فقط تعطي فحصاً موجباً للاندول وجميعها مؤكسدة للاورنثين بينما لا تستطيع تخمير المالتوز. وتوجد صفات كيموحيوية أخرى مثل إنتاج

غاز كبريتيد الهيدروجين إذ أن ٩٨% من سلالات *P.mirabilis* منتجة لكبريتيد الهيدروجين ولا تستطيع أكسدة اللايسين والارجنين كما ان ٦٥% من سلالاتها تستطيع استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون. وهي مخمرة لسكر الكلوز والترهالوز والاكزايروز ولكنها مختلفة في تخميرها للسكروز. وهي غير مخمرة لسكر الرافينوز والرامينوز والارابينوز (Farmer *etal.*, 1985) (Murray *etal.*,) (1999).

١-٥ الدور الامراضي لبكتريا *P.mirabilis*:

إن بكتريا *P.mirabilis* من اكثر الممرضات الانتهازية شيوعاً خاصة في إصابات المجاري البولية والإصابات المرتبطة بإصابات المستشفى (Swierzko *etal.*, 2000). وذلك بسبب قدرتها على البقاء والانتشار في بيئة المضيف (Host). وامتلاكها لعدد من عوامل الضراوة المهمة التي تعمل مجتمعاً على تسهيل إحداث الإصابات في جسم المضيف، ومقاومتها لمضادات الحياة الشائعة الاستخدام في العلاج (Swihart and Welch., 1990-b)، (Zunino *etal.*, 1999) (Coker *etal.*, 2000). حيث تعد بكتريا *P.mirabilis* من أهم الأنواع التابعة لجنس المتقلبات من الناحية السريرية (Jawetz *etal.*, 1998). وهي مسؤولة عن عدد كبير من الحالات المرضية منها.

١-٥-١ التهابات المجاري البولية **Urinary Tract Infection**:

تشكل بكتريا *P.mirabilis* ٩٧% من مجموع إصابات المجاري البولية التي تسببها أنواع المتقلبات (Swihart and Welch., 1990-a) وتأتي بالمرتبة الثانية بعد *E.coli* في أحداث التهابات المجاري البولية (Uphoff and Welch., 1990) (Senior., 1997-b).

تصيب بكتريا *P.mirabilis* بشكل شائع الأطفال والنساء وكبار السن وخاصة المرضى الراقدين في المستشفيات المقطرين (Catheterized) وغير المقطرين أو الذين يعانون من الانسداد والتشوهات الوظيفية أو التشريحية (Functional or anatomical abnormalitis) (Zunino) (etal., 1994) (Zunino *etal.*, 1999) (Zhao *etal.*,1999). تفضل بكتريا *P.mirabilis* إصابة

الجزء العلوي من المجرى البولي والذي يؤدي إلى حدوث مضاعفات خطيرة مثل تحطم أنسجة الكلى والتهاب الكلى الحادة والحويضة الحادة، (pyelonephritis) والتهاب المثانة (cystitis) أو الإصابات المزمنة أو الراجعة كنتيجة للتحصي البولي (Urolithiasis) وقد يؤدي إلى الفشل الكلوي ثم الموت (Coker *etal.*, 2000) (Mobley and Belas., 1995) (Zunino *etal.*, 1995) (Liaw *etal.*, 2000).

١-٥-٢ التجزئ البولي عديم الأعراض **Asymptomatic Bacteriuria**

تسبب بكتريا *P.mirabilis* التجزئ البولي عديم الأعراض وتمتاز بأنها من أكثر الأنواع مقاومة مع مضادات الحياة مقارنة مع بقية الأنواع المعزولة مثل *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* و *E.coli* (Akerle *etal.*, 2001).

ويعرف الالتهاب البولي البكتيري عديم الأعراض على انه الحالة السريرية التي تتصف بعدم وجود التفاعل الالتهابي الحاد في القناة البولية رغم وجود نمو معنوي (Significant growth) للبكتيريا عند زرع الإدراج ولعدة فحوصات متعاقبة (Hansson *etal.*, 1990) ويعتقد أن هذا النوع من الالتهاب يحدث نتيجة إصابة القناة البولية ببكتريا حدثت بها طفرة أدت إلى فقدانها لمتعدد السكريد الشحمي الموجود في جدرانها وهذا نوع من التحايل على الاستجابة المناعية المحلية للمضيف (Hanson *etal.*, 1981).

تكن قدرة بكتريا *P.mirabilis* في أحداث الإصابة لكونها سريعة الحركة داخل الجسم وتمتلك قدرة على غزو الخلايا خاصة الخلايا الطلائية المبطنة للمجرى البولي بسبب وجود ظاهرة الانثيال Swarming وهذا يساعدها على إمكانية أمراضيتها في أكثر من موقع وانتقالها من المثانة إلى الكلية وإحداث التهاب الكلية والحويضة (Liaw *etal.*, 2000) كما أن إنتاجها لإنزيم اليوريز الذي يحلل يوريا الإدراج ويرفع القاعدية يكون مسؤولاً عن تكون حصى الكلى (Zhao *etal.*, 1998) وتعتقد الإصابة بطرق متعددة فتصبح الجرثومة محجوزة داخل الحصى مما يصعب المعالجة بمضادات الحياة (Xin-Li *etal.*, 2002).

١-٥-٣ التهاب البروستات المزمن **Chronic bacterial Prostatitis**

تسبب بكتريا *P.mirabilis* التهاب البروستات المزمن Prostatitis (Jones and Mobley., 1988) وقد وجد حديثاً أن أفضل علاج لبكتريا *P.mirabilis* وبكتريا *E.coli* المسببة لالتهاب البروستات المزمن كان مضاداً Ciprofloxacin-HCl (Internet., 1996). ويحدث التهاب البروستات نتيجة لمضاعفات الإصابة بالتهابات المجاري البولية للمرضى المقتطرين وغير المقتطرين (Jones and Mobley., 1988).

١-٥-٤ التهاب المفاصل الرثوي **Rheumatoide (RA) Arthritis**

ثبت حديثاً دور بكتريا *P.mirabilis* كمسبب لمرض التهاب المفاصل الرثوي. فقد تم عزلها من إدرار مرضى مصابين بمرض RA (Albert., 2000) حيث وجد في إحدى الدراسات أن سلالات *P.mirabilis* المعزولة من مرضى التهاب المفاصل الرثوي جميعها منتجة للبروتسين Proticine ومعظمها من النمط ٣ وهودليل على إصابة الجزء العلوي من المجرى البولي ببكتريا *P.mirabilis* لمرضى RA (Wilson et al., 1998). وقد أشار Senior (1979) في دراسة سابقة إلى أن السلالات المنتجة للبروتسين هي أكثر تكراراً من غيرها في إصابة الجزء العلوي من المجرى البولي.

١-٥-٥ التهاب الأذن الوسطى **Otitis media**

تصيب أفراد العائلة المعوية مثل *E.coli* وأنواع المتقلبات الأذن بنسبة قليلة إلا أن فرص الإصابة بها تزداد في الأذن المصابة بمرض فقد وجد أن بكتريا المتقلبات تأتي بالمرتبة الثالثة بعد *Ps.aeruginosa* و *Staph. aureus* في التهاب الأذن الوسطى المزمن وهذه النتيجة تتفق مع كل الدراسات في العالم. وتسبب بكتريا المتقلبات رائحة كريهة تنته في الأذن (Al-segar., 2000) وتعتبر بكتريا *P.mirabilis* المسبب الرئيسي عند عزلها

بمفردها إلا أنها تعتبر إصابة ثانوية عند عزلها مع *Streptococcus pyogenes* (Cruickshank *etal.* 1975).

إن التهاب الأذن الوسطى من الأمراض الشائعة في مرحلة الطفولة كما يصيب أطفال الرضاعة الاصطناعية وفاقدى المناعة (Immuno Deficient) ويصيب الأشخاص في المناطق المزدحمة ويكون شائعا في فصل الربيع عادة وهو من الإصابات القححية لتجويف الأذن الوسطى (Prince., 1998) وفي حالة التهاب الأذن الوسطى القححي المزمن تتطور الحالة إلى خراج دماغي (Brain abscess) (Abdul-Razzak., 2000).

١-٥-٦ إصابات العين:

في دراسة لـ Lam وجماعته (١٩٩٨) وجد أن *P.mirabilis* كانت المسبب الرئيسي في التهاب العين (Post-kerato Plasty endophthalmitis) لمريضة بداء السكر. كما وجد أنها جرثومة سائدة في إصابات قرح الضغط (pressure ulcer) وإصابات التخرر (necrotic lesions) (Closky *etal.*, 1998).

١-٥-٧ تسمم الدم Septicaemia:

تخترق بكتريا *P.mirabilis* المجرى الدموي (Blood stream) من وقت إلى آخر مسببة تسمم الدم الجرثومي (Septicaemia) وهذا يحدث عادة نتيجة لإصابة سابقة للمجرى البولي أو كنتيجة للقتطيرة أو العمليات الجراحية. إن تجرثم الدم ببكتريا المتقلبات (Proteus-Bacteraemias) صعب المعالجة كما يسبب معدل وفيات يتراوح بين ١٥% - ٨٨% (Senior., 1997-b).

إن إصابات المجرى الدموي ببكتريا *P.mirabilis* المتوافق مع صدمة تجرثم الدم يمتاز بمعدل عالٍ من الوفيات (Senior., 1977).

ولا يعرف فيما إذا كانت بكتريا *P.mirabilis* التي تخترق مجرى الدم لها صفات ضراوة خاصة أم أن هنالك أنماط Proticine Production/Proticine Sensitivity خاصة أم أن هنالك أنماط

(P/S) خاصة أي أنماط حساسية البكتريا تجاه البروتسين من هذا النوع لها القدرة على اختراق مجرى الدم.

١-٥-٨ إصابات أخرى متنوعة:

تصيب بكتريا *P.mirabilis* العديد من الجروح وجروح العمليات (Welch., 1987) وتسبب التهابات الحروق (Collee *etal.*, 1996) كما تصيب حديثي الولادة مسببة التهاب السحايا الدماغية (Senior., 1977) كذلك تعزل من قرحة طريحي الفراش (bed sore) التي تحدث في المستشفيات والتي مصدرها النبيت الطبيعي للأمعاء (Jawetz *etal.*, 1998) وقد تكون هذه البكتريا السبب في التهاب المعدة (Gastroenteritis) عند انتقالها عن طريق الغذاء الملوث (Kriey and Holt., 1984). وقد تم عزلها من حالات التليف الحويصلي Cystic fibrosis حيث لوحظ ان هذه السلالات مقاومة لمضادات Amoxicillin و Tetracyclin و Cotrimoxazole وتكررت الإصابة في الرئة (Recurrent Lung Infection) للمريض نفسه (Vargas *etal.*, 1990).

عزلت بكتريا *P.mirabilis* من طفلة زائيرية مصابة بفقر الدم المنجلي (SCA) حيث كانت السبب في إصابتها بالتهاب العظم (Osteomyelitis) وهي حالة نادرة أصابت أضلاع القفص الصدري.

إن من الشائع عزل بكتريا *Salmonella spp* من التهابات العظام الطويلة إلا أن عزل بكتريا *P.mirabilis* تعتبر حالة نادرة (Kanfaoui *etal.*, 1999).

وجد الباحث Eisenberg وجماعته (١٩٩٨) حالة إصابة ببكتريا *P.mirabilis* عند امرأة بعمر ٧٨ سنة تسببت في تكوين قرحة في ورم أصاب النخاع الشوكي.

ويمكن أن تسبب بكتريا *P.mirabilis* إصابة ذات منشأ داخلي endogenous أو خارجية المنشأ exogenous وتحدث الإصابة الداخلية نتيجة التلوث بالنبيت الطبيعي للأمعاء (Mobley and Belas., 1995) أما الإصابة الخارجية فتحدث نتيجة استخدام الأدوات التشخيصية والعلاجية الملوثة أو بعد إدخال أنابيب القنطرة في الاطليـل (Morris and Stickler., 1998).

١-٥-٩ التأثير السمي الخلوي **Cytotoxic effects**:

في دراسة أجريت في التأثير السمي لبكتريا *P.mirabilis* على خلايا الزرع النسيجي وجد ان الخلايا تحول شكلها من المغزلي إلى الكروي عند معاملتها بالبكتريا الحية أوالمكسرة أوراشح مزرعة البكتريا. وعند الكشف عن الكروموسومات لخلايا الدم البيض ظهرت الكروموسومات مكسرة وقصيرة ومتفرقة في المجموعة التي عوملت بالجزء الطافي من نبيت مزرعة البكتريا.

ووجد ان بكتريا *P.mirabilis* مولدة للحمى عند حقنها بالأرانب النيوزلندية وفي الدراسة نفسها سبب هذا النوع اسقاطات للفئران الحوامل عند حقنها بالخلايا الحية والمكسرة وراشح مزرعة البكتريا (Kareem., 2001).

١-٦ مقاومة بكتريا *P.mirabilis* لمضادات الحياة:

تمتلك البكتريا نوعين من المقاومة الذاتية (Intrinsic) وأخرى مكتسبة. فالمقاومة الذاتية هي مقاومة طبيعية للكائن الحي حيث يظهر عجز في استقبال مضاد الحياة لذلك قد تدخل جزئيات قليلة منه إلى موقع الهدف. وتشمل آليات المقاومة الذاتية عدم نفاذية الجدار الخلوي أو تأثير المضخة الباعثة (Pump) أو إنتـاج الأنزيمات (Efflux) (Russell *etal.*, 1999).

أما المقاومة المكتسبة فتشكل مشكلة في العلاج الكيميائي إذ أن البكتريا تفقد قدرتها على التحسس تجاه مضادات الحياة فتصبح مقاومة لها وهناك ثلاثة عوامل تؤثر على تعدد المقاومة المكتسبة وهي:

- ١- كمية المضاد الحيوي المستخدم.
- ٢- تكرار حدوث الطفرة التلقائية للمقاومة.
- ٣- وجود البلازميدات القادرة على نقل المقاومة من بكتريا إلى أخرى (Jawetz *etal.*, 1998).

١-٦-١ مقاومة مضادات الحياة من نوع البيتاالاكتام (β -Lactam):

تصنف مضاد البيتاالاكتام (β -Lactam) ضمن مضادات الحياة التي تثبط تصنيع الجدار الخلوي من خلال تثبيط الأنزيمات المسؤولة عن تكون طبقة الببتيدوكلايكان حيث يرتبط المضاد بمستقبلات خاصة على سطح البكتيريا وتدعى Penicillin binding Proteins PBPs وتشمل هذه المجموعة البنسلينات والسيفالوسبورينات الحاوية على حلقة بيتالاكتام. (Treagent and Pullium., 1982) (Jawetz *etal.*, 1998).

وتأتي المقاومة لمضادات البيتاالاكتام من خلال إنتاج أنزيمات تستهدف حلقة البيتاالاكتام تحطمها وتثبط عمل المضاد وتعرف هذه الأنزيمات بـ β -Lactamase وهي من أكثر الأنزيمات شيوعاً التي تستخدمها هذه البكتيريا تجاه مضادات الحياة. ولقد ظهرت مقاومة بكتيريا *P.mirabilis* خلال السنوات الأخيرة بإنتاج أنزيم β -Lactamase والذي يسميه الباحثون E SBLs Extended Sptreum Beta lactamases والتي تكون مقاومة لأكثر مضادات البيتاالاكتام فاعلية ألا وهي مشتقات سيفالوسبورينات الجيل الثالث مثل (Luzzaro *etal.*, 2001). كما ثبت دور أنزيمات β -Lactamase في مقاومة *P.mirabilis* لطيف واسع من السيفالوسبورينات حيث وجد ان بكتيريا *P.mirabilis* المعزولة في جنوب إفريقيا تنتج أنماطاً من هذه الأنزيمات مثل SH V-5, SH V-2, TEM-26 وهذه المرة الأولى التي تسجل فيها سلالات حاملة لمثل هذه الأنزيمات في جنوب إفريقيا وبذلك تضاف إلى قائمة الدول التي تعاني من مشكلة مقاومة مضادات البيتاالاكتام بهذه الأنزيمات (Pitout *etal.*, 1998).

وتحدث المقاومة عادة بسبب إحداث تحوير في PBP عن طريق أنزيمات محورة يشفر لها بلازميد متخصص وهي حالة شائعة في بكتيريا *P.mirabilis* و *Enterobacter aerogenes* (Neuwirth *etal.*, 2001).

وفي دراسة حديثة وجد أن هناك أنزيماً (Glutathione Transferase B11) وفي GTB11 يلعب دوراً مهماً في مقاومة مضادات البيتاالاكتام في بكتيريا *P.mirabilis* (Allocatie *etal.*, 1999) ويمتلك هذا الأنزيم أصرة كبريتية لها وظائف متعددة تساهم في إزالة

السمية الخلوية من خلال ارتباط هذا الإنزيم بقوة بمضاد الحياة مما يسبب اختزال فعاليته العلاجية (Rossjohn *et al.*, 1998).

وتقع المورثات المشفرة لإنزيم β -Lactamase على البلازميد كما في أنزيم Penicillinase في بكتريا *Staph aureus* بينما تقع على الكروموسوم في معظم الأنواع التابعة للبكتريا السالبة لملون كرام (Jawetz *et al.*, 1998).

وقد أمكن نقل صفة المقاومة بوجود β -Lactamase من بكتريا *Klebsiella pneumoniae* إلى بكتريا *P. mirabilis* عن طريق الاقتران الانتقالي (Babalova *et al.*, 1999) (Transconjugation).

وقد تحدث المقاومة نتيجة لحدوث طفرة تسبب فقدان أو تحويل المستقبلات الخاصة بالمضاد PBPs مما يسبب تثبيط المضاد أو قد تحدث المقاومة نتيجة انخفاض نفاذية الغشاء الخلوي للمضاد (Jawetz *et al.*, 1998).

١-٦-٢ مقاومة مضادات **Aminoglycosides**:

أصبحت مقاومة الامينوكليكوسايد شائعة في إصابات المستشفيات بين البكتريا السالبة لملون كرام (Rubens *et al.*, 1981).

تثبط مضادات الامينوكليوسيدات تصنيع بروتين الخلية من خلال ارتباطها مع رايبوسومات الخلية البكتيرية (Treagan and Pulliam, 1982). وتقاوم البكتريا هذه المضادات بطرق عدة منها إنتاج أنزيمات تعمل على تحوير الامينوكليكوسايد وتمنعه من الارتباط مع الهدف وهو الرايبوسوم مثل أنزيم 3-6 Amino Glycosidephospho transferase الذي يسبب مقاومة مضاد Streptomycin وأنزيمات تقوم بنقل مجموعة Adenyle إلى جزيئة مضاد الستربتوميسين فيفقد المضاد فعاليته (Jawetz *et al.*, 1998).

وتساهم البلازميدات في انتقال صفات المقاومة بين خلايا البكتيريا فقد أشار Shafi و Datta (١٩٧٥) إلى ان بكتريا *P.mirabilis* تقاوم عدداً من مضادات الامينوكليوسيدات باحتوائها على بلازميدات مقاومة للمضاد. اذ تم تحديد اثنين من عوامل المقاومة R-Factors أحدهما يشفر إلى مقاومة الجنتاميسين والثاني إلى التوبراميسين والجنتاميسين معاً أوتشفر هذه البلازميدات إلى أنزيمات تقاوم بالفسفرة (Phosphorylating) والاسئلة (Acetylating) وإضافة مجموعة ادنين Adenylating فتعمل على تحطيم المضاد الحيوي (Jawetz *etal.*, 1998).

وقد تحدثت المقاومة لهذا النوع من مضادات الحياة من خلال انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي للمضاد بسبب حدوث تحويرات في تركيب عديد السكريد الشحمي فيصبح حاجزاً يمنع مرور المضاد الحيوي وتحدثت المقاومة أحياناً بآلية المضخة الباعثة وهي من الآليات المهمة التي تمتلكها أنواع البكتيريا السالبة والموجبة لملون كرام. وتتم من خلال اخذ الجزيئات ثم ضخها إلى الخارج بالاعتماد على بروتينات خاصة في الغشاء الخلوي ويشفر لهذا النوع من المقاومة مورثات متعددة والتي تقع على الكروموسوم وتلعب دوراً مهماً في المقاومة الذاتية في البكتيريا السالبة لملون كرام (Jawetz *etal.*, 1998) (Russell *etal.*, 1999).

١-٦-٣ مقاومة مضادات **Fluoroquinolones** و **Quinolones** :

تكون مضادات Fluoroquinolones واسعة الطيف في تأثيرها تجاه العديد من البكتيريا السالبة والموجبة لملون كرام بضمنها عائلة Enterobacteriaceae ومن أهمها مضاد Ofloxacin و Ciprofloxacin (1998) (Martinez-Martinez *etal.*, 1999) (Ansdell and Ericysom, 1999).

وتستهدف هذه المضادات عمل انزيم DNA Gyrase حيث تقوم بتثبيط عمله المسؤول عن جعل شريط الدنا الكروموسومي البكتيري فائق اللف وبالتالي تؤدي إلى توقف بناء الدنا وموت الخلية (Katzung, 2001).

وعلى الرغم من ان الـFluoroquinolones مضادات فعالة تجاه البكتريا المقاومة للمضادات المايكروبية التقليدية إلا أن الدراسات تشير إلى ظهور سلالات مقاومة لهذه المضادات (Martinez-) (Martinez *et al.*, 1998). لقد تطورت المقاومة الكروموسومية من خلال حدوث الطفرات التي تسبب تحويراً في Topoisomerase والأنزيم DNA Gyrase وهي هدف المضاد أو تغير في نفاذية الغشاء الخارجي مما سبب تراكم العقار في البكتريا (Katzung, 2001).

كما تحدث المقاومة بسبب الية الضخ Efflux حيث تضخ الجزئيات التي تأخذها الخلايا بواسطة بروتينات خاصة (Russell *et al.*, 1999) كما وجد Martinez وجماعته (1998) وجود بلازميد يحمل صفة المقاومة المتعددة لمضاد Nalidixic acid, وCiprofloxacin يستطيع أن ينتقل بين عدد كبير من أنواع البكتريا المعوية بالإضافة إلى *Ps.aeruginosa*.

١-٦-٤ مقاومة مضادات **Macrolides**:

تشمل مضادات Macrolides مجموعة من مضادات الحياة قريبة الصلة من بعضها من ناحية الصفات فهي تحتوي على حلقة Macrocylic Lactone ويعتبر مضاد الارثرومايسين اقدم أنواع هذه المجموعة الذي يكون فعالاً تجاه البكتريا الموجبة لملون كرام بسبب فعاليتها في تجميع المضاد داخل الخلية كذلك تتأثر بعض أنواع البكتريا السالبة لملون كرام بهذا المضاد فيقوم بتثبيط تصنيع البروتين في تلك الخلية البكتيرية (Jawetz *et al.*, 1998).

كما يكون للارثرومايسين تأثير أوسع تجاه الممرضات المعوية عند الأس الهيدروجيني القاعدي في المعى (Ansdell and Ericyson, 1999).

وتأتي مقاومة البكتريا لمضادات Macrolides من خلال ثلاث آليات وهي:

- ١- انخفاض النفاذية الاختيارية للغشاء الخلوي أو الضخ الفعال.
- ٢- إنتاج أنزيمات Esterase التي تحلل Macrolides مائياً.

٣- تحوير موقع الارتباط الريبوسومي الذي يدعى الحماية الريبوسومية بواسطة الطفرة الكروموسومية أو بواسطة التحفيز أو الحث من قبل المضاد أو من خلال تكوين أنزيم Methylase (Katzung., 2001).

ويشفر البلازميد عادة لمقاومة الاثرثومايسين. وقد يكون مسيطر عليه من قبل الكروموسوم (Jawetz *etal.*, 1998) (Katzung., 2001).

ويشبه مضاد كلندامايسين عمل الاثرثومايسين من حيث الآلية حيث يقوم بتنشيط تصنيع البروتين في البكتريا. ويشتق الكلندامايسين من اللنكومايسين وهو فعال تجاه البكتريا الموجبة والسالبة لملون كرام. وتكون البكتريا السالبة مقاومة طبيعياً للكلندامايسين بسبب انخفاض النفاذية الانتخابية للغشاء الخارجي (Katzung., 2001).

١-٦-٥ مقاومة مضادات **Tetracycline**:

يستخدم التتراسايكلين ضد مدى واسع من الأحياء المجهرية كالبكتريا السالبة والموجبة لملون كرام ومن ضمنها اللاهوائية والركتسيا والكلاميديا وحتى بعض الابتدائيات كالاميبيا.

ويدخل مضاد التتراسايكلين إلى داخل الخلية البكتيرية عن طريق النقل الفعال. وتقوم البكتريا الحساسة بتركيز المضاد داخل الخلية. حيث يرتبط بوحدة الريبوسوم الصغيرة S30 للبكتريا ويمنع ارتباط Aminoacyl-tRNA في موقعه المناسب على معقد (الريبوسوم-mRNA) مما يمنع إضافة الأحماض الأمينية ويثبط تصنيع البروتين في الخلية البكتيرية (Jawetz *etal.*, 1998). وتقاوم البكتريا مضاد التتراسايكلين من خلال ثلاث آليات هي:

- ١- المضخة الباعثة من خلال زيادة ضخ المضاد إلى خارج الخلية البكتيرية بواسطة النقل الفعال.
- ٢- حماية الريبوسوم المستهدف من قبل المضاد بواسطة إنتاج بروتينات تتداخل مع ارتباط التتراسايكلين بالريبوسوم.
- ٣- تنشيط إنزيمي للتتراسايكلين.

وتعتبر آلية المضخة الباعثة من أهم آليات المقاومة والتي يشفر لها على البلازميد والذي يمكن انتقاله بالعائى أو بالاقتران. وبسبب وجود هذه البلازميدات التي عادة ما تشفر إلى جينات

مقاومة لمضادات الحياة الأخرى كالأمينوكليوكوسايد والكلورمفينكول والسلفانواميد لذا تعتبر مقاومة التتراسايكلين هي إشارة إلى المقاومة المتعددة لمضادات الحياة. ومما زاد في ظهور عزلات مقاومة للتتراسايكلين استخدامه في الغذاء الحيواني لتحسين الإنتاج مما أدى إلى زيادة انتشار مقاومة التتراسايكلين ضمن البكتريا المعوية وانتشار البلازميدات المشفرة لمورثات المقاومة كما ان استخدامه تسبب في تغير النبيت الطبيعي من خلال كبح *Coliform* والحساسية وزيادة نمو الأجناس المقاومة مثل *Pseudomonas* و *Proteus* و *Staphylococcus* و *Coliform* المقاومة و *Candida* و *Clostridia* (Katzung., 2001).

١-٦-٦ مقاومة مضاد **Rifampin**:

يقع هذا النوع من المضادات ضمن مجموعة Isoniazid التي تثبط النمو البكتيري بواسطة الارتباط بقوة بإنزيم بلمرة (RNA) مما يثبط تصنيع RNA. وتقاوم البكتريا Rifampin من خلال تغير في انزيم البلمرة بسبب حدوث الطفرات الكروموسومية والتي تحدث عادة بتكرار عالٍ (Jawetz *etal.*, 1998).

١-٧ دور البلازميدات في نقل المورثات المخصصة لمقاومة مضادات الحياة:
تعرف البلازميدات على إنها دنا خارج كروموسومي له القابلية على التضاعف بشكل مستقل عن الدنا الكروموسومي للخلية البكتيرية (Atlas *etal.*, 1995).

وتحمل البلازميدات المورثات الضرورية لصيانة وظائف البلازميد كبدء التضاعف والسيطرة عليه، في حين يحمل بعضها مورثات مسؤولة عن انتقال البلازميدات نفسها عن طريق الاقتران البكتيري (Prescott *etal.*, 1990).

توجد أنواع عدة من البلازميدات إلا أن أهمها من الناحية السريرية هي البلازميدات الحاملة لمورثات مقاومة مضادات الحياة ومورثات عوامل الضراوة ويمكن ان تنتقل بلازميدات المقاومة من خلية إلى أخرى خلال جسر الاقتران بين بعض أنواع البكتريا (Jawetz *etal.*, 1984) وتعتبر ظاهرة الاقتران من أهم الطرق وأكثرها انتشاراً في نقل بلازميدات المقاومة خاصة بين الأنواع الموجودة بصورة طبيعية وبكثافة عالية في نفس البيئة.

تستطيع أفراد العائلة المعوية ان تكتسب مورثات المقاومة وتنتشرها بسرعة عندما يكون هناك ضغط انتخابي لمضادات الحياة (Rice *etal.*, 1990).

يمكن ان تنتقل بلازميدات المقاومة بالعائيات حيث ثبت من خلال الدراسة انتقال عوامل المقاومة R-Factors إلى بكتريا *P.mirabilis* عن طريق التنبيغ بالعائتي حاملاً معه مقاومة مضادي الكنامايسين والامبسلين وحامض النالديكسيك وغيرها من مضادات الحياة (Coetzee *etal.*, 1973) (Coetzee., 1975).

تقسم البلازميدات على أساس تضاعفها إلى (التضاعف غير المحدد) Relaxed Replication وهو النوع الشائع في بكتريا *P.mirabilis* وفيه يتضاعف البلازميد ليعطي نسبة ٢٠:١ (كروموسوم : بلازميد) والنوع الثاني (التضاعف المحدد) Stringent replication وفيه يكون التضاعف بنسبة (١:١) (كروموسوم : بلازميد) (Meyhell., 1973).

١- ٧- ١ بلازميد المقاومة في الدراسات الوبائية الجزئية:

طبق تحليل النسق البلازميدي (Plasmid Profile) في الدراسات الوبائية عن طريق تحديد عدد وحجم البلازميدات التي تحملها السلالات الممرضة إذ أن التعرف على النسق البلازميدي يعطي مؤشراً وبائياً (Murray *etal.*, 1999) حيث وجد الباحث Hoffmann وجماعته (١٩٩٨) من خلال دراسة النسق البلازميدي لثلاثين سلالة بكتريا *P.mirabilis* إنها جميعاً أظهرت تماثلاً في محتواها البلازميدي. كما وجد ان تحليل النسق البلازميدي طريقة مفيدة في تتبع انتشار الأحياء المجهرية مثل أفراد العائلة المعوية المسؤولة عن حدوث الأمراض (Collee *etal.*, 1996).

كما أشار Neuwirth وجماعته (٢٠٠١) من خلال دراسة وبائية لعدد من أفراد العائلة المعوية المقاومة لعدد من مضادات الحياة والمعزولة من خمسة مرضى احتوائها على بلازميد بحجم 100kb والذي يشفر إلى أنزيم ESBL.TEM-24. كما وجد في الدراسة نفسها ان هذا البلازميد له القدرة على الانتقال بسهولة داخل الجسم الحي *in vivo* من السلالة المكلونة *E.aerogenes* إلى سلالات مختلفة من *K.pneumoniae* و *E. coli* و *P.vulgaris* و *P.mirabilis* و *Serratia*

marcescens. إن معظم البلازميدات المشفرة إلى ESBLs هي أكبر من 80kb وتحمل مقاومة لأكثر من مضاد حيوي (Silva *etal.*, 2001).

أشار المرجاني (٢٠٠١) ان عزلته المحلية جميعها احتوت على (٤-٥) حزمة بلازميدية متقاربة في أحجامها وأكد على وجود مؤشر وبائي وكأن العزلات تعود إلى اصل واحد أو سلالة واحدة.

٨-١ عوامل الضراوة **Virulence Factors**:

يوضح الشكل رقم (١-١) أهم عوامل الضراوة المنتجة من قبل بكتريا *P.mirabilis* وتساعد هذه العوامل على الإضرار بالمضائف Host التي تتواجد فيها وتسهل من



عوامل الضراوة المنتجة من قبل بكتريا *P.mirabilis*

(Mobley and Belas., 1995)

MR/P mannose - resistant / Proteus like fimbriae
PMF *Proteus mirabilis* fimbriae

ATF ambient temperature fimbriae

NAF non agglutinating fimbriae 1-8-1 الانتثالية والاسواط **Swarming motility and** **:flagella**

1-1-8-1 حركة الاسواط وأثرها في ظاهرة الانتثال:

وهي حركة بشكل أمواج تبدأ من حافة المستعمرة الأصلية لتغطي أسطح الأوساط الصلبة مثل الاغار المغذي أو اغار الدم. وهي ظاهرة تميز أنواع جنس المتقلبات عن بقية أفراد العائلة المعوية (Jawetz *etal.*, 1998). وهذه الظاهرة سلوك حركي متعدد الخلايا (Multicellular Motility Behavior) وتحدث نتيجة التمايز وتغير شكل الخلايا بعد مرورها بأربع ظواهر منفصلة هي:

- 1- القدرة على تحسس الإشارات من المحيط الخارجي: حيث يعتبر الكلوتامين من المؤثرات خارج الخلية المهمة التي يمكن ان تتحسسها الخلية البكتيرية بواسطة آلية توصيل خاصة مستقلة عن نظام الخلية الذي تنتقل به الأحماض الأمينية المغذية (Mobley and Belas., 1995) وقد تم إثبات ان للكلوتامين دوراً في ظاهرة الانتثال وذلك في دراسة أجراها Senior (1999).
- 2- تكون الخلايا المتطاوله المتحركة بالانتثال Swarming عند التمايز تتحول الخلايا السابحة (Swimmer cells) ذات الطول 1,5-2 مايكروميتر إلى خلايا الانتثال Swarmer وتصبح بطول 10-80 مايكروميتر كما يزداد عدد الاسواط من 4-10 ليصبح 10³-10⁴ (Mobley and Belas., 1995)، (Liaw *etal.*, 2000).
- 3- إنتاج بروتين الـ Flagellin وبكميات كبيرة (Claret *etal.*, 2000) إذ أن الاسواط ضرورية لظاهرة الانتثال (Zunino *etal.*, 1994) وثبت ذلك من خلال الحصول على طفرات فاقدة القدرة على تكوين الاسواط أي فاقدة للمورثات المشفرة لصفة إنتاج الاسواط والتي يطلق عليها fla A (يشفر للخويط) و flg H (المشفر للجسم القاعدي) و fli G المشفر للبروتين المحرك (Switch Protein) ومورثات أخرى ذات العلاقة مثل (fli L) الذي له تأثير على عملية تمايز الخلايا وسلوك الانتثال.
- 4- ارتباط عدة خلايا تتعاون لتغطي الأمواج الحلقية أو الاسطح (Terraces). لا يعرف بالضبط كيف تتجمع الخلايا مع بعضها البعض لتتعاون وتعطي هذه الحلقات. إن فقدان أية

ظاهرة من هذه الظواهر ينتج عنها انثيال غير طبيعي أوفقدان تام للحركة.
(Hay *etal.*, 1999) (Mobley and belas., 1995).

١-٨-١-٢ دورة الانثيال **Swarming Cycle**:

تبدأ هذه الحركة الزاحفة بعد مدة من التلقيح ويكون النمو غير مستمر (Discontinuous) (Jawetz *etal.*, 1998) حيث تبدأ الحركة ولمدة زمنية معينة ثم يتبعها طور التماسك (Consolidation Phase) لكي تتغذى البكتريا فيها وتتقسم، ثم تبدأ الحركة من جديد بشكل أسطح (Terraces) وهذه تمثل دورة الانثيال (Swarming cycle) وينتج عن هذه الدورة مستعمرات بشكل يسمى نقطة مركز الهدف (Bull's Eye) وهي صفة تميز بكتريا *P.mirabilis* ويتغير عرض السطح المتحرك (Terraces) رغم تساوي المدد الزمنية للحركة (Belas), (walkere *etal.*, 1999), (Matsuyama *etal.*, 2000) (*etal.*, 1998).

وتعد هذه الحركة من العوامل المهمة في إحداث التهاب المجرى البولي حيث تتمكن الخلايا المنثالة من غزو خلايا المجرى البولي الطلائية للمضيف (Urothelial Cells) (Fajardo *etal.*, 1996) كما ان الخلايا المنثالة لها القدرة في التعبير (Expression) عن عوامل الضراوة كالليوريز والبروتيز والهيمولايسين والفلاجلين (Flagellin) اكثر خلال عملية التمايز منها في الخلايا الخضرية (Vegetative Cells) (Liaw *etal.*, 2000).

١-٨-١-٣ مورثات الاسواط والانثيال:

لقد وجد Mobely و Belas (١٩٩٥) ان تعبير المورث *fla A* يزداد في الخلايا المنثالة ثمان مرات اكثر مما في حال الخلايا غير المتمايزة كذلك الحال بالنسبة لإنزيم البروتيز إذ يعبر (Expression) المورث *zap A* المسؤول عن التشفير للبروتيز بشكل كامل أثناء تمايز الخلايا إلى الخلايا المنثالة (Swarmer Cells) (Walker *etal.*, 1999).

وجد Latta وجماعته (١٩٩٩) أن الخلايا أثناء الانثيال وطور التماسك تحتوي على الخملة (Fimbriae) من نوع (Non-Agglutinating Fimbriae) NAF بينما تحمل نوعين من الخملة هي

المتحرك الذي تكونه حركة الانثيال. (Mannose. Resistant Proteus-like) MR/P و NAF في المناطق القريبة والبعيدة عن السطح

وقد وصف Hay وجماعته (١٩٩٩) نوعاً جديداً من البروتينات الغشائية التي لها دور في ظاهرة الانثيال حيث وجد أن لها تأثيراً في شكل الخلايا. إذ تم تحديد نوعين من المورثات C_{cmA1} و C_{cmA2} المسؤولة عن البروتين والذي يزيد تركيزه حوالي ٢٠ مرة في الخلايا المنثالة.

تمت دراسة الأصل الوراثي لهذه الظاهرة من خلال الحصول على طفرات فاقدة القدرة على الانثيال فوجد ان طفـرات *P.mirabilis* ينقصها موقع هـ و

(Locus kb 5.4) موجود على الكروموسوم يشفر إلى منظم سلوك الانثيال (Regulator of Swarming Behavior RsbA) (Belas *etal.*, 1998).

١-٨-٤ طرق تثبيط الانثيال:

تشكل هذه الحركة على الاوساط الزرعـية الصلبة صعوبة في إمكانية عزل الأنواع الأخرى من البكتريا من النماذج السريرية مثل عزل *Campylobacter* وبكتريا *Bacteroides fragilis* (Firehammer, 1987). لذا تم استخدام العديد من المواد والطرق لتثبيط هذه الظاهرة مثل استخدام مواد azide و Sodium (PNPG) و P-nitro phenyl glycerin و phenyl ethylalcohol أو استخدام وسط (CLEED) Cystein- (Firehammer, 1987) Lactose Electrolyte Deficient medium (Jawetz *etal.*, 1998). أو استخدام أملاح الصفراء التي تضاف الى وسط ماكونكي (Liaw *etal.*, 2000) (ولا تتوقف هذه الحركة إذا كان سطح الوسط رطباً) كما يمكن ان تثبط الحركة بزيادة الاغار المضاف بنسبة ٢,٥-٣% (Jones *etal.*, 1990).

ويمكن إضافة مضادات الحياة مثل التتراسايكلين بتركيز 20µg/ml أو الامبسلين 100µg/ml أو الكاناميسين 50µg/ml بشرط أن تكون الخلايا مقاومة لهذه المضادات لمنع ظاهرة الانثيال (Swihart and Welch, 1990-b).

١-٨-١-٥ الانثيال في أنواع أخرى من البكتريا:

هناك أنواع أخرى من البكتريا مثل *Bacillus licheniformis* تتحرك بما يشبه حركة الانثيال في المتقلبات إلا إنها تختلف بظهور انتشار بشكل خيوط، كما تمتاز بلزوجة النموبالإضافة إلى ان هذه البكتريا لا تملك اسواطاً بل خيوطاً (Filaments) (Bisset and Street, 1973) كما ثبت ان ٥٠% من أنواع جنس *Aeromonas* تقوم بحركة الانثيال وبعض الأنواع الأخرى التابعة للعائلة *Vibrionaceae* مثل *Vibrio alginolyticus* و *V. parahaemolyticus* حيث تقوم بالانثيال بواسطة الاسواط الجانبية (Lateral Flagella) (Kirov *etal.*, 2002).

١-٨-٢ عديد السكريد الشحمي (الذيفان الداخلي) **:LPS-Endotoxin**

وهي جزيئة توجد في الأغشية الخارجية للبكتريا السالبة لملون كرام حيث تعتبر إحدى عوامل الضراوة المهمة في هذه البكتريا (Nnalue *etal.*, 1999).

١-٨-٢-١ أنواع الذيفانات الداخلية في *P.mirabilis*:

تمتلك بكتريا المتقلبات *P.mirabilis* نوعين من الذيفانات الداخلية إحداها متعدد السكريد الشحمي LPS والذي يتكون من ثلاث مناطق هي المستضد الجسمي O (Somatic Antigen) ومنطقة اللب القاعدي Basal core والدهن A والذيفان الآخر هو الذيفان الذي يتكون من بروتينات ودهون وسكريات مختزلة (Jawetz *etal.*, 1998) (Kareem, 2001).

١-٨-٢-٢ مكونات الذيفانات الداخلية في المتقلبات:

أثبتت الدراسات المصلية والكيميائية ان بكتريا المتقلبات تمتلك مكونات فريدة ضمن تركيب ال LPS مما يسبب اختلافاً في الفعالية البايولوجية للـ LPS ضمن المتقلبات ومن هذه المركبات D-galacturonic acid في منطقة اللب كذلك حامض اليورونك وسكريات غير اعتيادية وحوامض امينية في موقع O-Polysaccharide في متعدد السكريد الشحمي بالإضافة إلى N-acetyl

glucosamine والمانوز وهي مركبات غير شائعة في تركيب أفراد العائلة المعوية (Swierzko *etal.*, 2000).

١-٨-٢-٣ الامراضية المتسببة عن الذيفان الداخلي للمتقلبات:

يمتلك الذيفان الداخلي القدرة على تحفيز انقسام الخلايا (Mitogenicity) ويستحث التخر النزفي (Necrosis) وعامل تنخر الورم (Hemorrhagic) و TNF (Tumor Necrosis Factor)، وذلك عند حقن جرعة صغيرة منه في الحيوانات المختبرية كما تظهر حالات إسهال وارتقاع درجات الحرارة وسرعة النض (Green wood *etal.*, 1997). ويقوم هذا الذيفان في المتقلبات بتنشيط العامل المتمم أكثر مما في حالة الذيفان المشابه في البكتريا *E. coli* و *Ps. aeruginosa*. ويساعد وجود المركب (AraN) 4-amino-4-deoxy-L-arabinosyl في متعدد السكريد الشحمي على مقاومة البكتريا لمضاد الحياة PolymyxinB (Kaca *etal.*, 2000) (Swierzko *etal.*, 2000).

١-٨-٣ إنتاج اليوريز **Urease**:

١-٨-٣-١ أهمية أنزيم اليوريز كمسبب للأمراضية:

تعد المتقلبات من أكثر الأنواع شيوعاً في مستوى إنتاج اليوريز وتظهر أهميته في إصابات المجاري البولية حيث يعمل على تحليل يوريا الإدرار إلى الامونيا NH_4 وحامض الكاربونيك H_2CO_3 . أما الامونيا فتترسب بشكل أملاح والتي تسمى Struvite وتتكون حصى الكلى نتيجة لذلك وتسمى Stone (Mobley and Warren., 1987) Infection (Jones and Mobley., 1988) وتترسب هذه الأملاح في مادة مخاطية Uromucoid التي تنتج من قبل البكتريا ويدخل في تركيبها مادة Glycocalyx (عديد السكريد) والتي تساعد في ترسيب الأملاح (Mobley and Hausinger., 1989).

يرتفع الأس الهيدروجيني بسبب تحلل اليوريا إلى امونيا والأخيرة تعد سامة للخلايا الكلوية وعاملاً فعالاً في تكون حصى الكلى. وتتكون الحصى تصبح الإصابة مزمنة وتبقى البكتريا حية داخل الحصى وتحميها خلال المعالجة بمضادات الحياة بالإضافة إلى ان الحصى تعيق المجرى البولي وتثبط بذلك إحدى آليات تنظيف الجسم الطبيعية (Xin-Li *etal.*, 2002) (Mobley and Chippendale., 1990).

وعندما تصبح الإصابة مزمنة تعود إلى تحطيم البرنكايمما الكلوية (Renal Parenchyma) حيث تسبب موت طبقة الخلايا الظهارية الكلوية وتلفها مع تثبيط عمل المتمم، كما تسبب زيادة القاعدية غيبوبة كبدية (Hepatic Coma) مع زيادة الامونيا (Hyperammonia) (Braude and Siemienski.,1960) (Jones and Mobley., 1987).

وتستخدم صفة إنتاج اليوريز كصفة تشخيصية لأنواع المتقلبات لتفريقها عن باقي أفراد العائلة المعوية (Senior *etal.*, 1980).

١-٨-٢ مورثات أنزيم اليوريز:

تقع المورثات المسؤولة عن إنتاج اليوريز إما على الكروموسوم أو قد تكون على البلازميد (Mobley and Hausinger., 1989) وهناك نوعان معروفان من البلازميدات وجد إنهما يحملان مورثات اليوريز وهي من النوع المنتقل. وتمتلك المورثات المشفرة لإنزيم اليوريز المفرز من قبل *P.mirabilis* المورث UreR الذي يحث استتساخ (Transcription) عنقود (Operon) اليوريز الذي يتضمن مورثات تشفر للوحدات الصغيرة التركيبية لإنزيم اليوريز هي ure ABC ومورثات أخرى يتطلبها اتحاد ايون النيكل Ni^{+2} بالـ Apoenzyme وهي ure DEFG (Xin-Li *etal.*, 2002).

١-٨-٤ إنتاج الهيمولايسين **Hemolysin Production**:

يعد الهيمولايسين مادة سامة إذ يقوم بتحليل الغشاء الخلوي لكريات الدم الحمر من خلال عمل ثقوب في الغشاء ويحرر Leukotrienes من كريات الدم البيض متعددة النواة (Polymorpho

PMNs (Nuclear cells) ويحرر الهستامين من الخلايا الصارية (Mast Cells). ولأنها صفة مرتبطة غالبا بالسلالات الممرضة فقد عدت من العوامل التي تزيد من ضراوة البكتريا (Swihart and Welch., 1990-b).

١-٤-٨-١ الامراضية المتسببة عن الهيمولاييسين:

إن إفراز الهيمولاييسين صفة شائعة في السلالات المعزولة من الحالات السريرية لأنواع *P.mirabilis* و *P.vulgaris* *Morganella morganii* (Koronakis et al., 1987).

لقد أشار كل من Welch و Swihart (1990-a-b) إلى ان السلالات المنتجة للهيمولاييسين في *P.mirabilis* تكون اكثر ضراوة من السلالات غير المنتجة كما ان هنالك علاقة مباشرة بين غزو الخلايا وإنتاج الهيمولاييسين.

تمتلك المتقلبات نوعين من الهيمولاييسين تعتمد فعالية أحدهما على وجود أيونات الكالسيوم Ca^{2+} يرمز له (HlyA) وهو غير شائع بين سلالات المتقلبات ويشبه الهيمولاييسين الفا المفرز من قبل *E.coli* أما النوع الثاني HpMA وهو نوع شائع بين أنواع المتقلبات لا تعتمد فعاليته على وجود أيونات الكالسيوم (Welch., 1987) (Uphoff and Welch., 1990).

يملك هيمولاييسين HpMA سمية خلوية تجاه الخلايا الطلائية في الزجاج حيث يسبب تحلل الخلايا الكلوية البشرية في المزرعة النسيجية بعد مدة تماس قصيرة (Mobley and Belas., 1995).

وتشير الدراسة أن ٩٤% من *P.mirabilis* منتجة للهيمولاييسين بينما تنتج بكتريا *P.vulgaris* بنسبة ٨٤% (Swihart and Welch., 1990-a).

١-٤-٨-٢ مورثات الهيمولاييسين:

تتم السيطرة على تصنيع الهيمولاييسين الفعال وإفرازه إلى المحيط بمورثات تقع إما على بلازميد قابل للانتقال (Transmissible Plasmid) أو على الكروموسوم (Koronakis *et al.*, 1987) ويتألف عنقود (Operon) الهيمولاييسين من أربع مورثات hly A-B-C-D اثنتان من المورثات hlyA و hlyC تساهم في تصنيع الهيمولاييسين ونقله لاحقاً خلال الغشاء الساييتوبلازمي، ويحتاج نقل الهيمولاييسين من البريبلازم إلى الغشاء الخارجي إلى مورث آخر هو hlyB (Swihert and Welch., 1990-a-b) ويقوم المورث hlyD بتحرير بروتين الهيمولاييسين من الغشاء الخارجي إلى وسط النمط والبكتيري (Swihert and Welch., 1990-a).

١-٨-٥ إنزيم البروتياز **Protease**:

١-٨-٥-١ آلية عمل إنزيم البروتياز:

تحمي بكتريا *P.mirabilis* نفسها من دفاعات الجسم المناعية بإنتاجها لإنزيم البروتياز الذي يقوم بشطر السلاسل الببتيدية التي تدخل في تركيب البروتينات المناعية وبالتالي تفقد فعاليتها المناعية. (Moblely and Belas., 1995) (Senior., 1999) حيث تعمل هذه الأنزيمات في قطع مواقع محددة للسلسلة الثقيلة للكليوبولينات المناعية IgA و IgG وكذلك المواد غير المناعية مثل الجلوتين والكارازئين والبومين ومصل البقر والمركبات المفرزة.

ويتم القطع في مواقع محددة خلال ١٦ حامضاً أمينياً للسلسلة الببتيدية الغنية بالبرولين لـ IgA₁. أما IgA₂ فإنه أقل استعداداً للتجزؤ بالبروتياز وذلك لقلّة وجود السلاسل الببتيدية الغنية بالبرولين (Swiersko., 2000) (Senior., 1999) (Loomes *et al.*, 1990).

١-٨-٥-٢ أمراض إنزيم البروتياز:

تقوم إنزيمات البروتياز بتكسير بروتينات الوسط الزراعي وتستخدمها مصدراً للغذاء (Wandersman., 1989)، كما أن البروتين له دور في توليد بعض المنتجات مثل الكلوتامين الذي يعد عاملاً مهماً في الحث على ظاهرة الانتثال وإنتاج عوامل الضراوة الأخرى مثل الهيمولاييسين

والبيوريز وكنتيجة لذلك تستطيع البكتريا غزوخلايا المضيف. وقد وجد الباحثون علاقة وثيقة بين الانيثال والقدرة على إنتاج البروتيز إذا أن السلالات غير المنثالة لا تستطيع إنتاج البروتيز كما وجد أن السلالات المطفرة تستطيع اصابة مائة الفئران المختبرية ولكن ليس لها المقدرة في إصابة الكلى وتكوين الخراج (Senior., 1999). وعد البروتيز من عوامل الضراوة المهمة ليس فقط في إصابات المجرى البولي بل في إصابات مواقع أخرى. (Senior et al., 1981).

يشترك إنزيم البروتيز المفرز من قبل *P.mirabilis* ببعض الصفات مع الانزيمين المفرزين من قبل بكتريا *Ps.aeuroginosa* وهما البروتيز القاعدي المقاوم للـ EDTA والايلاستيز الحساس للـ EDTA. الا انه اكثر تشبهاً بانزيم الايلاستيز (Elastase) في صفات شطر الكلوبيولينات المناعية، كما يقوم إنزيم البروتيز المفرز من قبل بكتريا *P.mirabilis* بشطر السلسلة المؤكسدة للانسولين Oxidative-B-chain (Loomes et al., 1990).

١-٨-٣ مورثات البروتيز:

تتم السيطرة على إنتاج البروتيز من قبل المورث zapA بالإضافة إلى أربع مورثات إضافية تسيطر على الوظائف التي تحتاجها فعالية zapA وهذه المورثات هي zapE و zapB و zapC و zapD والمحمولة على الكروموسوم.

وقد وجد ان الطفرات الفاقدة للمورث zapA تفقد قدرتها على تحطيم IgA وتقل قدرتها على البقاء حية في الحيوانات المختبرية المصابة بالتهاب المجاري البولية (Walker et al., 1999).

١-٨-٦ قابلية الالتصاق **Adhesion**:

تعد قدرة الالتصاق من عوامل الضرورة المهمة في إحداث الإصابات وخاصة إصابات المجرى البولي وتلعب الزغب (Pili) أو الخملة (Fimbriae) دوراً مهماً في آلية الالتصاق (Adebola et al., 1983).

١-٦-٨-١ قابلية الالتصاق:

إن الالتصاق إلى ظهارة حويض الكلية يلعب دوراً مهماً في إنشاء وإدامة التهاب الكلية والحويضة حيث يعد الالتصاق الخطوة الأولى المهمة في بدء الالتهاب وقد لوحظ أن قدرة *P.mirabilis* ذات الخملة الكثيفة (Heavily Fimbriated) على الالتصاق بالخلايا الظهارية للكلى أفضل من البكتيريا ذات الخملة القليلة (Light Fimbriated) (Zunino *etal.*, 1994) وفي إحدى الدراسات وجد أن الخلايا المنثالة تزال من مجرى البول بسبب تدفق الإدراج وذلك لامتلاكها عدداً كبيراً من الاسواط التي تعيق الالتصاق (Zunino *etal.*, 1999).

وتمتلك بكتريا *P.mirabilis* ثلاثة أنواع من الخملة تتوافق مع قدراتها على تلتزيم كريات الدم الحمر وفي أنواع عدة من الحيوانات (Mobely and Chippendle., 1990) والأنواع الثلاثة للخملة تتضمن.

١- النوع الحساس للمانوز (Mannose Sensitive, Ms) يتوافق مع قدرتها على تلتزيم كريات دم خنازير غينيا.

٢- الخملة المقاومة للمانوز - شبيهة للكبسيلا (Mannose Resistant/Klebsiella like- MR/K) تتوافق مع قدرتها على تلتزيم كريات الدم الحمر للثيران OX.

٣- الخملة المقاومة للمانوز - شبيهة البروتيس (Mannose Resistant/Proteus Like- MR/p) تتوافق مع قدرتها على تلتزيم كريات الدم الحمر للدجاج والأغنام وخنازير غينيا والخيول والثيران وكذلك الانسان (Adegbola *etal.*, 1983).

ويعد النوعان MR/R,MR/K ضروريين لالتصاق البكتيريا بمستقبلات خاصة في المجرى البولي وإحداث الاستيطان (Bahrani *etal.*, 1993) (Bahrani and Mobley., 1993).

١-٦-٨-٢ مورثات مسببات الالتصاق:

تقع المورثات المشفرة للزغب أو الخملة في بكتريا *P.mirabilis* على الكروسوم (Matsumoto., 1991) بينما تقع عوامل الالتصاق في بكتريا *E.coli* تحت سيطرة مورثات محمولة على البلازميد.

اكتشف حديثاً نوع جديد من الخملة في بكتريا *E.coli* يشفر له بلازميد كبير يتكون من ست مورثات حيث يشفر أحد هذه المورثات لبروتين الزغب الذي وجد أن يشبه المورث PmpA المشفر لزغب بكتريا *P.mirabilis* فـ التـركـيـبـي (Brunner *etal.*, ٢٠٠١).

١-٨-٧ المقاومة الطبيعية لمضاد الحياة **Polymyxin B**:

تقاوم أنواع المتقلبات وبشكل طبيعي مضاد الحياة Polymyxin B ويعتقد أن سبب المقاومة وجود AraN في تركيب متعدد السكريد الشحمي كما أن وجود سلسلة O-polysaccharide في متعدد السكريد الشحمي تحميه من الفعل المدمر لمضاد الحياة Polymyxin B (Swierzko *etal.*, 2000).

١-٨-٨ مقاومة بروتينات المصل **Serum Resistance**:

تقاوم بكتريا *P.mirabilis* بروتينات المصل الطبيعي (Zunino *etal.*, 1999) لذلك يمكنها البقاء في مجرى الدم ومقاومة التحلل بالمتهم (Complement) الذي يترسب على سطح البكتريا وتعود المقاومة إلى امتلاك البكتريا في متعدد السكريد الشحمي سلاسل جانبية (O-side chains) تعيق ترسيب مكونات المتمم وتمنع التحلل. ان عامل الضراوة هذا مهم لبكتريا *P.mirabilis* في قدرتها على الغزو (Invasiveness) مسببة تجرثم الدم (Bacteremia) (1998) (Jawetz *etal.*).

١-٩ عوامل أخرى تساهم في امراضية بكتريا *P.mirabilis*:

هنالك عوامل ضراوة أخرى لبكتريا *P.mirabilis* مثل إنتاج البروتسين الذي يزيد من ضراوة البكتريا ويلعب دوراً في انتشار البكتريا ضمن المنطقة التي تستوطنها (Tracy and Thomson., 1972) (Senior *etal.*, 1981) كذلك قدرتها على غزو الخلايا وامتلاكها لإنزيمات أكسدة الأحماض الأمينية Amino Acid Deaminase التي تولد

acid α -keto من الأحماض الأمينية وهذه بدورها ترتبط مع Fe^{+3} وتسمح بنمو البكتريا في بيئة محدودة الحديد (Moblely and Belas., 1995) Iron Limiting Environment (Zhao *et al.*, 1999). وامتلاكها لعدد سكريد المحفوظة Capsule Polysaccharide وهي مادة كاربوهيدراتية تسهل من ظاهرة الانثيال وتسرع من تكون الحصى في الجهاز البولي (Rahman *et al.*, 1994).

١٠-١ التتميط في بكتريا *P.mirabilis* :

تسبب إصابات المتقلبات في المستشفيات مشاكل علاجية بسبب تزايد المقاومة لمضادات الحياة كما ان هنالك مشكلة صعوبة تمييز الإصابات المشتركة (Cross-infection) لبكتريا *P.mirabilis* لان الإصابات ممكن ان تكون خارجية أو داخلية لذلك لجأ الباحثون إلى تتميط السلالات المعزولة واستخدامها في الدراسة الوبائية لتحديد مصدرها (Tracy and Thomson., 1972).

هنالك وسائل عدة للتتميط، والشائع منها في تتميط بكتريا المتقلبات وخاصة *P.mirabilis* والتي أشار إليها Senior (1977) وهي استخدام التتميط المصلي والتتميط الحيوي (Biotyping) والتتميط بالعائثي (Phagetyping) وتتميط دنييس (Dienes typing) وتتميط البكتيروسين (Bacteriocinc typing).

في حين اتجهت الدراسات الوبائية الجزئية (Molecular Epidemiology) إلى استخدام تقنيات حديثة ومتطورة وسريعة في الكشف عن مورثات الضراوة دون اللجوء إلى الطرائق التقليدية في العزل والتشخيص واختبار الحساسية لمضادات الحياة وذلك باستخدام REA (Restriction Enzyme Analysis) للدنا الكروموسومي، DNA finger Printing و DNA PCR amplification واستخدام التهجين الجزيئي بالاستعانة بمجسات وراثية متخصصة لكل جنس أو نوع من البكتريا (Murray *et al.*, 1999) وتصنف طرائق التتميط إلى نوعين.

١ - ١٠ - ١ التقنيات المظهرية phenotypic techniques:

١ - ١ - ١٠ - ١ التتميط الحيوي Biotyping:

يشير التتميط الحيوي إلى فعاليات المسالك الايضية التي تظهرها العزلات والتي يمكن التعرف عليها من خلال الاختبارات الكيموحيوية ضمن النوع الواحد أو الأنواع المختلفة (Murray *etal.*, ١٩٩٩). كما يتضمن التتميط الحيوي الصفات المظهرية للمستعمرة وتحملها للظروف البيئية المحيطة كنوع الوسط الغذائي أو درجة الحرارة أو الأس الهيدروجيني المتطرف فقد تم وصف ٤٠ مجموعة جديدة ضمن العائلة المعوية اعتمادا على الصفات الكيموحيوية (Farmer ١٩٨٥ *etal.*).

ويمكن التفريق بين *P. mirabilis* و *P. vulgaris* وفق ثلاثة اختبارات أساسية وهي إنتاج الاندول وتخمر المالتوز وأكسدة الاورنثين (Senior., 1997-a)، كما صنفت *P. vulgaris* إلى مجموعتين حيويتين (biogroup) اعتمادا على تخمير السالسين والتحلل المائي للاسكيولين (٢٠٠١ Janda *etal.*) بينما قسم نوع *M. morganii* إلى مجموعتين حيويتين بالاعتماد على ثلاث صفات كيموحيوية (Farmer *etal.*, ١٩٨٥).

وضع France و Markham عام ١٩٦٨ مخططا بالاعتماد على الاختبارات الكيموحيوية صنف فيها سلالات *P. mirabilis* إلى أربع أنماط حيوية (Biotypes) بينما لم يجد باحثون آخرون النمطين الحيويين الثالث والرابع في السلالات المعزولة من قبلهم للحالات السريرية المختلفة، إذ وجدوا ان نسبة ٨٢,٩% من السلالات تعود إلى النمط الحيوي الأول (biotype,1) و ١٧,١% تعود إلى النمط الحيوي الثاني (Biotype,2) (Tracy and Thomson., 1972).

ويضم التتميط الحيوي تباين الحساسية تجاه تراكيز ثابتة من المواد الكيميائية مثل المعادن الثقيلة أو مضادات الحياة وهذا ما يعرف بتتميط المقاومة Resistotyping (Green Wood *etal.*, 1997) وقد أظهرت إحدى الدراسات أن هناك ٣٦ نمط مقاومة Resistotype لمجموع ٥٦ سلالة *P. mirabilis* معزولة من عينات سريرية مختلفة تم اختبارها على

عدة مواد كيميائية عضوية وغير عضوية وبعض مضادات الحياة
(Kashbur *et al.*, 1974).

١- ١٠- ١- ٢ التتميط المصلي Serotyping:

تمتلك البكتريا عدداً من التراكييب في سطوحها، مثل متعدد السكريد الشحمي والغشاء الخارجي (Outer Membrane) والاسواط والكبسولة وغيرها وهي تراكييب مستضدية تسبب رفع مستوى الأجسام المضادة تجاهها لذا يمكن استخدامها في تتميط العزلات للحصول على النمط المصلي (Serotype) (Green wood *et al.*, 1997).

استخدمت الصفات المستضدية للسطوح (Flagellar-H-antigen) وللمستضد الجسمي (Somatic-O-antigen) في التتميط المصلي لبكتريا *P.mirabilis*. وقد وجد من خلال الدراسات ان النمط المصلي للخلايا البكتيرية المعزولة من المصدر نفسه لها النمط المصلي نفسه رغم اختلاف الاختبارات الكيموحيوية. كما وجد أن *P.mirabilis* و *P.vulgaris* لها الصفة المستضدية نفسها على الرغم من الاختلاف الكبير في الصفات الكيموحيوية بين النوعين (Delouvois., 1969).

وضع Perch عام ١٩٤٨ مخططاً للتتميط المصلي وقد وجد ان هنالك ٤٩ مستضداً جسياً و ١٩ مستضداً سوطياً تابعة لجنس المتقلبات (Penner and Hennessy., 1980) وقد استند lanyi على هذا المخطط في تتميط المتقلبات المعزولة من التهاب أمعاء الأطفال (Infantile Enteritis) فوجد ان النمطين المصليين O_3 و O_{26} اكثر تكراراً مقارنة مع بقية الأنماط، بينما لوحظ في دراسة أخرى ارتفاع تكرار النمط المصلي O_3 في إصابات البشر (Delouvios., 1969).

وقد أجريت دراسة لفصل أنماط المستضد الجسمي لسلاطات *P.mirabilis* عن سلاطات *P.vulgaris* الموصوفة من قبل مخطط Perch وقد وجد ان هنالك ٢٧ مستضداً جسياً لبكتريا *P.mirabilis* و ١٧ مستضداً جسياً لبكتريا *P.vulgaris* كما وجد ان الأنماط المصلية O_3 و O_6 و O_{10} و O_{29} و O_{30} في مجاميع بكتريا *P.mirabilis* اكثر تكراراً من غيرها (Penner and Hennessy., 1980). بينما لوحظ حديثاً أن النمطين المصليين O_{24} و O_{29} شائعان في العينات

السريرية كما لوحظ تفاعل مضاد *P.mirabilis* لمصل O₂₄ تصالبياً مع عديد السكريد الشحمي للنمط المصلي O₂₉ (Literacka *etal.*, 1999).

١- ١٠- ١- ٣- التتميط بالعائى Phage typing :

تتباين البكتريا في حساسيتها تجاه التحلل بالعائى (Bacteriophage) لذا يشخص نمط العائى (Phage Type) بالاستناد إلى نمط الحساسية لعدد من العائيات المحللة. ويستخدم التتميط بالعائيات بشكل واسع في تفريق سلالات الأجناس *Staphylococcus* و *Salmonella* و *P.mirabilis* (Murray *etal.*, 1999).

تعد دراسة Farmer و Hickman من أوسع الدراسات في التتميط باستخدام العائيات حيث استخدموا ٢٣ عائياً اختيروا من بين ٨٢ عائياً لتعيين النمط الوبائى لـ *P.mirabilis* في مركز اتلانطا للسيطرة على الأمراض (Penner., 1981).

تم مؤخراً تصميم مخطط جديد للتتميط بالعائى لبكتريا *P.mirabilis* و *P.vulgaris* بالاعتماد على خصائص التحلل (Lytic Properties) لواحد وعشرين عائياً بكتيرياً (Sekauinova *etal.*, 1998).

١- ١٠- ١- ٤- Bacteriocin Typing :

تنتج بكتريا المتقلبات البكتيريوسين والذي يطلق عليه في المتقلبات بروتسين (Proticine) وقد استخدم بشكل شائع في نظم التتميط (Senior., 1983) (Senior., 1999).

البكتيريوسين هو مادة مضادة للبكتريا تنتج من قبل معظم الأنواع البكتيرية وهو فعال تجاه سلالات الجنس نفسه وكذلك السلالة المنتجة نفسها (Greenwood *etal.*, 1997) وصف Watson و Cradock عام (١٩٦٥) عشرة أنواع من البروتسين إلا أن AL-Jumaili (1975-a) أشار في دراسته إلى استخلاص ١٢ نوعاً من البروتسين باستخدام الوسط السائل وبإضافة مادة محثة وهي Mitomycin C.

١ - ١٠ - ١ - ٤ - ١ تركيب جزيئة البروتسين وأثره على فعاليتها:

أشار Senior (١٩٧٩) ان السلالات المنتجة للبروتسين نوع ٣ تعزل بشكل شائع في إصابات الجزء العلوي من المجرى البولي.

درس Senior (١٩٨٣) تنقية البروتسين ٣ وتركيبه وتصنيعه في سلالات *P.mirabilis* فوجد أن الفعالية الحيوية للبروتسين ٣ ترتبط بتركيبه الشبيه بذنب (Tail) العائى البكتيري.

يكون شكل بروتسين ٣ في بداية إنتاجه بشكل المسامير (nails) بطول ١٢٨٠ انكستروماً وعرض ١٨٢ انكستروماً يحتوي عل نهاية مدببة والنهاية الأخرى مسطحة تلتصق عليها ألياف طويلة أودبابيس. إلا أن هذا الشكل غير مستقر ويتحول إلى الشكل غير الفعال (شكل الصاروخ الناري Rocket). كما أشارت الدراسة نفسها إلى ان البروتسين يتألف من ١١ بروتيناً وظهر من خلال الترحيل على الهلام باستخدام SDS-Polyacrylamide اثنين من هذه البروتينات الرئيسية أساسية بأوزان جزيئية 49×10^3 و 34×10^3 اما التسعة الباقية فهي ثانوية. إلا أن الفعالية الحيوية للبروتسين ترتبط بالبروتين ذي الوزن الجزيئي 58×10^3 . ويمتاز البروتسين بأنه قليل الانتشار في الاغار وانه يتحول من الشكل الفعال (nail) إلى الشكل غير الفعال (Rocket) أثناء خزنه بدرجة حرارة ٤ م.

إن هذا الشكل الذي يظهر عليه البروتسين مهم لغرض التماس مع مستقبلات خاصة على سطح الخلية البكتيرية.

١ - ١٠ - ١ - ٤ - ٢ استخدام البروتسين في التتميط:

لقد لاحظ Cradock و Watson ان ٦١% من بكتريا *P.mirabilis* و ١٠% من *P.vulgaris* تكون منتجة للبروتسين على الوسط الصلب (AL-Jumaili., 1975-a).

استخدم Senior (1977) الأنماط العشرة القياسية للبروتسين الموصوفة من قبل Cradock و Watson في التتميط إلا انه اعتمده طريقة Proticin Production/Proticine Sensitivity P/s) أي السلالة المنتجة وحساسيتها تجاه البروتسينات القياسية فوجد ٩٠ نمطاً مختلفاً بينما وجد ٤٠ نمطاً على أساس الحساسية للبروتسين و ٢٠ نمطاً فقط على أساس إنتاج البروتسين. وذلك من مجموع ٢٥٠ عزلة *P.mirabilis*.

وفي دراسة أخرى وجد Senior (1979) ٩٧ نمطاً مختلفاً من البروتسين لمجموع ٢٤١ سلالة من *P.mirabilis* وكانت ٧٥% من السلالات منتجة للبروتسين وقد أشار إلى وجود أنماط معينة من بكتريا *P.mirabilis* لها الفة خاصة في إصابة المجرى البولي كما انه لا توجد علاقة بين نمط البروتسين وعمر المريض أو جنسه.

لوحظ عدم تغير نمط حساسية العزلات عند خزنها على مائل الاغار المغذي بعد إعادة الاختبار لشهور عدة، ولوحظ أيضاً انه لا يمكن ان تتواجد اكثر من سلالة في المريض الواحد في الوقت نفسه (AL-Jumaili., 1975-a).

يعد التنميط بالبروتسين من اكثر الطرق ثباتاً واستقلالاً عن غيرها من طرق التنميط كالتنميط المصلي O-serotyping كما إنها طريقة مميزة لتنميط سلالات *P.mirabilis* (Senior., 1997-b) (Senior., 1979).

كما وجد من خلال دراسة أخرى انه لا توجد علاقة بين نمط البروتسين والقدرة على التلازن ووجود الخملة كقياس للالتصاق (Adegbola *etal.*, 1983).

أشار Szymaniak وجماعته (١٩٩٩) الى وجود علاقة بين نمط البروتسين (P/S) لبكتريا *P. mirabilis* المعزولة من التهابات المجاري البولية وبين مقاومتها للعلاج بمضادات الحياة حيث لوحظت أنماط معينة من P/S أكثر تكراراً من غيرها بالاضافة الى كونها منتجة لانزيم البييتالاكتاميز (ESBL Producers).

وفي دراسة لسلالات *P.mirabilis* المعزولة من ٤٩ مريض بالتهابات المفاصل الرثوي RA و٤٤ شخص سليم استخدموا كسيطرة، اختبرت السلالات تجاه ثلاثة عشر سلالة قياسية من *P.mirabilis* وجد ان جميع السلالات في مرضى RA منتجة للبروتسين ومعظمها من النوع ٣ وقد وجد عدد قليل من الأنماط المختلفة للبروتسين في سلالات مرضى RA مقارنة مع سلالات الأشخاص الأصحاء (Wilson *etal.*, 1998).

١- ١٠- ٥- Dienes typing

استخدم دنييس لأول مرة عام ١٩٤٦ ظاهرة الانثيال في الكشف عن التشابه بين السلالات المختلفة حيث لاحظ ان السلالات المتشابهة من بكتريا المتقلبات تتداخل مستعمراتها النامية مع بعضها البعض بدون وجود حد فاصل (Demarcation) عند انثيالها. بينما اعتبرها غير متشابهة (نتيجة موجبة) عند وجود حد فاصل بين المستعمرتين (line demarcation) واستخدمت هذه الظاهرة في تنميط السلالات (Delouvios., 1969) (Tracy and Thomson.,1972).

لقد اثبت Delouvios (١٩٦٩) ان ٦١% من السلالات المنمطة مصلياً بالإضافة إلى نمط دنييس والمعزولة من الإدراز وعينات الخروج من المريض نفسه كانت متطابقة مما يشير إلى ان الإصابة نتجت من الأمعاء.

استخدم Pfaller وجماعته (٢٠٠٠) التنميط باختبار دنييس والتنميط الريبي (ribotyping) فوجدوا ١٣ نمطاً من أنماط دنييس لمجموع ٢٣ عزلة و ١٢ نمطاً ريبياً (ribotype). وأكد الباحثون في الدراسة نفسها ان التنميط باختبار دنييس والتنميط الريبي طريقتان مهمتان في تشخيص السلالات المفردة لبكتريا *P.mirabilis* كما أشار إلى بساطة اختبار دنييس وسهولته وقلة تكاليفه حيث يمكن لاي مختبر ان يجري هذا التنميط كما يجب استخدامه في الدراسات الوبائية لعزلات *P.mirabilis*.

فسرت ظاهرة دنييس ان تكوّن الحد الفاصل بين المستعمرتين هو سبب إنتاج مادة البروتسين وهذا يعني أن جميع السلالات المنتجة للبروتسين يجب أن تعطي كشفاً موجباً إلا أن ذلك لم يظهر في كل الدراسات كما أشارت الدراسة نفسها إلى أن هذه الظاهرة قد تعود إلى التركيب المستضدي H لسلالات *P.mirabilis* (Tracy and Thomson., 1972).

أكد Senior و Larsson (١٩٨٣) على أهمية استخدام تنميط دنييس للسلالات التي تفشل طرائق التنميط الأخرى في تصنيفها.

١ - ١٠ - ٢ التقنيات الوراثية **Genotypic Techniques**:

ظهرت في السنوات الأخيرة أنظمة للتمييز على المستوى الجزيئي طبقت في الدراسات الوراثية التصنيفية ومن أهمها تحليل النمط البلازميدي إضافة إلى التمييز الريبي وتحليل تتابع النيوكليوتيد (Nucleotide sequence analysis) وتهجين DNA مع DNA وتهجين rRNA مع DNA (Murray *et al.*, 1999).

رغم محدودات استخدام النمط البلازميدي في التمييز بسبب قدرة البلازميدات على الانتقال تلقائياً بين السلالات وفقدان بعض السلالات للبلازميدات إلا أن استخدام النمط البلازميدي في التحري عن وجود مؤشرات وبائية ما زال يستخدم في تمييز سلالات الأنواع التابعة للعائلة المعوية وبكتريا *Staph. aureus* وغيرها. حيث تشير الدراسات مؤخراً إلى استخدام الإنزيمات القاطعة في الكشف عن النسق البلازميدي (David and McCumber., 1986) (Murray *et al.*, 1999) إذ وجد من خلال الدراسة أن سلالات بكتريا الكلبسيلا المعزولة من مستشفيات عدة أظهرت تماثلاً وتشابهاً في محتواها البلازميدي من حيث العدد والحجم الجزيئي. كما وجد في دراسة أخرى استخدم فيها الإنزيم Hind III لتقطيع خمسة بلازميدات معزولة من خمسة أنواع مختلفة من البكتريا فوجد إنها تعطي النمط نفسه في مواقع التقطيع وهو دليل قاطع على تشابه هذه البلازميدات (Rubens *et al.*, 1981).

أما التمييز الريبي (ribotyping) فهي طريقة عامة في التشخيص الجزيئي للبكتريا، كما إنها أداة تصنيفية مهمة تعطي معلومات دقيقة عن إمكانية التمييز بين المسببات الداخلية والمسببات الخارجية للإصابة (Guth *et al.*, 1999).

تتضمن هذه التقنية تقطيع الدنا الكروموسومي بأنزيمات قاطعة وتهجينها مع قطع rRNA معلمة (Murray *et al.*, 1999). يعد التمييز الريبي طريقة حساسة في التوصيف الجزيئي للأجناس *Proteus* و *Morganella* و *Providencia* وكذلك الأنواع العشرة التابعة لها. فقد تم فصل سلالات هذه الأجناس إلى مجموعات ريبية عدة (ribogroups) باستخدام الأنزيمات القاطعين EcoRV و Hinc II فقد وجدت مجموعتان ريبيتان تعودان إلى بكتريا *P. vulgaris* وأربع مجموعات باستخدام

EcoRV لبكتريا *P.rettegeri* وهكذا. كما أشارت الدراسة نفسها إلى وجود اختلافات ثانوية ضمن الأنماط العائدة لسلاسل المجموعة الريبية نفسها (Pignato *etal.*,1999).

١١-١ تحليل النسق البروتيني Protein Profile Analysis:

تعد دراسة النسق البروتيني للخلية البكتيرية دراسة غير مباشرة لنسخة الجينوم في الخلية كما ان الحصول على نسق البروتينات في الخلية يدعى (Protein electrophorogram) وبعد بمثابة طبعة الإصبع للسلاسل التي يتم التحري عنها حيث ان السلاسل البكتيرية التي تنمى في ظروف متماثلة تعطي دائماً أنواعاً من البروتينات متماثلة. ومن الناحية النظرية ان فقدان أو اكتساب البلازميدات من السلاسل البكتيرية يمكن ان يؤثر على النسق البروتيني (Good fellow *etal.*, 1985).

لقد أثبتت طريقة ترحيل البروتين الذائب على هلام SDS-Polyacrylamide بأنها أداة قوية في الدراسات التصنيفية للبكتريا كما إنها طبقت وبنجاح لتشخيص وتصنيف أنواع مختلفة من البكتريا على أساس الاختلافات في النسق البروتيني مثل الأنواع التابعة لجنس *Streptomyces* (Gottlieb and Hepden.,1966) و *Mycoplasma* (Daniels and Meddins., 1973) و *Brucella* (Morris., 1973) و *Agrobacterium* (Kersters and Deley., 1975) و *Pediococcus* (Barros *etal.*, 2001).

لقد أشار Good fellow وجماعته (١٩٨٥) إلى حساسية تقنية فصل البروتينات الخلوية بالترحيل الكهربائي إضافة إلى كونها تعطي معلومات واضحة عن التشابه بين السلالات ضمن الأنواع وتحت الأنواع Subspecies واستخدمت بشكل واسع في الدراسات التصنيفية. بينما أشار Barros وجماعته (٢٠٠١) إلى إنها تقنية تعطي نتائج قطعية في التوصيف الجزيئي لسلاسل البكتريا وتحديد الاختلافات بين الأنواع ومصادرها السريرية والإصابات الناتجة عن هذه البكتريا.

١- ١١- ١ الطرائق المستخدمة لتكسير الخلايا البكتيرية:

هناك وسائل عدة لتكسير الخلايا البكتيرية لغرض الحصول على البروتين الذائب الكلي فقد استخدم مزيج الفينول وحامض الخليك والماء بنسبة (١:٢:٤) (Morris., 1973) والأمواج فوق

الصوتية بعد معاملة الخلايا بأنزيم ديوكسي رايونيوكلبيز (٠,٠٠١%) حيث تعرض الخلايا إلى ٢ دقيقة لكل فترة ولثلاث مرات ثم ترسب الخلايا بالطرد المركزي على ان تكون ظروف الاستخلاص في درجة حرارة ٤ م (Kerstes and Deley., 1975). أويتم معاملة الخلايا بالايوسوزايم (Barros *etal.*, 2001). أومعاملة الخلايا بدارئ يحتوي على نسب معينة من Tris-cl و glycerol و SDS بالإضافة إلى beta mercaptoethanol وتضاف صبغة البروموفينول الأزرق لمتابعة الترحيل (Fajardo *etal.*, 1996) وفي كل هذه الطرق يتم الحصول على البروتين الذائب الكلي للخلية.

ان المعلومات التصنيفية التي يتم الحصول عليها تعتمد على ظروف تحضير العينة البروتينية ومبادئ الفصل بالترحيل الكهربائي (Good fellow *etal.*,1985).

١- ١١- ٢ الترحيل الكهربائي على هلام SDS-Polyacrylamid:

رغم اختلاف طرائق الترحيل الكهربائي إلا أن هنالك تشابهاً في مبادئ الترحيل حيث استخدم بعض الباحثين حامض الخليك واليوريا مع هلام الاكرالاميد (Morris., 1973) أو الطريقة التقليدية بدون SDS (Conventional) (Kerstes and Deley., 1975) إلا أن الطريقة الأمثل في الحصول على الحزم البروتينية لأكبر عدد ممكن من البروتينات هي استخدام الترحيل الكهربائي في ظروف ماسخة للبروتين وإضافة SDS حيث يعتمد هذا النوع من الفصل للبروتينات على الهلام على حجم الجزيئات فقط مما يجعل مجالاً واسعاً للمقارنة بين بروتينات السلالات البكتيرية من الناحية التصنيفية.

أما الطريقة الاعتيادية (بدون إضافة SDS) فانها تسمح للبروتينات بالانفصال على أساس الشحنة والحجم (Good fellow *etal.*, 1985).

ان التركيز الأمثل لهلام الاكرالاميد هو ١٠% حيث يقوم بفصل مدى واسع من الأوزان الجزيئية للبروتين الواطئة والعالية. بينما يستخدم التركيز ١٢%-١٥% لفصل الأوزان الجزيئية التي تقل عن 20 KDa (كيلودالتون) والتركيز ٧,٥% يستخدم لفصل البروتينات ذات الأوزان الجزيئية التي تزيد عن 100 000KDa (Kornhnen *etal.*, 1985).

أما الصبغات المستخدمة في تصبيغ الحزم البروتينية فهناك أنواع عدة فمن الباحثين من استخدم صبغة Amido black وهي صبغة عامة للبروتين (Gottlieb and Hepden., 1966) (Morris., 1973) بينما استخدمت صبغة Coomassie Blue في دراسات أخرى وهي صبغة شائعة الاستخدام أما صبغة Silver nitrate وهي صبغة حساسة ١٠٠ مرة أكثر من صبغة Coomassie Blue فهي تستخدم عادةً لتصبغ متعدد السكريد الشحمي وتتحسس الأوزان الجزيئية الواطئة من البروتينات (Korhonen *et al.*, 1985).

١-٢ المواد والأجهزة:

٢- ١- ١- الأجهزة والأدوات المستخدمة:

اسم الجهاز	الشركة المجهزة
١ فرن كهربائي	Gallen Kamp (England)
٢ موصدة	Daikyo
٣ ميزان	Mettler (switzerland)
٤ ميزان حساس	Sartorius
٥ حمام مائي هزاز	Precision
٦ مجهر ضوئي مركب	Olympus (Japan)
٧ حاضنة	Haraeus
٨ مازج	Jenkons
٩ جهاز منبذ	M. S. E.

M. S. E.	جهاز منبذ دقيق	١٠
CECIL	مطياف ضوئي	١١
Pye-unicom	مقياس الأس الهيدروجيني	١٢
BOGM	مضخة تفريغ	١٣
BandT	المحرك المغناطيسي	١٤
LKB	جهاز ترحيل الدنا	١٥
BIO RAD (Italy)	مجهر القدرة	١٦
LKB	جهاز ترحيل البروتين	١٧
UVP (USA)	جهاز فحص عينات الدنا	١٨
Millipore Corporation	وحدة الترشيح دقيق المسام	١٩
U. S. A	ماصة دقيقة	٢٠

٢- ١- ٢ المواد الكيميائية:

الشركة المجهزة	المادة
BDH (England)	Acetic acid
BIO-RAD	Acrylamide
Fluka (switzerland)	Agar-Agar
Fluka	Agarose
DIFCO (England)	Alanine
DIFCO (England)	Arginine
BIO-RAD (Italy)	Ammonium persulphate
BDH (England)	Barium chloride dihydrate (BaCl ₂ -H ₂ O)
BDH (England)	Bis-acrylamide
BDH (England)	Boric acid
BDH (England)	Bromocresol purpule
BDH (England)	Bromophenol blue
BDH (England)	Butanol
BDH (England)	D. glucose
Riedal- Dehonageelze	Disodium ethylene diamine
Difco	Dulcitol
(Germany)	Tetra acetic acid (Na ₂ -EDTA)
Ajax (Australia)	Ethanol (99%)
Sigma (U. S. A)	Ethidium bromide

DIFCO (England)	Glutamic acid
BDH (England)	Glycerol
DIFCO (England)	Glycine
DIFCO (England)	Isoleucin
BDH (England)	Lactose
Sigma (U. S. A.)	Lysine

الشركة المجهزة	المادة
Sigma (U.S.A.)	L. Ornithine
Sigma (U. S. A.)	Lysozyme
BDH	Maltose
BDH	Melibiose
DIFCO	Peptone
BDH	Phenol
BDH	Potassium acetate
DIFCO	Rhamnose
BDH	Rhaffinose
Fluka	SDS
BDH	Sucrose
BDH	Trehalose
Merck (Germany)	Tris- base
Fluka	<i>Tris- HCl</i>
BDH	Triton x-100

Sigma	Tryptophan
Ajax	Urea
BDH	Xylose

مواد مختلفة

المواد	الشركة المجهزة
Human Blood (Type 0)	Teaching Laboratories/Baghdad Hospital
Sterile Swabs	Medical Wire and Equipment co. (England)
Parafilm (m)	American National com (U.S.A)
Normal Saline	Medical equipment co./ Baghdad.

Antibiotic Powders مساحيق مضادات الحياة

الشركة المجهزة	مضادات الحياة
S.D.I (Iraq)	Ampicillin
S.D.I (Iraq)	Tetracycline
Biochemie Gesellschaft M.b.H Wien/Austria	Streptomycin

أقراص مضادات الحياة Antibiotic discs

الشركة المجهزة	مايكروغرام	الرمز	Aminoglycoside	ت
Sigma	٣٠	Gm	Gentamicin	١
الرازي	١٠	N	Neomycin	٢
الرازي	١٠	Sm	Streptomycin	٣
Oxoid	٣٠	Tm	Tobramycin	٤
الشركة المجهزة	مايكروغرام	الرمز	Penicillin	ت
Sigma	٢٥	Am	Amoxicillin	١
Oxoid	٣٠	Ax	Ampiclox	٢
Oxoid	10 Units	PG	Penicillin G	٣
Oxoid	١٠٠	PRL	Piperacillin	٤
الشركة المجهزة	مايكروغرام	الرمز	Cephalosporins	ت
الرازي	٣٠	Cxm	Cefotaxime	١
الرازي	٣٠	KF	Cephalexin	٢
الرازي	٣٠	CF	Cephalothin	٣
الشركة المجهزة	مايكروغرام	الرمز	Quinolone	ت
Oxoid	20	NA	Nalidixic acid	١
الشركة المجهزة	مايكروغرام	الرمز	Fluroquinolone	ت
الرازي	5	CIP	Ciprofloxacin	١

الشركة المجهزة	مايكروغرام	الرمز	Lincosamide	ت
Oxiod	10	L	Lincomycin	١
Oxiod	٢	DA	Clindamycin	٢
الشركة المجهزة	مايكروغرام	الرمز	Isoniazid	ت
Oxiod	5	Rf	Rifampicine	١
الشركة المجهزة	مايكروغرام	الرمز	Tetracyclin	ت
Oxiod	30	Te	Tetracycline	١
الشركة المجهزة	مايكروغرام	الرمز	Macrolide	ت
Oxiod	15	E	Erythromycin	١

٢- ١- ٣ طرق التعقيم **Sterilization Methods**:

٢- ١- ٣- ١ التعقيم بجهاز الموصدة **Autoclave**: تم تعقيم جميع الأوساط الزرعية والمحاليل التي لا تتلف بالحرارة باستخدام الموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة ١٢١م وضغط ١ جو ولمدة ١٥ دقيقة. أما حليب الفرز والمحاليل التي تتلف عند تعرضها للحرارة مدة طويلة فعقمت بالجهاز نفسه ولكن لمدة ٥-١٠ دقائق فقط.

٢- ١- ٣- ٢ التعقيم بالترشيح: تم تعقيم الأوساط والمواد التي تتلف بالحرارة كاليوريا ومضادات الحياة والسكريات باستخدام أغشية الترشيح الدقيق (0.2 µm, 0.45 µm millipore filters).

٢- ١- ٣- ٣ التعقيم بجهاز الفرن الكهربائي **Oven**: تم تعقيم جميع الزجاجيات والأدوات المختبرية باستخدام الفرن الكهربائي عند ١٨٠-٢٠٠ م ولمدة ساعتين.

٢- ١- ٤ تعديل الأس الهيدروجيني: يتم تعديل الأس الهيدروجيني لجميع الأوساط والمحاليل الكيماوية باستخدام (Fluka)(1N NaOH) لرفعه او (BDH)(1N HCl) لخفضه او جعله متعادلاً.

٢- ١- ٥ الأوساط الزرعية للعزل والإدامة:

٢- ١- ٥- ١ اغار الدم: حضر وسط أساس الدم حسب تعليمات الشركة المجهزة (oxid) عدل الأس الهيدروجيني إلى ٧,٣. عقم بالموصدة ثم برد إلى ٤٥ م. أضيف ٧% دم إنسان إلى وسط أساس الدم. استخدم هذا الوسط للكشف عن ظاهرة الانثيال.

٢- ١- ٥- ٢ اغار ماكونكي: حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (biolife) واستخدم لتشخيص البكتريا السالبة لملون غرام. ومعرفة قدرة البكتريا على تخمير اللاكتوز. كما استخدم الوسط في الكشف عن قابلية البكتريا في إنتاج البروتيسين.

٢- ١- ٥- ٣ الآغار المغذي: حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (oxid) واستخدم لحفظ وإدامة العزلات.

٢- ١- ٥- ٤ المرق المغذي: حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (oxid) واستخدم

لتنمية العزلات وحفظها واستخدم لتعليق البكتريا وتنشيط العزلات لنقلها إلى الأوساط الزرعية الأخرى.

٢- ١- ٥- ٥ اغار نقيع القلب والدماغ: حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (oxid)

واستخدم كوسط اغنائي لتنشيط العزلات.

٢- ١- ٥- ٦ مرق نقيع القلب والدماغ: حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة

(oxid)

٢- ١- ٥-٧ اغار مولر هنتون:

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (Oxoid) واستخدم في تنمية العزلات لغرض دراسة حساسيتها تجاه مضادات الحياة.

٢- ١- ٥-٨ مرق واغار (Luria Broth, Luria agar) L (Sambrooke etal., 1989)

حضر بإضافة الأوزان الآتية: ١٠ غرامات ببتون، ٥ غرامات خلاصة الخميرة و ٥ غرامات كلوريد الصوديوم إلى ٨٠٠ مللتر من الماء المقطر. عدل الأس الهيدروجيني إلى ٧,٥ باستخدام (1N NaOH) واكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر ثم عقم بالموصدة. استخدم في تنمية العزلات الحاوية على البلازميد بعد إضافة مضاد الحياة Ampicillin وبتركيز $100 \mu\text{g/ml}$ او Tetracycline وبتركيز $100 \mu\text{g/ml}$.

٢- ١- ٦- الأوساط والمحاليل المستخدمة في التشخيص:٢- ١- ٦-١: Salmonella-shigella agar

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (Oxoid) واستخدم في الكشف عن قابلية البكتريا في إنتاج كبريتيد الهيدروجين H_2S .

٢- ١- ٦-٢ اغار اليوريا:

حضر ٩٥٠ مللتر من أغار أساس اليوريا (Christensen's media) حسب تعليمات الشركة المجهزة ثم عقم بالموصدة وبرد إلى ٥٠ م. أضيف ٥٠ مللتر من محلول ٤٠% يوريا (BDH) معقم بالترشيح. نقل الوسط إلى أنابيب معقمة وثبت بشكل مائل. استخدم الوسط في الكشف عن قابلية البكتريا في إنتاج انزيم اليوربيز.

٢- ١- ٦-٣: Triple sugar Iron agar

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (Difco) وعدل الأس الهيدروجيني إلى ٧,٣ استخدم في الكشف عن قابلية البكتريا على تكوين غاز كبريتيد الهيدروجين.

٢-١-٤ وسط Cystine Lactose Electrolyte Dificient :medium (CLED)

حضر حسب وصف (Mackey and Sandys., 1966) ويتكون هذا الوسط من ٠,٤% بيتون، ٠,٤% تريبتون، ١% لاكتوز، ٠,١٢٨% L-Cystiene، ٠,٣% خلاصة اللحم و ٠,٥% كازئين. أذيبت المكونات في محلول فوسفات البوتاسيوم الدائري ليكون الأس الهيدروجيني ٧,٠ أضيف الاغار بنسبة ٢,٥%.

حور الوسط باستبدال الكازئين بالكولاجين او الايلاستين وبتركيز ٠,٥% عقم الوسط بالموصدة لمدة ١٥ دقيقة ودرجة ١٢١م. أما عند إضافة حليب الفرز (Skim milk) (oxid) عقم الحليب لمدة ٥ دقائق ثم أضيف إلى وسط CLED بعد ان برد وبتركيز ٢% (senior., 1999) استخدم الوسط في الكشف عن انزيم البروتيز.

٢-١-٥ وسط الجلاتين (Collee et al., 1996):

حضر بإذابة ١٢ غراماً من مادة الجلاتين (Difco) Gelatin Powder في ١٠٠ مللتر من المرق المغذي واستخدم الوسط في الكشف عن قابلية البكتريا في إنتاج الجلاتينيز.

٢-١-٦ وسط Phenyl alanine

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (oxid) يوزع في أنابيب اختبار استخدم هذا الوسط في الكشف عن إنتاج Phenylalanin deaminase.

٢-١-٧ وسط الحركة (Collee et al., 1996):

حضر بإضافة ٠,٤% اغار-اغار إلى المرق المغذي وزع في أنابيب اختبار بواقع ١٠ مللتر استخدم في الكشف عن قابلية البكتريا على الحركة.

٢- ١- ٦- ٨ وسط الكشف عن إنتاج **Lipase** (Cowan and steel., 1974):

حضر من إضافة ١ مللتر من زيت عباد الشمس إلى ١٠٠ مللتر من الاغار المغذي أضيفت أملاح الصفراء بنسبة ٠,٣% لتنشيط الحركة وعقم بالموصدة. استخدم هذا الوسط في الكشف عن إنتاج الـ lipase.

٢- ١- ٦- ٩ وسط **Simon Citrate**:

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (Difco) استخدم لاختبار قدرة البكتريا في استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون.

٢- ١- ٦- ١٠ اغار التريتوفان (Penner., 1981):

حضر من إذابة ٢ غرام تريتوفان في ١٠٠ مللتر من الاغار المغذي وعقم بالموصدة. تم صبه في أطباق معقمة. استخدم هذا الوسط في الكشف عن قابلية إنتاج الصبغة البنية من قبل العزلات.

٢- ١- ٦- ١١ ماء البيبتون:

حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (Difco) واستخدم في اختبارات تخمر السكريات وفي اختبار الاندول.

٢- ١- ٦- ١٢ وسط الأوكسدة-الاختزال (**O/F medium**) (Collee et al., 1996):

حضر وسط شبه صلب يتكون من ٢ غرام بيتون، ٥ غرام كلوريد الصوديوم، ٠,٣ غرام K_2HPO_4 وأضيف إليه ٣ مللتر من محلول كاشف بروموثايمول الأزرق بتركيز ١%. ثم عدل الأس الهيدروجيني إلى ٧,١ باستخدام (NaOH 1N) قبل إضافة الكاشف ثم أضيف ٣ غرام من الاغار -

- البلور البنفسجي (Fluka).
- أيودين (LTD).
- إيثانول (BDH).
- سفرانين (Fluka).

٢- ١- ٧- ٢ كاشف الاوكسيداز (Collee et al., 1996):

حضر من إذابة ١ غرام من مادة Tetra methyl-p phenyldiamine dihydrochloride في ١٠٠ مللتر من الماء المقطر. استخدم للكشف عن إنتاج أنزيم الاوكسيداز من قبل الجرثومة.

٢- ١- ٧- ٣ كاشف الكاتالاز (Collee et al., 1996):

يتألف من محلول بيروكسيد الهيدروجين (Fluka)H₂O₂ بتركيز ٣%. استخدم للكشف عن إنتاج الكاتالاز من قبل الجرثومة.

٢- ١- ٧- ٤ محلول كاشف الميثيل الأحمر (Collee et al., 1996):

حضر من إذابة ٠,١ غرام من الميثيل الأحمر (oxid) في ٣٠٠ مللتر كحول ايثيلي أولاً. بعدها أضيف ٢٠٠ مللتر ماء مقطر.

٢- ١- ٧- ٥ محلول كاشف Voges-Proskauer (Collee et al., 1996):

حضر من:

- ١- VP₁ (40%) هيدروكسيد البوتاسيوم (BDH) في الماء المقطر.
- ٢- VP₂ (5%) الفانفثول (BDH) في كحول ايثيلي مطلق.

٢- ١- ٧- ٦ كاشف كوفاك (Collee et al., 1996):

حضر من إذابة ١٥ مللتر كحول ايزواميلي و ١ غرام Para-dimethyl amino benzaldehyde و ٥ مللتر من حامض HCl مركز (يذوب الالديهيد تدريجياً في الكحول ثم أضيف

الحامض المركز بحذر وبالتدريج وحفظ في الثلاجة بعد التحضير). استخدم للكشف عن تكون الاندول.

٢- ١- ٧- ٧- محلول Mcfarland القياسي للكثافة (WHO., 1987):

حضر من إضافة ٠,٥ مللتر من ٠,٠٤٨ مولاري (١,٧٥% وزن/حجم) كلوريد الباريوم المائي ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) إلى ٩٩,٥ مللتر من ٠,٣٥ مولاري NH_2SO_4 (١% حجم/حجم) حفظ المحلول في أنبوب محكم الغلق وفي مكان مظلم.

٢- ١- ٧- ٨- محاليل الكشف عن أنزيمات β .Lactamases (WHO., 1978):

٢- ١- ٧- ٨- أ داريء الفوسفات:

محلول (١) حضر من إذابة ٠,٩٠٧ غرام من KH_2PO_4 في ٩٠ مللتر ماء مقطر ثم أكمل الحجم بالماء المقطر الى ١٠٠ مللتر.

محلول (٢) حضر من إذابة ٠,٩٤٦ غرام من Na_2HPO_4 و ١,١٩ غرام من $NaHPO_4 \cdot 2H_2O$ في ٩٠ مللتر ماء مقطر ثم أكمل الحجم الى ١٠٠ مللتر.

تم مزج ٨٧,٦ مللتر من محلول (١) مع ١٢,٣ مللتر من محلول (٢) عدل الأس الهيدروجيني الى ٦,

٢- ١- ٧- ٨- ب- محلول البنسلين G:

أذيب ٠,٥٦٩٣ غرام من Penicillin G بداريء الفوسفات (٢-١-٧-٨-أ) ثم رشح وخرن بدرجة ٤ م.

٢- ١- ٧- ٨- ج- محلول اليود:

حضر من إذابة ٢,٠٣ غرام يود و ٥,٣٢ غرام يوديد البوتاسيوم في ٩٠ مللتر ماء مقطر ثم أكمل الحجم الى ١٠٠ مللتر بالماء المقطر وخرن بدرجة ٤ م.

٢- ١- ٧- ٨- د- محلول النشا:

حضر أنيا من إذابة ١ غرام من النشا الذائب في ١٠٠ مللتر من الماء المقطر.

٢- ١- ٨- API (API bio-Merieux) 20 E:

تتكون عدة الـ API 20 E من:

٢- ١- ٨- شريط الاختبارات The Gallery:

إن شريط الاختبارات عبارة عن شريط بلاستيكي فيه عشرون خانة صغيرة الحجم تحتوي كل منها على مكونات لمواد تفاعل منزوعة الماء (dehydrated reactive ingredients) يثبت الشريط داخل الوعاء (الحافظة) (Tray) المخصصة له.

٢- ١- ٨- ٢- كواشف API 20 E Reagents API 20 E:

١- كاشف كوفاك.

٢- كاشف Vogues-Proskauer.

٣- كلوريد الحديد ٣,٤%.

٤- كاشف الاوكسيداز.

٢- ١- ٩- مواد ومحاليل عزل الدنا البلازميدي (Sambrook *etal.*, 1989):

٢- ١- ٩- ١- السلالات البكتيرية (Bacterial strains):

عزلات محلية من *Proteus mirabilis* أطلقت عليها الرموز Pm1, Pm3, Pm5, Pm6, Pm8, Pm9, Pm11, Pm18, Pm22 إضافة إلى السلالات القياسية *E. coli* (HB101) التي استخلص منها البلازميد pBR322 كسيطرة لغرض المقارنة.

٢-٩-١-٢ الأوساط الزرعية (Culture Media):

- مرق وagar L (٢-١-٥-٨) مضافاً إليه (١٠٠) مايكروغرام لكل ملتر Ampicillin لتنمية الجرثومة المقاومة للمضاد.
- agar ماكونكي (2-5-1-2) لتنمية السلالة *E. coli* HB101 والتأكد من نقاوتها.

٢-٩-١-٣ محاليل استخلاص الدنا (DNA Extraction Solutions):

٢-٩-١-٣ أ-٣-٩-١-٢ (Holmes and Quigley., 1981) Boiling method:

٢-٩-١-٣ أ-٣-٩-١-٢ داري TE (Tris ٠,٠١ مـولاري EDTA ٠,٠٠١ مـولاري) بأس هيدروجيني ٨.

حضر من إذابة ٠,١٥٨ غرام Tris و ٠,٠٣٧٢ EDTA في ١٠٠ ملتر ماء مقطر. عدل الأس الهيدروجيني إلى ٨ بإضافة (HCl 0.1 N) ثم عقم بالموصدة استخدم في تعليق وغسل الخلايا الجرثومية وفي إذابة الدنا المحضر.

٢-٩-١-٣ أ-٣-٩-١-٢ محلول STET:

حضر حسب وصف (Holmes and Quigley., 1981) من ٨% Sucrose و ٥% Triton x-100، ٥٠ ملي مولارياً EDTA و ٥٠ ملي مولارياً Tris-base، عدل الأس الهيدروجيني إلى ٨ ثم عقم بالموصدة لمدة ١٠ دقائق وحفظ في الثلجة. استخدم في استخلاص الدنا البلازميدي من الخلايا الجرثومية.

٢-١-٩-٣-أ ٣ خـزـن مـحـلـول الـلايـسـوزايم (١٠ مـلـغـرام/مـلـتـر) (Holmes and Quigley., 1981).

حـضـر أنـيـا بإذابـة ٢٠ مـلـغـراماً مـن الـلايـسـوزايم فـي ٢ مـلـتـر مـن مـحـلـول STET (٢-١-٩-٣-أ) اسـتـخـدم لـغـرض تـحـلـيل الجـرثـومـة السـالـبـة لـمـلـون كـرام.

٢-١-٩-٣-أ ٤ مـحـلـول Buffered Phenol (Sambrook *etal* 1989):

حـضـر مـحـلـول Tris-Cl (٠,١ مـولـاري) بـاس هـيـدروـجـيني ٨,٠ وشـبـع بـالفـينـول..

٢-١-٩-٣-أ ٥ مـحـلـول فـينـول /كـلورفورم/كـحـول ايزوامـيلـي (Sambrook *etal.*, 1989):

حـضـر هـذا المـحـلـول وـفـق الآتـي ٥٠% فـينـول و ٤٨% كـلورفورم و ٢% كـحـول ايزوامـيلـي. اسـتـخـدم فـي تـتـقـيـة وإزـالـة البروتـين مـن الدنا البلازمـيدي.

٢-١-٩-٣-أ ٦ كـحـول اثـيلـي بـتـركـيز ٩٦%، ٧٠%:

اسـتـخـدم التـركـيز ٩٦% لـتـرسـيب الدنا والتـركـيز ٧٠% اسـتـخـدم لـغـرض غـسل الدنا المـتـرسـب.

٢-١-٩-٣-ب مـحـالـيل اسـتـخـلاص البلازمـيد **DNA** بـطـرـيـقـة التـحـلـيل بـالقـاعـدة **Alkaline**

Lysis

(Sambrook *etal.*, 1998):

٢-١-٩-٣-ب ١ دـارـئ الكـلـكـوز TEG:

حـضـر الدارـئ مـن ٠,٢٥ مـلي مـولـاري Tris-base، ١٠ مـلي مـولـاري EDTA، ٥٠ مـلي مـولـاري كـلـكـوز فـي المـاء المـقـطر. عـدل الأـس الهـيـدروـجـيني إـلى ٨ و عـقم المـحـلـول بـالتـرشـيح ثم حـفـظ فـي الثـلاـجـة. اسـتـخـدم المـحـلـول لـغـسل الخـلايا.

٢-١-٩-٣-ب ٢ مـحـلـول SDS ١%:

حـضـر فـي مـحـلـول NaOH (٠,٢ عـيارـي). اسـتـخـدم لـتـكـسـير الخـلايا البـكـتـيرـية.

٢-١-٩-٣-ب-٣ محلول خلات البوتاسيوم:

(٣ مولاري) عدل الأس الهيدروجيني لهذا المحلول إلى ٤,٨ باستخدام حامض الخليك الثلجي. عقم بالموصدة وحفظ في الثلجة.

٢-١-٩-٣-ب-٤ دارئ TES:

حضر من NaCl (١٠٠ ملي مولاري)، EDTA (١٠ ملي مولاري) Tris-HCl (١٠ ملي مولاري). عدل الأس الهيدروجيني إلى ٨ باستخدام (NaOH 1 N) ثم اكمل الحجم إلى ٢٥٠ مللترًا عقم بالموصدة وحفظ في الثلجة.

٢-١-١٠ المواد والمحاليل ذات العلاقة بالترحيل الكهربائي **Electrophoresis Solutions** (Sambrook *et al.*, 1989):

٢-١-١٠-١ خزین محلول دارئ ١٠X TBE:

حضر من إذابة ٨١ غراماً Tris-base، ٢٣,١٥ غراماً من حامض البوريك و ٤,٧٥ غرام من EDTA في ٢٠٠ مللتر من الماء المقطر و عدل الأس الهيدروجيني إلى ٨,٨ باستخدام 1 N HCl ثم اكمل الحجم إلى ٥٠٠ مللتر و عقم بالموصدة ثم حفظ في الثلجة. عند الاستخدام خفف بنسبة ١:١٠ بالماء المقطر.

٢-١-١-٢ خزين محلول بروميد الاثيديوم ١٠ ملغرام/مللتر:

حضر من إذابة ٥٠ ملغراماً من بروميد الأثيديوم في ٥ مللتر من الماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة.

٢-١-١-٣ هلام الاكاروز ٠,٨%:

حضر الهلام من إذابة ٠,٤ غرام من الاكاروز في ٥٠ مللتر من محلول خزين دارى TBE (٢-١-١-١) المخفف عشر مرات.

٢-١-١-٤ دارى التحميل (Sambrook *et al.*, 10x (Loading Buffer)

:1989)

حضر من ٥٠% كليرول و EDTA (٠,١ مولاري) بأس هيدروجيني ٨ و ٠,٢% من صبغة البرمو فينول الأزرق.

٢-١-١١ المواد والمحاليل المستخدمة في استخلاص البروتين:

٢-١-١١-١ الوسط الزراعى:

حضر حسب وصف (Kerstens and Deley., 1975) من إذابة ١٠ غرام كلوكوز، ١٠ غرام خلاصة الخميرة، ١ غرام $(NH_4)_2SO_4$ ، ٠,٢٥ غرام KH_2PO_4 ، ٢٥ غرام اغار في لتر من الماء المقطر عدل الأس الهيدروجيني إلى ٧,٢ وعقم بالموصدة.

استخدم الوسط لغرض تنمية الجرثومة المراد عزل البروتين منها.

٢-١-١١-٢ دارى الفوسفات الملحي (PBS) PH 7.0 (Atlas., 1995):

حضر كالاتي:

أذيب كل من كلوريد الصوديوم ٨ غرام و $(BDH) K_2HPO_4$ ١,٢١ غرام و $(BDH) KH_2PO_4$ ٠,٣٤ غرام في لتر من الماء المقطر. عقم بالموصدة، ثم برد. استخدم هذا الدارئ لتعليق وغسل الخلايا الجرثومية.

٢- ١- ١١- ٣- دارئ **Tris-HCl** (٣ ملي مولاري) بأس هيدروجيني ٧,٠:

حضر من إذابة ٠,٠٣٦٣ غرام من Tris-Cl في كمية من الماء المقطر ثم عدل الأس الهيدروجيني إلى ٧,٠ ثم اكمل الحجم إلى ١٠٠ مللتر. استخدم في غسل الخلايا الجرثومية.

٢- ١- ١١- ٤- دارئ **Tris-Cl** (٦,٤ ملي مولاري) بأس هيدروجيني ٨,٤:

حضر من إذابة ٠,٠٧٧٤ غرام Tris-Cl في كمية من الماء المقطر ثم عدل الأس الهيدروجيني إلى ٨,٤ ثم اكمل الحجم إلى ١٠٠ مللتر بالماء المقطر. استخدم في تعليق الخلايا الجرثومية لغرض تعريضها إلى الذبذبات فوق الصوتية.

٢- ١- ١١- ٥- **Streptomycin Sulphate**

أضيف بتركيز نهائي يبلغ ١,٥% إلى خلاصة الخلايا عند ترسيب الأحماض النووية لغرض التخلص منها.

٢- ١- ١٢- مواد ومحاليل الترحيل الكهربائي باستخدام هلام **SDS**

Polyacrylamide (Sambrook *etal*, 1989):

٢- ١- ١٢- ١- محاليل خزين تحضير الهلام:

أ- محلول خزين Acrylamide/Bisacrylamide (Sambrook *etal*., 1989).

حضر من إذابة ٣٠ غراماً من Acrylamide و ٠,٨ غرام Bisacrylamide في الماء المقطر وبحجم نهائي ١٠٠ مللتر، رشح المحلول بأغشية الترشيح ($0.45 \mu m$) خزن بدرجة حرارة ٤ م في قنينة مظلمة.

ب- دارئ هلام الفصل (١,٥ مولاري Tris-Cl يحتوي ٠,٤ SDS) 4X Tris-Cl/ SDS PH 8.8

حضر من إذابة ٩١ غراماً من Tris-base و ٢ غرام SDS في ٣٠٠ مللتر من الماء المقطر عدل الاس الهيدروجيني إلى ٨,٨ باستخدام HCl مركز. ثم اكمل الحجم إلى ٥٠٠ مللتر بالماء المقطر. رشح المحلول كما في الفقرة (أ) خزن بدرجة حرارة ٤ م.

ج- دارئ هلام الرص (٠,٥ مولاري Tris-Cl يحتوي ٠,٤ % SDS) 4X Tris-Cl/SDS PH 6.8
حضر من إذابة ٦,٠٥ Tris-base و ٠,٤٩ غرام SDS في ٤٠ مللتر من الماء المقطر عدل الاس الهيدروجيني باستخدام HCl مركز إلى ٦,٨ ثم اكمل الحجم إلى ١٠٠ مللتر ثم رشح المحلول وخزن كما في الفقرة ب.

د- TEMED (sigma) N.N.N. Ntetra methyle ethylene diamine أضيف بشكل مركز.

هـ Ammonium Per sulphate (Koronen *etal.*, 1985). حضر أنيا من إذابة ١ غرام من Ammonium persulphate في ١٠ مللتر من الماء المقطر.

٢- ١٢- ١- ٢- دارئ الترحيل المستخدم في حوض الترحيل 5X Electrode buffer (Sambrook *etal.*, 1989)

حضر من إذابة ١٥ غراماً Tris base و ٤٩ غراماً Glycine ثم أضيف ٥٠ مللتر من ١٠% SDS في ٣٠٠ مللتر من الماء المقطر عدل الأس الهيدروجيني إلى ٨,٧ باستخدام HCl مركز. ثم اكمل الحجم إلى لتر.

٢- ١٢- ١- ٣- دارئ العينة (Sample buffer) (Korhonen *etal.*, 1985):

حضر من خلط ١٢,٥ مللتر من ٠,٥ مولاري (Tris PH 6.8)، ٩ مللتر من ٢٠% SDS (w/v)، ٥ مللتر من mercaptoethanol، ١٠ مللتر من glycerol، ٥ ملغرام من صبغة bromophenol blue اكمل الحجم إلى ٥٠ مللتر بالماء المقطر قسم إلى كميات صغيرة ثم خزن بدرجة حرارة 20- م.

٢- ١- ١٢- ٤- محلول التصبيغ (Staining Solution) (korhonen et al., 1985):

حضر من إذابة ١,٤ غرام من صبغة Coomassie brilliant blue R250 في ١٨٤ مللترًا من حامض الخليك، و ٩٠٨ مللتر من الميثانول و ٩٠٨ مللتر من الماء المقطر.

٢- ١- ١٢- ٥- محلول التثبيت (Fixative Solution):

حضر من مزج ٥٠ مللترًا من الميثانول و ١٠ مللتر من حامض الخليك و ٤٠ مللترًا من الماء المقطر.

٢- ١- ١٢- ٦- محلول إزالة الصبغة (Destaining Solution):

(Sambrook et al., 1989):

حضر من ٥% ميثانول، ٧% حامض الخليك و ٨٨% ماء مقطر.

٢- ١- ١٣- المواد والمحاليل المستخدمة لتقدير كمية البروتين:

تم تقدير البروتين الكلي للبكتريا حسب طريقة (Lowry et al., 1951) والتي وصفت من قبل (Atlas., 1995).

محلول رقم (أ) محلول البومين مصل البقر القياسي 4 mg/ml BSA:

حضر من إذابة ٤٠ ملغراماً من BSA (BDH) في ١٠ مللتر من الماء المقطر.

محلول رقم (ب) ٢% كاربونات الصوديوم في ٠,١ مولاري NaOH:

حضر بإذابة ٢ غرام من كاربونات الصوديوم في ١٠٠ مللتر من محلول ٠,١ مولاري

هيدروكسيد الصوديوم.

محلول رقم (ج) ١% كبريتات النحاس:

حضر من إذابة ١ غرام من كبريتات النحاس في كمية من الماء المقطر. ثم اكمل الحجم إلى ١٠٠ مللتر بالماء المقطر.

محلول رقم (د) ٢% تترترات الصوديوم -البوتاسيوم:

حضر من إذابة ٢ غرام تترترات الصوديوم-البوتاسيوم في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم بالماء المقطر إلى ١٠٠ مللتر.

محلول رقم (هـ):

حضر هذا المحلول أنيا وذلك بخلط محلول رقم (ج) مع محلول رقم (د) بنسبة ١:١ (حجم/حجم) مع التحريك السريع. ثم أضيف ٩٨ مللترًا تدريجياً من المحلول رقم (ب) على ان لا يتكون راسب.

محلول رقم (و):

حضر أنيا بخلط كاشف فولن (Folin reagent) (BDH) مع الماء المقطر بنسبة ١:١ (حجم/حجم).

٢-٢ طرائق العمل Methodology

٢- ٢- ١ جمع العينات:

تم جمع ٣٠٢ عينة خلال المدة من تشرين الأول ٢٠٠٠ إلى كانون الثاني ٢٠٠١ من مستشفيات اليرموك التعليمي ومستشفى الرشيد العسكري ومستشفى صدام للأطفال في بغداد وتضمنت ما يأتي:

أ- عينات الإدرار (Urine Samples):

جمعت ١٢٥ عينة إدرار من الأشخاص المصابين بالتهابات المجاري البولية الراقدين في مستشفى اليرموك ومستشفى الرشيد العسكري. فضلاً عن عينات لمراجعي العيادة الاستشارية. كما تم الحصول على عزلات مشخصة من مختبرات مستشفى اليرموك.

تم جمع العينات من فئات عمرية تراوحت بين ١٥-٧٣ سنة. جمعت العينات في أنابيب معقمة ذات استخدام لمرة واحدة فقط. ونقلت إلى المختبر مباشرة وزرعت بالتخطيط على وسط ماكونكي ووسط اغار الدم ثم حضنت مدة ٢٤ ساعة وبدرجة حرارة ٣٧م. ثم أجريت الخطوات اللاحقة لعزل وتشخيص عزلات بكتريا الـ *Proteus*.

ب- عينات مسحات الأذن (Ear Swab Samples):

تم جمع ١٠٦ مسحة إذن من المرضى المصابين بالتهاب الأذن الوسطى الحاد والمزمن من فئات عمرية تراوحت بين اشهر عدة إلى ٨١ سنة. لمراجعي العيادة الاستشارية لمستشفى اليرموك ومستشفى صدام المركزية للأطفال.

أخذت مسحات الأذن بعد ان شخصت الحالة من قبل الطبيب المختص، بواسطة مسحة جاهزة لشركة Medical Wire and Equipment Co. زرعت العينات على وسطي ماكونكي واغار الدم. وحضنت بدرجة حرارة ٣٧م ولمدة ٢٤ ساعة.

ج- عينات الخروج (Stool Samples):

جمعت ٢٠ عينة من أشخاص مصابين بالإسهال المائي معظمهم من الأطفال من العينات المسلمة لمختبر مستشفى صدام للأطفال ومستشفى اليرموك التعليمي. ثم تم زرعها على وسط ماكونكي ووسط اغار الدم وحضنت بدرجة حرارة ٣٧م ولمدة ٢٤ ساعة.
د- عينات متفرقة:

توزعت بين ٢٢ مسحة جروح، ١٥ مسحة من الأنف و ١٠ مسحات حروق و ٤ مسحات مهبلية. اتبعت الطريقة السابقة نفسها في زرع العينات وحضنها.

٢- ٢- ٢ عزل وإدامة وتشخيص الـ *Proteus mirabilis*:

٢- ٢- ١ العزل:

بعد ان تم زرع العينات على اغار ماكونكي واغار الدم حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧م ولمدة ٢٤ ساعة. ثم نقلت المستعمرات المفردة غير المخمرة لسكر اللاكتوز والتي أعطت فحصاً سالباً

للاوكسيداز وأظهرت ظاهرة الانثيال Swarming على اغار الدم، إلى وسط ماكونكي واغار الدم مرة اخرى ليتم التأكد من نقاوتها. تم تكرار العملية لحين الحصول على مستعمرات نقية.

فحصت المستعمرات على شريحة زجاجية بعد ان صبغت بلون كرام بالمجهر الضوئي ودرست صفاتها.

٢- ٢- ٢ حفظ العزلات البكتيرية وإدامتها (Maniatis *etal.*, 1982):

حفظت عزلات الـ *P. mirabilis* على مائل الاغار المغذي بنقل مستعمرة واحدة بعد التأكد من مواصفاتها وتتم إدامة العزلات بنقلها إلى مائل الاغار المغذي شهرياً وقد نشطت أثناء الإدامة بنقلها إلى وسط اغنائي Brain-Heart infusion broth.

حفظت العزلات في الثلجة بدرجة حرارة ٤ م. ولغرض حفظ العزلات مدة أطول دون تعرضها لفقدان بعض صفاتها الوراثية حضر المرق المغذي وأضيف له ٤٠% كليسروول ثم لقع الوسط بملء عروة الناقل (Loopful) من خلايا المزروع على الوسط الصلب وخزنت بدرجة حرارة ٢٠-م في المجمدة. يمكن الاحتفاظ بالعزلات لفترة سنة او اكثر بهذه الطريقة.

٢- ٢- ٣ تشخيص العزلات:

تم تشخيص العزلات على أساس مصنف بركي لعام ١٩٩٤ (Holte *etal.*, 1994) بالاعتماد على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية وفق الطرق المستخدمة في (Collee *etal.*, 1996) و (Cowan and steel., 1974) وكما يأتي:

لوحظت الصفات المزرعية للمستعمرات النامية على وسط ماكونكي، اغار الدم ووسط S-S agar مثل شكل المستعمرة، لونها، الرائحة، قوامها، طريقة التجمع وحركتها على الأوساط ثم تم عمل مسحة لملون غرام بأخذ جزء من المستعمرة باستخدام الناقل (Loop) المعقم بالحرارة وتثبيتها على الشريحة الزجاجية باللهب وصبغت بملون كرام وفق وصف (Jawetz *etal.*, 1984) وفحصت بالمجهر الضوئي.

٢- ٢- ٣- ١ اختبار الاوكسيداز (Oxidse test) (Collee *etal.*, 1996):

تغمر ورقة ترشيح بمحلول كاشف الاوكسيداز (٢-٧-١-٢) ثم ينقل جزء من المستعمرات النامية على وسط مغذٍ بواسطة أعواد خشبية معقمة وتنتشر على الورقة تحول لون المستعمرة إلى البنفسجي الغامق خلال مدة ١٠-٦٠ ثانية يدل على الكشف الموجب.

٢-٢-٢-٢ اختبار اليوريز (Urease test) (Collee et al., 1996):

نقل جزء من المستعمرات السالبة لفحص الاوكسيداز بواسطة عروة الناقل وزرعها على مائل اغار اليوريا. حضنت الأنابيب لمدة (٢٤-٧٢) ساعة بدرجة حرارة ٣٧ م.

تحول لون الوسط من الأصفر إلى الوردى دليل على تحول الأس الهيدروجيني للوسط تجاه القاعدية بدلالة تغير لون كاشف الفينول الأحمر بسبب انتاج اليوريز.

٢-٢-٢-٣ Triple sugar Iron test (TSI) (Atlas., 1995):

زرعت الجرثومة على مائل وسط TSI الصلب بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل وحضنت لمدة (٢٤-٤٨) ساعة وبدرجة حرارة ٣٧ م..

ان تغير لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر دليل تكون الحامض وظهور راسب اسود دليل النتيجة الإيجابية لتكون كبريتيد الحديد. وتكسر او اندفاع الاغار إلى الأعلى دليل تكون غاز ثنائي أوكسيد الكربون.

٢-٢-٢-٤ اختبارات IMVIC (Collee et al., 1996):

أ- اختبار الاندول **Indol test**:

لقح ماء البيتون بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ م ولمدة ٤٨ ساعة ثم أضيف ٠,٥ ملتر من كاشف كوفاك (٢-٧-١-٦) مع رج خفيف لأنبوب المزروع. الكشف الموجب ظهور حلقة حمراء على السطح.

ب- اختبار احمر المثل **Methyl Red test**:

لقح وسط MR بإضافة ٠,٥ مللتر من العالق البكتيري وحضنت بدرجة حرارة ٣٧م ولمدة (٢٤-٤٨) ساعة ثم أضيف ٥ قطرات من كاشف المثيل الأحمر (٢-١-٧-٤) يلاحظ تكون لون احمر دليل موجب للكشف.

ج- اختبار فوكس بروسكاور **Voges-Proskauer test**:

لقح وسط vp بإضافة ٠,٥ مللتر من العالق البكتيرية وحضن بدرجة حرارة ٣٧م ولمدة (٢٤-٤٨) ساعة. ثم أضيف ١ مللتر من محلول الكشف vp1 و ٣ مللتر من محلول الكشف vp2 (٢-١-٥-٧) الكشف الموجب ظهور لون وردي بعد مرور خمس دقائق.

د- اختبار استهلاك السترات **Simone citrate test**:

لقح وسط اغار مائل سترات سايمون بالتخطيط على السطح وحضن بدرجة حرارة ٣٧ م ولمدة (٢٤-٤٨) ساعة. النتيجة الموجبة تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق.

٢- ٢- ٥-٣ اختبار السكريات **sugar tests** (Senior., 1997-a):

لقح وسط السكريات (٢-١-٦-١٣) بإضافة ٠,٥ مللتر من العالق البكتيري وحضن بدرجة حرارة ٣٧م ولمدة (١٨-٢٤) ساعة. النتيجة الموجبة تغير لون الوسط من البنفسجي إلى اللون الأصفر دليل تولد الحامض.

٢- ٢- ٦-٣ اختبار الأوكسدة-الاختزال **O/F test** (Collee et al., 1996):

لقحت أنبويتان حاويتان على وسط O/F (٢-١-٦-١٢) خلايا بكتيرية بواسطة الطعن ثم تم تغطية إحدى الأنبويتين بشمع البارافين المعقم الذائب بسمك ٥-١٠ ملم. وحضنت الأنبوب بدرجة حرارة ٣٧ م ولمدة ٤٨-٧٢ ساعة. النتيجة الموجبة تحول الوسط إلى اللون الأصفر وتقارن النتائج في الأنبوب المغلق والمفتوح.

٢- ٢- ٧-٣ إذابة الجلاتين **Gelatin liquefaction** (Collee et al., 1996):

لقح وسط الجلانتين (٢-١-٦-٥) بالطعنة. وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة ٢٢ م ولمدة لا تقل عن ٧ أيام. النتيجة الموجبة تحول الوسط إلى السائل وللتأكد من النتيجة تحفظ في الثلاجة بدرجة ٤ م ولمدة نصف ساعة النتيجة الموجبة بقاء الوسط سائلاً.

٢- ٢- ٢- ٨-٣-٢-٢-٢: Phenylalanine Deaminase test (PDA test)

لقح وسط PDA (٢-١-٦-٦) الموزع في أنابيب اختبار وبقاوع ٢ مللتر بعالق ٠,٢ مللتر من المزروع البكتيري. حضنت الأنابيب بدرجة حرارة ٣٧ م ولمدة ٢٤ ساعة. النتيجة الموجبة تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق.

٢- ٢- ٢- ٩-٣-٢-٢-٢: Amino Acid Decarboxylase And Arginine

:(Senior., 1997-a) Dihydrolase Test

لقح وسط الأحماض الأمينية (٢-١-٦-١٦) بإضافة ٢٥ مايكروليتر من مزروع جرثومي في المرق المغذي. تم تغطية الوسط بشمع البرافين (Ajax). وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ م ولمدة ٢٤ ساعة. في البداية يتحول لون الوسط إلى الأصفر دليل على تخمر سكر الكلوز ثم يتحول لون الوسط إلى البنفسجي دليل ارتفاع الأس الهيدروجيني إلى القاعدية بسبب إزالة مجموعة الكربوكسيل. مع ملاحظة بقاء أنبوب السيطرة اصفر وهي النتيجة السالبة.

٢- ٢- ٢- ١٠-٣-٢-٢-٢: فحص الكاتلايز Catalase test (Collee et al., 1996):

وضعت قطرة من ٣% فوق اوكسيد الهيدروجين (٢-١-٧-٣) على شريحة زجاجية نظيفة ويمزج معها قليل من النمو البكتيري. ظهور فقاعات غازية دليل النتيجة الموجبة.

٢- ٢- ٢- ١١-٣-٢-٢-٢: اختبار الحركة Motility test (Atlas., 1995):

لقح وسط الحركة (٢-١-٦-٧) بالطعن وحضن بدرجة حرارة ٣٧ م ولمدة ٢٤ ساعة النتيجة الموجبة ظهور انتشار في النمو على شكل مخروطي.

٢- ٢- ٢- ١٢-٣-٢-٢-٢: اختبار تحلل الدهون بأنزيم Lipase (Cowan and steel., 1974):

٢- ٢- ٣ تشخيص عزلات الـ *Proteus mirabilis* باستخدام :API 20E

تم تشخيص عزلات *P. mirabilis* بالاعتماد على ٢٠ اختباراً كيموحيوياً قياسيماً والذي يتضمنه نظام API 20 E (جدول ١-٢).

٢- ٢- ٣- ١ تحضير شريط الاختبارات *Preparation of the Gallery*

يحضر الشريط بوضع ٥ مللتر من ماء الحنفية في الوعاء (الحافظة) لتجهيز رطوبة كافية أثناء الحضانة. يوضع الشريط البلاستيكي داخل الحافظة.

٢- ٢- ٣- ٢ تحضير العالق البكتيري *Preparation of bacterial suspension*

علقت مستعمرة واحدة من الجرثومة في ٥ مللتر من المحلول الملحي الفيزيولوجي (٠,٨٥%) كلوريد الصوديوم) المعقم بخلطها جيداً برج الأنبوب لضمان تجانس العالق الجرثومي.

٢- ٢- ٣- ٣ تلقیح شريط الاختبارات *Inoculation of the Gallery*

تم تلقیح الخانات الصغيرة باستخدام ماصة باستور المعقمة بحيث تملأ كل الحافظات عدا اختبارات URE, H₂S, ODC, LDC, ADH يكمل ملء الخانة باستخدام زيت البارافين السائل المعقم ثم تغلق بالغطاء البلاستيكي، حضنت الأشربة بدرجة حرارة ٣٧ م ولمدة ١٨-٢٤ ساعة.

٢- ٢- ٣- ٤ قراءة نتائج اختبارات نظام *API*

تم تسجيل نتائج الاختبارات التي لا تحتاج إلى كواشف ثم أضيفت الكواشف الآتية:
أ- قطرة واحدة من كلوريد الحديد ٣,٤% إلى خانة TDA.
ب-قطرة واحدة من كاشف كوفاك إلى خانة IND.
ت-قطرة واحدة من كاشف Voges Preskauer إلى خانة VP.
ث-قطرة واحدة من كاشف الاوكسيداز إلى خانة ONPG.

٢- ٢- ٥ تفسير التفاعلات Interpretation of reactions

تفسير التفاعلات تم تثبيته في الجدول (١-٢).

٢- ٢- ٦ تشخيص البكتريا *P. mirabilis*

تم تثبيت النتائج على دليل نمط التحليل analytical profile index جدول (٢-٢) بحيث تحمل كل نتيجة ضمن مجموعتها رقم ١ او ٢ او ٤ تجمع النتائج الموجبة فقط ضمن كل مجموعة على حدة. فتكون شفرة رقمية مكونة من ٠-٧ أرقام يتم مقارنتها مع دليل يعطي النوع المقابل لهذه الشفرة.

الاختبارات الكيموحيوية التي يتضمنها نظام API 20 E وكما يأتي:

- | | | |
|-----|------------------|------------------------------|
| 1- | | Beta-galactosidase test |
| | ONPG | |
| ٢- | ADH | Arginine dihydrolase test |
| ٣- | LDC | Lysine decarboxylase test |
| 4- | ODC | Ornithine decarboxylase test |
| ٥- | CIT | Citrate Utilization test |
| ٦- | H ₂ S | Hydrogen Sulfide test |
| ٧- | | Urease test |
| | URE | |
| 8- | TDA | Tryptophan deaminase test |
| ٩- | IND | Indol test |
| 10- | VP | Voges Proskauer test |
| 11- | GEL | Gelatin liquefaction test |
| 12- | GLU | Glucose Fermentation test |

13-	MAN	Manitol Fermentation test
၁၄-	INO	Inositol Fermentation test
၁၅-	SOR	Sorbitol Fermentation test
၁၆-	RHA	Rhamnose Fermentation test
၁၇-	SAL	Sucrose Fermentation test
၁၈-	MEL	Melibiose Fermentation test
၁၉-	AMY	Amygdalin Fermentation test
၂၀-	ARA	Arabinose Fermentation test
21-	OXI	Oxidase test

الجدول (١-٢)

كيفية قراءة نتائج شريط نظام آبي للعائلة المعوية

(Biomerieux, API 20 E system)

التفاعل السالب	التفاعل الموجب	خانة الاختبار
عديم اللون	اصفر (١)	ONPG
اصفر	احمر / برتقالي (٢)	ADH
اصفر	برتقالي	LDC
اصفر	احمر / برتقالي (٢)	ODC
اخضر شاحب اصفر	اخضر مزرق / ازرق	CIT
عديم اللون	راسب اسود	H ₂ S
اصفر	احمر / برتقالي	URE
اصفر	بني غامق	TDA
عديم اللون حلقة خضراء	حلقة حمراء	IND
عديم اللون	وردي / احمر	VP
عدم انتشار صبغة سوداء	انتشار صبغة سوداء	GEL
ازرق / ازرق مخضر	اصفر	GLU
ازرق / ازرق مخضر	اصفر	MAN
ازرق / ازرق مخضر	اصفر	INO
ازرق / ازرق مخضر	اصفر	SOR

ازرق / ازرق مخضر	اصفر	RHA
ازرق / ازرق مخضر	اصفر	SAC
ازرق / ازرق مخضر	اصفر	MEL
ازرق / ازرق مخضر	اصفر	ANY
ازرق / ازرق مخضر	اصفر	ARA
عديم اللون / بنفسجي فاتح	بنفسجي داكن	OXI

(١) اصفر شاحب جداً يعد موجباً

(٢) اللون البرتقالي بعد ٢٤ ساعة من الحضانة يعد سالباً

جدول (٢-٢)

The analytical Profile index

دليل نمط التحليل (التصنيف)

Group 1			Group 2			Group 3			Group 4		
ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU
١	٢	٤	١	٢	٤	١	٢	٤	١	٢	٤

-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
٠			٧			٣			٧		

Group 5			Group 6			Group 7		
MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OXI
١	٢	٤	١	٢	٤	١	٢	٤

-	-	-	-	-	-	-	-	-
٠			٠			٠		

الشفرة المقابلة لبكتريا

٠٣٧٧٠٠٠ أو ٠٧٣٧٠٠٠ *Proteus mirabilis*

- اخذ الطافي ونقل إلى أنابيب معقمة مغلقة. ثم عقم المستخلص بيضع قطرات من الكلورفورم مزجت جيداً ثم خزنت بدرجة ٤ م.

٢- ٤- ٣ اختبار حساسية العزلات تجاه البروتسين :

أ- طريقة الجميلي (AL-Jumaili., 1975-a):

- تم تنمية العزلات المراد اختبارها في ٥ ملتر من مرق Pp3 (١-٢-٦-١٥) في حمام مائي بدرجة حرارة ٣٧ م ولمدة ٧ ساعات.
- نشر ٢ ملتر من العالق البكتيري بتخفيف ١٠^٢ خلية / ملتر على وسط اغار نقيع القلب الدماغ المضاف له ٠,٨% أملاح الصفراء ونشر وأزيل الفائض باستخدام ماصة دقيقة.
- بعد ان جف سطح الاغار أضيف البروتسين المستخلص بحجم ثلاثة مايكروليتر لكل عزلة منتجة. حضنت الأطباق بدرجة ٣٧ م ولمدة (٣-٧) ساعات تقرأ النتيجة الموجبة بظهور مناطق تثبيط للنمو. دليل على حساسية العزلة تجاه هذا النوع من البروتسين (تفحص الأطباق بمجرد ظهور النمو).

ب- طريقة Senior (Senior., 1997-b):

- تم عمل خطوط من المزروع البكتيري في المرق المغذي ويعمر ١٨ ساعة على وسط اغار مائوني الخالي من الرطوبة (بترك الأطباق غير الملقحة في الحاضنة ١٨ ساعة لتجف).
 - ثم وضعت قطرة بحجم ثلاث مايكروليتر من كل مستحضر من مستحضرات البروتسين وباستخدام ماصة دقيقة فوق خطوط المزروع البكتيري.
 - حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧ م ولمدة ٦-١٨ ساعة.
- فحصت الأطباق بمجرد ظهور النمو النتيجة الموجبة حصول تثبيط للنمو بفعل مستحضر البروتسين.

٢- ٢- ٥ اختبار مقاومة مضادات الحياة باستخدام الأقراص

:Disk Diffusion (Sensitivity) test

استخدمت طريقة Kirby-Bauer والتي وردت من قبل بروسكوت وجماعته ١٩٩٠ (Atlas.,

(Prescott *et al.*, 1990).

- نقلت ٣-٤ مستعمرات إلى ٥ مللتر من المرق المغذي وحضنت بدرجة حرارة ٣٥ م ولمدة ٦ ساعات حتى يلاحظ نمو جيد.
- تم مقارنة النمو مع أنبوب ماكفرلاند وخفف المزروع بالمرق المغذي حتى تم الحصول على التخفيف نفسه 10^8 خلية / مللتر (٧-٧-١-٢).
- غمرت Cotton swab قطنية في العالق البكتيري وأزيل الفائض منه بالضغط على جدار الأنبوب ثم مرر على سطح اغار مولد-هنتون المضاف له ٠,٨% أملاح الصفراء. (٧-٥-١-٢).
- مررت المسحة Cotton swab بثلاثة اتجاهات حتى غطي كل السطح بالعالق البكتيري بشكل متجانس ثم ترك ليجف.
- تم وضع أقراص مضادات الحياة في ظروف معقمة باستخدام ملقط معقم وبواقع ٦-٧ قرص لكل طبق.
- حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧ م ولمدة ١٨-٢٤ ساعة.
- ثم تقاس مناطق التثبيط باستخدام مسطرة حيث يؤخذ المعدل ٣-٤ أقطار ثم تقارن النتائج وفقاً إلى National Committee for Laboratory Standard (NCCLS) 1993.

٢-٥-١ استخدام طريقة اليود للكشف عن β -Lactamases

استخدمت طريقة اليود في الكشف عن إنتاج أنزيمات β -Lactamases المنتجة من قبل ١٧ عزلة *P-mirabilis* تم انتخابها على أساس مقاومتها المتعددة لمضادات الحياة وكما وصفت من قبل (Sykes., 1978).

علق ملء عروة ناقلة من مزروع بكتيري بعمر ١٨ ساعة من الوسط الصلب في ٠,٥ مللتر من محلول البنسلين (٧-١-٢-٨-ب) وبعد ساعة واحدة وبدرجة حرارة الغرفة أضيفت قطرتين من محلول النشا (٧-١-٢-٨-د) الى العالق البكتيري ثم أضيفت قطرة من محلول اليود (٧-١-٢-٨-ج) مزج جيداً. النتيجة الموجبة ظهور لون أزرق خلال ثواني.

٢-٥-٢ عزل الدنا البلازميدي β -Plasmid DNA Extraction

Boiling Method (Holmes and Quigley., 1981):

عزل الدنا البلازميدي وذلك باتباع طريقة (Holmes and Quigley., 1981):

- تم تنمية العزلات المراد استخلاص الدنا منها (٢-١-٥-٨) في مرق L المضاف له ١٠٠ مايكروليتر لكل ملتر من Ampicillin للعزلات المقاومة لهذا المضاد او ١٠٠ مايكروغرام لكل ملتر من Penicillin عند تنمية السلالة *E.coli* HB101 القياسية.
- رسبت الخلايا في انابيب ابندروف (appendorf) بحجم ١,٥ ملتر بعد وضعها في المنبذة (Microfuge) ونبذت بسرعة ٦٠٠٠ دورة /دقيقة لمدة ١٥ دقيقة. أهمل الرائق وكررت العملية حتى الحصول على كمية جيدة من راسب الخلايا.
- غسلت الخلايا بمقدار ٥٠٠ مايكروليتر من دارئ TE (٢-١-٩-٣-أ-١) إلى ان تتجانس الخلايا ثم تنبذ بسرعة ٦٠٠٠ دورة /دقيقة مع التبريد بدرجة حرارة ٤ م.
- تم إضافة ٣٨٠ مايكروليتر من محلول STET (٢-١-٧-٣-أ-٢) إلى الخلايا وتمت مجانسيتها جيداً باستخدام مازج أضيف بعدها ٢٠ مايكروليتر من خزين محلول اللايسوزايم (٢-١-٩-٣-أ-٣) ثم حضن الخليط بدرجة ٣٧ م لمدة نصف ساعة بعدها حضن في الثلج لمدة ساعة.
- سحب مقدار ١٠ مايكروليتر من الخليط (لغرض الترحيل الكهربائي) ونقل الخليط المتبقي من الثلج مباشرة إلى حمام مائي بدرجة الغليان لمدة ١-٢ دقيقة ثم رفع ووضع في الثلج وترك لمدة ساعة في الثلج.
- نبذت الأنابيب بالمنبذة (Micro fuge) وبسرعة ١٣٠٠٠ دورة / دقيقة وفي درجة حرارة ٤ م لمدة عشرة دقائق.
- سحب الراسب بواسطة عود خشبي معقم واهمل. تم قياس الطافي وأضيف له حجم مساوٍ من محلول الفينول: كلورفورم: كحول ايزواميلي (٢-١-٩-٣-أ-٥) مزج جيداً وترك في الثلجة لمدة ساعة.
- نبذت الأنابيب بسرعة ١٣٠٠٠ دورة /دقيقة لمدة عشرين دقيقة وبدرجة حرارة ٤ م. حيث تكونت ثلاث طبقات منفصلة.
- تم سحب الطبقة العليا بواسطة ماصة دقيقة ونقلت إلى أنبوب ابندروف معقم وأضيف لها ضعف الحجم ايثانول ٩٦% المبرد جيداً.
- ظهر الدنا المترسب بعد تقليب الأنبوب برفق مرات عدة بشكل خيوط رفيعة. تركت الأنابيب في الثلج لمدة ساعة (يمكن تركها إلى اليوم التالي بدرجة الصفر المئوي).
- نبذت الأنابيب بالمنبذة بسرعة ١٣٠٠٠ دورة /دقيقة لمدة ٣٠ دقيقة وبدرجة حرارة ٤ م.
- غسل الراسب بعد التخلص من الرائق بمقدار ٥٠ مايكروليتر في ٧٠%كحول اثيلي ونبذ المزيج بسرعة ١٣٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة مع التبريد.

أهمل الرائق وأذيب الراسب بعشرة مايكروليتر من دارئ TE (٢-١-٩-٣-أ-١) بعد ان تم التأكد من جفاف الراسب من الكحول. حرك باستمرار لزيادة سرعة الذوبان. حفظ في الثلاجة بدرجة حرارة ٤ م لحين الترحيل.

ب- التحلل باستخدام القاعدة Alkaline Lysis:

- عزل الدنا البلازميدي من عزلات منتخبة على أساس مقاومتها لمضادات الحياة لبكتريا *Proteus mirabilis* وذلك باتباع طريقة التحلل القاعدي (Birnboim and Doly., 1979).
- رسب ٥٠ ملتر من المزروع بعمر ١٨ ساعة بواسطة النبذ المركزي ٦٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٥ دقيقة. ثم أعيد غسل راسب الخلايا بإضافة ١٠ ملتر من دارئ TES (٢-١-٩-٣-ب-١) (٤). حيث كررت هذه الخطوة مرتين.
- علقت الخلايا بإضافة ٣ ملتر من دارئ التحلل TEG (٢-١-٩-٣-ب-١) ثم أضيف ٦ ملتر من محلول ١% SDS (٢-١-٩-٣-ب-٢) وحضنت الأنابيب مدة ٣٠ دقيقة بدرجة حرارة ٢٥ م.
- أضيف ٢ ملتر من محلول خلاات البوتاسيوم (٣ مولاري). ثم مزج النموذج بالتقليب مدة دقيقتين ووضع في الثلج مدة ١٠ دقائق. بعدها تم تعريض الأنابيب للنبذ المركزي ٦٠٠٠ دورة/دقيقة مدة ١٠ دقائق.
- أهمل الراسب ونقل الرائق إلى أنابيب معقمة وأضيف له حجم مماثل من محلول فينول: كلورفورم: كحول ايزواميلي (٢-١-٩-٣-أ-٥) ومزج بالتقليب مرات عدة ثم نبذت النماذج مركزيا بسرعة ١٠٠٠٠ دورة/دقيقة. نقلت الطبقة الرائقة إلى أنابيب أخرى وكررت العملية نفسها.
- سحبت الطبقة العليا وأضيف لها ضعف الحجم من الايثانول المطلق المبرد وحضنت بدرجة حرارة ٢٠-م ولمدة ساعة.
- نبذت النماذج مركزيا بسرعة ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة مدة ١٥ دقيقة.
- تم التخلص من الكحول بالتجفيف وأذيب الدنا المترسب بإضافة ٣٥٠ مايكروليتر من دارئ TE (٢-١-٩-٣-أ-١) وحفظت بدرجة حرارة ٢٠-م.

٢- ٧- الترحيل الكهربائي على الهلام للدنا المستخلص DNA Gel

Electrophoresis (Sambrook *etal.*, 1989):

حضر هلام الاكاروز بتركيز ٠,٨% (٢-١-١٠-٣) ويرد إلى حوالي ٥٠ م وأضيف إليه واحد مايكروليتر من محلول خزين الاثيديوم برومايد (٢-١-١٠-٢) مزج جيداً دون تكوين فقاعات. ثبت المشط (Comb) على القالب Tray بحيث كان وضع الهلام مستويًا بعد التصلب ومتساوي السمك من كلا الطرفين. بحيث كان سمك الهلام ٣ ملمتر. رفع المشط بعد ان تصلب الهلام.

غمر الهلام في دارئ 1X TBE (الذي حضر من تخفيف دارئ 10X TBE عشر مرات بالماء المقطر) (٢-١-١٠-١) في جهاز الترحيل الكهربائي الذي يملأ بمحلول TBE المخفف.

ربط جهاز الترحيل بمصدر مجهز القدرة Power supply ونظم مرور التيار الكهربائي. بحيث تكون الفولتية ٤٠ فولتاً عند البدء ولمدة ١٥ دقيقة قبل إضافة العينات لضمان مجانسة مرور التيار فيه.

تم تحضير عينات الدنا وذلك من خلط عشرة مايكروليترات من الدنا المستخلص مع و مايكروليتراً واحداً من دارئ التحميل (٢-١-١٠-٤) مزج جيداً الخليط ثم نقل بواسطة ماصة دقيقة إلى حفر الهلام المغمور بدارئ TBE. تم توصيل التيار الكهربائي وعلى فولتية ٤٠ فولتاً ولمدة ثلاث ساعات.

فحص الهلام بعد وصول صبغة دارئ التحميل إلى منتصف مسافة الهلام ثم استمر الترحيل إلى ان انفصلت حزم الدنا بوضوح.

٢- ٢- ٨ استخلاص البروتين **Protein Isolation**:

اتبعت طريقة (Kerstens and Deley., 1974) وكما يأتي:

اختيرت 7 عزلات من بكتريا *Proteus mirabilis* للكشف عن النمط البروتيني لها.

- نشطت العزلات بتميتها في مرق نقيع القلب-الدماغ ولمدة ١٨ ساعة وبدرجة حرارة ٣٧م، ثم نقلت إلى الوسط المحضر وفق الفقرة (٢-١-١١-١) وحضنت بدرجة حرارة ٢٨م ولمدة ٢٤-٤٨ ساعة.

- علفت الخلايا في ٥ مللتر من دارى الفوسفات الملحي ذي الأس الهيدروجيني ٧,٠ (٢-١-١-٢) -
- ١١-٢) غسلت الخلايا مرة واحد بالدارى أنفاً ونبذت بالمنبذة بسرعة ٦٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة.
- أعيد تعليق الخلايا في ٣ مللتر من دارى 6.4 ملي مولاري Tris-HCl ذي الأس الهيدروجيني ٧,٠ (٢-١-١-٣). غسلت الخلايا مرتين بنفس الدارى ونبذت بالمنبذة بسرعة ٦٠٠ دورة / دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة.
- أعيد تعليق الخلايا في ٣ مللتر من دارى 6.4 ملي مولاري Tris-HCl ذي الأس الهيدروجيني ٨,٤ (٢-١-١-٤).
- عرضت الخلايا المعلقة بالدارى إلى الأمواج فوق الصوتية لمدد تعريض بلغ مجموعها ٤٠ ثانية (ثم وضعت النماذج في الثلج).
- نبذت الخلايا المتحللة بالمنبذة وبسرعة ١٣٠٠٠ دورة/دقيقة مع التبريد لمدة ٢٠ دقيقة حيث تم التخلص من الخلايا المتحللة.
- أعيد تنبيذ الطافي بعد إضافة Streptomycin Sulphate وبتركيز ١,٥ % مع التحريك المستمر والتبريد لترسيب الأحماض النووية والتخلص منها.
- تم تقدير كمية البروتين بإتباع طريقة (Lowery etal 1951) والموصوفة من قبل (Atlas., 1995). كما سيأتي لاحقاً.
- تم تعديل تركيز البروتين بحيث اصبح ١٢ ملغراماً /مللتر بواسطة دارى Tris-Cl 6.4 ملي مولاري ذي الأس الهيدروجين 8.4 وحفظ البروتين بدرجة حرارة ١٢-م (في المجمدة الثلجة).

٢- ٢- ٩- تقدير البروتين **Protein Assay** (Lowery etal., 1951):

- أ- المنحني القياسي للبروتين:
- استخدم المحلول القياسي من البومين مصل الدم البقري الخزين ٤ ملغرام /مللتر (٢-١-١٣-أ) بتركيز مختلفة وبحجم واحد مللتر لكل تركيز بعد تخفيفها بالماء المقطر.
- أضيف ٥ مللتر من محلول الكاشف (٢-١-١٣-هـ) إلى محاليل البروتين القياسي بتركيزه المختلفة (5,10,20,40,80,100, 120,140 µg/ml) مزجت جيداً وحضنت بدرجة حرارة الغرفة لمدة ١٥ دقيقة .

- أضيف ٣٠٠ مايكروليتر من كاشف فولن (٢-١-١٣-و) بالتدريج مع الرج السريع لكي يتجانس المحلول. ظهر اللون الأزرق نتيجة تفاعل الكاشف مع معقد النحاس والنتروجين. ترك الخليط لمدة ٣٠ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة.

- حضر كفاء الكاشف Blank للتخافيف المحضرة من واحد ملتر من الماء المقطر بدلاً من البروتين ومن ثم أضيفت إليه الكواشف كما في (٢، ٣) آنفاً.

- ثم رسم المنحني القياسي على اساس العلاقة بين تراكيز مصل الالبومين البقري المقدر بالميكروغرام لكل ملتر ومقدار الامتصاصية عند الطول الموجي ٦٠٠ نانوميتر.
ب- قياس البروتين في العينة:

- خفف ٠,٥ ملتر من مستخلص البروتين باضافة ٠,٥ ملتر ماء مقطر.

- حضر كفاء Blank من الدارئ الذي أذيبت فيه العينة ٦,٤ ملي مولاري (Tris-HCl) ٠,٥ ملتر مع ٠,٥ ملتر من الماء المقطر.

- طبقت الخطوات (٢، ٣، ٥) آنفاً كما في تقدير المنحني القياسي للبروتين.

- تم الحصول على تركيز بروتين العينة من خلال مقارنة الامتصاصية عند ٦٠٠ نانومتر فيما يقابلها من تركيز على المنحني القياسي.

٢- ١٠- الترحيل الكهربائي للبروتين الذائب على هلام **SDS-PAGE** (Korhonen *et al.*, 1985):

٢- ١٠- ١- تحضير هلام SDS-PAGE:

أ- هلام الفصل: حضر بتركيز ١٠% من إضافة ١٢ ملتر من acrylamide/bisacryl amide (٢-١-١٢-أ) إلى ١٤,٥ ملتر من الماء المقطر منزوع الايونات و ٩ ملتر من دارئ هلام الفصل (٢-١-١٢-ب) في دورق (Sidearm Flask) ذي حجم ٢٥٠ ملتر. ثم أضيف ١٢ مايكروليتر TEMED (٢-١-١٢-٥) وافرغ الخليط من الفقاعات باستخدام مضخة مفرغة ولمدة

١٠ دقائق وأضيف ١٨٠ مايكروليتراً من محلول Ammonium Persulphate 10% (٢-١-١٢-١) -١-٥) ثم مزج بلطف.

حضرت أنابيب الترحيل بغسلها جيداً وتجفيفها ثم ثبتت في حامل الأنابيب بعد ان غلقت من الأسفل باستخدام parafilme. ثم صب الهلام حال تحضيره وبعمق ٥ سنتيمتر ثم غطي بالبيوتانول وترك لمدة نصف ساعة ليتصلب وبدرجة حرارة ٢٥ م. بعدها أزيل البيوتانول باستخدام مسحة قطنية.

ب- هلام الرص: حضر من مزج ١ ملتر من acrylamide/bisacrylamide (٢-١-١٢-١-أ) و ٣,٤ ملتر من الماء المقطر منزوع الايونات و ١,٥ ملتر من دارى هلام الرص (٢-١-١٢-١-ب) و ٣ ملتر من TEMED في دورق وكما في الخطوة أ. فرغ المزيج من الفقاعات كما مر سابقاً ثم أضيف ٦٠ مايكروليتراً من Ammonium Persulphate 10% (٢-١-١٢-١-٥). صب هلام الرص بعمق ١,٥ سنتيمتر ثم غطي بالبيوتانول وترك لمدة نصف ساعة ليتصلب بدرجة حرارة ٢٥ م.

٢- ١٠- ٢- ٢ الترحيل الكهربائي (Sambrooke et al., 1989):

بعد تصلب الهلام جفف البيوتانول باستخدام مسحة قطنية ثم ثبتت الانابيب في حوض الترحيل عمودياً. مليء حوض الترحيل السفلي بدارى الترحيل بحيث انغمرت نهاية الأنابيب بدارى الترحيل بحيث لا تتكون فقاعات في نهاية أنابيب الترحيل. ثم ملء الحوض العلوي بنفس الدارى بحيث انغمرت نهاية الأنابيب العلوية بالدارى يوصل التيار الكهربائي بربط جهاز الترحيل بمجهر القدرة ونظم مرور التيار الكهربائي بحيث تكون الفولتية ٤٠ فولت ولمدة ١٥ دقيقة لمجانسة التيار. تحضير العينات:

حضرت العينات من إضافة ثلاثة حجوم من دارى التحميل للعينه (٢-١-١٢-٣) إلى حجم واحد من العينه البروتينية ثم وضعت في حمام مائي بدرجة الغليان لمدة ٥ دقائق ثم وضعت العينات المحضرة في هلام الرص خلال دارى الترحيل. أوصل التيار الكهربائي ٤٠ فولت في بداية الترحيل ورفع إلى ٧٠ فولت عند عبور صبغة التحميل هلام الرص. اوقف الترحيل الكهربائي عند وصول صبغة التحميل إلى نهاية هلام الفصل بسنتيمتر واحد.

٢- ٢- ١١ تحديد حزم البروتين على هلام الاكرالاميد
:(Sambrook *etal.*, 1989)

٢- ٢- ١١- ١ استخراج الهلام من الأنابيب:

تم استخراج الهلام بدفع الماء بين الهلام والزجاج ومن الجهتين باستخدام أبرة طبية إلى ان يخرج الهلام من أحد الجهات و وضع في أنابيب نظيفة وجافة

٢- ٢- ١١- ٢ التثبيت **Fixative**:

غمر الهلام بمحلول التثبيت (٢-١-١٢-٥) ولمدة ساعتين ثم ازيل محلول التثبيت من الأنابيب.

٢- ٢- ١١- ٣ التصبغ **Staining**:

أضيف محلول صبغة Coomassie Brilliant blue R250 (٢-٢-١٢-٤) إلى كل أنبوب بحيث غمر الهلام ولمدة ثلاث ساعات ثم أزيلت الصبغة من الأنابيب.

٢- ٢- ١١- ٤ إزالة الصبغة **Destaining**:

غمر الهلام بمحلول إزالة الصبغة (٢-١-١٢-٦) ولمدة ٢٤ ساعة وكررت العملية مرات عدة إلى أن أصبحت الحزم البروتينية زرقاء مع خلفية خالية من الصبغة ثم صور الهلام.

١-٣ عزل وتشخيص بكتريا *Proteus mirabilis*:

٣-١-١ العزل:

تم التحري عن وجود بكتريا *Proteus* ضمن ٣٠٢ عينة جمعت من مصادر سريرية مختلفة (جدول ١-٣). شملت الدراسة ١٠٦ مسحة أذن من المرضى المصابين بالتهاب الأذن الوسطى من فئات عمرية تراوحت بين أشهر عدة إلى ٨١ سنة و ١٢٥ عينة إدرار لمرضى يشكون من أعراض تدل على إصابتهم بالتهاب المجاري البولية وفئات عمرية تراوحت بين ١٥-٧٣ سنة و ٢٠ عينة خروج جمعت معظمها من الأطفال المصابين بالإسهال و ٢٢ مسحة جروح مختلفة و ١٠ مسحات حروق و ٤ مسحات مهبلية و ١٥ مسحة أنف، حيث جمعت العينات من مستشفيات (اليرموك التعليمي ومستشفى الرشيد العسكري ومستشفى صدام للأطفال في الإسكان) وللمدة من تشرين الأول / ٢٠٠٠ وإلى كانون الثاني / ٢٠٠١ .

وبعد التشخيص المظهري والكيموحيوي تم التعرف على ٥٠ عزلة *Proteus mirabilis* من مجموع ٣٠٢ عينة وكان توزيعها حسب الجنس ٢٣ عزلة (٤٦%) ضمن عينات الذكور و ٢٧ عزلة (٥٤%) ضمن عينات الإناث.

أما من حيث مصدر العزل فقد أظهرت نتائج جدول (١-٣) إن مسحات الأذن أعطت أعلى نسبة للعزل ٢١ عزلة (٤٢%) وعند توزيعها حسب الجنس كانت ٨ عزلات (١٦%) في عينات الذكور و ١٣ عزلة (٢٦%) ضمن عينات الإناث وتشير الدراسات إلى أن سلالات *Proteus aeruginosa* و *Staphylococci* من أكثر الأحياء المجهرية الممرضة شيوعاً في إصابة الأذن. حيث وجد في دراسة أجريت في الهند على ٤٧ مريضاً مصاباً بالتهاب الأذن الوسطى أن ٦٣% من العينات كانت حاوية على أنواع *Proteus* (Vartiainen and Vartiainen, 1996) كما أشارت Al-Segar (٢٠٠٠) إلى أن نسبة عزلها تأتي بالمرتبة الثالثة بعد *Ps.aeruginosa* و *Staph.aureus* .

وجد في دراسة لـ Senior و Sweeney (1984) أن بكتريا *P.mirabilis* تشكل ٧٩% من مجموع سلالات *Proteus* المعزولة من التهاب الأذن الوسطى.

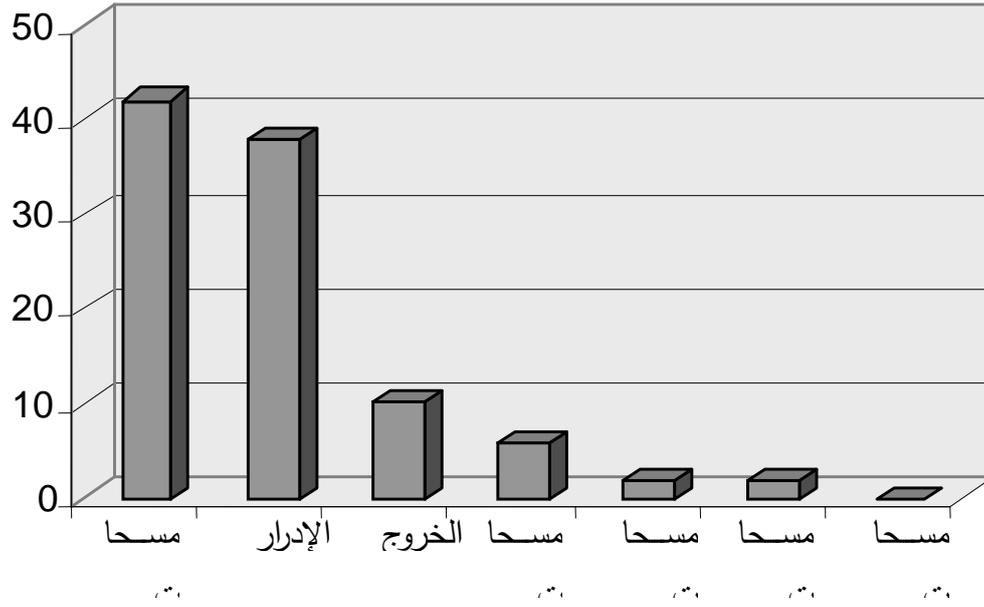
ويعزى نجاح البكتريا في إحداث الإصابة إلى قدرتها في الوصول إلى الأذن الوسطى بسبب انسداد أنبوب أوستاكي بإصابة موضعية مثل التهاب البلعوم، وعند حدوث ضغط سلبي في هذا التجويف فإنه يسمح باندفاع البكتريا من الخارج، إن اندفاع البكتريا وانسداد مجرى الإفرازات إلى البلعوم ينتج عنه تدفق السوائل إلى الأذن الوسطى التي تصبح مصابة بالبكتريا (Abdl-Ruzzak., 2001). كما تساهم الأمراض التنفسية كالتهاب الأنف المزمن

Chronic rhinitis والتهاب الجيوب الأنفية Sinusitis في التهاب الأذن الوسطى. وتعزى إمراضية هذه البكتريا إلى قابليتها على إنتاج العديد من عوامل الضرارة كالإنزيمات المحللة للبروتينات والهيمولايسين وغيرها (Al-Segar., 2000).

جدول (١-٣)

توزيع عزلات *P.mirabilis* وفقا إلى مصدر العزل وجنس المريض

		الذكور		الإناث	
العدد	%	العدد	%	العدد	%
٨	١٦	١٣	٢٦		
١١	٢٢	٨	١٦		
١	٢	٤	٨		
٣	٦	٠	٠		
٠	٠	١	٢		
-	-	١	٢		
٠	٠	٠	٠		
٢٣	٤٦	٢٧	٥٤		



شكل (١-٣)

توزيع عزلات *P. mirabilis* وفقاً الى مصدر العزل

تضح من نتائج هذه الدراسة أن نسب عزل بكتريا *P.mirabilis* من عينات الإدرار لمرضى التهاب المجاري البولية كانت ١٩ عزلة (٣٨%) شكل (٣-١) وتشير الدراسات إلى تفاوت نسب عزل بكتريا المتقلبات في مرضى التهاب المجاري البولية. ففي دراسة أجريت في العراق من قبل Laftaa (٢٠٠١) على مرضى التهاب المجاري البولية وجد أن نسبة عزل بكتريا *P.mirabilis* كانت (٣٧,٣٣%) بينما وجد Warren وجماعته (١٩٨٢) أن نسبة عزلها هي ٢٨% في حين أشارت Al-Grawy (١٩٩٩) إلى أن نسبة عزلها كانت ٦% من مجموع ٢٠٦ عينة إدرار.

أما من ناحية توزيعها حسب الجنس فقد أظهرت نتائج العزل أن نسبة بكتريا *P.mirabilis* في عينات الذكور هي ١١ عزلة (٢٢%) وهي أعلى من نسبة عزلها في الإناث (١٦%) وتتفق نتائج دراستنا مع المرجاني (٢٠٠٠) الذي وجد أن نسبة عزلها من الذكور هي ٦٣,٥% ونسبتها في الإناث ٣٦,٤٩% بينما أشارت Al-Jubori (٢٠٠١) في دراسة لمرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية إلى تساوي نسب عزلها في الذكور والإناث. ويعود السبب في أن نسب عزلها في الذكور تكون أعلى منها في الإناث بسبب وجود كيس القلفة (Preputial Sac) والذي يعد أحد المستودعات المهمة لهذا الجنس والذي من خلاله يمكن أن تصعد البكتريا بما تملكه من حركة سريعة لتسبب إصابة المجاري البولية من خلال الطريق الصاعد (Ascending Route). وتعزى نسبة الإصابة الواطئة في الإناث عنها في الذكور إلى التأثير القاتل للسائل المهبلي ذي الأس الهيدروجيني المنخفض تجاه بكتريا المتقلبات (Stamey., 1975) (Al-Jubori., 2001) وقد يعود سبب اختلاف نسب عزل بكتريا *P.mirabilis* من باحث وآخر إلى الاختلافات في مواسم جمع العينات وعددها والطرق المتبعة في تشخيصها ومدى حساسية هذه الطرق فضلاً عن الاختلافات في مصادر العزل.

أظهرت دراستنا أن نسبة عزل *P.mirabilis* كانت ١٠% من خروج المرضى ومعظمهم من الأطفال المصابين بالإسهال فقد أشار Delouvios (١٩٦٩) إلا أنه تم فحص ١٢٤٢ سلالة من المتقلبات في هنكاريما فوجد أن ١٠٤١ منها تعود للنوع *P.mirabilis* وأن العدد الأكبر من هذه السلالات كان مصدرها التهاباً معويّاً عند الأطفال (infantile enteritis) ولم يكن المسبب أي نوع آخر من الممرضات المعوية. كما أشار Larson (١٩٨٤) إلى أن بكتريا المتقلبات قد تسبب التهاب المعدة Gastroenteritis بالإضافة إلى أنها نبيت طبيعي للأمعاء (Jawetz et al., 1984) أن وجودها في الأمعاء له أهمية من الناحية الطبية حيث تصبح كخزين للإصابة الذاتية أو ما يسمى Cross-infection (الإصابة المشتركة) خاصة بين المرضى الراقدين في المستشفى (Penner., 1981) وأظهرت نسب عزل بكتريا *P.mirabilis* من مسحات الجروح ٣ عزلات (٦%) بينما كانت نسب عزل هذه البكتريا من الحروق والمسحات المهبلية عزلة واحدة (٢%).

ويعود مثل هذا النوع من الإصابات إلى تلوثها بالنبيت الطبيعي للأمعاء. وتشير الدراسات إلى إمكانية عزل هذه البكتيريا من الكادر الطبي ومن بيئة المستشفيات والأدوات الطبية كالمقثرة كما يمكن أن تنتقل بكتريا المتقلبات أيضاً من شخص إلى آخر عن طريق الآلات والأدوات المستخدمة من قبل الكادر الطبي (Krieg and Holt., 1984)، (Smith *etal.*, 2000).

أما بالنسبة لعينات مسحات الأنف فلم تظهر أية نسبة عزل.

٣ - ١ - ٢ التشخيص:

شخصت ٥٠ عزلة *Proteus* تشخيصاً أولياً اعتماداً على حركة الإنثيال Swarming على أغار الدم ولون مستعمراتها على وسط أغار ماكونكي التي تظهر شاحبة لأنها غير مخمرة لسكر اللاكتوز (Collee *etal.*, 1996).

ولغرض تمييز المتقلبات عن بقية العائلة المعوية (Enterobacteriaceae) تم الإعتماد على إنتاجها لصبغة بنية على وسط الأغار المغذي المضاف له ٢% تربتوفان شكل (٢-٣) حيث أشار Singer وVolcani (١٩٥٥) إلى أهمية استخدام هذه الصفة في تشخيص أجناس قبيلة Proteae عن بقية أفراد العائلة المعوية وخاصة جنس *Proteus, Providencia* (Penner., 1981).

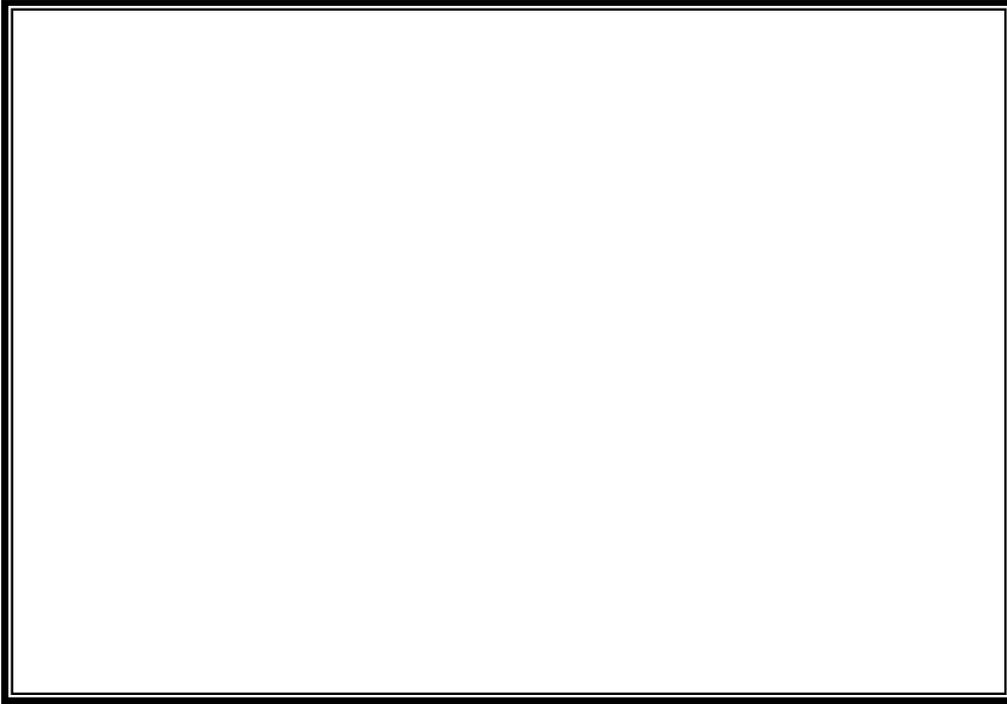
جدول (٢-٣)

الفحوصات التشخيصية الكيموحيوية للنوع *P.mirabilis* للعوائل المحلية وعوائل مسجلة عالمياً

Ornithine Decarboxylase	Maltose Fermentation	Indole	H ₂ S على وسط TSI	Urease	Phenylalanine deaminase	Oxidase	الفحص
(+) ١٠٠	(-)100	(-) ٩٤	(+) ٩٤	(+) ١٠٠	(+) ١٠٠	(+) ١٠٠	النسبة المئوية % (العوائل المحلية)
(+) ٩٩	(-)100	(-) ٩٨	(+) ٩٨	(+) ٩٨	(+) ١٠٠	(+) ١٠٠	النسبة المئوية % (العوائل المدروسة من قبل Farmer وجماعته (١٩٨١))

(+) فحص موجب

(-) فحص سالب



شكل (٢-٣)

يوضح إنتاج الصبغة البنية المحمرة على وسط التريبتوفان



شکل (٣-٣)

تشخیص عزلات *P.mirabilis* باستخدام نظام .Api 20 E

جدول (٣-٣)

تنتج بكتريا المتقلبات هذه الصبغة نتيجة تكون Indolpyruvic acid من التربتوفان بفعل إنزيم Tryptophan deaminase وبوجود كلوريد الحديد في الوسط يتفاعل الحامض Indolpyruvic acid مولداً الصبغة البنية (Atlas., 1995).

دلت نتائج الفحوصات الكيموحيوية المخصصة لتشخيص بكتريا *P.mirabilis* (جدول ٣-٢) إضافة إلى نتائج اختبارات عدة التشخيص API 20E (٣-٢-٢) إلى أن الخمسين عزلة جميعها تعود إلى النوع *P.mirabilis* (شكل ٣-٣).

تم تشخيص العزلات العائدة للنوع *P.mirabilis* اعتماداً على مصنف بركي (Holt et al., 1994) وقد كانت نتائج التشخيص كما يأتي:

١-٢-١-٣ النمو على وسط ماكونكي:

تظهر مستعمرات *P.mirabilis* شاحبة لأنها غير مخمرة لسكر اللاكتوز وذات حافات غير منتظمة. ويحتوي هذا الوسط (٢-٥-١-٢) على أملاح الصفراء لذا لم تظهر حركة الانثيال.

١-٢-٢-٣ النمو على أغار الدم :

أظهرت العزلات جميعها قدرتها على الانثيال وبشكل واضح على وسط أغار الدم (١-٥-١-٢) حيث غطى النمو البكتيري كل سطح الوسط ولم يلاحظ إنتاجها للهيموليسين بشكل واضح عند تنميتها على هذا الوسط. كما تميزت برائحة لاذعة.

١-٢-٣-٣ الفحص المجهرى:

أظهر الفحص المجهرى للشرائح المصبغة بملون كرام، بكونها عصيات سالبة لملون كرام.

١-٢-٤-٣ اختبار الأوكسيداز :

التريتوفان. وتشير الدراسة التي أجراها Farmer وجماعته (١٩٨٥) على أنواع العائلة المعوية أن ٢% فقط من سلالات *P.mirabilis* لها القدرة على إنتاج الأندول بينما لا تستطيع ٩٨% من سلالات هذا النوع أن تنتجه كما أشار Murray وجماعته (١٩٩٦) إلى هذه النسب نفسها. بينما لم تسجل محلياً مثل هذه النتيجة.

١-٣- ٢- ٩- اختبار Ornithine decarboxylase :

أظهرت نتائج هذا الاختبار أن جميع عزلات *P.mirabilis* لها القدرة على إزالة مجموعة كربوكسيل (Decarboxylation) من الحامض الأميني الأورنثين من خلال تغير لون الكاشف Bromocresol purpule حيث يتحول في البداية إلى اللون الأصفر بسبب ارتفاع الحامضية نتيجة تخمر سكر الكلوكوز ثم تغير لون الكاشف إلى البنفسجي دليل القاعدية بسبب إزالة مجموعة كربوكسيل من الحامض الأميني (Senior., 1997-a). لقد أشار Farmer وجماعته (١٩٨٥) و Murray وجماعته (١٩٩٦) إلى أن ٩٩% من *P.mirabilis* التي درست لها القدرة على إزالة مجموعة كربوكسيل من الأورنثين.

١-٣- ١٠-٢- اختبار تخمر المالتوز :

لم تظهر العزلات جميعها قدرتها على تخمر المالتوز وتشير الدراسات إلى أن بكتريا *P.mirabilis* ليس لها القدرة على تخمر المالتوز ويستخدم هذا الاختبار (٢-٢-٢-٣-٥) مع اختبار Ornithine decarboxylase (١-٢-٦-١٦) واختبار الأندول (٢-٢-٣-٤-أ) في التمييز بين سلالات *P.mirabilis* و *P.vulgaris* (Senior., 1997-a).

وقد يعود السبب في ظهور الصفتين إنتاج الأندول وعدم إنتاجها لغاز كبريتيد الهيدروجين إلى حصول طفرات في مواقع الجينات المسؤولة عن إنتاج الأنزيمات الخاصة بتلك التفاعلات أو لأسباب أخرى حيث ذكر Falkow وجماعته (١٩٦٤) و Penner (١٩٨١) ظهور سلالات *P.mirabilis* لها القدرة على تخمير اللاكتوز وذلك بسبب حملها لموروثات هذه الصفة على بلازميد اقتراني كما أشاروا إلى إمكانية انتقاله أثناء الإصابة في الجسم الحي من بكتريا إلى أخرى.

٢-٣ التحليل التجميعي (العنقودي) Cluster analysis :

يشير جدول (٣-٣) إلى نتائج ٤١ اختباراً كيموحيوياً لخمسين عزلة *P.mirabilis* بالاعتماد على الفحوصات المختبرية بالإضافة إلى اختبارات نظام API 20 E (٣-٢-٢). فقد توزعت الفحوصات المختبرية بين تنميتها على الأوساط المختلفة وتخميها للسكريات وإنتاجها للأنزيمات وإنتاجها لـ α -Keto acid من الأحماض الأمينية.

وعند إجراء التصنيف العددي باستخدام جهاز الحاسوب وتطبيق معادلة نسب التشابه

(Ssm) (جدول ٣-٤) ضمن برنامج موضح في ملحق رقم (١) تم التوصل إلى أن العزلات المدروسة لبكتريا *P.mirabilis* والمعزولة من حالات سريرية مختلفة رغم التشابه المظهري فيما بينها إلا أنها يمكن أن تتوزع إلى ثلاثة أنماط حيوية (١١،٠،١) فقد أشار Tracy و Thomson (١٩٧٢) أن مخطط France و Markham عام ١٩٦٨ صنف سلالات *P.mirabilis* إلى أربعة أنماط حيوية بينما لم يجد Tracy و Thomson إلا مجموعتين ضمن سلالاتهم المدروسة من بكتريا *P.mirabilis*.

ومن ملاحظة نمط التجمع (الدندروكرام) (شكل ٣-٤) نجد أن المجموعة I تمثل معظم العزلات (جدول ٣-٥) حيث تمثل ٣٨ عزلة (٧٦%) أما المجموعة II فتشمل تسع عزلات وتمثل نسبة ١٨% من العزلات في حين احتوت المجموعة III على ثلاث عزلات وكانت نسبتها ٦% من مجموع العزلات.

جدول (٤-٣)

النسب المئوية للتشابه اعتماداً على الفحوصات الكيموحيوية بالاستناد الى معامل التشابه البسيط (Ssm)

شكل (٤-٣)

نمط التجمع (الدندروكرام) بين عزلات *P. mirabilis* اعتماداً على الفحوصات الكيموحيوية

وعند ملاحظة جدول (٣-٥) للفحوصات الكيموحيوية نلاحظ أن سبب انفصال النمطين الحيويين II ، III عن النمط I هو في إنتاج الأندول وتخمر السكرز وإنتاج كبريتيد الهيدروجين بينما تتشابه في الصفات الأخرى، فقد أوضح النمط العنقودي أن الأنماط الثلاثة تتشابه عند نسبة التشابه (٩٣%) بينما انفصلت المجموعات III،II عن نسبة التشابه ٩٥% حيث يظهر أن اختلاف النمط II عن النمط III بسبب اختلاف تخميرها للرفينوز والسكرز وإنتاج كبريتيد الهيدروجين وتتشابه معظم عزلات *P.mirabilis* ضمن النمط الحيوي I عند نسبة التشابه ٩٨% وهو النمط السائد بين العزلات وتتشابه معظم العزلات التابعة له بنسبة تشابه ١٠٠%.

تمكن Janda وجماعته (٢٠٠١) من تصنيف سلالات *P.vulgaris* على أساس خمسة اختبارات كيموحيوية إلى ست مجموعات حيوية biogroups ووجدوا أن السلالات في المجموعات ٢،٥،٦ هي السائدة حيث كانت نسبتها ٤٩% من مجموع العزلات المدروسة في حين كانت بقية المجموعات أقل تكراراً.

جدول (٣-٥)

يوضح النسب المئوية للصفات الكيموحيوية للأنماط الحيوية الثلاثة لبكتريا *P.mirabilis* المعزولة من حالات سريرية مختلفة اعتماداً على نظام API 20E

الاختبار	النمط الحيوي I عزلة ٣٨	النمط الحيوي II عزلات ٩	النمط الحيوي III عزلات ٣
ONPG	-100%	-100%	-100%
ADH	-100%	-100%	-100%
LDC	-100%	-100%	-100%
ODC	+100%	+100%	+100%
CIT	+86.8%	+89%	+67%
H ₂ S	+97%	+100%	+33%
URE	+100%	+100%	+100%
TDA	+100%	+100%	+100%

IND	-100%	-67%	-50%
VP	-94.7%	-67%	-67%
GEL	+100%	+100%	+100%
GLU	+100%	+100%	+100%
MAN	-100%	-100%	-100%
INO	-100%	-100%	-100%
SOR	-100%	-100%	-100%
RHA	-100%	-100%	-50%
SAC	-84%	-55.5%	-67%
MEL	-100%	-100%	-100%
AMY	-100%	-100%	-100%
ARA	-100%	-100%	-100%

٣-٣ اختبار حساسية عزلات *P.mirabilis* تجاه أقراص مضادات الحياة:

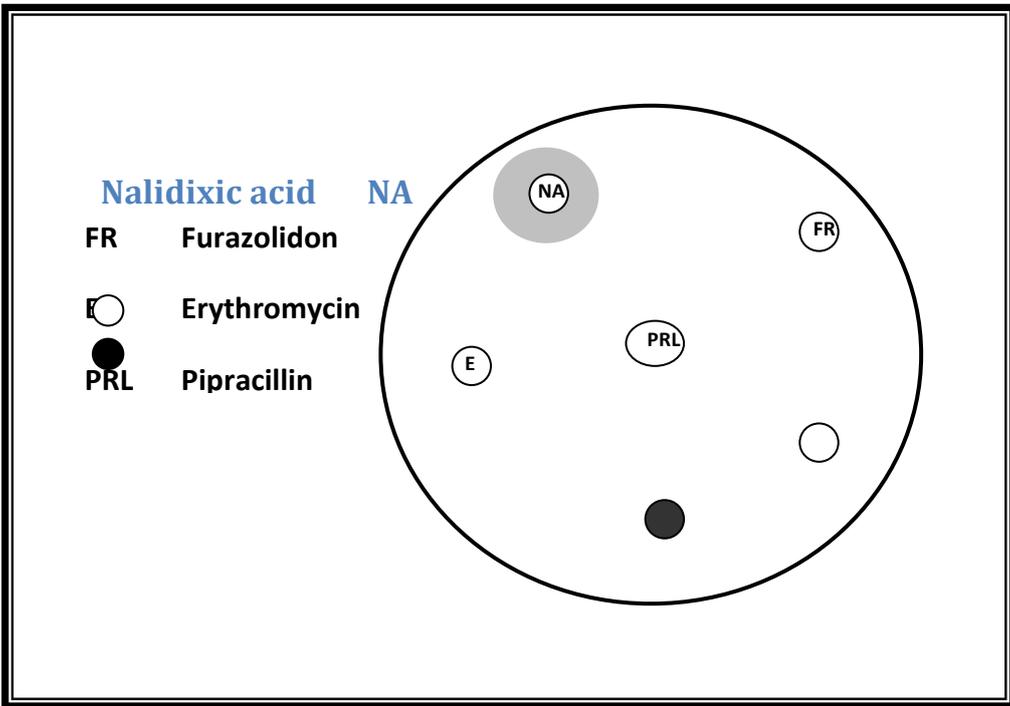
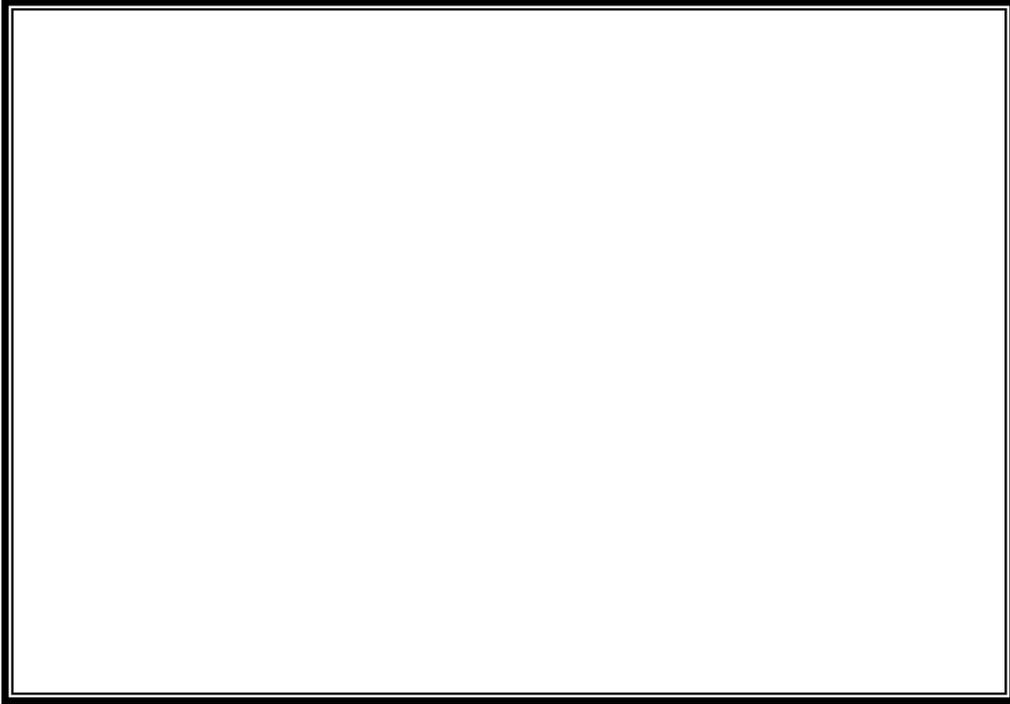
نتيجة إساءة استعمال مضادات الحياة في علاج مختلف الأمراض البشرية والحيوانية ظهرت سلالات مقاومة حيث أصبح من الشائع في المستشفيات عزل سلالات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية خاصة مقاومة مضادات البيبتالاكتام ضمن أفراد العائلة المعوية (Silvar *etal.*, 2001) ومضادات الأمينوكلايكوسايد ضمن البكتريا السالبة لمون كرام التي تسبب الإصابات المكتسبة من المستشفيات والتي يتوسط مقاومتها البلازميد عادة (Rubens *etal.*, 1981). كما ظهرت سلالات مقاومة لمضادات الكوينولونات مثل مضاد السبروفلوكساسين وحامض النالديكسك وغيرها (Martinez-Martinez *etal.*, 1998).

تم اختبار ٥٠ عزلة *P.mirabilis* تجاه ١٩ مضاداً حيويماً باستخدام طريقة Kirby-Bauer كما موضح في الأشكال (٣-٥) (أ، ب، ج) التي وصفت من قبل Atlas وجماعته (١٩٩٥) وقورنت مناطق التنشيط وفقاً إلى NCCLS (١٩٩٣)، (ملحق رقم ١) .

تشير نتائج دراستنا (جدول ٣-٦) إلى أن كل عزلات بكتريا *P.mirabilis* كانت مقاومة (١٠٠%) لمضادات اللنكوماميسين والأيرثرومايسين والفيورازوليدون والكلنداميسين والبنسلين بينما كانت نسبة مقاومتها للنترسايكلين ٩٦% والنيومايسين ٧٨% والتوبراميسين ٧٤% والسيفالاكسين ٧٢% بينما كانت جميع العزلات حساسة ١٠٠% لمضاد السبروفلوكساسين وسجل حامض النالديكسك أقل نسبة مقاومة ٦% بينما تراوحت نسب المقاومة لبقية المضادات بين هذه النسب. وتشير نتائج دراستنا إلى أن أفضل المضادات في تأثيرها على عزلات *P.mirabilis* والمعزولة من حالات سريرية مختلفة هي مضادات الكوينولونات

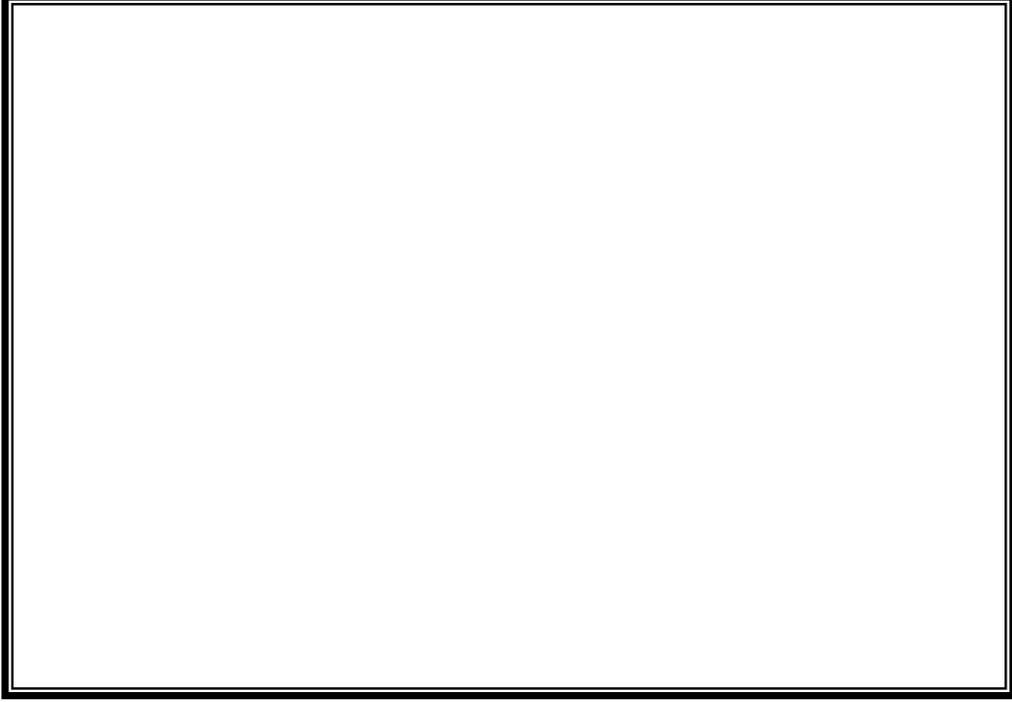
(شكل ٣-٦) حيث لم تظهر نسبة مقاومة لمضاد السبروفلوكساسين وتتفق نتائج دراستنا مع نتائج Akerele وجماعته (٢٠٠١) الذين وجدوا أن نسبة الحساسية لمضاد السبروفلوكساسين ١٠٠% بينما المرجاني (٢٠٠٠) سجلت عزلاته المحلية نسبة مقاومة ٤,٧%. أما حامض النالديكسك فقد أظهرت العزلات نسبة مقاومة ٦% وهي نتيجة تقترب من نتائج الباحثة Kareem (٢٠٠١) التي أظهرت عزلاتها المحلية نسبة مقاومة ٤% ولا تتفق مع نتائج Al-Jebouri (٢٠٠١) التي سجلت عزلاتها المحلية نسبة مقاومة ٢٠%.

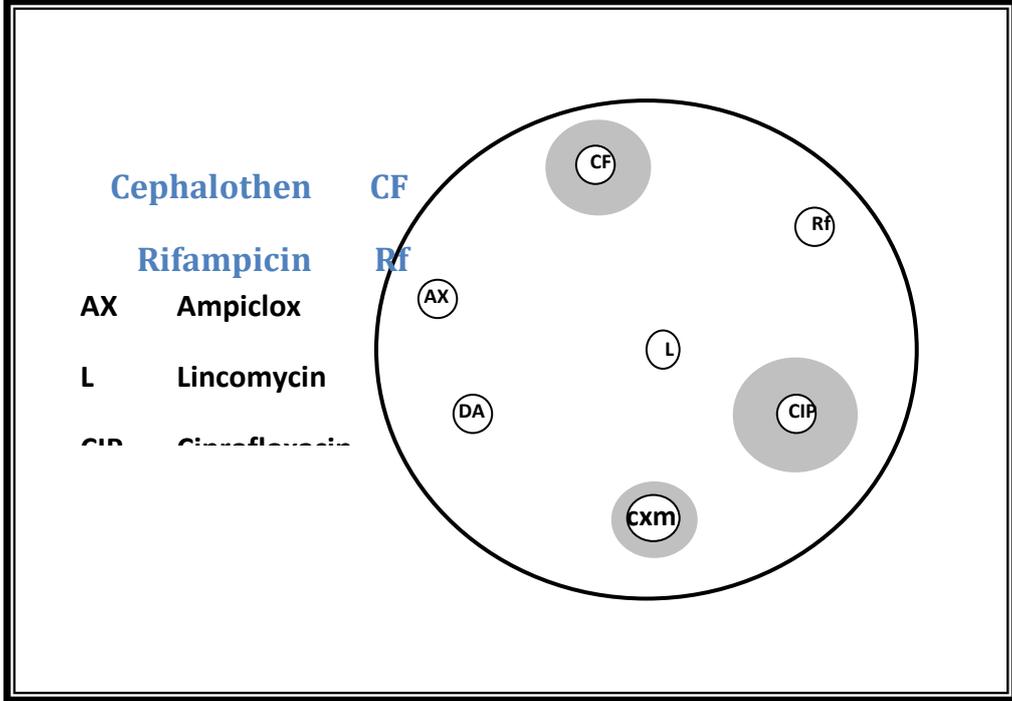
ويعود مضاد السبروفلوكساسين وحامض النالديكسك إلى مجموعة الكوينولونات التي تمتاز بتأثيرها واسع الطيف على الأحياء المجهرية وتستخدم بشكل واسع تجاه البكتريا المعوية (Ansdell and Ericyson, 1999) وعلى الرغم من ذلك فقد أشار كل من Martinez وجماعته (١٩٩٨) إلى ظهور سلالات مقاومة لمضادات الكوينولونات ضمن البكتريا المعوية حاملة لبلازميدات تشفر مورثاتها لمقاومة السبروفلوكساسين وحامض النالديكسك وبعض مضادات المجموعات الأخرى.



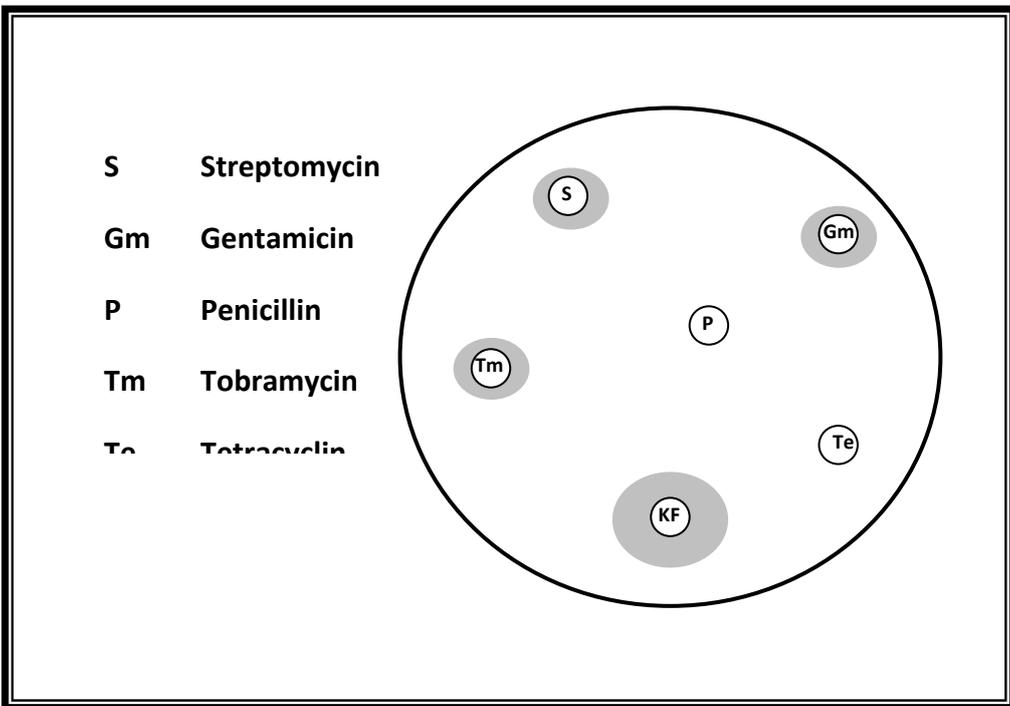
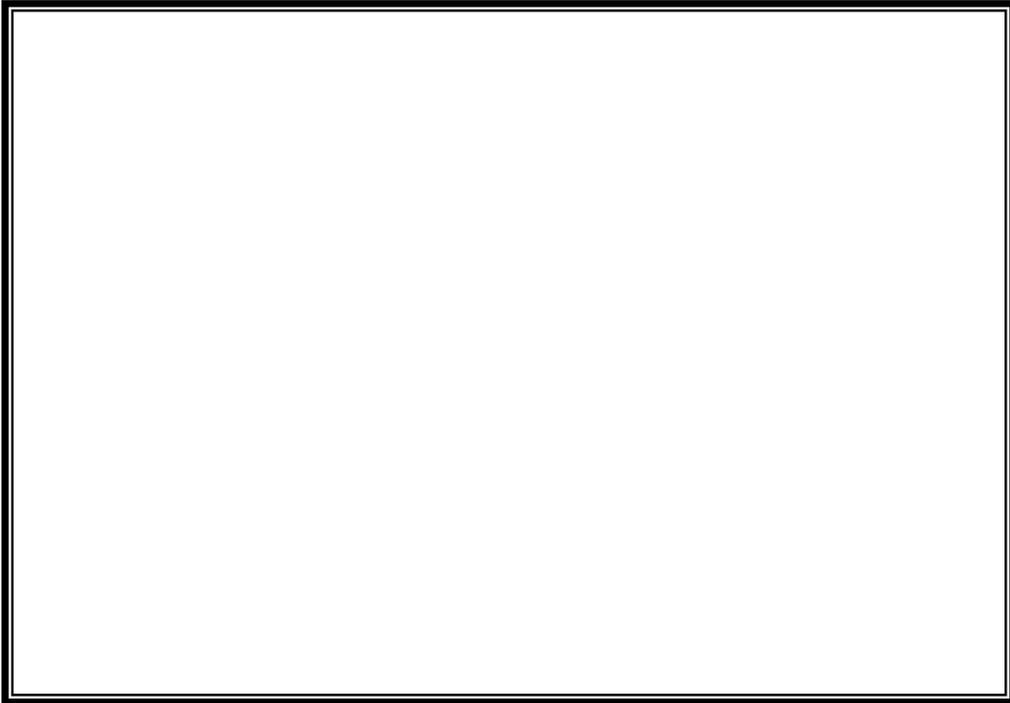
شكل (٣-٥-أ)

اختبار حساسية العزلة رقم ٣ تجاه ١٩ مضاد حيوي





شکل (۳-۵-ب)



شکل (ج-۵-۳)

جدول (٧-٣)

النسب المئوية لمقاومة مضادات الحياة لبكتريا *P.mirabilis*

النسبة المئوية	عدد العزلات المقاومة	مضاد الحياة	
١٠٠	٥٠	Lincomycin	١
١٠٠	٥٠	<i>Clindamycin</i>	٢
١٠٠	٥٠	Furazolidon	٣
١٠٠	٥٠	Erythromycin	٤
٩٦	٤٨	Tetracycline	٥
١٠٠	٥٠	Penicillin	٦
٦٤	٣٢	Amoxicillin	٧
٤٢	٢١	Pipracillin	٨
٦٤	٣٢	Cephalothin	٩
٧٢	٣٦	Cephalexin	١٠
٥٢	٢٦	Cefotaxime	١١
٦٨	٣٤	Streptomycin	١٢
٧٤	٣٧	<i>Tobramycin</i>	١٣
٧٨	٣٩	Neomycin	١٤
٣٢	١٦	Gentamicin	١٥

٤٠	١٠	Rifampicin	١٦
٦	٣	Nalidixic acid	١٧
٠	٠	<i>Ciprofloxacin</i>	١٨
٧٤	٣٥	Ampiclox	١٩

وتمتلك هذه البلازميدات القدرة على الانتقال بين أنواع البكتيريا المعوية ونقل هذه المقاومة ضمن مدى واسع من المضائف عن طريق الإقتران.

أما مجموعة مضادات البييتالاكتام والتي تشمل البنسلينات والسيفالوسبورينات فقد أظهرت نسب مقاومة متباينة حيث كانت العزلات جميعها مقاومة (١٠٠%) للبنسلين وتتفق نتائج دراستنا مع نتائج الباحثة Al-Jebouri (٢٠٠١) وتقرب من نتائج Kareem (٢٠٠١) التي أظهرت عزلاتها المحلية نسبة مقاومة ٩٠%. أما مضاد الأموكسلين الشائع الاستخدام في العلاج لمختلف أنواع الإصابات فقد كانت نسبة مقاومته ٦٤% وهي نتيجة تتفق مع نتيجة المرجاني (٢٠٠٠) الذي سجلت عزلته المحلية نسبة مقاومة (٦٩,٨%) وأظهرت العزلات نسبة مقاومة ٧٤% تجاه مضاد الأمبيكلوكس ويعود سبب ارتفاع نسبة المقاومة لهذه المضادات إلى استخدامها وبشكل واسع بالإضافة إلى انتشار العوامل الوراثية الناقلة لهذه المقاومة بين العزلات المنتجة لأنزيمات البييتالاكتاميز (Neuwirth *etal.*, 2001).

وأشارت نتائج دراستنا إلى أن ٤٢% من العزلات كانت مقاومة لمضاد البيراسيلين وهو من البنسلينات الحديثة وتتفق هذه النتيجة مع نتيجة Banter وجماعته (٢٠٠٠) الذين وجدوا أن نسبة المقاومة لهذه المضادات هي ٣٩% في دراسة أجريت في الأرجنتين.

أما مجموعة السيفالوسبورينات فقد لوحظ من النتائج ازدياد المقاومة تجاه الجيل الأول لها حيث أظهر السيفالوثين نسبة مقاومة (٦٤%) وتقرب نتيجة دراستنا من نتيجة

Al-Jebouri (٢٠٠١) حيث كانت نسبة المقاومة ٦٠% ولا تتفق مع نتيجة Banter وجماعته (٢٠٠٠) اللذين سجلوا نسبة مقاومة (٣٩%).

أظهر السيفالوكسين نسبة مقاومة (٧٢%) وهي نتيجة تقترب من نتيجة Al-Jebouri (٢٠٠١) التي سجلت نسبة مقاومة (٨٠%). وأمتاز مضاد السيفوتاكسيم وهو من سيفالوسبورينات الجيل الثاني نسبة مقاومة أقل (٥٢%) وهي نتيجة تتفق مع نسبة المقاومة التي سجلها المرجاني (٢٠٠١) وهي (٥٠,٧%) ولا تتفق مع نسبة المقاومة التي سجلتها عزلات *P.mirabilis* التي درستها Al-Jebouri (٢٠٠١) حيث كانت نسبة المقاومة (٣٠%).

لوحظ من الدراسة ارتفاع نسبة المقاومة بين عزلات *P.mirabilis* التي تمت دراستها كما يلاحظ أن هناك أكثر من مضاد حيوي تقاومه البكتريا إن هذه النتائج غير مستبعدة وذلك بسبب امتلاك بكتريا *P.mirabilis* لأنزيمات المحطمة لمضادات البيتا لاكتام واسعة الطيف ESBLs فقد أشار Luzzaro وجماعته (٢٠٠١) إلى ازدياد معدلات عزل سلالات *P.mirabilis* المنتجة لأنزيمات ESBL بنسبة ٨,٨% من كل عزلات *P.mirabilis* المعزولة خلال المدة من ١٩٩٧-١٩٩٩ وأشارت الدراسة إلى وجود ثلاثة مورثات مختلفة (TEM-15 TEM-20 TEM-52) تشفر إلى ثلاث أنزيمات من نوع ESBLs لم تسجل سابقاً في بكتريا *P.mirabilis* كما وجد Neuwirth وجماعته (٢٠٠١) أن البلازميدات تتوسط أنزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف ESBLs حيث أشار الباحثون إلى عزل بلازميد كبير الحجم ١٠٠ كيلو قاعدة يشفر إلى TEM-24 من بكتريا *E.aerogenes* وله القدرة على الانتقال في الجسم الحي vivo إلى بكتريا *K.Pneumonia* و *Ecoli* و *P.mirabilis* و *Serratia* و *P.vulgaris* و *marcescens*.

وفي دراسة أخرى وجد أن عزلات *P.mirabilis* المعزولة من حالات سريرية مختلفة في البرازيل تنتج أنزيم CTX-M وهو أحد أنواع أنزيمات البيتا لاكتاميز الذي يسبب تحطيم مضاد Cefotaxime وتحمل صفة إنتاجه على بلازميد اقتراني (Bonnet et al., 2000).

أظهرت عزلاتنا المدروسة من *P.mirabilis* نسبة مقاومة عالية لمضاد التتراسايكلين حيث كانت نسبة المقاومة ٩٦% وتتفق نتيجة دراستنا مع المرجاني (٢٠٠٠) الذي سجلت عزلته نسبة

مقاومة (٩٦,٨%) وهي نتيجة مرتفعة إذا ما قورنت مع نتيجة Akerele وجماعته (٢٠٠١) الذين وجدوا أن نسبة الحساسية لهذا المضاد (٧٢,١%).

ويعود سبب المقاومة لمضاد التتراسايكلين إلى وجود بلازميدات تشفر إلى آلية المضخة الباعثة التي تعتبر أهم آليات المقاومة لمضادات التتراسايكلين والتي لها القدرة على الانتقال بالاقتران أو عن طريق التنبيغ بالعائي، وتشفر هذه البلازميدات بالإضافة إلى ذلك إلى مقاومة مضادات الأمينوكلايكوسايد والكلورامفينيكول والسلفاناميد لذا تعتبر مقاومة التتراسايكلين مؤشراً إلى المقاومة المتعددة لمضادات الحياة (Katzung., 2001).

أما مجموعة الأمينوكلايكوسايد فقد أظهرت نسب مقاومة متباينة حيث كان مضاد الجنتاميسين أكثر مضادات هذه المجموعة تأثيراً على بكتريا *P.mirabilis* فقد كانت نسبة المقاومة واطئة (٣٢%) إذا ما قورنت مع نتيجة Al-Jebouri (٢٠٠١) التي سجلت عزلاتها نسبة مقاومة ٦٠% ومع النتائج المسجلة من قبل Akerele وجماعته (٢٠٠١) حيث كانت نسبة المقاومة للمضاد (٧٢,٧%) في حين تتفق نتائج دراستنا مع Bantar وجماعته (٢٠٠٠) الذين سجلوا نسبة مقاومة ٣٨% وتقترب من نتيجة Kareem (٢٠٠١) التي أظهرت عزلاتها نسبة مقاومة (٤٥%).

لقد أشار Katzung (٢٠٠١) إلى أن مقاومة مضاد الجنتاميسين من قبل البكتريا السالبة لملون كرام تعود إلى وجود بلازميدات مشفرة إلى الأنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسايد كما فسر الباحث Rubens وجماعته (١٩٨١) السبب في ازدياد مقاومة الجنتاميسين إلى الاستخدام الواسع لهذا المضاد في المستشفيات والتي أصبحت بيئة عالية الانتخاب لظهور الأحياء المجهرية المقاومة لمضاد الجنتاميسين كما أشار الباحثون أنفسهم أن مقاومة الجنتاميسين يتوسطها البلازميد الذي يشفر إلى الأنزيمات المحورة.

أما مضاد الستربتومايسين وهو أقدم الأمينوكلايكوسايد فقد كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد (٦٨%) وهي نسبة مرتفعة إذا ما قورنت مع نتيجة Kareem (٢٠٠١) التي أظهرت عزلاتها نسبة مقاومة (٤٥%) وهي واطئة مقارنة مع نسبة المقاومة التي سجلتها عزلات Al-Jebouri (٢٠٠١) حيث كانت نسبة المقاومة (٩٠%).

أما مضاد التوبرمايسين كانت نسبة المقاومة له (٧٤%) بينما أظهر النيومايسين أعلى نسبة مقاومة من بين مضادات الأمينوكلايكوسايد (٧٨%).

ومن ملاحظة الجدول (٧-٣) نجد أن هناك ٤٣ نمطاً من أنماط المقاومة من مجموع خمسين عزلة *P.mirabilis* لذا يصعب الاعتماد على أنماط المقاومة كصفة تشخيصية لعزلات *P.mirabilis*. كما أظهرت العزلات جميعها مقاومة متعددة لمضادات الحياة حيث يظهر من الجدول (٧-٣) أن أقل العزلات تعدداً في مقاومة المضادات هي المقاومة تجاه سبعة مضادات حيوية كما في العزلات (٧،٢٢،٢٣) بينما كان أعلى عدد للمضادات التي تمت مقاومتها من قبل هذه البكتريا هو ١٧ مضاداً كـمـا فـي العـزـلتين (٣،٤) الأشكال (٣-٥-أ)، (٣-٥-ب)، (٣-٥-ج).

ومن ملاحظة نتائج فحص الحساسية يمكن ملاحظة ارتباط مقاومة مضاد الجنتاميسين وهو من الأمينوكلايكوسايد واسعة الاستخدام مع مضاد الأموكسيلين وهو من مضادات البييتالاکتام واسعة الاستخدام أيضاً حيث يلاحظ أن كل العزلات المقاومة لمضاد الجنتاميسين كانت مقاومة لمضاد الأموكسيلين بالإضافة إلى سيفالوسبورينات الجيل الأول (السيفالوثين والسيفالكسين). ربط الباحثون بين انتقال المقاومة لمضادات البييتالاکتام ومضادات الأمينوكلايكوسايد حيث أشار Neuwirth وجماعته (٢٠٠١) إلى أن انتقال مقاومة مضادات البييتالاکتام يساعد على انتقال المقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسايد.

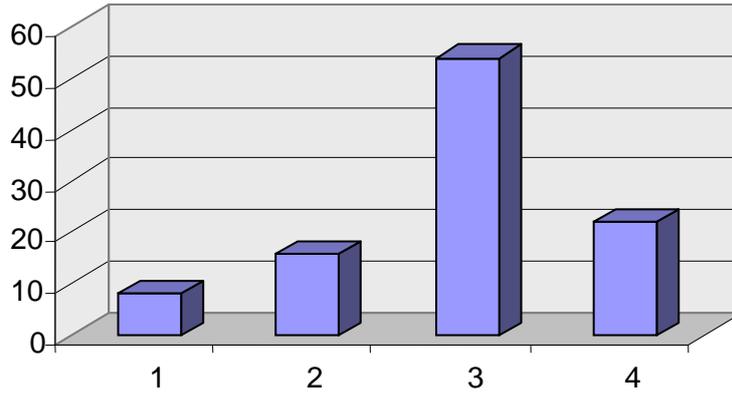
وعند ملاحظة الشكل (٧-٣) نجد أن عزلات *P.mirabilis* يمكن تقسيمها إلى أربع مجموعات اعتماداً على عدد مضادات الحياة التي تقاومها هذه البكتريا كما نلاحظ أن المجموعة الثالثة هي السائدة حيث تشكل نسبة (٥٦%) من العزلات والتي تقاوم ١٢-١٤ مضاداً حيوياً (جدول ٣-٨). وتتفق نتائج دراستنا مع نتائج كل من Adler وجماعته (١٩٧١) و Kareem (٢٠٠١) الذين وجدوا أن معظم عزلات *P.mirabilis* التي درست من قبلهم كانت متعددة المقاومة لمضادات الحياة.

أشار المرجاني (٢٠٠٠) أن ٤٧,٦% من عزلاته كانت مقاومة لـ ١١-١٥ مضاداً حيوياً وقد مثلت المجموعة السائدة.

جدول (٨-٣)

تقسيم عزلات *P.mirabilis* إلى أربع مجاميع اعتماداً على عدد المضادات التي تقاومها

النسبة المئوية	عدد العزلات المقاومة	عدد مضادات الحياة	المجموعة
٨	٤	٧ - ١	١
١٦	٨	١١ - ٨	٢
٥٤	٢٧	١٤ - ١٢	٣
٢٢	١١	١٧ - ١٥	٤



شكل (٧-٣)

النسبة المئوية لمجاميع عزلات المقاومة المتعددة في بكتريا *P. mirabilis*

١-٣-٣ الكشف عن أنزيمات البييتالاكتاميز:

تقوم أنزيمات البييتالاكتاميز بمهاجمة حلقة β -lactam الموجودة في نواة البنسلينات والسيفالوسبورينات وكسر أصرة الأמיד Amide فيها فيتحول المضاد إلى مركب فاقد الفعالية (Jawetz *etal.*, 1998) استخدمت طريقة اليود في التحري عن وجود أنزيمات البييتالاكتاميز والموصوفة من قبل Skey (١٩٧٨) حيث انتخبت ١٧ عزلة معظمها أظهرت مقاومة عالية وكان المحتوى البلازميدي لعدد منها (٢-١) بلازميد.

أظهرت نتائج الكشف أن هناك ٧ عزلات منتجة لأنزيمات البييتالاكتاميز من مجموع ١٧ عزلة منتخبة من بكتريا *P.mirabilis* أي نسبة ٤١,١%. ويشير الجدول (٣-٩) أن العزلات (١١,٩,٣) كانت هي الأسرع في إظهار النتيجة الموجبة أي أنها تنتج أنزيمات البييتالاكتاميز بشكل أكبر مما يعطي مؤشراً لمقاومتها الواسعة لأغلب مضادات البييتالاكتاميز خاصة البنسلين أما العزلات (٨,١٣,٢١) فقد أعطت نتيجة موجبة بعد مرور أكثر من خمس دقائق مما يعزى إلى إنتاجها لهذه الأنزيمات ولكن بكميات أقل من العزلات السابقة.

أما بقية العزلات فهي مقاومة لمضادات البييتالاكتام إلا أنها لم تظهر نتيجة موجبة لهذا الفحص وهذا يعطي مؤشراً على أن هناك آليات أخرى للمقاومة عدا إنتاجها لأنزيمات البييتالاكتاميز أو أنها تنتج أنزيمات البييتالاكتاميز المنتجة من قبل السيفالوسبورينات والتي لم تستخدم في التجربة. فقد أشارت الدراسات إلى أن هنالك أكثر من ٥٠ أنزيماً معروفاً من أنزيمات البييتالاكتاميز المختلفة ومعظمها تقع تحت سيطرة بلازميدات البكتريا وبعض هذه الأنزيمات مستحثة من قبل سيفالوسبورينات الأجيال الجديدة أو قد تكون المقاومة لمضادات البييتالاكتام بسبب تغير أو فقدان في مستقبلات (PBPs) التي يرتبط بها المضاد أو امتلاك البكتريا لحاجز النفاذية (Permeability barriers) وتقع هذه الآليات تحت سيطرة الكروموسوم (Jawetz *etal.*, 1998). وجد Neuwirth وجماعته (٢٠٠١) من خلال تحليل بروتينات الغشاء الخارجي لسلاسل *P.mirabilis* المقاومة لمضاد Imipenem وجود تحور في بروتينات ارتباط البنسلين PBP.

أشار Abd-Al-Razzak (٢٠٠١) إلى أن العزلات المقاومة لمضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات لم تكن جميعها منتجة لأنزيمات البييتالاكتاميز عند دراسته لسلاسل *Ps.aeruginosa* وأشار Sykes (١٩٧٨) إلى أن البكتريا السالبة لملون كرام والمنتجة لهذه الأنزيمات بكميات كبيرة ممكن أن يكشف عنها بنجاح بطريقة اليود هذه. أما الأنواع التي تنتجها بكمية قليلة فيصعب الكشف عنها بهذه الطريقة، كما أشار إلى أن معظم البكتريا السالبة لملون كرام تنتج أنزيمات البييتالاكتاميز بكميات قليلة أو تكون مرتبطة بالجدار خلف الغشاء الخارجي للجدار الخلوي أي أنه لا يفرز خارج الخلية لذا يصعب الكشف عنه. من جهة أخرى أن هذا الكشف لا يميز إن كانت هذه الأنزيمات محمولة على بلازميد أو كروموسوم.

لقد أشار Luzzaro وجماعته (٢٠٠١) إلى ازدياد نسبة عزل سلالات *P.mirabilis* المنتجة لأنزيمات البيبتالكتاميز واسعة الطيف ESBLs. كما أكد Babalova وجماعته (١٩٩٩) إلى إمكانية انتقال البلازميدات التي تشفر لأنزيمات ESBLs والمقاومة لمضادات Cefotaxime وCeftazidim وAztreonam إلى بكتريا *E.coli* و *P.mirabilis*.

جدول (٩-٣)

نتائج اختبار ١٧ عزلة في إنتاجها لأنزيمات البيبتالكتاميز باستخدام اليود

رقم العزلة	١	٢	٣	٥	٦	٧	٨	٩	١١	١٣	١٤	١٨	٢١	٣٥	٣٦	٤٠	٤٥
النتيجة	-	-	++	-	-	-	+	+++	+++	+	-	+	+	-	-	-	-

(+++) حدوث تغير سريع بلون الكاشف (خلال الخمس دقائق الاولى للفحص).

(++) تغير لون الكاشف خلال العشرة دقائق الاولى للفحص.

(+) تغير لون الكاشف في وقت أكثر من عشرة دقائق.

(-) العزلة غير منتجة للأنزيم.

٣-٤ التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا *P.mirabilis*:

تمتلك بكتريا *P.mirabilis* عدداً من عوامل الضراوة التي تمكنها من أحداث الضرر والإصابات المختلفة في المضيف ومنها إنتاج الأنزيمات وقدرتها على الحركة السريعة ووجود ظاهرة الأنتيال وإنتاج أنزيمات deaminase وغيرها (Zhao *etal.*, 1999) (Zunino *etal.*, 1999).

٣-٤-١ التحري عن إنتاج اليوربيز:

تم الكشف عن إنتاج اليوربيز عند تغير لون كاشف الفينول الأحمر في وسط اليوريا (Christensen) المضاف له ٢% يوريا من اللون الأصفر إلى اللون الوردي لقد أظهرت العزلات جميعها (١٠٠%) قدرتها على إنتاج أنزيم اليوربيز كما في الجدول (٣-٢)، (٣-٣) أشار Mobley وChippendale (١٩٩٠) إلى أن سلالات *P.mirabilis* جميعها منتجة لليوربيز بينما أشار Farmer وجماعته (١٩٨٥) إلى أن (٩٨%) من سلالات *P.mirabilis* منتجة لأنزيم اليوربيز

واعتبرها الباحثون صفة تشخيصية وتصنيفية لأنواع المتقلبات (Mobley and Hausinger., 1989) يقوم أنزيم اليوريز بتغيير لون الوسط بسبب ارتفاع الأس الهيدروجيني إلى القاعدية نتيجة تحلل اليوريا إلى أمونيا وغاز ثنائي أكسيد الكاربون (Collee *etal.*, 1996). ويعتبر إنزيم اليوريز من أهم عوامل الضراوة التي تملكها هذه البكتريا لما له الأثر الكبير في أحداث مختلف الإصابات خاصة إصابات المجرى البولي مثل تكون حصى الكلى والمثانة والتهاب الكلية والحويضة الحاد والغيبوية الكبدية وانسداد قنطرة المجرى البولي (Mobley and Hausinger., 1989) (Xin-li *etal.*, 2002) كما أن الأمونيا بحد ذاتها تكون سامة بشكل مباشر للخلايا الطلائية الكلوية (Mobley and Chippendale., 1990).

وجد Macfaddin (٢٠٠٠) أن سلالات *P.mirabilis* أحياناً تتأخر أو تعطي كشافاً موجباً ضعيفاً لليوريز.

وتحمل صفة إنتاج اليوريز أما على بلازميد أو كروموسوم. ويتكون عنقود (Operon) اليوريز من سبعة مورثات ثلاثة منها ABC ure تشفر إلى تركيب الوحدات الصغيرة للأنزيم (Subunits) بينما يتطلب اتحاد أيون النيكل Ni^{+2} مع apoenzyme المورثات Ure DEFG. كما وجد أن الطفرات الفاقدة لصفة اليوريز تستطيع استيطان مثانة الفئران المقتطرة بنجاح إلا أنها لا تسبب حصى المثانة Urolithiasis وتبقى ضعيفة في قدرتها على الصعود إلى الكلى كما وجدوا باستخدام المجهر الليزري الماسح Laser scanning microscopy بكتريا *P.mirabilis* داخل مادة الحصى المتكونة كنتيجة لإنتاج إنزيم اليوريز (Xin-Li *etal.*, 2002).

٣-٤-٢ الكشف عن الهيمولاييسين:

أظهرت نتائج اختبار العزلات في إنتاجها للهيمولاييسين على وسط نقيع القلب - الدماغ المضاف له ٢% كريات دم حمر لإنسان مغسولة و ٠,٨% أملاح الصفراء (لتنشيط ظاهرة الأنثيال) أن ٧٠% من العزلات لها القدرة على إنتاج الهيمولاييسين (الجدول ٣-٣) من خلال ملاحظة التحلل حول النمو وفي بعض الأحيان يتطلب إزالة النمو لملاحظة التحلل (Welch., 1987) وتقرب نتائج دراستنا من نتيجة Thanoon (١٩٩٤) الذي وجد أن ٧٨,٦% من عزلات *P.mirabilis* لها القدرة على إنتاج الهيمولاييسين.

أشار Welch و Swihart (a-1990) إلى أن ٩٤% من سلالات *P.mirabilis* المدروسة من قبلهم كانت منتجة للهيمولايسين وأن هناك نوعين من الهيمولايسين تنتجه هذه البكتريا أحدهما HpMA وهو أكثر شيوعاً من HlyA بين سلالات المتقلبات. وتحمل صفة إنتاج الهيمولايسين في أنواع المتقلبات *P.mirabilis* و *P.vulgaris* على بلازميدات. حيث تم عزل البلازميدين pWPM100 و pWPM110 المشفرين للهيمولايسين (Uphoff and Welch., 1990).

تكمن أهمية الهيمولايسين في فعاليته السمية تجاه الخلايا (Cytotoxic) كما يؤدي إلى تحلل كريات الدم الحمر من خلال عمل ثقوب في الغشاء الخلوي (Swihart and Welch., 1990-b) كما يظهر تأثيره السمي على الخلايا الطلائية ويسبب تحطيم أنسجة المضيف (Mobley and Belas., 1995) أشار Zunino وجماعته (١٩٩٩) إلى أن الهيمولايسين من عوامل الضراوة الفعالة إلا أنه لا يظهر في المراحل الأولى من الإصابة بالتهاب المجاري البولية بل يظهر في المراحل المتأخرة للإصابة.

إن أقصى فعالية لإنتاج الهيمولايسين تصل عند منتصف الطور اللوغارتمي وتقل بشكل سريع في نهاية مراحل النمو. لقد وجد من الدراسة إن هنالك تشابه كبير بين الهيمولايسين الذي تنتجه بكتريا *E.coli* وبكتريا *Morganella morganii*, *P.mirabilis* حيث تسيطر المورثات الأربعة (*hlyC*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyD*) على إنتاج الهيمولايسين ونقله خارج الخلية إلا أنه لم يلاحظ وجود المورث *hlyD* والمسؤول عن إخراج الهيمولايسين خارج الخلية في بكتريا *P.mirabilis* وهذا ما يفسر ارتباط فعاليتها الهيمولايسية بين الجدار (cell-associated) في هذه البكتريا (Koronakis *etal.*, 1987). لذا قد تمتلك ٣٠% الباقية من عزلاتنا الهيمولايسين ولكن بشكل غير فعال مرتبط بالجدار.

٣-٤-٣ الكشف عن إنتاج البروتيز:

استخدمت أوساط عدة للتحري عن إنتاج إنزيمات البروتيز للكشف عن قدرة تحليل البروتينات المختلفة من قبل عزلات *P.mirabilis* المعزولة من حالات سريرية مختلفة كما أن الهدف من هذه

الاختبارات هو التحري عن أنواع إضافية من الأنزيمات المحللة للبروتينات Proteolytic enzymes المنتجة من قبل هذه البكتريا والتي قد تعتبر عوامل ضراوة للبكتريا تناولت الاختبارات.

٣-٤-٣-١ اختبار تحلل الجلاتين :

أظهرت ٥٠ عزلة (١٠٠%) قدرتها على تحليل الجلاتين (الجدول ٣-٣) وقد أشار Senior (١٩٩٩) إلى استخدام الجلاتين كمادة أساس سريعة في تحديد الأنزيمات الحالة للبروتينات Proteolytic enzymes المفروزة من قبل السلالات لمختلف أنواع المتقلبات حيث أشار أن أكثر من ٩٥% من السلالات كانت محللة للجلاتين. تم تحديد الأختبار الموجب من خلال بقاء وسط الجلاتين سائلاً حتى بعد تركه في الثلاجة بدرجة ٤م وهو دليل على تحلل الجلاتين أما بقاء الوسط صلباً دليل النتيجة السالبة

(Collee et al., 1996).

وتشير نتائج Farmer وجماعته (١٩٨٥) إلى أن ٩٠% من سلالات *P.mirabilis* لها القدرة على تحليل الجلاتين.

٣-٤-٣-٢ إنتاج الكازئينيز:

يستخدم وسط CLED لتثبيط ظاهرة الأنثيال. فقد استخدم بعد أن أضيف الكازئين بتركز (٠,٥%) للكشف عن إنتاج أنزيم الكازئينيز. حيث تم قياس مناطق التحلل بعد فترة حضانة ٢٤-٤٨ ساعة (Senior., 1999).

أظهرت ٤٢ عزلة *P.mirabilis* (٨٤%) قابليتها في إنتاج إنزيم الكازئينيز. تم قياس مناطق التحلل بعد مرور ٢٤ ساعة وعند زيادة مدة الحضانة لوحظ زيادة سعة مناطق التحلل، كما ظهر أن بعض العزلات غير المنتجة بعد مرور ٢٤ ساعة أظهرت مناطق تحلل صغيرة حول اللقاح عند زيادة

مدة الحضانة ٤٨ ساعة بينما بقيت العزلات الأخرى غير محللة الكازائيين. لقد أشار Laftaa (٢٠٠١) إلى أن بكتريا *P.mirabilis* المدروسة من قبله أعطت

إنتاجية عالية على وسط CLED المضاف له الكازائيين والـ BSA إلا أنه أشار إلى استخدام وسط الكازائيين في بقية خطوات الدراسة لأنه أقل كلفة وأكثر وفرة من بقية البروتينات.

٣-٤-٣ فعالية أنزيمات البروتياز والكولاجينز والإيلاستيز في وسط حليب الفرز:

بينت نتائج الأختبارات أن ٤٦ عزلة (٩٢%) قادرة على تحليل بروتينات حليب الفرز وهي نتيجة تتفق مع Senior (١٩٩٩) الذي وجد أن ٩٤% من عزلته محللة لبروتينات هذا الوسط بينما أشار Laftaa (٢٠٠١) أن جميع عزلت *P.mirabilis* المدروسة من قبله كانت محللة لبروتينات هذا الوسط بعد مرور ٢٤ ساعة.

لوحظ من خلال دراستنا ازدياد مناطق التحلل بعد الاستمرار بالحضانة بحيث يختفي حليب الفرز من الطبق بسبب تحلله.

عند استبدال الكازائيين بالكولاجين أو الإيلاستين لم تظهر أية مناطق تحلل حتى بعد مرور خمسة أيام على الحضانة مما يشير إلى أن بكتريا *P.mirabilis* ليس لها القدرة على تحليل الكولاجين أو الإيلاستين. أشار Loomes وجماعته (١٩٩٠) إلى أن إنزيم البروتياز المفرز من قبل بكتريا *P.mirabilis* مشابه في عمله لإنزيم الإيلاستيز المفرز من قبل *Ps.aeruginosa* عند تقطيعه لسلسلة ببتيد IgG ولكن *P.mirabilis* لا تنتج الإيلاستيز أو الكولاجينز.

من خلال مقارنة الأوساط الثلاثة نجد أن وسط الجلاتين أكثرها سهولة وسرعة في التحري عن أنزيمات البروتياز إلا أن وسط حليب الفرز أكثر وضوحاً في الكشف عن السلالات المنتجة للأنزيمات المحللة للبروتينات. لقد أشار Senior (١٩٩٩) أنه يمكن استخدام وسط حليب الفرز بشكل عام وبغض النظر عن نوع الكائن المجهرى حيث تظهر مناطق التحلل بشكل سريع كما أشار إلى أن زيادة مدة الحضانة إلى أكثر من ٣٢ ساعة تزيد من مناطق التحلل.

وعندما قارن Senior بين الجلاتين والكزائيين كمادة أساس للكشف عن البروتييز أقتراح استخدام الجلاتين أفضل من الكازئين في دراسة أنزيمات البروتييز وذلك بسبب حساسية الجلاتين في الكشف عن هذه الأنزيمات.

أشار Laftaa (٢٠٠١) أن بكتيريا *P.mirabilis* أعطت إنتاجاً لأنزيم البروتييز أفضل على الأوساط الحاوية على بروتينات حيوانية مقارنة بالبروتينات النباتية وذلك لأن البكتريا الممرضة المعزولة من الإنسان تكون قد تكيفت للاستفادة من البروتينات الموجودة في الأنسجة التي تهاجمها هذه البكتريا وأشار الباحث نفسه إلى أن البروتييز ينتج في طور اللوغارتمي للكائن وكلما كانت سرعة النمو اللوغارتمي عالية كلما كانت سرعة إنتاج البروتييز أكثر ويصل أقصى إنتاج للبروتييز في طور الثبات ثم ينخفض بعد ذلك.

٣-٤-٤ إنتاج إنزيمات **Deaminases**:

تمتاز بكتريا *P.mirabilis* بقدرتها على إزالة مجموعة الأمين من الأحماض الأمينية بفعل إنتاج أنزيمات (amino acid Deaminases) التي تولد α -Keto acid والتي ترتبط بأيونات الحديد Fe^{+3} وبالتالي تسمح للبكتريا بالنمو في بيئة محـددة الحديد (Mobley and Belas ., 1995) وقد اعتبرها الباحثون من عوامل الضراوة المهمة (Zhao et al., 1999) (Zunino et al., 1999).

وتستطيع بكتريا *P.mirabilis* أكسدة عدد كبير من الأحماض الأمينية وتحويلها إلى α -Keto acids والأمونيا والذي يتفاعل مع كلوريد الحديد الذي يمكن إضافته إلى الوسط الزراعي ليتكون لون خاص لكل حامض أميني (Krieg and Holt., 1984).

وقد أعتبرت صفة إنتاج هذه الألوان على الأوساط الزراعية التي يضاف لها الحامض الأميني صفة تشخيصية عن طريقها يمكن تمييز أنواع *Proteus*، *Providencia* عن بقية أفراد العائلة المعوية (Singer and Volcani., 1955)، (Penner., 1981) تم استخدام الأحماض الأمينية الآتية للتعرف على قابلية البكتريا على أكسبتها.

أ-الكشف عن أنزيم Phenyl alanine Deaminase:

أظهرت العزلات المدروسة من بكتريا *P.mirabilis* جميعها قدرتها على إنتاج إنزيم Phenylalanine Deaminase على وسط الفنل ألنين من خلال ملاحظة تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق ويعمل هذا الأنزيم على إزالة مجموعة الأمين من الأمينات أو الأحماض الأمينية وتعتبر تفاعلات إزالة مجموعة الأمين من التفاعلات التي تساهم في إزالة سمية بعض المركبات السامة وتحولها إلى أحماض كاربوكسيلية تدخل في المسالك الأيضية للخلية كما هو الحال عند تحول الفنل ألنين إلى الفينيل أنزيم acid phenylpyruvic

(Atlas *etal.*, 1995). أن صفة إنتاج هذا الأنزيم هي صفة مميزة لجميع أنواع قبيلة *Proteae* حيث أشار Senior (1997-a) في حالة وجود أية عزلة لا تعطي نتيجة موجبة لهذا الكشف لا يجب اعتبارها أحد أفراد قبيلة *proteae* بينما أشار Farmer وجماعته (١٩٨١) إلى أن ٩٨% من سلالات *P.mirabilis* منتجة لأنزيمات Phenylalanine Deaminases.

ب- الكشف عن إنتاج إنزيم Tryptophane Deaminase:

أظهرت عزلتنا جميعها المدروسة من *P.mirabilis* قدرتها على إنتاج صبغة بنية (جدول ٣-٣) (شكل ٣-٣) على وسط التربتوفان والتربتوفان من الأحماض الأمينية الأروماتية ويسمى (α-Amino 3-3-indole Propionic acid) (المظفر ١٩٩٠). تنتج بكتريا *P. mirabilis* إنزيم Tryptophane Deaminase الذي يحفز على تحول التربتوفان إلى indole pyruvic acid ويتحد الأخير مع كلوريد الحديد مولداً صبغة بنية محمرة مميزة. يعمل هذا الأنزيم على تحويل التربتوفان إلى مركب يمكن أن يدخل ضمن الفعاليات الأيضية للخلية البكتيرية (Atlas *et al.*, 1995) وتشير الدراسات إلى أن سلالات *P.mirabilis* جميعها منتجة لهذا الأنزيم (Penner, 1981) (Krieg and Holt , 1984).

٣-٤-٥ إنتاج إنزيم Ornithine decarboxylase:

أظهرت نتائج دراستنا أن جميع عزلات *P.mirabilis* (١٠٠%) لها القدرة على إنتاج إنزيم إزالة مجموعة كاربوكسيل من الأورنثين (الجدول ٣-٣، ٢-٣) حيث تم الكشف عنه من خلال تحول

لون الوسط أولاً إلى الأصفر بفعل تخمر سكر الكلوكوز ثم تحول لون الكاشف إلى البنفسجي دليل ارتفاع القاعدية بسبب إزالة مجموعة كاربوكسيل من الأورنثين.

الأورنثين من الأحماض الأمينية التي تتكون أثناء العمليات الحياتية للأمونيا وهو من الأحماض الأمينية التي لا تدخل في بناء البروتينات بل توجد في مصادر خاصة بشكل منفرد أو مرتبط مع مركبات أخرى. (المظفر . ١٩٩٠).

يعد اختبار أكسدة الأورنثين من أهم الاختبارات لتمييز بكتريا *P.mirabilis* و *M.morganii* عن بقية أفراد قبيلة Proteeae إذ ينتج هذان النوعان أنزيم Ornithine decarboxylase بكميات كبيرة مما يسمح بإعطاء نتيجة موجبة حتى لو كان تركيز الكلوكوز ٠,٥% (Senior, 1997-a).

أشار Murray وجماعته (١٩٩٦) أن ٩٩% من سلالات *P.mirabilis* لها القدرة على إنتاج إنزيم Ornithine decarboxylase بينما أشار Senior (1997-a) أن سلالات *P.mirabilis* جميعها تنتج هذا الأنزيم.

استخدمت الأحماض الأمينية اللايسين والأرجنين والكلوتامين والألنن والأيزوليوسين بالطريقة نفسها فوجد أن بكتريا *P.mirabilis* ليس لها القدرة على أكسدة اللايسين والأرجنين بينما تباينت قدرة هذه البكتريا في أكسدة الأحماض الأمينية الباقية حيث أظهرت ٩٠% من العزلات قدرة على أكسدة الكلوتامين و ٨٦% كانت مؤكسدة لللايسين و ٨٢% مؤكسدة للأيزوليوسين (الجدول ٣-٣) مما يشير إلى امتلاك هذه البكتريا لعدد كبير من الأنزيمات يمكنها من النمو في أوساط وبيئات مختلفة (Krieg and Holt ., 1984).

ويعتمد هذا الاختبار على إزالة مجموعة كاربوكسيل من الأحماض الأمينية كما هو الحال في الأورنثين واللايسين بينما يعتبر dihydrolase test بالنسبة للأرجنين (Collee et al., 1996).

٣-٥ التحري عن إنتاج البروتسين:

أستخدمت طريقة Senior (١٩٧٧) في الكشف عن قدرة عزلات *P.mirabilis* في إنتاج البروتسين على وسط ماكونكي وكما هو موصوف في طريقة العمل حيث تم الكشف عن العزلات المنتجة من خلال ظهور مناطق التثبيط للنمو البكتيري عند نقطة تقاطع الخطوط (شكل ٣-٩) فوجد أن هناك ١٠ (٢٠%) من عزلات *P.mirabilis* المدروسة منتجة للبروتسين عند اختبار كل عذلة ضد بقية العزلات بمجموع ٢٥٠٠ اختبار وتمثل العزلات (١٨،٢٢،٢٥،٣٦،١١،٩،٢،٣،٥،٨) العزلات المنتجة للبروتسين وهي قليلة نسبياً إذا ما قورنت مع نتائج Senior (١٩٧٧) الذي وجد أن ٧٥% من مجموع ٢٥٠ سلالة *P.mirabilis* كانت منتجة للبروتسين. وقد يعود السبب إلى العدد القليل من العزلات المدروسة مقارنة مع عزلات الباحث.

وجد من خلال دراستنا أن ١١ عذلة *P.mirabilis* كانت حساسة للبروتسين المنتج وكما هو موضح في الجدول (٣-١٠) كما لوحظ أنه يمكن تقسيم العزلات إلى ٨ أنماط (P/S) مختلفة من مجموع ١٠ أنماط (P/S) اعتماداً على حساسية العزلات تجاه العزلات المنتجة للبروتسين ووجد أن هنالك نمطين متشابهين ($P_{9/S_{3,16}}$) و ($P_{18/S_{3,16}}$) كذلك النمطين ($P_{23/S_{14,34}}$) و ($P_{36/S_{14,34}}$) وهذا يشير إلى تشابه العزلتين ١٨،٩ وكذلك تشابه العزلتين ٢٥ و٣٦.

أشار Senior (١٩٧٧) إلى وجود ٩٧ نمطاً مختلفاً من مجموع ٢٤١ سلالة *P.mirabilis* معزولة من التهابات المجاري البولية كما أكد أن هناك أنماط (P/S) معينة لها الفة خاصة في إصابتها للمجرى البولي العلوي، حيث لاحظ بالتحديد النمط المنتج للبروتسين من النوع ٣ أكثر تكراراً في إصابتها لهذا الجزء من المجرى البولي. كما وجد Senior (1997-b) في دراسة على سلالات *P.mirabilis* المعزولة من مجرى الدم (blood stream) أن هنالك ٢٦ نمطاً (P/S) من بين ٣٨ عذلة. وفي دراسة لـ Wilson وجماعته (١٩٩٨) على مجموعة من مرضى التهاب المفاصل الرثوي RA ومجموعة من الأصحاء لوحظ أن السلالات المعزولة جميعها من مرضى الـ RA كانت منتجة للبروتسين وأن هنالك أنماطاً معينة من P/S ومعظمها من النمط ٣ بينما لوحظ تعدد الأنماط واختلافها في مجموعة الأصحاء.

درس Senior (١٩٨٣) التركيب الجزيئي للبروتسين ٣ ووجد أنه يشبه ذنب العائيات وأن شكله هذا له علاقة وثيقة بفعاليتة الحيوية.

يعزي Senior (1997-b) سبب حساسية بعض سلالات *P.mirabilis* تجاه السلالات الأخرى المنتجة للبروتسين إلى وجود نوع خاص من المستقبلات على السطح الخارجي للسلالة البكتيرية المختلفة.

وبالنظر لعدم توافر العزلات القياسية المنتجة للبروتسين لا يمكن تحديد العدد الحقيقي من الأنماط (P/S) حين يمكن أن تكون هنالك عزلات غير منتجة إلا أنها حساسة للعزلات القياسية كما سجلها Senior (1997-a) ويرمز لها مثلاً Po/S_2 .

تعتبر طريقة التتميط بالبروتسين من الطرق المميزة في تتميط سلالات *P.mirabilis* وهي طريقة مستقلة عن بقية أنواع التتميط كالتتميط المصلي كما أن صفة إنتاج البروتسين ثابتة حتى بعد مرور مدة زمنية من الخزن للسلالات المنتجة (Senior., 1997-b).

العزلة الحساسة رقم ٣

العزلة الحساسة رقم ١٦

(العزلة المنتجة
(٩
منطقة تثير
النمو البكتيري

(العزلة المنتجة
(١٨



شكل (٩-٣)

تتميط سلالات *P.mirabilis* اعتماداً على إنتاج البروتسين وحساسيتها له على

وسط ماكونكي بعد مدة حضانة ١٨ ساعة وبدرجة حرارة ٣٧ م

جدول (٣-١٠)

يوضح نمط الحساسية تجاه عزلات *P.mirabilis* المنتجة للبروتسين والمعزولة من حالات سريرية مختلفة

P/S type	Sensitive strains العزلات الحساسة	Producer strains العزلات المنتجة	ت
P ₂ / S _{5,7}	5,7	2	1
P ₃ / S _{2,5,7}	2,5,7	3	2
P ₅ / S _{3,15}	3,15	5	3
P ₈ / S _{3,11,14}	3,11,14	8	4
P ₁₁ / S _{5,18}	5,18	11	5
P ₉ / S _{3,16}	3,16	9	6
P ₁₈ / S _{3,16}	3,16	18	7
P ₂₂ / S ₁₀	10	22	8
P ₂₅ / S _{14,34}	14,34	25	9
P ₃₆ / S _{14,34}	14,34	36	10
10	11	المجموع	

جدول (٣-١١)

يوضح نمط الحساسية تجاه مستخلصات البروتسين المستخلصة من عزلات *P.mirabilis*

P/S type	Sensitive strains العزلات الحساسة	Producer strains العزلات المنتجة	ت
P ₂ / S _{5,7}	5,7	2	1
P ₃ / S _{2,5,7}	2,5,7	3	2

$P_5 / S_{3,14,15,34}$	3,14,15,34	5	3
$P_8 / S_{3,11,14,15,40}$	3,11,14,15,40	8	4
$P_{11} / S_{5,18,42}$	5,18,42	11	5
$P_9 / S_{3,16}$	3,16	9	6
$P_{18} / S_{3,16}$	3,16	18	7
P_{22} / S_{10}	10	22	8
$P_{25} / S_{14,34}$	14,34	25	9
$P_{36} / S_{14,34}$	14,34	36	10
10	13	المجموع	

٣-٥-١ الكشف عن البروتسين بطريقة **Senior (1997-b)**:

انتخبت العزلات المنتجة للبروتسين جدول (٣-١١) وتم استخلاص البروتسين منها بطريقة Senior (1997-b) وباستخدام محث الـ Mitomycin C وكما هو موصوف بطرائق العمل حيث تم الحصول على ٨ أنواع مختلفة من البروتسين.

استخدمت هذه المستخلصات في تنميط عزلات *P.mirabilis* وحسب وصف (Al-Jumaili., 1975-a) وطريقة Senior (1997-b) حيث وجد أن هناك ١٣ عزلة حساسة من مجموع ٥٠ عزلة *P.mirabilis* أي ٢٦% من العزلات كما لوحظ من خلال الدراسة أن طريقة تحضير البروتسين باستخدام الوسط السائل هي أكثر نجاحاً من استخدام الوسط الصلب وأكثر سرعة وهذا يتفق مع ما أشار إليه Al-Jumaili (1975-b) عند تحضيره إلى ١٢ مستحضراً من البروتسين القياسي لتنميط ١٠٠٠ عزلة حيث تم الحصول على ٤٨ نمط من أنماط الحساسية تجاه البروتسين القياسي مقارنة مع الأنماط العشوائية من مجموع ٢٠٤ عزلة لـ Cradock و Watson (1965).

كما لوحظ من دراستنا أنه لا توجد فروقات بين التتميط بطريقة الجميلي (a-1975) أو Senior (b-1997) فكلاهما أعطت النتيجة نفسها.

ويعتبر الباحثون البروتسين عاملاً يزيد من ضراوة البكتريا ويساعد في انتشارها ضمن المنطقة التي تستوطنها مما يسهل أحداث الإصابة (Tracy and Thomson., 1972) (Senior *etal.*, 1987) فقد أشار Senior (b-1997) إلى أنه قد يرتبط إنتاج البروتسين بشكل مباشر أو غير مباشر بضراوة البكتريا كما هو الحال في الكولسين المنتج من قبل سلالات *E.coli*.

٢-٦ اختبار دنييس Dienes test:

يعد هذا الإختبار من الإختبارات المهمة في الدراسات التصنيفية من خلال التعرف على وجود التشابه أو الإختلاف بين العزلات البكتيرية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة حيث يتم ربط هذا النوع من التصنيف مع أنواع أخرى من التتميط كالتتميط بالبروتسين والتتميط بالعائيات ونمط المقاومة للمضادات الحيوية.

تم انتخاب ٢٥ عزلة *P.mirabilis* من مصادر عزل مختلفة كالإدرار ومسحات الأذن ومسحات الجروح ومسحات الحروق ومن الخروج وعلى أساس إنتاجها للبروتسين ومقاومتها لمضادات الحياة بالإضافة إلى تشابه صفاتها الكيموحيوية حيث ظهر من نتائج الاختبار أن هنالك ١٢٠ نمط دنييس من ٣٠٠ حالة مختبرة. (حيث تم اختبار كل عزلة من الخمس وعشرين التي تم انتخابها للاختبار تجاه بقية العزلات الأخرى وكما في الجدول (٣-١٢) يعتمد هذا الاختبار على ظاهرة الأنتيال حيث تكون العزلتان مختلفتين (+) عند تكون حد فاصل عند نقطة التقاء أمواج العزلتين المنتاله بينما تعتبر متشابهة (-) عندما لا يكون هذا الحد الفاصل بل يتداخل النمو فيما بينها (الشكل ٣-٩-أ) و(٣-٩-ب) (Tracy and Thomson., 1972).

عند محاولة ربط التتميط بالبروتسين والتتميط باختبار دنيس نجد أن نمط حساسية البروتسين للعزلتين المنتجتين (٩ و ١٨) يكون متشابهاً تجاه العزلات نفسها مما قد يشير إلى أنهما عزلتان متماثلتان بل قد يعودان للسلالة نفسها إذ لم يتكون بينهما حد فاصل عند اختبارهما باختبار دنيس مما قد يشير إلى أن هنالك علاقة وثيقة بين اختبار دنيس وإنتاج البروتسين وينطبق ذلك على العزلة رقم (٣ و ٢٥). فقد أشار Adler وجماعته (١٩٧١) إلى وجود علاقة وثيقة بين أنماط البروتسين وأنماط دنيس فقد وزع ٤٣ سلالة *P.mirabilis* إلى ١٠ مجموعات على أساس نمط البروتسين ووجد أن هناك نمطين يرتبطان بشكل وثيق بأنماط دنيس ونمط مقاومتها لمضادات الحياة.

أما عند مقارنة العزلتين قيد الدراسة (٩ و ١٨) تجاه مقاومتها لمضادات الحياة و(٣ و ٢٥) نجد أن نمط المقاومة لكل عزلتين متشابه تقريباً مما يؤكد أن هذه العزلات تعود إلى السلالة نفسها حيث نمط المقاومة للعزلتين ٩، ١٨ (Te-P-Am-Cxm-KF-CF-Gm-N) كما في الجدول (٣-٧).

أما نمط المقاومة للعزلتين (٣ و ٢٥) (Te-P-Am.Ax-PRL-Cxm-KF-CF-N-S-) (Tm).

كما يمكن ملاحظة أن العزلات المذكورة تقع ضمن النمط الحيوي I (شكل ٣-٤) وتنتج العزلتان ٩، ١٨ إنزيمات البيتالاكتاميز بشكل واضح (جدول ٣-٩).



شكل (٣-٩-أ)

نتيجة سالبة لاختبار دنيس والذي يشير الى تشابه العزلتين ٥ و ١ بسبب

عدم تكون حد فاصل بين العزلتين



شكل (٣-٩-ب)

نتيجة موجبة لاختبار دنيس والذي يشير الى اختلاف العزلتين ٢ و ١٨ بسبب تكون حد فاصل بين العزلتين

٣ - ٧ عزل الدنا البلازميدي:

انتخبت العزلات ١،٣،٥،٦،٨،٩،١١،١٨،٢٢ للكشف عن المحتوى البلازميدي إذ تم انتخابها على أساس مقاومتها لمضادات الحياة ونتاجها لأنزيمات البييتالاكتاميز وعوامل الضراوة.

استخدمت طريقة الغليان Boiling method فوجد من خلال ترحيل المستخلص البلازميدي للعزلات المنتجة على هلام الأكاروز أن العزلات (١،٣،٥،٢٢) احتوت على (١-٢) حزمة بلازميدية (شكل ٣-٨) بينما لم تظهر بقية العزلات أي محتوى بلازميدي. تعتمد طريقة الغليان على استخدام درجة حرارة ١٠٠م بوجود مواد تضعف الجدار الخلوي وعوامل تساعد على منع تحطيم الدنا بواسطة انزيمات nucleases كما أن الراسب المتكون بعد التبريد يحتوي على الدنا الكروموسومي المتمسخ جزئياً والبروتينات المتمسكة بينما يبقى معظم الـ (RNA) والبلازميدات في الجزء الطافي والذي يمكن فصله باستخدام الطرد المركزي وإضافة خليط من الكلوروفورم والفينول الذي يخلص الدنا من البروتينات وبقية المواد المضافة (detergents) (Holmes and Quigley, 1981).

وعند استخدام طريقة التحلل بالقاعدة alkaline lysis أعطت نتائج الترحيل النتيجة السابقة نفسها. مما يشير إلى إمكانية استخدام الطريقتين في استخلاص بلازميدات بكتريا *P.mirabilis*. وتعتمد طريقة التحلل بالقاعدة على تجزئة الأغشية الداخلية باستخدام (detergents) مثل SDS كما يساعد المحيط القاعدي على تسيخ جزئي للدنا الكروموسومي، استخدمت هذه التقنية وبنجاح في استخلاص الدنا البلازميدي لجميع الأجناس والأنواع عدا بعض أجناس البكتريا مثل *Pseudomonas*, *Campylobacter* (Wachsmuth, 1986).

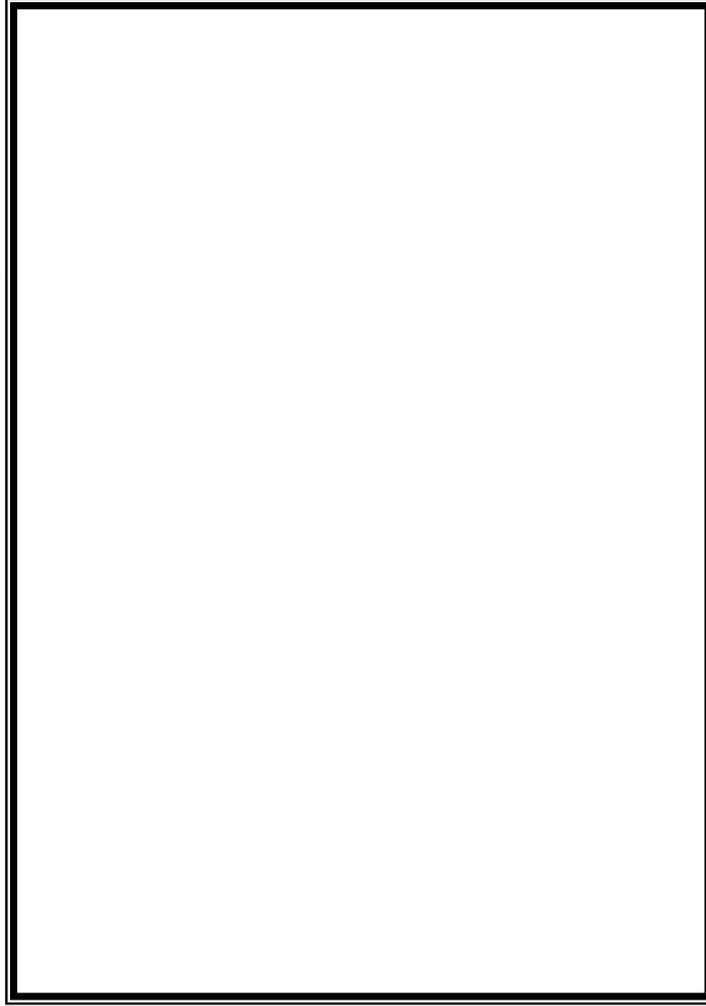
لقد أشار Desai وجماعته (١٩٨١) إلى أن بكتريا *P.mirabilis* التي درست من قبلهم كانت تحتوي على أكثر من حزمة بلازميدية واحدة. كما أشار Shafi و Datta (١٩٧٥) إلى أن مقاومة الجنتاميسين والتوبراميسين في بكتريا *P.mirabilis* محمولة على اثنين من البلازميدات وتحمل بكتريا *P.mirabilis* بلازميدات تشفر إلى بعض عوامل الضراوة فقد تم عزل بلازميد pWP M١٠٠ من سلالات هذا النوع المنتجة للهيموليسين (Welch., 1987) كما تمكن Hoffmann وجماعته

(١٩٩٨) مــــن تحديــــد بلازميــــد دين كبيــــرين بحــــدود ٦٠-٧٠

كيلو قاعدة عند دراستهم لثلاثين سلالة *P.mirabilis* ووجدوا أن أربع سلالات احتوت على
بلازمند صغير بحدهد ٦ كيلو قاعدة (Kb).

1 2 3 4 5 6 7 8 9

دنا بالبزميدي



>

شكل (٨-٣)

حزم الدنا البلازميدي المستخلص بطريقة الغليان لعزلات *P. mirabilis* بعد ترحيلها كهربائياً على هلام الأكاروز (٠,٨%)

٦ = عزلة رقم ٩

١ = عزلة رقم ١

٧ = عزلة رقم ١١

٢ = عزلة رقم ٣

٨ = عزلة رقم ١٨

٣ = عزلة رقم ٥

٩ = عزلة رقم ٢٢

٤ = عزلة رقم ٦

٥ = عزلة رقم ٨

٣-٧-١ دراسة النسق البلازميدي **Plasmid profile**:

يشفر البلازميد لمقاومة مضادات الحياة واستهلاك السترات واللاكتوز والسكرور واليوربا وإنتاج إنزيم Lysine decarboxylase و H₂S والمستضد O والبروتينيز والكوليسين والسموم المعوية وغيرها ، كما يعتبر وسيلة مهمة في التشخيص والتصنيف للأحياء المجهرية الممرضة لذا فقد تم استخدام النسق البلازميدي في الدراسات الوبائية بشكل واسع (Wachsmuth, 1986) (John and Twitty,) (1986) (Neuwirth et al, 2001) عند ملاحظة شكل (٣-١٠) النسق البلازميدي للعزلات المدروسة *P.mirabilis* لوحظ تشابه عدد الحزم البلازميدية بالإضافة إلى أوزانها الجزيئية للعزلات (٣،٥،٢٢،١) مما قد يعطي مؤشراً إلى وجود تشابه بين هذه العزلات فعند ملاحظة الشكل (٣-٤) نجد أن العزلات (١،٣،٥،٢٢) تقع ضمن النمط ١ وهي المجموعة السائدة والتي تتشابه بنسبة تشابه (٩٨%-١٠٠%) إي أن هذه العزلات تتشابه من ناحية الصفات الكيمو حيوية .

النتائج السابقة لاختبار دنيس تشير إلى وجود تشابه بين هذه العزلات المدروسة إلا أنه لا يمكن الكشف عن هذا التشابه من خلال النسق البلازميدي إلا عند استخدام الأنزيمات القاطعة الداخلية (restriction enzymes) والتي تعطي مؤشراً إلى وجود التشابه والاختلاف بين السلالات حتى وإن كان اختلافاً بسيطاً (John and Twitty, 1986).

لقد أشار Wachsmuth (١٩٨٦) إلى استخدام الأنزيمات القاطعة الداخلية التي تستهدف مواقع محددة على الدنا البلازميدي أو الكروموسومي. فقد وجد عند استخدام هذه الأنزيمات لدراسة سلالتين من بكتريا *E.coli* المسببة للإسهال والمعزولة من المريض نفسه والتي أظهرت نسقاً بلازميدياً متماثلاً واختلافاً في مناطق القطع مما يشير إلى اختلاف السلالتين. في حين استخدم Rubens وجماعته (١٩٨١) الأنزيمات القاطعة في تحديد التشابه بين خمسة بلازميدات عائدة إلى خمسة أجناس بكتيرية مختلفة تعود إلى العائلة المعوية حيث ثبت تشابهها في مناطق القطع مما أشار إلى وجود مؤشرات وبائية لانتقال المقاومة المحمولة على البلازميدات.

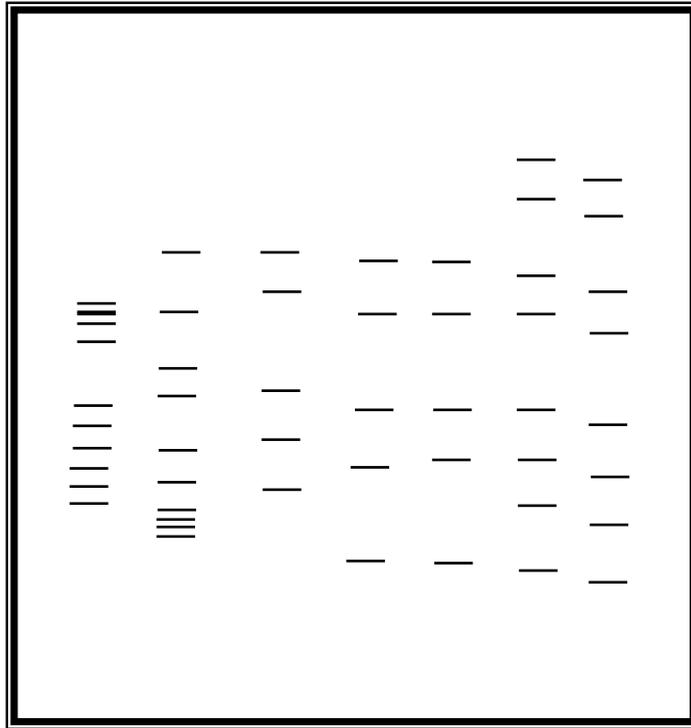
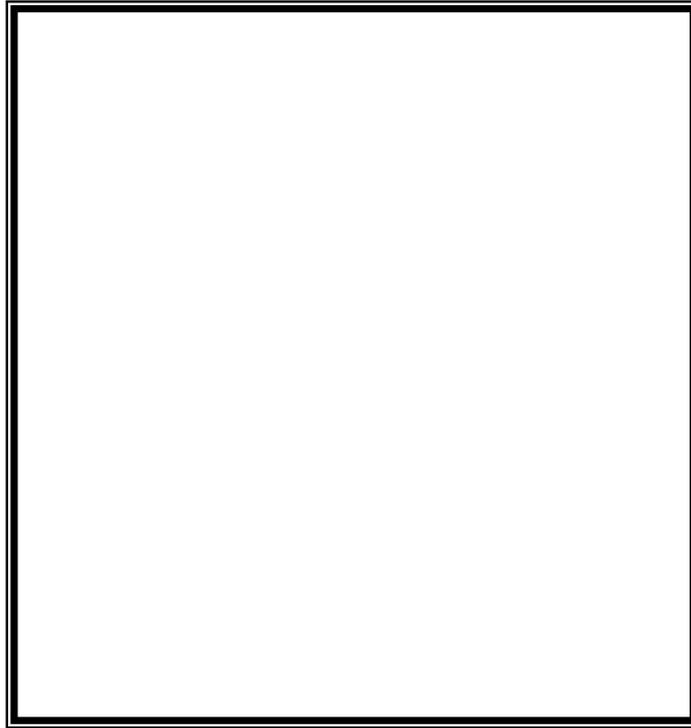
٣ - ٨ تحليل النسق البروتيني:

انتخبت سبع عزلات من الأنماط الحيوية الثلاثة المنمطة سابقاً على أساس الاختبارات الكيموحيوية (شكل ٣-٤) وتم تكسير الخلايا للحصول على البروتين الكلي الذائب باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية وتم تهجير البروتين على هلام SDS-Polyacrylamide وبعد إجراء الهجرة الكهربائية electrophoresis اعتماداً على الوزن الجزيئي للبروتينات المستخلصة صبغت الحزم بصبغة Coomassie Brilliant blue. تم قياس مسافة الهجرة لكل حزمة بالملمتر وتم إيجاد معامل التشابه البسيط Ssm (جدول ٣-١٣) بمقارنة أنماط الهجرة لكل عزلة مع الأخرى (شكل ٣-١١) ثم تم رسم الدندروكرام (شكل ٣-١٢).

وعند دراسة الدندروكرام لوحظ وجود اختلاف كبير بين تلك السلالات حيث أظهر المخطط أن السلالات المختلفة المستعملة في الدراسة يمكن أن تتوزع إلى أربع مجموعات (شكل ٣-١٢) مما يشير إلى إمكانية استخدام مسارات الهجرة الكهربائية للبروتينات الكلية الذائبة في التصنيف وعند ملاحظة العزلات التي تعود إلى المجموعة رقم ١ والتي تشمل العزلتين (٧،١٢) نجد أنها تنتمي إلى النمط الحيوي III (شكل ٣-٤) أما العزلتان (١١،٨) اللتان تقعان ضمن المجموعة رقم ٢ نلاحظ أنهما تنتميان إلى النمط الحيوي I وهو النمط السائد بين العزلات أما المجموعة رقم ٣ والتي تشمل العزلتين (٢١،٣٥) فإنها تنتمي إلى النمط الحيوي III في حين أن المجموعة رقم ٤ والتي تمثل العزلة رقم ٤ تعود إلى النمط الحيوي II مما قد يعطي مؤشراً على وجود علاقة وثيقة بين الصفات الكيموحيوية ونمط الترحيل للبروتين الكلي الذائب وهذا التفسير قد يكون منطقياً إذ أن الصفات الكيموحيوية تعبر عن الإنزيمات والبروتينات التي تنتجها الخلية والتي يمكن أن تظهر في الهجرة الكهربائية للبروتينات. لقد وجد Voros و Senior (١٩٩٠) ٢١ نمطاً من مجموع ١٥٠ سلالة *M.morganii* اعتماداً على نسق ترحيل بروتينات الغشاء الخارجي التي تتراوح بين ٣٥-٤٠ كيلو دالتن. وفي دراسة أخرى لـ Barros وجماعته (٢٠٠١) على سلالات *Pediococcus* المعزولة من حالات سريرية تمكن الباحثون من تشخيص ٧٢ سلالة اعتماداً على WCPP (Whole Cell Protein Profile) ما دامت كل سلالة تمتلك نسقاً بروتينياً خاصاً بها كما وجدوا

علاقة وثيقة بين النمط البروتيني وتهجين DNA مع DNA.

٨ ١١ ٧ ١٢ ٢١ ٣٥ ٤٤



شكل (١١-٣)

أنماط ترحيل البروتين الذائب الكلي WCPP على هلام SDS-Polyacrylamide ١٠% ولمدة ست ساعات

لقد أشار Deley و Kersters (١٩٧٥) إلى أن طريقة ترحيل البروتين الكلي للخلية تعطي معلومات مهمة في التشخيص وفي التعرف على الأحياء المجهرية غير المعروفة إذا تمت هذه الطريقة في ظروف مسيطر عليها كما أثبت Barros وجماعته (٢٠٠١) إلى أن تحليل WCPP على هلام SDS-Polyacrylamide يعد أداة يعول عليها في تمييز وتشخيص البكتيريا.

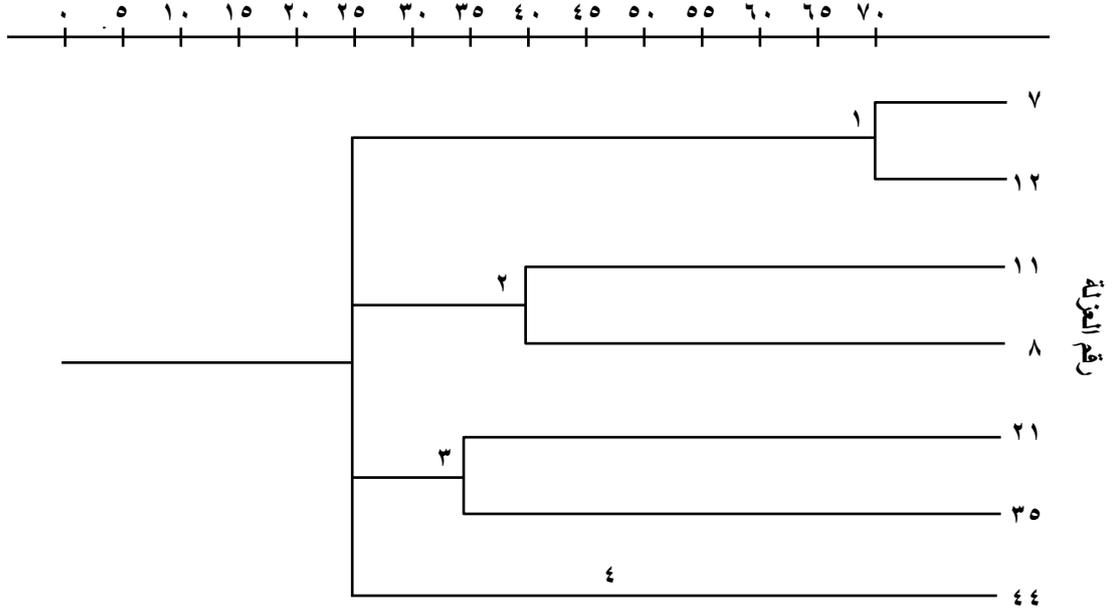
يمكن أن نلاحظ ومن دراسة النسق البروتيني التشابه الواضح بين العزلة رقم ٨ و ١١ من حيث تقارب مواقع وعدد الحزم وهي ثمانية مع وجود فرق بسيط في نهاية هلام العزلة رقم ٨ حيث لم تظهر احدى الحزم التي يمكن ملاحظتها في العزلة رقم ١١ أما العزلتين (٧ و ١٢) فقد أظهر الترحيل لبروتيناتها تشابهاً كبيراً حيث احتوت على (٧ حزم) كما يظهران تشابهاً مع العزلتين (٨ و ١١). أما نسق الهجرة لبروتينات العزلة رقم ٢١ فلم تظهر الحزم البروتينية الواقعة بين الحزم الاساسية بشكل دقيق وأظهرت اختلافاً بسيطاً عن بقية العزلات. وتميزت العزلة ٣٥ بعدد من الحزم البروتينية يصل إلى (١٠ حزم) بعضها واضح بشكل دقيق والآخر منتشر وهي أقرب إلى العزلتين (٨ و ١١) بينما انفردت العزلة ٤٤ في شكل حزمها حيث بلغ عدد الحزم (١١ حزمة) واضحة وحادة.

جدول (٣-١٣)

معامل التشابه Ssm لسلاسل *P.mirabilis* اعتماداً على مقارنة أنماط الهجرة الكهربائية للبروتين الذائب الكلي

	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧
١	١٠٠						
٢	٧٠	١٠٠					
٣	١٠	١٠	١٠٠				
٤	١٠	٢٠	٤٠	١٠٠			
٥	١٠	١٠	٢٠	١٠	١٠٠		
٦	١٠	١٠	٢٥	٢٥	١٠	١٠٠	
٧	١٥	١٥	١٠	١٥	١٠	٣٥	١٠٠

النسب المئوية للتشابه



شكل (١٢-٣)

دندروكرام يوضح انماط تجميع عزلات *P. mirabilis* اعتماداً على ترحيل البروتين الذائب الكلي على هلام SDS-polyacrylamide

جدول (٧-٣)

أنماط مقاومة مضادات الحياة لبكتريا *Proteus merabilis* تجاه ١٩ مضاد حيوي

Tetracycline	Penicillin	Amoxicillin	Ampiclox	Piperacillin	Cefutaxime	Cephaloxin	Cephalothin	Gentamicin	Neomycin	Streptomycin	Tobramycin	Rifampicin	Ciprofloxacin	Nalidixic acid	Furazolidon
R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R
R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R
R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R
R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R
R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R
R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
R	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	S	R
R	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R
R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R
R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R
R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R
S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R
R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R

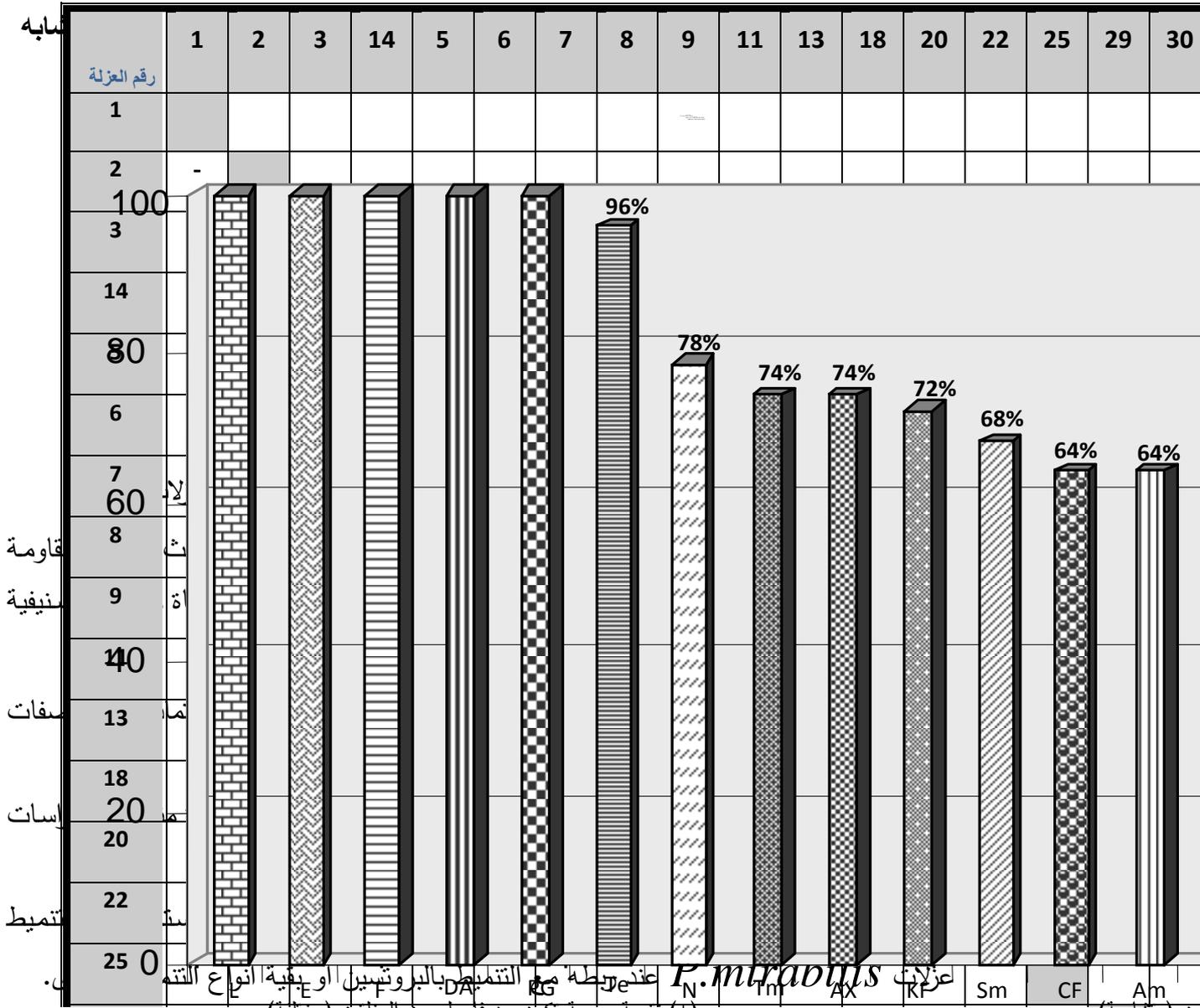
	Tetracycline	Penicillin	Amoxicillin	Ampiclox	Piperacillin	Cefutaxime	Cephaloxin	Cephalothin	Gentamicin	Neomycin	Streptomycin	Tobramycin	Rifampicin	Ciprofloxacin	Nalidixic acid	Furazolidon
	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R
	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R
	R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R
	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R
	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R
	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R
	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R
	R	R	S	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R
	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	R
	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	R
	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R
	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R
	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R
	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R
	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R
	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R
	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R
	R	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	R
	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R
	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R

مقاومة = R ، حساسية = S

جدول (٣-١٢)

جدول (٣-٤)

مع اختبار دنيس لخمس وعشرين عزلة *P. mirabilis*



٦- يمكن الاستفادة من نسق هجرة البروتين الكلي الدائب في تصنيف سلالات النوع نفسه. (+) نتيجة موجبة تكون حد فاصل بين العزلتين (مختلفة).

النسب المئوية لمقاومة مضادات الحياة من قبل عزلات *P. mirabilis*

46 93 95 90 93 93 90 88 90 88 88 85 85 78 88 88 83 90 88 90 88 88 90 90 90 90 88 88 90 90 88 85 95 8
47 98 90 100 98 98 95 93 95 98 98 95 90 83 93 93 93 95 98 100 98 83 95 100 100 95 98 98 100 100 98 95 90 9
48 95 88 98 95 95 93 90 98 95 95 93 88 80 90 90 90 93 95 98 95 85 93 98 98 93 95 95 98 98 95 93 88 9
49 95 88 98 95 95 93 90 98 95 95 93 88 80 90 90 90 93 95 98 95 85 93 98 98 93 95 95 98 98 95 93 88 9
50 88 80 90 88 88 85 83 90 88 88 95 95 88 88 88 93 85 88 90 88 83 85 90 90 85 88 88 90 90 88 95 80 9

المحتويات

الصفحة	الموضوع
١	المقدمة
٢	الهدف من الدراسة
	الفصل الأول
٤	استعراض المراجع
٥	١-١ أصل وتصنيف بكتريا <i>P.mirabilis</i>
٧	٢-١ مصادر عزل بكتريا <i>P.mirabilis</i>

- ٧ ٣-١ الصفات العامة المميزة لجنس المتقلبات
- ٨ ٤-١ الصفات التشخيصية المميزة لبكتريا *P.mirabilis*
- ٩ ٥-١ الدور الإمبراضي لبكتريا *P.mirabilis*
- ٩ ١-٥-١ التهابات المجاري البولية
- ١٠ ٢-٥-١ التجرثم البولي عديم الأعراض
- ١٠ ٣-٥-١ التهاب البروستات المزمن
- ١١ ٤-٥-١ التهاب المفاصل الرثوي
- ١١ ٥-٥-١ التهاب الأذن الوسطى
- ١١ ٦-٥-١ إصابات العين
- ١٢ ٧-٥-١ تسمم الدم
- ١٢ ٨-٥-١ إصابات أخرى متنوعة
- ١٣ ٩-٥-١ التأثير السمي الخلوي
- ١٣ ٦-١ مقاومة بكتريا *P.mirabilis* لمضادات الحياة
- ١٤ ١-٦-١ مقاومة مضادات الحياة من نوع البيبتالاكتام
- ١٥ ٢-٦-١ مقاومة مضادات Aminoglycosides
- ١٦ ٣-٦-١ مقاومة مضادات Quinolones و Fluoroquinolones
- ١٦ ٤-٦-١ مقاومة مضادات Macrolides
- ١٧ ٥-٦-١ مقاومة مضادات Tetracycline

- ١٨ ٦-٦-١ مقاومة مضاد Rifampin
- ١٨ ٧-١ دور البلازميدات في نقل المورثات المخصصة لمقاومة مضادات الحياة
- ١٩ ١-٧-١ بلازميد المقاومة في الدراسات الوبائية الجزيئية
- ٢٠ ٨-١ عوامل الضراوة
- ٢١ ١-٨-١ الإنتخالية والأسواط
- ٢٣ ٢-٨-١ عديد السكريد الشحمي الذيفان الداخلي للمستضد الجسمي
- ٢٤ ٣-٨-١ إنتاج اليوريز
- ٢٥ ٤-٨-١ إنتاج الهيموليسين
- ٢٧ ٥-٨-١ أنزيم البروتيز
- ٢٨ ٦-٨-١ قابلية الالتصاق
- ٢٩ ٧-٨-١ المقاومة الطبيعية لمضاد الحياة Polymyxim B
- ٢٩ ٨-٨-١ مقاومة بروتينات المصل
- ٢٩ ٩-١ عوامل أخرى تساهم في إمرضية بكتريا *P.mirabilis*
- ٣٠ ١٠-١ التتميط في بكتريا *P.mirabilis*
- ٣٠ ١-١٠-١ التقنيات المظهرية
- ٣٠ ١-١-١٠-١ التتميط الحيوي
- ٣١ ٢-١-١٠-١ التتميط المصلي

- ٣٢ ٣-١-١٠-١ التتميط بالعائى
- ٣٣ Bacteriocin Typing ٤-١-١٠-١
- ٣٥ Dienes Typing ٥-١-١٠-١
- ٣٥ ٢-١٠-١ التقنيات الوراثة
- ٣٧ ١١-١ تحليل النسق البروتينى
- ٣٧ ١-١١-١ الطرائق المستخدمة لتكسير الخلايا البكتيرية
- ٣٨ ٢-١١-١ الترحيل الكهربائى على هلام SDS-Polyacrylamide

الفصل الثانى

- ٣٩ المواد وطرائق العمل
- ٣٩ ١-٢ المواد والأجهزة
- ٣٩ ١-٢-٢ الأجهزة والأدوات المستخدمة
- ٤٠ ٢-١-٢ المواد الكيماوية
- ٤٣ ٣-١-٢ طرائق التعقيم
- ٤٣ ١-٣-١-٢ التعقيم بجهاز الموصدة
- ٤٣ ٢-٣-١-٢ التعقيم بالترشيح
- ٤٣ ٣-٣-١-٢ التعقيم بجهاز الفرن الكهربائى
- ٤٣ ٤-١-٢ تعديل الأس الهيدروجينى
- ٤٣ ٥-١-٢ الأوساط الزرعى للعزل والإدامة

- ٤٤ ٦-١-٢ الأوساط والمحاليل المستخدمة في التشخيص
- ٤٧ ٧-١-٢ الكواشف والمحاليل المستخدمة في اختبارات التشخيص
- ٤٩ ٨-١-٢ API 20 E (API bio – Merieux)
- ٤٩ ٩-١-٢ مواد ومحاليل عزل الدنا البلازميدي
- ٤٩ ١-٩-١-٢ السلالات البكتيرية
- ٥٠ ٢-٩-١-٢ الأوساط الزرعية
- ٥٠ ٣-٩-١-٢ محاليل استخلاص الدنا
- ٥٠ ١-٢-٩-٣ أ محاليل استخلاص البلازميد DNA بطريقة الغليان
- ٥١ ١-٢-٩-٣ ب محاليل استخلاص البلازميد DNA بطريقة التحليل
بالقاعدة
- ٥١ ١٠-١-٢ المواد والمحاليل ذات العلاقة بالترحيل الكهربائي
- ٥١ ١-١٠-١-٢ خزيرن محلول دارى TEB 10X
- ٥٢ ٢-١٠-١-٢ خزيرن محلول بروميد الأثيديوم
- ٥٢ ٣-١٠-١-٢ هلام الأكاروز ٠,٨%
- ٥٢ ٤-١٠-١-٢ دارى التحميل
- ٥٢ ١١-١-٢ المواد والمحاليل المستخدمة في استخلاص البروتين
- ٥٢ ١-١١-١-٢ الوسط الزرعى

- ٥٢ ٢-١١-١-٢ دارئ الفوسفات الملحي PH 7.0
- ٥٢ ٢-١١-٣-٢ دارئ Tris-HCl ٣ ملي مولاري بأس هيدروجيني ٧,٠
- ٥٢ ٢-١١-٤-٢ دارئ Tris-HCl ٦,٤ ملي مولاري بأس هيدروجيني ٨,٤
- ٥٣ ٢-١١-٥-٢ Streptomycin Sulphate
- ٥٣ ٢-١٢-١-٢ مواد ومحاليل الترحيل الكهربائي باستخدام هلام SDS-
Polyacrylamide
- ٥٣ ٢-١٢-١-٢ محاليل خزين تحضير الهلام
- ٥٣ ٢-١٢-٢-٢ دارئ الترحيل المستخدم في حوض الترحيل
- ٥٤ ٢-١٢-٣-٢ دارئ العينة
- ٥٤ ٢-١٢-٤-٢ محلول التصيغ
- ٥٤ ٢-١٢-٥-٢ محلول التثبيت
- ٥٤ ٢-١٢-٦-٢ محلول إزالة الصبغة
- ٥٤ ٢-١٣-١-٢ المواد والمحاليل المستخدمة لتقدير كمية البروتين
- ٥٥ ٢-٢-٢ طرائق العمل
- ٥٥ ٢-٢-١ جمع العينات
- ٥٦ ٢-٢-٢ عزل وإدامة وتشخيص *P.mirabilis*
- ٥٦ ٢-٢-٢-١ العزل
- ٥٦ ٢-٢-٢-٢ حفظ العزلات البكتيرية وإدامتها

- ٥٦ ٣-٢-٢-٢ تشخيص العزلات
- ٦٠ ٣-٢-٢ تشخيص عزلات *P.mirabilis* باستخدام API 20 E
- ٦٤ ٤-٢-٢ اختبار عزلات *P.mirabilis* المنتجة للبروتسين
- ٦٤ ١-٤-٢-٢ اختبار انتاج البروتسين
- ٦٤ ٢-٤-٢-٢ استخلاص البروتسين
- ٦٥ ٣-٤-٢-٢ اختبار حساسية العزلات تجاه البروتسين
- ٦٥ ٥-٢-٢ اختبار مقاومة مضادات الحياة باستخدام الأقراص
- ٦٦ ١-٥-٢-٢ استخدام طريقة اليود للكشف عن البيتا لاكتاميز
- ٦٦ ٦-٢-٢ عزل الدنا البلازميدي
- ٦٦ Boiling Method أ-٦-٢-٢
- ٦٨ ب-٦-٢-٢ التحلل باستخدام القاعدة
- ٦٨ ٧-٢-٢ الترحيل الكهربائي على الهلام للدنا المستخلص
- ٦٩ ٨-٢-٢ استخلاص البروتين
- ٧٠ ٩-٢-٢ تقدير البروتين
- ٧١ ١٠-٢-٢ الترحيل الكهربائي للبروتين الذائب على هلام SDS-PAGE
- ٧١ ١-١٠-٢-٢ تحضير هلام SDS-PAGE
- ٧١ ٢-١٠-٢-٢ الترحيل الكهربائي
- ٧٢ ١١-٢-٢ تحديد حزم البروتين على هلام الأكرالأميد

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

- ٧٣
- ٧٤ ١-٣ عزل وتشخيص بكتريا *P.mirabilis*
- ٧٤ ١-١-٣ العزل
- ٧٧ ٢-١-٣ التشخيص
- ٨٢ ٢-٣ التحليل التجميعي (العنقودي)
- ٨٦ ٣-٣ اختبار حساسية عزلات *P.mirabilis* تجاه أقراص مضادات الحياة
- ٩٧ ١-٣-٣ الكشف عن أنزيمات البييتالاكتاميز
- ٩٩ ٢-٣-٣ عزل الدنا البلازميدي
- ١٠١ ١-٢-٣-٣ دراسة النسق البلازميدي
- ١٠٢ ٤-٣ التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا *P.mirabilis*
- ١٠٢ ١-٤-٣ التحري عن إنتاج اليوريز
- ١٠٣ ٢-٤-٣ الكشف عن الهيمولايسين
- ١٠٤ ٣-٤-٣ الكشف عن البروتيز
- ١٠٤ ١-٣-٤-٣ اختبار تحلل الجلوتين
- ١٠٤ ٢-٣-٤-٣ إنتاج الكازانينيز
- ١٠٥ ٣-٣-٤-٣ فعالية أنزيمات البروتيز والكولاجنيز والإيلاستيز في وسط حليب الفرز
- ١٠٦ ٤-٤-٣ إنتاج أنزيمات Deaminases

١٠٧	Ornithine Decarboxylase إنزيم ٥-٤-٣
١٠٨	٥-٣ التحري عن إنتاج البروتسين
١١١	١-٥-٣ الكشف عن البروتسين بطريقة (1997-b) Senior
١١١	٦-٣ اختبار دنيس
١١٥	٧-٣ تحليل النسق البروتيني
١١٩	الاستنتاجات
١١٩	التوصيات
١٢٠	المصادر

المصادر العربية:

المرجاني، محمد فرج شذر (٢٠٠٠) دراسة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وبعض عوامل الضراوة لبكتريا *Proteus mirabilis* المسببة لالتهابات المجاري البولية، ودراسة المحتوى البلازميدي، رسالة ماجستير، كلية العلوم الجامعة المستنصرية.

المظفر، سامي عبد المهدي. (١٩٩٠) الكيمياء الحياتية، الكتاب الاول. الجزيئات والحياة، الماء الدهنيات، الكربوهيدرات، الاحماض الامينية. الطبعة الثانية، كلية العلوم. جامعة بغداد.

المصادر الأجنبية:

* *A* *

Abdul-Razzak, H.H. (2000). Study of the role of some β -lactam inhibitors and the combination of some antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics and some heavy metals, Isolated from chronic suppurative otitis media: genetic study M.S.C. Thesis. Al-Mustansiriya university. Baghdad. Iraq.

Adegbola, R. A.; D.C. OLD; and B.W. Senior (1983) The adhesins and fimbriae of *Proteus mirabilis* strains associated with high and low affinity for the Urinary tract. J.Med. Microbiol. **16**: 427-431

Adler, J.L; J.P; Burke, D.F Martin, and M Finland, (1971) *Proteus* Infections in general hospital. II some clinical and epidemiological characteristics with an analysis of 7/cases of *Proteus* bacteria. Annals of Internal Medicine **75**:531-536.

Akerele, J; P. Abhulimen; and F. Okonofua (2001) Prevalence of asymptomatic bacteriuria among Pregnant women in Benin city, Nigeria. J. Obstetrics. Gynaecology. **21**(2):141-144.

Albert, L.J. (2000). Infection and rheumatoid arthritis: guilt by association. J. Rheumatol. **27**(3):564-566.

AL-Jebouri, K.K.W, (2001) A study on antibiotic resistant bacteria isolated from patients with urinary tract infection M.S.C.Thesis college of Science Baghdad University. Baghdad. Iraq.

AL-Jumaili, I.J (1975-b) Bacteriocine typing of *Proteus* . J. Clin- path. **28**: 784-787.

AL-Jumaili, I.J (1975-a) An evaluation of two methods of bacteriocine typing of organisms of the genus *proteus* . J. Clin.Path. **28**:788-792

Al-Grawy, J.G.A. (1999). A study on the use of bacterial lipopolysaccharide as an immunomodulator and immunoprophylactic agent in urinary tract infections in rats. M. S. C. in Microbiology Thesis of College of Science Baghdad University. / Al. Jaderia. Iraq.

Al-Segar. (2000). Studies on some Aerobic bacteria resistant to antibiotics isolated from otitis media patient M.S.C. Thesis college of Science. Baghdad university /AL.Jaderia-Iraq.

Allocati, N; E. Casalone; M. Masulli; I. Cecarelli; E. Carletti; M.W. Parker; C. De- Illio (1999). Functional analysis of The evolutionarily conserved proline 53 residue in *Proteus mirabilis* glutathione transferase B 1-1. ESBS-Lett. **445**(2-3) : 347-350.

Ansdell, V.E; and C.D Ericyson,. (1999). Prevention and empiric treatment of traveler's diarrhea. Med. Clin. North. Am. **83**(40):253-266.

Atlas, R.M. (1995). Principles of Microbiology 1st edition. Inc. Missouri P.

Atlas, R.M; A.E, Brown; L.C., Parks (1995). Laboratory manual of Experiment Microbiology. 1st (ed). Mosby. Inc. Missouri.

* *B* *

Babalova, M; J. Blahova; K. Kralikova; V. Krcmery; J. Hanzen; O. Balogova; P. Milosovic (1999) Transfer of resistance to 3rd generation cephalosporins and aztreonam in strains of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta. Lactamases. Epidemiol – Mikrobiol – Imunol – **48**(1): 21-27 (Abs).

Bahrani, F.K.; and H.L.T. Mobley (1993). *proteus mirabilis* MR/P fimbriae : Molecular cloning, Expression, and nucleotide sequence of the major fimbrial subunit gene. J. Bacteriol- **175** (2): 457-464.

Bahrani, F.K.; S. Cook; R.A. Hull; G. Massad; and H.L.T. Mobley (1993). *proteus mirabilis* fimbriae: N-terminus amino acid Sequence of a major fimbrial

Subunit and nucleotide sequences of the genes from two strains. *Infect. Immun.* **61**(3): 884-891.

Bantar, C.; A. Famiglietti; and M. Gold bery (2000) Three-Year Surveillance study of nosocomial Bacterial resistance in Argentina, *Int. J. Infect. Dis.* **4**:85-90.

Barros, R.R; M.S Carvalho; J.M Peralta; R.R. Facklam; and L.M. Teixeira (2001) Phenotypic and Genotypic characterization of pediococcus strains Isolated from human clinical Source. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1241-1246.

Belase, R.; R. Schineider and M. Melch (1998). Characterization of *Proteus mirabilis* precocious swarming mutants: identification of *rsbA*, encoding regulator of swarming behavior. *J. Bacteriol.* **180**:6126-6139.

Birnboim, H.C; and J. Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for Screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids Res.* **7**: 1513-1523.

Bisset, K. A; and J. Street (1973) Morphological phases in the swarm of *Bacillus licheniformis* . *J. Gen. Microbiol.* **76**:369-373.

Bonnet, R; J. L. Sampaio; R. Labia; C. De-Champs ; D. Sirot; C. Chanal; J. Sirot (2000) Anovel CTX-M beta- Lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime- resistant *Enterobacteriaceae* Isolated in Brazil *Antimicrob. Agents. Chemother.* **44**(7): 1936-1942.

Braude, A.I; and J. Siemienski (1960). Role of bacterial urease in experimental. Pyelonephritis. *J. Bacteriol.* **80**:171-179.

Breed, R.S., E.G.D Murray, and N.R. Smith. (1957). Bergey's manual of determinative bacteriology – 7th ed. Bailliere, Tindall and Cox Ltd., London. P.364-368.

Brunder, W; A.S. Khan; J Hacker; H. Karch (2001) Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol – Fermenting enterohemorrhagic *Esherichia coli* O₁₅₇:H(-). *Infect. Immun.* **69**(7): 4447-4457.

Buchanan, R.F., and N. E. Gibbons (eds). (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. The Willias and Wilkins Co. Baltimore. P. 327-330.

* *C* *

Claret., Laurent; Hughes and Colin (2000). Rapid turnover of FlhD and FlhC, the flagellar regution transcriptional activator proteins, during swarming J. of Bacteriology. **182**: 833-837.

Closky, A.S; R.S. Kirsner; F.A. Kerdel (1998) Microbiologic evaluation of cutaneous wounds in hospitalized dermatology Patients. *Ostomy. wound. Manage.* **44**(3):40-46.

Coetzee, J.N. (1975). High frequency transduction of resistance to ampicillin and kanamycin in *Proteus mirabilis* . *J. Gene. Microbiol.* **87**: 173-176.

Coetzee, J.N.; N. Datta; R.W. Hedges; and P.C. Appelbaum (1973) Transduction of R- factors in *Proteus mirabilis* and *P.vulgaris*. *J. Gene. Microbiol-* **76**: 355-368.

Coker, C; C.A. Poore; Li, X and H.I.T. Mobley (2000). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract Infection. *Microbes. Infect.* **2**(12) : 1497-1505.

Collee, J.G, G.A, Fraser, P.B Marmion, and A. Simmons. (1996). Practical Medical microbiology. 14th edition. Chrchill living . stone, New York.

Cowan, S.T and K. J. Steel (1974) Manual for the Identification of Medical bacteria, 2nd edn. Cambridge, Cambridge university Press.

Cruickshank, R.; J.P Dugend ; B.P. Dugend ; B.P. Marmion and R.H. A.Swain. (1975), Medical Microbiology – VoL.2 12th ed. Logram group Limited. Britain. Chrchill, Living stone.

*** *D* ***

Daniels, M.J.; and B.M. Meddins (1973) Polyacrylamide gel electrophoresis of *Mycoplasma* proteins in sodium dodecylsulphate. J.Gen. Microbiol. **76**: 239-242.

David, M.S. and C.A, Currie-McCumber (1986). Plasmid analysis in molecular epidemiology: A summary and future direction. Reviews. Infectious. Dis. **8(5)**: 738-746.

De.Louvois, L. (1969). Serotyping and the dienes reaction on *Proteus mirabilis* from hospital infections. J.Clin. Path. **22**: 263-268

Desai, B.; B.R, Panthora and K.C, Aqarwal (1981) Trancferable drug resistance in *Proteus* species. Indian. J. Med. Res. **74**:192-195.

*** *E* ***

Edwards, P.R., and W.II Ewing. (1972). Identification of Enterobateriaceae, 3rd ed. Burgss Pubishing company, Minnea polis. P. 337- 356.

Eisenberg, M.B; R. Lopez; and AE. Stanek, (1998). Abscess formation within aparasagittal meningioma. J. Neurosury. **88**: 895-897.

* *F* *

Fajardo, L.G.; P. Zunino; G. Piccini; A. Allen; and D. Maskell (1996) Defind mutants of *Proteus mirabilis* lacking flagella cause ascending urinary tract infection in mice. Microbial. Pathogenesis **21**:395-405.

Falkow, S; J.A Wohlhieter; R.V Citarella; and L.S Baron (1964). Transfer of episomic elements to *Proteus* . II. Nature of Lac⁺ *Proteus* Strain Isolated from clinical specimens .J.Bacteriol. **88**(6): 1598-1601.

Farmer J.JI., B. R. Daris., W. Hickman- Brenner., A. McwHorter., G.P.Huntley –carter., M-A.Asbury; C.Riddle; H.G wathen-Grady; C.Elias; G.R.Fanning ; A.G.Steiger walt.,C.M.O’Hara, G.K.Morris; P.B.Smith and D.J. Brenner. (1985) Biochemical Identification of new species and biogroups of *enterobacteriaceae* isolated from clinical Specimens. J.Clin Microbiol. **21**(1): 46-76.

Firehammer, B. D.; (1987) Inhibition of growth and swarming of *Proteus mirabilis* and *proteus vulgaris* by triclsoan. J. Clin Microbiol. **25**(7):1312-1313.

* *G* *

Good Fellow, M; D. Jones; and F.G. Priest (1985). Computer assisted Bacterial systematics 1st edition. Published for the society for General Microbiology by Academic. Press.

Gottlieb, D. and P.A. Hepden (1966) The electrophoretic movement of proteins from various *Streptomyces* species as a tarxnomie criterion J. Gen. Microbiol. **44**: 45: 109.

Green wood, D.; R. Slack; and J. Pentherer (1997) Medical microbiology. 15th edition Churchill, livingstone. London P

Guth, B.E.C.; K. Irino and L. R Trabulsi (1999) Clonal structure of providencia alcalifaciens strains isolated from diarrhoeal stools in São Paulo Brazil. J.Med. Microbiol **48**: 205-209.

* *H* *

Hansson, S.; K, Hjalmas.; V, Jodal.; and R, Sixt (1990) Lower urinary tract dysfunction in girls with untreated a symptomatic or covert bacteriuria. The . J. Urology. **143**:333-335.

Hanson, L.; A, Fasth.; V, Jodal.; B, Kajser and C.S, Eden (1981). Biology and pathology of urinary tract infections. J. Clin. Pathol. **34**:695-700.

Hay, N.A.; D.J Tipper; D. Gygi; C. Hughes (1999) Anovel membrane protein influencing cell shape and multicellular swarming of *Proteus mirabilis* . J. Bacteriol. **181**(7): 2008-16.

Hoffmann,G.; G. Gajdos; M. Czako; V. Toth and T. Tomesanyi (1998). Diversity among clinical isolates of *Proteus penneri* detected by random amplified Polymorphic DNA analysis. Zentralbi-Bakteriol. **288**: 351-360. (Abs.).

Holmes, D.S; and M. Quigley (1981) Arapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. analytical. Bioch.**114**:193-197.

Holt, J.G; N.R Kreig; P.H.A Sneath; J.T Stanely and S.T williams (eds) (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology 9th edition, Williams and Wilkins, USA-P.532-553

* *|* *

Inter net (1996) Treatments of chronic bacterial prostatitis. Modren Medicin V.64 P.29-30. [http://ehostvgw11.epnet. Com/delivery](http://ehostvgw11.epnet.Com/delivery).

* *J* *

Janda J.M; S.L Abbott; S.khashe., and W Probert. (2001). Biochemical Identification and characterization of DNA groups within the *Proteus vulgaris* complex. J.Clin-Microbiol. **39**(4): 1231-1234.

Jawetz, E. ; J. K. Melnick; and E.A. Adelberg (1998) *Enterobacteriaceae*. In : Medical microbiology. review – 12th ed. P. 223-224. Apelton and large, Middle eastol Libravie dulbin, Beirut.

Jawetz, E; J.K. Melnick; and E.A. Adelberg (1984), Entericgram negative microorganisms: the *proteus*, providencia groupe, in review of Medical Microbiology, 16th (ed). Muddle east edition, Beirut, London.

John, J-F and J.A. Twitty (1986) Plasmids as epidemiologic markers in nosocomial gram- negative bacilli: experience at a university and review of the literature. Reviews. Infect. Dis. **8**(5): 693-704.

Jones, B. D.; C. Virginia Locatel; D. E, Johnson and H.L.T, Mobly (1990). Construction of a urease- Negative mutants of *P. mirabilis* . Infect. Immun. **58**:1120-1123.

Jones, B.D and H.L.T Mobley, (1988) *Proteus mirabilis* urease: genetic organization regulation and expression of structural genes. J-Bacteriology. **170** (8): 3342-3342.

Jones, B.D; and H.L.T. Mobley (1987) Genetic and Biochemical diversity of ureases of *proteus* , *Providencia* , and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. Inf. Immun. **55**: 2198-2203.

* *K* *

Kaca, W.; E Literacka; A.G Sjöholm; and A. Weinbaub (2000) Complement activation by *Proteus mirabilis* negatively charged lipopolysaccharides. J.Endotoxin. Res. 6(3): 223-234.

Kanfaoui, A; D, Graide; M, Petein; J.J, Kengo and R, Denis. (1999) *Proteus mirabilis* osteomyelitis of the ribs in a girl with sickle cell anemia. Eur. J. Ped . 158: 767.

Kareem. I. J. (2001) A study of pathogenesis of *Proteus mirabilis* isolated from human urinary tract infection by tissue culture technique and laboratory animals. M.S.C in biotechnology. Thesis of university of Baghdad Iraq.

Kashbur, I.M; R.N. George; and A.J. Ayliffe (1974) Resistotyping of *Proteus mirabilis* and comparison with other methods of typing. J.Clin. Path. 27: 572-577.

Katzung, B.G. (2001). Basic and clinical pharmacology. 8th (ed), P.774-801 Int. edition Lange Medical books, Mcgraw-Hill.

Kerstens, K; and J. Deley (1975) Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns J.Gen, Microbiol. 87:333-342.

Kirov, S.M.; B.C. Tassell; A.B.T. Semmler; L. A. O'Donovan; A.A. Raboan; and J. G. Show (2002) Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species J. Bacteriol. 184: 547-555.

Korhonen, T.K; E.A. Dawes; and P.H. Makela (1985). Enterobacterial surface antigens: methods for molecular characterization. 1st edition Published by Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division). P. 123-130.

Koronakis, V.; M. Cross; B Senior; E. Koronakis, and C. Hughes, (1987). The Secreted hemolysins of *proteus mirabilis* , *Proteus vulgaris*, and *Morganella*

morganii are genetically related to each other and to the alpha-hemolysin of *Escherichia coli* J. Bacteriol- **169**(4): 1509-1515.

Krieg, N.R and J.G Holt (ed). (1984) Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1.The williams and wilkins co.

* *L* *

Laftaa, B.A. (2001) Enzymatic study on the protease produced by *Proteus mirabilis* causes urinary tract Infection. M.S.C.Thesis college of science. Baghdad university /AL-Jaderia. Iraq.

Lam, Ds; AK. Kwok; S. Chew (1998) Post- Keratoplasty endophthalmitis caused by *Proteus mirabilis* . Eye. **12**: 136-140.

Larson, E.R.N.(1984). Clinical microbiology and infection control- 3rd (ed). Black well Scientific Publications.

Latta, R.K.; A Grondin; H.C. Jarrell; G.R. Nicholls and L.R. Berube (1999). Differential expression of nonagglutinating fimbriae and MR/P Pilin swarming colonies of *Proteus mirabilis* J. Bacteriol. **181**(10): 3220-3225.

Liaw, S.J., H-C Lai, S.W, HO, K-T LuH, and W. Wang, B. (2000) Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Proteus mirabilis* by P-nitrophenylglycerol. J.Med. Microbiol **49**: 725-731.

Literacka. E; A. V. Perapelov; S. N. Senchenkova; G.V Zatonsky; A. S Shashkov; Y.A. Knirel; and W. Kaka (1999) Structures of the O-specific polyaccharides and a serological cross-reactivity of the lipopolysaccharides of *Proteus mirabilis* O₂₄ and O₂₉. FEBS-Lett- **456**(2):227-231.

Loomes, L.M., B. W. Senior and M.A Kerr. (1990) A proteolytic enzyme secreted by *Proteus mirabilis* degrades immunoglobulins of the

immunoglobulin (IgA1), (IgA2) and IgG isotypes. *Infect. Immun* **58**: 1979-1985.

Lowry, O.HH., N.J Rosebrough; N.J Farr; and R.J. Randall (1951). Protein measurement with the folin Phenol reagent *J.Biological. Chem.* **193**: 267-275.

Luzzaro, F ; M. Perilli ; G. Amicosante; R. Belloni; A. Zollo ; C. Bianchi; and A. Toniolo (2001). Properties of multidrug resistant. ESBL-Producing *Proteus mirabilis* isolates and possible role of beta-lactam/beta- lactamase inhibitor combinations. *Int. J. Antimicrob-Agents – 17(2) : 131-135.*

* *M* *

Macfaddin,J.F. (2000) Biochemical tests for identification of Medical Bacteria. 3rd edition. Lippincott williams and Wilkins.

Mackey, J.P. and G. H. Sandys (1966) Diagnosis of urinary tract infection. *British. Medical. J.* **1**:1173-1177.

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

Matsumoto, T.(1998). Virulance factors and host response in U.T.I. *Sangyoika. Daigaku. Zasshi. B*:45-60. (Abs).

Matsuyama; Tohey; Takagi; and Yuko (2000). Dynamic aspects of the structured cell Population in aswarming colony of *Proteus mirabilis* *J. of Bacteriology.* **182**:385-389.

Mccoy. R.H and R.J.Seidler. (1973) Potential pathogens in the environment: isolation enumeration, and identification of seven genera of Intestinal bacteria associated with small green pet turtles. *Appl. Microbiol.* **25(4).** 534-538.

Meynell, G.G. (1973) Bacterial plasmids. Conjugation colicinogeny and transmissible drug- resistance. First published in the united states of America by the M.I.T. press.

Maniatis, T.; E.F. Fritsch; and J. Sambrook (1982). Molecular. Cloning: a laboratory manual. Cold spring Harbor laboratory, cold spring Harbor, N.Y.

Mobley, H.L.T; and G.R. Chippendale (1990). Hemagglutinin, Urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* J. Infect. Dis. **161**:525-530.

Mobley, H.L.T; and J.W. Warren (1987). Urease- Positive Bacteriuria and obstruction of Long-term urinary catheters J. Clin. Microbiol. **25**(11): 2216-2217.

Mobley, H.L.T., and R. Belas (1995) Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. Trends in Microbiol. **3**(7): 280-284.

Mobley, H.L.T; and R.P, Hausinger. (1989), "Microbiol ureases in infectious disease", High L. Moffet (ed), Philadelphia, Lippincate Co., Ch. **10**:P.85-108.

Morris, J.A. (1973) The use of polyacrylamide gel electrophoresis in taxonomy of Brucella. J.Gen. Microbiol. **76**: 231- 237.

Morris, N.S. and D. J, Stickler (1998). Encrustation of indwelling urethral catheters by *Proteus mirabilis* biofilms growing in human urine. J. Hosp. Infect. **39**(3): 227-234.

Murray, P.R; E. J. Baron; M.A Pfaller; F.C Tenover and R. H,Yolken (1999) Manual of clinical microbiology 7th edition. P. 116-135.

Murray. P. R; E. J. Baron; M. A. Pfaller; F. C. Tenover; R. H, Yolken (eds). (1996) Manual of clinical Microbiogy, 6th edition ASM press, Washington, DC.

* *N* *

National Committee of Clinical Laboratory Standards (1993) performance standards for antimicrobial disk suseptibility , Dec. 4th edition. NCCLs vol. 10, no.7, Wayne.Pa.

Neuwirth, C ; E. Siebor; A. Pechinot; J.M. Duez; M. Pruneaux; F. Garel; A. Kazmierczak; and R. Labia (2001) Evidence of in Vivo transfer of a plasmid

encoding the extended spectrum β . Lactamase TEM-24 and other resistance factors among different members of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol. **39**: 1985 - 1988.

Nnalue, N.A.; G.N. Khan; and N. Mustafa (1999). Cross-reactivity between six *Enterobacteriaceae* Complete lipopolysaccharide core chemotypes. J. Med. Microbiol. **48**: 433-441.

* *P* *

Penner, J.L. (1981) The tribe Proteeae. P. 1204-1224 In M.P. Starr, H.Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.C. Schlegel (ed) The Prokaryotes. Springer-Verlag. Berlin.

Penner, J.L; and J.N. Hennessy (1980) Separate O.Grouping Schemes for serotyping clinical isolates of *Proteus vulgaris* and *P. mirabilis* J.Clin. Microbiol. **12**(3): 304-309.

Pfaller, M. A.; I. Mujeeb; R. J. Hollis; R. N. Jones; and G.V Doern (2000). Evaluation of the discriminatory powers of the dienes test and ribotyping as typing methods for *Proteus mirabilis* J. Clin. Microbiol. **38**(3): 1077-1080.

Pignato, S.; G.M. Giammanco; F. Grimont; P.A. Grimont; G. Giammanco. (1999) . Molecular Characterization of the genera *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia* by ribotyping. J.Clin. Microbiol. **37**(9):2840-7.

Pitout, J.D.; K.S. Thomson; N. D. Hanson; A.F. Ehrhardt; E.S. Moland and C.C. Sanders (1998). Beta – Lactamases responsible for resistance to expanded spectrum cephalosporins in *Klebsilla pheumonia*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. Antimicrob. Agents. Chemother. **42**(6) : 1350-1354.

Prescott, L.M; L.P. Harley and D.A. Klein (1990)
Microbiology 1st (ed) W.M.C Brown Publisher.
New York.

Prince, A. (1998). Infectious diseases. in Behrman, R.E and Kliegman R.M.
 Nelson essentials of pediatrics –3rd (ed): W.B. Saunders Company
 Philadelphia.

* *R* *

Rahman, M. M; P Jean; A. Kokila; W. Colin; and Russell, (1994) Pathogenic
Proteus mirabilis; a capsular polysaccharide that facilitates swarming. from
 Internet. <http://www.nalusda.gov/ttic/tektraul> data.

Rice, L. B.; S. H. Willey; G. A. Papanicolaou; A.A. Medeiros and G. A. Jacoby
(1990) Outbreak of ceftazidim resistance caused by extended spectrum β -
 lactamases at Massachusetts chronic care facility- Antimicrob. Agents.
 Chemother. **34**:2193-2199

Rossjohn, J; G. Polekhina; S.C. Feil; N. Allocati; M. Masulli; C. De-Illio; MW.
Parker (1998) A mixed disulfide bond in bacterial glutathione transferase
 functional and evolutionary implications. Structure. **6**(6) : 721 – 734.

Rubens, C. E ; J.R. Edmund Farrar; Z.A. McGee and W. Schaffner (1981)
 Evolution of a plasmid mediating resistance to multiple antimicrobial agents
 during a prolonged epidemic of nosocomial infections. The. J. Infect Dis.
143(2) : 170-180.

Russel, A.D; T.E. Suller and J. Y. Maillard
(1999) Do antiseptics and disinfectants select for
 antibiotic resistance. J . Med. Microbiol . **48**: 613-
 615.

* *S* *

Sambrook, J.; E.F Fritsch; and T. Maniatis (1989) Molecular cloning: Laboratory manual. 2nd edition. P.A Cold spring Harbor laboratory Press.

Sekauinova, G; I. Rychlik; M. Kolarova; J. Pillich; J Semenka; V. Zajicova (1998). Anew bacteriophage typing scheme for *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris* strains. 3. Analysis of lytic Properties. Folia. Microbiol. Praha. **43(2):136-140.** (Abstract)

Senior, B.W. (1977) Typing of *Proteus* strains by Proticine Production and sensitivity. J. Med. Microbiol. **10: 7-16.**

Senior, B.W. (1979) The Special affinity of particular types of *proteus mirabilis* for the urinary tract J.Med. Microbiol. **12:1-7.**

Senior, B.W. (1997-a) Media and tests to simplify the recognition and Identification of members of the Proteeae. J. Med. Microbiol. **46: 39-44.**

Senior, B.W. (1997-b). The ability of a *Proteus mirabilis* strain to invade the blood stream is independent of its proticine production / proticine sensitivity type. J. Med. Microbiol. **46 : 407-412.**

Senior, B.W. (1999). Investigation of the types and characteristic of the proteolytic enzymes formed by diverse strains of *proteus* species. J. Med. Microbiol. **48:623-628.**

Senior, B.W. and S. Vörös (1990). Protein typing a new method at typing *morganella morganii* strains J.Med. Microbiol **33: 259-264.**

Senior, B.W.(1983) The purification, Structure and Synthesis of proticine 3. J. Med. Microbiol. **16: 323-331**

Senior, B.W.; M. Al-Brechtsen and M.A. Kerr; (1987) *Proteus mirabilis* strains of diverse type have IgA protease activity. J. Med. Microbiol. **24**:175-180.

Senior, B.W; and G. Sweeney (1984) The association of particular types of *proteus* with chronic suppurative otitis media. J. Med. Microbiol. **17**: 201-205

Senior, B.W; Bradford, N.C; and simpson, D.C. (1980) the urease of *proteus* strains in relation to virulence for the urinary tract. J. Med. Microb. **13**: 507-512.

Senior; B.W and P. Larsson, (1983) A highly discriminatory multi-typing scheme for *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris*. J. Med. Microbiol. **16**: 193-202.

Shafi, M.S., Datta, N. (1975) Infection caused by *Proteus mirabilis* strains with transferable gentamicin resistance factors. Lancet I: 1355-1357.

Singer, L and B.E, Volcani (1955) An improved ferric chloride test for differentiating *Proteus-providence* group from other *Enterobacteriaceae*. J. Bacteriol. **69**: 303-305.

Silva, J; R. Gatica; C. Aguilar; Z. Becerra; U. Garza-Ramos; , M. Velazquez; G. Miranda; B. Leanos; F. Solorzano; and G. Echaniz (2001) Out break of infection with extended. Spectrum β - Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital. J. Clin. Microbiol. **39**: 3193-3196.

Smith, P.W; C.W. Seip; S.C. Schaefer; and C. Bell Dixon (2000). Microbiologic survey of long-term care facilities. Am. J. Infect- Control. **28** (1): 8-13.

Stamey, T.A.(1975). A clinical classification of U.T.I based upon origin. Southern. Med. J. **68**:934-939.

Swierzko, A.S; T Kirikae; F. Kirikae; M. Hirata; C. Cedzynsk; A. Zioliowski; Y. Hirai; S. ku sumoto; T. Yokochi and M. Nakano (2000) Biological activities of

lipopolysaccharides of *Proteus spp.* and their interactions with polymyxin B and an 18:KDa cationic antimicrobial Protein (CAP 18) –derived peptide – J. Med. Microbiol. **49**: 127-138.

Swihart, K.G and R.A, Welch (1999-b) The HpmA hemolysin in more common than HlyA among *Proteus* isolates. Infect. Immun. **58**: 1853-1957.

Swihart, K.G. and R.A. Welch (1990-a). Cytotoxic activity of the *Proteus* hemolysin HpmA. Infect. Immun. **58**: 1861-1868.

Sykes, R.B. (1978). Methods for detecting β -Lactamase. P.64-69. In Laboratory methods in antimicrobial chemotherapy. by David, S.; Ian, P., David, W. and Richerd, W, 1st (ed). Churchill livingstone. Edinburgh. London.

Szymaniak, L., T. Aleksandrowicz; K. Giedrys; S. Alemba, (1999). Drug resistance and Proticinogenic types of *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infections. Med- DOSW- Mikrobiol. **51**(3-4):323-30 (Abstract).

* *T* *

Thanoon. S.M. (1994). Haemagglutinin and hemolysin compared with urease production as markers for pathogenicity of *proteus* species isolated from patients with U.T.I. M.S.C Thesis submitted to the college of medicine, university of Baghdad.

Tracy, O. and E.J. Thomson, (1972) An evaluation of three methods of typing Organisms of the genus *Proteus* J. Clin. Path. **25**: 69-72.

Treagan, L. and L. Pulliam (1982) Medical Microbiology Laboratory Procedure W. B. Saunders Co.

* *U* *

Uphoff, T.S ; and R.A. Welch (1990) Nucleotide Sequencing of the *Proteus mirabilis* Calcium. independent hemolysin genes (hpmA and hpmB) reveals

sequence similarity with the *Serratia marcescens* hemolysin genes (shIA and shIB). J. Bacteriol. **172**(3): 1206-1216.

* *V* *

Vargas, M.O; A, Pacheco; M; Elia; R, Villaverde and F, Baquero. (1990) *Proteus mirabilis* as cause of recurrent lung infection in acystic fibrosis patient. Eur. J.Clin. Microbiol. Infect. Dis. **9**:234-235.

Vartiainen, E.; and J. Vartiainen (1996) Effect of aerobic bacteriology on the clinical presentation and treatment results of chronic suppurative otitis media. J. Larynol. Otolology. **110**: 315-318

* *W* *

Wachsmuth, K. (1986) Molecular epidemiology of bacterial infection examples of methodology and of investigations of outbreaks. Reviews Infect. Dis. **8**(5): 682-692.

Walker, K.E.; J.S. Moghaddame; C.V. Lockatell; D. Johnson; and R. Belas (1999) ZapA, the IgA- degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis* is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells Mol. Microbiol. **32**: 825-836.

Wandersman, C. (1989) Secretion, Processing and activation of bacterial extracellular proteases. Mol. Microbiol- **3**(12):1825-1831.

Warren, J.W; J.W Tenney; J.W. Woopes; W.L Muncie; and W.C. Anthony (1982). A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. J.Inf. Dis. **146**(6): 719-723.

Welch, R.A. (1987) Identification of two different hemolysin determinants in uropathogenic *Proteus* isolates. *Infect. Immun.* **55**(9): 2183-2190.

WHO., (1987). Guidelines for antimicrobial susceptibility testing. *Lab.* **871** P. 21-38.

WHO. (1978). Techniques for the detection of β -lactamase producing strains of *Neisseria gonorrhoeae* **616**:P.137-143.

Williams, F.D. (1973) Abolition of Swarming of *Proteus* by *P*-nitrophenyl glycerin: general properties. *Appl. Microbiol.* **25**(5): 745-750.

Wilson C., B.W, Senior: H, Tiwana; W, Caparros-Wanderley., A. Ebringer (1998) Antibiotic sensitivity and Proticine typing of *P. mirabilis* strains associated with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* **17**(5): 203-205.

Wray, S, S.I Hull, R.G. Cook, , J. Barrish, and R. A. Hull, (1986). Identification and characterization of a uroepithelial cell adhesin from a uropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun-* **54**(1): 43-49.

* *X* *

Xin-Li; H.L.T. Zhao., L, Virginia., C.B, Drachenberg., D.E. Johnson and H.L.T, Mobley (2002) Visualization of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stones during experimental urinary tract infection, *Infect. Immun.* **70**(1): 389-394.

* *Z* *

Zhao, H; Li-X; Johnson-DE; Mobley-HLT- (1999) Identification of Protease and rPoN-associated genes of uropathogenic *Proteus mirabilis* by negative selection in a mouse model of ascending urinary tract Infection. *Microbiology.* **145**: 185-95.

A decorative graphic of a rolled-up scroll with the word "Abstract" written in a bold, serif font across its center.

Abstract

Out of 302 clinical samples 50 isolates were identified as *Proteus mirabilis*, isolated from various sources, their incidence occurring in the following percentage: 42 % were isolated from the ear, 38% from urine, 10% from stool, 6% from wounds and 2% from other sources. Specimens were collected from hospitalized patients of both sexes in Baghdad.

The *P. mirabilis* isolates were subjected to forty one biochemical tests which were further analyzed by using statistical analysis by computer programming for calculating the similarity rate using the Ssm (Simple matching coefficient). Cluster analysis (dendrogram) indicated the distribution of the 50 isolates in to three biotypes, I, II, and III.

Further tests were carried out to detect virulence factor production and the results were as follows; all isolates were urease producers and had the ability to swarm, 92% were protease producers on skim milk medium but only 84%, showed protease activity on casein medium. All isolates were gelatinase producers but none lysed elastin and collagen.

Susceptibility tests towards nineteen antibiotics were carried out showing that the most effective were Ciprofloxacin, Nalidixic acid and Gentamicin.

Seventeen multiresistant *P.mirabilis* isolates were investigated for β -Lactamase production and it was found that 41.1% produced this enzyme.

Proticine (a bacteriocin) production was detected in 20% of the 50 *P.mirabilis* isolates, 22% of the total isolates were sensitive to the proticines produced and when Mitomycin C was used as a proticine inducer the

percentage of sensitivity increased to 26% towards the proticines prepared. Accordingly eight different P/S types (proticine production / proticine sensitive) were detected among the 50 isolates.

Dienes test was applied to 25 isolates selected according to their antibiotic resistance patterns and proticine production and through 300 tested probabilities there emerged 120 different types.

Nine isolates were selected according to their antibiotic resistance pattern and proticine production.

Plasmid DNA extraction using both boiling and alkaline lysis methods indicated the presence of 1-2 bands of plasmid DNA in the same four isolates.

Electrophoretic soluble protein patterns of seven isolates of *P.mirabilis* , representing the previously mentioned biotypes I,II and III were investigated. Dissimilarity was observed among the distribution of the *P.mirabilis* isolates and four distinct biotypes were observed according to the results of the protein profile.

University of Baghdad

**Taxonomic and Molecular
Study of Some Virulence
Factors in Clinical Isolates
of
Proteus mirabilis**

A Thesis

Submitted to the College of Science

University of Baghdad

in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science in

Biology/Microbiology

By

Karama Tahreer Al-Taiee

July 2002