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

دراسة بكتريولوجية لبكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من اخماج سريرية مختلفة في مدينة المقدادية

رسالة مقدمة

إلى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير
في
علوم الحياة / الأحياء مجهرية

من قبل
ابراهيم عدنان محمود الرجب

بإشراف

أ. د. عدنان نعمة عبد الرضا العزاوي
أ. م. د. هادي رحمن رشيد الطائي

1435هـ
2014م

الفصل الاول

المقدمة Introduction

ينتمي الى العائلة المعوية Enterobacteriaceae اعداد كبيرة من الاجناس البكتيرية منها جنس *Proteus*، هذه الاجناس ذات صفات متنوعة منها العصوية الشكل والهوائية او اللاهوائية اختيارية والسالبة لملون غرام، وتعد القناة الهضمية في الانسان والحيوان الموطن الطبيعي لهذه البكتريا (Brooks *et al.*, 2007). ويضم جنس *Proteus* الانواع الاتية: *P. mirabilis, P. vulgaris, P. penneri, P. hauseri, P. zenkeri*.

تمتلك بكتريا *Proteus* العديد من عوامل الضراوة منها انتاج انزيم الهيمولايسين، وانزيم اليوريز، وانزيم اللاييز، وانزيم البروتييز، وانتاجها للغشاء الحيوي وهذا يزيد من الإمراضية والوبائية العالية اذ انها تصيب كافة الفئات العمرية وتسبب حالات مرضية مختلفة (الجبوري، 2012). تعد بكتريا *P. mirabilis* من مسببات اخماج المسالك البولية، وتأتي بالمرتبة الثانية بعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من حيث الانواع البكتيرية المسببة لخمج خمج الاذن الوسطى، و المسبب الرئيس لخمج الاذن الوسطى المزمن (سلمان، 2008)، كما تسبب هذه البكتريا خمج المثانة المزمن، وخمج البروستات المزمن اذ تعد المسبب الثالث لأخماج المثانة و حويض الكلية، واحتلت بكتريا *Proteus* مراتب مختلفة من بين المسببات البكتيرية للاخماج المصاحبة لإصابات الحروق والجروح، كما انها تفرز الذيفانات الداخلية، وبذلك تؤدي الى تسمم الدم (Braunwald *et al.*, 2001).

تعد انواع العائلة المعوية من اكثر الانواع البكتيرية انتاجا لإنزيمات البيتالاكتاميز وخصوصا واسعة الطيف، مما يجعلها الاكثر مقاومة للمضادات الحيوية التي تنتمي لمجموعة البنسلينات والسيفالوسبورينات (Karlowsky *et al.*, 2003). اذ تمتلك بكتريا *Proteus* القدرة على مقاومة مضاد Ampcillin و Co-amoxiclav بنسبة 90% و 100% على التوالي (الكعبي، 2007).

تعد عملية تكوين الاغشية الحيوية من قبل البكتريا التي تعد من عوامل الضراوة احدى الصعوبات التي تواجه علاج الاصابة اذ تكون ذات مقاومة عالية للمضادات الحيوية بسبب صعوبة اختراق المضاد لطبقات هذا الغشاء (Solano *et al.*, 2002). إن امتلاك العديد من اجناس بكتريا العائلة المعوية لعوامل مختلفة مثل احتوائها على وسائل الحركة التي لها الاثر الكبير في التصاق الخلايا بالسطوح غير الحية والتفاعلات بين الخلايا تمنحها القدرة على تكوين الأغشية الحيوية (Mariana *et al.*, 2009).

ان التطور السريع لمقاومة البكتريا للمضادات الحياتية المتزامن مع الجهود الحثيثة لاكتشاف مضادات حياتية جديدة يدعو البحث عن اساليب مختلفة للتغلب على هذه المشكلة منها التحري عن الفعل التأزري للمضادات الحياتية المختلفة في القضاء على الانواع البكتيرية ذات المقاومة العالية إذ تؤدي عملية مزج المضادات على منع ظهور المقاومة (Adikwu *et al.*, 2010) ، كما اعتمد الباحثون عملية مزج المضادات (مزج مضادين معا او اكثر) لتقليل مستوى السمية، وتوسيع الطيف الفعال للمضادات الحياتية (Olajuyigbe and Afolayan, 2012). ان اهمية خمج الاذن الوسطى، والجروح، والحروق، وارتفاع معدلات التلوث الجرثومي فيها سبب لاختيارها في البحث لذا هدفت هذه الدراسة الى:

1. عزل بكتريا *Proteus* spp. وتشخيصها من اخماج سريرية مختلفة.
2. دراسة اهم عوامل ضراوتها ومقاومتها للمضادات الحيوية الحديثة.
3. دراسة تأثير مزج المضادات الحيوية على ظاهرة الإنثيال وتكوين الغشاء الحيوي.
4. تحديد صفة تكوين ظاهرة الإنثيال وتكوين الغشاء الحيوي وراثيا بلازميدية ام كروموسومية.

Summary

Two hundred twenty five samples were included (100 samples – Otities media, 92 burning infection and 33 wound infection) of the patient in Al-Muqdadiyah – Diyala for the period November 2012- March, 2013.

The results bacterial culture on blood agar, MaCconkey agar, diagnostic phenotypic, and biochemical tests and confirm the diagnosis by using api 20E system showed that 37 isolates belong to *P. mirabilis*

The results of the investigation of some virulence factors of *P. mirabilis* reveals that isolates were able to produce Haemolycine, Urease enzyme and the formation of Swarming phenomenon with rate 100%.This study reveals that (72.97, 67.56 and 5.4) % of isolates were able to form Biofilm, by using ELSA method, Tube method and Congo red method respectively.

The results showed that *P. mirabilis* were able to produce β-lactamase enzymes with 91.89%, while production of Extended Spectrum β-lactamase and Metalo β-lactamase enzymes with percentage (56.75%, 13.51%) respectively.

The results induct that *P. mirabilis* had resistance to the antibiotics: Nitrofuration, Cefotaxime, Ampicillin, Cefalothin, Ceftazidime, Trimethoprim with the rates 100%, 100%, 100%, 91.9%, 97.3% and 91.9% respectively. Whereas the ability of the resistance to other antibiotics was less. They were: Tobramycin, Clavulanic acid and Amoxicillin (Augmentin), Gentamycin 81%, 81% and 83.8% respectively.

The isolates were more sensitive to Amikacin 43.2%. The best two antibiotics to deal with *P. mirabilis* were Imipenem and Ciprofloxacin with resistance rate 16.2% and 10.8% respectively.

Multiple resistance pattern for antibiotic divided into two groups, first group included (9) isolates 24.32% which were resistant to (4- 8) antibiotics, while second group included (28) isolates.75.67 % were resistant to (9- 12) antibiotics . Results indicated that the second group was dominant.

The results showed values of MIC and stopping swarming for Cefotaxime ranged (2- <1024) µg\ml. whereas for Tetracycline, it ranged (8- 256) µg\ml. The MIC of Gentamycin ranged (32- 1024) µg\ml and swarming ranged (32- 512) µg\ml.

The results showed that the best rate for combination between Cefotaxime with Gentamycin once and with Tetracycline the other time was (1: 2) for stopping swarming values were (16- 32) µg\ml and MIC stoppage (32- 64) when combination Cefotaxime and Gentamycin. While Cefotaxime combination with Tetracycline for stopping swarming was ranged (8- 16) µg\ml and MIC stoppage ranged (16 -32) µg\ml.

The results showed that combination between Cefotaxime and Gentamicin at ratio (1:2) also combination between Cefotaxime and Tetracycline with same ratio were significantly inhibited the biofilm formation by *P.mirabilis* when using of each antibiotic alone,

The results showed that *P. mirabilis* had one large plasmid band. After achieving the curing process by using Acridine orange and SDS were active in curing process it cured the isolates at concentration (4000) µg\ml .

The cured isolates were tested to produce biofilm or not. It was shown that the isolates were able to produce biofilm and swarming. This result proved the characteristic of producing biofilm and swarming is chromosomal not plasmid characteristic.