



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة ديالى  
كلية العلوم



## تحديد جينات *CTX-M-1* و *CTX-M-3* في العزلات الضارية ذات المقاومة المتعددة لبكتريا الزائفة الزنجارية

رسالة

مقدمة إلى مجلس كلية العلوم - جامعة ديالى  
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة  
من قبل الطالبة  
زينب محمد حميد

إشراف

أ.م.د. هادي رحمن رشيد الطائي

2017 م

1438 هـ

## بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا إِذَا قِيلَ لَكُمْ تَفَسَّحُوا فِي الْمَجَالِسِ فَأْفَسَحُوا يَفْسَحِ  
اللَّهُ لَكُمْ<sup>ط</sup> وَإِذَا قِيلَ انشُرُوا فَانشُرُوا يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ  
أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ

### حَدِّقِ اللَّهُ الْعَظِيمِ

المجادلة الآية : 11

## الإهداء

إلى من كلّت انامله ليقدّم لنا لحظة سعادة  
إلى من حصّد الأشواك عن دربي ليمهّد لي طريق العلم  
إلى القلب الكبير ابي الغالي

إلى معنى الحب والحنان والتفاني  
إلى بسمة الحياة وسر الوجود  
إلى من دعائها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي أمي الحبيبة

إلى المقاتلين الأبطال وأرواح الشهداء الأبرار  
الذين بذلوا دماءهم الطاهرة وبفضلهم ننعم بالأمان  
أهدي ثمرة جُهدي ...

زينب

## شكرو تقدير

### بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الحمدُ لله مالك الملك ومدبر الامر لا إله إلا هو العليم الخبير والشكرُ له وحده رب العالمين ،  
والصلاة والسلام على سيد الخلق محمد الرسول الامين البشير النذير ونور الهداية وعلى اله واصحابه الكرام  
الذين نهجوا منهجه وماتوا حده ... وبعد

لقد منَّ الله عليَّ بأكمال هذه الرسالة ، لذا فمن دواعي الاعتراف بالجميل أن أتقدم بالشكر الى عمادة كلية  
العلوم / جامعة ديالى و رئاسة قسم علوم الحياة لإتاحتهم الفرصة لإكمال دراستي العليا.  
كما أتقدم بفائق الشكر والتقدير إلى مشرفي الفاضل أ.م.د. هادي رحمن رشيد الطائي الذي شاركني  
مسيرة البحث معلم مقتدر، ومشرف كريم أدامه الله شمعةً تضيئ طريق طلبة العلم والمعرفة .

كما اتقدم بالشكر والامتنان الى اساتذتي في السنة التحضيرية ، وأخصُّ بالذكر: أ.د. عبد اللطيف مولان  
لما قدمه من دعم وإسناد طيلة مدة الدراسة و م.د مثنى عبد القادر صالح لتعاونه وتسهيل عملي في  
مختبر تفاعل البلمرة و م.د. ازدهار محمد التي وقفت بجانبني ولم تبخل عليَّ بمعلوماتها ، كما اتقدم بالشكر  
والإمتنان لرئيس قسم علوم الحياة /كلية التربية الاصمعي الدكتور عمار احمد سلطان لموافقته على  
إستخدامي أجهزة مختبر البيولوجي الجزيئي .

وما أحراني إلا أن أشكر من كان لي في درب العلم مرشداً وملهماً أستاذي الفاضل أ.د.عبد الرزاق  
شفيق حسن الذي لم يبخل عليَّ من كنوز العلم التي لديه ، وكان كتاباً مفتوحاً و زاخر العلم و العطاء .  
كما اتوجه بالشكر والتقدير الى مدير مختبر الصحة العامة السيد هادي علي حمودي ، والى منتسبي  
شعبة البكتريولوجي ، واخص بالذكر الدكتور داوود سلمان علي والاساذ الفاضل ضمد جواد ، كما اتقدم  
بالشكر الى اطباء شعبة E.N.T في العيادة الاستشارية ، كما اتقدم بالشكر والامتنان الى السيد مسلم  
ثابت المنتسب في شعبة الاحياء المجهرية في مستشفى البنول التعليمي لتقديمه يد المساعدة ، كما اتوجه  
بالشكر الى زميل الدراسة علي غازي مع تمنياتي له بالتوفيق ، واخيراً اتقدم بخالص شكري وإمتناني  
الى كل الذين وقفوا الى جانبي يشدون من أزري بحسن تشجيعهم وصائب آرائهم وصادق نصائحهم مما  
كان لهم اطيب الاثر لإتمام هذه الرسالة ومن الله التوفيق .

زينب

## الخلاصة:

أُجريت هذه الدراسة في مستشفى بعقوبة التعليمي والعيادة الإستشارية إبتداءً من شهر ايلول سنة 2015 الى شهر نيسان سنة 2016 , وذلك لأهمية جراثيم الزائفة الزنجارية المقاومة لمضادات البييتالاكتام والمسببة لأخماج سريرية مختلفة , إذ جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على التحري عن افضل طريقة لتشخيص العزلات الجرثومية , و الكشف عن مقاومة العزلات المحلية لبعض مضادات البييتالاكتام , وتحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) لبعض هذه المضادات , ودراسة المحتوى من عوامل الضراوة في عزلات الزائفة الزنجارية و دراسة إنتشار جينات مقاومة مضادات الحياة .

تضمنت الدراسة جمع 176 نموذج من أخماج الحروق والجروح وأخماج الأذن والمجاري البولية , إذ شكلت نسبة المرضى الذكور %65.34 (115) والمرضى الإناث %34.66 (61) , وتراوحت أعمارهم 10-60 سنة , %85.23 مرضى غير راقدين و %14.77 مرضى راقدين في المستشفى , و زرعت النماذج المرضية على وسط الماكونكي الصلب ووسط الدم الصلب ووسط السيدوموناس الصلب الاساس ولوحظت الصفات المظهرية للمستعمرات , وأُجريت الفحوصات الجرثومية والكيموحيوية القياسية لتشخيص العزلات الجرثومية , إذ تضمنت فحص الاوكسيديز والكتاليز و إختبارات IMViC , وتمّ تأكيد التشخيص بإستخدام جهاز VITEK 2 , إضافة الى إجراء التشخيص الجزيئي بالكشف عن وجود الجين 16s rDNA في العزلات الجرثومية بإستخدام جهاز المدور الحراري.

تمّ عزل 20 عزلة جرثومية من كلا الجنسين ومن مختلف الأعمار , اذ بلغت نسبة العزلات من الذكور %55 ومن الإناث %44 ولم يكن هناك فارق إحصائي معنوي , وبلغت نسبة تشخيص عزلات الزائفة الزنجارية بإستخدام جهاز VITEK2 %100 , هذا وقد كشف التشخيص الجزيئي للعزلات قيد الدراسة أنها حاملة للجين 16s rDNA وبنسبة %100 , , و بلغت نسبة العزلات من أخماج الحروق والأذن والمجاري البولية والجروح %18.18 , %11.60 , %10.81 , %6.25 على التوالي وبفارق إحصائي معنوي عالي جداً ( $P = 0.0001$ ) .

أُجري إختبار الحساسية لعشرة من مضادات البييتالاكتام بإستخدام طريقة Kerby- Bauer , وُدد التركيز المثبط الأدنى MIC للمضادين Cefotaxime و Ceftazidime بطريقة التراكم المتسلسلة المتضاعفة , أظهرت العزلات مقاومتها لمضادات مجموعة السيفالوسبورينات بشكل متفاوت , وبلغت نسبة المقاومة للمضادات Cefotaxime , Cephalothin , Cephalexin , Ceftazidime , Cefaclor %90 , %25 , %100 , %100 , %15 على التوالي . تراوحت قيم المتوسط الحسابي  $\pm$  الانحراف المعياري SD للتركيز المثبط الأدنى MIC لمضاد Cefotaxime  $(78 \mu\text{g/ml} \pm 119.61)$  , ومضاد Ceftazidime  $(74 \mu\text{g/ml} \pm 266)$  على التوالي .

كما أُجري الكشف عن إنتاج العزلات الجرثومية لعوامل الضراوة التي شملت إنزيمات البروتياز على وسط حليب الفرز والجيلاتينيز على وسط الجيلاتين والهيموليسين على وسط الدم الصلب المضاف له 5% من الدم البشري , والكشف عن تكوين الاغشية الحيوية بطريقة الصفيحة الدقيقة والكشف عن وجود مضخات الدفع بطريقة عجلة العربة , هذا وقد تمّ الكشف عن إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بطريقة الأقراص المدمجة Combined disk test وإنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية بطريقة إتحاد المضاد مع EDTA Combined EDTA disk test , بلغت نسبة العزلات المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف 55% , في حين لم تكن أيّ من العزلات منتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية , كما أظهرت 100% من العزلات قابليتها على تكوين الاغشية الحيوية , وإمتلك 95% منها أنظمة دفع .

وأخيراً , تمّ إستخلاص الحامض النووي DNA للجراثيم التي أظهرت مقاومتها للمضادين Cefotaxime و Ceftazidime وأُجري الكشف عن الجينات *bla* CTX-M-1 , *bla* CTX-M-3 و باستخدام تفاعل البلمرة التسلسلي PCR والكشف عن حجم الجين بواسطة الترحيل الكهربائي و باستخدام مصدر الأشعة فوق البنفسجية , إذ بلغت نسب العزلات الحاملة للجينات *bla* CTX-M-1 و *bla* CTX-M-3 72.7% و 63.63% على التوالي .

أظهرت هذه الدراسة عدة إستنتاجات هي إنّ عزلات الزائفة الزنجارية تمتلك عوامل ضراوة متعددة منها تكوين الاغشية الحيوية ومضخات دفع بكفاءة عالية ومتوسطة, وإنها مقاومة لأغلب مضادات البيتالاكتام ووجود علاقة بين إنتاج عوامل الضراوة والمقاومة المتعددة لمضادات البيتالاكتام, وإنّ غالبية العزلات الجرثومية منتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs من خلال الكشف المظهري عن هذه الانزيمات كما بين الكشف الجيني وجود الجينات المسؤولة عن التعبير عن هذه الإنزيمات مثل *bla* CTX-M-1 و *bla* CTX-M-3 , و كلما زادت قدرة جراثيم الزائفة الزنجارية على مقاومة مضادات البيتالاكتام , إزدادت نسبة العزلات المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs, مما يدلّ على وجود علاقة ما بين المقاومة المتعددة للمضادات وإنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs عند جراثيم الزائفة الزنجارية.

## قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
الخلاصة		
الفصل الاول:المقدمة		
1	المقدمة Introduction	1
3	اهداف البحث	1
الفصل الثاني: استعراض المراجع Literature Review		
4	عائلة الزوائف <i>Pseudomonadaceae</i>	1.2
5	الصفات العامة لجرثومة الزائفة الزنجارية General Charecters of <i>P.aeruginosa</i>	2.2
6	الوبائية والانتشار Epidimiology & Spread	3.2
7	تصنيف جرثومة الزائفة الزنجارية Classification of <i>P.aeruginosa</i>	4.2
8	المكون الوراثي للزائفة الزنجارية <i>P.aeruginosa</i> Genome	5.2
8	تشخيص جرثومة الزائفة الزنجارية Identification of <i>P.aeruginosa</i>	6.2
9	التشخيص الجزيئي Molecular Identification	1.6.2
9	التشخيص التقليدي Conventional Identification	2.6.2
10	إمراضية الزائفة الزنجارية Pathogenesis of <i>P.aeruginosa</i>	7.2
11	اخماج الاذن Ear Infection	1.7.2
11	اخماج القناة البولية Urinary Tract Infection	2.7.2
11	اخماج الجروح Wound Infection	3.7.2
11	اخماج الحروق Burns Infection	4.7.2
12	عوامل الضراوة عند جرثومة الزائفة الزنجارية Virulance factors of <i>P.aeruginosa</i>	8.2
12	تكوين الغشاء الحيوي Biofilm Formation	1.8.2
13	إنتاج الانزيمات الحالة للبروتين Protease	2.8.2
13	إنتاج الهيمولايسين Hemolysin	3.8.3

14	إنزيمات البيتا لاكتاميز عند جراثيم الزائفة الزنجارية $\beta$ -lactamase in <i>P.aeruginosa</i>	9.2
14	إنزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف - Extended Spectrum $\beta$ -lactamase (ES $\beta$ Ls)	1.9.2
16	إنزيمات البيتا لاكتاميز المعدنية (Metallo $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls))	2.9.2
17	مضادات الحياة Antibiotics	10.2
17	مضادات البيتا لاكتام $\beta$ -lactam antibiotics	11.2
20	مثبطات إنزيمات البيتا لاكتاميز $\beta$ -lactamase inhibitors	12.2
20	ليات مقاومة جرثومة الزائفة الزنجارية لمضادات البيتا لاكتام	13.2
20	نفوذية الغشاء الخارجي Outer Membrane Permeability	1.13.2
20	المقاومة بواسطة انظمة الدفع Efflux Systems	2.13.2
21	تغيير الموقع الهدف لعمل المضاد Alteration in target site	3.13.2
22	المقاومة الدوائية المتعددة عند الزائفة الزنجارية Multi-Drug Resistant (MDR) <i>P.aeruginosa</i>	14.2
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل		
24	الاجهزة والمواد المستعملة	1.3
24	الاجهزة المستعملة	1.1.3
25	المواد الكيميائية والبايولوجية	2.1.3
26	الايوساط الزرعية	3.1.3
27	الكواشف والمحاليل	4.1.3
27	اقراص ومساحيق مضادات الحياة المستخدمة	5.1.3
28	العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة	6.1.3
29	طرائق العمل	2.3
29	تحضير المحاليل والكواشف	1.2.3
29	محلول ثابت العكورة القياسي Macfarland Standard	1.1.2.3
30	محاليل مضادات الحياة Antibiotic Solutions	2.1.2.3
30	محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions	3.1.2.3
30	محلول خزين بروميد الإثيديوم Ethidium Bromide Stock Solution	1.3.2.3



## الفصل الأول: المقدمة

### المقدمة Introduction

تعدُّ جرثومة الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* من الأنواع الجرثومية الممرضة الإنتهازية والخطيرة على الصحة العامة للبشر , إذ تُعتبر من المسببات الشائعة المسؤولة عن الكثير من الأخماج عند المرضى الراقدين في المستشفيات ودرجة أقل عند مراجعي العيادات الخارجية (Paterson,2006) . تسبب هذه الجراثيم أخماج خطيرة في المضائف المصابة بالكبت المناعي وتسبب الأخماج المصاحبة لعملية نقل الأعضاء (Mittal et al.,2009;Chen, 2014) , وهي إحدى مسببات تجرثم الدم Bacteremia و ذات الرئة , وتسبب أخماج الأذن, وأخماج القناة البولية وأخماج الجلد , فضلاً عن كونها العامل الرئيسي المسبب للإصابات المكتسبة في المستشفيات لاسيما ردهات الحروق (Salimi et al.,2010;Todar,2012).

تمتلك جرثومة الزائفة الزنجارية عدداً كبيراً من عوامل الضراوة التي تجعلها مسؤولة عن العديد من الإصابات في البشر, منها تكوين الأغشية الحيوية وإنتاج السموم والإنزيمات التي تسبب تلف واسع النطاق في الأنسجة وبالتالي الوصول الى المجرى الدموي , مسبباً إنتشار هذه الجراثيم في انسجة الجسم (Cotar et al.,2010; Karatuna and Yagci,2010; Mohammad,2013).

تمثل الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* ظاهرة من المقاومة لمضادات الحياة , إذ تعود صعوبة معالجة الإصابات التي تسببها الى تأصل المقاومة الدوائية في هذا النوع من الجراثيم, , إذ تمتلك مقاومة طبيعية منها تغيير نفوذية الجدار الخارجي (Breidenstein et al.,2011), وإمتلاكها عدة مجاميع من أنظمة الدفع (Morita et al.,2012) . كما تنتج جراثيم الزائفة الزنجارية العديد من الإنزيمات المسؤولة عن تحلل العديد من مضادات الحياة وخصوصاً مضادات مجموعة البيتالاكتام كإنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo  $\beta$ -Lctamases(M $\beta$ Ls) وإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended Spectrum Beta -Lactamases(ES $\beta$ Ls) وإنزيمات الصف الجزيئي لامبلر Ampler Molecular Class (AMPC) (Gellatly and Hancock,2013;Park et al.,2014) , إذ إنَّ التَعَرُّض المستمر والعشوائي لمضادات البيتالاكتام على الخلية الجرثومية وفي المقابل إنتاجها المستمر لإنزيمات البيتالاكتاميز  $\beta$ -lactamases أدى الى حدوث العديد من الطفرات في المورثات المشفرة لإنتاجها مما

سبب في ظهور جينات مقاومة مشفرة لإنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف التي تمنح صفة المقاومة للخلية الجرثومية تجاه الكثير من مجاميع مضادات البييتالاكتام كالبنسلينات، السيفالوسبورينات (للعديد من اجيالها) ومضادات الكاربابينيم (Strateva&Yordanov,2009; Rezai *et al.*,2014). إذ تمتلك جرثومة الزائفة الزنجارية القدرة على إنتاج العديد من انواع إنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs والتي تعود لعائلة TEMs و SHVs و PERs و VEBs و GESs و IBCs والتي تعد مسؤولة عن تحلل مضادات حياة مختلفة (Libisch *et al.*,2008).

وقد تمَّ إكتشاف عائلة CTX-M التابعة لأنماط إنزيمات ESβLs , إذ تمَّ عزل انزيم *bla*<sub>CTX-M-1</sub> من جرثومة الزائفة الزنجارية المعزولة من المرضى الراقدين في مستشفى الكاظمية التعليمي في مدينة بغداد والمصابين بالتهابات الأذن الوسطى عام 2013 , وتمَّ عزل الجين *bla*<sub>CTX-M-1</sub> من بلازميدات الجرثومة (Aude *et al.*, 2013) .

يُعدُّ تشخيص جرثومة الزائفة الزنجارية بإستعمال الجين 16s rDNA ادق من الإختبارات التقليدية المستعملة مختبرياً , إذ أنَّ الجين 16s rDNA يعطي تشخيصاً على مستوى النوع وله تتابع ثابت لكل نوع من الانواع الجرثومية لذلك له دور مهم جداً في التشخيص الجزيئي (Hussien *et al.*,2012; Altaai *et al.*,2014).

اخيراً يمكن القول إنَّ جراثيم الزائفة الزنجارية ذات الإنتاج المتعدد لإنزيمات البييتالاكتاميز وخصوصاً إنزيمات ESβLs قد تسبب فشل علاجي كبير في حال عدم الكشف المبكر عن هذا النوع الجرثومي المنتج لإنزيمات المقاومة للمضادات , وبالتالي فإنَّ الكشف المبكر عن الأخماج التي تسببها هذه السلالات الجرثومية ضروري جداً من اجل المعالجة المناسبة , ولتقليل إنتشار السلالات المقاومة منها فضلاً عن خفض عدد الوفيات لمرضى المستشفيات . (Altun *et al.*,2013).

## أهداف البحث:

نظراً لأهمية الدراسات الخاصة بتحديد أنواع جرثومة الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* المقاومة لمضادات البييتالاكتام والمسببة لأخماج سريرية مختلفة بين الراقدين وغير الراقدين في مدينة بعقوبة جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على ما يلي :

1. التحري عن افضل طريقة لتشخيص العزلات الجرثومية .
2. الكشف عن مقاومة العزلات المحلية لبعض مضادات البييتالاكتام , وتحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لبعض هذه المضادات.
3. دراسة المحتوى من عوامل الضراوة في عزلات الزائفة الزنجارية .
4. دراسة إنتشار جينات مقاومة مضادات الحياة .

## الفصل الثاني: استعراض المراجع

### 2. إستعراض المراجع Literature Review

#### 1.2. عائلة الزوائف: Pseudomonadaceae :

تتميز افراد عائلة الزوائف بانتشارها في اغلب البيئات مثل التربة , النباتات , الحشرات و مياه الصرف الصحي , وهي عبارة عن جراثيم عصوية الشكل , مستقيمة او منحنية , سالبة لملون غرام , هوائية , موجبة لفحص الاوكسيديز , متحركة .

تضم هذه العائلة عشرة اجناس ينتمي اليها 180 نوع. يعتبر الجنس الشائع لعائلة الزوائف هو جنس الزائفة *Pseudomonas* , إذ يعدُّ هذا الجنس من أكثر الاجناس إنتشاراً وتتوعاً في البيئة , إذ تنتشر أنواعه في البيئات البرية والبحرية بالإضافة الى إنتشارها بين النباتات والحيوانات . تعتبر جرثومة الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* النوع الشائع لجنس الزائفة , يختلف هذا النوع عن غيره من انواع الزائفة بسبب قدرته الامراضية للبشر والثدييات الاخرى ( Garrity et al.,2004 ; Rehm et al.,2008).

سميت جرثومة الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* لأول مرة من قبل العالم Schroeter عام 1872 , إذ قام بعزلها بشكل مزرعة نقية من جروح متقيحة , ثم قام العالم الفرنسي Gessard بإجراء عدة دراسات , إذ قام بعزل جراثيم الزائفة الزنجارية تحت اسم عصيات القيح الازرق *Bacillus pyocyaneus* من مرضى مصابين بجروح جلدية كانت مصحوبة بإنتاج قيح ذو لون اخضر مزرق (Gessard,1984). وهذا ما يفسر تسمية جرثومة *P.aeruginosa* في بداية اكتشافها بعصيات القيح الازرق *Bacillus pyocyaneus* , إذ تشير كلمة *Bacillus* الى الشكل العصوي الذي تمتلكه الجرثومة وكلمة *pyo* تعني القيح *pus* أما كلمة *cyaneous* فتشير الى لون الصبغة الزرقاء التي تفرزها هذه الجرثومة .أما تسمية هذه العصيات بالزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* فيرجع الى الاسم *Pseudo* في

الاعريقية يعني كاذبة, وإنّ Monas تعني مفردة أما المقطع Aeruginosa في الإغريقية يسمى بالزنجار (الصدأ) (Brooks et al.,2010) .

## 2.2. الصفات العامة لجرثومة الزائفة الزنجارية: General Charecters of *P. aeruginosa*

تتصف جرثومة الزائفة الزنجارية على انها جرثومة انتهازية Opportunistic عسوية الشكل يتراوح طولها بين 1-5 مايكرومتر وعرضها 0.5-1 مايكرومتر, سالبة لملون غرام , هوائية اجبارياً Obligatory aerobic , غير مكونة للابواغ Asporogenous , تتحرك بسوط قطبي واحد أو عدة اسواط وتحتوي على المحفظة Capsule (Todar,2012;Bhaws&Singh,2014). تكون هذه الجرثومة على شكل عصيات مفردة او على شكل تجمعات زوجية او على هيئة سلاسل قصيرة وتفرز العديد من الصبغات منها صبغة البايوسيانين Pyocyanin ذات اللون الازرق المخضر وصبغة البايوفردين Pyoverdin ذات اللون الاصفر المخضر وتظهر هذه الصبغة تألقاً عند تعرضها للاشعة فوق البنفسجية Ultra violete وتكون هذه الصبغات غير سامة (Jawetz et al,2001) . وتنتج بعض السلالات صبغات اخرى مثل صبغة البايوروبين الحمراء الغامقة Pyorubin وصبغة البايوميلاينين Pyomelanin السوداء (Carroll et al,2016).

تستطيع جرثومة الزائفة الزنجارية أن تنمو في مدى حراري واسع يتراوح بين 10-44 درجة مئوية أما النمو المثالي فيتم في درجة حرارة  $37 \pm 2$  . تنمو على وسط الماكونكي وتظهر غير مخمرة لسكر اللاكتوز Non lactose fermentor , كذلك تنمو على وسط الدم الصلب وتظهر محللة للدم وذلك لإنتاجها للهيمولايسين. تنتج اغلب مستعمرات جراثيم الزائفة الزنجارية رائحة تشبه الأستر Ester-like odor وهي رائحة مميزة لهذا النوع . أما الرقم الهيدروجيني المثالي لهذه الجراثيم فيتراوح بين  $7 \pm 0.5$  (Gillespie and Hawkey,2006;Aravindhan et al.,2014).

تظهر جراثيم الزائفة الزنجارية نتيجة موجبة في فحص الاوكسيديز Oxidase و الكاتاليز Catalase واليوريث Urease واختبار استهلاك السترات ونتيجة سالبة لفحص الاندول

Indol وإختبار احمر المثل methyl red وكذلك Vogas –proskauer. تعمل هذه الجرثومة على اكسدة بعض السكريات مثل الكلوكوز, المانتول والزيلول (Forbes *et al*,2002 ; Collee *et al*,1996).

تمتلك جرثومة الزائفة الزنجارية طبقة مخاطية بسبب إنتاجها لمادة الالجنيت Alginate slime layer فضلاً عن طبقة متعددة السكريات الخارجية Extra Cellular Polysaccharide (Todar,2011) والتي تشكل الغشاء الحيوي Biofilm لجراثيم الزائفة الزنجارية , إذ تقوم هذه الاغشية الحيوية بحماية الجراثيم من مضادات الحياة , إذ يعتبر الغشاء الحيوي حاجزاً فيزيائياً (Rezace *et al*.,2002), بالإضافة الى كون طبقة الالجنيت تعمل على تثبيط عملية البلعمة (Todar ,2008; Carroll *et al*,2016).

تنتج جرثومة الزائفة الزنجارية ثلاث انواع من المستعمرات , النوع الاول المعزولة من الماء والتربة وتكون عبارة عن مستعمرات صغيرة وخشنة , إمّا المعزولة سريرياً فتكون على نوعين من المستعمرات الاولى تكون كبيرة وملساء وذات حافات مستوية ومظهر مرتفع, والثانية غالباً ما يتم عزلها من المجاري البولية والتنفسية وتكون ذات مظهر مخاطي (Todar,2004).

### 3.2. الوبائية والانتشار : Epidimiology and Spread

تتواجد جراثيم الزائفة الزنجارية بشكل حر في بيئات مختلفة مثل التربة والماء وعلى اسطح النباتات كما تتواجد على جلد الانسان والحيوان (Todar,2012;Bhasin *et al*.,2015) وتعد من أخطر الجراثيم المسببة للإصابات عند الانسان بالإضافة الى الامراض التي تسببها لكل من النباتات والحيوانات كما تعد من إهم الجراثيم المسببة للأمراض في المستشفيات . إذ تمّ عزل جرثومة الزائفة الزنجارية من مصادر متنوعة شملت ردهات المستشفى وصالات العمليات ويتمّ عن طريق الراقدين والعاملين فيها, وعزلت من الصابون والمغاسل واجهزة التنفس الإصطناعي والمطهرات والقساطر البولية urinary catheters ومن أحواض السباحة وحتى من الماء المقطر (Schwager,2012).

إنّ الإقامة في المستشفى قد يؤدي الى إرتفاع نسبة الإصابة بهذه الجراثيم والتي قد تصل الى 20% خلال 72 ساعة خصوصاً لدى المرضى المصابين بحروق شديدة (Pollack,2000; Ochoa *et al*.,2013).

إن استخدام العوامل المثبطة للجهاز المناعي Immuno suppressive agents أو مضادات الأيض Anti metabolites أو مضادات الحياة Antibiotics أو الإشعاع تعدُّ من العوامل المساعدة في زيادة قابلية المريض للإصابة بهذه الجرثومة وانتشارها (Todar, 2004).

إن عملية إنتشار الزوائف الزنجارية نتيجة الالتماس المباشر وغير المباشر بين المرضى وإستخدام الادوات الجراحية الملوثة , علماً إنّ لهذه الجرثومة القدرة على البقاء في المواد المطهرة والعلاجات أو الادوية السائلة مثل قطرات العيون , اقنعة التخدير وارضية صالات العمليات (Qarah, 2007 ;Mitiku et al., 2014).

#### 4.2. تصنيف جرثومة الزائفة الزنجارية : Classification of *P.aeruginosa*

تتنتمي جرثومة الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* الى عائلة Pseudomonadaceae التي تضمُّ جنس *Pseudomonas* الذي يضم 76 نوع فضلاً عن جنس Xanthomons (Baho, 2006; Conti et al., 2009; Todar, 2012).

تصنف جرثومة *P.aeruginosa* اعتماداً على تسلسل القواعد النتروجينية في الحامض النووي لاسيما تسلسل 16s rRNA والموقع التصنيفي لجرثومة *P.aeruginosa* (Tripathi et al., 2013; Slonczewski and Foster, 2014) وكما يأتي :

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gamma Proteobacteria

Order: Pseudomonadales

Super Family: Ribosomal RNA I

Family: Pseudomonadaceae

Genus: *Pseudomonas*

Species: *Pseudomonas aeruginosa*

## 5.2. المكون الوراثي للزائفة الزنجارية: *P.aeruginosa* Genome

يعكس حجم وتعقيد المكون الوراثي لجرثومة الزائفة الزنجارية التكيف التطوري الذي سمح للجرثومة بأن تنمو في بيئات متنوعة و تقاوم تأثيرات المواد المضادة للجراثيم (Spencer *et al.*, 2003).

يتألف المكون الوراثي لجرثومة الزائفة الزنجارية لاسيما العزلات المرضية من 6.3 مليون زوج قاعدي ويعتبر اكبر تتابع وراثي جرثومي , وهذا التتابع يمنح جرثومة الزائفة الزنجارية خاصيات عديدة منها مقاومة العقاقير (Stover *et al.*, 2000).

تتشترك عزلات الزائفة الزنجارية المختلفة بدرجة عالية من التشابه في موروثاتها الجينية ( Ernst *et al.*, 2003). عندما تكون الاختلافات عائدة بشكل كبير الى مجاميع الجينات الخاصة بكل عترة , والتي تتكون من مجموعة من الجينات متشابهة او متقاربة بوظائفها برغم الاختلاف في اشربة الحامض النووي الديرابيوزي (He *et al.*, 2004).

إن كبر حجم الموروثات الجينية في جرثومة الزائفة الزنجارية هو ناشئ من التعقيد الجيني الكبير اكثر مما هو بسبب الاختلافات في تنظيم الموروثات الجينية (Wolfgang *et al.*, 2003). ويمكن القول إن حجم الموروثات الجينية في الزائفة الزنجارية هو ناشئ من العدد الكبير للجينات وتنوع وظائفها. إن الموروثات الجينية لجرثومة الزائفة الزنجارية تمتلك عوائل جينية اكثر بشكل معنوي (المجاميع المترادفة: عبارة عن موروثين يمتلكان تشابهاً هيكلياً مما يدل على انهما منحدران من جين سلفي واحد مشترك وإن التباعد الذي تمتلكه هو بسبب الطفرات الوراثية و الانتخاب الطبيعي او التغيرات الجيني على مستوى الالاء, مقارنة بالموروثات الجينية الجرثومية الكبيرة الاخرى. هنالك حوالي 50% من هذه الجينات المترادفة الاخرى في الزائفة الزنجارية (Kapinis *et al.*, 2006).

## 6.2. تشخيص جرثومة الزائفة الزنجارية: Identification of *P.aeruginosa*

إن تشخيص جرثومة الزائفة الزنجارية بدأ بالتراجع وذلك لغياب نظام التشخيص الموثوق . لذلك تم وصف العديد من الطرق لتشخيص جرثومة الزائفة الزنجارية تتضمن الطرق التقليدية وتشمل التشخيص المظهري والفحوصات الكيموحيوية , والستراتيجيات الجزيئية غيرالمباشرة مثل



نظام (MALDI-TOFMS) , والستراتيجيات الجزيئية المباشرة مثل تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي Sequencing analysis و Polymerase Chain Reaction(PCR) . وهنا سيتم التركيز على الطرق التقليدية وطرق التشخيص الجزيئي المباشرة (Eusebio,2013).

### 1.6.2. التشخيص الجزيئي: Molecular Identification

تعدّ تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في الكشف عن الممرضات الجرثومية تقنيةً دقيقة وسريعة لاسيما عندما يصعب تنمية هذه الممرضات في المختبر او تلك الممرضات التي تحتاج مدة حضانة طويلة لكي تنمو في الوسط الزرعى (Yamamoto,2002). بواسطة تقنية PCR يمكن الكشف عن العديد من الجينات التي تستعمل للكشف عن جرثومة الزائفة الزنجارية المعزولة من العينات السريرية والبيئية ومنها 16s rDNA (Wolfgang *et al.*,2003; Salman *et al.*,2013).

أدى إستعمال تتابعات 16s rDNA الى إعادة تصنيف العديد من الاجناس الجرثومية ونقل احياء من جنس الى اخر وإستحداث أجناس وأنواع جديدة (Woo *et al.*,2008) , إذ إستعمل الجين 16s rDNA في تشخيص جرثومة الزائفة الزنجارية الذي يميزها عن باقي انواع جنسها او الاجناس الاخرى ويعدّ هذا التشخيص ادق من الاختبارات التقليدية المستعملة مختبرياً (Altaai *et al.*,2014) , إذ أنّ الجين 16s rDNA يعطي تشخيصاً على مستوى النوع وله تتابع ثابت لكل نوع من الانواع الجرثومية لذلك له دور مهم جداً في التشخيص الجزيئي Molecular Identification (Hussien *et al.*,2012). وعليه فإنّ الفائدة المهمة عند استعمال هذه الطريقة هي التشخيص السريع عند الاصابة بجرثومة الزائفة الزنجارية و بالتالي الاستعمال المبكر لمضادات الحياة المناسبة للقضاء على الاصابة ومنع العدوى (Ugur *et al.*,2012).

### 2.6.2. التشخيص التقليدي: Conventional Identification

غالباً ما تستعمل الطرق التقليدية المختبرية لتشخيص عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية التي تشمل الفحوصات المجهرية , و خصائص المستعمرات , والاختبارات الكيموحيوية القياسية

(Todar,2012) , إلا أنّ هذا النوع من الطرق بدأ يواجه العديد من الصعوبات في التشخيص الدقيق للعزلات الجرثومية لاسيما التغيرات التي تحدث في النمط المظهري Phenotype في الاجناس الجرثومية المعزولة التي تحتوي على العديد من الانواع المتقاربة جداً فيما بينها , بالإضافة الى نقصان فعالية الاختبارات الكيموحيوية ( Ferroniet et al.,2002; Eusebio et al.,2013).

## 7.2. إمراضية الزائفة الزنجارية: Pathogenesis of *P.aeruginosa*

تعدُّ جرثومة الزائفة الزنجارية من الجراثيم المهددة للصحة العامة عند البشر , إذ تمتاز بكونها ممرضات إنتهازية Opportunistic pathogen وتكون مترمة على الانسان Common human saprophyte , ومن النادر أن تسبب إصابات للأشخاص الأصحاء إلا أنها تستطيع أن تسبب إصابات خطيرة في المضائف المصابة بالكبت المناعي Immuno compromised hosts وتسبب الإصابات المصاحبة لنقل الاعضاء Organ Transplant Infection (Mittal et al.,2009;Chen, 2014). وتعدُّ مسؤولة عن العديد من الامراض التي تصيب اجهزة الجسم كأخماج الجروح والحروق والعين والمجرى البولي والمجرى التنفسي واخماج الاذن الوسطى والجريبات الشعرية Folliculitis infection وتجرثم الدم Bacteremia واخماج الجهاز العصبي Hawkey,2006 (Gillespie and) . وتصيب المرضى المصابين بالسرطان , او الايدز والمرضى المصابون بالتليف الكيسي (Senturk et al.,2012) , وهي إحدى مسببات ذات الرئة, وإنَّ جرثومة الزائفة الزنجارية تسبب التهاب شغاف القلب , واخماج العظام والمفاصل , واخماج المعدة والامعاء , واخماج الجلد والانسجة الرخوة (Salimi et al.,2010;Todar,2012). وعند دخول جرثومة الزائفة الزنجارية الى جسم المضيف تبدأ مرحلة الالتصاق والاستعمار الجرثومي Bacterial attachment and Colonization في الخلايا بواسطة الاهلاب Pili ثم إنتاج عوامل الضراوة التي تسبب الإمراضية ومن عوامل الضراوة هذه إنتاج الإنزيم الحال للبروتين protease الذي يحلل الألياف البروتينية ليكشف المستقبلات للخلايا الجرثومية (Stones and Krachler, 2015) , بعدها تبدأ مرحلة الغزو الموضعي Local Invasion للأنسجة الذي يعتمد بشكل كبير على إنتاج السموم خارج خلوية والإنزيمات التي لها القدرة على تحطيم دفاعات المضيف بعد ذلك يحدث الإنتشار الجهازي للمرض

Dissmenated Systemic من خلال مجرى الدم ويساعدها على الإنتشار هو مقاومتها الأجسام المضادة ولعملية البلعمة Phagocytosis (Okuda et al.,2010). ومن الأمراض التي تسببها جراثيم الزائفة الزنجارية :

### 1.7.2. أخماج الأذن: Ear Infections

تعدُّ جرثومة الزائفة الزنجارية مسؤولة عن إلتهاب الأذن الخارجية External Otitis وإلتهاب الأذن الخارجية الخبيث Malignant External Otitis وهذا يصيب بنسبة اكبر مرضى السكري , والمرضى المصابين بالايذز , وكبار السن , وإلتهاب الأذن الوسطى القيحي المزمن Chronic Suppurative Otitis Media (Parija,2012;Bush &Perez ,2014).

### 2.7.2.أخماج القناة البولية: Urinary Tract Infections

تمتلك جرثومة الزائفة الزنجارية القدرة على إستعمار اسطح القساطر البولية Urinary Catheters وذلك بتشكيل الاغشية الحيوية على اسطح هذه القساطر, الامر الذي يساعد على إنتقال هذه الجرثومة الى المجرى البولي للمريض المقسطر وبالتالي حدوث اخماج المجاري البولية. تعدُّ جرثومة الزائفة الزنجارية مسؤولة عن 12% من أخماج المجاري البولية المكتسبة Nosocomial Urinary Tract Infections , إذ تحتل المرتبة الثالثة من بين الجراثيم المسببة لهذه الأخماج وهي بعد جرثومة الاشريكية القولونية *E.coli* والمكورات المعوية *Enterococci* (Coli et al.,2014).

### 3.7.2.أخماج الجروح: Wound Infections

تعدُّ أخماج الجروح من أهم وأخطر الأسباب التي تؤدي الى إرتفاع نسبة الوفاة عند المرضى . فعند حدوث أذى على سطح الجلد بسبب عامل خارجي تصبح الأنسجة الداخلية في حالة التماس مع الوسط الخارجي وبدون حماية , الامر الذي يؤمن بيئة رطبة ودافئة وغنية بالمواد الغذائية , تؤدي الى إستعمار هذه الانسجة من قبل جراثيم الزائفة الزنجارية. كما إنَّ لهذه الجرثومة القدرة على إستعمار اسطح الجروح بتشكيل أغشيتها الحيوية (Smith et al., 2012).

### 4.7.2.أخماج الحروق: Burns Infections

إنَّ نسبة وفيات مرضى الحروق المصابين بجرثومة الزائفة الزنجارية , والمسببة لتجرثم الدم Bacteremia قد ارتفعت الى 75% خلال 25 سنة الماضية. فعند إصابة جلد المريض بالحروق ينتج عن ذلك ما يعرف بالرضوض Trauma , والذي يحفز الجسم على ارسال العديد من كريات الدم البيضاء العذلة الى مكان الإصابة . وعندما تقوم جرثومة الزائفة الزنجارية بنخر العدلات يتم إطلاق الأكتينات بالإضافة الى أشربة ال DNA من قبل الجرثومة الى الوسط الملتهب , حيث تشكل هذه البنى مع العدلات الميتة ما يشبه الحامل او السقالة لتشكيل الغشاء الحيوي Biofilm . إن هذا الامر يلعب دوراً كبيراً في تسريع عملية تشكيل الغشاء الحيوي لجرثومة الزائفة الزنجارية في مكان الإصابة الامر الذي يزيد من خطر إمرضية هذه الجرثومة (Nichols et al.,2013).

## 8.2. عوامل الضراوة عند جرثومة الزائفة الزنجارية: Virulence factors of *P.aeruginosa*

تمتلك جرثومة الزائفة الزنجارية عدداً كبيراً من عوامل الضراوة التي تجعلها مسؤولة عن العديد من الاصابات التي تصيب البشر ومن هذه العوامل :

### 1.8.2. تكوين الغشاء الحيوي: Biofilm Formation

يمكن تعريف الغشاء الحيوي Biofilm على أنه تجمع من الأحياء الدقيقة تكون مرتبطة بالسطوح بواسطة عديد السكريات Polysaccharides , البروتينات والاحماض النووية (Sauer et al., 2002). تعدُّ عملية تكوين الأغشية الحيوية نتيجة الاستجابة لمجموعة من العوامل منها انخفاض الرقم الهيدروجيني pH, نقص المغذيات وكذلك لتؤمن الحماية اللازمة للتجمعات الجرثومية من دفاعات المضيف , ويعدُّ الغشاء الحيوي صفة مهمة لإستمرار الإصابة (Sharma et al.,2014).

يقوم الغشاء الحيوي لجرثومة الزائفة الزنجارية بالعديد من الوظائف منها مقاومة مضادات الحياة , وهو مسؤول عن المراحل الالتهابية الاولية ومقاومة عملية البلعمة Phagocytosis التي تقوم بها كريات الدم البيضاء العذلة Neutrophils والهروب من الاليات الدفاعية وطرد الجذور الحرة التي تطلقها الخلايا البلعمية Macrophages والخلايا العذلة Neutrophils , ومقاومة المواد التي تثبط الغشاء الحيوي مثل مادة Polysorbate 80 كما يعدُّ مسؤولاً عن الإحتفاظ بالماء والمواد الغذائية في الظروف

البيئية الصعبة (Wei and Ma .,2013). تسبب الأغشية الحيوية إصابات مزمنة , كونها تُظهر قابلية تحمل لمضادات الحياة والمطهرات الكيميائية ومقاومة عملية البلعمة ودفاعات الجسم الأخرى وذلك لأنّ هذه التجمعات الجرثومية تحيط نفسها بقالب صلب ولزج من عديد السكريات Extrapolysaccharide matrix الذي يستخدم لحمايتها ( Davies ,2002).

وقد تمّ تسليط الضوء على دور ظاهرة التحسس بالنصاب (Quorum sensing(QS) لجراثيم الزائفة الزنجارية في تكوين الأغشية الحيوية (Sutherland,2001) . إذ طورت هذه الجراثيم نظام إتصال كيميائي بين الخلايا لتنسيق عملية التعبير الجيني والنشاطات الأخرى داخل المجتمعات الجرثومية وقد عُرفَ هذا النظام بظاهرة التحسس بالنصاب (Yang,2009).

تقوم ظاهرة التحسس بالنصاب QS بتنظيم الإتصال بين خلايا جراثيم الزائفة الزنجارية عبر إنتاجها لإشارات خاصة , إذ تلعب هذه الظاهرة دوراً في تكوين الغشاء الحيوي وإنتاج عوامل الضراوة عند هذه الجرثومة , فضلاً عن تأمين المقاومة تجاه مضادات الحياة . وإنّ توقف ظاهرة التحسس بالنصاب عن العمل يؤدي الى تخفيض عوامل الضراوة أو حتى إنعدامها (Harjai et al.,2014)

إنّ المراحل المتتابعة لتطور الأغشية الحيوية تشمل ارتباط الجراثيم على السطح , الالتصاق, النمو, تجمع الخلايا داخل مستعمرات دقيقة , واخيراً نضوج وإنفصال الخلايا الأمية لتكوين مستعمرات جديدة من الأغشية الحيوية (Li et al.,2007; Nakamura et al.,2008) .

### 2.8.2. إنتاج الإنزيمات الحالة للبروتين: Protease Production

تنتج جراثيم الزائفة الزنجارية أربعة مجاميع من هذه الإنزيمات وهي Las Elastase A و (A) Elastase B (Las B) والبروتيتيز القاعدي Alkaline protease والبروتيتيز IV4 Protease , إذ تعدّ مسؤولة عن تلف الأنسجة الخلوية للمضيف وذلك من خلال قدرتها على تفكيك مجموعة كبيرة من المواد الاساس مثل الكولاجين collagen , ومولد الليفين Fibrinogen , والترانسفيرين Transferrin , و Laminin وبعض العناصر المناعية التابعة لمكونات نظام المتمم Complement Components و Immunoglobulins (Andrejko et al., 2013).

### 3.8.2. إنتاج الهيموليسين Hemolysin production

يعدُّ الهيمولاييسين من عوامل الضراوة المنتجة من قبل الجراثيم الموجبة والسالبة لملون غرام ومنها جرثومة الزائفة الزنجارية (Truan *et al.*, 2013).

إنَّ للهيمولاييسين دور كبير في تحقيق الأمراض من خلال تحليله لكريات الدم الحمراء للمضيف وعليه يؤمن الحديد لنمو الجراثيم وكذلك يؤدي الى حدوث تنخرات في الجلد وبشكل عام فإنَّ غالبية عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية تكون منتجة له ومن النوع Beta-hemolysin (Massimelli *et al.*, 2005).

## 9.2. إنزيمات البيتا لاكتاميز عند جراثيم الزائفة الزنجارية: $\beta$ -lactamase Enzymes in *P.aeruginosa*

تتميز الاخماج الناجمة عن جرثومة الزائفة الزنجارية بأنها مقاومة للعلاج وذلك بسبب المقاومة الطبيعية والمكتسبة التي تبديها هذه الجرثومة . إنَّ من أهمِّ الليات المقاومة المكتسبة التي تبديها جراثيم الزائفة الزنجارية هي إنتاج إنزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف Extended Spectrum  $\beta$  - lactamase (ES $\beta$ Ls) وإنزيمات الصف الجزئي لأمبلر المتواسطة البلازميدات Plasmid Mediated AmpC  $\beta$  - lactamase وإنزيمات البيتا لاكتاميز المعدنية Metallo  $\beta$  – lactamase , ونتيجة لإزدياد أنواع هذه الإنزيمات بالإضافة الى نسبة ظهورها في المجتمع , فإنَّ الكشف المبكر عنها أمرٌ بالغ الأهمية وذلك لإنتقاء مضادات الحياة المناسبة للمعالجة السريعة الأمر الذي يضمن نجاح الخطة العلاجية (Upadhyay *et al.*,2010).

## 1.9.2. إنزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف: Extended Spectrum $\beta$ - lactamase (ES $\beta$ Ls)

إنَّ إحدى الليات المقاومة المهمة للخلية الجرثومية هي إنتاج إنزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف ES $\beta$ Ls وهذه الإنزيمات تكون معقدة , متنوعة , سريعة التطور وشكلت تهديداً للكثير من المضادات الحياتية المتاحة (Shaikh *et al.*,2015).

إنَّ التعرض المستمر والعشوائي لمضادات البيتا لاكتام على الخلية الجرثومية وفي المقابل إنتاجها المستمر لإنزيمات البيتا لاكتاميز  $\beta$  -lactamase أدى الى حدوث العديد من الطفرات في المورثات المشفرة لإنتاجها مما سبب في ظهور جينات مقاومة مشفرة لإنتاج إنزيمات البيتا لاكتاميز

واسعة الطيف (Strateva and Yordanov,2009) , التي تمنح صفة المقاومة للخلية الجرثومية تجاه الكثير من مجاميع مضادات البييتالاكتام كالبنسلينات ,السيفالوسبورينات (للعديد من أجيالها) ومضادات الكاربابينيم (Rezai *et al.*,2014) , ومما زاد من المقاومة لمضادات البييتالاكتام خاصة الحديثة منها هو أنّ المورثات المشفرة لإنتاج إنزيمات البييتالاكتامز واسعة الطيف ESβLs تكون محمولة على البلازميد مما سهّل إنتقالها بين العديد من الانواع الجرثومية إذ أدى إلى إنتشار صفة المقاومة (Brouwer *et al.*,2014).

تمتلك جرثومة الزائفة الزنجارية القدرة على إنتاج العديد من أنواع إنزيمات ESβLs والتي تعود لعائلة TEMs و SHVs و PERS و VEBs و GESs و IBCs والتي تعد مسؤولة عن تحليل مضادات حياة مختلفة (Bebrone *et al.*,2013), وكذلك عائلة OXA التي لها القدرة العالية على تحليل مضاد Oxacillin وهي شائعة وبشكل واسع في جرثومة الزائفة الزنجارية (Libisch *et al.*,2008).

وقد تمّ إكتشاف عائلة أخرى من أنماط إنزيمات ESβLs عند جراثيم الزائفة الزنجارية وهي عائلة CTX-M . إذ تمّ عزل إنزيم CTX-M لأول مرة عام 2004 في هولندا بمدينة امستردام من قشع أحد المرضى المصابين بداء التليف الكيسي وكان من النوع CTX-M-1 وفي نفس العام أيضاً تمّ إكتشاف إنزيم CTX-M-43 عند جراثيم الزائفة الزنجارية , وتمّ عزل CTX-M-2 لأول مرة عند جرثومة الزائفة الزنجارية عام 2005 . تقسّم إنزيمات هذه العائلة على أساس تشابه أحماضها الأمينية إلى خمس مجموعات هي CTX-M-1 و CTX-M-2 و CTX-M- و CTX-M-8 و CTX-M-9 و CTX-M-25 , إذ تتشارك أفراد كل مجموعة بنسبة تطابق 94% (Bonnet, 2004;Canton) and Coque ,2006).

على عكس إنزيمات العائلتين TEM و SHV التي تنشأ عن طريق حدوث الطفرات المؤدية إلى إستبدال حوامض أمينية بأخرى في الأنماط السلف (SHV-1,TEM-1,TEM-2) فإنّ أنزيمات العائلة CTX-M واسعة الطيف تمّ إكتسابها بالإنتقال الأفقي للجينات Horizontal Gene Transfer (HGT) من جرثومة إلى أخرى , فقد أظهرت دراسة تسلسل النيوكليوتيدات التابعة لجينات النمط CTX-M المحمولة على البلازميد وجود تطابق مع المناطق التابعة للجين الكروموسومي bla<sub>KLUG</sub> في النوع الجرثومي *Kluyvera Georgiana* والجين bla<sub>KLUA</sub> في النوع الجرثومي *Kluyvera ascorbata* , مما أدى إلى إنتقال جينات إنزيمات العائلة CTX-

M من كروموسوم الجنس *Kluyvera* إلى بلازميدات أنواع جرثومية أخرى مثل الكلبسيلا الرئوية والاشريكية القولونية (Humeniuk et al., 2002; Rodriguez et al., 2004).

إنّ مورثات هذه العائلة محمولة على البلازميدات ، وتتميز بقدرة كبيرة على تحليل مضادى Cefotaxime و Ceftriaxone ولكنها لا تستطيع تحليل مضاد Ceftazidime . (Canton et al ., 2012; Zhao & Hu, 2013 ; Moghaddam et al., 2014)

تكون إنزيمات العائلة CTX-M حساسة لمثبطات إنزيمات البييتالاكتاميز رغم ملاحظة مستوى منخفض من المقاومة تجاه المركب التآزري Amoxicillin+Clavulanic acid أو Ticarcillin+Clavulanic acid (Bonnet, 2004).

يشفر جين  $bla_{CTX-M}$  إلى 291 حامض أميني ، وإنّ تغيير حامض أميني واحد في جين  $bla_{CTX-M}$  يؤدي إلى إنتاج نوع جديد من إنزيمات CTX-M مثلاً يختلف CTX-M-10 عن CTX-M-3 باستبدال إثنين من الأحماض الأمينية وكذلك يختلف إنزيم CTX-M-3 عن إنزيم CTX-M-1 بتغيير مواقع 4 أحماض أمينية ، أمّا إنزيم CTX-M-15 يختلف عن CTX-M-3 بتغيير حامض أميني واحد فقط ، إذ إنّ معظم إنزيمات CTX-M تشفر لمقاومة مضادات Cefotaxime ، Ceftriaxone ولكنها حساسة لمضاد Ceftazidime لأنّ هذا المضاد الحياتي يحتوي على مركب C7 beta-amino thiazoloxymino-amide في السلسلة الجانبية له تأثيراً فعالاً ضد إنزيم CTX-M ، مع ذلك أنتجت الطفرات النقطية إنزيمات من هذه العائلة ذات فعالية أكثر قوة تجاه مضاد Ceftazidime وذلك عند إستبدال الحامض الأميني Aspartic acid بالحامض الأميني Glutamic acid في الموقع 240 أدى إلى إشتقاق نوع جديد من إنزيمات CTX-M يمتلك القابلية على تحليل مضاد Ceftazidime (Canton et al., 2012; Moghaddam et al ., 2014)

### 3.9.2 إنزيمات البييتالاكتاميز المعدنية: Metallo $\beta$ -lactamase (M $\beta$ LS)

تعود هذه الإنزيمات إلى المجموعة الثالثة من تصنيف البييتالاكتاميز حسب تصنيف الباحثة Bush وزملاؤها ، تختلف أفراد هذه المجموعة في البنية التركيبية عن غيرها من إنزيمات البييتالاكتاميز وذلك لوجود عنصر الزنك في الموقع الفعّال ، تتميز إنزيمات البييتالاكتاميز المعدنية بقدرتها على تحليل مضادات الكاربابينيم ( Mochon et al., 2011 ) ، بالإضافة إلى ألفتها



الضعيفة في تحليل مضادات المونوباكتام ولا تثبط هذه الإنزيمات بمثبطات البيتا لاكتام الشائعة كحامض الكلافولانك أو التازوباكتام وإنما يتم تثبيطها بالمركبات الكلابية المخليبية المعدنية كمركب EDTA ومركب Dipicolinic acid (Saderi et al.,2008). تتواجد الجينات المشفرة لهذه الإنزيمات على الكروموسوم عند الجراثيم السالبة لمون غرام. ولكن تبين أن هذه الجينات قادرة على الانتقال. فمثلاً يعتبر إنزيمي IMP و VIM من إنزيمات البيتا لاكتاميز المعدنية المحمولة على البلازميدات، وتتميز بإحتوائها على ذرتين من الزنك في الموقع الفعال (Bush & Jacoby,2010).

تمّ الكشف عن إنزيمات MβLs عند جراثيم الزائفة الزنجارية لأول مرة عام 1991 في اليابان، ومن ذلك الوقت إنتشرت في معظم أنحاء العالم كآسيا، واوربا، وشمال امريكا، وجنوب افريقيا. ونظراً الى قدرة الجينات المشفرة لهذه الإنزيمات على الانتقال بواسطة البلازميدات تمتلك جراثيم الزائفة الزنجارية عدداً من إنزيمات MβLs المكتسبة وهي IMP, VIM, GIM, SPM (Pitout et al.,2005).

يمكن أن توجد الجينات المشفرة لإنزيمات MβLs كعائلة VIM على الإنتغرونات Integrons، كما تمتلك جراثيم الزائفة الزنجارية المنتجة لإنزيمات MβLs صفة المقاومة الدوائية المتعددة MDR (Liakopoulos et al., 2013).

## 10.2. مضادات الحياة: Antibiotics

إن مضادات الحياة عبارة عن النواتج الأيضية الثانوية التي تنتجها بعض الأحياء، وتمتلك فعالية ضد مجموعة من الأحياء الدقيقة، وتعرف بأنها مواد كيميائية تنتج من قبل الأحياء الدقيقة المختلفة ولها القدرة على تثبيط نمو أو قتل الأحياء الدقيقة الأخرى دون التأثير على خلايا الجسم، وتوجد في البيئة التي تشغلها ويرتبط إنتاج مضادات الحياة بإعتبارها مواد أيض ثانوية بانخفاض معدلات النمو وتكونها بعض الأحياء عند عملية التبوغ كما أن النباتات تكون مضادات ميكروبية إستجابة للظروف البيئية (الشويخ، 2016).

## 11.2. مضادات البيتا لاكتام: β-lactam antibiotics

إنَّ مضادات البيتا لاكتام عبارة عن مجموعة كبيرة من مضادات الحياة والتي تشترك بإحتوائها على حلقة البيتا لاكتام Beta lactam ring وتضمُّ أربعة مجاميع رئيسية وهي:

1. مجموعة البنسلينات Penicillins : بأنواعها المختلفة كالمضادات الطبيعية مثل بنسلين G (Benzyl penicillin) وبنسلين V (Phenoxy methyl penicillin) والبنسلينات نصف المصنعة وتضم البنسلينات واسعة الطيف Extended spectrum penicillins , تكون فعالة ضدَّ جراثيم *P.aeruginosa* وتشمل مضادات Carboxy penicillins مثل Carbencillin و Ticarcillin ومجموعة Ureido penicillins وتشمل Azlocillin , Mezlocillin , Piperacillin (الشويخ, 2016) .

2. السيفالوسبورينات: Cephalosporins وتقسم إلى أربعة أجيال إعتماًداً على تركيبها الكيميائي وفعاليتها المضادة للمايكروبات (Brooks et al,2007).

سد

●  
يفالوسبورينات الجيل الأول First generation cephalosporins : كمضادات Cephalexin, Cefadroxil , Cephaprime , Cephalothin و Cephacetrile , Cephalordine و Cephalexin (المرجاني, 2011).

●  
سيفالوسبورينات الجيل الثاني Second Generation Cephalosporins : كمضادات Cefoxitin , Cefotetan (Katzung , 2001) .

سد

●  
يفالوسبورينات الجيل الثالث Third Generation Cephalosporins : كمضادات Cefotaxime , Ceftazidium , Ceftriaxone , Cefixime ( ) Murray et al., 2007 .

سد

●  
يفالوسبورينات الجيل الرابع Fourth Generation Cephalosporins : كمضاد Cefepime .

3. مضادات المونوباكتام Monobactams : كمضاد Aztreonam (المرجاني , 2011) .

4. مضادات الكاربابينيم Carbapenems : تضم مجموعة من المضادات منها Imipenem, Meropenem بالإضافة الى المجموعة الحديثة التي تشمل الـ Faropenem (Faropenem *et al.*,2003) (Dalhoff).

وتؤثر هذه المضادات في الخطوة الأخيرة من تركيب الجدار الخلوي للجرثومة (Guilfoile *et al.*,2007), إذ تعمل مضادات البيتالاكتام على تثبيط تخليق الجدار الخلوي للجرثومة وذلك من خلال الإرتباط مع مواقع خاصة في الخلية الجرثومية والتي تسمى البروتينات الرابطة للبنسلين Penicillin binding proteins , إذ تقوم بتثبيط عمل الإنزيم الناقل للبيتيد Transpeptidase الذي له دور في تكوين الروابط البيتيديّة في طبقة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan التي تكون ضمن مكونات الجدار الخلوي (Zervosen *et al.*,2012).

بعض أفراد مجموعة البيتالاكتام ذات منشأ طبيعي والبعض الآخر صناعي . وتعتبر حلقة البيتالاكتام  $\beta$ -lactam ring الرباعية , النواة الأساسية لهذه المضادات , إذ تحتوي هذه الحلقة على ثلاثة ذرات من الكاربون وذرة واحدة من النتروجين وبعض أفراد هذه المجموعة تعتبر أكثر تطوراً وتتمتع بنشاط بايولوجي أكثر من غيرها نتيجة كون حلقة البيتالاكتام فيها خماسية او سداسية . (Saradhi,2012) .

## 12.2. مثبطات إنزيمات البيتالاكتاميز : $\beta$ -lactamase inhibitors

إنّ إنتاج عدد من مثبطات إنزيمات البيتالاكتاميز هي إستراتيجية فريدة من نوعها , إذ ترتبط هذه المثبطات بكفاءة في الموقع الفعّال من الإنزيم (Buynak,2006) . وهذه المثبطات في الواقع ليست ذات تأثير على الجراثيم ولا ترتبط حتى بالبروتينات الرابطة للبنسلين التي تمثل هدف البنسلينات (Drawz and Bonomo,2010) . إنّ أكثر المثبطات نجاحاً هو حامض الكلافولانك Clavulanic acid , وهو عبارة عن مركب بيتا-لاكتام ولكن بدلاً من حلقة Thiazolidine الموجودة في البنسلينات ترتبط حلقة البيتالاكتام بحلقة خماسية تحوي الاوكسجين (Lorian 2005) .

تمّ خلط حامض الكلافولانك مع الاموكسيسيلين واصبح هذا المركب من افضل المنجزات العلاجية في معالجة اصابات الجهاز التنفسي . كذلك تمّ خلط حامض الكلافولانك مع التيكارسلين لمعالجة الاخماج الحادة الناتجة من المستشفيات الناجمة عن الجراثيم المنتجة لانزيمات

البيتالكتاميز مستغلين بذلك زيادة نفاذية التيكارسلين وظيفه الاوسع بالمقارنة مع الاموكسيسيلين (Lee et al.,2003).

ويوجد نوعان آخران من مثبطات إنزيمات البيتالكتاميز إذ أُستخدما في التطبيقات العلاجية وهما Sulbactam يخلط مع الامبيسلين , والتازوبكتام Tazobactam يخلط مع البييراسلين . وكلا المثبتين المذكورين يحتويان في تركيبهما على حلقة البيتا-لاكتام ويعملان بنفس آلية حامض الكلافلونك في تثبيط إنزيمات البيتالكتاميز (Payne et al.,1994).

أما المثبط Avibactam الذي يستخدم خطأً مع مضاد Ceftazidime , إذ يعمل على تثبيط إنزيمات البيتالكتاميز واسعة الطيف ESβLs و إنزيمات البيتالكتاميز صنف C وبعض أنواع Oxacillinase و Carbapenemase و عند خلطه مع مضاد Ceftazidime فإنه يمنع تحلل المضاد (CDER,2015).

## 13.2. اليات مقاومة جرثومة الزائفة الزنجارية: *P.aeruginosa* لمضادات البيتالكتام

### 1.13.2 نفوذية الغشاء الخارجي: Outer Membrane Permeability

تتميز الجراثيم السالبة لملون غرام ومنها جراثيم الزائفة الزنجارية بقابليتها على تغيير نفاذية الغشاء الخارجي مما يؤمن لها مقاومة الكثير من أنواع مضادات الحياة (Breidenstein et al.,2011). تستطيع جراثيم الزائفة الزنجارية أن تغير من النفاذية الإختيارية بجدارها الخلوي وذلك من خلال الطفرات المؤدية إلى حذف بعض بروتينات الجدار الخلوي, إذ تمتلك جراثيم الزائفة الزنجارية عدد من القنوات التي تعرف بأسم Porins .

إنّ عدد قنوات البورين العامة قليلة جداً (واحدة فقط) عند بعض جراثيم الزائفة الزنجارية وهو البروتين Opr F الذي يعتبر من اهم البروتينات المكونة للجدار الخلوي والذي يسمح بمرور المركبات الكبيرة نسبياً ومن بينها مضادات الحياة . ان فقدان قناة Opr F تؤدي الى مقاومة العديد من مضادات الحياة , إذ إنّ فقدان Opr F , يؤدي الى مقاومة جراثيم الزائفة الزنجارية

للعديد من المضادات كالمركب التآزري Ampicillin –Sulbactam ومضادات Ertapenem و Ceftaxime و Ceftazidime و Levofloxacin و Trimethoprim- و (Hancock and Brinkman,2002; Tige cycline Do tsch et Sulfamethoxazol al., 2009)

ومن قنوات البورين الأخرى الموجودة عند جراثيم الزائفة الزنجارية هي Opr D والتي تلعب دوراً في مقاومة مضادات الحياة أيضاً . إذ أنّ فقدانها يؤدي إلى مقاومة بعض مضادات الحياة , إذ أثبتت دراسة فقدان Opr D من الجدار الخلوي يؤدي إلى مقاومة جراثيم الزائفة الزنجارية لمضادات Carbapenimes وبشكل أساسي Impenem (Skurnik et al., 2013).

### 2.13.2 . المقاومة بواسطة أنظمة الدفع: Efflux Systems

يرجع السبب في زيادة المقاومة لمضادات الحياة هو إمتلاك جراثيم الزائفة الزنجارية لنظام الدفع Efflux System والذي يعمل على تقليل تركيز المضاد في الخلية (Lawy (,2003;Mushtaq et al ., 2004

تمتلك جراثيم الزائفة الزنجارية عدة مجاميع من أنظمة الدفع ومن أهمها عائلة Resistance-Nodulation-Devison(RND) . تؤمن هذه الأنظمة مقاومة دوائية متعددة MDR لجراثيم الزائفة الزنجارية . تتألف أنظمة الدفع هذه من ثلاثة أقسام رئيسية : وهي عامل الغشاء الخارجي Outer Membrane fusion protein (MFP) , membrane factor (OMF) , وبروتين المندمج بالغشاء Membrane fusion protein (MFP) , وناقل الغشاء الساييتوبلازمي Cytoplasmic membrane transporter (CMT) , إذ تشكل هذه الأقسام مجتمعة قناة تعمل على ثقب الغشاء بشكل كامل وتنتجه نحو الجدار الخلوي للخلية وتسمح بضخ مضادات الحياة من المحيط الساييتوبلازمي إلى الوسط الخارجي (Vaez et al.,2014). ومن أنظمة الدفع الأخرى المسؤولة عن المقاومة الذاتية لدى جراثيم الزائفة الزنجارية هو نظام Mex EF –opr N الذي يؤمن المقاومة لمضادات الفلوروكينولونات والكلورامفينكول والتريميتوبرايم كذلك نظام الدفع Mex X Y الذي يرتبط ببروتينات الجدار الخارجي ( Opm I,Opm B, OpmG, Opm H ) بالإضافة إلى نظام Opr M الذي يعدّ مسؤولاً عن المقاومة تجاه بعض المضادات , كمضادات مجموعة الأمينوكلايكوسيد ومجموعة Fluoroquinolones ومضاد Tetracycline ومضاد Tige cycline ومضاد Erythromycin ويعمل النظام Mex AB-opr M على مقاومة الزائفة الزنجارية لمضادات مجموعة

البيبتالاكتام (Poole,2001;Adewoye *et al.*,2002;Kriengkauykiat *et al.*,2005; Morita *et al.*,2012).

### 3.13.2. تغيير الموقع الهدف لعمل المضاد: Alteration in target site

تتوسط البروتينات الرابطة للبنسلينات (PBPs) Pencillins- binding proteins في المراحل الأخيرة من تركيب طبقة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan إحدى مكونات الجدار الخلوي عند جراثيم الزائفة الزنجارية , إذ تعدُّ هذه البروتينات الهدف الرئيس لمضادات مجموعة البيبتالاكتام . إنّ إرتباط مضادات مجموعة البيبتالاكتام مع PBPs يؤدي الى إيقاف تشكيل الجدار الخلوي وبالتالي موت الخلية , فعند حدوث الطفرات تؤدي الى تعديل البنية التركيبية ل PBPs مما يؤدي إلى انخفاض ألفة هذه البروتينات للإرتباط بجزيئات مضاد الحياة وبالتالي ظهور المقاومة تجاه مضادات البيبتالاكتام (Basavraj and Namdev,2012;Smith *et al.*, 2013; Sun *et al.*,2014) . كذلك حدوث تحوير لمضاد الحياة بواسطة إنزيمات تحوير المضاد التي تسمى Modifying enzymes مثل إنزيمات Adenylate (AACs), Acetylate (ANT),Phosphorylate (APH) , إذ تعدُّ أهم وأكثر الآليات شيوعاً (Chandra kanth *et al.*, 2008) , إذ تعمل هذه الإنزيمات على إحداث تحوير في جزيئة مضاد الحياة ليتحول الى الشكل الغير فعال من خلال الإرتباط بمضاد الحياة , او إضافة مجاميع كيميائية الى المضاد وعليه لا يمكن الوصول الى الموقع الهدف (Blair *et al.*,2015).

### 14.2. المقاومة الدوائية المتعددة عند الزائفة الزنجارية: Multidrug Resistant

#### (MDR) *P.aeruginosa*

تعرف المقاومة الدوائية المتعددة MDR لجراثيم الزائفة الزنجارية بقدرة هذه الجراثيم على مقاومة ثلاثة أنواع على الاقل من مضادات الحياة تابعة لثلاثة مجاميع مختلفة وبشكل أساسي هي مجموعة البنسلينات والسيفالوسبورينات والامينوكلايكوسيدات بالإضافة الى بعض المجاميع الأخرى كمجموعة الكاربابينيم والفلوروكينولونات (Hirsch and Tam,2010).

تعود ظاهرة المقاومة الدوائية المتعددة عند جراثيم الزائفة الزنجارية لعدة أسباب أهمها عمل بعض العناصر الوراثية المتنقلة كالبلازميدات والترانسبوزونات والانتغرونات , إذ تتمتع الجينات المحمولة على الإنتغرون بقدرتها على تأمين آليات المقاومة المتعددة تجاه العديد من المضادات الحياتية كمضادات البيبتالاكتام والامينوغلايكوسيدات بالإضافة الى مضادات الحياة الأخرى

(Odumosu *et al.*,2013). كما تعود هذه المقاومة الى ضخامة جينوم جرثومة الزائفة الزنجارية وإمتلاك هذه الجراثيم العديد من آليات المقاومة كأنظمة مضخات الدفع Efflux pumps وقلة عدد قنوات البورين Porin channels في الجدار .

واخيراً إنّ من أهمّ اليات المقاومة عند هذه الجراثيم هي قدرتها على إنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز التي تؤمن لها المقاومة تجاه مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات , والكاربابينيمات (Giamarellou and Kanellakopoulou,2008).

تشير معظم الدراسات العالمية الى إرتفاع نسبة المقاومة الدوائية لجراثيم الزائفة الزنجارية , ففي اوريا أشار الباحث Souli وزملاؤه عام 2008 الى مقاومة الزائفة الزنجارية لمضادات مجموعة Carbapenem بنسبة فاقت 25% . بالإضافة الى الدراسة الامريكية للباحث Morrow وزملاؤه عام 2013 , إذ كانت عزلات الزائفة الزنجارية مقاومة لمجموعة كبيرة من مضادات الحياة شملت عدة مجاميع كالكاربابينيمات وهي مضادات Doripenem و Imipenem و Meropenem ومن الفلوروكينولونات كمضاد Levofloxacin , ومن السيفالوسبورينات كمضاد Ceftazidime , ومن الامينوكلايكوسيدات كمضاد Tobramycin, ومن البنسلينات كالمركب التآزري Piperacillin/tazobactam وبنسبة 11.4% , 21.9% , 15.2% , 10.1% , 14.7% (Nathwani *et al.*,2014).

في الولايات المتحدة تسبب جراثيم الزائفة الزنجارية سنوياً حوالي 51000 حالة خمجية في مراكز الرعاية الصحية , اكثر من 6000 حالة (13%) ناتجة عن جرثومة الزائفة الزنجارية ذات المقاومة الدوائية المتعددة MDR والتي تسبب ما يقارب 400 حالة وفاة (CDC,2013) . إنّ إنتشار الزائفة الزنجارية متعددة المقاومة الدوائية يميل الى زيادة الوفيات حول العالم , وهذا ماأكده الباحث الامريكي Tam وزملاؤه عام 2010 , عندما عزل نوع جرثومة الزائفة الزنجارية من مرضى مصابين بتجرثم الدم , إذ كانت العزلات ذات المقاومة المتعددة الدوائية 23% وكانت نسبة الوفيات 40% خلال 30 يوم من الإصابة (Tam *et al.*,2010).

### الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل

#### 3. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

##### 1.3. الأجهزة والمواد المستعملة

##### 1.1.3. الأجهزة المستعملة

أُستخدمت الأجهزة المبينة في الجدول 1.3.

#### جدول 1.3: الأجهزة المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	الجهاز
Hirayama (Japan )	الموصدة Autoclave
Helena ( USA)	جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis apparatus
Russian	جهاز التقطير Distillatar
Thermo (U.S.A)	جهاز القطرة النانوية Nanodrop
Biomeriex (France)	جهاز تشخيص الجراثيم Vitek 2
Eppendorf (German)	جهاز تفاعل البلمرة التسلسلي Thermocyclor
Heraeus ( Germany)	جهاز طرد مركزي صغير Microfuge



Lab.Tech (Korea)	DdH <sub>2</sub> O	جهاز ماء منزوع الايونات
Lab.Tech (Korea)	Vortex	جهاز مزاج
U.S.A	Incubater	حاضنة
Biomeriex (France)	Water bath	حمام مائي
Biomeriex (France)	Shaking water bath	حمام مائي هزاز
Memmert(Germany)	Oven	فرن كهربائي
Dragon-med (Spain)	Micropipettes	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة
Nikon ( Japan)	Light microscope	مجهر ضوئي
Slimline (USA)	UV-Transilluminator	مصدر الأشعة فوق البنفسجية
Radiometer ( Denmark )	pH-meter	مقياس الأس الهيدروجيني
TAFESA (Germany)	Sensitive balance	ميزان حساس

### 2.1.3. المواد الكيميائية والبايولوجية

استخدمت المواد المبينة في الجدول 2.3.

جدول 2.3: المواد الكيميائية والبايولوجية المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	المادة
Fluka ( Switzer land )	EDTA اثيلين ثنائي المثيل ثلاثي حامض الخليك
BDH( England )	Methyl Red صبغة احمر المثيل
Sigma ( U.S.A )	Agarose أكاروز

Oxoid ( England )	Peptone	ببتون
BDH ( England )	Ethidium bromide	بروميد الاثيديوم
BDH ( England )	Tris – base	ترس قاعدي
BDH ( England )	Gelatine	جيلاتين
Merck ( Germany )	Boric acid	حامض البوريك
BDH ( England )	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	حامض الكبريتيك
Al-Safii (KSA)	Skim milk	حليب الفرز
Fluka ( Switzer land )	Yeast extract	خلاصة الخميرة
BDH( England )	$\alpha$ -Naphthol	الفا – نفثول
BDH( England )	Ethanol	كحول اثيلي 95%
Oxoid ( England )	BaCl <sub>2</sub> ..H <sub>2</sub> O	كلوريد الباريوم المائي
BDH ( England )	Glycerol	كليسيرول
BDH( England )	Potassium Hydroxide	هيدروكسيد البوتاسيوم

### 3.1.3. الاوساط الزرعية

استخدمت الاوساط الزرعية المبينة في الجدول 3.3.

جدول 3.3: الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	الوسط
Oxoid (England)	Methyl Red agar وسط احمر المثيل الصلب

Himedia (India)	Blood agar	وسط الدم الصلب
Himedia (India)	Pseudomonas agar	وسط السيدوموناس الصلب
Himedia(India)	Trypticase Soy Agar	وسط الصويا الصلب
Himedia( India)	MacConkey agar	وسط الماكونكي الصلب
Oxoid (England)	Nutrient broth	وسط المرق المغذي
Oxoid(England)	Nutrient agar	الوسط المغذي الصلب
Himedia(India)	Simmon Citrate agar	وسط سايمون ستريت الصلب
Oxoid (England)	Muller-Hinton agar	وسط مولر هنتون الصلب
Oxoid (England)	Brain-heart infusion broth	وسط مرق نقيع القلب والدماغ

### 4.1.3 الكواشف والمحاليل

استخدمت المحاليل والكواشف المبينة في الجدول 4.3.

#### جدول 4.3: الكواشف والمحاليل المستخدمة في الدراسة

الشركة المجهزة والمنشأ	اسم الكاشف / المحلول
Himedia (India)	Kovac's Indole Reagent كاشف الاندول
B.B.H(England)	Hydrogen peroxide محلول بيروكسيد الهيدروجين
Syrbio (S.A.R)	Gram stain Solution محاليل صبغة غرام

### 5.1.3 اقراص ومساحيق مضادات الحياة المستخدمة

أُستخدِمت أقراص ومساحيق مضادات الحياة المبينة في الجدول 5.3 و 6.3 .

جدول 5.3: أقراص مضادات الحياة المستخدمة في الدراسة

تركيز القرص µg/ml	الرمز	مضاد الحياة	تركيز القرص µg/ml	الرمز	مضاد الحياة
30	CEP	Cephalothin	30	AT	Aztreonam
10	Ipm	Imipenem	30	CEC	Cefaclor
100	Pi	Piperacillin	30	CTX	Cefotaxime
75	TIC	Ticarcillin	36	CAZ	Ceftazidime
10	MEM	Meropenem	30	CL	Cephalexin

جدول 6.3: مساحيق مضادات الحياة المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	مضاد الحياة
Julphar (U.A.E)	Cefotaxime
Julphar (U.A.E)	Ceftazidime
Kirklareli (Turkey)	Clavulanic acid

6.1.3. العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة :

أُستُخدمت في هذه الدراسة كل من العدد المختبرية المبينة في جدول 7.3 .

جدول 7.3 : العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	العدة
Korea/Geneaid	DNA- Extraction KIT
Korea	DNA Ladder 100bp
Korea /Bioneer	Pre Mix
Korea/Geneaid	Proteinase K
France/Biomeriex	Vitek 2 kit

### 2.3.2. طرائق العمل

#### 1.2.3. تحضير المحاليل والكواشف

حُضرت المحاليل والكواشف والصبغات المستخدمة في الدراسة ، وعقمت تلك التي تحتاج الى تعقيم باستخدام جهاز الموصدة (Autoclave) عند درجة حرارة 121 م° لمدة 15 دقيقة وبضغط (15 باوند/ إنج<sup>2</sup>) ، بينما عقمت بقية المواد الأخرى التي تتعرض للتلف بدرجات الحرارة المرتفعة مثل مضادات الحياة بالترشيح بمرشحات دقيقة Milliporefilter بقطر 0.22 مايكرومتر ، أمّا المواد الزجاجية فقد عُقمت بالفرن عند درجة حرارة 180م° لمدة ساعتين.

#### 1.1.2.3. محلول ثابت العكورة القياسي Macfarland Standard

حُضر المحلول وفق ما جاء في (Bauer et al.,1996) كما يلي:-

محلول (A): أُذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم المائي BaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O في 90 مل من الماء المقطر، وأُكمل الحجم الى 100 مل.

محلول (B): حُضِر بإضافة 1 مل من حامض الكبريتيك المركز ( $H_2SO_4$ ) الى 99 مليلتر من الماء المقطر المعقم ثم أُكْمِل الحجم إلى 100 مليلتر. أُضيف 0.5 مل من محلول (A) الى 99.5 مليلتر محلول (B) رُجَّ المحلول بقوة ووضع في أنابيب زجاجية معتمة محكمة الغطاء لمنع التبخر وحُفِظت في الظلام لحين الإستعمال . تمزج محتويات الأنبوبة جيداً قبل كل إستخدام .أستعمل هذا المحلول لإعطاء عدد تقريبي للخلايا الجرثومية (  $1.5 \times 10^8$  خلية / مليلتر).

### 2.1.2.3 محاليل مضادات الحياة Antibiotic Solutions

حُضرت محاليل خزينة (Stock solutions) بتركيز نهائي مقداره 10 ملغم/مليلتر حسب ما ورد في (CLSI,2012) لكل من مضادات الحياة Ceftazidime , و Cefotaxime و Clavulanic acid .

بإذابة 1 غم من المضاد في 90 مليلتر من الماء المقطر ثم أُكْمِل الحجم الى 100 مليلتر ، عُقمت هذه المحاليل بالترشيح بوساطة مرشحات دقيقة ذات ثقب بقطر 0.22 مايكرومتر وحُفِظت في الثلاجة لحين الإستخدام .

### 3.1.2.3 محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions

حُضرت محاليل الترحيل الكهربائي وحسب ما ورد في ( Russel and Sambrook,2001) وكما يأتي :

#### 1.3.1.2.3 محلول خزين بروميد الإثيديوم Ethidium Bromide Stock Solution

حُضِر بإذابة 0.05 غم من صبغة بروميد الإثيديوم في 9 مل من الماء المقطر ثم أُكْمِل الحجم إلى 10 مل بالماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 5 ملغم / مل .

#### 2.3.1.2.3 محلول (TBE10x) (Tris- Boric acid – EDTA)

يتكون المحلول من 0.089 مولار من Tris-base ، و 0.089 مولار من حامض البوريك و 0.002 مولار من  $Na_2$ -EDTA في 800 ملي لتر من الماء المقطر ، وعُدل الأس الهيدروجيني إلى 8 وأُكْمِل الحجم إلى 1000 ملي لتر ، وعُقم بالموصدة ، وحفظ في 4 م° لحين الإستعمال.

#### 3.3.1.2.3 محلول EDTA (Ethylen diamine tetra acetic acid)

حُضِرَ هذا المحلول بإضافة 18.6 غم من مادة الـ EDTA الى 100 مليلتر من الماء المقطر المعقم، وضبط الـ pH الهيدروجيني الى 8 بإستعمال هيدروكسيد الصوديوم NaOH ، وعقم بالمؤصدة ( Bhalerao *et al.*,2010).

### 2.2.3 الكواشف المستخدمة في تشخيص الجرثومة:

#### 1.2.2.3 كاشف إنزيم الكاتاليز Catalase Reagent

حُضِرَ من خلط 1 مل من بيروكسيد الهيدروجين المركز (30%) مع 9 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 3% بيروكسيد الهيدروجين، وحفظ في الثلاجة في عبوة داكنة ، إستعمل للكشف عن قابلية العزلات الجرثومية قيد الدراسة على إنتاج إنزيم الكاتاليز ( Collee *et al.*, 1996).

#### 2.2.2.3 كاشف احمر المثيل Methyl red test

حُضِرَ كاشف احمر المثيل بإذابة 0.1 غرام من صبغة أحمر المثيل في 300 مليلتر من كحول اثيلي تركيزه 95% وأكمل الحجم إلى 500 مليلتر بإستخدام الماء المقطر ، وقد إستعمل للكشف عن قدرة الجرثومة على التحلل الكلي لسكر الكلوكوز (Harly & Prescott, 2002).

#### 3.2.2.3 كاشف فوكس بروسكاور Voges-Proskauer reagent

أُستخدِمَ الكاشف للكشف عن التحلل الجزئي للسكريات ، وحُضِرَ من جزئين :  
A- كاشف ألفا - نفتول  $\alpha$ - naphthol : أُذِيبَ 6 غرام من المادة  $\alpha$ - naphthol في 90 مليلتر كحول اثيلي 95% ومزج جيداً، ثم أُكْمِلَ الحجم إلى 100 مليلتر .  
B- كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم . حُضِرَ بإذابة 16 غرام من المادة في 100 مليلتر الماء المقطر، حُفِظَت الكواشف في درجة حرارة 4 م° لحين الإستخدام (Brown,2005).

#### 4.2.2.3 كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent

حُضِرَ الكاشف انياً عند الإستخدام و ذلك بإذابة 0.1 غرام من مادة N-N-N-N- Tetra methyl para phenylene diamine dihydro chloride في 10 مليلتر من الماء المقطر في

قنينة غامقة ومعتمة ، إستعمل للكشف عن قابلية الجراثيم على إنتاج أنزيم الاوكسيديز ( Brown ، 2005 ) .

### 4.3.4. الأوساط الزرعية Culture Media

حُضرت الأوساط الزرعية المبينة في الجدول 3.3 وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوات وضبط الأس الهيدروجيني الى 7 ثمَّ عقت بالموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 م° وضغط (15 باوند/ انج<sup>2</sup>) لمدة 15 دقيقة ، ومن ثمَّ حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها بعدها حفظت في الثلجة عند حرارة 4 م° لحين الإستعمال.

### 1.4.3.1. وسط الدم الصلب الأساس Blood agar base media

حضر وسط الدم الصلب حسب التعليمات المذكورة على العبوة وعقت بالموصدة، بعدها تُركت لتبرد بدرجة حرارة 45-50 م° ثمَّ أُضيف اليه صنف الدم AB بنسبة 5% ، ومُزج جيداً بعدها صُبَّ الوسط في أطباق معقمة ، وتُرك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، حفظ بدرجة 4 م° لحين الإستعمال ، أُستخدم للعزل الأولي للجراثيم المنتجة للهيموليسين Hemolysin الحال لكريات الدم الحمراء .

### 2.4.3.2. وسط ماء البيبتون Pepton water

حُضر بإذابة 10 غرام من البيبتون و 5 غرام من كلوريد الصوديوم في لتر من الماء المقطر المعقم ، عُم بالموصدة بعد ضبط الأس الهيدروجيني الى 7.4 ، أُستخدم هذا الوسط في الكشف عن إنتاج الأندول (Koneman et al.,1992).

### 3.4.3.3. وسط حليب الفرز الصلب Skim milk Agar medium

حُضر بإذابة الوسط المغذي الصلب Nutrient agar في 87.5 مليلتر من الماء المقطر وعُم بالموصدة وبعد أن عُم وبُرد الى 50 م° ، أُضيف إليه 12.5 مليلتر من الحليب المعقم الخالي من الدسم بظروف معقمة ومزج جيداً ثمَّ صُبَّ في أطباق وحُفظ لحين الإستعمال ، أُستخدم هذا الوسط للكشف عن إنتاج إنزيم البروتينيز للعزلات الجرثومية قيد الدراسة (Cruickshant et al.,1975).

### 4.4.3.4. وسط الجيلاتين Gelatene media

أُستخدم وسط المرق المغذي Nutrient broth وأُضيف له 2% جيلاتين وعقم بالموصدة بدرجة 121 م° لمدة 15 دقيقة وضُبَّ في أنابيب إختبار وحُفظ في الثلجة لحين الإستعمال . (Atlas,1995)

### 5.4.3.5. وسط المثيل الاحمر - فوكس بروسكاور السائل MR-VP Broth



حُضِر بإذابة 0.5 غرام من البيبتون و 5 غرام من فوسفات البوتاسيوم في 100 مليلتر من الماء المقطر عقم بالموصدة بعد توزيعه في أنابيب إختبار بواقع 5 مليلتر للانبوبة ، بعد التبريد أُضيف إليه 10% من محلول سكر الكلوكوز المعقم بالترشيع بحيث أصبح التركيز النهائي للكلوكوز في الوسط 0.5% وأُستخدم في إختبار احمر المثل- فوكس بروسكاور (Harley and Prescott, 2002).

### 6.4.3. وسط الصويا الصلب (TSA) Trypticase Soy Agar

حُضِر هذا الوسط بإذابة 19 غرام من TSA في 500 مليلتر من الماء المقطر حسب تعليمات الشركة المصنعة، وأُضيفت إليه 1% من خلاصة الخميرة وُعقِمَ بالموصدة (القصاب والخفاجي 1992).

### 5.3. جمع العينات Collection of Samples

جُمعت 176 عينة من حالات مرضية مختلفة وتضمنت 11 عينة من مسحات الحروق ، و 16 عينة من مسحات الجروح و 112 عينة من مسحات الأذن ، بإستعمال Disposable Cotton Swabs و 37 عينة إدرار بإستعمال قناني بلاستيكية معقمة لجمع عينات الإدرار الوسطي ، تمَّ جمع العينات من مستشفى بعقوبة التعليمي والعيادة الإستشارية للفترة من شهر ايلول سنة 2015 ولغاية كانون الثاني سنة 2016 . سجلت المعلومات المتعلقة بالمرضى فيما لو كان راقداً في المستشفى او مراجع والعمر والجنس ومصدر العينة وكما في الاستمارة المبينة في الملحق 1 ، زُرعت النماذج مباشرة بعد أخذ العينة لغرض التشخيص.

### 6.3. زرع العينات Samples culture

زُرعت العينات ( مسحات الحروق ، ومسحات الجروح ، ومسحات الأذن، عينات الإدرار) مباشرة بعد الجمع على وسط الدم الصلب ووسط ماكونكي ، وتم تنقية العزلات على وسط *Pseudomonas agar* وحُضِنَتْ كافة الأطباق هوائياً بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ، أُجري بعدها عدد من الفحوصات التشخيصية المظهرية والكيموحيوية والجزئية للجراثيم المعنية بالدراسة.

### 7.3. حفظ وإدامة العزلات الجرثومية

حُفظت العزلات الجرثومية بعد تشخيصها على أوساط زرعية مائلة Slant من الوسط المغذي الصلب في درجة 4 م° وأُستمرت عملية الإدامة بشكل دوري شهرياً . وأُستخدم مرق نقيع القلب والدماغ Brain heart infusion broth المضاف إليه كليسيول بنسبة 15% لحفظ العزلات مدة طويلة ، وتمَّ حفظها في درجة 20- م° لحين الإستعمال (Fugelsang and Edwards,2007) .

### 8.3. تشخيص العزلات الجرثومية

#### 1.8.3. الفحوصات المظهرية

شُخصت العزلات الجرثومية إعتماًداً على ما ورد في (Baron *et al.*,2007) , إذ شُخصت المستعمرات مبدئياً إعتماًداً على قدرتها على النمو على وسط السيدوموناس الاساس الصلب *Pseudomonas base agar* , وكذلك زُرعت على وسط الماكونكي MacConky ووسط الدم الصلب Blood agar لتشخيص صفاتها الزرعية التي تضمنت شكل المستعمرات، ولونها.

### 2.8.3. الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

#### 1.2.8.3. إختبار إنزيم الكتاليز Catalase test

نُقل جزء من المزروع الجرثومي الى شريحة زجاجية نظيفة بواسطة عيدان خشبية وأضيف اليها بضع قطرات من كاشف بيروكسيد الهيدروجين ( $H_2O_2$ ) , ويعد ظهور فقاعات غاز الاوكسجين دليل على إيجابية الفحص (Tadesse and Alem,2006).

#### 2.2.8.3. إختبار إنزيم الاوكسيديز Oxidase test

أجري فحص الأوكسيديز وذلك بنقل إحدى المستعمرات النامية على وسط الماكونكي الى ورقة ترشيح ثم وضع 2-3 قطرات من كاشف الاوكسيديز المحضر انياً فوق المستعمرة ومزجها مع المستعمرة بواسطة عيدان خشبية معقمة , إنَّ ظهور اللون البنفسجي خلال 20-30 ثانية يدل على إيجابية الإختبار (Tadesse and Alem,2006).

#### 3.2.8.3. إختبار الأندول Indole test

أُستخدم للكشف عن وجود الاندول , الذي يعد أحد نواتج أيض الحامض الاميني التريبتوفان نتيجةً لامتلاك الجرثومة لإنزيم التريبتوفانيز Tryptophanase , إذ لُقح وسط ماء البيبتون السائل بمزروع العزلة قيد الدراسة , حُضن الوسط بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة , ثم أُضيف 5 قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's reagent على السطح الداخلي لأنبوبة الإختبار, تعد النتيجة موجبة عند ظهور حلقة حمراء اعلى الوسط (Koneman *et al.*,1992).

#### 4.2.8.3. إختبار إستهلاك السترات Citrate Utilization test

زُرعت العزلات على مائل وسط سايمون- ستريت ، حضن بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة ،  
تعدُّ النتيجة موجبة عند تحول لون الوسط من الاخضر الى الازرق لإستهلاك السترات.

### 5.2.8.3 فحص المثيل الاحمر Methyl – Red test

أُفحت الأنابيب الحاوية على وسط (MR-VP) بمستعمرات مفردة منمأة على وسط مانكوكي  
وحُضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة , تضاف 5 قطرات من كاشف المثيل الأحمر الى كل  
انبوبة ورجت بهدوء, يعد ظهور اللون الاحمر الغامق دلالة على النتيجة الموجبة .

### 6.2.8.3 إختبار فوكس بروسكاور Voges-Proskauer test

أُفحت الأنابيب الحاوية على وسط MR-VP بمستعمرات مفردة منمأة على وسط مانكوكي و  
حضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24-48 ساعة ، وبعد إنتهاء مدة الحضانة أُضيف 6 قطرات من  
كاشف (A) الفا نفثول وقطرتين من كاشف (B) هيدروكسيد البوتاسيوم ومزج الخليط جيداً ، دلّ  
ظهور اللون الوردي مباشرة او بعد ترك الانابيب لمدة 20 دقيقة على إيجابية الإختبار .

### 3.8.3.3 التشخيص بجهاز VITEK 2 Compact

أُستعمل جهاز VITEK 2 المُجهز من قبل شركة Bio Merieux لعمل الإختبارات الكيموحيوية  
للعزلات الجرثومية , إذ يتضمن هذا الجهاز 48 إختبار من الإختبارات الكيموحيوية التي تُستعمل  
في تشخيص الجراثيم بحيث تصل درجة دقة التشخيص بهذا الجهاز إلى 99% كذلك يمكن  
إجراء فحص الحساسية لمضادات الحياة بهذا الجهاز (Pincus, 2011) .

### 1.3.8.3 المواد المستعملة :

- VITEK 2 Cassete
- محلول ملحي فسلجي
- وسط الماكونكي الصلب
- قطعة بلاستيكية من مادة Polystyrene لغرض حمل الانابيب
- VITEK 2 GN Card
- VITEK 2 DENSICHEK
- مزج
- مسحة معقمة
- VITEK 2 DENSICHEK Power Adapter .

### 2.3.8.3. طريقة العمل

#### • تحضير العالق الجرثومي Suspension Preparation :

1- زُرعت الجراثيم المراد فحصها على وسط الماكونكي الصلب بطريقة التخطيط , وحضنت الاطباق لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م°.

2- أُجري فحص ملون غرام للعينة لغرض إختيار بطاقة VITEK 2 المناسبة.

#### • تلقيح البطاقة: Inoculation of the card : تلقيح البطاقة حسب الخطوات التالية:

1. قيست عكورة المستعمرة بجهاز VITEK 2 DENSICHEK بحيث تكون العكورة 0.5 – 0.63 .

2. نُقل العالق والبطاقة الى حامل الجهاز Casste وتمّ وضعهما في الأماكن المخصصة لهما, ثمّ تمّ ربط البطاقة والعالق بواسطة الأنبوب الناقل , وأُدخل رمز البطاقة بواسطة الماسح الضوئي.

3. يوضع الحامل في حُجرة خاصة مفرغة من الهواء Vacuum chamber, إذ إنّ عملية تفرغ الهواء تعمل على نقل المايكروبات الى البطاقة بواسطة الأنبوب الناقل فضلاً عن توزيعها في الحفر الموجودة فيها.

• ختم البطاقة وحضنها Card Sealing and Incubation: يُقطع الأنبوب الناقل اليأ من قبل الجهاز خلال مدة (15) دقيقة ويتمّ ختم البطاقة أي إحكام إغلاق منفذ الانبوب الناقل لمنع أي تسرب, ثمّ تنتقل الى الحاضنة incubator , وتحضن البطاقات بدرجة (1.0±35.5) درجة مئوية , إذ تستوعب الحاضنة (30-60) بطاقة).

• نظام التشخيص البصري Optical System : يعمل نظام التشخيص البصري في الجهاز على تسقيط عدد من الحزم الضوئية تجاه البطاقة للتعرف على الأطوال الموجية للتفاعلات وترجمتها من خلال التغيرات اللونية والعكورة فضلاً عن النواتج الايضية.

#### • نتائج الإختبار وتقنيات التحليل Test Reaction results & Analytical Techniques

يعمل الجهاز على حساب النتائج ومقارنتها بالنتائج المخزونة بالجهاز والتي تضم العديد من قياسات الإختبارات كما في الملحق (2) , ولعدد كبير من السلالات النامية في ظروف مختلفة والمعزولة من أماكن متنوعة, يظهر الجهاز نتائج الإختبارات بشكل +, -, , (+) , (-) وتشير النتيجة بين الاقواس أنّ الإختبار ضعيف.

• **تحديد مستوى تشخيص الجراثيم Identification Level** : يتم تحديد مستوى تشخيص الجراثيم من خلال خارطة إختبارات وتقران بالصفات التصنيفية للجهاز فيعطى للكائن نسبة إحصائية ومستوى الثقة, فمثلاً إذا كانت نسبة الإحصائية (96-99%) فهي عند مستوى الثقة ممتاز (Pincus,2011).

### 9.3.الكشف عن عوامل الضراوة في جراثيم الزوائف الزنجارية **Detection of Virulance** **Factors of Pseudomonas aeruginosa**

#### 1.9.3. الكشف عن إنتاج الهيموليسين **Detection of Haemolysin Production**

تمّ الكشف عن قابلية العزلات الجرثومية قيد الدراسة على إنتاج الهيموليسين الجرثومي بزرع هذه العزلات على وسط الدم الصلب ، حُضنت الاطباق بعد التلقيح في درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة . وشوهدت مناطق التحلل متمثلة بمناطق شفافة تحيط بمستعمرات الجراثيم المنتجة للهيموليسين . (Kayser et al.,2005).

#### 2.9.3.الكشف عن إنتاج إنزيم البروتيز **Detection of Protease production**

لُقح وسط Skimmed milk agar بالمستعمرات الجرثومية ، إذ تمّ عمل حفر دائرية منتظمة وحقن العالق الجرثومي المحضر في الفقرة 3.4.3 في هذه الحفر، وحُضنت الاطباق بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة ، وإنّ ظهور هالة شفافة حول الحفر دليل على إيجابية الإختبار (Benson,2002) .

#### 3.9.3.الكشف عن إنتاج إنزيم الجيلاتينيز **Detection of Gelatinase production**

لُقحت 3-4 مستعمرات للعزلات النامية في الانابيب الحاوية على الوسط المحضر في الفقرة (4.4.3) ، تمّ حُضنت الأنابيب بدرجة 37 م° لمدة 24-48 ساعة وبعد الحضان وضعت الأنابيب في الثلاجة أو في حمام مائي لمدة 30-60 دقيقة . إنّ ملاحظة السيولة في كل أنبوب دليل على الكشف الموجب أي إنتاج الجراثيم لإنزيم الجيلاتينيز (Atlas et al,1995).

#### 10.3.فحص الحساسية لمضادات الحياة **Antibiotic susceptibility test**

أجري إختبار حساسية الجراثيم لمضادات الحياة المذكورة في جدول(5.3) بالإعتماد على طريقة Kerby- Bauer method على وسط مولر-هنتون الصلب بحسب ماورد في (CLSI,2014) وكالاتي :

1. حُضر عالق جرثومي من العزلات الجرثومية قيد الدراسة بنقل مستعمرة مفردة بعمر 24 ساعة نمائة على وسط الماكونكي الصلب الى 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسلجي ثم قورنت عكورة العالق مع عكورة محلول ثابت العكرة القياسي الذي يُعطي عدداً تقريبياً للخلايا مقداره  $1.5 \times 10^8$  خلية / مليلتر .

2. بوساطة مسحة قطنية معقمة نشر مقدار 0.1 مليلتر من العالق الجرثومي الى سطح أطباق حاوية على وسط مولر-هنتون الصلب , ثم تُركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.
3. نُقلت أقراص مضادات الحياة Antibiotic disk بملقط معقم الى الأطباق بواقع 5-6 أقراص للطبق الواحد , حُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 18-24 ساعة .
4. فُرئت النتائج بملاحظة مناطق التثبيط المتكونة حول أقراص مضادات الحياة وأُعتبرت الجراثيم حساسة , او متوسطة , او مقاومة حسب المواصفات القياسية الواردة في (CLSI,2014,NCCLS,2002).

### 11.3 قياس التركيز المثبط الأدنى Minimal - Inhibitory Concentration

حُدد التركيز المثبط الأدنى (MIC) لكل العزلات الجرثومية وفقاً للمعايير القياسية ل(CLSI,2014)

1. حُضرت تراكيز متسلسلة متضاعفة تراوحت بين 4-8-16-32-64-128-256-512-1024 مايكروغرام/ مل لمضادات Cefotaxime , Ceftazidime بإضافة نسب مختلفة من هذه المضادات من محاليلها الخزينة المحضرة في الفقرة (2.1.2.3) الى وسط مولر- هنتون المعقم والمبرد الى 45 م° .
2. حُضر العالق الجرثومي لكل عزلة جرثومية وتمت مقارنة عكوره مع عكورة المحلول القياسي Mc Farland .
3. سُحب 5 مايكرو لتر من التخفيف أعلاه بوساطة ماصة دقيقة , ولقحت بطريقة التقطير Spotted على شكل قطرة واحدة على أوساط المضادات .
4. كُررت العملية للمزارع كافة بالتسلسل مكررين للتركيز الواحد, وتركت الاطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لحين جفاف القطرات قبل قلب الاطباق , حُضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .
5. حُسب التركيز المثبط الأدنى بأنه أقل تركيز يمنع ظهور النمو الجرثومي بعد حضانة 24-18 ساعة بدرجة حرارة 37 م°.
6. تمّ مقارنة النتائج مع نقطة التوقف Break point ويمثل أقل تركيز يمكن أن يصله المضاد في المصل ليعطي أعلى فعالية وبعده يصبح مقاوماً (CLSI,2012b).

### 12.3. إختبار الكشف المظهري عن مضخات الدفق Efflex Pumps

أُختبرت العزلات قيد الدراسة إذ أُجري هذا الإختبار بإستخدام طريقة عجلة العربية EtBr-agar Cart Wheel Method بحسب ما جاء في (Martins *et al.* , 2011) وكما يأتي:

1. أُضيفت أحجام مختلفة من صبغة بروميد الاثيديوم تتراوح بين 10،20،25،100،200،250 مايكرو لتر الى وسط Trypticase Soy Agar (TSA) المعقم والمبرد الى 45 م°.
2. حُضرت العوالق الجرثومية المنماة على وسط نقيع القلب والدماغ بعمر 24 ساعة بإستعمال محلول الملح الفسلجي المعقم وقورنت عكورته مع محلول ثابت العكورة القياسي Macfarland.
3. سُحب 5 مايكرو لتر من العالق أعلاه بوساطة ماصة دقيقة ، ولُقحت به على وسط الصويا الصلب TSA المحضر في الفقرة (6.5.3) المحتوي على صبغة برميد الإثيديوم وتُركت الأطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لحين جفاف القطرات قبل قلب الأطباق ، حُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .

4. فُحصت الأطباق بإستعمال مصدر الاشعة فوق البنفسجية U.V. light لملاحظة شدة التألُّق، فالمستعمرات الجرثومية التي تعطي تألُّقاً في التراكيز القليلة من الصبغة تمتلك مضخات دفع أعلى كفاءة مقارنة بالمستعمرات التي تتألُّق بالتراكيز العالية من الصبغة.

### 13.3 الكشف عن تكوين الأغشية الحيوية Detection of biofilm formation by *P.aeruginosa* (Almeida *et al.*,2013)

أُستخدمت طريقة صفيحة المعايرة الدقيقة Micro Titer Plate (MTP) وكالاتي:

1. تمّ تنمية العزلات الجرثومية قيد الدراسة على المرق المغذي Nutrient broth لمدة 24-18 ساعة عند درجة حرارة 37 م° تحت الظروف الهوائية.
2. نقلت 2-4 من المستعمرات الجرثومية الى وسط Nutrient broth ، ثمّ مقارنة عكورته مع عكورة المحلول القياسي Mc Farland .
3. بواسطة ماصة دقيقة Micro pipette نقل 150 مايكرو لتر من العالق الجرثومي لكل العزلات الى حفر صفيحة مسطحة مصنوعة من مادة Polystyrene مكونة من 96 حفرة ، عمل لكل عزلة جرثومية ثلاث مكررات ، كما أُضيف من المرق المغذي Nutrient broth إلى عدة حفر وتُركت بدون تلقيح جرثومي وأُعتبرت حفر سيطرة سالبة ، ثمّ تمّ تغطية الصفيحة وحضنت في الحاضنة Incubator لمدة 24 ساعة .

4. بعد الحضانة أُزيل غطاء الصفيحة وأُفرغ الحفر من المزارع السائلة برفق، ثم أُزيلت الخلايا غير الملتصقة بغسل الحفر 2-3 مرات بالماء المقطر .
  5. تُبنت الخلايا الملتصقة بجدران الحفر بإضافة 200 مايكرو لتر من كحول الميثيل Methanol لمدة 10 دقائق .
  6. صُبغت الأغشية الحيوية بإضافة 200 مايكرو لتر من صبغة Crystal Violet بتركيز 0.5% لكل حفرة لمدة 15 دقيقة.
  7. بعد إنتهاء تفاعل التصبغ , أُزيلت الصبغة الزائدة بالغسل بالماء المقطر 2-3 مرات .
  8. أُضيف 200 مايكرو لتر من 95% من الكحول الأيثلي Ethanol لكل حفرة ولمدة 10 دقائق وذلك لغرض إزالة الصبغة الملتصقة في الخلايا (Tang et al., 2011).
  9. حُسبت الإمتصاصية لجميع الحفر بواسطة جهاز قارئ الاليزا عند طول موجي 630 نانومتر وذلك حسب ماجاء في (Tang et al., 2011) , إذ تمت مقارنة مقدار الإمتصاصية للحفر المزروعة مع مقدار الإمتصاصية مع حفر السيطرة وكما يلي :
- $2 * A_c \leq A$  (اغشية حيوية قوية),  $A_c \leq A \leq 2 * A_c$  (اغشية حيوية متوسطة),  $A \leq A_c$  (غير مكونة للاغشية الحيوية) , إذ إنّ A تمثل الحفر المزروعة و  $A_c$  تمثل حفر السيطرة .

### 14.3. الكشف عن إنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف - Extended Spectrum $\beta$ -Lactamase (ES $\beta$ Ls)

تمّ إستخدام طريقة الأقراص المدمجة Combined disk Test (CDT) للكشف عن إنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف وذلك بحسب ما جاء في (CLSI, 2011) , وهي من الطرائق السهلة والدقيقة , إذ تصل دقة النتائج فيها من 96% الى 100% , كذلك يمكن قراءة النتائج بشكل مباشر (Thirapanmethee, 2012) وكالاتي :-

1. حُضر عالق جرثومي من العزلات الجرثومية المراد إجراء الإختبار لها بنقل مستعمرة مفردة بعمر 24 ساعة منماة على وسط المرق المغذي الصلب الى 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسلجي ثم فُورنت عكورة العالق مع عكورة محلول ثابت العكرة القياسي الذي يعطي عدداً تقريبياً للخلايا مقداره  $1.5 \times 10^8$  خلية / مليلتر .
2. نُشر مقدار 0.1 مليلتر من العالق الجرثومي بواسطة مسحة قطنية معقمة الى سطح أطباق حاوية على وسط مولر-هنتون الصلب ثم تُركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق .



3. وُضِعَ قرصين من مضاد الحياة Ceftazidime (30µg) في وسط الطبق الزرعي المُلَقَّح على أن تكون المسافة بينهما 3 سم .

4. وضع 5 مايكرو لتر من المحلول الخزين لمضاد Clavulanic acid المُحضَّر في الفقرة (2.1.2.3) الى واحد من أقراص الـ Ceftazidime .

5. حُضِنَت الأطباق عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 18-24 ساعة .

6. بعد ملاحظة مناطق التثبيط فإن حدوث زيادة منطقة التثبيط على 5 ملليمتر حول قرص مضاد Ceftazidime مع Clavulanic acid مقارنة مع قرص Ceftazidime لوحده تعدّ النتيجة موجبة وإنّ الجراثيم تُعدّ منتجة لإنزيم ESβLs .

### 15.3. الكشف عن قابلية الجرثومة على إنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز المعدنية –Metallo β lactamase MβL باستخدام طريقة إتحاد المضاد مع EDTA Combined EDTA disk test (CEDT)

1. حُضِرَ عالق جرثومي من العزلات الجرثومية المراد إجراء الإختبار لها بنقل مستعمرة مفردة بعمر 24 ساعة منماة على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب الى 5 مليلتر من المحلول الملحي الفسلجي ثمّ قورنت عكورة العالق مع عكورة محلول ثابت العكورة القياسي الذي يعطي عدد تقريبي للخلايا مقداره  $5 \times 10^8$  خلية / مليلتر . كما في طريقة (CLSI, 2011).

2. نُشِرَ مقدار 0.1 مليلتر من العالق الجرثومي بوساطة مسحة قطنية معقمة الى سطح اطباق حاوية على وسط مولر-هنتون الصلب ثمّ تُركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق .

3. وضع قرصين من مضاد الحياة Imipenem (10µg) في وسط الطبق الزرعي المُلَقَّح على أن تكون المسافة بينهما 20 mm .

4. تمّ وضع 5 مايكرو لتر من محلول EDTA المُحضَّر في الفقرة (7.1.2.3) الى أحد قرصي مضاد Imipenem .

5. حُضِنَت الأطباق عند درجة حرارة 37 م° لمدة 18-24 ساعة .

6. بعد ملاحظة مناطق التثبيط فإنّ زيادة منطقة التثبيط على 7 ملليمتر حول قرص الـ Imipenem مع EDTA مقارنة مع قرص Imipenem لوحده تعدّ نتيجة موجبة وأنّ

الجراثيم تعدّ منتجة لإنزيم MβL (Bhalerao et al., 2010; Bashir et al., 2011; Anoar et al., 2014a).

### 16.3. إستخلاص الحامض النووي DNA لجراثيم الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* DNA extraction

إستخلص DNA الجراثيم حسب الطريقة الموصوفة من الشركة المصنعة لعدة الإستخلاص و كما التالي:

1. نقل 1 مليلتر من مزرع العزلات الجرثومية المنماة بعمر 24 ساعة على وسط Brian heart infusion broth الى أنابيب أبندروف (1.5 مل) ورسبت الخلايا الجرثومية بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة وبسرعة 14000-16000 دورة /دقيقة وسحب العالق بواسطة ماصة وترك الراسب .
2. أُضيف 180 مايكرو لتر من دارىء GT ومزجت المحتويات جيداً بواسطة المازج لمدة 5 ثوان .
3. أُضيف لمحتويات الأنبوبة 20 مايكرو لتر من Proteinase K ثم حُضنت الأنابيب في حمام مائي هزاز بدرجة حرارة 60 م° لمدة 10 دقائق مع التأكد من تحريك المحتويات كل 3 دقائق.
4. أُضيف 200 مايكرو لتر من دارىء GB ومزجت المحتويات جيداً بواسطة المازج لمدة 10 ثواني .حُضنت الأنابيب بدرجة 70م° لمدة 10 دقائق بحمام مائي وتُرج الأنابيب ثلاث مرات في أثناء فترة الحضانة ( كل 3 دقائق ) إلى أن يصبح المحلول رائق.
5. أُضيف 200 مايكرو لتر أيثانول مطلق 99% Absolute ethanol ثم خلط المزيج بقوة.
6. تمّ وضع عامود GD في أنبوبة الجمع Collection tube سعة 2 مل ونقل له جميع الخليط .
7. طُردت الأنابيب مركزياً لمدة دقيقتين بسرعة 14000-16000 دورة /دقيقة بعدها نُقلت المحتويات الى أنبوبة جمع جديدة ( أهملت أنابيب الجمع وتنقل الفلاتر الى أنابيب جديدة ).
8. أُضيفت 400 مايكرو ليلتر من دارىء W1 الى عمود GD.
9. طُردت الأنابيب مركزياً بسرعة 16000 دورة /دقيقة لمدة 30 ثانية ثمّ وضع عمود GD في أنبوبة الجمع.( تُهمل أنابيب الجمع وتنقل الى أنابيب جديدة ).
10. أُضيف 600 مايكرو لتر من دارىء Wash buffer الى عمود GD (بعد إرجاعه الى أنابيب الجمع) .
11. أُجري الطرد المركزي 16000 دورة / دقيقة لمدة 30 ثانية .
12. أُعيد الطرد المركزي لمدة ثلاث دقائق بسرعة 16000 دورة / دقيقة لتجفيف العمود.
13. نُقل العمود GD الى أنبوبة ابندروف نظيفة 1.5 مل .

14. أُضيف 100 مايكولتر من داريء Elution المسخن مسبقاً ( يضاف لمركز الانبوية ) ويُترك 5 دقائق للإذابة , ثمَّ طُرِدَت الأنايب مركزياً لمدة 30 ثانية بسرعة 16000 دورة / دقيقة .

15. يحفظ بعد ذلك في درجة حرارة -20 م.

### 17.3. تقدير تركيز DNA ونقاوته Estimation DNA Concentration and Purity

تمَّ قياس تركيز الحامض النووي DNA وذلك بإضافة 1 مايكولتر من DNA المستخلص إلى جهاز القطرة النانوية Nanodrop Spectrophotometer لتقدير تركيز الحامض النووي DNA (النانوغرام/مايكولتر ng/μl), وقدَّرت النقاوة من خلال الإمتصاصية (OD) عند الطولين الموجيين 260 / 280 نانومتر, لتحديد في ما إذا كانت العينة ملوثة بالبروتينات او بالحامض النووي الريبوسومي RNA , وإنَّ الإمتصاصية المقبولة على 260/280 لتركيز الحامض النووي DNA النقي تكون 1.8-2 نانومتر (Russel and Sambrook,2001).

### 18.3. تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)

تمَّ إجراء التشخيص الجزيئي للعزلات الجرثومية الداخلة في الدراسة من خلال الكشف عن الجين 16s rDNA باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وتمَّ الكشف عن الجينات *bla*<sub>CTX-M-1</sub> و *bla*<sub>CTX-M-3</sub> في العزلات المقاومة لمضادات مجموعة ال-β-Lactam وابتاع الخطوات الآتية :

#### 1.18.3. تحضير مزيج سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة PCR Master mixture preparation

حُضِرَ مزيج ال-PCR حسب ما جاء في تعليمات الشركة المصنعة Bioneer / Korea وبالخطوات الآتية :

1. حُضِرَت البودئ النوعية المُستهدفة لجينات *bla*<sub>CTX-M-1</sub> و *bla*<sub>CTX-M-3</sub> و 16s rDNA لجرثومة الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* بإستعمال ماء مزال الايونات ddH<sub>2</sub>O للحصول على تركيز 100 بيكومول 1 مايكولتر وفقاً لما ذُكر في (Ghane and Azmi, 2014; Tavajjohi et al., 2011), وكما موضح في جدول 10.3 , وتمَّ تحضير محلول كل بادئ وبشكل منفصل , وذلك بأخذ 10 مايكولتر من المحلول الخزين لكل بادئ وإضافته إلى 90 مايكولتر من ddH<sub>2</sub>O ومُزج جيداً للحصول على تركيز نهائي 1pg/μl وحُفِظَ المتبقي من البودئ في الثلاجة لحين الإستعمال في حين حُفِظَت المحاليل الخزينة

للبودائ في درجة 20- مع مُراعاة مزج المحلول بعد إخراجِه من الثلاجة بإستعمال المازج لمُجانسته قبل الإِستعمال .

2. أُذيب PCR PreMix بتعريضه لدرجة حرارة الغرفة ، ثمَّ وضعه في جهاز المازج الميكانيكي لكي تتجمع المكونات في قعر الأنبوب.

3. أُعدَّ مزيج التفاعل وكما موضح في الجدول 10.3 بإضافة الحجم والتركيز المطلوبة من البودائ و الحامض النووي DNA القالب بإستخدام المعادلة  $C1V1 = C2V2$  .

جدول 9.3: تتابعات البودائ النوعية لجينات  $bla_{CTX-M-3}$  و  $bla_{CTX-M-1}$  لجراثيم الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* وحجم الناتج لكل بادئ

المصدر	حجم الناتج bp	عدد القواعد bp	تتابع البادئ 5'—3'	البادئ	ت
Tavajjohi et al.,2011	605	20	F/5-GCGATGTGCAGCACCAGTAA -3	$bla_{CTX-M-1}$	1
		20	R/ 5-GGTTGAGGCTGGGTGAAGTA -3		
	873	18	F /5-GGTTAAAAAATCACTGCG -3	$bla_{CTX-M-3}$	2
		17	R/ 5-TTACAAACCGTCGGTGA- 3		
Ghani and Azimi	375	16	F/5-CAACGAGCGCAACCCT -3	16s rDNA	3
		19	R/5-GGTTACCTTGTTACGACTT-3		
		20	R/5-AATTTGGGCTTAGGGCAGAA-3		

F = Forward / R = Revers

جدول 10.3: المكونات اللازمة للتفاعل التضاعفي لكل من الجينات  $bla_{CTX-M-3}$  و  $bla_{CTX-M-1}$  و 16s rDNA

الحجم المضاف لخليط التفاعل والتركيز النهائي للبودائ والدنا القالب	المكونات	ت
5µl	PCR PreMix	1
2µl -1 pg/ µl	البادئ الأمامي	2

2µl - 1 pg/µl	البادئ الخلفي	3
5µl - 0.45 ng/µl	DNA قالب	4
6µl	ddH <sub>2</sub> O	5
20µl	الحجم النهائي	

4. تمّ مزج مكونات المزيج في جهاز المازج الميكانيكي لمدة 5 ثوان

### 2.18.3. برمجة جهاز PCR The cycling reactions program

تمّ إجراء خطوات التضاعف للكشف عن الجينات *bla*<sub>CTX-M-3</sub> و *bla*<sub>CTX-M-1</sub> و 16s rDNA بحسب ما جاء في (Gniadkowski *et al.*,1998; Lalzmapuia & Dutta,2013) ثمّ تمت برمجة جهاز PCR كما موضح في الجدول 11.3.

#### جدول 11.3: برمجة جهاز P.C.R

Gene	Initial denaturation	No of cycle	Denaturation	Annealing	Extension	Final Extension
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	7min. at 94c	30	30s at 94c	30s at 57c	30s at 72c	5min. at72c
<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub>	3min. at 95c	30	30s at 95c	30s at 55c	30s at 72c	3min.at 72c
16s rDNA	5min. at 95c	30	45s at 95c	40s at 56c	45s at 72c	3min. at72c

\* نُقل بعد ذلك 10 مايكرو لتر من ناتج التضاعف لغرض إجراء الترحيل الكهربائي .

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

### 19.3. الترحيل الكهربائي في الهلام Gel Electrophoresis

حُضِر هلام الأكاروز بتركيز 1% باذابة 1 غم من الأكاروز في 100 مل من محلول 10 x TBE بعد تخفيفه 10 مرات للحصول على 1x TBE، سُخِن الأكاروز إلى درجة الغليان وتُرك ليبرد إلى درجة حرارة 45م° ، ثم أُضيفت إليه صبغة بروميد الإثديوم بتركيز نهائي 0.5 مايكروغرام 1 مل بإستعمال المحلول الخزين المحضّر لهذه الصبغة بعدها مُزج الأكاروز جيدا . تم إعداد صفيحة لإسناد الأكاروز Tray بإحاطة حافاتها بشريط لاصق وبشكل جيد ، ثم ثُبت المشط Comb لتكوين الحفر Wells المُعدة لتحميل العينات ثم صُب الأكاروز بشكل هاديء ومستمر لتجنب حدوث فقاعات هوائية ، بعدها تُرك الهلام ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، رُفِع المشط بهدوء ونُزِع الشريط اللاصق . بعدها نُقل

الهلام مع القالب إلى حوض الترحيل الحاوي على حجم مناسب يغطي الهلام من 1x TBE ثم حُمِل 10 مايكرو لتر من العينات المُعدة للترحيل بإستعمال ماصة دقيقة Micropipette . بعدها تم إجراء عملية الترحيل الكهربائي بفرق جهد مقداره 75 فولت أسم لمدة ساعة و 30 دقيقة حتى وصول العينات إلى ما قبل نهاية الهلام ، بعد الإنتهاء من عملية الترحيل نُقِل القالب لفحص الهلام بتعريضه إلى مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator عند طول موجي 320 نانومتر (Russell and Sambrook,2001).

### 20.3. التحليل الإحصائي : Statistical analysis

أُجري التحليل الإحصائي بإستخدام برنامج الحزمة الإحصائية للعلوم الإجتماعية (Statistical package for social sciences) ذي الإصدار رقم 22 فيما يتعلق بالمتغيرات ذات الصيغة الوصفية فقد تم وصفها بصيغة العدد والنسبة المئوية وتمت المقارنة بين البيانات الوصفية بإستخدام إختبار Chi-Square كما تم استخدام t-test للمقارنة بين البيانات العددية وأُعتبرت كل قيمة  $P$  value أقل من 0.05  $<$  معنوية إحصائياً (Levesque,2007) .

## الفصل الرابع: النتائج والمناقشة

### 4 النتائج والمناقشة Results and Discussion

#### 1.4. عزل وتوصيف الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* Isolation and Identification of

##### 1.1.4. العزل Isolation

تمَّ عزل 20 عزلة جرثومية (11.36%) من مجموع 176 عينة جمعت من مصادر سريرية مختلفة (مسحات الاذن و الجروح والحروق وعينات الادرار) ، جمعت المسحات و العينات من مستشفى بعقوبة

التعليمي والعيادة الاستشارية ابتداءً من شهر ايلول لسنة 2015 وحتى شهر كانون الثاني لسنة 2016 , من مرضى راقدين وغير راقدين في المستشفى ومن كلا الجنسين ومن مختلف الاعمار .

يُظهر الجدول رقم 1.4 النسب المئوية للعينات السريرية الداخلة في هذه الدراسة وعلاقتها بالمرضى الراقدين وغير الراقدين واجناسهم واعمارهم , وبشكل عام كانت نسبة النماذج المرضية المجموعة من المرضى غير الراقدين اعلى من تلك المجموعة من المرضى الراقدين , اذ بلغت نسبة العينات من المرضى غير الراقدين 85.23% ونسبة العينات من المرضى الراقدين 14.77%. فيما يتعلق بنسب النماذج المرضية وتوزيعها حسب الجنس فقد كانت اعلى لدى الذكور اذ بلغ عدد العينات 115 عينة مقارنة بالاناث اذ بلغ عدد العينات المجموعة 61 عينة وبفارق احصائي معنوي ( $P=0.004$ ,  $65.34\%$  Vs  $34.66\%$ ). وكانت مسحات الاذن هي الاعلى بين كل من الذكور والاناث اذ بلغ عددها 112 عينة تليها نماذج الادرار اذ كان عدد النماذج المجموعة 37 نموذج , ثم تليها عينات الجروح اذ بلغ عددها 16 عينة واقلها عينات الحروق , اذ بلغ عدد العينات 11 من الاناث والذكور على حد سواء.

جدول 1.4: النسب المئوية لتوزيع العينات السريرية حسب المرضى الراقدين وغير الراقدين , وحسب اجناسهم .

نوع العينة	المرضى الراقدين (%)	المرضى غير الراقدين (%)	عدد الذكور (%)	عدد الاناث (%)
الادرار	0	37(100)	26(70.27)	11(29.73)
الاذن	0	112(100)	69(61.60)	43(38.40)
الجروح	15(93.75)	1(6.25)	12(75)	4(25)
الحروق	11(100)	0	8(72.73)	3(27.27)
المجموع (%)	26(14.77)	150(85.23)	115(65.34)	61(34.66)
<b>P value</b>	0.001(S)		0.004	
<b>Chi-square</b>	87.361		16.588	

#### 2.1.4. التشخيص الجرثومي Bacterial Identification

##### 1.2.1.4. الصفات المظهرية Colonies Morphology :

اظهرت العزلات قيد الدراسة عند تنميتها على وسط الماكونكي الصلب مستعمرات كبيرة , محدبة ذات حافات غير منتظمة , بعضها اظهرت لزوجة , وذات رائحة مميزة وكانت غير مخمرة لسكر اللاكتوز في حين ظهرت على وسط الدم الصلب بشكل مستعمرات رمادية اللون محللة للدم بشكل كامل . كذلك

أظهرت قابليتها على النمو في درجة حرارة 42 م بعد تنميتها على الوسط المغذي الصلب Nutrient agar ، إذ إن قابلية النمو بدرجة حرارة 42 م تعد صفة تميز النوع *P.aeruginosa* عن بقية أنواع *Pseudomonas* (Carroll et al.,2016). ولتأكيد التشخيص تمت تنمية العزلات على وسط السيدوموناس الأساس الصلب *Pseudomonas base agar* وهو وسط انتقائي Selective وكانت النتيجة ظهور مستعمرات ذات لون أخضر براق و ذات رائحة مميزة دليل على أن العزلات المشخصة كانت تعود إلى جراثيم الزائفة الزنجارية.

#### 2.2.1.4 الفحوصات الكيموحيوية: Biochemical Tests

نلاحظ في الجدول رقم (2.4) نتائج الفحوصات الكيموحيوية لجراثيم الزائفة الزنجارية والتي أجريت بالاعتماد على (Macfaddin,2000) ، إذ أعطت جميع العزلات الداخلة في الدراسة والبالغ عددها 20 عزلة نتائج موجبة لكل من فحص الأوكسيداز والكتاليز واختبار استهلاك الستريت Citrate (test Utilization) ، في حين أعطت نتائج سالبة مع فحص فوكس بروسكاور Voges-Proskauer (VP) وأحمر الميثيل (MR) methyl red وفحص إنتاج الاندول Indole.

#### جدول 2.4: الفحوصات الكيموحيوية لعزلات جرثومة *P. aerogenosa*

Biochemical tests						عزلات <i>P.aeruginosa</i>
Citrate	VP	MR	Indol	Catalase	Oxidase	
+	-	-	-	+	+	

+ = الاختبار موجب - = الاختبار سالب

#### 3.2.1.4 الفحوصات الكيموحيوية باستخدام جهاز VITEK 2 Compact GN

أجري الفحص التأكيدي للعزلات الجرثومية باستخدام جهاز ViTEK2 Compact GN من شركة Biomeriux الفرنسية والموجود في مستشفى البتول التعليمي الذي يعطي نتائج تشخيصية بحيث تصل نسبة دقة التشخيص بهذا الجهاز إلى 99% (Pincus ,2011) .



جدول 3.4: نتائج الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص عزلات الزائفة الزنجارية في جهاز

VITEK2

نوع الأختبار	النتيجة	نوع الأختبار	النتيجة	نوع الأختبار	النتيجة
APPA	-	SAC	-	BXYL	-
ADO	-	Dtag	-	BAlap	+
PyrA	-	Dtre	-	ProA	+
IARL	-	CIT	+	LIP	+
Dcel	-	MNT	+	PLE	-
BGAL	-	5KG	-	TyrA	+
H2S	-	ILATK	+	URE	+
BNAG	-	AGLU	-	CMT	+
AGLTp	-	SUCT	+	BGUR	-
Dglu	+	NAGA	-	O129	+
GGT	+	AGAL	-	GGAA	-
OFF	-	PHOS	-	IMLTa	+
BGLU	-	GiyA	-	ELLM	-
Dmal	-	ODC	-	ILATa	+
Dman	-	LDC	-	Dsor	-
Dmne	+	IHISa	-		

+ الاختبار موجب - الاختبار سالب

وبعد التشخيص تم التأكد من ان جميع العزلات الجرثومية الداخلة في الدراسة تابعة للنوع

*P.aeruginosa* , وحسب الفحوصات الكيموحيوية المبينة في الجدول رقم 3.4, ملحق رقم 2.

#### 3.2.1.4. التشخيص الجزيئي باستخدام الجين 16s rDNA : Molecular Identification by 16s rDNA gene

بينت نتائج الكشف عن وجود الجين 16s rDNA في العزلات الداخلة في الدراسة وكانت جميعها

حاملة للجين (100%) , اذ بينت نتائج تفاعل البلمرة التسلسلي لجين 16s rDNA انه يمتلك حجم 375

زوج قاعدي عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder ذي الحزم المعروفة الأحجام الجزيئية والمجهز من قبل شركة Bioneer \ Korea لوحظ ان أحجام الحزم مماثلة للحجم المتوقع وذلك عند مقارنته مع النتائج التي توصل اليها (Azimi and Ghani,2014) كما في الشكل (1.4) .



شكل 1.4: الترحيل الكهربائي لجين 16s rDNA في عزلات جراثيم الزائفة الزنجارية بإستعمال هلام الاكاروز بتركيز 1% الحاوي على 0.5µg/ml من صبغة Ethidium bromide وبإستعمال DNA Ladder (2000 bp-100bp) وبفرق جهد 75 فولت/سم لمدة ساعة وثلاثون دقيقة.

وبالاعتماد على الصفات المظهرية والزربية والاختبارات الكيموحيوية و التشخيص الجزيئي بإستخدام الجين 16s rDNA, ووفقاً لما ورد في Macfaddin,2000; Forbes *et al.*,2007; Ghani (and) Azimi, 2014; Carroll *et al.*,2016 , اظهرت النتائج ان جميع العزلات المشخصة تابعة لنوع *P. aeruginosa* .

بلغت النسبة الكلية لعزلات الزائفة الزنجارية 11.36% من جميع النماذج المرضية , اذ بلغت نسبة عزل جراثيم الزائفة الزنجارية من الذكور 55% ومن الاناث 45%.

تعد نسبة العزلات التي حصلنا عليها في الدراسة الحالية مقارنة لما توصل اليه الباحث Wang وزملاؤه عام 2014 , اذ قام بعزل الزائفة الزنجارية من العديد من العينات السريرية بنسبة 23.7% (Wang *et al.*,2014), واقل من النسبة الناتجة من دراسة الباحثة Al-Niaame وزملاؤها عام 2013 التي اجريت في العراق , اذ كانت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المعزولة من العينات المرضية 35.29% (Al-Niaame) *et al.*,2013 , ربما يعود ذلك لعدة اسباب منها عدد انواع العينات المرضية الداخلة في الدراسة واختلاف التقنيات المختبرية المستخدمة في العزل والتشخيص الجرثومي.

تشابهت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج Shiny وزملاؤه اذ بلغت نسب عزل الزائفة الزنجارية من الذكور 57.75% ومن الاناث 42.25% (Shiny et al.,2016). كما توافقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة اجريت في ماليزيا من قبل الباحثين Raja و Singh عام 2007, اذ كانت نسبة الذكور المصابين بجراثيم الزائفة الزنجارية 61.58 , اما الاناث فكانت بنسبة 38.42% (Raja & Singh,2007) . قد تكون هذه النتيجة موحدة في جميع الدراسات المماثلة التي اجريت في مناطق مختلفة من العالم ( Fatima et al.,2016; Ahmadi et al.,2012) , اذ ان سبب اصابة الذكور بجراثيم الزائفة الزنجارية بشكل اعلى من الاناث هو بحكم مهن الذكور والتي غالبا ما تعرضهم لاصابات مختلفة منها الجروح والحروق , فضلا عن تعرضهم للتلوث بهذه الجراثيم نظرا لقضائهم اوقاتا اطول خارج المنزل , وربما السباحة بمياه البرك او الانهار الملوثة والتي قد تؤدي الى التهاب الاذن , اذ اظهرت الدراسة الحالية ان اعلى نسبة عزل لجراثيم الزائفة الزنجارية كان من مسحات الاذن.

يظهر نظام VITEK 2 Compact تشخيص مرض لعصيات الجراثيم السالبة لملون غرام , كما لوحظ في الدراسة الحالية , اذ اظهرت نتائج التشخيص بواسطة نظام VITEK 2 ان 100% من العزلات المشخصة تابعة لنوع الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* . بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المشخصة بواسطة جهاز Vitek 2 GN في دراسة الباحثة العراقية Jaafar واخرون عام 2014 90.7% (Jaafar et al.,2014) , وبلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المشخصة بواسطة جهاز Vitek 2 في دراسة Lester واخرون عام 2009 90.1% (Lester et al.,2009).

تُعد طريقة التشخيص في جهاز VITEK 2 سريعة واقل جهد من الاختبارات الكيموحيوية الشائعة (Alhasan,2012).

توافقت نتائج التشخيص الجزيئي باستخدام الجين 16s rDNA مع نتائج دراسة Abdullah وMahdi عام 2016 , اذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية الحاملة للجين 16s rDNA 100% (Abdullah and Mahdi,2016). خالفت نتائج هذه الدراسة نتائج دراسة Ghane وAzimi عام 2014 بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية الحاملة للجين 16s rDNA 25% (Azimi and Ghani,2014). كما تشابهت هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث Hossein واخرون عام 2012 , اذ كانت جميع عزلات الزائفة الزنجارية حاملة للجين 16s rDNA (Hussein et al.,2012). كما توافقت مع دراسة الباحثة Jaafar في دراسة اجريت في العراق وكانت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية الحاملة للجين 16s rDNA بحجم 952 زوج قاعدي 100% (Jaafar et al.,2014).

تعد طريقة تشخيص جرثومة الزائفة الزنجارية بأستعمال الجين 16s rDNA , من الطرق السريعة والمفيدة والاكثر دقة والموثوق بها لتشخيص الزائفة الزنجارية , وهذا الجين يعد من الجينات المهمة , اذ من خلاله يمكن تحديد العامل الوراثي للجرثومة والتي يمكن تمييز الجين الخاص بجرثومة *P.aeruginosa* عن الانواع الاخرى من الجرثومة *Pseudomonas spp.* وذلك بالاعتماد على 16S الرايبوسومي للحامض النووي DNA (Abdullah and Mahdi,2016).

#### 3.1.4. توزيع العزلات حسب موضع الاصابة :

#### Distribution of isolates according to source of infection

يبين الجدول رقم 4.4 عدد العزلات ونسبها حسب موضع الاصابة , اذ بلغ عدد العزلات التي حصلنا عليها من الاذن 13 عزلة جرثومية من مجموع 112 مسحة وبنسبة 11.60%, بينما كانت العزلات التي حصلنا عليها من الادرار 4 عزلات من مجموع 37 نموذج وبنسبة 10.81% , اما عزلات الحروق فقد بلغ عددها 2 من مجموع 11 مسحة وبنسبة 18.18%, وكانت العزلات التي حصلنا عليها من الجروح الاقل من بين العزلات السريرية , اذ بلغ عددها عذلة واحدة من مجموع 16 مسحة وبنسبة 6.25% , وكان هناك فارق احصائي معنوي عالي جدا بين مصادر العزل ( $P=0.0001$ ).

جدول 4.4 : عدد العزلات ونسبها حسب مواضع الاصابة

نوع العينة	عدد العينات	عدد العزلات	النسبة المئوية
الادرار	37	4	10.81%
الاذن	112	13	11.60%
الجروح	16	1	6.25%
الحروق	11	2	18.18%

11.36%	20	176	المجموع
0.0001[S]			P value

توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة الباحثة السعدي في دراستها التي اجرتها في بعقوبة عام 2011 , اذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المعزولة من مسحات الحروق 14.6% (السعدي, 2011). وتعد نسبة قليلة مقابل مع ما توصل اليه الباحثين Zayed و Alharbi عام 2014 , اذ اشارا في دراستهما الى ان نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المعزولة من مرضى الحروق شكلت 36.14% (Alharbi & Zayed, 2014) , وتعد نسبة اعلى بكثير من النسبة التي حصلت عليه الباحثة الطائي سنة 2012 , اذ كانت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المعزولة من مرضى الحروق 2.5% (الطائي, 2012).

يعود سبب ارتفاع نسبة العزل من عينات الحروق في الدراسة الحالية الى تلف الخلايا الجلدية عند تعرضها للاصابة بالحرق, بالاضافة الى المساحة الكبيرة الناتجة عن هذه الاصابة , يؤمن لجرثومة الزائفة الزنجارية البيئة الملائمة لإستعمار هذه الانسجة وتشكيل الاغشية الحيوية على كامل مساحة السطح المصاب , وبالتالي إزدياد فترة الاصابة بهذا النوع الجرثومي وصعوبة علاجه بمضادات الحياة , كما تلعب الاقامة في المستشفيات وخصوصاً الطويلة منها دوراً كبيراً في الاصابة بهذه الجراثيم (Morrays, 2007; Nichols *et al.*, 2013), فضلاً عن تلوث ردهات الحروق بهذه الجراثيم وغرف الحمامات وغيرها اذ تعتبر البيئة الرطبة عامل مهم في نمو وتكاثر الزوائف الزنجارية (Song *et al.*, 2001) , إضافة الى كون جراثيم الزوائف الزنجارية معروفة بكونها مقاومة للمضادات المايكروبية , اضافة الى متطلبات الجرثومة الغذائية القليلة والدليل على ذلك قابليتها على النمو في الماء المقطر وتحملها للظروف الفيزيائية المختلفة , جميعها تساهم في نجاح انتشار هذه الجراثيم في البيئة ودورها الفعال ككائن انتهازى (Parsnjoth and Dheepa, 2010). جرت دراسات عديدة حول تلوث ردهات الحروق في العراق وفي محافظة ديالى بجراثيم الزائفة الزنجارية , اذ تعتبر هذه الجراثيم الخطر الاول على المرضى المصابين بالحروق , اذ احتلت جراثيم الزائفة الزنجارية المرتبة الاولى من بين الجراثيم التي قام بعزلها كل من (محسن واخرون , 2011, Ahmed *et al.*, 2014) من ردهات الحروق . على ما يبدو إن هذه الجرثومة لها ألفة عالية High affinity لاصابة الانسجة المحروقة , اذ ان الاوعية الدموية في البشرة

المصابة بحروق متوسطة وشديدة قد تعرضت للتلف او التحطم بالتالي فإن العوامل المناعية في الجسم مثل الخلايا التائية T cells لا يمكنها ان تصل الى المواقع المصابة (Church et al.,2006).

تتوافق نسبة العزلات التي حصلنا عليها من اخماج الاذن في الدراسة الحالية مع ما جاء به Abdullah وزملاؤه عام 2010 , اذ كانت نسبة العزل في دراستهم 12% من حالات اخماج الاذن الوسطى (Abdullah et al.,2010) . بينما لم تتوافق نسبة عزل جراثيم الزائفة الزنجارية مع دراسة (السعدي, 2011 ؛ النيسانى , 2011) , اذ حصلت السعدي على نسبة 25.3% وهي ايضاً بالدرجة الثانية بين نسب الاصابة للعينات السريرية المختلفة اما النيسانى فحصت على نسبة 38.7% .

تستطيع جرثومة الزائفة الزنجارية ان تصل الى القناة الاذنية عن طريق البلل بالماء الملوث بهذه الجراثيم وخصوصاً في بيئة المستشفى , اذ تعتبر معظم البيئات المائية غير المعقمة خزانات لجراثيم الزائفة الزنجارية الامر الذي ينتج عنه اصابة الاذن وخاصة خمج الاذن الوسطى . فضلاً عن ان هذه الجراثيم قادرة على تشكيل الاغشية الحيوية بداخل انابيب وصنابير الماء وتستطيع البقاء لفترة طويلة بكامل نشاطها الامر الذي يلعب دوراً في إنتقال جراثيم الزائفة الزنجارية مع الماء الى العينات السريرية التي يستخدم فيها الماء (Kenneth,2004;Rossolini and Mantengoli,2005). كما قد يلجأ بعض الناس للسباحة في الانهار والبحيرات والبرك المائية الملوثة وخاصة ايام الصيف القائض في ظل شحة مياه الإسالة للإستحمام وهذه تشكل مصدراً إضافياً لحدوث اخماج الاذن الوسطى بهذه الجراثيم. كما ان تمزق غشاء الطبلة في الاذن الوسطى نتيجة عصف المقذوفات الحربية والمتفجرات قد يلعب دوراً مهماً لإصابة الاذن بهذه الجراثيم, كما ان قلة التوعية الصحية في مجتمعنا حول الطريقة الصحيحة لتنظيف الاذن , فغالباً يتم تنظيف الاذن بأشياء صلبة او غير نظيفة مما يؤدي الى دخول هذه الجراثيم وإحداثها للأخماج (Song et al.,2016;Roser et al.,2014;Hasan and Al-Sahaf,1986).

توافقت نسبة العزلات التي جمعت من نماذج الإدرار في الدراسة الحالية مع دراسة بلال التي اجرتها عام 2010 للتحري عن انزيمات  $\beta$ -lactamase للعزلات السريرية للزوائف الزنجارية في محافظة النجف , اذ كانت نسبة العزل من عينات الادرار 9.9% , وكانت نسبة الدراسة الحالية اعلى من النسبة التي توصل اليها الباحثين Kareem و Kireççe عام 2014 في دراسة اجريت في العراق , اذ كانت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المعزولة من الادرار 5.66% (Kirççe and Kareem,2014).

تعد جرثومة الزائفة الزنجارية احدى المسببات المرضية الشائعة في خمج المجاري البولية لاسيما بعد التدخل الجراحي (Sleigh and Timbury,1998). تصل جراثيم الزائفة الزنجارية الى المجرى البولي من خلال عوامل محدودة كالقساطر البولية عند مرضى المجاري البولية , لاسيما إنَّ معظم هؤلاء المرضى هم من كبار السن او ممن يعانون من الكبت المناعي لأي سبب كان , اذ تتميز هذه الجراثيم بقدرتها على إستعمار أسطح القساطر البولية وتشكيل الاغشية الحيوية وبالتالي عند إجراء القسطرة تنتقل جراثيم الزائفة الزنجارية الى الجهاز البولي للمريض مسببة إصابات المجاري البولية ومقاومتها للعديد من المضادات الجرثومية من خلال تواجدها ضمن الغشاء الحيوي الكثيف (Thic biofilm) (Brook et al., 2014; Goering et al., 2008; Cole et al., 2014).

وكانت نسبة عزلات جراثيم الزائفة الزنجارية من الجروح في الدراسة الحالية مقارنة للنسبة التي حصلت عليها الباحثة العراقية Mohammed في دراستها عام 2014 , اذ كانت نسبة عزل الزائفة الزنجارية من الجروح %9.18 (Mohammed, 2014), واقل بكثير من النسبة التي حصل عليها الباحث Mitiku عام 2014 في دراسة اجريت في اثيوبيا , اذ كانت نسبة جراثيم الزائفة الزنجارية المعزولة من الجروح %47.5 (Mitiku et al.,2014). إنَّ التباين في نسب عزل جراثيم الزائفة الزنجارية من الجروح ربما يعود الى مدى إنتشار جراثيم الزائفة الزنجارية في بيئة الدراسة وكذلك طبيعة المرضى الداخليين في الدراسة , وطبيعة العلاج المتبع في تلك البلاد.

تعتبر الجروح منفذاً مهماً من منافذ دخول الجرثومة الى داخل الجسم لاسيما وإنَّ تلوث الجروح امر شائع في بيئتنا نظراً لقدرة هذه الجرثومة على العيش في التربة والمياه (Bhasin et al.,2015) , فضلاً عن إنَّ معظم المصابون بالجروح هو ناتج عن الانفجارات والعمليات العسكرية والتي غالباً ما يكون المصابين من المدنيين الذين يسعفون من قبل المواطنين وبسياراتهم الخاصة.

#### 2.4. إختبار حساسية جرثومة الزائفة الزنجارية لمضادات الحياة: Sensitivity Test of

##### *P.aeruginosa* to Antibiotics

أُستخدمت طريقة الاقراص Kirby – Bauer لجميع العزلات قيد الدراسة لعشرة مضادات حياة من مجموعة البييتالاكتام معظمها من الانواع الشائعة الاستخدام في القطر لعلاج الاخماج المختلفة لمعرفة نوع الاستجابة من خلال قياس قطر منطقة التثبيط حول قرص مضاد الحياة المستخدم و قورنت النتائج حسب ماورد في (CLSI,2014;NCCLS,2002) .

يبين الشكل رقم 2.4 نتائج الاختبار لمضادات الحياة المستخدمة في الدراسة ، اذ بلغت نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية لمضاد (CAZ) Cefotaxime 90% وعزلتين حساستين 10% وبفارق احصائي معنوي عالي جدا ( $P=0.001$ ) . تتوافق هذه النتيجة مع نتيجة الباحث Shaikh وزملاؤه في دراسة أُجريت في الهند عام 2015 ، اذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المقاومة لمضاد CAZ ، 91.49% (Shaikh et al.,2015) . كما تتفق مع دراسة الباحث Goudarzi في دراسة أُجريت في ايران عام 2014 ، اذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المقاومة لمضاد CAZ في دراسته 98.6% (Goudarzi et al.,2014). كما تشابهت مع دراسة الباحث (Mahmoud et al.,2013) في مصر ، اذ بلغت نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية لمضاد CAZ 91% .

بلغت نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية الداخلة في الدراسة لمضاد Cefotaxime (CTX) 25% ، وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد 70% ، و نسبة العزلات الحساسة للمضاد بلغت 5% وبفارق احصائي معنوي عالي جدا ( $P=0.001$ ). توافقت هذه النسبة مع دراسة Izundu و Brown عام 2004 ، اذ كانت نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية لمضاد CTX 25.5% (Izundu & Brown,2004) ، خالفت هذه النتائج نتائج الباحث Shaikh وزملاؤه عام 2015 ، اذ كانت نسبة مقاومة عزلات الزائفة للمضاد 91.49% (Shaikh et al.,2015).

اظهرت نتائج اختبار حساسية العزلات الداخلة في الدراسة لمضاد Cephalexin (CL) إنّ جميع العزلات كانت مقاومة للمضاد 100% ، وهذه النتائج متفقة مع ما توصلت اليه الباحثة السعدي عام 2011 و Abdullah وزملاؤه عام 2010، إذ كانت عزلاتهم مقاومة لهذا المضاد وبنسبة 100% (Abdullah et al.,2010 ؛ السعدي ، 2011).

بلغت نسبة مقاومة العزلات لمضاد Cephalothin (CEP) 100% ، وهذه النتائج متفقة مع ما توصلت اليه الباحثة الصفار عام 2010 (الصفار ، 2010) ، كما توافقت نسبة الدراسة مع ما توصل اليه Al-shaibani و Issa عام 2004 و Hashim عام 2005 ، إذ كانت عزلات الزائفة الزنجارية مقاومة لهذا المضاد وبنسبة 100% (Issa and Al-Shaibani,2004;Hashim ,2005).

بلغت نسبة العزلات المقاومة لمضاد Cefaclor (CEC) 15% ، وان نسبة العزلات متوسطة الحساسية للمضاد بلغت 30% ، اما العزلات الحساسة للمضاد فقد بلغت نسبتها 55% . خالفت هذه



النتائج ما جاء في دراسة Izundu و Brown عام 2004 , إذ كانت نسبة مقاومة عزلات *P.aeruginosa* 100% (Izundu& Brown,2004).

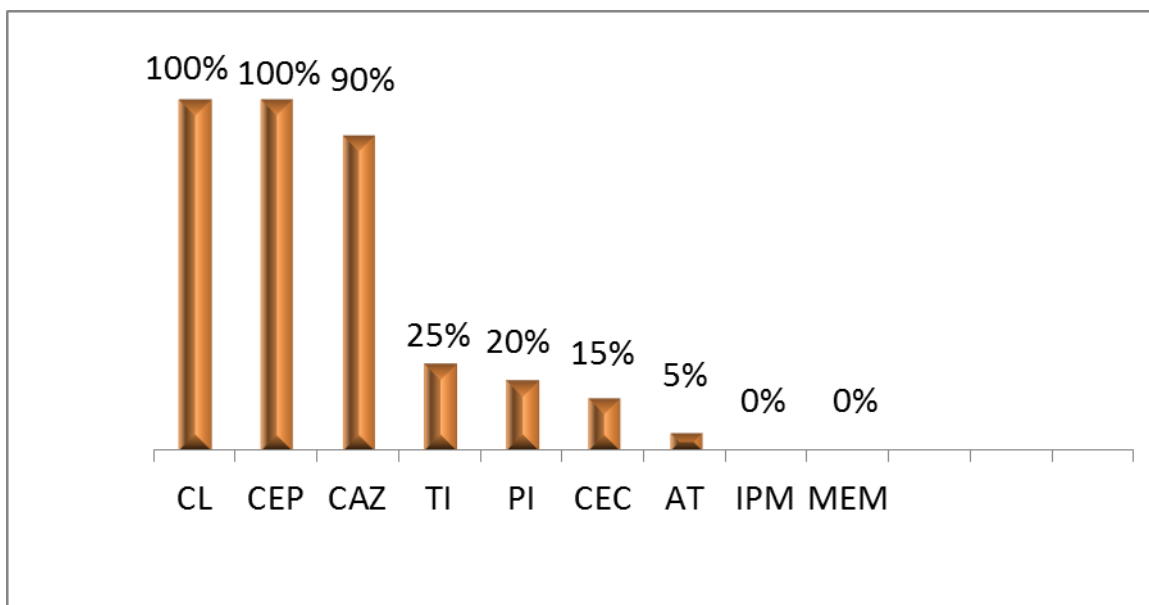
بينت نتائج إختبار الحساسية لمضاد Imipenem (IPM) عدم ظهور اي عزلة مقاومة لهذا المضاد . توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج الشويخ وآخرون عام 2009 , إذ كانت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المقاومة لمضاد IPM 0% (الشويخ وآخرون , 2009) , إتفقت هذه الدراسة مع دراسة Haenni وآخرون عام 2015, إذ بلغت نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية لمضاد IPM 0% (Haenni et al.,2015).

بينت نتائج إختبار الحساسية لمضاد Meropenem(MEM) عن عدم ظهور أي عزلة مقاومة للمضاد من العزلات الداخلة في الدراسة , وبلغت نسبة حساسية عزلات الزائفة الزنجارية لمضاد MEM 100% , توافقت هذه الدراسة مع دراسة Ansari وآخرون عام 2015 , إذ لم تظهر العزلات الداخلة في دراستها أي مقاومة لمضاد Meropenem . كما توافقت الدراسة الحالية مع دراسة Essawi وزملاؤه عام 2013 في فلسطين , إذ كانت نسبة حساسية عزلات الزائفة الزنجارية لمضاد MEM 89.9% (Essawi et al.,2013; Ansari et al.,2015) وبفارق احصائي معنوي عالي جدا ( $P=0.001$ ).

كانت نتائج اختبار حساسية العزلات لمضاد Aztreonam (AT) هي ظهور عزلة واحدة مقاومة للمضاد 5% , و 11 عزلة متوسطة الحساسية للمضاد 55% , و أظهرت 8 عزلات حساسيتها للمضاد وبنسبة 40% ولم يكن هناك فارق إحصائي معنوي ( $P=0.19$ ) . خالفت نتائج هذه الدراسة نتائج دراسة الباحث Almarjani وآخرون عام 2015 , إذ كانت نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية لمضاد Aztreonam 18.5% , وبلغت نسبة العزلات المقاومة للمضاد في دراسة Goli وآخرون عام 2016 60% (Almarjani et al.,2015; Goli et al.,2016).

بلغت نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية لمضاد Ticarcillin(TI) 25% . توافقت نتيجة هذه الدراسة مع دراسة Essawi وزملاؤه عام 2013 , إذ كانت نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية لمضاد TI 22.5% (Essawi et al.,2013) , وإنّ 45% من العزلات الداخلة في الدراسة الحالية كانت متوسطة الحساسية للمضاد و 30% من العزلات كانت حساسة لمضاد TI وبفارق احصائي معنوي ( $P=0.03$ ).

بلغت نسبة العزلات الداخلة في الدراسة المقاومة لمضاد Piperacillin (PI) 20% , وإن نسبة 60% من عزلات الدراسة الحالية كانت متوسطة الحساسية للمضاد , وأظهرت 20% من عزلات الدراسة الحالية حساسيتها لمضاد Piperacillin وبفارق احصائي معنوي ( $P=0.04$ ). توافقت هذه النسبة مع دراسة Ansari وآخرون عام 2015 , إذ كانت نسبة عزلات *P.aeruginosa* المقاومة لمضاد Piperacillin 16.1% (Ansari et al.,2015). كما تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه Abdullah وزملائه عام 2010 , إذ بلغت نسبة مقاومة هذا المضاد 24%.



شكل 2.4 : النسب المئوية للعزلات الجرثومية المقاومة لمضادات البيتا لكتام قيد الدراسة

CAZ=Ceftazidime, CTX=Cefotaxime, CL=Cephalexin, CEP=Cephalothin, CEC=Cefaclor, IPM=Imipenem, MEM=Meropenem, AT=Aztreonam, TI=Ticarcillin, PI=Piperacillin

نلاحظ في هذه الدراسة إرتفاع نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية تجاه مضادات السيفالوسبورينات والبنسلينات مثل مضاد Cefazidime و Cephalothin و Cefaclor و Cephalexin و Piperacillin و Ticarcillin , يعود ذلك الى قدرة الزائفة الزنجارية على إنتاج إنزيمات البيتا لكتاميز كإنزيمات البيتا لكتاميز واسعة الطيف ESβLs والتي تعمل على تحليل البنسلينات والسيفالوسبورينات بشكل خاص , والتي تكون جيناتها محمولة إما على الكروموسومات او على البلازميدات في العديد من أنواع الجراثيم والذي يؤدي إلى مقاومة متعددة لمضادات الحياة المختلفة , بالإضافة الى تعديل بنية البروتينات الرابطة للبنسلين PBPs والتي تُعد الهدف الأساس لمضادات البيتا لكتام (Ullah et

(Ocampo-Sosa et al.,2012;Abdullah and Mahdi,2016) , كما قد يعود سبب مقاومة الزائفة الزنجارية للعديد من أجيال مجموعة السيفالوسبورينات الى إنتاج الجرثومة لإنزيمات Cephalsporinase والتي تكون من أهم أنواع إنزيمات  $\beta$ -lacamase التي تشفر لها جينات محمولة على الكروموسوم إضافة الى أنواع أخرى من الإنزيمات منها PSE-1 , PSE-4 , CARB-3 , CARB- , CARB-4 التي وجدت في جراثيم الزوائف الزنجارية والتي تكون مسؤولة عن مقاومة مضادات Pencilins ومضادات Aztreonam , Carbapenems و مضادات الجيل الاول والثاني والثالث من Cephalsporins (Bonomo and Szabo,2006;Basak et al.,2009;Basak et al.,2012) , كما إنَّ الإستخدام الواسع والعشوائي لهذه المضادات من قبل المرضى (في عدة حالات) , قد يؤدي الى نشوء المقاومة وذلك لتوفرها وسهولة تعاطيها(عن طريق الفم) ورخص ثمنها , إذ إنَّ إرتفاع نسب مقاومة الجراثيم بصورة عامة لمضادات الحياة هي مشكلة من صنع الإنسان وهي عالمية الإنتشار ولكنها تتجلى بشكل واضح في بلدان العالم النامية مقارنة بالبلدان المتقدمة (Martinez et al.,2002) .

قد يعود سبب إرتفاع نسبة حساسية العزلات الداخلة في الدراسة لمضادات مجموعة الكاربابينيم مثل مضاد Meropenem و Imipenem الى عدم إنتاجها لإنزيمات البييتالاكتاميز المعدنية M $\beta$ LS , إذ بيّن الكشف المظهري لإنزيمات M $\beta$ LS عدم إنتاج أيّ من العزلات الداخلة في الدراسة لإنزيمات M $\beta$ LS , إذ تعمل إنزيمات البييتالاكتاميز المعدنية على تحليل مضادات هذه المجموعة (Bush and Jacoby,2010) .

### Multiple Antibiotic Resistance

### 3.4. المقاومة المتعددة لمضادات الحياة

أبدت جميع عزلات جراثيم الزائفة الزنجارية مقاومة متعددة لمضادات البييتالاكتام , تراوحت المقاومة من ثلاث الى سبع مضادات وحسب الجدول 5.4 , إذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية متعددة المقاومة والمقاومة لثلاثة مضادات حياة %55 . تشابهت هذه النتيجة مع دراسة Mahmoud عام 2013 , إذ كانت نسبة مقاومة عزلات الزائفة الزنجارية المقاومة لثلاث مضادات %52 (Mahmoud,2013) . خالفت هذه النسبة ما جاء في دراسة الباحث Goudarzi عام 2014 , إذ كانت نسبة العزلات المقاومة لثلاث مضادات حياة %12.3 (Goudarzi et al.,2014) .

بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية متعددة المقاومة والمقاومة لأربع مضادات حياة %25 . توافقت هذه النتيجة مع نتيجة دراسة الباحث Moniri وزملائه عام 2005 , إذ كانت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية

ذات المقاومة المتعددة لأربع مضادات 27.5% (Moniri *et al.*,2005). بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المقاومة لخمس مضادات حياة 10% . تقاربت هذه النتيجة مع نتيجة دراسة الباحث Goudarzi وزملاؤه عام 2014 , إذ كانت نسبة العزلات ذات المقاومة لخمس مضادات 17.8% (Goudarzi *et al.*,2014) . بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية ذات المقاومة المتعددة والمقاومة لست مضادات حياة . 5% شابته نتيجة هذه الدراسة نتيجة دراسة الباحث Lodise وزملاؤه عام 2007 , إذ أظهرت عزلات الزائفة الزنجارية في دراسته مقاومة متعددة لست مضادات حياة وبنسبة 4.9% (Lodise *et al.*,2007). بلغت نسبة المقاومة لسبعة مضادات 5% , وهي نسبة مقاربة للنسبة التي حصلت عليها الباحثة السعدي عام 2011 , إذ كانت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المقاومة لسبع مضادات حياة 2.6%(السعدي, 2011) . وكان هناك فرق إحصائي معنوي عالي جداً ( $P=0.001$ ) لعدد العزلات متعددة المقاومة لمضادات الحياة .

#### جدول 5.4: المقاومة المتعددة لمضادات الحياة التي أظهرتها العزلات قيد الدراسة

عدد المضادات التي قاومتها العزلات	عدد العزلات (%)	مصدر العزلة
7	1(5%)	مسحات الاذن
6	1(5%)	مسحات الاذن
5	2(10%)	مسحات الاذن وعينات الادرار
4	5(25%)	مسحات الاذن والجروح
3	11(55%)	مسحات الاذن والحروق وعينات الادرار
<b>P value</b>	0.001[S]	

إنَّ أحد الخصائص المقلقة للزائفة الزنجارية هي حساسيتها الواطئة لمضادات الحياة والتي تعزى الى المقاومة الطبيعية لمدى واسع من المضادات وقد تكتسب المقاومة بعد العلاج الغير ناجح , بالإضافة الى إمتلاكها إنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs والتي تؤمن مقاومة واسعة الطيف تجاه مضادات السيفالوسبورينات (الجيل الثالث) (Ceftazidime,Cefotaxime,Cetriaxone) , ومضادات مجموعة المونوباكتام (Aztreonam) , (Lee *et al.*,2005).

طورث جرثومة الزائفة الزنجارية المتعددة المقاومة لمضادات الحياة العديد من ميكانيكيات المقاومة مثل المقاومة بواسطة أنظمة الدفع , إنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز , الإنزيمات المحورة لمضادات مجموعة الإمينوكلايكوسيدات وتقليل نفاذية الغشاء الخارجية و تحويل الموقع الهدف لعمل المضاد والطفرات الكروموسومية (Allen *et al.*,2010;Bredenstien *et al.*,2011), وإنَّ أحد أسباب المقاومة المتعددة

لمضادات الحياة من قبل الزائفة الزنجارية هو إمتلاكها إنزيمات Cephalosporinase والتي يشفر لها جينات محمولة على الكروموسومات , وقد تكون هذه الجينات متنقلة عبر عناصر قافزة او عبر البلازميدات , وإن لهذه البلازميدات القدرة على نقل نسخ مطابقة لها الى الجراثيم الاخرى (Ramphal and Ambrose,2006; Al-Marjani *et al.*,2008).

#### 4.4. تحديد التركيز المثبط الأدنى: Determination of Minimal Inhibitory Concentration

أُخضعت جميع العزلات الداخلة في الدراسة لإختبار تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimal inhibitory concentration لمضادين هما Cefotaxime و Ceftazidime . وحُدِّدَ MIC بطريقة التراكيز المتسلسلة المتضاعفة في وسط مولر هنتون الصلب لإجراء هذا الإختبار، كون مكونات الوسط المستعمل تعد من العوامل المؤثرة على نتائج قيم MIC المحسوبة , لذلك يفضل استخدام وسط مولر هنتون الصلب لإحتوائه على كمية قليلة من كلوريد الصوديوم، ونسب قليلة من أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم (Stocks & Ridgway,1987) ، كذلك حُددت نتائج هذه العزلات كونها حساسة او مقاومة إعتماًداً على نقطة التوقف Break Point المثبتة في (CLSI,2014) كأساس لحساب الإستجابة وتعرف بإنها التركيز الامثل الذي يمكن أن يصله المضاد في المصل بحيث يوفر أعلى حد للمعالجة ، يعد الكائن مستجيباً Susceptible عندما تكون مقادير MIC المحسوبة أقل من نقطة التوقف.

أظهرت النتائج المبينة في جدول 6.4 الى إن قيم التراكيز المثبطة الدنيا لمضاد Cefotaxime تراوحت بين 8-512 مايكروغرام/مل، إذ بلغت نسبة العزلات المقاومة للمضاد 40% بالإعتماد على (NCCLS,2002) ، أما بالنسبة لمضاد Ceftazidime فقد تراوحت قيم MIC له 8-1024 مايكروغرام/مل ، إذ بلغت نسبة العزلات المقاومة للمضاد 15% بالإعتماد على (CLSI,2014) .

#### جدول 6.4 : قيم التركيز المثبط الأدنى لمضادات Cefotaxime , Ceftazidime

مضاد الحياة / نقطة التوقف (مايكروغرام / مل)			
ت	نوع العزلة	CTX ≥8	CAZ ≥8
1	Pu	512	1024
2	Pe	128	128
3	Pe	64	16
4	Pw	64	16
5	Pe	256	16
6	Pe	128	128
7	Pe	128	16

8	16	Pe	<b>8</b>
8	16	Pe	<b>9</b>
8	16	Pb	<b>10</b>
8	16	Pe	<b>11</b>
16	32	Pe	<b>12</b>
16	32	Pu	<b>13</b>
8	8	Pe	<b>14</b>
16	64	Pb	<b>15</b>
16	64	Pe	<b>16</b>
8	16	Pe	<b>17</b>
8	16	Pu	<b>18</b>
8	16	Pu	<b>19</b>
8	16	Pe	<b>20</b>
74.00	78.00	Mean	
226	119.61	SD	
0.16[NS]	0.009[S]	<b>P value</b>	

Pu = عزلات الادرار , Pe = عزلات الاذن , Pw = عزلات الجروح , Pb = عزلات الحروق

تقاربت نتائج هذه الدراسة مع ما توصلت اليه الباحثة السعدي عام 2011 , إذ تراوحت قيم MIC

لمضاد Ceftazidime 512-8 مايكروغرام/مل, و لمضاد Cefotaxime 1024-16 مايكروغرام/مل

(السعدي, 2011). كما قاربت دراسة (Abdullah,2010) , إذ تراوحت نسب MIC لمضاد

Cefotaxime 1024-8 مايكروغرام/مل. خالفت نتائج الدراسة الحالية نتائج دراسة Fathel عام 2013

, إذ تراوحت قيم MIC لمضاد CTX و CAZ 64-1 مايكروغرام/مل (Fadhel,2013) .

إنَّ سبب إختلاف قيم التركيز المثبط الأدنى MIC في هذه الدراسة عن الدراسات السابقة قد يكون كمية اللقاح الجرثومي المُستخدم او عدد نسخ البلازميد داخل الخلية الجرثومية , أدى الى نشوء المقاومة المتعددة لمضادات الحياة . كذلك قد يكون السبب هو إختلاف اليات المقاومة التي إستخدمتها العزلات الجرثومية مثل مضخات الدفع , طبيعة الغشاء الخارجي وإنتاج إنزيمات البيبتالاكتاميز (Cheng *et al.*,1998;Al khazali,2002) . كما قد يكون لمصدر العزلات الجرثومية المستخدمة في هذه الدراسة دور في إختلاف نتائج الدراسة الحالية عن الدراسات السابقة . إنَّ من مزايا هذه الطريقة هو الحصول على نتيجة كمية , وتبين الكمية الضرورية للمضاد اللازم لتثبيط نمو الأحياء المجهرية (Carroll *et al.*,2016).

#### 5.4. عوامل الضراوة للزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* Virulence Factors of

##### Hemolysin Production

##### 1.5.4. إنتاج الهيموليسين:

أُختبرت قابلية العزلات الداخلة في الدراسة عن إنتاجها للهيموليسين وذلك من خلال تتميتها على وسط الدم الصلب المضاف له 5% من الدم البشري , إذ أعطت جميع العزلات الداخلة في الدراسة نتائج موجبة للهيموليسين نوع بيتا  $\beta$ -hemolysin, إذ ظهر التحلل الكامل للدم على الوسط . توافقت هذه النتيجة مع النتيجة التي حصلت عليها الباحثة Al-Musawi عام 2014 (Al-Musawi,2014) . تقاربت نتيجة هذه الدراسة دراسة الباحث Shiny وزملاؤه عام 2016 , إذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة للهيموليسين 93.33% (Shiny et al.,2016). وانخفضت نتائج دراسة السعدي عام 2011, إذ كانت نسبة إنتاج عزلات الزائفة الزنجارية للهيموليسين 89.3% (السعدي,2011) .

#### 2.5.4. تكوين الأغشية الحيوية: Biofilm formation

أُستخدمت طريقة صفيحة المعايرة الدقيقة (MTP) Micro Titer Plate method في الكشف عن تكوين عزلات الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* للأغشية الحيوية , إذ أظهرت النتائج المبينة في الجدول 7.4 وبالإعتماد على دراسة (Tang et al.,2011) في الكشف عن تكوين الأغشية الحيوية , إنّ جميع العزلات الداخلة في الدراسة تمتلك خاصية تكوين الغشاء الحيوي, إذ تراوحت قيم الامتصاصية بين 0.073-0.22, وإنّ 25% من العزلات الداخلة في الدراسة تمتلك خاصية تكوين الأغشية الحيوية بشكل قوي ويقيم إمتصاصية تراوحت بين 0.098-0.22 , وإنّ نسبة 75% من العزلات كونت الأغشية الحيوية بشكل متوسط ويقيم إمتصاصية تراوحت بين 0.069-0.089.

#### جدول 7.4: قابلية تكوين الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* للأغشية الحيوية

مصدر العزلة	قيمة الإمتصاصية للحفر المزروعة A عند طول موجي = 630nm	مستوى إنتاج الأغشية الحيوية مقارنة بحفر السيطرة Ac
Pu	0.085	متوسط
Pe	0.085	متوسط
Pe	0.14	قوي
Pw	0.071	متوسط
Pe	0.080	متوسط
Pe	0.22	قوي
Pe	0.075	متوسط
Pe	0.079	متوسط
Pe	0.084	متوسط
Pb	0.13	قوي
Pe	0.081	متوسط
Pe	0.08	متوسط
Pu	0.073	متوسط
Pe	0.088	متوسط
Pb	0.089	متوسط

متوسط	0.084	Pe
قوي	0.098	Pu
متوسط	0.087	Pu
قوي	0.13	Pe
قوي =25% متوسط =75% P value=0.007[S]	Ac=0.049	

=Pu عزلات الادرار , =Pe عزلات الاذن , =Pw عزلات الجروح , =Pb عزلات الحروق

=A الحفر المزروعة

=AC حفر السيطرة

توافقت هذه النتيجة مع ما جاء في دراسة الباحثة العراقية Moteeb عام 2008 , إذ كانت جميع عزلات الزائفة الزنجارية مكونة للأغشية الحيوية (Moteeb *et al.*,2008), وتقاربت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الباحث Sanchez واخرون عام 2013, إذ تراوحت قيم الإمتصاصية 0.142-0.094 ( Sanchez *et al.*,2013). خالفت نتائج الدراسة الحالية نتائج الباحثة Al-Musawi عام 2014 , إذ كانت عزلات الزائفة الزنجارية المكونة للأغشية الحيوية وبشكل قوي %45 , بينما بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية التي كونت الأغشية الحيوية بشكل متوسط %48.3 , وكانت نسبة العزلات غير المكونة للأغشية الحيوية %6.6 (Al-Musawi,2014) . كما خالفت نتائج الدراسة الحالية نتائج Jakribettu واخرون عام 2013 , إذ بلغت نسبة العزلات المكونة للأغشية الحيوية بشكل قوي %54.5, والعزلات المكونة للأغشية الحيوية بشكل متوسط بلغت نسبتها %36.4 , بينما بلغت نسبة العزلات الغير مكونة للأغشية الحيوية %9.1 (Jakribettu *et al.*.,2013) .

قد يكون سبب إختلاف نتائج الدراسة الحالية عن الدراسات السابقة الى إختلاف مكونات الوسط كأستخدام وسط TSA او LB , تركيز المزرعة الجرثومية , او إختلاف فترة الحضان (24 ساعة) , اذ تزداد الكثافة الخلوية في الغشاء الحيوي كلما ازدادت فترة الحضان , كما لتركيز الصبغة المستخدمة دور في إختلاف النتائج , إذ إنَّ التركيز %0.5 يعطي نتائج أفضل بالمقارنة عند إستخدام الصبغة بتركيز %1 (Agarwal) (*et al.*,2011), او قد يكون سبب إختلاف النتائج هو إختلاف الصفيحة المستخدمة, إذ تعتبر الصفيحة المصنوعة من مادة Polystyrene أكثر كفاءة في إلتصاق الاغشية الحيوية مقارنة بالصفائح المصنوعة من مواد اخرى كالزجاج او الستيل او الكرانيت (Sinde and Carballo,2000;Djordjevic *et al.*,2002).



إنَّ قابلية العزلات السريرية على تكوين الأغشية الحيوية مرتبطة بقدرة هذه الأحياء على العيش في بيئات المستشفيات , الأدوات الطبية المستخدمة بالإضافة الى قابليتها على العيش في داخل الجروح (Donlan and Costerton, 2002; Smith *et al.*, 2012).

في مقارنة عزلات الزائفة الزنجارية الداخلة في الدراسة , المتعددة المقاومة لمضادات الحياة مع تكوينها للأغشية الحيوية , تبينَ إنَّ هناك علاقة بين نسبة العزلات الجرثومية المكونة للأغشية الحيوية والمقاومة المتعددة لمضادات الحياة , إذ أظهرت جميع العزلات المكونة للأغشية الحيوية , مقاومة متعددة لمضادات الحياة خاصة مضادات السيفالوسبورينات , إذ بلغت أعلى نسب المقاومة , وهذه النتيجة تتفق مع نتيجة دراسة Sanchez وآخرون عام 2013 , إذ أبدت عزلات الزائفة الزنجارية المكونة للأغشية الحيوية مقاومة متعددة لمضادات السيفالوسبورينات (Sanchez *et al.*, 2013).

قد تعود مقاومة مضادات الحياة في الجراثيم المكونة للأغشية الحيوية الى عدة اسباب منها تأخر إختراق العامل المضاد للجراثيم لقلب الغشاء الحيوي , و تغير معدل نمو الخلايا المكونة للأغشية الحيوية , و حدوث بعض التغيرات الفسلجية بسبب نمط نمو الغشاء الحيوي (Donlan and Costerton, 2002).

تُعتبر مقاومة المضادات المايكروبية خاصية متأصلة بالنسبة للجراثيم المكونة للأغشية الحيوية , كما بيّنت العديد من الدراسات إنَّ تكوين الأغشية الحيوية مُرتبط بشكل كبير مع المقاومة المتعددة لمضادات الحياة بسبب قرب الخلايا الجرثومية من بعضها , إذ يمنح هذا الإتصال الخلوي الجراثيم قابلية إنتقال البلازميدات الفعال من خلية الى أخرى (Rajamohan *et al.*, 2009; Sanchez *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2016).

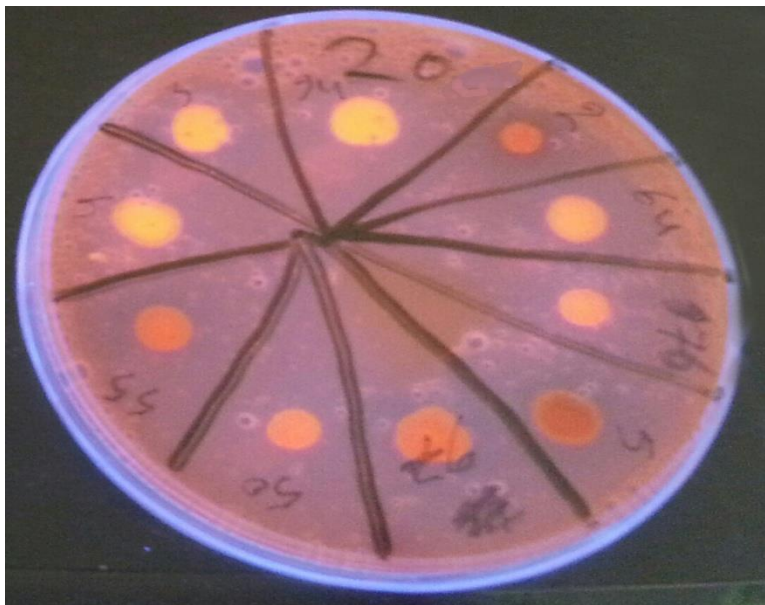
#### 3.5.4. مضخات الدفع : Efflux pumps

أُستخدمت طريقة عجلة العربة EtBr-agar Cart Wheel Method , إذ أُستخدمت صبغة Ethidium bromide للكشف عن مضخات الدفع المقاومة للعقاقير ولا تتجمع هذه الصبغة داخل الخلية الجرثومية (Patel *et al.*, 2010). أُختبرت العزلات الجرثومية الداخلة في الدراسة عن إمتلاكها لمضخات الدفع , إذ أُستخدم مصدر للأشعة فوق البنفسجية U.V. light للكشف المظهري عن مضخات الدفع , بلغت نسبة العزلات التي تمتلك مضخات دفع وبكفاءة عالية 85% , وإنَّ نسبة 10% من العزلات كانت

تمتلك مضخات الدفع وبكفاءة متوسطة , في حين إنَّ 5% من العزلات لم تكن تمتلك مضخات دفع وكما مبين في الجدول 8.4 و الشكل 3.4.

**جدول 8.4 : النسب المئوية لجراثيم الزائفة الزنجارية المنتجة والغير منتجة لمضخات الدفع Efflux pumps**

كفاءة مضخات الدفع	عدد العزلات المنتجة لمضخات الدفع (%)
High efflux pumps كفاءة عالية	17 (85%)
Intermediate efflux pumps كفاءة متوسطة	2 (10%)
Low efflux pumps لا تمتلك مضخات دفع	1 (5%)
<b>P value = 0.001[S]</b>	



**شكل 3.4: الكشف المظهري عن مضخات الدفع في جراثيم الزائفة الزنجارية بعد التنمية على وسط TSA الحاوي على صبغة Ethidium bromide بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة**

إنَّ نسبة العزلات الجرثومية التي تمتلك مضخات دفع بكفاءة عالية قريبة من نتائج دراسة ALMarjani في بغداد عام 2015 في الكشف عن مضخات الدفع في عزلات الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* , إذ بلغت النسبة 76.6% (ALMarjani et al.,2015). خالفت نتائج الدراسة الحالية دراسة Suresh وآخرون عام 2016 , إذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة لمضخات الدفع بكفاءة عالية 47.82% , وبلغت نسبة العزلات غير المنتجة لمضخات الدفع 52.17% (Suresh et al.,2016). قد يكون تفسير إختلاف نتائج الدراسة الحالية عن نتائج دراسة Suresh , إلى إختلاف عدد

العزلات الجرثومية التي أُجريت عليها الدراسة , حجم العالق الجرثومي , تراكيز الصبغة المُستخدمة , إضافة الى الطول الموجي المُستخدم في الكشف عن التعبير عن مضخات الدفع .  
يبيّن الجدول 9.4 وجود علاقة بين إنتاج العزلات الداخلة في الدراسة لمضخات الدفع والمقاومة المتعددة لمضادات الحياة , إذ كلما إرتفعت نسبة إنتاج العزلات الداخلة في الدراسة لمضخات الدفع كلما إرتفع عدد المضادات التي قاومتها العزلات .

**جدول 9.4 : العلاقة بين المقاومة المتعددة في عزلات الزائفة الزنجارية ونسب إنتاجها لمضخات الدفع**

عدد العزلات	عدد العزلات المنتجة منها لمضخات الدفع	نسبة العزلات المنتجة لمضخات الدفع في العزلات متعددة المقاومة	عدد المضادات التي قاومتها العزلات MDR
11	10	90%	3
5	5	100%	4
2	2	100%	5
1	1	100%	6
1	1	100%	7
<b>P value</b>	0.936[NS]		

تلعب أنظمة الدفع دوراً مهماً في تطور مقاومة الجراثيم السالبة لملون غرام للعقاقير ( Suresh *et al.*,2016), إذ تعمل أنظمة الدفع على دفع مضاد الحياة خارج الخلية الجرثومية , وبذلك تمكن الأحياء الدقيقة من تنظيم بيئتها الداخلية (Pearson *et al.*,1999; Kardy,2003) .

دراسات عديدة قد سلطت الضوء على مساهمة مضخات الدفع في المقاومة المتعددة لمضادات الحياة من قبل الجراثيم (Kosmidis *et al.*,2012; Sato *et al.*,2013) , إنّ التعبير الجيني عن مضخات الدفع المقاومة لمضادات الحياة يكون عالي التنظيم (Grkovic *et al.*,2001) , وتختلف الية عمل مضخات الدفع عن اليات المقاومة الجرثومية الأخرى (كإنتاج إنزيمات البيبتالاكتاميز) , إذ يكون العمل على أكثر من مجموعة من مضادات الحياة , أي مضخة دفع واحدة بإمكانها طرد مدى واسع من مضادات الحياة ومن مجاميع مختلفة (Vila and Martinez,2008; Olivares *et al.*,2013).

#### 4.4.4. إنتاج إنزيم البروتياز : Production of protease

أُختبرت قابلية جميع عزلات *P.aeruginosa* على إنتاج إنزيمات البروتياز باستخدام وسط حليب الفرز (Skimmed Milk) , إذ أعطت 15 عزلة (75%) نتائج موجبة مقابل 5 عزلات (25%) أعطت نتائج سالبة لإنتاجها للبروتياز وعليه أظهر التحليل الإحصائي وجود فارق احصائي معنوي عالي جداً بينهما ( $P = 0.007$ ) . تقاربت نسبة العزلات المنتجة للبروتياز في الدراسة الحالية ما جاء في دراسة (AI- Tikrity,2009) الذي أشار الى إنَّ 86.1% من عزلات الزوائف الزنجارية لها القابلية على إنتاج البروتياز القاعدي . خالفت نتائج هذه الدراسة نتائج الباحث Shiny وزملاؤه عام 2016 , إذ كانت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة للبروتياز 93.33% (Shiny et al.,2016) . خالفت نتائج الدراسة الحالية نتائج الباحث Saleem عام 2012 في دراسة أجراها في بعقوبة , إذ كانت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية للبروتياز 100% (Saleem,2012).

يبين الجدول رقم 10.4 وجود علاقة بين إنتاج عزلات الزائفة الزنجارية للبروتياز والمقاومة المتعددة لمضادات الحياة , إذ كلما زادت نسبة إنتاج العزلات الداخلة في الدراسة للبروتياز , إزدادت عدد مضادات الحياة التي قاومتها العزلات .

**جدول 10.4: العلاقة بين نسبة العزلات المنتجة لإنزيم البروتياز والمقاومة المتعددة لمضادات الحياة**

عدد العزلات	عدد العزلات المنتجة منها للبروتياز	نسبة العزلات المنتجة للبروتياز في العزلات متعددة المقاومة	المقاومة المتعددة
11	7	63.63%	MDR(3)
5	4	80%	MDR(4)
2	2	100%	MDR(5)
1	1	100%	MDR(6)
1	1	100%	MDR(7)
<b>P value</b>		0.019[NS]	

قد يكون سبب العلاقة بين زيادة إنتاج إنزيم البروتياز وزيادة المقاومة لمضادات الحياة هو ظاهرة التجمع الخلوي وميكانيكية التحسس بالنصاب , ومن خلال هذه العملية فإنَّ الخلية الجرثومية تقوم بتنظيم العديد من الفعاليات منها الإقتران البلازميدي وإنتاج العديد من عوامل الضراوة ومن هذه العوامل إنتاج إنزيم البروتياز القاعدي وتكوين الأغشية الحيوية بالتالي تسبب مقاومة الجراثيم لمضادات الحياة (Davies, 2002; Antunes et al.,2010;Jimenez et al.,2012).

#### 5.4.4. إنتاج إنزيم الجيلاتينيز : Gelatinase production

أُختبرت قابلية عزلات الزائفة الزنجارية عن إنتاجها للجيلاتينيز, إذ بلغت نسبة العزلات المنتجة للجيلاتينيز 45% مقابل 55% من العزلات أعطت نتائج سالبة ولم يكن هناك فارق إحصائي معنوي ( $P=0.37$ ). وقد خالفت نتائج الدراسة الحالية نتائج دراسة Shiny وزملاؤه, إذ كانت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة للجيلاتينيز 73.33% (Shiny et al.,2016). كما خالفت نتائج الدراسة الحالية نتائج دراسة (AL-Salihi and Hassan,2015), إذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة للجيلاتينيز 97.14%.

يبين الجدول رقم 11.4 وجود علاقة بين إنتاج عزلات الزائفة الزنجارية للجيلاتينيز والمقاومة المتعددة لمضادات الحياة, إذ كلما زادت نسبة إنتاج العزلات الداخلة في الدراسة للجيلاتينيز, إزدادت عدد مضادات الحياة التي قاومتها العزلات.

#### جدول 11.4: العلاقة بين نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة للجيلاتينيز والمقاومة المتعددة

##### لمضادات الحياة

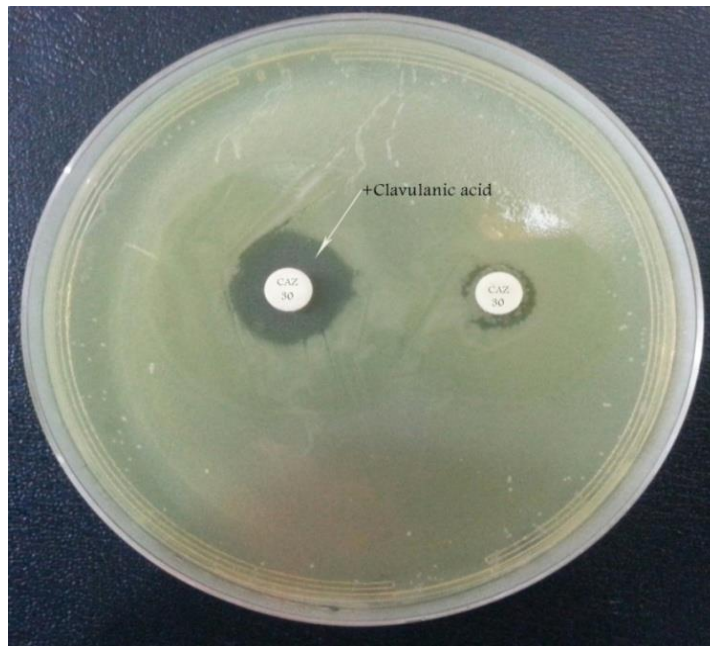
عدد العزلات	عدد العزلات المنتجة للجيلاتينيز	نسبة العزلات المنتجة للجيلاتينيز في العزلات متعددة المقاومة	المقاومة المتعددة
11	5	45.45%	MDR(3)
5	4	80%	MDR(4)
1	1	100%	MDR(6)
1	1	100%	MDR(7)
<b>P value</b>	< 0.001[S]		

#### 6.4. إنزيمات البييتالكتاميز واسعة الطيف: Extended Spectrum $\beta$ - Lactamase Enzyme (ES $\beta$ Ls)

أُستخدمت طريقة الأقراص المدمجة (Combined disk Test (CDT) في الكشف عن إنزيمات البييتالكتاميز واسعة الطيف ES $\beta$ Ls, إذ أظهرت نتائج إختبار إنَّ 11 عزلة من العزلات الداخلة في الدراسة كانت مُنتجة للإنزيم وبنسبة 55% ولم يكن هناك فارق إحصائي معنوي, وكما مبين في الجدول 12.4 والشكل 4.4.

جدول 12.4: عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة وغير المنتجة لإنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف  
ESβLs

عدد العزلات الجرثومية غير المنتجة لإنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف (%) ESβLs	مصدر العزلة	عدد العزلات الجرثومية المنتجة لإنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف (%) ESβLs	مصدر العزلة
9(45%)	مسحات الحروق ومسحات الأذن وعينات الأدرار	11 (55%)	مسحات الحروق , الجروح ومسحات الأذن وعينات الأدرار
0.655[NS]			<b>P value</b>



شكل 4-4: الكشف عن إنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف في جراثيم الزائفة الزنجارية بعد التنمية على وسط مولر هنتون الصلب الحاوي على قرصين لمضاد Ceftazidime (30μg) ، المضاف لأحدهما 5 مايكرو لتر من مثبط Clavulanic acid على درجة حرارة 37°م لمدة 18-24 ساعة . تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة الباحث Alikhan وزملاؤه عام 2014 ، إذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة لإنزيمات ESβLs 58.25% (Alikhan et al.,2014). كذلك توافقت مع دراسة Shiny وزملاؤه عام 2016، إذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة لإنزيمات ESβLs 59% (Shiny et al.,2016). وقد خالفت نتائج الدراسة الحالية نتائج دراسة الباحثة (Wassef

(*et al.*,2015) في مصر, إذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف %5.3. خالفت نتائج الباحثة (Ullah *et al.*,2009) في دراسة أجريت في الباكستان , إذ بلغت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف %35.85 .

قد يعود السبب في الإنتشار الكبير لجراثيم الزائفة الزنجارية المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف إلى الإستخدام الكبير وغير الضروري لسيفالوسبورينات الجيل الاول والثاني والثالث في حالات عديدة في المعالجة المختلفة بسبب توفر ورخص ثمن هذه المضادات , والإستخدام الخاطئ لهذه المضادات من قبل المرضى وبيعها بدون وصفات من قبل الصيادلة , أدى الى موت العترات الحساسة فاسحة المجال للعترات المقاومة للتكاثر والإنتشار خاصة في بيئات المستشفيات . ايضاً الإفتقار الى البحوث العلمية حول مدى إنتشار هذه العترات الجرثومية المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف المقاومة لأغلب المضادات وندرت مضادات الحياة البديلة , كلها أسباب ساهمت في إنتشار العترات المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف والمقاومة لأغلب المضادات .

إنّ نسبة إنتاج عزلات الزائفة الزنجارية لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف في الدراسة الحالية إرتفعت كثيراً عن نتائج دراسة (Wassef *et al.*,2015) في مصر و (Ullah *et al.*,2009) في الباكستان , وقد يكون السبب في ذلك إختلاف الظروف البيئية وبالتالي إختلاف إنتشار جراثيم الزائفة الزنجارية , إختلاف عتر الزائفة الزنجارية المعزولة في أماكن الدراسة والتقنيات المختبرية الخاصة بالكشف عن الإنزيم .

يبين الجدول 13.4 وجود علاقة بين إنتاج عزلات الزائفة الزنجارية الداخلة في الدراسة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs والمقاومة المتعددة لمضادات الحياة .

جدول 13.4: العلاقة بين عزلات الزائفة الزنجارية المنتجة لإنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs والمقاومة المتعددة لمضادات الحياة MDR

عدد العزلات	عدد العزلات المنتجة منها لإنزيمات ESβLs	نسبة العزلات المنتجة لإنزيمات ESβLs في العزلات متعددة المقاومة %	المقاومة المتعددة MDR
11	6	54.5	MDR(3)
5	3	60	MDR(4)
1	1	100	MDR(6)
1	1	100	MDR(7)
< 0.001[S]			<b>P value</b>

نلاحظ مما سبق , إنه كلما زادت قدرة جراثيم الزائفة الزنجارية على مقاومة مضادات الحياة , إزدادت نسبة العزلات المنتجة لإنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs, مما يدل على وجود علاقة ما بين المقاومة المتعددة للمضادات وإنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs عند جراثيم الزائفة الزنجارية , ويمكن تفسير هذه النتائج بأنَّ العناصر الوراثية الإنتقالية الموجودة عند جراثيم الزائفة الزنجارية تلعب دوراً كبيراً في نقل العديد من الجينات المسؤولة عن مقاومة هذه الجراثيم تجاه عدد من مجاميع مضادات الحياة وخصوصاً الأنتغرونات Integrans , إذ تلعب دوراً كبيراً في إكساب جراثيم الزائفة الزنجارية صفة المقاومة المتعددة MDR , إذ غالباً ما تترافق مع العناصر الوراثية المنقولة كالترانسبوزونات والبلازميدات (Odumosu) *et al.*,2013, ففي دراسة أجرتها الباحثة Budak وزملاؤها عام 2012 في تركيا, إذ إستطاعت عزل الأنتغرونات من خلايا جراثيم الزائفة الزنجارية المعزولة من بعض العينات السريرية , وكانت الأنتغرونات حاملة للجينات المشفرة لإنتاج إنزيمات ESβLs النوع *bla*<sub>PER-1</sub> المسؤولة عن مقاومة مضادات البييتالاكتام الذي أمنَ لهذه العزلات صفة المقاومة المتعددة تجاه مضادات البييتالاكتام (Budak *et al.*,2012).

#### 7.4. إنزيمات البييتالاكتاميز المعدنية ( MβLs ) Metallo β-Lactamase Enzymes

أُستخدمت طريقة إتحاد المضاد مع EDTA Combined EDTA disk test (CEDT) للكشف عن قابلية عزلات الزائفة الزنجارية الداخلة في الدراسة على إنتاج إنزيمات البييتالاكتاميز المعدنية . بيّنت نتائج الدراسة الحالية إنَّ جميع العزلات الداخلة في الدراسة غير منتجة للإنزيم (100%) .

خالفت نتائج الدراسة الحالية نتائج Saderi وزملاؤه عام 2008 , إذ كانت نسبة إنتاج عزلات جراثيم الزائفة الزنجارية لإنزيمات البييتالاكتاميز المعدنية MβLs 38.28% (Saderi *et al.*,2008). أما في دراسة Yousefi وزملاؤه عام 2010 كانت نسبة إنتاج عزلات الزائفة الزنجارية لإنزيمات MβLs

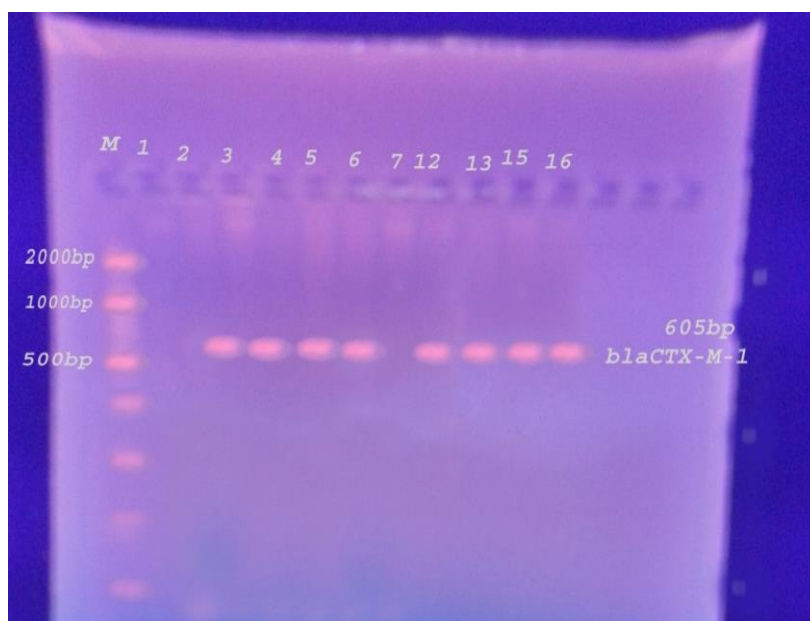


37.50% (Yousefi *et al.*,2010) , وكانت نسبة إنتاج عزلات الزائفة الزنجارية لإنزيمات MβLs 10.8% في دراسة الباحث Oie وآخرون في كوريا (Oie *et al.*,2009).

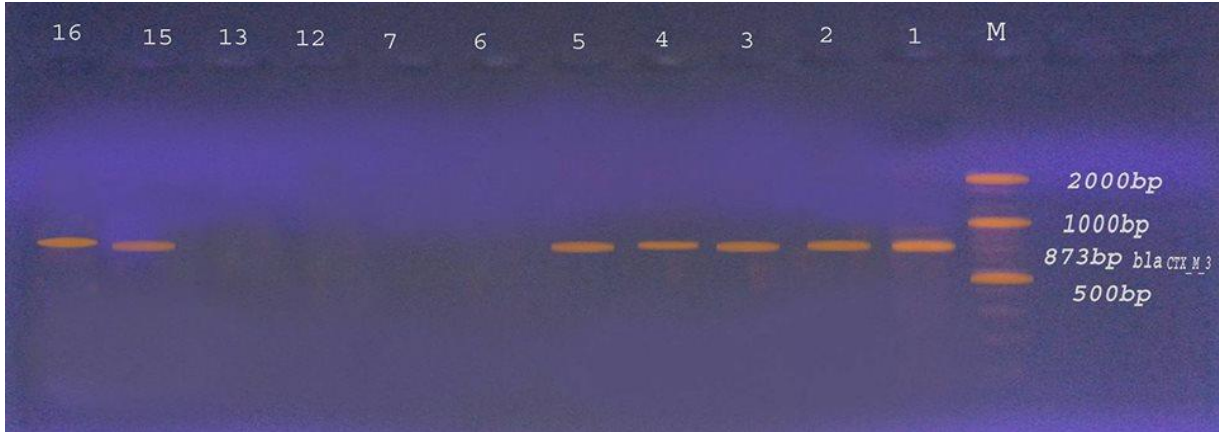
#### 8.4. الكشف عن وجود الجينات *bla* CTX-M-3 و *bla* CTX-M-1

تمّ الكشف عن نواتج إستخلاص الحامض النووي DNA الجرثومي بإستخدام جهاز Nanodrop لتحديد تركيز الحامض النووي الجرثومي المستخلص ونقاوته لبعض العزلات , إذ كانت نقاوة DNA تتراوح بين 1.6-2.2 وكما مبين في ملحق 7 , ثم أُختبرت بعض عزلات الزائفة الزنجارية التي أظهرت مقاومة متعددة لمضادات البييتالاكتام والمُنتجة لإنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف في الكشف المظهري عن الإنزيم عن إحتوائها على جينات *bla* CTX-M-1 , *bla* CTX-M-3 , بإستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي PCR .

تمّ الكشف عن الجين *bla* CTX-M-1 و الجين *bla* CTX-M-3 في 11 عزلة (55% ) من العزلات الداخلة في الدراسة, إذ كانت نتائج الكشف إنّ 8 عزلات كانت حاملة للجين *bla* CTX-M-1 وبنسبة 72.7% ويفارق إحصائي معنوي ( $P=0.05$ ) , إذ بيّنت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *bla* CTX-M-1 إنه يمتلك حجم 605 زوج قاعدي عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder . وبيّنت نتائج الكشف عن الجين *bla* CTX-M-3 إنّ 7 عزلات كانت حاملة للجين وبنسبة 63.63% , وبيّنت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل للجين *bla* CTX-M-3 إنه يمتلك حجم 873 زوج قاعدي عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي DNA Ladder. الشكل 5.4 و 6.4.



شكل 5.4 : الترحيل الكهربائي لجين *bla*<sub>CTX-M-1</sub> لجراثيم الزائفة الزنجارية بواسطة هلام الاكاروز بتركيز 1% الحاوي على 0.5µg/ML من صبغة Ethidium bromide وباستعمال DNA ladder (100bp-2000bp) ، وبفرق جهد 75 فولت/سم لمدة ساعة و 30 دقيقة ، إذ تُبين المسارات 3,4,5,6,12,13,15,16 وجود الجين *bla*<sub>CTX-M-1</sub> ، أما المسارات رقم 1 , 2 , 7 فلا تحتوي على الجين .



شكل 6.4 : الترحيل الكهربائي لجين *bla*<sub>CTX-M-3</sub> لجراثيم الزائفة الزنجارية بواسطة هلام الأكاروز بتركيز 1% الحاوي على 0.5µg/ML من صبغة Ethidium bromide وباستعمال DNA ladder (100bp-2000bp) ، وبفرق جهد 75 فولت/سم لمدة ساعة و 30 دقيقة ، إذ تُبين المسارات 1,2,3,4,5,15,16 وجود الجين *bla*<sub>CTX-M-3</sub> ، أما المسارات 6,7,12,13 فلا تحتوي على الجين .

توافقت هذه النتائج مع نتائج دراسة الباحث العراقي Al-kaabi عام 2011 ، إذ كانت نسبة جراثيم الزائفة الزنجارية الحاوية على الجين *bla*<sub>CTX-M-1</sub> 83.33% (Al-kaabi *et al.*,2011), كما توافقت الدراسة الحالية مع دراسة الباحثة العراقية Auda وآخرون عام 2013 في الكشف عن جين *bla*<sub>CTX-M-1</sub> في الجراثيم السالبة لملون غرام ، إذ كانت نسبة عزلات الزائفة الزنجارية الحاوية على الجين *bla*<sub>CTX-M-1</sub> 86.7% (Auda *et al.*,2013). خالفت نتائج هذه الدراسة ما توصل اليه Chen وزملاؤه عام 2015 ، إذ كانت نسبة وجود الجين *bla*<sub>CTX-M-3</sub> في عزلات الزائفة الزنجارية 12.9% (Chen *et al.*,2015).

إنَّ سبب إنتشار هذا النوع من الجينات يعود الى إنحدار CTX-M من عناصر وراثية عالية التعبئة مثل البلازميدات والترانسبوزونات بالإضافة الى إنحدارها من نسل ناجح (Cantón and (Conque,2006;Rogers *et al.*,2011;Woodforg *et al.*,2011) ، أما السبب الثاني فيعود الى ظاهرة زيادة المقاومة في الكائنات الحاملة لجينات CTX-M خصوصاً المقاومة لمجموعة

الأمينوكلايكوسيدات والفلوروكينولونات التي قد تسهل من عمليات الإنتشار ( Delmas *et al.*,2008; Morosini *et al.*,2010; Cantón and Ruiz-Garbajosa,2011).

يبين الجدول 14.4 العلاقة بين نسبة وجود الجين *bla* CTX-M-1 و *bla* CTX-M-3 في العزلات الداخلة في الدراسة ومقاومتها المتعددة لمضادات الحياة , ولم يكن هناك فارق إحصائي معنوي بين العزلات الحاملة لجينات *bla* CTX-M .

**جدول 14.4: العلاقة بين المقاومة المتعددة في عزلات الزائفة الزنجارية ونسب وجود الجينات *bla***

CTX-M

نسبة العزلات الحاملة للجينات <i>bla</i> CTX-M	عدد العزلات الحاملة للجينات <i>bla</i> CTX-M	عدد المضادات التي قاومتها العزلات	عدد العزلات الجرثومية
100%	4	3	4
75%	2	4	3
100%	1	6	1
100%	1	7	1
0.571[NS]			<b>P value</b>

إنَّ وجود الجينات *bla* CTX-M-1 و *bla* CTX-M-3 في جراثيم الزائفة الزنجارية قد يفسر المقاومة المتعددة لمضادات البيبتاكتام , إذ إنَّ الجين *bla* CTX-M يُشفر لمقاومة مضادات Cefotaxime و Ceftazidime التي تعود لمضادات السيفالوسبورينات وإنَّ هذا الجين يُشفر أيضاً لمقاومة مضادات البنسلينات و المونوباكتام (Delmas *et al.*,2008;Canton *et al.*,2012)

## الاستنتاجات والتوصيات

### الإستنتاجات :Conclusions

1-تبيّن عزلات الزائفة الزنجارية أنّها تمتلك عوامل ضراوة متعددة منها تكوين الاغشية الحيوية وبكفاءة عالية ومتوسطة كما إن اغلبها تمتلك مضخات دفع عالية الكفاءة ومتوسطة الكفاءة , وإنّ عزلات الزائفة الزنجارية مقاومة لأغلب مضادات مجموعة السيفالوسبورينات ووجود علاقة بين إنتاج عوامل الضراوة و مقاومة مضادات مجموعة البيتالاكتام .

2-نتيجة لتقييد إستعمال مضادات الكاربابينيم (Imipenem و Meropenem) في المستشفيات, كانت جميع العزلات الجرثومية حساسة لهذين المضادين وهذا الامر جيد لوجود مضادات مقاومة لهذه الجراثيم .

3-إنّ غالبية العزلات الجرثومية كانت منتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs وذلك من خلال الكشف المظهري للجراثيم كما بيّن الكشف الجيني لهذه الإنزيمات وجود الجينات المسؤولة عن التعبير عن هذه الإنزيمات مثل *bla CTX-M-1* و *bla CTX-M-3* .

4-كلما زادت قدرة جراثيم الزائفة الزنجارية على مقاومة مضادات البيتالاكتام , إزدادت نسبة العزلات المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs, مما يدل على وجود علاقة ما بين المقاومة المتعددة للمضادات وإنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESβLs عند جراثيم الزائفة الزنجارية.

### التوصيات :Recommendations

1-إجراء دراسات دورية كل سنتين لمعرفة تطور مقاومة الزائفة الزنجارية لمضادات الحياة الحديثة وبالتعاون مع برنامج السيطرة على عدوى المستشفيات .

2-إجراء دراسة جزيئية للجزر الإمرافية المسؤولة عن إنتاج السموم الميكروبية لعزلات جراثيم الزائفة الزنجارية .

## الفصل الخامس: المصادر

### 1.5. المصادر العربية:

بلال، الهام جواد كاظم, (2010) , التحري عن إنزيمات البيتا لاكتاميز في العزلات السريرية في بكتريا الزوائف الزنجارية في مدينة النجف- رسالة ماجستير, كلية التربية للبنات, جامعة الكوفة.

السعدي ، لينا عبد الأمير سلمان, (2011) , دراسة بكتريولوجية لبكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في مدينة بعقوبة وضواحيها , رسالة ماجستير - كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة ديالى.

الشويخ , رنا مجاهد عبدالله , (2016), المضادات الحيوية واستعمالاتها، الطبعة الاولى , عمان - دار دجلة للنشر والتوزيع . 13-39.

الشويخ ، رنا مجاهد عبدالله , (2006), إنتاج وتوصيف protease من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من حالات مرضية وعلاقته ببعض مضادات الحياة , أطروحة دكتوراه . كلية العلوم , الجامعة المستنصرية .

الصفار ، بتول عبد الأمير باقر , (2010) , تأثير مستخلصات قشور البرتقال على نشاط بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المقاومة للمضادات الحيوية والمعزولة من التهابات جروح الحروق وجروح ما بعد العمليات في مدينة بغداد ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

الطائي ، الاء محمد محمود , (2012), دراسة وراثية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المقاومة لمضاد Ciprofloxacin , رسالة ماجستير.كلية العلوم , الجامعة المستنصرية.

القصاب ، عبد الجبار عمر و الخفاجي ، زهرة محمود , (1992) , تأثير الظروف المختلفة على الفعالية التثبيطية للعصيات اللبنية المعوية أتجاه البكتريا المعوية المسببة للأسهال . كلية العلوم الزراعية . مجلد (123) . العدد (7):18-26 .

محسن ، مسلم عيدان ، الشمري, محمد جاسم محمد وعلي , زهرة محسن , (2011), عزل وتشخيص البكتريا الملوثة لردفات الحروق في محافظة النجف , المجلة العلمية الاكاديمية العراقية .

المرجاني ، محمد فرج ، (2011) ,المضادات الحيوية المقاومة الحيوية البكتيرية للمضادات الحيوية ، عمان - دار دجلة .

المشهداني ، كوكب ادريس محمود حسين .(2004).دراسة تشخيصية وإمراضية لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من المصادر المختلفة في مدينة الموصل .اطروحة دكتوراه فلسفة . كلية العلوم . جامعة الموصل .

النيساني ، علياء لطيف سلمان.(2011) . دراسة بعض عوامل ضراوة بكتريا *P.aeruginosa* باستخدام بعض المؤشرات الوراثية. رسالة ماجستير- كلية العلوم. جامعة تكريت.

## 2.5.المصادر الأجنبية:

**Abdullah, R.M.;** Samaan, S.F. and AL-Shwaikh, A.M. (2010) . study the effect of antibiotic combination of beta – Lactam and amino glycoside with another group of antibiotics and their synergism effect. JABHS.11(1).

**Abdullah,R.M.**and Mahdi,A.F.(2016).Identification of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical specimen by using 16S rDNA.Iraq Acad. Sci. J.10(1):45-49.

**Adewoye, L.;** Sutherland,A.; Srikumar, R.; and Poole,K.(2002). The MexR Repressor of the mexAB – oprM Multidrug Efflux Operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization of Mutations Compromising Activity. J . Bacteriol. 184:4308–12.

**Agarwal,R.K.;**Singh,S.;Bhilegaonkar,K.N. and Singh,V.P.(2011).Optimization of microtiter plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes .Int.food Res.J.18(4):1493-98.

**Ahmadi,K;**Hashemia,A.M.;Pouryaghobi,S.M.;Akhava,R.;Rozmina,S.and Bolvardi,E.(2016).Antibiotic Resistance Properties of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Cases of Superficial Infections at the Emergency. Unit.Jundishapur. J .Microbiol.9(1):e276646.

**Ahmed, M. ;**Al-Ghanimi, H. and Abboud,H. (2014).An Insight In to Bacterial profile and antimicrobial susceptibility of Burns Wound Infections in Kerbala,Iraq.Karbala J.Med.7(2): 23-33.

**ALHARBI, S. A.;** ZAYED, M. E.(2014). Antibacterial susceptibility of bacteria isolated from burns and wounds of cancer patients. Journal of Saudi Chemical Society. 18: 3–11.

**Al-Hasan,R.**(2012).Astudy of carbapenem resistance in *Acinetobacter bumanii* isolates from Kuwait.Phd.Thesis.University of Edinburgh.

**ALIKHANI, M. Y.;** TABAR, Z. K.; MIHANI ,F.; KALANTAR, E.; KARAMI, P.; SADEGHI,M.(2014). Antimicrobial Resistance Patterns and Prevalence of *bla*PER-1 and *bla*VEB-1 Genes Among ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in West of Iran. Jundishapur J Microbiol.7(1): 1-5.

**Al-Kaabi, M.H.A.**(2011). Detection of TEM and extended spectrum  $\beta$ -lactamase enzymes produced by some Gram negative bacteria using polymerase chain reaction. M. Sc. Thesis. College of Science .Al-Mustansiryah University.

**AL-Khazali, Khitam ali obaid.**(2002).Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Isolated from Burns and Wound Infections to Antibiotics and some Disifectants. M. Sc. Thesis. University Mustansirya.

**Allen, H.K.;** Donato, J.; Huimi Wang, H.; Cloud-Hansen, K.A.; Davies, J. and Handelsman, J. (2010). Call of the wild antibiotic genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(4):251-9.

**Al-marjani,F.;** Mohammed,R.; Abd,Y. and Mansour,F.(2015). Efflux Pumps In Colistin Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in Baghdad. *Int. J. Advan. Res.*3(11):680-5.

**Almeida, C.;** Azevedo, N. F.; Santos, S.; Keevil, C. W. and Vieira, M. J. (2013). Correction: Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA FISH). *PLoS ONE.* 8(6): 101-371.

**Al-Musawi, D.K.M.**(2014). Correlation of Quorum Sensing Genes with some Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* . M. Sc. Thesis. College of Science. Al-Mustansiryah University.

**AL-NIAAME, A. E.;** AL-MARJANI, M. F.; ABD, S.Y. (2013). Detection of ESBL And AmpC  $\beta$ -Lactamases In Gram Negative Isolates from some Iraqi Medical Centers In Baghdad. *Int. J. Advan. Res.* 1(7): 600-9.

**AL-Salihi,S.S.** and Hasan,A.Y.(2015). Detection of some virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* associated with diarrhea in Kirkuk City. *KUJSS.*10(1):78-89.

**Al-Shaibani, I. N.** (2004). Taxonomical study of species belonged to *Pseudomonads* isolated from Baghdad hospitals and effect of some agents. D.Ph., thesis. College of science. Al-Mustansiriya University.

**Altaai, M.E.;** Aziz, I.H. and Marhoon, A.A. (2014) . Identification *Pseudomonas aeruginosa* by 16SrRNA gene for differentiation from others *Pseudomonas* species that isolated from patients and environment . *J. Bagh. Sci.* 11(2): 1028-34.

**Al-Tikrity , A.L.** (2009) . Bacteriological and Genetical study of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different human infection. M.Sc. Theses. college of Scince . University of Tikrit.

**ALTUN, S.;** KOCAKTUFAN, Z. and YAĞCI,S.(2013). Extended Spectrum Betalactamases, AmpC and Metallo Beta-lactamases in Emerging Multi-drug Resistant Gram-negative Bacteria in Intensive Care Units. *Open Access Scientific Reports.* 2(4): 1-4.

**ANDREJKO, M.;** ZDYBICKA-BARABAS, A.; JANCZAREK, M. and CYTRYŃSKA, M. (2013). Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles. *Biochimica polonica,* 60(1): 83-90.



- Anoar, K.A.;** Ali, F.A. and Omer, S.A. (2014a). Phenotypic Detection of Metallo  $\beta$ - Lactamase Enzyme among Gram Negative Bacteria Isolated From Burn Patients in Sulaimani, Iraq. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 3(3): 315-325.
- Ansari, A.;** Salman, M. and Yaqoob, S. (2015). Antimicrobial Resistance Pattern in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated at Ears Lucknow, India. *International J. curr. Microbiol. App. Sci.* 1:48-58.
- Antunes, L.C.;** Ferreira, R.B.; Buckner, M.M. and Finlay, B.B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiol.* 156(8):2271–82.
- ARAVINDHAN, R.;** NAVEEN, N.; ANAND, G.; RAGHAVA RAO, J. and UNNI NAIR, B. (2014). kinetics of biodegradation of phenol and a polyphenolic compound by a mixed culture containing *pseudomonas aeruginosa* and *bacillus subtilis*. *Applied Ecology and Environmental Research.* 12(3): 615-25.
- Atlas, R. M. ;** Brown, A. E. and Parks, L. C. (1995) . Laboratory Manual Experimental Microbiology. 1<sup>st</sup>. ed. Yearbook , Mosby Inc. 148: 884-8 .
- AUDA, I. G.;** AL-KAKEI, S. N. H. and HAMED, S. L. (2013). Occurrence of CTX-M-I Type  $\beta$ -lactamases Gene in Certain Gram Negative Bacteria. *IPMJ.* 12(2) : 306-11.
- Baho, S. I. S.** (2006). Genetic study on the locally isolated *Pseudomonas aeruginosa* and ability in lectin production. M.S.C. thesis, College of science, Al-Nahrain University.
- Baron, E. J. ;** Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. (2007) .Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 9<sup>th</sup>. ed. Mosby Company. Missouri.
- BASAK, S.;** KHODKE, M.; BOSE, S. and MALLICK, S. K. (2009). Inducible AmpC Beta-Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolated In A Rural Hospital Of Central India. *JCDR.* 3(6) :1921-7.
- BASAVRAJ, N.;** NAMDEV, S. (2012). Antimicrobial Resistance in *P. aeruginosa* A Review. *J. Med. Edu. Res.* 2(1): 1-7.
- Bashir, D. ;** Thokar, M. A. ; Fomda, B. A. ; Bashir, G. ; Zahoor, D. ; Shabir Ahmed, A. and Toboli, A. S. (2011) . Detection of Metallo-beta-lactamase ( MBL ) Producing *Pseudomonas aeruginosa* at a Tertiary Care Hospital in Kashmir . *Afri. J.Microbiol. Res.* 5: 164-172.
- Bauer, S.W.;** Kirby, W.M.; Sherris, J.C. and Truck, M.D. (1996) . Antibiotic susceptibility testing by standardized single dose method. *American J. clin. path.*
- BEBRONE, C.;** BOGAERTS, P.; DELBRÜCK, H.; BENNINK, S.; KUPPER, M. B. and DE CASTRO, R. R. (2013). GES-18, a New CarbapenemHydrolyzing GES-Type  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas*

*aeruginosa* That Contains Ile80 and Ser170 Residues. Antimicrob. Agents Chemother. 57(1): 396–401.

**Benson** , H.G.(2002) . Microbiological Applications ( Laboratory Manual in General Microbiology ) . 8<sup>th</sup>. ed. published by McGraw – Hill , New York.

**Bhalerao**, D. S. ; Roushani, S. ; Kinikar, A. G. and Akhter, I. (2010). Study of Metallo-beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pravara Rural Hospital. Pravara. Med. Rev. 2(3): 16-9.

**Bhasin**, S.; Shukla, A.S. and Shrivastava, S. (2015) . Observation on *Pseudomonas aeruginosa* in Kshipra river with relation to anthropogenic activities . Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 4(4): 672-84 .

**BHAWSAR**, N. A . and SINGH M. (2014). Isolation And Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* From Waste Soybean Oil as Biosurfactants Which Enhances Biodegradation of Industrial Waste With Special Reference To Kosmi Dam, Betul District, (M.P.). Inter. J. Advan. Res. 2(6): 778-83.

**Blair**, J.M. ; Webber, M.A. ; Baylay, A.J. ; Ogbolu, D.O. and Piddock, L.J.V. (2015) . Molecular mechanisms of antibiotic resistance . J. Nature . 13: 42-51 .

**Bonnet**, R. (2004). Growing of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase : the CTX-M enzyme. J. Antimicrob. Agent. Chemother. 48(1): 1-14

**Bonomo**, R. and Szabo, D. (2006). Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter species* and *Pseudomonas aeruginosa* CID.43(2):546-56.

**Bredenstein**, E.B.M.; Fuente-Nunez, C. and Hancock, R.E.W.(2011). *Pseudomonas aeruginosa* all roads lead to resistance. Trends Microbiol. 19(8):419-25.

**Brooks** , G. F.; Butel , J. S.;Carroll, K. C. and Morse, S. A. (2007) . Jawetz , Melnick , J.L. and Adlebergs Medical Microbiology , 24<sup>th</sup> ed. A lange medical book.

**BROOKS**, G. F.; CARROL, K. C.; BUTEL, J. S.and MORSE, S. A.(2007). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 24<sup>th</sup>. ed. The McGraw-Hill Companies, USA.

**BROOKS**, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. (2010). Medical Microbiology. 25<sup>th</sup>.ed. McGraw-Hill Companies, new york. P: 240.

**Brouwer**, M.S.M. ; Bossers, A. ; Harders, F. ; Essen-Zandbergen, A.V. ; Mevius, D.J. and Smith, H.E. (2014) . Complete genome of IncI1 plasmids extended spectrum beta-lactamase genes . J. ASM. 2(4): 859- 873 .

**Brown**, A. E. (2005). Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology.McGraw-Hill. New York. companies, Inc., 1221 Avenue of the Americas, New York. 144-6.

- Brown,D,P.**, and Izundu, A.(2004). Antibiotic resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Jamaica. Rev. Panam. Salud. Publica. 16(2):125–30.
- BUDAK, F.;** KASAP, M.; KOLAYLI,F.; KARADENİZLİ,A.and VAHABOĞLU, M. H.(2012). Integron-associated resistance genes among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. Turkish J. Med. Sci. 42(1): 149-56.
- BUSH, K.** and JACOBY, G. A.(2010). Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 54(3): 969–76.
- Bush, K.;** Jacoby, G.A.; and Medeiros, A.A.(1995). A Functional classification scheme for  $\beta$  -lactamase and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents. Chemother. 39(6): 1211-1233.
- Bush, L.M.** and Perez, M.T. (2014) . *Pseudomonas* and related infections : gram negative bacilli . J. Merck Manual . 1: 1-4 .
- Buynak, J. D.** (2006). Understanding the longevity of the beta-lactam antibiotics and of antibiotic/beta-lactamase inhibitor combinations. Biochem. Pharmacol,71(7): 930-940 .
- Cantón, R.**, and Coque, T. M. (2006). The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. Curr. Opin. Microbiol. 9: 466–75.
- Cantón, R.;** and Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. Curr. Opin. Pharmacol. 11: 477–85.
- CANTÓN, R.;** GONZÁLEZ-ALBA, J.M.and GALÁN, J. C. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. Front Microbiol. 3(110): 1-19.
- Carroll,K.C.;**Morse,S.A.;Mietzner,T.;Miller,S.; and et al.(2016).Pseudomonads and Acinetobacter.In:Jawetz,Melinick and Adelbergs Medical Microbiology , 27<sup>th</sup> . ed. A lange medical book.
- Center for Drug evaluation and Research(CDER).**(2015). Mechanism action of avibactam.p:47
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC).**(2013). ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States. P: 69.
- Chandrakanth, R.K.;** Raju, S. and Patil, S.A. (2008). Aminoglycoside – resistance mechanisms in multidrug – resistant *Staphylococcus aureus* clinical Isolates. 56(6):558-62.
- Chen, S.S.** (2014) . *Pseudomonas* infection . infect. Dis. J. 31: 1-5 .
- Chen,Z.;**Niu,H.;Chen,G.;Li,M.L. and Zhou,Y.(2015).Prevalence of ESBLs-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different wards in a chinese teaching hospital.Int.J.Clin. Exp. Med.8(10):19400-5.

**Cheng, S.S.;** Chen, K.K.; Lin, A.T.; Chang, Y. H.; hsu, T.H.; Wu, H.H.; Chiu, A.W.and chang, L.S. (1998). Complicated urinary tract infection :analysis of 179 patients . Chung . Hua I. Hsueh . Tsa . Chin . Taipei . 61:651-6.

**Church, D.;** Elsayed, S.; Reid, O.; Winston, B. and Lindsay, R. (2006). Burn Wound Infections. Clin. Microbiol. Rev.19 (2), 3 –34.

**CLSI.** (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-First Informational Supplement M100-S21 . Clinical and Laboratory Standards Institute , Wayne, PA. USA . 30(1): 1-115.

**CLSI.** (2012) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-second informational supplement . Clinical Laboratory Standards Institute . 31(1): 124-8 .

**CLSI.** (2012b) . Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement M100-S22 . Clinical and Laboratory Standards Institute , Wayne, PA. USA . 23(3): 1-188 .

**CLSI.** (2014) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-second informational supplement . M100-S24.Clinical Laboratory Standards Institute . 34 (1): 58-172.

**COLE, S. J.;** RECORDS, A. R.; ORR, M. W.; LINDEN, S. B. and V T LEE. (2014). Catheter Associated Urinary Tract Infection by *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by Exopolysaccharide-Independent Biofilms. Infect.imm. 82(5): 2048-58.

**Collee , J. G. ;** Fraser , A. G. ; Marmion , B. P. and Simmons , A. (1996) . Mackie and McCartney practical medical microbiology . p.173-4 . 14<sup>th</sup> ed. Churchill Livingston .

**Conti, S. ;** Santos, D. ; Koga-Ito, C.Y. and Jorge, A.O. (2009) . Enterobacteriaceae and pseudomonaceae on the dorsum of the human tongue . J. Appl. Oral. Sci. 17(5): 3750-380 .

**Cotar,A.;** Chifiriuc,M.; Dinu ,S. Bucur,M.; Iordache,C.; Banu,O.; Dracea,O.; Larion,C. and Lazar ,V.(2010). Screening of Molecular Virulence Markers in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinical Infections.Int. J. Mol. Sci..11: 5273-91.

**Cruickshank, R.;** Duguid, J. R.; Marion, B. P. and Swain, R. H. (1975). The practice of medical microbiology. 12<sup>th</sup>ed. 2. Churchil Livingston, U.K. Ctries. 4(4): 239-42 .

- Dalhoff, A.** ; Nasu, T. and Okamoto, K. (2003) . Beta-lactamase stability of faropenem . *Chemother.* 49(5): 229-36 .
- Davies, J. C.**(2002).*Pseudomonas Aeruginosa* in Cystic Fibrosis: Pathogenesis and Persistence. *Paediatric Respiratory Reviews* . 3(2):34-128.
- Delmas, J.,** Chen, Y., Prati, F., Robin, F., Shoichet, B. K., & Bonnet, R. (2008). Structure and dynamics of CTX-M enzymes reveal insights into substrate accommodation by extended-spectrum beta-lactamases. *J. Mol. Biol.* 375(1): 192-201.
- Djordjevic, D.,** Wiedmann, M. and McLandsborough, L. A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology.* 68: 2950–2958.
- Donlan, R. M.** & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167–193.
- Drawz, S. M.,** & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. rev.*23(1): 160-201.
- Ernst, R.K.;** Argenio,D.A.; Ichikawa ,J.K .; Bangera ,M.G ; Selgrade ,S, Burns,J.L.;Hiatt ,P.; McCoy,K.; Brittnacher ,M and Kas , A .(2003).Genome mosaicism is conserved but not unique in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the airways of young children with cystic fibrosis.*J. Environ Microb.*5:1341-1349.
- Essawi,T.;**Sabri,I. and Farraj,M.(2013).Extended spectrum *B*-lactamase and antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the west Bank,Palastine.*J.Microbiol. Infect. dis.*3(2):56-60.
- Eusebio, N.** ; Pinheiro, T. ; Amorim, A . A . ; Gamboa, F . ; Saraiva, L and Gusmao, L. (2013) . A practical single nucleotide polymorphism multiplex assay for genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* . *PLOSone.* 8(6): 1-8 .
- Fadhel,R.A.**(2013).Inhibition of Biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from patients with Diabetic Foot Ulcer Grade II . M.Sc.Thesis.College of Science.Al-Mustansiryah University. College of Science University of Baghdad.
- FATIMA, A.;** NAQVI, S. B.; ABDUL KHALIQ, S.; PERVEEN, S.and JABEEN, S. (2012). Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of lower respiratory tract infections. *Springer Plus J.* 70(1) : 1-4.
- Ferroni ,A.;** Sermet,G. I.; Abachin, E.; Quesne, G.; Lenoir , G and Berche, P.(2002).Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cysticfibrosis center. *J.Clin. Microb.*40:3793–7.

- Forbes, B.A.;** Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2002). Bailey and Scott,s Diagnostic Microbiology. 11<sup>th</sup> ed. 384-98. Mosby Company. Missouri.
- Forbes, B.A.;** Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2007). Baily and scott's: Diagnostic microbiology. 12<sup>th</sup> ed. Mosby, Inc. Baltimore. USA. :266-277.
- Fugelsang, K.C.** and Edwards, C.G. (2007) . Wine microbiology practical applications and procedures . 2<sup>nd</sup>. ed. Springer . New York .
- GARRITY, G. M.;** BELL, J. A.and LILBURN, T. G. (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes. Springer, New York. 94-102.
- GELLATLY, S. L.;** HANCOCK, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog. Dis. 67(3): 159–173.
- Genium's handbook of Safety,**(1999). health and environmental data for common hazardous substances. 456-78.
- GESSARD, C.** (1984). Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. Rev. Infect. Dis. 6(3): 775–6.
- Ghane, M.** and Azimi, Z. (2014). Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility of *Pseudomonas spp.* Isolated from Hospital Environment in Tonekabon, North of Iran. Journal of Applied & Environmental Microbiology. 2(4):97-101.
- GILLESPIE, S. H.** and HAWKEY, P. M. (2006). Principles and practice of clinical bacteriology, Second Edition, John Wiley & Sons Ltd, Southern Gate, Chichester, England.
- Goering, R.V.;** Dockrell, H.M.; Wakelin, D.; Zuckerman, M.; Chiodini, P.L.; Roitt, I.M. and Mims, C. (2008). Mims medical microbiology. 4<sup>th</sup> ed. Mosby. China.
- Goli, H.R.;** Nahaei, M.R.; Rezaee, M.A.; Hasani, A.; Kafil, H.S. and Aghazadeh, M. (2016). Emergence of colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Tabriz hospital, Iran. Iranian J. Microbiol. 8(1):62-9.
- GOUDARZI, M.;** AZAD, M.; SEYEDJAVADI, S. S.; GOUDARZI, G. and RASHIDAN, M. (2014). Study of flagellin profiling in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRPA) isolated from burn wound infections, Tehran, Iran. J. Paramed. Sci. 5(3): 40-5.
- Grkovic, S.;** Brown, M.H. and Skurray, R.A. (2001) Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. Semin. Cell Dev. Biol. 12: 225–37.
- Guilfoile, P. G. ;** Alcamo, E. and Heymann, D. (2007) . Antibiotic – Resistance bacteria. Chelsea House Publishers . 53: 62-72 .

- Gupta,R.;**Malik,A.;Rizvi,M.and Ahmed,M.(2016).Incidence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas Spp.* In ICU Patients with Special Resistance to ESBLs, AMPC, MBL and Biofilm Production . J. Glob. Infect. Dis.8(1):25-31.
- Haenni,M.;**Hocquet,D.;Ponsin.;Cholley,P.;Guyeux,C.;Madec.J.andBertrand,x.(2015).Population structure and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from animal infections in France. BMC Veterinary Research.11(9):1-5.
- Hall-Stoodley, L.;** Costerton, J.W. and Stoodley, P.(2002). Bacterial biofilms from the natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol. 2:95–108.
- HANCOCK, R. E. W. and BRINKMAN, F. S .L. (2002).** Function Of *Pseudomonas* Porins In Uptake And Efflux, Annu. Rev. Microbiol. 56: 17–38.
- HARJAI K.;** GUPTA, R. K. and SEHGAL, H.(2014). Attenuation of quorum sensing controlled virulence of *Pseudomonas aeruginosa* by cranberry. Indian J. Med. Res. 139: 446-53.
- Harley, J. and Prescott, L. (2002).** Laboratory exercises in Microbiology. 5<sup>th</sup>. ed. 466 – 7.The McGraw Hill, Companies . New York .
- HASAN, A.SH. and Al-Sahaf, T.A. (1986).** Otitis media: A bacteriological study. Iraqi J. Military Med. 3(2): 85-90.
- Hashim, S. T. (2005).** Isolation and diagnosis of burn contaminated bacteria and study the effect of fat extract on their growth. M.C.S. thesis. College of science. Al- Mustansiriya University.
- He, J.;**Baldini , R.L.; Deziel, E.; Saucier, M.; Zhang ,Q and Liberati,. (2004) .The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. Proc. Natl .Acad. Sci .USA.101:2530–5.
- HIRSCH, E. B. and TAM, V. H. (2010).** Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. Expert. Rev. Pharmacoecon Outcomes Res. 10(4): 441–451.
- Hoiby,N.;** Bjarnsholt,T.; Givskov,M.; Molin,S. and Ciofu,O.(2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int. J. Antimicrob. Agents. 35(4): 322–32.
- Humeniuk, C.,** Arlet, G., Gautier, V., Grimont, P., Labia, R., & Philippon, A. (2002). Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. Antimicrob. Agent. Chemother, 46(9), 3045-3049.

**Hussien, I.A.** ; Habeb, K.A. and Jassim, K.A. (2012) . Identification of *Pseudomonas aeruginosa* from burn wounds isolates by PCR using exotoxin A-specific primers . Iraqi J. Biotech. 11(2): 282-91 .

**Issa, M. A.** (2004). The effect of *Thymbra spicata* extract on infection in patients with bed sore. M.S.C. thesis. College of science. Al- Mustansiriya University.

**Jaafar, Z.M.;** Dhahi, M.A.R.; Abd, A.H. and Jaafar, S.M. (2014). Molecemicular identification and antibiotics resistance genes profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iraqi patients. Acad. j.8(21):2183-92.

**Jakribettu, R. P .** ; Ahmed , S . M . ; Anju , M . M . ; Sefeera , M.I.V and Chandran ,A.(2013). Emerging biofilm producing multidrug resistant mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* in arural medical collage hospital in north kerala . *J.microbial.biotec.*3(6):59-63.

**Jasim, M.A.H.** (2010). Genetic Study of Biofilms and Free *Pseudomonas spp.* Causing Urinary Tract Infections. M. Sc.thesis. College of Science. Babylon Univ.

**Jawetz, M;** Adelberg, E.A.; Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). Medical Microbiology. 22<sup>nd</sup>. ed) McGraw-Hill Company, New York.

**Jimenez. P.N.;** Koch, G.; Thompson, J.A.; Xavier, K.B.; Cool, R.H. and Quax, W.J.(2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*76(1):46–65.

**Kadry, K.**(2003). Lack of Efflux Mechanism in a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa* Highly Resistant to Beta-Lactams and Imipenem. *Folia Microbiologica* .48( 4): 529-33.

**Kapinis, E.;** Sawa, T.; and Wiener, K. J. (2006). Targitingmechanisims of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med mal infect.* 36:78-91.

**Katzung, B. G.** (2001) . Basic and Clinical Pharmacology. 8<sup>th</sup>. ed. Lange Medical Books . McGraw-Hill . New York .

**Kayser, F.H. ;** Bienz, K.A. ; Eckert, J. and Zinkernagel, R.M. (2005) . Medical Microbiology . 9<sup>th</sup>. ed. Thieme Stuttgart . New York .

**Kenneth, J.;** and Ryanes.(2004). Sherri's Medical microbiology 4<sup>th</sup>. ed.chap 23-387.

**KİREÇÇİ, E.** and KAREEM, R. D.( 2014). Antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from various clinical specimens. *Sky J. Microbiol. Res.*2(2) : 13-17.



- Koneman, E.W;** Allen, S.D; Janda, W.M; Schreckenberger, P.C and Winn, W.C.J.(1992). Color Atlas and Textbook Of Diagnostic Microbiology. 4<sup>th</sup> ed. J.B.Lippincott Company. Philadelphia.
- Kosmidis, C.;** Schindler, B.D.; Jacinto, P.L.; Patel, D.; Bains, K.; Seo, S.M. and Kaatz, G.W.(2012). Expression of multidrug resistance efflux pump genes in clinical and environmental isolates of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Antimicrob. Agents .40: 204–9.
- Kriengkauykiat, J.;** Porter,E. Lomovskaya,.O and Wong-Beringer, A.(2005). Use of an Efflux Pump Inhibitor To Determine the Prevalence of Efflux Pump-Mediated Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* . Antimicrob. Agents Chemother. 49:565-70.
- Lalzampuia,H.,and Dutta,T.K.**(2013).PCR-Based Detection of Extended-Spectrum B-Lactamases(*blaCTX-M-1* and *blaTEM*) in *Escherichia Coli*,*Salmonella Spp.* And *Klebsiella pneumonia* isolated from Pigs in North Eastern India(Mizoram).Indian J.Microbiol. 53(3): 291–6.
- Lee, N.;** Yuen, K. Y., & Kumana, C. R. (2003). Clinical role of betalactam/beta-lactamase inhibitor combinations. Drugs. 63(14): 1511-1524 .
- Lee, S.;** Park,Y. J.; Kim, M.; Lee, H. K.; Han, K. ; Kang,C. S. and Kang ,M. W.(2005).Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamase among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. J. Antimicrob. Chemother. 56:122-7.
- Levesque, R.** (2007) . SPSS Programming and Data Management , 4<sup>th</sup>. ed . Chicago .522 .
- Li ,J. ;** Attila ,C. ; Wang , L.; Wood,T. K . ; Valdes , J . J and Bentley ,W.E .(2007).Quorum sensing in *Escherichia coli* is signaled by AI-2/LsrR: effects on small RNA and biofilm architecture.J .Bacterial. 189:6011-20.
- LIAKOPOULOS, A.;** MAVROIDI, A.; KATSIFAS, E. A.; THEODOSIOU, A.; KARAGOUNI, A. D. ; MIRIAGOU, V.; et al. (2013). Carbapenemaseproducing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. BMC Infect. Dis. 13(1): 1-7.
- Libisch, B. ;** Poirel, L. ; Lepsanovic, Z. ; Mirovic, V. ; Balogh, B. ; Paszti, J. ; Hunyadi, Z. ; Dobak, A. ; Fuzi, M. and Nordmann, P. (2008) . Identification of PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from hungary and serbia . FEMS Imm. Med. Microb. 54: 330-8 .

- Lister, P.D.;** Wolter, D.J. and Hanson, N.D. (2009). Antibacterial resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin. Microbiol. Rev. 22:582-610.
- LODISE, T. P.;** MILLER, C. D.; GRAVES, J.; FURUNO, J. P.; MCGREGOR, J. C.; LOMAESTRO, B.; et al. (2007). Clinical Prediction Tool To Identify Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Respiratory Tract Infections at Greatest Risk for Multidrug Resistance. Antimicrob. Agents. Chemother. 51(2): 417–22.
- Lorian, V.** (2005). Antibiotics in laboratory medicine: Lippincott Williams & Wilkins. p: 850.
- Lowy, F.D.** (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Invest. 111:1265-73.
- Macfaddin, J.F.**(2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. 3<sup>rd</sup>.ed. The Williams and Wilkins . Baltimore, USA.
- Magiorakos, A. P.** (2011). 'MultidrugResistant (MDR), Extensively Drug Resistant (XDR) and Pandrug-1 Resistant (PDR) Bacteria in Healthcare Settings. Expert Proposal for a Standardized International Terminology,' Available online at [www.escmid.org](http://www.escmid.org).
- Mahmoud, B.A.;** Zahran, A.W.; Hindawi, R.G.; Labib, Z.A.and Galal, R. (2013). Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with nosocomial infections at a University Hospital in Egypt, with special reference to typing methods. JVM. 13. 1.
- Maniatis, T. ;** Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) . Molecular cloning : A laboratory Manual . Cold Spring Harbor Laboratory . New York .
- Martins, M. ;** Viveiros, M. ; Couto, I. ; Costa, S. S. ; Pacheco, T. ; Fanning, S. ; Pagès, J. M. and Amaral, L. (2011) . Identification of efflux pump-mediated multidrug-resistant bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method . In Vivo. 25: 171–78.
- Massimelli, M.J. ;** Beassoni, P.R. ; Forrellad, M.A. ; Barra, J.L. ; Garrido, M.N. ; Domenech, C.E. and Lisa, A.T. (2005) . Identification , cloning and expression of *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase gene . Curr. Microbiol. 50(5): 251-6.
- MITIKU, M.;** ALI, S. and KIBRU, G. (2014) .Antimicrobial Drug Resistance and Disinfectants Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Clinical and Environmental Samples in Jimma University Specialized Hospital, Southwest Ethiopia. AJBLS. 2(2): 40-5.

- Mittal, R.;** Aggarwal, S. ; Sharma, S. ; Chhibber, S. and Harjai, K. (2009) . Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* . Amini review J. Infec. publ. Heal. 2: 101-11 .
- Mochon, A. B. ;** Garner, O. B. ; Hindler, J. A. ; Krogstad, P. ; Ward, K. W. ; Lewinski, M. A. ; Rasheed, J. K. ; Anderson, K. F. ; Limbago, B. M. and Humphries, R. M. (2011) . New Delhi Metallo-B-Lactamase (NDM-1)-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Case Report and Laboratory Detection Strategies . J. Clin. Microbiol . 49(4): 1667–70 .
- Moghaddam, M. N.,** Beidokhti, M. H., Jamehdar, S. A., & Ghahraman, M. (2014). Genetic properties of *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>PER</sub>  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae by polymerase chain reaction. Iranian j. basic med. sci.17(5): 378.
- Mohammed,H.A.**(2014).Immunological and Pathological effects of Pyocyanin extracted from *Pseudomonas aeruginosa*.Thesis of Master. College of Science University of Baghdad.
- MONIRI R.;** MOSAYEBI, Z.; MOVAHEDIAN, A. H. and MOUSAVI, G. A. (2005). Emergence of Multi-Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Neonatal Septicemia. J. Infect. Dis. Antimicrob Agents.22(2): 39-44.
- MORITA, Y.;** TOMIDA, J.and KAWAMURA, Y. (2012). MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 3(408): 1-13.
- Morosini, M. I.;** Valverde, A.; GarcíaCastillo,M.; Nordmann, P. and Cantón, R. (2010). Persistent isolation of Salmonella concord harbouring CTX-M-15, SHV-12 and QnrA1 in an asymptomatic adopted Ethiopian child in Spain also colonized with CTX-M-14- and QnrB-producing Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. 65: 1545–6.
- Motaab,S.H.**(2008).Quantitative and Qualitative Assays of Bacterial Biofilm Produced by *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella* spp.J.Al-anbar university for pure science.2(3):1-7.
- Murray, P. R. ;** Baron, E. J. ; Jorgensen, J. H. ; Landry, M. L. and Pfaller, M. A. (2007) . Manual of clinical microbiology . 9<sup>th</sup>. ed. 770-803 . American Society Of Microbiology . Washington, USA .
- Murray,C.K.**(2007).Infections in burns.The Journal of trauma.62(6):73.
- Mushtaq, S.;**Ge, Y. and Livermore, D.M. (2004). Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa* in vitro : Activity against characterized isolates, Mutants and Transconjugants and resistance selection potential. Antimicrob. Agents .Chemother. 48(8):3086-92.

**Nakamura,S.;** Higashiyama,Y.; Izumikawa , K.; Seki , M.; Kakeya, H.; Yamamoto,Y. ; Yanagihara , K and Miyazaki,Y.(2008).Release extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*. Jpn. J .Infect. Dis.61:375-8.

**NATHWANI, D.;** RAMAN, G.; SULHAM, K.; GAVAGHAN, M. and MENON, V.(2014). Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. Antimicrob. Resist. Infect. Control.3(32): 1-16.

**National Committee For Clinical Laboratory Standareds.** (2002). Perfomance Standared For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS. Villanova P.A.

**NICHOLS, D. P.;** CACERES, S.; CAVERLY, L.; FRATELLI, C.; KIM, S .H.; MALCOLM, K. C.; et al., (2013). Effects of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection. J Surg Res. 183(2): 767–76.

**OCAMPO-SOSA, A. A.;** CABOT, G.; RODRIGUEZ, C.; ROMAN, E.; TUBAU F.; MACIA, M. D.; et al., (2012).Alterations of OprD in Carbapenem-Intermediate and –Susceptible Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Bacteremia in a Spanish Multicenter Study. Antimicrob. Agents Chemother. 56(4): 1703-13.

**OCHOA, S. A.;** LÓPEZ-MONTIEL, F.; ESCALONA, G.; CRUZ-CORDOVA, A.; DAVILA, L. B.; LOPEZ-MARTINEZ, B.; et al. (2013). Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 70(2):133-44.

**ODUMOSU, B. T.;** ADENIYI, B. A. and CHANDRA, R.(2013). Analysis of integrons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 12(29): 1-7.

**Oie, S.;** Fukui, Y.; Yamamoto, M.; Masuda, Y.and Kamiya, A. (2009). In vitro antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallolactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Infect. Dis.10(9):123.

**Okuda, J. ;** Hayashi, N. ; Okamoto, M. ; Sawada, S. ; Minagawa, S. ; Yano, Y. and Gotoh, N. (2010) . Translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the intestinal tract is mediated by the binding of Exo S to an Na<sup>+</sup> , K-ATPase regulator , FXYD3 . Infection Immunity . 78(11): 4511-4522 .

- Olivares, J.;** Bernardini, A.; Garcia-Leon, G.; Corona, F.; Martinez, J.L. (2013). The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 4(103):3389-10.
- PARIJA, S. C.** (2012). Textbook of Microbiology and Immunology. 2<sup>nd</sup>.ed. 316.ELSEVIER, India.
- PARK, A. J.;** SURETTE, M. D.; KHURSIGARA, C. M. (2014). Antimicrobial targets localize to the extra cellular vesicle associated proteome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in a biofilm. *Antimicrob. Res. Chemother.* 5(464): 1-12.
- Parsnjothi, S.** and Dheepa R.(2010). Screening for multidrug resistance bacteria *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patient in Hosur, Krishnagiri. *International j. pharma bio sci.*1(3):975.
- Patel, D.;** Kosmidis, C.; Seo, S.M. and Kaatz, G.W.(2010). Ethidium bromide MIC screening for enhanced efflux pump gene expression or efflux activity in *Staphylococcus aureus*.*Antimicrob. Agents. Chemother.*54: 5070- 3.
- PATERSON, D. L.** (2006). The Epidemiological Profile of Infections with MultidrugResistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* Species. *Infec. Dis. Soci. Ame.* 43(2): 43–48.
- Payne, D. J.,** Cramp, R.; Winstanley, D. J. & Knowles, D. J. (1994). Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 38(4): 767-772.
- Pearson, J.P.;** Van Delden, C.and Iglewski, B.H.(1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* 181(4):1203-10.
- Pincus, D. H.** (2011) . Microbial Identification Using The Biomérieux Vitek® 2 System . bioMérieux, Inc. Hazelwood, MO, USA . 1: 1-32.
- PITOUT, J. D. D.;** GREGSON, D. B.; POIREL, L.; MCCLURE, J.; LE, P.and CHURCH D, L.( 2005). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* Producing Metallo  $\beta$ -Lactamases in a Large Centralized Laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 43(7): 3129–35.
- Pollack, M.** (2000). *Pseudomonas aeruginosa*. In Principles and Practice of Infectious Diseases, spp. 2310 – 2335. Edited by G. L. Mandell .J. E. Bennett and R, Dolin. Philadelphia : Churchill Livingstone.
- Poole,K.**(2001).Multidrug Efflux Pumps and Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and Related Organisms. *J. Mol. Microbio. Biotech.* 3 (2) : 255-64.

- Potera, C.** (1999). Forging a link between biofilms and disease. *Science* 283(5409): 1837–8.
- Qarah, S.**(2007) . *Pseudomonas aeruginosa* infection. Medicine book 15<sup>th</sup>. ed USA.
- Rabaey, K.** and Verstracte, W. (2005). Microbial Fuel Cells: novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotech.* 23(6): 291-298.
- RAJA, N.S.** and SINGH, N. N. (2007). Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *J. Microbiol, Imm.Infect.* 40(1): 45-9.
- Rajamohan, G.;** Srinivasan, V.B.and Gebreyes, W.A.(2009). Biocide-tolerant multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains are associated with higher biofilm formation. *J. Hosp. Infect.* 73:287–9.
- Ramphal, R.** and Ambrose, P. (2006). Extended-spectrum b-lactamases and clinical outcomes: Current Data. *Clin. Infect. Dis.* 42:S164–72.
- REHM, B. H. A.**( 2008). *Pseudomonas* Model Organism, Pathogen, Cell Factory. Wiley-Vch, Weinheim. 1.
- Rezaee, M. A.;** Nejad, Q. B.; Pirayeh, Sh. N. and Owlia, O. (2002). Higher aminoglycoside resistance in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* than in Non-mucoid strains. P. Owlia PhD. Department of microbiology, faculty of medicine, Shahed University.No. 29, keshavarz bivd., Tahran, Iran.
- Rezai, M.S. ;** Salehifar, E. ; Rafiei, A. ; Langae, T. ; Rafati, M. ; Shafahi, K. and Eslami, G. (2014) . Characterization of multidrug resistant extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* among uropathogens of pediatrics in north of iran . *Biomed Research International* . 23: 4847-61 .
- Rodríguez-Baño, J.;** Navarro, M. D.; Romero, L.; Martínez-Martínez, L.; Muniain, M. A.; Perea, E. J. and Pascual, A. (2004). Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *J. Clin. Microbiol.* 42(3): 1089-94.
- Rogers, B. A.;** Sidjabat, H. E.and Paterson, D. L. (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J. Antimicrob. Chemother.* 66: 1–14.
- Roser, D.J.;** van den Akker, B.; Boase, S.; Haas, C.N.; Ashbolt, N.J. and Rice, S.A. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* dose response and bathing water infection. *Epidemiol. Infect.*;142(3):449-62.
- ROSSOLINI, G. M.** and MANTENGOLI, E. (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin.Microbiol.Infect.*11(4): 17-32.

**Sambrook, J.** and Russel, D. (2001). Detection of DNA on agarose gel. In: Sambrook J, Russel, D. W. (eds) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 514-18.

**Saderi, H.** ; Karimi, Z. ; Owlia, P. ; Bahar, M. A. ; Mohammad, S. and Rad, B. A. (2008) . Phenotypic detection of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients . Iraq J. Pathol. 3: 20-4 .

**Saleem, A. J.** (2012). Relationship Study between the Alkaline Protease Production and the Growth phases of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from patients. Advan. Microbiol. 2: 354-7.

**Salimi, H.** ; Yakhchal, B. ; Owlia, P. ; and Lari, A. R. (2010) . Molecular Epidemiology and Drug Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from burn patients . J. Labmedicine . 41(9): 540-50 .

**Salman, M.** ; Ali, A. and Haque, A. (2013) . A novel multiplex PCR for detection of *Pseudomonas aeruginosa* A major cause of wound infections . Pak. J. Med. Sci. 29(4): 957-966 .

**Sanchez, C. J.**; Mende, K.; Beckius, M. L.; Akers, K. S., and Romano, D. R. (2013). Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infect. Dis. 47: 1471-34.

**SARADHI, B. VP.** (2012) Structural and biochemical investigation of Metallo- $\beta$ -lactamases; Insights into the antibiotic binding sites. PhD Thesis, university of TROMSO, Norway. p: 10.

**Sato, T.**; Yokota, S.; Okubo, T.; Ishihara, K.; Ueno, H.; Muramatsu, Y.; Fujii, N.; Tamura, Y. (2013). Contribution of the AcrAB-TolC efflux pump to high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs and humans. J. Vet. Med. Sci. 75: 407-14.

**Sauer, K.**; Camper, A. K.; Ehrlich, G. D.; et al. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J. Bacteriol. 184(4): 1140-54.

**SCHWAGER, S. A .M.** (2012). The Use of Non-Mammalian Infection Models to Study the Pathogenicity of Members of the Genus Burkholderia and *Pseudomonas aeruginosa*. PhD Thesis, University of Zurich, Germany. P: 15.

**Senturk , S. S. U** and Gulgun, B. T. A. and Ulusoy , S . (2012). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infections. J. Infect. Dev. Ctries. 6(6): 501-7.

**SHAIKH, S.;** FATIMA, J.; SHAKIL, S.; RIZVI, S. M. D. and KAMAL, M. A.(2015).Prevalence of multidrug resistant and extended spectrum betalactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. Saudi J. Biol. Sci. 22(1): 62-4.

**Sharma, G. ;** Rao, S. ; Bansal, A. ; Dang, S. ; Gupta, S. and Gabrani, R. (2014) . *Pseudomonas aeruginosa* biofilm : potential therapeutic targets . J. Biologicals . 42(1): 1-7.

**Shiny,P.A.;**Rajendran,S. and Sarayu,L.(2016).Astudy on isolation and antibiotic sensitivity testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with respiratory tract infection with special reference to phenotypic and genotypic characterization of extended spectrum beta lactamases(ESBLs).j. med.microbiol.80-6.

**Sinde, E.** and Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluor-ethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. Food Microbiology. 17: 439–447

**Sleigh , J.D.** and Timbury, M. C. (1998). Notes on Medical Bacteriology. 5<sup>th</sup>. ed. Churchill Livingstone . 245 –52.

**Slonczewski, J.L.** and Foster, J.W. (2014) . Microbiology an evolving science. 2<sup>nd</sup> ed. Norton and company . Alabama . pp 1100 .

**SMITH, J. D.;** KUMARASIRI, M.; ZHANG, W.; HESEK, D.; LEE, M.; TOTH, M.; et al. (2013). Structural Analysis of the Role of *Pseudomonas aeruginosa* Penicillin-Binding Protein 5 in B-Lactam Resistance, Antimicrob. Agents . Chemother. 57(7): 137–3146.

**SMITH, S.;** GANIYU, O.; JOHN, R.; FOWORA, M.; AKINSINDE, K. and ODEIGAH, P.(2012). Antimicrobial Resistance and Molecular Typing of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Surgical Wounds in Lagos, Nigeria. Acta. Medica. Iranica. 50(6): 433-8.

**Song, W.;** Lee, K.; Kang, H.; Shin, D. and Kim, D.(2001). Microbiologic aspects of predominant bacteria isolated from the burn patients in Korea. Burns. 27:136-9.

**Song, J.J.;** Lee, B.D.; Lee, K.H.; Lee, J.D.; Park, Y.J. and Park, M.K. (2016). Changes in antibiotic resistance in recurrent *Pseudomonas aeruginosa* infections of chronic suppurative otitis media. Ear, Nose, Throat, J. ;95(10-11):446-51.

**Spencer,D.H.;** Kas,A.;Smith ,E.E.; Raymond ,C.K.; Sims,E.H and Hastings, M.; et al. (2003).Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J . Bacterial.185:1316–25.



**Stocks, E.J.** and Ridgway, G. (1987). Handling clinical specimen for microbiology studies; 5<sup>th</sup> ed. Churchill living stone Edinburgh .173-201.

**Stones, D.H.** and Krachler, A. (2015) . Fatal attraction: how bacterial adhesins affect host signaling and what we can learn from them . Int. J. Mol. Sci. 16: 2626-2640 .

**Stover, C.K.;** Pham ,X.Q.; Erwin, A.L.; and *et al.*(2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen.J. Nature. 406: 959-64.

**STRATEVA, T.;** YORDANOV, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. J. Med. Microbiol. 58, 1133–1148.

**Sun, S. ;** Selmer, M. and Andersson, D.I. (2014) . Resistance to  $\beta$  –lactam antibiotic conferred by point mutations in penicillin-binding proteins PBP3, PBP4 and PBP6 in *Salmonella enterica* . PLOS one . 9(5): 97202- 9.

**Suresh, M.;** Nithya, N.; Jayasree, P.R. and Manish, K.P.R.(2016). Detection and prevalence of efflux pump-mediated drug resistance in clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative bacteria from north Kerala, India. Asian J. Pharma. Clin. Res. 9(3):324-7.

**Sutherland, I.W.**(2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework.J. Microb.147:3-9.

**Tadesse, A.** and Alem, M. (2006) . Medical Bacteriology . EPHTI . Gondar University .

**TAM, V. H.;** ROGERS, C. A.; CHANG, K. T.; WESTON, J .S.; CAEIRO, J .P. and GAREY K W.(2010). Impact of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia on Patient Outcomes. Antimicrob. Agents. Chemother.54(9): 3717-22.

**Tang, J.;** Kang, M.; Chen, H.; Shi, X.; Zhou, R.; Chen, J. and Du, Y.(2011). The Staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria.Sci. China. Life. 54(9):863-9.

**Tavajjohi, Z.** Moniri, R. and Khorshidi, A. (2011). Detection and characterization of multidrug resistance and extended-spectrum-beta-lactamasae-producing(ESBLs) *Pseudomonas aeruginosa* isolates in teaching hospital. Afri.J.Microbiol.Res.5(20):23-28.

**THAM, J.** (2012). Extended-Spectrum Beta-Lactamase- Producing *Enterobacteriaceae* Epidemiology, Risk Factors, and Duration of Carriage. Thesis, LUND University, Sweden, P: 19.

**Thirapanmethee, K.** (2012) . Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Critical Tools of Bacterial Resistance . Mahidol University J. Pharma Sci . 39 (1): 1-8.

**Todar, K.** (2004). *Pseudomonas aeruginosa*. Todar online textbook of Bacteriology . Wisconsin University . U.S.A.

**Todar, K.** (2008). *Pseudomonas aeruginosa*. Todar<sup>s</sup> Online textbook of Bacteriology. University of Wisconsin- Madison Department of Bacteriology.

**Todar, K.** (2011). *Pseudomonas aeruginosa*. Todar<sup>s</sup> Online textbook of Bacteriology. University of Wisconsin- Madison Department of Bacteriology.

**Todar, K.** (2012). *Pseudomonas aeruginosa*. Todar<sup>s</sup> Online textbook of Bacteriology. University of Wisconsin- Madison Department of Bacteriology.

**Tripathi, P. ; Banerjee, G. ; Gupta, M.K. ; Saxena, S. and Ramteke, P.W.** (2013) . Assessment of phylogenetic affiliation using 16S rRNA gene sequence analysis for *Pseudomonas aeruginosa* in patients of lower respiratory tract infection .IJMR. 138(4): 557-9 .

**Truan, D. ; Vasil, A. ; Stonehouse, M. ; Vasil, M.L. and Pohl, E.** (2013) . High level over expression , purification and crystallization of a novel phospholipase C / sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa* . J. Homepade . 90: 40-60 .

**Ueda, Y. and Sunagawa, M.**(2003). In vitro and in vivo activity of novel 2-(thiazol-2-ylthio)-1-beta-methylcarbapenemes with potent activity against multiresistant gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. Aug.47 (8): 2471-8.

**Ugur, A. ; Ceylan, O. and Aslim, B.** (2012) . Characterization of *Pseudomonas spp.* from seawater of the southwest coast of turkey . J. Biol. Environ. Sci. 6(16): 15-23.

**Ullah, F., Malik, S.A. and Ahmed, J.** (2009). Antimicrobial susceptibility and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the north west of Pakistan. Burns 35(7): 1020-25.

**UPADHYAY, S.; SEN, M. R.; BHATTACHARJEE, A.** (2010). Presence of different beta-lactamase classes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* expressing AmpC beta-lactamase enzyme. J. Infect. Dev. Ctries, 4(4): 239-242.

**VAEZ, H.; FAGHRI, J.; ISFAHANI, B. N.; MOGHIM, S.; YADEGARI, S.; FAZELI, H and et al.** (2014). Efflux pump regulatory genes mutations in multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections in Isfahan hospitals. Advan. Biomed. Res. 3(117): 1-5.

**Vila, J. and Martinez, J.L.**(2008). Clinical impact of the over-expression of efflux pump in nonfermentative Gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. Curr. Drug Targets . 797–807.

- Wassef,M.;**El Mahallawy,H.;Zafer,M.;Ghaith,D. and Abdel hamid,R.(2015).Lab Based Surveillance of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Cario University Hospitals,Egypt.J.Microbiol.Exp.2(2):00039.
- WEI, A.;** MA, L. Z. (2013). Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Mol. Sci. 14(10): 20983-1005.
- Wolfgang, M.C.;** Kulasekara, B.R. ; Liang , X.;Boyd, D.; Wu, K and Yang Q,*et al.*(2003).Conservation of genome content and virulencedeterminants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.Proc. Nat. Acad .Sci. USA.100:8484.
- Woo, P.C.Y. ;** Lau, S.K.P. ; Teng, J.L.L. ; Tse, H. and Yuen, K.Y. (2008) . Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories . J. Compilation . 14: 908-34.
- Woodford, N.;** Turton, J. F. and Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol. Rev. 35. 736–55.
- Yamamoto, Y.** (2002) . PCR in diagnosis of infection : detection of bacteria in cerebrospinal fluids . Clini. Lab. Imm. 9(3): 508-14 .
- Yang,L.**(2009).*Pseudomonas aeruginosa* quarm sensing .A factor in biofilm development and an antipathogenic drug target. PH.D thesis Department of system Biology .technical university of Denmark.
- Yousefi, S.;** Farajnia, S.; Nahaei, MR.; Akhi ,MT.; Ghotaslou, R.; Soroush, MH.; Naghili, B.; Jazani, NH. (2010). Detection of metallo- $\beta$ -lactamaseencoding genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in northwest of Iran. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 68(3): 322-5.
- Zervosen, A. ;** Sauvage, E. ; Frere, J. ;Charlier, P. and Luxen, A. (2012) . Development of new drugs for an old target – the penicillin binding prpteins . J. Molecules . 17: 12478-12505 .
- ZHAO, W.;** HU, Z. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 39(1): 79–101.

## الملاحق

ملحق 1 : إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى

رقم العينة .

اسم المريض .

العمر .

الجنس .

السكن .

نوع العينة .

تاريخ جمع العينة .

مكان العزل .

ملحق 2: الفحوصات الكيموحيوية التي يقوم بها جهاز VITEK 2

تركيز المركب	المختصر	اسم الاختبار	رقم الحفرة
0.0384 mg	APPA	Ala –Phe-Pro-ARYLAMIDASE	2
0.1875 mg	ADO	ADONITOL	3
0.018 mg	PyrA	L-Pyrrolydonyl –ARYLAMIDASE	4
0.3 mg	IARL	L-ARABITOL	5
0.3 mg	dCEL	D-CELLOBIOSE	7
0.036 mg	BGAL	BETA –GALACTOSIDASE	9
0.0024 mg	H2S	H2S PRODUCTION	10
0.0408 mg	BNAG	BETA -N –ACETYL - GLUCOSAMINDASE	11
0.0324 mg	AGLTp	Glutamyl Arylamidase Pna	12
0.3 mg	Dglu	D-GLUCOSE	13
0.0223 mg	GGT	GAMMA -GLUTAMYL - TRANSFERASE	14
0.45 mg	OFF	FERMENTATION /GLUCOSE	15
0.036 mg	BGLU	BETA -GLUCOSIDASE	17
0.3 mg	dMAL	D –MALTOSE	18
0.1875 mg	Dman	D-MANNITOL	19
0.3 mg	Dmne	D-MANNOSE	20
0.0324 mg	BXYL	BETA –XYLOSIDASE	21
0.0174 mg	BAIap	BETA-Alanine aryamidase Pna	22
0.0234 mg	ProA	L-Proline ARYLAMIDASE	23
0.0192 mg	LIP	LIPASE	26
0.3 mg	PLE	PALATINOSE	27
0.0276 mg	TyrA	Tyrosine ARYLAMIDASE	29
0.15 mg	URE	UREASE	31
0.1875 mg	dSOR	D-SORBITOL	32
0.3 mg	SAC	SACCHAROSE /SUCROSE	33

0.3 mg	dTAG	D-TAGATOSE	34
0.3 mg	Dtre	D-TREHALOSE	35
0.054 mg	GIT	CITRATE (SODIUM)	36
0.15 mg	MNT	MALONATE	37
0.3 mg	5RG	5-KETO –D –GLUCONATE	39
0.15 mg	ILATK	L-LACTATE alkalipisation	40
0.036 mg	AGLU	ALPHA –GLUCOSIDASE	41
0.15 mg	SUCT	SUCCINATE alkalipisation	42
0.0306 mg	NAGA	Beta –N-ACETYL – GALACTOSAMINIDASE	43
0.036 mg	AGAL	ALPHA-GALACTOSIDASE	44
0.0504 mg	PHOS	PHOSPHATASE	45
0.012 mg	GlyA	Glycine ARYLAMIDASE	46
0.3 mg	ODC	ORNITHINE DECARBOXYLASE	47
0.15 mg	LDC	LYSINE DECARBOXYLASE	48
NA	ODEC	DECARBOXYLASE BASE	52
0.087 mg	IHISa	L-HISTIDINE assimilation	53
0.126 mg	CMT	COURMARATE	56
0.0378 mg	BGUR	BETA –GLUCORONIDASE	579
0.0105 mg	O129 R	O/129 RESISTANCE (comp. vibrio.)	58
0.0576 mg	GGAA	GLU-GLY-Arg-ARYLAMIDASE	59
0.042 mg	IMLTa	L-MALATE assimilation	61
0.03 mg	ELLM	ELLMAN	62
0.186 mg	ILATa	L-LACTATE assimilation	64

ملحق 3: نتيجة التشخيص الجرثومي بواسطة جهاز VITEK 2

bioMerieux Customer

System#:11612  
14,2016

Printed Jan

Patient Name:178

Printed by Lab Admin

Isolate Group:178-1

Patient ID:44

Card Type GN Testing Instrument:0000148FF4B8(10140)

Bionumber:0043053003500240

Organism Quantity:

Comments:	Oksidaz(+) Kural 31		
Identification Information	Card: GN	Lot Number: 241330940	Expires: Jan 5,2016 12:00 AST
	Completed:Jan 10,2016 14:51 ADS	Status: Final	Analysis Time: 4.75 hours
Selected Organism	99% Probability Pseudomonas aeruginosa Bionumber: 0043053003500240 Confidence:Excellent Identification		
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern (s)			

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

Installed VITEK 2 Systems Version:07.01

Therapeutic Interpretation Guideline:

MIC Interpretation Guideline:

AES Parameter Last Modified:

AES Parameter Set Name :

Page 1 of 1

ملحق 4 : نتائج اختبار حساسية العزلات لمضادات الحياة

حساسية العزلات الجرثومية للمضادات الحيوية										نوع العزلة
PI	TI	AT	MEM	IPM	CEC	CEP	CL	CTX	CAZ	
I	I	S	S	S	S	R	R	R	R	Pu
R	R	I	S	S	R	R	R	I	R	Pe
I	I	I	S	S	I	R	R	S	R	Pe
I	I	S	S	S	S	R	R	R	R	Pw
I	R	R	I	S	R	R	R	R	R	Pe
S	I	S	S	S	S	R	R	R	S	Pe
S	R	S	S	S	I	R	R	I	R	Pe
S	I	I	S	S	S	R	R	R	R	Pe
R	R	I	S	S	S	R	R	I	R	Pe
I	I	S	S	S	I	R	R	I	R	Pu
I	I	I	S	S	I	R	R	I	R	Pe
I	I	S	S	S	S	R	R	I	R	Pe
I	S	S	S	S	S	R	R	I	R	Pu
I	S	I	S	S	S	R	R	I	R	Pe
S	R	I	S	S	I	R	R	I	S	Pb
R	S	I	S	S	S	R	R	I	R	Pe
I	S	S	S	S	S	R	R	I	R	Pe
R	I	I	S	S	R	R	R	I	R	Pu
I	S	I	S	S	I	R	R	I	R	Pu
I	S	I	S	S	S	R	R	I	R	Pe

ملحق 5 : اعداد ونسب العزلات الحساسة والمقاومة لمضادات الحياة

عدد العزلات (%)				مضادات الحياة
P value	حساسة	متوسطة الحساسية	مقاومة	
0.001	2(10)	0(0)	18(90)	CAZ



0.001	1(5)	14(70)	5(25)	CTX
1.00	0(0)	0(0)	20(100)	CL
1.00	0(0)	0(0)	20(100)	CEP
0.086	11(55)	6(30)	3(15)	CEC
1.00	20(100)	0(0)	0(0)	IPM
0.001	19(95)	1(5)	0(0)	MEM
0.019	8(40)	11(55)	1(5)	AT
0.031	6(30)	9(45)	5(25)	TI
0.041	4(20)	12(60)	4(20)	PI

ملحق 6: عوامل الضراوة لجراثيم الزائفة الزنجارية

Virulence factors					نوع العزلة	رقم العزلة
Hemolysin	Biofilm	Efflux pumps	Protease	Gelatinase		
+	Weak	High	-	+	Pu	1

+	Weak	High	+	-	Pe	2
+	Strong	Intermediate	+	+	Pe	3
+	Weak	High	+	+	Pw	4
+	Weak	High	+	-	Pe	5
+	Strong	High	+	+	Pe	6
+	Weak	High	+	+	Pe	7
+	Weak	High	+	+	Pe	8
+	Weak	High	+	-	Pe	9
+	Strong	High	-	+	Pu	10
+	Weak	High	+	+	Pe	11
+	Weak	High	-	-	Pe	12
+	Weak	High	+	-	Pu	13
+	Weak	High	+	-	Pe	14
+	Weak	High	+	-	Pb	15
+	Weak	High	+	-	Pe	16
+	Weak	Intermediate	-	-	Pe	17
+	Strong	Low	+	-	Pu	18
+	Weak	High	+	-	Pu	19
+	Strong	High	-	+	Pe	20
100%(+)	25%(Strong) 75%(Weak)	85%(High) 10%(Int.) 5%(Low)	75%(+) 25%(-)	45%(+) 55%(-)	%	

ملحق 7: تراكيز الحامض النووي DNA وقيم الامتصاصية في جهاز Nanodrop spectrophotometer

التركيز / $\mu\text{ng}$	الامتصاصية 260/280	رقم العينة
1.5	1	1
2	1.01	2
2.5	1.15	3
1.8	1.61	4
1.3	1.22	5
2.8	2.1	6
1.4	2.4	7
1.6	2.08	8

1.55	2.2	9
1.9	1.65	10
2.2	1.5	11
1.67	2	12
2.23	2.3	13
2.2	1.7	14
2.5	1.8	15
1.6	1.3	16
2.23	2.2	17
2.6	2	18
1.9	1.9	19
1.2	1.08	20

## Summary

This study was conducted in Baquba General Teaching Hospital and Outpatients' Clinic for the period starting from September 2015 to April 2016. This study was suggested due to the important role of *P. aeruginosa* in a wide spectrum of clinical infections beside its increasing resistance against the commonly used antibiotic, therefore this study was aimed to highlights to find out the most precise laboratory procedure for bacterial diagnosis, figure out the antimicrobial resistance of locally isolated bacterial strains toward certain  $\beta$ -lactame antibiotics, determine the minimum inhibitory concentration (MIC) for some of these antibiotics, detection and study the virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*, and study the existence of antibiotic resistant genes.

the isolation and identification procedures and to figure out the extent of antibiotic resistance against the  $\beta$ -lactams through detection of certain genes that may encode for production of  $\beta$ -lactams destroying enzymes. The study was also arranged to explore the association between the production of virulence factors and the development of antibiotic resistance of *P. aeruginosa*.

One hundred seventy six clinical specimens were included in this study. These were collected from different clinical sources including burns, wounds, ear and urinary tract infections. 65.34% (115) of the patients were males and 34.66% (61) were females. The age range of the patients was 10-60 years. 14.77% were inpatients and 85.23% were outpatients. All clinical specimens were initially cultured on blood agar, MacConkey agar and the basic *Pseudomonas* agar plates. The colony morphology was thoroughly investigated. Others bacteriological and biochemical tests were done according to standard procedures which include catalase, oxidase and IMViC tests. Final diagnosis and confirmation of the isolated was achieved by using the VITEK 2 (Biomeriex-France) plus the detection of 16s rDNA gene, by commercial polymerase chain reaction.

Twenty isolates of *P. aeruginosa* were recovered, 55% were from males and 45% from female of different ages. The bacterial diagnosis of all these isolates (100%) were confirmed by VITEK2, beside its possession of the 16s rDNA gene as determined by molecular detection. The isolation rate from burn, ear, urinary tract, and wound infections were 18.18%, 11.60%, 10.81%, and 6.25% respectively with significantly statistical difference ( $P= 0.0001$ ).

The antibiotic susceptibility patterns for 10  $\beta$ -lactams were carried out using the Kerby-Bauer technique, and the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the Cefotaxime and Ceftrazidime were determined by serial double dilutions technique. The antibiotic resistance of *P. aeruginosa* isolates to cephalosporines was appeared to be variable, so that the resistant rate to Ceftazidime, Cefatoxime, Cephalexin, Cephalothin and Cefaclor were 90%,

25%, 100%, 100%, and 15% respectively. The mean  $\pm$  SD of MIC for Cefatoxime was (78 $\pm$ 119.6), and for Ceftazidime was (74 $\pm$ 266.0).

Additionally, all *P. aeruginosa* isolates were investigated for the production of virulence factors which include production of proteinases on skimmed milk medium, production of gelatinase on gelatin medium, and production of hemolysin on blood agar supplemented with 5% of human blood, the ability for the biofilms formation using the microtiter plate method, and the detection of efflux pumps by cart wheel technique (ET-BR). Furthermore, the detection of the detection of broad spectrum  $\beta$ -lactamases was performed by compact CD method, and the detection of metallo  $\beta$ -lactamases Combined EDTA disk test (CMDT), 55% of the isolates were appeared to have the ability for broad spectrum  $\beta$ -lactamases, while none of the isolates produce the metallo  $\beta$ -lactamases. Furthermore, 100% of the isolates were biofilms former, and 95% of the isolates possess the efflux pumps.

Finally, the DNA of the *P. aeruginosa* isolates which appeared to be resistant to both Cefotaxime and Ceftrazidime was extracted and the presence of *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-3</sub> genes was detected using polymerase chain reaction (PCR) and the size of the genes were determined using an ultraviolet light source. The isolates possession rate for *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *bla*<sub>CTX-M-3</sub> were 72.7% and 63.63% respectively.

The present study has yielded several outcomes; of these are, the *P. aeruginosa* isolates has multiple virulence factors including biofilms formation, high and intermediate efficient efflux pumps. Moreover, the majority of these isolated were resistant to most  $\beta$ -lactam antibiotics which was directly proportionate with the number of virulence factors. Additionally the majority of these isolates were extended  $\beta$ -lactamase producers (ES $\beta$ Ls) as detected by phenotypic assays. Furthermore, the molecular detection revealed the presence of specific genes coding for expressing of these enzymes, e.g. *bla*<sub>CTX-M-1</sub> and *bla*<sub>CTX-M-3</sub>. There was a direct relationship between the production of ES $\beta$ Ls and the resistance to the  $\beta$ -lactam antibiotics, suggesting the existence of a relationship between multiple antibiotic resistance and the production of ES $\beta$ Ls by *P. aeruginosa* isolates.



Republic of Iraq  
Ministry of Higher Education  
and Scientific Research  
Diyala University  
College of Science



**Detection of *CTX-M-1* and *CTX-M-3* genes in  
virulent , Multidrug resistant *Pseudomonas  
aeruginosa* isolates**

*A Thesis*

*Submitted to the Department of Biology, College of Science, Diyala  
University, in Partial Fulfillment of Requirements for the Degree of  
Master of Science in Biology*

*By*

***Zainab Mohammed Hameed***

*Supervised By*

**Assist.Prof.Dr. Hadi Rahman Rasheed Al-taai**

2017 A. D.

1438