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

دراسة بكتريولوجية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في مدينة بعقوبة وضواحيها .

رسالة مقدمة الى

كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الأحياء المجهرية

من قبل

لينا عبدالأمير سلمان السعدي

بكالوريوس علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ديالى 2004 – 2005

بإشراف

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

محرَم/1433هـ **كانون الأول/2011 م**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿وَلَوْ أَنَّمَا فِي الْأَرْضِ مِن شَجَرَةٍ أَقْلَامٌ وَالْبَحْرُ يَمُدُّهُ مِن بَعْدِهِ سَبْعَةُ أَبْحُرٍ مَّا نَفِدَتْ كَلِمَاتُ اللَّهِ إِنَّ اللَّهَ عَزِيزٌ حَكِيم ﴾.

صَدَقَ اللَّهُ العَظِيمْ

من سورة لقمان

الآية (27)

الإهداء

الى ... من دعائهم سر نجاحي وتوفيقي

ورضاهــم عنــي غايتي ورجائي

وأبهى من ابصرته عيني ... والدي العزيز

ووالدتي العزيزة

الى... من هم أغلى علي من نفسي

من كان عونا لي في شدتي

تاج رأسي ونبراس دربي ... زوجي سيف

وولدي محمد

الى ... المصابيح النيرة التي أضاءت لي الدرب وزادتني

طموحا وتفاؤلا ... اخوانــي بشار وأحمد

واختــي فرح

الى... شمس العلم المضيئة على مر الزمان ... أساتذتي– حفظهم الله

أهدي ثمرة جهدي المتواضع هذا وفاءً وعرفاناً بالجميل ...

لينا

إقرار المشرفين على الرسالة

نشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية .

التوقيع :

المشرف : د. عدنان نعمة عبدالرضا العزاوي

اللقب العلمي : أستاذ

كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

التاريخ : / / 2012

التوقيع :

المشرف : د.هادي رحمن رشيد الطائي

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

كلية العلوم / جامعة ديالى

التاريخ : / / 2012

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الأسم : د. نجم عبدالله الزبيدي

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

رئيس لجنة الدراسات العليا – رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / 2012

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة ، أننا إطلعنا على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونعتقد إنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية بدرجة (امتياز) .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الأسم : د. عباس عبود فرحان

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ : / / 2012

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم : د. محمد فرج المرجاني

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ : / / 2012

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم : د. محمد عبدالدايم صالح

المرتبة العلمية : مدرس

التاريخ : / / 2012

عضو اللجنة المشرف

التوقيع :

الأسم : د.عدنان نعمة عبدالرضا العزاوي

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2012

عضو اللجنة المشرف

التوقيع :

الأسم : د.هادي رحمن رشيد الطائي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2012

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع :

الأسم : د. عباس عبود فرحان

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ :

فهرست المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
الفصل الاول : المقدمة		
1	**المقدمة**	**1**
الفصل الثاني : أستعراض المراجع		
2	استعراض المراجع	**3**
1.2	بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*	**3**
2.2	وبائية بكتريا الزوائف الزنجارية Epidemiology of *P .aeruginosa*	**4**
3.2	الأمراض المتسببة عن بكتريا الزوائف الزنجارية	**5**
1.3.2	الإصابات الجلدية Skin Infections	**5**
2.3.2	إصابات المجاري البولية Urinary Tract Infections	**6**
3.3.2	إصابات الاذن Ear Infections	**6**
4.3.2	الأمراض الأخرى المتسببة عن بكتريا الزوائف الزنجارية	**6**
4.2	عوامل الضراوة في بكتريا الزوائف الزنجارية	**7**
1.4.2	عوامل الإلتصاق والأستيطانAdhesion & Colonization Factors	**8**
2.4.2	أنزيم الليسيثينيز Lecithinase Enzyme	**8**
3.4.2	إنتاج الهيمولايسين Hemolysin Production	**9**
4.4.2	انزيم البروتييز Protease Enzyme	**9**
5.4.2	انزيم اليورييز urease Enzyme	**10**
5.2	المضادات الحيوية Antibiotics	**11**
1.5.2	مضادات البيتالاكتام β-Lactam Antibiotic	**11**
1.1.5.2	البنسلينات Penicillins	**12**
1.1.1.5.2	البنسلينات محددة الطيفNarrow Spectrum Penicillins	**12**
1.1.1.1.5.2	البنسلينات الطبيعية Natural Penicillins	**12**
2.1.1.1.5.2	البنسلينات ضد المكورات العنقودية Anti Staphylococcal Penicillins	**12**
2.1.1.5.2	بنسلينات واسعة الطيف Broad spectrum Penicillins	**13**

3.1.1.5.2	البنسلينات ضد الزوائف Anti Pseudomonal Penicillins	**13**
1.3.1.1.5.2	مجموعة كاربوكسي بنسلين Carboxy Penicillins	**13**
2.3.1.1.5.2	مجموعة اليوريدوبنسلين Ureido Penicillins	**13**
2.1.5.2	السيفالوسبورينات Cephalosporins	**14**
1.2.1.5.2	سيفالوسبورينات الجيل الاول First generation cephalosporins	**14**
2.2.1.5.2	سيفالوسبورينات الجيل الثانيSecond generation cephalosporines	**15**
3.2.1.5.2	سيفالوسبورينات الجيل الثالث Third generation cephalosporins	**15**
4.2.1.5.2	سيفالوسبورينات الجيل الرابع Fourth generation cepalosorines	**15**
5.2.1.5.2	سيفالوسبورينات الجيل الخامس Fifth generation cephalosporins	**16**
3.1.5.2	الكربابنيم Carbapenems	**16**
4.1.5.2	المونوباكتام Monobactam	**16**
5.1.5.2	الكارباسفيم Carbacephems	**17**
2.5.2	الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides	**17**
3.5.2	الكوينولونات Quinolones	**18**
4.5.2	السلفوناميد والتراي مثيريم Sulfonamides & Trimethoprime	**18**
5.5.2	النيتروفيورانتوين Nitrofurantoin	**18**
6.2	مقاومة الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية *P.aeruginosa* Antibiotic Resistance	**19**
1.6.2	إنتاج أنزيمات محللة لبعض انواع مضادات الحياة	**20**
2.6.2	تحوير الموقع الهدف لعمل المضاد Modification of antibiotic target	**20**
3.6.2	التحوير في حاجز النفاذية Alteration in Permeablity barrier	**21**
4.6.2	مضخات الدفق Drug Efflux Pumps	**21**
5.6.2	زيادة إنتاج المواد التنافسية Increase Production Of Competitive Compounds	**22**
6.6.2	الطبقة المخاطية Slime layer	**23**
7.2	أنزيمات البيتالاكتاميز β -Lactamase Enzyme	**23**
1.7.2	آلية عمل أنزيم البيتالاكتاميز The Mechanism of β-Lactamase Action	**23**
2.7.2	تصنيف أنزيمات البيتالاكتاميز Classification of β -Lactamase	**24**

4.7.2	العوامل الوراثية المسيطرة على أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز	25
1.4.7.2	أنزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية Chromosomal β -Lactamase	25
2.4.7.2	أنزيمات البيتالاكتاميز البلازميدية β-Lactamase–Plasmid-mediated	26
3.4.7.2	أنزيمات البيتالاكتاميز التي تتواسطها جينات قافزة	26
4.4.7.2	أنزيمات البيتالاكتاميز التي تتواسطها الأنتجرونات	27
5.7.2	أنزيمات البتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs	27
8.2	مثبطات البيتالاكتاميز β-Lactamase Inhibitors	29
1.8.2	مثبط حامض الكلافيولنك Clavulanic acid	29
2.8.2	السلباكتام Sulbactam	30
3.8.2	التازوباكتم Tazobactam	30
9.2	النسق البلازميدي لبكتريا الزوائف الزنجارية	31
10.2	تحييد البلازميدات Plasmids curing	32
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل		
1.3	الأجهزة والمواد المستعملة	33
1.1.3	الأجهزة المستعملة	33
2.1.3	المواد الكيمياوية والبايلوجية	34
3.1.3	الأوساط الزرعية	35
4.1.3	الكواشف والمحاليل	35
5.1.3	المضادات الحيوية	36
1.5.1.3	اقراص المضادات الحيوية المستخدمة واقطار منطقة التثبيط القياسية	36
2.5.1.3	مساحيق المضادات الحيوية	37
6.1.3	المثبطات Inhibitors	37
7.1.3	السلالات القياسية	38
8.1.3	مواد متفرقة	38
1.8.1.3	عدة التشخيص api 20NE Kit	38
2.8.1.3	عدة عزل الدنا البلازميدي Plasmid Extraction	38
3.8.1.3	مصدر الدم	38
2.3	طرائق العمل	39
1.2.3	تحضير المحاليل والكواشف	39
1.1.2.3	المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline	39

2.1.2.3	محلول ثابت العكورة القياسي Macfarland Standard	**39**
3.1.2.3	محاليل المضادات الحيوية	**39**
4.1.2.3	محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز	**40**
1.4.1.2.3	محلول النشأ Starch Solution	**40**
2.4.1.2.3	محلول اليود Iodine Solution	**40**
3.4.1.2.3	محلول البنسلين جي (Penicillin G Solution)	**40**
5.1.2.3	محاليل عزل الدنا البلازميدي	**41**
6.1.2.3	محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions	**41**
7.1.2.3	كاشف أنزيم الكاتاليز Catalase Reagent	**41**
8.1.2.3	كاشف الاوكسيديز Oxidase Reagent	**42**
2.2.3	الاوساط الزرعية	**42**
1.2.2.3	وسط أكار الدم Blood base agar	**42**
2.2.2.3	وسط مرق لوريا Lauria Broth	**43**
3.2.2.3	وسط أكار اليوريا Urea base Agar	**43**
4.2.2.3	وسط ماء الببتون Pepton water	**43**
5.2.2.3	وسط المثيل الاحمر – فوكس بروسكاور السائل MR-VP Broth	**43**
6.2.2.3	وسط أكار السيدوموناس *Pseudomonas* isolation agar	**44**
7.2.2.3	وسط أكار الحليب الخالي من الدهن skim milk Agar media	**44**
8.2.2.3	وسط أكار البيض Egg Yolk agar	**44**
3.2.3	جمع العينات	**44**
4.2.3	زرع العينات Samples culture	**45**
5.2.3	حفظ وإدامة العزلات البكتيرية	**45**
6.2.3	تشخيص العزلات البكتيرية	**45**
1.6.2.3	الفحوصات المورفولوجية	**45**
2.6.2.3	الفحوصات الكيموحيوية	**45**
1.2.6.2.3	إختبار أنزيم الكاتاليز Catalase test	**45**
2.2.6.2.3	إختبار أنزيم الاوكسيديز Oxidase test	**46**
3.2.6.2.3	إختبار الاندول Indole test	**46**

4.2.6.2.3	إختبار احمر المثيل Methyl red test	46
5.2.6.2.3	اختبار فوكس بروسكاور Voges –Proskaur test	46
6.2.6.2.3	إختبار استهلاك السترات Citrate Utilization test	47
3.6.2.3	التشخيص بنظام Api-20NE	47
7.2.3	التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا الزوائف الزنجارية	48
1.7.2.3	التحري عن أنزيم الليسيثينيز Lecithenase Production test	48
2.7.2.3	التحري عن إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production	48
3.7.2.3	التحري عن أنزيم البروتييز Protease Production test	48
4.7.2.3	اختبار قابلية العزلات على الالتصاق بالخلايا الطلائية	48
1.4.7.2.3	تحضير الخلايا الطلائية	48
2.4.7.2.3	إختبار الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية	49
5.7.2.3	اختبار تلازن كريات الدم الحمر Hemagglutination test	49
1.5.7.2.3	تحضير كريات الدم الحمر للانسان	49
2.5.7.2.3	اختبار تلازن كريات الدم الحمر	49
6.7.2.3	التحري عن أنزيم اليوريز Urease test	50
8.2.3	فحص الحساسية لمضادات الحياة Antibiotic suscepitibility test	50
9.2.3	التحري عن إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز β-Lactamase Production	50
1.9.2.3	الفحص الاولي الخاص بانتقاء العزلات المقاومة لمضادات البيتالاكتام	50
1.1.9.2.3	تحضير العالق البكتيري	51
2.1.9.2.3	تلقيح الاوساط الزرعية	51
2.9.2.3	إستخدام طريقة اليود القياسية السريعة للكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز	51
10.2.3	التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs)	52
11.2.3	قياس التركيز المثبط الادنى Minimal Inhibitory Concentration	52
1.11.2.3	قياس التركيز المثبط الادنى بدون مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز	52
2.11.2.3	قياس التركيز المثبط الادنى مع مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز	53
12.2.3	إستخلاص الدنا البلازميدي Extraction Plasmid DNA	54
13.2.3	الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي في هلام الاكاروز Gel Electrophoresis	55
14.2.3	تحييد الدنا البلازميدي Curing of Plasmid DNA	55

15.2.3	التحليل الإحصائي	56
الفصل الرابع : النتائج والمناقشة		
4	النتائج والمناقشة	57
1.4	عزل وتشخيص بكتريا الزوائف الزنجارية	57
1.1.4	العزل Isolation	57
2.1.4	التشخيص Identification	57
3.1.4	توزيع العزلات حسب موضع الاصابة	59
2.4	التحري عن بعض عوامل الضراوة المهمة لبكتريا الزوائف الزنجارية	61
1.2.4	إنتاج انزيم الليسيثينيز Lecithinase Production	62
2.2.4	إنتاج الهيمولايسين Hemolysin Production	62
3.2.4	انتاج انزيم البروتييز Protease Production	62
4.2.4	اختبار قابلية العزلات على الالتصاق بالخلايا الطلائية	63
5.2.4	اختبار التلازن الدموي Slid hemagglutination test	64
6.2.4	انتاج انزيم اليوريييز Urease Production	65
3.4	حساسية بكتريا الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية	68
4.4	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية	71
5.4	النسق السائد للمقاومة المتعددة لبكتريا *P.aeruginosa* للمضادات الحيوية	73
6.4	الانتقاء الاولي للعزلات المقاومة لمضاد الامبسلين	74
7.4	التحري عن أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز	74
8.4	التحري عن انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف	78
9.4	تحديد التراكيز المثبطة الدنيا لعدد من المضادات الحيوية	80
1.9.4	بدون وجود المثبطات	80
2.9.4	تحديد التراكيز المثبطة الدنيا بوجود مثبطات انزيمات البيتالاكتاميز	84
1.2.9.4	السلباكتام/ الامبسلين Ampicillun/Sulbactam	85
2.2.9.4	حامض الكلافيولنك/الأموكزاسلين Amoxicillin/Clavulanic acid	86
3.2.9.4	حامض الكلافيولنك/الكاربنسلين Carbencillin/Clavulanic acid	87
4.2.9.4	حامض الكلافيولنك/السيفالكسين Cephalexin/Clavulanic acid	88
5.2.9.4	حامض الكلافيولنك/السيفوتاكسيم Cefotaxim/Clavulanic acid	89
6.2.9.4	حامض الكلافيولنك/السيفترياكسون Ceftriaxon/Clavulanic acid	90
7.2.9.4	حامض الكلافيولنك/السيفتازديم Ceftazidim/Clavulanic acid	91
8.2.9.4	حامض الكلافيولنك/الببراسلين Pipracillin/Clavulanic acid	93
9.2.9.4	التازوباكتام / الببراسلين Pipracillin/Tazobactam	94

10.4	النسق البلازميدي لبكتريا الزوائف الزنجارية	**95**
11.4	تحييد البلازميدات Plasmids curing	**97**
الاستنتاجات والتوصيات		
الاستنتاجات		**99**
التوصيات		**101**
المصادر		
المصادر العربية		**102**
المصادر الاجنبية		**103**

قائمة الأشكال

التسلسل	العنوان	الصفحة
1.4	نتيجة تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* بنظام api 20 NE	58
2.4	الخلايا الطلائية كسيطرة سالبة تحت العدسة الزيتية (100X)	63
3.4	نتيجة اختبار موجبة لألتصاق بكتريا *P.aeruginosa* بالخلايا الطلائية الظهارية	64
4.4	كريات الدم الحمراء الطبيعية (Controle) تحت القوى 40X	64
5.4	نتيجة أختبارموجبة لتلزين كريات الدم الحمراء تحت القوى 40X	65
6.4	النسب المئوية لمقاومة بكتريا الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية المختلفة	70
7.4	فحص التحري عن أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز	75
8.4	النسبة المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز	76
9.4	النسبة المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف	79
10.4	أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف للعزلة المحلية *P.aeruginosa*	79
11.4	التأثير التآزري لمضاد الأموكزاسلين و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	86
12.4	التأثير التآزري لمضاد الكاربنسلين و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا*Pseudomonas aeruginosa*	88
13.4	التأثير التآزري لمضاد السيفالكسين و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	89
14.4	التأثير التآزري لمضاد السيفوتاكسيم و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	90
15.4	التأثير التآزري لمضاد السيفترياكسون وحامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	91
16.4	التأثير التآزري لمضاد السيفتازديم وحامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	92
17.4	التأثير التآزري لمضاد الببراسلين وحامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	93
18.4	التأثير التآزري لمضاد الببراسلين والتازوباكتام ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	94
19.4	المحتوى البلازميدي لبعض عزلات بكتريا *P.aeruginosa*	96
20.4	فقدان الحزم البلازميدية لعزلات *P.aeruginosa* المحيدة	98

قائمة الجداول

التسلسل	العنوان	الصفحة
1.4	الأختبارات الكيموحيوية والزرعية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	59
2.4	مصدر عزل جراثيم الزوائف الزنجارية من الحالات المرضية المختلفة مع النسب المئوية للأصابة	60
3.4	قابلية عزلات *Pseudomonas aeruginosa* على إنتاج بعض عوامل الضراوة	66
4.4	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي اظهرتها عزلات بكتريا *P.aeruginosa*	72
5.4	تقسيم العزلات المحلية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* الى مجموعتين على اساس عدد المضادات التي تقاومها	73
6.4	النسق السائد للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ضمن المجموعة	74
7.4	قابلية العزلات المحلية لبكتريا *P. aeruginosa* على إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز β- Lactamase	77
8.4	قابلية عزلات *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة محليا"على انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف – Extended – spectrum β luctamase	80
9.4	قيم M. I .C لبعض المضادات الحيوية المستخدمة Drug of Choice في علاج الألتهابات المتسببة عن بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	83
10.4	النسب المئوية للتأثير الخلطي لمثبطات البيتالاكتاميز / المضاد على حساسية عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* للمضادات الحيوية	85
11.4	يوضح القيمة التائية بين Amoxicillin وAmoxicillin/Clavulanicacid عند مستوى الدلالة 5% ، 1%.	87
12.4	يوضح القيمة التائية بين Carbencillin و Clavulanic acid/ Carbencillin عند مستوى الدلالة 5% ، 1%	88
13.4	يوضح القيمة التائية بين Cephalexinو Cephalexin/Clavulanic acid عند مستوى الدلالة 5% ، 1%	89
14.4	يوضح القيمة التائية بين Cefotaximeو Cefotaxime/Clavulanic acid عند مستوى الدلالة 5% ، 1%	90
15.4	يوضح القيمة التائية بين Ceftriaxoneو Ceftriaxone/Clavulanic acid عند مستوى الدلالة 5% ، 1%	91
16.4	يوضح القيمة التائية بين Ceftazidime وClavulanic acid/ Ceftazidime عند مستوى الدلالة 5% ، 1%	92
17.4	يوضح القيمة التائية بين Pipracillinو Pipracillin/ Clavulanic acid عند مستوى الدلالة 5% ، 1%	93

18.4	يوضح القيمة التائية بين Pipracillinو Pipracillin/ Tazobactam عند مستوى الدلالة 5% ، 1%	**95**
19.4	المحتوى البلازميدي لبكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من أخماج مختلفة	**97**

قائمة الملاحق

التسلسل	العنوان
1	إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى
2	نتائج تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* بنظام Api 20NE
3	مقاومة عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* للمضادات الحيوية المختلفة.
4	يبين التأثير الخلطي لمثبط Amoxicillin + Clavulanic acid (Augmentin)وبنسبة (1 : 2)
5	يبين التأثير الخلطي لمثبط Cephalexin + Clavulanic acid وبنسبة (4:1)
6	يبين التأثير الخلطي لمثبط Carbencillin + Clavulanic acid وبنسبة (4:1)
7	يبين التأثير الخلطي لمثبط Cefotaxime + Clavulanic acid وبنسبة (4:1)
8	يبين التأثير الخلطي لمثبط Ceftriaxone + Clavulanic acid وبنسبة (4:1)
9	يبين التأثير الخلطي لمثبط Ceftazidime + Clavulanic acid وبنسبة (4:1)
10	يبين التأثير الخلطي لمثبط Piperacillin + Clavulanic acid وبنسبة (4:1)
11	يبين التأثير الخلطي لمثبط Piperacillin + Tazobactam وبنسبة (8:1)
12	التحليل الأحصائي بأستخدام برنامج SPSS

قائمة المختصرات

Abbreviation	Key
ATCC	American Type Culture Collection
API	Analytical Profile Index
β-Lactamase	Beta Lactamase
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acitic Acid
ESBLs	Extended Spectrum β - Lactamases
FIC	Fraction Inhibitory Concentration
ICU	Intensive Care Unit
K.I.A	Kligler's Iron Agar
LPS	Lipopolysaccharid
µg	Microgram
Mg	Miligram
M.I.C	Minimal Inhibitory Concentraion
NCCLs	National Committee for Clinical Laboratory Standard
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance System
OMPs	Outer Membrane Proteins
PBPs	Penicillin – Binding Protiens
PLC	Phospholipase C
PCR	Polymerase Chain Reaction
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
Staph . aureus	*Staphylococcus aureus*
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TBE	Tris-Boric acid-EDTA
Ure	Urease gene
U.T.I	Urinary Tract Infection
UECs	Uroepithelial Cells

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف المرسلين سيدنا محمد وعلى آله الطيبين الطاهرين وصحبه أجمعين . وبعد ..

يسعدني ويشرفني وأنا أنهي كتابة رسالتي أن أتقدم بخالص شكري وتقديري وعرفاني بالجميل الى أستاذيّ الفاضلين الدكتور هادي رحمن رشيد الطائي ، والدكتور عدنان نعمة عبدالرضا العزاوي لأقتراحهما موضوع البحث ومتابعتهما المتواصلة وتوجيهاتهما السديدة لي طوال مدة البحث داعيةً الله أن يوفقهما لما يحبه ويرضاه .

كما أتقدم بوافر شكري وتقديري الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة المتمثلة بالأستاذ الدكتور عباس عبود فرحان ورئاسة قسم علوم الحياة لأتاحتهم الفرصة لأكمال دراستي العليا، وما قدموه لي من العون والمساعدة .

كما أتوجه بوافر الشكر والأمتنان الى عمادة كلية العلوم ورئاسة قسم علوم الحياة ومنتسبيه / جامعة ديالى، وأخص بالذكر د.محمدعبدالدايم، و م.عصام حامد لما قدموه من دعم وإسناد طيلة مدة البحث .

وأتوجه بشكري وتقديري الى مدير مختبر الصحة المركزي في بعقوبة السيد هادي علي حمودي و منتسبي مختبر الصحة المركزي كافة ،وأخص بالذكر الدكتور داوود سلمان والبكتريولوجيين الاء محمد محمود ، وأماني موسى ، ورامي حميد والكيمياوية زينب هاشم، كما يدعوني الوفاء أن أشكر الدكتور مازن اللهيبي مدير مختبرات مستشفى بعقوبة التعليمي ومنتسبي شعبة البكتريولوجي السيدة ثريا كاظم ، وأسماء يحيى ، وزينب سالم ، ومنتسبي مختبرات مستشفى البتول، وأطباء ومنتسبي شعبة الـ ENT في الأستشارية والمعاون طبي السيد هيثم والسيد وسام خالد لما قدموه لي من العون والمساعدة وتعاونهم معي في جمع العينات .

ولايفوتني ان أشكر زميلاتي وزملائي طلبة الدراسات العليا داعيةً الله لهم بدوام النجاح والموفقية ، وأشكر طالبة الدراسات العليا علياء لطيف / جامعة تكريت .

كما اقدم شكري العميق الى عائلتي داعيةً من الباري (عزوجل) أن يمنَ عليهم بالصحة والعافية انه سميع مجيب . وأخيراً اتقدم بخالص شكري وإمتناني الى كل من مدّ يد العون والمساعدة لي ولو بكلمة تشجيع او أشعل في طريقي نور الأمل لإتمام هذه الرسالة .

لينا

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص 75 عزلة من بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* من أصل 304 عينة من المرضى المصابين باخماج مختلفة في مستشفى بعقوبة التعليمي ومستشفى البتول للولادة والأطفال في مدينة بعقوبة إذ كانت نسبة عزل هذه البكتريا من اخماج المجاري البولية (41.3%) ومن اخماج الأذن الوسطى (25.3%) ومن حالات الجروح (18.6%) ومن الحروق (14.6%) . وتم التأكد من التشخيص بإستخدام نظام API 20NE فضلاً عن إجراء الإختبارات الزرعية والمجهرية والكيموحياتية .

أظهرت نتائج التحري عن عوامل الضراوة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ان جميع العزلات منتجة لأنزيم الليسيثينيز بنسبة (100%) ، بينما كانت 67 عزلة (89.3%) منتجة للهيمولايسين ، و66 عزلة (88%) منتجة لأنزيم البروتييز ، و65 عزلة (86.6%) قادرة على الإلتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية ، و61 عزلة (81.3%) ملزنة لكريات الدم الحمر ، و37 عزلة (49.3%) منتجة لأنزيم اليورييز .

أختبرت حساسية العزلات تجاه 16 مضادا حيويا أظهرت النتائج إن Ofloxacin و Ciprofloxacin هما المضادان الأكثر فعالية ضد العزلات المحلية وبنسبة مقاومة 3% و21% على التوالي بينما مضادات Ampicillin و Amoxicillin و Cephalexin و Co-Trimoxazol هي المضادات التي لم تظهر اية فعالية ضد العزلات إذ كانت نسبة المقاومة 100% .

أظهرت نتائج إختبارات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية إن جميع العزلات المحلية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* تتصف بمقاومتها المتعددة للمضادات الحيوية ، وقسمت العزلات الى مجموعتين إعتماداً على مقاومتها للمضادات الحيوية ضمت المجموعة الاولى (23) عزلة مقاومة لـ (6–10) مضاد بينما المجموعة الثانية فقد ضمت (52) عزلة مقاومة لـ (11–15) مضاداً ، وأشارت النتائج إلى أن المجموعة الثانية هي السائدة .

كان نسق المقاومة السائدة أحد عشر مضاداً حيوياً هي (Amoxicillin – Ampicillin – Cefotaxime – Carbencillin – Co-Trimoxazole – Cephalexin – Nitrofurantoin – Gentamicin - Ceftazidime – Piperacillin – Ceftriaxone) وكان هناك جين لمقاومة مضاد واحد يضاف الى نسق المقاومة .

أستخدم مضاد الأمبسلين (تركيز 100 مكغم / مل) لإختبار قابلية العزلات على مقاومة مضادات البيتالاكتام وأظهرت جميع العزلات مقاومتها لهذا التركيز من المضاد .

أستخدمت طريقة اليود القياسية السريعة للتحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من قبل العزلات ، بينت النتائج ان (34) عزلة من أصل (75) وبنسبة (45.44%) من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* كانت منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز .

أستخدمت طريقة الأقراص المتاخمة للكشف عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وأشارت النتائج ان هناك (7) عزلات (20.58%) كانت منتجة لهذه الأنزيمات .

تم تحديد التراكيز المثبطة الدنيا MIC لأحد عشر مضاداً هي الأكثر إستعمالاً لمعالجة الاخماج المختلفة وهي Ampicillin ، Amoxycillin ، Carbencillin ، Cephalexin ، Cefotaxime ، Ceftriaxone ، Ceftazidime ، Pipracillin ، Ciprofloxacin ، and Gentamicin ، Amikacin . وأظهرت العزلات قيد الدراسة مديات مختلفة في قيم MIC إذ قاومت تراكيز عالية من مضادي Ampicillin و Amoxicillin وصلت الى 1000 مكغم / مل بينما أقل مقاومة أظهرتها العزلات لمضاد Ciprofloxacin (2) مكغم / مل .

إنخفضت قيم التراكيز المثبطة الدنيا لمضادات البيتالاكتام (Amoxacillin ، Carbencillin ، Cephalexin ، Cefotaxime ، Ceftriaxone ، Pipracillin and Ceftazidime) عند خلطها مع حامض الكلافيولينك ، أظهرت العزلات حساسية بنسبة (100%) تجاه توليفة السيفتازديم / حامض الكلافيولنك بعد إن كانت نسبة المقاومة (41.17%) ، وأظهرت النتائج إن نسبة الحساسية تجاه توليفة الأمبسلين / سلباكتام كانت 0% ، أما تجاه توليفة الببراسلين / تازوباكتام فإن الحساسية (91.17%) بعد إن كانت (35.29%) .

تمت دراسة المحتوى البلازميدي للعزلات الأربع (PU10 (من الادرار) و PE47 (من الاذن) و PW64 (من الجروح) و PB71 (من الحروق)) ، وبينت النتائج احتواء جميع العزلات على حزمة بلازميدية واحدة كبيرة .

أجريت عملية تحييد الدنا البلازميدي بإستخدام مادة Acridin orange إذ نجحت هذه المادة في تحييد الحزم البلازميدية عند تركيز 512 مكغم / مل .

تم التحري عن قابلية العزلات المحيدة على إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز ، والمقاومة لمضادي الأمبسلين والأموكزاسلين ، وأظهرت النتائج فقدان العزلات (PU10 ، PB71) لصفة إنتاج انزيمات البيتالاكتاميز وفقدان مقاومتها لمضادي الأمبسلين والأموكزاسلين ، أما العزلتان (PE47 ، PW64) فلم تفقدا مقاومتهما لمضادي الأمبسلين والإموكزاسلين .

المقدمة

Introduction

استعراض المراجع

Literature Review

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods

النتائج والمناقشة

Results & Discussion

Conclusions

&

Recommendations

References

Appendix

1- المقدمة Introduction

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من الأجناس البكتيرية المهمة لكونها واسعة الإنتشار في الطبيعة و إمراضيتها العالية للإنسان والحيوان والنبات ، لهذه البكتريا القدرة على العيش في بيئات متنوعة فهي حرة المعيشة ، تعيش في التربة والمستنقعات ومياه الأنهار وتتواجد بصورة شائعة في البيئات الرطبة للمستشفيات (Brooks *et al*., 2007) كما تسبب ما يعرف بالإصابات المكتسبة بالمستشفيات (Vianelli *et al*., 2006).

تسبب بكتريا الزوائف الزنجارية أمراضاً عديدة في جسم الإنسان منها اخماج الجروح والحروق ، واخماج العين ، واخماج الجلد ، و المجاري البولية ، و الأذن الوسطى ، وتجرثم الدم Bacteremia ، وتسبب أمراضاً عديدة عند الأشخاص الذين يعانون من أمراض نقص المناعة والأشخاص المصابين بالأيدز (Feltzer *et al*., 2003 ; Gaynes *et al*., 2005) .

إزداد الإهتمام بدراسة عوامل الضراوة لهذه البكتريا ذات العلاقة المباشرة أوغير المباشرة بالإمراضية ، إذ تمتلك بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* العديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من تحطيم الأنسجة وإجتياح مجرى الدم ومن أهم هذه العوامل أنزيم الهيمولايسين المحلل للدم ، و اللسيثينيز ، و البروتييز ، و اليورييز ، وتلزين كريات الدم الحمر ، والقدرة على الإلتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية (Todar , 2008 ; Choi *et al*., 2002).

تظهر صعوبة علاج هذه البكتريا بسبب مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية ، إذ إنها مقاومة لمضادات البيتالاكتام فضلاً عن مقاومتها العالية لمضادات Fluoroquinolones و Aminoglycosides مما يجعلها من أخطر الممرضات وأكثرها إصابةً للانسان (Landman *et al*., 2002) ، ويعود سبب ذلك الى إمتلاك هذه البكتريا آليات مختلفة لمقاومة المضادات الحيوية مثل تغيير حاجز النفاذية أوتغيير في موقع الهدف أو إنتاجها للأنزيمات المحللة للمضادات الحيوية مثل أنزيمات البيتالاكتاميز(β-Lactamases) (Laura *et al*., 2002).

أشارت العديد من الدراسات حول صفات أنزيمات البيتالاكتاميز وأنواعها وإنتاجيتها الى إن هذه الأنزيمات هي السبب الرئيس في إفشال الكثير من العلاجات المستخدمة في علاج الاخماج سيما بين المرضى الراقدين في المستشفيات (Chanal *et al*., 2000) ، إن إنتاج هذه الأنزيمات يعود الى طبيعة العوامل الوراثية المشفرة لها والتي تكون كروموسومية فضلاً عن تواجدها على بلازميدات أقترانية مما يسهل إنتقالها بعمليتي الأقتران والتحول وربما محمولة على ترانسبوزونات أو إنتجرونات (Nass *et al*., 2003) ، ومما يزيد في خطورة هذه الأنزيمات حصول الطفرات في الجينات المسؤولة عن تشفيرها لتحولها الى أنزيمات واسعة الطيف مقاومة لمضادات البيتالاكتام الحديثة ومنها الأجيال المتطورة للسيفالوسبورينات (Baho , 2006) .

كما إن حدوث الطفرات الوراثية في الجينات يؤدي الى حصول تطور سريع في مقاومة بكتريا الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية وذلك خلال مدة قصيرة من إستعمال هذه المضادات في العلاج ، ويعد هذا النوع من المقاومة خطيراً جداً وذلك بسبب تطور المقاومة إثناء العلاج وهو ما قد يسبب فشلاً في علاج إصابات هذه البكتريا ، الأمر الذي يتطلب البحث عن علاجات جديدة أو إستعمال أكثر من علاج في آن واحد للحد من مقاومة هذه البكتريا (Nass *et al*., 2003 ; Lynch , 2001) . ولندرة الدراسات التي تتناول وبائية هذه البكتريا في مدينة بعقوبة جاءت هذه الدراسة لتحقق الأهداف الآتية :

1- عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من مرضى مصابين باخماج مختلفة من مستشفيات مدينة بعقوبة ، ثم التحري عن بعض عوامل ضراوتها .
2- دراسة نمط المقاومة للمضادات الحيوية وتحديد نسق المقاومة السائد بين العزلات المحلية .
3- التحري عن أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز، وأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف .
4- دراسة التركيز المثبط الأدنى MIC بدون مثبطات البيتالاكتاميز .
5- إستخدام مثبطات البيتالاكتاميز لإسترجاع فعالية المضادات الحيوية .
6- دراسة المحتوى البلازميدي للعزلات الاكثر مقاومة وإجراء عملية طرد لبلازميدات العزلات المختارة (Curing process) .

إستعراض المراجع

1-2 بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*

يعد العالم Schroter أول من إقترح تسمية *Bacterium aeruginosa* لهذه البكتريا عام (1872) إذ عزلها من جروح متقيحة ، ثم جاء Gesssard الذي إمتدت دراستهُ عشر سنوات منذ عام (1882–1892) إذ كان أول من إستطاع عزل *P.aeruginosa* من القيح الاخضر المزرق للجروح ، وميزها بوصفها بكتريا عصوية وأطلق عليها *Bacillus Pyocyanin*،ثم سميت *Pseudomonas Pyocyaneas*، تنتمي بكتريا *P.aeruginosa* إلى عائلة Pseudomonadaceae، التي تضم جنس *Xanthomonas* فضلاً عن *Pseudomonas* الذي يضم 76 نوعاً (Macfaddin,2000 ; Baho,2006 ; Todar,2008 ;) .

بكتريا *P.aeruginosa* عبارة عن عصيات سالبة لملون كرام إسطوانية ذات نهاية مدورة طولها يتراوح بين (1.5–3.0) مايكروميتر، وعرضها (0.5–0.8) مايكروميتر، تترتب بصورة مفردة أو أزواج او سلاسل قصيرة ، وتتحرك بسوط قطبي واحد او عدة أسواط ، غير مكونة للابواغ (Ryan&Ray,2004) وتحتوي على المحفظة Capsule (Rezace *et al*.,2002)

تتميز بكتريا *P.aeruginosa* بكونها هوائية اجبارياً (Obligate aerobic) لكنها من الممكن أن تنمو في ظروف لاهوائية إذ تستطيع إستخدام النترات مستقبلاً نهائياً للالكترونات بدلاً عن الاوكسجين مما يساعدها على النمو في ظروف لا هوائية (Rabaey&verstracte , 2005; Valls *et al*., 2004) . تنمو بكتريا *P.aeruginosa* على الاوساط الزرعية الشائعة جميعها دون الحاجة الى متطلبات غذائية معقدة (Brooks *et al*.,2007) ، ودرجة الحرارة المثلى للنمو (37م°)، ولكنها تنمو في مدى واسع من درجات الحرارة (5–42 م°) وليس لها القدرة على أكسدة أو تخمير الكاربوهيدرات عدا الكلوكوز ، وتظهر هذه المستعمرات عديمة اللون باهتة في وسط اكارالماكونكي لعدم تخمرها لسكر اللاكتوز المتوافر في الوسط Forbes *et al* .,2002) وتنتج 95% من سلالات بكتريا *P.aeruginosa* الصبغات مثل صبغة البايوسيانين (Pyocyanin) ذات اللون الاخضر المزرق وهي صفة مميزة للالتهابات القيحية ، وصبغة الفلورسين (Fluorescin) الخضراء المصفرة التي ليس لها دور في الامراضية فضلاً عن تلون بعضها باللون البني المحمر(Pyorubin) (Songer,2004) . تنتج هذه البكتريا

أنزيم الاوكسيديز (Oxidase) والكاتاليز (Catalase) ، ولها القابلية على تحليل الدم تحللاً من النوع(β) (Cooper *et al*.,2003; Forbes *et al*., 2002).

أشار Todar (2004) الى أن بكتريا *P.aeruginosa* تنتج ثلاثة أنواع من المستعمرات ، النوع الاول الطبيعية المعزولة من الماء والتربة تنتج مستعمرات صغيرة وخشنة ، أما المعزولة سريرياً فتكون منتجة لنوعين من المستعمرات الاولى كبيرة وملساء وذات حافات مستوية ومظهر مرتفع ، أما الثانية فغالباً ما تعزل من المجاري البولية والتنفسية وتكون ذات مظهر مخاطي . وفي وسط المرق المغذي تظهر بصورة عامة عكورة مع ترسبات ثقيلة .

تنتج بعض السلالات طبقة من الالجنيت (Alginate) وهي عبارة عن طبقة لزجة من السكريات المتعددة تشكل محفظة للبكتريا Biofilm ، يقوم بحماية البكتريا من المضادات الحيوية(بوصفه حاجزاً فيزياوياً) إذ تكون السلالات المخاطية أكثر مقاومة للمضادات الحيوية مقارنة بالسلالات غير المخاطية (Rezace *et al*.,2002) ، وتقوم طبقة الألجنيت بتثبيط عملية البلعمة ، إذ أن معظم السلالات المعزولة من أخماج الجهاز التنفسي السفلي ولا سيما المسببة للتليف الكيسي للرئة تكون مخاطية (Todar,2008; Baho,2006).

2-2 وبائية بكتريا الزوائف الزنجارية Epidemiology of *P .aeruginosa*

تستوطن بكتريا *P.aeruginosa* المستشفيات وتعد ثاني أهم المسببات للأمراض المكتسبة من المستشفى بعد بكتريا *E. coli* ، ويكون إنتشار هذه البكتريا في ردهات وصالات المستشفى الذي قد يتم عن طريق الراقدين والعاملين فيها ، إذ وجد أن معدل الاستيطان لهذه البكتريا في الانسان السليم أقل من 6% بينما معدل الأستيطان في المرضى داخل المستشفى يكون 38% ، أما الذين لديهم ضعف في الجهاز المناعي فانها 78% (Snoger,2004) وتدخل هذه البكتريا بيئة المستشفى عن طريق الفواكه والخضر الملوثة ، كما توجد في البيئات الرطبة لارضيات المستشفيات والحمامات والمطابخ والادوات الطبية (Baron& finegold,1990).

تسبب جراثيم الزوائف الزنجارية *P. aeruginosa* امراضاً عديدة منها اخماج الجروح ، والحروق، واخماج المجاري البولية ، واخماج الاذن الوسطى المزمنة ، واخماج المجاري التنفسية السفلية ، وتسمم الدم (Kenneth,2004).

اعتماداً على احصائيات مركز (NNIS) للسيطرة المرضية والوقائية لبيانات جمعت ما بين الاعوام (1992-1999) فإن بكتريا *P .aeruginosa* تأتي في المرتبة الثانية من المسببات

الشائعة لذات الرئة ، والمرتبة الرابعة من المسببات الشائعة لاخماج المجاري البولية، وفي المرتبة السادسة من مسببات مجرى الدم في وحدات العناية المركزة (Christopher *et al*.,2005).

2-3 الامراض المتسببة عن بكتريا الزوائف الزنجارية

Diseases Caused by *P.aeruginosa*

تعد بكتريا *P. aeruginosa* مسبباً مهماً للاصابات، وخصوصاً عند الأشخاص الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي (Brooks *et al*., 2007) ، كما ان هذه البكتريا تمثل معظم العزلات الشائعة من المرضى الذين يرقدون المستشفى لاكثر من أسبوع مثل المرضى الذين يعانون من حروق أو الراقدين في العناية التنفسية المركزة (Fiorillo *et al*.,2001 ; Todar , 2008).

2-3-1 الاصابات الجلدية Skin infections

تحدث الاصابة بعد تحطم الجلد المغلف للجسم نتيجة لعدد من الاصابات منها الجروح، والحروق، والرضوض ،والكدمات وغيرها مما يؤدي الى تلوث هذه المناطق بالجراثيم المحيطة وهذا يؤدي الى التهاب خلايا الادمة ،وتحت الادمة، ومن ثم إنتشارها الى أنحاء الجسم المختلفة وكذلك حالات الحروق التي تؤدي الى حدوث تحطم نسيجي ونضوح بلازما الدم خارج الجلد لتصبح المنطقة منبتاً جيداً لنمو الجراثيم وتكاثرها (Brooks *et al*., 2007; Todar,2004) ، وتصبح الحالة اكثر تعقيداً عند انتقال البكتريا لمجرى الدم ، وحدوث تجرثم الدم (Bacteremia) إذ يصل معدل الوفيات بين المرضى المصابين بها الى 75% (Still and Law ,2001).

إنَ بكتريا الزوائف الزنجارية لا تنمو على الجلد الجاف ولكن تنمو جيداً على الجلد الرطب وتسبب قيحاً أخضراً وهذه الاصابات من الممكن ان تتطور عند الاشخاص الذين تكون ايديهم مغمورة مدة طويلة في الماء كذلك فأن الاصابات الثانوية تحدث عند الاشخاص المصابين بالاكزمة وغيرها من الامراض الجلدية (Fiorillo *et al*.,2001) كما عزلت بكتريا *P. aeruginosa* من التهاب جذر الشعر وانواع صعبة العلاج من حب الشباب (Wychoff *et al*.,2002) .

2-3-2 إصابات المجاري البولية Urinary tract infections

اصابات المجاري البولية المتسببة عن *P. aeruginosa* عادة ما تكون مكتسبة من المستشفيات إذ ترتبط بعملية القثطرة للمجاري البولية (Chatheterization) او بالعمليات الجراحية ، وتعد هذه البكتريا المسبب الثالث لاصابات المجاري البولية المكتسبة من المستشفيات بعد *Staph aureus* , *E.coli* كما إن بكتريا الزوائف الزنجارية ممكن ان تغزو الدم عن طريق المجاري البولية (Fiorillo *et al*.,2001) حيث تشكل *P .aeruginosa* 12% من التهابات المجاري البولية المكتسبة في المستشفيات (Todar,2008).

تشير دراسة قامت بها (Muhsin , 2010) الى أن بكتريا *P.aeruginosa* تشكل نسبة 22.73% من إلتهابات المجاري البولية في الأطفال ، بينما أشار الباحثان Ali و Issa (2004) إلى أن هذه البكتريا تشكل نسبة 28.81% من التهابات المجاري البولية .

2-3-3 إصابات الاذن Ear infections

بكتريا الزوائف الزنجارية *P .aeruginosa* مسببات شائعة لبعض حالات إصابات الاذن الخارجية مثل التهاب أذن السباحين ، إن هذه البكتريا غالباً ما تتواجد في الاذن الطبيعية ولكن عندما تقطن القنوات السمعية الخارجية فإنها ترتبط بحدوث أضرار والتهابات في حالات وجود رطوبة بسيطة ، كذلك فان بكتريا *P.aeruginosa* مسبب شائع لالتهاب الاذن الوسطى المزمن Chronic otitis media (Wariso & Ibe , 2006 ; Todar , 2004).

2-3-4 الامراض الاخرى المتسببة عن بكتريا الزوائف الزنجارية

Other Diseases Caused by *P. aeruginosa*

إضافة الى ما ذكر من أمراض فإن بكتريا *P. aeruginosa* تسبب عدداً من الامراض الاخرى إذ تصيب الجهاز الهضمي في أي جزء ابتداءاً من البلعوم وحتى المستقيم ، وايضاً الاصابة بها مرتبطة بالضعف المناعي ، ايضاً تصيب هذه البكتريا صمامات القلب عند الاشخاص الذين يتعاطون المخدرات عن طريق الوريد ، كذلك ممكن أن تصيب صمامات القلب الصناعية الموضوعة بعمليات جراحية (Todar,2004).

كما تعد بكتريا *P. aeruginosa* ممرضاً شائعاً للجهاز التنفسي للانسان ، وبصورة خاصة سبباً مهما في أخماج الجهاز التنفسي المزمنة المتعلقة بالتليف الكيسي (Cystic fiberosis) اذ ان الاصابات المزمنة للجهاز التنفسي تنتشر بين الاشخاص ذوي التليف الكيسي (Marty *et al*.,1998) ، إن اصابات الجهاز التنفسي المتسببة عن بكتريا

الزوائف الزنجارية تحدث عند الاشخاص ذوي الانظمة الدفاعية الضعيفة ، وتحدث اصابات ذات الرئة عند المرضى ذوي الامراض الرئوية المزمنة والمرضى الذين يتعاطون علاج السرطان .(Todar,2008)

كما تسبب بكتريا*P. aeruginosa* إصابات مدمرة في عين الانسان ، اذ تعد واحدة من المسببات الشائعة لالتهاب القرنية ، وخراج الغشاء الخارجي للعين عند الكبار، كما تسبب التهاب العين ، والرمد عند الاطفال وبكتريا *P. aeruginosa* ومن الممكن ان تستعمر الطبقة الطلائية للعين بوساطة الارتباط الهدبي للبكتريا بمستقبلات خلايا الطبقة الطلائية (feltzer *et al*.,2003) ، كما يحدث التجرثم الدموي بعد وصول الجراثيم الى مجرى الدم وتكاثرها وانتشارها. معظم اصابات الزوائف الزنجارية تكون مكتسبة من المستشفيات وتمثل نسبة 25% من كل المسببات السالبة لصبغة كرام المكتسبة من المستشفيات كما ان معدل الوفيات فيها بحدود 10% (Todar,2008) .

2- 4 عوامل الضراوة في بكتريا الزوائف الزنجارية

Pseudomonas aeruginosa virulence factors

إن قدرة بكتريا *P.aeruginosa* على إحداث إصابات متعددة قد يكون نتيجة لقابليتها الكبيرة على انتاج مدى واسع من عوامل الضراوة المرتبطة بالخلية (داخل الخلوية) والعوامل خارج الخلوية (Williams *et al*.,2000) ، فعلى سبيل المثال تمتلك هذه البكتريا عوامل ضراوة مرتبطة بالخلية مثل الأهداب (pili) ، الاسواط (Flagella)، وعديد السكريد الشحمي LPS ، والالجنيت ، أما عوامل الضراوة خارج الخلوية فقد تضم السموم ذات الاوزان الجزيئية المنخفضة التي تفرزها البكتريا مثل الفينازين ، والهيمولايسين أو عوامل الضراوة متعددة البروتين مثل الانزيمات الناقلة لـADP والبروتييز والفوسفولايبيز و الليسيثينيز (Todar , 2008 ; Choi *et al*.,2002) ومن أهم هذه العوامل :

2-4-1 عوامل الالتصاق والاستيطان Adhesion and Colonization Factors

إن قابلية البكتريا على الالتصاق وإستيطان الأغشية المخاطية هي أول مرحلة من مراحل تطور الخمج . تلتصق بكتريا *P.aeruginosa* بالخلايا الطلائية المبطنة للانسجة والاعضاء المصابة ، و تساهم الاهداب (Pili) الموجودة على سطح البكتريا بالتصاق بكتريا

P.aeruginosa ،كما إنها تلعب دوراً رئيسياً في الاستيطان البدائي لاحداث الخمج في الاغشية المخاطية للمسالك البولية والتناسلية والمعوية والمجرى التنفسي الخاص بالمرضى المصابين بالتليف الكيسي (Arora *et al*.,1998) ، إذ ترتبط بكتريا *P.aeruginosa* بالخلايا الطلائية للمجاري التنفسية العليا وبالخلايا الطلائية للمجاري البولية بوساطة الاهداب ، وان هذا الارتباط يكون عن طريق مستقبلات خاصة لـ Galactose أو Mannose أو Sialic acid موجودة على أسطح الخلايا الطلائية وان عملية إستعمار بكتريا *P.aeruginosa* للمجاري التنفسية تحتاج الى الاهداب (Todar,2004;Kenneth,2004). تعد الأهداب واحدة من أهم عوامل الضراوة والتي هي عبارة عن خيوط سطحية مرنة تنتج عند اقطاب الخلية البكتيرية وتمتد الاهداب من الجهة الأمامية للخلية ، كما أن تماس الاهداب مع أي سطح يؤدي الى إتساع وإنكماش الاهداب الذي ينتج عنه الحركة اللولبية، وهذه الحركة تحدث بوساطة أهداب النوع الرابع التي تحتاجها للانتشار المتعاقب فوق سطح الخلية المضيفة (Kohler *et al*.,2000).

كذلك تساهم الجزيئات الكبيرة (Macromolecules) الموجودة في السطح الخارجي للبكتريا بعملية الالتصاق والاستيطان ، ومن أهم هذه الجزيئات هي متعدد السكريد الشحمي (Lipopolysaccharide: LPS) (Norman *et al*.,2002).

2-4-2 أنزيم اللسيثينيز Lecithinase Enzyme

تنتج جراثيم *P.aeruginosa* انزيماً فعالاً في تكسير Lecithen الذي هو أحد مكونات الغشاء الخلوي (Cell membranes) ، وقد أتضح ان التركيب الكيميائي لهذا الانزيم هو Phospholipase إذ يحرر الفسفور والكولين من الليسيثين ، ويساعد هذا الانزيم على غزو هذه الجراثيم لانسجة الجسم Invasivenes (Udo & Jacob,2000).

وهذا الانزيم لا يحلل الليسيثين فقط بل ايضاً الفوسفات الدهنية (Phospholipids) مثل سفنجيومايلين (Sphingomylin) وفوسفاتيديل الامين الاثيلي (phosphatidy ethanolamine) والسيفالين (Cephalin) والثرمبوبلاستين (thromboplastine) (Udo & Jacob,2000).

2-4-3 إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production

الهيمولايسين عبارة عن أنزيم يقوم بتدمير الغشاء الخلوي لكريات الدم الحمراء Erythrocytes مما يؤدي الى تحللها محدثاً بذلك الأصابة التجرثمية Septic infection (Liaw *et al*.,2000).

تنتج بكتريا *P.aeruginosa* نوعين من الهيمولايسين الاول يطلق عليه Phospholipase C(PLC) ، والاخر يطلق عليه Rhamnolipid hemolysin ، إذ تعمل هذه الانزيمات بصورة مشتركة على تحطيم الدهون Lipids والليسيثين Lecithin وكلاهما يسهم في غزو وتحطيم الانسجة بوساطة تأثيرهما السمي للخلايا (Todar,2004; Christopher *et al*.,2005) . يمتلك Rhamnolipid hemolysin تركيباً مشابها لتركيب المنظفات (Detergents) ويعتقد ان ذلك يعينه في إذابة الدهون المفسفرة لسطح الرئة جاعلاً إياها أكثر عرضة وسهولة للكسر والتحطيم بوساطة Phospholipase C (PLC) ، مما ينجم عنه فقدان لنسيج سطح الرئة وتحطمه مؤدياً الى فقدان او تثبيط الحركة الهدبية للخلايا الطلائية في الجهاز التنفسي للانسان (Ostroff & Vasil.,1987).

2-4-4 أنزيم البروتييز Protease Enzyme

يعد البروتييز(Protease) المفرز خارج الخلايا من العوامل المهمة في تدمير الانسجة اثناء الإصابات التي تسببها بكتريا *P.aeruginosa* ، وهو واحد من أهم عوامل الضراوة في مرحلة الغزو (Engle *et al*.,1998).

يمتلك الانزيم وزناً جزيئياً قدره 26 كيلو دالتون ونقطة التعادل الكهربائي 8.7 ويكون الانزيم فعالاً في مدى واسع من الأس الهيدروجيني (6-11)، والفعالية القصوى له في أس هيدروجيني 10 بدرجة حرارة 45 م° (Wilderman *et al*.,2001).

تنتج بكتريا *P.aeruginosa* أنواع عدة من أنزيمات البروتييز تشمل Elastase بنوعيه A,B (LasA elastase, LasB elastase) ، والبروتييز القاعدي (Alkaline protease) وتساهم هذه الانزيمات بزيادة ضراوة البكتريا سيما المصابين بالحروق خاصة أنزيم الـ Elastase ، إذ يحلل الطبقة المتقرنة والكولاجين ، أما البروتييزالقاعدي فإنه يحلل الفايبرين (Braun *et al*,2000)، إضافة الى ذلك فإن كلا النوعين يدمران المادة الصلبة للقرنية ، وينتجان في رئات المرضى المصابين بالتليف الكيسي مما يؤدي الى دمار الخلايا الطلائية للجهاز التنفسي ويساهمان في عدم فعالية كل من انترفيرون كاما (γ-Gamainterferon IFN) وعامل التنخر (Tumor necrosis factor TNF) (Todar,2008).

أشار Petermann وجماعته (2001) الى ان أنزيم البروتييز له قابلية على تحليل Elastin الموجود في جدران الاوعية الدموية وانواع عديدة من الجزيئات الفعالة بايولوجياً مثل Immunoglobulin ومكونات المتمم Complement Compound والفايبرينوجين Fibrinogen التي ترتبط بالاستجابة المناعية للانسان، ويعمل انزيم البروتييز على تحلل الانسجة الرخوة ومكوناتها كما يتداخل انزيم Protease مع تشكيل الـ Fibrin ومن ثم يحلل Fibrin (Todar,2004).

2-4-5 أنزيم اليوروييز Urease Enzyme

تشير الدراسات الحديثة الى أهمية اليوروييز لكونه مسبباً مرضياً وعامل ضراوة للعديد من أنواع البكتريا وينتج من قبل العديد من الاجناس البكتيرية المسببة لخمج المجاري البولية مثل *Proteus , klebsiella , Pseudomonas* (Ahmed *et al*.,2003) إذ يلعب دوراً مهماً في عملية الاستعمار (Colonization) وتحصي الكلية (Nephrolithiasis) وكذلك في تطور التهابات حويض الكلية (Dattelbaum *et al*., 2003).

أظهرت الدراسات المتخصصة بالتنظيم الوراثي لمجاميع الجينات ذات العلاقة بإنتاج اليوروييز بان إنتاجها يخضع لمجموعتين من الجينات تعرف الاولى بالجينات التركيبية Structural genes وهنالك جين اخر يسيطر على الاستنساخ Transcription يعرف بالجين التنظيمي Regulatory gene ويرمز له *Urer* (Mulrooney & Husinger,2003). تمثل اليوريا المركب النايتروجيني الرئيس المطروح من جسم الانسان وكذلك الحيوانات ، ويعمل أنزيم اليوروييز على تحليل اليوريا الى الامونياNH_3 ، وحامض الكاربونيكH_2CO_3 (Tanak *et al*.,2003) .

تعمل الامونيا المتحررة من تحلل اليوريا على زيادة قاعدية الادرار مما يتسبب في تقليل الفعالية البايولوجية للاجسام المضادة (Antibodies) والى تحطيم خلايا الدم البيضاء Leukocytes (Larsson ,1978). إن زيادة قاعدية الادرار يساعد في زيادة معدل تكوين الحصى (Kaitwatcharachi *et al*.,1999) ، وإمتصاص الامونيا المتحررة من تحلل اليوريا بفعل أنزيم اليوروييز يمكن ان يؤدي الى زيادة الامونيا في الدم (Hyperammonaenia) مما يؤدي الى وفاة المريض بسبب عجز الكلية (Van-Daele *et al*.,1998)، وبما ان البول القلوي يعزز من نمو البكتريا ومن ثم يزيد الأذية الكلوية لذا فالمعالجة تتضمن الحفاظ على درجة pH منخفضة للبول (Levinson & Jawetz,2000).

2 -5 المضادات الحيوية Antibiotics

تعرف المضادات الحيوية بإنها من النواتج الايضية الثانوية الخاصة أو المحورة والتي تمتلك فعالية ضد مجاميع مختلفة من الاحياء المجهرية ، كذلك تعرف بأنها مواد كيمياوية عضوية تنتج من قبل الاحياء المجهرية المختلفة ، ولها القدرة على تثبيط نمو الاحياء المجهرية الاخرى دون التأثير على خلايا المضيف ، وهي تشمل المنتجات المستحصلة بوساطة التحوير الكيمياوي للمضادات الطبيعية وغيرها من منتجات الايض المايكروبي او بوساطة التحوير المايكروبي للمواد المصنعة (Prescott *et al*., 2005) ، كما إنها أصبحت اليوم تنتج تركيبياً على نطاق واسع لاستخدامها في علاج مختلف الاخماج (Walled,2003) .تقسم المضادات الحيوية من حيث طيف الفعالية الى مضادات واسعة الطيف (Broad spectrum) ومنها الـ Ampicillinو Gentamicin ، والنوع الثاني مضادات محددة الطيف (Narrow Spectrum) مثل Erythromycin,Penicillin (Walled,2003) ومن أهم مجاميع المضادات الحيوية :

2-5-1 مضادات البيتالاكتام *β*-Lactam antibiotic

تعد مضادات البيتالاكتام من المضادات الأكثر أهمية من بين المجاميع الدوائية المضادة للبكتيريا وأكثرها استخداماً ، وذلك لفعاليتها الواسعة ولتأثيراتها الجانبية القليلة، لذا يمكن عدها من المضادات الامينة بإستثناء المرضى الذين يعانون من الحساسية لهذه المضادات (Laurence *et al*.,1997) وتضم مضادات البيتالاكتام المجاميع الاتية :

2-5-1-1 البنسلينات Penicillins

البنسلينات هي مجموعة واسعة من المضادات الحيوية الطبيعية والمضادات شبه المصنعة، ويتكون البنسلين من نواة البنسلين (6-aminopenicillinic acid) ، والضرورية للفعالية البايولوجية ، وهي عبارة عن حلقة ثايوزولدين (Thiozolidine ring) مرتبطة مع حلقة البيتالاكتام (*β*-lactam ring) وتتصل مع النواة سلسلة جانبية R-side chain يضاف لها جذور مختلفة للحصول على مشتقات للبنسلينات (المرجاني،2011) ويمكن تصنيف البنسلينات

بالاعتماد على السلسلة الجانبية والفعالية ضد مايكروبية الى ما يلي (Mandell *et al*.,1995).

2-5-1-1-1 البنسيلينات محددة الطيف Narrow spectrum Penicillins

التي تضم البنسلينات الطبيعية والبنسلينات ضد المكورات العنقودية :

2-5-1-1-1-1 البنسلينات الطبيعية Natural penicillins

وتشمل كل من بنسلين جي Penicillin G (Benzyl Penicillin) وبنسلين في PenicillinV (Phenyl methyl Penicillin) وهما من البنسلينات الطبيعية .

تمتاز هذه المجموعة بأنها فعالة ضد أغلب أنواع البكتريا الموجبة لصبغة غرام غير المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز فضلاً عن فعاليتها ضد البكتيريا اللاهوائية والمكورات السالبة لصبغة غرام مثل *Neisseria* (Celbrex *et al*., 2002 ; Katzung ,2001).

يمتاز بنسلين في (Penicillin V) بمقاومته للعصارة المعدية وبثبوتيته بينما بنسلين جي (Penicillin G) يكون حساساً للعصارة المعدية ، لذلك يعطى عن طريق العضل (المرجاني ،2011).

2-5-1-1-1-2 البنسلينات ضد المكورات العنقودية

Anti staphylococcal penicillins

وتضم مجموعة من المضادات الحيوية مثل Cloxacillin, Dieloxacillin, flucloxacillin, methicillin (Katzung,2001) ، يعد مضاد (Methicillin) أول مشتقات هذه المجموعة واستعمل علاجاً ضد التهابات المكورات العنقودية عام 1960 وله فعالية ضد المكورات العنقودية ، والمنتجة لانزيم البيتالاكتاميز ، وذلك لامتلاك هذا المضاد سلسلة اسيل جانبية Acyle side –Chain ، والتي تحمي آصرة البيتالاكتام β-lactam وتمنع من وصول الانزيم المحطم لها (Laurence *et al*.,1997).

2-5-1-1-2 بنسلينات واسعة الطيف Broad spectrum Pinicillins

يطلق على هذه المجموعة من المضادات Aminopenicillin (الامينوبنسلين) وهي من المضادات شبه المصنعة وتضم كلاً من الامبسلين Ampicillin والاموكزاسلين

Amoxycillin فضلاً عن المشتقات الجديدة Bacmpicillin ,Hetacillin, Cycloillin تمتاز هذه المجموعة بفعالية اكبر من المجموعة السابقة إذ أن فعاليتها تشمل البكتريا العصوية الموجبة لصبغة كرام فضلاً عن بعض الانواع السالبة لصبغة كرام بجانب فعاليتها ضد المكورات السالبة لصبغة كرام المقاومة للبنسلين جي (Laurence *et al*.,1997) .

2-5-1-1-3 البنسلينات ضد الزوائف Anti Pseudomonal Penicillins

2-5-1-1-3-1 مجموعة كاربوكسي بنسلين Carboxy Penicillin

تضم هذه المجموعة مضادي Carbencillin و Ticarcillin (Laurence *et al*.,1997) . يمتاز هذان المضادان بفعاليتهما ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام المقاومة للبنسلينات مثل بكتريا *P.aeruginosa* وتقل فعاليتها ضد البكتريا المنتجة للانزيمات المحللة لهما(Mahon&Manuselis,2000).

2-5-1-1-3-2 مجموعة اليوريدوبنسلين Ureido Pencillins

تضم هذه المجموعة مضادات الازلوسيلين (Azlocillin) ، والميزلوسلين (Mezlocillin) ، والببراسيلين (Piperacillin) (Katzung, 2001). وهي من البنسلينات الحديثة تمتلك مجاميع جانبية تسهل مرورها السريع عبر القنوات الموجودة في الغشاء الخارجي للخلية البكتيرية (Mandell *et al*.,1995)، كما ان لها الفه عالية للارتباط مع موقع الهدف في الجدار الخلوي ، وهي تحتوي على سلسلة جانبية مشتقة من اليوريا مرتبطة بنواة البنسلين مما يعطيها فعالية أعلى ضد *P.aeruginosa* اذ تستعمل لمعالجة حالات التسمم الدموي (Septicemia) الناتج عنها (Laurence *et al* .,1997).

تمتاز هذه المضادات بحساسيتها لأنزيمات البيتالاكتاميز والمنتجة من قبل بكتريا *Klebsiella Spp, E.coli*(المرجاني ،2011) . تستخدم في علاج اخماج المجاري البولية فهي اكثر اماناً لمرضى الكلى بسبب احتواءها على كمية قليلة من الصوديوم (Laurance *et al*.,1997) ، يمتاز مضاد Piperacillin بفعاليته الواسعة ضد بكتريا الزوائف والسيلان (Finch,1984) ، بالرغم من فعاليته ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام الا أن العديد من العزلات أصبحت مقاومة له وذلك بسبب افرازها أنزيم البيتالاكتاميز (Frank *et al*.,2003).

2-5-1-2 السيفالوسبورينات Cephalosporins

تمتلك هذه المضادات فعالية واسعة الطيف أكثر من مجموعة البنسلينات ضد البكتريا العصوية السالبة لصبغة كرام والكائنات الاخرى المقاومة للبنسلينات لذا تستخدم في علاج حالات الاصابة المتكررة بالبكتريا، وتستعمل كبدائل عن البنسلينات للمرضى الذين يعانون من الحساسية من البنسلين إذ تمتاز بمقاومتها لانزيم البنسلينيز (Penicillinase) ولكن ليس لانزيم السيفالوسبورنيز (Atlas,1995) تقسم مجموعة السيفالوسبورينات اعتماداً على تركيبها الكيمياوي وفاعليتها الضد مايكروبية ، كما يمكن ان تصنف الى عدة اجيال وهو المفضل لدى الكثير من الباحثين (Brooks *et al*., 2007) .

2-5-1-2-1 سيفالوسبورينات الجيل الاول First generation cephalosporins

تضم مجموعة من المضادات التي تؤخذ فموياً (Orally) مثل Cefactor، Cefaradine, Cephalexin او بشكل زروق (Injections) مثل , Cefazolin Cephapirin , Cephalothin(Brooks *et al*., 2007).

تمتلك هذه المضادات فعالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام فضلاً عن فعاليتها ضد أفراد العائلة المعوية مثل *Proteus mirabilis* ، *E.coli*، *Klebsiella Pneumonia* (Katzung,2001)، وتكون قليلة الفعالية ضد بكتريا *P.aeruginosa* ، وتكون غير فعالة ضد العنقوديات المقاومة لمضاد Methicillin (Hussar,2001) . وتستخدم مضادات سيفالوسبورينات الجيل الاول بصورة واسعة لعلاج الالتهابات الجلدية والمجاري البولية والتنفسية (Brooks *et al*., 2007).

2-5-1-2-2 سيفالوسبورينات الجيل الثاني Second generation cephalosporines

تضم مجموعة من المضادات مثل Cefuroxime ,Cefoxitin Cefamandol, Cefmotazole,Cefprozil, (Tierney *et al*.,1999). تمتاز بإنها اكثر مقاومة لأنزيم البنسلينيز (Penicillinase) وذات فعالية جيدة ضد المكورات العنقودية وبعض البكتريا السالبة لصبغة غرام ولكنها غير فعالة ضد بكتريا *Enterococci* (Katzung,2001). يمتاز

مضاد Cefuroxime بوصوله بتراكيز عالية في سائل النخاع الشوكي لذا يستخدم لعلاج التهاب السحايا الناجم عن بكتريا *E.coli, Klebsiella* (Christopher *et al*.,1991).

2-5-1-2-3 سيفالوسبورينات الجيل الثالث Third generation cephalosporins

تضم مجموعة من المضادات ومنها Ceftriaxone , Cefixime , Ceflibutien Cefoperazone and Ceftazidime , Cefotaxime(Brooks *et al*.,2007).

تمتاز هذه المجموعة بطيفها الواسع ضد أفراد العائلة المعوية المقاومة للبنسلينات وكذلك ضد *Streptococcus pyogenes* والمكورات الاخرى (Baron *et al*.,1999). يعد مضاد السيفوتاكسيم Cefotaxime اول مشتقات هذه المجموعة ويمتاز بفعاليته العالية ضد اغلب البكتريا السالبة لصبغة كرام ، أما مضاد السفتازيديم Ceftazidime فيمتاز بفعالية تفوق فعالية السيفوتاكسيم Cefotaxime وبخاصة ضد بكتريا *P.aeruginosa*(المرجاني،2011) وبالتالي فهو يستعمل لعلاج التهابات السحايا الذي تسببه هذه البكتريا (Christophor *et al*.,1991)، أما مضاد السفترياكسون Ceftriaxone يمتلك فعالية عالية وهو يطرح من الكليتين دون تغيير منتجاً تراكيز عالية منه في الادرار (Neu,1994).

2-5-1-2-4 سيفالوسبورينات الجيل الرابع Fourth generation cepalosorines

تضم هذه المجموعة كلاً من مضادي Cefepime وCefpirome ، وتعد من المضادات المهمة المستخدمة حديثاً في المجالات الطبية المختلفة لما لها من تأثيرات علاجية ناجحة (Angelescu & Apostol,2001) تمتاز بفعالية عالية ضد افراد العائلة المعوية وبكتريا *P.aeruginosa* (Mahon&Manuselis,2000) ،والـ Cefepime مضاد حديث ذو طيف واسع مقارنة بالجيل الثالث من السيفالوسبورينات مثل Cefotaxime. اما البكتريا الحساسة لهذا المضاد فتشمل العائلة المعوية و *S.aureus,Neisseria , Pseudomonas* والمسبحيات (Tam *et al*.,2002; المرجاني،2011) ،كما أشار الباحثان Jones و Varnam (2002) الى أن الـ Cefepime ثابتاً ومستقراً أمام أنزيمات البيتالاكتاميز المحللة التي تفرز من قبل البكتريا السابة لصبغة غرام(Angelescu & Apostol,2001).

2-5-1-2-5 سيفالوسبورينات الجيل الخامس Fifth generation cephalosporins

مثالها مضاد Ceftobiprole ذو الفعالية ضد بكتيريا *S.aureus* المقاومة للمثسلين (MRSA) وبكتريا *Streptococcus pneumonia* المقاومة للبنسلين ، يعطى بالحقن لعلاج اصابات الجلد والانسجة الرخوة (المرجاني ، 2011).

2-5-1-3 الكربابنيم Carbapenems

تضم مجموعة من المضادات منها Imipenem ومضاد Meropenem فضلاً على المجموعة الحديثة التي تشمل Faropenem الذي يعطى عن طريق الفم (Dalhoff *et al*.,2003;Ueda & sunagawa,2003)

ويعد مضاد Imipenem أول مضاد ضمن هذه المجموعة الذي يمتاز بفعالية واسعة الطيف ضد العصيات السالبة لصبغة غرام وبكتريا *P.aeruginosa* (Pai *et al*.,2001; Turnidge *et al*.,2002) له فعالية ضد أفراد العائلة المعوية Enterobacteriaceae (Katazung,2001) . يستعمل مضاد Imipenem لعلاج حالات التجرثم الدموي وإصابات المجاري البولية والاصابات الرئوية المكتسبة (Nosocomial Pneumoniae) اثناء مدة الرقود في المستشفيات (Laurance *et al*.,1997) اما مضاد Meropenem فله فعالية عالية ضد البكتريا الهوائية السالبة لصبغة غرام (katzung,2001) ، وتمتاز مضادات الكربابنيم بتأثيرها القاتل Bacteriocidal على البكتريا (Ueda&sunagawa,2003).

2-5-1-4 المونوباكتام Monoactom

يعد مضاد Aztreonam أول أفراد هذه المجموعة ، وهو يمتلك فعالية ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام ومنها ، *Neisseria gonorrhoeae*, *P.aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*(Laurence *et al*.,1997)، ومضاد Aztreoname يشبه مضاد الـ Ceftazidime في فعاليته ضد العصيات السالبة لصبغة غرام ولكن ليس له فعالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام و البكتريا اللاهوائية (Brooks *et al*., 2007).

2-5-1-5 الكارباسفيم Carbacephems

تستبدل فيها ذرة الكبريت في حلقة Thiozolidine بالكاربون إذ تضم هذه المجموعة مضاد Loracarbef الفعال ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل *Staphylococcus*

(المرجاني ، 2011) ، وبسبب الزيادة في كلفة هذا المضاد استبعد من الاستخدام كخط علاج أول .

2-5-2 الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides

تضم مجموعة من المضادات منها Streptomycin, Neomycin, Amikacin , Tobramycin, Gentamicin , Kanamycin, Sisomicin ,Netilmicin وهي تتشابه في الخواص الحركية والدوائية والتركيبية والسمية (Katzung,2001; المرجاني 2011) ، هذه المضادات تخترق الغشاء الخارجي للخلية البكتيرية بوساطة الانتشار عن طريق قنوات البورينات لكن هذه الالية غير ممكنة لجزيئات مضادات الامينوكلايكوسيدات كبيرة الحجم الا بوساطة النقل النشط فتنتقل غير الغشاء الخلوي الى السايتوبلازم وهي عملية تعتمد على الطاقة (Brooks *et al*., 2007) ، حال دخول المضادات الى داخل الخلية تعمل على تثبيط تصنيع البروتين وذلك من خلال ارتباطه بموقع الهدف على الوحدة الرايبوسومية الصغيرة Subunit30S (Brooks *et al*., 2007) ، تستخدم مضادات الامينوكلايكوسيدات في علاج الالتهابات التي تسببها البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام (Fluit *et al*.,2001)، تؤخذ عن طريق العضل لكونها قليلة الامتصاص في القناة الهضمية ، وتظهر أعلى فعالية في المحيط القاعدي ولها اعراض جانبية على العصب السمعي وعلى الكلية (Brooks *et al*., 2007)، يعد مضاد الجنتامايسين Gentamicin ذا اهمية كبيرة في علاج التهابات المجاري البولية وهو من علاجات الخط الاول في هذا المجال ، كما يكثر استخدامه كمضاد أولي ضد البكتريا المعوية (Thureen *et al*.,1999).

أما مضاد الاميكاسين Amikacin وهو من المضادات شبه المصنعة المشتقة من الكانامايسين Kanamycin وفعال ضد عدد كبير من أفراد العائلة المعوية ، وبكتريا *P.aeruginosa* ، فهو مقاوم لاكثر الانزيمات المشفرة بالبلازميدات Plasmid Mediated Enzyme التي تتواسط المقاومة للـ Streptomycin ,Gentamycin (Katzung,2001; Rotschafer&Peterson,2004) .

2-5-3 الكوينولونات Quinolones

تقوم هذه المجموعة من مضادات الحياة بتثبيط انزيمات (DNA Gyrase) المسؤول عن جعل الكروموسوم البكتيري فائق اللف وبالتالي يؤدي الى الموت السريع للبكتريا (-FunG; Brooks *et al*., 2007 Tomc *et al*.,2000) ومن العقارات المهمة التابعة لهذه المجموعة Ciprofloxacin, Ofloxacin, Nalidixicacid ويمثل مضاد Nalidixic acid الجيل الاول ، ويعد من الكوينولونات القديمة (Katzung,2001) ، أما مضادات Ciprofloxacin و Norfloxacin و Ofloxacin فتمثلان الجيل الثاني من مجموعة الكوينولونات والتي تمتاز بطيف واسع ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام عموماً ومن ضمنها بكتريا *P.aeruginosa* ، وتعد من أنجح المضادات الحيوية استعمالاً في معالجة التهابات المجاري البولية والالتهابات المعوية (Brooks *et al*., 2007).

2-5-4 السلفوناميد والتراي مثبريم Sulfonamides & Trimethoprime

تمتلك هذه المضادات فعالية تثبيطية لنمو البكتريا Bacteriostatic إذ تقوم مركبات السلفا بايقاف نمو البكتريا من خلال تثبيط أنزيم Dihydropteroate Synthetase (DHPS) ، بينما يقوم الـ Trimethoprime بتثبيط أنزيم Dihydro Folate reductase (DHFR) وهذه الانزيمات ضرورية في صنع حامض الفوليك البادئ في تصنيع الحامض النووي في خلايا البكتريا (Brooks *et al*., 2007).

وبما ان كلاً من مضادي Trimethoprimeو Sulofonamide يعملان على اغلاق المسار الايضي لتصنيع حامض الفوليك لهذا فهما يستعملان معاً إذ يعملان تآزرياً مما يجعل تأثيرهما التثبيطي أكبر (Katzung,2001) يستخدم هذا خليطاً في علاج إصابات المجاري البولية المعقدة (Brooks *et al*., 2007).

2-5-5 النيتروفيورانتوين Nitrofuantoin

أستخدم منذ زمن بعيد بوصفه مضاداً فعالاً في علاج التهابات المجاري البولية وله فعالية ضد العديد من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وتزداد فعاليته عند الرقم الهيدروجيني pH 5.5 (Katzung,2001)، يستخدم لعلاج التهابات المجاري البولية وبالاخص لدى النساء الحوامل لما له من تأثير قاتل للبكتريا المسببة للالتهابات كما انه قليل التأثير على النساء الحوامل (Joklik *et al*., 1992) . إن اعطاء جرعة واحدة يومياً (100ملغم) من هذا المضاد تمنع تكرار إصابة المجاري البولية عند بعض النساء (Katzung,2001).

2-6 مقاومة الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية Antibiotic Resistance of *P.aeroginosa*

تمتلك بكتريا *P.aeruginosa* حساسية قليلة تجاه معظم مضادات الحياة المستعملة في العلاج الطبي ، مما جعل هذه البكتريا تشكل خطراً شديداً على صحة الانسان (Japoni *et al*., 2006) .

يعود سبب مقاومة هذه البكتريا للمضادات الحيوية الى امتلاكها مورثات (جينات) المقاومة المحمولة على البلازميدات Plasmid التي تسبب تطور المقاومة للمضادات الحيوية، (Baho,2006) . اشار Raka وزملاؤه (2004) الى ان الاستعمال العشوائي المتزايد لمضادات البيتالاكتام في علاج الالتهابات المختلفة ادى الى ازدياد المقاومة للمضادات الحيوية من قبل البكتريا المسببة لهذه الالتهابات.

قام كل من Sriram و Hauser (2005) بتقسيم مقاومة بكتريا *P.aeruginosa* الى مجموعتين رئيستين الاولى المقاومة الذاتية (Internsic susceptibilility) التي تحدث بصورة طبيعية في بكتريا *P.aeruginosa* مما يجعل هذه البكتريا قليلة التأثر بالمضادات الحيوية مثل Ampicillin و Cephalosporin مقارنة بالأجناس الاخرى السالبة لصبغة كرام بسبب عدم نفاذية جدارها الخارجي ، وقابليتها على نقل المضادات الحيوية خارج الخلية ، وتستعمل هذه التسمية للدلالة على المقاومة الطبيعية للبكتريا التي تكون الخصائص الوراثية هي المسؤولة عن منع فعل المضاد الميكروبي.

أما المجموعة الثانية فهي المقاومة المكتسبة للبكتريا (Aquired Susceptibility) التي تكون نتيجة لظهور سلالات مقاومة من المجتمعات البكتيرية الحساسة سابقاً التي تظهر بعد تعرضها لمضاد معين ويكون سببها وجود بلازميد المقاومة أو عوامل قافزة أوأنتجرونات أو نتيجة لحصول طفرات كروموسومية (Takeda *et al*.,2007).

تمتلك بكتريا *P.aeruginosa* العديد من الآليات لمقاومة المضادات الحيوية تشمل :

2-6-1 إنتاج أنزيمات محللة لبعض انواع المضادات الحيوية

Production of antibiotic degrading enzymes

تم اكتشاف إنتاج أنزيمات β-lactamase في هذه البكتريا وصنفت الى مجموعات اعتماداً على الركيزة (Substrate) التي تعمل عليها ، أو مواقع جيناتها التي قد تحمل على الدنا البلازميدي أو الدنا الكروموسومي وهي تعمل على مجموعة مضادات β.Lactams لذا تدعى بأنزيمات البيتالاكتاميز وتشمل Pencillinase و Cephalosporinase (Cavallo *et al* 2000,.). تعمل هذه الانزيمات على كسر آصرة الامايد في حلقة البيتالاكتام الموجودة في مضادات البيتالاكتام لتحويلها الى المركبات فاقدة الفاعلية (حامض Pencillonic acid الناتج من تحطم البنسلينات و Cephalosporinic acid الناتج من تحطم السيفالوسبورينات (المرجاني ،2011).

كما وجدت أنزيمات تعرف بالانزيمات المحورة (Modifying enzymes) منها التي تساعد البكتريا على مقاومة مضادات المجموعة الامينوكلايكوسيدية مثل Gentamicin (Hasegawa *et al*.,1996).

2-6-2 تحوير الموقع الهدف لعمل المضاد Modification of antibiotic target

تمكن هذه الآلية البكتريا من تطوير مقاومتها لأنواع عدة من المضادات الحيوية ، إذ تحصل المقاومة عن طريق تغير موقع الهدف الذي يعمل عليه المضاد الحيوي بسبب حدوث طفرة وراثية في مواقع ارتباط المضاد الحيوي مع المكان الخاص به في الجرثومة ، وبذلك يفقد المضاد الحيوي الفته للارتباط مع الموقع الهدف ، وهذا يؤدي الى مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية (Walsh,2000).

إن هدف مضادات البيتالاكتام هو مجموعة من الانزيمات تدعى بالبروتينات المرتبطة بالبنسلين Penicillin Binding Protiens (PBPs) والتي تشارك في المرحلة الاخيرة من عملية بناء طبقة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan للجدار الخلوي للبكتريا (المرجاني،2011) ، البروتينات المرتبطة بالبنسلين هي مجموعة من أنزيمات Transpeptidase Transglycosylase, Carboxy Peptidases(Hebeisen *et al*.,2001).

يحدث احياناً تحوير في هذه البروتينات مما يؤدي الى تناقص الالفة لمضادات البيتالاكتام ، وفي بعض الحالات تصبح هذه البروتينات اقل حساسية لعملية الاستلة (acylation) والتثبيط بوساطة المضادات (Cao *et al*.,2002; Neuwirth *et al* .,2001).

وعند دراسة الية المقاومة لمضادات من نوع Flouroquinolones ظهر انها تكمن في تحوير الهدف الذي يعمل عليه المضاد وهو DNA gyrase (Lei *et al*.,1991).

2-6-3 التحوير في حاجز النفاذية Alteration in Permeablity barrier

إمتلاك حاجز النفاذية من أهم الوسائل التي تتمكن بوساطتها البكتريا السالبة لصبغة غرام من مقاومة المضادات الحيوية وبسبب طبيعتها الاختيارية (Selective Permeability barrier) فان البكتريا السالبة لصبغة كرام تحتاج الى تراكيز عالية من المضاد لقتلها مقارنة بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام (Spanu *et al*., 2002 ; Winokur *et al*.,2001)، تعتمد نسبة النفاذية على حجم وشكل وشحنة جزيئات المضاد المارة من خلال ثقوب متخصصة ذات طبيعة بروتينية محبة للماء (Hydrophilic) وتنتظم بشكل قنوات تسمح بمرور الجزيئات الصغيرة الذائبة في الماء (Water Soluble) الى الفسحة البريبلازمية ، وتدعى هذه القنوات بقنوات الانتشار عبر الغشاء (Transmembrane diffution Chanals) وتدعى طريقة العبورعبرهذه القنوات بطريقة الامتصاص المحب للماء(Hydrophilic uptake pathway) (Koneman *et al* .,1992) . اشارت الدراسات الى وجود نوعين اساسين من هذه المسامات هما (Outermembrance porin F.C) (OMPF ,OMPC) ، تعد هذه المسامات الممر الرئيسي الاساس لعبور مضادات البيتالاكتام ، وان اختزال عدد هذه الثقوب في الغشاء الخارجي لبعض انواع البكتريا يؤدي الى التقليل من تدفق المضاد عبر هذه الاغشية وبالتالي تصبح البكتريا مقاومة لمضادات البيتالاكتام (Nikaido *et al*.,1985).

2-6-4 مضخات الدفق Drug Efflux Pumps

وهي الالية التي تزيد من مقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية نتيجة لفرط التعبير في منع النفاذية في السلالات عديدة المقاومة (Morshed *et al*.,1995)، تمتلك بكتريا*P.aeruginosa* مقاومة متعددة للمضادات الحيوية تعود غالباً لنفاذية غشاءها المنخفضة ولوظيفة مضخات دفق العقاقير المتعددة (Multi drugs efflux Pumps) ، وهي سلسلة متعددة العناصر، والاجزاء تلعب دوراً مهما في المقاومة الطبيعية ، والمكتسبة للبكتريا السالبة لصبغة كرام ومنها *P.aeruginosa* (Zgurskaya & Nikado 1999).

في الطراز البري لبكتريا*P.aeruginosa* انظمة الدفق من نوع Mex AB Mpump (Poole *et al*.,1996;)، عند حدوث طفرة في الجين المنظم nalB او mex R يحدث فرط في التعبير عن نظام الدفق من نوع Mex ABM pump ويصبح الكائن اكثر مقاومة من

السلالة البرية للمدى نفسه من مضادات الحياة (Masuda *et al*.,2001). لذا فان نظام الدفق Mex ABM Pump يلعب دوراً مركزياً في مستويات المقاومة الطبيعية والمستويات المتصاعدة لتعدد المقاومة لمضادات الحياة في بكتريا *P.aeruginosa* (Guan & Nakae,2001) .

تكون بعض المضخات متعددة Multi Purpose اي تضخ اكثر من مضاد مثالها مضخة في بكتريا *P.aeruginosa* تضخ التتراسايكلين والسبرفلوكساسين والكلورمفنكول والارثرومايسين والبنسلين ، وتوجد مثل هذه المضخات في بكتريا اخرى مثل بكتريا *Staph.aureus* التي تضخ السبروفلوكساسين والمضادات ذات العلاقة (المرجاني ،2011).

2-6-5 زيادة إنتاج المواد التنافسية

Increase Production Of Competitive Compounds

توجد هذه المقاومة عادة ضد مركبات السلفا (Sulfa) التي توقف تكوين حامض الفوليك Folic acidالذي يعد بادئ (Precursor) في تخليق الاحماض النووية ، يدخل في المسار الايضي لصنع حامض الفوليك (Folic acid) مركباً أولياً يدعى Para-aminobenzoic acid (PABA) يتفاعل مع مركب Hydroxymethyl dihydroptridine بوجود أنزيم Dihydropteraic synthetase (DHPS) ليعطي مركب Folic acid وهذا بدوره يتحول الى Tetrahydrofolic بوجود انزيم Dihydrofolate Reductase (DHFR) من ثم يتحول الى Pyrimidines و Purines التي تدخل في صنع DNA (; Poole,2002المرجاني،2011)، يعمل مضاد Sulphonamide على تثبيط عمل انزيم DHPS في حين يثبط مضاد Trimethoprime انزيم (DHFR) يرتبط مضاد Trimethoprime بانزيم البكتريا بالفة اعلى 60 الف مرة من الفة ارتباط انزيم الانسان ، تقاوم البكتريا هذه المضادات بزيادة انتاج مادة (PABA) لكي تدخل مسار صنع حامض الفوليك وتنافس بذلك مضاد Sulphonamide وبالتالي يستمر صنع حامض الفوليك Folic acide(Wright,2003 ; المرجاني،2011).

2-6-6 الطبقة المخاطية Slime layer

هنالك عامل وظيفي آخر يساعد البكتريا في مقاومة مضادات الحياة وهو وجود طبقة مخاطية (Slime) تحيط بالخلية تكون حرة غير مرتبطة وعند ارتباطها بالجدار تعرف بالمحفظة ، تتكون من مادة كربوهيدراتية تعرف (glycocalyx) أو (Expolysaccharide alginate) ، إذ تفرز هذه المادة بكميات كبيرة وخاصة عند الاصابة بمرض التكيس الليفي في الرئة لذا أصبح المظهر المخاطي لبكتريا *P.aeruginosa* أحد أهم مظاهر التشخيص لحالات الاصابة في التكيس الليفي (Hanna *et al*.,2000)

2-7 أنزيمات البيتالاكتاميز β -Lactamase Enzyme

تستطيع العديد من الانواع البكتيرية انتاج انزيمات تعمل على تحطيم مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات والكاربابنيم (Carbapenems) وتدعى هذه الأنزيمات أنزيمات البيتالاكتاميز β –Lactamase (المرجاني ، 2011) ، ويعود إكتشاف هذه الأنزيمات الى الباحثين Abraham & Chain عام (1940) عند ملاحظتهما أن مستخلص سلالة *E.coli* قد حطم البنسلين ولهذا أطلق على هذا الأنزيم أسم البنسيلينيز Penicillinase (Ambler,1980).

يعد أنزيم البيتالاكتاميز أحد الأنزيمات التابعة للمجموعة المميئة Hydrolases ذات الرقم التصنيفي (amino hydrolases E.C 3.5.2.6) وهو ينتمي إلى عائلة السيرين (Serine family) الحاوية على الحامض الاميني سيرين بمجموعته الهيدروكسيلية ويعد الموقع الفعال Active site لفعالية الأنزيم (Bush *et al.*, 1995; Sander *et al.*, 1993) .تنتج هذه الأنزيمات من البكتريا فقط ولها صفة دفاعية متخصصة ضد مضادات البيتالاكتام التي تمنع تكوين طبقة الببتيدوكلايكان (Peptidoglycan) في الجدار الخلوي (Amyes& Gemmel, 1997) ، وربما تكون أنزيمات البيتالاكتاميز مشتقة من أحد الأنزيمات الداخلة في تصنيع طبقة الببتيدوكلايكان (Koch,2000).

1-7-2 آلية عمل أنزيم البيتالاكتاميز The Mechanism of β-Lactamase Action

تمتلك البكتريا وسائل دفاعية عدة لحماية خلاياها من التحلل بوساطة مضادات البيتالاكتام ، ومن هذه الوسائل أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز (Livermore, 1995) ويعتمد عمل المضاد على عدة عوامل منها الموقع Location ، وكمية الأنزيم المنتج ، وجزيئات المضاد العابرة عبر الأغشية , والحركيات (Kinetics) وعلى الظروف الفيزوكيميائية

Physiochemical condition (Livermore,1995). تعمل هذه المضادات على منع تكوين الجدار الخلوي للبكتريا الذي يتكون أساساً من طبقة أساسية تدعى الببتيدوكلايكان، وهي تتكون من وحدتي سكريات أمينية (Aminosugars) مترتبة تبادلياً تدعى الوحدة الأولى N-acetyl muramic acid والثانية N-acetyl glutamic acid (Koch,2000) .

تعمل أنزيمات البيتالاكتاميز على تثبيط عمل مضادات البيتالاكتام من خلال كسرها لأصرة الأمايد (Amide bond) الموجودة في حلقة البيتالاكتام (β -Lactam ring) (Hall *et al*., 2004) مؤدية إلى تحطيم جزيئة المضاد، يتحول بعدها المضاد ألى مركب فاقد الفاعلية . يطلق على المركب الناتج من تحطيم البنسلينات أسم حامض البنسلويك Penicilloic acid ويحتوي على مجموعتين حامضيتين في حين هناك مجموعة واحدة في المركب الأصلي ويكون المركب الجديد مستقراً(Livermore, 1995) ، بينما ينتج مركب وسط غير مستقر يدعى حامض السيفالوسبوريك Cephalosporic acid من تكسير السيفالوسبورينات ، وسرعان ما يتفكك الى جزيئتين غير فعالة (Livermore, 1995).

2-7-2 تصنيف أنزيمات البيتالاكتاميز Classification of β -Lactamase

هناك اعداد كثيرة وانواع مختلفة من انزيمات البيتالاكتاميز فيوجد على الأقل 340 انزيم بيتالاكتاميز بكتيري مختلف تم وصفها مما يجعل من تصنيفها امراً صعباً ، وهناك نظامان لتصنيفها:

أولهما تصنيف Ambler الذي يعتمد على التشابه في تتابع الأحماض الأمينية والنظام الثاني هو نظام Bush-Jacoby-Medeiros الذي يعتمد على نسق المثبط–المادة الأساس (المرجاني ، 2011). هناك اربعة اصناف حسب تصنيف Ambler:

صنفA: وهي أنزيمات البنسلينيز (Penicillinase) والسيفالوسبورينيز (Cephalosporinase) التي تشفر بالبلازميدات او بالقافزات (الترانسبوزونات).

صنف B: وهي أنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo β- Lactamase.

صنف C: وهي سيفالوسبورينيز كروموسومية .

صنف D: وهي Oxacillinase.

أنزيمات صنف A تعد اكثرها شيوعاً ثم أنزيمات صنف C (المرجاني ، 2011).

أما تصنيف Bush-Jacoby-Medeiros فهو كذلك يضم اربعة اصناف او مجموعات هي:

المجموعة الأولى: السيفالوسبورينيز المشفرة كروموسومياً والتي تكون ضعيفة التثبيط بحامض الكلافيولنك .

المجموعة الثانية:البنسلينيز ، والسيفالوسبورينيز، والأنزيمات واسعة التخصص التي تضمن Carbapenemases سواء المشفر بلازميدياً او كروموسومياً والتي تثبط الكلافيولنك ومثبطات اخرى للبيتالاكتاميز .

المجموعة الثالثة : Metallo β- Lactamas وهي انزيمات لا تتأثر بجميع مثبطات البيتالاكتاميز .

المجموعة الرابعة : تضم عدداً محدوداً من انزيمات البنسلينيز غير الموصوفة التي لا تثبط بحامض الكلافيولنك . (المرجاني ، 2011).

2-7-3 العوامل الوراثية المسيطرة على أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز:

يخضع أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز لسيطرة عوامل وراثية مختلفة ويمكن تقسيمها إلى:

2-7-3-1 أنزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية Chromosomal β -Lactamase

تنتج معظم أفراد البكتريا السالبة لصبغة كرام وفي مقدمتها أفراد العائلة المعوية والزوائف الزنجارية أنزيمات البيتالاكتاميزالكروموسومية ، وتحمي هذه الأنزيمات الخلية البكتيرية ضد العديد من مضادات البيتالاكتام وتكون الجينات المسؤولة عن تشفيرها محمولة على كروموسوم الخلية (Jacoby&Sutton , 1985) وتقسم الأنزيمات الكروموسومية على قسمين :

أ-الأنزيمات الكروموسومية منتظمة التكوين Constitutive enzymes

تنتج هذه الأنزيمات بشكل طبيعي ومنتظم من دون الحاجة الى وجود عوامل محفزة، ويكون أنتاجها بمستويات واطئة (الطائي ، 2005).

ب- أنزيمات كروموسومية محفزة Inducible enzyme

ينتج هذا النوع من الأنزيمات بوجود محفز (inducer) وتسمى أنزيمات عالية التحفيز High inducible enzyme لتحولها من قليلة ألى عالية الأنتاج الأنزيمي ويخضع أنتاج هذا النوع من الأنزيمات لجينات تركيبية Structural genes ينظم عملها جين كابح Repressor gene وجينات تنظيمية Regulatory genes وأن حدوث طفرة وراثية في الجينات التنظيمية أو في الجين الكابح المنظم لعمل الجينات التنظيمية يؤدي الى زيادة أنتاج هذا النوع من الأنزيمات (Benett&Chapro,1993) ، تزداد خطورة هذه الخلايا الطافرة عند تحول أنتاجها الأنزيمي من النوع المحفز ألى منتظم التكوين (Matsumoto &Inoue,1999)، وهي تمتاز بالفة عالية لمضادات السيفالوسبورينات كمحفزات جيدة قياساً بالبنسلينات ، كما أنها

لا تتأثر بالمثبطات العادية مثل Clavulanic acid ، Tazobactam ، Sulbactam بل بمثبطات أخرى مثل Coxacillin (Livermore,1995).

2-3-7-2 أنزيمات البيتالاكتاميز البلازميدية β-Lactamase–Plasmid-mediated

هناك عدة أنواع من البلازميدات ومن أهمها من الناحية السريرية البلازميدات الحاملة لجينات مقاومة المضادات الحيوية وجينات الضراوة ، ويمكن تقسيمها ألى مجموعتين، البلازميدات الأقترانية (Conjugative plasmids) وتمتاز هذه البلازميدات بقابليتها على الأنتقال الذاتي Self-transmissible plasmids لأحتوائها على نوعين من الجينات تساعد الأولى في عملية الأتصال ويعرف النوع الثاني من الجينات Tra genes ويساعد البلازميدات على الأنتقال من الخلية الواهبة (الذكرية) ألى المستلمة (الأنثوية) عبر الجسور الرابطة ، المجموعة الثانية البلازميدات غير الأقترانية (Nonconjugative) وهي غير قابلة للأنتقال ولكنها يمكن أن تكون محركة بوساطة بلازميدات أقترانية أخرى عندما تكون منطقة التعبئة لها (mobilizing region) فعالة (Tortora *etal*.,2007;Ryan & Ray , 2004) . تعد بلازميدات المقاومة (R-Plasmid) واسعة الأنتشار في البكتريا السالبة لصبغة غرام وخاصة في العائلة المعوية ومنها بلازميد RTEM-1 والذي تتراوح نسبة أنتشاره ما بين (70-100) % (Couturer *et al*.,1988)، وكذلك البلازميد RP1 المعزول من بكتريا *P.aeurginosa* والمشفر لمقاومة الكاربنسلين (Data *et al*.,1971).

تعد الأنزيمات المشفرة بلازميديا ًالأكثر اهمية في البكتريا السالبة لصبغة كرام ، حيث تم التوصل الى ان عدد البلازميدات المشفرة لأنزيمات البيتالاكتاميز الى اكثر من 75 بلازميد مختلف في العصيات السالبة لصبغة كرام منتشر في كل انحاء العالم . تمتاز هذه الأنزيمات بكونها منتظمة التكوين وتعمل على مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات كمادة اساس ،كما إنها تثبط بأغلب المثبطات المعروفة مثل Clavulanic acid , Sulbactam , Tazobactam على العكس من الأنزيمات الكروموسومية (Marchandin *et al* ,2000) .

2-3-7-3 أنزيمات البيتالاكتاميز التي تتواسطها جينات قافزة

Transposons mediated β -Lactamase

العناصر القافزة هي تسلسلات من DNA التي تستطيع القفز من موقع الى آخر في جينوم الخلية بعملية تسمى القفز (Transposition) ، وأكتشفت في البكتريا عام 1987 وأطلق عليها التسلسلات المنغرزة (Insertion sequences) (Freifleder,1987).

وتصنف الترانسبوزونات ألى صنفين:

الترانسبوزونات البسيطة مثل Tn3 فإنه يشفر لمقاومة مضادات البيتالاكتام من خلال تشفير لأنزيمي TEM-1، TEM-2 (Jacoby,1994) . وأثبتت صفة القفز الخاصة بجين أنزيم TEM-1 لأول مرة من قبل Datta وجماعته(1971) . وهناك بعض البلازميدات تحمل ترانسبوزوناً واحدا" أو أكثر يحمل جينات تشفر لصفة المقاومة لمضاد حيوي واحد أو أكثر كما لها ألقدرة على القفز من بلازميد إلى آخر ومن بلازميد إلى الكروموسوم وبالعكس محدثة طفرة بعد أنغرازها في موقع ولتسلسلات معينة تدعى تسلسلات الهدف(Target Sequences) وهي بذلك تزود البكتريا بالإمكانية على التكيف في بيئات معينة مثل المستشفيات إذ تصبح البكتريا مقاومة نتيجة أنتقال جين المقاومة أليها بعملية القفز (Prescott *et al* ., 2005) .

الترانسبوزونات المركبة وهي التي تحتوي على عناصر الأقحام Insertion Sequences IS عند نهايتي الترانسبوزونات المركبة مثل Tn5 إذ تحمل قطعة الدنا (DNA) بين تسلسل IS جيناً يشفر لمقاومة الكانامايسين(Freifelder,1987).

2-7-3-4 أنزيمات البيتالاكتاميز التي تتواسطها الأنتجرونات:

Integrons-mediated β -Lactamase

الأنتجرون عنصر وراثي متخصص يسمح للجينات بالحركة بوساطة عمليات إعادة أرتباط متخصصة الموقع ، ويتألف الأنتجرون من جين يشفر لأنزيم الأنتيجريز مع كاسيتات (Cassette) جين مجاور التي تحتوي بصورة شائعة على جينات مقاومة المضادات الحيوية (Recchia&Hall ,1995).

2-7-5 أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

Extended Spectrumβ-Lactamases (ESBLS) :

أدى الإستخدام الواسع لمضادات سيفالوسبورينات الجيل الثالث في المجال الطبي العملي منذ سنة 1980 الى إحداث تغييرات في أنزيمات البيتالاكتاميز ، وظهور أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) ، والتي تعد من الأسباب المهمة التي ساعدت البكتريا على مقاومة مضادات البيتالاكتام الحديثة (المرجاني ، 2011).

تمثل حقبة الثمانينات بداية ظهور الأنزيمات واسعة الطيف عندما أكتشف SHV-2 ثم أعقبه إكتشاف TEM-3 ثم توالت الأكتشافات فوصل عدد الأنزيمات التابعة لعائلة TEM الى ما يزيد على 90 نوعا" وهناك 25 نوعا" ضمن عائلة SHV فضلا" عن أنواع أخرى (Bradford , 2001) . تحتوي انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBL على السيرين في الجزء الفعال وهي تعود الى صنف A حسب تصنيف Ambler الجزيئي Amblir's

(molecular class A) وان هذه الانزيمات لها القدرة على تحليل مادة Oximino – Cephalosporine وهي تثبط بوساطة حامض الكلافيولنك و التازوباكتام Yan *et al* (2006,.) . أول ظهور لهذه الأنزيمات كان ضمن العائلة المعوية وعائلة الزوائف وذلك نتيجة الأفراط في إستخدام مشتقات البيتالاكتام الحديثة وخاصة السيفالوسبورينات (Sanders *et al.*, 1993) ، وبالرغم من أمتلاك هذه البكتريا لأنزيمات كروموسومية محفزة فإن أنتشار المقاومة بينها بشكل واسع يعود إلى أنتاجها لأنزيمات مشفرة بلازميدياً قادرة على تحطيم مجاميع مضادات البيتالاكتام الحديثة (Jacoby , 1994) ومنها :

1- مجموعة Imino methoxy cephalosporins التي تضم مضادات Cefotaxime، Ceftazidime، Ceftriaxone.

2- مجموعة Oxyimino monobactam مثل مضاد Aztreonam.

3- مجموعة α-methoxy cephosporin وتضم مضاد Cefotetan، Cefoxitin.

4- مجموعة Carbapenems ومنها مضاد Imipenem.

تنتج أغلب أنزيمات واسعة الطيف (ESBLs)عن طريق حدوث طفرات في الجينات البلازميدية المشفرة لانزيمات البيتالاكتاميزنوع (TEM,SHV) مؤدية إلى حدوث تغير في تناسق أو ترتيب الأحماض الأمينية للموقع الفعال (Active site) (Jacoby,1994; المرجاني ، 2011) . تحمل الجينات المشفرة لأنزيمات واسعة الطيف عادة على بلازميدات متنقلة ذاتياً (Self transferable) ذات وزن جزئي عالٍ وتحمل صفة المقاومة المشتركة لمضادات أخرى مثل Tetracycline، Aminoglycosides، Chloramphenicol، Trimethoprim، Sulfonamid (Rice *et al.*, 1990) ، من الممكن تشفير هذه الأنزيمات عن طريق جينات محمولة على العناصر القافزة (Tranposable elements) وهذا يسهل أنتقالها بين البلازميدات وبالتالي أنتشارها في أغلب أجناس العصيات السالبة لصبغة غرام (Jacoby,1994) ، تمتلك أنزيمات واسعة الطيف ألفة عالية للأرتباط مع مثبطات بيتالاكتاميز مثل Tazobactam، Sulbactam، acid Clavulanic لذا تخلط مضادات البيتالاكتام سواء البنسلينات أو السيفالوسبورينات مع هذه المثبطات لأيقاف فعالية أنزيمات واسعة الطيف (Jacoby & Mederiors , 1991) .

2-8-مثبطات البيتالاكتاميز β-Lactamase Inhibitors :

تدعى مثبطات البيتالاكتاميز بالمثبطات الإنتحارية (Francioll Suicide inhibitors (1991, لتكوينها معقدات ثابتة بينها وبين الأنزيم نتيجة تفاعل كيميائي مكون من خطوات عدة مؤدية إلى قطع الطريق أمام الأنزيم وبالتالي منعه من تحطيم جزيئة مضاد البيتالاكتام الفعالة)

(Miller *et al*., 2001)، تتصف هذه المثبطات بكونها مضادات حيوية ضعيفة الفعالية ضد البكتريا إلاإنها قادرة على تثبيط أنزيمات البيتالاكتاميز البلازميدية والكروموسومية إذ ترتبط معها وتثبطها بتفاعل غير عكسي (Totir *et al*., 2007).

من أهم مثبطات البيتالاكتاميز هي :

2-8-1 مثبط حامض الكلافيولنك Clavulanic acid

وهو مضاد حيوي ذو فعالية ضعيفة ضد البكتريا ولكنه يمتلك فعالية تثبيطية لمدى واسع من أنزيمات البيتالاكتاميز ، وقد تم عزله عام 1967 من العزلة *Streptomyces clavuligerus* (Murray *et al*., 1999) . يشابه هذا المركب نواة البنسلين ويختلف عنها بأمتلاكه السلسلة الجانبية اسيل أمين acyl amine كما يمتلك الأوكسجين بدلاً من الكبريت ويحتوي على β-Hydroxy ethlidine أحلت في Oxazolidine ring(Reading & cole , 1977).

يمتلك حامض الكلافيولنك فعالية تآزرية مع البنسلينات والسيفالوسبورينات إذ يستخدم خلطاً مع مضاد Amoxicillin ويعرف تجارياً بـ (Augmentin) ويستخدم ضد الأصابات الناجمة من الممرضات المقاومة لمضاد Amoxicillin عند إستخدامه بمفرده (Rolinson ,1991)، وكذلك يخلط حامض الكلافيولنك مع Ticarcillin ويعرف بأسم (Timentin) التي تستخدم لعلاج اصابات بكتريا *P.aeruginosa* و*Haemophilus influenzae* كذلك يكون هذا الخليط فعالاً ضد بكتريا *Legionella pneumoniae* ووجد ان الكلافيولنك لوحده كفوء ضد هذه البكتريا وعند خلطه مع Amoxicillin او Ticarcillin يكون له فعل تأزري للأرتباط بأنزيم PBPs ، وفي داخل الخلايا يكون الكلافيولنك اكثر كفاءة من Amoxicillin وTicarcillin ضد بكتريا *Legionella pneumoniae* مما يدل على ان الكلافيولنك يخترق الخلايا أسرع من البنسلينات (المرجاني ، 2011). كما أن خلطه مع المضادات الحيوية يعمل على تثبيط أنزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من *Staph aureus* والبكتريا السالبة لصبغة كرام خاصة تلك التي تتوسطها بلازميدات تعود لعوائل PSE، HMS، OXA، TEM (Fisher,1984).

2-8-2 السلباكتام Sulbactam

يعد السلباكتام من المركبات شبه المصنعة وتركيبه هو 6-desaminopenicillin sulfone وهو مثبط فعال لأغلب أنزيمات البيتالاكتاميز المهمة سريرياً وهو أوسع طيفاً من حامض الكلافيولنك ولكنه أقل فعالية من حامض الكلافيولنك (Totir *et al*.,2007).

يمتاز هذا المثبط بعدم أمتلاكه قابلية استحثاث الأنزيمات الكروموسومية (Mandell *et al.*,1995) لذا يستخدم ممزوجاً مع مضادات البيتالاكتام لعلاج الأصابات الناتجة من البكتريا المعوية المنتجة لأنزيمات سيفالوسبورنيز المستحثة Inducible Cephalosporinase (Kazmierzak *et al.*,1990). يمتلك مثبط السلباكتام فعالية تآزرية مع مضادات البيتالاكتام فهو يوجد مخلوطاً مع مضاد الأمبسلين بنسبة 2-1 (1 غم أمبسلين – 0.5 غم سلباكتام) كما أنه قليل الأمتصاص من الأمعاء لذا يؤخذ عن طريق الوريد (Intravenous administration) (Ripa *et al.*,1990).

يمتلك خليط الامبسلين–سلباكتام فعالية ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وكذلك ضد البكتريا اللاهوائية (Akalin,1999). تشير أغلب الدراسات إلى أمكانية إستخدام خليط (الأمبسلين–سلباكتام) كخط علاجي أولي لفعاليته العالية وسميته القليلة فضلاً عن إنعدام تأثيراته الجانبية وكلفته القليلة (Akalin,1999)، لذا فأن هذا الخليط يستخدم لعلاج أصابات عديدة منها أصابات داخل البطن Intra-abdominal والتهابات المجاري البولية (Oliver *et al.* , 1999).

2–8–3 التازوباكتام Tazobactam:

يعد مثبط التازوباكتم من المركبات شبه المصنعة وتركيبه هو(atriazolyl-substituted penicillanic acid sulfone)(Murray *et al.*, 1999).

يمتلك هذا المثبط تأثيراً متقارباً مع حامض الكلافيولنك والسلباكتام ، وذلك من حيث خفض التركيز المثبط الأدنى M.I.C ألى حوالي 20 مرة لعدة أنواع من البكتريا، وبالرغم من كونه مضادا" حيويا" ضعيفاً ضد البكتريا الآانه يمتلك فعالية تثبيطية لمدى واسع من أنزيمات البيتالاكتاميز (Murray *et al.*,1999).

يتوفر بشكل توليفة مع مجموعة اليوريد بنسلين مثل الببراسلين Piperacillin ويسمى (التازوسين)، ووجد أن له دوراً ناجحاً في إعادة فعالية مضاد الببراسلين ضد البكتريا المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز TEM، SHV والبكتريا اللاهوائية(Sweet *et al.*,1994). وأشار الباحث Frank وزملاؤه (2003) إلى إمكانية أستخدام خليط التازوباكتام / الببراسلين في علاج الأصابات المكتسبة من المستشفيات وخاصة بكتريا *E.coli* وبكتريا *Proteus vulgaris*وبكتريا *P.aeruginosa* كما أن له فعالية قوية لعلاج أصابات الجهاز التنفسي المزمن (Oizumi *et al.*,1995).

ولاحظ Babini وزملاؤه (2003) أن خليط الببراسلين/التازوباكتام فعال ضد عزلات *Klebsiella* و*P.aeruginosa* المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended

spectrum β lactamase ، وأستخدم Bantar وزملاؤه (2004) خليط التازوباكتام–ببراسلين في علاج التهابات المجاري البولية .

2- 9 النسق البلازميدي لبكتريا الزوائف الزنجارية

Pseudomonas aeruginosa plasmid profile

البلازميد هو عبارة عن تركيب حلقي يتكون من خيطين حلزونيين من الـ DNA البكتيري ويعد من العناصر الوراثية خارج الكروموسومية وعادة ما تحمل البلازميدات جينات مسؤولة عن عوامل الضراوة او المقاومة للمضادات الحيوية في البكتريا (Kaye *et al.*, 2000 ; Levy, 2001).

للبلازميدات قابلية على التضاعف الذاتي بدون الإعتماد على كروموسوم المضيف لأحتوائها على منشأ التضاعف تدعى Replicon , كذلك يتميز البلازميد بأنه مستقر وراثياً ويحتوي على جينات من (1–300) جين ويوجد في بدائية النواة Prokaryotes مثل البكتريا وكذلك في حقيقية النواة Eukaryotes مثل الخمائر والفطريات وتكون الجينات المحمولة على البلازميد غير ضرورية لحياة وتكاثر الخلية البكتيرية والبكتريا الفاقدة للبلازميد تكون طبيعية في وظائفها (Prescott *et al* ., 2005).

تستطيع البلازميدات الانتقال من خلية الى اخرى بوساطة آلية تعرف بالاقتران (conjugation) التي من خلالها تنقل البكتريا الصفات الوراثية من خلية الى أخرى أو من خلال الية اخرى تعرف بالتنبيغ (transduction) بوساطة العاثيات البكتيرية (Livermore,2000).

قد تحمل جينات المقاومة على الكروموسوم او البلازميد أو كلاهما معا وإليها يعزى انتقال صفة المقاومة لمضادات الحياة ، وتعرف البلازميدات الحاملة لجينات المقاومة ببلازميدات المقاومة (R-plasmids) وتعدّ مؤشرات جزيئية مهمة في الدراسات الوبائية (Lyobe *et al.*, 1994).

في دراسة اجريت في الهند على 10 عزلات من بكتريا *P. aeruginosa* مأخوذة من مصابين بالحروق ، اظهرت النتائج ان جميع العزلات تملك بلازميداً مفرداً متطابقاً كما ان صفة مقاومة مضاد الحياة Amikacin هي صفة محمولة على بلازميد المقاومة بينما صفة مقاومة كل من مضاد الـ Clindamycin والمضاد Carbenicillin كانت محمولة على الكروموسوم ، كما امكن خلال تلك الدراسة نقل البلازميد المسؤول عن صفة مقاومة Amikacin الى بكتريا *E. coli* التي كانت حساسة لجميع المضادات قبل نقل البلازميد اليها بعملية التحول

(transformation) لتصبح بعدها مقاومة للمضاد Amikacin (Shahid & Malika, 2004) .

وفي دراسة أخرى تم عزل البلازميدات من 50 عزلة لبكتريا *P. aeruginosa* في احد مستشفيات الصين ووجد انها تتشارك باحتوائها على بلازميد مقاومة وزنه الجزيئي 55 كيلو زوج قاعدة ، وفي 15 عزلة جمعت من اماكن متفرقة وجد ان 10 منها تحمل بلازميداً بذات الوزن الجزيئي بينما احتوت ثلاث عزلات منها بلازميد اضافي وزنه الجزيئي 12.5 كيلو زوج قاعدة ، وقد اشير الى ان مصدر المقاومة في اغلب السلالات هو البلازميد نفسه (Jia ,1992) .

2 – 10 تحييد البلازميدات Plasmids curing

يعرف التحييد بأنه عملية فقدان العزلات البكتيرية للبلازميد ويمكن ان يكون فقدان البلازميد ذاتياً Spontaneous من خلال فشل نسخة البلازميد في الانتقال الى الخلية الجديدة او بأستعمال عوامل كيميائية Chemical agent وعوامل فيزيائية Physical agents (Prescott *et al* ., 2005) . أو بأستعمال مستخلصات نباتية Plant extract (Reuter & Sendel,1994) ، كما ان لبعض المضادات الحيوية تأثيراً على ال DNA البلازميدي مما يسهل فقدان تلك البلازميدات كمضاد Rifampicin,Novobiocin .(Johuston & Richmond,1970)

إن آلية عمل هذه المواد في التخلص من البلازميد متعلقة بأحداث ضرر في DNA البلازميد الذي يؤدي بالتالي الى المنع من عملية تضاعفه الأعتيادي بدون التأثير على تضاعف الكروموسوم (Kalkarni & Kanekar,1998) ، وتشمل المواد الكيميائية مادة SDS ، واليوريا UREA ، والأكردين البرتقالي Acridine Orange ، وبروميد الأثيديوم Ethidium bromide وغيرها ، إن آلية التحييد بالأكردين البرتقالي تكون بتثبيط تضاعف البلازميد عن طريق تخلله بين قواعد الـ DNA وان استعمال التراكيز العالية منه تثبط تضاعف الكروموسوم (Friefeder,1987) أما مادة SDS فأن استعمالها يؤدي الى فقدان كل او جزء من العناصر الوراثية وبتكرار عالٍ.

المواد وطرائق العمل

3-1 الاجهزة والمواد المستعملة

3-1-1 الاجهزة المستعملة

الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ
حاضنة Incubater	Memmert (Germany)
فرن كهربائي Oven	Memmert (Germany)
حمام مائي Water bath	Memmert (Germany)
ماصات دقيقة بأحجام مختلفة Micropipettes	Brand (Germany)
مصدر الأشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator	Herolab(Germany)
جهاز نبذ مركزي صغير Microfuge	Heraeus (Germany)
دوارة Vortex	Labcco (Germany)
جهاز نبذ مركزي Centrifuge	Gallenkamp (England)
المرشحات الدقيقة Millipore filter	Gallenkamp (England)
جهاز التقطير Distillatar	Gallenkamp (England)
حمام مائي هزاز Shaking water bath	Gallenkamp(England)
مجهر ضوئي Light microscope	Olympus (Japan)
الموصدة Autoclave	Hirayama (Japan)
ميزان حساس Sensitive balance	Mettler (Switzerland)
ثلاجة Refrigerater	Qean (Egypt)
مقياس الأس الهيدروجيني pH-meter	Radiometer (Denemark)
جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis apparatus	Helena(USA)

3-1-2 المواد الكيميائية والبايولوجية

المادة	الشركة المصنعة والمنشأ
كليسيرول Glycerol	BDH (England)
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4	BDH (England)
فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين Na_2HPO_4	BDH (England)
فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين المائية $Na_2HPO_4.2H_2O$	BDH (England)
النشأ Starch	BDH (England)
اليود Iodine	BDH (England)
يوديد البوتاسيوم Potassium iodide	BDH (England)
حامض الكبريتيك H_2SO_4	BDH (England)
كلوريد الصوديوم NaCl	BDH (England)
إيثانول Ethanol	BDH (England)
ترس قاعدي Tris – base	BDH (England)
بروميد الأثيديوم Ethidium bromide	BDH (England)
فوسفات البوتاسيوم Potassium phosphate	BDH (England)
كلوكوز Glucose	BDH (England)
بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide	Oxoid (England)
ببتون Peptone	Oxoid (England)
يوريا Urea	Merck (Germany)
حامض البوريك Boric acid	Merck (Germany)
خلاصة الخميرة Yeast extract	Fluka (Switzer land)
EDTA	Fluka (Switzer land)
أكاروز Agarose	Sigma (U.S.A)
تربتون Tryptone	Difco (U.S.A)
بنسلين جي Penicillin G	Sandox (Astralia)

3-1-3 الاوساط الزرعية

الوسط	الشركة المجهزة والمنشأ
أكارماكونكي MacConkey agar	Himeda(India)
أكارالدم الاساس Blood base agar	Himedia (India)
أكار السيدوموناس Pseudomonas isolation agar	Himedia (India)
أكار اليوريا الاساس Urea agar base	Himedia (India)
وسط سترات السايمون Simmon Citrate agar	Himedia(India)
أكار المغذي Nutrient agar	Oxoid(England)
وسط MR/VP	Oxoid (England)
أكارمولرهنتون Muller-Hinton agar	Oxoid (England)
وسط المرق المغذي Nutrient broth	Oxoid (England)
وسط نقيع القلب والدماغ Brain-heart infusion broth	Oxoid (England)
وسط كليغلر Kligler's iron agar	Merseyside (U.K)

4-1-3 الكواشف والمحاليل

اسم الكاشف / المحلول	الشركة المجهزة
محاليل صبغة كرام Gram stain Solution	Syrbio (S.A.R)
كاشف الاندول Kovac's Indole Reagent	Himedia (India)
كاشف احمر المثيل Methyl red	B.B.H(England)
كاشف فوكس بروسكاور Voges-Proskauer Vp1-Vp2	Bio-Merieux (France)

3-1-5 المضادات الحيوية

3-1-5-1 اقراص المضادات الحيوية المستخدمة واقطار منطقة التثبيط القياسية

(NCCLS,2002)

قطرمنطقة التثبيط (ملليمتر)						
حساسة S	متوسطة I	مقاومة R	المنشأ	تركيزالقرص µg/ml	الرمز	المضاد الحيوي
14	13-12	11	Ireland	10	Am	Ampicillin
14	13-12	11	Turkey	25	Amx	Amoxycillin
18	17-15	14	Turkey	30	CL	Cephalexin
≥17	16-14	≤13	Turkey	100	PY	Carbencillin
≥23	22-15	≤14	Turkey	30	CTX	Cefotaxime
≥21	20-14	≤13	Alrazi-Iraq	30	CTR	Cefriaxone
≥18	17-15	≤14	India	300	FT	Nitrofourantoin
≥17	16-15	≤14	Turkey	30	AK	Amikacin
≥17	16-13	≤12	Turkey	10	NOR	Norfloxacin
≥15	14-13	≤12	Alrazi-Iraq	10	TB	Tobramycin
≥15	14-13	≤12	Turkey	10	CN	Gentamicin
≥21	20-16	≤15	Turkey	5	CIP	Ciprofloxacin
≥18	17-15	≤14	Turkey	100	PRL	Piperacillin
≥18	17-15	≤14	Turkey	30	CAZ	Ceftazidime
≥16	15-11	≤10	Turkey	25	SXT	Co-trimoxazole
≥16	15-13	≤12	India	5	OF	Ofloxacin

3-1-5-2 مساحيق المضادات الحيوية

المضاد	المنشأ
Ampicillin	معمل ادوية سامراء
Amoxicillin	معمل ادوية سامراء
Carbencillin	معمل ادوية سامراء
Cephalexin	معمل ادوية سامراء
Cefotaxime	معمل ادوية سامراء
Cftriaxone	معمل ادوية سامراء
Ciprofloxacin	دار الدواء / الاردن
Gentamicin	معمل ادوية سامراء / العراق
Piperacillin	Pharmachim/Italy
Amikacin	الشركة العربية لتصنيع الادوية/ الاردن
Ceftazidime	ELsaad pharma/aleppo-syria

3-1-6 المثبطات (Inhibitiors)

المثبط	المنشأ
حامض الكلافولينك Clavulanic acid	مركز ابحاث الرازي / العراق
ببراسيلين / تازوبكتام Tazocin	Wyeth lederle S.P.A / Catania (Italy)
أمبسلين / سلباكتام Sulba	الفا- حلب للصناعات الدوائية حلب – سورية

3-1-7 السلالات القياسية

السلالة	المصدر
Pseudomonas aeruginosa ATCC154427	قسم علوم الحياة – كلية العلوم – الجامعة المستنصرية
E.coli ATCC10536	قسم علوم الحياة – كلية العلوم – الجامعة المستنصرية

3-1-8 مواد متفرقة

3-1-8-1 عدة التشخيص api 20NE Kit

مجهزة من الشركة Bio Meriux (France) وتضم مجموعة من الفحوصات الكيموحيوية المبينة في الملحق (2).

3-1-8-2 عدة عزل الدنا البلازميدي Plasmid Extraction

مجهزة من الشركة (USA) Promega .

3-1-8-3 مصدر الدم

دم بشري صنف (AB) مجهز من مصرف الدم/ ديالى.

3-2 طرائق العمل

3-2-1 تحضير المحاليل والكواشف

حضر عدد من المحاليل والكواشف والصبغات المستخدمة في الدراسة ، عقمت تلك التي تحتاج الى تعقيم باستخدام جهاز الموصدة (Autoclave) عند درجة حرارة 121م° لمدة15 دقيقة وبضغط (15 باوند/ انج^2) ، بينما عقمت بقية المواد الاخرى التي تتعرض للتلف بدرجات الحرارة المرتفعة مثل اليوريا والمضادات الحيوية بالترشيح بمرشحات دقيقة Milliporefilter بقطر 0.22 مايكروميتر ، أما المواد الزجاجية فقد عقمت بالفرن عند درجة حرارة 180م° لمدة ساعتين .

3-2-1-1 المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline

حضر المحلول الملحي الفسلجي حسب ما جاء في (Forbes *et al*.,2002) وذلك لاستعماله في اجراء التخافيف بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 90 مل ماء مقطر ثم اكمل الحجم الى 100مل ، عقم بالموصدة ، وحفظ بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال .

3-2-1-2 محلول ثابت العكورة القياسي Macfarland Standard

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

محلول-أ- اذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم في 90 مل من الماء المقطر، واكمل الحجم الى 100 مل.

محلول – ب- حضر 1% من حامض الكبريتيك المركز (H_2SO_4) باضافة 1 مل من الحامض الى 90 مل من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم الى 100 مل.

أضيف 0.5 مل من محلول (أ) الى 99.5 مل محلول (ب) رُج المحلول بقوة ووضع في أنابيب زجاجية محكمة الغطاء لمنع التبخر وحفظت في الظلام لحين الاستعمال . تمزج محتويات الأنبوبة جيداً قبل كل إستخدام .

3-2-1-3 محاليل المضادات الحيوية

حضرت محاليل خزينة (Stock solutions) بتركيز نهائي مقداره 10 ملغم/مل حسب ما ورد في (NCCLS , 2002) لكل من المضادات الاتية:-

Carbencillin , Cephalexin , Amoxicillin , Ampicillin , Gentamicin, Ciprofloxacin , Piperacillin , Cefotaxime , Ceftazidime ,Ceftriaxone Amikacin.

بإذابة 1 غم من المضاد في 90 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى 100مل ، عقمت هذه المحاليل بالترشيح بوساطة مرشحات دقيقة ذات ثقوب بقطر 0.22 مايكروميتر وحفظت في الثلاجة لحين الاستخدام .

3-2-1-4 محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز

حضرت محاليل الكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز بطريقة اليود السريعة Rapid Iodometric Method وذلك حسب ما ورد في (WHO,1978) والمحاليل هي :

3-2-1-4-1 محلول النشأ Starch Solution

حضر آنياً عند الاستعمال باذابة 0.1 غم من مادة النشأ في 10 مل من الماء المقطر، نقلت القنينة الى حمام مائي بدرجة حرارة 100م° لمدة 10 دقائق وذلك للتأكد من ذوبان النشأ ، حفظ المحلول في درجة 4 م°.

3-2-1-4-2 محلول اليود Iodine Solution

حضر بإذابة 2.03 غم من اليود و5.32 غم من يوديد البوتاسيوم في 90 مل من الماء المقطر بعدها اكمل الحجم الى 100 مل وحفظ المحلول في قنينة معتمة ومعقمة بدرجة 4 م°.

3-2-1-4-3 محلول البنسلين جي (Penicillin G Solution)

حضر بإذابة البنسلين جي في دارئ الفوسفات المتكون من محلولين هما:-

المحلول (أ):- اذيب (0.907) غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين K_2HPO_4 في كمية من الماء المقطر ، اكمل بعدها الحجم الى (100) مل .

المحلول (ب):- اذيب (0.946) غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na_2HPO_4، و (1.19) غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين (المائية) $Na_2HPO_4.2H_2O$ في كمية من الماء المقطر ، أكمل بعدها الحجم بالماء المقطر الى (100) مل ، بعد ذلك أُخذ (87.6) مل من محلول (أ) و (12.4) مل من محلول (ب) خلطا معاً وضبط الرقم الهيدروجيني الى (6.0) بعد تحضير هذا الدارئ ذوب فيه (0.5693) غم من بنسلين جي (Penicilin G) ، عقم بالترشيح ووزع في عبوات صغيرة وحفظ عند درجة حرارة (20- م°) لحين الاستعمال .

3-2-1-5 محاليل عزل الدنا البلازميدي

أستخدمت محاليل عزل الدنا البلازميدي المجهزة من قبل الشركة Promega (U.S.A) وتضم المحاليل التالية :

1. Cell lysis buffer (CLC).
2. Neutralization Solution (NSC).
3. Endotoxin Removel Wash (ERB).
4. Column Wash Solution (CWC).
5. Elution Buffer (EBB).

Kit name : Pure Yield™ Plasmid Miniprep System .

3-2-1-6 محاليل الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis Solutions

حضرت محاليل الترحيل الكهربائي وحسب ما ورد في (Maniatis *et al*.,1982) وكما يأتي :

❖ **دارئ الترس بوريت TBE**

حضر بتركيز نهائي (0.089) مولار ترس قاعدي (Tris - base) ، (0.089) مولار من حامض البوريك (Boric acid) و (0.002) مولار من مادة EDTA ، اكمل الحجم الى 1 لتر من الماء المقطر، ضبط الاس الهيدروجيني الى (8) وعقم بالموصدة .

❖ **صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide**

حضر محلول خزين تركيزه (5) ملغم/مل ، بإذابة (5) ملغم من صبغة بروميد الاثيديوم في (1) مل من الماء المقطر المعقم ، وخفف عند الاستعمال للحصول على تركيز نهائي مقداره (0.5%) مكغم/مل .

❖ **دارئ التحميل Loading Buffer**

حضر من (30%) كليسيرول ، (50%)TBE، (20%) ماء مقطر ، (0. 25%) صبغة بروموفينول الازرق .

3-2-1-7 كاشف أنزيم الكاتاليز Catalase Reagent

حضر 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 ، استعمل للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على انتاج انزيم الكاتاليز (Collee *et al*., 1996).

3-2-1-8 كاشف الاوكسيديز Oxidase Reagent

حضر انياً بإذابة (1) غم من رباعي المثيل بارافنيلين ثنائي الامين هيدركلوريكك Tetramethyl-P-phenylen diamindihydrochlorid في (90) مل من الماء المقطر المعقم ومن ثم أكمل الحجم الى (100) مل ، أستخدم هذا الكاشف للكشف عن انتاج انزيم الاوكسيديز من قبل البكتريا (Koneman *et al*.,1992).

3-2-2 الاوساط الزرعية Culture Media

حضرت الاوساط الزرعية حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوات وضبط الاس الهيدروجني الى (7) ثم عقمت بالموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 م° وضغط (15 باوند/ انج^2) لمدة 15 دقيقة ، ومن ثم حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها بعدها حفظت في الثلاجة عند حرارة 4 م° لحين الاستعمال.

وهذه الاوساط هي :

- وسط أكاراماكونكي MacConkey
- وسط أكار المغذي Nutrient agar
- وسط أكارمولرهنتون Muller- Hinton agar
- وسط المرق المغذي Nutrient broth
- وسط نقيع الدماغ والقلب Brain –heart infusion broth
- وسط أكار الستريت Simmon citrate agar

(حضر بشكل مائل بعد صبه في أنابيب وتعقيمه بالموصدة).

- وسط كليغلر Kligler's Iron agar

(حضر بشكل مائل بعد صبه في أنابيب وتعقيمه بالموصدة).

3-2-2-1 وسط أكار الدم Blood base agar

حضرت قاعدة الدم الاساس حسب التعليمات المذكورة على العبوة وعقمت بالموصدة، بعدها تركت لتبرد بدرجة حرارة 45-50 م° ثم اضيف صنف الدم AB بنسبة 5% ، ومزج جيداً بعدها صب الوسط في اطباق معقمة ، وترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، حفظ بدرجة 4 م° لحين الاستعمال ، أستخدم للعزل الاولي للبكتريا المنتجة لأنزيم Hemolysin الحال لكريات الدم الحمر .

3-2-2-2 وسط مرق لوريا Lauria Broth

حضر الوسط بإذابة مكوناته في 950 مل من الماء المقطر وهي 10 غم من التربتون (Tryptone) و 5 غم من مستخلص الخميرة (Yeast Extract) و 10 غم من NaCl وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7، ثم اكمل الى 1 لتر بالماء المقطر وعقم بالموصدة (Sambrook *et al*.,1989).

3-2-2-3 وسط أكار اليوريا Urea base Agar

حضر 950 مل من وسط اكار اليوريا الاساس Urea Base agar حسب التعليمات الواردة من الشركة المصنعة وبعد تعقيمه بالموصدة وتبريده الى 45 م° اضيف اليه 50مل من محلول 40% يوريا معقمة بالترشيح باستخدام اغشية الترشيح الدقيقة (Millipore Filter) ، ثم صب بصورة مائلة في أنابيب معقمة ذات اغطية محكمة ، أستخدم الوسط لغرض الكشف عن قابلية العزلات على إنتاج انزيم اليوريز (Li *et al* .,2004).

3-2-2-4 وسط ماء الببتون Pepton water

حضر بإذابة (2) غم من الببتون و 0.5 غم من كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر المعقم ، عقم بالموصدة بعد ضبط الاس الهيدروجيني الى 7 ، أستخدم هذا الوسط في التحري عن إنتاج الاندول (Koneman *et al*.,1992).

3-2-2-5 وسط المثيل الاحمر – فوكس بروسكاور السائل MR-VP Broth

حضر بإذابة 0.5 غم من الببتون و 5 غم من فوسفات البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر عقم بالموصدة بعد توزيعه في أنابيب اختبار بواقع 5 مل للانبوبة ، بعد التبريد أضيف اليه 10% من محلول سكر الكلوكوز المعقم بالترشيح بحيث أصبح التركيز النهائي للكلوكوز في الوسط 0.5% وأستخدم في اختبار احمر المثيل- فوكس بروسكاور (Harley & Prescott,1996).

3-2-2-6 وسط أكار السيدوموناس *Pseudomonas* isolation agar

حضر بإذابة 45.3 غم من الوسط في 1000 مل من الماء المقطرالحاوي على 20 مل كليسيرول وعقم بالموصدة أستخدم هذا الوسط في تنمية عزلات *Pseudomonas* فيعد وسطاً انتقائياً Selective media (Baron&Finegold ,1990).

3-2-2-7 وسط أكار الحليب الخالي من الدهن skim milk Agar medium

حضر بإذابة الاكار المغذي في 87.5 مل من الماء المقطر وعقم بالموصدة وبعد ان عقم وبرد الى 50م°، اضيف اليه 12.5 مل من الحليب المعقم الخالي من الدسم بظروف معقمة ومزج جيداً ثم صب في أطباق وحفظ لحين الاستعمال ، أستخدم هذا الوسط للتحري عن إنتاج أنزيم البروتييز للعزلات البكتيرية قيد الدراسة1975,.*al* (Cruickshant *et*).

3-2-2-8 وسط أكار البيض Egg Yolk agar

حضر محلياً بإضافة صفار البيض الطازج الى وسط المغذي الصلب المعقم والمبرد الى درجة حرارة (45-50) م° وبنسبة 15% ومزج جيداً ثم صب في أطباق وحفظ لحين الاستعمال أستخدم هذا الوسط للتحري عن انتاج انزيم الليسيثينيز للعزلات البكتيرية قيد الدراسة (Cruickshant *et al*.,1975).

3-2-3 جمع العينات Collection of Samples

جمعت 304 عينة تحت الاشراف الطبي المختص من حالات مرضية مختلفة وتضمنت 47 عينة من مسحات الحروق ، و 51 عينة من مسحات الجروح ، و 79 عينة من مسحات الاذن ، و 127 عينة من عينات الادرار ، بإستعمال Disposable Cotton Swabs و قناني بلاستيكية معقمة لجمع عينات الادرارالوسطي ، تم جمع العينات من مستشفى بعقوبة التعليمي ، ومستشفى البتول للولادة والاطفال ، والعيادة الاستشارية في الفترة بين 2010/9/1 ولغاية 2011/1/16 إذ سجلت المعلومات المتعلقة بالمريض من المصدر والعمر والجنس وأمراض اخرى في استمارة خاصة (ملحق 1)، زرعت النماذج مباشرة بعد أخذ العينة لغرض التشخيص.

3-2-4 زرع العينات Samples culture

زرعت العينات (مسحات الحروق ، ومسحات الجروح ، ومسحات الاذن، والادرار) بشكل فوري على وسط اكار الدم ووسط ماكونكي ، وتم تنقية العزلات على وسط *Pseudomonas* agar بطريقة التخطيط على هذه الاوساط وحضنت كافة الاطباق هوائياً بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ، أجري بعدها عدد من الفحوصات التشخيصية المورفولوجية والكيموحيوية للبكتريا المعنية بالدراسة.

3-2-5 حفظ وإدامة العزلات البكتيرية

حفظت العزلات البكتيرية بعد تشخيصها على أوساط زرعية مائلة Slant من الاكار المغذي في درجة 4 م° وأستمرت عملية الادامة بشكل دوري شهرياً من خلال تجديد زراعتها وذلك بنقل مستعمرة واحدة الى مائل أكار مغذي جديد لضمان بقائها نشطة طيلة فترة الدراسة.
أستخدم وسط نقيع الدماغ والقلب المضاف اليه كليسيرول بنسبة 15% لحفظ العزلات مدة طويلة ، وتم حفظها في درجة 20- م° لحين الاستعمال.

3-2-6 تشخيص العزلات البكتيرية

3-2-6-1 الفحوصات المظهرية

شخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على ما ورد في (Holt *et al.*,1994) إذ شخصت المستعمرات مبدئياً اعتماداً على الصفات المظهرية وتضمنت شكل المستعمرات، ولونها، وقوامها، ورائحتها، وحجمها على وسط أكار الماكونكي وأكار الدم ، أخضعت العزلات الى الفحص المجهري بإستخدام صبغة كرام للتعرف على شكل البكتريا وترتيبها وتفاعلها مع ملون كرام .

3-2-6-2 الفحوصات الكيموحيوية

3-2-6-2-1 إختبار أنزيم الكاتاليز Catalase test

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم الكاتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين الى ماء ويتحرر غاز الاوكسجين بشكل فقاعات هوائية ، إذ نقل جزء من المزروع البكتيري الى شريحة زجاجية نظيفة وأضيف اليها بضع قطرات من3% كاشف بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بإستخدام ماصة باستور، يعد ظهور فقاعات غاز الاوكسجين دليل على ايجابية الفحص (Koneman *et al.*,1992).

3-2-6-2-2 إختبار أنزيم الاوكسيديز Oxidase test

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج أنزيم السيتوكروم اوكسيديز (Cytochrome oxidase) ، إذ شبعت ورقة ترشيح بقطرات من كاشف الاوكسيديز، وبوساطة أعواد خشبية معقمة نقلت مستعمرة من العزلة قيد الدراسة الى ورقة الترشيح ، تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون البنفسجي خلال (10) ثوانٍ من ملامسة الخلايا البكتيرية لكاشف الاوكسيديز على الورقة (Koneman *et al*.,1992).

3-2-6-2-3 إختبار الاندول Indole test

استخدم للكشف عن وجود الاندول ، الذي يعد أحد نواتج أيض الحامض الاميني التربتوفان نتيجةً لامتلاك البكتريا لانزيم التربتوفانيز Tryptophanase ، إذ لقح وسط ماء الببتون السائل بمزروع العزلة قيد الدراسة ، حضن الوسط بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ، ثم أضيف 5 قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's reagent على السطح الداخلي لانبوبة الاختبار، تعد النتيجة موجبة عند ظهور حلقة حمراء خلال ثوان من إضافة الكاشف (Koneman *et al*.,1992).

3-2-6-2-4 إختبار احمر المثيل Methyl red test

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج كميات كبيرة من احماض اللاكتيك Lactic أو الفورميك Formic نتيجة أيض الكلوكوز، إذ لقح مرق MR/VP بمزروع للعزلة قيد الدراسة ، حضن بدرجة 37 م° لمدة 48-72 ساعة ، ثم أضيفت خمس قطرات من كاشف احمر المثيل ، تعد النتيجة موجبة عند تغيير اللون الى احمر (Koneman *et al*.,1992).

3-2-6-2-5 اختبار فوكس بروسكاور Voges –Proskaur test

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج استيل مثيل كاربينو (اسيتون) Aceton إذ لقح مرق MR/VP بمزروع العزلة قيد الدراسة ، حضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 48-72 ساعة .

نقل (1) مل من العالق الى أنبوبة إختبار نظيفة ، أضيف اليها (0.6) مل من محلول الفانفثول (كاشفVp1) متبوعاً (0.2) مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 40%(كاشف Vp2) مع رج الانبوبة بلطف ، تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون الاحمر بعد حوالي 15 دقيقة (Koneman *et al*.,1992).

3-2-6-2-6 إختبار استهلاك السترات Citrate Utilization test

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

3-2-6-3 التشخيص بنظام Api-20NE

بعد الحصول على نتائج الفحوصات التشخيصية للعزلات قيد الدراسة ، أستخدمت عدة التشخيص Api 20NE للتشخيص التأكيدي الذي يعتمد على السرعة والدقة ، إذ يتألف الشريط الواحد من (20) أنبوبة صغيرة تحتوي كل منها على المادة الأساس لإختبار كيموحيوي معين .

حضر عالق من المزروع البكتيري مع (2) مل من المحلول الفسيولوجي المعقم الى أن تصبح كثافة المحلول بمقدار كثافة أنبوبة ماكفرلاند القياسية (0.5) ، لُقحت الإختبارات من NO3 إلى PNPG بتوزيع عالق المحلول داخل الأنابيب ، وليست الكؤوس بإستخدام نفس الماصة ، ثم أضيف (200) مايكروليتر من العالق البكتيري المحضر إلى وسط زرعي خاص Auxomedium (7) مل ومُزج جيداً للمجانسة ، ملأت الأنابيب والكؤوس للإختبارات من GLU إلى PAC بهذا العالق ، ثم أضيف زيت معدني إلى كؤوس الإختبارات الثلاثة URE ، ADH ، GLU لغرض توفير ظروف لاهوائية ويتم توفير الرطوبة بإضافة كمية قليلة من الماء إلى قاعدة العلبة ، حضنت الأشرطة في (37) م° لمدة (24) ساعة وأضيف بعدها الكواشف حسب متطلبات كل إختبار ، دونت النتائج وفسرت بوساطة Api 20NE analytic profile index لتشخيص النماذج من جنس ونوع حسب تعليمات الشركة المصنعة ملحق (2) .

3-2-7 التحري عن بعض عوامل الضراوة في بكتريا الزوائف الزنجارية Detect of Virulance Factors of *Pseudomonas aeruginosa*

3-2-7-1 التحري عن أنزيم الليسيثينيز Lecithenase Production test

تم التحري عن إنتاج انزيم الليسيثينيز بإستخدام وسط صفار البيضEgg Yolk agar ، إذ أخذت مستعمرات نقية ولقح الوسط بها ، وحضنت الاطباق في درجة حرارة 37 م° لمدة -48

24 ساعة ، تكون مناطق رائقة حول المستعمرات النامية دلالة على إنتاج أنزيم الليسيثينيز (Cruickshank *et al* ., 1975).

3-2-7-2 التحري عن إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production

تم الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على إنتاج الهيمولايسين البكتيري بزرع هذه العزلات على وسط اكار الدم ، حضنت الاطباق بعد التلقيح في درجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة . وشوهدت مناطق التحلل متمثلة بمناطق شفافة تحيط بمستعمرات البكتريا المنتجة للهيمولايسين (Atlas *et al*.,1995).

3-2-7-3 التحري عن أنزيم البروتييز Protease Production test

لقح وسط Skimmed milk agar بالمستعمرات البكتيرية ، إذ تم عمل حفر دائرية منتظمة وحقن العالق البكتيري (فقرة 3-2-9-1-1) في هذه الحفر، وحضنت الاطباق بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة ، ظهور هالة شفافة حول الحفر دليل النتيجة الموجبة للاختبار(Benson,2002) .

3-2-7-4 اختبار قابلية العزلات على الالتصاق بالخلايا الطلائيةِ Adhesion Uro Epithelial Cells

أتبعت طريقة (Iwahi *et al*.,1983) لمعرفة قابلية العزلات على الالتصاق بالخلايا الطلائية .

3-2-7-4-1 تحضير الخلايا الطلائية

تم الحصول على الخلايا الطلائية من راسب عينات إدرار إناث غير مصابات باخماج المجاري البولية ، إذ غسلت الخلايا بعد ترسيبها بالمحلول الملحي الفسلجي أربع مرات بإعادة النبذ المركزي في كل مرة لمدة خمس دقائق بسرعة 1500-2000 دورة / دقيقة ثم أعيد تعليق الخلايا بالمحلول الفسلجي .

3-2-7-4-2 إختبار الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية

- أخذ 0.5 مليلتر من مزروع بكتيري بعمر 24 ساعة وأضيف اليه 0.5 مليلتر من عالق الخلايا الطلائية المحضر في الفقرة (3-2-7-4-1).
- مزج الخليط جيداً ثم حضن بدرجة حرارة 37م° لمدة ساعة واحدة مع التحريك كل عشر دقائق .

- غسلت الخلايا لاربع مرات بالمحلول الملحي الفسلجي مع النبذ المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 1500-2000 دورة بالدقيقة لكل مرة للتخلص من البكتريا غير الملتصقة .
- أخذت قطرة من العالق النهائي على شريحة زجاجية وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة ثم ثبتت بحرارة اللهب وصبغت الشريحة بصبغة كرام .
- لوحظت نتائج الالتصاق تحت المجهر الضوئي بإستخدام العدسة الزيتية إذ تظهر النتيجة الموجبة بالتصاق البكتريا بشكل مفرد أو تجمعات على سطح الخلايا الطلائية.

أستخدم الملح الفسلجي مع الخلايا الطلائية من دون عالق بكتيري كفحص سيطرة سالبة .

3-2-7-5 اختبار تلزين كريات الدم الحمراء Hemagglutination test

أتبعت طريقة (Iwahi *et al.*,1983) للكشف عن قابلية العزلات قيد الدراسة على تلزين كريات الدم الحمراء .

3-2-7-5-1 تحضير خلايا الدم الحمراء للانسان

استخدم الدم البشري صنف AB الذي تم الحصول عليه في عبوات بلاستيكية معقمة ، أجريت عملية النبذ المركزي للدم بسرعة 1500-2000 دورة / دقيقة ولمدة 5 دقائق بإستخدام أنابيب نبذ مركزي بلاستيكية معقمة للتخلص من البلازما والحصول على راسب كريات الدم الحمراء ، غسلت الخلايا بالمحلول الملحي الفسلجي أربع مرات حيث يتم نبذ العالق بالسرعة نفسها والوقت السابقين في كل مرة ليصبح عالق الدم جاهز لاجراء الاختبار .

3-2-7-5-2 اختبار تلازن خلايا الدم الحمراء

استخدمت طريقة التلازن بالشريحة (Slide agglutination) لاجراء الفحص، إذ مزجت قطرة (0.05) مليلتر من العالق البكتيري بعمر 24 ساعة مع قطرة من كريات الدم الحمر المحضرة في أعلاه بعدها مزجت القطرتان بإستخدام عيدان خشبية معقمة ولمدة دقيقيتين ، شوهدت بعدها نتائج التلازن بإستخدام المجهز الضوئي ، اجريت تجربة سيطرة مع كل عزلة بمزج قطرة من كريات الدم الحمر مع قطرة من المحلول الملحي الفسلجي على شريحة زجاجية نظيفة .

3-2-7-6 التحري عن أنزيم اليوريز Urease test

لقح وسط اليوريا بالمزروع البكتيري ثم حضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24-48 ساعة ، ان تحول لون الوسط الى اللون الوردي دليل على إيجابية الاختبار.

3-2-8 فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic suscepitibility test

أستخدمت طريقة Bauer & Kerby القياسية لاختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية (Vandepitte *et al*.,1991) وكالاتي :

- لقح 5 مل من وسط المرق المغذي بـ 2-3 مستعمرات من مزارع بكتيرية نقية بعمر 24 ساعة .
- رجت الانابيب جيداً ، وحضنت بالحاضنة بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة .
- قورنت عكورة النمو بعكورة المحلول ثابت العكرة القياسي لاعطاء عدد تقريبي مساوي 1.5×10^8 خلية / مل.
- نقل 0.1 مل من العالق البكتيري ونشر على وسط اكار مولر هنتون، ترك الطبق لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لحين جفاف المزروع .
- نقلت اقراص المضادات الحيوية الى سطح الوسط الزرعي بوساطة ملقط معقم بمعدل 6-7 اقراص لكل طبق .
- حضنت الاطباق بدرجة 37 م° لمدة 18-24 ساعة قيست بعدها اقطار مناطق التثبيط حول كل قرص ، عدت البكتيريا حساسة (S) او مقاومة (R) اومتوسطة intermediate(I) حسب المواصفات القياسية الواردة في NCCLS (2002).

3-2-9 التحري عن إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز β-Lactamase Production

3-2-9-1 الفحص الاولي الخاص بانتقاء العزلات المقاومة لمضادات البيتالاكتام

أجري فحص أولي للتحري عن البكتريا المقاومة لمضادات البيتالاكتام ، وأختيرت مضادات الامينوبنسلين لتمثل المجموعة وكما يأتي:

3-2-9-1-1 تحضير العالق البكتيري

لقحت أنابيب إختبار تحوي كل منها على (5) مل من محلول الملح الفسلجي بـ (150) مايكروليتر من مزارع بكتيرية منماة في وسط نقيع الدماغ والقلب بعمر(18) ساعة للعزلات قيد الدراسة ، مزجت بمازج وبذلك تم تحضير عالق بكتيري بتركيز تقريبي للخلايا (10^8)خلية/مل ، وذلك بعد مقارنة عكرة النمو المتكونة مع عكرة محلول ثابت العكرة القياسي المحضر حسب الفقرة (3-2-1-2) وإجراء العدد الحي للخلايا في المحلول .

3-2-9-1-2 تلقيح الاوساط الزرعية

حضر وسط أكار مولر هنتون وعقم بالموصدة ثم برد الى (45-50) م° أضيف مضاد الأمبسلين بتركيز نهائي مقداره (100) مكغم/مل ، رجت الاوساط جيداً وصبت في أطباق معقمة وحفظت في درجة (4 م°) بعد التأكد من عدم تلوثها زرعت الاوساط المحضرة بطريقة البقع حيث اضيف (10) مايكرولتر لكل بقعة (10^5) خلية / مل من العالق البكتيري المحضر وفق الفقرة (3-2-9-1-1) لكل عزلة قيد الدراسة وحضنت الاطباق في درجة حرارة (37)م° لمدة 24 ساعة .

3-2-9-2 إستخدام طريقة اليود القياسية السريعة للكشف عن أنزيم البيتالاكتاميز

استخدمت هذه الطريقة للكشف عن قابلية العزلات قيد الدراسة على إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز وذلك حسب ما ورد في WHO(1978) ، وكما يأتي :

1. حضرت مزارع للعزلات البكتيرية بعمر 24 ساعة .
2. نقلت المستعمرات البكتيرية بوساطة العروة الى أنابيب صغيرة حاوية على (100) مايكروليتر من البنسلين جي (فقرة 3-2-1-4-3) ، حضنت الانابيب لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 37 م° ، ثم أضيف الى كل انبوبة 50 مايكروليتر من محلول النشأ (فقرة 3-2-1-4-1) ومزجت جيداً .
3. اضيف الى كل انبوبة في اعلاه (20) مايكروليتر من محلول اليود (فقرة 3-2-1-4-2) ، إذ يتحول لون المحلول الى أزرق غامق نتيجة تفاعل اليود مع النشأ ، مزجت محتويات الانابيب جيداً لمدة دقيقة واحدة.
4. أحتسبت النتيجة موجبة عند حصول تغير لوني سريع من اللون الازرق الى اللون الابيض خلال دقيقة واحدة فقط من إضافة الكاشف (اليود) ، أعيد الفحص بظهور نتيجة موجبة متأخرة (أكثر من خمس دقائق) قورنت النتائج مع السيطرة االسالبة المتمثلة بالسلالة القياسية *P.aeruginosa* ATCC154427 والسيطرة الموجبة المتمثلة بالسلالة *E.coli* ATCC10536 .

3-2-10 التحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs)

أستخدمت طريقة الاقراص المتاخمة Disc approximation للتحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وذلك حسب ما جاء في (Jarlier, *et al*.,1988) وكالاتي :

1. حضر العالق البكتيري للعزلات قيد الدراسة وفق الفقرة (3-2-9-1-1)، ونشر المزروع بوساطة المسحة القطنية Swab المعقمة على اطباق حاوية على وسط مولر هنتون بصورة كاملة ، تركت الاطباق لمدة 10 دقائق لتجف.
2. وضع قرص يحتوي على خليط من Amoxicillin/ClavulanicAcid (30µg/Disc) في وسط الطبق الزرعي الملقح ، بعد ذلك رتبت أقراص المضادات الحيوية , Piperacillin و Ceftazidime و Cefotaxime , على بعد 3 سم من مركز قرص خليط المضاد / المثبط .
3. حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 18-24 ساعة .
4. بعد ملاحظة مناطق التثبيط فأن حدوث إتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي وواحد أو اكثر من الاقراص المذكورة دليل على النتيجة الموجبة أي إنتاج العزلة للانزيم .

3-2-11 قياس التركيز المثبط الادنى Minimal - Inhibitory Concentration

3-2-11-1 قياس التركيز المثبط الادنى بدون مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز

استخدمت طريقة التخافيف المضاعفة المتسلسلة Two Fold Dilution Method لحساب التركيز المثبط الادنى لعدد من المضادات الحياتية اعتماداً على ما ورد في Stock & Ridgway(1987) وكما يلي :

- حضرت تراكيز متسلسة متضاعفة تراوحت بين 0.5-1024 مايكروغرام/ مل لكل من المضادات الحيوية :

Ceftriaxone , Carbencillin , Cephalexin , Amoxicillin , Ampicillin , Gentamicin , Ciprofloxacin , Piperacillin , Ceftazidime , Cefotaxime , Amikacin

بإضافة نسب مختلفة من هذه المضادات من محاليلها الخزينة (الفقرة 3-2-1-3) الى وسط أكار مولر- هنتون المعقم والمبرد الى 45 م° .

- حضرت التخافيف العشرية وأختير التخفيف (10^{-2}) لمزارع البكتريا بعمر 24 ساعة بإستعمال المحلول المحلي الفسلجي المعقم .
- سحب 5 مايكروليتر من التخفيف اعلاه بوساطة ماصة دقيقة كلا على حدة ، ولقحت كقطرة واحدة على أوساط المضادات.

- كررت العملية للمزارع كافة بالتسلسل مكررين للتركيز الواحد، وتركت الاطباق لفترة في درجة حرارة الغرفة لحين جفاف القطرات قبل قلب الاطباق ، حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة .
- احتسب التركيز المثبط الادنى بأنه اقل تركيز يمنع ظهور النمو البكتيري بعد حضانة 18-24 ساعة بدرجة حرارة 37 م°.

تم مقارنة النتائج مع نقطة التوقف Break point ويمثل اقل تركيز يمكن ان يصله المضاد في المصل ليعطي اعلى فعالية وبعده يصبح مقاوماً.

3-2-11-2 قياس التركيز المثبط الادنى مع مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز

تم قياس التركيز المثبط الادنى ودراسة فعالية إرجاع مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز للمضادات سيما مضادات البيتالاكتاميز وهي (Amoxicillin, Ampicillin , Ceftazidime , Ceftriaxone , Cefotaxime , Carbencillin , Cephalexin , Piperacillin) ، إذ أتبعت طريقة (Farrell *et al* ., 2003; Oliver *et al*., 1999) بمزج المضادات مع مثبط Clavulanic acid بنسبة 4:1 لكل من المضادات آنفة الذكر باستثناء الاموكزاسلين أستخدمت التوليفة التجارية (Augmentin) بنسبة خلط 2:1 المثبط الى المضاد ، أما بالنسبة لمثبط التازوباكتام (Tazobactam) فقد أستخدم الخليط مع مضاد الببراسلين وهو مجهز من قبل الشركة المصنعة وبنسبة 8:1 وكذلك السلباكتام (Sulbactam) المخلوط مع مضاد الامبسيلين وبنسبة 2:1 فهو مجهز من قبل الشركة المصنعة ، وأتبعت طريقة العمل المذكورة بالفقرة (3-2-11-1).

3-2-12 إستخلاص الدنا البلازميدي Extraction DNA Plasmid

تم إستخلاص الدنا البلازميدي بإتباع الخطوات التالية إعتماداً على تعليمات الشركة المجهزة (Promega U.S.A):

1. نقل 600 مايكروليتر من المزروع البكتيري بعمر 18 ساعة الى أنبوبة ابندروف (1.5 مل).

2. اضيف 100 مايكروليتر من البفر المحلل للخلايا Cell Lysis Buffer ، ومزج الخليط عن طريق قلب الانبوبة 6 مرات .
3. اضيف 350 مايكروليتر من محلول التعادل المبرد(4-8C°) Cold Neutralization Solution ومزجت المحتويات بالقلب عدة مرات.
4. نبذ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق .
5. نقل الراشح تقريباً 900 مايكروليتر الى عمود تنقية Pure Yield Minicolumn وأهملت الحبيبة اللزجة المتكونة .
6. وضع عمود التنقية داخل انبوبة الجمع Collection Tube ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة / دقيقة لمدة 15 ثانية .
7. تم ازالة الراسب المتكون في أنبوبة الجمع ، وإرجاع عمود التنقية داخلها.
8. أضيف 200 مايكروليتر من محلول Endotoxin Removal Wash الى عمود التنقية Minicolumn ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 15ثانية .
9. اضيف 400 مايكروليتر من محلول Column Wash Solution الى عمود التنقية Mincolumn ونبذ المزيج بسرعة 13000 دورة / دقيقة بالمنبذة الصغيرة لمدة 30 ثانية .
10. نقل عمود التنقية Minicolumn الى أنبوبة إبند روف نظيفة سعة 1.5 مل ، ثم أضيف 30 مايكروليتر من محلول Elution Buffer مباشرة الى أنبوبة عمود التنقية وترك المزيج لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة الغرفة .
11. نبذ المزيج بوساطة المنبذة الصغيرة لمدة 15 ثانية ، ثم غلقت انبوبة إبندرف الصغيرة باحكام ، وحفظ الدنا البلازميدي المستخلص بدرجة °20C- وقد اصبح جاهزاً للترحيل الكهربائي.

13-2-3 الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي في هلام الاكاروز Gel Electrophoresis

أجريت عملية الترحيل الكهربائي لفصل خليط الدنا المستخلص وفحصه :

1. تم اذابة 0.7 غم من الاكاروز في 100 مل من دارئ TBE وترك الهلام ليبرد وتصل حرارته 50 م° ، اضيف 5 مايكروليتر من محلول بروميد الايثيديوم بتركيز 5 مكغم/ مل ومزج جيداً.

2. حضر قالب صب الهلام (Tray) وذلك باحاطة حافتي القالب بالشريط اللاصق وثبت مشط تكوين الحفر (Comb) على بعد واحد سنتمتر من احدى حافتي القالب، ثم صب الهلام داخل القالب الموضوع في وضع افقي تماماً وترك ليتصلب لمدة 30 دقيقة وفيما بعد رفع المشط والشريط اللاصق برفق ووضع القالب داخل حوض الترحيل الكهربائي المحتوي على دارئ TBE بحيث يغمر هلام الاكاروز .
3. أجريت عملية تحميل عينات الدنا في حفر الهلام بعد مزج 10 مايكروليتر من محلول الدنا مع 3 مايكروليتر من دارئ التحميل (Loading buffer).
4. رحلت كهربائياً تحت فرق جهد قدرة 3-4 فولت/سم وبمعدل مرور للتيار 20 ملي امبير ولمدة 1.5-3 ساعة .
5. تم فحص الهلام بوساطة جهاز UV-Transilluminator بطول موجي مقداره 336 نانوميتر ، ثم صور بوساطة الكاميرا (O'Connell,1984).

3-2-14 تحييد الدنا البلازميدي Curing of Plasmid DNA

أستخدمت مادة الاكردين البرتقالي Acridin orange كمادة محيدة وبالاعتماد على (Trevors,1986) وكالاتي :

- تم عمل تخافيف مختلفة للمادة المحيدة أعلاه للحصول على التراكيز (16 , 32 , 64 , 128, 256 , 512 , 1024,2000,2500,3000 مكغم/مل) .
- لقحت الأنابيب الحاوية على هذه التراكيز بـ (0.1) مل من البكتيريا المنماة في المرق المغذي بعمر 18 ساعة.
- حضنت الانابيب بدرجة 37 م° ولمدة 24 ساعة ، بعدها لوحظت كثافة النمو في الانابيب مع المقارنة بأنبوب السيطرة ، وحدد تأثير المادة المحيدة على نمو البكتيريا .
- تم تحديد التركيز المثبط الادنى للمادة المحيدة من خلال تحديد اقل تركيز له عمل على تثبيط نمو البكتيريا .
- عملت تخافيف عشرية للانبوب الحاوي على أعلى تركيز للعامل المحيد الذي عنده أستمرت البكتيريا بالنمو(يسمى هذا الانبوب Subminimal inhibitory concentration).
- اخذ (0.1) مل من أنابيب التخفيف (10^{-4}) الى (10^{-8}) ونشرت على وسط الأكار المغذي وحضنت بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة .

- تم ترحيل العزلات المحيدة بالاكاروز للتحري عن فقدانها للحزم البلازميدية التي تمتلكها العزلة الاصلية .
- تم اختبار العزلات الفاقدة للبلازميد من مقاومتها للامبسلين والاموكزاسلين.

3-2-15 التحليل الإحصائي

تم تحليل النتائج إحصائياً بإستعمال إختبار t- (t-test)عند مستوى معنوية 5% ، 1% بإستخدام النظام الإحصائي SPSS (2010) لتحليل المعلومات الخاصة بقيم MIC قبل الخلط مع المثبطات وبعد الخلط .

النتائج والمناقشة

4-1 عزل وتشخيص بكتريا الزوائف الزنجارية

Isolation and Identification of *Pseudomonas aeruginosa*

4-1-1 العزل Isolation

تم الحصول على (75) عزلة من بكتريا الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa* من مجموع (304) عينة سريرية من مصادر عزل متنوعة هي (الادرار والجروح والحروق والاذن) أي بنسبة اصابة 24.6%، جمعت من المرضى المصابين باخماج المجاري البولية وباخماج الجروح والحروق واخماج الاذن الوسطى للمدة من 2010/9/1 لغاية 2011/1/16.

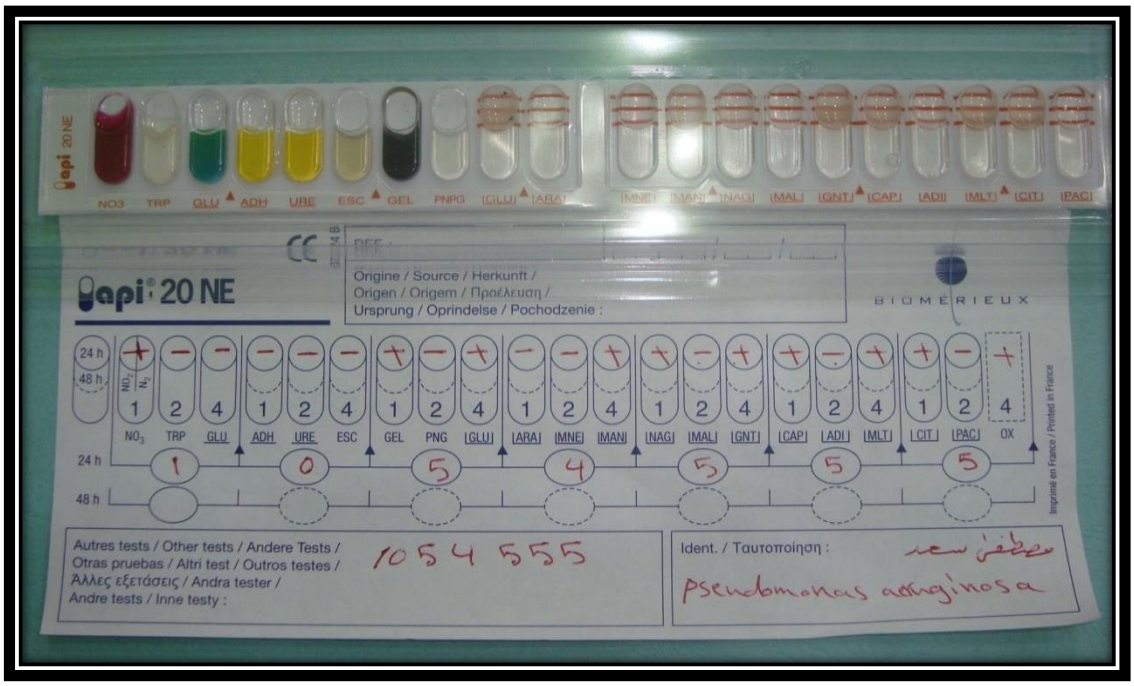
أستخدم الوسط اكار الماكونكي التفريقي ووسط اكار الدم لزراعة هذه العينات، ثم نميت بعد ذلك على وسط *Pseudomonas* Isolation agar الانتقائي لغرض تنقيتها، وتم التأكد من تشخيصها بالاختبارات الكيموحيوية .

4-1-2 التشخيص Identification

شخصت عزلات بكتريا *P.aeruginosa* بالاعتماد على صفاتها المظهرية والإختبارات المجهرية والزرعية والكيموحيوية جدول (4-1) ، إذ اظهرت هذه العزلات بأنها خلايا عصوية سالبة لملون غرام مكونة مستعمرات شاحبة اللون عند تنميتها على وسط اكار الماكونكي بوصفها غير مخمرة لسكر اللاكتوز، وبأنها مستعمرات كبيرة نسبياً وذات تحدب قليل وحافات مشرشرة أومنتظمة وغالباً ما تفرز(البايوسيانين) عند نموها على وسط الاكار المغذي الصلب وتكون لها رائحة مميزة، ولها القابلية على النمو في درجات حرارة مختلفة تتراوح بين 4-42م°، كما اثبتت هذه العزلات قدرتها على انتاج أنزيم الاوكسيديز (Oxidase) الذي يعد صفة تشخيصية مهمة لهذه البكتريا وإنتاج أنزيم الكاتاليز (Catalase) وأظهرت الإختبارات بأنها مستهلكة للسترات.

لتأكيد تشخيص العزلات تم اجراء الفحص IMViC وكانت النتائج سالبة لاختبار الاندول وسالبة لاختبار المثيل الاحمر وسالبة لاختبار فوكس بروسكاور.

وبالاعتماد على نتائج الاختبارات المجهرية والزرعية والبايوكيميائية وفقاً لما ورد في المصادر (Macfaddin,2000; Holt *et al*.,1994)، بأن العزلات هي من النوع *P.aeruginosa* وللتأكد من تشخيص عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية التي تم عزلها فقد تم استخدام عدة التشخيص api-20NE التي تمتاز بالسهولة والسرعة في التشخيص لتأكيد نتائج التشخيص الكيموحيوي ، شكل(4-1).



شكل (4-1) نتيجة تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* بنظام api 20 NE

جدول (4–1) الأختبارات الكيموحيوية والمجهرية والزرعية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

الأختبارات	النتيجة
Gram stain	–
Oxidase	+
Catalase	+
Simmon citrate	+
Urease	Variable
K.I.A	A/nochange
H2S Production	–
Voges_ proskaure	–
Indol	–
Methyl red	–
Lactose fermentation	–

+ نتيجة موجبة – نتيجة سالبة

4–1–3 توزيع العزلات حسب موضع الاصابة :

Distribution of isolates according to source of infection

صنفت العزلات والبالغ عددها (75) عزلة حسب مواضع الاصابة بعد ان تم تشخيصها على وفق ما ذكرناه ، اذ يلاحظ من الجدول (4–2) ان النسبة الاكبر للعزلات كانت ضمن عينات الادرار (31) عزلة (41.3%) من المجموع الكلي، وتلاها نسبة عزلات حالات اخماج الاذن الوسطى اذ بلغت (19) عزلة (25.3%) في حين كانت نسبة العزلات في عينات الجروح (14) عزلة (18.6%) من المجموع الكلي اما حالات الحروق فقد كانت النسبة (11) عزلة (14.6%) من المجموع الكلي.

جدول (4–2) مصدر عزل بكتريا الزوائف الزنجارية من الحالات المرضية المختلفة مع النسب المئوية للأصابة

مصدر العزل	عدد الذكور	عدد الأناث	العدد الكلي	عدد ونسب الأصابة بجراثيم الزوائف الزنجارية
إدرار	50	77	127	31 (41.3%)
اخماج الأذن الوسطى	41	38	79	19 (25.3%)
جروح	31	20	51	14 (18.6%)
حروق	21	26	47	11 (14.6%)
المجموع الكلي	143	161	304	75 (100%)

جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما توصل اليه Olayinka وزملاؤه (2004) والذين أوضحوا أن أعلى نسبة إصابة بجراثيم الزوائف الزنجارية كانت من اخماج المجاري البولية إذ بلغت (47) اصابة (51.1%) ، تليها حالات اخماج الجروح والحروق التي بلغت (38) حالة (41.3%) ، تليها اخماج الاذن الوسطى التي بلغت حالتان فقط (2.1%).

كما اتفقت هذه النتائج مع ما توصل اليه Abdullah وزملاؤه (2010) الذين اوضحوا ان اعلى نسبة لجراثيم الزوائف الزنجارية كانت معزولة من حالات التهابات المجاري البولية التي بلغت (40%) مما يدل على دور هذه البكتريا في خمج المسالك البولية وخاصة لدى المرضى الذي يخضعون لعملية القثطرة وقد يعزى السبب الى عوامل الالتصاق التي تمتلكها هذه البكتريا والتي تسهل عمليه التصاقها بمواد القثطرة ومقاومتها للعديد من المضادات البكتيرية من خلال تواجدها ضمن الغشاء الحيوي الكثيف (Thic biofilm) (Brook *et al*.,2007 : Goering *et al*., 2008).

يأتي معدل الخمج في حالات التهابات الاذن الوسطى جدول (4-2) بهذه البكتريا بالدرجة الثانية بعد خمج المسالك البولية (19) حالة (25.3%) ، وهذه النتائج لاتتفق مع جاء به Abdullah وزملاؤه (2010)، اذ كانت نسبة العزل في دراستهم (6) عزلات (12%) من حالات خمج الاذن الوسطى ، قد يعزى ذلك لأختلاف ظروف العزل وحجم العينة وطبيعة الظروف البيئية في مدينة بعقوبة .

أما معدل الخمج في الجروح فقد بلغ (14) حالة (18.6%) وقد يعود السبب الى ان هذه البكتريا تعد من الممرضات الثانوية الانتهازية إذ انها تنتهز فرصة حدوث اختلال عام او موضعي في احد دفاعات الجسم الميكانيكية او المناعية او كليهما معاً (Brooks *et al*.,2007; Goering *et al*.,2008)، إذ استطاعت المحمدي (2000) من عزل (15) عزلة من بكتريا *P.aeruginosa* من مجموع (20) عينة في حالات الجروح في مستشفيات بغداد أي بنسبة (20) عينة في حالات الجروح في مستشفيات بغداد أي بنسبة (68.2%)، كما اكدت الدراسة التي اجريت في توباكو لمجموعة من المستشفيات من قبل Orretti (2004) ان بكتريا *P.aeruginosa* كانت الاكثر شيوعاً في حالات الجروح اذ تم عزل (141) عزلة من بكتريا *P.aeruginosa* من اصل (183) عينة أي بنسبة (77%).

أشار كل من Nwobu و Oguntibeju (2004) في جنوب أفريقيا ان نسبة عزل هذه البكتريا في التهابات الجروح كانت عالية اذا ما قورنت بباقي المسببات المرضية الاخرى اذ بلغت نسبة العزل (33.3%).

أما معدل الخمج في حالات الحروق فقد بلغ (11) حالة (14.6%) وقد يعود السبب الى تلوث هذه الحروق من اجواء المستشفيات والادوات والاسرة وايدي العاملين في المستشفى بهذه البكتريا (Songer,2004).

أشار Abdullah وزملاؤه (2010) ان نسبة عزل بكتريا الزوائف الزنجارية في حالات الحروق بلغت (32%) في مستشفيات بغداد .

4-2 التحري عن بعض عوامل الضراوة المهمة لبكتريا الزوائف الزنجارية
Detection of some important virulance factors of *P.aeruginosa*

إن قابلية بكتريا *P.aeruginosa* على احداث الخمج يعود لامتلاكها عدداً من عوامل الضراوة ، بعضها يلعب دوراً مباشراً والبعض الاخر له دور غير مباشر فإذا ما اجتمعت هذه العوامل فإنها ستكون المسؤولة عن إحداث الضرر في جسم المضيف ، أخضعت جميع العزلات البالغة (75) عزلة لدراسة هذه العوامل وقد كانت النتائج كما يأتي :

4-2-1 إنتاج انزيم الليسيثينيز Lecithinase Production

تم التحري عن قدرة العزلات على إنتاج أنزيم الليسيثينيز وأظهرت النتائج إن جميع العزلات قيد الدراسة تتصف بقدرتها العالية على إنتاج أنزيم الليسيثينيز إذ كانت نسبة العزلات المنتجة 100% بأستخدام وسط البيض Egg Yolk agar إذ تكونت مناطق رائقة حول المستعمرات النامية جدول (4-3) ، وهذا يتفق مع ما أكده الباحث Al-Tikrity (2009) على قدرة عزلات بكتريا *P.aeruginosa* على إنتاج هذا الأنزيم بنسبة (100%) وتكمن آلية عمل هذا الأنزيم في تحطيم Lecithin (phosphatidyl cholin) وهو مكون للأغشية الخلوية لكائنات حقيقية النواة مما يسمح لبكتريا *P.aeruginosa* بالإنتشار.

4-2-1 إنتاج الهيمولايسين Hemolysin Production

اختبرت قابلية عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية على إنتاج الهيمولايسين من خلال تنميتها في وسط أكار الدم الحاوي على 5% دم الانسان ، وقد أظهرت النتائج إن عدد العزلات المنتجة لانزيم الهيمولايسين (67) عزلة مما يشكل نسبة (89.3%) من مجموع العزلات الممرضة البالغ (75) عزلة ، تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليه العبيدي (2002) التي وجدت ان (88.46%) من عزلات *P.aeruginosa* كانت لها القابلية على انتاج الهيمولايسين ، كذلك جاءت هذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه Qasim (2006) الذي وجد ان 86% من عزلات *P.aeruginosa* كانت لها القابلية على انتاج الهيمولايسن، بينما اشار (Aouf,2001) الى ان النسبة المئوية لانتاج أنزيم الهيمولايسين في عزلاته الممرضة *P.aeruginosa* بلغت حوالي 62,7%.

4-2-3 إنتاج أنزيم البروتييز Protease Production

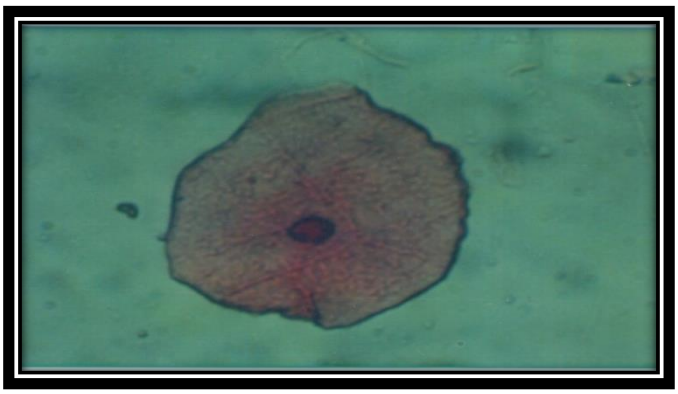
أختبرت قابلية جميع عزلات بكتريا *P.aeruginosa* على إنتاج أنزيمات البروتييز الخارجية باستخدام وسط حليب الفرز (Skimmed Milk) وأظهرت النتائج ان (88%) من العزلات كانت منتجة لانزيم البروتييز جدول(4-3) ، تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه Al-Tikrity (2009) الذي أشار الى ان (86.1%) من سلالات الزوائف الزنجارية لها القابلية على إنتاج البروتييز القاعدي ، وكذلك تتفق مع ما توصلت إليه الشويخ (2006) التي ذكرت أن (86%) من العزلات أظهرت قابليتها على إنتاج البروتييز القاعدي .

تختلف هذه النتيجة مع ما توصلت اليه الباحثة Al-Saffar (2005) التي وجدت إن جميع عزلات الزوائف الزنجارية كانت لها القابلية على إنتاج انزيم البروتييز .

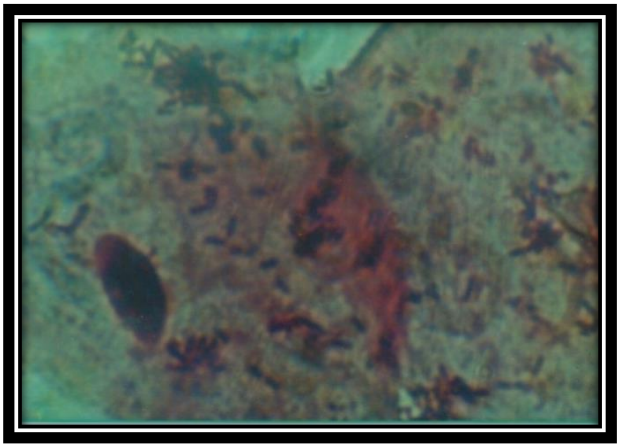
4-2-4 اختبار قابلية العزلات على الالتصاق بالخلايا الطلائية

تعد قابلية البكتريا على الالتصاق من عوامل الضراوة المهمة في احداث اول خطوة في امراضية البكتريا، تظهر النتيجة الموجبة من خلال حصول التصاق الخلايا البكتيرية وبشدة على سطوح الخلايا الطلائية (المعزولة من إدرار أشخاص غير مصابين) ، إذ ظهرت خلايا البكتريا بشكل مفرد او بشكل تجمعات ملتصقة على الخلايا الطلائية كما في الشكل (4-3) مقارنة مع السيطرة السالبة وهي عبارة عن خلايا طلائية فقط الشكل (4-2). تبين نتائج الجدول (4-3) ان (65) عزلة من المجموع الكلي للعزلات الخاضعة للدراسة أي بنسبة (86.6%) لها القابلية على الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية.

أشار Drago وزملاؤه (2001) ، ان التصاق الميكروبات على السطوح الطلائية تعد مرحلة اولية واساسية لحدوث الاصابة ، كما ذكر الباحث Wesley(2004) ان لعوامل الالتصاق اهمية كبيرة في استيطان البكتريا المسببة للالتهابات في انسجة الجسم، اذ تلتصق الاهداب بطبقة الـ (Glycolipid) الموجود في الخلايا الطلائية، وهذا له علاقة بالتهابات حويض الكلية (Pyelonephritis). تشير الدراسات الحديثة الى ان التراكيب الخيطية او بروتينات الغشاء الخارجي (LPS) والكلايكوبروتين (Glycoproteins) هي بمثابة لواصق (Adhesins) تسهل عملية تثبيت الكائن المجهري بانسجة المضيف (Cortes *et al*.,2002; Sherlock *et al*., 2004).



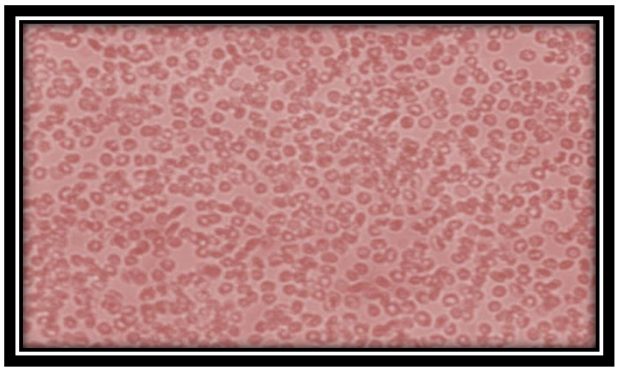
شكل (4-2) الخلايا الطلائية كسيطرة سالبة تحت العدسة الزيتية (100X)



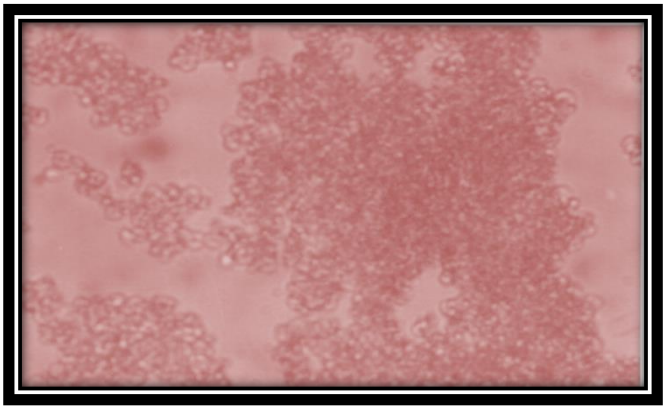
شكل (4–3) نتيجة اختبار موجبة لألتصاق بكتريا *P.aeruginosa* بالخلايا الطلائية الظهارية تحت العدسة الزيتية (100X)

4–2–5 اختبار التلازن الدموي Slid hemagglutination test

بينت نتائج فحص التلازن الدموي وبإستخدام الشريحة الزجاجية ان (61) عزلة من مجموع العزلات (75) الخاضعة للدراسة أي بنسبة (81.3%) كانت تمتلك القابلية على تلزين كريات الدم الحمر للانسان، جدول (4–3) وظهرت كريات الدم الحمر الملزنة بشكل تجمعات متراصة، كما لوحظ حدوث تغير في مظهرها العام اذ ظهرت بشكل مجعد الشكل (4–5)، فيما احتفظت كريات الدم الحمر غير الملزنة بشكلها الطبيعي (الدائري) الشكل (4–4)، تتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليه الباحثة العبيدي (2002) التي وجدت ان (84.4%) من *P.aeruginosa* كانت لها القابلية على تلزين كريات الدم ، كما أكد Sherlock وزملاؤه (2004) و Merino وزملاؤه (1997) ان تفسير فعالية التلازن الدموي التي تقوم بها العديد من الانواع البكتيرية هو إمتلاكها اللواصق المتمثلة بالتراكيب البروتينية الموجودة على سطح الخلية الخارجي ، ويعد وجودها ضرورياً في تطور الحالة المرضية (Pathogenesis).



شكل (4–4) كريات الدم الحمراء الطبيعية (Control) تحت القوى (40X)



شكل (4-5) نتيجة أختبارموجبة لتلزين كريات الدم الحمراء تحت القوى (40X)

4-2-6 انتاج انزيم اليورييز Urease Production

اوضحت نتائج الدراسة ان (37) عزلة من مجموع العزلات (75) الخاضعة للدراسة أي بنسبة (49.3%) كانت تمتلك القابلية على إنتاج أنزيم اليورييز جدول (4-3) ، وتتأتى أهمية هذا الانزيم من قابليته على تحليل اليوريا الى الامونيا NH_3 وحامض الكاربونيك H_2CO_3 (Tanak *et al*.,2003) إذ يسبب هذا الأنزيم إعتلالاً دماغياً ناشئاً عن الأمونيا الذي يدعى (Amonia Encephalopathy) بسبب عدم أيض الأمونيا الزائدة في الكبد (Tanak *et al*.,2003).

أستخدم وسط اليوريا الحاوي على الدليل (Phenol red) الذي يتأثر بتغير درجة حموضة الوسط ، لذا فان الامونيا سوف تعمل على رفع الرقم الهيدروجيني للوسط مما يؤدي الى تغيير لون الدليل الى اللون الوردي ، وبذلك استدل على ايجابية النتيجة (Konemon *et al*.,1992).

جدول(4-3)قابلية عزلات *Pseudomonas aeruginosa*على إنتاج بعض عوامل الضراوة

رقم العزلة	انتاج انزيم الليسيثينيز Lecithenase	انتاج الهيمولاسين HP	انتاج انزيم البروتييز Protease	الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية UECs	تلزين خلايا الدم الحمراء HA	انتاج أنزيم اليوريز Urease
PU1	+	+	+	**+	–	+
PU2	+	–	–	**+	*+	+
PU3	+	+	+	++	*+	+
PU4	+	+	+	**+	*+	+
PU5	+	+	+	**+	*+	+
PU6	+	+	+	**+	*+	+
PU7	+	+	–	++	*+	+
PU8	+	+	+	**+	*+	+
PU9	+	+	+	–	–	+
PU10	+	+	+	+++	*+	+
PU11	+	+	+	**+	*+	–
PU12	+	–	–	**+	*+	+
PU13	+	+	+	**+	*+	+
PU14	+	+	+	**+	–	+
PU15	+	+	+	++	*+	+
PU16	+	+	+	–	–	–
PU17	+	+	+	**+	*+	+
PU18	+	+	+	**+	+*	+
PU19	+	+	+	**+	*+	+
PU20	+	+	+	++	*+	+
PU21	+	+	+	**+	–	+
PU22	+	+	+	–	–	+
PU23	+	+	+	–	–	+
PU24	+	+	+	**+	*+	+
PU25	+	+	+	++	*+	+
PU26	+	+	+	**+	*+	+
PU27	+	+	+	**+	*+	+
PU28	+	+	+	++	*+	+
PU29	+	–	–	**+	*+	+

+	*+	**+	+	+	+	**PU30**
+	*+	**+	+	+	+	**PU31**
+	*+	**+	+	+	+	**PE32**
_	*+	++	+	+	+	**PE33**
_	*+	+++	+	+	+	**PE34**
+	*+	**+	+	+	+	**PE35**
_	*+	**+	+	+	+	**PE36**
_	*+	**+	_	_	+	**PE37**
_	_	**+	+	+	+	**PE38**
+	*+	**+	+	+	+	**PE39**
_	*+	++	+	+	+	**PE40**
_	*+	**+	+	+	+	**PE41**
_	*+	**+	+	+	+	**PE42**
_	_	_	+	+	+	**PE43**
_	*+	+++	+	+	+	**PE44**
_	*+	**+	+	+	+	**PE45**
_	*+	**+	+	+	+	**PE46**
+	*+	++	+	+	+	**PE47**
_	*+	**+	+	+	+	**PE48**
+	*+	**+	_	_	+	**PE49**
_	*+	_	+	+	+	**PE50**
_	*+	**+	+	+	+	**PW51**
_	*+	**+	+	+	+	**PW52**
_	*+	**+	+	+	+	**PW53**
_	*+	**+	+	+	+	**PW54**
_	_	**+	+	+	+	**PW55**
_	*+	+++	_	_	+	**PW56**
_	*+	**+	+	+	+	**PW57**
_	*+	**+	+	+	+	**PW58**
_	_	_	+	+	+	**PW59**
_	_	_	+	+	+	**PW60**
+	_	_	+	+	+	**PW61**
_	*+	+++	_	_	+	**PW62**
_	*+	**+	+	+	+	**PW63**

PW64	+	+	+	++	*+	–
PB65	+	+	+	+++	–	+
PB66	+	+	+	**+	*+	–
PB67	+	+	+	**+	*+	–
PB68	+	+	+	++	*+	–
PB69	+	+	+	**+	*+	–
PB70	+	+	+	**+	*+	–
PB71	+	+	+	++	*+	–
PB72	+	+	+	–	–	–
PB73	+	+	+	**+	*+	+
PB74	+	+	+	+++	*+	–
PB75	+	–	–	++	*+	–

– : تدل على عدم امتلاك البكتريا لعامل الضراوة + : امتلاكها لعامل الضراوة

تلزين ; كريات الدم الحمراء

+* : تلازن اكثرمن(10) من كريات دم حمراء النتيجة موجبة

– : تلازن اقل من(10) من كريات دم حمراء النتيجة سالبة

الالتصاق بالخلايا الطلائية الظهارية

+ ** التصاق اكثر من (20) خلية بكتيرية

+ + التصاق اكثر من (40) خلية بكتيرية

+++ التصاق اكثر من (80) خلية بكتيرية

PU يشير الى العزلات المعزولة من الادرار

PE يشير الى العزلات المعزولة من الاذن

PW يشير الى العزلات المعزولة من الجروح

PB يشير الى العزلات المعزولة من الحروق

4-3 حساسية بكتريا الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية

Antibiotic senitivty tests of *P.aeruginosa*

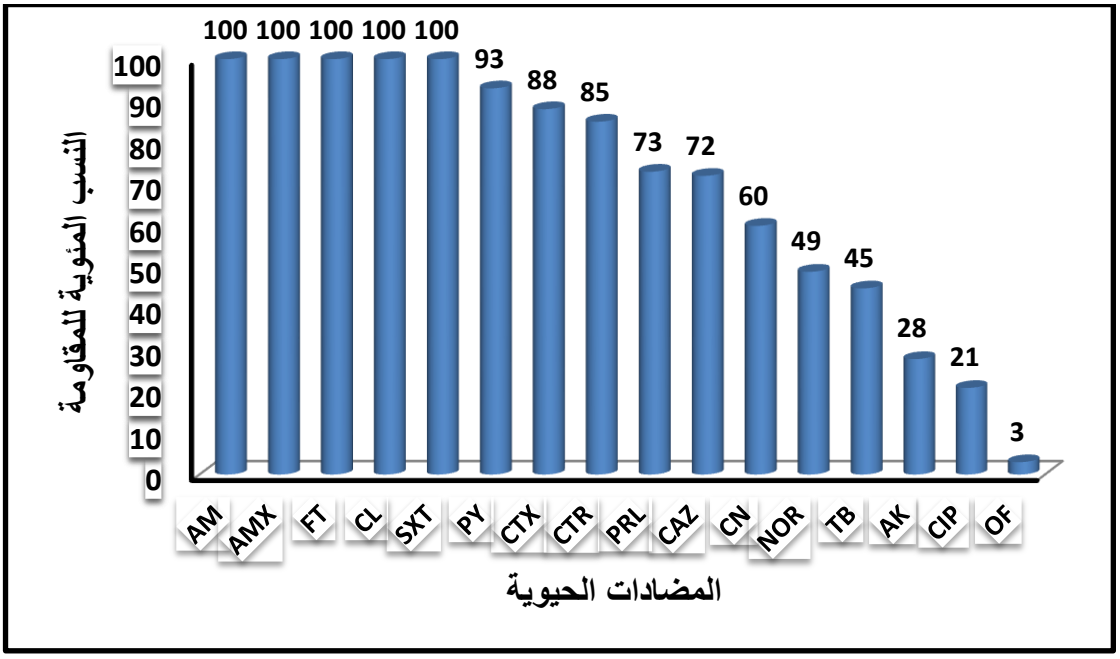
أختبرت حساسية جميع عزلات *P.aeruginosa* (75) عزلة تجاه (16) نوع من المضادات الحيوية ، معظمها من الانواع الشائعة الاستخدام في القطر لعلاج الاصابات المختلفة لمعرفة نوع الاستجابة من خلال قياس قطر منطقة التثبيط ومقارنة النتائج مع ما ورد في NCCLS(2002) ، ملحق (3).

أظهرت نتائج الدراسة تبايناً واضحاً في مقاومة بكتريا الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية ، فقد قاومت جميع العزلات قيد الدراسة مضادات Ampicillin ،

Amoxicillinو Cephalexinو Nitrofourantoinو Co-Trimoxazol وبنسبة 100% ، وهذه النتائج متفقة مع ما توصلت اليه AL-Saffar (2005) و Abdullah وزملاؤه (2010)، إذ كانت عزلاتهم مقاومة لهذه المضادات وبنسبة 100% ، الشكل (4–6) .

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (4–6) ان نسبة مقاومة العزلات للمضاد Carbencillin بلغت 93% وهذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه العبيدي (2002) إذ كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد في عزلاتها 92%، والصفار (2010) اذ كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد في عزلاتها 92.98%، ولا تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Aouf (2001) اذ بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد في عزلاته 75%، وقد يعود سبب هذه المقاومة الى قلة نفاذية الجدار الخارجي وكذلك افراز انزيمات البيتالاكتاميز وانظمة الدفق للجزيئات الصغيرة المحبة للماء مثل المضادات الحيوية (Livermore,2002) .

كما يشير الشكل (4–6) الى ان نسبة المقاومة تجاه المضادات Cefotaxime ، Ceftriaxone، ceftazidime بلغت 88%، 85% ،72% على التوالي. وهذه النتائج مقاربة لما توصل اليه Qasim (2006) إذ بلغت نسبة المقاومة لمضاد Cefotaxime في عزلاته 92%، وتختلف هذه النتائج مع ما توصلت اليه الباحثة Al-Gherawi (2009) اذ بلغت نسبة مقاومة مضاد Cefotaxime في عزلاتها 66.7%، وقد بينت الصفار (2010) ان نسبة مقاومة بكتريا *P.aeruginosa* الى Cefotaxime، Ceftriaxone، Ceftazidime هي (67.54%، 78.94%، 65.78%) على التوالي وهي بذلك تختلف عن النتيجة التي تم التوصل اليها في هذه الدراسة ، وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه Rashid وزملاؤه (2007) اذ بلغت نسبة مقاومة مضاد Ceftriaxone في عزلاتهم 86.1%، وجاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لما توصل اليه Abdullah وزملاؤه (2010) اذ بلغت نسبة المقاومة لمضاد Ceftazidime في عزلاتهم 78% .



شكل (4–6) النسب المئوية لمقاومة بكتريا الزوائف الزنجارية للمضادات الحيوية المختلفة

AM = Ampicillin AMX = Amoxicillin FT = Nitrofurantoin CL = Cephalexin SXT = Co-Trimoxazole
PY = Carbencillin CTX = Cefotaxime CTR = Ceftriaxone PRL = Piperacillin CAZ = Ceftazidime
CN = Gentamicin NOR = Norfloxacin TB = Tobramycin AK = Amikacin CIP = Ciprofloxacin
OF = Oflaxacin

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (4–6) ان نسبة مقاومة العزلات للمضاد Piperacillin هي 73%، ولا تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه Abdullah وزملاؤه (2010) اذ بلغت نسبة مقاومة هذا المضاد في عزلاتهم 24%.

أما مجموعة الامينوكلايكوسايد التي شملت كل من مضادات Gentamicin، Tobramycin، Amikacin فقد بلغت نسبة المقاومة لها في هذه الدراسة 60% ، و45% ، و 28% على التوالي وجاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصلت اليه العبيدي (2002) التي اشارت الى ان نسبة مقاومة العزلات لمضاد Tobramycin هي 46% ، وقد بينت Al-Gherawe (2009) ان نسبة مقاومة بكتريا *P.aeruginosa* لمضاد Gentamicin هي 66%، وهي مقاربة للنتيجة التي تم التوصل اليها في هذه الدراسة، وقد لوحظ نتائج مختلفة لمضاد الجنتامايسين مع ما ذكرته العبيدي (2002) في ان نسبة المقاومة لهذا المضاد في عزلاتها كانت 42%، وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصلت اليه الصفار (2010) اذ بلغت نسبة مقاومة عزلاتها لمضاد Amikacin 28.94%.

أما مجموعة Quinolones التي تضم مضاد Norfloxacin و Ciprofloxacin و Ofloxacin فقد بلغت نسبة المقاومة لها 49% و 21% و 3% على التوالي وتتفق هذه النتائج

مع ما توصلت اليه العبيدي (2002) والصفار (2010) اذ كانت نسبة مقاومة عزلاتهم لمضاد Ciprofloxacin هي 23%، وتختلف هذه النتيجة مع ما توصل اليه Abdullah وزملاؤه (2010) الذين اشاروا الى نسبة مقاومة مضاد Ciprofloxacin هي 4%، كما جائت نتائج الدراسة الحالية مقاربة لما توصل اليه Abdullah وزملاؤه (2010) اذ وجدوا ان جميع عزلاتهم كانت حساسة لمضاد Ofloxacin.

تتفق نتائج هذه الدراسة مع العديد من الدراسات التي بينت مقاومة جراثيم الزوائف الزنجارية للعديد من المضادات الحيوية إذ إنها مقاومة لمضادات البيتالاكتام β-lactams ، فضلا عن مقاومتها العاليه لمضادات Fluoroquinolone باستثناء مضاد Oflaxacin و Aminoglycoside وهو ما يجعلها صعبة العلاج (Abdullah *et al* .,2010) .

4-4 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية

Multiple Antibiotic Resistance

أصبحت مقاومة العزلات المرضية ولاسيما المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية مشكلة اخذت بالتزايد الامر الذي يؤدي الى صعوبة في اختيار العلاج المناسب وبالتالي ازدياد نسبة الوفيات(Karlowsky *et al* .,2003; Bradford,2001).

أظهرت الدراسة الحالية ان جميع عزلات *P.aeruginosa* المحلية قيد الدراسة تحمل صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (مقاومة لاكثر من مضاد حيوي واحد)، تشير النتائج ان العزلة (PB71) المعزولة من الحروق كانت اكثر العزلات مقاومة للمضادات الحيوية إذ استطاعت مقاومة 15 مضاداً حيوياً (جدول 4-4) اما العزلات (PE34،PU4) فهي العزلات الاقل مقاومة حيث إنها قاومت (7) مضادات حيوية فقط فهي العزلات الاكثر حساسية بين العزلات قيد الدراسة. وتتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه العبيدي (2002) من أن اكبر مقاومة كانت من نصيب بكتريا *P.aeruginosa* (15) مضاداً من قبل عزلة واحدة في حين كانت اقل مقاومة هي (9) مضادات من قبل عزلتين، مما يشير الى وجود المقاومة المتعددة للمضادات، كما اوضح Qasim (2006) في دراسة على بكتريا *P.aeruginosa* معزولة من مرضى مصابين بالتهابات مختلفة في مدينة بغداد تملك صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ، اذ لاحظ ان أعلى نسبة للمقاومة في عزلاتها كانت (56%) وهي تمثل نسبة العزلات المقاومة لمدى من المضادات يتراوح بين (6-8) مضاد من المضادات المستخدمة في الدراسة ،

وان أقل نسبة مدى مقاومة كانت (4%) وهي تتمثل بالعزلة المقاومة لمضادين فقط من مجموعة المضادات المستخدمة .

إن عدم توافر العلاج الفعال ضد البكتريا التي تملك صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية هي مشكلة خطيرة على صحة الانسان مما يستدعي الحاجة الى البحث لإيجاد مضادات حديثة فعالة ضد هذه البكتريا (Murray, 1999 ; Ueda&Sunagawa,2003).

جدول (4-4) المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي اظهرتها عزلات بكتريا *P.aeruginosa*

عدد المضادات التي قاومتها العزلات	عدد العزلات	ارقام العزلات
7	2	PE34 , PU4
8	4	PE46,PE35,PE32,PU21
9	6	PW52,PE44,PE36,PE33,PU28
10	11	,PE42,PE40,PU30,PU23,PU15,PU13,PU12,PU9,PU7 PB72,PB65
11	20	,PE38,PU27,PU24,PU22,PU19,PU18,PU11,PU5,PU3 ,PW61,PW60,PW59,PW56,PW53,PW51,PE48,PE45 PB69,PB68,PW62
12	15	PE50,PE43,PE39,PE37,PU29,PU28,PU17,PU16,PU1 PB75,PB74,PB70,PB67,PW57,PW55,
13	13	,PE49,PE41,PU26,PU25,PU20,PU14,PU8,PU6,PU2 PB73,PB66,PW58,PW54
14	3	PW64,PE47,PU10
15	1	PB71

تم تقسيم عزلات بكتريا *P.aeruginosa* قيد الدراسة الى مجموعتين على أساس عدد المضادات التي قاومتها جدول (4-5) اذ وضعت العزلات المقاومة (6-10) مضاد حيوي في المجموعة الاولى أما العزلات المقاومة الى (11-15) مضاداً حيوياً وضعت في المجموعة الثانية، كانت المجموعة الثانية هي المجموعة السائدة في الدراسة وتحتوي على (52) عزلة بكتيرية مقاومة (11-15) مضادا حيويا وبنسبة 69.33% من المجموع الكلي للعزلات الخاضعة للدراسة، وجاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصل اليه Qasim (2006) الذي وجد ان المجموعة السائدة تشكل نسبة (56%) بين العزلات *P.aeruginosa* المعزولة من مصادر

سريرية مختلفة ، بينما كانت اقل نسبة مقاومة متعددة للمضادات الحيوية ضمن الدراسة الحالية أظهرتها المجموعة الاولى وكانت 30.66% من العزلات الكلية .

جدول (4–5) تقسيم العزلات المحلية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* الى مجموعتين على اساس عدد المضادات التي تقاومها

المجموعة	عدد المضادات التي قاومتها	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية (%)
1	**10 – 6**	**23**	**30.66**
2	**15 – 11**	**52**	**69.33**
المجموع		**75**	**% 100**

4–5النسق السائد للمقاومة المتعددة لبكتريا *P.aeruginosa* للمضادات الحيوية

أظهرت نتائج الدراسة ان نسق المقاومة السائد للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية يقع ضمن المجموعة الثانية جدول(4–5) ، وبعد تحليل المعلومات الخاصة بمقاومة كل عزلة للمضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة تبين أن نسق المقاومة السائد لعزلات *P.aeruginosa* قيد الدراسة هو احد عشر مضادا جدول (4–6) وكما ياتي :–

AM – AMX – FT- CL – SXT-PY-CTX-CTR-PRL-CAZ-CN

من النتائج المسجلة في الجدول (4–6) يتضح ان هناك جين مقاومة لمضاد واحد يضاف الى نسق المقاومة للمضادات NOR-TB-Ak لدرجات المقاومة 14,13,12 ضمن المجموعة الثانية على التوالي.

وبعد مقارنة النتائج مع ما توصلت اليه العبيدي (2002) لوحظ تقارب بالنتائج إذ كان النسق السائد للمقاومة المتعددة لدى العبيدي هو ثلاثة عشر مضادا وهي كالاتي :–

AMP- AMX- TE- KF-FT-S-PY-SXT-TOB-PRL-RD-CTX-GM

جدول (4–6) النسق السائد للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ضمن المجموعة

نوع المضادات	درجة تعدد المقاومة
Am –Amx –FT- CL- SXT-PY-CTX-CTR-PRL-CAZ-CN	**11**
Am –Amx –FT- CL- SXT-PY-CTX-CTR-PRL-CAZ-CN-NOR	**12**
Am –Amx –FT- CL- SXT-PY-CTX-CTR-PRL-CAZ-CN-NOR-TB	**13**
Am –Amx –FT- CL- SXT-PY-CTX-CTR-PRL-CAZ-CN –NOR-TB-AK	**14**

4–6 الانتقاء الاولي للعزلات المقاومة لمضاد الامبسلين

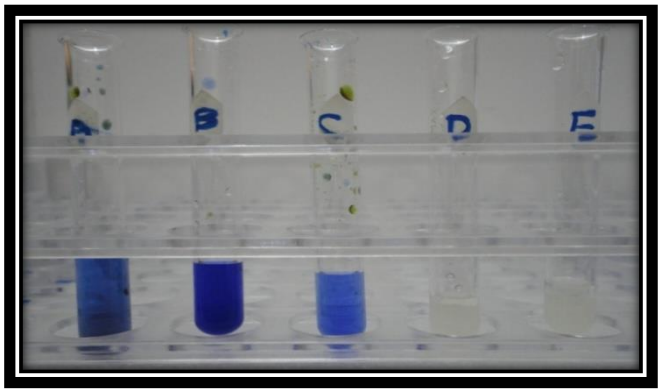
أظهرت جميع العزلات مقاومة لمضاد الامبسلين واستطاعت النمو في تركيز 100مكغم/مل مما يعطي انطباعا عن عدم فعالية هذا المضاد ضد البكتريا، وربما يعود سبب مقاومة البكتريا لهذا المضاد نتيجة الاستعمال العشوائي او الى سوء اختيار الجرعة المناسبة وهذا ما اكده الباحثان (Sanders& Sanders ,1992).

4–7 التحري عن أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز

Detection of β-lactamase Production

أعتمدت طريقة اليود القياسية السريعة للتحري عن قابلية انتاج انزيم البيتالاكتاميز لكافة العزلات قيد الدراسة ، وهي من الطرائق السريعة في اعطاء النتائج وغير المكلفة وسهلة التطبيق لتوافر المواد اللازمة لعمل الاختبار، وهي تستخدم البنسلين جي كركيزة (Substrate) كونه يمثل الاساس لعمل انواع انزيمات البيتالاكتاميز جميعاً (Bush *et al*.,1995)، تعتمد طريقة اليود القياسية السريعة على اساس واحد هو الكشف عن حامض البنسلويك Pencillioc acid المتكون من كسر اصرة الامايد Amide band في حلقة البيتالاكتام (Sykes&Mattew,1976) ، إذ يتكون معقد بنفسجي غامق ويبقى مستقراً بدون انتاج أنزيم البيتالاكتاميز دلالة على النتيجة السالبة الموضحة في الشكل (4–7) الأنابيب A,B,C للعزلات PW62,PE38,PU4 على التوالي ، وفي حالة انتاج أنزيم البيتالاكتاميز فإن حامض البنسلويك المتكون نتيجة فعالية الانزيم سوف يقوم باختزال اليود (Iodine) الى يوديد (Iodide)

والاخير ليس له قابلية التفاعل مع النشأ مما يؤدي الى تحوله الى اللون الابيض دلالة على النتيجة الموجبة كما في الشكل (4–7) الانابيب D,E للعزلات PB71,PU10 على التوالي.



شكل (4–7) فحص التحري عن أنتاج أنزيم البيتالاكتاميز

A_النتيجة السالبة للعزلة PU4 B_النتيجة السالبة للعزلة PE38

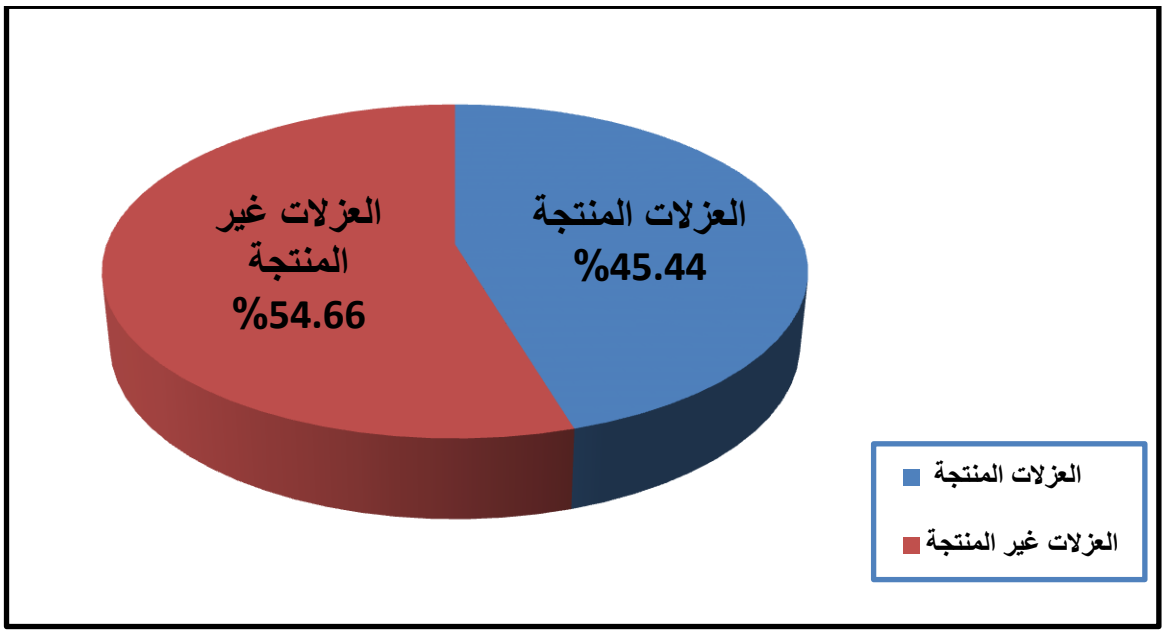
C_ النتيجة السالبة للعزلة PW62 D_النتيجة الموجبة للعزلة PU10

E_النتيجة الموجبة للعزلة PB71

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن (34) عزلة من مجموع (75) عزله لبكتريا *P.aeruginosa* الخاضعة للدراسة أعطت نتيجة موجبة لفحص إنتاج البيتالاكتاميز أي نسبة (45.44%) جدول(4–7) وشكل (4–8) ، يلاحظ من الجدول ان العزلات PU1,PU10,PU14,PU25,PU26,PE32,PE41,PE47,PW64,PB67,PB71,PB72) كانت الاسرع في اعطاء النتيجة الموجبة خلال ثوان معدودات أي انها الاعلى من حيث إنتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز مقارنة بالسلالة القياسية *E.coli* ATCC10536 وبالرجوع الى جدول التحري نجد ان (41) عزلة من أصل (75) عزلة أي نسبة 54.66% غير منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز مقارنة بالسيطرة السالبة متمثلة بالسلالة القياسية *P.aeruginosa* ATCC154427 ، وقد يعزى ذلك الى امتلاك هذه العزلات لاليات اخرى للمقاومة غير الية انتاج انزيمات البيتالاكتاميز مثل امتلاكها حاجز النفاذية او حدوث تغيير في بروتينات الغشاء الخارجي مما يؤدي الى تغيير في موقع الهدف (Pope *et al.*,1998) او نتيجة لامتلاكها انظمة الدفق (Chuanchune *et al.*,2001) .

يمكن تفسير الاختلاف في وقت اعطاء النتيجة الموجبة اعتمادا على تركيز انزيم البيتالاكتاميز المنتج من قبل البكتريا (Plaucha *et al.*,1999) اذ كلما كان تركيز الانزيم اكثر كلما كان الوقت اللازم لظهور النتيجة الموجبة اقل والعكس صحيح، يعود الامر في ذلك الى الجينات المشفرة لهذه الانزيمات ان كانت بلازميدية او كروموسومية ومن نوع الانزيمات المتكونة اساسا او المستحثة (Phillippon *et al.*,2002) .

وتتفق هذه النتيجة مع ما توصلت اليه العبيدي (2002) عندما وجدت ان نسبة بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز تصل الى 46.15%، بينما وجد الباحث Strateva (2007) وزملاؤه ان (66.8%) من عزلات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مصادر مختلفة منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز وذلك من خلال دراستهم على 203 عزلة بكتيرية ، واشار الباحث Lee وزملاؤه (2005) في دراسة قاموا بها في كوريا الى ان نسبة بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز كانت (25.4%).



شكل (4–8) النسبة المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز

جدول (4–7) قابلية العزلات المحلية لبكتريا *P. aeruginosa* على إنتاج أنزيم البيتالاكتاميز β- Lactamase

رقم العزلة	انتاج انزيم البيتالاكتاميز	رقم العزلة	انتاج انزيم البيتالاكتاميز	رقم العزلة	انتاج انزيم البيتالاكتاميز	رقم العزلة	انتاج انزيم البيتالاكتاميز
PU1	+++	PU21	_	PE41	+++	PW61	_
PU2	+	PU22	_	PE42	_	PW62	_
PU3	_	PU23	_	PE43	_	PW63	+
PU4	_	PU24	_	PE44	_	PW64	+++
PU5	++	PU25	+++	PE45	_	PB65	++
PU6	_	PU26	+++	PE46	_	PB66	++
PU7	+	PU27	-	PE47	+++	PB67	+++
PU8	_	PU28	++	PE48	_	PB68	_
PU9	_	PU29	-	PE49	+	PB69	-
PU10	+++	PU30	-	PE50	_	PB70	++
PU11	_	PU31	_	PW51	+	PB71	+++
PU12	_	PE32	+++	PW52	++	PB72	+++
PU13	_	PE33	++	PW53	_	PB73	++
PU14	+++	PE34	++	PW54	++	PB74	+++
PU15	_	PE35	++	PW55	++	PB75	_
PU16	_	PE36	++	PW56	_	E.coli ATCC10536	+
PU17	+	PE37	+	PW57	_		
PU18	_	PE38	_	PW58	_	P.aeruginosa ATCC154427	_
PU19	_	PE39	++	PW59	_		
PU20	++	PE40	_	PW60	+		

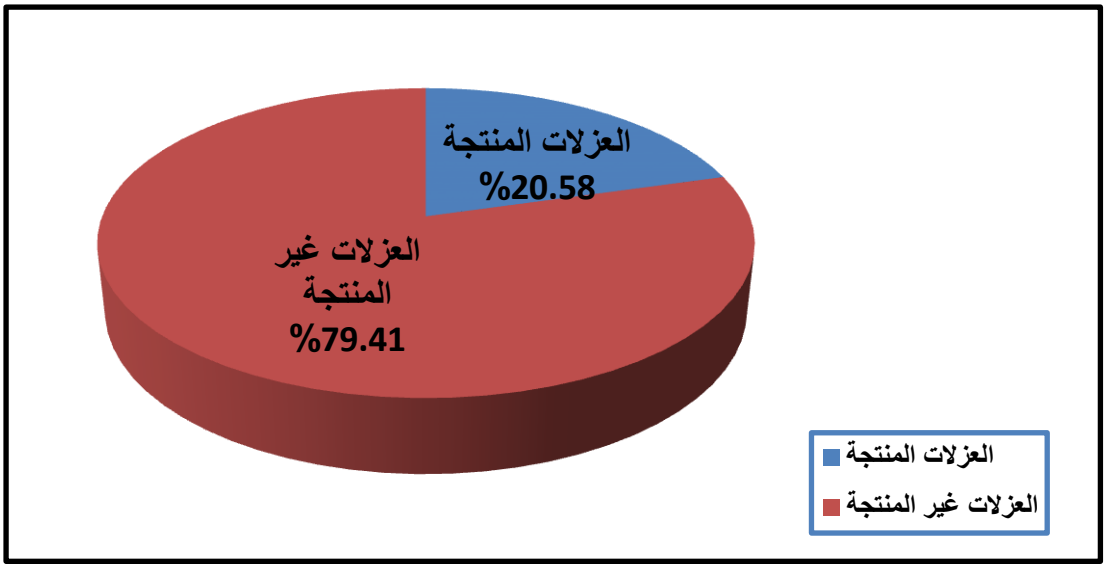
+++ نتيجة موجبة خلال اقل من دقيقة

++ نتيجة موجبة خلال 1–5 دقائق _ نتيجة سالبة

4-8 التحري عن انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف
Detection of Extended Spectrum β-lactamase enzymes

أستخدمت في هذه الدراسة طريقة الأقراص المتاخمة Disk Approximation للتحري عن أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended Spectrum β-lactamase (ESBLs) ، وهي من الطرائق السهلة والدقيقة ، وتعد النتيجة موجبة عند حدوث اتساع في منطقة التثبيط بين القرص المركزي الحاوي على خليط الاموكزاسلين / حامض الكلافيولنك مع واحد او اكثر من المضادات الاخرى امثال Ceftazidime , Cefotaxime, Piperacillin ، إذ أشار الباحث Bonfiglio وزملاؤه (2002) الى فعالية هذه الطريقة في تشخيص العزلات المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بالاضافة الى اجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية.

أخضعت جميع العزلات قيد الدراسة المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز والتي بلغ عددها (34) عزلة للكشف عن انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وقد اشارت النتائج الى ان (7) عزلات من مجموع (34) عزلة اعطت نتيجة موجبة لاختبار انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs أي بنسبة (20.58%) ، جدول (4-8) شكل (4-9،4-10) ، وجاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصل اليه Strateva وزملاؤه (2007) الذين اشاروا الى ان إنتاج بكتريا *P.aeruginosa* لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف بنسبة (26.3%) من خلال دراسة اجروها على مصابين بالتهابات مختلفة في بلغاريا، بينما وجد الباحث Alipour وجماعته (2010) ان (30%) من عزلات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من عدد من مستشفيات ايران منتجة لانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وذلك من خلال دراستهم على (350) عزلة بكتيرية . وأشار الباحث (Winokur,2001) الى ان تشفير هذه الانزيمات يكون بوساطة بلازميدات كبيرة الحجم تتراوح بين (80-300) كيلو زوج قاعدة تنتقل بين الانواع البكتيرية المختلفة ، وفضلاً عن ذلك فإنها تحمل جينات تشفر الى مقاومة مضادات بيتالاكتام اخرى .



شكل(4-9) النسبة المئوية للعزلات المنتجة وغير المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

شكل (4-10) أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف للعزلة المحلية *P.aeruginosa*

1. مضاد الأموكزاسلين / كلافيولنك
2. مضاد السيفتازديم
3. مضاد السيفوتاكسيم
4. مضاد الببراسلين

جدول (4-8) قابلية عزلات *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة محليا"على انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended – spectrum β -Lactamase (ESβLs)

رقم العزلة	انتاج انزيمات واسعة الطيف	رقم العزلة	انتاج انزيمات واسعة الطيف
PU1	_	PE41	+
PU5	_	PE47	+
PU7	_	PW51	_
PU10	+	PW52	_
PU14	_	PW54	_
PU17	_	PW55	_
PU20	+	PW60	_
PU25	_	PW63	_
PU26	_	PW64	+
PE28	_	PW65	_
PE32	_	PW66	_
PE33	_	PW67	_
PE34	_	PB70	_
PE35	_	PB71	+
PE36	_	PB72	_
PE37	+	PB73	_
PE39	_	PB74	_

- عزلات غير منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

+ عزلات منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

4-9 تحديد التراكيز المثبطة الدنيا لعدد من المضادات الحيوية

4-9-1 بدون وجود المثبطات

تم تحديد التركيز المثبط الادنى (M.I.C) لبعض المضادات الحيوية التي اختيرت كونها تمثل المضادات الاكثر استعمالاً (Drug of choice) لمعالجة الالتهابات المختلفة التي تسببها بكتريا *P.aeruginosa* في مستشفياتنا، أخضعت جميع العزلات المنتجة لانزيمات

البيتالاكتاميز (34) عزلة لهذا الفحص ، تم إختبار هذه العزلات تجاه (11) مضاد حيوياً وهي Ampicillin، Amoxicillin، Carbencillin، Cephalexin، Cefotaxime، Ceftriaxone،Ceftazidime Piperacillin، Ciprofloxacin، Gentamicin، Amikacin، اعتمدت نقطة التوقف (Break point) الموصوفة من قبل (NCCLs,2002) كأساس لحساب الاستجابة وتعرف بإنها التركيز الامثل الذي يمكن ان يصله المضاد في المصل بحيث يوفر اعلى حد للمعالجة ، يعد الكائن مستجيباً (Susceptible) عندما تكون مقادير (M.I.C) المحسوبة أقل من نقطة التوقف ، واستخدمت طريقة التراكيز المضاعفة المتسلسلة في وسط اكار مولر هنتون لاجراء هذا الاختبار، لكون مكونات الوسط المستعمل تعد من العوامل المؤثرة على نتائج قيم (M.I.C) المحسوبة اذ تؤثر تأثيراً واضحاً على مقادير M.I.C المحسوبة لذلك يفضل إستخدام أكار مولر هنتون لاحتوائه على كمية قليلة من كلوريد الصوديوم ، ونسب قليلة من أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم (Stocks & Ridgway,1987) .

تشير نتائج الدراسة الحالية وكما موضح في الجدول (4–9) الى ان العزلات قيد الدراسة جميعها ابدت مقاومة لمضادات Ampicillin و Amoxicillin تراوحت ما بين (512–1024) مكغم/مل ، وهذه النتائج جاءت مقاربة الى ما توصل اليه Abdullah وزملاؤه (2010) إذ كانت قيم (M.I.C) لها (128–1024<) وان نتائجنا ايضاً كانت مطابقة الى ما توصل اليه (Poirel *et al.*,2000) من ان جميع عزلات *P.aeruginosa* كانت مقاومة 100%، يلاحظ من النتائج بإن العزلات أظهرت مقاومة مشتركة لمضادي الامبسلين والاموكزاسلين بتراكيز بلغت أضعاف نقاط التوقف ، وهذا وارد لان بمقدور الانزيمات المحطمة للامبسيلين ان تعمل بالكفاءة نفسها على تحطيم الاموكزاسلين لان المضادين يعودان الى مجموعة واحدة (Atlas,1995)، وكذلك الاستخدام الشائع والمتداول بكثرة لهذين المضادين .

أما بالنسبة لمضاد الببراسلين Piperacillin فقد استطاعت (20) عزلة مقاومة المضاد بتركيز تراوح بين (256–512)مكغم/ مل وبالرغم من ان النتائج تشير الى ان فعالية الببراسلين ضد بكتريا *P.aeruginosa* أعلى من فعالية مجموعة الامينوبنسلين لكن مع هذا فإن النتائج تدل على وجود مقاومة لهذا المضاد بالرغم من دخوله الحديث للعلاج في العراق وربما يعزى السبب في ذلك الى امتلاك هذه البكتريا انزيمات تعمل على تحطيم مضاد الببراسلين، وكذلك يعود السبب في ذلك الى كثرة استعمال هذا المضاد في مستشفياتنا .

اما بالنسبة الى مضاد الـ Carbencillin فقد تراوحت قيم M.I.C له ما بين (64–1024)، فقد اشار Neu (1985) الى ان السلالات البكتيرية المنتجة لانزيمات البيتالاكتاميز

نوع TEM بمقدورها تحطيم مضاد الكاربنسلين فضلاً عن الببراسيلين وربما يفسر هذا السبب المقاومة لمضاد الكاربنسلين والببرسلين.

بلغت قيمة التركيز المثبط الادنى M.I.C لمضادات Cephalexin، Cefotaxime، Ceftriaxon (128–1024)، (16–1024)، (16–1024) مكغم /مل، على التوالي، اما قيم التركيز المثبط الادنى M.I.C لمضاد Ceftazidime فكانت (8–512) مكغم/مل، جاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصل اليه Abdullah وزملاؤه (2010) الذين اظهروا ان قيم M.I.C لمضاد Cefotaxime تراوحت بين (8–1024)مكغم/مل ، بينما أشار Du وزملاؤه (2010) في دراستهم على جراثيم الزوائف الزنجارية في تايوان ، باستخدام مضاد Ceftazidime بأن قيم M.I.C تتراوح بين (4–256) مكغم/مل، ويعزى سبب ارتفاع المقاومة لمضادات السيفالوسبورينات الى الانتاج العالي لانزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية والبلازميدية معاً او لأنخفاض تجميع الدواء بوساطة الجدار وانظمة الدفق التي تمتلكها بكتريا *P.aeruginosa* (Livermore,2000)، وقد يعزى سبب المقاومة الى الضغط المستمر لاستعمال المضاد والذي ينتج عنه تطور صفة المقاومة سيما عن طريق موقع الهدف او عن طريق أنظمة الدفق وكل هذه الميكانيكيات يشفر لها كروموسومياً (Ruiz ,2003).

أما بالنسبة لمضادات مجموعة الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides فقد بلغت قيمة M.I.C لمضاد Gentamicin (2–1024)مكغم/مل ، ولمضاد Amikacin (4–256) مكغم/مل ، جاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة لما توصل اليه Abdullah وزملاؤه (2010) الذين بينوا ان قيم M.I.C لمضاد Amikacin كانت منخفضة فقد تراوحت (4–128) مكغم/مل.

أما مضاد Ciprofloxacin فقد كانت قيم التركيز المثبط الادنى له (1–64) مكغم/مل ، وقد بينت الدراسة الحالية ان هنالك مقاومة منخفضة لهذا المضاد من قبل جراثيم الزوائف الزنجارية ، وقد أتفقت هذه النتائج مع العبيدي (2002) التي بينت ان قيم M.I.C منخفضة لمضاد Ciprofloxacin والتي بلغت (0.5–64)مكغم/مل ، فيما أشار Abdullah وزملاؤه (2010)إلى ان قيم M.I.C لمضاد Ciprofloxacin كانت (1–16)مكغم/مل في دراستهم على جراثيم الزوائف الزنجارية .

جدول (4–9) قيم M. I .C لبعض المضادات الحيوية المستخدمة Drug of Choice في علاج الألتهابات المتسببة عن بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

Amikacin	Gentamicin	Ciprofloxacin	Pipracillin	Ceftazidime	Ceftriaxone	Cefotaxime	Cephalexin	Carbenicillin	Amoxicillin	Ampicillin	المضاد / رقم العزلة
≥32	≥8	≥4	≥128	≥32	≥32	≥32	≥32	≥128	≥32	≥32	نقاط التوقف $\mu g/ml^{-1}$
16	32	2	64	16	32	256	512	1024	1024	512	PU1
4	2	1	256	128	128	32	128	512	512	512	PU5
16	4	2	32	16	64	512	1024	1024	1024	1024	PU7
128	16	32	512	256	512	512	1024	1024	1024	1024	PU10
16	2	1	128	128	128	128	1024	1024	1024	512	PU14
4	4	4	256	256	256	256	512	512	512	512	PU17
256	128	64	512	512	512	512	512	512	1024	1024	PU20
4	2	2	128	128	256	256	256	512	512	1024	PU25
4	16	2	256	256	512	512	512	512	512	512	PU26
16	64	2	64	16	16	512	1024	1024	1024	1024	PE28
64	4	8	256	64	64	16	1024	1024	1024	1024	PE32
16	4	2	32	32	32	32	512	512	512	512	PE33
4	16	16	64	128	512	512	512	512	1024	1024	PE34
8	4	2	64	16	16	512	512	512	512	1024	PE35
16	128	2	256	16	128	256	1024	1024	1024	512	PE36
64	1024	32	256	512	16	16	512	64	512	256	PE37
16	4	2	512	16	512	512	1024	1024	1024	1024	PE39
256	512	32	512	512	512	512	512	1024	1024	512	PE41
128	256	64	512	256	1024	1024	1024	1024	1024	1024	PE47
16	2	2	64	16	256	256	512	512	512	512	PW51
8	4	1	32	16	16	16	128	128	512	512	PW52
128	16	64	512	64	512	512	512	512	512	512	PW54
128	32	2	32	16	256	256	256	1024	1024	1024	PW55
8	4	2	64	8	512	512	512	512	512	512	PW60
16	2	2	256	256	256	256	256	512	512	512	PW63
128	256	2	512	128	1024	1024	1024	1024	1024	1024	PW64
8	4	8	64	16	32	32	512	1024	1024	1024	PW65
4	2	1	256	128	1024	1024	1024	1024	1024	1024	PW66

4	16	2	512	512	512	512	512	1024	1024	1024	PW67
16	2	16	256	256	1024	1024	1024	1024	1024	1024	PB70
64	512	2	512	512	512	512	1024	1024	1024	1024	PB71
4	128	2	64	16	512	512	512	512	512	512	PB72
8	4	2	256	128	512	512	512	1024	1024	1024	PB73
4	2	2	256	16	16	256	256	1024	1024	1024	PB74

4-9-2 تحديد التراكيز المثبطة الدنيا بوجود مثبطات انزيمات البيتالاكتاميز

تم تحديد التراكيز المثبطة الدنيا (M.I.C) للمضادات الحيوية بوجود مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز لمعرفة تأثير الفعل الخلطي لمثبطات انزيمات البيتالاكتاميز مع مضادات البيتالاكتام في هذه الدراسة وهي Ampicillin، Amoxycillin، Cephalexin، Carbencillin، Piperacillin، Cefotaxime، Ceftriaxone، Ceftazidime، اذ تم مزج المضاد مع المثبط حامض الكلافيولنك بنسبة 1: 4 ، كما استخدم الببراسلين/ تازوبكتام (Tazocin) المحضر تجارياً وبنسبة 1: 8 وكذلك مضاد الامبسلين/ سلباكتام المحضر تجارياً باسم (Sulba) وبنسبة خلط 2: 1 وكذلك الاموكزاسلين / حامض الكلافيولنك المعروف (Augmentin) وبنسبة 2: 1.

جدول (4-10) النسب المئوية للتأثير الخلطي لمثبطات البيتالاكتاميز / المضاد

على حساسية عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* للمضادات الحيوية

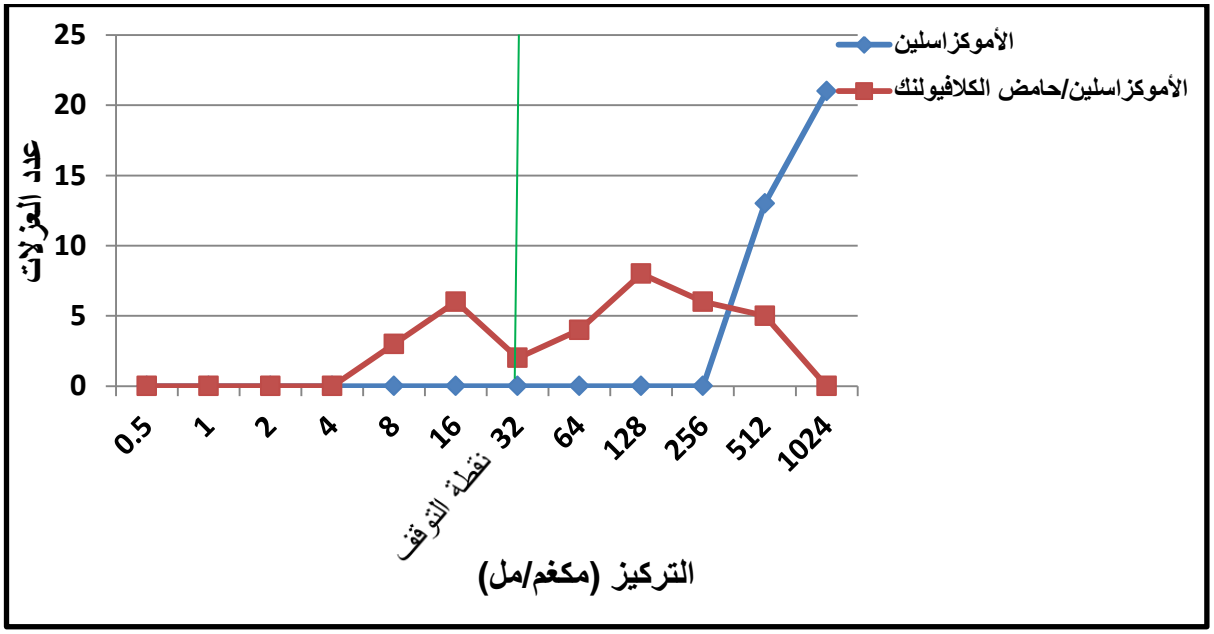
المضاد المثبط	نسبة العزلات الحساسة (%)	نسبة العزلات المقاومة (%)
Ampicillin	0	100
Ampicillin / Sulbactam	0	100
Amoxicillin	0	100
Amoxicillin / Clavulanic acid	26.47	73.52
Carbenicillin	5.88	94.11
Carbenicillin / Clavulanic acid	41.17	58.82
Cephalexin	0	100
Cephalexin / Clavulanic acid	32.35	67.64
Cefotaxim	17.64	82.35
Cefotaxim / Clavulanic acid	73.52	26.47
Ceftriaxone	23.52	76.47
Ceftriaxone/ Clavulanic acid	79.41	20.58
Ceftazidime	41.17	58.82
Ceftazidime/ Clavulanic acid	100	0
Pipracillin	35.29	64.70
Pipracillin / Clavulanic acid	85.29	14.70
Pipracillin / Tozabactam	91.17	8.82

4-9-2-1 السلباكتام/ الامبسلين Ampicillin/Sulbactam

تشير نتائج الدراسة الحالية الى ان جميع العزلات الخاضعة للدراسة والبالغ عددها (34) عزلة كانت مقاومة لمضاد الأمبسلين اي بنسبة 100% جدول (4-10) وبإستخدام توليفة المضاد مع مثبط السلباكتام تراجعت قيم M.I.C بدرجة قليلة وبقيت جميع العزلات مقاومة ، تدلل هذه النتيجة على عدم وجود تأثير تآزري (Synergestic effect) بين المضاد والمثبط بعد خلطهما . يعرف التآزر (Synergism) بأنه اختزال او تناقص في قيم M.I.C لمضادات البيتالاكتام بمقدار اربع مرات أو أكثر عند أستخدام المثبط مخلوطاً معها ، مقارنةً مع قيم M.I.C لمضادات البيتالاكتام بمفردها.

4-9-2-2 حامض الكلافيولنك/الأموكزاسلين Amoxicillin/Clavulanic acid

أما بالنسبة لتوليفة مضاد الأموكزاسلين وحامض الكلافيولنك أستخدمت النسبة التجارية بالدواء المحضر المعروف بأسم (Augmentin) وهي نسبة 1:2 مضاد الى مثبط ، تشير نتائج الدراسة الحالية الى ان جميع العزلات كانت مقاومة لمضاد الأموكزاسلين أي بنسبة 100% جدول (4-10) وبأستخدام هذه التوليفة تراجعت قيم M.I.C شكل (4-11) وأصبح عدد العزلات الحساسة (9) عزلة أي بنسبة 26.47% ، إذ لوحظت فروق معنوية عند تطبيق أختبار t عند مستوى معنوية (1%،5%) جدول (4-11) ، تدلل هذه النتيجة على وجود تأثير تآزري واضح في تقليل قيم M.I.C لمضاد الأموكزاسلين ملحق (4) ، واشار AlAfifi وزملاؤه (2007) إلى ان نسبة العزلات الحساسة لمضاد الأموكزاسلين بعد خلطه مع حامض الكلافيولنك هي 20% في دراسةٍ أجروها على بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في بعض مستشفيات فلسطين ، كما أشار Al Sahli و Abdulkhair (2011) الى ان خلط مضاد الأموكزاسلين مع مثبط حامض الكلافيولنك قد زاد من حساسية عزلات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مرضى مصابين بألتهابات المجاري البولية في المملكة العربية السعودية ، إذ بينوا ان خليط حامض الكلافيولنك بتركيز ($128\ mgL^{-1}$) مع مضاد الأموكزاسلين بتركيز ($125\ \mu gml^{-1}$) يستطيع ان يثبط نمو بكتريا *P.aeruginosa* الى اوطأ التراكيز.



شكل (4-11) التأثير التآزري لمضاد الأموكزاسلين و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

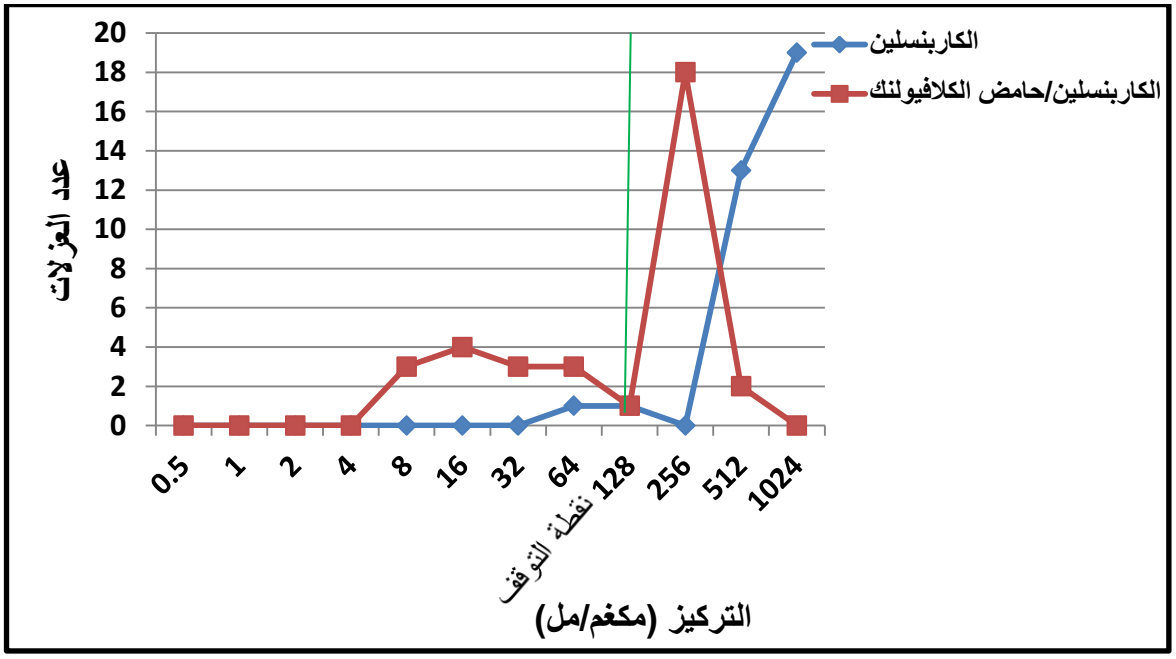
جدول (4-11) يوضح القيمة التائية بين Amoxicillin و Amoxicillin/Clavulanicacid عند مستوى الدلالة 5% ، 1%.

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Amoxicillin	34	828.24	252.554	33	18.666**	1.96	0.05
Amoxicillin+Clavulanic acid	34	163.53	169.307			2.576	0.01

* – معنوي عند مستوى الدلالة 0.05 ** – عالي المعنوية عند مستوى الدلالة 0.01

4-9-2-3 حامض الكلافيولنك/الكاربنسلين Carbencillin/Clavulanic acid

تم خلط مضاد الكاربنسلين مع حامض الكلافيولنك بنسبة 4:1 و أظهرت النتائج انخفاض في قيم M.I.C للعزلات قيد الدراسة شكل (4-12) ملحق (6) وتشير نتائج التحليل الأحصائي عند تطبيق أختبار t الى أن هنالك فروقاً معنوية عند مستوى معنوية (1%،5%) جدول (4-12) فبعد ان كانت عزلتان حساستان اي بنسبة 5.88% جدول (4-10) أزداد عدد العزلات ليصل الى (14) عزلة أي بنسبة 41.17% ، تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه الطائي (2005) من ان معظم عزلات بكتريا *Proteus mirabilis* الخاضعة لدراسته قد إنخفض M.I.C تجاه مضاد الكاربنسلين عند خلطه مع مثبط حامض الكلافيولنك.



شكل(4-12) التأثير التآزري لمضاد الكاربنسلين و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

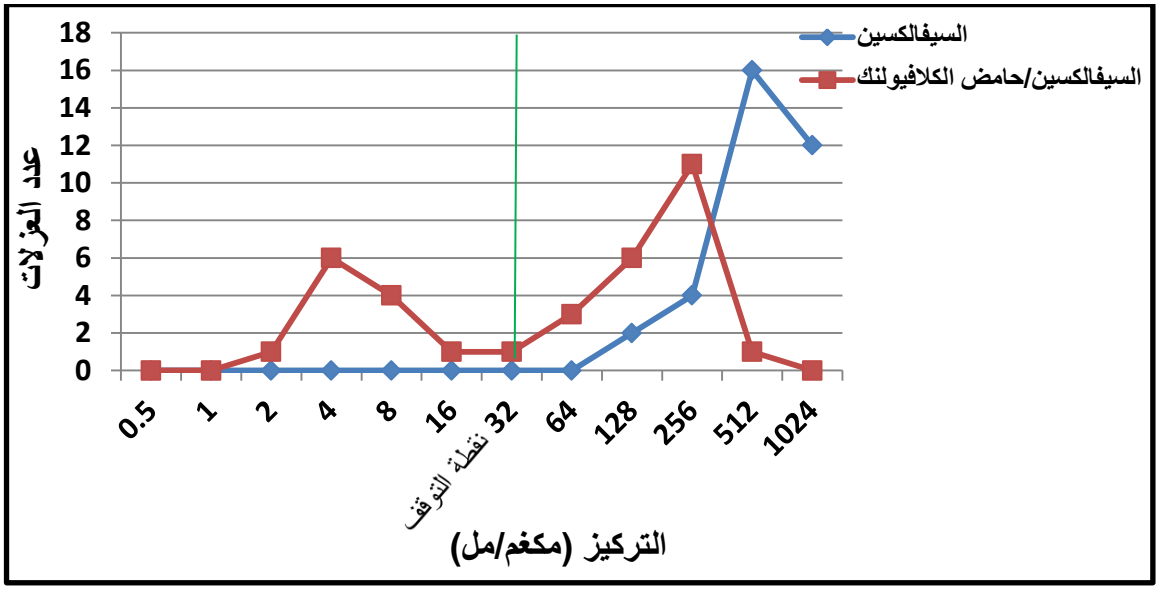
جدول (4-12) يوضح القيمة التائية بين Carbencillin و Clavulanic acid/ Carbencillin عند مستوى الدلالة 5% ، 1%

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Carbencillin	34	773.65	301.576	33	14.088**	1.96	0.05
Carbencillin+Clavulanic acid	34	180.47	138.118			2.576	0.01

* – معنوي عند مستوى الدلالة 0.05 ** – عالي المعنوية عند مستوى الدلالة 0.01

4-9-2-4حامض الكلافيولنك/السيفالكسين Cephalexin/Clavulanic acid

أما بالنسبة لمضادات البيتالاكتام العائدة لمجموعة السيفالوسبورينات المخلوطة مع حامض الكلافيولنك ، فقد أظهرت النتائج لمضاد السيفالكسين فروقاً معنوية أدت الى انخفاض في قيم M.I.C بعد الخلط مع حامض الكلافيولنك عند مستوى معنوية (1%،5%) جدول (4-13) شكل (4-13) ملحق (5) فبعد ان كانت جميع العزلات مقاومة له أي بنسبة 100% أصبح عدد العزلات الحساسة (11) عزلة أي بنسبة 32.35% جدول(4-10).



شكل (4–13) التأثير التآزري لمضاد السيفالكسين و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

جدول (4-13)يوضح القيمة التائية بين Cephalexinو Cephalexin/Clavulanic acid عند مستوى الدلالة 5% ، 1%

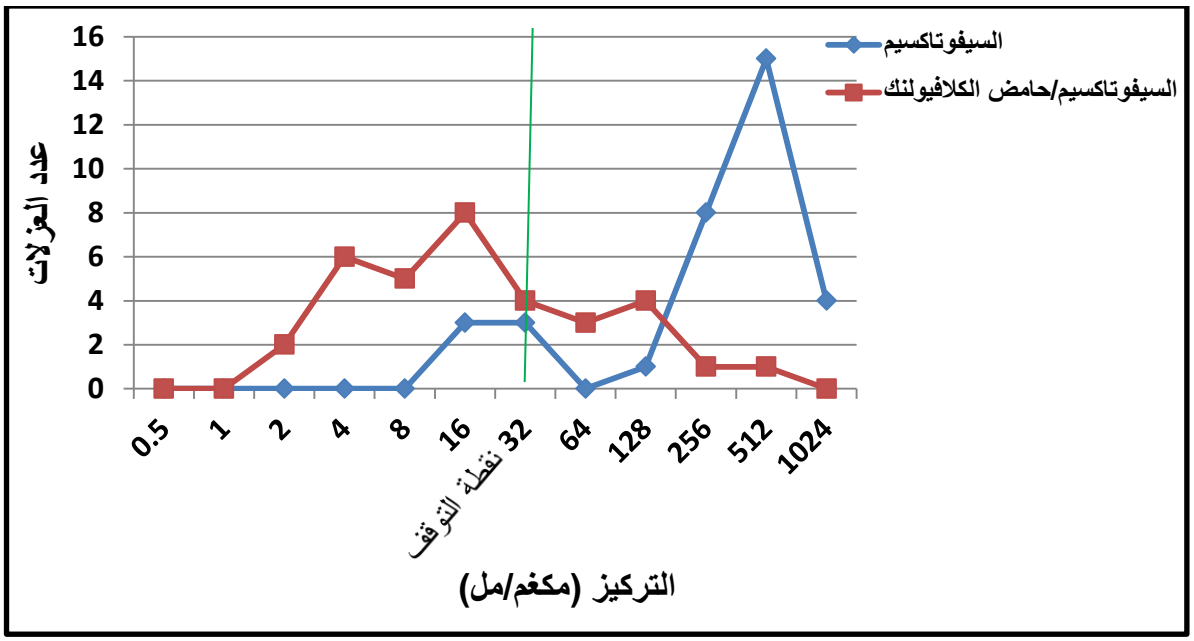
التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Cephalexin	34	640.00	308.748	33	12.120**	1.96	0.05
Cephalexin+Clavulanic acid	34	129.24	126.420			2.576	0.01

* – معنوي عند مستوى الدلالة 0.05 ** – عالي المعنوية عند مستوى الدلالة 0.01

4–9–2–5حامض الكلافيولنك/السيفوتاكسيم Cefotaxim/Clavulanic acid

أما فيما يخص توليفة السيفوتاكسيم مع حامض الكلافيولنك فقد اوضحت نتائج الدراسة الحالية وكما موضح في شكل (4–14) ملحق (7) جدول (4–10،4-14) بإن للمثبط تأثيراً معنوياً فقد تمكن من إرجاع فعالية المضاد عند مستوى معنوية (1%،5%) بحيث عادت بعض العزلات الى المدى الحساس إذ أصبح عدد العزلات الحساسة (25) عزلة أي بنسبة 73.52% بعد أن كانت (6) عزلات أي بنسبة حساسية 17.64% ، تتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه Al-Khaffash (1999) أن مضادات السيفالوسبورينات مع توليفة حامض الكلافيولنك تمكنت من إرجاع قيم M.I.C للعزلات المقاومة الى المدى الحساس ، بينما أشار Abdul-Razak

(2000) الى أن هذه التوليفة لم تتمكن من إرجاع قيم M.I.C لكل العزلات أذ بقيت بعضها مقاومة ضمن مدى نقطة التوقف (point Break) ، وقد يعزى السبب في ذلك الى إختلاف نوعية العزلات المستخدمة في البحث .



شكل (4-14) التأثير التآزري لمضاد السيفوتاكسيم و حامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

جدول (4-14)يوضح القيمة التائية بين Cefotaximeو

Cefotaxime/Clavulanic acid عند مستوى الدلالة 5% ، 1%

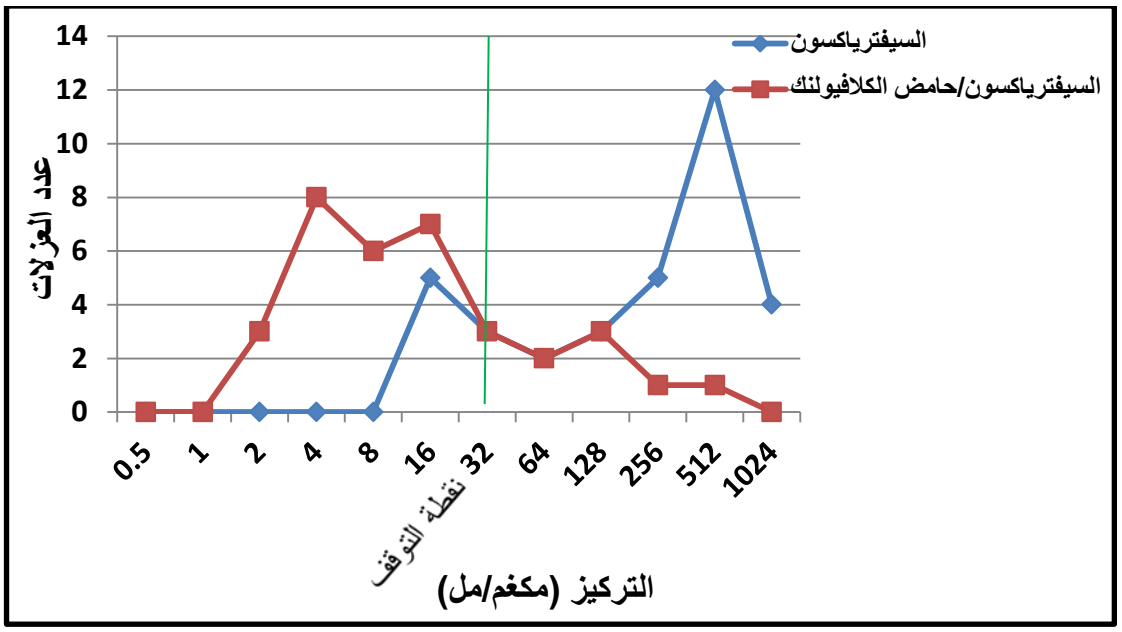
التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Cefotaxime	34	414.54	292.686	33	8.241**	1.96	0.05
Cefotaxime+Clavulanic acid	34	52.82	98.042			2.576	0.01

* – معنوي عند مستوى الدلالة 0.05 ** – عالي المعنوية عند مستوى الدلالة 0.01

4-9-2-6 حامض الكلافيولنك/السيفترياكسون Ceftriaxon/Clavulanic acid

أما بالنسبة لتوليفة السيفترياكسون مع حامض الكلافيولنك فقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية عند تطبيق أختبار t ان هنالك فروقا معنوية عند مستوى معنوية (1%،5%) تمثلت في

إنخفاض في قيم M.I.C للعزلات قيد الدراسة شكل (4–15) ملحق (8) جدول (4–15)، فبعد أن كانت (8) عزلات حساسة أي بنسبة 23.52% جدول (4–10) أزداد عدد العزلات الحساسة ليصل الى (27) عزلة أي بنسبة 79.41% .



شكل (4–15) التأثير التآزري لمضاد السيفترياكسون وحامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

جدول (4-15) يوضح القيمة التائية بين Ceftriaxoneو Ceftriaxone/Clavulanic acid عند مستوى الدلالة 5% ، 1%

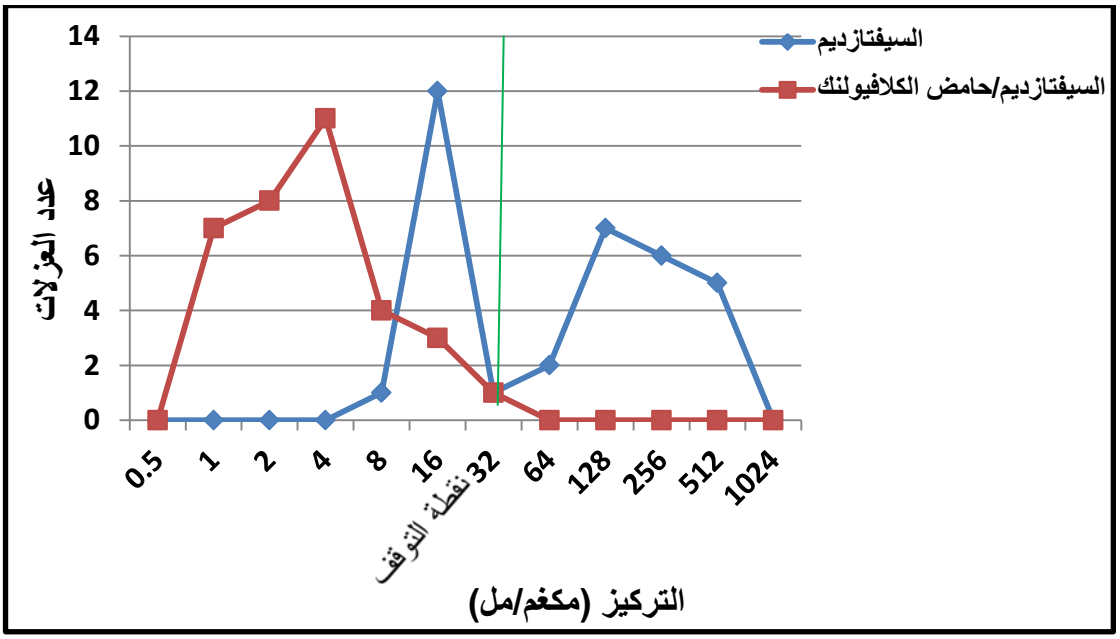
التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Ceftriaxone	34	359.06	318.425	33	6.542**	1.96	0.05
Ceftriaxone+Clavulanic acid	34	46.29	98.095			2.576	0.01

* – معنوي عند مستوى الدلالة 0.05 ** – عالي المعنوية عند مستوى الدلالة 0.01

4–9–2–7 حامض الكلافيولنك/السيفتازديم Ceftazidim/Clavulanic acid

أظهرت نتائج الدراسة الحالية فروقاً معنوية واضحة إذ أن جميع العزلات أصبحت حساسة لمضاد السيفتازديم أي بنسبة 100% بعد أن كانت نسبة العزلات الحساسة 41.17% عند خلطه مع حامض الكلافيولنك عند مستوى معنوية (1%،5%) وإنخفاض قيمة M.I.C الى حد وصل

(0.5) مكغم/مل ، ملحق (9) شكل (4–16) وجدول (4–10،4–16) ، كما أشار Poirel وزملاؤه (2001) من أن معظم عزلات بكتريا *P.aeruginosa* الخاضعة لدراستهم قد أنخفض M.I.C تجاه مضاد السيفتازديم عند خلطه مع حامض الكلافيولنك في دراستهم على بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من بعض مستشفيات الكويت ، إذ أثبتوا ان هناك تأثيراً تآزرياً عند خلط المضاد مع المثبط ، وفي دراسة أجراها Pellegrino وزملاؤه (2006) في البرازيل على بكتريا الزوائف الزنجارية وجدوا أن أستخدام خليط مضاد السيفتازديم / حامض الكلافيولنك كان له فعالية عالية ضد العزلات مما أدى الى خفض M.I.C تجاه السيفتازديم وعادت غالبية العزلات الى المدى الحساس .



شكل (4–16) التأثير التآزري لمضاد السيفتازديم وحامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

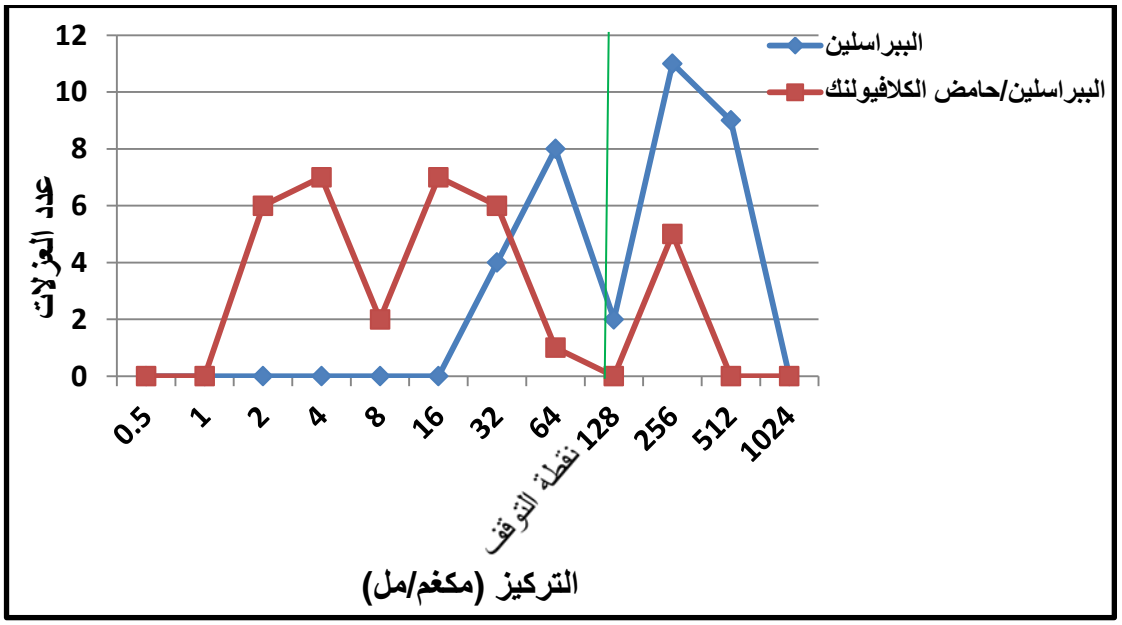
جدول (4-16) يوضح القيمة التائية بين Ceftazidime وCeftazidime/ Clavulanic acid عند مستوى الدلالة 5% ، 1%

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية Df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Ceftazidime	34	157.41	5.26	33	5.151**	1.96	0.05
Ceftazidime+Clavulanic acid	34	173.075	6.326			2.576	0.01

* – معنوي عند مستوى الدلالة 0.05 ** – عالي المعنوية عند مستوى الدلالة 0.01

4-9-2-8 حامض الكلافيولنك/البيراسلين Pipracillin/Clavulanic acid

أما فيما يخص توليفة البيراسلين مع حامض الكلافيولنك فقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية فروقاً معنوية وكما موضح في الشكل (4-17) ملحق (10) جدول (4-10،4-17) بأن المثبط تمكن من أرجاع فعالية المضاد عند مستوى معنوية (1%،5%) بحيث عادت بعض العزلات الى المدى الحساس أذ أصبح عدد العزلات الحساسة (29) عزلة أي بنسبة 85.29% بعد أن كانت (12) عزلة أي بنسبة 35.29% وهذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه Rokos وزملاؤه (2000) من ان خلط البيراسلين مع الكلافيولنك قد تحسست له السلالات السالبة لصبغة غرام بنسبة تزيد على (90%) .



شكل (4- 17) التأثير التآزري لمضاد البيراسلين وحامض الكلافيولنك ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

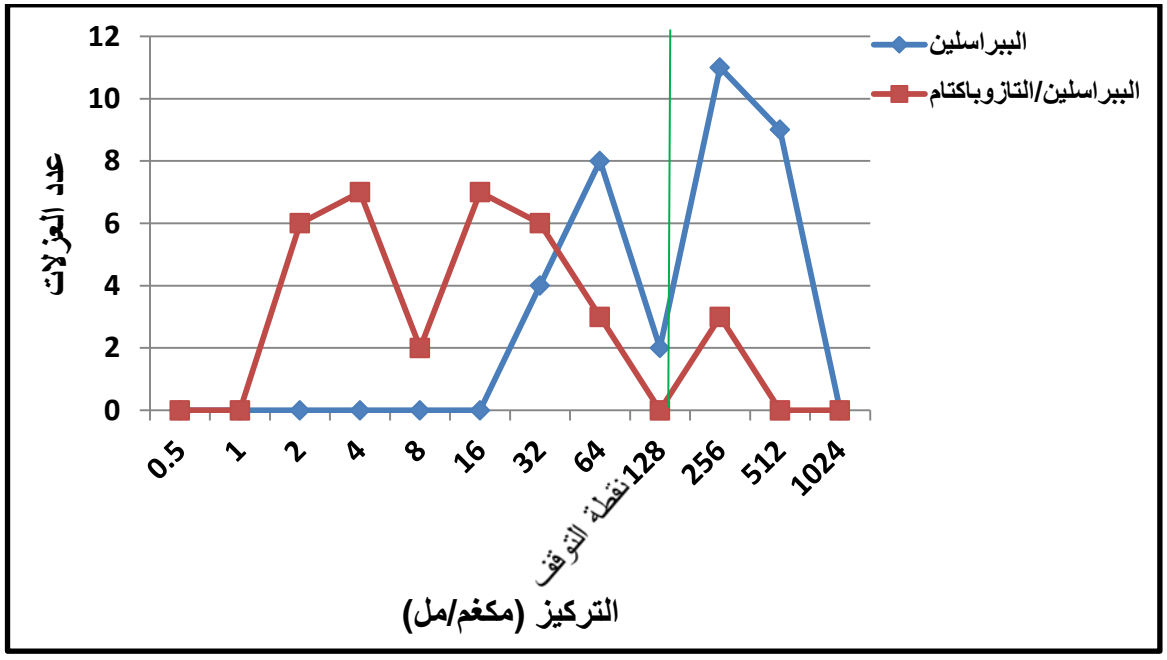
جدول (4-17)يوضح القيمة التائية بين Pipracillin وPipracillin/ Clavulanic acid عند مستوى الدلالة 5% ، 1%

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية Df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Pipracillin	34	244.71	183.722	33	7.817**	1.96	0.05
Pipracillin+Clavulanic acid	34	50.12	87.832			2.576	0.01

* – معنوي عند مستوى الدلالة 0.05 ** – عالي المعنوية عند مستوى الدلالة 0.01

4-9-2-9 التازوباكتام / البيراسلين Pipracillin/Tazobactam

أما توليفة التازوباكتام/بيراسلين وكما موضح بالملحق (11) شكل (4-18) فإن نسبة العزلات الحساسة إزدادت من 35.29% لمضاد البيراسلين بدون المثبط الى 91.17% بوجود التازوباكتام مما يدل على ان لهذا المثبط القدرة على توسيع فعالية مضاد البيراسلين ضد العزلات البكتيرية المقاومة لهذا المضاد جدول (4-10،4-18) ، فقد لوحظ إنخفاض واضح في قيم M.I.C للعزلات عند مستوى معنوية (1%،5%) ، وفي دراسة أجراها Mohanty وزملاؤه (2005) على بكتريا الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في بعض مستشفيات الهند كانت نسبة العزلات الحساسة لهذة التوليفة في دراستهم 81.37% ، وعند مقارنة نتائج توليفة حامض الكلافيولنك مع مضاد البيراسلين بتوليفة هذا المضاد مع التازوباكتام نلاحظ أن الأخيرة هي الأفضل من حيث أزدياد نسبة العزلات الحساسة وإرجاعها المدى الحساس للمضاد من خلال خفض M.I.C لهذا المضاد ، كما أشار الباحث Pournaras وزملاؤه (2008) في دراستهم على بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من التهابات المجاري البولية في بعض مستشفيات اليونان أن لتوليفة التازوباكتام / بيراسلين أهمية كبيرة في علاج الأصابات الناتجة عن بكتريا *P.aeruginosa* ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية مقارنة مع التوليفات الأخرى .



شكل (4-18) التأثير التآزري لمضاد البيراسلين والتازوباكتام ضد عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

جدول (4-18)يوضح القيمة التائية بين Pipracillinو Pipracillin/ Tazobactam عند مستوى الدلالة 5% ، 1%

التأثير	حجم العينة N	المتوسط الحسابي Mean	الأنحراف المعياري S.D	درجة الحرية df	القيمة التائية t		مستوى الدلالة
					المحسوبة	الجدولية	
Pipracillin	34	244.71	183.722	33	7.654**	1.96	0.05
Pipracillin+Tazobactam	34	38.82	70.892			2.576	0.01

* – معنوي عند مستوى الدلالة 0.05 ** – عالي المعنوية عند مستوى الدلالة 0.01

4– 10 النسق البلازميدي لبكتريا الزوائف الزنجارية

Pseudomonas aeruginosa plasmid profil

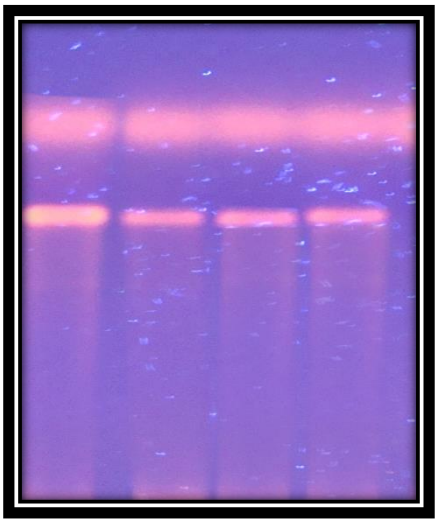
تم التحري عن المحتوى البلازميدي لـ(4) عزلات من بكتريا *P.aeruginosa* بأستخدام Pure Yield™ Plasmid Miniprep Kit المجهز من قبل شركة Promega (U.S.A) وتميزت هذه العزلات بأنها مختلفة في مصادر عزلها وفي انتاجها لعوامل الضراوة المختلفة وأنتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز واكثر العزلات مقاومة للمضادات الحياتية وهذه العزلات هي (PB71,PW64 ,PE47,PU10) ، وبعد عزل الدنا البلازميدي وترحيل الدنا المستخلص على هلام الأكاروز وجد ان جميع العزلات حاوية على بلازميد مفرد وجميع البلازميدات كانت ذات حجوم متقاربة نسبياً ، كما موضح في الجدول (4–19) والشكل (4–19) .

يمكن الأستنتاج ان هنالك ارتباطاً من نوع ما مابين نمط المقاومة الواسع لمضادات الحياة وانتاج عوامل الضراوة ، اذ ارتبطت المقاومة المتعددة لمضادات الحياة مع انتاج عوامل الضراوة المهمة في الأستيطان البكتيري ، تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه Qasim (2006) في دراسة اجراها على بكتريا *P.aeruginosa* في مدينة بغداد إذ وجد ان جميع عزلاته البالغ عددها (6) حاوية على بلازميد مفرد بإستثناء عزلة واحدة كانت غير حاوية على بلازميد وجميع البلازميدات كانت ذات حجوم متقاربة نسبياً.

وقد اشارت الدراسات المتخصصة في هذا المجال الى ان البلازميدات المستخلصة من عزلات بكتريا *P.aeruginosa* التي تحمل صفة تعدد المقاومة لمضادات الحياة تكون كبيرة نسبياً (Senda *et al*., 1996) ، كما أشار Gabisonia وزملاؤه (1982) الى ان احجام البلازميدات في بكتريا *P.aeruginosa* التي تحمل صفة تعدد المقاومة لمضادات الحياة

تراوحت بين (20–100) ميكا دالتون كما اشارت بعض البحوث الى ان بعض العزلات السريرية لبكتريا *P.aeruginosa* تمتلك بلازميدات بحجم كبير يصل الى (106) كيلو قاعدة (Vivian *et al*., 2001).

4 3 2 1



الشكل (4–19) المحتوى البلازميدي لبعض عزلات بكتريا *P.aeruginosa*

العمود (1) : المحتوى البلازميدي للعزلة PU10 العمود (2) : المحتوى البلازميدي للعزلة PE47

العمود (3) : المحتوى البلازميدي للعزلة PW64 العمود (4) : المحتوى البلازميدي للعزلة PB71

وقد أشارت دراسات عدة الى أن تعدد المقاومة في بكتريا *P.aeruginosa* يعود في الغالب الى احتوائها على بلازميدات كبيرة نسبياً ، إذ اشارت دراسة اجريت في الهند على مجموعة من العزلات الممرضة لبكتريا *P.aeruginosa* متعددة المقاومة الى ان جميع العزلات كانت حاوية على بلازميد مفرد ومتشابه ، وعند نقل البلازميد الى بكتريا اخرى كانت حساسة تجاه مضاد الـ Amikacin اصبحت هذه البكتريا مقاومة لهذا المضاد (Shahid & Malik , 2004) .

تتميز بكتريا *P.aeruginosa* بأحتوائها على مجموعة من الجينات المحمولة على البلازميدات لها دور في عملية تكوين المقاومة المستمرة للمضادات الحيوية ويمكن انتقال المقاومة بوساطة الأقتران البكتيري (Conjugation) لجعل البكتريا اكثر مقاومة للمضادات الحيوية (Poirel *et al*., 2001) ، كما أشار Graupner وزملاؤه (2001) الى إمكانية إنتقال البلازميدات غير الأقترانية بوساطة ظاهرة التحول الوراثي في بكتريا *P.aeruginosa* .

لم يكن للبلازميدات الأقترانية وغير الأقترانية الدور الوحيد في نقل بعض المؤشرات الوراثية ، إذ أظهرت الدراسات ان بكتريا *P.aeruginosa* تحوي على عناصر وراثية إضافية كأحتوائها على العناصر القافزة (Transposones) (Dubois *et al*., 2002) .

كما تحتوي بكتريا *P.aeruginosa* على مجموعة من الجينات المتحركة تساهم في تنظيم آلية عمل نظام Recombination وتعتمد فعالية هذا النظام على أنزيم DNA integrase إضافة الى موقع النظام في هذه البكتريا (Yamane *et al*., 2004) .

إن تشابه البلازميدات التي أظهرتها النتائج قد يشير الى مدى التقارب بين عزلات بكتريا *P.aeruginosa* وهذا يعطي احتمالية كون هذه العزلات تعود الى السلالة نفسها وبالتالي يعطي مؤشراً جزئياً حول إنتشار هذه البكتريا في بيئة المستشفيات في محافظة ديالى .

أشار Lipuma وزملاؤه (1989) الى إمكانية إستخدام النسق البلازميدي اضافة الى نسق المقاومة للمضادات الحيوية في تحديد مدى التقارب بين السلالات البكتيرية وبالتالي معرفة وبائيتها .

جدول (4-19) المحتوى البلازميدي لبكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من أخماج مختلفة

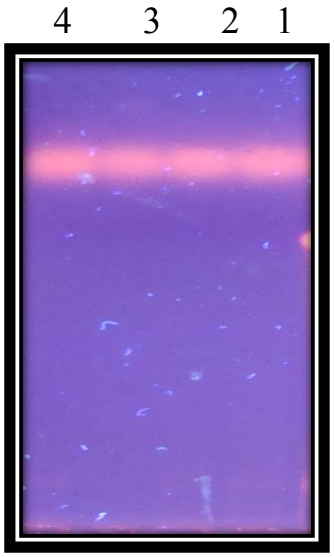
رقم العزلة	مصدر العزلة	عدد الحزم البلازميدية
PU10	ادرار	1
PE47	التهاب الأذن الوسطى	1
PW64	جروح	1
PB71	حروق	1

4-1 1 تحييد البلازميدات Plasmids curing

تم إجراء تجربة تحييد الدنا البلازميدي في محاولة لربط المحتوى البلازميدي لأنتاجية بكتريا *P.aeruginosa* لأنزيمات البيتالاكتاميز ومقاومتها لبعض المضادات الحيوية ، إذ تم استخدام مادة Acridine orange بوصفها مادة محيدة ثم نميت العزلات (PU10 , PE47 , PW64 , PB71) المراد تحييدها في أوساط سائلة تحتوي على هذه المادة بتراكيز (16, 32 , 64 , 128 , 256 , 512 , 1024 , 2000 , 2500 , 3000) مكغم/مل .

فقدت العزلات الحزم البلازميدية عند التركيز 512 مكغم/مل شكل (4–20) ، وأتفقت نتائجنا جزئياً مع ما توصلت اليه المحمداوي (2006) عند إجراء تجربة تحييد الدنا البلازميدي لبكتريا *P.aeruginosa* ، إذ فقدت عزلاتها الحزمة البلازميدية عند التركيز 1024 مكغم/مل من مادة Acridine orange ، وبعدها تم إجراء إختبار للعزلات المحيدة من حيث إنتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز ومقاومتها لمضادي الأمبسلين والأموكزاسلين ، وقد أظهرت العزلات (PU10 , PB71) فقدان قابليتها على انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز وفقدان مقاومتها لمضادي الأمبسلين والأموكزاسلين ، ويتضح من ذلك ان صفة انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز والمقاومة لبعض مضادات الحياة قد تكون محمولة على بلازميد ، اما العزلتان (PE47 , PW64) فلم تفقد مقاومتها لمضادي الأمبسلين والأموكزاسلين مما يشير الى ان صفة مقاومة هذين المضادين في هاتين العزلتين قد تكون محمولة على الكروموسوم .

من الدراسات التي تطرقت الى هذا الموضوع دراسة أجريت في الهند على مجموعة من العزلات الممرضة لبكتريا *P.aeruginosa* متعددة المقاومة ، وعند إجراء عملية تحييد البلازميد اصبحت العزلات أكثر حساسية لمضادات الحياة نفسها الي كانت مقاومة لها قبل نزع البلازميد منها (Shahid&Malik , 2004).



شكل (4–20) فقدان الحزم البلازميدية لعزلات *P.aeruginosa* المحيدة

Conclusions الأستنتاجات

1. تعد بكتريا *P.aeruginosa* من المسببات المهمة لإخماج المجاري البولية واخماج الأذن الوسطى وأخماج الجروح والحروق في بعض مستشفيات مدينة بعقوبة .
2. أظهرت نتائج التحري عن عوامل الضراوة بأن الغالبية العظمى من العزلات تمتلك عوامل الضراوة المتمثلة بإنتاج أنزيم البروتييز ، وأنزيم الليسيثينيز ، وأنزيم اليورييز وإنتاج الهيمولايسين ، وقابليتها على تلزين كريات الدم الحمراء ، وقابليتها على الألتصاق بالخلايا الطلائية مما تزيد من إمراضية هذه العزلات .
3. مضادات Ampicillin وAmoxacillin و Cephalexin و Co-Trimoxazol و Carbencillin و Cefotaxime لم تعد فعالة ضد عزلات *P.aeruginosa* المعزولة محلياً نتيجة مقاومة البكتريا المتزايدة لهذه المضادات أما Amikacin وCiprofloxacinو Oflaxacin هي المضادات الأكثر فعالية ضد العزلات المحلية لبكتريا *P.aeruginosa* .
4. لوحظ ان المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية كانت شائعة بين العزلات المحلية من بكتريا *P.aeruginosa* قيد الدراسة وكان نسق المقاومة 11–15 مضاد حيوي هو السائد وهو يحتوي على أحد عشر مضاداً حيوياً (AM – Amx –FT– CL – SXT – PY – CTX – CTR – PRL – CAZ – CN) وأن هناك جيناً واحداً متخصصاً في مقاومة مضاد حيوي جديد يضاف الى النسق السائد .
5. أثبتت النتائج امتلاك (45.44%) من عزلات *P.aeruginosa* القابلية على أنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز و (20.58%) منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف المحطمة للبنسلينات والسيفالوسبورينات .
6. كانت مثبطات البيتالاكتاميز ذات فعالية في خفض قيم M.I.C للعزلات المقاومة لمضادات البيتالاكتام .
7. تحتوي العزلات متعددة المقاومة للمضادات على بلازميدات مقاومة كبيرة الحجم نسبياً وتحمل هذه البلازميدات بعض صفات الضراوة كإنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز فضلاً عن

حملها صفات المقاومة المتعددة مما يبرز سبب الأرتباط المظهري بين بعض عوامل الضراوة والمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية .

8. ان مادة Acridin orange عامل محيد جيد لبكتريا *P.aeruginosa* .
9. المحددات الوراثية المشفرة لانتاج أنزيمات البيتالاكتاميز قد تكون بلازميدية في بعض عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* .

التوصيات Recommendations

1. إجراء دراسة لعزل بكتريا *P.aeruginosa* من وحدات العناية المركزة وأجهزة القثطرة ومقارنتها مع العزلات المعزولة من أشخاص راقدين في هذه الوحدات والمستخدمين أجهزة القثطرة لمعرفة مدى أنتشار هذه العزلات ووبائيتها داخل المستشفيات .
2. إجراء دراسات موسعة عن عوامل الضراوة المهمة لهذه البكتريا من الناحية الوراثية والمناعية وأستخدام تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) لتحديد وبائية العزلات المرضية .
3. إجراء دراسة كيموحيوية موسعة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف والأنزيمات المقاومة لمثبطات البيتالاكتام .
4. إجراء دراسات موسعة عن مثبطات أنزيمات البيتالاكتاميز ، والعمل على إيجاد توليفات جديدة بين المثبطات والمضادات الحيوية لمعالجة الألتهابات المختلفة .
5. إجراء دراسة تعتمد على الطرائق الوراثية الجزيئية بأستخدام تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) والتقنيات الأخرى لتحديد التعاقبات المشفرة لأنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز وأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف في بكتريا *P.aeruginosa* .

المصادر العربية

- الشويخ ، رنا مجاهد عبدالله . (2006) . إنتاج وتوصيف Protease من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من بعض الحالات السريرية وعلاقته ببعض المضادات الحيوية ، رسالة 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 ، هادي رحمن رشيد . (2005) . دراسة بكتريولوجية كيموحيوية وجزيئية لبكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من التهابات المجاري البولية في بعض مستشفيات مدينة بغداد ، رسالة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

- العبيدي ، سوسن شوكت عبد عبد الله . (2002) . 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 .

- المحمداوي ، خولة جبر خلف (2006) , دراسة كيموحيوية للبروتين A المنتج من العزلة المحلية لبكتريا *pseudomonas* .اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ،الجامعة المستنصرية.

- المحمدي ، لهيب رجب حماد . (2000) . عزل وتشخيص بكتريا *P.aeruginosa* مع امكانية رسم الخارطة الأفتراضية لحركة هذه البكتريا بين المصادر المختلفة ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .

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

المصادر الأجنبية

- **Al-Akayleh,** A.T. (1999). Invasive burn wound infection annals of burns and five disasters. J. Surg. Gynecol.Obstet. 12(4) : 1-5.
- **Al-Afifi,** M.S. ; Al-Jarosha, K.H. ; Abu Samaha, S. and El Jadba, N. (2007). Nosocomial infections due to multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. J. Al Azhar.Uni.Gaza,Vol.9, page:1-12 .
- **Abdullah**, R.M. ; Samaan, S.F. and AL-Shwaikh, A.M.(2010). Study the effect of antibiotic combination of beta-lactam and aminoglycoside with another group of antibiotics and their synergism effect . Journal of Arab Board of Health Specializations , Vol.11 , No 1.
- **Abul- Rasak**, H.H. (2000). Effect of Some β-lactamase inhibitors and Combined Action of Some Antibiotic on *Pseudomnas areuginosa* – resistant to antibiotics and some heavy metals isolated from otities medial: Genetic study. College of Science Almustansiriya. UN.
- **Ahmed**, V.U.; Hussain, J.; Hussain, H.; Jassbi, A.R.; Ullah, F.; Lodhi, M.A.; Yasin, A. and Choudhary, M.I. (2003). First natural urease inhibitor from *Euphorbia decipiens*. Chem. Pharm. Bull. 51(6): 719-23.
- **Akalin,** H.E; (1999). The hole of β-lactam / β -Lactamase inhibitor in the management of mixed infections. J.Antimicrobial. Agents. Chemoth .112 supp 111: 15-20.
- **Al- Gherawi**, R. S. (2009). Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Bark and *Apium graveolens* L. Seed on the antibiotic resistant bacteria isolated from UTI female patients (in vitro). M.S.C., thesis. College of science. Al- Mustansiriya University.
- **Ali**, E.N. and Issa. R.H. (2004). Isolation and extraction of flagellar and polysaccharide antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. Al-Mustansiriya J. Sci. 15(1): 87-101.
- **Alipour**, T. ; Sadeghifard, N. ; Amirmozafari, N. ; Ghafurian, S. ; Abdulamir, A.S. ; Mohebi, R. ; Abu Bakar, F. and Raftari, M. (2010). Incidence of Extended Spectrum Beta-lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* and frecuency of OXA-2 and OXA-10 Genes. Astralian Journal of Basic and Applied Sciences, 4(8):3202-3207.

- **Al-Khaffash** S.S, (1999). Genetic Study of Extended- Spectrum β-Lactamas in *E-coli*. M.S.C., thesis .College of Science. Al-Mustansiriya, UN.
- **Al-Saffar**, A.K.H. (2005). Genetic study of *Pseudomonas aeruginosa* cusing burn and wound infections in Babil Governorate . M.S.C., thesis. College of science. Al-Mustansiriya University.
- **Al Sahli,** A.A. and Abdulkhair, W.M. (2011). Inhibition of beta-lactamase enzyme of *Pseudomonas aeruginosa* by clavulanic acid of *Rumex vesicarius* L. African Journal of Agricultural Research Vol. 6(12), pp. 2908-2915.
- **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.
- **Ambler**. R.P. (1980). The Structure of β -Lactamases. Philos. Trans. R.Soc London. Biol. Sci. 289: 321-331.
- **Amyes**, S.G.and Gemmell, C.G. (1997). Antibiotic resistance. J. Med. Microboil, 96: 436-470.
- **Angelescu**, M. and Apostol, A. (2001). Cefepime (mexipime), large spectrum 4th generation cephalosporin, resistant to beta-lactamases. Chirurgia (Bucur). Nov-Dec. 96(6): 547-52 (Abstract).
- **Arora** , K. S.,Ritchings , W.B. ; Al-Mira, C.E. ; Lory , S. and Ramphal. R. (1998). *P.aeruginosa* flageller cap protein FilD, is responsiple for mucin adhesion . J.Infect. Immun. 66(3):1000-1007.
- **Atlas**, R. M. ; Parks, L. C. and Brown, A. E. (1995) . Laboratory manual of experimental microbiology. 1st ed. Mosby, Inc, USA.
- **Babini**, G.S.; Yuan, M.; Hall, L.M.C. and Livermore, D.M.(2003). Variable susceptibility to pipracillin/tazobactam amongst *Klebsiella spp.* with extended spectrum *β*-lactamases. Journal of Antimicrob.Chemother. 51: 605-12.
- **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.

- **Bantar**, C.; Vesco, E.; Heft, C.; Salamone, F.; Krayeski, M.; Gomez, H.; Goassolo, M.A.; Fiorillo, A.; Franco, D.; Arango, C.; Duret, F.and Oliva, M.E. (2004). Replacement of broad-spectrum cephalosporins by piperacillin/tazobactam: Impact on sustained high rates of bacterial resistance. Antimicrob.Agents Chemother. Feb.48 (2): 392-5.

- **Baron**, E. J. and Finegold, S. M. (1990). Baily and Scott`s Diagnostic Microbiology. 8th ed. C.V. Mosby Co. USA.

- **Baron**, E.; Pealler, M.A.; Tenover, F.C.; and Yokken, R.H. (1999). Commensal and Pathogenic Microorganism In Manual Of Clinical Microbiology. (7th) Ed. Vol. (1) 27. ASM Press Washington (USA).

- **Bauer**, S.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C. and Truck, M.D. (1996) . Antibiotic susceptibility testing by standardized single dose method. American Journal clinical path.

- **Beatson** , A.S.; Whitchurch, B.C.; Sargent, L.J.; Levesque, C.R. and Mattick,O.(2002). Differential regulation of twitching motility and elastase production by *vfr* in *P.aeruginosa* .J.Bacteroil.184(13): 3605-3613.

- **Benett,** P.M. and Chapro, L. (1993). Molecular basis of β – Lactamases induction in bacteria. Antimicrobil. Agents Chemother. 37: 153 – 158.

- **Benson ,** H.G.(2002) . Microbiological Applications (Laboratory Manual in General Microbiology) . Eighth edition published by McGraw – Hill , New York.

- **Bonfiglio**, G.; Perilli, M.; Stefani, S.; Amicosanti, G. and Nicoletti, G. (2002). Performance of extended-spectrum β-lactamases among *Enterobacteriaceae*: an Italian survey. Int.J.Antimicrob. Agents. Mar.19 (3): 213-7.

- **Bradford**, P.A. (2001). Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st century: Characterization, Epidemology, and detection of this important resistance threat. Clin.Microbiol.Rev.14: 933-951.

- **Braun**, P. Bitter, W. and Tommassen, J. (2000). Activation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase in *P. putida* by triggering dissociation of the prppeptide – enzyme complex. Microbiol. 146: 2565-2572.

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

- **Bush**, K.; Jacoby, G.A.; and Medeirose, A.A.(1995). A Functional classification scheme for β -lactamase and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents. Chemother. 39(6): 1211-1233.
- **Cao**, V.; Lambert, T.; Nhu, D.Q.; Loan, H.K.; Hoang, N.K.; Arlet, G. and Courvalin, P. (2002). Distribution of extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vitnam. Antimicrobial Agents. Chemother. Dec.46 (12): 3739-43.
- **Cavallo**, J. D., Fabre, R., Leblanc, F., Nicolas-Chanoine, M. H., Tabaut, A. and Gerpb. (2000). Antibiotic susceptibility and mechanisms of β-lactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study (1996). Journal of Antimicrobial Chemotherapy 46, 133–6.
- **Celbrex**, D.; Zocor, R. and Meror, S. (2002). Amikacin in neonatal infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 63(4): 106.
- **Chanal.** C., Bonnet, N.; Champs, C.; Sirot, D.; Labia, R. and Sirot, J. (2000). Prevalence of β -lactamase among l, o72 Clinical Strains of *Proteus mirabilis*: a 2-Year survey in French Hospital,. Antimicrob. Agents. Chemother. 44(7): 1930-1935.
- **Choi**, J. Y. ; C. D. Sifri ; B. C. Goumnerow ; L. G. Rahme ; F. M. Ausubal and S. B. Colderwood. (2002). Identification of Virulence Genes in a pathogenic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational Difference Analysis. J. Microbiology. 184 : 952 – 961.
- **Christopher**, R.W.; Edwards, I.; and Bonchier, I. (1991). Antibiotic Chemotherapy. P: 193-99 In: Davidson's Principles and Practice of Medicine. (16^{th}) ed. Churchill.
- **Christopher** A. ; Ohi,Mathew and Pollack.S.(2005).Infection due to *Pseudomonas spp*. Of Harrison's, PRINCIPLE OF INTERINAL MEDICINE,16^{th} ed..Mc Graw-Hill,Medical publishing Division.
- **Chuanchune**, R.; Beinlich, K.; Hoang, T.T.; Becher, A.; and Schweizer, R.K.(2001). Multidrug efflux pumps mediate cross-resistance between Triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*: Exposure of a susceptible mutant strain to Triclosan selects nfx mutants over expressing Mex CD-Opr. Journal of Antimicrobial Agents. Chemother.45 (2): 428-32.

- **Collee ,** J. G. ; Fraser , A. G. ; Marmion , B. P. and Simmons , A**.** (1996) . Mackie and McCartney practical medical microbiology . 14th ed. Churchill Livingston . P.173-174 .
- **Cooper**, M.; Tavankar, G. R.and Williams H.D. (2003). "Regulation of expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase in *Pseudomonas aeruginosa"*.Microbiology 149(pt5): 1275-84. doi: 10.1099/mic.0.26017-0. PMID 12724389.
- **Cortes**, G.; Borrell, N.; Astorza, B. and Gomez, C. (2002). Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and lipopolysacchride O side chain to the virulence of *klebsiella pneumoniae* in mnurine mode and of *Pneumoniae*. Infection and Immunity. Vol 70 (5): 2583-2590 .
- **Couturier,** M., Francoise, B., Berguist, P. & Landmass, W.K. (1988). Identitication and classification of bacterial plasmids. Microbial. Rev. 52, 375-395.
- **Cruickshank**, R.; Duguid, J. R.; Marion, B. P. and Swain, R. H. (1975). The practice of medical microbiology. 12thed. vol. 2. Churchil Livingston, U.K.
- **Dalhoff**, A.; Nasu, T. and Okamoto, K. (2003). Beta-lactamase stability of faropenem. Chemotherapy. Sep. 49(5): 229-36.
- **Datta, N** & Hedges, R. W.; Shaw, E.J.; Sykes, R. B. & Richmond, M.H. (1971). Properties of anR-Factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 108(3): 1244-1249.
- **Dattelbaum**; J.D.; Lockatell, C.V.; Johanson, D.E.and Mobley, H.L.T. (2003). Ure R, the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in expermintal urinary tract infections. Infect. Immun. Feb. 71(2): 1026-30.
- **Drago**, L.; Vecchi, E.; Mombelli, B.; Valli, M. and Nicola, L. (2001) . Activity of levofloxacin and ciprofloxacin against urinary pathogens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48 : 37-45 .
- **Du**, S.J. ; Kuo, H.C. ; Cheng, C.H. ; Fei, A.C.Y. ; Wei, H.W. and Cheng, S.K. (2010). Molecular mechanisms of ceftazidime resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from and human infections. Veterinarni Medicina,55, (4) : 172-182.

- **Dubois**, V. ; Arpin, C. ; Noury, P. and Quentin, C. (2002). Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying abla $_{TEM-21}$ gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon .J. Antimicrobiol. Chemother. 46(11): 3624-3626.

- **Engel**, L. S., J. M. Hill, A. R. Caballero, L. C. Green, and R. J. O'Callaghan. (1998). Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 273:16792–16797.

- **Farrell,** D.J., Morrissey, I., De Rubeis, D.; Robbins, M& Felmingham, D. (2003). AUK Multicenter study of the antimicrobial suscptibility of bacterial pathogens causing urinary tract infection. J. Infect. (46): 94-100.

- **Feltzer**, R E.; Gray, R. D.; Dean, W. L. and Pierce, W. M. (2003). Alkaline proteinase inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* a interaction of native and N-terminally truncated inhibitor proteins with *Pseudomonas* alkaline proteinase. J. Biol. Chem., 278(28): 25952-25957.

- **Finch,** R. (1984). Antibacterial Chemotherapy. Medicine International. (2^{nd}) Series. 2:41-49.

- **Fiorillo**,L.,Zucker,M. and Sawyer,D.(2001)The *Pseudomonas* hot-foot syndrome.N Engl .J.Med. ,2;345(5):335-8.

- **Fisher**, J. (1984). β-lactam resistant to hydrolysis by the *β*-lactamases. In antimicrobial drug resistance (Bryan, L.E.Ed.), pp.33-79. Academic Press Orlando.

- **Flamm** R.K.; Weaver R. K.and Thornsberry, C.(2004). Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested in clinical laboratories in the United States from 1999 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*. 48:2431-2436.

- **Fluit**, A.C.; Visser, M.R.&Schmitz, F.J.(2001).Molecular detection of antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews. Oct. 836-71.

- **Forbes**, B. A. ;Sahm, D. F. and Wessifeld, A. S. (2002) . Bailey and Scotts' diagnostic microbiology . 9^{th} ed . Mosby . U.S.A. Vol.1:509 .

- **Francioll**, M. (1991). β -Lactamas inhibitor cominations for oral administrations. Schmeiz-Med- Wochenschr. 121(39): 1399-1407.

- **Frank**, U.; Mutter, J.; Schmidt-Eisenlohr and Daschner, F.D. (2003). Comparative in vitro activity of piperacillin, piperacillin-sulbactam and piperacillin-tazobactam against nosocomial pathogens isolated from intensive care patients. Clin. Microbiol. Infect. 9: 1128-32.
- **Frifelder.** D. (1987). Molecular Biology- (2^{nd}) ed. Yones and Barttorr. Boston.
- **FunG-Tomc**, J.C.; Gradelski, Eivalera, L.; Kalek, B.; and Bonner, D.P.(2000). Comparative Killing Rates Of Fluroquinolones and Cell Wall Active Against. J.Antimicrob.Agents Chemother. 44: 1377-80.
- **Gabisonia**, T. G. ; Gallushka, F.P. and T. G. Chanishvili. (1982). Conjucative R Plasmids Isolated from Hospital of *Pseudomonas aeruginosa.* Antibioti. Khilioter. 37 (12) : 39 – 41.
- **Gaynes**, R.; Edward, J. R.; and National Nosocomial Infections Survulance system.(2005). overview of nosocomial infections caused by Gram negative bacilli, Clin. Infect. Dis. 41: 848-854.
- **Goering**, R.V.; Dockrell, H.M.; Wakelin, D.; Zuckerman, M.; Chiodini, P.L.; Roitt, I.M. and Mims, C. (2008). *Mims medical microbiology*. 4^{th} ed. Mosby. China.
- **Graupner**, S. ; Weger, N. ; Sohni, M. and Wackernagel, W. (2001). Recquirment of novel competence genes *pil* T and *pil* U of *P.stutzeri* for natural transformation and suppression of pil T deficiency by a hexahistidine tag on the type IV pilus protein *pil* Al.J. Bacteriol. 183(16):pp.4694-4701.
- **Greenwood**, D.; Slack, R. and Peutherer, J. (1997). Medical Microbiology 15^{th}ed. Churchill Livingstone inc.
- **Guan**, L. and T. Nakae (2001). Identification OF Esential Charged Residues in Transmembrane Segments of Multidrug Transporter mexB of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriology. 183 : 1734 – 1739.
- **Hagberg**, L.; Jodel. U. & Lindberg, U. (1981). Adhesion, Haemagglutination and Virulence of *E.coli* causing U.T.Is. Infec. Immun, 31:564-570.
- **Hall**, S. ; Shrestha, R and Vogel, S. (2004). Methicillin\Oxacillin-Resistant *Staph aureus* (MRSA\ORSA) : Laboratories Detection . 15:2-10.

- **Hanna**, S. L. ; N. EW. Sherman ; M. T. Kinter and J. B. Goldberg (2000). Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing Initial and chronic Isolates from a cystic fibrosis patient : an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column Liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Microbiology. 146 : 2495 – 2508.

- **Harley**, J. P. and Prescott, L. M. (1996). Laboratory exercises in Microbiology. 3rd ed. McGraw Hill. USA.

- **Hasegawa**, M. ; Kobayashi, I. ; Saika, T. and Nishida, M. (1996). Drug – Resistance Patterns of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Regard to Their Lipopolysaccharides-Chain Sizes. Kansenshogaku-Zasshi. 70 (6) : 606 – 612.

- **Hauser**, R.A. and Sriram, P. (2005). Severe *Pseudomonas aeruginosa* infection . J. Infect. Postgraduate Medicine.117(1):1-10.

- **Hebeisen**, P.; Heinze-Krauss, I.; Angehrn, P.; Page, M.P.G.and Then, R.L. (2001). In vitro and in vivo properties of Ro 63-9141, a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococci.* Antimicrobial Agents. Chemother. Mar. 45(3): 825-36.

- **Holt**,J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.A.; and Williams, S.T.(1994). Bergy' s Manual Of Derminative Bacteriology. (9th) ed.
- **Hussar**, A. D. (2001). New drugs of 2000. Am. Pharmaceutical Association, Inc. 41(2): 229-272.

- **I wahi**, T.; Abs, R.; Nako, M. and Imado, A (1983). Role of type-1 fimbriae in the pathogensis of ascending U,T.I by *E.coli* in mice Infec. Immune. 39:1307-1315.

- **Jacoby**, G.A. & Sutton, L. (1985). β -Lactamases and β-Lactam resistance in *E . coli* Antimicrob. Agents. Chemother, 28(5): 703-705.

- **Jacoby,** G. A. & Mederios, A. (1991). More Extended – spectrum β– Lactamases. Antimicrob. Agents. Chemother. 35 (9): 1697 –1704.

- **Jacoby**,G.A.(1994).Genetices Of Extended- Spectrum Beta-Lactamases. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.Supplement. 1: 2-11.

- **Japoni**, A.; Alborzi, A.; Kalani, M.; Nasiri, J.; Hayati, M. and Farshad, S. (2006). Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics

against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. Burns. 32(3):343-347.

- **Jarlier**, V.; Nicolas, M.; Fournier, G.; and Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β-Lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev. Infect. Dis. 10(4): 867-78.
- **Jia**, C. G. (1992). Plasmid Fingerprinting Technique Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from a Burn Unit. Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chin. 8 (2) : 139 – 140.
- **Joklik,** W.K.; Wikett, H.P.; Amos, D.B.; and Wifert, C.M. (1992). Zinsser Microbiology. (20^{th}) ed. Appeston & Longe. U.S.A.
- **Johston**, J.N. and Richmond, M.H. (1970). The increased rate of loss of penicillin' s plasmids from Staphylococcus aureus in the present of rifampcin. J. gen. Microbiol. 60 : 137-139.
- **Jones**, R.N. and Varnam, D.J. (2002). Antimicrobial activity of broad-spectrum agents tested against Gram-negative bacilli resistant to ceftazidiome. Diagan-Microbial-Infect-Dis. 44(4) :82 – 379 .
- **Jones**, R. N. and Pfaller, M. A. (2002). Ciprofloxacin as broad – spectrum empiric therapy – are fluroquinolones still viable monotherapeutic agents compared with beta-lactams : data from the Mystic program (US) Diagn. Microbial infect. 42 : 213 – 215.
- **Kaitwatcharachi**, C.; Vasuvattakul, S.; Yenchitsomeans, P. (1999). Distal Renal Tubular Acidocis & High Urine Carbon Dioxide Tension In Patients With South East Asian Ovolocytosis. Am.J.of Kidney. Dis. 33: 1147-51.
- **Kalkarni**, R.S. and Kanekar (1998). Effects of some curing agents on phenotyping stsbility in *Pseudomonas putida* degrading epsilon – caprolocam. J. Microbiology and Biotechnology . 14(2) : 255-257.
- **Karlowsky**, J.A.; Jones, M.E.; Thornsberry, C.; Friedland, I.R.and Sahm, D.F. (2003). Trends in antimicrobial susceptibilities among *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in United States from 1998 to 2001. Antimicrobial. Agents . Chemother. May; 47(5): 1672-80.
- **Katzung**, B.G. (2001). Basic and Clinical Pharmacology. (8^{th}) ed. Lange Medical Books. McGraw-Hill. New York.

- **Kaye,** K.; Fraimow,H. and Abrutyn,E.(2000).Pathogens resistant to antimicrobial agent .Epidemiology ,molecular mechanisms, and clinical management .Infect.Dis.Clin.North Am.,14(2):319-293.
- **Kazmierzak,** A.; Cordin, X.; Duez, J.M.; and Sirot, J. (1990). Differences Between Clavulanic acid and Sulbactam in Induction and Inhibition Of Cephalosporines In Enterobacteriaceae. J.Inter.Med.Res.18: 76D-7D.
- **Kennth Todar's**.(2004)Textbook of Bacteriology on line,Wisconsin-Madison Dept.of Bacteriology.
- **Koch,** A.L., (2000) Penicillin binding proteins β - Lactamase, and Lactamases: offensive, Attacks and Detersive counter measures, Microbiol, 26(4): 205-220.
- **Kohler**, T. , Curty.L.K.; Barja,F. ; Delden, V.C. and Pechere, C.J.(2000). Swarming of *P.aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili . J. Bacteriol. 182: 5990-5996.
- **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^{th}) ed. J.B.Lippincott Company. Philadelphia.
- **Landman** D, Quale JM, Mayorga D, *et al*. (2002).Citywide clonal outbreak of multiresistant Acinetobacter baumannii and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned. *Arch Intern Med*. 162:1515-1520.
- **Larsson**, P. (1978). Acomparison of the host Parasite relationship in U.T.I. caused by *Proteus* and *E.coli* in Animal and children. Goeteborg.P. 12.
- **Laura,** P.; Roberta, M.; Lucia; P.; Ceilia, M.; Ernesto G; Gianfranco, A.; Egidio, R. and Gian, M. (2002). Emerging extended spectrum β-Lactamases in *Proteus mirabilis.*
- **Laurence**, D.R.; Bennett, P.N.; and Brown, M.J. (1997). Clinical Pharmacology. (8^{th})ed .Churchill Livingstone London.
- **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 β-lactamases

among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Koria. Antimicrob Chemother 56, 122-127.

- **Lei**, Y. ; Sato, K. and Nakae, T. (1991). Ofloxacin – resistant *Pseudomonas aeruginosa* Mutants with Elevated Drug Communications. 178 (3) : 1043 – 1048.
- **Levinson**, W. and Jawets, E. (2000). Medical Microbiology and Immunology examination and board review.(6^{th}) ed.
- **Levy**, S. (2001). The challenge of antibiotic resistance. Sci.Am. 278: 32-39.
- **Li,** X.; Lockatel, C.V.; Johnson, D.E.; Lane, M.C.; Warren, J.W.and Mobley, H.L.T.(2004). Development of intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by *Proteus mirabilis.* Infect. Immun. Jan. 72(1): 66-75.
- **Liaw**, S.J. ; AI, H.C. ; HO, S.W. ; Luh, K.T. and Wang, W.B. (2000). Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Proteus mirabilis* by *p*-nitrophenly glycerol. J. Med. Microbiol. 49: 725-731.
- **Lindgren**, V. ; R. M. Gardner and C. C. Sanders. (1999). Genetic mapping of the structural gene for phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. J. Bacteriol. 172 (2) : 1155 – 1156.
- **Lipuma**, J.J.; Stull, T.L.; Dasen, S.E.; Pidock, K.A. and Kazeniomiski, O.M. (1989). DAN Polymorphism among *E. coli* isolated from bacteriuria Women. J. Infect. Dis. 159: 526-531.
- **Livermore**, D.M. (1995). β-lactamases In Laboratory and Clinical Resistance. Clin.Microbiol.Review 8(4): 560.
- **Livermore** DM. (2000). Epidemiology of antibiotic resistance. Intensive Care Med, 26:S14–S21.
- **Livermore**, D. M. (2002). Multiple mechanisims of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* : Our worst night ware ?. Clin. Infec. Dis. 34: 634-640.
- **Lynch D.**(2004). Cranberry for prevention urinary tract infection. Am.Fam Physicians. 70:2175-77.

- **Lynch** JP. (2001). Hospital – acquired pneumonia risk factors. Microbiology and treatment . Chest; 119:373S-84S.
- **Lyobe,** S. Tsunoda, M. and Mitsuhashi, S. (1994). Cloning and expression in Enterobactericeae of the extended spectrum β-lactamase gene from *P.aeruginosa* plasmid . Microbiol. 121: 175-180.
- **MacFaddin**, J. F. (2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. 3rd ed. The Williams and Wilkins. Baltimore, USA.
- **Mandell**, G.L.; Bennet, J.E.; and Dolin, R.(1995). Principles & Practice Of Infectious Diseases. (4th) ed. Churchill Livingstone, London.
- **Mahon**, R. and Manuselis, G. (2000). Diagnostic Microbilogy 2nd ed. Saunders company U.S.A.
- **Maniatis**, T.; Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: Alaboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring, New York.
- **Marchandin**, H.; Jean-Pierre, H.; De Champs, C.; Sirot, D.; Darbas, H.; Perigault, P. F. and Carriere, C. (2000). Production of a TEM- 24 plasmid-mediated extended-spectrum β- Lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* . Antimicrob. Agents Chemoth. vol. 44(1): 213-216.
- **Masuda**, N, E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, and Nishino, T. (2001). Hypersusceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa* nfxB mutant to _-lactams due to reduced expression of the AmpC - lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 45:1284–1286.
- **Matsumoto,** y.& Inoue. M. (1999). Charactrization of SFO-l- a plasmid-mediated inducible classA β - lactamase from Enterobacter cloacae. J. Antimicrob. Agents. Chemoth. 93(2) 307-313.
- **Marty**, N. ; Pasquier, J.L. ; Dournes, K.C. ; Chavagnat, F. ; Guin, M. ; Chabanon, G, ; Pipy, B. and montrozier, H. (1998). Effects of characterized *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharidse on adherence to human tracheal cells. J.Med.Microbiol. 47: 129-134.
- **Merino**, S.; Rubires, X.; Aguilar, A. and Tomas, M.J. (1997). The role of O1-antigen in the adhesion to uroepithelial cells of *Klebsiella pneumoniae* grown in urine, Microbial Pathogenesis, vol.23 (1) : 49-53.

- **Miller**, L.A.; Ratnam, K. and Payane, D.J.(2001). β-lactamase – inhibitor combinations in the 21st century: current agents and new developments. *Curr Opin Pharmacol*, 1 : 451-8.
- **Mohanty**, S.; Singhal, R.; Sood, S.; Dhawan, B.; Das, B.K. and Kapil, A. (2005). Comparative in vitro activity of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations against Gram negative bacteria. Indian J MED Res 122. pp: 425-428.
- **Morshed**, S. R. M. ; Y. Lei ; H. Yoneyma and T. Nakae. (1995). Expression of Genes Associated with Antibiotic Extrusion in *Pseudomonas aeroginosa*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 210 (2) : 356 – 362.
- **Muhsin,** E.A. (2010). Astudy of some immunological aspects in children with renal disease. M.S.C., thesis. College of science. Al- Mustansiriya University.
- **Mulrooney**, S.B.; and Hausinger, R.P. (2003). Nickel uptake and utilization by microorganisms. FEMS Microbiology Reviews. 27: 239-61.
- **Murray**, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C. & Yolken, R.H. (1999). Manual Of Clinical Microbiology. (7th)ed. American Society Of Microbiology. Washington, U.S.A.
- **Naas,** T.; Zerbih, M.; Girlich, D.; Nordmann, P. (2003). Integration of Transposon Tn1- Encoded inhibitor resistant β -Lactamase Gene *bla*TEM-67 from *Proteus mirabilis,,* into *the Escherichia coli* chromosome. J. Antimicrob. Chemoth. 47 (1): 19-20.
- **National Committee For Clinical Laboratory Standareds** (2002). Perfomance Standared For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS. Villanova P.A.
- **Neu**, H.C. (1985). Contribution Of Beta-lactamases To Bacterial Resistance and Mechanisms to Inhibit Beta-lactamases. The American Journal of Medicine. 79 (Suppl.) 1-11.
- **Neu**, H.C. (1994). The 10 Most Commonly Asked Questions About Cephalosporines. Infect.Dis.In Clinical Practice. 3: 209.
- **Neuwirth,** C.; Siebor, E.; Pechinot, A.; Duez, J-M.; Pruneaux, M.; Garel, F.; Kazmierczak, A.and Labia, R.(2001). Evidence of in vivo transfer of a plasmid encoding the extended-spectrum β-lactamase TEM-24 and

other resistance factors among different members of the family *Enterobacteriaceae.* Journal of Clinical Microbiology. May.39 (5): 1985-8.

- **Nikaido**, H., and T. Nakae. 1979. The outer membrane of gram-negative bacteria. Adv. Microb. Physiol. 20:163–250.
- **Nikaido**, H.(1985). Molecular basis of bacteria outer membrane permeability. Microbiological Review. 49: 1-32.
- **Nikaido**, H. (1998). Multiple antibiotic resistance and efflux. Curr. Opin. Microbiol. 1 : 516 – 523.
- **Norman**, S.R.; Suau, F.R. and Morris, P.J. (2002).Variability in *P.aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. Microbiol. J. 68(10) : 5096-5103.
- **O'Connell,M.(1984)**. Genetic Transfer in prokaryotes transformation, transduction and conjugation.: 2 — 13 in Advanced Molecular Genetic by publisher, A. and Timmis. K. Springer verlug — Berlin.
- **Oguntibeju**, O.O. and Nwobu, R.A.U.(2004). Occurrence of *P.aeruginosa* in post –operative wound infection .J.Med,Sci. 20(30): 187-191.
- **Oizumi**, K.; Ohno, T.; Kawahera, M.; Kawaguchi, S; Saiho, M.; Mitutake, Y.; and Takcbe, K.(1995). A comparative study of tazobactam/piperacillin and piperacillin in bacterial pnenomena. Jpn.J.Antibiot. 48(4): 449-81.
- **Olayinka** A.T.; Onile B.A. and Olayinka BO.(2004). Prevalence of multi-drug resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolates in surgical units of Ahmadu Bello University Teaching Hospital, Zaria, Nigeria: an indication for effective controle measures. Ann Afr Med;3(1):3-16 .
- **Oliver,** A.; Vazquez, M.B.and Ferrer, M.M.(1999). Ampicillin-Sulbactam and Amoxicillin-Clavulanate Susceptibility Testing Of *E coli* Isolates With Different β-lactam Resistance Phenotypes. J. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 862-7.
- **Ostroff**, R. H. and M. L. Vasil. (1987). Identification of a new Phospholipase C activity by analysis of an insertional mutation in the hemolytic phospholipase C structural gene of *Pseudomonas aeruginosa* J. Bacteriol. 169 (10) : 899 – 908.

- **Orretti**, A.F. (2004). Antimicrobial susceptibility survey of *P.aeruginosa* strain isolated from clinical sources J. Microbiol. 96 (8) : 1065-1069.
- **Pai,** H.; Kim, J.W.; Kim, J.; Lee, H.; Choe, K.W.; & Goton, N.(2001). Carbapenem Resistance Mechanisms In *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isoletes. Antimicrob. Agents. Chemother. 45 (2): 480-4.
- **Paul**, S. ; R. L. Bezbaruh ; M. K. Roy and A. C. Ghosh (1997). Multiple Antibiotic Resistance (MAR) Index and its Reversion in *Pseudomonas aeruginosa* Letters in Applied Microbiology. 24 (3) : 169 – 171.
- **Pellegrino**, F.L.P. ; Santos, K.R.N. ; Riley, L.W. and Moreira, B.M. (2006). bla $_{GES}$ carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro , Barazil. Barazilian Journal of Infectious Diseases , 10(4) : 251-253.
- **Peterman**,R.S.; Doetkott, C. and Rust, L.(2001). Elastase deficiency phenotype of *P.aeruginosa* canine otitis externa isolates. J. Clin Diagn Lab Immun. 8(3): 632-636.
- **Philippon**, A.; Arlet, Gand Jacoby, A.G. (2002). Plasmid-determined AmpC-Type β-Lactamases. Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy vol,46 (1) : 1-11.
- **Pitt**, T. L. ; M. Sparrow ; M. Warner and M. Stefanidou (2003). Syrvey of Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with Cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. Thorax. 58 : 794 - 796 .
- **Plaucha**, A.; Mikiewicz, B and Hryniewicz, W. (1999). Concurrent out breaks of extended-spectrum β-Lactamase-producing organisms of the family Enterobacteriaceae in a Warsaw Hospital. Journal of Antimicobial Chemotherapy 44 : 489-499.
- **Poirel,** L.N.; Guibert, T.; Labia. E.B.; Nordmann, P. (1999). Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-Spectrum β-Lactamas, encoded by an *Escherichia coli* integron gene. Antimicrob. Agents. Chemotherapy. 43:573-581.
- **Poirel**, L. ; Nass, T. ; Nicolas, D. ; Collet, L. ; Bellais, s. ; Cavallo, J. and Nordman, P. (2000). Characterization of VIM-2, acarbapenem hydrolyzing metallo-β-lactamase and plasmid and integron-bornegene

from a *Pseudomonas aeroginosa* clinical isolates in france . J. Antimicrob.Agent. Chemother.44(4): 891-897.

- **Poirel**, L. ; Rotimi, V.O. ; Mokaddas, E.M. ; Karim, A. and Nordman, P. (2001). VEP-1-Like extended – spectrum β-lactamases in *Pseudomonas aeroginosa* ,Kuwait. Emerging Infectious Diseases. Vol.7,No.3.

- **Poole**, K. ; K. Gotoh ; H. Tsujimoto ; Q. Zhao ; A. Wada and T. Yamasaki. (1996). Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operion in *nfxB*-type multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeroginosa* . Mol. Microbiol. 21 : 713 – 724.

- **Poole**, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistence . J. Appl. Microbiol. 92, Suppl.1:55S-64S.

- **Pope**, A.J.; Toseland, C.D.N.; Rushant, B.; Richardson, S.; McVey. M.; & Hills, J.(1998). Effect of potent urease inhibitor flurofamide, on *Helicobacter spp.* In vivo and in vitro. Digestive Diseases & Sciences. Jan.43 (1): 109-19.

- **Pournaras**, S. ; Ikonomidis, A. ; Neou, E. ; Kantzanou, M. ; Maniatis,A.N. and Tsakris, A.(2008). Piperacillin/ tazobactam- hetero resistant *Pseudomonas aeroginosa* from urinary infections,successfully treated by piperacillin/ tazobactam. Journal of Antimicrobial Chemotherapy . doi:10.1093/jac/dkm528.

- **Prescott**, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. (2005). Microbiology. 6th ed. McGraw. Hill companies Inc. New York.

- **Puzova**, H. ; L. Siegfried ; H. Kmetova ; J. Durovicova and A. Kerestesova (1994). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Urinary tract Infections. Folia microbiologia. 39 (4) : 337 – 341.

- **Qasim**, K.W. (2006). Effect of some chemical and physical factors on *Pseudomonas aeroginosa* membrane permeability. M.S.C. thesis . College of Sciences . Baghdad University.

- **Rabaey**, K. and Verstracte, W. (2005). Microbial Fuel Cells: novel biotechnology for energy generation. Trends in Biotechnology. 23(6): 291-298.

- **Raka**, L.; Mulliqi,-Osmani, G.; Berisha, L.; Begolli, L.; Omeragiq, S.; Parsons, L.; Salfinger, M.; Jaka, A.; Kurti, A and Jakupi, X.(2004).

Etiology and susceptibility of urinary tract isolates in Kosova. Int.J.Antimicrob.Agents. Mar.23 (Suppl 1): 2-5.

- **Rashid**, A. ; Chowdhury, A. ;Rahman, S.H. ; Begum, S.A. and Muazzam, N. (2007). Infections by *Pseudomonas aeroginosa* and Antibiotic Resistance Pattern of the Isolates from Dhaka Medical College Hospital. Bangladesh.J. Med. Microbiol.01 (02): 48-51.

- **Reading**, C& Cole, M. (1977). Clavulanic acid β -lactamase inhibting β -lactam from streptomysen clauligers. Antimicrob Agent. Chemother. 11(5): 852-857.

- **Recchia,** G.D.& Hall, R.M.(1995). Gene cassettes a new class of mobile elements. Microbiology. 141,3015.2027.

- **Reuter**, H.D. and Sendel, A. (1994). *Allium sativum* and *Allium ursinus* :chemistry , pharmacology and medicinal application-London Academic Press. 6: 55-113.

- **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. Fax:+98-21-8966310.

- **Rice,** L.B., Willeg, S.H. Papanicolaou, G.A. Mederriors A& Jacoby, G.A.(1990). Outbreake of Ceftazidium resistance caused by extended Spectrum β - Lactamases at Mussach usetts Chronic- Care Racility. Antimicrob. Agents. Chemother.34: 2193-2199.

- **Ripa** , s.; Ferrante , L . and Preena, M. (1990). Pharmacokinethcs of sulbactam / ampicillin in humans after intravenous and intramuclar injection. Chmother. 36: 185 –192.

- **Rokos**, A. ; Samicka-Grzelak, A.; Kot, K.; Pituch, H.; Meisel-Mikolajczyk. F. and Luczak, M. (2000). Beta – Lactamases with a wide. Substrate spectrum in gram-negative Strictly anaerobic rods Mod. Dosw. Mikrobid.52: 129-137.

- **Rolinson**, G.N.(1991). Evdution of β -Lactamase inhibitors. Sury. Gynecol. Obstct. 172 suppl: 11-16.

- **Rotschafer**, C. and Peterson, M. (2004). Aminoglycoside tutorial. University of Minnesota. (from Internet).
- **Ruiz**, J. (2003). Mechanisins of resistance to quinolones target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 51 : 1109-1117.
- **Ryan,** K. J. and Ray, C. G. (2004). Sherris Medical Microbiology. 4th ed. McGraw Hill, ISBN 0.8385-85: 9-9.
- **Sambrook**, J. ; E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- **Sanders,** W. E.. & Sanders, W.E. (1992). β -Lactam resistance in gram-Negative bacteria: Globel trends and clinical impact. Clin. Infect 15:828-839.
- **Sanders,** C.C.; Thomoson, K.S. and Bradford. D.A. (1993)- Problems with the detection of β. lactam resistance among non-fastidious gram-negative bacilli. Infect. Dis. Clin. North. AM. 7(2): 411-424.
- **Sanders** M.E**..**Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health.J. Mutr.(2000);130:384S-390S.
- **Senda**, K. ; Y. Akakawa ; K. Nakashima ; H. Ito ; S. Ichiyama ; K. Shimakata ; N. kato and M. Ohta. (1996). Multifocal Outbreaks of Methalo-β- lactamase – Producing *Pseudomonas aeruginosa* Resistance to Broad – Spectrum β- lactamase , including Carbapenems. Antimicrobial Sgents and Chemotherapy. 40 : 349 – 353.
- **Shahid,** M. and Malik, A. (2004). Plasmid Mediated Amikacin Resistance in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Medical. 22 : 182 – 184.
- **Sherlock**, O.; Schembri, A.M; Reisner, A. and klemm , P. (2004). Novel roles for the AIDA adhesion from diarrheagenic *E.coli*, cell aggreagation and biofilm formation. Journal of Bacteriogy; vol 186 (23) : 8058- 8065 .
- **Songer** , G. (2004). Virulence factors and pathgensis of Pseudomonas aeruginosa . The University of Arizona.
- **Spanu,** T.; Luzzaro, F.; Perilli, M.; Amicosanti, G.; Toniolo, A.; Fadda, G.; and The Italian ESBL Study Group (2002). Occurance of extended-

spectrum *β*-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to β-lactams and other antimicrobial drugs. Antimicrobial Agents . Chemotherapy. Jan.46 (1): 196-202.

- **Still**, J.M. and Law, E.J. (2001). Primary excision of the burn wound. Clin Plast Surg. (1): 23-47. (Medline).
- **Stocks**, E.J. and Ridgway, G. (1987). Handling clinical speciment for microbiology studies; 5th ed. Churchill living stone Edinburgh . p: 173-201.
- **Strateva**, T. ; Ouzounova-Raykova, V. ; Markova, B. ; Todorova, A. ; Martiva-Proevska, Y. and Mitov,I. (2007). Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. J.Med.Microbiol.56:956-963.
- **Sweet,** R .L. ; Roy,,S . ; Faro, S.; Brien, WF. ; Sanfillipo .JS. Seidlin, M. (1994). Pipracillin and Tazobactam Versus clindamycin and gentamicin in the treatment of hospitalized women with pelvic infection the Pipracillin / tazobactam study group . abstract-gynecol. 83 (2) : 280 – 285 .
- **Sykes**, R.B.and Mathew, M.(1976). The β-Lactamases of Gram negative bacteria and their role in resistance to β-Lactam antibiotic. J, Antimicrobial Chemotherapy; 2 : 115-157.
- **Takeda**, S.; Nakai, T.; Wakai, Y.; Ikeda, F. and Hatano, K. (2007). In vitro and in vivo activities of a new cephalosporin, FR264205, against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 51(3): 826-830.
- **Tam**, V.H.; Mckinnon, P.S.; Akins, R.L. and Rybak, M. (2002). Pharmacodynamic of cefepim in patients with Gram-negative infections. Journal-Antimicrob-Chemother; 50(3) : 8-425.
- **Tanak**, T.; Kawase, M.; Tani, S.(2003). Urease inhibitory activity of simple α, β-unsaturated ketones. Life Sciences. 73: 2985-90.
- **Thureen,** P.J.; Reither, P.D.; Gresores, A. (1999). Once - Versus Twice Daily Gentamicin Dosing In Neonates 34 Weeks Gestation: cost - ffectiveness Analysis. Pediatrics. 103: 594-8.
- **Tierney,** L.M.Jr.; McPhee, S.J.; Papadakis, M.A. (1999). Current Medical Diagnosis & Treatment. (38th) ed.Appleton & Lange U.S.A.

- **Todar**.(2004)Textbook of Bacteriology on line,Wisconsin-Madison Dept.of Bacteriology.
- **Todar**, K. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*. Todar's Online Textbook of Bacteriology. University of Wisconsin- Madison Department of Bacteriology.
- **Tortora**, G.J. Funke, D.R. and Case, C.L.(2007). Microbiology . 3rd ed . pearson Education Inc. USA.
- **Totir**, M.A. ; Helfand, M.S. and Carey, M.P. (2007). Sulbactam forms only minimal amounts of irreversible acrylate-enzyme with SHV-1 beta-lactamase. Biochemistry ,46 (31) : 8980-7.
- **Trevorse,** J.T. (1986) . Plasmid curing in bacteria . FEMS. Microbiol . Rev . ,32 : 149–157.
- **Turnidge**, J.; Bell, J. and Biedenbach, D.J. (2002). Pathogen occurrence and antimicrobial resistance trends among urinary tract infection isolates in the Asia-Western. Int-J-Antimicrob-Agents; vol.20(1) : 7-10.
- **Udo**,E.E;and Jacob,L.E.(2000).Characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* fom Kuwait hospitals with high level fusidic acid resisrance .J.Med .Microbiol.,49(5):419-26.
- **Ueda,** Y. & Sunagawa, M.(2003). In vitro and in vivo activity of novel 2-(thiazol-2-ylthio)-1-beta-methylcarbapenemeswith potent activity against multiresistant gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. Aug.47 (8): 2471-8.
- **Valls,** M.; Cases, I. and Lorenzo, V. (2004). Transcription mediated by rpon-Dependent promoters. *Pseudomonas,* Pp: 398-308.
- **Vandepitte**, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuck, G. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO Switzerland.
- **Van-Daele**, P.L. ; Quero-Guillen, J.C. ; Lesterhuis, W.; & Van-Der-Menlen, J.(1998). Hyperammonemia In Hydronephrosis. Ned.Tijdschr-Geneesked. 142: 2414-5 (Abstract).
- **Vianelli** N, Giannini MB, Quartic C. (2006). Resolution of a *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a haematology unit with the use of disposable sterile water filter. Haematol J ; 91 (7): 983-985.

- **Vivian**, A. ; J. Murillo and A. W. Jackson. (2001). The Roles of Plasmids in phytopathogenic bacteria : mobilearsenals J. Microbiology. 147 : 763 – 780.
- **Walled** (2003). (http://www.Olom.net.).
- **Walsh,** C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature. 406:775–81.
- **Wariso**, B. A. and Ibe, S. N. (2006). Bacteriology of chronic discharging ears in porthar court Nigeria. West Afr. J. Med. 25(3): 219-22.
- **Weideman**, B.; Klieloe; C.; Kreskn, M. (1989). The epidemiology of β - lactamases. J. Antimicrob. Chemother. 24 (suppl B): 1-22.
- **Wesley**, W.E. (2004). Urinary tract infection. (http://www. emedicine.com).
- **WHO**. (1978). Techniques For The Detection Of β -Lactamase Producing Strains Of *Neisseria gonorrhoeae*. 616: 137-143.
- **Wilderman** ,J.P.;Vasil, I.A.; Jaohanson, Z. ; Wilson, J.M. ; Cunliffe, E.H. ; Camont, L.I. ;and Vasil, L.M. (2001). Characterization of an endoprotease (prpl) encoded by *pvds*-regulated gene in *P.aeruginosa* . J.Microbiol.18:242-249.
- **Williams**, P.; Camara, M.; Hardman, A.; Swift, S.; Milton, D.; Hope, V. J.; Winzer, K.; Middleton, B.; Pritchard, D. I. and Bycroft, B. W. (2000). Quorum sensing and the population dependent control of virulence. Philos. Trans. R. Soc. London. B. Biol. Sci. 355: 667- 680.
- **Winokur**, P.L.; Canton, R.; Casellas, J-M.; Legakis, N.(2001). Variations in the performance of strains expressing an extended-spectrum β - Lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. Clinical Infections Diseases. 32(Suppl 2): S94-103.
- **Wright**, G.D.(2003). Mechnisms of resistence to antibiotics . Curr. Opin. Chem. Biol. 7:563-9.
- **Wychoff,** J. T.; Thomas, B.; Hassett, J. D. and Wozniak, J. D. (2002). Static growth of mucoid *P. aeruginosa* selects for non-mucoid variants that have acquired flagellum-dependent motility. J. Microbiol. 148: 3423-3430.

- **Yamane**, K. ; Doi, Y. ; Yokoyama, K. ; Yagi, T. ; Kurokawa, H. ; Shebata, N. ; Shibayama, K. ; Kato, H. and Arakawa, Y. (2004). Genetic environments of the rmt A gene in *P. aeruginosa* clinical isolates . J. Antimicrobiol. Chemother.48 : 2069-2074.
- **Yan** , J.J. ; Hsueh, P.R. ; Ko, W.C. ; Luh, K.T. ; Tsai, S.H. ; Wu, H.M. and Wu, J.J. (2006). Metallo-beta-lactamase in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM -3 , a novel variant of the VIM-2 enzyme . Antimicrob . AgentsChemother . 45:2224-2228.
- **Zgurskaya**, H. I. and Nikaido, H. (1999). Bypassing the periplasm : reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 7190 – 7195.

ملحق (1) إستمارة المعلومات الخاصة بالمرضى

رقم العينة .

اسم المريض .

العمر .

الجنس .

السكن .

نوع العينة .

تاريخ جمع العينة .

مكان العزل .

معرفة هل تناول المريض مضادات حيوية ام لا .

ملحق (2) نتائج تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* بنظام Api 20NE

Tests	Active Ingredients	Reactions/Enzymes	Results	
			Negative	Positive
NO_3	Potassium nitrate	Reduction of nitrates to nitrites	NIT1+NIT2/5min	
			Colorless	Pink-red
		Reduction of nitrates to nitrogen	Zn/5min	
			Pink	colorless
TRP	L-tryptophane	Indole production	James/immediate	
			Colorless Pale green/yellow	pink
GLU	D-glucose	Fermentation(glucose)	Blue to green	yellow
ADH	L-arginine	Arginine dihydrolase	Yellow	Orange/pink
URE	Urea	Urease	Yellow	Orange/pink
ESC	Esculin ferric citrate	Hidrolysis(β-glucosidase)Esculin	Yellow	Grey/brown black
GEL	Gelatin(bovine origin)	Hydrolysis (protease)	No pigment diffution	Diffution of black pigment
PNPG	4-nitrophenyl-βD-glactopytanoside	β-glactosidase(para-nitrophenyl-βD-galactopyranosidase)	Colorless	yellow
GLU	D-glucose	Assimilation (glucose)	Transparent	opaque
ARA	L-arabinose	Assimilation(arabinose)	Transparent	opaque
MNE	D-mannose	Assimilation(mannose)	Transparent	opaque
MAN	D-mannitole	Assimilationmannitole)	Transparent	opaque
NAG	N-acetyl-glucosamine	Assimilation(N-Acetyl-Glucosamine)	Transparent	opaque
MAL	D-mallose	Assimilation(maltose)	Transparent	opaque
GNT	Potassium gluconate	Assimilation(potassium gluconate)	Transparent	opaque
CAP	Capric acid	Assimilation(capric acid)	Transparent	opaque
ADI	Adipic acid	Assimilation(adipic acid)	Transparent	opaque

MLT	Malic acid	Assimilation(malate)	Transparent	opaque
CIT	Trisodium citrate	Assimilation(trisodum citrate)	Transparent	opaque
PAC	Phenylacetic acid	Assimilation(phenylacitic acid)	Transparent	opaque
OX	(See oxidase test package insert)	Cytochrome oxidase	(see oxidase test pakage insert)	

ملحق (3) مقاومة عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* للمضادات الحيوية المختلفة.

OF	CAZ	NOR	CIP	AK	TB	CN	SXT	PRL	CTR	CTX	PY	CL	FT	AX	AM	رقم العزلة
S	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU1
S	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PU2
S	R	S	S	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PU3
S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	PU4
S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU5
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU6
S	S	R	S	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU7
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU8
S	R	S	S	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PU9
R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU10
S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PU11
S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU12
S	R	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	PU13
S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU14
S	S	R	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU15
S	R	S	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU16
S	R	S	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU17
S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU18
S	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU19
S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU20
S	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	PU21

S	R	S	S	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU22
S	R	R	S	S	S	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	PU23
S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU24
S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU25
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU26
S	R	R	S	S	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PU27
S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU28
S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU29
S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PU30
S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PU31
S	S	R	I	R	I	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	PE32
S	S	S	I	S	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	PE33
S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	PE34
S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	PE35
S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE36
S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE37
S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	PE38
S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE39
S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE40
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE41
S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	PE42
S	S	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	PE43
S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE44
S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	PE45
S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	PE46
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE47
S	R	R	R	S	S	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PE48
S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PE49
S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	PE50
S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	PW51
S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PW52
S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PW53
S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PW54
S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	PW55
S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	PW56
S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	PW57

S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PW58
S	R	R	S	S	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	PW59
S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PW60
S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PW61
S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PW62
S	R	R	S	S	R	I	R	S	R	S	R	R	R	R	R	PW63
S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PW64
S	S	S	S	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB65
S	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB66
S	R	R	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB67
S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB68
S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB69
S	R	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB70
R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB71
S	R	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB72
S	R	S	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB73
S	R	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB74
S	R	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	PB75

S - Sensitive / حساسة

I - Intermediate / متوسطة

R - Resistant / مقاومة

ملحق(4) يبين التأثير الخلطي لمثبط Amoxicillin + Clavulanic acid

(Augmentin) وبنسبة (1 : 2)

Clavulanic acid + Amoxicillin µg/ml	Amoxicillin µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Amoxicillin µg/ml	Amoxicillin µg/ml	رقم العزلة
256	1024	PE41	64	1024	PU1
512	1024	PE47	8	512	PU5
64	512	PW51	64	1024	PU7
8	512	PW52	512	1024	PU10
32	512	PW54	128	1024	PU14
128	1024	PW55	16	512	PU17
16	512	PW60	512	1024	PU20
128	512	PW63	16	512	PU25
16	1024	PW64	128	512	PU26
512	1024	PW65	128	1024	PE28
512	1024	PW66	128	1024	PE32
256	1024	PW67	32	512	PE33
16	1024	PB70	128	1024	PE34
256	1024	PB71	16	512	PE35
8	512	PB72	128	1024	PE36
256	1024	PB73	64	512	PE37
256	1024	PB74	256	1024	PE39

ملحق (5) يبين التأثير الخلطي لمثبط Cephalexin + Clavulanic acid

وبنسبة (1 : 4)

Clavulanic acid + Cephalexin µg/ml	Cephalexin µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Cephalexin µg/ml	Cephalexin µg/ml	رقم العزلة
256	512	PE41	128	512	PU1
512	1024	PE47	2	128	PU5
64	512	PW51	128	1024	PU7
4	128	PW52	128	1024	PU10
32	512	PW54	64	1024	PU14
4	256	PW55	8	512	PU17
256	512	PW60	256	512	PU20
4	256	PW63	4	256	PU25
256	1024	PW64	128	512	PU26
8	512	PW65	256	1024	PE28
256	1024	PW66	128	1024	PE32
128	512	PW67	4	512	PE33
256	1024	PB70	256	512	PE34
256	1024	PB71	16	512	PE35
8	512	PB72	256	1024	PE36
64	512	PB73	8	512	PE37
4	256	PB74	256	1024	PE39

ملحق (6) يبين التأثير الخلطي لمثبط Carbencillin + Clavulanic acid

وبنسبة (1 : 4)

Clavulanic acid + Carbencillin µg/ml	Carbencillin µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Carbencillin µg/ml	Carbencillin µg/ml	رقم العزلة
256	1024	PE41	256	1024	PU1
512	1024	PE47	16	512	PU5
64	512	PW51	64	1024	PU7
8	128	PW52	256	1024	PU10
32	512	PW54	256	1024	PU14
256	1024	PW55	32	512	PU17
256	512	PW60	256	512	PU20
256	512	PW63	16	512	PU25
256	1024	PW64	128	512	PU26
512	1024	PW65	256	1024	PE28
256	1024	PW66	256	1024	PE32
64	1024	PW67	32	512	PE33
256	1024	PB70	256	512	PE34
256	1024	PB71	16	512	PE35
8	512	PB72	256	1024	PE36
16	1024	PB73	8	64	PE37
256	1024	PB74	256	1024	PE39

ملحق(7) يبين التأثير الخلطي لمثبط Cefotaxime + Clavulanic acid

وبنسبة (1 : 4)

Clavulanic acid + Cefotaxime µg/ml	Cefotaxime µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Cefotaxime µg/ml	Cefotaxime µg/ml	رقم العزلة
256	512	PE41	16	256	PU1
512	1024	PE47	4	32	PU5
16	256	PW51	32	512	PU7
2	16	PW52	16	512	PU10
32	512	PW54	8	128	PU14
4	256	PW55	8	256	PU17
16	512	PW60	128	512	PU20
4	256	PW63	16	256	PU25
32	1024	PW64	128	512	PU26
8	32	PW65	64	512	PE28
16	1024	PW66	2	16	PE32
128	512	PW67	4	32	PE33
128	1024	PB70	8	512	PE34
64	512	PB71	16	512	PE35
8	512	PB72	16	256	PE36
64	512	PB73	4	16	PE37
4	256	PB74	32	512	PE39

ملحق (8) يبين التأثير الخلطي لمثبط Ceftriaxone + Clavulanic acid

وبنسبة (1 : 4)

Clavulanic acid + Ceftriaxone µg/ml	Ceftriaxone µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Ceftriaxone µg/ml	Ceftriaxone µg/ml	رقم العزلة
256	512	PE41	4	32	PU1
512	1024	PE47	4	128	PU5
16	256	PW51	2	64	PU7
2	16	PW52	64	512	PU10
32	512	PW54	8	128	PU14
4	256	PW55	8	256	PU17
16	512	PW60	128	512	PU20
4	256	PW63	16	256	PU25
32	1024	PW64	128	512	PU26
8	32	PW65	2	16	PE28
16	1024	PW66	16	64	PE32
16	512	PW67	4	32	PE33
512	1024	PB70	8	512	PE34
64	512	PB71	4	16	PE35
8	512	PB72	8	128	PE36
16	512	PB73	4	16	PE37
4	16	PB74	32	512	PE39

ملحق (9) يبين التأثير الخلطي لمثبط Ceftazidime + Clavulanic acid

وبنسبة (1 : 4)

Clavulanic acid + Ceftazidime µg/ml	Ceftazidime µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Ceftazidime µg/ml	Ceftazidime µg/ml	رقم العزلة
8	512	PE41	4	16	PU1
4	256	PE47	4	128	PU5
2	16	PW51	1	16	PU7
2	16	PW52	16	256	PU10
32	64	PW54	8	128	PU14
1	16	PW55	8	256	PU17
1	8	PW60	4	512	PU20
4	256	PW63	2	128	PU25
4	128	PW64	1	256	PU26
2	16	PW65	2	16	PE28
1	128	PW66	16	64	PE32
16	512	PW67	4	32	PE33
1	256	PB70	8	128	PE34
2	512	PB71	4	16	PE35
1	16	PB72	2	16	PE36
4	128	PB73	4	512	PE37
4	16	PB74	2	16	PE39

ملحق(10) يبين التأثير الخلطي لمثبط Piperacillin + Clavulanic acid

وبنسبة (1 : 4)

Clavulanic acid + Pipracillin µg/ml	Pipracillin µg/ml	رقم العزلة	Clavulanic acid + Pipracillin µg/ml	Pipracillin µg/ml	رقم العزلة
256	512	PE41	4	64	PU1
256	512	PE47	4	256	PU5
2	64	PW51	2	32	PU7
2	32	PW52	256	512	PU10
32	512	PW54	16	128	PU14
32	32	PW55	32	256	PU17
32	64	PW60	4	512	PU20
4	256	PW63	2	128	PU25
256	512	PW64	32	256	PU26
2	64	PW65	2	64	PE28
16	256	PW66	16	256	PE32
16	512	PW67	4	32	PE33
64	256	PB70	4	64	PE34
256	512	PB71	8	64	PE35
32	64	PB72	8	256	PE36
16	256	PB73	16	256	PE37
4	256	PB74	16	512	PE39

ملحق(11) يبين التأثير الخلطي لمثبط Piperacillin + Tazobactam

(Tazocin) وبنسبة (1 : 8)

Tazobactam + Pipracillin µg/ml	Pipracillin µg/ml	رقم العزلة	Tazobactam + Pipracillin µg/ml	Pipracillin µg/ml	رقم العزلة
64	512	PE41	4	64	PU1
256	512	PE47	4	256	PU5
2	64	PW51	2	32	PU7
2	32	PW52	256	512	PU10
32	512	PW54	16	128	PU14
32	32	PW55	32	256	PU17
32	64	PW60	4	512	PU20
4	256	PW63	2	128	PU25
256	512	PW64	32	256	PU26
2	64	PW65	2	64	PE28
16	256	PW66	16	256	PE32
16	512	PW67	4	32	PE33
64	256	PB70	4	64	PE34
64	512	PB71	8	64	PE35
32	64	PB72	8	256	PE36
16	256	PB73	16	256	PE37
4	256	PB74	16	512	PE39

ملحق (12) التحليل الأحصائي بأستخدام برنامج SPSS

أختبار t (t-test)

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation
Pair 1	A1	798.12	34	258.045
	A2	171.29	34	175.427
Pair 2	A3	828.24	34	252.554
	A4	163.53	34	169.307
Pair 3	A5	773.65	34	301.576
	A6	180.47	34	138.118
Pair 4	A7	640.00	34	308.748
	A8	129.24	34	126.420
Pair 5	A9	414.59	34	292.686
	A10	52.82	34	98.042
Pair 6	A11	359.06	34	318.425
	A12	46.29	34	98.095
Pair 7	A13	157.41	34	173.075
	A14	5.26	34	6.326
Pair 8	A15	244.71	34	183.722
	A16	50.12	34	87.832
Pair 9	A17	244.71	34	183.722
	A18	38.82	34	70.892

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	A1 - A2	17.241	33	.000
Pair 2	A3 - A4	18.666	33	.000
Pair 3	A5 - A6	14.088	33	.000
Pair 4	A7 - A8	12.120	33	.000
Pair 5	A9 - A10	8.241	33	.000
Pair 6	A11 - A12	6.542	33	.000
Pair 7	A13 - A14	5.151	33	.000
Pair 8	A15 - A16	7.817	33	.000
Pair 9	A17 - A18	7.654	33	.000

Summary

The study was included isolation and identification of (75) isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from (304) samples from patients with different infections in Baaquba Teaching Hospita l and Al –Batool Hospital in Baaquba city . The results appeared that the percentage isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from the urin was (41.3%) , otitis media (25.3%) , wound (18.6%) and burn was (14.6%) . All bacterial isolates were identified by the biochemical , cultural and microbial characteristics and confirmed by api-20NE system .

Results of this study indicated that all local isolates were lecithinase producer , while (67) isolates (89.3%) haemolysin producer , (66) isolates (88%) were protease producer , (65) isolates (86.6%) had the ability to adhere to uro-epithelial cell , (61) isolates (81.3%) were able to agglutinate red blood cells , (37) isolates (49.3%) were urease producer .

The sensitivity of these isolates were tested against (16) antibiotics , the results showed that the Ofloxacin and Ciprofloxacin were found to be the more effective against local isolates with apercentage of resistance 3% , 21% respectively, while the Ampicillin , Amoxacillin , Cephalexin , Co-trimoxazole were non effective with percentage of resistance (100%) .

The results indicated that all the local isolates appeared multi-resistant . Multiple resistance pattern for antibiotic divided into two groups , first group included (23) isolates which were resistant to (6-10) antibiotics , while second group included (52) isolates were resistant to (11-15) antibiotics . Results indicated that the second group was dominant.

The dominated pattern of multiple resistance was eleven antibiotics (Ampicillin – Amoxicillin – Nitrofurantoin – Cephalexin - Co-Trimoxazole - Carbencillin – Cefotaxime – Ceftriaxone – Piperacillin – Ceftazidime - Gentamicin) . The increase in the degree of multiplicity it's accompanied by the addition of specific resistance marker to the pre-existing dominant pattern .

Ampicillin (final concentration 100 µg / ml) was used as a β-Lactam antibiotic group representative for the primary selection of *Pseudomonas aeruginosa* resistant isolates . All isolates showed resistance for final concentration .

Rapid iodometric assay was used to investigated β-Lactamase activity of *Pseudomonas aeruginosa*. It was found that (34) isolates (45.44%) were β-Lactamase producer .

Disk approximation test was used to detect the production of extended spectrum β-Lactamase . Results showed that (7) isolates (20.58%) were positive .

The minimum inhibitory concentration (M.I.C) was determined for eleven antibiotics including Ampicillin , Amoxacillin , Carbencillin , Cephalexin , Cefotaxime , Ceftriaxone , Ceftazidime , Pipracillin , Ciprofloxacin , Gentamicin and Amikacin . Results showed differences ranges among isolates , some were able to resist high concentrations of Ampicillin and Amoxacillin reached 1000 µg / ml , while others were inhibited by 2 µg / ml of Ciprofloxacin .

The values of (M.I.C) for β-Lactam antibiotics (Amoxacillin , Carbencillin , Cephalexin , Cefotaxime , Ceftriaxone , Ceftazidime , Pipracillin) were decreased at the presence of β-Lactamase inhibitors . Results showed that (100%) of *Pseudomonas aeruginosa* isolates were sensitive to Ceftazidime – Clavulanic acid , 0% showed sensitivity to Ampcillin – Sulbactam , while (91.17%) were showed sensitivity to Pipracillin – Tazobactam .

The plasmid content of the four isolates (PU10 (urin) , PE47 (ear) , PW64 (wound) , PB71(burn)) was studed , and the Results showed that all isolates contain single large plasmid band .

Curing was conducted by use of Acridin orange . The plasmids were lost at concentration 512 µg / ml.

The production of β-Lactamase enzyme and the resistance of the four selected isolates to the Ampicillin and Amoxacillin were studied . Results showed that (PU10 , PB71) was unable to produce β-Lactamase enzyme and lose their ability to resist Ampicillin and Amoxacillin,. But isolates (PE47 , PW64) were able to resist Ampicillin and Amoxacillin .

Repuplic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Sciences

Bacteriological Study of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Different Clinical Sources in Baaquba City and it's Suburbs .

A Thesis

submitted to the College of Education for Pure Science

Diyala University In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science In Biology / Microbiology

By

Lina Abd Alameer Salman Al Saadi

Supervised by

Dr.Adnan Neama Al Azawy
Professor

Dr. Hadi Rahman Rasheed Al Taai
Assistant Professor

2011/December **1433/Muharam**