جامعة القادسية
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

انتشار انزيمات بيتالاكتاميز نوعOXA بين عزلات بكتيريا الزوائف الزنجارية في مدينة الديوانية.

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية العلوم/جامعة القادسية وهي جزء من متطلبات

نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة/أحياء مجهرية.

من قِبل

رنا مشعل سالم

إشراف

أ.م.د.سيوف خومان علوان

جامعة القادسية /كلية الصيدلة

1435هـ

2014م

إقرار المشرف

أشهد إن رسالة الماجستير الموسومة بـ (**انتشار انزيمات بيتالاكتاميز نوعOXA بين عزلات بكتيريا الزوائف الزنجارية في مدينة الديوانية).**

وقد أعدتها الطالبة بإشرافي، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم / علوم الحياة / أحياء مجهرية.

التوقيع:

الأسم : د. سيوف خومان علوان

اللقب العلمي : استاذ مساعد

العنوان: كلية الصيدلة- جامعة القادسية

التاريخ:

توصية رئيس قسم علوم الحياة

اشارة إلى التوصية المقدمة من الأستاذ المشرف أحيل هذه الدراسة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الأسم : د. جاسم حنون

اللقب العلمي : مدرس

العنوان : كلية العلوم – جامعة القادسية

التاريخ:

المحتويات

الموضوع	الصفحة
الفصل الاول : المقدمة	2-1
الفصل الثاني : استعراض المراجع **Literatures review**	22-3
1.2. جنس الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*	3
2.2. الصفات العامة	3
1.2.2. الصفات المجهرية	3
2.2.2. الصفات الزرعية	3
3.2.2. الصفات الكيموحيوية	4
3.2. إمراضيه الزوائف الزنجارية Pathogenicity of *P.aeruginosa*	4
1.3.2.عوامل الضراوة Virulence factors	4
2.3.2. الأمراض المتسببة عن بكتريا *Ps. aeruginosa*	6
4.2 الوبـــائية Epidemiology	6
5.2 مضادات البيتالاكتام ß-Lactam Antibiotics	7
1.5.2 البنسيلينات Pencillins	8
2 .5.2 السيفالوسبورينات Cephalosporins	8
3 .5.2 مضادات المونوباكتام Monobactam Antibiotics	10
4.5.2 مضادات الكاربابينيم Carbapenemes Antibiotics	10
5.5 .2 مثبطات البيتالاكتاميز ß–Lactamases Inhibitors	11
6 .2 ميكانيكية تأثير مضادات البيتالاكتام Mechanesim of ß-Lactams	12
7.2 آلية المقاومة لبكتيريا الزوائف الزنجاريه للمضادات الحيوية Rsestance of *P. aeruginosa* to Antibiotics	13
1.7.2 إنخفاض النفاذية في الغشاء الخارجي Low Permeability of Outer Membrane	13
2.7.2 مضخات الدفق Efflux-Pump	14
3.7.2 تقليل إلفة المضاد الحيوي لاستهداف البروتينات الرابطة للبنسيلين Decreased Affinity of antibiotics to Targt Penicillin Binding Protins	15

4.7.2 تكوين الغشاء الحيوي Formation of biofilm	16
5.7.2 إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز Enzymes β-lactamases production	16
8.2 آلية تأثير إنزيمات البيتالاكتاميز Mechanizim of ß- Lactamases Action	16
9.2 تصنيف إنزيمات البيتالاكتاميز Classificatio of ß-Lactamases	17
1.9.2انزيمات السيرين بيتالاكتاميز Serine ß –Lactamases Enzymes	18
1. 1.9.2 انزيمات بيتا لاكتاميز صنف A Class A ß-Lactamases Enzymes	18
2.1.9.2 انزيمات البيتالاكتاميز صنف D Class D ß-Lactamases Enzymes	18
3.1.9.2 انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C Class C ß-Lactamases Enzymes	22
2.10.2 انزيمات البيتالاكتاميز المعدنية Metallo-ß-lactamase	22
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل	37-23
1.3 المـواد Materials	23
1.1.3 الأجهـزة والأدوات المختبرية Equipment and apparatus	23
2.1.3 المـواد الكيـمياويـة Chemical materials	24
3.1.3 الأوساط الزرعية الجاهزة Ready media	25
4.1.3 المضادات الحيوية Antibiotics	26
5.1.3 عدتا إستخلاص الدنا (DNA extraction)	27
6.1.3 بادئات الـDNA (DNA primers)	27
2.3. طرائق العمل Methods	28
1.2.3 تحضير الأوساط الزرعية Culture media	28
2.2.3 تحضير الكواشف والمحاليل Solutions and Reagents	28
1.2.2.3 الكواشف Reagents	28
2. 2.2.3 المحاليل Solutions	29
3.2.3 جمع العينات Samples collection	29
4.2.3 عزل البكتريا Isolation of bacteria	30

5.2.3 تشخيص البكتريا Identification of bacteria	30
1.5.2.3 الخصائص المظهرية	30
2.5.2.3 الفحص المجهري	30
3.5.2.3 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests	30
6.2.3 حفظ العزلات البكتيرية وإدامتها Preservation and maintenance of bacterial isolates	32
7.2.3 اختبار فحص الحساسية Antibiotic Susceptibility Testing	32
8.2.3 محاولة تصميم بادئ جديد ومتخصص لتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa*	33
9.2.3 تفاعل السلسلة المتبلمرة (PCR) Poly Chain Reaction	33
1. 9.2.3 إستخلاص DNA الكلي DNA Extraction	33
2. 9.2.3 تحضير هلام الأگاروز Agarose gel	34
3. 9.2.3 تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة PCR master mix	34
4. 9.2.3 برنامج الدورات الحرارية لتضخيم ألـ DNA	35
5.9.2.3 التحري عن حزم ألـ DNA المستخلص (Extracted DNA):	36
6. 9.2.3 الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis	37
7.9.2.3: التحليل الاحصائي	37
الفصل الرابع :النتائج والمناقشة	62-38
4 النتائج والمناقشة Results and Discussion	38
1.4 الدراسة الاحصائية للعينات Samples Demography	38
2.4 عزل بكتيريا *P. aeruginosa* وتشخيصها Isolatation and Identification of *P. Aeruginosa*	39
3.4 الكشف الجزيئي التأكيدي لبكتيريا *P. aeruginosa* باستخدام PCR	40
4.4 انتشار وتوزيع الزوائف الزنجارية في العينات البيئية والسريرية Incidence and distribution of *P. aeruginosa* in Environmental and Clinical Sample	41

4.4 اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	Antibiotic Susceptibility Test	47
6.4 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية	Multiple-antibiotics Resistance	55
6.4 تفاعل السلسلة المُتبلمرة (PCR)	Polymerase chain reaction	59
7.4 انتشار إنزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز في عزلات بكتيريا *P. aeruginosa*		59
الفصل الخامس : الأستنتاجات والتوصيات		63
1.5 الأستنتاجات	Conclusions	63
2.5 التوصيات	Recommendation	63
المصادر	**References**	92-64
الملاحق	**Appendix**	93-94
summery		A-B

قائمة بعناوين الجداول

الجدول	الصفحة
3-1 مكونات مزيج تفاعل إنزيم البلمرة PCR master mix وحجومها	35
3-2 الظروف المستعملة في جهاز الدورات الحرارية PCR	36
4- 1 الاختبارات الكيموحيوية لبكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من للعينات السريرية والبيئية	39
4-2 نسب العزل الاولي للعينات السريرية والبيئية	41
4-3 عدد العـزلات المأخوذة من عينات بيئية لمستشفى الديوانية التعليمي ونسبها	42
4 -4 عدد عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* السريرية ونسبها المعزولة من مواقع الأصابة المختلفة	43
4-5 مصادر الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* موزعة بحسب الفئات العمرية	46
4-6 مصادر الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* موزعة حسب الجنس	46
4-7 مصادر الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* موزعة حسب حالة المرضى	47
4-8 المقاومة الكلية للعزلات البكتيرية (البيئية و السريرية) قيد الدراسة للمضادات الحيوية	54
4-9 توزيع العزلات بين انواع المقاومة والنسب المئوية لها	56
4-10العزلتان المقاومتان لمضاد Polymyxin B والمضادات الحيوية الاخرى	58

قائمة بعناوين الاشكال

الشكل	الصفحة
2-1 تركيب البنسيلين	8
2-2 تركيب السيفالوسبورين	9
2-3 آلية تأثير مثبطات إنزيمات البيتالاكتاميز	11
2-4 تركيب جدار خلية سالبة لصبغة غرام وآلية تأثير مضادات بيتالاكتام	12
2-5 الية استر السيرين المستعمله من قبل انزيمات OXA البيتالاكتاميز في تحطيم حلقة البيتالاكتام	21
4-1 نسب العينات السريرية والبيئية من مصادرها المختلفة	38
4-2 الترحيل الكهربائي لمورث 16s-ribosomal RNA المتضاعفة باستعمال تقنية ألـ(PCR) لعزلات *P. aeruginosa* من (1-25) عزلة	40
4- 3 المقاومة الكلية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة للمضادات الحيوية	48
4-4 الترحيل الكهربائي لمورث $bla_{\text{OXA-10}}$ المتضاعفة باستعمال تقنية ألـ (PCR) لعزلات *P. aeruginosa* من (1-13) عزلة	60

قائمة المختصرات

المختصر	تعريفه
AmpC Molecular class	Molecular class C –lactamases
bla gene	β-Lactamase Gene
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTX-M	Cefotaximase, -lactamase active on cefotaxime
ESBLs	Extended-Spectrum β-Lactamases
IMP	β-Lactamase Active on Imipenem
KPC-	*Klebsiella pneumoniae*-carbapenemase
MBLs	Metallo-β-Lactamases
MDR	Multidrug Resistant
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OXA	Oxacillinases, -lactamase active on oxacillin
PBPs	Pinicillin Binding Proteins
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDR	Pan-drug resistance
PER	Pseudomonas Extended Resistant and Also the Initials of its Discoverers: Patric, Esthel, and Roger
SHV	β-Lactamase (Sulfhydryl Reagent Variable)
TEM	β-lactamase named after the patient (Temoneira) providing the first sample
VEB	Vietnam Extended-Spectrum β-Lactamase
VIM	Verona Integron-Encoded Metallo-β-Lactamases
XDR	Extensive-drug resistance

الخلاصة

تهدف هذه الدراسة الى تحديد انتشار مجاميع انزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز في عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من حالات سريرية واخرى بيئية غير حية في مستشفى الديوانية التعليمي باستخدام الطرائق المظهرية والجزيئية .

جُمِعت عينات الدراسة من مصادر مختلفة بواقع 390 عينة للمدة من شهر تشرين الثاني 2011 لغاية شهر آذار 2012 وشملت (292 عينة سريرية و98 عينة بيئية)، فأظهرت نتائج الفحوص الزرعية والإختبارات الكيموحيوية عائدية 50 عزلة (39عزلة مصدرها العينات السريرية و11 عزلة مصدرها العينات البيئية) لبكتريا الزوائف الزنجارية ، وتم تاكيد تشخيصيها باستعمال **16s-ribosomal RNA** اذ بينت الدراسة احتواء العُزلات جميعهاعلى المورث 16s-ribosomal RNA التي تُمثّل المورثة التشخيصيّة المصممة في هذه الدراسة .

أظهرت نتائج الدراسة أن أعلى نسبة عزل لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* كانت من التهابات الحروق، 23.6% ثم تلتها التهابات الجهاز التنفسي (القشع) كانت 15.3% ومن ثم التهابات الاذن الوسطى 12.5 % واخيرا أخماج المسالك البولية كانت نسبة عزل البكتريا10.4% ، اما نسب العزل من العينات البيئية فكانت 11.5% من ارضية شعبة الحروق ، تلتها 10.8% من الادوات الطبية للعاملين في الشعبة .

من الملاحظ في هذه الدراسة ان للعمر والجنس وحالة المرضى تأثير على الاصابة ببكتيريا *P.aeruginosa* اذ سجلت أعلى معدل اصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* عند الفئات العمرية (**61**<) سنة وعند توزيع الحالات المرضية بحسب جنس المريض اتضح بأن الاناث اكثر إصابة وعرضة لاستعمار بكتيريا *P. aeruginosa* خصوصا في اخماج المسالك البولية ،كما اظهرت الدراسة ارتفاع نسبة الاصابة البكتيرية للمرضى الراقدين في المستشفىً، ويزداد الامر سوءا في حال كون المرضى هم كبار السن و ذوي الحالات الحرجة المحتاجين الى القسطرة البولية اضافة الى المرضى الذين يعانون الحروق الشديدة ووحدات العناية المركزة .

أُجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية لجميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* تجاه 22 نوعاً من المضادات الحيوية بطريقة إنتشار القرص لـ كيربي- باور،واشارت هذه الدراسة الى أنّ هنالك مقاومة عالية نسبياً أبدتها بكتيريا*P. aeruginosa* لمضادات البيتالاكتام و لمضادات الأمينو كلايكوسايد و مضادات الفلوروكوينولون وقد اوضحت النتائج ان العزلات المدروسة اظهرت احتمالية انتاج انزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف ، والدليل على ذلك هو المقاومة التي تبديها البكتيريا تجاه السيفالوسبورينات الجيل الثالث وتجاه مضاد الازترونام ،كما اتضح ان هناك تباين في المقاومة لمضادات الكاربابينيم فكانت نسبة المقاومة لكل من الأميبينيم والميروبينيم فكانت 16% و64% على التوالي. كما استخدمت مضادات

البوليمكسين B والبوليمكسين E الذي يطلق علية كولستين(Colistin) و كانت نسبة المقاومة للكولستين 0% والبوليمكسينB 4% أي أن هنالك عزلتين ظهرت في هذه الدراسة مقاومة لمضاد البوليمكسينB وهذا النوع من المقاومة هو تحدي لنجاح الجهود العلاجية .

اشارت هذه الدراسة الى أنّ هنالك22 (44%) من العزلات مقاومة على الأقل لثلاثة من أصناف المضادات الحيوية، لذلك عُدّت هذه العزلات متعددة المقاومة (Multidrug Resistant) وشكلت العزلات ذات المقاومة الشاملة(Extensive-drug resistance)نسبة 26(52%) وتمثل اعلى نسبة بين الانواع الثلاث للمقاومة اما النوع الثالث من المقاومة فسجل نسبة 2(4%) وتمثل المقاومة لكل أصناف المضادات الحيوية المدروسة (Pan- drug resistance) .

تم التحري عن قابلية هذه العزلات على إنتاج مجاميع انزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز واسعة الطيف من خلال الكشف عن تواجد مـــورثات bla_{OXA-2}, bla_{OXA-1}, bla_{OXA-18}, bla_{LCR-1}, bla_{OXA-10} لدى تلك العزلات باستعمال تقنية سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة [Polymerase chain reaction(PCR)]، إذ أظهرت 50/50 (100%) عزلة إحتوائها المورث bla_{OXA-10} الذي ينتمي الى OXA group I ، وأشارت الدراسة الحالية إلى أنّ العزلات جميعها لم تعطِ ناتج تضخيم للموروثات bla_{OXA-18}, bla_{LCR-1}, bla_{OXA-2}, bla_{OXA-1} وتعود الى المجاميع الرئيسة لانزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز واسعة الطيف وهي OXAgroup II وOXAgroup III و OXAgroup V على التوالي باستثناء انزيم OXA18 فلا يعود الى اي من هذه المجاميع .

المقدمة : Introduction

تعد بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* من ملوثات المستشفيات واسعة الانتشار والتي تشكل خطرا حقيقيا للمرضى الراقدين وبشكل خاص المرضى الذين يعانون نقص المناعة و المرضى المصابين بحروق شديدة أو مرض السرطان، فهي واحدة من اهم الانواع البكتيرية المسببة لتفشي العدوى المكتسبة من المستشفيات (Nosocomial infections) (Wirth *et al.*, 2009)، اذ يمكن لهذه البكتيريا ان تنمو في بيئات متنوعة منها البيئات الرطبة للمستشفيات كأرضية الردهات و الادوات الطبية والجراحية حتى بعد استعمال المعقمات والمطهرات (Greenwood *et al*., 2007) .

ان امتلاك *P. aeruginosa* عدد من الخصائص الجديرة بالملاحظة ذات الارتباط الوثيق بالامراضية يعكس التكيفات التطورية التي تسمح لها ان تزدهر في بيئات مختلفة (Todar, 2008)، اذ تشتهر *P. aeruginosa* ببراعة التمثيل الغذائي (في وسعها استعمال ما لا يقل عن ثمانين من المركبات العضوية) وتنمو في اوساط مكونة من الحد الادنى من متطلبات النمو العضوي (Todar, 2008)، وعلى الرغم من ان هذه البكتيريا هوائية مجبرة وغير مخمرة للالكتوزالا انها تنمو بغياب O_2 اذا توافرNO_3 بوصفة مستقبلاً الكترونياً، كما يمكن لها ان تنمو بدرجات حرارية عالية تصل الى42^oC , كل هذه المجموعة الواسعة من الخصائص اسهمت في جعلها احد العوامل الممرضة الانتهازية (Csilla, 2011) .

تمتلك البكتيريا القدرة على الالتصاق والاستيطان وغزو بعض مناطق الجسم وإحداث العديد من الاخماج نتيجة امتلاكها عوامل ضراوة متعددة، والتي يمكن تقسيمها إلى عوامل ضراوة إفرازية كالانزيم المحلل للدم Haemolysin والمحلل للبروتين Protease والبكتريوسين Bacteriocinوالانزيم المحلل للدهونLipase ، ومتعدد السكريد للجدار الخلوي (Cell wall polysaccharides)، فضلاً عن قدرة البعض على إنتاج المحفظة (Capsule) وعوامل خلوية (Cellular Factors) التي تؤدي دورا كبيرا في إحداث المرض مثل الأسواط والشعيرات (Kaszab et al., 2011).

وتُعدْ بكتيريا *P. aeruginosa* المُسبب الرابع لأخماج عدوى المستشفيات ونتيجة لذلك اصبحت تشارك في زيادة عدد الوفيات فضلاً عن إطالة مدة الرقود في المستشفيات وخاصة الذين يعانون من نقص في الدفاعات الميكانيكية للجسم كمرضى الحروق والمصابين بالتليُف الكيسي، إذ تصل نسبة الموت لديهم حوالي 50%(Brusselaers *et al*., 2011).وازدادت أهمية هذه البكتيريا ليس لما قد تسببه من أمراض خطيرة فحسب وانما لمقاومتها العديد من المضادات الحيوية ومنها مضادات البيتالاكتام(Krisztina et al., 2011).إذ بإمكان هذه البكتيريا استعمال آليات متنوعة في المقاومة، ومن أهم هذه الآليات انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي، و مضخات دفق متعددة العقاقير، وإنتاج إنزيمات محطمة للمضاد الحيوي مثل

إنزيمات البيتالاكتاميز وتعدّ آلية إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (Extended spectrum β-lactamases) من أهم آليات المقاومة التي تم اكتشافها في العصيات السالبة لصبغة غرام (Poole, 2011) . وتشفر انزيمات البيتالاكتاميز كروموسوميا أو بلازميديا، ويتميز الاخير بقدرته على التضاعف الذاتي بشكل متزامن مع DNA الكروموسومي و الانتقال بين الأنواع البكتيرية بوساطة عملية الاقتران البكتيري (Conjugation)، وهذا يفسر إنتشار المقاومة للمضادات الحيوية (Philippon *et al*., 2002; Livermor and Brown, 2005). إنّ التطور الذي حصل في تقديم مضادات البيتالاكتام للاستعمال السريري تبعة تطور في آليات إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز من قبل بكتيريا*P. aeruginosa* وظهور سلالات تمتاز بصفة تعدد المقاومة للعقاقير(MDR) (Livermore, 2012) .

وفي السنوات الأخيرة اكتشفت المئات من إنزيمات البيتالاكتاميز المختلفة (Hsueh and Luh, 2005). وهذه الإنزيمات لها أثر كبير ومهمٌّ في انتشار المقاومة للمضادات الحيوية، وربما سوف تحدد الاختيارات المستقبلية للمضادات الحيوية المستعملة في علاج الإصابات المهددة للحياة، والمتسببة عن سلالات من بكتيريا*P. aeruginosa* المنتجة لهذه الانزيمات ونظرا لعدم توافر دراسة سابقة عن انواع إنزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز في محافظة الديوانية كان هدف دراستنا :

معرفة إنتشارانزيمات البيتالاكتاميز نوع OXA في عزلات *P. aeruginosa* المعزولة من الحالات السريرية وبيئة مستشفيات مدينة الديوانية.

خطوات البحث:

1- عزل وتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* من الحالات السريرية وبيئة مستشفى الديوانية التعليمي.

2- تشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* باستعمال التفاعل الجزيئي المتبلمر (PCR) .

3-التحري عن مقاومة هذه البكتيريا للمضادات الحيوية الشائعة .

4- الكشف عن السلالات المنتجة لانزيمات الـOXA بيتالاكتاميز واسعة الطيف باستعمال التفاعل الجزيئي المتبلمر (PCR) .

2 : أستعراض المراجع Literatures review

1.2 :جنس الزوائف الزنجارية Genus:- *Pseudomonas aeruoginosa*

عُزلت بكتيريا *P. aeruginosa* لأول مرة في مزرعة نقية من الجروح الجلدية التي لها لون ازرق مخضر من قبل العالم Gessard الذي اجرى عدة دراسات منذُ عام 1882 وسماها *Bacillus* pyocinas اذ استطاع من خلال دراسته لها لأكثر من نصف قرن أن يوفر أغلب المعلومات عن هذه البكتيريا ، ولاحظ إن هذه البكتيريا تنتج صبغتين احدهما Polyamine مشتقة من Pyocyaneus معناها القيح الازرق التي يميز الإصابة بهذه البكتيريا والأخرى صبغة Fluorescin، وفي عام 1886 شخص نوعان آخران من بكتيريا الزوائف من قبل Flugge تنتجان صبغة الفلورسين أيضا، بعدها تمكن الباحث Crubur عام 1887 من عزل هذه البكتيريا من قيح الأذن (Doggett, 1979)، ثم سميت من قبل Myrvik and Weiser (1988) بـ *P.* pyocineas والتي سميت أخيرا بالزوائف الزنجارية وأصبح الاسم العلمي للبكتيريا *P.aeruginosa* (Holt *et al.*, 1994) .

2.2 :الصفات العامة General characteristics

1.2.2 : الصفات المجهرية microscopic characteristics

تضم مجموعة من البكتيريا الهوائية الاجبارية ،خلاياه عصوية الشكل سالبة لصبغة غرام تظهر بشكل مفردة او ثنائية او على شكل سلاسل قصيرة، مستقيمة او منحنية ، تمتلك سوط قطـــبي وهي متحركة عموما (Collee *et al*., 1996) .

2.2.2 : الصفات الزرعية Cultural characteristics

تظهر مستعمرات *P. aeruginosa* ، شاحبة اللون على وسط ماكونكي اكار لعدم قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز (Baron and Finegold, 1990)، تمتاز معظم انواع جنس الزوائف الزنجارية بإنتاجها صبغة البايوفردين الخضراء المصفرة التي تعرف بصبغة الفلورسين التي تذوب بالماء والكلورفورم (Lau *et al*., 2004) ، كما ان قليل من السلالات المحددة والعائدة لهذه البكتيريا لها القابلية على انتاج بعض الصبغات مثل : صبغة البايروبين الحمراء ، وصبغة البايوميلانين السوداء او البنية (Jawetz *et al*., 2010) .

3.2.2 : الصفات الكيموحيوية Biochemical characteristics

تتصف بكتيريا *P. aeruginosa* بإيجابيها لاختبار الأوكسديز والكتاليز، وكذلك فحص الستريت وتميع الجيلاتين ، وتكون سالبة لفحص الأندول، وسالبة ايضا لفحص المثيل الأحمر ، وفحص فوكس بروسكاور (Greenwood *et al*., 1998) ، تستطيع هذه البكتيريا استغلال مركبات متنوعة بوصفها مصدراً للطاقة كالمصادر النايتروجينية والكاربونية (Collee *et al*., 1996 ; Itah and Essien , 2005).

3.2 : إمراضية بكتيريا *P. aeruginosa*

Pathogenicity of *P. aeruginosa*

1.3.2.عوامل الضراوة Virulence factors

تُظهر بكتيريا *P. aeruginosa* مقاومة للعديد من العوامل المُضادة للبكتيريا، بسبب امتلاكها للعديد من عوامل الضراوة منها عوامل خلوية كالاهلاب pili والشعيرات Fimbriae الأسواط Flagella، التي تساعد على الحركة والالتصاق بخلايا المضيف وعوامل افرازية مثل المواد البروتينية كصبغتي ألـ Pyocyanin و Pyoverdin، وذيفانات Exotoxin A التي تعدّ قاتلةً عند حقنها بشكل نقي في الحيوانات المختبرية أذ تمنع تخليق البروتين وكذلك انتاجها ذيفانات Exotoxin S التي وظيفتها الالتصاق ومنع عملية البلعمة في الأنسجة المصابة (Jawetz *et al*., 2010). ومن عوامل الامراضية الاخرى الغشاء الحيوي Bio film حيث تلجأ بكتريا *P. aeruginosa* الى تكوين الغشاء الحيوي والذي هو تجمع لخلايا البكتريا التي تكون مغطاة بغلاف يسمى Alginate ويساعد البكتريا على الآلتصاق على السطوح ويحافظ عليها من تقلبات العوامل البيئية (Salyers and Whitt, 2002) ويكثر إنتاجه في حالات الخمج المزمن للرئة وخاصة في حالة التليف الكيسي وله دور أساس في زيادة مقاومة البكتيريا لعملية البلعمة كما له دورا في تقليل نفاذية التراكيز القاتلة لعدد من المضادات الحيوية والمعقمات ويمنعها من الوصول الى الموقع الهدف في الخلية البكتيرية (Jawetz *et al*., 2010).

ان غزو المضيف عن طريق البكتيريا يتطلب اختراقا او تحطيما للغلاف الخلوي الخارجي ويحدث ذلك عن طريق أساليب فيزيائية او وسائل أنزيمية او الأثنين معـــــــا (Musk and Hergenrothe, 2008) ، وبما ان الدهون المفسفرة والبروتينات تمثل الوحدات الكيميائية الأساسية للغشاء الخلوي في المضيف لذا فأن العوامل الأنزيمية تؤدي دورا أساسيا في تحطيم او تحليل هذه الوحدات التركيبية في أثناء غزو خلايا المضيف ومن هذه الأنزيمات :

A – الأنزيم الحال للشحوم Lipase

تعمل هذه الأنزيمات على تحطيم طبقة الدهون الموجودة في الجدار الخلوي للمضيف مما يساعد البكتيريا على الانتشار داخل جسم الكائن الحي (George *et al*., 2005) ، اذ يستهدف هذا الأنزيم الطبقة الشحمية الموجودة بين الأدمة وتحت الأدمة مما يسمح باختراق البكتيريا لأنسجة الجسم ويصاحب الإصابة تكوين الخراجات (Todar, 2008) .

B – أنزيم Lecithinase

يعمل هذا الانزيم على تحطيم طبقة Lecithin في الغشاء الخلوي للمضيف ، وأن مصطلح Lecithinase يشير الى مجموعة غير متجانسة من الأنزيمات التي تشترك في تحطيم واحد أو اكثر من الروابط الأستيرية Aster linkge في الدهون المفسفرة الكليسريدية في الغشاء الخلوي (Ansell and Hawthrone, 2008) ، كما لوحظ ان بكتيريا *P. aeruginosa* تنتج أنزيم Licithinase في اثناء عملية الإصابة وبذلك تعطي مؤشرا بأن هذا الأنزيم من عوامل الأمراضية المهمة لدى هذه البكتيريا (Pier *et al*., 1992) .

C – إنزيمات البروتيز Protease

أن إنزيمات البروتيز الخارج خلوية لها أهمية خاصة بسبب الدور الذي تؤدية في اختراق الأنسجة ولها دور مهم في إمراضية البكتيريا (Clark, 2006) ، إذ توجد عدة أنواع من إنزيمات البروتيز ومنها أيلاستينيز (Elastase) والبروتيز (Protease) ويقوم هذان الأنزيمان بتحليل Elastin الموجود في جدران الأوعية الدموية مما يؤدي الى نضوح مكونات الدم السائلة مثل المصل والبلازما والتي تستغلها البكتيريا كعوامل نمو وتكاثر مما يساعد على آنتشارها داخل الجسم (Pichova *et al*., 2001) ، كذلك تعمل هذه الأنزيمات مع السم Exotoxin A المنتج من قبل بكتيريا *P. aeruginosa* على تلف أنسجة الرئة من خلال تحطيم مادتي Elastin و Collegen (Jawetz *et al*., 2010) .

D – أنزيم الكتاليز Catalase

يؤدي هذا الأنزيم دورا مهما في حماية الخلية البكتيرية من التأثير السمي لبيروكسيد الهيدروجين H2O2 الناتج من الفعاليات الأيضية للبكتيريا ، إذ يقوم بتكسير H2O2 الى ماء واوكسجين (Suh *et al*., 1999) .

2.3.2. الأمراض المتسببة عن بكتيريا *P. aeruginosa*

Diseases caused by *P. aeruginosa*

تسبب *P. aeruginosa* حالات مرضية مختلفة تكون موضعية ولا سيما بعد العمليات الجراحية وإصابات الحروق ثم تنتشر الإصابة وتسبب حالات تجرثم الدم المميت ،اذ أشارت الدراسات الى ان الأحياء المجهرية تنتهز الفرصة للتضاعف والاستعمار في منطقة الحرق المفتوحة نتيجة لتحطيم حاجـــز الجلد وتحول منطقة الحرق الى وسط غني ومناسب لنمو الجراثيم (Fournior and Philpott, 2005) و تزداد الإصابة بالخمج اعتمادا على عدة عوامل منها : طبيعة الحرق و العلاج و الحالة المناعية للمريض وطول بقاء الشخص المصاب في وحدة العناية المركزة . إنّ الإصابات الشديدة ببكتيريا *P. aeruginosa* تكون بسبب قدرتها على استعمار مواقع تشريحية مختلفة (بسبب امتلاكها آليات التصاق فعالة ومتطلبات تغذية قليلة ومقاومة للمضادات الحيوية) .

وتسبب بكتيريا *P. aeruginosa* عددا واسعا ومتنوعا من الاخماج في الأنسجة العميقة في الجسم (De Miguel Martinez *et al*., 2005) مثل اخماج القناة البولية Urinary tract infections وتزداد هذه الاخماج عند المرضى المصابين بالتهاب البروستات المزمن أو الحصى اذ يكونون أكثر حساسية للإصابة بالخمج من غيرهم (Gourlay and Gibran, 2005) .

كما تعد بكتيريا *P. aeruginosa* سببا مهما في أخماج الجهاز التنفسي المزمن المرتبطة بالتليف الكيسي Cystic fiberosis ، ويصاحب المرض إفراز مخاط لزج لا يمكن أزالته من الرئة مما يسبب خلل في وظيفة الجهاز التنفسي (Hoiby *et al*., 2001) ،كما تُسبب بكتيريا *P. aeruginosa* أخماجاً اخرى عديدة منها:، أخماج الجلد والأنسجة الرخوة وجروح ما بعد العمليات، أخماج العظام والمفاصل، أخماج الأذن والعين،إلتهاب الكلية المُزمن، تجرثُم الدم وأخماج جهازية مُتنوعة خصوصاً لدى المرضى الذين يعانون من حروق شديدة والمرضى الذين يعانون من نقص في الدفاعات الميكانيكية للجسم (Forbes *et al*., 1998) .

4.2 :الوبـــائية Epidemiology

تعد الوبائية من أهم الجوانب التي يجب الإحاطة بها ، ومعرفتها بشكل واف لما لذلك من أهمية للفرد والمجتمع ، ولغرض السيطرة على عوامل الانتشار ، وتصحيح المسارات التقنية في مواجـهة المـرض والوقـاية منه ، إذ تعيش بكتيريا *P. aeruginosa* في البيئات الرطبة وتستخدم مجموعة واسعة من المركبات العضوية للنمو ،مما يعطيها قدرة استثنائية لاستعمار بيئات مائية والتربة والأنسجة الحيوانية والنباتية حتى ولو توافرت المواد الغذائية بشكل محدود، و تعمـل هذه البكتيريا على اســتيطان

مناطق الجسم المختلفة مع تفضيل المناطق الرطبة كالأنف والمجاري التنفسية والأذن و يكون الانتشار منخفضاً جدا في الافراد الاصحاء ، وتزداد هذه النسبة لدى لأشخاص الراقدين في المستشفيات ومن أهم مصادر انتشار الأخماج هم المرضى المصابين بالتقرحات المخمجة واصابات الحروق (اذ يصل استعمار البكتيريا للجلد 80 % بحلول اليوم التاسع بعد الحرق) (Pirnay *et al*.,2003) ومن ثم تنتقل مباشرة إلى المرضى الآخرين عن طريق أيادي الأشخاص المرافقين و العاملين في المستشفى، وفي سنة (2003) قدمت مستشفى الولايات المتحدة تقريرا ذُكر فيه ان بكتيريا *P. aeruginosa* تعد مصدراً رئيساً للإصابات الشديدة للمرضى الذين يعانون الالتهاب الرئوي والتهاب المسالك البولية وهي الاكثر شيوعا بين بكتيريا السالبة لصبغة غرام المسببة لعدوى المستشفيات (Tam *et al*.,2007).

توجد بكتيريا *P. aeruginosa* في المحاليل المعقمة والمطهرات والصابون وهي قابله للتكيف الى حد كبير اذ تحتوي على جينوم كبير مكون من 6.26mbp مقارنة مع البكتيريا المعوية التي تحتوي على 4.64mbp وهذا ما يفسر طبيعتها التكيفية بما في ذلك القدرة على تطوير المقاومة ضد المضادات الحيوية (Jacoby and Bush, 2009).

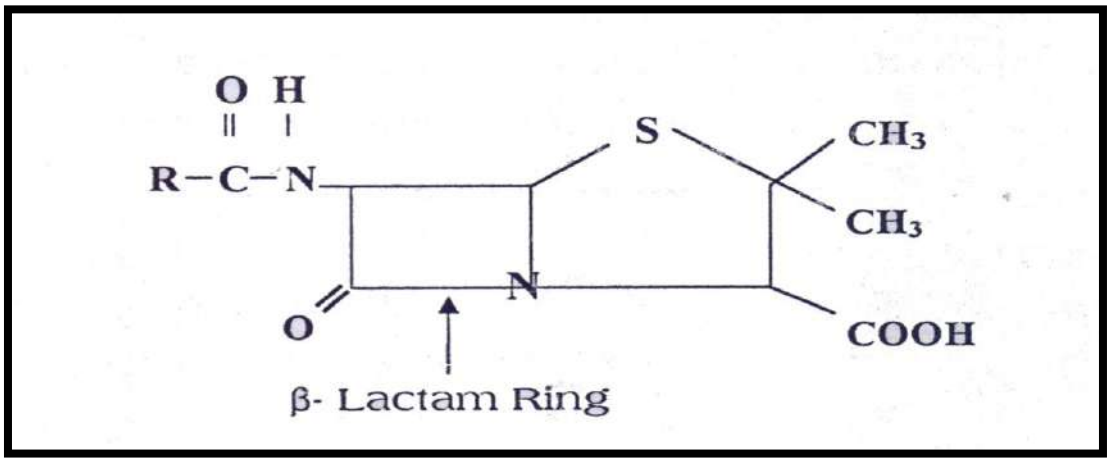
5.2 : مضادات البيتالاكتام ß-Lactam Antibiotics

تعرف المضادات الحيوية بأنها مركبات عضوية تنتج بوساطة أنواع معينة من الأحياء المجهرية، وهذه المركبات تستطيع بتراكيز قليلة أن تثبط نمو أو تقتل أحياءً مجهرية أخرى (Bradford, 2001).
عزلت مضادات البيتالاكتام من مصادر متعددة ولكنها عزلت وبشكل أساسي من البكتيريا والفطريات. في عام 1929 أُطلق اسم البنسلين Penicillin على أول مضاد تم اكتشافه من قبل العالم Alexander Fleming (Ibezim, 2005).

إنّ مضادات البيتالاكتام هي مجاميع كبيرة من المضادات الحيوية تشترك جميعها باحتوائها على حلقة بيتالاكتام ، وتضم أربع مجاميع رئيسة هي : البنسيلينات (Penicillins) والسيفالوسبورينات (Cephalosporins) والكاربابينيم (Carbapenims) والموناباكتام (Monobactam) وتختلف هذه المجاميع في طبيعة الحلقة الإضافية المتصلة بحلقة البيتالاكتام، ففي مجموعة البنسيلينات نجد أنّ الحلقة الإضافية هي (5- Thiozolidin)، وفي مجموعة السيفالوسبورين هي (6- Cephem)، إضافة إلى وجود حلقتين إضافيتين في مضادات الكاربابينيم. أمّا مجموعة مضادات المونوباكتام فتقتصر على حلقة البيتالاكتام فقط، كذلك فإنّنا نجد اختلافات بين المضادات العائدة للمجموعة نفسها الذي يكون سببه اختلافها في نوع السلسلة الجانبية المتصلة بحلقة البيتالاكتام.(Samaha- Kfoury Araj, 2003) .

1.5.2: البنسيلينات Pencillins

تمتاز هذه المضادات بكونها محدودة الطيف او ذات طيف فعالية ضيق (Narrow-spectrum)، فهي فعالة ضد المكورات الموجبة وبعض المكورات السالبة لصبغة غرام، إذ تعمل البنسيلينات على تثبيط بناء جدار الخلية البكتيرية من خلال ارتباطها مع البروتينات الرابطة للبنسيلين، القريبة إلى الغشاء السايتوبلازمي، وبذلك يحصل إغلاق للموقع الذي يتم عندها الارتباط العرضي للببتيدات المرتبطة أصلاً بمتعدد السكريد الدهني الذي يعطي جدار الخلية التركيب الصلب(Ryan and Ray ,2004; Kiffer *et al*., 2005. ويعد الكاربنسلين أفضل مثال عن البنسيلينات ، ويستعمل بشكل واسع، وتشترك البنسيلينات جميعها بالتركيب الأساس نفسه، وهو حامض البنسيلانك الأميني (6-aminopenicillanic acid) المتكون من حلقتين، الحلقة الأولى والرئيسة، وهي الحلقة الثابتة والمتكونة من خمس ذرات، وتدعى بحلقة الثايزولدين (Thiazolidin ring)، التي ترتبط مع حلقة البيتالاكتام غير الثابتة المتكونة من أربع ذرات،وتعتمد صفات البنسيلين على السلسلة الجانبية لذرة الكاربون رقم (6) التابعة لحلقة البيتالاكتام، وتختلف البنسيلينات باختلاف السلاسل الجانبية المرتبطة بهذه الذرة ويوضح الشكل (2-1) التركيب العام للبنسيلينات(Brooks *et al*., 1998; Samaha –Kfoury and Araj, 2003).

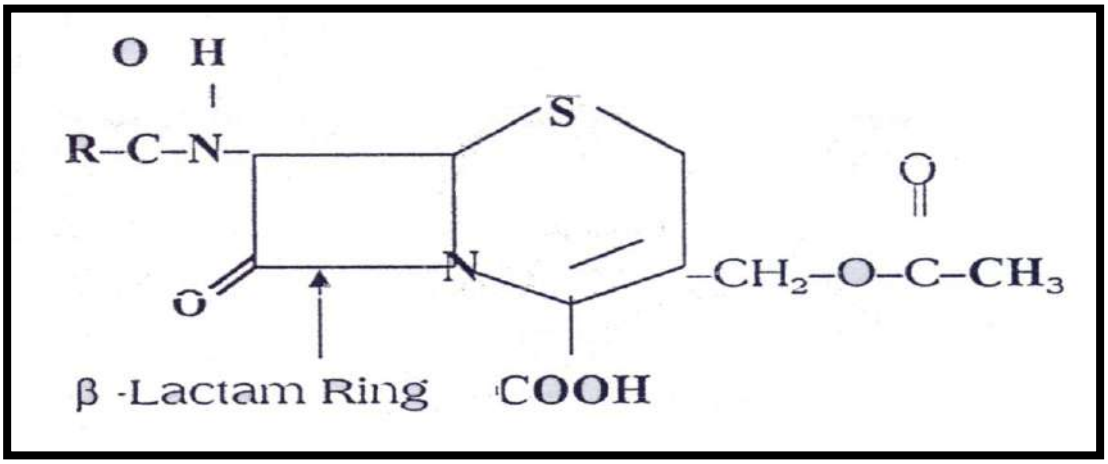


شكل(2-1) تركيب البنسيلين

2.5.2: السيفالوسبورينات Cephalosporins

تعدّ مضادات السيفالوسبورين مركبات قاتلة للبكتيريا ولها نمط العمل نفسه لمضادات البيتالاكتام الأخرى مثل البنسلين،و يحتوي مركب السيفالوسبورين على نواة (Amino-cephalosporanic-acid) الشكل (2-2) وتشتمل على نواة البيتالاكتام مندمجة مع حلقة دايهايدروثايازين (Dihydrothiazine)، وقد عُدّلت كثير من البدائل ذات الخصائص والصفات الدوائية المختلفة والجيدة من تلك المركبات، ويمكن أن تقسم مركبات السيفالوسبورين ًإلى مجموعتين،المجموعة الأولى الأوكسي أمينوسيفالوسبورين

(Oxyamino cephalosporin) ، والمجموعة الثانية هي الميثوكسي سيفالوسبورين (Methoxyce phalosporin) ومن الأمثلة على مجموعة الأوكسي أمينو سيفالوسبورين هي مضادات السيفوتاكسيم (**Cefotaxime**) وسيفترياكسون (**Ceftriaxone**) وسيفتازيديم (**Ceftazidime**)، أمّا مجموعة الميثوكسي سيفالوسبورين أو السيفاميسين (Cephamicine) مثل السيفوكسيتين (**Cefoxitin**)، وهي ذات صلة بالسيفالوسبورينات، ولكنها تمتلك (Oxacephem) بدلاًمن -7-aminocephalosporanic) acid) الموجود في الأوكسي أمينو سيفالوسبورين (Bush *et al.*, 1995; Yao and Moellering, 2003).



شكل (2-2) تركيب السيفالوسبورين (Henry *et al* ., 2001)

وصنفت مضادات السيفالوسبورينات الى خمسة اجيال مستندة على نشاطهم المضاد للبكتيريا (Livermore,2012)وهي:

1-الجيل الأول: First Generation

ويشمل السيفالوسبورينات ذات الطيف الضيق، مثل السيفالوثين(cephalothin), والسيفازولين (cephalexin)، وهذه المركبات لها نشاط بسيط نسبياً ضد البكتيريا السالبة لصبغة غرام، ولكن في الوقت نفسه نجد أنّ أنواعاً عديدة من بكتيريا *Escherechia coli* و *Klebsiella pnumoniae* تكون حساسة لهذه المضادات (Moya *et al*., 2010) .

2- الجيل الثاني : Second Generation

وهذه المركبات تكون مستقرة نوعا ما بوجود إنزيمات البيتالاكتاميز، وهذا يزيد من نشاطها ضد البكتيريا السالبة لصبغة غرام ومثال على هذه المجموعة من المضادات السيفوكستين(cefoxitin), والسيفوتيتان(cefotetan)(Samaha-Kfoury and Araj, 2003) .

3-الجيل ألثالث : Third Generation

تضم مجموعة المضادات الحيوية ذات نشاط أكثر من المضادات ذات الطيف الضيق ومستقرة بوجود إنزيمات البيتالاكتاميز، وقادرة على عبور الجدار الخارجي للبكتيريا السالبة لصبغة غرام، ومن هذه المضادات السيفترياكسون (ceftriaxone) والسفيكسيم (cefixime) السيفوتاكسيم(cefotaxime) والسيفتازيديم (Greer, 2006 ; Moya *et al*. 2010,) وتعدّ هذه المضادات الاكثر استعمالا ضد اخماج الجهاز التنفسي الشديد والإصابات المكتسبه من المستشفيات (Livermore, 2012) .

4-الجيل الرابع : Fourth Generation

مثل السيفيم (Cepheme) الذي طُوّر في سنة 1994، ويُظهر هذا المضاد زيادة في الإستقرارية، ليس فقط للإنزيمات التي تشفر لها الكروموسومات، بل حتى لبعض هذه الإنزيمات التي تكون جيناتها محمولة على البلازميدات (Yoa and Moellering, 2003; Kalai *et al*., 2005) وتعتبر ذات نشاط جيد ضد *P. aeruginosa* و*Enterobacteriaceae* (Livermore, 2012) .

5- الجيل الخامس: Fifth Generation

ويشمل السفتارولين (Ceftaroline) وهوسيفالوسبورين ذو طيف واسع وله نشاط بسيط جدا ضد بكتيريا الزوائف الزنجارية (Livermore, 2012) .

3. 5.2: مضادات المونوباكتام Monobactam Antibiotics

تمتاز مضادات المونوباكتام بامتلاكها حلقة بيتالاكتام مفردة وغير مرتبطة بحلقة أخرى، وتكون مضادات مونوباكتام ذات فعالية ضد العصيات السالبة لصبغة غرام، وفي الوقت نفسه غير فعالة ضد البكتيريا الموجبة لصبغة غرام والبكتيريا اللاهوائية، وأول عقار شاع استعماله من هذه المجموعة هو الأزتريونيم (Aztreonam) ;Samaha-Kfoury and Araj, 2003) (Livermore and Williams, 2002 .

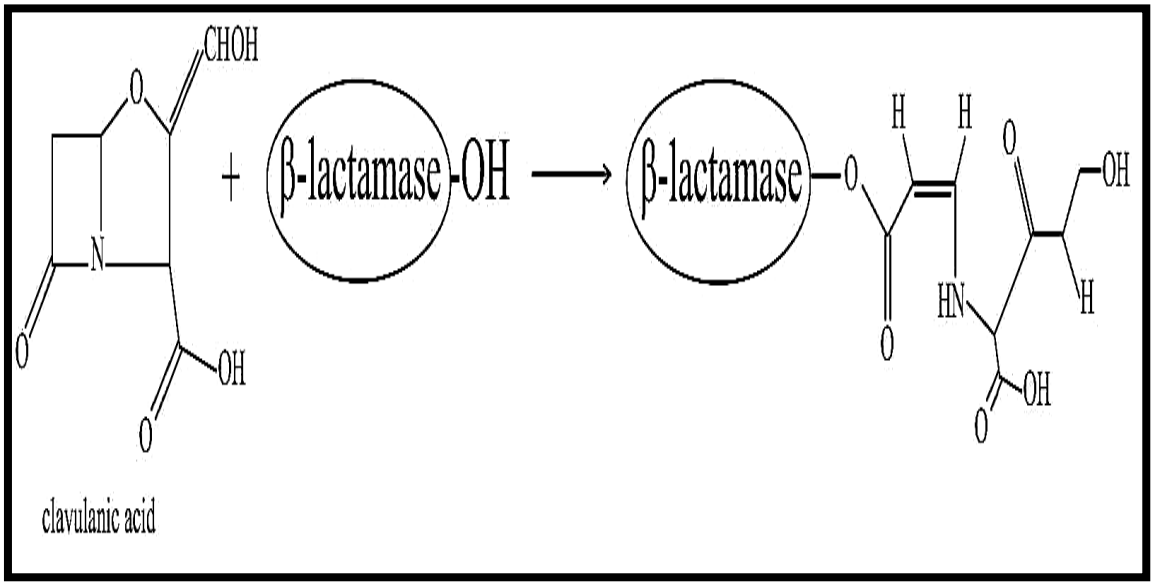
4.5.2 : مضادات الكاربابينيم Carbapenemes Antibiotics

تكون مضادات الكاربابينيم ذات تركيب مشابه تماماً للبنسيلينات، ولكن ذرّة الكبريت استُبدلت بذرة كاربون. وتتميز هذه المضادات بكونها تمتلك طيف فعالية واسع ضد البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام والبكتيريا اللاهوائية. ومن هذه مضادات الأميبينيم (Imipenem)والميروبينيم (Meropenem)،

ويُعدّ الأميبينيم هو أول عقار من مجموعة الكاربابينيم ذو الفعالية الجيدة ضد مجاميع البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام، وكذلك ضد البكتيريا اللاهوائية، فهو مركب مستقر جداً ولا يتأثر بالبيتالاكتاميز (Queenan and Bush, 2007;Jacoby and Bush, 2009).

2. 5.5 : مثبطات البيتالاكتاميز ß–Lactamases Inhibitors

صممت هذه المركبات لتثبيط فعالية إنزيمات البيتالاكتاميز أو تحطيمها ، وهي ذات فعالية ضعيفة ضد البروتينات الرابطة للبنسيلين التي تشترك في تخليق جدار الخلية البكتيرية، ولكن تزداد فعالية هذه المثبطات عندما تتحد مع أحد مضادات البيتالاكتام (Livermore, 2012). ويعتمد تأثير هذه المثبطات على تفاعلها مع إنزيمات البيتالاكتاميز مكونة معقداً يدعى أسيل – إنزيم بتفاعل غير عكسي، الأمر الذي يؤدي إلى فقدان الإنزيم لفعاليته شكل (1-3)، وتقسم مثبطات البيتالاكتاميز إلى مجموعتين، الأولى تضم حامض الكلافولانك (Clavulanic acid)، والمجموعة الثانية تضم حامض البنسيلانك سلفونيز (Penicillanic acid sulfonase)، (Moya *et al*., 2010) .

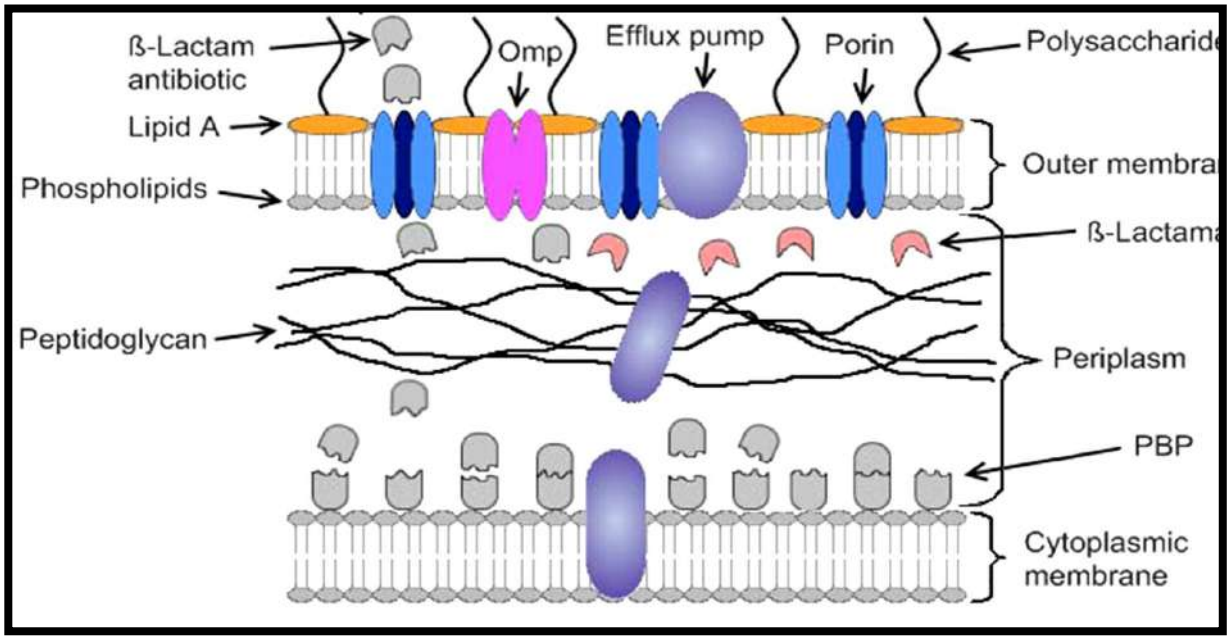


شكل (1-3): آلية تأثير مثبطات إنزيمات البيتالاكتاميز(Livermor, 2006)

يؤثر حامض الكلافولانك وبالتآزر مع البنسيلينات والسيفالوسبورينات في البكتيريا المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز، وكذلك مجموعة حامض البنسيلانك سلفونيز، مثل السلباكتام (sulbactam)والتازوباكتام (tazobactam)، فهي مركبات ترتبط هيكلياً بالمضاد الحيوي. مثلا السلباكتام يتحد مع الأمبيسيلين، بينما التازوباكتام يتحد مع الببراسيلين لتشكل علاجاً أكثر فعالية ضد الإنزيمات المحللة البيتالاكتام (Jacoby and Bush, 2005).

6. 2 : ميكانيكية مضادات البيتالاكتام Mechanesim of ß-Lactams

تستهدف مضادات البيتالاكتام إنزيمات الترانسبتايديز التي تشترك في تصنيع جدار الخلية البكتيرية وتؤثر على استقراريها (Bradford,2001). والشكل (2-4)يوضح هذه الميكانيكية إذ إنّ مضادات البيتالاكتام تعمل على تثبيط فعالية بيبتايدوگلايكان ترانسبيبتايديز التي يطلق عليها البروتينات الرابطة للبنسيلين (PBP) .



شكل (2-4) تركيب جدار خلية سالبة لصبغة غرام وآلية تأثير مضادات بيتالاكتام (Livermore *et al* , 2006)

البروتينات الرابطة للبنسيلينات هي إنزيمات تتموضع في الطبقة الخارجية للغشاء السايتوبلازمي للبكتيريا، وتحفز الخطوات النهائية لتخليق البيتايدوگلايكان الذي يشكل المكوّن الأكبر في جدار الخلية البكتيرية. وفي حالة وجود المضاد الحيوي فسوف ترتبط إنزيمات الترانسبتايدز معه ارتباطاً تساهمياً قاتلاً للبكتيريا، ذلك بسب تكون معقد يدعى (Peniciloyl-enzyme) الذي يعمل على غلق التفاعل الطبيعي لهذه الإنزيمات، ومن ثم تثبيط عملية البلمرة (Polymerization). الأمر الذي يضعف الإرتباط التآصري لطبقة البيتايدوگلايكان ويجعل البكتيريا ذات حساسية عالية للتحلل والموت (Ryan and Ray, 2004). إنّ من الصفات المرغوبة لهذه المضادات سهولة وصولها إلى منطقة الهدف المتمثل بإنزيمات الترانسبتايدز الموجودة في الطبقة الخارجية للغشاء السايتوبلازمي وخصوصيتها ضد البكتيريا (Walther-Rasmussen and Hoiby, 2004).

7.2: مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية :

Rsestance of *P. aeruginosa* to Antibiotics

تعد بكتيريا***P. aeruginosa*** مسبباً مرضيّاً مشهوراً بقدرته على مقاومة كثير من مجاميع المضادات الحيوية شائعة الاستعمال حالياً (Jacoby and Bush, 2009)، إذ إنّ الوجود الطبيعي للبكتيريا في التربة مع عصيات Actinomycetes و الأعفان (المنتجة طبيعياً للمضادات)، جعل البكتيريا تطور مقاومة طبيعية لعدد من مضادات الحياة عن طريق انتقال بلازميد المقاومة (R-factor) الموجود أصلاً في الكائنات المنتجة للمضادات إلى البكتيريا المحيطة (Jones and Pfaller, 2002; Flamm *et al*., 2004)لذلك فهي تمتلك حساسية قليلة ومقاومة عالية اضافة الى قدرتها على اكتساب مقاومة تكيفيه تجاه معظم مضادات الحياة المستعملة في اثناء مدة العلاج الطبي (Bukharie and Mowafi, 2010).

وقد أظهرت بيانات أنظمة المراقبة العامة للعدوى المكتسبة زيادة مستمرة في مقاومة بكتيريا *Ps aeruginosa* في وحدة العناية المركزة للجيل الثالث للسيفالوسبورينات والكوينولونات والكاربابنيم، بمقارنة معدلاتها للعام 2002 ومتوسط معدلات المقاومة للسنوات الخمس السابقة، كما أظهرت منظمة كورية مراقبة أخرى ,وأجرت برنامجاً لهذه المشكلة بين السنوات 2003-1998ووجدت أنّ مدى ظهور بكتيريا *P. aeruginosa* متعددة المقاومة للمضادات أرتفع إلى (30%) والنسبة ترتفع في 2004 وقد وضعت بالمرتبة الثالثة بين البكتيريا المكتسبة من المستشفيات (Lee *et al*.,2005) و بين Strateva واخرون (2009) ان بكتيريا *P. aeruginosa* مسؤولة عن 10-15 % من الاصابات المكتسبة بالمستشفيات عالميا واغلب الاحيان تجد الكوادر الطبية صعوبة في معالجة هذه الاصابات بسبب امتلاكها الكثير من الآليات لمقاومة مضادات الحياة (Thomas, 2007). ومن هذه الآليات :

1.7.2: انخفاض النفاذية في الغشاء الخارجي

Low Permeability of Outer Membrane

يغلف سطح البكتيريا السالبة لصبغة غرام غشاء خارجي يمنع ويعيق كثيراً من المركبات السامة الموجودة في المحيط الخارجي من الدخول إلى الخلية، وبما أنّ على البكتيريا أنّ تتبادل الجزيئات مع البيئة الخارجية، لذا نجد أنّ الغشاء الخارجي يحتوي على ثغور بروتينية خاصة تعرف بـ Porins مسؤولة عن هذه العملية، وتكون هذه الثغور على شكل قنوات مملوءة بالماء، وهي تشارك بصورة غير متخصصة في التبادل غير الفعال للأيونات والجزيئات المحبة للماء (Yildirim *et al*., 2005).

تقسم الثغور الى صنفين هما:

- الصنف الأول: ثلاثية البروتين الكلاسيكية وتشمل: OmpF وOmpC في بكتيريا *E. coli* وOprD في بكتيريا *P. aeruginosa* وتمتلك هذه الثغور خاصية نفاذية عالية جداً(Yildirim *et al*., 2005).
- الصنف الثاني: الثغور أحادية البروتين التي تمتلك نفاذية أقل بكثير من الأولى، ومثالها OmpA في بكتيريا *E. coli*.(Woodford *et al*., 2007) وكذلك OprF في بكتيريا *P. aeruginosa* إذ يشكل البروتين OprF الثغر الرئيس في بكتيريا *P. aeruginosa* الذي يكون قنوات ثنائية أو ثلاثية السكريد عبر الغشاء الخارجي لهذه البكتيريا(Zhang *et al*., 2005)، وبالتالي فإنّ OprF له أثراً كبيراً في تحديد الغشاء الخارجي وتركيب الخلية، وعلى الرغم من كون OprF هو بورين، الا أنّ تركيبه مختلف تماماً عن غالبية الثغور البكتيرية، وبالإضافة إلى ذلك فإنّ التحور الحاصل في بروتينات الغشاء الخارجي يؤدي دورٌاً كبيرٌاً في منع مرور بعض مضادات الحياة، فعلى سبيل المثال ارتبطت مقاومة المضاد الحيوي الامبينيم بفقدان البروتين D2، وهو أحد البروتينات المسؤولة عن تكوين الثغور ، ومن ثم القنوات الناقلة لمضادات الحياة من المحيط الخارجي إلى داخل الخلية (Yildirim *et al*., 2005) ، وفي دراسة أخرى وُجد أنّ هنالك علاقة ما بين فقدان أو انخفاض التعبير عن بروتين الغشاء الخارجي OprD في غشاء بكتيريا *P. aeruginosa* وزيادة مقاومتها لمضادالكاربابنيم (Pai *et al*., 2001). إذ إنّ فقدان هذا البروتين يسهم في مقاومة البكتيريا للمضاد الاميبنيم، وكذلك يسهم ولكن بمستوى أقل في مقاومة المضاد الميروبنيم (Livermore, *et* ; Kohler *et al*., 1999; Saderi *et al*., 2008 1992). أمّا OprM فهو عبارة عن بروتين دهني مرتبط بالغشاء الخارجي لبكتيريا *P. aeruginosa* ، وهو الذي يتولى تكوين مسار انتشار المركبات المختلفة خلال الغشاء الخارجي (Nikaido, 1996 ;Nakajima *et al*., 2000) إضافة إلى ذلك تمتاز *P. aeruginosa* بامتلاكها غشاءاً خارجياً ذا نفاذية أوطأ (10-100) مرة من بقية أنواع البكتيريا السالبة لصبغة غرام الأخرى مثل *E.coli*، وهذه الميزة الفريدة في غشاء هذه البكتيريا تبطيء انتشار المضادات الحيوية من خلاله وبدرجة كبيرة جداً (Cavallo *et al*., 2002) .

2.7.2: مضخات الدفق Efflux-Pump

بكتيريا *P. aeruginosa* ذات مقاومة متعددة لمضادات الحياة تعود غالباً لنفاذية غشائها المنخفضة، ولوظيفة مضخات الدفق الخارجي متعددة العقاقير(Multi Drugs Efflux Pumps) (Nakae *et al*., 1997). يستهدف هذا النوع من المقاومة طريق الوصول الى الموقع الهدف (Target site) للمضاد الحيوي من خلال طرحه خارج الخلية (Mims *et al*., 2004)، اذ تكمن الية عمل هذه

الانظمة من خلال قذف المضاد الحيوي خارج الخلية البكتيرية بعد احتجازه من قبل اغشية بروتينية خاصة يساعدها في ذلك الغشاء الداخلي وفسحة الفراغ المحيطي (Alekshun and levy, 1997; Ziha-Zarifi *et al*., 1999; Masuda *et al*., 2000; Lambert *et al*., 2001) في بعض البكتيريا وخصوصا الـ*P. aeruginosa* يوجد هناك نظام دفق فعال يخفض تراكم المضاد الحيوي داخل الخلية البكتيرية ويسمح لانزيم ذي قابلية تحليلية محدودة على تثبيط المضاد قبل الوصول الى هدفهِ. إنّ أنظمة الضخ هذه تمتلك تخصص لأنواع مختلفة من المادة الأساس، وقد تم عزل الكثير من مضخات الدفق من العينات السريرية، إذ إنّ وجود هذه المضخات إمّا أن يكون جوهرياً أصيلاً أو بالإنتاج الفائق المتسبب عن الطفرات الوراثية (Nakajima, 2000 ;Wang *et al*., 2007) .

3.7.2: تقليل إلفة المضاد الحيوي لاستهداف البروتينات الرابطة للبنسيلين

Decreased Affinity of antibiotics to Targt Penicillin Binding Protins (PBPs)

إنّ مكونات جدار الخلية البكتيرية تمثل أهدافاً إنتقائية ممتازة لمضادات البيتالاكتام، ولكنّ ظهور طفرات وراثية في إنزيمات PBPs ممكن أن ينتج عنه تقليل الإلفة تجاه المضاد الحيوي، إضافة إلى أنّ آلية المقاومة هذه تكون مرتفعة في أعداد مهمة سريرياً من البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام (Livermore, 2002) مكّنت هذه الآلية البكتيريا من تطوير مقاومتها لعدة أنواع من مضادات الحياة، إذ إنّ حدوث طفرة جينية مفردة يمكن أن يؤدي إلى تغيير موقع الهدف بصورة كاملة، ومن ثم تنخفض إلفة المضاد لهذا الموقع. إنّ التغير الكبير في سلالات *P. aeruginosa* الطافرة، والناتج عن حصول خلل أو عيب في جين معين، تكون نسبته أعلى 100 مرة من التغير التلقائي، وهذا يؤدي إلى سهولة توليد نسخ بمستويات متزايدة من المقاومة لمختلف المضادات الحيوية، وهذه التغيرات ممكن أن تعطل عدداً كبيراً من الجينات التنظيمية المسيطرة على وظيفة نفاذية الغشاء ومضخات الدفق (Livermore and Woodford, 2006).

4.7.2: تكوين الغشاء الحيوي Formation of biofilm

تلجأ بكتيريا *P. aeruginosa* الى تكوين الغشاء الحيوي الذي هو عبارة عن تجمع لخلايا البكتيريا التي تكون مغطاة بغلاف يسمى Alginate والمتكون أصلا من عديد السكريد الذي يساعد البكتيريا على الالتصاق على السطوح ويحافظ عليها من تقلبات العوامل البيئية كالمضادات الحيوية أو المعالجة الفيزيائية وبهذا يكون بمثابة مقاومة تظهرها البكتيريا لهذه العوامل (Cornelis, 2008) .

5.7.2: إنتاج أنزيمات البيتالاكتاميز Enzymes β-lactamases production

تنتج معظم البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام هذا النوع من الأنزيمات لأنهاء فعالية مضادات البيتالاكتام (Sacha *et al.*, 2008) وتكون خارج خلويه في البكتيريا الموجبة لصبغة غرام و تكون في منطقة البلازم المحيطي لبكتيريا السالبة لصبغة غرام (Livermor ,*et al* , 2006). إنّ إنتاج هذه الإنزيمات إمّا أن يكون محفزاً (Inducible)، أو كامناً (Constitutive)، إذ إنّ الإنزيمات المحفزة تنتج فقط عند تعرض البكتيريا للمضادات الحيوية، ويتوقف إنتاجها بمجرد توقف تعرضه للمضاد. أمّا الإنزيمات الكامنة أو الذاتية المقاومة فهي إنزيمات مشفرة على الكروموسومات تنتقل بين السلالات وتنتج عند توافر المحفز أو عدم توافرها(Livermore, 2011) . وقد أمكن التعرف على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز من تتبع الأثر الوبائي لبكتيريا *P. aeruginosa* والاستعمال السريري لمضادات البيتالاكتام تبعه تطور في آليات إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز من قبل البكتيريا وفي السنوات الأخيرة وصفت اكثر من 250 نوعا منها (Hsueh and Luh, 2005). وتُعدّ هذه الآلية من آليات المقاومة المهمة لدى سلالات *P. aeruginosa* إذ تم اكتشاف وجود هذه الإنزيمات بشكل متزايد يوماً بعد آخر (Jacoy and Bush, 2009). كذلك فإنّ هذه الإنزيمات أصبحت شائعة جداً لقابليتها على الانتقال إلى بقية البكتيريا السالبة لصبغة غرام بوساطة عملية الاقتران (Conjugation)، كما تمتلك كثيراً من البكتيريا السالبة لصبغة غرام تواجداً طبيعياً لإنزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية تتضمن دفاع البكتيريا ضد مضادات البيتالاكتام التي تنتجها الفطريات في الطبيعة (Livermor and Wood Ford,*et al* 2006).

8.2:آلية عمل إنزيمات البيتالاكتاميز

Mechanisim of ß- Lactamases Action

تمتلك الكثير من المضادات الحيوية أواصر كيمياوية حساسة لها قابلية على التحلل المائي، مثل أواصر الأستر والأمايد وقد وجدت العديد من الإنزيمات التي لها القابلية على استهداف هذه الأواصر وكسرها وتحليلها ، ومنها إنزيمات البيتالاكتاميزاذ تحلل هذه الإنزيمات المضادات الحيوية من نوع البيتالاكتام بفتح حلقة البيتالاكتام منتجة حامض البنسيلويك (Penicilloic –acid) أوحامض السيفالوسبوريك (Cefalosporic - acid) وهذه المركبات غير فعالة ضد البكتيريا وعندها تنشأ المقاومة (Woodford, 2007). وتُعد هذه الإنزيمات من أهم أسباب المقاومة التي تبديها البكتيريا لمضادات البيتالاكتام، وتفرز في البكتيريا السالبة لصبغة غرام في منطقة البلازم المحيطي Priplasmic space))إذ ترتبط بالمضاد الحيوي داخل الخلية وقبل أن يصل إلى مواقع تأثيره، أمّا في البكتيريا الموجبة لصبغة غرام فتقوم بإفراز هذه الإنزيمات إلى خارج الخلية البكتيرية (Garau *et al*., 2004)،

وفي دراسة أعدها Walley وجماعته 1992 تضمنت آلية عمل إنزيمات البيتالاكتاميز،وجد ان هناك آليتين لعملهما الاولى تعتمد على بقية السيرين (Serine resedio) المرتبط في الموقع الفعال للإنزيم، وذلك من خلال ارتباطه بالمضاد الحيوي ارتباطاً غير تساهمياً لإنتاج معقد يهاجم حلقة البيتالاكتام من الطرف الهيدروكسيلي الحر على جانب السيرين المرتبط في الموقع الفعال للإنزيم، وعند فتح حلقة البيتالاكتام تتكون أواصر تساهمية لتكوين أسيل- أستر (Acyle estar)، ومن ثم حصول عملية التحلل المائي للأسيل- أستر متضمناً تحرير الإنزيم الفعال وتاركاً المضاد الحيوي بالشكل غير الفعال، ومن ثم تحصل عملية التحلل المائي للمضاد الحيوي.

والآلية الثانية، وهي أقل شيوعاً من الآلية الأولى، وكما اقترحها Page (2002) إذ تشمل مجموعة إنزيمات يطلق عليها إنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية (MßLs) التابعة للصنف (B) بحسب تصنيف أمبلر، والتي تتضمن نقل أيون الزنك (ZN^{+2}) المعدني الذي يرتبط مع الهستدين (Histidin) أو السستين (Cystine) المرتبط أصلاً مع الإنزيم، فهو يتفاعل مع مجموعة الكاربونيل للآصرة الأميدية لكل من البنسيلينات أو السيفالوسبورينات.

9.2: تصنيف إنزيمات البيتالاكتاميز Classification of ß-Lactamases

صنفت إنزيمات البيتالاكتاميز اعتمادا على الخاصيتين الجزيئية والوظيفية فالتصنيف الاول يطلق عليه الية تصنيف أمبلر الجزيئية سنة1982 (Ambler molecular classification scheme)، والمستند على التركيب الجزيئي لهذ الانزيمات معتمدا على تتابعات الاحماض الأمينية ويشمل اربعة اصناف جزيئية هي A,C,D وهي انزيمات السيرين (Serine β-lactamases) والصنف B الذي يمثل الانزيمات المعدنية التي تمتلك متبق الحامض الاميني السيرين(Serine residue) في الموقع الفعال للانزيم وتعتمد على ايون الزنك ثنائي الشحنة (ZN^{2+}) بوصفه عاملاً مساعداً لفعاليته الأنزيمية (Jacoby and Bush, 2009). اما التصنيف الوظيفي الذي وضعه Bush وجماعته سنة (1995) والذي يعدّ اكثر شمولا معتمدا في تصنيف الانزيمات على خصائصها الوظيفية والكيموحيوية مثل نوع المادة الاساس التي يؤثر عليها الانزيم ، او صورته التثبيطية او شحنة الانزيم النهائية او نسبة التحلل المائي وغيرها ويشمل اربع مجاميع رئيسة اعطيت ارقاما (1,2,3,4,Group) وتعدّ المجموعة الثانية اكبر المجاميع اذ انها تضم مجموعات فرعية هي (2a,2d,2be,2br,2c,2d,2e,2f) (Jacoby and Bush, 2009) ، وبالرغم من كون هذه الآلية أكثر الأليات المتوافرة شمولاً إلا أنه لا توجد آلية أو تصنيف وظيفي يكونُ مُرضياً بشكل كامل، لأن أنزيمات البيتا-لاكتاميز تظهر قدراً كبيراً من التنوع في عدد استبدالات الأحماض الأمينية التي يمكن ان تتحملها، لذا كلما كانت المعلومات المتوفرة حول أنزيم ما أكثر وأشمل كلما كانت عملية تصنيفه أسهل (Bush *et al.*,1995) .

1.9.2: انزيمات السيرين بيتالاكتاميز Serine ß –Lactamases

1. 1.9.2: انزيمات بيتا لاكتاميز صنف A ß-Lactamases Class A

بحسب تصنيف Ambler ان انزيمات الصنف (A) كعائلة مهمة تمتاز بوجود السيرين في الموقع الفعال (70) ووجود اواصر الكبريتيت بسبب Cys69 وCys238 و هذه الانزيمات كلها قادرة على تحليل البنسلينات والجيل الاول للسيفالوسبورينات والمونوباكتام (Rawat and Nair 2010) وهذه الانزيمات تثبط بوساطة clavulanic acid والتازوباكتام ولكن ليس ملح EDTA ،من هذه الانزيمات TEM و SHV وCTX-M ، العديد من سلالات *P. aeruginosa* تنتج فئة مختلفة من انزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف والتي تمكن هذه البكتيريا من مقاومة الطيف الواسع للسيفالوسبورينات مثل السيفوتاكسيم ، سيفترياكسون ، والسيفتازيديم (Hagen *et al.*, 2003; Poole, 2011) وتحمل انزيمات الصنف A بوساطة البلازميدات مثل انزيمات PER التي وصفت في سلالات *P. aeruginosa* (Kiratisin *et al.*, 2008) . وانزيم VEB-1 الذي يعود الى الصنف A يحمل على بلازميد في البكتيريا المعوية ولكن وجد انه يحمل على كروموسوم في كل بكتيريا*P. aeruginosa* و *Acinetobacter baumannii* (Poirel *et al.*, 2010b) اما انزيمات الكاربنمييز ذات منشأ بلازميدي ومنها (KPC, GES) اذ كانت GES تعدّ اصلا من انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ولكن الان صنفت ضمن السيرين كاربينميز (Kurokawa *et al.*,2003; Radice *et al.*,2004) .

2.1.9.2: انزيمات البيتالاكتاميز صنف D ß-Lactamase Class D

أول صفة مميزة للصنف D بيتالاكتاميز هي وجود انزيم اوكساسلينز (oxacillinase) ويرمز له OXA وهو شديد الفعالية ضد isoxazolylpenicillins, oxacillin و cloxacillin فهو يحلل هذه المضادات بمقدار مرتين الى أربع مرات أسرع من البنسلين مثل بنسلين G (Sun *et al.*, 2003)، كذلك فان انزيمات الصنف D البيتالاكتاميز على عكس انزيمات A ,C لا يتم تثبيطها بحامض الكلافونك ومثبطات البيتالاكتاميز الاخرى لذلك فان هنالك مشكلة سريرية رئيسة مع هذه الانزيمات .

تعود هذه الانزيمات طبقا لتصنيف Ambler الى الصنف الجزيئي D والى المجموعة الوظيفة 2d (Woodford *et al.*, 2000; Bush *et al.*, 1995) . تم اكتشاف معظم انواع انزيمات الـOXA في العزلات السريرية لبكتيريا *P.aeruginosa* اذ اكتشفت لاول مرة في فرنسا وتركيا ووثقت هذه الانزيمات على انها المسؤولة عن المقاومة لمضادات البيتالاكتام . (Hall *etal.*, 1993; Naas *etal.*, 1998; Mugnier *etal.*,1998; Danel *etal.*, 1999; Bou *etal.*, 2000; Woodford *etal.*,

(2000 . ولكن بعض منها قد تم الحصول عليها من البكتيريا السالبة لصبغة غرام ومثال على ذلك *Salmonella typhimurium* و *Acinetobacter baumannii* (Sun et al., 2003) .

تختلف انزيمات الصنف D البيتالاكتاميز عن صنف A بحلول سلسلة جانبية carboxylated lysine (Golemi *et al*., 2001) ،و تمتلك انزيمات الصنف D البيتالاكتاميز ثلاث مواقع فعالة ذات ثبوتية عالية الموقع الاول Ser67-X-X-Lys اذ يمثل X بقية السيرين المرتبط بالموقع الفعال، اما الموقع الثاني Ser115-X-Val/Ile وهو ما يعادل Ser-Asp-Asn الموجود في الصنف A البيتالاكتاميز و Tyr-Ala/Ser-Asnفي الصنف C بيتالاكتاميز والموقع الثالث الفعال Trp232-X-X-Gly ، ان هذه المواقع الفعالة التي ذكرناها ليس لها نظائر في غيرها من اصناف انزيمات البيتالاكتاميز-(Walther Rasmussen and Høiby, 2007) .،وتعتمد الية عمل انزيمات الصنف D البيتالاكتاميزعلى تحطيم مضادات البيتالاكتام باستعمال الية استر السيرين (Serine ester mechanism) الموضحة في الشكل (2-3)، اذ يرتبط الأنزيم أولاً بشكل لا تساهمي مع المضاد لينتج معقداً لا تساهمياً، وعندها تهاجَم حلقة البيتا-لاكتام من قبل الهيدروكسيل الحر على السلسلة الجانبية للسيرين في الموقع الفعال للأنزيم لينتج أستر أسيلي تساهمي (Covalent acyl ester)، يتم بعد ذلك إضافة جزيئة ماء ليحدث التحلل المائي للأستر محرراً في النهاية الأنزيم الفعال والمضاد المحلل مائياً بصورته غير الفعالة اذ يتبقى جزئيين من اللاسين لبناء الموقع الفعال من جديد .اللايسين في الموقع الفعال لانزيمات الصنف D البيتالاكتاميزوالمتمثل Lys Ser67 X- X- يعادل بوساطة غاز ثاني أوكسيد الكاربون وذلك للحفاظ على درجة الحموضة(pH)و توفير النشاط الكامل للانزيم (Sun *et al*., 2003) . وقد وجد ان انزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز تمتلك قدراً كبيراً من التغايرات في تسلسل الحوامض الأمينية(Pai *et al*., 2001a) . اذ يوجد أكثر من 239 تسلسلاً مختلفاً لإنزيمات الاوكساسلينيز ، تسعة منها سُجلت على أنّها إنزيمات بيتالاكتاميز واسعة الطيف، كما سُجل سبعة وثلاثون منها إنزيمات كاربابينيميز ,Walther-Rasmussen and Hoiby) (2004. ان وجود انزيمات OXA بيتالاكتاميز بنطاق واسع ادى الى تصنيف هذه الانزيمات الى خمس مجاميع (Bert *et al* . ,2002) وهي :

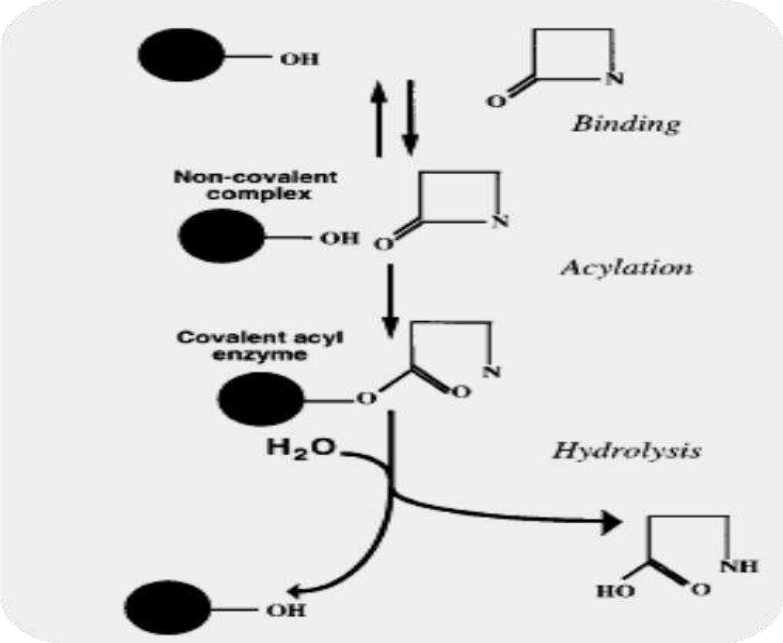
- OXA group I وتتضمن كل من OXA -5 ؛ OXA -7 ؛ OXA -10 و يشتق منه : (OXA -11، OXA -14 ، OXA -16 ، OXA -17، OXA -74) ؛ OXA -13 و يشتق منه ايضا : (OXA -19)، (OXA -28) (Mugnier, *et al* ., 1998 ; Danel *et al*., 1999; Poirel, *et al* 2001a).
- OXAgroup II وتتضمن كل من OXA -2 ؛ OXA -3 ؛ OXA -15 ؛ OXA -20 (Naas *et al*. , 1998).

- انزيمات OXAgroup III بما في ذلك OXA -1، OXA -4 ، OXA -30 ، OXA -31 (Sanschagrin *et al.* , 1995).
- وتحدد OXA group IV بوساطة انزيم واحد فقط OXA -9 (Sanschagrin *et al.* , 1995) .
- واخيرا OXAgroup V تحتوي على انزيم LCR -1 فقط . وبالإضافة إلى ذلك ،فأن انزيم OXA -18 لا ينتمي إلى أي من هذه االمجاميع التي ذكرت وعلى الرغم من ان انزيمات الـOXA تميزت بفقدانها للتثبيط بحامض الكلافولانك فقد اشارت احدى الدراسات الى ان الانزيم OXA-18 يثبط بهذا المركب (Philippon *et al*., 1997) .

ان البعض من انواع OXA-β-lactamase تشفر كروموسوميا وظهر هذا في بعض العوامل الوراثية البكتيرية مثل تلك الموجودة في *Aeromonas* .spp، *P.aeruginosa* (Giuliani *et al*., 2005) ، والبعض الاخر من هذه الانزيمات تشفر بلازميديا (Naas *et al*, 1999)) هذه الانزيمات المشفره بلازميديا سجلت في بعض الانواع الممرضة للعائلة المعوية و*P.aeruginosa* (Crowley *et al*., 2002) ، وقد وجد الجزء الاكبر من انزيمات الـOXA قادر على مقاومة السيفا لوسبورينات والكاربينيم ومثال على ذلك OXA-2 ، وهو اول صنف تم اكتشافه عائد الى الصنف D البيتالاكتاميز(Dale *et al*., 1985)،واتضح ان انزيمات OXA-2 تمنح مقاومة ضعيفة ضد (Oxyimiocephalosprins)في العائلة المعوية ولكن تمنح مقاومة ذات مستوى عالي في بكتيريا *P. aeruginosa* ضد المركب المذكور(Hall *et al*.,. 1993). و اثبتت دراسات اخرى ان انزيم - OXA 10 من انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وان عدداً من انزيمات البتالاكتاميز واسعة الطيف نوع OXA اشتقت من انزيم OXA-10 وتختلف هذه الانواع فيما بينها باختلاف عدد الاحماض الامينية و تتابعها وتنشا المتغيرات عند حدوث استبدال أو اضافة في واحد من هذه الاحماض الامينية ، وبالتالي تتغير خصوصية المادة الاساس للانزيم (Paetzel *et al*., 2000) ، وتختلف عدد الاحماض الامينية المتغايرة لهذه الانزيمات اذ تنحصر من حامض اميني واحد في OXA -14 ،وأثنان من الاحماض الامينية في OXA-11 ،اما OXA-13 فيختلف بحلول تسعة احماض امينية (Sun *et al*., 2003) .

وقد تبين أن المقدار الاكبر من انزيمات OXA البيتالاكتاميز تمنح مقاومة للسيفتازيديم وبالإ ضافة الى ذلك فأن OXA-10 بيتالاكتاميز تمنح مقاومة ضد السيفوتاكسيم، السيفترياكسون باستثناء - OXA 17 المشتق من OXA-10 فتكون مقاومة ضعيفة للسفتازيديم (Fatma *et al*., 2012) . وفي سنة 1993 إكتُشفت مجموعة من إنزيمات الكاربابينيمز تعود إلى الصنف D بحسب تصنيف Ambler عادة تشفر على كروموسوم والعديد منها واسعة الانتشار في بكتيريا *P. aeruginosa* وقد وجدت هذه

الانزيمات لأول مرة في بكتيريا سلالات *A. baumannii* في اسكتلندا عام 1985 اصلا كان يسمى ARI-1اذ يهاجم الـ(Oxyimino-cephalosporins) ويمتاز بفعاليته التحليلية العالية للـ (Oxacillin)، والـ (Cloxacillin)(Costa *et al.*,2003; Walsh, 2008) .



لشكل (2-3): الية استر السيرين المستعملة من قبل انزيمات OXA البيتالاكتاميز في تحطيم حلقة البيتالاكتام (Waley, 1992) .

3.1.9.2:انزيمات البيتالاكتاميز الصنف C Class C ß-Lactamases Enzymes

تنتمي لهذه االمجموعة إنزيمات AmpC البيتالاكتاميز وهي مجموعة مهمه من الانزيمات واسعة الانتشار تمتلك موقع السيرين الفعال (Active-seren-sit) ولها قابلية على مقاومة مجاميع مضادات البيتالاكتام نوع (Oxyimino)ولا تتأثر بمثبطات البيتالاكتاميز (7-α-methoxy- cephalosporin) مثل الكلافولانيت والسالباكتام والتازوباكتام(Jacoby and Bush., 2009).

إنّ البكتيريا التي تمتلك هذه الإنزيمات تكون غير مقاومة للجيل الثالث من السيفالوسبورينات، ما لم يكن التعبير الجيني لإنزيمات AmpC بمستويات عالية، وهذه الإنزيمات تكون على نوعين، إمّا ذات منشأ كروموسومي اوبلازميدي ، ففي كثير من الأنواع البكتيرية نجد أنّ إنزيمات AmpC المحفزة تنتج بشكل طبيعي، ولكن بمستويات منخفضة جداً، ولكنها نوعياً تتحفز بشكل كبير جداً بوجود أحد مضادات البيتالاكتام، ومنها السيفوتاكسيم والسيفوكسيتين(Arora and Bal, 2005). وقد أظهرت بكتيريا

P. aeruginosa تواجد إنزيم AmpC من النوع المحفز الذي يعدّ من الأسباب المهمة في مقاومتها للمضادات الحيوية (Jacoby and Bush, 2009) .

2.10.2: انزيمات البيتالاكتاميزالمعدنية : Metallo-ß-lactamase

وتنتمي إلى الصنف (B) بحسب تصنيف Ambler. (Tsakris *et al*., 2000; Lee *et al*., 2007). تمتاز هذه المجموعة من الإنزيمات بقابليتها على تحليل مضادات الكاربابينيم ومقاومتها التثبيط بوساطة مثبطات البيتالاكتام ولكنها حساسة للتثبيط بوساطة (EDTA) ، إنّ لهذه الإنزيمات فعالية كبيرة على معظم مضادات البيتالاكتام، مثل البنسيلينات والسيفالوسبورينات والكاربابينيم ولكنها تفتقد القدرة على تحليل الازتريونام.(Walsh *et al*., 2005) تتثبط هذه المجموعة من الإنزيمات بوساطة أملاح EDTA التي لها القابلية على سحب أيونات الزنك إذ يتنافس هذا المركب مع إنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية للارتباط بأيونات الزنك،(Yong *et al*., 2002) ان مورثات VIM وIMP مسؤولة عن إنتاج هذه الإنزيمات (MBL) وتكون محمولة على الكرموسوم أو البلازميد، ويعد الكشف السريع للبكتيريا السالبة لصبغة غرام المنتجة لهذه الإنزيمات ضرورية للمساعدة في السيطرة على العدوى ومنع انتشارها (Bennett, 1999; Toleman *et al*., 2002; Gladstone *et al*., 2005) .

3: المواد وطرائق العمل Materials and methods

1.3: المـــواد Materials

1.1.3: الأجهــزة والأدوات المختبرية Equipment and apparatus

ت	أســـــم الجـــهـاز		الشركة المصنعة (المنشـــأ)
1	مجهر ضوئي مركب	Compound light microscope	Olympus (Japan)
2	ميزان الكتروني حساس	Sensitiveelectronic balance	A& D co. (Japan)
3	جهاز المطياف الضوئي	Spectrophotometer	Apel (Japan)
4	كاميرا رقمية	Digital camera	Sony (Japan)
5	موصدة	Autoclave	Hiclave (Japan)
6	جهاز قياس كثافة DNA	Nano Drop	Sony (Japan)
7	محرك مغناطيسي	Magnetic stirrer	Gallenkamp (Englan)
8	انابيب ابندورف	Ependorff tubes	Sigma (England)
9	مسخن حراري	Hot plate	GallanKamp (Englan)
10	فيرنيا	Calipers	China
11	ماصات دقيقة	Automatic micropipettes	Certyfied (German)
12	منبذة (مبردة)	Cooling centrifuge	Hettich (German)
13	حمام مائي	Water bath	Kottermann (German)
14	جهاز تقطير	Distiller	GFL (German)
15	منبذة عالية السرعة	High speed centrifuge	Hettich (Germany)
16	حاضنة	Incubator	Memmert (German)
17	جهاز قياس الحموضة	pH-meter	Ino-lab. (German)
18	جهاز التجميد العميق	Deep freezer	GFL (German)
19	انابيب (PCR)	PCR tubes	Ependorff (USA)
20	حاضنة هزازة	Shaker incubator	Lab-line (USA)
21	مرشحات دقيقة	Millipore filters (0.22µm)	Difco (USA)
22	مازج	Vortex mixer	Melrosee park (USA)
23	فرن كهربائي	Electric oven	Eriotti (Italy)
24	كابينة الزرع المجهري	Laminar flow cabient	Cruma (Spain)
25	ثلاجة	Refrigerator	Concord (Lebanon)
26	الناقل الزرعي القياسي	Standard wire loop (1µ)	Himedia (India)
27	جهاز الدورات الحرارية	Thermocycler	A & B co. (Singapore)
28	مصدر الأشعة فوق البنفسجية	UV-transilluminater	MUV (Taiwan)
29	وحدة ترحيل كهربائي	Electrophoresis unit	Lab-net (Tiwan

2.1.3: المـــواد الكيـــمياويـــة Chemical materials

ت	أســـــم المـــادة		الشـــركة المصنعة (المنشـــأ)
1	أكـــار	Agar	Biolife (Italy)
2	كلوريد الباريوم	Barium chloride	Fluka (Switzerland)
3	كليســيرول	Glycerol ($C_3H_8O_3$)	Fluka (Switzerland)
4	هيدروكســيد الصوديوم	Sodium hydroxide (NaOH)	Fluka (Switzerland)
5	الفانفثول	α-naphthol ($C_{10}H_8O$)	BDH (USA)
6	حامض البوريك	Boric acid	BDH (USA)
7	بروموفينول الأزرق	Bromo phenol blue	BDH (USA)
8	كلوروفورم	Chloroform	BDH (USA)
9	البلور البنفسجي	Crystal violet	BDH (USA)
10	كحول الايثانول	Ethanol (96%)	BDH (USA)
11	بروميد الاثيديوم	Ethidium bromide	Sigma (England)
12	فورمالديهايد	Formaldehyde	Fluka (Switzerland)
13	جيلاتين	Gelatin	BB (USA)
14	كلـوكوز	Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	Difco (USA)
15	حامض الهيدروكلوريك	Hydrochloric acid (HCl)	BDH (USA)
16	آيزواميل الكحول	Isoamyl alcohol	BDH (USA)
17	آيزوبروبانول	Isopropanol	BDH (USA)
18	اليود	Iodine	Mastdiagnostic (USA)
19	مالتوز	Maltose	BDH (USA)
20	مانيتول	Mannitol	BDH (USA)
21	المثيل الاحمر	Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)	BDH (USA)
22	فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين	Monopotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	BDH (USA)
23	بيروكسيد الهيدروجين	Hydrogen peroxide (H_2O_2) (70%)	SDI (Iraq)

24	محلول اليوريا	Urea solution	Mastdiagnostic
25	ببتون	Peptone	Difco (USA)
26	الفينول	Phenol	BDH (USA)
27	هيدروكسيد البوتاسيوم	Potassium hydroxide (KOH)	BDH (USA)
28	يوديد البوتاســيوم	Potassium iodide (KI)	BDH (USA)
29	ســفرانين	Safranine	Sigma (England)
30	كلوريد الصوديوم	Sodium chloride (NaCl)	BDH (USA)
31	رباعي المثيل - بارافينيل - ثنائي أمين – ثنائي كلوريد الهيدروجين	Tetramethyl-*P*-phenylene diamine dihydrochloride	BDH (USA)
32	تربتون	Trypton	Difco

3.1.3: الأوساط الزرعية الجاهزة Ready media

ت	اسم الوسط الزرعي		الشركة المصنعة (النشأ)
1	وسط أغار نقيع القلب – الدماغ	Brain- heart infusion agar	Mastdiagnostic (USA)
2	وسط نقيع القلب – الدماغ السائل	Brain -heart infusion broth	Mastdiagnostic(USA)
3	وسط أغار ماكونكي	MacConkey agar	Himedia (India)
4	وسط المثيل الأحمر/ فوكس- بروسكاور السائل	MR/VP broth	Oxoid (UK)
5	وسط أغار مولر- هنتون	Muller-Hinton agar	Oxoid (India)
6	الوسط أغار المغذي	Nutrient agar	Himedia (India)
7	الوسط المغذي السائل	Nutrient broth	Himedia (India)
8	ماء الببتون	Peptone water	Himedia (India)
9	وسط استهلاك السترات	Simons citrate agar	Himedia (India)
10	وسط أغار ثلاثي السكريات والحديد	Trible sugar iron agar	Himedia (India)
11	الوسط اغار *Pseudomonas* P	*Pseudomonas* Agar P	Oxoid (UK)
12	وسط أغار أساس اليوريا	Urea agar base	Himedia (India)

4.1.3: المضادات الحيوية Antibiotics المجهزة من قبل شركة Bioanalyse (Turkey)

التركيز / مايكرو غرام	الرمز	اسم المضاد الحيوي	تحت الصنف للمضاد الحيوي	صنف المضاد الحيوي
100	PY	Carbenciln	Ureidopenicillin	Penicillins
100	PI	Piperacillin		
75	TI	Ticarcillin	Carboxypencillin	
75/10	TCC	Ticarcillin -clavulanic acid		β-/β-lactam lactamase inhibitor combination
30	CX	Cefoxitin	Cephamycin	Cephems
30	CAZ	Ceftazidime	الجيل الثالث Cephalosporin	
30	CTX	Cefotaxime		
30	CTR	Ceftriaxone		
5	CFM	Cefixime	الجيل الرابع Cephalosporine	
10	IMP	Imipenem	Carbapenem	Penems
10	MEM	Meropenem		
30	AT	Aztreonam		Monobactams
30	AK	Amikacin		Aminoglycosid
30	K	Kanamicin		
10	GEN	Gentamicin		
10	TOB	Tobramicin		
5	CIP	Ciprofloxacin	Floroquinolones	Quinolones
10	NOR	Norfloxacine		
10	LO	Lomefloxacin		
5	LEV	Levofloxacin		
300	PB	Polymixin B		Lipopeptide
100	CS	Colistin		

5.1.3:عدتا إستخلاص الدنا (DNA extraction) .

ت	أسم العدة	المكونات	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	عدة إستخلاص الحامض النووي Genomic DNA Mini Kit	GT Buffer 30 ml	Geneaid (USA)
		GB Buffer 40 ml	
		W1 Buffer 45 ml	
		Wash Buffer 100 with ethanol	
		Elution Buffer 30 ml	
		GD Colum 100 pcs	
		2ml collection tubes 100 pcs	
2	عدة مزيج تفاعل سلسلة البلمرة AccuPower® PCR PreMix	Top DNA polymerase 1U	Bioneer (South Korea)
		dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) each: 250µM	
		Tris-HCl (pH 9.0) 10mM	
		KCl 30mM	
		$MgCl_2$ 1.5mM	
		Stabilizer and tracking dye	
		Standard 96 PCR tubes	

6.1.3: بـادئـات الـDNA (DNA primers) المجهزة من شركة Bioneer – كوريا الجنوبية

نوع البادئ	تسلسل القواعد للنتروجينية ('5-'3)		حجم ناتج التضخيم	Homology with genes	المصدر
16S Rrna	F GGTGGTTCAGCAAGTTGGAT		473 bp	صمم في هذه الدراسة	(Bert *et al.*, 2002)
	R ATGCAGCACCTGTGTCTGAG				
OXA-10	F TCAACAAATCGCCAGAGAAG		276 bp	OXA I group (OXA-10) ESBL	
	R TCCCACACCAGAAAAACCAG				
OXA-2	F AAGAAACGCTACTCGCCTGC		478 bp	OXA II group (OXA-2) ESBL	
	R CCACTCAACCCATCCTACCC				
OXA-1	F TTTTCTGTTGTTTGGGTTTT		427 bp	OXA III group (OXA-1) ESBL	
	R TTTCTTGGCTTTTATGCTTG				
OXA-18	F CGATTACGGCAACAAGGA		322 bp	OXA-18 ESBL	
	R TTAGGCGGGCGAAGACGA				
LCR-1	F CCTTTGGTCTCTTTATTGCG		706 bp	OXA group V	
	R CGTCTTTGGCTATCTGCGTT				

Forword :F البادئ الامامي ، Reverse : R البادئ العكس

2.3:طرائق العمل Methods

1.2.3: تحضير الأوساط الزرعية Culture media

أ- تحضير الاوساط

حضرت الاوساط الغذائية المذكورة في فقرة(3.1.3) ببحسب تعليمات الشركة المنتجة وضبط الرقم الهيدروجيني له عدا الاوساط التركيبية فيها والتي شملت وسط اغار الدم ووسط اليوريا.

ب- تعقيم الاوساط

عقمت الاوساط الزرعية المستعملة بالموصدةAtoclave بحرارة121 مْ وضغط 1 جو مدة (15) دقيقة عدا السكريات واليوريا التي عقمت بالرشيح .

2.2.3 :تحضيرالكواشف والمحاليل Solutions and Reagents

1.2.2.3: الكواشف Reagents

أ- كاشف اختبار الأوكسديز Oxidase test reagent:حُضر آنياً بإذابة 1غم من مادة Tetra methyl-P-phenylene diamine dihydro chloride في 90 مل من الماء المقطر المعقم ثم أُكمل الحجم إلى 100 مل. استُعمل للكشف عن قابلية البكتيريا على إنتاج إنزيم الأوكسديز (MacFaddin, 2000) .

ب- كاشف اختبار الكتاليز Catalase test reagent:حُضر بتركيز (3%) من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 واُستعمل في الكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم الكتاليز (MacFaddin, 2000).

ج- كاشف كوفاكس Kovac's reagent:حُضر بإذابة 5غم من مادة Para–dimethyl aminobenzaldehyde في 75مل كحول آيزوبروبيلي باستعمال حمام مائي ثم أُكمل الحجم إلى 100مل بحامض HCl المركز ليصبح لون الكاشف أصفر شاحب، بعدها حُفظ في قنينة معتمة في الثلاجة ، واستُعمل في إختبار الأندول (MacFaddin, 2000).

د- كاشف المثيل الأحمر Methyl red reagent:حُضر بإذابة 0.1غم من المثيل الأحمر في 300مل من الكحول المثيلي بتركيز (95٪) ثم أكمل الحجم إلى 500 مل بإضافة 200 مل من الماء المقطر استعمل للكشف عن التحلل الكامل للسكريات (MacFaddin, 2000).

2.2.3 .2:المحاليل Solutions

أ- المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline Solution حضر المحلول بإذابة 0.85 غرام من كلوريد الصوديوم في 90 ملي لتر من الماء المقطر، وأُكمل الحجم إلى 100 ملي لتر، وعقم بالموصدة. واستعمل هذا المحلول في إعداد اللقاح البكتيري المباشر(MacFaddin, 2000) .

ب- أنبوبة ماكفرلاند القياسية McFarland Tube Standard حُضّرت من المحاليل الآتية وبحسب ما جاء في NCCLS (2003):

1- محلول كلوريد الباريوم $BaCl_2.2H_2O$

حُضّر المحلول بإذابة 1.175 غرام في 50 ملي لتر من الماء المقطر المعقم وأُكمل الحجم إلى 100 ملي لتر للحصول على تركيز 0.048 مول/لتر من كلوريد الباريوم

2 - محلول حامض الكبريتيك H_2SO_4

حُضّر المحلول بإضافة 18 ملي لتر من حامض الكبريتيك المركز ببطء إلى 50 ملي لتر من الماء المقطر المعقم، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر للحصول على تركيز 0.18 مول/لتر من H_2SO_4. أضيف 0.5 ملي لتر من محلول الاول إلى 99.5 ملي لتر من محلول الثاني وعُدلت قراءة العكورة القياسية ما بين(0.08-0.10) وحدة تكوين المستعمرة عند طول موجي 625 نانومتر وهذه القراءة تمثل ما يقارب عكورة (1-2 x10^8) [Colony forming unit (CFU)] في ملي لتر واحد من البكتيريا النامية، ووزع المحلول في أنابيب اختبار معقمة ذات سدادات محكمة بحجم 4 ملي لتر لكل أنبوبة وحفظ في أماكن معتمة بدرجة حرارة الغرفة واستُعملت لغرض مقارنة كثافة النمو البكتيري في اللقاح المستعمل مع كثافة المحلول في الأنبوبة.

3.2.3 :جمع العينات Samples collection

تم جمع 390 عينة سريرية وبيئية من مستشفى الديوانية التعليمي خلال الفترة من تشرين الثاني 2011 إلى اذار 2012، وشملت الدراسة عينات بيئية وعددها 98عينة وجمعت من أماكن مختلفة من أرضية شعبة الحروق والادوات الطبية المستعملة لدى العاملين في شعبة الحروق . كما شملت الدراسة عينات سريرية وعددها 292عينة ، تم جمعها من مناطق مختلفة من الجسم للمرضى الراقدين والوافدين لجميع الأعمار ولكلا الجنسين ، حيث أخذت العينات من الإدرار(وقد تم جمع العينات للاعمار الاقل من السنة باستعمال الاكياس) والحروق وافرازات الجهاز التنفسي (القشع) والأذن (من التهاب الاذن الوسطى والتهاب الاذن الخارجية).

4.2.3: عزل البكتيريا Isolation of bacteria

لغرض عزل البكتيريا، لقحت الاوساط الزرعية اغار الدم blood agar واغار الماكونكي MacConkey's agar بمساحات العينات بطريقة التخطيط ثم حضنت بحرارة 37 مْ مدة 18-24 ساعة. كما تم حضن الأطباق التي لم يظهر فيها نمو خلال 24 ساعة مدة 24 ساعة أخرى قبل عدَّها نتيجة سالبة.

5.2.3 : تشخيص البكتيريا Identification of bacteria

شخصت المستعمرات البكتيرية النامية اعتماداً على :

1.5.2.3:الخصائص المظهرية

لوحظت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية كاشكالها ،لونها ، سطح المستعمرات ووجود روائح مميزة لها ،قوامها شفافيتها ،نمط التحلل الدموي على وسط اغار الدم وتخمر اللاكتوز على وسط اغار ماكونكي (Winn *et at*.,2006) .

2.5.2.3: الفحص المجهري

فحصت العزلات البكتيرية مجهرياً وذلك بأخذ مسحة من المستعمرات البكتيرية النامية على الاوساط الزرعية وتثبيتها وتصبيغها بملون غرام لملاحظة اشكال وترتيب الخلايا البكتيرية وتفاعلها مع الملون (موجبة او سالبة) ووجود المحفظة وتكوينها للأبواغ .

3.5.2.3:الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

لغرض اجراء هذه الاختبارات تم استعمال المزروع البكتيري النامي على الوسط المغذي الصلب بعمر 24 ساعة وهذه الاختبارات تشمل :

1- اختبار الكاتيليز Catalase test : تم إجراء الاختبار بنقل كمية قليلة من النمو البكتيري بوساطة العيدان الخشبية المعقمة إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ثم أضيف لها قطرة من (3%) بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) ،إن ظهور الفقاعات الغازية يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

2- اختبار الاوكسيدز Oxidase test: تم إجراء الكشف بنقل كمية من النمو البكتيري بوساطة العيدان الخشبية المعقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف المحضر آنياً ، تلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجي يدل على النتيجة الموجبة للكشف (Collee *et al*., 1996).

3- اختبار انتاج الهيمولايسين Haemolysin production : تم تنمية المزروع البكتيري على وسط الدم الصلب وحضن بدرجة حرارة37مْ مدة 24-48 ساعة، ظهورمناطق التحلل حول المستعمرات النامية يشير إلى قابلية البكتيريا على انتاج سموم الهيمولايسين (Macfaddin, 2000).

4- اختبار انتاج كبريتيد الهيدروجين Production of hydrogen sulfite :

اجري الاختبار بتلقيح وسط كلكلر بالمزروع البكتيري لفحصه وحضن بدرجة حرارة 37مْ مدة 24 ساعة، ظهور الراسب الاسود في الانبوبة يدل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 2000).

5- اختبار استهلاك السترات Citrate utllization test : اجري الاختبار بتلقيح وسط السترات المائل بالمزروع البكتيري المراد فحصه وحضن بدرجة حرارة 37مْ مدة 24-48 ساعة. ان تحول لون الوسط الاخضر الى الازرق وظهور النمو على خطوط الزرع يدل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 2000).

6- اختبار قابلية الحركة Motility test : اجري الاختبار بتلقيح الانابيب الحاوية على وسط الحركة بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة حرارة 37مْ مدة 24-48 ساعة، انتشار النمو خارج حدود الطعنة يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996) .

7- اختبار تخمير الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation test : لقحت الأنابيب الحاوية على وسط تخمر الكربوهيدرات بالمزروع البكتيري ثم حضنت بدرجة حرارة 37مْ مدة 2-5 يوم تحول لون الوسط من الاحمر الى الاصفر وظهور الفقاعات الغازية في انبوبة درهم يدل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 2000).

8- اختبار ألا ندول Indol test : اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي بالمزروع البكتيري حضنت بدرجة حرارة 37مْ مدة 18-24 ساعة، عندها أضيفت بضع قطرات من كاشف كوفاكس إلى كل أنبوبة مع الرج الجيد، ظهور حلقة حمراء في أعلى الوسط يدل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 2000).

9- اختبار احمر المثيل Methyl red test : اجري الاختبار بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي M.R.V.P Medium بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37مْ مدة 24-48 ساعة عندها تم اضافة 5 قطرات من كاشف احمر المثيل مع رج الانبوبة ان ظهور اللون الاحمر في الأنبوبة بعد 15 دقيقة يدل على التحلل الكامل للسكريات وانتـاج الحامض (Collee *et al*., 1996).

10- اختبار الفوكس بروسكاور Voges pros-kauer test : اجري الاختبار بتلقيح الوسط الزرعي MR-VP Medium بالمزروع البكتيري، وحضن بدرجة حرارة 37مْ مدة 24-48 ساعة بعد ذلك تم إضافة 1 مليليتر من الكاشف إلى كل أنبوبة مع الرج، ان ظهور اللون الوردي خلال 2-5 دقيقة الذي يصبح كرزي غامق خلال 30 دقيقة مع الرج المتواصل يعبر عن النتيجة الموجبة (Collee *et al*., 1996).

11- الكشف عن انزيم اليوريز Urease test : تم الكشف عن هذا الانزيم بتلقيح وسط اغار اليوريا بالمزروع البكتيري ثم حضن بدرجة حرارة 37مْ مدة 24 ساعة ،وظهور اللون الوردي يدل على النتيجة الموجبة(Macfaddin, 2000) .

6.2.3 : حفظ العزلات البكتيرية وإدامتها

Preservation and maintenance of bacterial isolates

أ-الحفظ قصير الأمد

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتيريا المراد حفظها وحضنت في درجة حرارة 37 مº مدة 24 ساعة، ثم حفظت في درجة 4 مº (Collee *et al.*, 1996).

ب-وسط الحفظ طويل الأمد

حضر الوسط بإضافة 15% من الكليسيرول إلى الوسط نقيع القلب والدماغ السائل المحضر بإذابة 4 غرام من الوسط في 50 ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر، وعقم بالمؤصدة، وترك ليبرد في درجة حرارة 56 مْ باستعمال الحمام المائي، ووزع على أنابيب اختبار معقمة وذات سدادات محكمة وحفظ في 4 مْ لحين الاستعمال. استعمل هذا الوسط لحفظ البكتيريا المعزولة والمشخصة لعدة أشهر في درجة حرارة - 20 مْ (NCCLS, 2003) .

7.2.3 : اختبار فحص الحساسية Antibiotic Susceptibility Testing

اختبرت الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بطريقة الأقراص اعتمادا على طريقة Bauer وجماعته (1966) وCLSI (2012)، وتضمنت:

نقل (2-4) مستعمرات من بكتيريا *P. aeruginosa* إلى أنبوب إختبار يحوي 5 مل من مرق تربتون الصويا المغذي وحضنت بدرجة 37 مْ مدة 8 ساعات. خفف النمو الحاصل باستعمال محلول الملح الفسلجي، ثم تمت مقارنة النمو في الأنبوب مع أنبوبة ماكفرلاند (0.5) القياسية، وتم غمس المسحة القطنية في مرق تربتون الصويا المزروع، وأزيل الفائض بالضغط على الجوانب الداخلية للأنبوبة.

ومن ثم نشرت البكتيريا على وسط مولر- هنتون الصلب بطريقة التخطيط لأكثر من مرة، وباتجاهات مختلفة لغرض التأكد من نشر البكتيريا المراد إختبار حساسيتها بالتساوي، وتُركت الأطباق 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة لضمان امتصاص الرطوبة، وُضعت أقراص مضادات الحيوية المذكورة في الفقرة (3-1-4) بواقع خمسة أقراص في طبق قياس 100 ملي متر، و 12 قرص في طبق قياس 150 ملي متر، والمسافة بين كل قرص وآخر 20 ملي متر من مركز القرص الأول إلى مركز القرص الآخر، حُضنت الأطباق في 37 مْ (18) ساعة لأنواع المضادات الحيوية جميعها، ثم قيست أقطار التثبيط باستعمال الفيرنيا وقورنت مع القيم القياسية المذكورة في CLSI (2012).

8.2.3:محاولة تصميم بادئ جديد ومتخصص لتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa*

استعملت في الدراسة الحالية تقنية سلسلة تفاعل انزيم البلمرة (PCR) لتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* من خلال تصميم بادئ جديد ومتخصص لمورث **16s-ribosomal RNA** و صمم البادئ الجديد عن طريق الموقع **NCBI** والحصول على التسلسل الجيني من بنك الجينات Gene Bankثم ادخل هذا التسلسل الجيني في برنامج الـ Primer.3 والذي يوجد على الموقع الالكتروني WWW.Primer3.Co و ضبطت الاعدادات الملائمة للبادئ المصمم مثل درجة حرارة الارتباط ونسبة G + C وغيرها من الاعدادات وبحسب الحاجة وذكرت هذه الاعدادات ضمن الملحق (1-2) واخيرا اختير البادئ الذي يعتقد بانه هو المناسب وجهز من شركة (Bioneer، كوريا) .

9.2.3: تفاعل السلسلة المتبلمرة (PCR) Poly Chain Reaction

1. 9.2.3: إستخلاص DNA الكلي DNA Extraction

تم استخلاص الحامض النووي (DNA) من بكتيريا ***P. aeruginosa*** وذلك بأستعمال العدة الجاهزة وببحسب تعليمات الشركة المجهزة وكآلاتي :

1- نقل 1مل من عالق كل عزلة من بكتيريا . *P. aeruginosa* النامية على وسط مرق نقيع القلب والدماغ ووضعت في انابيب ابندروف قياس 1.5مل معقمة وبعدها نقلت الى جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 15000 دورة / دقيقة وذلك لجمع الخلايا البكتيرية ثم التخلص من السائل الطافي.

2- حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة مدة 10 دقائق وخلال مدة الحضن تم تقليب الأنابيب لضمان تحليل كامل للخلايا في المزيج.

3- أضيف 200 ميكروليتر من محلول GB Buffer المجهز من العدة الى مزيج الخلايا المتحللة ومزج جيدا بوساطة المازج vortex مدة 5 ثوانٍ.

4- حضن المزيج بدرجة حرارة 70 مْ مدة 10 دقائق باستعمال الحمام المائي.

5- أضيف200 ميكروليتر من الكحول الأثيلي المطلق الى المزيج المتحلل ومزج الخليط جيدا" بجهاز المازج vortex مدة 10 ثوانٍ .

6- نقل الخليط من أنبوبة الابندروف الى انابيب جمع (collection tubes) قياس 2 مل الحاوية على أعمدة تحوي مرشحات لتنقية الحامض النووي (GD filter colum) والمجهزة مع العدة.

7- وضعت انابيب الجمع مع الأعمدة الحاويه على خليط في جهاز الطرد المركزي المبرد ودورت بسرعة 15000دورة / دقيقة للتخلص من نواتج الخلايا المتحللة.

8- تم التخلص من المحلول الراسب للخلايا المتحللة ونقل الـ (GD column) الحاوي على الحامض النووي الى أنبوبة جمع collection tube جديدة .

9- أضيف 400 ميكروليتر من محلول W1 Buffer المجهز مع العدة الى العمود الحاوي على الحامض النووي لغسل الحامض النووي بعدها وضعت الأنابيب في جهاز الطـــرد المـــركزي بـسرعة 15000 دورة مدة 30 ثـــــانية.

10- تم التخلص من الراسب ومن ثم أضيف 600 ميكروليتر من محلول الغسل الحاوي على الكحول الاثيلي المطلق Wash buffer المجهزة مع العدة الى العمود الحاوي على الحامض النووي ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسـرعة 15000 دورة مدة 30 ثانيـة.

11- تم التخلص من الراسب وإعادة الأنابيب الى جهاز الطرد المركزي المبرد مرة ثانية لتجفيف الأعمدة بسرعة 15000 دورة مدة 3 دقائق.

12- نقلت الأعمدة الحاوية على الحامض النووي الى انابيب ابندروف معقمة مع إضافة 50 ميكروليتر من محلول الإذابة Elution Buffer المجهز مع العدة الى وسط العمود وترك مدة 5 دقائق وبعدها وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 15000 دورة مدة 30 ثانية وقد قيست كثافة الحامض النووي بواسطة جهاز قياس كثافة DNA وحفظ في درجة حرارة (-20) مْ لحين أجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة .

2. 9.2.3: تحضير هلام الأگاروز Agarose gel

حُضر ببحسب طريقة Sambrook وجماعته (2001)، وكالآتي:

1- أُذيبَ 1.5غم من هلام الأگاروز في 100 مل من محلول TBE buffer الدارئ بتركيز (1X) وباستعمال الصفيحة الحرارية مدة 15 دقيقة.

2- تُركَ الهلام ليبرد بدرجة حرارة الغرفة وبعدها أُضيفَ 2 مايكرولتر من صبغة الحامض النووي المُشعَّة Ethidium bromide ومُزجت جيداً مع الهلام.

3- صُبَّ هلام الأگاروز في قالب الترحيل (Tray) الحاوي على المشط (Comb) وبعدها تُرك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة مدة 15 دقيقة. تم إزالة المشط من الهلام بعناية لغرض عمل الحُفر وتحديدها (wells) في الهلام اللازمة لحقن العينات المضخمة.

3. 9.2.3 تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة PCR master mix

حضُر مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المفرد بأُستعمال عدة AccuPower® PCR PreMix وبحسب تعليـــمات الشـــركة المجـــهزة كالاتي :

1- حضُر مزيج تفاعل إنزيم البلمرة في انابيب (PCR) المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل إنزيم البلمرة مع إضافة المكونات الأخرى لمزيج التفاعل كما في جدول (3-1):

2- بعد إكمال تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة تم غلق الأنابيب مع المزج بعناية مدة 5 ثوانٍ .

3- نقلت الأنابيب الى جهاز المضخم الحراري Thermocycler لتفاعل إنزيم البلمرة لأجراء عملية تضخيم الـ DNA . (DNA Amplication) على وفق الظروف المثلى للدورات الحرارية Thermo cycling conditions والمتمثلة بعمليات فصل شريط الـ DNA **(**Denaturation**)** وارتباط البادئات مع الشريط المنفصل (Annealing) وتطويل سلسلة الـ DNA (Extension) .

جدول (3-1): مكونات مزيج تفاعل إنزيم البلمرة PCR master mix وحجومها

PCR master mix		Volume
DNA template		5 µL
Primer	Forward primer	1.5µL
	Reverse primer	1.5µL
PCR water		12 µL
Total		20 µL

4. 9.2.3 : برنامج الدورات الحرارية لتضخيم ألـ DNA

أُجري تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد باستعمال المضخم الحراري Thermo cycler لجهاز ألـ PCR. وتم برمجة الجهاز بحسب طريقة Townsend وجماعته (2001) لكل بادئ. وكُرِرت الدورات الحرارية لكل بادئ إلى 30 دورة، كما في جدول (3-2).

5.9.2.3: التحري عن حزم ألـ DNA المستخلص (Extracted DNA):

أ- حُمِّلَ 10 مايكرولتر من العينات لكل حُفرة بصبغة التحميل Loading dye (2 مايكرولتر) ووُضعت في الحُفر.

ب- غُمِرَ هلام الأگاروز بعد ذلك في محلول الترحيل الدارئ TBE Buffer بتركيز (1X) حتى يصل إلى (3-5) ملم بحيث يُغطي سطح الهلام، ثم وُضع غطاء الترحيل بإحكام ورُبطت الأقطاب الكهربائية بجهد القدرة (Power supply) ووُصِّلَ التيار الكهربائي وتمت عملية الترحيل بفرق جهد 100 فولت وتيار 80 أمبير مدة ساعة واحدة.

ج- بعد الانتهاء فُحصَ الهلام للتحري عن وجود ألـ DNA باستعمال مصدر الأشعة فوق البنفسجية .

جدول (3-2) الظروف المستعملة في جهاز الدورات الحرارية PCR

المورثات	الظروف المستعملة في جهاز الدورات الحرارية				
	المسخ الأولي (دورة واحدة)	(35) دورة			الاستطالة النهائية (دورة واحدة)
		المسخ	التثبيت	الاستطالة	
bla_{OXA-18}	96مْ / 5 دقيقة	96مْ / 30ثانية	53مْ/30 ثانية	72مْ /1دقيقة	72مْ/ 5 دقائق
bla_{OXA-10}	96مْ / 5 دقيقة	96مْ / 30ثانية	53مْ/30 ثانية	72مْ /1دقيقة	72مْ/ 5 دقائق
*bla*OXA-1	96مْ / 5 دقيقة	96مْ / 30ثانية	55مْ/ 30ثانية	72مْ /1دقيقة	72مْ/ 5 دقائق
bla_{LCR-1}	96مْ / 5 دقيقة	96مْ / 30ثانية	55مْ/ 30ثانية	72مْ /1دقيقة	72مْ/ 5 دقائق
bla_{OXA-2}	96مْ / 5 دقيقة	96مْ / 30ثانية	58مْ/ 30ثانية	72مْ /1دقيقة	72مْ/ 5 دقائق
$bla_{16s-r\ RNA}$	96مْ / 5 دقيقة	96مْ / 30ثانية	56مْ/ 30ثانية	72مْ /1دقيقة	72مْ/ 5 دقائق

6. 9.2.3: الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis

تم أجراء الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز المحضُر بنسبة 1.5% تحت فرق جهد 100 فولت وتيار 80 امبير وزمن ساعة لغرض الكشف عن حزم (Bands) الـDNA المستخلص والـ DNA المضخم والذي يمثل نواتج التضخيم (Amplicon size) او نواتج الـ PCR (PCR Products) وبالمقارنة مع سلم الحامض النووي القياسي (100-2000) DNA Ladder .

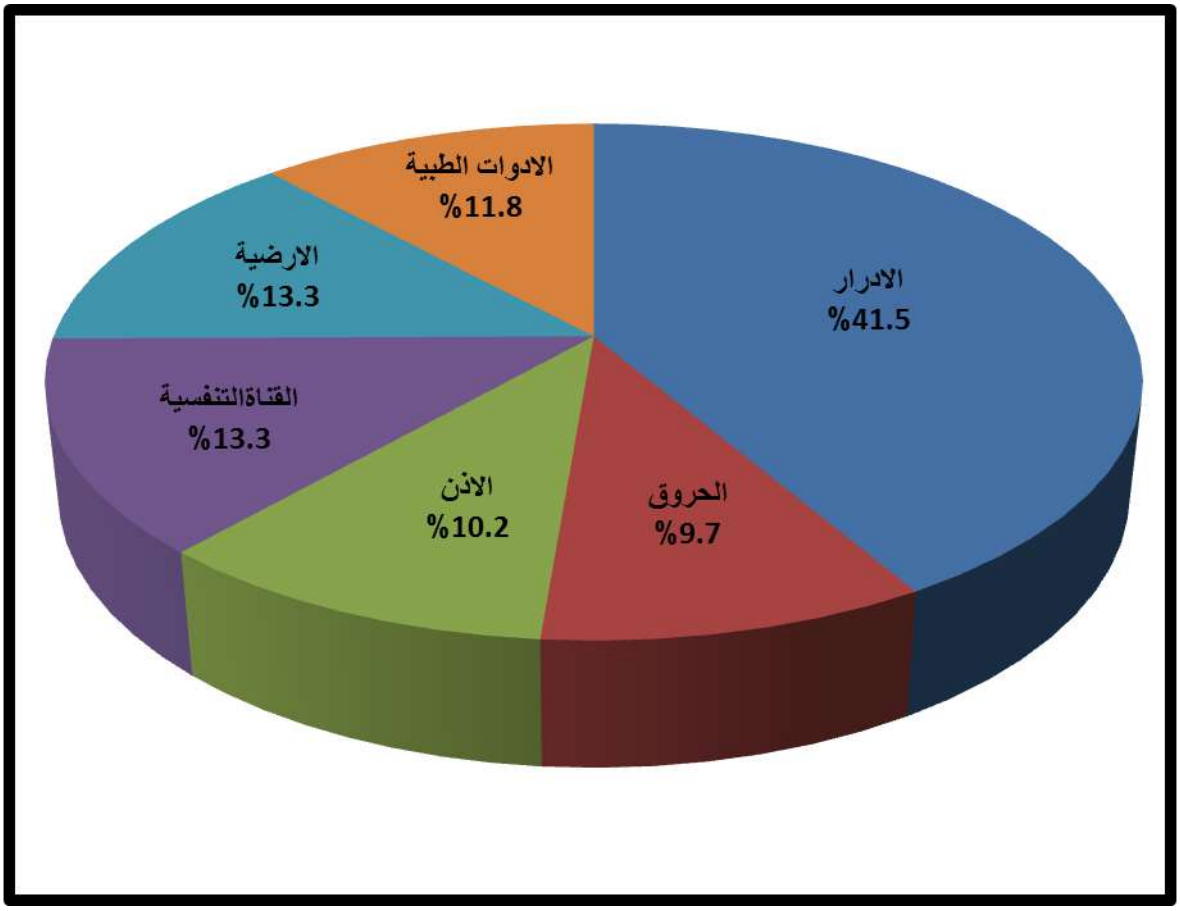
7.9.2.3: التحليل الاحصائي :

لقد تم استخدام نوعين من البرامج في وصف وتحليل البيانات الواردة في هذه الدراسة وهي SPSS (الحزمة الاحصائية للعلوم الاجتماعية ; أصدار 16) و Microsoft Office Excel 2007 .

4: النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4:الدراسة الاحصائية للعينات : Samples Demography

تضمنت الدراسة جمع 390 عينة من مصادر مختلفة في مستشفى الديوانية التعليمي خلال المدة من شهر تشرين الثاني 2011 لغاية شهر آذار 2012 و كانت عملية جمع العينات بشكل عشوائـــــي من مصادر مختلفة للتحري عن بؤر التـــلوث ببكتيريا *P. aeruginosa* وما يترتب على ذلك من إجراءات تشخيصية ووقائية وعلاجية والشكل (4-1) يوضح توزيع العينات السريرية والبيئية من مصادر جمعها .



شكل (4-1): نسب العينات السريرية والبيئية من مصادرها المختلفة

شملت العينات السريرية حالات التهابية مختلفة منها التهاب المجاري البولية162 عينة (41.5%) والحروق38مسحة (9.7 %) والتهاب الاذن 40مسحة (10.2%) اما المسحات المأخوذة من افرازات الجهاز التنفسي او القشع فكان عددها 52 مسحة (13.3%)،و شملت العينات البيئة مسحات من ارضية الردهات لشعبة الحروق52 (13.3%) مسحة و46 مسحة(11.8%)من بعض الادوات الطبية للعاملين في هذه الشعبة .

2.4 : عزل وتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa*

Isolatation and Identification of *P. aeruginosa*

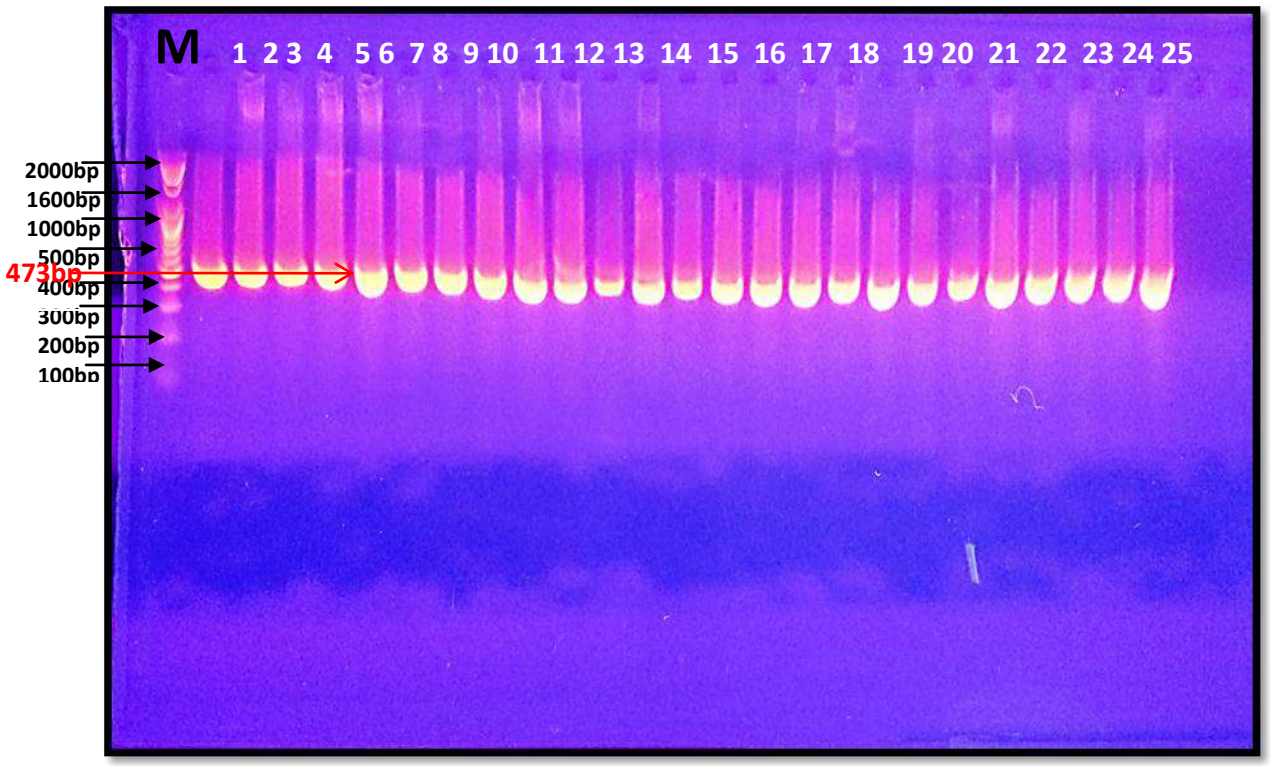
شُخصت عزلات *P. aeruginosa* في بادئ الأمر بدراسة الصفات المظهرية للمستعمرات النامية ، أذ ظهرت على وسط أكار الماكونكي شاحبة عديمة اللون لعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز الموجود في الوسط الزرعي ولها رائحة شبيهة برائحة العنب المتخمر ، أما على وسط أكار الدم فظهرت مستعمراتها بلون غامق وأغلبها محاطة بهالة شفافة مما يدل على قدرتها على التحلل الكامل للدم،اما على وسط *Pseudomonas* Agar P فقد ظهرت المستعمرات ناعمة ، مرتفعة قليلا ،تنحصر اقطارها بين (1-3) ملي متر ذات لون ازرق مخضر او اخضر بسبب انتاجها صبغه البايوسين بالإضافة الى تلون الوسط بأكمله لخصائصه التي تعزز من انتاج البايوسين ، و أظهرت نتائج الفحص المجهري ان خلايا البكتيريا المعزولة عصويه الشكل ، مفرده او ثنائيه الترتيب ، سالبه لصبغة غرام ، مكونة للمحفظة ، أما فيما يخص نتائج الفحوصات الكيموحيوية جدول(4-2) ، فقد أثبتت قابلية العزلات على إنتاج أنزيمي الأوكسيديز والكتاليز وكانت سالبة لاختبار الأندول ولها القدرة على النمو بدرجة حرارة (42) وسالبة لاختبار أحمر المثيل واستهلاك السترات وسالبة لفوكس بروسكاور ، كما اتصفت العزلات جميعها بعدم قدرتها على إنتاج غاز H_2S وانزيم اليوريز ولها القابلية على تخمر الكالكتوز والسكروز .

جدول (4- 1) الاختبارات الكيموحيوية لبكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من للعينات السريرية والبيئية

الأختبار	النتيجة
اختبار الأوكسديز	+
اختبار الكتاليز	+
اختبار الأندول	-
اختبار النمو في درجة 42 م°	+
اختبار احمر المثيل	-
اختبار فوكس بروسكاور	-
اختبار استهلاك السترات	+
اختبار استهلاك السكريات الثلاثة وإنتاج H2S	A/K--
انتاج اليوريز	-

3.4:الكشف الجزيئي التأكيدي لبكتيريا *P. aeruginosa* باستعمال تقنية PCR

اشارت الدراسة الحالية الى احتواء عُزلات *P. aeruginosa* (50 عُزلة) جميعها على مورثة 16s-ribosomal RNA التي تُمثّل المورثة التشخيصيّة المصممة في هذه الدراسة لبكتيريا *P. aeruginosa* والبالغ وزنها الجزيئي (473bp) مما يُثبت عائدية العزلات (50 عزلة) جميعها لبكتيريا *P. aeruginosa* كما موضح في الشكل (2-4) اذ ان استخدام هذه التقنية في التشخيص لأول مرة مهمة جدا لتشخيص هذه البكتيريا الخطرة ،وتعد استعمال 16s-ribosomal RNA في تصنيف الانواع البكتيرية يحل مشكلة التغايرات في النمط المظهري للأنواع البكتيرية ويعتمد على تضخيم الجينات بتقنية PCR ، و تمتلك انواع البكتيريا جميعها على منطقة جينية محدد وفريدة تسمح بتحديد ذلك النوع البكتيري وبالتالي تكون العزلات العائدة للنوع الواحد مشتركة بنسبة 99-100 % بالتسلسل النيوكلوتيدي مع بعضها البعض(Damien ,2007) .



شكل (2-4): الترحيل الكهربائي لمورث 16s-ribosomal RNA المتضاعفة باستعمال تقنية ألـ(PCR) لعزلات *P. aeruginosa* من (1-25) عزلة .

4-4 انتشار وتوزيع الزوائف الزنجارية في العينات البيئية والسريرية:

Incidence and distribution of *P. aeruginosa* in Environmental and Clinical Sample

بلغ عدد عزلات *P. aeruginosa* التي تم الحصول عليها من مجموع 390 عينة 50 (12.8%)عزلة ، توزعت ما بين 11(11.2%) عزلة من 98 عينة بيئية و39(13.3%) عزلة من 292 عينة سريرية كما مبين في جدول (4-2) ويتضح ان نسبة عزل بكتيريا *P. aeruginosa* من العينات السريرية كانت اعلى من نسبة العزل للعينات البيئية ،ويمكن أن يعزى السبب إلى كون الإنسان يمثل وسط إنمائي غني بالمواد التي تحتاجها البكتيريا وتوفيره لدرجات الحرارة والرطوبة الملائمتين للنمو والتكاثر، وعلى الرغم من وجود الوسائل الدفاعية والمناعية لجسم الإنسان إلا أن *P. aeruginosa.* تستطيع أن تجد مواطن عديدة للتكاثر والاستعمار الطويل الأمد (Thomson *et al.*, 2004) .

جدول (4-2):نسب العزل الاولي للعينات السريرية والبيئية

مصادر العينات	عدد العينات الكلي	عدد عزلات *P. aeruginosa*	عدد عزلات البكتيريا السالبة لصبغة غرام	عدد العينات الخالية من النمو البكتيري
السريرية	292	(%13.3)39	(%41)120	(%45.5)133
البيئية	98	(%11.2)11	(%36.7)36	(%52)51
الكلية	390	(%12.8)50	(%40)156	(%47)184

جاءت نتائجنا مطابقة لما توصلت اليه الدراسات الاخرى في العراق (Al-Muhannak, 2010 ; Al-Shara,2013) بأن سلالات بكتيريا *P. aeruginosa* في الوقت الحاضر هي واحدة من أكثر المسببات المرضية المرتبطة بالمستشفيات، كما وذكرت احد الدراسات العالمية ان بكتيريا *P. aeruginosa* هي الممرض الثالث والاكثر شيوعا بنسبة عزل (10%) من 2 مليون اصابه سنويا سجلت في مستشفى الولايات المتحدة (Robert, *et al.*, 2002) . وفي عام 2003 كانت الأكثر ترددا

بين البكتيريا سالبة غرام بنسبة (18.1 %) المعزولة في مستشفيات الالتهاب الرئوي في الولايات المتحدة(Gaynes and Edwards, 2005).

كما عززت الدراسة الحالية الدراسات التي اجرها كلٌ من منحر (2011) و Umadevi وجماعته (2011) و Rajalakshmi و Amsaveni (2012) بأن أسباب انتقال التلوث البكتيري في المستشفيات اما ان يكون ذاتيا بوصفها تمثل جزءا صغيرا من الفلورا الطبيعية للإنسان اومكتسبا من طراق خارجية كاستعمال المرضى للصحيات او عن طريق الأشخاص المشرفين على رعاية المريض، وبصورة عامة فأن الهواء والمياه والأيدي والأطعمة جميعها تساعد على انتقال البكتيريا من شخص لآخر وبالتالي أتساع دائرة العدوى البكتيرية (Thomas, 2007) .

جدول (4-3): عدد العـزلات المأخوذة من عينات بيئية لمستشفى الديوانية التعليمي ونسبها

مصدر العينات	عدد العينات	عدد عزلات *P. aeruginosa*	النسبة (%)
الارضية	52	6	11.5
الادوات الطبية	46	5	10.8
المجموع	98	11	11.2

أظهر الجدول (4-3) أن أعلى نسبة عزل *P. aeruginosa* للعينات البيئية كانت لارضية شعبة الحروق (11.5%)، تلتها نسبة العزل من الادوات الطبية للعاملين في الشعبة (10.8%) ، إن هذه النسب تظهر مقدار التنوع ، والتعدد في البيئات التي تتواجـد فيها وقد يرجع ذلك لعدة أسباب كامتلاكها للعديد من العوامل التي تزيد من ضراوتها وتمكنها من التواجد في بيئات مختلفة مثل إنتاج الإنزيمات التي تعمل على تحطيم المركبات العضوية المعـقدة التركيب وتحـويلها إلى مواد أولـية وامتلاكها القابلية على العيش والبقاء في الظروف الرطبة ، والجافة على حدٍ سواء ، (MacFaddin, 2000) ، فضلاً عن امتلاكها وسائل الحماية الأوزموزية المتمثلة بالمحفظة التي تعد من أهم وسـائل الحماية ضد الأذى الكيمـيائي والميكانيكي و قدرتها على تحمل مدى واسع من درجات الحـرارة التي قد تصـل إلى 42 م° (O'Riodan and Lee, 2004).

أن النسب المسجلة للعزلات البيئية للدراسة الحالية لا تختلف كثيرا عن مثيلاتها في دول العالم ففي دراسة أجريت في إيران، وجدت أن نسبة عزل بكتيريا *P. aeruginosa* 42 (6%) وكانت أكثر العزلات انتشارا مقارنة مع البكتيريا سالبة صبغة غرام الأخرى التي تم عزلها من بيئات

المستشفى(Ekrami *et al* .,2010). ، وهذا ما أكدته دراسة اخرى للباحث Heyman (2004) بأن المستشفيات هي من أفضل مستودعات التلوث البكتيري مهما ارتفعت فيها نسبة العناية والنظافة ، اذ ان المريض الراقد يعد حاملاً وناقلاً جيداً لأسباب التلوث والعدوى .

تُستعمل المطهرات السطحية في المستشفيات لمنع انتشار البكتيريا، ولكن إذا كانت هذه البكتيريا يمكنها مقاومة مثل هذه المطهرات فمن الممكن ان تسبب تهديدا خطيرا للمرضى في المستشفيات، اذ اشار العلماء في الجامعة الوطنية الايرلندية في جالواي بأن إضافة كميات متزايدة من المواد المطهرة إلى مزارع بكتيريا *P. aeruginosa* يجعلها تتدرب على مقاومة هذه المادة المطهرة، وقد شدد تقرير للاتحاد الاوروبي نشر في وقت سابق من هذا العام على أهمية الاستعمال الملائم والحكيم في استعمال المطهرات للتقليل من خطر أن تصبح البكتيريا مقاومة لكل تلك المطهرات (Cover , 2006) .

اما العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* فقد قسمت بحسب مصادر جمعها كما موضح في الجدول (4-4) اذ أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة عزل للبكتيريا كانت من التهابات الحروق، إذ بلغت (23.6%) وتكمن خطورة نسبة العزل بدرجة الإصابة وغالبا ما تؤلف البكتيريا المعزولة نسبة عالية من حالات الحروق على مستوى دول العالم ، ففي إحصائية لمنظمة WHO (2001) تم إدراج (80%) من حالات حروق الدرجة الثانية سبباً في إحداث وفيات بنسب عالية جداً وذلك لكون الوسائل الدفاعية للمصابين مخترقة واقل قدرة على المقاومة.

جدول (4 -4)عدد عزلات *P. aeruginosa* السريرية ونسبها المعزولة من مواقع الأصابة المختلفة

موقع الاصابة	عدد العينات	عدد عزلات*P. aeruginosa*	النسبة(%)
الادرار	162	17	10.49
الحروق	38	9	23.68
القشع	52	8	15.38
الاذن	40	5	12.5
المجموع	292	39	13.35

وقد تباينت نتائج الدراسات الاخرى في نسب العزل من الحروق ما بين نسب مرتفعة ومنخفضة ويمكن أن يعزى هذا إلى اختلاف الموسم لأخذ العينات أو بسبب التدابير الصحية واختلاف موقع الإصابة

اذ ذكرت بلال (2010) ان نسبة عزل بكتيريا *P. aeruginosa* من التهابات الحروق (67.5 %)، اما Iwalokun واخرون (2006) فقد توصلوا بأن أعلى نسبة عزل (29%) كانت من الحروق .

وقد يعود شيوع بكتيريا *P. aeruginosa* في حالات الحروق كون المصابين راقدين في المستشفى لتلقي العلاج ، وهذا يؤكد بأنّ بيئة المستشفيات تشكل بؤرة استيطانية لأنواع البكتيريا الانتهازية المقاومة لأغلب المضادات الحيوية التي يشيع استعمالها، ففي إحصائية لمنظمة WHO (2001) تم خلالها إدراج (80%) من حالات (حروق الدرجة الثانية) سبباً في إحداث الوفيات بنسب عالية جدا وذلك لكون الوسائل الدفاعية للمصابين مخترقة واقل قدرة على المقاومة ، ويمكن الاستنتاج بان نسبة عزل البكتيريا في هذه الدراسة من حالات الحروق لا تخلو من الخطورة على الرغم من ان شعبة الحروق خاضعة للرقابة المشددة اذ خفض هذا معدل التهابات الحروق للمصابين الراقدين بشكل ملحوظ ولكن ما تزال العدوى البكتيرية تهدد حياة المصابين بحروق شديدة .

اوضحت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة عزل *P. aeruginosa* من التهابات الجهاز التنفسي (القشع) كانت (15.38%) اذ أُخذ بنظر الاعتبار عينات القشع الحاوية على اكثر من25 خلية متعددة الانوية (polymorphonuclear cells) واقل من 25 خلية طلائية (epithelial cells) وهذا ما اشار اليه (Srifuengfung *et al.*, 2005) . وتعد *P. aeruginosa* من أهم العوامل الممرضة التي تصيب الجهاز التنفسي عند مرضى التليف الكيسي والأمراض المزمنة وأمراض نقص المناعة ويحمل الاستعمار المبكر للرئة إنذاراً سيئاً مسببا الوفاة لأكثر من (30%) من مرضى الالتهاب الرئوي والذين يعانون من الامراض التي مر ذكرها,(Anjum and Mir 2010) . ونشرت احد الدراسات المحلية Al-Shara (2013) ان نسبةعزل هذه البكتيريا من القشع في مستشفيات النجف (14.2%) ،اما عن دراسة اخرى اجرها منحر (2010) بلغت نسبة العزل من القشع(4.4%) في مستشفيات الديوانية ،ويعزى اختلاف النسب الى اختلاف الموسم الذي جمعت فيه العينات والى اختلاف المرضى اذ ترتفع النسبة لدى المرضى الراقدين والمرضى الذين يعانون أصلا من ضعفٍ في أنظمة الجسم المناعية (CDC, 2001).

في هذه الدراسة كانت نسبة عزل *P. aeruginosa* من التهابات الاذن (12.58 %) ويمكن عدّها ضمن نطاق النسب المتعارف عليها في الدراسات الاخرى التي اجرها كل من منحر (2010) و-Al Shara (2013) اذ كانت (12.5%)،(13.9%)على التوالي، وذكرت دراسات اخرى ان نسبة العزل في ايران (1.0%) وفي باكستان(3.0%) ,(Anjum and Mir 2010) .

أظهرت نتائج الدراسة هذه أن بكتيريا *P. aeruginosa* هي أحد أهم الأسباب الرئيسة في تكوين أخماج المسالك البولية اذ كانت نسبة عزلها من الادرار(10.49%)، وقد إشارة إلى هذه الحقيقة آنفا Fayroz-Ali (2012) بان بكتيريا *P. aeruginosa* تعد الممرض الانتهازي الرابع المسبب لاخماج

المسالك البولية، و ذكرت دراسة اخرى Al-Fatlawi(2012) ان نسبة العزل من الادرار في مستشفيات مدينة الديوانية (6%) .

من الملاحظ في هذه الدراسة ان للعمر والجنس تأثيراً على الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* والجدول (4-5) يبين توزيع الحالات المرضية على الفئات العمرية المدونة ضمن بيانات المرضى اذ سجلت أعلى معدل اصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* عند الفئات العمرية (**61**<) سنة ، اذ عند جمع عينات اخماج القناة البولية كانت اصابات بكتيريا *P. aeruginosa* تزداد في المرضى كبار السن وخاصة الذين يعانون أمراضاً مزمنة والذين يتناولون الأدوية المُثبِطة للمناعة (Willenbrock & Ussery, 2007) ،اضافة الى ذلك ترتفع نسبة عينات الأذن من المرضى الذين يعانون من التهاب الأذن الوسطى القيحي والاذن الخارجية والذي يزداد عند كبار السن للسبب نفسه الذي ذكر سابقا، كما ان عينات القشع اخذت من الاعمار الكبيرة وهذا الامر مفهوم لأن الاطفال غير قادرين على التقشع العفوي ، اما توزيع الحالات المرضية بحسب جنس المريض اتضح بأن الاناث اكثر إصابة وعرضة لاستعمار بكتيريا *P. aeruginosa* خصوصا في اخماج المسالك البولية والجدول(4-6) يبين مصادر الاصابة موزعة حسب الجنس ويعزى ارتفاع الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* في الاناث الى وجود بكتيريا *P. aeruginosa* كجزء صغير من الفلورا الطبيعية للأمعاء والتلوث البرازي يعد سببا رئيسًاً في احداث هذه الاخماج (Akinloye *et al.*, 2006).

اظهرت الدراسة ارتفاع نسبة الاصابة البكتيرية للمرضى الراقدين في المستشفى والجدول (4-7) يبين مصادر الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* موزعة حسب حالة المرضى لكون بكتيريا *P. aeruginosa* غالبا ما تستوطن المستشفيات استيطانا واسعاً، ويزداد الامر سوءا في حال كون المرضى هم كبار السن ومن ذوي الحالات الحرجة المحتاجين الى القسطرة البولية اضافة الى المرضى الذين يعانون الحروق الشديدة ووحدات العناية المركزة اذ ان البقاء لمدة أطول في المستشفى يزيد من استعمار الجلد والبيئة للمريض وربما تكون مسؤولة عن ارتفاع عدة حالات التهابيه وقد تؤدي إلى مشاكل صحية كامنة للمرضى الراقدين في المستشفى ويكونوا بؤرة استيطانية للبكتيريا المرضية، ولا يمكن عزل الارتباط والعلاقة الشديدة بين المريض وبيئته المادية مما يجعل المريض الراقد من أهم مصادر انتشار البكتيريا في المستشفى و تعد اكثرها هيمنة واعسرها علاجا (Rajalakshmi & Amsaveni, 2012).

جدول (4-5) مصادر الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* موزعة بحسب الفئات العمرية

مصادر الإصابة / الفئات العمرية	التهاب الحروق	التهاب المسالك البولية	التهاب الاذن	التهاب الجهاز التنفسي
10-1	(%10.5)4	(%0.6)1	(%0)0	(%0)0
20-11	(%0)0	(%0)0	(%0)0	(%0)0
30-21	(%5.2)2	(%3)5	(%0)0	(%0)0
40-31	(%5.2)2	(% 1.2)2	(%0)0	(%1.9)1
50-41	(%2.6)1	(%0.6)1	(%2.5)1	(%1.9)1
>61	(%0)0	(%4.9)8	(%10)4	(%11.5)6
المجموع	(%23.6)9	(%10.4)17	(%12.5)5	(%15.3)8

جدول(4-6) مصادر الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* موزعة بحسب الجنس

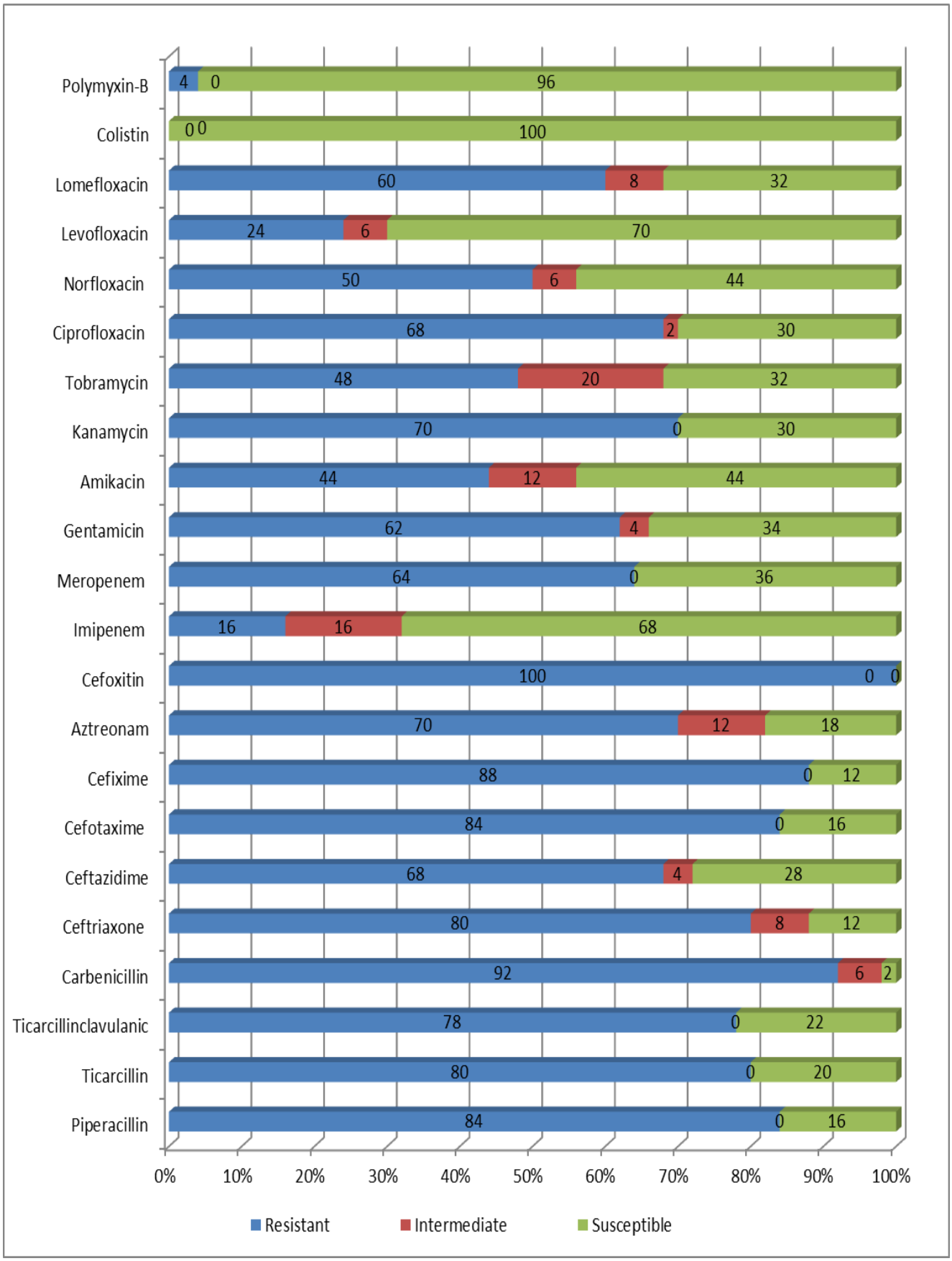
مصادر الإصابة / الجنس	التهاب الحروق	التهاب المسالك البولية	التهاب الاذن	التهاب الجهاز التنفسي
الذكور	(%5.2)2	(%3.7)6	(%7.5)3	(%13.4)6
الاناث	(%18.4)7	(%6.7)11	(%5)2	(%1.9)2
المجموع	(%23.6)9	(%10.4)17	(%12.5)5	(15.3)8

جدول(4-7) مصادر الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* موزعة بحسب حالة المرضى

مصادر الاصابة / حالة المرضى	التهاب الحروق	التهاب المسالك البولية	التهاب الاذن	التهاب الجهاز التنفسي
الراقدين	(%23.6)9	(%6.7)11	(%2.5)1	(%11.5)6
الوافدين	(%0)0	(%3.7)6	(%10)4	(%3.8)2
المجموع	(%23.6)9	(%10.4)17	(%12.5)5	(15.3)8

5.4: اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic Susceptibility Test

أُجري اختبار فحص الحساسية لجميع عزلات *P. aeruginosa* الواردة في الدراســـة تجاه 22 من المضادات الحيوية جدول (4.1.3)وقد اختيرت هذه المضادات الحيوية لشيوع استعمالها في معالجة بعض الاخماج الناتجة عن الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* . والشكل (4-2) يوضح نسب المقاومة والحساسية وما بينهما للعزلات الكلية تجاه المضادات الحيوية المستعملة ،وبالاعتماد على نتائج الفحص (قياس قطر منطقة التثبيط) حول قرص المضاد والتي قورنت مع جداول قياسية بحسب ما جاء في CLSI (2012) .



الشكل (4- 3) المقاومة الكلية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة للمضادات الحيوية

أتضح من الشكل (4-4) والملحق (1-1) أنّ هنالك مقاومة عالية نسبياً أبدتها عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* لمضادات البيتالاكتام، والمتمثلة بالبنسيلينات، مثل مضادي التيكراسيلين والببراسيللين والكربنسيلين ، اذ وجد أن (84%)من العزلات مقاومة لمضاد الببراسيلين وفي دراسة نشرت في الديوانية من قبل حران (2012) كانت نسبة المقاومة (88%)، بينما بلغت نسبة المقاومة للببراسيلين لدراسة اخرى من قبل Al-Shara (2013) (60.5%)، اما بالنسبة لمضادات الكاربوكسي بنسلينات مثل الكربنيسيلين و التيكراسيلين ذات الطيف الأوسع والذين لديهم نشاط ضد *P. aeruginosa* والتي تختلف عن البنسلين في أنها تحتوي على شاردة الكربوكسيل في سلسلة من الجانب الجزيء جعلتها أكثر فعالية لمكافحة البكتيريا سالبة غرام، ويفترض أنها تخترق جدار الخلية الخارجي على نطاق واسع أكثر من البنسلين الأخرى (Williams *et al.*, 1984)،كانت نسبة المقاومة للكربنسيلين وللتيكراسيلين (92%, 80%) على التوالي، أن نسبة المقاومة للكربنسيلين في الدراسة الحالية أعلى من نسبة المقاومة في دراســـة الحسو (2006) (26.9%) وأدنى من دراسة للرماحي (2006) (100%) ، وفي دراسة اخرى وجد Petropoulou وآخرون (2006) أن معدل مقاومة سلالات *P. aeruginosa* للتيكراسيلين المعزولة من مرضى و حدة العناية المركزة (40%) ، وأظهرت النتائج دراسة ايرانية ان(93%) من البكتيريا المعزولة كانت سلالات مقاومة للتيكراسيلين (Ranjbar *et al.*, 2011).

لا تختلف الدراسة الحالية كثيراً عن مثيلاتها في امتلاك عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* لمستويات عالية من المقاومة لمضادات البيتالاكتام المتمثلة بالبنسلينات، ويمكن تفسير مقاومة البكتيريا لمضادات البنسلينليات بالمقاومة الطبيعية (Natural resistance) المعروفة لهذه البكتيريا تجاه البنسلينات (Ibezim, 2005) ، كما أكد Fuda وجماعته (2004) بان المقاومة لهذه المركبات لا تشمل فقط إنتاج إنزيم البنسيلينيز وإنزيمات البيتالاكتاميز وانما يتعدى ذلك إلى إنتاج البروتينات الرابطة للبنسيلين (PBPs) الواقعة في الغشاء السايتوبلازمي المرتبط بجدار الخلية ، وتمتلك هذه البروتينات فعالية إنزيمية مثل الترانسبتايديز والكاربوكسيبتايديز ، وهذه البروتينات تعد هدفاً لكل من المضادات الحيوية (البنسيلينات والسيفالوسبورينات) إذ تعمل على تغيير الهدف وبالتالي تنتج المقاومة البكتيرية لمضادات البيتالاكتام (Livermore and Brown. 2005).

أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى أنّ نسبة المقاومة التي أبدتها عزلات *P. aeruginos* لمضاد تيكارسيلين حامض الكلافيولانك (78%) ، وهو من مضادات البيتالاكتام التعاضدية (تيكراسيلين + حامض الكلافيولانك)، الذي يمتاز بتأثيره الفعال على البكتيريا المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز، إذ إنّ استعمال تيكراسيلين وحده أدى إلى مقاومة عالية من قبل العزلات البكتيرية، لذلك تم زيادة كفاءته بإضافة حامض كلافيولانك، ولا تختلف آلية مقاومة هذا المضاد عن سابقاتة من مضادات البيتالاكتام، إذ تتم مقاومتة من خلال تغير الموقع الهدف، وقد تحدث نتيجة خفض نفاذية المضاد الحيوي عبر غشاء الخلية

البكتيرية (Ryan and Ray, 2004). او امتلاك العزلات قيد الدراسة فعالية انزيمية التي لا تتأثر بالفعل المثبط للكلافولانيت كامتلاكها انزيمات البيتالاكتاميز صنف D، أو قد يعود السبب إلى امتلاك العزلات المذكورة لإنزيمات البيتالاكتاميز المعدنية، أو هذه الأسباب جميعها (Livermore, 2002).

أظهرت الدراسة الحالية أنّ هنالك مقاومة عالية نسبياً أبدتها عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* للجيل الثالث من السيفالوسبورينات المتمثلة بـ سيفترياكسون وسيفتازيديم (80%)و(68%) لكل منهما و (84%)لمضاد سيفوتاكسيم، وهذه النتائج جاءت مخالفة مع ما ذكرته الرماحي (2006) بان نسبة المقاومة لهذين المضادين هي (86.2%) للسيفتازيديم و(34.6%) للسيفترياكسون فيما كانت متفقة مع الباحث نفسه بالنسبة لمضاد سيفوتاكسيم الذي وجد نسبة المقاومة لهذا المضاد (81.9 %) ،ومن الجدير بالذكر أن الدراسة الحالية كشفت عن انخفاض المقاومة للجيل الثالث من السيفالوسبورينات عن ما توصل اليه حران (2012) اذ وجد ان نسبة المقاومة لمضاد سيفتازيديم (96%) و(100%) لمضادي سيفترياكسون و سيفوتاكسيم ، وفي دراسة اجراها Al-Shara (2013) وجد ان نسبة المقاومة للجيل الثالث للسيفالوسبورينات كانت (55.5%) للسيفتازيديم و(60.5 %) للسيفترياكسون و(51.1 %) سيفوتاكسيم، ونشرت دراسة لمرضى العوز المناعي في تونس من قبل Kalai وجماعته (2005) وجد أنّ نسبة المقاومة لمضاد سيفتازيديم (36%) ،اما الباحث Hsueh وجماعته (2005) وجدوا ان زيادة المقاومة تجاه مجموعة السيفالوسبورينات تزداد مع ازدياد استهلاكها .

اظهرت بكتيريا *P. aeruginosa* مقاومة مرتفعة تجاه مضاد الازترونام اذ بلغت (70%) وتعّد مضادات المونوباكتام مثل الازترونام ذات نشاط واسع ضد بكتيريا السالبة لصبغة غرام (Bush, 1996)،وقد اوضحت النتائج اعلاه ان العزلات المدروسة اظهرت احتمالية انتاج انزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف في اختبار الحساسية الدوائية ، اذ افضل دليل على ذلك هو المقاومة التي تبديها البكتيريا تجاه مضادات السيفالوسبورينات الجيل الثالث وتجاه مضاد الازترونام وقد اشار مركز السيطرة على الامراض (CDC) (2007) ان اكثر من (70%) من البكتيريا المسببة للإصابات المكتسبة في المستشفيات هي مقاومة على الاقل لواحد من المضادات الشائعة الاستعمال في علاجها، وبالإشارة إلى نسب المقاومة المرتفعة اعلاه يمكن الاستدلال على مدى خطورة المقاومة لكل من الجيل الثالث من السيفالوسبورينات والمونوباكتام ، وهذه المقاومة تشكل ضغطا دوائيا إذ تعمل على تقليص جدول المضادات الحيوية المقدم إلى المريض وخصوصا السيفالوسبورينات ، كونها تمتاز بتأثيرها الدوائي الفعال في معالجة الاخماج الناتجة عن الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* فضلا عن امتلاك الجيل الثالث من السيفالوسبورينات تأثيرا علاجيا طويل الامد قد يمتد الى ما بعد إيقاف العلاج ، وعموماً فان المقاومة في هذه الدراسة قد تعزى لأسباب عديدة منها إفراز إنزيمات Cephalosporinase المشفّر لها

كروموسومياً(Lopez-Yeste *et al*., 1996) ، وكذلك إنزيمات البيتالاكتاميز ذات الطيف الواسع والمحطمة لمضادات السيفالوسبورين (Fazzeli *et al*., 2012; Angadi *et al*., 2012) .

اشارت الدراسة الحالية الى ان نسبة المقاومة للسيفوكسيتين كانت (100%)، ولاتختلف هذه النسبة كثيراً عن الدراسات الاخرى التي أبدت ارتفاعا في نسب المقاومة للسيفوكسيتين (100%) لكل من الباحثين Al-Muhannak (2010) و حران(2012) واثبتت العـــديد من الدراســـات وجود (90%) من بكتيريا*P. aeruginosa* مقاومة للسيفوكسيتين اذ ترتبط مقاومتها في الغالب بإنتاج انزيمات Ampc سيفالوسبورينيز التي تمتلك اكثر سلالاتها موروثات هذا الانزيم (Crowley *et al* , 2002) .

سجلت *P. aeruginosa* في هذه الدراسة نسبة مقاومة (16%) للمضاد الحيوي الأميبينيم وهو من مجموعة الكاربابينيم ويعّد العلاج الأمثل حالياً للإصابات التي تسببها *P. aeruginosa* ، بينما سجلت النتائج ارتفاعا ملحوظاً في مقاومة عزلات*P. aeruginosa* لمضاد الميروبينيم(64%). وفي دراسة مماثلة أشار Varaiya وجماعته (2007) إلى أنّ نسبة المقاومة لكل من الأميبينيم والميروبينيم كانت (10%) ، وقد ذكر Salimi وجماعته (2009) في دراسته أنّ نسبة مقاومة عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* لمضاد الأميبينيم (30.2%)، ولمضاد الميروبينيم (37.2%)،وفي دراسة نشرت في العراق من قبل بلال (2010) كانت بها نسبة المقاومة لمضاد الأميبينيم (0%) ،اما نسبة المقاومة لمضاد الميروبينيم جاءت مقاربة لما حصلنا عليه ،لذلك فإنّ هذا التباين والازدياد في نسب المقاومة لهذين المضادين يعود إلى التباين في استعمال هذين المضادين، كما يُعدّ مؤشراً خطيراً على تصاعد المقاومة ضد أغلب أنواع المضادات الحيوية الشائعة، وبالنتيجة سوف تتقلص الخيارات العلاجية للإصابات التي تسببها هذه البكتيريا، إذ إنّ السلالة المقاومة لمضادات الكاربابينيم تكون بالنتيجة مقاومة لمضادات البيتالاكتام جميعها ، ماعدا المونوباكتام اذ تمتاز مضادات الكاربابينيم - وخصوصاً الاميبينيم - باستقراريتها العالية، وعدم تأثرها بإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف التي تنتجها البكتيريا، والتي تحلل المضاد الحيوي فتجعله غير فعال(Jacoby and Bush, 2009).

أكدت نتائج الدراسة الحالية وجود ارتفاع ملحوظ في نسب مقاومة العزلات لمضادات الأمينو كلايكوسايد، التي كانت - وإلى وقت قريب - العلاج الأمثل لإصابات *P. aeruginosa*، ففي الوقت الذي كانت نسبة مقاومة العزلات قيد الدراسة للمضاد الحيوي جنتامايسين (62%)، أظهرت تلك العزلات مقاومة معتدلة نسبياً لكل من المضادين الأميكاسين وتوبراميسين (44%) و(48%) على التوالي. وقد يعود سبب هذا التباين في درجة حساسية عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية الثلاثة إلى ثبوتية المضاد الحيوي الأميكاسين والتوبراميسين تجاه الانزيمات المؤثرة على مجموعة الأمينوكلايكوسايد والمتمثلة بالـAminoglycosid acetylase ،كانت هذه النتائج مخالفة لما حصل عليه Masaadeh وJaran (2009)الذي ذكر بأنّ نسبة مقاومة *P. aeruginosa* لكل من مضادي

الجنتاميسين والتوبراميسين (72%) و(69%) على التوالي، في حين جاءت النتائج مقاربة لما دوّنته دراسات محلية سابقة، اذ ذكرت الرماحي(2006)ان نسبة المقاومة للمضاد الحيوي الأميكاسين بين عزلات *P. aeruginosa* المعزولة من اخماج الاذن الوسطى الحاد والمزمن (38%) ، وجاءت نسب المقاومة لدراسة اجراها Al-Shara (2013) (64.8%) للأميكاسين و(87%) ، (77%) لكل من مضادي الجنتاميسين والتوبراميسن على التوالي .

تعود مقاومة بكتيريا *Ps.aeruginosa* لمضادات الأمينوكلايكوسيدات إلى إفراز البكتيريا لإنزيمات Aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) ،إذ وجد Shahid و-Abida (2005) Malic في دراسة أُجريت في الهند أنّ العزلات جميعها قيد الدراسة (49 عزلة) كانت منتجة لأنواع مختلفة من إنزيمات AMEs، ولا سيما إنزيم Aminoglycoside acetylase enzymes-1 AAC (6)، وكانت الجينات المشفرة لهذه الإنزيمات محمولة على بلازميد، وقد تكون مشفرة كروموسوميا (Lopez-Yeste *et al*.,1996)، أو قد تكون المقاومة عبر تغيير نفاذية الجدار، أما مضاد الجنتاميسين فتعود مقاومة البكتيريا تجاهه إلى تغيير نفاذية الجدار وإفراز الإنزيمات المحللة له(CLSI, 2012) .

وبالعودة إلى نتائج دراستنا نجد أنّ المضادات السبروفلوكساسين والنورفلوكساسين والليفوفلوكساسين واللوموفلوكساسين من مجموعة مضادات الفلوروكوينولون التي عرفت بفعاليتها العالية في مقاومة نمو بكتيريا*P.aeruginosa* وقد أظهرت فعالية متوسطة ضد عزلات هذه البكتيريا إذ كانت نسبة المقاومة تجاه المضاد الحيوي سبروفلوكساسين (68%)،التي عرفت بفعاليتها العالية في مقاومة نمو بكتيريا *P.aeruginosa* ، قد تعود المقاومة العالية التي أظهرتها عزلات *P.aeruginosa* تجاه المضاد الحيوي السبروفلوكساسين إلى تزايد استعمال هذا المضاد الحيوي في علاج الإصابات المتسببة عنها في مستشفى الديوانية التعليمي وخصوصاً في شعبة الحروق، الأمر الذي ساعدها على تطوير آليات مقاومة أكثر فاعلية تجاهه ، وهناك بعض الدراسات التي سلطت الضوء على المقاومة العالية لمضادات الفلوروكوينولون منها دراسة Al-Muhannak(2010)، إذ أظهرت نسبة المقاومة للسبروفلوكساسين (40%)،أما بالنسبة للمضادين النورفلوكساسين واللوموفلوكساسين، فقد أظهرت الدراسة الحالية ارتفاعا نسبياً في نسب المقاومة لهما، (50%) و(60%) على التوالي، وكانت هذه النتائج مقاربة لما حصل عليه Al-Shara (2013) أنّ نسبة المقاومة لمضاد النورفلوكساسين (55%) .

اوضحت نتائجنا ان نسبة مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* لمضاد الليفوفلوكساسين (24%) وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما توصل أليه بلال (2010) ان نسبة المقاومة لهذا المضاد (21.6%) ،اذ تمتاز هذه المضادات بقابليتها القاتلة للأحياء المجهرية (Bactericidal) من خلال تثبيط بناء الـDNA اذ تثبط فعالية الـDNA gyrase والذي يعمل على فك الارتباط الحلزوني للـDNA ويضمن تباعدهما عن بعضهما في اثناء عملية استنساخ الـDNA (Turnridge, 1995) اما سبب مقاومة هذه البكتيريا لهذه

المجموعة من المضادات نتيجة لحدوث طفرة في الانزيم الهدف DNA gyrase او بفعل نظام الضخ الخارجي (Efflux pump) (Pode, 2000; Martinela and Baquero 2002) .

استعملت في الدراسة الحالية مجموعة جديدة من المضادات الحيوية المسماة بالبوليمكسينات التي لم يتطرق إليها في الدراسات المحلية السابقة ،وهذه الفئة من المضادات هي ليبوببتايد (Lipopeptide) تم اكتشافها لأول مرة في عام 1950 (Benedict,1947) ،وتعمل هذه المضادات ضد الغشاء الخارجي للبكتيريا سالبة لصبغة غرام تؤدي الى فقدان الغشاء لوظيفته وبالتالي تسرب المكونات الخلوية وموت الخلية (Warunee,2010)، وتعّد البوليمكسين ذات نشاط جيد ضد بكتيريا *P. aeruginosa* اذ كانت نسبة المقاومة للكولستين (0%) والبوليمكسينB (4%) أي أن هنالك عزلتان ظهرت في هذه الدراسة مقاومة للمضاد المذكور وهذا النوع من المقاومة هو تحدي لنجاح الجهود العلاجية المبذولة للتحكم بالانتشار البكتيري .وفي احد الدراسات التي نشرت سنة (2010)من قبل Kalaivani واخرون أظهرت العزلات جميعها قيد الدراسة حساسية عالية للمضاد الحيوي البوليمكسينB بنسبة (100%) ،واجريت دراسة اخرى في هنكاريا اجراها Csilla (2011) والتي من خلالها تم التأكيد على عدم وجود مقاومة واسعة للمضاد الحيوي البوليمكسينB ضمن البيانات الطبية فيما عدا بعض المقاومات المفردة المعزولة من قبل مرضى ثبت تعاطيهم لهذا المضاد لفترات طويلة.

تظهر العزلات البكتيرية في هذه الدراسة تباينا ملحوظا في مقاومتها لمضادات البيتالاكتام والمضادات الاخرى على الرغم من عدم وجود فروق معنوية على المستوى الاحصائي ولكن توجد فروق حسابية وقد يرجع السبب في ذلك الى الاختلاف في مصادر جمع العينات اذ أظهرت العزلات السريرية قيد الدراسة نسب مقاومة اعلى من العزلات البيئية كما موضح في الجدول (4-8) وتعزى هذه الاختلافات إلى احتمالية ارتفاع إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز في العزلات السريرية نسبة الى العزلات البيئية بسبب تعاطي مضادات البيتالاكتام من قبل المرضى التي قد تكون سبباً في تحفيز عملية إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز (Zhang *et al*., 2001). ، والسبب الآخر يعتمد على عوامل الضراوة للبكتيريا ذاتها إذ تظهر بعض العزلات السريرية مقدار من الضراوة أكثر من غيرها وهذا ما اشار اليه Heyman (2004) إذ تؤلف بيئات المستشفيات أفضل مستودعات التلوث البكتيري مهما ارتفعت فيها نسبة العناية والنظافة ، وأكد على ان المريض الراقد حاملاً وناقلاً للبكتيريا ذات المقاومـــة العالية والضراوة العالـــية .

.

جدول (4-8) المقاومة الكلية للعزلات البكتيرية(البيئية و السريرية) قيد الدراسة للمضادات الحيوية

انواع المضادات الحيوية	عدد ونوع العينات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية (%)							
	الادرار n=17	الحروق n= 9	الاذن n=5	القشع n=8	عددالعزلات السريرية المقاومة(%) n=39	الارضية n= 6	الادوات الطبية n= 5	عددالعزلات البيئية المقاومة (%) n=11
Piperacillin	14(82.3%)	9(100%)	5(100%)	7(87.5%)	35(89.7%)	3(50%)	4(80%)	7(63.6%)
Ticarcillin	13(46.4%)	8(88.8%)	5(100%)	6(75%)	32(82%)	5(83.3%)	3(60%)	8(72.7%)
Ticarcillinclavulanic	12(70.5%)	8(88.8%)	4(80%)	7(87.5%)	31(79.4%)	4(66.6%)	4(80%)	8(72.7%)
Carbenicillin	16(94.1%)	9(100%)	5(100%)	8(100%)	38(97.4%)	4(66.6%)	4(80%)	8(72.7%)
Ceftriaxone	12(70.5%)	9(100%)	5(100%)	7(87.5%)	33(84.6%)	3(50%)	4(80%)	7(63.6%)
Ceftazidime	15(88.2%)	9(100%)	5(100%)	7(87.5%)	36(92.3%)	4(66.6%)	4(80%)	8(72.7%)
Cefotaxime	14(82.3%)	9(100%)	5(100%)	7(87.5%)	35(89.7%)	3(50%)	4(80%)	7(63.6%)
Cefixime	16(94.1%)	9(100%)	5(100%)	8(100%)	38(97.4%)	4(66.6%)	2(40%)	6(54.5%)
Aztreonam	10(58.8%)	8(88.8%)	5(100%)	6(75%)	29(74.3%)	4(66.6%)	2(40%)	6(54.5%)
Cefoxitin	17(100%)	9(100%)	5(100%)	8(100%)	39(100%)	6(100%)	5(100%)	11(100%)
Imipenem	1(5.9%)	2(22.2%)	2(40%)	3(37.5%)	8(20.5%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Meropenem	13(46.4%)	6(66.6%)	3(60%)	5(62.5%)	27(69.2%)	4(66.6%)	1(20%)	5(45.4%)
Gentamicin	10(58.8%)	7(77.7%)	4(80%)	6(75%)	27(69.2%)	2(33.3%)	2(40%)	4(36.3%)
Amikacin	3(17.6%)	3(33.3%)	3(60%)	2(25%)	11(28.2%)	6(100%)	5(100%)	11(100%)
Kanamycin	14(82%)	8(88.8%)	5(100%)	7(87.5%)	34(87.1%)	1(16.6%)	0(0%)	1(9%)
Tobramycin	8(47%)	6(66.6%)	3(60%)	2(25%)	19(48.7%)	2(33.3%)	3(60%)	5(45.4%)
Ciprofloxacin	11(64.7%)	9(100%)	3(60%)	8(100%)	31(79.4%)	1(16.6%)	2(40%)	3(27.2%)
Norfloxacin	8(47%)	8(88.8%)	2(40%)	3(37.5%)	21(53.8%)	2(33.3%)	2(40%)	4(36.3%)
Levofloxacin	4(23.5%)	2(22.2%)	2(40%)	4(50%)	12(30.7%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Lomefloxacin	9(52%)	7(77.7%)	3(60%)	6(75%)	25(64.1%)	3(50%)	2(40%)	5(45.4%)
Colistin	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Polymyxin-B	0(0%)	2(22.2%)	0(0%)	0(0%)	2(5.1%)	0(%)	0(0%)	0(0%)

*لا توجد فروق معنوية .

6.4 :المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية:

Multiple-antibiotics Resistance

العديد من التعريفات المختلفة للمقاومة المتعددة للأدوية Multidrug Resistant (MDR) والمقاومة الشاملة للأدوية Extensive-drug resistance (XDR) والمقاومة لكل الادوية المدروسة Pan-drug resistance (PDR) المستعملة في البحوث الطبية على نطاق واسع ولتصنيف المقاومة المختلفة ضد أصناف المضادات الحيوية التي وجدت في وحدات الرعايا الصحية والمستشفيات ، قامت مجموعة من الخبراء الدوليين بأجراء مبادرة مشتركة من قبل المركز الاوربي للوقاية من الامراض والسيطرة عليها European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) ومراكز السيطرة على الامراض والوقاية منها Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ،ولجنة المقاييس المختبرية السريرية Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) لإنشاء مصطلحات دولية موحدة لوصف ملامح المقاومة المكتسبة للبكتيريا الانتهازية المستوطنة في المستشفيات مثل المكورات العنقودية والعائلة المعوية أضافه الى بكتيريا *P. aeruginosa* ،والتي غالبا ما تكون مسؤولة عن العدوى المصاحبة في وحدات الرعايا الصحية والمستشفيات وتعلن عن ارتفاع متزايد للمقاومة ضد المضادات المقدمة للعلاج . لذلك اتفقوا على أن تعريف (MDR) هي المقاومة المسجلة ضد ثلاث أو أكثر من أصناف المضادات الحياتية المستعملة على أن تكون البكتيريا مقاومة مضاد واحد على الاقل ضمن الصنف، أما (XDR) فتعرف على أنها المقاومة المسجلة لكل أصناف المضادات الحياتية في الدراسة عدا صنف واحد أو أثنين من هذه الاصناف على أن تكون مقاومة لمضاد واحد على الاقل ضمن الصنف ،واخيرا (PDR) فهي المقاومة المسجلة لكل أصناف المضادات الحياتية المستعملة في الدراسة، أما ما تبقى فهي مقاومة عادية لا تنتمي لهذه الانواع من المقاومة (Magiorakos *et al*.,2012) .

استعملت في هذه الدراسة 8 من أصناف المضادات الحيوية وشملت (مضادات البنسلينات ومضادات البيتا لاكتام التعاضدية والسيفالوسبورينات والكاربنيم والمونوباكتام والامينوكلايكوسياد والكوينولون والليبوبتايد) ووزعت عزلات الدراسة كما موضح في الجدول (4-6) والملحق (1-1) على الانواع الثلاث للمقاومة حيث شكلت العزلات ذات المقاومة المتعددة نسبة 22 (44%) اذ كانت المقاومة موزعة من 3-5 أصناف من المضادات الحياتية .

جدول (4-9) توزيع العزلات بين انواع المقاومة والنسب المئوية لها

نوع المقاومة	رمز العزلة	عدد العزلات المقاومة	النسبة المئوية
*MDR	PA2,PA3,PA6,PA9,PA10,PA11 PA12,PA15,PA16,PA17,PA26 PA27,PA34,PA38,PA40,PA41 PA42,PA43,PA45,PA46,PA47 PA48	22	(%44)
*XDR	PA1,PA4,PA5,PA7,PA8,PA13 PA14,PA19,PA20,PA12,PA23 PA24,PA25,PA28,PA29,PA30 PA31,PA32,PA33,PA35,PA37 PA38,PA39,PA44,PA49,PA50	26	(%52)
*PDR	PA22,PA18	2	(%4)

* (MDR) = Multidrug Resistant ، (XDR) =Extensive-drug resistance ، (PDR) = Pan-drug resistance

كل عزلات *P. aeruginosa* قيد الدراسة كانت ذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية ، وقد وثقت هذه الانواع ذات المقاومة المتعددة في دراسات سابقة ، (Al- Shara;2013) ، ويعود سبب المقاومة المتعددة لبكتيريا *P.aeruginosa* إلى امتلاكها الكثير من آليات المقاومة مثل إنتاج الإنزيمات – β lactamase، وAminoglycoside modifying enzymes، وامتلاكها لآلية الضخ الخارجي (Efflux pump)، وغيرها من الآليات التي قد تعمل معاً مسببة ظاهرة MDR. (Poole, 2000; Dekeivit *et al*., 2001 ; Martinez and Baquero, 2002; Pournaras *et al*., 2005; Shahid and AbidMalik; 2005.

إنّ الارتفاع الملحوظ في نسبة عزلات *P. aeruginosa* ذات المقاومة المتعددة في مستشفى مدينة الديوانية يُعد مؤشراً على تفشّي السلالات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية، مما يؤدي بالنتيجة إلى احتمالية فشل العلاجات المتوافرة حالياً في علاج الإصابات التي تسببها هذه البكتيريا، لذلك فأن هنالك حاجة للتأكيد على الاستعمال الامثل للمضادات الميكروبية والحد من الاستعمال العشوائي للمضادات .

وشكلت العزلات ذات المقاومة الشاملة نسبة 26(52%) وتمثل اعلى نسبة بين الانواع الثلاث للمقاومة وبالإشارة إلى ما سبق يمكن الاستدلال على مدى خطورة ارتفاع نسبة هذه العزلات لأنه من الممكن عد العزلات المدروسة مقاومة على الأقل الى (7-6)من أصناف المضادات الحيوية ، تكمن خطورة سلالات XDR في توطنها داخل المستشفيات وسرعة انتشارها وارتفاع نسبة مقاومتها وتحولها إلى سلالات PDR ، ولوحظ ان العديد من العوامل المتداخلة التي قد تزيد من نسبة خطورتها ولاسيما مناطق الاستيطان لهذه السلالات وخاصة الأشخاص الراقدين في المستشفى وجدول المضادات الحيوية المقدم للمريض وهذه العوامل قد تتفاعل فيما بينها منتجة سلالات ذات إمراضية ومقاومة عالية ، تشكل بذلك ضغطا دوائيا و تعمل على تقليص جدول المضادات الحيوية المقدم إلى المريض.

اما النوع الثالث من المقاومة فسجل نسبة 2(4%) وتمثل العزلتان المقاومتان لكل أصناف المضادات الحيوية المدروسة وبالرجوع الى بيانات المرضى قيد الدراسة ومتابعة كلتا الحالتين وجد أن الحالة الاولى وهي أنثى تبلغ من العمر 28 سنة وكانت مصابة بحروق من الدرجة الثانية راقدة في المستشفى وفارقت الحياة بعد أحدَ عشرَ يوماً وتحمل العزلة(**PA18**) ،أما الحالة الثانية والتي تحمل العزلة **(PA22)** فقد كان ذكرًاً يبلغ من العمر 9 سنوات وكان مصاباً بحروق من الدرجة الثانية راقداً في المستشفى وفارق الحياة بعد أسبوعين ، كانت العزلتان PA18 و PA22 مقاومة لكل أصناف المضادات الحياتية قيد الدراسة الحالية عدى الكولستين كما في الجدول (4-10) لذلك عُدت هذه العزلات PDR. ويعزى سبب المقاومة التي أبدتها هاتان العزلتان لكل المضادات المستعملة في هذه الدراسة كونها عزلات من عينات الحروق كانت لمصابين راقدين في المستشفى لتلقي العلاج فان هذا يؤكد بأن بيئة المستشفيات تستوطن بها انواع من البكتيريا الانتهازية المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية التي يشيع استعمالها ، وأن هذه المقاومة تزداد طرديا مع الوقت على أثر الاستعمال الكبير وبشكل متكرر وهذا ما ساعد البكتيريا على تطوير آليات مقاومة مختلفة منها إنتاج البكتيريا لعدد كبير من إنزيمات البيتالاكتاميز المحطمة لهذه المضادات (VanDelden and Iglewski, 1998) . و قد تفسر نتيجة الدراسة الحالية للعزلتين المقاومة للبوليمكسين B بإمكانية حدوث طفرات وراثية او وجود جينات قافزة حاملة لصفة المقاومة او عن طريق حدوث تغيرات بالجدار الخلوي الحساس للمضاد الحيوي والمتمثلة بزيادة سمك الجدار او احاطة نفسها بغشاء مخاطي او الطبقة اللزجة التي تنتجها بشكل كبير او عن طريق تكوين انواع جديدة من انزيمات PBPS مما يؤدي الى تقليل الفة الارتباط بالمضادات التي تستهدف جدار الخلية (Reipert *et al*., 2003; Melo *et al*., 2005; Goldstein , 2006) .

جدول (4-10) العزلتان المقاومتان لمضاد Polymyxin B والمضادات الحيوية الاخرى

التسلسل	انواع المضادات الحيوية	PA18	PA22
1	Piperacillin	R	R
2	Ticarcillin	R	R
3	Ticarcillinclavulanic	R	R
4	Carbenicillin	R	R
5	Ceftriaxone	R	R
6	Ceftazidime	R	R
7	Cefotaxime	R	R
8	Cefixime	R	R
9	Aztreonam	R	R
10	Cefoxitin	R	R
11	Imipenem	R	R
12	Meropenem	R	R
13	Gentamicin	R	R
14	Amikacin	R	R
15	Kanamycin	R	R
16	Tobramycin	R	R
17	Ciprofloxacin	R	R
18	Norfloxacin	R	R
19	Levofloxacin	R	R
20	Lomefloxacin	R	R
21	Colistin	S	S
22	Polymyxin B	R	R

PA18 :

- **الجنس –أنثى**
- **العمر- 28 سنة**
- **الاصابة – حرق من الدرجة الثانية**
- **راقدة في شعبة الحروق /مستشفى الديوانية التعليمي فارقت الحياة بعد أحدى عشر يوم من الاصابة**

PA22 :

- **الجنس –ذكر**
- **العمر- 9 سنة**
- **الاصابة – حرق من الدرجة الثانية**
- **راقد في شعبة الحروق /مستشفى الديوانية التعليمي فارق الحياة بعد أسبوعين من الاصابة**

7.4:انتشار إنزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز في عزلات بكتيريا *P. aeruginosa*

Incidence of OXA β–lactamases enzymes in *P. aeruginosa* Isolates .

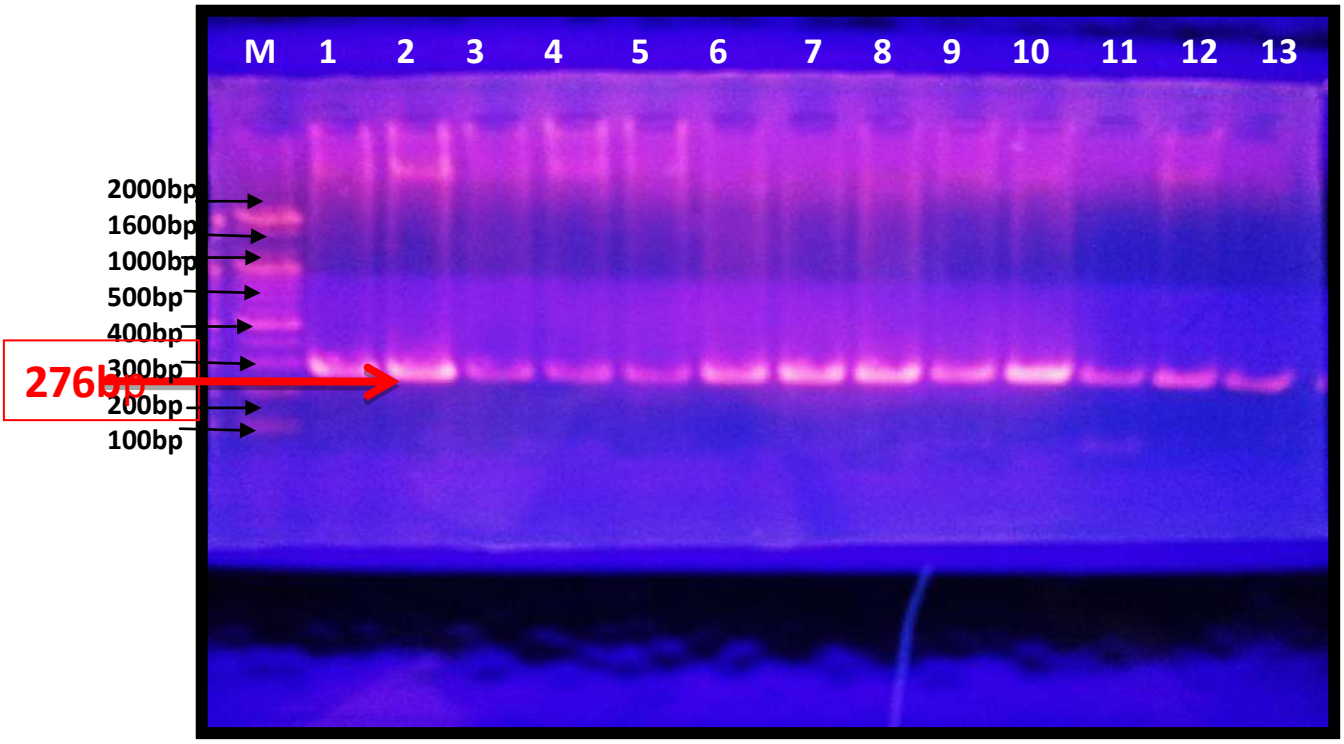
نظراً لعدم توافر معلومات عن مدى تواجد وتكرار إنزيمات الـOXA بيتا لاكتاميز في العزلات السريرية والبيئية لبكتيريا *P. aeruginosa* التي تستوطن المستشفيات في العراق بصورة عامة ومدينة الديوانية بصورة خاصة، ارتأت الدراسة الحالية التحري عن قابلية 50 عزلة *P. aeruginosa* على إنتاج إنزيمات الـOXA بيتالاكتاميز واسعة الطيف (ESBLs) باستعمال تقنية سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة PCR، ومن خلال استعمال قطع من DNA ذات عدد محدود من النيوكليوتايدا تعمل بادئات متخصصة (Oligonucleotid) لمورثات الـOXA بيتالاكتاميز،والتي شملت مورثات bla_{OXA-10} , bla_{LCR-1} bla_{OXA-2}, bla_{OXA-1}, bla_{OXA-18}، كما اعتمدنا على مستخلص DNA لبكتيريا *P. aeruginosa* والذي حصلنا عليه باستعمال العدة المستعملة له .

يبين الشكل (4-4) والجدول (4-11) احتواء عزلات *P. aeruginosa* قيد الدراسة المورث bla_{OXA-10} بواقع 50/50(100%) شملت العزلات التي مصدرها عينات بيئية 11/11بنسبة (100%) و التي مصدرها عينات سريرية 39/39 بنسبة (100 %)، ومن ملاحظة النتائج أعلاه، نجد أنّ نسبة تكرار المورث bla_{OXA-10} هي الأعلى بين عزلات *P. aeruginosa* قيد الدراسة،وقد تم تحديد المورث bla_{OXA-10} في العزلات البكتيرية لأول مرة في مدينة الديوانية وينتمي انزيم OXA-10 بيتالاكتاميزالى OXA group I وتمتلك هذه الانزيمات قدراً كبيراً من التغايرات في تسلسل الحوامض الأمينية (Pai *et al*., 2001).ولذلك نجد العديد من الانزيمات المشتقة من انزيم OXA-10 بيتالاكتاميز وهي: - OXA 11، 14- OXA ، 16- OXA ، 17- OXA، 74- OXA وتعّد هذه الانزيمات متطورة من انزيم OXA-10 بيتالاكتاميز لكي تحمل صفة المقاومة للعديد من المضادات الحياتية (Bert ,2002) وهذا ما يفسر انتشار المقاومة للمضادات الحياتية أذ يمنح انزيم OXA-10 بيتالاكتاميز مقاومة ضد السيفوتاكسيم، السيفترياكسون اضافة للسيفتازيديم الذي بينت الدراسات السابقة أن المقدار الاكبر من انزيمات OXA البيتالاكتاميز تمنح مقاومة له باستثناء 17- OXA المشتق من OXA-10 فتكون مقاومته ضعيفة للمضاد نفسه (Dane et al ., 1999) وكما يبين الشكل (4-2) أنّ (68%) من عزلات *P. aeruginosa* كانت مقاومة للسيفتازيديم، وأيضاً (84%),(80%) بالنسبة للسفوتاكسيم والسفتراكسون، وهذه النتيجة تبين أنّ آلية إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز تشكل واحدة من أهم آليات المقاومة لدى عزلات *P. aeruginosa* قيد الدراسة.

نشرت دراسة في العراق من قبل Al-Muhannak(2010) بأن **(4)**عزلات من بكتيريا *P. aeruginosa* من مجموع (17)عزلة من العصيات السالبة لصبغة غرام الاخرى جميعها حاملة للمورث

bla_{OXA} المنتج لانزيم OXA ولاحظ بان هذه العزلات الحاملة للمورث المذكور كانت جميعها ذات مقاومة متعددة للأدوية ولعدم توافر دراسة سابقة لانزيمات OXA بيتالاكتاميز ومجاميعها في المنطقة للمقارنة ،قورنت النتائج التي حصلنا عليها مع دراسات ذات صلة أُجريت في دول العالم ومنها دراسة في كوريا من قبل Seungok وجماعته (2005) أذ بلغت نسبة تردد المورث bla_{OXA-10} بين عزلات *P. aeruginosa* (13.1%) ، في ما يرى Fereshteh واخرون(2010)في دراسته أنّ هذا المورّث يتردد بشكل كبير بين عزلات *P. aeruginosa* في مستشفيات ايران إذ كانت نسبة تواجده (92.7%) ، أما Fatma وجماعته (2012) فتوصلت في دراستها الى أن نسبة تكرار إنزيم OXA-10 بين 14 عزلة سريرية لبكتيريا *P.aeruginosa* ذات مقاومة متعددة (MDR) (57%) .

كانت نتائج الدراسة الحالية التي كشفت عن تواجد إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف نوع OXA-10في عزلات لبكتيريا *P. aeruginosa* بنسبة (100%) والتي حصلنا عليها من مستشفى الديوانية التعليمي هي الأولى من نوعها ، و إنّ إنتشار هذه الإنزيمات يصبح سهلاً بوساطة البلازميدات والعناصر المتنقلة الأخرى بين عزلات *P. aeruginosa* ، و لهذه المعلومات أهمية في المختبرات السريرية التي ربما تفتقر إلى التعرف على هذا الإنزيم مما يعرض العلاج الكيموحيوي بالمضادات الحيوية للفشل، وإنّ هذا الاكتشاف يؤكد أنّ *P. aeruginosa* ربما تصبح مصدراً كامناً لمورّثات OXA-10.



الشكل (4-4): الترحيل الكهربائي لمورث bla_{OXA-10} المتضاعفة باستعمال تقنية ألـ (PCR) لعزلات *P. aeruginosa* من (1-13) عزلة.

جدول (4-11) النسب المئوية لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف نوع OXA في بكتريا *P. aeruginosa*

مصدر العزل	عدد العزلات	bla_{OXA-10}	bla_{OXA-2}	bla_{OXA-1}	bla_{OXA-18}	bla_{LCR-1}
الإدرار	17	(%100) 17	0(%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)
الحروق	9	(%100) 9	(%0.0)0	0 (%0.0)	0 (%0.0)	0 (%0.0)
القشع	8	(%100)8	(%0.0)0	0(%0.0)	0(%0.0)	0(%0.0)
الاذن	5	(%100)5	(%0.0)0	(%0.0)0	(%0.0)0	(%0.0)0
الارضية	6	(%100)6	(%0.0)0	(%0.0)0	(%0.0)0	(%0.0)0
الادوات الطبية	5	(%100)5	(%0.0)0	(%0.0)0	(%0.0)0	(%0.0)0
المجموع	50	(%100)50	(%0.0)0	(%0.0)0	(%0.0)0	(%0.0)0

أشارت الدراسة الحالية إلى أنّ العزلات جميعها لم تعطِ ناتج تضخيم للمورثات bla_{LCR-1}, bla_{OXA-18}, bla_{OXA-1}, bla_{OXA-2} ، وهي من إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف المكتشَفة حديثاً، ومورثاتها تحمل على بلازميدات كبيرة (Fatma *et al*., 2012) .

وتُعدّ هذا الإنزيمات سائدة في سلالات *P. aeruginosa* ضمن مناطق جغرافية معينة تنتشر عالمياً،ففي دراسة اجراها Bert واخرون (2002) في فرنسا بأنّ أكثر المورثات انتشاراً من بين العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* كانت bla_{OXA-2}, bla_{OXA-1}, bla_{OXA-10} بنسبة تردد 13.5 ،4.6، 26.3 على التوالي ، ولكنها كانت متطابقة فقط مع نتائج الدراسة الحالية من ناحية عدم امتلاك العزلات جميعها للمورثات bla_{LCR-1}, bla_{OXA-18} وقد يعود سبب عدم اكتشافه في العزلات قيد الدراسة يعود إلى عدم امتلاك العزلات للمورث المطلوب وذلك لأن دراستنا كانت على مجال ضيق واقتصرت على مستشفى الديوانية التعليمي ، اما النتائج التي توصلت اليها دراسة أُجريت في كوريا من قبل eungokوجماعته

(2005) أن نسبة تردد المورثين bla_{OXA-2} ,bla_{OXA-1} (2.3%)،(4.3%) على التوالي . وفي دراسة اخرى في ايران Fereshteh واخرون(2010) بلغت نسبة تردد المورث bla_{OXA-1} (70.7%) كما أشارت دراسة في تركيا إلى امتلاك العزلات للمورث bla_{OXA-2} بالنسبة نفسها تردد bla_{OXA-10} بين عزلات *P. aeruginosa* ذات المقاومة المتعددة (Fatma *et al*., 2012).

إنّ آلية إنتاج إنزيمات بيتالاكتاميز واسعة الطيف تُعدّ من أهم آليات المقاومة التي تم اكتشافها في العصيات السالبة لصبغة غرام. وقد أُجريت كثير من الدراسات لهذه الإنزيمات مستعملة تقنية سلسلة تفاعل إنزيم البلمرة (PCR) التي استُعملت في الدراسة الحالية والتي تمتاز بدقتها الشديدة وحساسيتها العالية للتحري عن العوامل الوراثية التي تسيطر على إنتاجها، ان معرفة العوامل المسببة للمقاومة المضادات الحيوية من الممكن ان تفتح آفاقاً جديدة لاكتشاف علاجات كيماوية تؤثر في هذه العوامل المسيطرة على المقاومة وبالتالي تحويل سلالات ذات المقاومة العالية الى سلالات حساسة .

1.5 الاستنتاجات Conclusions :

1- أظهرت الدراسة أن بكتيريا *P. aeruginosa* مسؤولة عن اخماج مرضية مختلفة ونسب اصابة عالية بين المرضى اضافة الى انتشارها بين البيئات الرطبة في مستشفى الديوانية التعليمي.

2- أظهرت عزلات *P. aeruginosa* جميعها قيد الدراسة صفة تعدد المقاومة (PDR،XDR،MDR) بسبب سوء استعمال المضادات الحيوية مما يشكل تحديا علاجيا كبيرا.

3- احتواء عزلات *P. aeruginosa* جميعها على مورثة 16 s-ribosomal RNA التشخيصيَّة المصممة في هذه الدراسة .

4- أظهرت تقنية تفاعل إنزيم البلمرة PCR قدرة عزلات *P. aeruginosa* جميعها على إنتاج إنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف نوع OXA-10 .

2.5 التوصيات Recommendation:

1- إجراء المسح الدوري للمستشفيات لمعرفة مستوى التلوث البكتيري ومصادره وتحديد مستوى المقاومة للمضادات الحيوية .

2- التأكيد على استعمال المضادات الحيوية عند الحاجة القصوى ،و اعتماد فحص الحساسية الدوائية في مختبرات مستشفى الديوانية التعليمي و المستشفيات الأخرى في العراق.

3- استعمال مضادات الأمييينيم والليفوفلوكساسين والبوليمكسين Bوالكولستين كخيار علاجي للإصابات الناتجة عن *P. aeruginosa*.

4- ضرورة استعمال اختبار تفاعل المتسلسل المتبلمر (PCR) في تشخيص انواع إنزيمات البيتالاكتاميز لما لها من دور في رصد المقاومة للمضادات الحيوية و للحد من انتشارها .

5- استعمال تقنية (RTPCR) لتحديد التعبير الجيني لإنزيمات البيتالاكتاميز المنتجة من قبل بكتيريا *P. aeruginosa*

المصادر العربية

- الحسو،محمود زكي سليمان سلطان.(2006). استخلاص وتنقية انزيمات البيتالاكتاميزمن بعض العصيات السالبة لصبغة كرام المعزولة من اصابات الجهاز التنفسي السفلي ودراسة بعض خصائصها. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم جامعة الموصل.
- الرماحي، سيوف خومان علوان.(2006). دراسة مايكروبية ومناعية على بعض المسببات المرافقة لخمج الاذن الوسطى في محافظة القادسية. اطروحة دكتوراه. كلية التربية-جامعة القادسية.
- بلال، الهام جواد كاظم.(2010). التحري عن بعض انزيمات البيتالاكتاميز في العزلات السريرية لبكتريا الزوائف الزنجارية في مدين النجف. رسالة ماجستير، كلية الطب، جامعة الكوفة.
- حران، عمر حسين (2012). التحري عن جينات المقاومة لمضادات البيتالاكتام من البكتريا المعزولة من بعض الاصابات السريرية في محافظة الديوانية. رسالة ماجستير، كلية العلوم - جامعة القادسية.
- منحر،لمى فؤاد (2011) . دراسة بعض الجوانب الفسلجية والوراثية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من حالات سريرية في مدينة الديوانية . رسالة ماجستير، كلية التربية- جامعة القادسية.

المصادر الانكليزية

- Akinloye, O.;Ogbolu, D.O.;Akinloye, O.M. and TerryA.O.A. (2006). Asymptomaticbacteriuria of pregnancy in Ibadan, Nigeria: a re-assessment.Br. J.
- Alekshun, M. N. and Levy, S. B. (1997). Mini review: Regulation of chromosomaly mediated multiple antibiotics resistance. Antimicrobial agents chemotherapy, 41:2067-2075.
- Al-Fatlawi, A. F .,(2012). Detection of Some Extended Spectrum Beta-Lactamases Genes in Escherichia coli & Klebsiella spp. Isolated from Colon and Bladder Cancer Patients in Al-Diwaniya City . M.Sc. Thesis. College of Medicine. Al-Qadisiya University.
- Al-Muhannak,F.H.,(2010). Spread of Some Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Clinical Isolates of Gram-Negative Bacilli in Najaf. M.Sc. Thesis. Collegeof Medicine. University of Kufa.
- Al-Shara,J.M(2013). Phenotypic and Molecular Detecting of Carbapenem Resistant*Pseudomonas aeruginosa* in Najaf Hospitals. M.Sc. Thesis. Collegeof Medicine. University of Kufa.
- Ambler,R.P. (1979).Amino acid sequences of β-lactamases. In: Hamilton-Miller,J.M.T. and Smith,J.T. (eds). "Beta-Lactamases". Academic Press Inc., London , U.K. ,pp.: 99-125.
- Angadi, K.M.; Kadam, M.; Modak, M.S.; Bhatavdekar, S.M.; Dalal, B.A.; Jadhavvar S.R.; Tolpadi, A.G.;Thakkar, V. and Shah, S.R.(2012). Detection of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates with Special Reference to Metallo -Lactamases from A Tertiary Care Hospital in Western India. Inter.J.Microbiol Res.,4(7):295-298.

- Anjum, F. and Mir,A.(2010).Susceptibility pattern of *pseudomonas aeruginosa* against various antibiotics. African J. Microbio. .Res., 4(10):1005-1012.
- Ansell, A. and Hawthrone, D.; (2008). Separation and characterization of lecithinase in *Pseudomonas aeruginosa* . J. Biochm . 84:179-191 .
- Arora S.and Bal M.(2005). AmpC β-lactamases producing bacterial isolates from Kolkatta hospital. India J. Med. Res, 122: 242-333.
- Baron, E.J. and Finegold, S.M. (1990).Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology .(8th ed.) Mosby . USA .
- Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. and Truck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Path. 36: 493-496.
- Benedict RG, Langlykke AF. The antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. J Bact 1947; 54: 24.
- Bennett P. M. (1999). Integrons and gene cassettes, a genetic construction kit for bacteria. Antimicrob Agents Chemother, 43: 1-4.
- Bert F, Branger C, Zechovsky NL. (2002). Identification of PSE and OXA b-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother; 50:11–8.
- Bou, G., A. Oliver, and J. Martı´nez-Beltra´n. 2000. OXA-24, a novel class D-lactmase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob. Agents Chemother. 44:1556–1561.
- Bradford, P.A. (2001). Extended-spectrum β-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev. 14: 933-951.

- Brooks, G.F.; Butel, J.S.; and Morse, S.A. (1998). Antimicrobial chemotherapy, In: Medical microbiology. (21ed). Typo Press. Lebanon.

- Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2007). Enteric Gram-negative rods(*Enterobacteriaceae*). In Brooks G.F.; Butel, J.S.; Morse, S.A.; Jawetz, Melnick, and Adelberg s Medical Microbiology. 24th ed. McGraw-Hill, USA.

- Bukharie, H. A. and Mowafi, H. A.(2010). Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* and Antibiotic Use in King Fahd Hospital of the University in Khobar, Saudi Arabia. Scientific Journal of King Faisal University. Basic and Applied Sc.,11(1):14-31.

- Bush, K., and R.B. Sykes. (1982). Interaction of new β-lactams with β-lactamases and β- lactamases-producing gram-negative rods, p.47-63. In H.C. Neu (ed.), New β-lactam antibiotics: review from chemistry to clinical efficacy of new cephalosporins. College of Physicians of Philadelphia, Philadelphia.

- Bush, K.; Jaoby, G.A. and Medeiros, A.A. (1995). a functional classification scheme for β-lactamses and it's correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39 (6): 1211-1233.

- Bush, K. (1997). The evolution of β-lactamase . Ciba Foundation Sympos - ium 207 :152-166.

- Cavallo, J. D.; Plesiat, P.; Couetdic, G.; Letlanc, F. and Fabe, R. (2002). mechanisms of β- lactamase resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Prevalence of OprM-overproducing strains oin a French multicentre study .(1997). J. Antimicrobial Chemotherapy. 50: 1039 – 1043.

- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2001). Methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* skin of soft tissue infections in a state prison–Mississippi, 2000. Morb. Mortal. Wkly. Rep., 50: 919 – 922.
- Clark, M., (2006) . Role of cell wall degrading enzymes in Pathogenicity of bacteria . Rev. Iberoam. Microbiology. 17:547-553 .
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2012). Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 23th Information Supplement 33(1). Wayne, Pannsylvannia, USA.
- Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmiom, B. P. and Simmon, A. (1996). Mackie and McCarteny, Practical Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone inc.; USA.
- Collee, J.G., Marmion, B.P, Fraser, A.G. and Simmons, A.(1996). Mackie & McCarthy–Practical Medical Microbiology. 4th ed., Longman Singapore Publishers (Pte) Lt. Singapore pp 361 – 381.
- Cornelis , P. (2008) . *Pseudomonas* : Genomics and Molecular Biology . 1st ed. Caister Academic Press.
- Cover, M.N. (2006). Molecular detection of three types of pyocin from *Pseudomonas aeruginosa* J. Biol. Chem, 270:8920-8927 .
- Costa, D. L. M.; Coelho, J. M. ; Souza, H.M. ; Castro, M. S.and Stier, C. J. N.(2003). Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. J.Clin. Microbiol., 41:3403- 3406.
- Crowley, D., Daly, M., Lucey, B., Shine, P., Collins, J. J., Cryan, B., Moore, J. E,Murphy, P., Buckley, G. and Fanning, S. (2002). Molecular epidemiology of cystic fibrosis-linked *Burkholderia cepacia* complex isolates from three national referral centres in Ireland. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 992-1004 .

- Csilla, R.(2011). Characterization of medically important *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Institute of Clinical Microbiology Faculty of Medicine University of Szeged.
- Dale, J. W., Godwin, D., Mossakowska, D., Stephenson, P. & Wall, S. (1985). Sequence of the OXA-2 β -lactamase: comparison with other penicillin-reactive enzymes. FEBS Letters 191, 39–44.
- Damien Ferguson(2007). A study of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* and the investigation ofantibiotic resistance mechanisms in themultidrug resistant strain PA13, Dublin City University,Dublin 9,Ireland.
- Danel, F., Hall, L. M. C., Duke, B., Gur, D. & Livermore, D. M. (1999). OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β-lactamase, isolated from Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43, 1362–1366
- De keivit, T. R.; Parkins, M. D.; Gillis, R. J.; Srikumar, R.; Cevi, H.; Poole, K.; Iglewski, B. H. and Storey, D. G. (2001). Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob. Agents. Chemother, 45 (6): 1761 – 1770.
- DeMiguel Martinez, I.;Del Rosario Quintana, C.; Bolanos, Rivero, M. and Ramos Macias, A. (2005). Aetiology and therapeutic considerations in chronic otitis media. Analysis of a 5 years period. Acta. Otorrinolaringol. Esp. 56 (10): 459 – 462.
- Doggett, R.G. (1979). *Psudomonas aeruginosa* Clinical manifestation of inf ection and current thearapy Academic press , New York .
- Ekrami, A. and Kalantar, E.(2007). Bacterial infections in burn patients at a burn hospital in Iran Alireza Ekrami. Indian J. MedRes., 126:541-544.

- Fatma BUDAK1, Murat KASAP2, Fetiye KOLAYLI1, Aynur KARADENİZLİ1, Mustafa Haluk VAHABOĞLU3. (2012). Integron-associated resistance genes among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens; 42 (1): 149-156 .
- Fayroz-Ali, J. M. H.(2012). Detection of Quinolone Resistance Genes in *Escherichiacoli* Isolated from Patients with Significant Bacteriuria in Najaf Province.Ph.D. Thesis. Sc.University of Babylon.Iraq.
- Fazzeli, H.; Akbari,R.; Moghim,S.; Narimani,T.; Arabestani, M.R. and Ghoddousi,A.R. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients, hospitalmeans, and personnel s specimens. J. Res. Med. Sci.,17(4): 332-7.
- Fereshteh Shacheraghi, Mohammad Reza Shakibaie, Hanieh Noveiri. (2010) . Molecular Identification of ESBL Genes *bla*GES-1, *bla*VEB-1, *bla*CTX-M *bla*OXA-1, *bla*OXA-4, *bla*OXA-10 and *bla*PER-1 in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Burn Patients by PCR, RFLP and Sequencing Techniques. International Journal of Biological and Life Sciences 6:3.
- Fergie, J.E.; Shama, S.J.; Lott, L.; Crawford, R. and Patrick, C.C.P. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in immunocompromised children: analysis of factors associated with a poor outcome. Clin. Infect. Dis., 18: 390-394.
- Flamm R.K.; Weaver R. K.;Thornsberry C, *etal*. (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.

- Forbes, B. A.; Saham, D. F. and Weissfeld, A. S. (1998). Infections of urinary tract. In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 10th ed. Mosby Inc., St. Louis, P: 350. USA.
- Fournior, B. and Philpott, D. (2005). Recognition of *Staphylococcus aureus* by the in nate immune system . Clinical Microbiol., Reviews . 18(3):521-540
- Fuda, C.; Suvorov, M.; Vakulenko, S. B.; and Mobashery, S. (2004). The basis for resistance to beta – lactam antibiotics by penicillin binding protein 2a of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem., 279: 40802–40806.
- Garau, G.; Garcia-Saez, I. and Bebrone, C. *et al.* (2004). Update of the standard numbering scheme for class B β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 48: 2347-2349.
- Gaynes, R. and Edwards, J. R. (2005).Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli.Clin. Infect. Dis. 41, 848- 854 .
- George, A.; Krivoshein, Y.D.; and Pichon, N. (2005). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in the clinical Libratory. J. of medical Microbiol., 2:9-16 .
- Ghuysen,J.M. (1979). Interaction between β-lactam antibiotics and the enzymes of the wall peptidoglycan crosslinking system . In: Hamilton-Miller,J.M.T. and Smith,J.T. (eds). "Beta-Lactamases". Academic Press Inc., London , U.K. ,pp.: 181-204.
- Giuliani, F.; Docquier, J.D.; Riccio, M.L.; Pagani, L. and Rossolini, G.M. (2005). OXA-46, a new class D β-lactamase of narrow substrate specificity encoded by a bla_{VIM-1}-containing integron from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrobial Agents Chemother., 49: 1973-1980.

- Gladstone P, Rajendran, P. and. Brahmadathan, KN. (2005). Incidence of carbapenem resistant non fermenting gram negative bacilli from patients with respiratory infections in the intensive careunit. Indian J Med Microbiol, 23: 189-191.

- Golemi, D., Maveyraud, L., Vakulenko, S., Samama, J. P. and Mobashery, S. (2001). Critical involvement of a carbamylated lysine in catalytic function of Class D - lactamases. *Biochemistry*, 98, 14280-14285.
- Gourlay , D.M. and Gibran , N.S. (2005) . Treatment and prevention of infections in patients with burn- injury. Current Treatment Options in infections diseases , 4:411-426 .
- Greenwood, D.; Slack, R. and Peutherer, J. (1998). Medical Microbiology. 15th Ed. Churchill Livingstone.

- Greenwood, D.; Finch, R.; Davey, P. and Wilcox, M. (2007). Antimicrobial chemotherapy. Oxford University Press, New York.

- Greer ND, (2006).Tigecycline (tygacil): the firstin the glycylcyclineclass of antibiotics.proc, (Bayl univ med cent). 19 (2): p: 155-61.

- Hagen, G.W.; Poirel, L.and Nordmann, P. (2003).Ambler class A extendedspectrum - β -lactamase in Pseudomonas aeruginosaaeruginosa: novel development and clinicalimpact. Antimicrob. Agents Chemother., 47:2385-92.
- Hall, L. C. M., Livermore, D. M., Gur, D., Akova, M. & Akalin, H. E. (1993). OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10(PSE-2) - lactamase from Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 37, 1637–44.

- Harada, S., Ishii, Y. and Yamaguchi, K.(2008). Extended-spectrum β-lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy Korean J. Lab. Med., 28:401-412.

- Hasegawa, M.; Kobayashi, I.; Saika, T. and Nishida, M. (1996). Drug – resistance patterns of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in regard to their lipopolysaccharide – chain sizes. Kansenhogaku. Zasshi. 70 (6): 605 – 612.

- Henry, F.; Chambers, M. D. (2001). Beta-lactam Antibiotics and Other Inhibitors of Cell Wall Synthesis. 8th (ed.) P. 754 – 774. In Bertram, G.; Katzung, M. D. Basic and Clinical Pharmacology. Lang Medical Book/McGraw-Hill, Inc.

- Heyman, D. (2004). Control of Communicable Diseases Manual. 18th ed. Washington D.C. American public health association.

- Hoiby, N.; Johansen, H.K.; Moser, C.; Song, Z.; Ciofu, O. and Kharazmi, A. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. Microb. Infection., 3: 23-35.
- Holt, J.G.; KJrieg, N.R.; Sheath, P.H.; Stalely, J.T. and Williams, S.S.T. (1994). Bergy's Manual of Determinative Bacteriology . (9th ed.) Williams and Wilkins U.S.A.
- Hsueh, P. P.; Chen, W. H. and Luh, K. T. (2005). Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram – Negative bacteria causing nosocomial infections from 1991 – 2003 at a University Hospital in Taiwan. Int. J. Antimicro. Agents.; Nov. 6.

- Ibezim E. C.(2005). Microbial resistance to antibiotcs. African Journal of Biotechnology. in burn patients . Burns , 28(1) .Isolates Causing 4 (13): 1606-1611.
- Itah, A.Y., and Essien , J.P. (2005). Growth profile and Hydrocarbono clastic potential of Micro organisms Isolated from Tarballs in the Bight of Bonny , Nigeria , World J. of Microbiol Biotechnol., V. 21: 6-7 .
- Jacoby, G.; and Bush, K. (2005). Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant β lactamases. (www. Lahey. Org/ studies/ webt. htm.).
- Jacoby, J. A. and Bush, K. (2009)."Amino Acid Sequences for Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant ß- TEM, SHV and OXA Lactamases.
- Jawetz, E., Melnik, J.L. ; Adelberg , E.A.; Brook, G.F.; Butel, J.S. and Morse , S.A. (2010). Medical Microbiology 26th. ed. Appleten and Lang New York. Connctical. PP.45-60 .
- Jones, R. N.; 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.
- Kalai, S.; Achour, W.;Abdeladhim, A.; Bejaoui, M. and Benttassen, A. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* isolated in immunocompromised patients: antimicrobial resistance, serotyping and molecular typing. Med. Mal. Infect. 35 (11): 530 – 535.
- Kalaivani, R.Shashikala Nair,Prashanthk, saranathan,Sheela Devic,Mary vjesudason,(2010) .Resistance Mechanisms of Multidrug Resistant P-*aeruginosa* in tertiary care hospital ;Department of Biotehnology, podicherrg university ,puducherry .

- Kaszab, E.; Szoboszlay, S.; Dobolyi, C.; Hhn, J.; Pék, N. and Kriszt, B.(2011).Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonasaeruginosa* strains isolated from composts. Bio. Tech., 102: 1543 1548.
- Kiffer, C.; Hsiung, A.; Oplustil, C.; Sampaio, J.; Sakagami, E.; Turner, p. and Mendes, C. (2005). Antimicrobial susceptibility of Gram – negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC program Brazil 2003. Braz. J. Infect. Dis. 9 (3): 216 – 224.
- Kiratisin, P.; Apisarnthanarak, A. ; Laesripa, C. and Saifon, P. (2008). MolecularCharacterization and Epidemiology of Extended-Spectrum- ß -Lactamase- Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia*
- Kohler, T.; Michea-Hamzehpour, M.; Simone, F. E. and Pechere, J. C. (1999). Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa:* respective contribution of OprD and efflux systems. Antimicrob. Agents Chemother. 43: 324 – 327.
- Krisztina, M.; Wallace, P.; Endimiani, A. Taracila, M. A and Bonomo R.A.(2011) Carbapenems: Past, Present, and Future. Antimicrob. Agents Chemother.,55, (11):4943 4960.
- Kurokawa, H.; Shibata, N.; Doi,Y.; Shibayama, K.; Kamachi, K. Yagi,T. and Arakawa,Y.(2003).A New TEM-DerivedExtended-Spectrum Lactamase (TEM-91) with an R164C Substitution at the -Loop Confers Ceftazidime Resistance. Antimicrob Agents Chemother., 47(9): 2981-2983.
- Lambert, O.; Michea-Hamzehpour, M.; Kohler, T.; Chau, F.; Fanrisson, F.; Dautrey, S. and Pechere, J. (2001). Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and ciprofloxacin in an experimental model of

Pseudomonas aeruginosa acutrtimice pneumoniae in rats. Antimicrobial agents chemotherapy, 44:571-576.

- Lau, G.W.; Hassett, D.J.; Ran, H. and Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends in Molecular Medicine, 10(12):599-606.
- Lee, Y.; Ahn, B. and Jin, J.(2007) Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to all antimicrobial agents but susceptible to colistin, in Daegu, Korea. J Microbio.,45:358-63
- Lee, K.; AeJa, P.; Moon, Y. K.; HeeJoo, L. and Ji-Hyun C.(2009). Metallo-Lactamase-Producing *Pseudomonas* spp. in Korea: High Prevalence of Isolates with VIM-2 Type and Emergence of Isolates with IMP-1 Type.Yonsei Med. J., 50(3): 335-339.
- Livermore, D. M. (2002). Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Infect. Dis. 34 (5): 634-640.
- Livermore, D. M. and Brown. D. F. J. (2005). "Detection of β-lactamase-mediated resistance." Retrieved 31.
- Livermore, D.M.; Hope, R.; Fagan, E.J.; Warner, M.; Woodford, N. and Potz, N. (2006). Activity of temocillin against prevalent ESBL- and AmpC producing Enterobacteriaceae from south-east England. J Antimicrob. Chemother., 57: 1012-1014.
- Livermore, D.M.(2012). Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. Korean J.Intern Med.27(2): 128 142.
- Lopez-Yeste, M.; Xercavins, M.; Lite, J.; Cuchi, E. and Garan, J. (1996). Fluoroquinolone and aminoglycosides resistance in chromosomal cephalosporenase – over producing in gram negative bacilli strains with

inducible beta – Lactamase. Enferm. Infect. Microbiol. Clin. 14 (4): 211 – 214.

- MacFaddin, J.F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
- MacFaddin, J.F. (2004). Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria. 4th ed., Waverly press, Inc., Baltimore, U.S.A.
- Magiorakos1, A. Srinivasan2, R. B. Carey2, Y. Carmeli3, M. E. Falagas4,5, C. G. Giske6, S. Harbarth7, J. F. Hindler8, G. Kahlmeter9, B. Olsson-Liljequist10, D. L. Paterson11, L. B. Rice12, J. Stelling13, M. J. Struelens1, A. Vatopoulos14, (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance
- Martinez, J. L. and Baquero, F. (2002a). Interactions among strategies associated with bacterial infections: Pathogenicity, epidemicity and antibiotic resistance. C. M. R. 15 (4): 647 – 679.
- Martinez, J. L. and Baquero, F. (2002b). Interactions among strategies associated with bacterial infections: Pathogenicity, epidemicity and antibiotic resistance. C. M. R. 15 (4): 647 – 679.
- Masaadeh, H.A.; Jaran, A.S. (2009) Incident of *Pseudomonas aeruginosa* in post-operative wound infection American Journal of Infectious. 5 .(1):1-6.
- Masuda, N.; Sakagawa, E.; Ohya, S.; Gotoh, N.; Tsujimato, H. and Nishino, T. (2000). Contribution of MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeroginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 2242 – 2246.

- Maveyraud, L., Golemi, D., Kotra, L. P.,Tranier, S., Vakulenko, S., Mobashery, S., Samama, J. P (2000). Insights into class D beta-lactamases are revealed by the crystalstucture of the OXA10 enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Structure*, 8, 1289-1298.
- Melo, G. B.; Melo, M. C.; Gama, A. P.; Carvalho, K. S.; and Filho, G. (2005). Analysis of the genetic diversity of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. Brazilian J. Microbiol., 36: 126–130.
- Mims, C. A., Dockrell, H. M.; Goering, R. V.; Roitt, I; Wakelin, D. and Zuckerman, M. (2004). Medical Microbiology. 3rd ed. Mosbey of Elsevier Limited.
- Moya, B.; Zamorano, L.; Juan, C.; Perez, J. L.; Ge, Y.; Oliver, A. (2010). Activity of a New Cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against {beta}-lactam-resistant pseudomonas aeruginosa mutants selected in vitro and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients. Antimicrob. Agents Chemother. 54: 1213-1217.
- Mugnier, P., Casin, I., Bouthors, A. T. & Collatz, E. (1998). Novel OXA-10-derived extended-spectrum -lactamases selected in vivo or in vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42, 3113–6.
- Mugnier, P., Podglajen, I., Goldstein, F. W. & Collatz, E. (1998). Novel OXA-10-derived extended-spectrum -lactamases selected in vivo or in vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42, 3113–6.
- Musk, A. and Hergenrothe, M. (2008). Microbiological study on the importance of *Pseudomonas* in nosocomially infected ICU patients, with special reference to metallo-beta lactamase production. Indian J. Pathol. Microbiol. 49:44-48 .

- Myrvik Q.N. and Weiser , R.S. (1988) . Fundamentals of Medical Bacteriology and Mycology (2nd ed.) Lea and Febiger Philadelphia U.S.A.
- Naas, T., L. Poirel, A. Karim, and P. Nordmann. (1999) . Molecular characterization of In50, a class1 integron encoding the gene for the extendedspectrum-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol.Lett. 176:411–419.
- Naas, T., Sougakoff, W., Casetta, A. & Nordmann, P. (1998). Molecular characterization of OXA-20, a novel class D□-lactamase, and its integron from Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42, 2074–83.
- Nakae, T.; Yoshihara, E. and Yoneyama, H. (1997). Multiantibiotic resistance caused by active drug extraction in hospital pathogens. J. Infect. Chemother. 3: 173 – 183.
- Nakajima, A.; Sugimoto, Y.; Yoneyama, H. and Nakae, T. (2000). Localization of the outer membrane subunit OprM of resistance – nodulation – cell division family multicomponent efflux pump in *Pseudomonas aeroginosa*. J. Biol. Chem. 275: 30064 – 30068.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (NCCLS). (2003) Performance standards for disk susceptibility testing; approved standard M 100-S13. NCCLS, Wayne, Pa.
- Nikaido, H. (1996). Multidrug efflux pumps of gram – negative bacteria. J. Bacteriol. 178: 5853 – 5859.

- Nikbin, V.S.; Abdi-Ali, A.; Feizabadi, M.M.; Gharavi, S.(2007). Pulsed field gel electrophoresis and plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* at two hospitals in Tehran, Iran. IndianJ.Med. Res.,126(2):146-51.
- O'Riodan, K. and Lee, J. C. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 17(1): 218–234.
- Paetzel, M., Danel, F., de Castro, L., Mosimann, S. C., Page, M. G., Strynadka, N. C. (2000). Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10. *Nat. Struct. Biol*., 7, 918-925.
- Page, M. I. (2002). Understanding metallo-β-lactamases. ASM. News. 68: 217-221.
- Pai, H.; Wonkim, J.; Kim, J.; lee, J.; CHOE, K. W. and Gotoh, N. (2001a). Carbapenem Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45: 480 – 484.
- Pernot, L., Frenois, F., Rybkine, T., L'Hermite, G., Petrella, S., Delettre, J., Jarlier, V., Collatz, E., Sougakoff, W. (2001). Crystal structures of the class D beta-lactamase OXA-13 in the native form and in complex with meropenem. *J. Mol. Biol*., 310, 859-874.
- Philippon, A.; Arlet, G. and Jacoby, G.A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type - lactamases. J. Antimicrob. Agents Chemother., 46:1 11.
- Philippon, L. N., T. Naas, A.-T. Bouthors, V. Barakett, and P. Nordmann.(1997). OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum - lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 2188–2195.

- Pichova, D.; Morihara, M.; and Lamann, M. (2001) . *Pseudomonas aeruginosa* . Protease: Isolation, crystallization and preliminany characterization , J. Biol. Chemi., 240:23-26 .
- Pier, G.B.; Meluleni, G.; and Neuger, E. (1992). A murine model of chronic mucosal colonization by *Pseudomonas aeruginosa* . Infect Immun . 60:4768-4776 .
- Poirel, L.; Ronco, E.; Naas, T. and Nordmann, P. (2001a). Extended-spectrum ß-lactamase TEM-4 in *Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Microbiol. Infect. 5:651-652.
- Pirnay, J.P.; De Vos, D.; Cochez, C.; Bilocq, F.; Pirson, J. and Struelens, M.(2003). Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa colonization in a burn unit: persistence of amultidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistantclone. J. Clin.Microbiol.,41(3):1192-1202.

- Poirel, L., Girlich, D., Naas, T. & Nordmann, P. (2010). OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 β-lactamase from Pseudomonas aeruginosa and its plasmid- and integron-located gene. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45, 447–53.

- Poirel, L.; Rodriguez-Martinez, J.M.; Al Naiemi, N.; Debets-Ossenkopp, Y.J.andNordmann, P.(2010). Characterization of DIM-1, an integron-encodedmetallo- - lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in theNetherlands. Antimicrob. Agents Chemother.,54:2420-2424.

- Poole, K. (2000). Efflux – mediated resistance to fluoroquinolones in gram – negative bacteria. A. A. C. 44 (9): 2233 – 2241.

- Poole, K. (2004). "Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria." Clin. Microbiol. Infect. 10: 12-26.

- Poole, K.(2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max.Frontiersin Microbio. cellular infec. Microbio.,2. (65).

- Pournaras, S.; Maniati, M. Spanakis, N. Ikononidis, A. Tassios, P. T. Tsakris, A. Legakis, N. J. and Maniatis, A. N. (2005). Spread of efflux pump overexpressing non – metallo beta lactamase producing, meropenem resistant but ceftazidim – susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with bla VIM endenicity. J. Antimicrob. Chemother. 56 (4): 761 – 764.

- Queenan, A.M. and Bush, K.(2007). Carbapenemases: the Versatile -Lactamases.Cli. Microbio. Rev., 20(3):440- 458.

- Queenan, A.M.; Shang, W.; Kania, M.; Page, M.G. and Bush, K.(2007). Interactions of ceftobiprole with -lactamases from molecular classes A to D. Antimicrob.Agents Chemother., 51: 3098-3095.

- Radice, M.; P. Power; G. Gutkind; K. Fernandez; C. Vay, A. Famiglietti, N. Ricover, and J. Ayala. (2004). First class A carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. Antimicrob. Agents Chemotherapy. 48:1068 1069.
- Ranjbarl, R.; Owlia, P.; Saderi, H.; Mansouri, S.; Jonaidi-Jafari, N.and Izadi, M.(2011).Characterization of *Pseudomonasaeruginosa* Strains Isolated from BurnedPatients Hospitalized in a MajorBurn Center in Tehran, Iran. Acta.Medica. Irani ca., 49(10): 675-679.

- Rajalakshmi, V. and Amsaveni, V. (2012). Antibiotic susceptibility of bacterial pathogens isolated from diabetic patients. Int. J. Microbiol. Res., 3(1): 30–32.
- Rawat, D. and Nair, D.(2010).Extended-spectrum -lactamases in Gram Negative Bacteria. J. Glob. Infect. Dis., 2(3): 263 274.
- Reipert, A.; Ehlert, K.; Kast, T. and Bierbaum, G. (2003). Morphological and genetic differences in two isogenic Staphylococcus aureus strains with decreased susceptibilities to vancomycin. J. Antimicrob. Agents and Chemother., 47(2): 568–576.
- Ryan, K. J. and Ray, C.G.(2004). Introduction to Infectious Diseases : Sherris Medical Microbiology.(4th ed.) Mc Graw- Hill , New York. S5-9.
- Saderi, H.; Karimi, Z.; Owlia, P.; Bahar, M. A.; Akhavi Rad, M. B. (2008). phenotypic detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burned patients iranian Journal of Pathology. 3. (1): 20-24.
- Salimi S, Owlia P, Yakhchali B and Rastegar Lari A. Drug Susceptibility and Molecular Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in a Burn Unit American Journal of Infectious Diseases 5 (4): 308-313, 2009.
- Salyers, A.A., and Whitt, D.D. (2002). Bacterial Pathogensis amolecular approach, P. 251- 259 . American Society for Microbiolog Press, Washington, D.C.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: laboratory manual, vol. 1, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

- Samaha-Kfoury, J. N.; and Araj, G. F. (2003). Recent developments in β-lactamases and extended-spectrum β-lactamases. BMJ. 327: 1209-1213.

- Sanschagrin, F., Couture, F. & Levesque, R. C. (1995). Primary structure of OXA-3 and phylogeny of oxacillin-hydrolyzing class Dβ-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39, 887–93.

- Seungok Lee1, Yeon-Joon Park2*, Myungshin Kim2, Hae Kyung Lee2, Kyungja Han2, Chang Suk Kang2 and Moon Won Kang3. (2005). Prevalence of Ambler class A and D b-lactamases among clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa in Korea. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 56, 122–127.

- Shahid, M. and Abida Malik. (2005). Resistance due to aminoglycoside modifying enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burns patients. India J. Med. Res. 122: 324 – 329.

- Strateva, T. and Yordanov, D.(2009). *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. J. Med.Microbio.,58,1133 1148.

- Suh, J.; Liegmann, K. and Peter, J.B. (1999). Rpid detection of gram negative bacteria. J. Clin. Microbiol., 39:51-52 .

- Sun, T., Nukaga, M., Mayama, K., Braswell, E. H. and Knox, J. R. (2003). Comparison of -lactamases of class A and D: 1.5-Å crystallographic structure of the class D OXA-1 oxacillinase (2003). *Protein Science*, 12, 82-91.

- Tam, V.H.; Kai-Tai, C.; Mark, T. L.; Amy, N. S.; Shana, K. M.; Keith, P. and Kevin, W. G.(2007). Prevalence, mechanisms, and risk factors of carbapenem resistance in bloodstream isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.

Diag.Microbio. Infec. Dis., 58:309 314.

- Thomas, L.C. (2007). Genetic methods for rapid detection of medically importantnosocomial bacteria. Faculty of Medicine, Department of Medicine, The University of Sydney, Australia.
- Thomson, N. (2004). The role of prophage-like elements in the diversity of *Salmonella enterica* serovars. J. Mol. Biol.,339 (2): 279-300.
- Todar, K.(2008). *Pseudomonas aeruginosa*. University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology.
- Toleman, M.A.; Simm, A.M.and Murphy, T.A. (2002).Molecular characterization ofSPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America:reportfrom the SENTRY antimicrobial surveillance programme.J.Antimicrob.Chemother.,50 : 673 -9.
- Tsakris, Pournaras, A.; S.; Woodford, N.; Palepou, M. F.; Babini, G. S, Douboyas, J. and Livermore. D. M. (2000). Outbreak of infections caused by *p seudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. J. Clin. Microbiol. 38: 1290-1292.
- Turnridge, J. (1995). Epidemiology of quinolone resistance. Eastern hemisphere. Drugs. 49: 43 – 47.
- Umadevi, S.; Kumar, S.; Joseph, N. M.; Easow, J. M.; Kandhakumari, G.; Srirangaraj, S.; Raj, S. and Stephen, S. (2011). Microbiological study of diabetic foot infections. Indian J. Med. Specialities, 2(1): 12–17.
- Van Delden, C. and Iglewski, B.H. (1998). Cell to cell signalling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerging Infectious Disease, 4(4): 1-14.

- Varaiya A, Kulkarni K, Kulkarni M, Bhalekar P, & Dogra J (2007)Incidence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in ICU patients. *Department of Microbiology, S.L.Raheja Hospital, Mumbai, India.*
- Walley, S. G. (1992). β-lactamses: Mechanism of action.. in M. I. page ed.1st, the chemistry of β-lactamse. A and P. Blackie, London. P. 198-228.
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature., 406: 775-781.
- Walsh, C. (2003). Antibiotics actions, origins, resistance. ASM Press, Washington D.C.
- Walsh, T. R. (2008). Clinically significant carbapenemases: an update. Curr. Opin .Infect. Dis.,21:367-371.
- Walsh, T.R.; Toleman, M.A.; Poirel, L. and Nordmann, P.(2005). Metallo- β - lactamases: the quiet before the storm? Clin.Microbiol . Infect. 11: 2-9.
- Walther-Rasmussen, J. and N. Hoiby (2004). "Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases." *Can J Microbiol* 50: 137-65.
- Walther-Rasmussen, J. and H iby, N.(2007). Class A carbapenemases. J.Antimicro. Chemoth.,60:470 482.
- Wang DD, Sun TY, Hu YJ. (2007) Contributions of efflux pumps to high level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. Chin Med J, 120: 68-70.

- Wang, S.H.; Sheng, W.H.; Chang, Y.Y.; Wang, L.H.; Lin, H.C.(2003). Healthcareassociated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* ina surgical intensive care unit. J. Hosp. Infect.,53(2):97-102.

- Warunee Srisupha-olarn, Pharm.D, (2010). Polymyxins Revisited: Carbapenem-Resistant Gram-negative Bacteria., College of Pharmacy The University of Texas at Austin.

- WHO (Word Health Organization) (2001). World Health Organization Monographys on selected medical plants. Geneva.

- Willenbrock, H. and Ussery, D.W. (2007). Prediction of highly expressed genes in microbes based on chromatian accessibility.BMC, Mol., Biol.,8:11 .
- Willenbrock, H.; Friis, C.; Friis, A.S. and Ussery, D.W. (2006). An environmental Signature for 323 microbial genomes based on codon adaption indices genome. Biol., 7 : R114 .
- Williams, R.J.; Livermore, D.M.; Lindridge, M.A.; Said, A. A. and Williams,J.D.(1984).Mechanisms of β -lactam resistance in british isolates of*Pseudomonas aeruginosa*, J. Med. Microbiol.,17: 283 293.
- Winn, W.C.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Koneman, E.W.; Procop, G.W.; Schreckenberger, P.C. and Woods, G.L. (2006). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology . 6th ed. Lippncott Williams and Wilkins . USA .
- Wirth FW, Picoli SU, Cantarelli VV, Gonçalves AL, Brust FR, Santos LM, Barreto MF (2009). Metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil.

Braz. J. Infect. Dis., 13: 170-172.

- Woodford, N.; Kaufmann, M. E.; Karisik E.; and J. W. Hartley (2007). "Molecular epidemiology of multiresistant *Escherichia coli* isolates from community-onset urinary tract infections in Cornwall, England." J. Antimicrob. Chemother. 59: 106-109.

- Yao, J.D.C. and Moellering, R.C.J.(2003). Antibacterial Agents. Manual of ClinicalMicrobiology. Washington, DC.,Ameri. Soci. Microbio., 1039-1073.

- Yildirim, S.; Narsal, T. Z.; Tarim, A.; Torer, N.; Noyan, T.; Demiroglu, Y. Z.; Moray, G. and Heberal, M. (2005). Bacteriological profile and antibiotic resistance: comparison of findings in a burn intensive care unit, other intensive care unit, and the hospital services unit of a single center, J. Burn. Car. Rehabil. 26 (6): 488 – 492.

- Yong, D.; Lee, K.; Yum, J. H.; Shin, H. B.; Rossolini, G. M. and Chong, Y. (2002).Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β - lactamaseproducing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J.Clin. Microbiol.,40:3798- 3801.

- Zhang, H. Z.; Hackbarth, C. J.; Chansky, K. M.; and Chambers, H. F. (2001). A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta lactams in staphylococci. Science . 291: 1962-1965.

- Zhang, Y. H.; Deng, S. L. and Liu, J. W. (2005). Analysis of susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burns toward antibiotics *in vitro* Zhonghue. Shao. Shang. Za. Zhi. 21 (2): 104 – 106.

- Ziha-Zarifi, I.; Llanes, C.; Kohler, T.; Pechere, J. and Pleasiat, P. (1999). *Invitro* emergence of multi drug resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* over expressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. Antimicrobial agents chemotherapy, 43:287-291.

الملحق (1-1)

مقاومة عزلات *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية

العزلات		المقاومة للمضادات الحيوية المستعملة																				
العدد	المصدر	PI	TI	TCC	PY	CTR	CAZ	CTX	CFM	AT	CX	IPM	MEM	GEN	AK	TOB	K	CIP	NOR	LEV	LO	CS	PB
PA1	الإدرار	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
PA2	الإدرار	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
PA3	الإدرار	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
PA4	الإدرار	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S
PA5	الإدرار	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S
PA6	الإدرار	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
PA7	الإدرار	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S
PA8	الإدرار	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
PA9	الإدرار	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
PA10	الإدرار	R	S	S	I	I	R	S	R	S	R	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S
PA11	الإدرار	R	R	R	I	R	R	R	R	I	R	S	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S
PA12	الإدرار	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
PA13	الإدرار	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
PA14	الإدرار	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	I	R	S	R	S	R	S	S
PA15	الإدرار	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
PA16	الإدرار	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
PA17	الإدرار	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	S	S	R	S	S
PA18	الحروق	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
PA19	الحروق	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S
PA20	الحروق	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S
PA21	الحروق	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	S
PA22	الحروق	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
PA23	الحروق	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	I	R	R	R	S	R	S	S
PA24	الحروق	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	R	R	R	S	R	S	S
PA25	الحروق	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	S
PA26	الحروق	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	S	S	S	R	R	S	R	S	S
PA27	الاذن	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I	R	S	S	R	R	S	S

S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	الاذن	PA28
S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	الاذن	PA29
S	S	R	S	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	الاذن	PA30
S	S	S	R	S	I	R	I	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	الاذن	PA31
S	S	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	القشع	PA32
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	القشع	PA33
S	S	I	R	S	R	R	I	S	S	S	S	R	I	R	R	S	I	R	S	S	R	القشع	PA34
S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	القشع	PA35
S	S	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	القشع	PA36
S	S	R	S	I	R	R	S	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	القشع	PA37
S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	القشع	PA38
S	S	I	S	S	R	R	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	القشع	PA39
S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	الارضية	PA40
S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	الارضية	PA41
S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	الارضية	PA42
S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	الارضية	PA43
S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	الارضية	PA44
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	الارضية	PA45
S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	الادوات الطبية	PA46
S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R	الادوات الطبية	PA47
S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	I	S	S	S	R	R	R	S	S	الادوات الطبية	PA48
S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	الادوات الطبية	PA49
S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	الادوات الطبية	PA50

LEV = Levofloxacin , TOB = Tobram Icin, CN = G Entam Icin , TCC= Ticarcillinclavulanic,LO= Lomefloxacin NOR = Norfloxacin, TI = Ticarcillin, AK = Amikacin, PI = PepRacillin, IPM= Imipenem ,K= Kanamycin , IMP = Imipnem, CX = Cefoxitin, , MEM = Meropnem, AT = Aztreonam, CTR = CTX = Ceftriaxon , CAZ=Ceftazidim , PY= Carbenicillin ,CS= Colistin, PB= Polymyxin B Cefotaxim,

S = SENSETIVE , R = RESISTANT

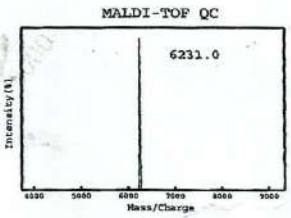
الملحق (1-2)

اعدادات البرايمر التشخيصي

rana 16S rRNA -F

GGT GGT TCA GCA AGT TGG AT

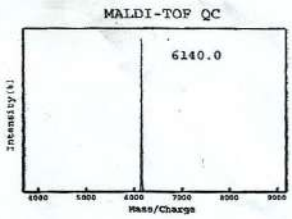
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6227.9 g/mole
Tm	53.5 C	Volume for 100 pmoles/ul	101.2 ul



rana 16S rRNA R

ATG CAG CAC CTG TGT CTG AG

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.5 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	55.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6132.9 g/mole
Tm	53.1 C	Volume for 100 pmoles/ul	105.4 ul



SUMMARY

The aim of This study is to determine the prevalence of OXA β-lactamase in *pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical and other environmental cases in Al- Diwaniya Teaching Hospital using phenotypic and molecular methods .The Samples of the study were collected from various sources and they were 390 samples for the period from November 2011 to March 2012,and they includ (292 clinical specimens and 98 environmental sample) , the results of cultural and biochemical tests showed that 50 isolates (39 of them were from clinical cases and 11 were from environmental samples),belonged to *ps. aeruginosa* , and their diagnosis were confirmed by 16s-ribosomal RNA ,and the study showed that all the isolates containing the 16s-ribosomal RNA gene , which represents the designed diagnostic gene in this study .The results of this study showed that the higher rate of *P. aeruginosa* isolates was due to burns infections (23.68 %) , followed by respiratory tract infections (sputum) that were (15.38 %) and then the case to otitis media infections (12.5 %), and lastly that due to urinary tract infections (10.49 %) , while the rate isolation from the environmental samples was (5.11 %) from the floor of burns department , followed by (10.8 %) from the medical instruments of department workers .It was noted from this study that the age and gender of the patients have some effect on the infection by *P. aeruginosa* it was recorded that the higher rate of infection was in patients older then 61 year old,and regarding gender,it was found that females are more infected than male, especially in urinary tract infections . The study showed that there is high rate of infection in the admitted patients, in older people and in those who need urinary catheterization, in addition to those with severe burns and those in the intensive care units .

Drug sensitivity test had been carried out for all the bacterial isolates to 22 types of antibiotics by disk diffusion method of Kirby - Bauer, and this study had indicated that there was relatively high resistance from *P. aeruginosa* to

β -lactam antibiotics, aminoglycoseides, and fluoroquinolone .

The results also showed that the studied isolates has possibility of producing broad-spectrum β- lactames enzymes, and this is supported by the resistance of this bacteria to the third generation cephalosporins and to Alaztronam , it was also shown that there was difference in the resistance to carbapenems antibiotics, the resistance rate to imipenem and meropenem were 16% and 64 %, respectively . Polymyxin B and Polymyxin E also called (Colistin) antibiotics were also used, and the resistance rate %0 for Colistin and %4 for Polymyxin B, that means there was two isolates which are resistant to Polymyxin B and this resistance was a challenge to the success of therapeutic efforts . this study noted that there was 22 (44%) isolates which were resistant to at least three types of antibiotics ,and regarded as multi-drug resistant (MDR) and Extensive-drug resistance (XDR) isolates were26 (52%) which was the higher rate among the three types of resistance, The third type of resistance was 2 (4%) which represents the resistance to all types of studied antibiotics (PDR). The ability of these isolates to produce broad-spectrum OXA β- lactames enzymes groups was investigated thrrough detection of presence of genes bla$_{OXA-10}$, bla$_{LCR-1}$, bla$_{OXA-18}$, bla$_{OXA-1}$, bla$_{OXA-2}$ in these isolates by using the polymerization chain reaction enzyme technology] (PCR) it showed 50/50 (100%) isolates contain blaOXA-10 gene, which belongs to the OXA group I, and the results of this study showed no amplification results for bla$_{OXA-18}$, bla$_{LCR-1}$, bla$_{OXA-1}$, bla$_{OXA-2}$ genes ,which belong to the main groups of broad-spectrum OXA β- lactames enzymes which are OXAgroup II ,OXAgroup III and OXA groupV respectively except OXA18 enzyme which is not belonging to any of these groups. .

University of Al-Qadisiya

College of Science

Department of Biology

Prevalence of OXA beta -lactamaes of *pseudomonas aeruginosa* in Al-Diwaniya City .

A thesis
Submitted to The Council of The College of Science
University of Al-Qadisiya as Partial
Fulfillment of The Requirements for The Degree
of Master of Science in
Biology / Microbiology

By

Rana Masheel Salim

Supervisor by

Asst. Prof. Dr.Syoof Khowman Alwan

University of Al-Qadisiya / College of Pharmacy

1435 A. H. 2014 A. C