جامعة بغداد

كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم

قسم علوم الحياة

دراسة التنميط الجيني وبعض عوامل الضراوة لبكتيريا

Pseudomonas aeruginosa

رسالة مقدمة الى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم) - جامعة بغداد
كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة /علم الأحياء المجهرية

من قبل

عباس فالح مهدي الأرناؤوطي

بكالوريوس علوم الحياة / جامعه بغداد - 2013

باشراف

أ.م. د. رنا مجاهد عبدالله الشويخ

١٤٣٦ هـــــ **2015 م**

بسم الله الرحمن الرحيم

((هَذَا خَلْقُ اللَّهِ فَأَرُونِي مَاذَا خَلَقَ الَّذِينَ مِنْ
دُونِهِ بَلِ الظَّالِمُونَ فِي ضَلَالٍ مُبِينٍ))

صدق الله العلي

العظيم

سورة لقمان

الآية ١١

<u>**" اقرار المشرف على الرسالة "**</u>

اشهد ان اعداد رسالة طالب الماجستير " **عباس فالح مهدي** " الموسومة (**دراسة التنميط الجيني وبعض عوامل الضراوة لبكتيريا** ***Pseudomonas aeruginosa***) جرى تحت اشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم) / جامعة بغداد ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الاحياء المجهرية .

التوقيع :

اسم المشرف : د. رنا مجاهد عبدالله

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم) / جامعة بغداد

التاريخ : / / 2015

توصية رئيس قسم علوم الحياة

استنادا الى التوصية اعلاه من قبل المشرف الاستاذ المساعد الدكتورة رنا مجاهد عبدالله ارشح هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الراي فيها .

التوقيع :

الاسم : د. مازن نواف عبود

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم) / جامعة بغداد

التاريخ : / / 2015

" اقرار لجنة المناقشة "

نشهد باننا اعضاء لجنة المناقشة قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة (**دراسة التنميط الجيني وبعض عوامل الضراوة لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa***) المقدمة من الطالب " **عباس فالح مهدي** " في قسم علوم الحياة ، وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما لـه عـلاقة بها ونجد انها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الاحياء المجهرية وبتقدير (أمتياز) .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسـم : د . شروق ريس كاظم

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ :

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسـم : د. اسماء عزت سليم فرج

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ :

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسـم : د. لمى عبدالهادي زوين

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ :

عضو اللجنة والمشرف

التوقيع :

الاسـم : د. رنا مجاهد عبدالله

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ :

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم

التوقيع :

الاسـم : د. خالد فهد علي

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ :

(الاهداء)

الى اصل وجودي في هذه الحياة .... ابي

الى الروح التي عاشت بها روحي .... امي

الى سندي .. وفرحتي في دنياي .... زوجتي .. وابني

الى اخواني و اخواتي

الى كل من له فضل في تعليمي

الى كل هؤلاء اهدي ثمرة جهدي

عباس

شكر وتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم ((لئن شكرتم لأزيدنكم)) فله الشكر كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه ، والحمد لله رب العالمين الذي هداني واعانني وقدرني على انجاز هذا البحث وصلى الله على سيدنا محمد خاتم النبيين وعلى آله الطيبين الطاهرين .

لا يسعني وانا انهي بحثي الا ان اقدم شكري وامتناني الجزيلين الى الدكتوره رنا مجاهد عبدالله لتفضلها باقتراح موضوع البحث ولاشرافها المستمر وتوجيهاتها القيمة ولرفدي بالمصادر العلمية ، واتقدم بشكري الجزيل الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم) و رئاسة قسم علوم الحياة لاسيما رئيس قسم علوم الحياة ا.م.د. مازن نواف عبود .

اتقدم بالشكر الجزيل الى ا.م.د. اسراء عبد الجبار و ا.م.د. لمى عبد الهادي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة (أبن الهيثم) وكذلك ا.م.د. منعم رضوان علي و ا.م.د. محمد فرج المرجاني في كلية العلوم / الجامعة المستنصرية الذين لم يبخلوا علي في مديد العون والمساعدة اثناء اجراء بحثي فجزاهم الله الجزاء الاوفى .

اتقدم بالشكر الجزيل الى الانسة نور رعد في شركة جسر المسيب لمساعدتها في قياس نقاوة DNA فوفقها الله لما يحبه ويرضاه ، كما اتقدم بالشكر الجزيل الى الانسة عاصفة علي في م. الطفل المركزي ، استاذ حيدر ساده شعلان في المختبرات التعليمية / مدينة الطب ، استاذ فريد علي جاسم في م. الصدر و الست سحر عبدالستار في م. الأمامين الكاظمين (ع) لمساعدتهم لي في جمع العزلات البكتيرية ، واخيرا اتقدم بخالص شكري وامتناني الى كل من اضاء في طريقي نور الامل ولو بكلمة تشجيع لاتمام هذه الرسالة لاسيما طلبة الدراسات العليا / قسم علوم الحياة .

عباس

الخلاصة

Summary

الخلاصة

جمعت 100 عزلة سريرية تعود لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* للمدة من 2014/9/1 ولغاية 2014/11/1 من مصادر سريرية مختلفة شملت : 33 عزلة من التهاب الاذن الوسطى Otitis media ، 27 عزلة من الحروق Burns ، 14 عزلة من الجروح Wounds، 15 عزلة من التهاب المجاري البولية Urinary tract infections ، 11 عزلة من الدم Blood وبعد تشخيص هذه العزلات تم الحصول على 75 عزلة شملت : 28 عزلة التهاب الاذن الوسطى ، 23 عزلة من الحروق ، 10 عزلات من الجروح ، 8 عزلات من التهاب المجاري البولية و 6 عزلات من الدم .

شخصت العزلات بزراعتها على الاوساط الزرعية اكار المكونكي MacConkey agar ، اكار السترمايد Cetrimide agar ، اكار السيدوموناس Pseudomonas agar ، اكار الكروماجين اورنتشن CHROMagar Orientation ، تم اجراء الفحوصات الكيموحيوية التي شملت فحص Oxidase test و Catalase test وللتشخيص النهائي استعمل نظام API20E وبعدها تم تشخيص العزلات البكتيرية جينيا وذلك بالاعتماد على جين التشخيص 16S rDNA وباستعمال جهاز تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR .

اختبرت حساسية العزلات البكتيرية قيد الدراسة اتجاه 18 مضاداً حيوياً وباستعمال طريقة انتشار الاقراص Disc diffusion method وحددت مقاومة Resistance هذه العزلات للمضادات الحيوية وبينت النتائج ان جميع العزلات البكتيرية كانت مقاومة بنسبة 100% لكل من المضادات Amoxicillin\Clavulanic acid ، Ampicillin ، Carbencillin ، Cefotaxime ، Ceftriaxone ، Cephalexin و Kanamycin ، بينما ابدت هذه العزلات مقاومة اقل لكل من المضادات Ceftazidime بنسبة 80% ، Cefepime بنسبة 72% ، Gentamicin بنسبة 46.6% ، Tobramycin بنسبة 38.6% ، Ofloxacin و Piperacillin بنسبة 37.3% لكل منهما ، Norfloxacin و Ciprofloxacin بنسبة 34.6% لكل منهما ، Meropenem بنسبة 33.3% ، Aztreonam بنسبة 22.6% و Imipenem بنسبة 17.3% .

بينت نتائج التحري عن انزيمات البيتالاكتاميز β-lactamase بأن 56 عزلة كانت منتجة لهذه الانزيمات وبنسبة 74.6% في حين اظهرت النتائج بأن 60 عزلة كانت منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs وبنسبة 80% .

بينت نتائج التحري عن بعض عوامل الضراوة مظهريا بأن جميع العزلات البكتيرية كانت منتجة لانزيم الهيمولايسين من النوع بيتا β -hemolysis وبنسبة 100% ، في حين كانت 61 عزلة منتجة للأنزيم الحال للبروتين Protease وبنسبة 81.3% و كانت 54 عزلة مكونة للغشاء الحيوي Biofilm وبنسبة 72% .

تم التحري عن بعض جينات الضراوة لبكتيريا *P. aeruginosa* وتضمنت هذه الجينات كل من *las B* ، *alg D* ، *pvd A* و *tox A* واظهرت النتائج وجود هذه الجينات بنسبة 84% ، 73.3% ، 69.3% و 68% على التوالي .

لغرض تحديد القرابة الوراثية Genetic relatedness تم تنميط عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال طريقة تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل والتعداد التكراري للجراثيم المعوية Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) واظهر تحليل النتائج وجود قرابة وراثية بين عزلات البكتيريا قيد الدراسة اذ وجدت 19 نسيلة Clone وباستعمال مخطط التحليل التجميعي Dendogram بينما كانت 8 عزلات فقط تحتوي على طرز وراثية مختلفة وتعد طريقة ERIC-PCR طريقة مفيدة ، عملية وسهلة لاجراء التنميط الجيني Genotying لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* .

قائمة المحتويات

ت	العنوان	الصفحة
1	**المقدمة**	1
2	**الفصل الأول / استعراض المراجع**	
3	1.1 تسمية و تصنيف بكتيريا *P. Aeruginosa*	4
4	2.1 الصفات العامة لبكتيريا *P. Aeruginosa*	5
5	3.1 تشخيص بكتيريا *P. Aeruginosa*	6
6	1.3.1 التشخيص التقليدي Conventional Identification	6
7	2.3.1 التشخيص الجزيئي Molecular Identification	6
8	4.1 الوبائية Epidemiology	7
9	5.1 الامراضية Pathogenesis	8
10	6.1 عوامل الضراوة Virulence Factor	10
11	1.6.1 الانزيم الحال للبروتين Protease	11
12	2.6.1 انتاج الصبغات Pigments Production	12
13	3.6.1 الذيفان الخارجي Exotoxin A	13
14	4.6.1 الالجنيت Alginate	13
15	5.6.1 الهيمولايسين Hemolysin	14
16	6.6.1 الغشاء الحيوي Biofilm	14
17	7.1 مقاومة بكتيريا *P.aeruginosa* للمضادات الحيوية	15
18	8.1 انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs	19
19	9.1 التنميط الجيني لبكتيريا *P. Aeruginosa*	20
20	**الفصل الثاني / المواد وطرائق العمل**	
21	1.2المواد Materials	26
22	1.1.2 الاجهزة المختبرية المستعملة Equipments and Apparateus	26
23	2.1.2 المواد الكيميائية Chemicals	27
24	3.1.2 المضادات الحيوية Antibiotic	27
25	1.3.1.2 اقراص المضادات الحيوية Antibiotic Disc	27
26	2.3.1.2 مساحيق المضادات الحيوية Antibiotic Powders	28
27	4.1.2الاوساط الزرعية Culture media	28
28	5.1.2 العدة المختبرية Kits	29
29	6.1.2 مواد اخرى	29
30	2.2 طرائق العمل Methods	30
31	1.2.2 التعقيم Sterilization	30
32	2.2.2 تحضير الكواشف والمحاليل	30
33	1.2.2.2 تحضير الكواشف	30
34	1.1.2.2.2 كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent	30
35	2.1.2.2.2 كاشف الكاتليز Catalase reagent	30
36	2.2.2.2 تحضير المحاليل	30
37	1.2.2.2.2 المحلول الملحي الفسلجي Normal saline solution	30
38	2.2.2.2.2 محلول ESBL supplement ES372	31
39	3.2.2.2.2 محلول Supplement CN	31
40	4.2.2.2.2 محلول صبغة Crystal violet	31
41	5.2.2.2.2 تحضير محاليل الكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز B-lactamase	31
42	6.2.2.2.2 محلول دارئ Tris borate EDTA buffer (1X) TBE	32
43	7.2.2.2.2 صبغة كرام Gram Stain	32
44	8.2.2.2.2 محاليل البوادئ Primers Solutions	33
45	9.2.2.2.2 الدليل الحجمي DNA Ladder لتحديد الوزن الجزيئي	34

34	Preparation of cultural media 3.2.2 تحضير الاوساط الزرعية	46
34	Ready made media 1.3.2.2 الاوساط الزرعية الجاهزة	47
34	Laboratory prepared media 2.3.2.2 الأوساط الزرعية التركيبية	48
34	Blood agar base 1.2.3.2.2 وسط اكار الدم	49
35	Pseudomonas agar 2.2.3.2.2 وسط اكار السيدوموناس	50
35	Cetrimide agar 3.2.3.2.2 وسط اكار الستراmايد	51
35	CHROM agar Orientation 4.2.3.2.2 وسط اكار الكرومايجين اورنتشن	52
35	5.2.3.2.2 وسط اكار الكروماجين الخاص للكشف عن انزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف CHROMagar ESBL	53
35	Skimmed Milk agar 6.2.3.2.2 وسط اكار الحليب الفرز	54
36	Luria broth 7.2.3.2.2 وسط لوريا	55
36	Bacterial isolates 5.2.2 العزلات البكتيرية	56
36	Collection of Bacterial isolates 1.5.2.2 جمع العزلات البكتيرية	57
36	Identification of bacterial isolates 2.5.2.2 تشخيص العزلات البكتيرية	58
36	Morphological examination 1.2.5.2.2 الفحوصات المظهرية	59
37	Microscopic examination 2.2.5.2.2 الفحص المجهري	60
37	Biochemical tests 3.2.5.2.2 الاختبارات الكيموحيوية	61
37	Oxidase test 1.3.2.5.2.2 فحص الاوكسيديز	62
37	Catalase test 2.3.2.5.2.2 فحص الكاتليز	63
37	API20E identification system API20E 4.5.2.2 التشخيص بنظام	64
38	Genomic DNA Extraction DNA 5.5.2.2 استخلاص الجينومي	65
39	6.5.2.2 التشخيص الجيني لبكتيريا *P. aeruginosa* باستعمال جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل (PCR)	66
40	Preservation of Bacterial Isolates 6.2.2 حفظ العزلات البكتيرية	67
40	Short term maintenance 1.6.2.2 الحفظ قصير المدى	68
41	Long term maintenance 2.6.2.2 الحفظ طويل المدى	69
41	Haemolysin production 7.2.2 انتاج الهيمولايسين	70
41	Protease production 8.2.2 انتاج الأنزيم الحال للبروتين	71
41	Biofilm formation 9.2.2 تكوين الغشاء الحيوي	72
42	B-lactamase production 10.2.2 انتاج انزيمات البيتالاكتاميز	73
42	ESBLs 11.2.2 التحري عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف	74
43	12.2.2 اختبار حساسية بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية	75
43	13.2.2 الكشف الجيني عن عوامل الضراوة (Virulence Factors) باستعمال جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل (PCR)	76
46	14.2.2 التنميط الجيني لبكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال طريقة ERIC	77
46	Agarose gel electrophoresis 15.2.2الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز	78
47	Statistical Analysis 16.2.2 التحليل الأحصائي	79
الفصل الثالث / النتائج والمناقشة		80
48	1.3 جمع وتشخيص بكتيريا *P. Aeruginosa*	81
52	2.3 مقاومة عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية	82
58	Multi-drug resistance 3-3 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية	83
60	4.3 التحري عن قابلية بكتيريا *P. aeruginosa* لانتاج أنزيمات البيتالاكتاميز	84
61	ESBLs 5.3 التحري عن انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف	85
64	6.3 الكشف المظهري عن عوامل الضراوة لبكتيريا *P. aeruginosa*	86
65	Hemolysin production 1.6.3 انتاج الهيمولايسين	87
65	Protease production 2.6.3 انتاج الأنزيم الحال للبروتين	88
66	Biofilm formation 3.6.3 تكوين الغشاء الحيوي	89
68	7.3 الكشف الجيني عن جينات الضراوة لبكتيريا *P. aeruginosa* باستعمال جهاز PCR	90

91	8.3 التنميط الجيني لبكتيريا *P. aeruginosa* باستعمال طريقة ERIC	73
92	الاستنتاجات	81
93	التوصيات	82
94	المصادر	83
95	الملاحق	113

قائمة الجداول

ت	عنوان الجدول	الصفحة
1	جدول (2 – 1) البوادئ المستعملة في هذة الدراسة	33
2	جدول (3-1) يبين مصدر العزلات البكترية وعدد عزلات كل مصدر والنسبة المئوية لهذه العزلات	51
3	الجدول (3-2) عدد العزلات والنسبة المئوية لمقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية	53
4	الجدول (3-3) انماط المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa*	59
5	جدول (3-4) يوضح عدد ونسب عوامل الضرواة التي تمتلكها بكتيريا *P. aeruginosa*	64
6	جدول (3-5) يوضح عدد ونسب جينات الضراوة التي تمتلكها بكتيريا *P. aeruginosa*	73
7	الجدول (3-6) الاوزن الجزيئية والنسب المئوية للحزم الناتجة في طريقة ERIC	74

قائمة الاشكال

ت	عنوان الاشكال	الصفحة
1	الشكل (1-1) عوامل الضراوة لبكتيريا *P. aeruginosa*	11
2	الشكل (1-2) يوضح عمل المضادات الحيوية على اهدافها في الخلية البكتيرية	16
3	الشكل (3-1) يوضح الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين 16S rDNA	50
4	الشكل (3-2) يوضح النسبة المئوية لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز من قبل عزلات بكتيريا *P. Aeruginosa*	60
5	الشكل (3-3) انتاج بكتيريا *P. aeruginosa* لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs. باستعمال وسط الكرومايجين CHROMagar ESBLs	62
6	الشكل (3-4) يوضح النسبة المئوية لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs من قبل عزلات بكتيريا *P. Aeruginosa*	63
7	الشكل (3-5) انتاج بكتيريا *P. aeruginosa* للغشاء الحيوي Biofilm	67
8	الشكل (3-6) يوضح الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين *tox A*	69
9	الشكل (3-7) يوضح الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين *las B*	70
10	الشكل (3-8) يوضح الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين *alg D*	71
11	الشكل (3-9) يوضح الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين *pvd A*	72
12	الشكل (3-10 A) يوضح الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال بادئ لاجراء التنميط الجيني بطريقة ERIC	78
13	الشكل (3-10 B) يوضح الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال بادئ لاجراء التنميط الجيني بطريقة ERIC	78
14	الشكل (3-10 C) يوضح الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال بادئ لاجراء التنميط الجيني بطريقة ERIC	79
15	الشكل (3-10 D) يوضح الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال بادئ لاجراء التنميط الجيني بطريقة ERIC	79
16	الشكل (3-11) يوضح مخطط التحليل التجميعي Dendogram لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال برنامج Past	80

قائمة المختصرات

Abbreviation	**Key**
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ADP-ribosyl	Adenosine Di Phosphate
alg D	Alginate D
AMEs	Aminoglycoside modifying enzymes
β -Lactamase	Beta-lactamase
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoxyribose Nucleic Acid
las B	Elastase B
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
EDTA	Ethyl-Diamine-Tetra-Acetic acid
tox A	Exotoxin A
ESBLs	Extended-Spectrum β -lactamase
LPS	Lipopolysaccharide
MDR	Multidrug Resistance
PBPs	Penicillin Binding Proteins
PLC	Phospholipase C
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
pvd A	Pyoverdin A
RAPD	Random Amplification of Polymorphic
REP	Repetitive Extragenic Palindromic
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
TBE	Tris borate EDTA buffer
UV Light	Ultra Violet Light
UTI	Urinary Tract Infections

المقدمة

Introduction

المقدمة

تعد *Pseudomonas aeruginosa* من الانواع البكتيرية المهمة لكونها واسعة الانتشار في الطبيعة وتسبب العديد من الامراض للانسان والحيوان منها تسمم الدم Bacteremia ، اصابات القناة البوليـــة Urinary tract infections ، التهاب شغاف القلب Endocarditis ، التهاب الأذن الوسطى Otitis media وكذلك اصابات الجروح والحروق Wound and Burn Infection (Bhasin *etal*.,2015) فهي من الممرضات الانتهازية Opportunistic pathgens و نادراً ما تسبب المرض في الاشخاص الاصحاء لكنها تشكل خطورة حقيقية على المرضى الراقدين في المستشفيات لاسيما مع المرضى الذين يعانون نقصاً في المناعة Immunodeficiency مثل الاشخاص المصابين بالايدز AIDS كذلك المصابين بالحروق إذ تعد اهم الانواع البكتيرية التي تسبب مايعرف بالاصابات المكتسبة في المستشفيات Nosocomial infection (Mulcahy *et al*.,2011) .

يعود صعوبة علاج الاصابات الناجمة عن هذه البكتيريا الى مقاومتها المتعددة للعديد من المضادات الحيوية و قدرتها على المقاومة الذاتية Intrinsic resistance من خلال الخصائص الوراثية التي لها دور في منع تأثير المضادات الحيوية في الخلية البكتيرية (Lister *etal*.,2009) وكذلك قدرتها على اكتساب صفة المقاومة Acquired resistance ويحصل ذلك من خلال طفرات في المادة الوراثية او اكتساب جينات المقاومة من انواع بكتيرية اخرى (Odumosu *etal*.,2013) ، وايضـــاً فـــإن انتـــاج هـــذه الـــبكتيريا لانـــزيمات البيتالاكتاميز β –lactamase وانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended-Spectrum β – lactamase (ESBLs) لها دور كبير في مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية (Strateva and Yordanov,2009) .

ان امتلاك بكتيريا *P. aeruginosa* للعديد من عوامل الضراوة Virulence factors التي لها دور بشكل مباشر او غير مباشر في امراضيتها ومن هذه العوامل هي الذيفان الخارجي Exotoxin A ، طبقة الالجنيت Alginate ، الهيمولايسين Hemolysin ، الغشاء الحيوي Biofilm ، الايلاستيز Elastase و الانزيم الحال للبروتين Protease (Jimenez *et al*.,2012) .

ان التطور الكبير في علم الأحياء الجزيئي ادى الى استعمال العديد من التقنيات الحديثة والمتطورة والسريعة في مجال ايجاد العلاقات الوراثية بين العزلات البكتيرية وتحديد مصدر وطرائق العدوى في داخل المستشفيات لمنع حدوث ما يسمى بالاصابات المكتسبة في المستشفيات (Ranjbar *etal*.,2014) وعليه تقييم مدى فعالية الطرائق المتبعة في السيطرة على الممرضات لمنع العدوى وكذلك لتحديد مدى وبائيتها (Li *etal*.,2009) وعليه فإن هناك العديد من طرائق التنميط الجيني Genotyping التي لها اهمية كبيرة في هذا المجال واحدى هذه الطرائق هي طريقة التسلسلات المتكررة المعتمدة على جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل Repetitive sequence-PCR التي تعتمد على وجود تسلسلات متكررة في جينوم البكتيريا ومن انواعها طريقة التعداد التكراري للجراثيم المعوية Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) (Mohapatra and Mazumder,2008) ، وتعد من الطرائق المهمة ، البسيطة والسهلة من ناحية اجرائها واقل تعقيدا في تحليل النتائج من الطرائق الاخرى و استعملت بشكل واسع في مجال دراسة التنميط الجيني Genotyping للعديد من الأنواع البكتيرية وفي مجال الدراسات الوبائية (EL-Bialy *etal*.,2008) .

لقد جاءت هذه الدراسة بهدف دراسة وتحديد القرابة الوراثية Genetic relatedness بين عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* بوساطة استعمال طريقة ERIC-PCR وتم ذلك من خلال اتباع مايأتي :

1. جمع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* من مصادر سريرية مختلفة واجراء تشخيص لهذه العزلات بالاعتماد على خصائص النمط المظهري Phenotype والنمط الجيني Genotype وباستعمال الجين 16S rDNA .

2. الكشف عن مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية و لمجاميع مختلفة منها البيتالاكتام β –lactama ، الامينوكلايكوسايد Aminoglycoside و الكينولينات Quinolones .

3. الكشف المظهري عن انـزيمات الـبيتالاكتاميز β– lactamase وانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Extended-Spectrum β –lactamase .

4. الكشف المظهري عن بعض عوامل الضراوة مثل الهيمولايسين Hemolysin ، الانزيم الحال للبروتين Protease والغشاء الحيوي Biofilm .

5. الكشف الجيني عن بعض جينات الضراوة *tox A* ، *las B* ، *alg D* و *pvd A* بتقنية PCR .

6. تحديد القرابة الوراثية Genetic relatedness بين عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وذلك من خلال تنميطها جينياً باستعمال طريقة ERIC-PCR .

الفصل الأول

استعراض المراجع

Literature Review

1. استعراض المراجع Literatures Review

1.1 تسمية و تصنيف بكتيريا *P. aeruginosa*

Nomenclature and classification of *P. aeruginosa*

عزلت بكتيريا *P. aeruginosa* لاول مرة في عام 1882 م من قبل العالم Gessard من حالات الجروح القيحية و اطلق عليها اسم *Bacillus pyocyaneas* تم تغيير اسمها الى *Pseudomonas pyocyaneas* وبعد ذلك سميت *Pseudomonas aeruginosa* (Person *et al*.,2004) .

ويعود تسمية البكتيريا من الاسم Pseudo في الاغريقية يعني كاذبة False ، وان Monas تعني واحدة اما المقطع الثاني aeruginosa في الاغريقية يسمى بالزنجار (صدأ نحاسي) (Brooks *et al*.,2010) .

تنتمي بكتيريا *P. aeruginosa* الى العائلة Pseudomonadaceae وتضم انواعا عديدة ضمن الجنس *Pseudomonas* (Conti *et al*.,2009) وتم الاعتماد على تسلسل الحامض النووي لاسيما تسلسل 16S rRNA في التصنيف (Tripathi *et al*.,2013) والموقع التصنيفي لهذه البكتيريا (Slonczewski and Foster,2014) كمايأتي :

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gamma Proteobacteria

Order : Pseudomonadales

Super Family : Ribosomal RNA I

Family : Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Species : *Pseudomonas aeruginosa*

2.1 الصفات العامة لبكتيريا *P. aeruginosa*

General characteristics of *P. aeruginosa*

بكتيريا الزوائف الزنجارية *P. aeruginosa* من العصيات السالبة لصبغة كرام Gram-negative rods وان قطر الخلية يتراوح مابين 0.5 – 0.8 مايكرومتر وطولها 1.5– 3 مايكرومتر والخلية تظهر مفردة او على شكل ازواج او سلاسل قصيرة (Todar,2008) ، لاتكون السبورات Non-spore ، متحركة بوساطة سوط قطبي Pollar Flagella ، تكون محاطة بمحفظة Capsule وهي هوائية اجبارية Obligately aerobic ، الدرجة الحرارية المثلى لنموها 37 م° ولكن لها القدرة على النمو في درجة الحرارة 42 م° (Brooks *et al.*,2013).

بكتيريا *P. aeruginosa* قادرة على افراز العديد من الصبغات منها صبغة البايوسيانين Pyocyanin ذات اللون الازرق المخضر ويكتسب الوسط الزرعي للبكتيريا لون صبغة البايوسيانين pyocyanin مثل الوسط Muller Hinton agar و وسط الاكار المغذي Nutrient agar ويصطبغ القيح باللون الاخضر المزرق Blue-Green pus في اصابات الحروق والجروح Wound and Burn Infection ، تمتلك البكتيريا ايضا صبغة البايوفردين Pyoverdin وتكون ذات اللون الاصفر المخضر وهذه الصبغات تكون ذائبة في الماء (Kayser *et al.*,2005) ، ومن صفاتها الزرعية تنمو على وسط MacConkey agar و لاتخمر سكر اللاكتوز non-Lactose Fermentation إذ تكون مستعمرات شاحبة اللون وعند نموها على وسط اكار الدم Blood agar تقوم بتحليل الدم وهذا يعود لانتاجها لانزيم الهيمولايسين Hemolysin (Hossain *et al.*,2013) ، تعطي نتيجة موجبة لفحص الاوكسيديز Oxidase والكاتاليز Catalase ، لها رائحة تشبه رائحة العنب Grape يعود ذلك لانتاجها مركب Aminoacetophenone (Alarji and Ali,2012) ، تحصل على الطاقة اللازمة لها من الكاربوهيدرات من خلال عملية الاكسدة (Greenwood *et al.*,2007) يمكنها البقاء على قيد الحياة حتى مع توفر مستويات منخفضة من المغذيات وهذا يتيح لها البقاء لمدة طويلة على المعدات الطبية والسطوح الاخرى مؤدية الى حدوث عدوى المستشفيات Nosocomial Infections (Ramos *et al.*,2013) .

3.1 تشخيص بكتيريا *P. aeruginosa*

Identification of *P. aerginosa*

تعد بكتيريا *P. aeruginosa* احدى الممرضات الانتهازية التي تصيب الانسان (Bentzmann and Plesiat,2011) تسبب العديد من الامراض الخطرة التي تؤدي في احيان كثيرة الى وفاة الشخص المصاب لذلك من الضروري اتباع الطرائق الدقيقة والسريعة في تشخيص هذا النوع من الممرضات (Overhage *et al*.,2008) ومن طرائق التشخيص المستعملة هي :

1.3.1 التشخيص التقليدي Conventional Identification

غالبآ ماتستعمل الطرائق التقليدية المختبرية في تشخيص العزلات البكتيرية ومنها بكتيريا *P. aeruginosa* التي تشمل خصائص المستعمرات والاختبارات البايوكيميائية (Tortora *et al*.,2004) ، لكن هذا النوع من الطرائق بدا يواجه صعوبات في التشخيص الدقيق للعزلات البكتيرية لاسيما مع التغايرات في النمط المظهري Phenotype في الاجناس البكتيرية المعزولة التي تحتوي على العديد من الأنواع المتقاربة جدآ فيما بينها وكذلك بطء نمو بعض الأنواع البكتيرية (Eusebio *et al*.,2013) .

2.3.1 التشخيص الجزيئي Molecular Identification

اصبح استعمال تقنية PCR في الكشف عن الممرضات البكتيرية طريقة دقيقة وسريعة لاسيما عندما تكون هذه الممرضات صعبة التنمية في المختبر وتحتاج الى مدة حضن طويلة لكي تنمو في الوسط الزرعي (Yamamoto,2002) وهناك العديد من الجينات التي يمكن ان تستعمل لتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* بوساطة PCR ومنها 16S rDNA ويتم تصميم البادئ المتخصص لهذا الجين (Salman *et al*.,2013) .

ادى استعمال تسلسلات 16S rDNA الى اعادة تصنيف العديد من الاجناس البكتيرية ونقل احياء من جنس الى اخر وكذلك من نوع الى نوع اخر واستحداث اجناس وانواع جديدة (Woo *et al*.,2008) .

وباستعمال الجين 16S rDNA الذي يهيئ التشخيص الدقيق لبكتيريا *P. aeruginosa* وتميزها عن باقي انواع جنسها او الاجناس الاخرى ولذلك يعد هذا التشخيص ادق من الاختبارات التقليدية المستعملة مختبريا (Altaai *et al*.,2014) إذ ان الجين 16S rDNA يعطي تشخيصآ على مستوى النوع و له تسلسل ثابت لكل نوع من الأنواع البكتيرية لذلك له دور مهم جدآ في التشخيص الجزيئي Molecular Identification (Hussien *et al*.,2012) وعلية فإن الفائدة المهمة عند استعمال هذه الطريقة هي التشخيص السريع عند الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* ويؤدي الى الاستعمال المبكر للمضادات الحيوية المناسبة للقضاء على الاصابة ومنع العدوى (Ugur *et al*.,2012) .

4.1 الوبائية Epidemiology

تعد بكتيريا *P.aeruginosa* واسعة الانتشار إذ تتواجد بشكل حر في بيئات عديدة ومنها التربة والمياه وحتى على النباتات وبشكل طبيعي وايضآ متواجدة بشكل متطفل على جلد الانسان والحيوان (Bhasin *et al*.,2015) وتواجدها في هذه البيئات المتنوعة يعود ذلك لقدرتها على الاستفادة من المركبات العديدة كمصادر للطاقة ومنها الكاربوهيدرات والمركبات النتروجينية وفضلا عن ذلك انها لاتحتاج الى عوامل نمو معقدة (Blanc,2007) .

ان بكتيريا *P.aeruginosa* لاتزال في تطور مستمرفي احداث الاصابات لاسيما في المرضى الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي لديهم اذ يكونون اكثر الاشخاص عرضة للاصابة (Hassan *et al*.,2009) وكذلك فإن العدوى عن طريق الاصابات التنفسية Respiratory infections لها دور مهم في انتشار بكتيريا *P.aeruginosa* وانتقالها من شخص الى اخر إذ تنتقل الى المناديل وايدي المرضى وبعد ذلك تنتقل بالملامسة المباشرة لجلد و ملابس المرضى وكذلك اصابات الجهاز الهضمي Digestive system وذلك عند تلوث الماء والغذاء عن طريق الحاملين للعامل الممرض Carriers (Martinez-Solano *et al*.,2008) ومما زاد من ضراوتها هو مقاومتها لمجموعة متنوعة من المركبات الكيميائية بما في ذلك المضادات الحيوية Antibiotics ، المنظفات Detergents والمطهرات Disinfectants (Mitiku *et al*.,2014) وهذا ما سمح لهذه البكتيريا بالبقاء في المواد المطهرة ، الادوية السائلة ، وكذلك على ارضية المستشفيات وهذا ساعد على زيادة نسبة الاصابة بهذه البكتيريا في المرضى الراقدين في المستشفيات لاسيما في وحدة العناية المركزة Intensive Care Unit (Ochoa *et al*.,2013) .

قد وجدت العديد من الدراسات ان بكتيريا *P.aeruginosa* هي احدى المسببات الرئيسة لتجرثم الدم Bacteremia ، ذات الرئة Pneumonia و السحايا Meningitis في وحدات العناية المركزة للاطفال حديثي الولادة Neonatal Intensive Care Unit (Crivaro *et al.*,2009) وكذلك فإن بكتيريا *P.aeruginosa* تسبب اصابات الاذن Ear infections ، التهاب شغاف القلب Endocarditis ، اصابات العظام والمفاصل Bone and Joint infections ، اصابات القناة البوليـــة Urinary tract infections واصابــات الــمعــدة والامعــاء Gastrointestinal infections فضلا على انها العامل الرئيس المسبب للاصابات المكتسبة في المستشفيات Nosocomial Infections لاسيما في مراكز الحروق (Salimi *et al.*,2010) .

يمكن ان يكون مصدر الاصابة للشخص مصدرا داخليا Endogenous من خلال تواجدها بشكل طبيعي في الامعاء او الجهاز التنفسي اذ يمكن ان تنتقل الى اماكن اخرى ومحدثة الاصابة عند حدوث خلل في دفاعات المضيف وهناك ايضا مصادر خارجية Exogenous قد تحدث عن طريقها الاصابة ومن هذه المصادر هي الادوات الجراحية ، انابيب التنفس ، الماء ، الغذاء او من مرضى اخرين وغيرها من المصادر (Horan *et al.*,2008) .

5.1 الامراضية Pathogenesis

بكتيريا *P.aeruginosa* تعد من الممرضات التي تسبب العديد من الاصابات الانتهازية الحادة Severe Opportunistic Infections وترافق حالة الوفيات وبنسبة عالية (Gellatly and Hancock,2013) مع ذلك فهي نادرآ ماتسبب الاصابة في الاشخاص الاصحاء لكنها تحدث الاصابة بعد ضرر الحواجز الدفاعية في المريض (Chen,2014) ولها دورا مهما للغاية في احداث الامراضية في الانسان والحيوان (Mulcahy *et al.*,2011) .

عند دخول بكتيريا *P.aeruginosa* الى جسم المضيف تبدا مرحلة الالتصاق Attachment في الخلايا بوساطة الاهلاب Pili ثم انتاج عوامل الضراوة التي تحقق لها الامراضية ومنها انتاج الانزيم الحال للبروتين Protease الذي يحلل الالياف البروتينية ليكشف المستقبلات للخلايا البكتيرية (Stones and Krachler,2015) وبعد الالتصاق وبناء المستعمرات تحدث مرحلة غزو موضعي Local invasion للانسجة الذي يعتمد بشكل كبير على انتاج الذيفانات الخارج خلوية والانزيمات التي لها القدرة على تحطيم دفاعات المضيف وامتلاكها المحفظة Capsule التي لها دور مهم في حماية الخلية البكتيرية من خلايا البلعمة او

من تأثير المضادات الحيوية بعد ذلك يحدث انتشار جهازي للمرض ومن خلال مجرى الدم الذي يساعد على الانتشار هو مقاومة بكتيريا *P.aeruginosa* للاضداد ولعملية البلعمة (Okuda *et al.*,2010) واحتوائها على متعدد السكريات الدهني Lipopolysaccharide (LPS) (King *et al.*,2009) وكذلك الذيفان الخارجي Exotoxin A له دور وبشكل فعال في الامراضية خلال الانتشار الجهازي للمرض (Gharajelar *et al.*,2013) .

ان الاصابة ببكتيريا *P.aeruginosa* غالبا ماتكون معقدة لقدرتها على اجتياح الانسجة والتكاثر فيها وكذلك انتاج السموم Toxigenic ليحدث الضرر وفي حالات كثيرة تحدث الاصابات عند نقل الاعضاء Transplant Infection (Sawa,2014) وعندما تحدث الاصابة في العين فإنها في الغالب تستعمر النسيج الظهاري للعين Ocular Epithelium و تستطيع ان تتكاثر بسرعة عند غياب دفاعات المضيف وتنتج الانزيمات وقد تؤدي الى فقدان البصر في الشخص المصاب (Tananuvat *et al.*,2012) .

يمكن ان تحدث الاصابة في الأذن Ear Infection بوساطة بكتيريا *P.aeruginosa* وتكون هذه البكتيريا المسببة لحالات التهاب الأذن الخارجية External Otitis وارتباطها في حالات الالتهاب ، الخدش او اي ضرر اخر يحدث في الاذن وهناك حالات اكثر خطورة التي تعرف بالتهاب الاذن الخارجية الخبيث Malignant External Otitis قد تسبب تلف الاذن ويؤدي الى فقدان حاسة السمع (Bush and Perez,2014) وايضا يمكن ان تحدث الاصابة في اي جزء من الجهاز الهضمي وعند وجود نقص في الوسائل الدفاعية مما يسبب الاسهال للاطفال او التهاب الامعاء (Markou and Apidianakis,2014) .

ومن الامراض الاخرى التي تسببها بكتيريا *P.aeruginosa* هـي تـجرثم الـدم Bacteremia وفي اغلب الاحيان يحدث هذا المرض في مرضى العوز المناعي لاسيما عند المصابين بالايدز AIDS وعند حدوث نقص في خلايا العدلة Neutrophil و حالات الجروح والحروق الشديدة Wound and Burn Infection إذ تـعد احدى المصادر المهمة لذلك (Bowers *et al.*,2013) إذ ان الجلد هو الخط الدفاعي الأول للجسم ضد العوامل الممرضة التي تهاجم الجسم وعليه فإن فقدان الجلد لهذه الوظيفة بعد التعرض للتلف الناتج عن الحروق او الجروح او اي مسبب اخر ينتج عن ذلك زيادة احتمالية الاصابة بالممرضات التي لها دور اساس في حالة الوفيات التي تحدث في اصابات الجروح والحروق (Park *et al.*,2014) ووجدت العديد من الدراسات ان بكتيريا *P. aeruginosa* هي المسبب الرئيس لاصابات الحروق

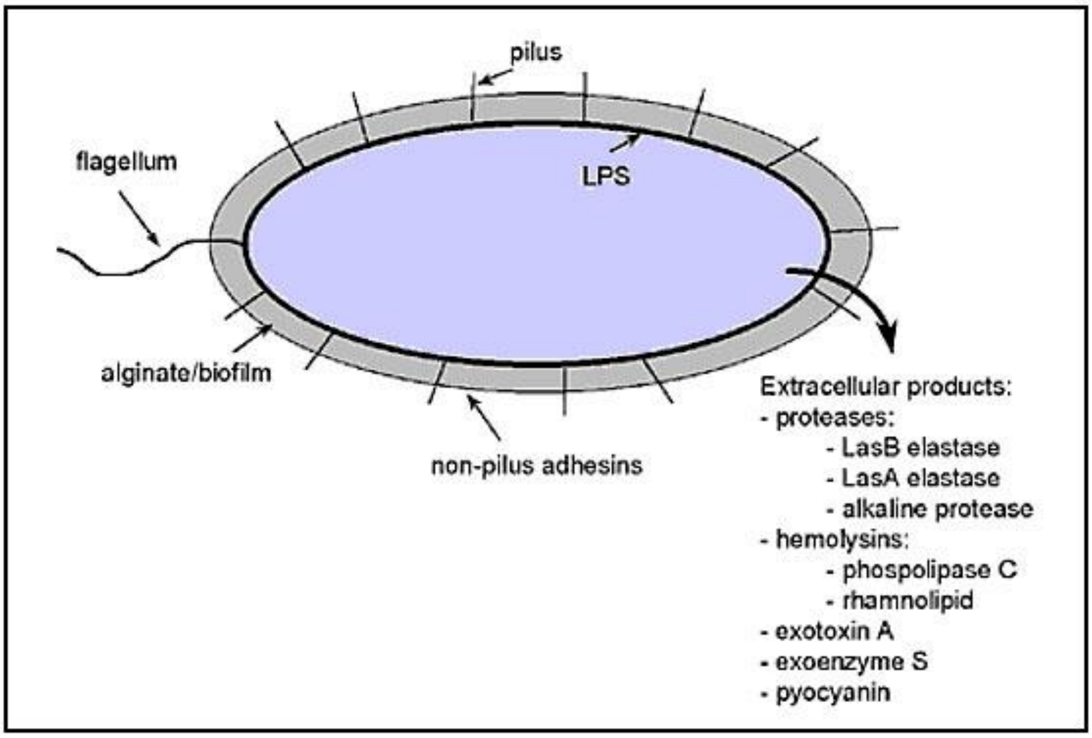
والجروح (Alwan *et al.*,2011)، كما يمكن ان تحدث الاصابة في القناة البولية Urinary Tract Infection وهناك الملايين من المرضى مصابيين بالتهاب المجاري البولية في كل سنة وغالبآ ما تحدث هذه الاصابات في المستشفيات لاسيما في الدول النامية Mittal) (*et al.*,2009 وتعد عمليات القثطرة Catheterization احدى العوامل المهمة التي تؤدي الى حدوث اصابات القناة البولية Urinary tract infections وذلك عن طريق انابيب القثطرة التي تكون ملوثة بالعوامل الممرضة (Cole *et al.*,2014) فضلا عن اصابتها للجهاز التنفسي Respiratory system التي تعد احدى المسببات للالتهاب الرئوي المزمن Chronic lung infections المرتبط بعملية التنفس الصناعي (Kukavica-Ibruj *et al.*,2008) .

وتسبب التهاب شغاف القلب Endocarditis إذ انها تصيب صمامات القلب عند استعمال الادوية في داخل الوريد او استعمال صمامات القلب الصناعية التي تكون ملوثة وبذلك تثبت نفسها في بطانة القلب (Ebadian *et al.*,2014) .

6.1 عوامل الضراوة Virulence Factors

ان اي عامل ممرض يحتاج لكي يحقق الاصابة والثبات في المضيف الى مجموعة من عوامل الضراوة لتحقق ذلك (Nikbin *et al.*,2012) ، وان القابلية الكبيرة لبكتيريا *P.aeruginosa* على غزو النسيج Invasive وانتاج السموم Toxinogenic يعود لكونـــها متعددة عوامل الضراوة Multifactorial Virulence (Sharma *et al.*,2004) كما موضحة في الشكل 1-1 .

تكون عوامل الضراوة اما مرتبطة بالخلية Cell-associated Factor ومنها الاسواط Flagella ، الاهلاب Pili ، عديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide (LPS) ويسمى ايضآ الذيفان الداخلي Endotoxin والألجنيت Alginate ، وهناك عوامل تفرز خارج الخلية Secreted Extracellular Factor ومنها الانزيم الحال للدم Hemolysin ، البروتيزالقاعدي Alkaline Protease ، Elastase ، الذيفان الخارجي Exotoxin ونظام افراز النوع الثالث Type III Secretion system (Jimenez *et al.*,2012) ، تتم عملية التحكم في انتاج الكثير من عوامل الضراوة في بكتيريا *P.aeruginosa* من قبل نظام Quorum-Sensing الذي له دور مهم في عملية التنظيم والتعبير عن الجينات المهمة والمسؤولة عن عوامل الضراوة لبكتيريا *P.aeruginosa* (Mattmann and Blackwell,2010) .



الشكل (1-1) عوامل الضراوة لبكتيريا *P. aeruginosa* (Delden and Iglewski,1998)

1.6.1 الأنزيم الحال للبروتين Protease

انزيمات Proteases لها دور مهم في زيادة ضراوة بكتيريا *P.aeruginosa* والمفرز منها خارج الخلية له اهمية في تدمير انسجة المضيف (Seo and Darwin,2013) .

تنتج بكتيريا *P.aeruginosa* انواعا من الأنزيمات الحاله للبروتين منها الحال للبروتين القاعدي Alkaline Protease و Elastase وان البروتيز القاعدي يشترك مع Elastase بتحليل بروتين Collagen وElastin (Ulrich *et al*.,2010) وعند افراز هذا الانزيم بكميات كبيرة يؤدي الى حدوث تنخر Necrosis في منطقة الاصابة وعند افرازه في رئة مرضى التليف الكيسي Cystic fibrosis يؤدي الى حصول دمار للخلايا الطلائية (Parker *et al*.,2012) وله القدرة على تحليل الأنسجة الرخوة والعديد من الجزيئات الفعالة بايلوجيا مثل الفايبرينوجين Fibrinogen(Komori *et al*.,2001) وكذلك تحليل بعض مكونات نظام المتمم Complement System (Laarman *et al*.,2015) .

انزيم Elastase هـو احـد عوامل الضراوة الرئيسة لبكتيريا *P.aeruginosa* وله علاقة بحصول التلف الشديد في الأنسجة خلال مرحلة غزو الانسجة من قبل البكتيريا (Hoge *et al*.,2010) ، ان ضراوته تكمن في قدرته على تحطيم Elastin وهو البروتين الذي يعد من

المكونات المهمة للاوعية الدموية في الانسان والمسؤول عن مرونتها وكذلك ان Elastin من المكونات الرئيسة للرئه والمسؤول عن عملية تمدد وتقلص الرئه ولهذا فإن انزيم Elastase له دور مهم في تحديد ضراوة بكتيريا *P.aeruginosa* خلال وقت الاصابة (Bai *et al*.,2011).

يشفر لانتاج انزيم Elastase الجين *las* B، إذ ان انزيم Las B elastase ذو كفاءة عالية جداً في تحليل البروتين واحداث عملية التنخر (Cathcart *et al*.,2011) وان عملية السيطرة على الجين *las B* تتم خلال عملية الاستنساخ Transcription من قبل النظام Quorum-Sensing (Zhao *et al*.,2014) .

2.6.1 انتاج الصبغات Pigments Production

تنتج بكتيريا *P.aeruginosa* العديد من الصبغات التي تكون ذات صفات تشخيصية ومن هذه الصبغات هي البايوسيانين Pyocyanin التي تكون ذات لون ازرق مخضر وهي من عوامل الضراوة المفرزة خارج الخلية (Parson *et al*.,2007) التي تكون ذات تأثير مثبط لنمو مجموعة البكتيريا الموجبة لصبغة كرام Gram-Positive عند نموها في الوسط الزرعي الحاوي على هذه الصبغة (El-shouny *et al*.,2011) ، ان صبغة البايوسيانين هي احدى مشتقات Phenozinium-5-methyl-hydroxy وهذه المركبات تكون لها فعالية في عملية التثبيط لبعض الانواع البكتيرية الموجودة في الموطن نفسه (Pierson and Pierson,2010) وكذلك لها تأثير في خلايا الانسان للتأثير في عملية التنفس الخلوي (Lau *et al*.,2004).

صبغة البايوفردين Pyoverdine (Fluorescein) وهذه الصبغة تكون متألقة تحت الأشعة فوق البنفسجية UV Light والمشفر لها من قبل الجين *Pvd A* وهناك جينات اخرى تشفر لانتاجها التي يتم التعبير عنها في ظروف نقص الحديد في الخلية البكتيرية *P. aeruginosa* وتمتلك بكتيريا (Creanga *et al*.,2011 ; Voulhoux *et al*.,2006) نوعين من انظمة نقل الحديد واحد النوعين هو البايوفردين Pyoverdine ولذلك فإن لصبغة البايوفردين اهمية كبيرة لأن نقص الحديد او فقدانه يؤثر في عملية انقسام الخلية وتوقف في عملية تصنيع DNA (Imperi *et al*.,2009) ، اما النوع الاخر فهو البايوجلين Pyochelin وان تكوين كلا النوعين يتم اثناء الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* وغزو الانسجة في جسم المضيف (Cornelis and Dingemans,2013) .

3.6.1 الذيفان الخارجي Exotoxin A

الذيفان الخارجي نوع A هو احد البروتينات عالية السمية الذي يعد احد العوامل شديدة الضراوة وترجع اليه بعض حالات الوفاة عند افرازه من قبل بكتيريا *P.aeruginosa* وهو يتوسط الامراض الموضعية والجهازية Local and Systemic disease وله علاقة في حدوث التنخر Necrosis في موقع الاصابة البكتيرية (Baradaran *et al.*,2013) ، يشفر للذيفان الخارجي Exotoxin A من قبل الجين *tox* A وهذا الذيفان عند انتاجه من قبل الخلية البكتيرية يرتبط بمستقبلات معينة على سطح خلية المضيف مما يسمح بالدخول اليها (Morlon-Guyot *et al.*,2009) .

تكمن خطورة الذيفان الخارجي Exotoxin A في تثبيطه لعملية تصنيع البروتين في خلايا المضيف من خلال تكوين المعقد 5-Diphosphate Ribosyl مع احد عوامل الاستطالة وهو EF2 من خلال نقل ADP-ribosyl من NAD الى العامل EF2 وبذلك يمنع استطالة سلسلة البروتين على الرايبوسوم ولهذا فإن الذيفان الخارجي له آلية مشابهة لعمل ذيفان الخناق diphtheria toxin لكن المستقبلات للذيفان الخارجي التي تكون موجودة على سطح الخلية تكون مختلفة عن مستقبلات ذيفان الخناق (Xing *et al.*,2010) وايضا لهذا الذيفان دور باختراق النسيج لاسيما عند المرضى المصابين بالتليف الكيسي Cystic fibrosis ووجد ان السلالات التي تكون غير منتجة للذيفان الخارجي تكون اقل ضراوة من السلالات المنتجة له (Davinic *et al.*,2009) .

4.6.1 الألجنيت Alginate

ان طبقة الألجنيت Alginate عبارة عن متعدد السكريات الخارجي Exopolysaccaride التي تمثل المادة المخاطية وتكون ذات لزوجة عالية وتوفر الحماية لخلية البكتيريا من العوامل الدفاعية للمضيف مثل خلايا البلعمة ومن مكونات نظام المتمم (Tan *et al.*,2014) ، ان الافراط في انتاج الألجنيت والتحول الى المظهر المخاطي هي احدى العلامات لظهور التهاب الرئتين المزمن في مرضى التليف الكيسي Cystic Fibrosis (Qiu *et al.*,2008) ويشفر الجين *alg D* لانتاج الألجنيت (Jain and Ohman,2005) .

تعد طبقة الألجنيت المخاطية عنصرا اساسيا لتكوين الغشاء الحيوي Biofilm وهناك العديد من العوامل التي تحفز لانتاج الألجنيت مثل الارتفاع في الضغط الازموزي ، قلة المواد الغذائية ، قلة معدل النمو **وكذلك التعرض للمضادات الحيوية** (Lamppa and Griswold,2013)

وهذه الطبقة تعد احدى اهم عوامل الضراوة التي لها دور في توفير الحماية اللازمة لخلية البكتيريا وعدم التعرض الى خلايا البلعمة وغيرها من دفاعات المضيف (Rowe,2013) .

5.6.1 الهيمولايسين Hemolysin

هو من عوامل الضراوة الذي ينتج من قبل البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ومنها بكتيريا *P.aeruginosa* وبشكل عام هناك نوعين من انزيم الهيمولايسين Hemolysin ، النوع الاول Phospholipase C وهذا النوع يكون متأثر حراريا Heat Labile (Truan *et al.*,2013) ، وان الأنزيم Phospholipase C (PLC) يكون على نوعين هما الحال للدم PLC-H والأخر غير الحال للدم PLC-N لكن لهما الوزن الجزيئي نفسه وان انزيم PLC له دور مهم في امراضية بكتيريا *P. aeruginosa* (Cotar *et al.*,2010) والنوع الثاني من انزيم الهيمولايسين هو Rhaminolipid الذي يكون ثابتا حراريا Heat Stable وله تركيب يشبه المنظفات وله القدرة على تحليل الدهون مما يجعلها اكثر سهولة في التحطيم بوساطة النوع PLC و يؤدي الى تثبيط او فقدان فعالية الحركة الهدبية بالخلايا الطلائية الموجودة في الجهاز التنفسي لذلك له دور مهم للغاية في الاصابات الحادة والمزمنة للبكتيريا (Roger and Ibrahim,2012) .

ان انزيم الهيمولايسين يؤدي دورا كبيرا في تحقيق الامراضية من خلال تحليل كريات الدم الحمر للمضيف وعليه يجعل الحديد متوفرا لنمو البكتيريا وكذلك يؤدي الى حدوث تنخرات في الجلد وبشكل عام فإن غالبية عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* تكون منتجة له ومن النوع Beta-hemolysin (Massimelli *et al.*,2005) .

6.6.1 الغشاء الحيوي Biofilm

تميل العديد من الخلايا البكتيرية لتكوين تجمعات مقاومة لظروف غير ملائمة رغم انه في اغلب الأحيان تتواجد الخلية البكتيرية بصورة حرة (Klausen *et al.*,2003) وهذه التجمعات تكون محاطة بطبقة مكونة من متعدد السكريات الخارجي الذي يساعد على الالتصاق وكذلك البروتين والحامض النووي DNA وتتميز بوجود قنوات ينقل من خلالها الافرازات الخلوية والمغذيات (Hoiby *et al.*,2010) .

تعد عملية تكوين الغشاء الحيوي استجابة لمجموعة من العوامل منها نقص المغذيات ، انخفاض الرقم الهيدروجيني PH وكذلك لتوفير الحماية اللازمة للتجمعات البكتيرية من دفاعات

المضيف ويعد الغشاء الحيوي صفة مهمة لاستمرار الاصابة (Sharma *et al*.,2014) وعند تكوين الغشاء الحيوي فإن البكتيريا تبدي مقاومة عالية للمضادات الحيوية وبنسبة قد تصل الى 1000 مرة مما هو في الأنواع البكتيرية غير المكونة للغشاء الحيوي ليشكل صعوبة في التخلص من العامل الممرض وعلاج الاصابة (Bacalso *et al*.,2011) .

ان تكوين الغشاء الحيوي لبكتيريا *P.aeruginosa* يساعدها في زيادة ضراوتها وبقائها على قيد الحياة لمدة طويلة جداً على الأسطح الجافة (Vallet *et al*.,2004) ، وتركز العديد من الدراسات على عملية تكوين الغشاء الحيوي وذلك لأنه يعد مصدراً للكثير من الامراض المزمنة ومنها الالتهاب الرئوي المزمن Chronic pneumonia ، التهاب المثانة المزمن Chronic bladder inflammation ، التهاب العظام Bone inflammation والتهاب شغاف القلب Endocarditis ويحدث ذلك من خلال تجمع الخلايا البكتيرية وانتاج الذيفانات Toxin (Lanter *et al*.,2014) وان عملية تكوينه تتم من خلال حدوث انجذاب للخلايا وبناء المستعمرات وانتاج عديد السكريد الخارجي Exopolysaccaride (Alginate) (Wei and Ma,2013) ويتم تنظيم عملية تكوين الغشاء الحيوي من خلال جينات Qourum-Sensing الذي يتيح من خلاله للخلايا البكتيرية التواصل مع بعضها البعض في داخل الغشاء الحيوي وبذلك تتفاعل فيما بينها وكأنها كائن متعدد الخلايا Multi-Cellular Organism (Li and Tian,2012) .

7.1 مقاومة بكتيريا *P.aeruginosa* للمضادات الحيوية

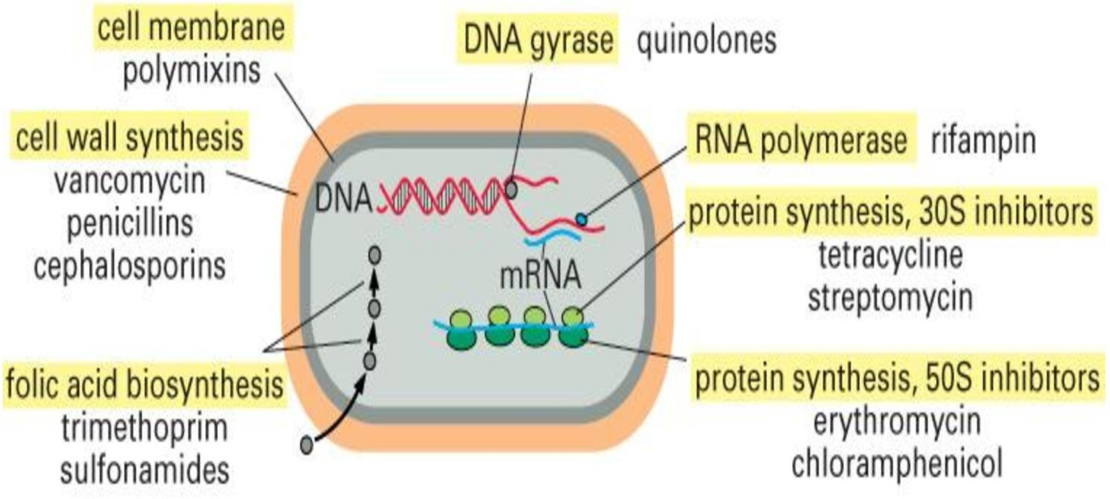
P.aeruginosa resistance to antibiotics

منذ ان تم اكتشاف المضادات الحيوية Antibiotic في عام 1929 م من قبل العالم الكسندر فليمنج عملت على التخلص من تهديد الامراض وخفض نسبة الوفيات التي سببتها العوامل الممرضة اما في الوقت الحاضر اصبحت مقاومة المضادات الحيوية مشكلة عامة حول العالم لاسيما في الدول النامية وفي تزايد مستمر (Idrees,2012) .

تمتلك المضادات الحيوية العديد من الاليات في قتل او تثبيط النمو البكتيري (Mahmoud (*et al*.,2013 كما موضحة في الشكل (1-2) وعلية فإنه هناك بعض المضادات التي لها فعالية ضد بعض عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* ومنها مجموعة مضادات البيتالاكتام β -Lactam مـــثل الـــبنسيلينات Penicillinis (Ampicillin) ، الســيفالوسبورينات

الـمونوبكتـام Monobactam ،(Cefotaxime و Ceftazidime) Cephalosporins الـكاربنييـم Carbapenems (Imipenem) ومجموعـة مضـادات ، (Aztreoname) الامـينوكـلايـكوسـايـد Aminoglycoside (Tobramycin ، Gentamicin، Amikacin) ومضادات الكينولينات Quinolones (Ofloxacin ، Norfloxacin ، Ciprofloxacin) (Black,2012) .

تعمل مجموعة مضادات البيتالاكتام B-lactam على تثبيط تخليق الجدار الخلوي Cell wall للبكتيريا وذلك من خلال الارتباط مع مواقع خاصة في الخلية البكتيرية تسمى Penicillin binding proteins إذ تقوم بتثبيط عمل الأنزيم Transpeptidase الذي له دور في تكوين الجسور الببتيدية في طبقة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan التي تكون ضمن مكونات الجدار الخلوي (Zervosen *et al*.,2012) وتعد هذه المجموعة من المضادات ذات الاهمية الكبيرة من بين المجاميع الأخرى وكثيرة الاستعمال (Konaklieva,2014) اما مجموعة مضادات الامينوكلايكوسايد فإن عملها يكمن في تثبيط تصنيع البروتين من خلال الارتباط مع تحت الوحدة الصغيرة للرايبوسومات (30s) التي تكون ذات تاثير قاتل للخلية البكتيرية التي لها طيف واسع ضد مجموعة البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (Hermann,2007) اما مجموعة مضادات الكينولينات فإن عملها يتمثل في تثبيط تصنيع الحامض النووي DNA من خلال ايقاف عمل انزيم DNA gyrase (Topoisomerase III) في مجموعة البكتيريا السالبة لصبغة كرام (Fabrega *et al*.,2009) .



الشكل (2-1) عمل المضادات الحيوية على اهدافها في الخلية البكتيرية (Islam,2008)

تعد الاصابة ببكتيريا *P.aeruginosa* صعبة العلاج نظرا لقدرتها على المقاومة الذاتية Intrinsic Resistance لمجاميع كثيرة من المضادات الحيوية من خلال الخصائص الوراثية المسؤولة عن منع تاثير الكثير من المضادات الحيوية والمقاومة الذاتية مرتبطة بالكروموسوم (Lister *et al.*,2009) وان هذا النوع من المقاومة يحدث بصورة طبيعية في البكتيريا مما يجعل مقاومتها عالية للمضادات الحيوية وتكون متوارثة وتنتقل بين أجيال البكتيريا كما في البكتيريا السالبة لصبغة كرام التي تمتلك الغشاء الخارجي Outer membrane الذي يعمل على منع دخول العديد من المضادات الحيوية الى داخل البكتيريا مما يجعلها مقاومة لهذه المضادات (Mesaros *et al.*,2007) فضلا عن قدرتها على اكتساب صفة المقاومة Acquired Resistance وهذا النوع من المقاومة يحصل عندما تتحول الخلية البكتيرية من حساسة الى مقاومة لأي مضاد حيوي ويحدث ذلك من خلال حصول طفرات في الكروموسوم Chromosome او اكتساب جينات المقاومة من مصادر خارجية عن طريق البلازميد Plasmid او جين قافزTransposone الذي يكتسب من انواع اخرى موجودة في الوسط نفسه (Odumosu *et al.*,2013; Akingbade *et al.*,2012) .

ان الاليات التي تمتلكها بكتيريا *P.aeruginosa* تكون عديدة التي تمكنها من مقاومة العديد من انواع المضادات الحيوية من هذه الأليات هو انتاجها انزيمات البيتالاكتاميز β - lactamase وبمستوى عال وان افرازها يكون في المنطقة Periplasmic في البكتيريا السالبة لصبغة كرام وتعمل على تحطيم حلقة البيتالاكتام وبمجرد توقف فعالية المضاد فإنه يتوقف انتاجها وان الجينات المشفرة لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز تكون محمولة اما كروموسوميآ او بلازميديآ او على الجينات القافزة (Boussoualim *et al.*,2014) .

تنتج انزيمات البيتالاكتاميز التي تكون محمولة على الكروموسوم من قبل العديد من أنواع البكتيريا السالبة لصبغة كرام ومنها *P. aeruginosa* التي تقوم بحماية الخلية البكتيرية من تأثير العديد من مجموعة مضادات البيتالاكتام وتقسم انزيمات البيتالاكتاميز الكروموسومية على نوعين انزيمات منتظمة التكوين Constitutive enzyme التي تنتج بشكل طبيعي من دون الحاجة لوجود عامل محفز لانتاجها التي تكون بمستويات واطئة والنوع الاخر هو الأنزيمات المحفزة Inducible enzyme التي تحتاج الى وجود محفز Inducer و تنتج بمستويات عالية (Cavalieri *et al.*,2005) اما انزيمات البيتالاكتاميز التي تكون محمولة على البلازميد الاكثر شيوعآ في حصول المقاومة للمضادات الحيوية وذلك لقدرتها على الانتقال من خلية

بكتيرية الى اخرى وكذلك فإن الاستعمال الواسع والعشوائي للمضادات الحيوية ادى الى انتشار المقاومة البلازميدية (Mohamudha *et al.*,2012) .

هناك الية اخرى للمقاومة من خلال تغيير نفاذية الغشاء الخارجي Outer Membrane Immpermeability للبكتيريا السالبة لصبغة كرام ومنها بكتيريا *P.aeruginosa* وان نفاذية هذا الغشاء في بكتيريا *P.aeruginosa* هو اقل 10 – 100 مرة من نفاذيته في بكتيريا *E. coli* مما يتيح لها مقاومة الكثير من انواع المضادات الحيوية (Breidenstein *et al.*,2011) وكذلك فإن الغشاء الخارجي يحتوي على فتحات بروتينية Porins وان حصول تغيير في موقع هذه الفتحات يؤدي الى عدم دخول المضاد ويؤدي الى حصول المقاومة (Lister *et al.*,2009) ، تعد انظمة الدفق Efflux Systems ايضآ احدى أليات المقاومة في بكتيريا *P.aeruginosa* التي تعمل على ضخ المضاد الحيوي خارج الخلية البكتيرية مما يزيد من مقاومتها عند التعرض للمضادات الحيوية وان لمضخات الدفق وظائف أخرى ومنها ازالة النواتج الأيضية والسامة الموجودة في داخل الخلية البكتيرية (Jacoby,2009) .

الية تغيير موقع الهدف Alteration target site التي مكنت البكتيريا من تطوير مقاومتها للعديد من مضادات الحياة وذلك من خلال حدوث طفرات جينية (Lambert,2005) كما في مجموعة مضادات البيتالاكتام التي هدفها البروتينات المرتبطة بالبنسلين (PBPs) Penicillin binding proteins فعند حصول طفرة في الجينات المسؤولة عن الموقع PBPs تؤدي هذه الطفرة الى تغيير موقع الهدف وعدم قدرة المضادات الحيوية بالارتباط مع هدفها وعليه تتحول الخلية البكتيرية من حساسة الى مقاومة للمضاد الحيوي (Sun *et al.*,2014) ، اما الية الأنزيمات المحورة Modifing enzyme التي لها القدرة على احداث تحوير في جزيئة المضاد الحيوي ليتحول الى الشكل غير الفعال من خلال الارتباط بالمضاد الحيوي او اضافة مجاميع كيميائية الى المضاد وعلية لايمكن الوصول الى الهدف (Blair *et al.*,2015) كالذي تقوم به الأنزيمات المحورة Modifing enzyme لمجموعة مضادات الأمينوكلايكوسايد التي تعمل على التحوير الكيميائي لمجموعة الأمين والهيدروكسيل لهذه المجموعة من المضادات لتصبح ضعيفة القدره على الارتباط بالهدف وهو الرايبوسوم (Cox *et al.*,2015) .

هناك العديد من الأنواع البكتيرية المسببة للامراض لها مرونة عالية في حدوث التغيرات في مادتها الوراثية من خلال حصول طفرات وايضاً من خلال عملية نقل الجينات المسؤولة عن اعطاء صفة المقاومة اثناء التضاعف مما يؤدي الى تطوير مقاومتها ضد العديد من مجاميع المضادات الحيوية المتوفرة حالياً (Mandsberg *et al*.,2009) .

8.1 أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

Extended-Spectrum β -lactamase

ان انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs هي احدى اليات المقاومة المهمة للخلية البكتيرية وهذه الأنزيمات تكون معقدة ، متنوعة ، سريعة التطور وشكلت تهديداً للكثير من المضادات الحيوية المتاحه (Shaikh *et al*.,2015) .

ان التعرض المستمر والعشوائي من قبل مضادات البيتالاكتام على الخلية البكتيرية وفي المقابل انتاجها المستمر لأنزيمات البيتالاكتاميز β -lactamase ادى الى حصول العديد من الطفرات في الجينات المشفرة لانتاجها مما سبب في ظهور جينات مقاومة مشفرة لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف (Strateva and Yordanov,2009) التي تمنح صفة المقاومة للخلية البكتيرية ضد الكثير من مجموعة مضادات البيتالاكتام البنسلينات ، السيفالوسبورينات (للعديد من اجيالها) ومضادات الكاربانييم (Rezai *et al*.,2014) .

مع تطور وتصنيع الكثير من مضادات البيتالاكتام واسعة الطيف وذات التأثير المقاوم لأنزيمات البيتالاكتاميز فإن الخلية البكتيرية انتجت العديد من انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف التي قاومت تأثير هذه المضادات (Lutz and Lee,2011) وما زاد من المقاومة لمضادات البيتالاكتام لاسيما الحديثة منها هو ان الجينات المشفرة لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs تكون محمولة على البلازميد مما سهل انتقالها بين العديد من الأنواع البكتيرية إذ ادى الى انتشار صفة المقاومة (Brouwer *et al*.,2014) وفي هذا الوقت فإن بكتيريا *P. aeruginosa* تمكنت من مقاومة العديد من المضادات الحيوية المتاحة واحد اسباب مقاومتها هذه هو امتلاكها للجينات المشفرة لانتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs (Kanj and Kanafani,2011) .

هناك العديد من العوائل لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs منها عائلة TEM التي عزلت أول مرة عام 1965م من احد المرضى في اليونان واسمه Temoneira ومن هنا اشتقت التسمية (Rawat and Nair,2010) وتمتلك انزيمات TEM-ESBLs القدرة على تحليل العديد من مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات وكذلك فإن الجين المحمول على البلازميد الذي يشفر لانتاج انزيمات TEM-ESBLs منتشر عالميا (Varkey *et al.*,2014) ، ان انزيمات عائلة SHV اكثر تكرارا في العزلات السريرية مقارنة بالعوائل الاخرى التي لها القدرة على تحليل مضادات السيفالوسبورينات واما عائلة CTX-M فإن تسميتها باسم CTX يعكس الفعالية التحليلية ضد مضاد Cefotaxime من قبل انزيمات هذه العائلة ويشفر لها بوساطة جين يكون Transferable وله وجود بشكل واسع في العائلة المعوية (Shi *et al.*, 2015) ، وكذلك عائلة OXA التي لها قدرة عالية على تحليل مضاد Oxacillin وهي شائعة وبشكل واسع في بكتيريا *P. aeruginosa* وعائلة PER التي وجدت لأول مرة كان في بكتيريا *P. aeruginosa* وان هذه العائلة لها اهمية سريرية فهي قادرة على تحليل مضادات البنسلينات والسيفالوسبورينات (Libisch *et al.*,2008) .

9.1 التنميط الجيني لبكتيريا *P. aeruginosa*

Genotyping of *P. aeruginosa*

ان عملية تمييز انماط مختلفة للعزلات البكتيرية العائدة الى النوع نفسه يسمى بالتنميط Typing (Van *et al.*,2007) .

هناك نوعان من انظمة التنميط وهما التنميط المظهري Phenotyping والتنميط الجيني Genotyping (Jamasbi and Proudfoot,2008) ، ان التنميط المظهري Phenotyping هو انعكاس لناتج التعبير الجيني ويحدد بوساطة الشكل المظهري للمستعمرات النامية على مختلف الاوساط الزراعية ، الاختبارات البايوكيميائية ، الطرائق المصلية ، الامراضية ، حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية وفي كثير من الاحيان اصبحت هذه الطرائق التقليدية غير كافية للتميز بين العزلات البكتيرية لاسيما القريبة من بعضها البعض وكذلك فإنها تحتاج الى جهد ووقت لانجازها (Sabat *et al.*,2013) وعليه فإن التطورات في التقنيات الجزيئيه لها تأثيرات هامة في دراسة الاحياء المجهرية (Wolk and Dunne,2011) .

اما التنميط الجيني Genotyping يعمل على التمييز بين العزلات البكتيرية على اساس محتواها الجيني (Yildirim *et al.*,2011) وان طرائق التنميط الجيني اصبحت مهمة في مجال

ايجاد القرابة الوراثية Genetic relatedness بين العزلات البكتيرية ، تحديد مصدر وطرائق العدوى وتميز السلالات عالية الضراوة لمنع انتشارها (Ranjbar *et al.*,2014) وتقيم مدى فعالية طرائق السيطرة لمنع العدوى لاسيما في المستشفيات ومنها وحدة العناية المركزة التي غالبا ماتكون مكانا لظهور العديد من الممرضات المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية ومنها بكتيريا *P. aeruginosa* وكذلك لتحديد مدى وبائية الانواع البكتيرية المسببة للأمراض (Li *et al.*,2009) وان طرائق التنميط الجيني Genotyping لها اهمية كبيرة في عملية تصنيف الاحياء المجهرية على مستوى السلالة والقدرة على التمييز وبكفاءة عالية بين السلالات البكتيرية العائدة الى النوع نفسه (Yildirim *et al.*,2011) .

هناك مجموعة واسعة من طرائق التنميط الجيني المستعملة حاليا التي تختلف بقدرتها على التمييز بين العزلات البكتيرية العائدة الى النوع نفسه وكذلك دقة نتائجها والتكلفة المادية والجهد والوقت المطلوب لاجرائها (Foxman *et al.*,2005) ومن هذه الطرائق هي التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسة Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) DNA التي تعد من الطرائق السريعة والبسيطة ولاتحتاج الى معرفة مسبقه لتسلسل DNA ويتم تطبيقها على مختلف الاحياء (الانسان ، الحيوان ، النبات ، الفطريات ، البكتيريا) التي تتضمن مضاعفة قطع موجودة في الجينوم وباستعمال بادئات يبلغ طولها 10 قواعد ولكن احتمال عدم الحصول على النتائج نفسها عند اعادة الطريقة تعد من اهم المشاكل التي تواجه استعمال هذه الطريقة (Giske *et al.*,2006) وفي دراسة قامت بها Faik *et al.* (2012) على بكتيريا *Salmonella enterica* للمقارنة بين التنميط المظهري Phenotyping والتنميط الجيني Genotyping وشمل التنميط المظهري Phenotyping كل من التنميط الحيوي Biotyping والتنميط للمضادات الحيوية إذ اظهرت جميع العزلات البكتيرية نمطا واحدا باستعمال API20E وكذلك كانت جميع العزلات حساسة للمضادات الحيوية المستعملة وعند اجراء التنميط الجيني Genotyping وباستعمال طريقة RAPD اظهرت هذه الطريقة قدرة عالية على استعمالها كوسيلة للتنميط ولدراسة وبائية الأنواع البكتيرية عند مقارنتها بطرائق التنميط المظهري Phenotyping .

طريقة التباين الوراثي لاطوال قطع الانزيمات القاطعة Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) التي استعملت للكشف عن قطع محددة في الجينوم وهذه الطريقة قد استعملت بشكل ناجح لتنميط عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* ولكن تعد

مـن الطرائق التي تتطلب جهدا كبيرا لانجازها مقارنة بطرائق التنميط الجيني الاخرى (Ranjbar *et al*.,2014) .

طريقة الترحيل الكهربائي الهلامي ذو المجال النابض Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) وفي هذه الطريقة يتم تعريض الحامض النووي DNA الى الانزيم القاطع Restriction Enzyme ويحدث القطع في مواقع محددة ضمن الجينوم واستعملت هذه الطريقة بشكل واسع في التنميط الجيني للتعرف على القرابة الوراثية Genetic relatedness لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* (Salimi *et al*.,2010) ولكن مايعيب هذه الطريقة (PFGE) انها تتطلب جهاز ترحيل متخصص الذي يسمح بفصل القطع ذات الوزن الجزيئي العالي وذلك لأن القطع التي هي اكبرمن 50 كيلو زوج قاعدة لايتم ترحيلها بكفاءة خلال جهاز الترحيل الكهربائي التقليدي وايضآ من عيوب هذه الطريقة انها تحتاج الى وقت طويل لاجرائها ومكلفة من الناحية المادية وتفقد القدرة على التمييز بين الحزم التي تكون متقاربة في الوزن الجزيئي (Doleans-Jordheim *et al*.,2009) .

طريقة التسلسلات المتكررة المعتمدة على جهاز تفاعل البلمرة التسلسلي Repetitive Sequence - PCR التي تعتمد على وجود تسلسلات متكررة منتشرة وبشكل نسخ متعددة في الجينوم للعديد من الانواع البكتيرية التي تعد من الطرائق المهمة في مجال دراسة التنميط الجيني (Mohapatra and Mazumder,2008) ومن انواع التسلسلات المتكررة المستعملة للتنميط الجيني هي :

1: Repetitive Extragenic Palindromic (REP)

2: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)

3: BOX elements (BOX)

تعد هذه الطريقة من الطرائق السهلة والسريعة التي لاتحتاج الى وقت طويل لانجازها مقارنة بالطرائق الاخرى (Lin *et al*.,2014) وتمتلك هذه الطريقة القدرة على ايجاد القرابة الوراثية Genetic relatedness للعزلات البكتيرية العائدة الى النوع نفسه مما يجعلها من الطرائق الواسعة الاستعمال (Doleans-Jordheim *et al*.,2009) تتضمن هذه الطريقة مضاعفة التسلسلات المتكررة الموجودة ضمن الجينوم بوساطة جهاز PCR ويتم ذلك باستعمال بادئات Primers وترتبط هذه البادئات بالتسلسل المكمل لها الموجود في شريط DNA إذ يمكن

رؤيتها على شكل حزم bands وهذه الحزم تكون مختلفة في الوزن الجزيئي و يتم مقارنة الحزم المختلفة الناتجة لايجاد القرابة الوراثية Genetic relatedness للعزلات البكتيرية (Goudarzi *et al*.,2011) .

ان موقع التسلسلات المتكررة وعددها يختلف باختلاف الانواع البكتيرية وكذلك تكون هذه التسلسلات مختلفة بين السلالات العائدة الى النوع الواحد وتتواجد التسلسلات المتكررة بنسبه 0.5-1% من المجموع الكلي للجينوم (Pryor,2008) ، وظيفة هذه التسلسلات غير معروفة لحد الأن لكن بالرغم من ذلك فإنها استعملت على نطاق واسع لتحديد القرابة الوراثية Genetic relatedness للعديد من الاحياء المجهرية بدائية النواة وذلك لقدرتها على التميز بين السلالات العائدة الى النوع الواحد (Kon *et al*.,2009) وكذلك استعمالها في مجال التشخيص الجزيئي وفي الدراسات الوبائية (Pounder *et al*.,2005) .

ان تسلسلات Repetitive Extragenic Palindromic (REP) توجد بوفرة عالية في جـينوم الاحياء المجهرية إذ تكون باكثر من 100 نسخة في الجينوم الواحد (Nunvar *et al*.,2010) وطـول هـذه التسلسلات هو 35 زوج قاعدة ويمكن ان تتواجد بشكل نسخ مفردة او بـهيأة ازواج ويـمـكن ان تتـواجد بـشكـل نـسخ مـتعددة مـتجاورة فـي الـجينوم (Soltysik *et al*.,2010) وفي الاصل فإن هذه التسلسلات وجدت في البكتيريا المعوية Enteric Bacteria وبعد ذلك وجدت في العديد من الانواع البكتيرية الاخرى (Messing *et al*.,2012) ، ان اصل ووظيفة تسلسلات (REP) غير معروفة ولكن يعتقد أن لها دورا في انهاء عملية الاستنساخ (Ishii and Sadowsky,2009) وفي دراسة قامت بها AL-Saleem (2013) التي استعملت طريقة REP-PCR لتحديد القرابة الوراثية بين العزلات السريرية والبيئية لبكتيريا *Acinetobacter baumannii* وعند تحليل النتائج التي حصلت عليها وجدت هناك قرابة وراثية بين عزلات هذه البكتيريا وكذلك اظهرت النتائج ان طريقة REP-PCR هي طريقة عملية ومفيدة لتنميط سلالات بكتيريا *A. baumannii* .

طـــريقـــة التـــعداد التكراري للجراثيم المعوية Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) الـتي وجدت تسلسلاتها بالاصل في بكتيريا *E. Coli* و *K. pneumonia* والانـواع الاخـرى مـن الـبكتيريا الـمعوية Enteric Bacteria (Lang *et al*.,2013) وتكون منتشرة في مناطق متعددة من الجينوم وطول تسلسلات ERIC هو 127 زوج قاعدة وان موقع وعدد هذه التسلسلات هو مختلف من سلالة الى اخرى واستعملت هذه

الطريقة بشكل متزايد للتعرف على القرابة الوراثية Genetic relatedness للبكتيريا وان وظيفة تسلسلات ERIC غير معروفة لحد الان (Goudarzi *et al.*,2011) .

ان العديد من الدراسات استعملت تسلسلات ERIC للتمييز بين السلالات البكتيرية والدراسات الوبائية وكذلك لتصنيف العديد من الانواع البكتيرية (El-Bialy *et al.*,2008) وهناك دراسة قام بها Lim *et al.* (2009) للمقارنة بين الطريقتين ERIC وPFGE لتحديد القرابة الوراثية Genetic relatedness لبكتيريا *P. aeruginosa* وجدوا ان كل من الطريقتين اظهرت نتائج جيدة في تحديد القرابة الوراثية Genetic relatedness لهذه البكتيريا ولكن طريقة ERIC تميزت بأنها اقل تعقيداَ في تحليل النتائج وكذلك اسرع واسهل واقل تكلفة وفي المقابل فإن طريقة PFGE تعد طريقة معقدة في اجرائها وتحتاج الى معدات خاصة ووقت طويل لاجرائها ومكلفة ماديا وهذه العيوب قللت من استعمال هذه الطريقة وايضاَ دراسة اخرى قام بها Mansour *et al.* (2013) باستعمال طريقة ERIC لتحديد مدى وبائية بكتيريا *P.aeruginosa*المعزولة من عينات سريرية واظهرت هذه الطريقة كفاءة عالية في التعرف على وبائية هذه البكتيريا وفي دراسة قام بها Ramazanzaden *et al.* (2013) لدراسة القرابة الوراثية Genetic relatedness لبكتيريا *E.coli* وباستعمال طريقة ERIC واظهرت هذه الطريقة قدرة على ايجاد انماط مختلفة لبكتيريا *E.coli* وهناك دراسة اخرى قام بها Zulkifli *et al.* (2009) على بكتيريا *Vibrio parahaemolyticus* للمقارنة بين طريقة RAPD وطريقة ERIC واظهرت النتائج التي حصلوا عليها بأن طريقة ERIC كانت اكثر قدرة لتمييز انماط مختلفة لعزلات هذه البكتيريا من طريقة RAPD .

اما طريقة تسلسلات BOX elements التي وجدت في بداية الأمر في جينوم البكتيريا الموجبة لصبغة كرام ومنها بكتيريا *Streptococcus pneumonia* وعند ذلك سميت هذه التسلسلات بالاسم BOX Repetitive elements (Brusetti *et al.*,2008) وان هذه التسلسلات المتكررة تتألف من ثلاث مناطق متميزة وهي box A ، box B و box C وان طول هذه المناطق هو 59 ، 45 و 50 زوج قاعده على التوالي وعليه فإن طول تسلسلات BOX هو 154 زوج قاعده و بالرغم من ان وظيفة هذه التسلسلات هو غير معروف لحد الان ولكن موقع هذه التسلسلات القريب من الجينات المسؤولة عن تنظيم مختلف العمليات الخاصة بالبكتيريا وجينات الضراوة جعلها الاقرب لأن يكون لها دور في عمليه السيطرة على التعبير الجيني Gene Expression ولكن هذا بقى مجرد اقتراح لدور هذه التسلسلات (Belkum and Hermans,2001) وهناك العديد من الدراسات السابقة التي وجدت ان تسلسلات BOX

تـعد طـريقة مـفيدة لـدراسة القرابة الوراثية Genetic relatedness وفي مجال الدراسات الوبائية للعديد من انواع البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ومنها بكتيريا *P. aeruginosa* (Wolska *et al*.,2011) وفي دراسة قامت بها Nassir (2012) على بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال طريقة BOX لدراسة التقارب الوراثي بين العزلات المرضية والبيئية واظهرت النتائج التي حصلت عليها وجود تباين وراثي بين كل من العزلات المرضية والبيئية عند استعمال طريقة BOX ولهذه التسلسلات قوة تميزية كبيرة في ايجاد القرابة الوراثية Genetic relatedness للعزلات البكتيرية وكذلك قابلة للتكرار وسريعة الاجراء (Kareem and Hassan,2014) .

الفصل الثاني
المواد و طرائق العمل

Materials and Methods

2. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.2 المواد Materials

1.1.2 الاجهزة المختبرية المستعملة Equipments and Apparateus

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم الجهاز	ت
Kelon (Korea)	Refrigeratot ثلاجة	1
Hettich(Germany)	Centrifuge جهاز الطرد المركزي	2
Optima (Japan)	Electrophoresis system جهاز ترحيل كهربائي	3
ESCO (Singapore)	PCR جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل	4
GFL (Germany)	Water distiller جهاز تقطير	5
Memmert (Germany)	Incubator حاضنة	6
Memmert (Germany)	Water bath حمام مائي	7
DLTG (China)	Electrical oven فرن كهربائي	8
Sony (Japan)	Digital camera كاميرا رقمية	9
Griffin (England)	Vortex مازج	10
Brand-W (Germany)	Micropipettes ماصات دقيقة	11
Kruss (Germany)	Microscope مجهر ضوئي	12
Stuart (UK)	Hot plate&Magnetic stirrer مسخن مع مازج مغناطيسي	13
Optima(Japan)	UV-transilluminator مصدر للأشعه فوق البنفسجية	14
Orient (USA)	PH meter مقياس الرقم الهيدروجيني	15
LS-B (Taiwan)	Autoclave مؤصدة	16
Denver (Germany)	Electric balance ميزان كهربائي	17
Labtech (Korea)	Laminar flow hood هود	18
Biogroup (UK)	Nano drpo نانو دروب	19

Chemicals المواد الكيميائية 2.1.2

الشركة المصنعة (المنشأ)	المادة	ت
Bio Basic INC (Canada)	Agarose الاكاروز	1
BHD(England)	Ethanol (70%) ايثانول	2
Ajax (Australia)	Iodine اليود	3
BDH (England)	Hydrogen peroxide بيروكسيد الهيدروجين	4
BDH (England)	Yeast extract خلاصة الخميرة	5
BDH (England)	Cetrimide ستريمايد	6
Bio Basic INC (Canada)	Ethidium bromide صبغة الأثيديوم بروومايد	7
Geneaid(Thailand)	6X DNA Loading day صبغة التحميل	8
Ajax (Australia)	KH_2PO_4 فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين	9
Ajax (Australia)	Na_2HPO_4 فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين	10
Ajax (Australia)	$Na_2HPO_4.H_2O$ فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين المائي	11
Difco(England)	(NNNN- tetra-methyl-p-phenylene-diamine dihydro chloride)	12
Merk(England)	Absolute ethanol (99%) كحول مطلق	13
BDH (England)	NaCL كلوريد الصوديوم	14
BDH (England)	Glycerol كليسيرول	15
Institute of Sera and Vaccines(Iraq)	Gram stain : crystal violet,iodine, acetone and safranin محاليل صبغة كرام	16
Bio Basic INC (Canada)	Tris-borate EDTA buffer 10X (TBE) دارئ	17
Sigma (USA)	Starch نشأ	18
Ajax (Australia)	KI يوديد البوتاسيوم	19
BDH (England)	Sodium nalidixate	20
Pioneer (France)	ESBL Supplement ES372	21

3.1.2 المضادات الحيوية Antibiotics

1.3.1.2 اقراص المضادات الحيوية Antibiotic Disc

الشركة المصنعة	تركيزالمضاد μg \ disk	الرمز	اسم المضاد	ت
Bioanalyse (Turkey)	30	AMC	Amoxicillin\Clavulanic acid	1
	10	AM	Ampicillin	2
	30	ATM	Aztreonam	3
	100	PY	Carbencillin	4
	30	FEP	Cefepime	5
	10	CTX	Cefotaxime	6
	30	CAZ	Ceftazidime	7
	10	CRO	Ceftriaxone	8
	30	CL	Cephalexin	9
	10	CIP	Ciprofloxacin	10
	10	CN	Gentamicin	11
	10	IPE	Imipenem	12
	30	K	Kanamycin	13
	10	MEM	Meropenem	14
	10	NOR	Norfloxacin	15
	5	OFX	Ofloxacin	16
	100	PRL	Piperacillin	17
	10	TOB	Tobramycin	18

2.3.1.2 مساحيق المضادات الحيوية Antibiotic Powders

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم المضاد
Schuchardt (Germany)	Penicillin G

Culture media الاوساط الزرعية 4.1.2

ت	الوسط الزرعي	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	الاكار المغذي Nutrient agar	Oxoid (England)
2	اكار الكرومايجين CHROMagar orientation	Pioneer (France)
3	المرق المغذي Nutrient broth	Oxoid (England)
4	اكار الستريمايد Cetrimide agar	Himedia (India)
5	اكار المكونكي MacConkey agar	Oxoid (England)
6	اكار المولر-هنتون Muller-Hinton agar	Oxoid (England)
7	اكار السيدوموناس Pseudomonas agar base	Himedia (India)
8	اكار نقيع القلب والدماغ Brain-Heart infusion agar	Himedia (India)
9	اكار الدم الأساس Blood agar base	Oxoid (England)
10	نقيع القلب والدماغ السائل Brain-Heart infusion broth	Himedia (India)
11	وسط البيتون Peptone water	Oxoid (England)
12	وسط تربتون الصويا Tryptone soy broth	LAB (UK)

Kits العدة المختبرية 5.1.2

ت	العدة	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	API20E System الذي يضم أشرطة الفحص فضلا عن : API Suspension Medium, Mineral Oil, Incubation Boxes وكذلك يضم الكواشف الأتية : James,VP1,VP2,TDA	BioMerieux (France)
2	عدة استخلاص DNA الجينومي DNA Genomic Extraction kit تضم المحاليل كافية لأجراء 100 فحص وهي : GT Buffer,GB Buffer,W1 Buffer,Wash Buffer,Elution Buffer,Proteinase K وكذلك يضم فلاتر GD Columns و انابيب الجمع Collection Tube	Geneaid (Thailand)
3	Go Taq Green Master Mix PCR	Bioneer(Korea)

6.1.2 مواد اخرى

ت	اسم المادة	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	الدليل الحجمي 100bp DNA Ladder (bp 2000 – 100)	Bioneer (Korea)
2	الدليل الحجمي 100bp DNA Ladder (bp 10000 – 100)	KAPA (South Africa)
3	الدم البشري فصيلة (AB)	مصرف الدم-مستشفى مدينة الطب / بغداد-العراق
4	ثاقب الفليني	/
5	حليب الفرز Skimmed milk	/
6	محلول ثابت العكورة القياسي Stander mcfarland solution	Biomerieux (France)
7	ماء مقطر اللأيوني المعقم Deionized sterile D.W.	Bioneer (Korea)
8	مسحات قطنية Cotton swab	Medical wire and Equipment (England)
9	وحدات الترشيح Millipore filters	GEMA (Spain)

2.2 طرائق العمل Methods

1.2.2 التعقيم Sterilization

تمت عملية تعقيم جميع الاوساط الزرعية المستعملة في هذه الدراسة بجهاز المؤصدة Autoclave وعند درجة حرارة 121 °م تحت ضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة وكذلك عقمت جميع الادوات الزجاجية التي تحتاج الى التعقيم الجاف بالفرن الكهربائي Electrical oven في درجة حرارة 180 °م ولمدة ساعتين وعقمت المحاليل التي تتأثر وتتلف بالحرارة العالية بوساطة وحدات الترشيح Millipore filters وذات قطر 0.22 مايكروميتر (Greenwood,2007).

2.2.2 تحضير الكواشف والمحاليل Preparation of reagents and solutions

1.2.2.2 تحضير الكواشف Preparation of reagents

1.1.2.2.2 كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent

حضركـاشف الأوكسيديز بـتركيز 1% بإذابة 0.1 غم مـن NNNN-tetramethyl para phenylene diamine dihydrochloride في 10 مللتر من الماء المقطر وتمت عمليه التعقيم بوساطة وحدات الترشيح Millipore filters وحفظ فـي قنـينة معـتمة لـحين الاستـعمال ويستعمل هذا الكاشف للتـحري عـن قابـلية البكـتيريا لانتـاج أنـزيم الاوكسيديز (Tadesse and Alem,2006) .

2.1.2.2.2 كاشف الكاتليز Catalase reagent

حضر محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3% من المحلول الاصلي ذي التركيز 30% وحفظ في قنينة معتمة لحين الاستعمال ويستعمل هذا الكاشف للكشف عن قابلية انتاج انزيم الكاتليز من قبل البكتيريا (Tadesse and Alem,2006) .

2.2.2.2 تحضير المحاليل Preparation of solutions

1.2.2.2.2 المحلول الملحي الفسلجي Normal saline solution

تم تحضير هذا المحلول بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم NaCL في كمية من الماء المقطر واكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر وبعد ذلك عقم بوساطة المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 م° وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة ، بعدها حفظ بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال واستعمل في اجراء التخافيف المطلوبة .

2.2.2.2.2 محلول ESBL supplement ES372

حضرمحلول ESBL supplement حسب تعليمات الشركة المصنعة Pioneer (France) وذلك بوزن 0.57 غم من مسحوق ESBL supplement ES372 واذابتة في 10 مللتر من الماء المقطر المعقم حتى يصبح المسحوق ذائبا تماما وتمت عمليه التعقيم بوساطة وحدات الترشيح Millipore filters واستعمل هذا المحلول انياً .

3.2.2.2.2 محلول Supplement CN

لقد حضر محلول Supplement CN من خلال مزج 0.2 غم من مادة الستريمايد Cetrimide و0.15 غم من مادة Sodium nalidixate و تذويبهما في 5 مللتر من الماء المقطر وتمت عمليه التعقيم بوساطة وحدات الترشيح Millipore filters وحفظ المحلول بدرجة الحرارة 4 م° لحين الاستعمال (Ramalho,2002) .

4.2.2.2.2 محلول صبغة Crystal violet

حضر هذا المحلول باذابة 0.1 غم من Crystal violet في 10 مل من الماء المقطر وتمت عمليه التعقيم بوساطة وحدات الترشيح Millipore filters ثم حفظ في درجة الحرارة 4 م° لحين الاستعمال في الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي Biofilm من قبل العزلات البكتيرية (Christensen,1982) .

5.2.2.2.2 تحضير محاليل الكشف عن أنزيمات البيتالاكتاميز B-lactamase

لقد حضرت هذه المحاليل حسب ما ورد في (Collee,1996) كما يأتي :-

1. محلول دارئ الفوسفات Phosphate buffer

إذ يتكون هذا المحلول من :

*محلول A: حضر هذا المحلول من اذابة 0.907 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين KH_2PO_4 في 90 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 100 من الماء المقطر.

*محلول B: حضر هذا المحلول من اذابة 0.946 غم من فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين Na_2HPO_4 و 1.19 غم من فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين المائي $Na_2HPO_4.H_2O$ في كمية من الماء المقطر واكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر، وبعد ذلك مزجت 87.6 مل من المحلول A مع 12.3 مل من المحلول B وضبط PH المحلول ليساوي 6 .

2. محلول بنسلسن ج Penicillin G solution

اذيب 0.569 غم من Penicillin G في محلول دارئ الفوسفات Phosphate Buffer المحضر في الفقرة السابقة وعقم بوساطة وحدات الترشيح Millipore filters ذات القطر0.22 مايكروميتر وحفظ بدرجة حرارة 4 م°لحين الاستعمال .

3. محلول النشأ Starch solution

حضر هذا المحلول من اذابة 1غم من النشأ Starch في 10 مل من الماء المقطر المعقم واستعمل هذا المحلول أنياً .

4. محلول اليود Iodine solution

حضر هذا المحلول باذابة 2.03 غم من اليود Iodine وكذلك 5.32 غم يوديد البوتاسيوم Potassium iodine في كمية من الماء المقطرالمعقم وأكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر المعقم وحفظ بدرجة الحرارة 4 م° لحين الاستعمال .

6.2.2.2.2 محلول دارئ Tris borate EDTA buffer (1X) TBE

خفف دارئ TBE من 10X الى 1X وذلك من خلال أخذ 100 مل من دارئ TBE Tris Borate EDTA Buffer (10X) المجهز من قبل شركة Bio Basic INC (Canada) واضيف له 900 مل من الماء المقطر المعقم وحفظ في درجة الحرارة 4 م° لحين الاستعمال (Sharpe,2005) .

7.2.2.2.2 صبغة كرام Gram Stain

استعملت المحاليل Crystal violet،Iodine،Acetone وSafranin المجهزة من قبل شركة Institute of Sera and Vaccines(Iraq) .

8.2.2.2.2 محاليل البوادئ Primers Solutions

حضرت محاليل البوادئ الخزينة حسب تعليمات شركة Alph DNA (Canada) المجهزة لها والمذكورة في الجدول (2 – 1) باستعمال الماء المقطر اللأيوني المعقم للحصول على تركيز 100 بيكومول / مايكروليتر .

جدول (2 – 1) : البوادئ المستعملة في هذه الدراسة

اسم الجين		تتابع البادئ Primer sequence (5′–3′)	الناتج (bp)	المصدر
16S rDNA	F	GGGGGATCTTCGGACCTCA	956	Spilker *et al.* (2004)
	R	TCCTTAGAGTGCCCACCCG		
lasB	F	GGAATGAACGAAGCGTTCTC	300	Sonbol *et al.*(2015)
	R	GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG		
toxA	F	GGTAACCAGCTCAGCCACAT	352	Lanotte *et al.* (2004)
	R	TGATGTCCAGGTCATGCTTC		
algD	F	ATGCGAATCAGCATCTTTGGT	1310	Mitov (2010)
	R	CTACCAGCAGATGCCCTCGGC		
pvdA	F	GACTCAGGCAACTGCAAC	1281	Cotar *et al.* (2013)
	R	TTCAGGTGCTGGTACAGG		
ERIC	F	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC	حزم متغايرة Variable Bands	Mansour *et al.* (2013)
	R	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		

ولقد حضر محلول كل بادئ بشكل منفصل بتركيز 10 بيكومول / مايكروليتر وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من محلول كل بادئ خزين Stock واضافة له 90 مايكروليتر من الماء المقطر اللاأيوني ومزج بوساطة المازج Vortex جيداً وحفظ مع المحاليل الخزينة Stock للبوادئ في درجة الحرارة – 20 م° مع مراعاة مزج محلول البادئ بعد اخراجه من الثلج باستعمال المازج Vortex لمجانسته قبل الاستعمال .

9.2.2.2.2 الدليل الحجمي DNA Ladder لتحديد الوزن الجزيئي

استعمل الدليل الحجمي DNA Ladder (100bp) المجهز من قبل شركة KAPA (South Africa) بتركيز 100 مايكروغرام / مل ، وتدرج القطع كان من (100 – 10000 bp) الذي حضر انيا من خلال خلط 5 مايكروليتر من الدليل الحجمي مع 1 مايكروليتر من 6X

(Loading day) وحسب التعليمات المرفقة من الشركة المجهزة وكذلك استعمل الدليل الحجمي DNA Ladder (100bp) وتدرج القطع له من (100 - bp2000) المجهز من قبل شركة Bioneer (Korea) .

3.2.2 تحضير الأوساط الزرعية Preparation of cultural media

1.3.2.2 الاوساط الزرعية الجاهزة Ready made media

حضرت الاوساط الزرعية الجاهزة وفقآ لتعليمات الشركات المصنعة لها وهذه الأوساط هي كل من وسط اكارالمكونكي MacConkey agar ، اكار الكرومايجين اورنتشن CHROM agar Orientation ، اكار المولر-هنتون Muller – Hinton agar،نقيع القلب والدماغ السائل Brain-Heart infusion broth ، نقيع القلب والدماغ الصلب Brain-Heart infusion agar ، الاكار المغذي Nutrient agar ، المرق المغذي Nutrient broth ووسط تربتون الصويا السائل Tryptone soy broth، إذ عقمت جميع هذه الأوساط الزرعية بالمؤصدة Autoclave بدرجة الحرارة 121 م° ضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة وبعد صب الأوساط في اطباق معقمة حضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها .

2.3.2.2 الأوساط الزرعية التركيبية Laboratory prepared media

1.2.3.2.2 وسط اكار الدم Blood agar base

حضر وسط اكار الدم Blood agar base حسب تعليمات الشركة المصنعة والمعقم بالمؤصدة Autoclave بدرجة الحرارة 121 م° وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة وبعد تبريد الوسط الى درجة الحرارة 45 م° تم اضافة دم الانسان فصيلة (AB) بنسبة 5% ثم صب في أطباق معقمة وترك ليتصلب (Vandepitte *et al.*,2003) .

2.2.3.2.2 وسط اكار السيدوموناس Pseudomonas agar

حضر هذا الوسط بإذابة 48.4 غم من وسط اكار السيدوموناس Pseudomonas agar في 1000 مللتر من الماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة Autoclave بدرجة الحرارة 121 م° وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة وبعد تبريد الوسط الى درجة الحرارة 45 م° اضيف محلول Supplement CN المحضر وفق الفقرة (3.2.2.2.2) ورج الوسط ليتجانس مع المحلول وصب في أطباق معقمة وترك ليتصلب (Ramalho,2002) .

3.2.3.2.2 وسط اكار السترامايد Cetrimide agar

حضر هذا الوسط بإذابة 45.3 غم من وسط اكار السترامايد Cetrimide agar في 1000 مللتر من الماء المقطر واضيف اليه 10 مللتر من الكليسيرول ثم عقم بالمؤصدة Autoclave بدرجة الحرارة 121 م° وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة وترك ليبرد الى درجة الحرارة 45 م° وصب في أطباق معقمة وترك ليتصلب واستعمال هذا الوسط لغرض عزل وتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* (Hashim,2013) .

4.2.3.2.2 وسط اكار الكرومايجين اورنتشن CHROM agar Orientation

حضر هذا الوسط بإذابة 33 غم من وسط اكار الكرومايجين اورنتشن Orientation CHROM agar في 1000 مللتر من الماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة Autoclave بدرجة الحرارة 121 م° وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة وترك ليبرد الى درجة الحرارة 45 م° وصب في أطباق معقمة وترك ليتصلب واستعمال هذا الوسط لغرض تشخيص بكتيريا *P. Aeruginosa* .

5.2.3.2.2 وسط اكار الكرومايجين الخاص للكشف عن أنزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف CHROMagar ESBL

حضر وســط CHROMagar ESBL حسب تعليمات شركة Pioneer (France) إذ تم مزج 1000 مللتر من وسط اكار الكرومايجين CHROM agar Orientation المحضر وفق الفقرة (1.3.2.2) مع 10 مللتر من محلول ESBL Supplement ES372 المحضر وفق الفقرة (2.2.2.2.2) وبعد ان برد الوسط الى درجة 45 م° بعدها صب في أطباق معقمة وحفظ في ظروف معتمة في الثلاجة واستعمل للكشف عن قابلية العزلات البكتيريا عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs .

6.2.3.2.2 وسط اكار الحليب الفرز Skimmed Milk agar

حضر هذا الوسط وذلك بإذابة 10 غم من الحليب الفرز Skimmed Milk في 100 مللتر من الماء المقطر وعقم في المؤصدة Autoclave لمدة 5 دقائق بعد ذلك حضر وسط Nutrient agar إذ تم وزن 25.2 غم واذابتة في 900 مللتر من ماء المقطروعقم بالمؤصدة Autoclave بدرجة الحرارة 121 م° وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة وترك ليبرد الى درجة الحرارة 45 م° وتم اضافة اليه محلول الحليب الفرز ومزج جيداَ وصب في أطباق معقمة وترك

ليتصلب واستعمل للتحري عن قابلية العزلات البكتيريا لانتاج انزيم Protease (Senior,1999).

7.2.3.2.2 وسط لورا السائل Luria broth

حضر هذا الوسط وفق ماورد في (Sezonov *et al.*,2007) بأذابة Tryptone(10غرام) ، Yeast Extract(5 غرام) و NaCL (5 غرام)في 1000 مللتر من الماء المقطروعقم بالمؤصدة Autoclave بدرجة الحرارة 121 م° وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة بعدها حفظ في الثلاجة لحين الاستعمال في تنشيط العزلات البكتيرية لأستخلاص DNA .

5.2.2 العزلات البكتيرية Bacterial isolates

1.5.2.2 جمع العزلات البكتيرية Collection of Bacterial isolates

جمعت 100 عزلة من مصادر سريرية مختلفة وشملت (33 عزلة من التهاب الاذن الوسطى Otitis media ، 27 عزلة من الحروق Burns ، 14 عزلة من الجروح Wounds، 15 عزلة من التهاب المجاري البولية Urinary tract infections ، 11 عزلة من الدم Blood) ، من عدة مستشفيات في مدينة بغداد وهي (مستشفى الطفل المركزي ، مدينة الامامين الكاظمين الطبية ، ابن البلدي ، الصدر ، المختبرات التعليمية و مستشفى الحروق / مدينة الطب) وخلال المدة من 2014/9/1 ولغاية 2014/11/1 .

2.5.2.2 تشخيص العزلات البكتيرية Identification of bacterial isolates

1.2.5.2.2 الفحوصات المظهرية Morphological examination

شخصت العزلات البكتيرية من خلال ملاحظة قدرتها على النمو على وسط اكار السيدوموناس Pseudomonas agar ووسط اكار السترمايد Cetrimide agar ووسط اكار الكرومايجين اورنتشن CHROMagar orientation وكذلك زرعت على وسط اكار المكونكي MacConkey agar لتشخيص صفاتها المزرعية ايضاً من حيث شكل ولون المستعمرات (Baron *et al.*, 2007) .

2.2.5.2.2 الفحص المجهري Microscopic examination

اخضعت العزلات البكتيرية قيد الدراسة الى الفحص المجهري من خلال أخذ جزء من المستعمرة البكتيرية ونقلها الى شريحة زجاجية وتصبيغها بصبغة كرام Gram stain لمشاهدة تفاعلها مع صبغة كرام،شكل الخلايا البكتيرية وطريقة تجمعها (Betsy and Keogh,2005) .

3.2.5.2.2 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

1.3.2.5.2.2 فحص الاوكسيديز Oxidase test

تم اجراء الاختبار وذلك بنقل احدى المستعمرات النامية على وسط اكار المكونكي MacConkey agar الى ورقة الترشيح وثم وضع 2-3 قطرات من كاشف الأوكسيديز المحضر وفق الفقرة (1.1.2.2.2) فوق المستعمرة ومزجها مع المستعمرة بوساطة عيدان خشبية معقمة ، ان ظهور اللون البنفسجي خلال 20-30 ثانية يدل على ايجابية الاختبار (Tadesse and Alem,2006).

2.3.2.5.2.2 فحص الكاتليز Catalase test

تم نقل احدى المستعمرات النامية على وسط اكار المكونكي MacConkey agar الى شريحة زجاجية نظيفة وجافة بوساطة عيدان خشبية معقمة وبعد ذلك وضعت فوقها قطرة من بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% المحضر وفق الفقرة (2.1.2.2.2) وأن ظهورفقاعات هوائية على سطح الشريحة يدل على ان نتيجة الاختبار موجبة (Tadesse and Alem,2006) .

4.5.2.2 التشخيص بنظام API20E API20E identification system

بعد الحصول على نتائج الفحوصات التشخيصية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة ، اعتمدت عدة التشخيص API20E المجهزة من قبل شركة BioMerieux (France) لغرض اجراء التشخيص التأكيدي للعزلات البكتيرية ويحتوي الشريط الواحد منه على 20 اختبارا.

لقح 5مل من المحلول الملحي بالمزروع البكتيري وتم مقارنة كثافة المحلول مع محلول ثابت العكورة القياسي Stander mcfarland solution الذي يعطي عددا تقريبيا للخلايا البكتيرية وهو(1.5×10^{8} خلية / مل) ، بعد ذلك اضيف جزء من العالق البكتيري بوساطة ماصة دقيقة Micropipette لكل حفرة من الحفر الأتية ONPG،ADG،LDC،ODC،HS،URE، TDA،IND،GIU،MAN،INO،SOR،RHA،SAC،MEI،AMY،ARA اما الحفر

GEL،VP،CIT فقد ملئت تماماً بالعالق البكتيري وكذلك أضيف الزيت الى الحفرADG ، URE،ODC،LDC لغرض توفير الظروف اللاهوائية وثم حضنت الأشرطة في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة ، بعد الحضن اضيفت قطرة من كاشف VP2،VP1 الى حفرة VP ولوحظ تغير اللون خلال 10 دقائق وكذلك اضيف الكاشف TDA الى الحفرة TDA والكاشف James الى الحفرة IND وبعدها قرأت نتيجة كل شريط وفسرت النتائج بوساطة API20E Analytic Profile Index .

5.5.2.2 استخلاص DNA الجينومي Genomic DNA Extraction

استعملت عدة لاستخلاص DNA الجينومي Genomic DNA mini Kit المجهز من قبل شركة Geneaid (Thailand) للعزلات البكتيرية قيد الدراسة على النحو الأتي :-

1. لقح وسط Luria broth المحضر وفق الفقرة (7.2.3.2.2) بالعزلات البكتيرية وقورنت كثافته مع محلول ثابت العكورة القياسي Stander Mcfarland Solution الذي يعطي عددا تقريبيا للخلايا البكتيرية وهو(1.5×10^{8} خلية / مل) وتم الحضن بدرجة الحرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة .

2. نقل 1.5 مل من المزروع البكتيري بوساطة ماصة دقيقة Micropipette الى انبوبة الابندروف جافة ومعقمة .

3. نبذت انابيب الابندروف في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة خمس دقائق وبسرعة 1400 دورة / دقيقة واهمل الطافي .

4. اضيف 180 مايكروليتر من دارئ GT buffer وتم المزج بوساطة جهاز المازج Vortex ثم اضيف 20 مايكروليتر من انزيم Proteinase K وحضنت الانابيب بدرجة الحرارة 60 م° لمدة 15 دقيقة في حمام مائي Water bath وخلال مدة الحضن تم رج الانابيب كل خمس دقائق وارجاعها الى الحمام المائي .

5. اضيف 200 مايكروليتر من دارئ GB buffer الى الانابيب ايضاً ومزجت بوساطة جهاز المازج Vortex وحضنت الانابيب بدرجة الحرارة 70 م° لمدة 15 دقيقة في حمام مائي Water bath وخلال مدة الحضن تم رج الانابيب كل خمس دقائق وارجاعها الى الحمام المائي .

6. اضيف 200 مايكروليتر من الكحول المطلق (Absolute ethanol(99% الى الانابيب وتم الخلط بوساطة المازج Vortex وخلال هذه المدة وضع محلول Elution الذي يستعمل في الخطوة 9 في حمام مائي بدرجة 70 م° .

7. تم وضع الفلاتر GD column في الانابيب جمع بحجم 2 مل وتم نقل الخليط اعلاه الى هذه الفلاتر ثم نبذت في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة دقيقتين وبسرعة 1400 دورة / دقيقة بعد ذلك اهملت الأنابيب الجمع ونقلت الفلاتر الى انابيب جمع جديدة بحجم 2 مل .

8. تم اضافة 400 مايكروليتر من دارئ W1 buffer الى الفلاتر ونبذت في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة 30 ثانية وبسرعة 1400 دورة / دقيقة ثم اهمل ما موجود في انابيب الجمع وثم ارجعت الفلاتر الى انابيب الجمع واضيف بعد ذلك 600 مايكروليتر من دارئ Wash buffer الى الفلاتر ونبذت في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة 30 ثانية وبسرعة 1400 دورة / دقيقة ثم اهمل ما موجود في انابيب الجمع وثم ارجعت الفلاتر الى انابيب الجمع وايضاً نبذت في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة 3 دقائق وبسرعة 1400 دورة / دقيقة لتجف الفلاتر.

9. نقلت الفلاتر الى انابيب ابندروف معقمة بحجم 1.5 مل واضيف الى الفلاتر 100 مايكروليتر من محلول Elution المسخن في الحمام المائي Water bath وترك لمدة 5 دقائق وبعد ذلك نبذت الانابيب في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة 30 ثانية وبسرعة 1400 دورة / دقيقة .

10. قياس نقاوة ناتج DNA في جهاز نانو دروب Nano drop ودرجة النقاوة كانت بين (2-1.2) كما موضح في الملحق (5) .

11. حفظ ناتج DNA في انابيب ابندروف وتم خزنه بدرجة -20 م° لحين الاستعمال .

6.5.2.2 التشخيص الجيني لبكتيريا *P. aeruginosa* باستعمال جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل (PCR)

تم استعمال جين 16S rDNA للتشخيص النهائي للعزلات البكتيرية قيد الدراسة وبوساطة جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل (PCR) واستعمل البادئ الخاص بالجين 16SrDNA والمحضر وفق الفقرة (8.2.2.2.2.2) .

حضر خليط PCR من GO Taq Green Master Mix والمجهز من قبل شركة Bioneer(Korea) ، 5 مايكروليتر من template DNA المستخلص وفق الفقرة (5.5.2.2) و1.5 مايكروليترمن F-Primer، 1.5 مايكروليترمن R-Primer و12 مايكروليتر من الماء المقطر اللأيوني المعقم والمجهز من قبل شركة Bioneer(Korea)، بعد ذلك مزجت محتويات أنابيب PCR جيداً باستعمال المازج Vortex ثم وضعت في جهاز PCR وحسب البرنامج الذي ورد في Spilker *et al.* (2004) على النحو الأتي :

الخطوة		البرنامج
1		دورة واحدة فقط لمدة دقيقتين عند درجة حرارة 95 مْ للمسخ الأولي DNA القالب .
2		25 دورة تضمنت :
	A	20 ثانية عند درجة حرارة 94 مْ لمسخ DNA القالب template DNA .
	B	20 ثانية عند درجة حرارة 58 مْ لكي يتم ارتباط البوادئ مع DNA القالب .
	C	40 ثانية عند درجة حرارة 72 مْ ليتم استطالة البوادئ المرتبطة .
3		دورة واحدة فقط ولمدة 1 دقيقة وبدرجة حرارة 72 مْ للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف .

وبعد ذلك نقل 5 مايكروليتر من ناتج تضاعف الجين للترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% .

6.2.2 حفظ العزلات البكتيرية Preservation of Bacterial Isolates

1.6.2.2 الحفظ قصير المدى Short term maintenance

لقحت العزلات البكتيرية المشخصة لبكتيريا *P. aeruginosa* على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب Brain-Heart Infusion agar المحضر وفق الفقرة (1.3.2.2) بشكل مائل Slant بطريقة التخطيط ، وحضنت بدرجة الحرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة وبعد الحضن حفظت بدرجة 4 مْ وجددت العزلات شهرياً (Fugelsang and Edwards,2007) .

2.6.2.2 الحفظ طويل المدى Long term maintenance

لغرض حفظ العزلات لمدة طويلة تم استعمال وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain-Heart Infusion Broth واضيف إليه الكليسيرول Glycerol بنسبة 15% وعقم بالمؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 م° وضغط 1.5 جو لمدة 15 دقيقة ثم لقحت الانابيب الحاوية على 5 مل من الوسط بالمزروع البكتيري وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة وبعد الحضن حفظت الانابيب بدرجة -20 م° وجددت العزلات كل ستة اشهر (Fugelsang and Edwards,2007) .

7.2.2 انتاج الهيمولايسين Haemolysin production

زرعت مستعمرة بكتيرية بالتخطيط على وسط اكار الدم Blood agar المحضر وفق الفقرة (1.2.3.2.2) لغرض الكشف عن قدرة بكتيريا *P. aeruginosa* على انتاج انزيم الهيمولايسين وبعد الزرع حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة وان ظهور هالة شفافة حول المستعمرة النامية دلالة على انتاج انزيم الهيمولايسين (Kayser *et al*.,2005) .

8.2.2 انتاج الانزيم الحال للبروتين Protease production

تم التحري عن العزلات البكتيرية المنتجة لأنزيم Protease باستعمال وسط اكار الحليب الفرز Skimmed milk agar المحضر وفق الفقرة (6.2.3.2.2) إذ اخذت مستعمرة واحدة ولقحت في وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain-Heart infusion broth وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة ثم نقل 20 مايكروليتر من العالق البكتيري الى الحفر التي تم عملها في الاطباق الحاوية على وسط اكار الحليب الفرز Skimmed milk agar بوساطة الثاقب الفليني بقطر 5 مليمتر وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة وتم ملاحظة العزلات المنتجة لانزيم Protease من خلال ظهور منطقة شفافة حول الحفر المحتوية على العالق البكتيري (Senior,1999).

9.2.2 تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

اختبرت قابلية العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي وذلك بتلقيح انابيب الاختبارالحاوية على وسط تربتون الصويا Tryptone soy broth والمحضر وفق الفقرة

(1.3.2.2) بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 48 ساعة ، بعدها سكب المزروع البكتيري من الأنابيب وتركت الأنابيب لتجف ثم صبغت بصبغة Crystal violet المحضرة وفق الفقرة (3.2.2.2.2) لمدة 15 دقيقة بعدها سكبت الصبغة وتركت الأنابيب لتجف ، عدت النتيجة موجبة عند ظهور الخلايا ملتصقة على جدران الأنبوبة ومصطبغة بلون صبغة Crystal violet بعد مقارنتها مع انبوبة السيطرة الحاوية على وسط تربتون الصويا دون المزروع البكتيري (Christensen,1982) .

10.2.2 انتاج انزيمات البيتالاكتاميز B-lactamase production

استعملت طريقة اليود القياسية Idometric method (Collee,1996) للتحري عن قابلية العزلات البكتيريا قيد الدراسة على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز وباستعمال المحاليل المحضرة وفق الفقرة (5.2.2.2.2) واجري الفحص كالأتي :

1. تم تحضير مزارع بكتيرية لبكتيريا *P. aeruginosa* بعمر 24 ساعة .

2. استعمل الناقل المعقم لتلقيح انابيب الأبندروف الحاوية على 100 مايكروليتر من محلول بنسلين ج Penicillin G بالمزروع البكتيري ثم حضنت بعدها الأنابيب بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 30 دقيقة .

3. اضيف 50 مايكروليتر من محلول النشأ ومزج مع محتويات الأنبوبة .

4. اضيف 20 مايكروليتر من محلول اليود مع ملاحظة تحول لون المحلول الى الأزرق الغامق نتيجة تفاعل اليود مع النشأ .

5. عدت النتيجة موجبة للفحص عند حصول تغير لوني سريع من الأزرق الى الأبيض خلال دقيقة واحدة من اضافة كاشف اليود .

11.2.2 التحري عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف Detection of ESBLs production

استعمل وسط اكار الكرومايجين الخاص لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف CHROMagar ESBL المحضر وفق الفقرة (5.2.3.2.2) للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف إذ زرعت الأطباق

المحضرة والمعقمة بالتخطيط وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة وعدت النتيجة موجبة عند قدرة العزلات البكتيرية على النمو على وسط CHROMagar ESBL .

12.2.2 اختبار حساسية بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية

اجري فحص الحساسية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة باستعمال طريقة انتشار الاقراص (Morello *et al*.,2007) على النحو الأتي :

1. نقلت عدد من المستعمرات النامية على وسط اكار المكونكي التي بعمر 24 ساعة الى انابيب تحتوي على 5 مل من المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline المحضر وفق الفقرة (2.2.2.2.2) وقورنت الكثافة مع محلول ثابت العكورة القياسي Stander Mcfarland Solution الذي يعطي عددا تقريبيا للخلايا (1.5×10^8 خلية / مل) .

2. ادخلت المسحة القطنية المعقمة داخل الانبوبة الحاوية على العالق البكتيري وبعدها مررت على وسط اكار مولر-هنتون Muller-Hinton agar والمحضر وفق الفقرة (1.3.2.2) ثلاث مرات في كل مرة يحرك الطبق ليتوزع العالق بشكل متساو في جميع اتجاهات الطبق .

3. تركت الأطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق وبعدها وضعت اقراص المضادات الحيوية بشكل وابعاد مناسبة مع الضغط وبلطف على كل قرص باستعمال ملقط معقم وحضنت بدرجة حرارة 37 م ولمدة 24 ساعة .

4. بعد الحضن قيس قطر منطقة التثبيط حول كل قرص بالمليمتر بوساطة مسطرة مدرجة وتم مقارنة النتائج بجداول قياسية وعالمية (CLSI,2012) .

13.2.2 الكشف الجيني عن عوامل الضراوة (Virulence Factors) باستعمال جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل (PCR)

تم تحضير خليط تفاعل PCR للجينات (*pvd A* ، *tox A* ، *las B* ، *alg D*) وتكون من GO Taq Green Master Mix والمجهز من قبل شركة Bioneer (Korea) ، 5 مايكروليتر من template DNA المستخلص وفق الفقرة (5.5.2.2) ، 1.5 مايكروليتر من F-Primer ، 1.5 مايكروليترمن R-Primer المحضرين وفق الفقرة (8.2.2.2.2) و 12مايكروليتر من الماء المقطر اللأيوني المعقم والمجهز من قبل شركة Bioneer (Korea)،

بعد ذلك مزجت محتويات أنابيب PCR جيداً باستعمال المازج Vortex ثم وضعت في جهاز PCR وبرمج الجهاز لكل جين بشكل منفصل .

* تم اجراء خطوات التضاعف للتحري عن جين *las B* حسب ما ذكر في (Sonbol *et al.*,2015) وتم تحوير البرنامج كما يأتي :

الخطوة	البرنامج	
1	دورة واحدة فقط لمدة 3 دقائق عند درجة حرارة 94 م° للمسخ الأولي DNA القالب .	
2	30 دورة تضمنت :	
	A	30 ثانية عند درجة حرارة 94 م° لمسخ DNA القالب template DNA .
	B	1 دقيقة عند درجة حرارة 55 م° لكي يتم ارتباط البوادئ مع DNA القالب .
	C	1 دقيقة عند درجة حرارة 72 م° ليتم استطالة البوادئ المرتبطة .
3	دورة واحدة فقط ولمدة 5 دقائق وبدرجة حرارة 72 م° للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف .	

وبعد ذلك نقل 5 مايكروليتر من ناتج تضاعف الجين للترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2%.

كذلك تم اجراء خطوات التضاعف الخاصة بالجين *tox A* حسب ماذكر في (Lanotte *et al*,2004) كما يأتي :

الخطوة	البرنامج	
1	دورة واحدة فقط لمدة 3 دقائق عند درجة حرارة 94 م° للمسخ الأولي DNA القالب .	
2	30 دورة تضمنت :	
	A	30 ثانية عند درجة حرارة 94 م° لمسخ DNA القالب template DNA .
	B	1 دقيقة عند درجة حرارة 55 م° لكي يتم ارتباط البوادئ مع DNA القالب .
	C	1 دقيقة عند درجة حرارة 72 م° ليتم استطالة البوادئ المرتبطة .
3	دورة واحدة فقط ولمدة 5 دقائق وبدرجة حرارة 72 م° للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف .	

وبعد ذلك نقل 5 مايكروليتر من ناتج تضاعف الجين للترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2%.

* اما خطوات التضاعف للتحري عن جين *alg D* حسب ما ذكر في(Mitov *et al*,2010) كما يأتي :

الخطوة	البرنامج	
1	دورة واحدة فقط لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 94 م° للمسخ الأولي DNA القالب .	
2	30 دورة تضمنت :	
	A	30 ثانية عند درجة حرارة 94 م° لمسخ DNA القالب template DNA .
	B	45 ثانية عند درجة حرارة 60 م° لكي يتم ارتباط البوادئ مع DNA القالب .
	C	45 ثانية عند درجة حرارة 72 م° ليتم استطالة البوادئ المرتبطة .
3	دورة واحدة فقط ولمدة 7 دقيقة وبدرجة حرارة 72 م° للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف .	

وبعد ذلك نقل 5 مايكروليتر من ناتج تضاعف الجين للترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% .

* وكذلك تم اجراء خطوات التضاعف للتحري عن جين *pvd A* حسب ما ذكر في (Cotar *et al*,2013) كما يأتي :

الخطوة	البرنامج	
1	دورة واحدة فقط لمدة دقيقتين عند درجة حرارة 95 م° للمسخ الأولي DNA القالب .	
2	30 دورة تضمنت :	
	A	30 ثانية عند درجة حرارة 95 م° لمسخ DNA القالب template DNA .
	B	30 ثانية عند درجة حرارة 59 م° لكي يتم ارتباط البوادئ مع DNA القالب .
	C	30 ثانية عند درجة حرارة 72 م° ليتم استطالة البوادئ المرتبطة .
3	دورة واحدة فقط ولمدة 7 دقيقة وبدرجة حرارة 72 م° للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف .	

وبعد ذلك نقل 5 مايكروليتر من ناتج تضاعف الجين للترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2%.

14.2.2 التنميط الجيني لبكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال طريقة ERIC

تكون خليط PCR من GO Taq Green Master Mix والمجهز من قبل شركة Bioneer (Korea) ، 5 مايكروليتر من template DNA المستخلص وفق الفقرة (5.5.2.2) و2 مايكروليترمن F-Primer ،2 مايكروليترمن R-Primer المحضرين وفق الفقرة (8.2.2.2.2) و11 مايكروليتر من الماء المقطر اللأيوني المعقم والمجهز من قبل شركة Bioneer (Korea)، بعد ذلك مزجت محتويات أنابيب PCR جيداً باستعمال المازج Vortex ثم وضعت في جهاز PCR وبرمج الجهاز حسب ماذكر في (Mansour,2013) وتم تحوير البرنامج على النحو الأتي :

الخطوة		البرنامج
1		دورة واحدة فقط لمدة 1 دقيقة عند درجة حرارة 94 م° للمسخ الأولي DNA القالب .
2		35 دورة تضمنت :
	A	45 ثانية عند درجة حرارة 94 م° لمسخ DNA القالب template DNA .
	B	45 ثانية عند درجة حرارة 48 م° لكي يتم ارتباط البوادئ مع DNA القالب .
	C	دقيقتين عند درجة حرارة 72 م° ليتم استطالة البوادئ المرتبطة .
3		دورة واحدة فقط ولمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 72 م° للاستطالة النهائية لشريط DNA المتضاعف .

وبعد ذلك نقل 5 مايكروليتر من ناتج تضاعف الجين للترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز المحضر بتركيز 2% .

15.2.2 الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis

استعملت هذه الطريقة لفصل جزيئات DNA المختلفة الحجم واجري الترحيل الكهربائي حسب ماورد في (Janam,2011) كما يأتي :

1. حضر هلام الاكاروز وذلك باذابة 2 غم من الاكاروز في 100 مل من دارئ (1X)TBE المحضر وفق الفقرة (6.2.2.2.2) وبعد ذلك سخن الاكاروز لدرجة الغليان بعدها ترك ليبرد لدرجة الحرارة 45 م° ثم اضيف له 5 مايكروليتر من صبغة الأثيديوم برومايد Ethidium bromide ذات تركيز 0.5 مايكروغرام /مللتر.

2. حضرت صفيحة اسناد الاكاروز Agarose بعد ان ثبت المشط وصب الاكاروز بهدوء في الصفيحة لمنع حدوث فقاعات هوائية وترك ليتصلب لمدة 20 دقيقة .

3. رفع المشط بهدوء من الاكاروز المتصلب وثبتت الصفيحة على مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي الأفقية المتمثلة بالحوض المستعمل للترحيل وملئ الحوض بمحلول (1X)TBE إذ يغطي سطح هلام الاكاروز بالكامل .

4. نقل 5 مايكروليتر من ناتج تضاعف الجينات المراد تحميلها في الحفر المخصصة لها وكذلك تم تحميل 5 مايكروليتر من الدليل الحجمي DNA Ladder (100bp) المستعمل لتحديد احجام قطع DNA الموجودة بعدها مرر التيار الكهربائي بفرق جهد 50 فولت ولمدة ساعتين .

5. فحص الهلام باستعمال مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV-Transilluminator عند طول موجي 300 نانوميتر.

16.2.2 التحليل الأحصائي Statistical Analysis

تم ايجاد العلاقة الوراثية بين جميع العزلات البكتيرية قيد الدراسة من خلال مخطط التحليل التجميعي Dendogram وذلك بتحويل النتائج التي ظهرت في الهلام الى جدول التوصيف إذ عند وجود الحزمة يوضع 1 وعند غيابها يوضع 0 وادخال هذه البيانات في برنامج Past software للحصول على مخطط التحليل التجميعي Dendogram ، وتم تحديد الأوزان الجزيئية للحزم الناتجة Bands باستعمال برنامج CS Analyzer 3 .

الفصل الثالث

النتائج و المناقشة

Results and Discussion

3 – النتائج والمناقشة Results and Discussion

1-3 جمع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وتشخيصها

Collection and identification of *P. aeruginosa*

تم جمع 100 عزلة من مصادر سريرية مختلفة شملت (33 عزلة من التهاب الاذن الوسطى Otitis media ، 27 عزلة من الحروق Burns ، 14 عزلة من الجروح Wounds، 15 عزلة من التهاب المجاري البولية Urinary tract infections ، 11 عزلة من الدم Blood) من عدة مستشفيات في مدينة بغداد و هذه العزلات مشخصة بشكل مبدئي على انها بكتيريا *P. aeruginosa* .

تم الحصول على 75 عزلة تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* بعد اجراء خطوات التشخيص النهائي التي اتبعت في المختبر لجميع هذه العزلات إذ تم اجراء التشخيص الزرعي Cultural identification وذلك بالاعتماد على الصفات المظهرية للعزلات البكتيرية عند تنميتها على وسط اكار المكونكي MacConkey agar وظهرت المستعمرات البكتيرية شاحبة اللون Pale وغير مخمرة لسكر اللاكتوز Lactose non-fermentation (Baron *et al.*,2007) ، بينت العزلات قدرتها على النمو على وسط اكار السترمايد Cetrimide agar 0.03 % وذلك لمقاومتها لمادة السترمايد إذ ظهرت المستعمرات البكتيرية باللون الاصفر المخضر واظهرت هذه العزلات قدرتها على النمو على وسط Pseudomonas agar الوسط الخاص لنمو بكتيريا *P. aeruginosa* إذ ظهرت المستعمرات باللون الاخضر او الكريمي حسب ما جاء في Ramalho (2002) وعند نموها على وسط اكار الكرومايجين اورنتشن CHROMagar Orientation ظهرت المستعمرات بالون الاخضر او الكريمي المخضر ، وكانت اغلب العزلات البكتيرية لها قابلية على انتاج صبغة البايوسيانين Pyocyanin التي بلغت 59 عزلة وبنسبة 78.66% وهذه النتيجة تتفق مع النتيجة التي حصل عليها Finlayson and Brown (2011) إذ وجد ان 82.5% من عـــزلات *P. aeruginosa* لها القابلية على انتاج صبغة Pyocyanin وكـذلك بـــينت Passat (2006) ان 80% من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كانت منتجة لصبغة Pyocyanin وتعد هذه الصبغة من الصفات التشخيصية المهمة لبكتيريا *P. aeruginosa* واحدى عوامل الضراوة المفرزة خارج الخلية ولها تأثير مثبط للعديد من الأنواع البكتيرية إذ انها من مشتقات Phenozinium-5-methyl-

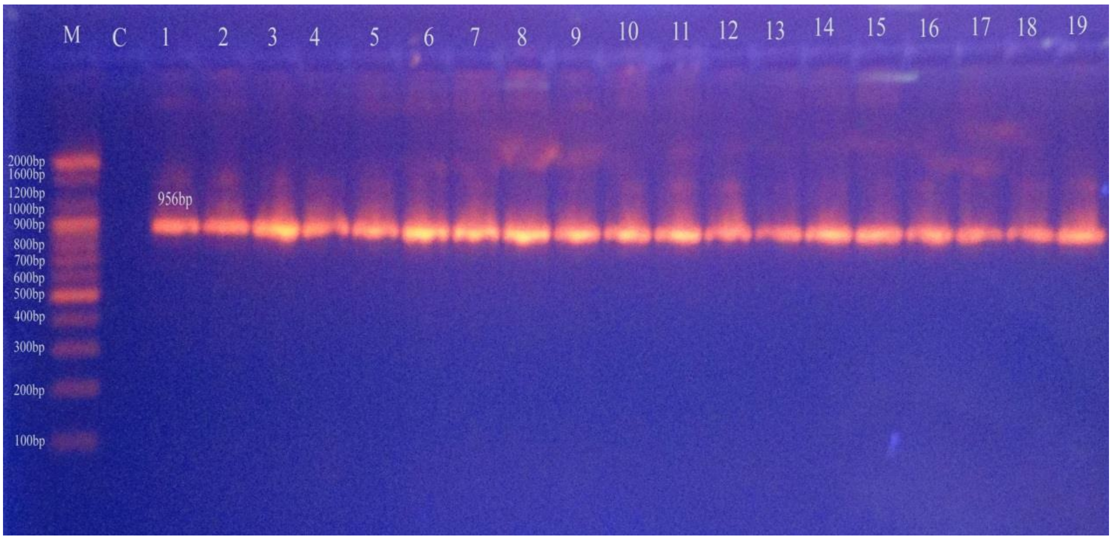
ولهذه المركبات فعالية جيده في عملية ثبيط الأنواع البكتيرية عند تواجدها في hydroxy الموطن نفسه (Pierson and Pierson,2010).

عند التشخيص المجهري Microscopical identification تم تصبيغ الخلايا البكتيرية بصبغة كرام وقد اظهر الفحص المجهري وجود عصيات Rods سالبة لصبغة كرام (Betsy and Keogh,2005) ، اما الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests المعتمدة لتمييز بكتيريا *P. aeruginosa* عن الأنواع البكتيرية الاخرى وحسب ما ذكر في Tadesse and Alem (2006) فقد استعمل كل من فحص الأوكسيديز Oxidase test وفحص الكاتاليز Catalase test إذ ظهرت جميع العزلات نتائج موجبة لفحص الأوكسيديز Oxidase test يعد هذا الاختبار من الاختبارات المهمة إذ ينشط انزيم الأوكسيديز انتقال الالكترون بين كل من البكتيريا الواهبة والصبغة التي تختزل الى اللون الارجواني الغامق ، و اظهرت جميع العزلات نتائج موجبة لفحص الكاتاليز Catalase test إذ ان جميع العزلات كانت قادرة على تحطيم H_2O_2 وتحويله بعد ذلك الى ماء H_2O وغاز الاوكسجين O_2 .

الخطوة الأتية من التشخيص استعمل فيها نظام API 20E لتشخيص عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* الذي يحتوي على 20 اختباراً كيموحيوياً وبعد الحصول على نتائج الاختبارات وتفسيرها بالاعتماد على API 20E Analytic profile index اظهرت النتائج أن 75 عزلة تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* كما موضح في الملحق (2) .

التشخيص النهائي لهذه العزلات تم بوساطة الجين 16S rDNA وباستعمال جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل PCR إذ استعمل بادئ متخصص يستهدف التسلسل النوعي للجين 16S rDNA لغرض تشخيص العزلات البكتيرية وبعد اجراء التفاعل وترحيل ناتج التضاعف على هلام الاكاروز Agarose بتركيز 2% ولمدة ساعتين لوحظ ظهور حزمة واحدة في حفر الهلام وبالمستوى نفسه بالنسبة لجميع العزلات وهذا يدل على ارتباط البادئ Primer مع التسلسل المكمل له في شريط DNA وتم تقدير الاوزان الجزيئية للحزم الناتجة بالاعتماد على موقع الحزم الموجودة التي تكون ذات اوزان جزيئية معروفة كما موضحة في المسار M للدليل الحجمي 100 زوج قاعدة إذ ظهرت النتائج تماثل في الوزن الجزيئي للحزم الناتجة التي كانت 956 زوج قاعدة بالنسبة للوزن الجزيئي للجين 16S rDNA كما موضح بالشكل (3-1) وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره Altaai (2014) إذ ان التشخيص باستعمال الجين 16S rDNA يعد من الجينات التشخيصية الدقيقة للنوع *P. aeruginosa* وللأنواع الأخرى وذلك لأن له تسلسلا

ثابتا لكل نوع من الأنواع البكتيرية وله دور مهم جداً في كل من التشخيص الجزيئي Molecular identification والتصنيف Classification كذلك قام Amutha and Kokila (2012) بتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من التربة بوساطة الجين 16S rDNA إذ وجد ان هذه التقنية مناسبة لعملية تشخيص الأنواع البكتيرية وغالبا مايستعمل تسلسلات منطقة الجين 16S rDNA في مجال دراسة العلاقات التطورية للسلالات المختلفة لهذه البكتيريا ، ولكون مناطق هذا الجين عالية الثبات وغير قابل للتغير مع مرور الزمن فلذلك يعد معياراً في التصنيف Classification وفضلاً عن ثباته العالي فإن جين 16S rDNA يحتوي على مناطق عالية التغاير بين الانواع البكتيرية وبذلك يوفر تسلسلاً خاصاً بكل نوع من الانواع التي يستفاد منها في تشخيص الانواع البكتيرية (Brooks *et al*,2010) .



الشكل (3-1) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين 16S rDNA (956 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت / لمدة ساعتين .

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة ، المسار C يمثل النتيجة السالبة Control .

المسارات (1- 19) ناتج تضخيم الجين 16S rDNA لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* .

وقد تم الحصول على 75 عزلة لبكتيريا *P. aeruginosa* بعد اجراء التشخيص الجيني لهذه العزلات وجد ان 28 عزلة بنسبة 37.33 % من التهاب الأذن الوسطى Otitis metia ، 23 عزلة وبنسبة 30.66 % من مسحات الحروق Burns ، 10 عزلات وبنسبة 13.33% من

مسحات الحروق Wounds ، 8 عزلات وبنسبة 10.66 % من التهاب المجاري البولية Urinary tract infection و6 عزلات وبنسبة 8 % من الدم Blood كما موضح في الجدول (3-1).

جدول (3-1) مصدر العزلات البكتيرية وعدد عزلات كل مصدر والنسبة المئوية للعزلات المشخصة بأستعمال البادئ النوعي للجين 16S rDNA

ت	مصدر عزلات بكتيريا ***P. aeruginosa***	عدد العزلات	النسب المئوية %
1	التهاب الاذن الوسطى Otitis media	28	37.33
2	الحروق Burns	23	30.66
3	الجروح Wounds	10	13.33
4	التهاب المجاري البولية UTI	8	10.66
5	الدم Blood	6	8
	العدد الكلي	75	100

2.3 مقاومة عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية

Resistance of *P. aeruginosa* to antibiotics

اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ان هناك تبايناً واضحاً في مقاومة عزلات البكتيريا قيد الدراسة اتجاه هذه المضادات الحيوية إذ ان جميع العزلات كانت مقاومة بنسبة 100 % لعدد من المضادات الحيوية المستعملة وهي Amoxicillin\Clavulanic acid ، Ampicillin ، Carbencillin ، Cefotaxime ، Ceftriaxone ، Cephalexin و Kanamycin ، بينما اختلفت العزلات البكتيرية فيما بينها فكانت مقاومة Resistance ، متوسطة Intermediate أو حساسة Sensitive إذ كانت نسبة المقاومة اتجاه المضادات Ceftazidime بنسبة 81.33% ، Cefepime بنسبة 70.66% ، Gentamicin بنسبة 46.66% ، Tobramycin بنسبة 38.66% ، Ofloxacin و Piperacillin بنسبة 37.33% لكل منهما ، Norfloxacin و Ciprofloxacin بنسبة 34.66% لكل منهما ، Meropenem بنسبة 33.33% ، Aztreonam بنسبة 22.66% و Imipenem بنسبة 17.33% كما موضح بالجدول (3-2) والملحق (3) .

الجدول (3-2) عدد العزلات والنسبة المئوية لمقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية

أسم المضاد	الرمز	عزلات بكتيريا *P. aeruginosa*					
		المقاومة (R)		المتوسطة (I)		الحساسة (S)	
		العدد	النسبة%	العدد	النسبة%	العدد	النسبة%
Amoxicillin\Clavulanic acid	AMC	75	100	-	-	-	-
Ampicillin	AM	75	100	-	-	-	-
Aztreonam	ATM	17	22.66	36	48	22	29.33
Carbencillin	PY	75	100	-	-	-	-
Cefepime	FEP	53	70.66	18	24	4	5.33
Cefotaxime	CTX	75	100	-	-	-	-
Ceftazidime	CAZ	61	81.33	7	9.33	7	9.33
Ceftriaxone	CRO	75	100	-	-	-	-
Cephalexin	CL	75	100	-	-	-	-
Ciprofloxacin	CIP	26	34.66	-	-	49	65.33
Gentamicin	CN	35	46.66	10	13.33	30	40
Imipenem	IPE	13	17.33	7	9.33	55	73.33
Kanamycin	K	75	100	-	-	-	-
Meropenem	MEM	25	33.33	6	8	44	58.66
Norfloxacin	NOR	26	34.66	4	5.33	45	60
Ofloxacin	OFX	28	37.33	8	10.66	39	52
Piperacillin	PRL	28	37.33	-	-	47	62.66
Tobramycin	TOB	29	38.66	12	16	34	45.33

*** بالاعتماد على CLSI (2012) .**　　**(Sensitive:S , Intermediate:I , Resistant:R)**

بينت العديد من الدراسات أن بكتيريا *P. aeruginosa* لها القابلية على مقاومة العديد من المضادات الحيوية المختلفة لاسيما مضادات البيتالاكتام (Boussoualim *et al.*,2014) إذ كانت نسبة المقاومة لمضاد Amoxicillin\Clavulanic acid 100 % وهذه النتيجة تتفق مع دراسات عالمية ومحلية كالدراسة التي قامت بها AL-Shwaikh (2006) التي اجرتها على 50 عزلة محلية لبكتيريا *P. aeruginosa* معزولة من العينات السريرية إذ وجدت أن هذه العزلات كانت مقاومة بنسبة 100 % لمضاد Amoxicillin\Clavulanic acid وكذلك تتفق نتيجة الدراسة الحالية مع النتائج التي حصل عليها Odumosu *et al.* (2012) إذ كانت نسبة المقاومة للمضاد Amoxicillin\Clavulanic acid وقد ذكر أن بكتيريا *P. aeruginosa* بشكل عام اصبحت مقاومة لهذا المضاد في نيجيريا ، ايضاً من خلال النتائج التي تم الحصول

عليها وجد أن المقاومة لمضاد Ampicillin كانت 100 % وهذه النتيجة تتفق تماماً مع النتيجة التي حصل عليها Kalantar *et al.* (2012) إذ كانت نسبة المقاومة لمضاد Ampicillin 100 % ، بينما ذكر Lutz and Lee (2011) أن نسبة المقاومة للمضاد Ampicillin من قبل بكتيريا *P. aeruginosa* كانت 74 % وذلك لأن دراسته كانت على عزلات معزولة من مصادر سريرية وبيئية في حين ذكر AL-Seweih (2005) الى أن مجموعة مضادات البيتالاكتام β-lactam لاسيما المضاد Ampicillin كان قليل الفعالية في علاج التهاب المجاري البولية المتسبب بوساطة بكتيريا *P. aeruginosa* في دراسة اجريت في الكويت ، كما أظهرت العزلات البكتيرية قيد الدراسة مقاومة لمضاد Carbencillin وبنسبة 100 % وهذا يتفق مع النتيجة التي توصل اليها Mahmoud *et al.* (2013) و AL-Khazali (2009) الذين وجدوا أن نسبة المقاومة للمضاد Carbencillin من قبل البكتيريا *P. aeruginosa* كانت 100 % ، اما نسبة المقاومة لمضاد Piperacillin فكانت 37.33 % وهذه النتيجة تتفق مع النتيجة التي حصل عليها Bhat and Tenguria (2015) إذ وجدا أن المقاومة لمضاد Piperacillin كانت 40 % ويعد مضاد Piperacillin من البنسلينات الواسعة الطيف Extended-Spectrum penicillin .

ابدت بكتيريا *P. aeruginosa* مقاومة لمجموعة مضادات السيفالوسبورينات Cephalosporines إذ بينت النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية أن عزلات هذه البكتيريا قاومت وبنسبة 100 % مضاد Cephalexin وهو من مضادات الجيل الاول للسيفالوسبورينات وهذه النتيجة تتفق مع النتائج التي حصلت عليها AL-Khazali (2009) التي وجدت أن نسبة المقاومة لهذا المضاد كانت 100% من قبل عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* ، كما أن نسبة المقاومة للمضادين Ceftriaxone و Cefotaxime كانت 100% لكلا المضادين وهذه النتيجة تتفق مع النتائج التي حصلت عليها AL-Khazali (2009) التي وجدت ان نسبة المقاومة لكل من المضادين Ceftriaxone و Cefotaxime كانت 100 % لكل منهما وكذلك فإن هذه النتيجة تتفق مع النتيجة التي توصل اليها EL-Bialy *et al.* (2008) الذي وجد أن المقاومة من قبل عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* لكل من المضادين Cefotaxime و Ceftriaxone كانت 100 % و 96 % على التوالي .

أن نسبة المقاومة للمضاد Ceftazidime هي 81.33 % وهذه النتيجة تتفق مع النتيجة التي حصل عليها Doosti *et al.* (2013) الذي وجد أن نسبة المقاومة لهذا المضاد من قبل بكتيريا *P. aeruginosa* كانت 78.9 % كذلك فإن هذه النتيجة تتفق مع النتيجة التي حصل

عليها .Mansour *et al* (2013) الذي وجد ان نسبة المقاومة لهذا المضاد هي 70.4 % إذ ان كل من المضادات Ceftriaxone ، Cefotaxime و Ceftazidime هي من مضادات الجيل الثالث للسيفالوسبورينات ، كذلك فإن بكتيريا *P. aeruginosa* أبدت مقاومة لمضادات الجيل الرابع للسيفالوسبورينات ومنها Cefepime التي كانت نسبة المقاومة له 70.66 % وهذه النتيجة اتفقت مع النتيجة التي حصل عليها .Kalantar *et al* (2012) إذ وجد أن نسبة المقاومة لهذا المضاد كانت 72 % .

أن مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* لمضاد Aztreoname كانت قليلة وبلغت 22.66% وهذا يعني أن مضاد Aztreoname له فعالية جيده ضد بكتيريا *P. aeruginosa* وقد ذكرت العديد من الدراسات الى أن مضاد Aztreoname يعد من المضادات الفعالة في علاج الاصابات بهذه البكتيريا إذ تتفق نتيجة الدراسة الحالية مع النتيجة التي حصل عليها Lutz and Lee (2011) الذين وجدا أن نسبة مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للمضاد Aztreoname كـانت 22 % وكذلك تتفق هذه النتيجة مع النتيجة التي حصل عليها Wolska *et al.* (2012) إذ كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد 19.4 % .

كانت مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* لكل من المضادين Meropenem و Imipenem هي 33.33 % و 17.33% على التوالي وهذه النتائج تتفق مع النتائج التي حصل عليها Idrees (2012) إذ وجد أن نسبة المقاومة لكل من مضاد Imipenem و Meropenem كانت 23.5 و 22 % على التوالي من قبل عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* ، إذ وجد في الدراسة الحالية فعالية عالية من قبل مضاد Imipenem ضد عزلات هذه البكتيريا وهذا يعود الى ان هذا المضاد من المضادات واسعة الطيف ضد العديد من الانواع البكتيرية ومنها بكتيريا *P. aeruginosa* إذ يكون فعال ضدها ويعد مثبط لمختلف انواع انزيمات البيتالاكتاميز (Riera *et al*,2011) .

تعمل مجموعة مضادات البيتالاكتام β-lactam على تثبيط تخليق الجدار الخلوي Cell wall للبكتيريا وذلك من خلال الارتباط مع مواقع خاصة في الخلية البكتيرية تسمى Penicillin binding proteins إذ تقوم بتثبيط عمل الأنزيم Transpeptidase الذي له دور في تكوين الجسور الببتيدية في طبقة الببتيدوكلايكان Peptidoglycan التي تكون ضمن مكونات الجدار الخلوي (Zervosen *et al.*,2012) وأن لهذه المجموعة من المضادات اهمية كبيرة من بين المجاميع الاخرى للمضادات وهي كثيرة الاستعمال (Konaklieva,2014) ، لكن بالرغم من

ذلك فإن النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية أظهرت مقاومة عالية من قبل بكتيريا *P. aeruginosa* اتجاه العديد من مجموعة مضادات البيتالاكتام β-lactam وهذا يرجع الى كثرة استعمال هذه المجموعة من المضادات إذ أن التعرض المستمر والعشوائي وبجرعات غير مناسبة للمضاد الحيوي يزيد من مقاومة الأنواع البكتيرية لهذه المضادات الأمر الذي ادى الى ظهور العديد من السلالات التي تمتاز بصفة تعدد المقاومة للمضادات الحيوية Multi-drug resistance (Ali *et al*.,2015) ، وايضا هناك طرائق لمقاومة المضادات الحيوية التابعة لهذه المجموعة من المضادات منها انتاج الانزيمات المحطمة للمضاد الحيوي مثل أنزيمات البيتالاكتاميز β-lactamase وانزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs وكذلك انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي Outer membrane و امتلاك الأنواع البكتيرية لمضخات الدفق Efflux pumps كل هذا ادى الى زيادة نسبة المقاومة وبدرجة كبيرة (Breidenstein *et al*.,2011) .

اظهرت نتائج الدراسة الحالية أن مضادات Tobramycin ، Gentamicin و Kanamycin التي هي ضمن مجموعة مضادات الامينوكلايكوسايد Aminoglycosides لها فعالية متباينة ضد بكتيريا *P. aeruginosa* إذ كانت نسبة المقاومة لكل من المضادين Gentamicin و Tobramycin هي 46.66 % و 38.66% على التوالي بينما اختلفت نسبة المقاومة للمضاد Kanamycin التي كانت 100 % ، في دراسة قامت بها AL-Musawi (2014) إذ وجدت أن مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للمضاد Tobramycin كانت 33.3% وهذه النتيجة تتفق مع النتيجة التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية وكذلك فإن النتيجة التي تم الحصول عليها تتفق مع النتيجة التي حصلت عليها Zeki (2009) التي وجدت أن نسبة المقاومة لهذا المضاد كانت 32.8 % ، كما وجد Mahmoud *et al*. (2013) أن المقاومة للمضاد Gentamicin كانت 43.9 % وهذه النتيجة تتفق مع نتيجة الدراسة الحالية ، وفي دراسة أجريت في مصر وجد الباحث EL-Bialy (2008) أن مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للمضاد Kanamycin هي 100 % وهذه النتيجة تتفق أيضاً مع نتيجة الدراسة الحالية ، و بالرغم من أن مجموعة مضادات الامينوكلايكوسايد Aminoglycosides تعمل على تثبيط تصنيع البروتين وذلك من خلال الارتباط مع تحت الوحدة الصغيرة للرايبوسومات (30S) ويكون لها تأثير قاتل للخلية البكتيرية وكذلك لها طيف واسع ضد كل من مجموعة البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (Hermann,2007) رغم ذلك فإن عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* ابدت مقاومة لمجموعة مضادات الامينوكلايكوسايد

ويعود سبب المقاومة لهذه المجموعة من المضادات في الأغلب الى افراز Aminoglycosides هذه البكتيريا للأنزيمات المحورة Aminoglycoside modifying enzymes (AMEs) مثل أنزيم N-acetyl transferase و Phosphotransferase والجينات المشفرة لهذه الأنزيمات قد تكون محمولة على البلازميد أو على الكروموسوم (Cox *et al.*,2015) ، قد تحدث المقاومة ايضا عن طريق تغيير في نفاذية الغشاء مما يؤدي الى عدم دخول جزيئة المضاد الحيوي الى داخل الخلية وهناك طريقة اخرى لحدوث المقاومة وهو حدوث طفرات كروموسومية لمستقبلات Receptor المضاد الحيوي على الرايبوسوم Ribosome (Lambert,2005) .

أن نسبة المقاومة للمضادات Ofloxacin ، Ciprofloxacin و Norfloxacin كانت 37.33 % ، 34.66% و 34.66% على التوالي ، أن هذه المضادات تقع ضمن مجموعة مضادات الكينولينات Quinolones وهذه النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية تتفق مع نتائج الدراسة التي قام بها AL-Marjani *et al.* (2015) إذ وجد أن المقاومة للمضاداتNorfloxacin ، Ofloxacin و Ciprofloxacin كانت 36% ، 32% و 30 % على التوالي ، وفي دراسة أخرى قام بها Haleem *et al.* (2011) وجد أن مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادين Norfloxacin و Ciprofloxacin و كانت 37.5% و 31.2 % على التوالي وهذه النتيجة تتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، تعمل مجموعة مضادات الكينولينات Quinolones على تثبيط تصنيع الحامض النووي DNA من خلال ايقاف عمل الأنزيم DNA gyrase (Topoisomerase III) في مجموعة البكتيريا السالبة لصبغة كرام ومنها بكتيريا *P. aeruginosa* الا انه بالرغم من ذلك فإن عزلات هذه البكتيريا أبدت مقاومة لمجموعة مضادات الكينولينات Quinolones وهذا يعود الى حدوث طفرات في الأنزيم DNA gyrase وعليه يؤدي الى حصول المقاومة لهذه المجموعة من المضادات (Fabrega *et al.*,2009) .

3-3 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية Multi-drug resistance

اظهرت نتائج الدراسة الحالية بأن جميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* قيد الدراسة كانت تحمل صفة المقاومة المتعددة Multi-drug resistance ويلاحظ في الجدول (3-3) وجود 14 نمطا من المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وأكثرها ترددا كان النمط الأول إذ كانت العزلات مقاومة لجميع المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة الحالية (18 مضادا حيويا)

الذي تمثل بوجود 11 عزلة ضمن هذا النمط اما النمط الثاني فقد اظهر مقاومة اقل للمضادات الحيوية إذ كانت العزلات قد قاومت 14-16 مضادا حيويا وتمثل بوجود 9 عزلات ضمن هذا النمط اما الأنماط الاخرى فقد اظهرت مقاومة للعديد من المضادات الحيوية المختلفة .

في الدراسة الحالية وجد أن هناك 11 عزلة من العزلات قيد الدراسة كانت مقاومة لجميع المضادات الحيوية المستعملة في هذه الدراسة وهذه العزلات 2 ، 7 ، 10 ، 12 ، 18 ، 24 ، 25 ، 37 ، 45 ، 47 و 61 وأن أغلب هذه العزلات كان مصدرها مسحات الحروق Burns وبواقع 8 عزلات وأيضا عزلة واحدة لكل من مسحات الجروح Wounds ، التهاب الأذن الوسطى Otitis media والادرار Urine وهذه النتيجة تتفق مع ما حصلت عليه AL-Musawi (2014) التي وجدت أن 6 عزلات تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* كانت مقاومة لجميع المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة من مجموع 60 عزلة .

لوحظ انماط متغايرة للمقاومة في عزلات الادرار والدم بينما أظهرت غالبية عزلات الحروق مقاومة عالية وضمن النمطين الأول والثاني إذ أن العزلات في كلا النمطين أظهرت أعلى معدل للمقاومة من الانماط الاخرى وهذا يتفق مع النتائج التي توصلت اليها Belal (2010) إذ بينت ان عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* التي مصدرها الادرار كانت اقل مقاومة للمضادات الحيوية من العزلات التي مصدرها الحروق التي كانت اكثر مقاومة للمضادات الحيوية واشد ضراوة وهذا يرجع في الغالب الى استيطان هذه البكتيريا في بيئة المستشفيات فلذلك حدوث الاصابة بها لاسيما السلالات الانتهازية التي لها مقاومة متعددة لاغلب انواع المضادات الحيوية وهذا ما يدعو الى القلق لأن انتشار هذه العزلات يؤدي بالنتيجة الى فشل العديد من العلاجات المتوفرة حاليا .

أن دراسة انماط مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية له اهمية في مجال الدراسة الوبائية لاسيما بين عزلات البكتيريا المعزولة في المستشفيات للتحري عن هذه العزلات ومحاولة التقليل من انتشارها بين المرضى (Rahman,2006) .

الجدول (3-3) انماط المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لعزلات بكتيريا ***P. aeruginosa***

النمط	عدد العزلات	نوع العزلة					المضادات الحيوية	عدد المضادات الحيوية
		الحروق	الجروح	التهاب الأذن	الإدرار	الدم		
1	11	8	1	1	1	-	AM,PY,PRL,CL,CAZ,CTX,CRO, FEP,MEM,IPE,ATM,CN,TOB,K, CIP,OFX,NOR,AMC	18
2	9	4	1	4	-	-	AM,PY,PRL,CL,CAZ,CTX,CRO, FEP,MEM,CN,TOB,K,CIP,OFX, NOR,AMC	16-14
3	2	1	-	1	-	-	AM,PY,PRL,CL,CAZ,CTX,CRO, FEP,MEM,ATM,CN,TOB,K,OFX, AMC	15-14
4	3	-	-	3	-	-	AM,PY,PRL,CL,CAZ,CTX,CRO, FEP,MEM,ATM,CN,K,AMC	13
5	3	1	1	1	-	-	AM,PY,CL,CAZ,CTX,CRO,FEP, TOB,K,CIP,OFX,NOR,AMC	13
6	2	-	-	1	-	1	AM,PY,CL,CAZ,CTX,CRO,CN, TOB,K,CIP,OFX,NOR,AMC	13-12
7	1	-	-	1	-	-	AM,PY,PRL,CL,CAZ,CTX,CRO, FEP,MEM,CN,K,AMC	12
8	9	3	2	3	1	-	AM,PY,PRL,CL,CAZ,CTX,CRO, FEP,ATM,K,OFX,AMC	12-10
9	1	-	-	-	1	-	AM,PY,CL,CAZ,CTX,CRO,FEP, MEM,TOB,K,AMC	11
10	1	-	-	-	1	-	AM,PY,CL,CAZ,CTX,CRO,FEP,K, CIP,AMC	10
11	4	1	-	1	-	2	AM,PY,CL,CAZ,CTX,CRO,FEP, MEM,K,AMC	10-9
12	11	2	3	5	1	-	AM,PY,CL,CAZ,CTX,CRO,FEP, CN,K,AMC	10-9
13	1	-	-	1	-	-	AM,PY,PRL,CL,CAZ,CTX,CRO,K, AMC	9
14	17	3	2	6	3	3	AM,PY,CL,CAZ,CTX,CRO,FEP,K, AMC	9-7

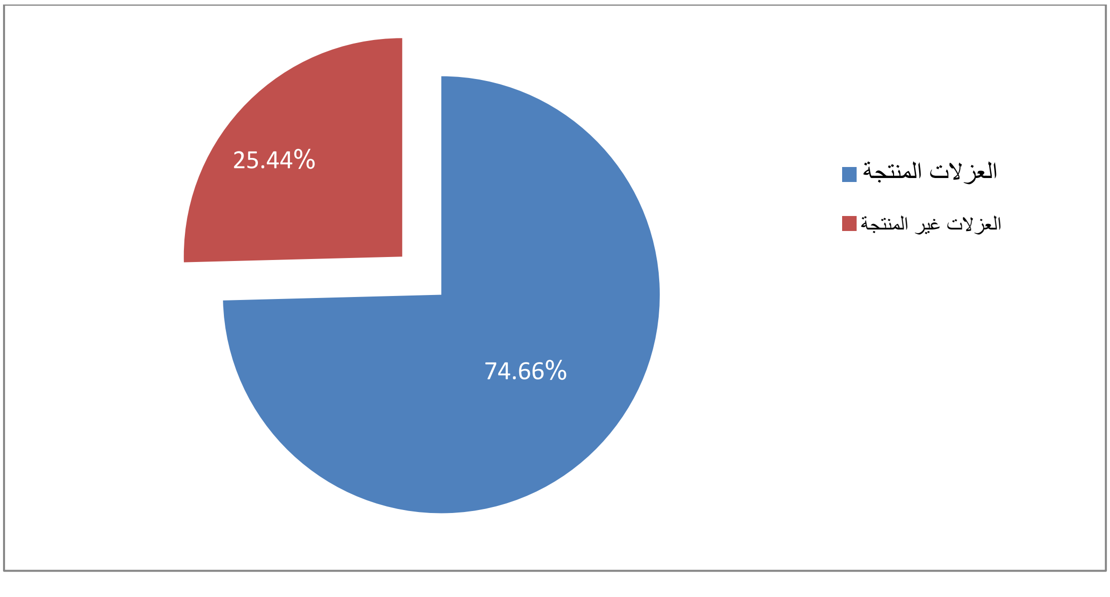
Amoxicillin\Clavulanic acid (AMC) , Ampicillin (AM) , Aztreonam (ATM) , Carbencillin (PY) , Cefepime (FEP) , Cefotaxime (CTX) , Ceftazidime (CAZ) , Ceftriaxone (CRO) , Cephalexin (CL) , Ciprofloxacin (CIP) , Gentamicin (CN) , Imipenem (IPE) , Kanamycin (K) , Meropenem (MEM) , Norfloxacin (NOR) , Ofloxacin (OFX) , Piperacillin (PRL) , Tobramycin (TOB) .

4.3 التحري عن قابلية بكتيريا *P. aeruginosa* لانتاج أنزيمات البيتالاكتاميز

Detection of β -lactamase production from *P. aeruginosa*

تم التحري عن قابلية بكتيريا *P. aeruginosa* لانتاجها انزيمات البيتالاكتاميز لجميع العزلات البكتيرية قيد الدراسة واعتمادا على طريقة اليود القياسية Iodometric method ، وتعتمد هذه الطريقة على الكشف عن مركبي حامض السيفالوسبورانك Cephalosporanic acid وحامض البنسلويك Penicilloic acid والمتكونيين من كسر أصرة الأمايد Amide bond في حلقة مضادات البيتالاكتام لكل من نواة السيفالوسبورينات Cephalosporines والبنسلينات Penicillins .

تعتمد طريقة اليود القياسية Iodometric method على تفاعل اليود مع النشأ ليتكون بعد ذلك معقد لوني ازرق اللون او بنفسجي غامق إذ عند انتاج الأنزيم فإن الحامض المتكون يقوم باختزال اليود Iodine الى اليوديد Iodide وهذا يكون فاقدا لقابلية التفاعل مع النشأ Starch وتكوين المعقد اللوني وسيتحول الى اللون الابيض دلالة على النتيجة الموجبة (Collee *et al.*,1996) ، اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية أن 56 عزلة كانت منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز وبنسبة 74.66 % وكانت 19 عزلة وبنسبة 25.44 % غير منتجة لهذه الأنزيمات كما في الشكل (3-2) .



الشكل (3-2) النسبة المئوية لانتاج أنزيمات البيتالاكتاميز من قبل عزلات بكتيريا *P. aeruginosa*

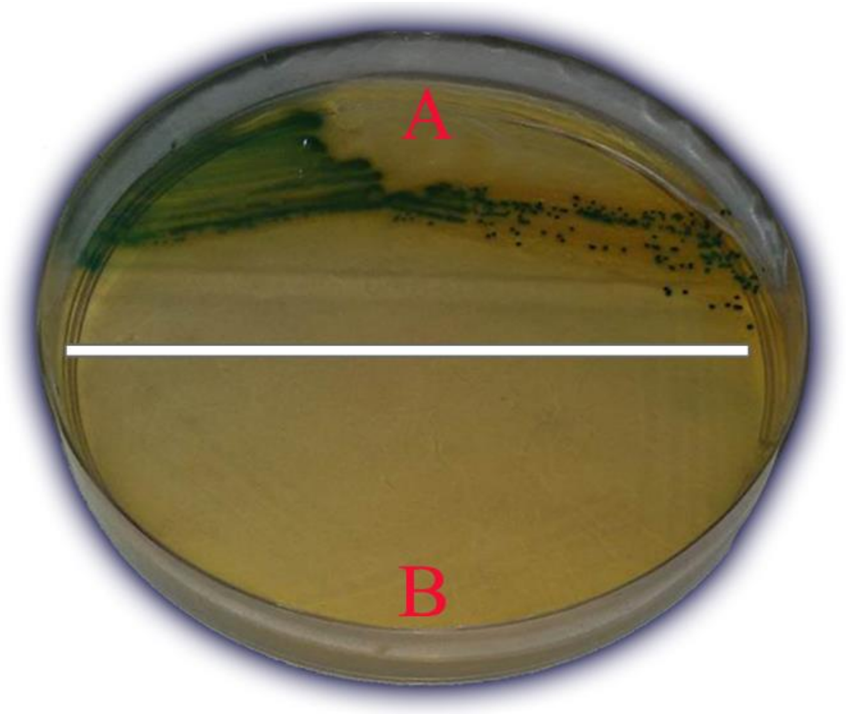
أتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه El-Baky *et al.* (2013) عندما وجدوا أن 72.4 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كانت منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز بينما وجد Ali *et al.* (2009) أن 79.16% من عزلات هذه البكتيريا والمعزولة من مسحات الحروق كانت قادرة على انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز من خلال دراستهم على 320 عزلة مصدرها الحروق ، ومن ناحية أخرى وجد أن بعض العزلات لم تكن قادرة على انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز بالرغم من مقاومتها للعديد من مضادات البيتالاكتام وقد يعود هذا لامتلاك هذه العزلات اليات اخرى للمقاومة مثل امتلاك حاجز النفاذية ، احداث تغيير في موقع الهدف او امتلاكها لانظمة الدفق Efflux pumps (Jacoby,2009) وهذا يدل على أن انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز لم تكن الميكانيكية الوحيدة لمقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* لهذه المجموعة من المضادات بالرغم من ذلك فإن لأنزيمات البيتالاكتاميز دور مهم جدا في فشل الكثير من المضادات في العلاج وذلك بسبب قدرتها على كسر أصرة الأمايد Amide bond في حلقة مضادات البيتالاكتام وتحويلها الى مركبات خاملة وغير فعالة .

5.3 التحري عن قابلية بكتيريا *P. aeruginosa* لانتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف

Detection of Extended Spectrum β –lactamase from *P. aeruginosa*

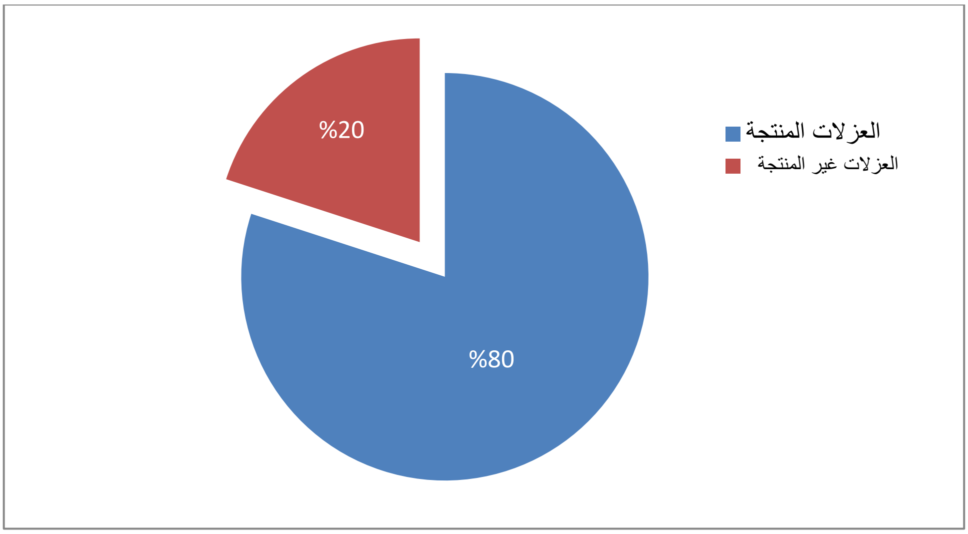
احدى اليات المقاومة المهمة للخلية البكتيرية هو انتاجها لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs إذ انها تكون معقده ، متنوعة وسريعة التطور (Shaikh *et al.*,2015) ، تم التحري عن قابلية بكتيريا *P. aeruginosa* عن انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs وذلك باستعمال وسط CHROMagar ESBL الخاص للكشف عن انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف وتعد هذه الطريقة من الطرائق السهلة والسريعة وحددت النتيجة بالاعتماد في قدرة العزلات البكتيرية على النمو على هذا الوسط فعند ظهور مستعمرات بكتيرية نامية على وسط CHROMagar ESBL تعد النتيجة موجبة وعكس ذلك يدل على أن النتيجة سالبة كما موضح في الشكل (3-3) .

بينت النتائج التي تم الحصول عليها أن 60 عزلة كانت منتجة لهذه الأنزيمات وبنسبة 80% في حين كانت 15 عزلة وبنسبة 20% غير منتجة لهذه الأنزيمات ويمكن ملاحظة النسبة المئوية لانتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs في الشكل (3-4) واتفقت نتيجة الدراسة الحالية مع النتائج التي حصل عليها .Glupczynski *et al* (2010) و Woodford *et al.* (2008) والذان وجدا أن 80% من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كانت منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs .



الشكل (3-3) انتاج بكتيريا *P. aeruginosa* لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs باستعمال وسط الكرومايجين CHROMagar ESBLs. حيث ان :

A : النتيجة الموجبة (ظهورالعزلات البكتيرية) ، **B**: النتيجة السالبة (عدم ظهور العزلات البكتيرية) .



الشكل (3-4)   النسبة المئوية لانتاج أنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs من قبل عزلات بكتيريا *P. aeruginosa*

بينت العديد من الدراسات الحديثة أن استعمال وسط الكرومايجين CHROMagar ESBLs يعد من الطرائق السريعة من أجل الكشف عن مقاومة الأنواع البكتيرية للمضادات الحيوية إذ استعمل وسط CHROMagar KPC الخاص للكشف عن مقاومة الأنواع البكتيرية التابعة للعائلة المعوية Enterobacteriaceae لمضاد Carbapenem(Samra *et al*.,2008) وقد بين AL-Marjani *et al*. (2015) أن البكتيريا التابعة للعائلة المعوية فضلا عن بكتيريا *P. aeruginosa* لها القابلية على انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز β -lactamase وأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs التي عملت على تطوير مقاومة البكتيريا لمجموعة مضادات البيتالاكتام خلال 20 سنة الماضية وهذا في الأغلب يعود الى أن الجينات المشفرة لانتاج هذه الأنزيمات تكون محمولة على البلازميدات مما يساعد على انتشارها ضمن مجاميع مختلفة من البكتيريا وعبر مختلف دول العالم .

استعمل في الدراسة الحالية 12 مضادا حيويا تابعا لمجموعة مضادات البيتالاكتام وهي Ampicillin ، Piperacillin ، Aztreonam ، Ceftazidime ، Cefepime ، Amoxicillin/clavulanic ، Ceftriaxone ، Cefotaxime ، Cephalexin ، Carbencillin ، Imipenem ، Meropnem وكانت 11 عزلة من العزلات البكتيرية وهي 2، 7 ، 10 ، 12 ، 18 ، 24 ، 25 ، 37 ، 45 ، 47 و 61 قد قاومت جميع هذه المضادات المستعملة ووجد ايضا أن هذه العزلات جميعها منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs وهذا يؤكد بأن لهذه الأنزيمات دورا في مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية التابعة

لمجموعة مضادات البيتالاكتام (Rezai *et al*.,2014) ، ومن خلال نتائج الدراسة الحالية وجد ان استعمال وسط الكرومايجين CHROMagar ESBLs تعد من الطرق السريعة والدقيقة في كشف عن انزيمات البيتالاكتاميز ESBLs (Samra *et al*.,2008) و وجد ان هناك عزلات بكتيرية منتجة لهذه الانزيمات وعدم انتاجها لانزيمات البيتالاكتاميز عند استعمال طريقة اليود القياسية مما يدل على عدم كفاءة ودقة طريقة اليود القياسية إذ تعد من الطرق القديمة ، تتطلب وقت طويل لأجرائها ، تحتاج الى ضبط PH المحاليل واخذ كمية متساوية من المزروع البكتيري إذ ان كل هذا يؤثر على ظهور النتيجة (Bidya and Suman,2014) .

6.3 الكشف المظهري عن عوامل الضراوة لبكتيريا *P. aeruginosa*

Phenotype detection of virulence factors for *P. aeruginosa*

أن قابلية العامل الممرض على احداث الاصابة Infection يعود لامتلاكه عددا من عوامل الضراوة وأن هذه العوامل بعضها له دور مباشر والبعض الأخر له دور غير مباشر في عملية تحقيق الاصابة ، وأن القابلية العالية لبكتيريا *P. aeruginosa* على غزو الأنسجة Invasive وانتاجها السموم Toxinogenic يعود لكونها متعددة عوامل الضراوة Virulence multifactorial (Sharma *et al*.,2004) واظهرت نتائج الدراسة الحالية أن عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* تمتلك العديد من عوامل الضراوة وبنسب مختلفة كما موضحة في الجدول (3-4) .

جدول (3-4) عدد ونسب عوامل الضروة التي تمتلكها بكتيريا *P. aeruginosa*

ت	المصدر Sources	عامل الضراوة Virulence factor		
		البروتيز Protease (%)	الغشاء الحيوي Biofilm (%)	الهيمولايسين Haemolysin (%)
1	التهاب الأذن الوسطى	25 (89.28)	20 (71.42)	28 (100)
2	حروق Burn	16 (69.56)	19 (82.60)	23 (100)
3	جروح Wound	8 (80)	6 (60)	10 (100)
4	التهاب المجاري البولية UTI	6 (75)	6 (75)	8 (100)
5	دم Blood	6 (100)	3 (50)	6 (100)
المجموع Total		61 (81.33)	54 (72)	75 (100)

1.6.3 انتاج الهيمولايسين Hemolysin production

أخضعت جميع العزلات البكتيرية لاختبار التحري عن انتاج أنزيم الهيمولايسين Hemolysis ، ومن خلال النتائج التي تم الحصول عليها لوحظ أن عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* جميعها كانت منتجة لهذا الأنزيم وبنسبة 100 % والتحلل من النوع بيتا -β hemolysis كما موضحة في الجدول (4-3) وهذا يتفق مع ما حصل عليه Hossain *et al.* (2013) إذ وجدوا أن جميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كانت منتجة لهذا الأنزيم ومن النوع β-hemolysis وكذلك فإن Raoof (2011) وجد ايضا بان نسبة انتاج هذه البكتيريا لأنزيم الهيمولايسين كانت 100 % ومن النوع β-hemolysis ، وأن أنزيم الهيمولايسين يعد من عوامل الضراوة المهمة لبكتيريا *P. aeruginosa* الذي يفرز خارج الخلية Extracellular إذ يساعدها على الغزو والانتشار من خلال تأثيراته السمية في الخلايا حقيقية النواة إذ يعمل على تحليل مجموعة الدهون الفوسفاتية Phospholipids التي تعد المكون الاساس لأغشية الخلايا حقيقية النواة (Roger and Ibrahim,2012) .

2.6.3 انتاج الأنزيم الحال للبروتين Protease production

تم التحري عن قابلية عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* على انتاج الأنزيم الحال للبروتين Protease وذلك باستعمال وسط اكار الحليب الفرز Skim milk agar ، ومن خلال النتائج التي تم الحصول عليها فإن عدد العزلات التي كانت منتجة لأنزيم Protease 61 عزلة وبنسبة 81.33 % وعدد العزلات غير المنتجة له كانت 14 عزلة وبنسبة 18.67 % كما موضحة في الجدول (4-3) وبالنسبة للعزلات المنتجة لهذا الأنزيم وكانت منطقة التحلل حول المستعمرات النامية كانت واضحة جدا إذ تم الحصول على اكبر منطقة تحلل وكانت 26 ملم من عزلة بكتيريا *P. aeruginosa* معزولة من الجروح Wound واقل منطقة للتحلل كانت 12 ملم من عزلة بكتيرية معزولة من التهاب الأذن اما مناطق التحلل التي اظهرتها العزلات البكتيرية الاخرى فكانت بين 12-26 ملم وربما يعود هذا الاختلاف في قطر منطقة التحلل للعزلات البكتيرية الى تنوع مصادر العزل التي تم عزل بكتيريا *P. aeruginosa* منها إذ كانت المصادر السريرية المختلفة من الحروق ، الجروح ، التهاب الأذن الوسطى ، الادرار و الدم إذ يدل ذلك على وجود تنوع وراثي بين عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* والمعزولة من مصادر متنوعة (Kadhim,2008) .

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي حصلت عليها AL-Nisani (2011) التي وجدت أن 84 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كانت لها القابلية على انتاج أنزيم Protease في حين وجدت Ali *et al.* (2009) أن 89.58 % من عزلات هذه البكتيريا اظهرت قابليتها على انتاج أنزيم Protease وهذه النسبة العالية التي حصلوا عليها تعود الى أن مصدر هذه العزلات كان من مسحات الحروق التي تكون في الغالب ذات ضراوة عالية .

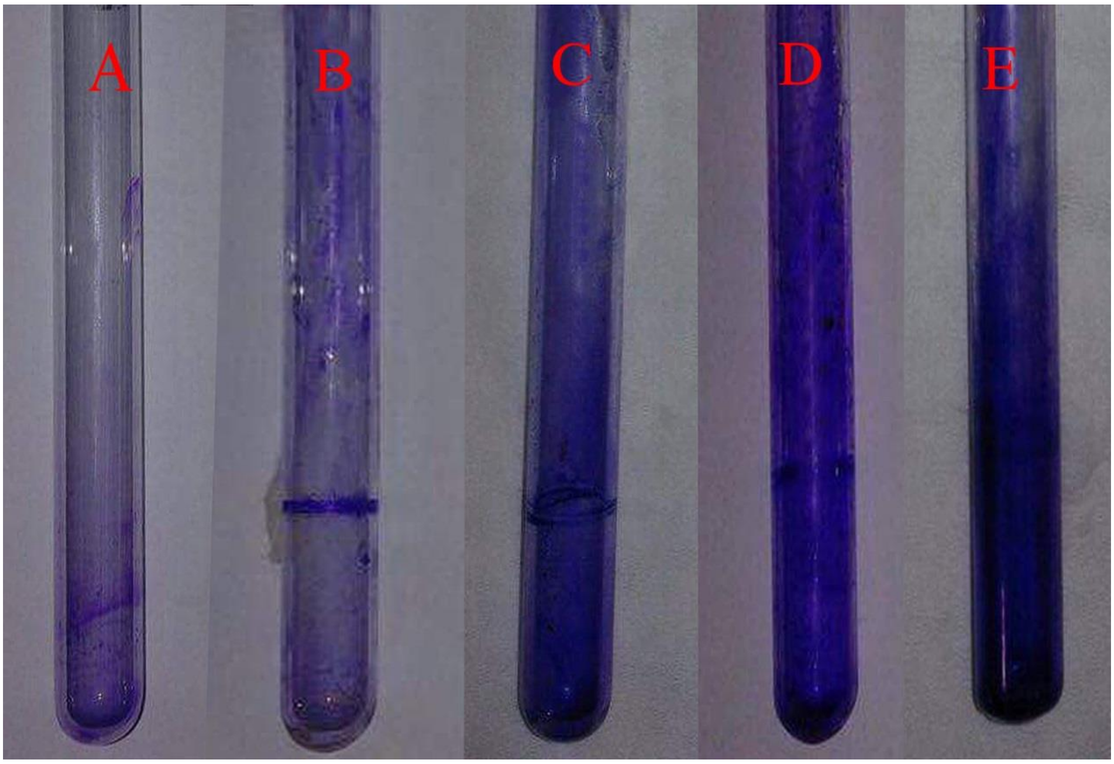
3.6.3 تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

أختبرت قابلية جميع عزلات الدراسة لبكتيريا *P. aeruginosa* على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm ، وتم اعتماد النتيجة الموجبة على أساس ظهور خلايا ملتصقه على جدران انابيب الاختبار أما عدم ظهور خلايا ملتصقه على جدران الأنابيب فهذا يشير الى النتيجة السالبة.

بينت النتائج التي تم الحصول عليها أن 54 عزلة وبنسبة 72 % أظهرت قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي إذ ان 18 عزلة بكتيرية بنسبة 33.33 % كانت منتجة للغشاء الحيوي بشكل قوي (+++) و 20 عزلة بكتيرية بنسبة 37.03 % كانت منتجة للغشاء الحيوي بشكل متوسط (++) و 16عزلة بكتيرية بنسبة 29.62% كانت منتجة للغشاء الحيوي بشكل ضعيف (+) بينما كانت 21 عزلة وبنسبة 28 % غير قادرة على تكوين الغشاء الحيوي وكما موضح في الشكل (3-5) والملحق (1) واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما حصل علية Senturk *et al.* (2012) إذ وجدا أن 78 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* اظـهرت قـابليتهـا على تكوين الغشاء الحيوي في حين بينت AL-Musawi (2014) أن 68.33 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* والمعزولة من حالات سريرية كانت لها القابلية على تكوين الغشاء الحيوي .

بينت النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية أن غالبية العزلات التي أظهرت مقاومة عالية للمضادات الحيوية كانت لها قابلية على تكوين الغشاء الحيوي واتفقت هذه النتيجة مع ما حصل عليه Kaur and Wankhede (2012) فقد وجدا الى أن 65 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* تمكنت من تكوين الغشاء الحيوي وكذلك وجدا أن العزلات المكونة للغشاء الحيوي ابدت مقاومة عالية للمضادات الحيوية عكس العزلات التي لم تكون الغشاء الحيوي وهذا يدل على اهمية الغشاء الحيوي ودوره في ظهور مقاومة عالية للمضادات الحيوية من قبل العديد من الأنواع البكتيرية المكونة له (Bacalso *et al.*,2011) إذ أن امتلاك البكتيريا القابلية على تكوين الغشاء الحيوي يساعدها على الالتصاق بالخلايا المضيفة (Vallet *et al.*,2004) ويعد حماية للخلية البكتيرية من الظروف الخارجية غير الملائمة مما يساعدها

على البقاء على السطوح الصلبة لاسيما في بيئة المستشفيات ولذلك فإن هذا يؤدي الـــى حـدوث الاصـــابات المـكتسبة في المستشفيات Nosocomial infections (Ramos *et al*.,2013) .



الشكل (3-5) انتاج بكتيريا *P. aeruginosa* للغشاء الحيوي Biofilm إذ ان :

A : السيطرة السالبة Control ، **B** : نتيجة سالبة (-) (عدم تكوين الغشاء الحيوي) ، **C** : نتيجة موجبة (+) (انتاج ضعيف للغشاء الحيوي) ، **D** : نتيجة موجبة (++) (انتاج متوسط للغشاء الحيوي) ، **E** : نتيجة موجبة (+++) (انتاج قوي للغشاء الحيوي) .

7.3 الكشف الجيني عن جينات الضراوة لبكتيريا *P. aeruginosa* باستعمال جهاز PCR

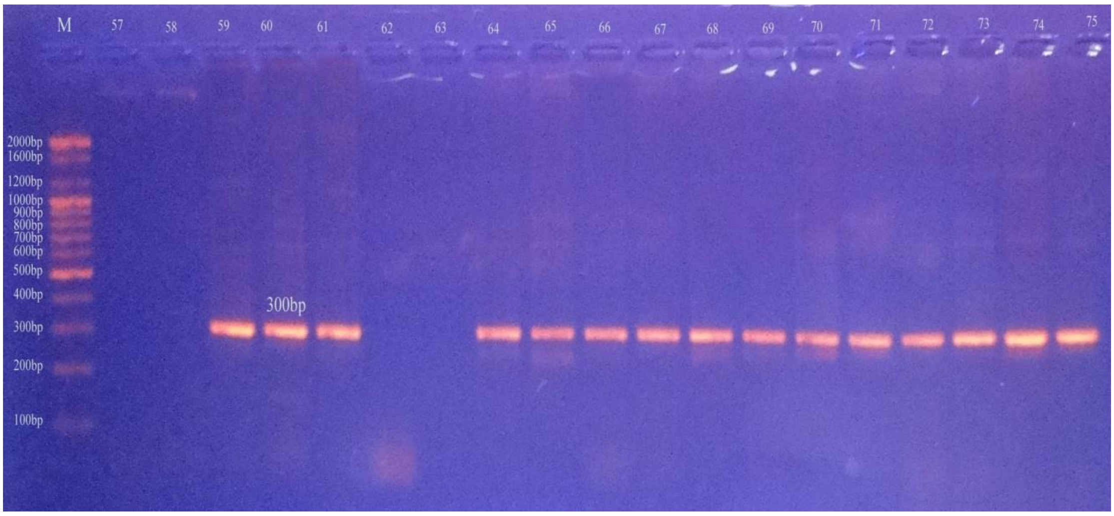
Genotype detection of virulence factor gene of *P. aeruginosa* using PCR

في الدراسة الحالية ، تم التحري عن جينات الضراوة وهي *las* B ، *tox* A ، *alg* D و *pvd* A وباستعمال جهاز PCR واظهرت النتائج أن عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* تمتلك هذه الجينات وبنسب مختلفة كما موضحة في الجدول (3-5) .

تم اجراء التفاعل التضاعفي لسلاسل DNA لجميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال بوادئ Primers متخصصة إذ تستهدف التسلسل النوعي للجينات اعلاه لغرض الكشف عن العزلات التي تملك هذه الجينات (*las* B ، *tox* A ، *alg* D ، *pvd* A) ، بعد اجراء برنامج التفاعل تم ترحيل ناتج التضاعف على هلام الاكاروز Agarose بتركيز 2% ولمدة ساعتين وعند فحص هلام الاكاروز تحت الاشعة فوق البنفسجية لوحظ ظهور حزمة واحدة في حفر الهلام وبالمستوى نفسه بالنسبة للعزلات البكتيرية التي تملك هذه الجينات وهذا يدل على ارتباط البادئ Primer مع التسلسل المكمل له في شريط DNA وأن تقدير الاوزان الجزيئية للحزم الناتجة تم بالاعتماد على موقع الحزم الموجودة التي تكون ذات اوزان جزيئية معروفة للدليل الحجمي 100 زوج قاعدة كما موضح في المسار M إذ اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية تماثلا في الوزن الجزيئي للحزم الناتجة عند مقارنتها مع الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة .

اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بأن 63 عزلة تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* تملك الجين *las* B وبنسبة 84 % كما موضحة في الجدول (3-5) ادناه ، عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي وجد أن الحزم الناتجة ذات وزن جزيئي 300 زوج قاعدة كما في الشكل (3-6) ، وجاءت هذه النتيجة تتفق تماما مع ما حصل عليه Wolska and Szweda (2009) إذ وجدوا أن 84.6 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كانت تملك الجين *las* B وكذلك فإن هذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه Shi *et al.* (2012) الذين وجدوا بأن 80 % من عزلات هذه البكتيريا تملك الجين *las B* ، اما Sabharwal *et al.* (2014) فانهم وجدوا أن 75 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كانت تملك هذا الجين ، أظهرت النتائج في

الدراسة الحالية أن نسبة عالية من العزلات السريرية أمتلكت الجين *las B* وذلك لكونه يشفر لانتاج أنزيم Elastase (Cathcart *et al*.,2011) الذي يعد عامل ضراوة مهم يساعد بكتيريا *P. aeruginosa* على تحطيم بروتين Elastin وهذا البروتين من المكونات المهمة للأوعية الدموية في الانسان والمسؤول عن مرونتها وكذلك فإن بروتين Elastin من المكونات الرئيسة للرئة والمسؤول عن عملية تمدد وتقلص الرئة ولهذا فإن أنزيم Elastase له دور مهم في تحديد ضراوة بكتيريا *P. aeruginosa* خلال مرحلة الاصابة بها (Bai *et al*.,2011) .



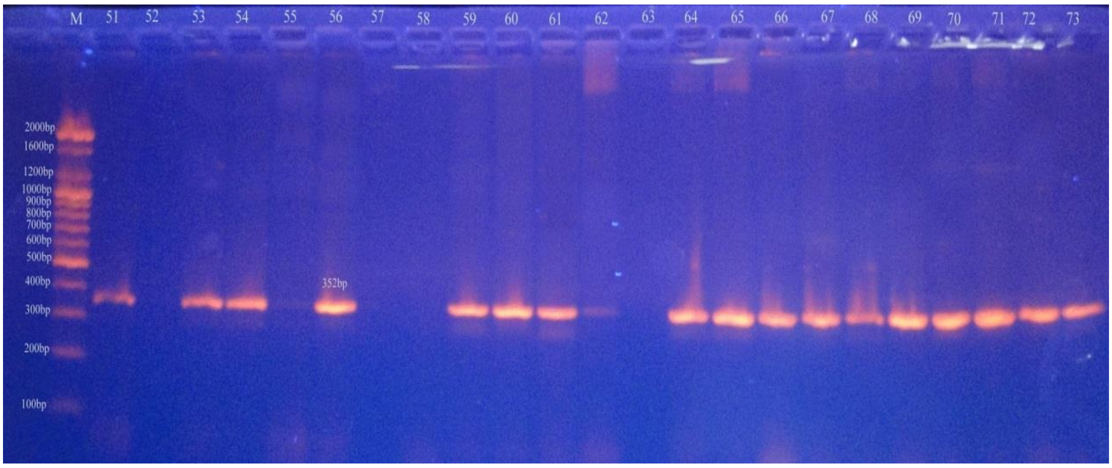
الشكل (3-6) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين *las B* (300 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت / لمدة ساعتين .

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة .

المسارات 57 - 75 تمثل ناتج تضخيم الجين *las B* لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* .

أظهرت النتائج في الجدول (3-5) ادناه وجود 54 عزلة التي تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* تمتلك الجين *tox* A وبنسبة 72 % ، عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي وجد أن الحزم الناتجة ذات وزن جزيئي 352 زوج قاعدة كما في الشكل (3-7) ، إذ ان هذه النتيجة تتوافق مع ما توصلت اليه الباحثة Garallah (2015) إذ كانت عزلاتها السريرية المنتجة للجين *tox* A بنسبة 73 % لكن لم تتوافق نتائج الدراسة الحالية مع ما حصل

عليه Taee *et al.* (2014) إذ وجدوا أن 81.5 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كـانت تملك الجين *tox* A وكان مصدر العزلات التي حصلوا عليها من مسحات الحروق ومرضى التليف الكيسي وكذلك فإن Nikbin *et al.* (2012) وجدوا أن 90 % من عزلات هذه البكتيريا كانت تملك الجين *tox* A وهذه النسبة العالية في الغالب تعود الى أن مصدر العزلات التي حصلوا عليها كانت من مسحات الحروق وتتفق هذه النتيجة مع نتائج الدراسة الحالية إذ أن 23 عزلة كان مصدرها مسحات الحروق وكانت جميعها تملك الجين *tox* A وبنسبة 100 % ، ويشفر الجين *tox* A لانتاج الذيفان الخارجي Exotoxin A وهو من البروتينات عالية السمية وله علاقة كبيرة بحدوث التنخر Necrosis في موقع الاصابة بهذه البكتيريا وتكمن خطورة هذا الذيفان في تثبيطه لعملية تصنيع البروتين (Xing *et al.*,2010) كذلك فإن لهذا الذيفان دورا في عملية اختراق الأنسجة لاسيما عند المرضى المصابين بالتليف الكيسي Cystic fibrosis (Davinic *et al.*,2009) .

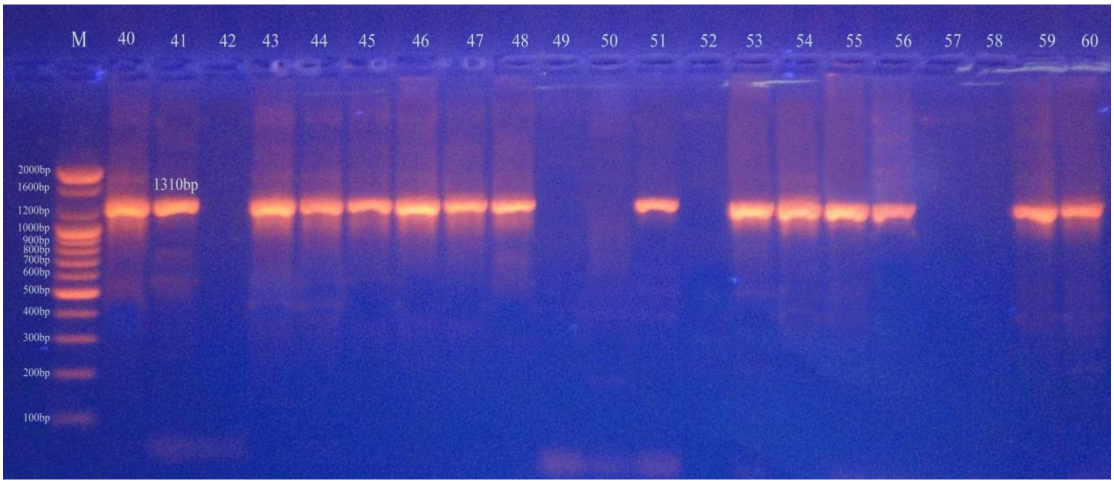


الشكل (3-7) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين *tox A* (352 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت / لمدة ساعتين .

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة .

المسارات (51- 73) تمثل ناتج تضخيم الجين *tox A* لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* .

عند الكشف عن الجين *alg* D أظهرت النتائج في الدراسة الحالية أن 56 عزلة بكتيريا *P. aeruginosa* بنسبة 74.66 % تملك الجين *alg* D كما موضحة في الجدول (3-5) ادناه ، عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي وجد أن الحزم الناتجة ذات وزن جزيئي 1310 زوج قاعدة كما في الشكل (3-8) ، وجاءت هذه النتيجة تتوافق مع ما حصل عليه Wolska and Szweda (2009) إذ وجدوا أن العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* كانت تملك الجين *alg* D وبنسبة 69.2 % وكذلك تتفق نتيجة الدراسة الحالية مع ما حصلت عليه Garallah (2015) إذ وجدت أن 65.38 % من عزلات هذه البكتيريا كانت تملك الجين *alg* D ، يشفر الجين *alg* D لانتاج طبقة الألجنيت Alginate التي هي عبارة عن عديد السكريات الخارجي Exopolysaccharide وتكون هذه الطبقة ذات لزوجة عالية وتوفر حماية للخلية البكتيرية من العوامل الدفاعية للمضيف مثل خلايا البلعمة ومن مكونات نظام المتمم (Tan *et al*.,2014) وأن هذه الطبقة (الألجنيت) تعد عنصرا اساسيا لتكوين الغشاء الحيوي Biofilm وبذلك توفر حماية عند التعرض للمضادات الحيوية (Lamppa and Griswold,2013) .

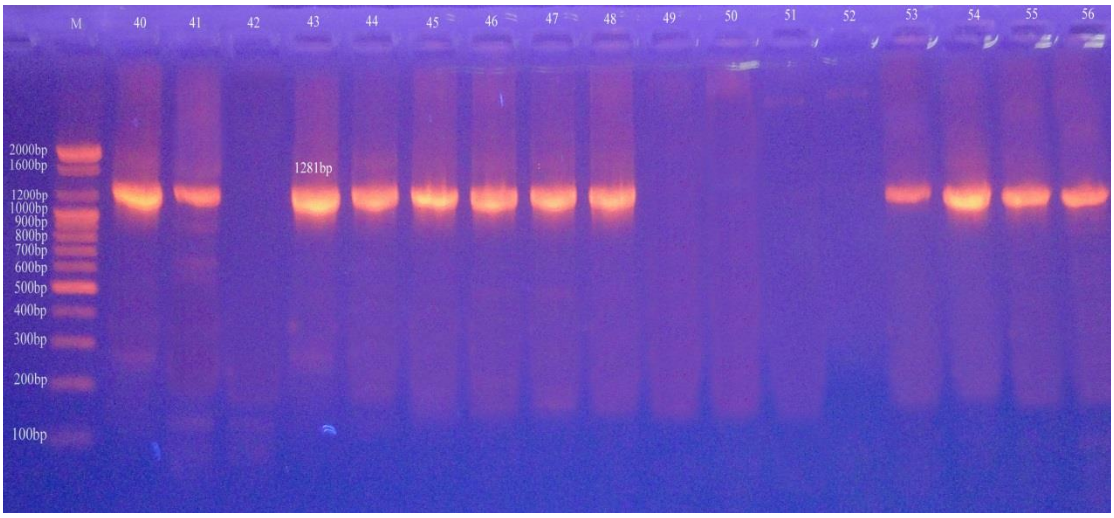


الشكل (3-8) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين *alg D* (1310 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت / لمدة ساعتين .

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة .

المسارات (40 - 60) تمثل ناتج تضخيم الجين *alg D* لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* .

عند الكشف عن الجين *pvd* A أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية أن 52 % بكتيريا *P. aeruginosa* تملك هذا الجين وبنسبة 69.33 % في حين 23 عزلة كانت لاتملك الجين *pvd* A وبنسبة 30.67 % كما موضحة في الجدول (3-5) أدناه ، عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي وجد أن الحزم الناتجة ذات وزن جزيئي 1281 زوج قاعدة كما في الشكل (3-9) ، اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع النتيجة التي حصل عليها Allydice-Francis and Brown (2012) إذ وجدوا أن نسبة امتلاك بكتيريا *P. aeruginosa* للجين *pvd* A كانت 68 % في حين وجد Konings *et al*. (2013) بأن نسبة امتلاك هذه البكتيريا للجين *pvd* A كانت 89 % في دراستهم التي أجريت على عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كان مصدرها القشع ، يشفر هذا الجين لانتاج صـــبغة البـــايوفردين Pyoverdine ويتم التعبير عن ناتج الجين *pvd* A في ظروف نقص الحديد في الخلية البكتيرية إذ أن هذه الصبغة تعد احد انظمة نقل الحديد ولذلك فإن لصبغة البايوفردين Pyoverdine اهمية كبيرة لأن فقدان الحديد او نقصانه يؤثر في عملية انقسام الخلية البكتيرية وتوقف عملية تصنيع DNA (Imperi *et al*.,2009) .



الشكل (3-9) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين *pvd A* (1281 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت / ساعتين .

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة .

المسارات (40 - 56) تمثل ناتج تضخيم الجين *pvd A* لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* .

جدول (3-5) عدد ونسب جينات الضراوة التي تمتلكها بكتيريا ***P. aeruginosa***

Virulence genes جينات الضراوة				**Sources المصدر**	ت
(%)*pvd A*	(%) *alg D*	(%) *tox A*	(%) *las B*		
(64.28)18	(75)21	(60.71)17	(82.14)23	**Otitis media التهاب الاذن الوسطى**	1
(65.21)15	(60.86)14	(78.26)18	(82.60)19	**Burn حروق**	2
(90)9	(90)9	(80)8	(100)10	**Wound جروح**	3
(62.5)5	(75)6	(62.5)5	(62.5)5	**UTI التهاب المجاري البولية**	4
(83.33)5	(100)6	(100)6	(100)6	**Blood دم**	5
(69.33)52	(74.66)56	(72)54	(84)63	Total المجموع	

*(Las B = Elastase B , tox A = Exotoxin A , alg D = Alginate , pvd A = Pyoverdine)

8.3 التنميط الجيني لبكتيريا *P. aeruginosa* باستعمال طريقة ERIC

Genotyping of *P. aeruginosa* using ERIC method

عملية التنميط الجيني Genotyping تعمل على التمييز بين السلالات البكتيرية على اساس محتواها الجيني وهناك العديد من طرائق التنميط الجيني التي اصبحت مهمة في مجال ايجاد القرابة الوراثية Genetic relatedness بين هذه السلالات وتحديد مصادر وطرائق العدوى وكذلك العمل على التمييز بين السلالات التي تكون ذات ضراوة عالية لمنع انتشارها . (Ranjbar *et al.*,2014 ; Yildirim *et al.*,2011)

لغرض ايجاد وتحديد القرابة الوراثية تم تنميط جميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* قيد الدراسة بوساطة استعمال طريقــة التــعداد التكراري للجراثيم المعوية Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) التي وجدت تسلسلاتها منتشرة في مناطق متعددة من الجينوم البكتيري ، أظهر تحليل نتائج الدراسة الحالية وجود قرابة وراثية Genetic relatedness بين تلك العزلات البكتيرية المعزولة من مصادر سريرية واظهرت

نتائج الدراسة الحالية وجود 15 حزمة DNA تراوح الوزن الجزيئي لهذه الحزم بين 100 – 1700 زوج قاعدة كما موضحة في الجدول (3-6) والشكل (3-10 A, B, C و D) .

الجدول (3-6) : الأوزن الجزيئية والنسب المئوية للحزم الناتجة في طريقة ERIC

الحزم	الوزن الجزيئي (bp)	النسبة المئوية % من العدد الكلي للعزلات
ERIC 1	100	6.66
ERIC 2	160	57.33
ERIC 3	200	18.66
ERIC 4	250	9.33
ERIC 5	300	9.33
ERIC 6	350	50.66
ERIC 7	400	14.66
ERIC 8	450	69.33
ERIC 9	500	45.33
ERIC 10	600	25.33
ERIC 11	650	56
ERIC 12	760	41.33
ERIC 13	1000	45.33
ERIC 14	1200	44
ERIC 15	1700	8

هذه النتيجة تتوافق مع النتيجة التي حصل عليها Mansour *et al.* (2013) إذ استعمل طريقة ERIC لتنميط عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وحصل على 12 و 15 نمطا ووجود 4 - 11 حزمة و 3 - 9 حزمة من هذه العزلات البكتيرية التي عزلت من مصر والمملكة العربية السعودية على التوالي ، اما الاوزان الجزيئية التي وجدها فتراوحت بين 110 – 1535 زوج قاعدة .

أظهر مخطط التحليل التجميعي Dendogram في الدراسة الحالية كما في الشكل (3-11) وجود 19 نسيلة Clone بينما كانت 8 عزلات تحتوي طرز وراثية مختلفة وهي 8 ، 19 ، 27 ، 40 ، 49 ، 55 ، 71 و 75 عن بقية العزلات التي تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* ، مع العزلتين 52 و63 كانت غير قابلة للتنميط Untypeable وذلك بسبب حصول طفرات في موقع التسلسلات المتكررة وهذه الطفرات تمنع ارتباط البادئ Primer مع التسلسل المكمل له

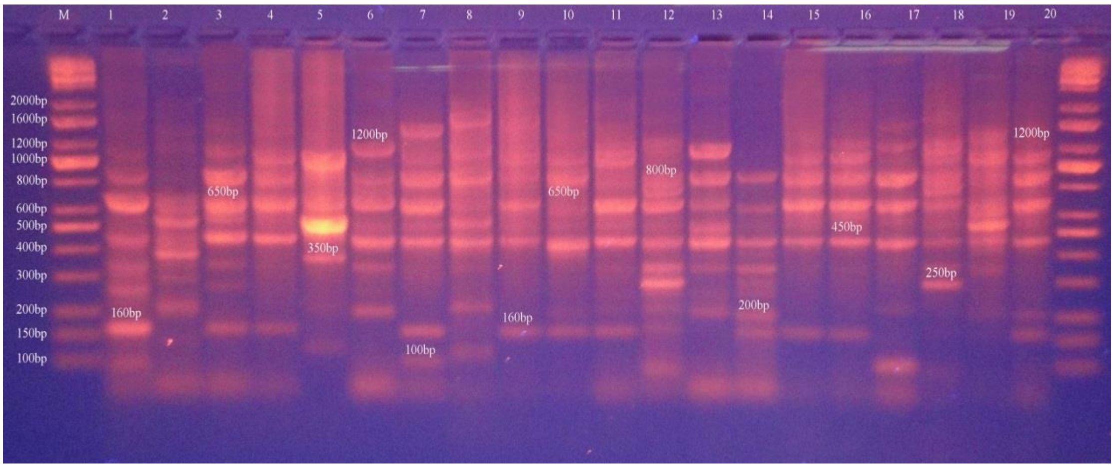
وبذلك لاتظهر الحزم على هلام الاكاروز (Wilson and Sharp,2006) وكذلك أظهر مخطط التحليل التجميعي وجود مجموعتين رئيستين هما (A و B) إذ ان المجموعة A تحتوي على 16 عزلة (21.9%) وتكونت من 5 نسيلة Clone في حين المجموعة B تحتوي على 57 عزلة (78.1%) وتكونت من 14 نسيلة Clone ولوحظ أن العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها من المستشفى نفسها أظهرت وجود علاقة وراثية فيما بينها وهذه النتيجة توضح انتقال بكتيريا *P. aeruginosa* من مريض الى اخر عند دخول المرضى الى المستشفيات و حدوث الاصابات المكتسبة في المستشفيات Nosocomial infections كما لوحظ ان العزلات البكتيرية لبكتيريا *P. aeruginosa* التي عزلت من المصدر نفسه فانها اظهرت تقاربا وراثيا فيما بينها .

توضح النتائج كما في الشكل (3-11) أن العزلتين 34 و 74 وجد بينهما تقارب وراثي وفي نسيلة Clone واحدة وعزلت هاتان العزلتان من مريضين في مستشفى الكرخ العام وكان مصدر عزلهما هو الدم Blood ومن حيث امتلاكهما للجينات فكل من العزلتين اظهرت امتلاكها لكل من الجينات *las B* ، *tox A* و *alg D* ، ايضا العزلات 37 ، 65 ، 68 و 69 وقعت في نسيلة Clone واحدة وهذه العزلات عزلت من مرضى في مستشفى بغداد التعليمي والمصدر التي عزلت منه هذه العزلات كان من التهاب الأذن الوسطى وكذلك من حيث امتلاك الجينات فاظهرت هذه العزلات امتلاكها للجينات *las B* ، *tox A* و *alg D* ، وجدت العزلتان 2 و 32 في نسيلة واحدة إذ أن هاتين العزلتين عزلت من مريضين في مستشفى الصدر العام وكان مصدر عزلهما من الجروح Wound اما من حيث امتلاك الجينات فاظهرت هذه العزلات امتلاكها للجينات *las B* ، *tox A* و *alg D* ، كذلك أظهرت العزلتان 1 و 66 وجود تقارب وراثي فيما بينهما إذ أن هاتين العزلتين عزلت من مريضين في مستشفى الكندي التعليمي وكان مصدر عزلهما من الادرار والدم على التوالي اما من حيث امتلاك الجينات فاظهرت هذه العزلات امتلاكها للجينات *las B* ، *tox A* و *alg D* ، كذلك أظهرت العزلتان 12 و 14 وجود تقارب وراثي فيما بينهما إذ أن هاتين العزلتين عزلت من مريضين في المختبرات التعليمية / مدينة الطب وكان مصدر عزلهما من الجروح والتهاب الاذن الوسطى على التوالي اما من حيث امتلاك الجينات فاظهرت هذه العزلات امتلاكها للجينين *las B* و *alg D* ، اظهرت العزلات 38 ، 64 ، 67 ، 70 و 73 وجود تقارب وراثي فيما بينهما وهذه العزلات عزلت من مرضى في المختبرات التعليمية / مدينة الطب والمصدر التي عزلت منه هذه العزلات كان من التهاب الأذن الوسطى وكذلك من حيث امتلاك الجينات فاظهرت هذه العزلات امتلاكها للجينات *las B* ، *tox A* و *alg D* ، اما العزلات 3 ، 18، 23 اظهرت وجود تقارب وراثي فيما بينها إذ ان هذه

العزلات عزلت من مرضى في مستشفى ابن البلدي وكان مصدر عزلهما من الادرار اما من حيث امتلاك الجينات فاظهرت هذه العزلات امتلاكها للجينات *las B* ، *tox A* و *alg D* ، كذلك فان العزلتين 36 و 39 أظهرتا وجود علاقة وراثية فيما بينهما إذ أن هاتين العزلتين عزلت من مريضين في مستشفى الطفل المركزي وكان مصدر عزلهما من الحروق Burn اما من حيث امتلاك الجينات فاظهرت هذه العزلات امتلاكها للجين *tox A* ، اظهرت العزلتان 30 و 50 وجود علاقة وراثية فيما بينهما إذ أن هاتين العزلتين عزلت من مريضين في مستشفى الصدر العام و مصدر عزلهما فكان من الحروق ومن ناحية امتلاكها للجينات فإن هاتين العزلتين اظهرت امتلاكها للجينين *las B* ، كذلك أظهرت العزلتان 60 و 61 وجود تقارب وراثي فيما بينهما إذ أن هاتين العزلتين عزلت من مريضين في مستشفى الكندي التعليمي وكان مصدر عزلهما من الحروق Wound اما من حيث امتلاك الجينات فاظهرت هذه العزلات امتلاكها للجينات *las B* ، *tox A* و *alg D* ، كذلك فإن العزلات 5 ، 24 ، 26 ، 28 ، 29 ، 33 ، 56 ، 57ظهرت جميعها في نسيلة واحدة إذ أن هذه العزلات عزلت من مرضى في مستشفى بغداد التعليمي ومصدر عزلها كان من الحروق Burn ومن ناحية امتلاكها للجينات فإن هذه العزلات اظهرت امتلاكها للجين *las B* ، ايضا العزلات 31 ، 35 و 58 وقعت في نسيلة Clone واحدة وهذه العزلات عزلت من مرضى في مستشفى الحروق / مدينة الطب والمصدر التي عزلت منه هذه العزلات كان من التهاب الأذن الوسطى وكذلك من حيث امتلاك الجينات فاظهرت هذه العزلات امتلاكها للجين *las B* ، كذلك فإن العزلات 4 ، 9 ، 17 و 22 اظهرت وجود تقارب وراثي فيما بينها إذ ان هذه العزلات عزلت من مرضى في مستشفى ابن البلدي وكان مصدر عزلهما من التهاب الأذن الوسطى اما من حيث امتلاك الجينات فاظهرت هذه العزلات امتلاكها للجين *las B* ، العزلات 10 ، 15 ، 16 ، 20 ، 43 ، 44 و 45 جميعها وجدت في نسيلة Clone واحدة إذ أن هذه العزلات عزلت من مرضى في مستشفى الكرخ العام اما مصدر عزل هذه العزلات كان من الحروق Burn والجروح Wound إذ أن العزلات 10، 43 ، 44 و 45 عزلت من الحروق Burn اما العزلات 15 ، 16 و 20 فكان مصدر عزلهما من الجروح Wound وكذلك فإن جميع هذه العزلات اظهرت امتلاكها للجين *las B* ، ايضا فإن العزلات 41 ، 42 ، 46 و 47 جميعها وجدت في نسيلة Clone واحدة إذ أن هذه العزلات عزلت من مرضى في مستشفى بغداد التعليمي ومصدر عزلها كان من الحروق Burn ومن ناحية امتلاكها للجينات فإن هذه العزلات اظهرت امتلاكها للجينين *las B* و *tox A* ، كذلك وجدت العزلات 11 ، 48 و 59 في نسيلة Clone واحدة إذ أن هذه العزلات عزلت من مرضى في مستشفى بغداد التعليمي ومصدر عزلها كان من الدم Blood للعزلتين 11 و 48 في حين ان

العزلة 59 عزلت من الادرار ومن ناحية امتلاكها للجينات فإن هذه العزلات أظهرت امتلاكها للجينات *las B* ، *tox A* و *alg D* ، اظهرت العزلتان 21 و 54 وجود علاقة وراثية فيما بينهما إذ أن هاتين العزلتين عزلت من مريضين في مستشفى الصدر العام و مصدر عزلهما فكان من التهاب الأذن الوسطى ومن ناحية امتلاكها للجينات فإن هاتين العزلتين اظهرت امتلاكها للجينات *las B* ، *tox A* و *alg D* ، كذلك اظهرت العزلتين 7 و 51 وجود تقارب وراثي فيما بينهما وهذه العزلات عزلت من مرضى في مستشفى الأمامين الكاظمين (ع) التعليمي والمصدر التي عزلت منه هذه العزلات كان من الجروح ، ايضا العزلات 6 ، 13 ، 25 و 72 وقعت في نسيلة Clone واحدة وهذه العزلات عزلت من مرضى في مستشفى بغداد التعليمي والمصدر التي عزلت منه هذه العزلات كان من التهاب الأذن الوسطى ، كذلك فإن العزلتين 53 و 62 وجدت في نسيلة Clone واحدة إذ أن هذه العزلات عزلت من مرضى في مستشفى الطفل المركزي ومصدر عزلها كان من التهاب المجاري البولية ومن ناحية امتلاكها للجينات فإن هاتين العزلتين اظهرت امتلاكها للجينين *tox A* و *alg D* ، كذلك فإن هذه النتائج تتفق مع النتائج التي حصل عليها EL-Bialy *et al.* (2008) باستعمال طريقة ERIC ومن خلال الدراسة التي قاموا بها وجدوا بأن هناك 31 نمطا لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* التي عزلت من التهاب المجاري البولية في مصر، وفي دراسة قام بها Jacome *et al.* (2012) تم ايجاد القرابة الوراثية Genetic relatedness لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من المستشفيات وخلال مدد مختلفة وباستعمال طريقة ERIC-PCR إذ وجدوا 21 نمطا لعزلات هذه البكتيريا وذلك بتفسير النتائج من خلال استعمال مخطط التحليل التجميعي Dendogram .

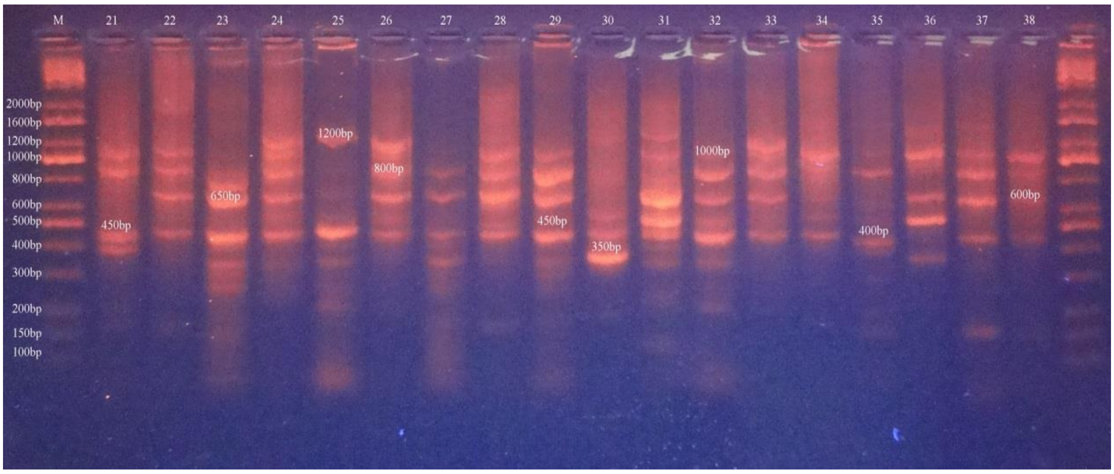
هناك العديد من الدراسات استعملت طريقة ERIC للتمييز بين السلالات البكتيرية وفي مجال الدراسات الوبائية وكذلك لتصنيف العديد من الانواع البكتيرية وتميزت هذه الطريقة بأنها أقل تعقيدا في تحليل النتائج وكذلك اسرع واقل كلفة عند مقارنتها بالعديد من طرائق التنميط الجيني الاخرى (Lim *et al.*,2009) .



الشكل (3-10 A) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال بادئ لاجراء التنميط الجيني بطريقة ERIC (100- 1700 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت / لمدة ساعتين .

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة .

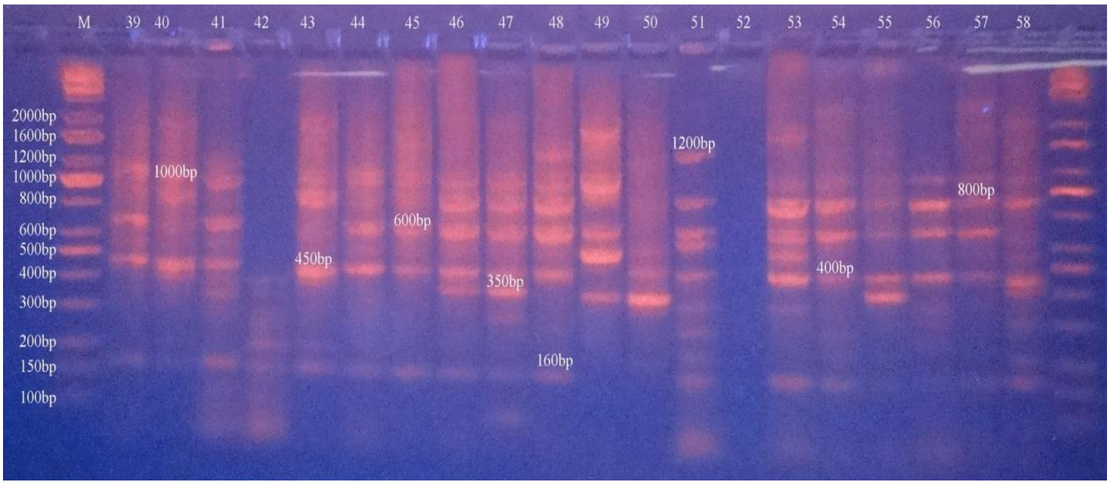
المسارات (1 – 20) ناتج تضخيم تسلسلات ERIC لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* .



الشكل (3-10 B) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال بادئ لاجراء التنميط الجيني بطريقة ERIC (100- 1700 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت / لمدة ساعتين .

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة .

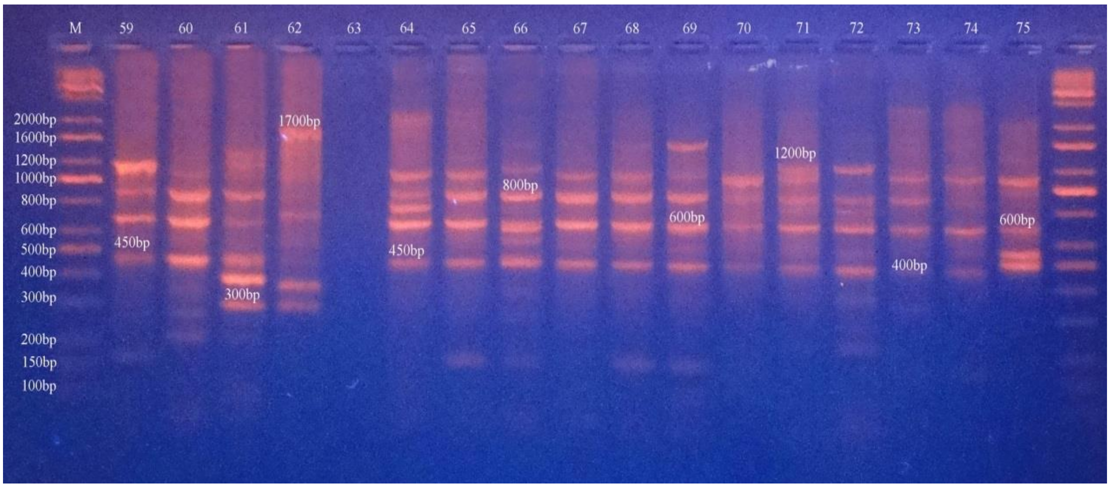
المسارات (21 – 38) ناتج تضخيم تسلسلات ERIC لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* .



الشكل (3-10 C) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال بادئ لاجراء التنميط الجيني بطريقة ERIC (100- 1700 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت / لمدة ساعتين .

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة .

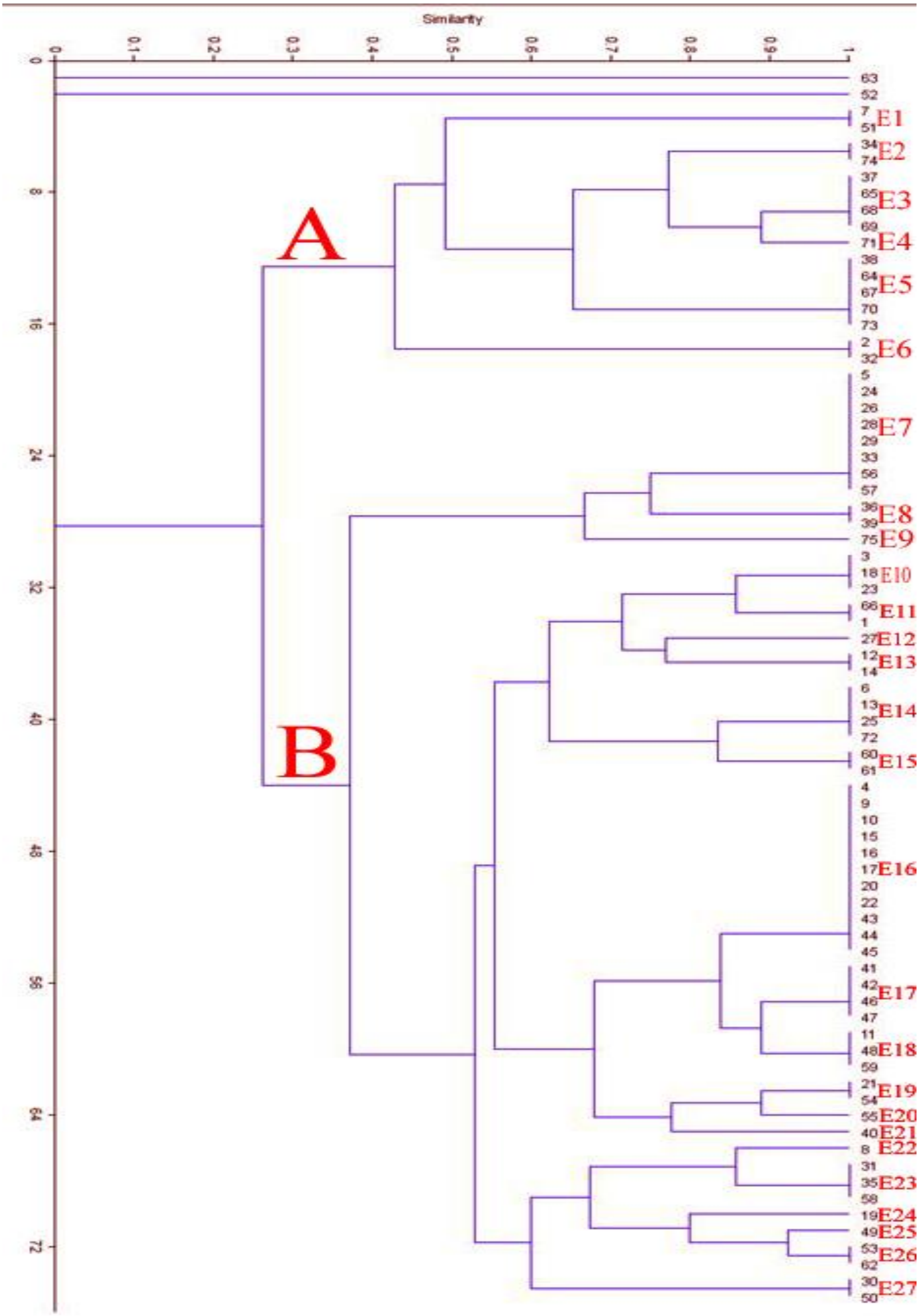
المسارات (39- 58) نـاتـج تضخيـم تسلسـلات ERIC لـعزلات بـكتيريــا *P. aeruginosa* .



الشكل (3-10 D) الترحيل الكهربائي لناتج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال بادئ لاجراء التنميط الجيني بطريقة ERIC (100- 1700 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت / لمدة ساعتين .

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة .

المسارات (59- 75) ناتج تضخيم تسلسلات ERIC لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* .



الشكل (3-11) مخطط التحليل التجميعي Dendogram لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال برنامج Past ، (E : يشير الى العزلات التي تم تنميطها) .

الاستنتاجات و التوصيات

Conclusions

And

Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

1. تعد طريقة تحديد الجين 16S rDNA في تشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* طريقة سريعة ودقيقة في تشخيص البكتيريا .

2. اظهرت عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* مقاومة عالية وبنسبة 100% لكل من المضادات Amoxicillin\Clavulanic acid ، Ampicillin ، Carbencillin ، Cefotaxime ، Ceftriaxone ، Cephalexin و Kanamycin .

3. اظهرت 80% من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* قابليتها على انتاج أنزيمات البيتالاكتاميز الواسعة الطيف ESBLs وباستعمال وسط CHROMagar ESBL الذي يعد من الطرائق البسيطة والسريعة في الكشف عن هذه الأنزيمات .

4. اظهرت 81.3% من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* قابليتها على انتاج أنزيم Protease و 72% من العزلات قابليتها على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm في حين كانت 100% من العزلات قابليتها على انتاج β-heomlysin.

5. اظهرت نتائج الكشف عن جينات الضراوة امتلاك بكتيريا *P. aeruginosa* كل من الجينات *las B* ، *alg D* ، *pvd A* و *tox A* وبنسبة 84% ، 73.3% ، 69.3% و 68% على التوالي .

6. اظهرت النتائج وجود قرابة وراثية Genetic relatedness بين عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من المستشفى نفسها فضلا عن وجود تقارب وراثي بين عزلات البكتيريا المعزولة من مصدر واحد .

7. تعد طريقة ERIC-PCR طريقة مفيدة ، عملية وسهلة لاجراء التنميط الجيني Genotying لعزلات بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* .

التوصيات Recommendations

1. اجراء العديد من الدراسات الوراثية الخاصة للتنميط الجيني Genotyping لبكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال طرائق التنميط الأخرى من اجل تحديد القرابة الوراثية Genetic relatedness بين العزلات البكتيريا المعزولة من مختلف مصادر العزل والمستشفيات .

2. اجراء العديد من الدراسات على جينات المقاومة للمضادات الحيوية المختلفة وعلاقتها بعوامل الضراوة .

3. اجراء العديد من الدراسات لجينات الضراوة الأخرى التي تمتلكها بكتيريا *P. aeruginosa* وتحليل تسلسلات الحمض النووي Sequencing لهذه الجينات من اجل تحديد الطفرات الوراثية لهذه الجينات .

المصادر

References

A

Akingbade, O.A. ; Balogun, S.A. ; Ojo, D.A. ; Afolabi, R.O. ; Motayo, B.O. ; Okerentugba, P.O. and Okonko, I.O. (2012) . Plasmid profile analysis of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections in south west, nigeria .*Wor. Appl. Sci. J.* 20(6): 766-775 .

Alarji, M.K. and Ali, S. (2012) . 2-Aminoacetophenone as a virulence factor for *Pseudomonas aeruginosa* causing sever burn and wound infections in iraq . *Ibn AL-Haitham J. Pur. Appl. Sci* . 3(25): 88-99 .

Ali, M.R. ; Kadum, M.M. and Hussin, M.S. (2009) . Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burn infections and detection of some virulence factor . *AL-Mustansiriya J.Sci.* 20(4): 1-10 .

Ali, Z. ; Mumtaz, N. ; Naz, S.A. ; Jabeen, N. and Shafique, M. (2015) . Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* : a threat of nosocomial infections in tertiary care hospitals . *J. Pak. Med. Assoc.* 65(1): 12-16 .

AL-Khazali, K.A.O. (2009) . Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from burns and wounds infections to antibiotics and some disinfectants . M.Sc. thesis . Collage of Science . University AL-Mustansiriyya .

Allydice-Francis, K. and Brown, P.D. (2012) . Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables . *Inter. J. Microbio*. 10: 1-7 .

Al-Marjani, M.F. ; Kadhim, K.A. ; Kadhim, A.A. and Kinani, A.Y. (2015) . Ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in baghdad . *IJPSR*. 6(2): 382-391 .

Al-Musawi , D.K.M . (2014) . Correlation of Quorum Sensing Genes with Some Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa* . M.Sc. thesis . College of Science . Al- Mustansiriyah University .

AL-Nisani, A.L.S. (2011) . Isolation and identification *Pseudomonas aeruginosa* and determination of some virulence factor using specific genetic markers . M.Sc.Thesis . College of Science . University of Tikrit .

AL-Saleem, N.H.H. (2013) . Genotyping relatedness of *Acinetobacter baumannii* isolated from Medical City/ Baghdad . Ph.D. Thesis . College of Science . University Baghdad .

Al-Seweih, N. ; Janal, W. and Rotimi, V. O. (2005) . Spectrum and antibiotic resistance of uropathogens isolated from hospital and community patients with urinary tract infections in two large hospitals in Kuwait. *Med. Princ. Pract.* 14 (6): 401 – 407.

Al-Shwaikh, R. M. (2006) . Production and Characterization of Protease from Pseudomonas aeruginosa Isolated from Some Clinical Cases and its Relation with some Antibiotic Agents . Ph.D.Thesis . College of Science . AL-Mustansiryia University.

Altaai, M.E. ; Aziz, I.H. and Marhoon, A.A. (2014) . Identification *Pseudomonas aeruginosa* by 16SrRNA gene for differentiation from

others *Pseudomonas* species that isolated from patients and environment . *J. Bagh. Sci.* 11(2): 1028-1034 .

Alwan, M.J. ; Lafta, I.J. and Hamzah, A.M. (2011) . Bacterial isolation from burn wound infections and studying their antimicrobial susceptibility . *Kufa J. Veterinary Medical Sciences* . 2(1): 121-130 .

Amutha, K. and Kokila, V. (2012) . PCR Amplification sequencing of 16S rRNA genes with universal primers and phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* . *Inte. J. Sci. Res*. 3(8): 257-266 .

B

Bacalso, M. ; Xu, T. ; Yeung, K. and Zheng, D. (2011) . Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 required *lasI* and was stimulated by the *Pseudomonas* quinolone signal although salicylic acid inhibition is independent of the *pqs* pathway . *JEMI.* 15: 84-89 .

Bai, F. ; Xu, H. ; Zhang, Q. ; Qi, X. ; Mou, R. ; Bai, G. and Qiao, M. (2011) . Functional characterization of pfm in protein secretion and lung infection of *Pseudomonas aeruginosa* . *Can. J. Microbiol.* 57: 829-837 .

Baradaran, B. ; Farajnia, S. ; Majidi, J. ; Omidi, Y. and Saeedi, N. (2013) . Recombinant expression and purification of *Pseudomonas aeruginosa* truncated exotoxin A in Escherichia coli . *Pharmaceutical Sciences* . 19(1): 31-34 .

Baron, E. J. ; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. (2007) .Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 9th ed. *Mosby Company*. Missouri.

Belal, E.J.K. (2010) . Investigation of some β-lactamase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in najaf city . M.Sc.Thesis . College of Education . University of Kufa .

Belkum, A.V. and Hermans, P.W.M. (2001) . BOX-PCR fingerprinting for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* . J. *Immunology* . 48: 159-168 .

Bentzmann, S. and Plesiat, P. (2011) . The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections . *J. Applied Micribiology* . 13(7): 1655-1665 .

Betsy, T. and Keogh, J. (2005) . Microbiology demystified . *Mcgraw Hill* . London .

Bhasin, S. ; Shukla, A.S. and Shrivastava, S. (2015) . Observation on *Pseudomonas aeruginosa* in Kshipra river with relation to anthropogenic activities . *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4(4): 672-684 .

Bhat, J.A. and Tenguria, R.K. (2015) . Detection of ESBLs in *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Micr. Biot. Res*. 5(1): 56-59 .

Bidya1, S. and Suman, R.S. (2014). Comparative Study of Three β Lactamase Test Methods in *Staphylococcus aureus* Isolated from Two Nepalese Hospitals . *J. Clinical Diagnostics*. 4: 47-52 .

Black, L.J. (2012) . Microbiology principles and explorations . 8^{th} ed . *John Wiley Sons. Inc.* United States of America .

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

Blanc, D.S. ; Francioli,P. ; and Zanette, G. (2007) . Molecular Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the Intensive Care Units – A Review . *Microb. J.* 1: 8-11.

Boussoualim, N. ; Trabsa, H. ; Krache, I. ; Arrar, L. ; Khennouf, S. and Baghiani, A. (2014) . Anti-bacterial and β-lactamase inhibitory effects of *Anchusa azurea* and *Globularia alypum* extracts . *Res. J. Phar. Bio. Che. Sci.* 5(1): 742-749 .

Bowers, D. ; Liew, Y. ; Lye, D.C. ; Kwa, A.L. ; Hsu, L. and Tam, V.H. (2013) . Outcomes of appropriate empiric combination versus monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia . *J. ASM.* 57(3): 1270-1274 .

Breidenstein, E.B.M. ; Fuente-Nunez, C.I. and Hancock, R.E.W. (2011) . *Pseudomonas aeruginosa* : all roads lead to resistance . *International J. Antimicrobial Agents* . 19(8): 419-426 .

Brooks, G.F. ; Carroll, K.C. ; Butel, J.S. ; Morse, S.A. and Mietzner, T.A. (2013) . Jawetz , melnick and adelbergs medical microbiology . 26th ed . *Mcgraw-Hill* . United States .

Brooks, G.F. ; Carroll, K.C. ; Butel, J.S. ; Morse, S.A. and Mietzner, T.A. (2010) . Medical Microbiology . 25th ed. *Mcgraw-HILL companies* . New York .

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

Brusetti, L. ; Malkhazova, I. ; Gtari, M. ; Tamagnini, I. ; Borin, S. ; Merabishvili, M. ; Chanishvili, N. ; Mora, D. ; Cappitelli, F. and

Daffonchio, D. (2008) . Fluorescent-BOX-PCR for resolving bacterial genetic diversity, endemism and biogeography . *BMC Microbiology* . 8(2): 1-13 .

Bush, L.M. and Perez, M.T. (2014) . *Pseudomonas* and related infections : gram negative bacilli . *J. Merck Manual* . 1: 1-4 .

C

Cathcart, G.R.A. ; Quinn, D. ; Greer, B. ; Harriott, P. ; Lynas, J.F. ; Gilmore, B.F. and Walker, B. (2011) . Novel inhibition of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor Las B : a potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in Pseudomonal . Antimicrob Agents Chemother . *J. Microbiology* . 55(6): 2670-2678 .

Cavalieri, S.J. ; Harbeck, R.J. ; Mccarter, Y.S. ; Ortez, J.H. ; Rankin, I.D. ; Sautter, R.L. ; Sharp, S.E. and Spiegel, C.A. (2005) . Manual of antimicrobial susceptibility testing . *American Society Microbiology* . Washington .

Chen, S.S. (2014) . *Pseudomonas* infection . *infect Diseases J*. 31: 1-5 .

Christensen, G. D. ; Simpson, W. A. ; Bison, A. L. and Beachy, H. (1982) . Adherence of slime – producing strains of *Staphlococcus epidermidis* to smooth surfaces. *J. Infect. Immune.* 37: 317 – 326.

CLSI. (2012) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-second informational supplement . *Clinical Laboratory Standards Institute* . 31(1): 124-128 .

Cole, S.J. ; Records, A.R. ; Orr, M.W. ; Linden, S.B. and Lee, V.T. (2014) . Catheter-Associated urinary tract infection by *Pseudomonas*

aeruginosa is mediated by exopolysaccharide independent biofilms . *J. ASM.* 82(5): 2048-2058 .

Collee, J.G. ; Fraser, A.G. ; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996) . Practical medical microbiology . 14th ed. *Churchill Livingstone* .

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

Cornelis, P. and Dingemans, J. (2013) . *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections . *Cellu. Infec. Microb.* 3(75):3389-3399 .

Cotar, A. ; Chifiriue, M. ; Dinu, S. ; Bucur, M. ; Iordache, C. ; Banu, O. ; Dracea, O. ; Larion, C. and Lazar, V. (2010) . Screening of molecular virulence markers in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical infections . *Int. J. Mol. Sci.* 11: 5273-5291 .

Cotar, A.I. ; Chifiriuc, M.C. ; Banu, O. and Lazar, V. (2013) . Molecular characterization of virulence patterns in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from respiratory and wound samples . *J. ACCESS.* 3(2): 551-558.

Cox, G. ; Stogios, P.J. ; Savchenko, A. and Wright, G.D. (2015) . Strutural and molecular basis for resistance to aminoglycoside antibiotics by the adenylytransferase ANT(2")-Ia . *J. mbio.* 6(1): 2180-2194 .

Creanga, D. ; Poiata, A. ; Fifere, N. ; Airinei, A. and Nadejde, C. (2011) . Fluorescence of pyoverdine synthesized by *Pseudomonas* under the effect of iron oxide nanoparticles . *Romanian Biotechnological Letters* . 16(4): 6336-6345 .

Crivaro, V. ; Popolo, A. ; Alessandro, C. ; Lambiase, A. ; Resta, M. ; Borriello, T. ; Scarcella, A. ; Triassi, M. and Zarrilli, R. (2009) . *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and infection control measures . *BMC Infection Disease* . 9(70): 1-7 .

D

Davinic, M. ; Carty, N.L. ; Colmer-Hamood, J.A. ; Francisco, M.S. and Hamood, A.N. (2009) . Role of Vfr in regulation exotoxin A production by *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Microbiology* . 155: 2265-2273 .

Delden, C.V. and Iglewski, B.H. (1998) . Cell-to-Cell signaling Pseudomonas aeruginosa infections . *J. synopsis* . 4: 1-4 .

Doleans-Jordheim, A. ; Cournoyer, B. ; Bergeron, E. ; Croize, J. ; Salord, H. ; Andre, J. ; Mazoyer, M. ; Renaud, F. and Freney, J. (2009) . Reliability of *Pseudomonas aeruginosa* semi-automated rep-pcr genotyping in various epidemiological situations . *J. Clin Microbiol Infect* . 28(9): 1105-1111 .

Doosti, M. ; Ramazani, A. and Garshasbi, M. (2013) . Identification and characterization of metallo β –lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in university hospital from zanjan province , iran . *Iranian Biomedical J.* 17(3): 129-133 .

E

Ebadian, M. ; Johnson, S.M. ; Ogunko, A. Cotter, L. ; Ahmad, M. and Surendran, A. (2014) . *Pseudomonas aeruginosa* endocarditis of a

bioprosthtic aortic valve associated with sigmoid adenocarcinoma in a non-IVDU patient . *J. Case Reports in Practice* . 2(3): 80-82 .

EL-Baky, R.M. ; EL-Azeim, N.H. and Gad, G.F.M. (2013) . Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase , AmpC beta-lactamase and metallo-beta-lactamase among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Advanced Biotechnology Bioengineering* . 1: 22-29 .

El-Bialy, A.A. ; El-Shennawy, G.A. ; Mosaad, A.A. and Bendary, L.A. (2008) . Phenotyping and genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* urine isolates in zagazig university hospitals . *Egyptian J. Medical Microbiology* . 17(4): 615-626 .

El-Shouny, W.A. ; Al-Baidani, A.R.H. and Hamza, W.T. (2011) . Antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wound infections . *Intern. J. Pharm. Med. Sci*. 1(1): 1-7 .

Eusebio, N. ; Pinheiro, T. ; Amorim, A . A . ; Gamboa, F . ; Saraiva, L and Gusmao, L. (2013) . A practical single nucleotide polymorphism multiplex assay for genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* . *PLOSone* 8(6): 1-8 .

F

Fabrega, A. ; Madurga, S. ; Giralt, E. and Vila, J. (2009) . Mechanism of action of and resistance to quinolones . *J. Soc. App. Mic. Bla*. 2(1): 40-61.

Faik, A.J. ; Salih, W.H. and Latif, K.R. (2012) . Conventional and molecular typing of Salmonella enterica serotype typing locally isolated in baghdad . *J. Bag. Sci*. 9(4): 632-639 .

Finlayson, E. A. and Brown, P.D. (2011) . Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors in Pigmented and Non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. *West Indian Med J*. 60 (1): 24-32.

Foxman, B. ; Zhang, L. ; Koopman, J.S. ; Manning, S.D. and Marrs, C.F. (2005) . Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies . *Epidemiologic Perspectives Innovations* . 2(10) : 1-8 .

Fugelsang, K.C. and Edwards, C.G. (2007) . Wine microbiology practical applications and procedures . 2nd ed. Springer . New York .

G

Garallah, E.T. (2015) . Molecular analysis of some virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and non cystic fibrosis sources . M.Sc.Thesis . College of Science . AL-Mustansiryia University.

Gellatly, S.L. and Hancock, R.E.W. (2013) . *Pseudomonas aeruginosa :* new insights into pathogenesis and host defenses . *J. Path. Dis*. 67: 159-173 .

Gharajelar, S.N. ; Ahmadi, M. and Hosseini, B. (2013) . Cloning and expression of the immunogenic moiety of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A . *Biological J. Microorganism* . 1(4): 7-14 .

Giske, C.G. ; Libisch, B. ; Colinon, C. ; Scoulica, E. ; Pagani, L. ; Fuzi, M. ; Kronvall, G. ; and Rossolini, G.M. (2006) . Establishing clonal relationships between VIM-1-Like metallo- β-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa strains from four european countries by

multilocus sequence typing . *J. clinical microbiology* . 44(12): 4309-4315.

Glupczynski, Y. ; Bogaerts, P. ; Deplano, A. ; Berhin, C. ; Huang, T. ; Eldere, J.V. and Rodriguez-Villalobos, H. (2010) . Detection and characterization of class A extended-spectrum β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in belgian hospitals . *J. Antimicrobial Chemotherapy* . 65: 866-871 .

Goudarzi, H. ; Karimi, F. ; Amoli, F.A. ; Abedinyfar, z. ; Doustdar, F. and Mehrnejad, F. (2011) . Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from eye infectins . *J. clinical infection diseases* . 6(1): 41-46 .

Greenwood, D. ; Slack, R. ; Peutherer, J. and Barer, M. (2007) . Medical Microbiology A guide to microbial infections . 18th ed. Elservier limited . New York .

H

Haleem, H. ; Tarrad, J.K. and Banyan, I.A. (2011) . Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical cases and environmental samples and analysis of its antibiotic resistant spectrum at hilla teaching hospital . *Medical J. Babylon* . 8(4):618-624 .

Hashim, I. (2013) . Microbiology culture medid in pharmaceutical industry . *OMICS Group* . Egypt .

Hassan, S. ; Parviz, O. and Bagher, Y. (2009) . Drug susceptibility and molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn unit . *American J. Infectious Diseases* . 10: 301-306 .

Hermann, T. (2007) . Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches . *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 1841-1852 .

Hoge, R. ; Pelzer, A. ; Rosenau, F. and Wilhelm, S. (2010) . Weapons of a pathogen: proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Microbial Biotechnology* . 1: 383-395 .

Hoiby, N. ; Ciofu, O. and Bjarnsholt, T. (2010) . *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in cystic fibrosis . *J. Microbiol.* 5(11): 1663-1674 .

Horan, T.C. ; Andrus, M. and Dudeck, M.A. (2008) . CDC/NHSN surveillance definition of health care associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting . *American J. infection Control* . 36(5): 309-332 .

Hossain, M.G. ; Saha, S. ; Rahmam, M.M. ; Singha, J.K. and Mamun, A.A. (2013) . Isolation , identification and antibiogram study of *Pseudomonas aeruginosa* from cattle in bangladesh . *J. Vet. Adv.* 3(7): 180-185 .

Hussien, I.A. ; Habeb, K.A. and Jassim, K.A. (2012) . Identification of *Pseudomonas aeruginosa* from burn wounds isolates by PCR using exotoxin A-specific primers . *Iraqi J. Biotech*. 11(2): 282-291 .

I

Idrees, E.K.M. (2012) . Comparison between different phenotypic and genotypic methods for detection of metallo β –lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* that has multidrug resistance th antibiotics . College of Science . Abdel aziz University .

Imperi, F. ; Tiburzi, F. and Visca, P. (2009) . Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa* . *J. PNAS.* 106(48): 20440-20445 .

Ishii, S. and Sadowsky, W.J. (2009) . Applications of the rep-pcr DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution . *J. Enviroment microbiology* . 11(4): 733-740 .

Islam, S. (2008) . Chromosomal antibiotic resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Neisseria gonorrhoeae . Stockholm University . Sweden .

J

Jacoby, G.A. (2009) . AmpC beta-lactamase . *Clin. Microbiol Rev.* 22(1): 161-182 .

Jacome, P.R.L. ; Alves, L.R. ; Cabral, A.B. ; Lopes, A.C.S. and Maciel, M.A.V. (2012) . Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from recife, state of pernambuco, brazil . *J. Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 45(6): 707-712 .

Jain, S. and Ohman, D.E. (2005) . Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* . *Amer. Soci. Microb.* 73(10): 6429-6436 .

Jamasbi, R. and Proudfoot, E.M. (2008) . Phenotypic and genotypic characteristics of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* rate of occurrence and distribution of different serotypes, antimicrobial susceptibility profiles and molecular typing . *J. Science* . 39(3): 155-161 .

Janam, R. ; Gulate, A.K. and Nach, G. (2011) . Antibiogram and genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human , animal , plant, water and soil sources in north India. Southeast. *Asian J. Trop. Med. Pub. Health*. 42(6):1477-1488 .

Jimenez, P.N. ; Koch, G. ; Thompson, J.A. ; Xavier, K.B. ; Cool, R.H. and Quax, W.J. (2012) . The multiple singaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa* . *J.ASM.* 11: 46-65 .

K

Kadhim, I.J. (2008) . Role of Proteases Produced by Pseudomonas aeruginosa in Corneal Ulcer (Keratitis) . Ph.D. Thesis . College of Science . University Baghdad .

Kalantar, E. ; Torabi, V. ; Salimizand, H. ; Soheili, F. and Ramezanzadeh, R. (2012) . Incidence and susceptibility pattern of metalli beta lactamase producers among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients at kurdistan province . *J. Microbiol* . 5(3): 507-510 .

Kanj, S.S. and Kanafani, Z.A. (2011) . Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram negative organisms : extended-spectrum β-lactamase-producing enterobacteriaceae , carbapenem-resistant enterobacteriaceae and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* . *Mayo. Clin. Proc.* 86(3): 250-259 .

Kareem, A.A. and Hassan, S.S. (2014) . Determination the genotyping diversity between biofilm forming and collagenase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains . *J. Natural Sciences Research* . 4(23): 178-185 .

Kaur, D.C. and Wankhede, S.V. (2013) . A study of biofilm formation and metallo beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care rural hospital . *Intern. J. Sci. Res. Pub*. 3(10): 1-10 .

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

King, J.D. ; Kocincova, D. ; Westman, E.L. and Lam, J.S. (2009) . Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Immunity* . 15: 261-312 .

Klausen, M. ; Heydorn, A. ; Ragas, P. ; Lambertsen, L. ; Aaes-Jorgensen, A. ; Molin, S. and Nielsen, T. (2003) . Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type , flagella and type IV pili mutants . *J. Molecular Microbiology* . 48(6): 1511-1524 .

Komori, Y. ; Nonogaki, T. and Nikai, T. (2001) . Hemorrhagic activity and muscle damaging effect of *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinase (elastase) . *J. Toxicon.* 39(9): 1327-1332 .

Kon, T. ; Weir, S.C. ; Howell, E.T. ; Lee, H. and Trevor, J.T. (2009) . Repetitive element (REP)-polymerase chain reaction (PCR) analysis of *Escherichia coli* isolates from recreational waters of southeastern lake huron . *J. Microbiol* . 55: 269-276 .

Konaklieva, M.I. (2014) . Molecular targets of β-lactam based antimicrobials : beyond the usual suspects . *J. Antibiotics* . 3: 128-142 .

Konings, A.F. ; Martin, L.W. ; Sharples, K.J. ; Roddam, L.F. ; Latham, R. ; Reid, D.W. and Lamont, I.L. (2013) . *Pseudomonas aeruginosa* use multiple pathways to acquire iron during chronic infection in cystic fibrosis lungs . *J. Infection Immunity* . 81(8): 2697-2704 .

Kukavice-Ibrulj, I. ; Bragonzi, A. ; Paroni, M. ; Winstonley, C. and Sanchagrin, E. (2008). Invivo growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in orat model of chronic lung infection. *J. Bacteriol.* 190: 2804-2813.

L

Laarman, A.J. ; Bardoel, B.W. ; Ruyken, M. ; Fernie, J. ; Milder, F.J. ; Strijp, J.A.G. and Rooijakkers, S.H.M. (2015) . *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways . *J. Immunology* . 188: 386-393 .

Lambert, P.A. (2005) . Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites . *Adv. Dru. Deliv. Rev.* 29(57): 1471-1485 .

Lamppa, J.W. and Griswold, K.E. (2013) . Alginate lyase exhibits catalysis independent biofilm dispersion and antibiotic synergy . *Antimicrob Agent Chemother* . 57(1): 137-145 .

Lang, X. ; Zhang, Y. ; Jiang, H. ; Liu, J. and Ni, H. (2013) . Development of an enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) to detect and genotype enterotoxigenic *Escherichia coli* of calf origin . *J. Microbiology research* . 7(31): 4001-4005 .

Lanotte, P. ; Watt, S. ; Mereghetti, L. ; Dartiguelongue, N. ; Rastegar-Lari, A. ; Goudeau, A. and Quentin, R. (2004) . Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from others origins . *J. Medical Microbiology* . 53: 73-81 .

Lanter, B.B. ; Sauer, K. and Davies, D.G. (2014) . Bacteria present in carotid arterial plaques are found as biofilm deposits which may contribute to enhanced risk of plaque rupture . *J. mbio* . 5(3): 1206-1220 .

Lau, G.W. ; Hassett, D.J. ; Ran, H. and Kong, F. (2004) . The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection . *Trends. Mol. Med*. 10(2): 599-606 .

Li, W. ; Raoult, D. and Fournier, P. (2009) . Bacterial strain typing in the genomic era . *FEMS Microb. Rev*. 33: 892-916 .

Li, Y. and Tian, X. (2012) . Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilm . *J. Sensors* . 2: 2519-2538 .

Libisch, B. ; Poirel, L. ; Lepsanovic, Z. ; Mirovic, V. ; Balogh, B. ; Paszti, J. ; Hunyadi, Z. ; Dobak, A. ; Fuzi, M. and Nordmann, P. (2008) . Identification of PER-1 extended-spectrum β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from hungary and serbia . *FEMS Imm. Med. Microb.* 54: 330-338 .

Lim, K. ; Yasin, R. ; Yeo, C. ; Puthucheary, S. ; Balan, G. ; Maning, N. ; Wahab, Z.A. ; Ismail, N. ; Tan, E. ; Mustaffa, A. and Thong, K. (2009) . Genetic fingerprinting and antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* hospital isolates in malaysia . *J. Microb. Imm. Infect*. 42: 197-209 .

Lin, T. ; Lin, L. and Zhang, F. (2014) . Review on molecular typing methods of pathogens . *J. Medical Microbiology* . 4: 147-152 .

Lister, P.D. ; Wolter, D.J. and Hanson, N.D. (2009) . Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* : clinical impact and complex

regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms . *Clinical Microbiology Reviews* . 22(4): 582-610 .

Lutz, J.K. and Lee, J. (2011) . Prevalence and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs . *Int. J. Environ. Res. Poblic. Health* . 8: 554-564 .

M

Mahmoud, A.B. ; Zahran, W.A. ; Hindawi, G.R. ; Labib, A.Z. and Galal, R. (2013) . Prevalence of multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* in patients with nosocomial infections at a university hospital in egypt, with special reference to typing methods . *J. Virol. Microl.* 2: 1-13 .

Mandsberg, L.F. ; Ciofu, O. ; Kirkby, N. ; Christiansen, L.E. ; Poulsen, H.E. and Hoiby, N. (2009) . Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system . *Antimicrobiol Agennts Chemotherapy* . 53(6): 2483-2491 .

Mansour, S.A. ; Eldaly, O. ; Jiman-Fatani, A. ; Mohamed, M.L. and Ibrahim, E.M. (2013) . Epidemiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates of intensive care units in egypt and saudi arabia . *J. EMHJ.* 19(1): 71-80 .

Markou, P. and Apidianakis, Y. (2014) . Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cancer . *Cellu. Infec. Microb.* 3: 1-9 .

Martinez-Solano, L. ; Macia, M.D. ; Fajardo, A. ; Oliver, A. and Martinez, J.L. (2008) . Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in

chronic obstructive pulonary disease . *Clinical infection Disease* . 47: 1526-1533 .

Massimelli, M.J. ; Beassoni, P.R. ; Forrellad, M.A. ; Barra, J.L. ; Garrido, M.N. ; Domenech, C.E. and Lisa, A.T. (2005) . Identification , cloning and expression of *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase gene . *Curr Microbiol*. 50(5): 251-256 .

Mattmann, M.E. and Blackwell, H.E. (2010) . Small molecules that modulate quorum sensing and control virulence in *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Org. Chem.* 75(20): 6737-6746 .

Mesaros, N. ; Nordmann, P. ; Plesial, P. ; Roussel-Delvallez, M. ; Eldere, J.V. ; Glupczynski, Y. ; Laethem, Y.V. ; Jacobs, F. ; Lebecque, P. ; Malfroot, A. ; Tulkens, P.M. and Bambeke, F.V. (2007) . *Pseudomonas aeruginosa* : resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium . *Euro. Soci. Clin. Micr. Inf.* 13: 560-578 .

Messing, S.A.J. ; Ton-Hoang, B. ; Hickman, A.B. ; Mccubbin, A.J. ; Peaslee, G.F. ; Ghirlando, R. ; Chandler, M. and Dyda, F. (2012) . The processing of repetitive extragenic palindromes: the structure of a repetitive extragenic palindrome bound to its associated nuclease . *Nucleic acids research* . 10: 1-16 .

Mitiku, M. ; Ali, S. and Kibru, G. (2014) . Antimicrobial drug resistance and disinfectants susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical and enviromental samples in jimma university specialized hospital , southwest ethiopia . *Ame. J. Biom. Life Sci*. 2(2): 40-45 .

Mitov, I. ; Strateva, T. and Markova, B. (2010) . Prevalence of virulence genes among bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* . *Brazilian J. Microbiology* . 41: 588-595 .

Mittal, R.; Aggarwal, S. ; Sharma, S. ; Chhibber, S. and Harjai, K. (2009) . Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* . *Amini review J. Infec. publ. Heal.* 2: 101-111 .

Mohamudha, P.R. ; Harish, B.N. and Parija, S.C. (2012) . Molecular description of plasmid mediated AmpC β-lactamase among nosocomial isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from six different hospitals in india . *Indian J. Med. Res.* 135: 114-119 .

Mohapatra, B.R. and Mazumder, A. (2008) . Comparative efficacy of five different rep-PCR methods to discriminate *Escherichia coli* populations in aquatic environments . *J. Technology* . 3: 537-547 .

Morello, J.A. ; Mizer, H.E. and Granato, P.A. (2007) . Microbiology application to patient care . 8th ed. *Mcgraw Hill* . London .

Morlon-Guyot, J. ; Mere, J. ; Bonhoure, A. and Beaumellem B. (2009) . Processing of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A is dispensable for cell intoxication . *J. Infec. Imm.* 77(7): 3090-3099 .

Mulcahy, H. ; Sibley, C.D. ; Surette, M.G. and Lewenza, S. (2011) . *Drosophila melanogaster* as an animal model for the study of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in vivo . *J. Microbiology* . 7: 1-10 .

N

Nassir, E.H. (2012) . Use BOX-PCR to study genetic relatedness of some *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different clinical and environmental sources in baghdad . *J. Basic Education* . 19(80): 723-732.

Nikbin, V.S. ; Aslani, M.M. ; Sharafi, Z. ; Hashemipour, M. ; Shahcheraghi, F. and Ebrahimipour, G. H. (2012) . Molecular Identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins.*Iranian J. Microbiology* . 4(3):118-123.

Nunvar, J. ; Huckova, T. and Licha, I. (2010) . Identification and characterization of repetitive extragenic palindromes (REP)-associated tryosine transposases: implications for REP evolution and dynamics in bacterial genomes . *BMC Genomics* . 11: 1-44 .

O

Ochoa, S.A. ; Lopez-Montiel, F. ; Escalona, G. ; Cruz-Cordova, A. ; Davila, L.B. ; Lopez-Martinez, B. ; Jimenez-Tapia, Y. ; Giono, S. ; Eslava, C. ; Hernandez-Castro, R. and Xicohtencati-Cortes, J. (2013) . Pathgenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strians resistance to carbapenems associated with biofilm formation . *J. Bol. Med. Hosp. Infant*. 70(2): 133-144 .

Odumosu, B.T. ; Adeniyi, B.A. ; Adegbola, H.D. and Chandra, R. (2012) . Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from southwest nigeria hospitals . *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 15(2): 11-15 .

Odumosu, B.T. ; Adeniyi, B.A. and Chandra, R. (2013) . Analysis of interons and associated gene cassettes in clinical isolates of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* from southwest nigeria . *Ann. Cli. Mic. Ant.* 12(29): 1-12 .

Okuda, J. ; Hayashi, N. ; Okamoto, M. ; Sawada, S. ; Minagawa, S. ; Yano, Y. and Gotoh, N. (2010) . Translocation of *Pseudomonas*

aeruginosa from the intestinal tract is mediated by the binding of Exo S to an Na , K-ATPase regulator , FXYD3 . *Infection Immunity* . 78(11): 4511-4522 .

Overhage, J. ; Bains, M. ; Brazas, M.D. and Hancock, R.E. (2008) . Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factor and antibiotic resistance . *J. Bacteriology* . 190(8) : 2671-2679 .

P

Park, S. ; Kim, J.L. ; Lee, L. ; Bae, J. ; Hwang, M. ; Kim, D. ; Jang, S. ; Kim, H. ; Park, M.S. ; Kwon, H. ; Song, J. ; Cho, Y. ; Chun, W. and Park, M. (2014) . Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* with a recombinant RNA-based viral vector expressing human β-defensin 4 . *BMC Microbiology* . 14: 237-242 .

Parker, D. ; Cohen, T.S. ; Alhede, M. ; Harfenist, B.S. ; Martin, F.J. and Prince, A. (2012) . Induction of type I interferon signaling by *Pseudomonas aeruginosa* is diminished in cystic fibrosis epithelial cells . AM. J. Respir. *Cell Mol. Biol.* 46(1): 6-13 .

Parsons, J.F. ; Greenhagen, B.T. ; Shi, K. ; Calabrese, K. ; Robinson, H. and Ladner, J.E. (2007) . Structure and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein phzM from *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Biochemistry* . 46(7): 1821-1828 .

Passat, D.N.F. (2006) . The effect of aqueous and alcoholic extracts of *Withania somnifera* (L.). Dun. and *Urtica* urens (L.) in some virulence factors and plasmid DNA in local isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. M.Sc. thesis. College of Science. University of Baghdad .

Person, C. ; Sundararaj, T. ; Anthonirj, S. ; Kannan, N. and Muthukaruppan, S.M. (2004) . Microbiology . 5 ed. Government of Tamil Nadu . Chennai.

Pierson, L.S. and Pierson, E.A. (2010) . Metabolism and function of phenazines in bacteria impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes . *Appl. Microbiol Biotechnol* . 86: 1659-1670 .

Pounder, J.I. ; Williams, S. ; Hansen, D. ; Healy, M. ; Reece, K. and Woods, G.L. (2005) . Repetitive-Sequence-PCR-Based DNA fingerprinting using the diversilab system for identification of commonly encountered dermatophytes . *Amer. soci. microb*. 43(5): 2141-2147 .

Pryor, S.M. (2008) . Bovine mastitis and ecology of Streptococcus uberis . Ph.D. Thesis . University of Waikato .

Q

Qiu, D. ; Eisinger, V.M. ; Head, N.E. ; Pier, G.B. and Yu, H.D. (2008) .Cipxp proteases positively regulate alginate overxpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Microbiology* . 154(7): 2119-2130 .

R

Rahman, M.I.I.A. (2006) . Bacteriology and immunological study of some causative factors in chronic uriary tract infections . Ph.D.Thesis . Collage of Science . University AL-Mustansiriyya .

Ramalho, R. ; Cunha, J. ; Teixeira, P. and Gibbs, P.A. (2002) . Modified Pseudomonas agar : new differential medium for the detection / enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water . *J. Microbiol Methods* . 49(1): 69-74 .

Ramazanzaden, R. ; Zamani, S. and Zamani, S. (2013) . Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* byenterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)–PCR technique in Sanandaj hospitals . *Iranian J. Microbiology* . 5(2): 126-131 .

Ramos, G. ; Rocha, J. and Tuon, F. (2013) . Seasonal humidity may influence *Pseudomonas aeruginosa* hospital acquired infection rates . *International J. Infectious Disease* . 17: 757-761 .

Ranjbar, R. ; Karami, A. ; Farshad, S. ; Giammanco, G.M. and Mammina, C. (2014) . Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide . *New Microbiology* . 37: 1-15 .

Raoof, W.M. (2011) . Distribution of *alg D , las B , pil B and nan 1* genes among MDR clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in respect to site of infection . *Tikrit Medical J.* 17(2); 148-160 .

Rawat, D. and Nair, D. (2010) . extended-spectrum β-lactamase in gram negative bacteria . *J. Glob. Infect. Dis*. 2(3): 263-274 .

Rezai, M.S. ; Salehifar, E. ; Rafiei, A. ; Langaee, T. ; Rafati, M. ; Shafahi, K. and Eslami, G. (2014) . Characterization of multidrug resistant extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* among uropathogens of pediatrics in north of iran . *Biomed Research International* . 23: 4847-61 .

Riera, E. ; Cabot, G. ; Mulet, X. ; Castillo, M. ; Campo, R. ; Juan, C. ; Canto, R. And Oliver, A. (2011) . Pseudomonas aeruginosa carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem . *J. Antimicrobial Chemotherapy* . 66 : 2022-2077 .

Roger, M. and Ibrahim, B. (2012) . Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants . *J. Academic* . 34(9): p1597 .

Rowe, W. (2013) . The role of alginate in the inhibition of macrophage phagocytosis of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* . *Medicine Health Sciences Commons* . 1: 1-3 .

S

Sabat, A.J. ; Budimir, A. ; Nashev, D. ; Sa-Leao, R. ; Dijl, J.M. ; Laurent, F. ; Grundmann, H. and Fridrich, A.W. (2013) . Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance . *J. Clini. Microb. Infec. Dis*. 18(4): 1-5 .

Sabharwal, N. ; Dhall, S. ; Chhibber, S. and Harjai, K. (2014) . Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections . *Int. J. Mol. Epidemiol Genet*. 5(3): 125-134 .

Salimi, H. ; Yakhchal, B. ; Owlia, P. ; and Lari, A. R. (2010) . Molecular Epidemiolog and Drug Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from burn patients . *J. Labmedicine* . 41(9): 540-550 .

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

Samra, Z. ; Bahar, J. Madar-Shapiro, L. Aziz, N. ; Isral, S and Bishara, J. (2008) . Evaluation of CHROMagar KPC for Rapid Detection of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae . *J. Clinical Microbiology*. 46(9): 3110–3111.

Sawa, T. (2014) . The molecular mechanism of acute lung injury caused by *Pseudomonas aeruginosa* : from bacterial pathogenesis to host response . *J. Intensive Care* . 2(10): 1-11 .

Senior, B.W. (1999) . Investigation of the types and characteristics of the proteolytic enzyme formed by diverse strains of Proteus species. *J. Med. Microbiol*. 48: 623 -628 .

Senturk, S. ; Ulusoy, S. ; Bosgeimez- Tinaz, G. and Yagci, A. (2012). Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infection. *J. Infection Devctries* . 6 (6): 501-507.

Seo, L. Darwin, A.J. (2013) . The *Pseudomonas aeruginosa* periplasmic protease Ctp A can affect system that impact its ability to mount both acute and chronic infections . *J. ASM* . 81(12): 4561-4570 .

Sezonov, G. ; Joseleau-Petit, D. and Ari, R. (2007) . *Escherichia coli* physiology in luria-bertani broth . *J. Bacteriology* . 189(23): 8746-8749 .

Shaikh, S. ; Fatima, J. ; Shakil, S. ; Rizvi, S.M.D. and Kamal, M.A. (2015) . Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamase : types, epidemiology and treatment . *Saudi J. Biological Sciences* . 22: 90-101 .

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

Sharma, S. ; Kaur, R. ; Yadav, V. ; Harjai, K. and Joshi, K. (2004) . Contribution of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* in acute and chronic experimental renal infection . *Jpn. J. Infect. Dis*. 57: 119-120 .

Sharpe, N. (2005) . Recipes for buffers and others laboratory solutions used in electrophoresis , PCR and DNA extraction . Lougheed Genetics Laboratory Manual . Queens University .

Shi, H. ; Sun, F. ; Chen, J. ; Ou, Q. ; Feng, W. ; Yong, X. and Xia, P. (2015) . Epidemiology of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamase (ESBL) –producing nosocomial *Escherichia coli* infection in china . *Annals Clinical Microbiology Antimicrobials* . 14: 1-4 .

Shi, H. ; Trinh, Q. ; Xu, W. ; Zhai, B. ; Luo, Y. and Huang, K. (2012) . A universal primer multiplex PCR method for typing of toxinogenic *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Applied Microbiology* . 95(6): 1579-1587 .

Slonczewski, J.L. and Foster, J.W. (2014) . Microbiology an evolvlng science. 2nd ed. . *Norton and company* . Alabama . pp 1100 .

Soltysik, D.A. ; Bednarek, I.A. ; Loch, T.M. ; Galka, S.E. ; Sypniewski, D.J. ; Machnik, G.M. and Blaszczyk, D.K. (2010) . Repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) as an alternative method for detection of bulking in activated sludge . *J. Microbiology* . 59(1): 11-20 .

Sonbol, F. ; Khalil, M.A.E. ; Mohamed, A.B. and Ali, S.S. (2015) . Correlation between antibiotic resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates . *Turkish J. Medical Sciences* . 45: 1406-1458.

Spilker, T. ; Coenye, T. ; Vandamme , P. and Lipuma, J.J. (2004) . PCR based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol* . 42 (5): 2074-2079.

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

Strateva, T. and Yordanov, D. (2009) . *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance . *J. Medical Microbiology* . 58: 1133-1148 .

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

T

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

Taee, S.R. ; Khansarinejad, B. ; Abtahi, H. ; Najafimosleh, M. and Ghaznavi-Rad, E. (2014) . Detection of *alg D , opr L and exo A* genes by new specific primers as an efficient , rapid and accurate procedure for direct diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* strains in clinical samples . *Jundishapur J. Microbiol* . 7(10): 1-10 .

Tan, J. ; Rouse, S.L. ; Li, D. ; Pye, V.E. ; Vogeley, L. ; Brinth, A.R. ; Arnaout, T. ; Whitney, J.C. ; Howell, P.L. ; Sansom, M.S.P. and Caffrey,

M. (2014) . A conformational landscape for alginate secretion across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Biological* . 70(8): 2054-2068 .

Tananuvat, N. ; Punaku, O. ; Aussayakhun, S. and Chaideroon, W. (2012) . Etiology and clinical outcomes of microbial keratitis at eye. Care center northern Thailand. *J. Med. Assoc. thai*. 95(4): 8 -17.

Todar,K. (2008) . Online textbook of bacteriology 330 lecture topics: *Pseudomonas aeruginosa* . Annual Reports of Wisconsin University.

Tortora, G.J. ; Funke, B.R. and Case, C.L. (2004) . Microbiology . 8 ed. Pearson Education . New York .

Tripathi, P. ; Banerjee, G. ; Gupta, M.K. ; Saxena, S. and Ramteke, P.W. (2013) . Assessment of phylogenetic affiliation using 16S rRNA gene sequence analysis for *Pseudomonas aeruginosa* in patients of lower respiratory tract infection . *J. Indian* . 138: 557-559 .

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

U

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

Ulrich, M. ; Worlitzsch, D. ; Viglio, S. ; Siegmann, N. ; Iadarola, P. ; Shute, J.K. ; Geiser, M. ; Pier, G.B. ; Friede, G. ; Barr, M.L. ; Schuster,

A. ; Meyer, K.C. ; Ratjen, F. ; Bjarnsholt, T. ; Gulbins, E. ; Doring, G. (2010) . Alveolar inflammation in cystic fibrosis . *J. Cyst. Fibrosis* . 9(3): 217-227 .

V

Vallet, I. ; Diggle, S.P. ; Stacey, R.E. ; Camara, M. ;Ventre, I. ; Lory, S. ; Lazdunski, A. ; Williams, P. and Filloux, A. (2004) . Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* : fimbrial *cup* gene clusters are controlled by the transcriptional regulator . *J. Bacteriology* . 186(9): 2880-2890 .

Van, B.A. ; Tassios, P. ; Dijkshoorn, L. ; Haeggman, S. ; Cookson, B. ; Fry, N. ; Fussing, V. ; Green, J. ; Feil, E. ; Gerner-Smidt, P. ; Brisse, S. and Struelens, M. (2007) . Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology . *Clin. Microb. Infect*. 3: 1-46 .

Vandepitte, J. ; Verhaegen , J. ; Engbaek, K. ; Rohner, P. ; Piot, P. and Heuck,C. C. (2003). Basic laboratory procedures in clinical Bacteriology. 2nd ed. *World Health Organization Geneva*. PP. 109-120.

Varkey, D.R. ; Balaji, V. and Abraham, J. (2014) . Molecular characteristion of extended-spectrum β-lactamase producing strains from blood sample . International *J. Pharmacy Pharmaceutical Sciences* . 6: 1-3 .

Voulhoux, R. ; Filloux, A. and Schalk, I.J. (2006) . Pyoverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: the tat system is required for pvd N but not for FpvA transport . *J. Bacterial* . 188(9): 3317-3323 .

W

Wei, Q. and Ma, L.Z. (2013) . Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa* . *Int. J. Mol. Sci.* 14: 20983-21005 .

Wilson, L.A. and Sharp, P.M. (2006) . Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in Escherichia coli: Evolution and Implications for ERIC-PCR . *Mol. Biol. Evol.* 23(6):1156–1168 .

Wolk, D.M. and Dunne, W.M. (2011) . New technologies in clinical microbiology . *J. Clinical Microbiology* . 49(9): 62-67 .

Wolska, K. ; Kot, B. ; Jakubczak, A. and Rymuza, K. (2011) . BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates . *J. Folia Histochem Cytobiol* . 49(4): 734-738 .

Wolska, K. and Szweda, P. (2009) . Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains . *J. Microbiology* . 58(3): 255-260 .

Woo, P.C.Y. ; Lau, S.K.P. ; Teng, J.L.L. ; Tse, H. and Yuen, K.Y. (2008) . Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories . *J. Compilation* . 14: 908-934 .

Woodford, N. ; Zhang, J. ; Kaufmann, M.E. ; Yarde, S. ; Tomas, M.D. ; Faris, C. ; Vardhan, M.S. ; Dawson, S. ; Cotterill, S.L. and Livermore, D.M. (2008) . Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum β-lactamase in the united kingdom . *J. Antimicrobial Chemotherapy* . 62: 1265-1268 .

X

Xing, D. ; Youle, R. ; Fitzgerald, D. and Pastan, I. (2010) . *Pseudomonas* exotoxin A mediated apoptosis is bak dependent and preceded by the degradation of Mci-1 . *J. PMC.* 1: 1-9 .

Y

Yamamoto, Y. (2002) . PCR in diagnosis of infection : detection of bacteria in cerebrospinal fluids . *Clini. Lab. Imm.* 9(3): 508-514 .

Yildirim, I.H. ; Yildirim, S.C. and Kocak, N. (2011) . Molecular methods for bacterial genotyping and analyzed gene regions . *J. Microb. Infect. dis.* 1(1): 42-46 .

Z

Zeki, L.S. (2009) . Extraction and purification of alginate from *Pseudomonas aeruginosa* isolates and study its role in pathogenesis . College of Science . Baghdad University .

Zervosen, A. ; Sauvage, E. ; Frere, J. ;Charlier, P. and Luxen, A. (2012) . Development of new drugs for an old target – the penicillin binding prpteins . *J. Molecules* . 17: 12478-12505 .

Zhao, K. ; Li, Y. ; Yue, B. and Wu, M. (2014) . Genes as early responders regulate quorum sensing and control bacterial cooperation in *Pseudomonas aeruginosa* . *PLOSone* . 9(7): e101887 .

Zulkifli, Y. ; Alitheen, N.B. ; Son, R. ; Raha, A.R. ; Samuel, L. ; Yeap, S.K. and Nishibuchi, M. (2009) . Random amplified polymorphic DNA-PCR and ERIC-PCR analysis on *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles in padang indonesia . *International Food Research J.* 16: 141-150.

الملاحق

Appendixes

ملحق (1) : نتائج الكشف عن بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتيريا *P. aeruginosa*

ESBL	B-lactamase	Biofilm	Protease	Pyocyanin	Hemolysin	المصدر Source	الجنس Sex	رقم العزلة
+	+	-	+	+	β	ادرار	انثى	1
+	+	+++	+	+	β	جروح	انثى	2
-	-	+	+	+	β	ادرار	ذكر	3
-	-	-	+	+	β	اذن	ذكر	4
+	+	-	+	+	β	حروق	ذكر	5
+	+	+	+	+	β	اذن	انثى	6
+	+	+++	+	+	β	جروح	ذكر	7
-	-	+++	+	-	β	اذن	انثى	8
+	-	+	+	+	β	اذن	ذكر	9
+	+	+++	+	+	β	حروق	ذكر	10
-	-	++	+	+	β	دم	انثى	11
+	+	+++	+	+	β	جروح	انثى	12
+	+	+	+	+	β	اذن	ذكر	13
+	+	-	+	+	β	اذن	انثى	14
+	+	-	+	+	β	جروح	ذكر	15
-	-	++	-	+	β	جروح	انثى	16
-	-	+	+	+	β	اذن	انثى	17
+	+	+++	+	+	β	ادرار	انثى	18
-	-	+	-	+	β	جروح	انثى	19
+	+	++	+	+	β	جروح	ذكر	20
+	+	-	+	+	β	اذن	انثى	21
-	-	+++	+	+	β	اذن	ذكر	22
+	-	++	+	+	β	ادرار	انثى	23
+	+	+++	+	+	β	حروق	انثى	24
+	+	+++	+	+	β	اذن	انثى	25
+	+	++	-	-	β	حروق	ذكر	26
+	+	+	+	+	β	اذن	ذكر	27
+	+	+	-	-	β	حروق	ذكر	28
+	+	-	+	+	β	حروق	انثى	29
+	+	+	+	-	β	حروق	انثى	30
+	+	++	+	+	β	اذن	انثى	31
+	+	-	-	+	β	جروح	ذكر	32
+	+	+	-	+	β	حروق	انثى	33
+	+	-	+	+	β	دم	ذكر	34
+	+	+	+	+	β	اذن	انثى	35
-	-	-	+	-	β	حروق	انثى	36
+	+	+++	+	-	β	اذن	ذكر	37
+	+	-	+	-	β	اذن	ذكر	38
+	+	+	-	-	β	حروق	ذكر	39

-	-	++	+	+	β	دم	انثى	40
+	+	+	+	-	β	حروق	ذكر	41
+	+	++	-	+	β	حروق	انثى	42
-	-	+++	+	+	β	حروق	ذكر	43
+	+	++	+	-	β	حروق	ذكر	44
+	+	+++	+	+	β	حروق	انثى	45
-	-	-	+	+	β	حروق	انثى	46
+	+	+++	+	+	β	حروق	ذكر	47
+	-	+	+	+	β	دم	انثى	48
+	+	++	+	-	β	اذن	ذكر	49
+	+	++	-	-	β	حروق	انثى	50
+	+	+	+	+	β	جروح	انثى	51
+	+	++	+	+	β	اذن	ذكر	52
+	+	++	+	+	β	ادرار	انثى	53
+	+	++	+	+	β	اذن	انثى	54
+	+	++	+	+	β	ادرار	ذكر	55
+	+	+	+	+	β	حروق	ذكر	56
+	+	-	+	+	β	حروق	انثى	57
+	+	+++	+	+	β	اذن	ذكر	58
+	+	-	+	+	β	ادرار	ذكر	59
+	+	++	+	+	β	جروح	انثى	60
+	+	+++	-	+	β	حروق	انثى	61
+	-	++	-	+	β	ادرار	انثى	62
+	+	-	-	+	β	اذن	انثى	63
+	+	++	+	+	β	اذن	انثى	64
+	+	+++	+	+	β	اذن	ذكر	65
+	+	-	+	+	β	دم	ذكر	66
+	+	-	-	+	β	اذن	انثى	67
+	+	-	+	+	β	اذن	ذكر	68
-	-	+++	+	+	β	اذن	انثى	69
+	+	+	+	+	β	اذن	ذكر	70
-	-	+++	-	+	β	حروق	ذكر	71
-	-	++	+	+	β	اذن	ذكر	72
+	+	++	+	+	β	اذن	انثى	73
+	+	-	+	+	β	دم	انثى	74
+	+	-	-	+	β	حروق	انثى	75

(+) : النتيجة الموجبة

(-) : النتيجة السالبة

ملحق (2) : نتائج تشخيص بكتيريا *P.aeruginosa* لفحص Api20NE

Test	Reactions / Enzyme	*P.aeruginosa*	*P.aeruginosa*
ONPG	Beta-galactosidase	-	-
ADG	Arginine dihydrolase	+	-
LDC	Lysine decarboxylase	-	-
ODC	Ornithine decarboxylase	+	-
CIT	Citrate utilisation	+	+
H_2S	H2S production	-	-
URE	Urease	+	-
TDA	Tryptophane deaminase	-	-
IND	Indole production	-	-
VP	Acetoin production	-	-
GEL	Gelatinase	+	+
GLU	Glucose	+	+
MAN	Mannitol	-	-
INO	Inositol	-	-
SOR	Sorbitol	-	-
RHA	Rhamnose	-	-
SAC	Sucrose	-	-
MEL	Melibiose	-	-
AMY	Amygdalin	-	-
ARA	Arabinose	+	-
OX	Oxidase	+	+

ملحق (3): نتائج فحص الحساسية للمضادات الحيوية المختلفة لبكتيريا *P. aeruginosa*

TOB	**PRL**	**OFX**	**NOR**	**MEM**	**K**	**IPE**	**CN**	**CIP**	**CL**	**CRO**	**CAZ**	**CTX**	**FEP**	**PY**	**ATM**	**AM**	**AMC**	**رقم العزلة**
I	S	S	S	S	R	S	I	S	R	R	R	R	I	R	S	R	R	1
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2
S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	3
S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	I	R	S	R	R	4
I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	5
I	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	R	R	6
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	7
S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	I	R	I	R	S	R	R	8
S	R	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	I	R	I	R	R	9
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	10
S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	I	R	R	R	S	R	R	11
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12
R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	13
S	S	S	S	S	R	S	I	S	R	R	S	R	I	R	S	R	R	14
S	S	S	S	I	R	S	S	S	R	R	R	R	I	R	I	R	R	15
S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	16
I	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	17
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	18
R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	19
I	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	20
S	S	I	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	21
I	R	S	S	S	R	I	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22
I	S	S	S	S	R	S	I	S	R	R	I	R	R	R	I	R	R	23
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	24
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	25
R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	26
R	S	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	27
S	R	S	S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	28
I	S	S	S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	I	R	I	R	R	29
S	S	S	S	S	R	S	I	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	30
I	S	S	S	S	R	I	I	S	R	R	R	R	I	R	I	R	R	31
R	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	32
R	S	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R	33
R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	I	R	S	R	R	34
R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	35
S	S	S	S	I	R	S	S	S	R	R	I	R	I	R	S	R	R	36
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	37
R	R	I	S	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	38
I	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	39
S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	I	R	R	R	I	R	R	40
R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	41
S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	42
S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	I	R	I	R	R	43

S	R	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	44
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	45
S	S	S	S	R	R	S	I	S	R	R	R	R	I	R	I	R	R	46
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	47
S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	I	R	I	R	R	48
R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	49
R	R	R	I	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	50
S	R	S	S	R	R	S	I	S	R	R	R	R	I	R	I	R	R	51
S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	52
S	S	I	S	S	R	S	S	S	R	R	I	R	R	R	S	R	R	53
S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	54
S	R	I	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	55
R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	56
S	R	S	S	I	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	57
S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	58
S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	I	R	R	59
S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	I	R	I	R	R	60
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	61
R	S	S	S	R	R	I	I	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	62
R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	63
S	S	I	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	I	R	R	64
S	S	S	I	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	65
S	S	R	I	S	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	66
R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	67
S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	I	R	R	68
I	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	I	R	S	R	R	69
S	R	I	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	70
R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	71
I	S	I	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	72
S	R	I	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	73
S	S	S	S	S	R	R	I	S	R	R	I	R	S	R	S	R	R	74
R	S	R	R	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	75

S –(Sensitive) , I –(Intermediate) and R –(Resistant)

Amoxicillin\Clavulanic acid (AMC) , Ampicillin (AM) , Aztreonam (ATM) , Carbencillin (PY) , Cefepime (FEP) , Cefotaxime (CTX) , Ceftazidime (CAZ) , Ceftriaxone (CRO) , Cephalexin (CL) , Ciprofloxacin (CIP) , Gentamicin (CN) , Imipenem (IPE) , Kanamycin (K) , Meropenem (MEM) , Norfloxacin (NOR) , Ofloxacin (OFX) , Piperacillin (PRL) , Tobramycin (TOB) .

ملحق (4) : نتائج الكشف عن بعض جينات الضراوة والتنميط الجيني بأستعمال تقنية PCR لبكتيريا *P. aeruginosa*

الاوزان الجزيئية لحزم ERIC	**عدد حزم ERIC**	***pvd A***	***alg D***	***las B***	***tox A***	**16S rDNA**	**رقم العزلة**
A,B,D,F,H,K,L,M	8	+	+	+	+	+	1
C,E,G,I,J,L	6	+	+	+	+	+	2
B,D,F,H,K,L	6	-	-	-	-	+	3
B,H,I,K,N	5	+	+	+	+	+	4
F,I,K,M	4	+	+	+	+	+	5
C,F,H,K,L,N	6	-	-	-	-	+	6
A,B,D,H,J,L,M	7	-	-	-	-	+	7
A,B,F,H,I,L,M	7	-	-	+	-	+	8
B,H,I,K,N	5	-	-	+	-	+	9
B,H,I,K,N	5	-	-	+	-	+	10
B,H,K,N	4	+	+	+	+	+	11
B,C,E,F,H,J,K	7	+	+	+	+	+	12
C,F,H,K,L,N	6	+	+	+	-	+	13
B,C,E,F,H,J,K	7	+	+	+	-	+	14
B,H,I,K,N	5	+	+	+	-	+	15
B,H,I,K,N	5	+	+	+	+	+	16
B,H,I,K,N	5	+	+	+	-	+	17
B,D,F,H,K,L	6	+	+	+	+	+	18
F,H,I,N,O	5	+	+	+	+	+	19
B,H,I,K,N	5	+	+	+	+	+	20
B,H,M,N	4	+	+	+	+	+	21
B,H,I,K,N	5	+	+	+	+	+	22
B,D,F,H,K,L	6	+	+	+	+	+	23
F,I,K,M	4	+	+	+	+	+	24
C,F,H,K,L,N	6	-	-	+	-	+	25
F,I,K,M	4	+	+	+	+	+	26
A,B,E,F,H,K	6	-	+	+	-	+	27
F,I,K,M	4	+	+	+	+	+	28
F,I,K,M	4	+	-	+	-	+	29
F,H,I	3	-	-	+	-	+	30
B,C,F,H,I,L,M	7	-	-	+	-	+	31
C,E,G,I,J,L	6	+	+	+	+	+	32
F,I,K,M	4	+	+	+	+	+	33
G,J,M	3	-	+	+	+	+	34
B,C,F,H,I,L,M	7	+	+	+	+	+	35
F,I,J,M	4	-	-	-	-	+	36
B,G,J,L,M	5	-	+	+	+	+	37
H,J,L,M	4	-	-	+	-	+	38
F,I,J,M	4	+	+	+	+	+	39
B,G,H,K,M,N	6	+	+	+	+	+	40
B,F,H,K,N	5	+	-	+	+	+	41
B,F,H,K,N	5	-	+	+	+	+	42

B,H,I,K,N	5	+	+	+	+	+	43
B,H,I,K,N	5	+	+	+	+	+	44
B,H,I,K,N	5	+	+	+	+	+	45
B,F,H,K,N	5	+	+	+	+	+	46
B,F,H,K,N	5	+	+	+	+	+	47
B,H,K,N	4	+	+	+	+	+	48
B,F,I,L,N,O	6	-	-	-	-	+	49
F,H,I	3	-	-	-	+	+	50
A,B,D,H,J,L,M	7	-	+	+	+	+	51
-	0	-	-	-	-	+	52
B,F,H,I,L,N	7	+	+	+	+	+	53
B,H,M,N	4	+	+	+	+	+	54
B,H,L,M,N	5	+	+	+	-	+	55
F,I,K,M	4	+	+	+	+	+	56
F,I,K,M	4	-	-	-	-	+	57
B,C,F,H,I,L,M	7	-	-	-	-	+	58
B,H,K,N	4	+	+	+	+	+	59
C,E,F,H,K,N	6	+	+	+	+	+	60
C,E,F,H,K,N	6	+	+	+	+	+	61
B,F,H,I,L,N	7	-	+	-	+	+	62
-	0	-	-	-	+	+	63
H,J,L,M	4	+	+	+	+	+	64
B,G,J,L,M	5	+	+	+	+	+	65
A,B,D,F,H,K,L,M	8	+	+	+	+	+	66
H,J,L,M	4	+	+	+	+	+	67
B,G,J,L,M	5	+	+	+	+	+	68
B,G,J,L,M	5	+	+	+	+	+	69
H,J,L,M	4	+	+	+	+	+	70
G,J,L,M	4	+	+	+	+	+	71
C,F,H,K,L,N	6	+	+	+	+	+	72
H,J,L,M	4	+	+	+	+	+	73
G,J,M	3	+	+	+	+	+	74
G,I,J,K,M	5	+	+	+	+	+	75

(+) : النتيجة الموجبة

(-) : النتيجة السالبة

(A=100 , B=160 , C=200 , D=250 , E=300 , F=350 , G=400 , H=450 , I=500 , J=600 , K=650 , L=760 , M=1000 , N=1200 , O=1700 , - = Untypeable)

ملحق (5) : نتائج قياس نقاوة ناتج DNA في جهاز نانو دروب Nano drop .

Sample Type	Con(ng/ul)	260/280	Abs280	Abs260	Sample ID
dsDNA	161	1.96	1.64	3.221	1
dsDNA	77.7	1.47	1.06	1.555	2
dsDNA	76.5	1.94	0.787	1.529	3
dsDNA	138	1.77	1.558	2.759	4
dsDNA	90	1.94	0.927	1.799	5
dsDNA	95.6	1.23	1.558	1.913	6
dsDNA	73.5	1.87	0.784	1.47	7
dsDNA	76.5	1.94	0.787	1.529	8
dsDNA	139	1.93	1.438	2.78	9
dsDNA	341.5	2	3.42	6.831	10
dsDNA	87.3	1.84	0.947	1.746	11
dsDNA	100.3	1.84	1.091	2.007	12
dsDNA	109.4	1.51	1.448	2.188	13
dsDNA	74.3	1.45	1.025	1.485	14
dsDNA	170	1.85	1.834	3.4	15
dsDNA	60.9	1.78	0.686	1.219	16
dsDNA	75.3	1.48	1.019	1.506	17
dsDNA	74.7	1.86	0.805	1.494	18
dsDNA	64	1.82	0.703	1.28	19
dsDNA	72.6	1.84	0.79	1.453	20
dsDNA	70.3	1.88	0.748	1.406	21
dsDNA	123	1.85	1.33	2.461	22
dsDNA	146.4	1.8	1.629	2.928	23
dsDNA	174.5	1.83	1.907	3.489	24
dsDNA	38.7	1.83	0.422	0.774	25
dsDNA	134.2	1.77	1.519	2.684	26
dsDNA	38.2	1.42	0.538	0.765	27
dsDNA	90.5	1.81	0.998	1.809	28
dsDNA	139	1.93	1.438	2.78	29
dsDNA	123.9	1.23	2.011	2.478	30
dsDNA	46	1.96	0.47	0.919	31
dsDNA	75.8	1.83	0.83	1.517	32
dsDNA	105.6	1.83	1.153	2.112	33
dsDNA	109.7	1.87	1.176	2.194	34
dsDNA	420.9	1.67	5.036	8.418	35
dsDNA	174.5	1.83	1.907	3.489	36
dsDNA	90	1.94	0.927	1.799	37
dsDNA	116.1	1.23	1.886	2.322	38
dsDNA	66	1.82	0.725	1.319	39
dsDNA	31.3	1.49	0.422	0.627	40
dsDNA	117.8	1.46	1.608	2.355	41
dsDNA	71.2	1.94	0.735	1.425	42
dsDNA	134.7	1.54	1.748	2.695	43
dsDNA	80.4	1.48	1.085	1.608	44

dsDNA	165.2	1.74	1.896	3.304	45
dsDNA	90	1.94	0.927	1.799	46
dsDNA	84.1	1.56	1.079	1.683	47
dsDNA	316.1	1.81	3.485	6.322	48
dsDNA	209.8	1.8	2.337	4.196	49
dsDNA	209.2	1.85	2.261	4.184	50
dsDNA	7.2	1.26	0.115	0.145	51
dsDNA	109.4	1.51	1.448	2.188	52
dsDNA	74.3	1.45	1.025	1.485	53
dsDNA	123	1.85	1.33	2.461	54
dsDNA	146.4	1.8	1.629	2.928	55
dsDNA	76.5	1.94	0.787	1.529	56
dsDNA	161	1.96	1.64	3.221	57
dsDNA	77.7	1.47	1.06	1.555	58
dsDNA	123.9	1.23	2.011	2.478	59
dsDNA	76.5	1.94	0.787	1.529	60
dsDNA	71.2	1.94	0.735	1.425	61
dsDNA	31.3	1.49	0.422	0.627	62
dsDNA	117.8	1.46	1.608	2.355	63
dsDNA	88.2	1.86	0.949	1.764	64
dsDNA	139	1.93	1.438	2.78	65
dsDNA	123.9	1.23	2.011	2.478	66
dsDNA	165.2	1.74	1.896	3.304	67
dsDNA	174.5	1.83	1.907	3.489	68
dsDNA	80.4	1.48	1.085	1.608	69
dsDNA	64	1.82	0.703	1.28	70
dsDNA	73.5	1.87	0.784	1.47	71
dsDNA	76.5	1.94	0.787	1.529	72
dsDNA	94.6	2	0.944	1.891	73
dsDNA	95	2	0.949	1.899	74
dsDNA	165.2	1.74	1.896	3.304	75

ملحق (6) : بيانات مخطط التحليل التجميعي Dendogram لبكتيريا *P. aeruginosa*

1700	1200	1000	760	650	600	500	450	400	350	300	250	200	160	100	رقم العزلة
0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1
0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	2
0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	3
0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	4
0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	5
0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	6
1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	7
0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	8
0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	9
0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	10
0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	11
0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	12
0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	13
0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	14
0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	15
0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	16
0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	17
0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	18
1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	19
0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	20
0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	21
0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	22
0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	23
0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	24
0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	25
0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	26
0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	27
0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	28
0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	29
0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	30
0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	31
0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	32
0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	33
0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	34
0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	35
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	36
0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	37
0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	38
0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	39
0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	40
0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	41

0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	42
0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	43
0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	44
0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	45
0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	46
0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	47
0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	48
1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	49
0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	50
1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	51
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52
1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	53
0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	54
0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	55
0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	56
0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	57
0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	58
0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	59
0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	60
0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	61
1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	62
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	63
0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	64
0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	65
0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	66
0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	67
0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	68
0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	69
0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	70
0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	71
0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	72
0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	73
0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	74
0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	75

* 1 : يوضع عند وجود حزمة .

2 : يوضع عند غياب الحزمة .

Summary

One hundred isolates of *Pseudomonas aeruginosa* has been collection from different sources included : 33 isolates from otitis media , 27 isolates from burn infections , 14 isolates from wound infections , 15 isolates from urinary tract infections and 11 isolates from blood during the period between 1/9/2014 to 1/11/2014 and after identification we obtained 75 isolate confirmed to be *P. aeruginosa* included : 28 isolates from otitis media , 23 isolates from burn infections , 10 isolates from wound infections , 8 isolates from urinary tract infections and 6 isolates from blood .

The isolates were identified by culturing on MacConkey agar , Cetrimide agar , Pseudomonas agar and CHROMagar Orientation then identified by performing biochemical tests including oxidase test and catalase test and further identification by using a API20E system . Genotypic identification has been done by 16S rDNA gene using PCR .

The antibiotic susceptibility test to 18 antibiotics by using disc diffusion method , the results showed that all isolates were resistant 100% to Amoxicillin\Clavulanic acid , Ampicillin , Carbencillin , Cefotaxime , Ceftriaxone , Cephalexin and Kanamycin , while these isolates showed resistance to Ceftazidime (80%) , Cefepime (72%) , Gentamicin (46.6%) , Tobramycin (38.6%) , Ofloxacin and Piperacillin (37.3%) each of them , Norfloxacin and Ciprofloxacin (34.6%) each of them , Meropenem (33.3%) , Aztreonam (22.6%) , Imipenem (17.3%) .

The results of β-lactamase test showed that 56 isolates (74.6%) was productive for these enzymes , while 60 isolates (80%) was productive for extended spectrum β-lactamase (ESBLs) .

The results of the phenotypic detection of some virulence factors showed that all isolated was productive for hemolysin (β-hemolysis) , while 61 isolates (81.3%) was productive for protease and 54 isolates (72%) productive for biofilm .

Genotypic detection for some virulence genes of *P. aeruginosa* which included *las B , alg D , pvd A and tox A* showed the presence of these genes in 80% , 73.3% , 69.3% and 68% respectively .

To determine genetic relatedness has been done typing *P. aeruginosa* isolates by using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (ERIC-PCR) and dendogram analysis of the results showed that there is a genetic relatedness between *P. aeruginosa* isolates in 19 clone , while 8 isolates contain different genotyping , ERIC-PCR method is partical , useful and easy for typing *P. aeruginosa* isolates .

Baghdad University

College of Education

for Pure Sciences -Ibn Al-Haitham

Department of Biology

Study of Genotyping and Some Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa*

A Thesis

Submitted to the council of College of Education for Pure Sciences (Ibn-Al-Haitham), University of Baghdad

A partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Education in Biology / Microbiology

By

Abbas Falih Mehdi Alornaaouti

B.Sc. Biology / Baghdad University – 2013

Supervised By

Asst. Pro. Dr. Rana Mujahid Abdullah Al-Shwaikh

2015 A.D **1436 H.J**