



جامعة بغداد

كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم

قسم علوم الحياة

دراسة التتميط 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 الأرنؤوطي

بكالوريوس علوم الحياة / جامعه بغداد - 2013

باشراف

أ.م. د. رنا مجاهد عبدالله الشويخ

2015 م

١٤٣٦ هـ



((هَذَا خَلَقُ اللَّهِ فَأَمْرُونِي مَاذَا خَلَقَ الَّذِينَ مِنْهُ))

دُونَهُ بَلِ الظَّالِمُونَ فِي ضَلَالٍ مُّبِينٍ))

صدق الله العلي
العظيم

سورة لقمان

الآية ١١

" اقرار المشرف على الرسالة "

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 له علاقة بها ونجد انها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الاحياء المجهرية وبتقدير (أمتياز) .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : د . شروق ريس كاظم

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ :

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. اسماء عزت سليم فرج

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ :

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. لمى عبدالهادي زوين

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ :

عضو اللجنة والمشرف

التوقيع :

الاسم : د. رنا مجاهد عبدالله

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ :

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم

التوقيع :

الاسم : د. خالد فهد علي

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ :

(الأهداء)

الى اهل 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 جمدي

عباس
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 الدكتور 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 فوقها الله لما يحبه ويرضاه ، كما اتقدم بالشكر الجزيل الى الانسة عاصفة علي في م. الطفل المركزي ، استاذ حيدر سادة 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
خيار

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 السترامايد Cetrinide 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 .

اُختبرت حساسية العزلات البكتيرية قيد الدراسة اتجاه 18 مضاداً حيويًا وباستعمال طريقة انتشار الاقراص Disc diffusion method و حددت مقاومة Resistance هذه العزلات للمضادات الحيوية وبينت النتائج ان جميع العزلات البكتيرية كانت مقاومة بنسبة 100% لكل من المضادات Amoxicillin\Clavulanic acid ، Ampicillin ، Kanamycin ، Cephalexin ، Ceftriaxone ، Cefotaxime ، Carbencillin ، 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 البيتا لكتاميز β -lactamase بأن 56 عزلة كانت منتجة لهذه الانزيمات وبنسبة 74.6% في حين اظهرت النتائج بأن 60 عزلة كانت منتجة لأنزيمات البيتا لكتاميز واسعة الطيف ESBLs وبنسبة 80% .

بينت نتائج التحري عن بعض عوامل الضراوة مظهرها 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 *tox A* و *pvd A* ، *alg D* ، *las B* و اظهرت 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) و اظهر 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 Genotyping لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* .

قائمة المحتويات

الصفحة	العنوان	ت
1	المقدمة	1
	الفصل الأول / استعراض المراجع	2
4	1.1 تسمية و تصنيف بكتيريا <i>P. Aeruginosa</i>	3
5	2.1 الصفات العامة لبكتيريا <i>P. Aeruginosa</i>	4
6	3.1 تشخيص بكتيريا <i>P. Aeruginosa</i>	5
6	1.3.1 التشخيص التقليدي Conventional Identification	6
6	2.3.1 التشخيص الجزيئي Molecular Identification	7
7	4.1 الوبائية Epidemiology	8
8	5.1 الامراضية Pathogenesis	9
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
13	4.6.1 الالجنيت Alginate	14
14	5.6.1 الهيمولايسين Hemolysin	15
14	6.6.1 الغشاء الحيوي Biofilm	16
15	7.1 مقاومة بكتيريا <i>P.aeruginosa</i> للمضادات الحيوية	17
19	8.1 انزيمات البيتا لاكتاميز واسعة الطيف ESBLs	18
20	9.1 التتميط الجيني لبكتيريا <i>P. Aeruginosa</i>	19
	الفصل الثاني / المواد وطرائق العمل	20
26	1.2 المواد Materials	21
26	1.1.2 الاجهزة المختبرية المستعملة Equipments and Apparatus	22
27	2.1.2 المواد الكيميائية Chemicals	23
27	3.1.2 المضادات الحيوية Antibiotic	24
27	1.3.1.2 اقراص المضادات الحيوية Antibiotic Disc	25
28	2.3.1.2 مساحيق المضادات الحيوية Antibiotic Powders	26
28	4.1.2 الاوساط الزرعوية Culture media	27
29	5.1.2 العدة المختبرية Kits	28
29	6.1.2 مواد اخرى	29
30	2.2 طرائق العمل Methods	30
30	1.2.2 التعقيم Sterilization	31
30	2.2.2 تحضير الكواشف والمحاليل	32
30	1.2.2.2 تحضير الكواشف	33
30	1.1.2.2 كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent	34
30	2.1.2.2.2 كاشف الكاتليز Catalase reagent	35
30	2.2.2.2 تحضير المحاليل	36
30	1.2.2.2.2 المحلول الملحي الفسلجي Normal saline solution	37
31	2.2.2.2.2 محلول ES372 ESBL supplement	38
31	3.2.2.2.2 محلول Supplement CN	39
31	4.2.2.2.2 محلول صبغة Crystal violet	40
31	5.2.2.2.2 تحضير محاليل الكشف عن انزيمات البيتا لاكتاميز B-lactamase	41
32	6.2.2.2.2 محلول دارئ TBE (1X) Tris borate EDTA buffer	42
32	7.2.2.2.2 صبغة كرام Gram Stain	43
33	8.2.2.2.2 محاليل البودائ Primers Solutions	44
34	9.2.2.2.2 الدليل الحجمي DNA Ladder لتحديد الوزن الجزيئي	45

34	Preparation of cultural media	3.2.2	تحضير الأوساط الزرعية	46
34	Ready made media	1.3.2.2	الأوساط 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 آكار الدم	49
35	Pseudomonas agar	2.2.3.2.2	وسط آكار السيدوموناس	50
35	Cetrimide agar	3.2.3.2.2	وسط آكار السترامايد	51
35	CHROM agar Orientation	4.2.3.2.2	وسط آكار الكروماجين أورنتشن	52
35	CHROMagar ESB	5.2.3.2.2	وسط آكار الكروماجين الخاص للكشف عن أنزيمات البييتالاكتاميز الواسعة الطيف	53
35	Skimmed Milk agar	6.2.3.2.2	وسط آكار الحليب الفرز	54
36	Luria broth	7.2.3.2.2	وسط لورا	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 المجهرى	60
37	Biochemical tests	3.2.5.2.2	الاختبارات الكيموحيوية	61
37	Oxidase test	1.3.2.5.2.2	فحص الأوكسيديز	62
37	Catalase test	2.3.2.5.2.2	فحص الكاتليز	63
37	API20E identification system	4.5.2.2	التشخيص بنظام API20E	64
38	Genomic DNA Extraction	5.5.2.2	استخلاص DNA الجينومي	65
39	<i>P. aeruginosa</i> genomic DNA	6.5.2.2	التشخيص الجيني لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> 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	إنتاج الهيموليسين	70
41	Protease production	8.2.2	إنتاج الأنزيم الحال للبروتين	71
41	Biofilm formation	9.2.2	تكوين الغشاء الحيوي	72
42	B-lactamase production	10.2.2	إنتاج أنزيمات البييتالاكتاميز	73
42	ESBLs	11.2.2	التحري عن إنتاج أنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف	74
43	<i>P. aeruginosa</i> sensitivity	12.2.2	اختبار حساسية بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> للمضادات الحيوية	75
43	<i>P. aeruginosa</i> virulence factors	13.2.2	الكشف الجيني عن عوامل الضراوة (Virulence Factors) باستعمال جهاز تضاعف البلمرة المتسلسل (PCR)	76
46	ERIC	14.2.2	التنميط الجيني لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> وباستعمال طريقة ERIC	77
46	Agarose gel electrophoresis	15.2.2	الترجيل الكهربائي في هلام الأكاروز	78
47	Statistical Analysis	16.2.2	التحليل الأحصائي	79
	الفصل الثالث / النتائج والمناقشة			80
48	<i>P. Aeruginosa</i>	1.3	جمع وتشخيص بكتيريا	81
52	<i>P. aeruginosa</i>	2.3	مقاومة عزلات بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> للمضادات الحيوية	82
58	Multi-drug resistance	3-3	المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية	83
60	<i>P. aeruginosa</i>	4.3	التحري عن قابلية بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> لإنتاج أنزيمات البييتالاكتاميز	84
61	ESBLs	5.3	التحري عن إنتاج أنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف	85
64	<i>P. aeruginosa</i>	6.3	الكشف المظهري عن عوامل الضراوة لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i>	86
65	Hemolysin production	1.6.3	إنتاج الهيموليسين	87
65	Protease production	2.6.3	إنتاج الأنزيم الحال للبروتين	88
66	Biofilm formation	3.6.3	تكوين الغشاء الحيوي	89
68	<i>P. aeruginosa</i>	7.3	الكشف الجيني عن جينات الضراوة لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> باستعمال جهاز PCR	90

73	8.3 التتميط الجيني لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> باستعمال طريقة ERIC	91
81	الاستنتاجات	92
82	التوصيات	93
83	المصادر	94
113	الملاحق	95

قائمة الجداول

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

قائمة الاشكال

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

قائمة المختصرات

Abbreviation	Key
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ADP-ribosyl	Adenosine Di Phosphate
<i>alg D</i>	Alginate D
AMEs	Aminoglycoside modifying enzymes
β -Lactamase	Beta-lactamase
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoxyribose Nucleic Acid
<i>las B</i>	Elastase B
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
EDTA	Ethyl-Diamine-Tetra-Acetic acid
<i>tox A</i>	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
<i>pvd A</i>	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 البولية Urinary tract infections ، التهاب شغاف القلب Endocarditis ، التهاب الأذن الوسطى Otitis media وكذلك اصابات الجروح والحروق Wound and Burn Infection (Bhasin *et al.*,2015) فهي من الممرضات الانتهازية Opportunistic pathogens 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 بالايذز 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 *et al.*,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 *et al.*,2013) ، وايضاً فإن انتاج هذه البكتيريا لانزيمات البييتالاكتاميز β -lactamase و انزيمات البييتالاكتاميز 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 أدى إلى استعمال العديد من التقنيات الحديثة والمتطورة والسريعة في مجال إيجاد العلاقات الوراثية بين العزلات البكتيرية وتحديد مصدر وطرائق العدوى في داخل المستشفيات لمنع حدوث ما يسمى بالإصابات 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 أهمية كبيرة في هذا المجال وأحدى 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 أنواعها طريقة التعداد التكراري للجراثيم المعوية Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) (Mohapatra and Mazumder,2008) ، وتعد من الطرائق المهمة ، البسيطة والسهلة من ناحية إجرائها وأقل تعقيدا في تحليل النتائج من الطرائق الأخرى 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* بواسطة استعمال طريقة ERIC-PCR وتم ذلك من خلال اتباع ما يأتي :

1. جمع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* من مصادر سريرية مختلفة وإجراء 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 البيتاكتام و β -lactama ، الامينوكلايكوسايد Aminoglycoside و الكينولونات Quinolones .

3. الكشف المظهري عن انزيمات البيتاكتاميز β -lactamase و انزيمات البيتاكتاميز واسعة الطيف β -lactamase Extended-Spectrum .

4. الكشف المظهري عن بعض عوامل الضراوة مثل الهيموليسين 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* لأول 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) كماياتي :

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 ما بين 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 الزراعي للبكتيريا لون صبغة البايوسيانين pyocyanin مثل الوسط Muller Hinton agar و وسط الاكار المغذي Nutrient agar ويصطبغ القيق 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 دائبة 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 الكربوهيدرات 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 (Ramos et al.,2013) Nosocomial Infections .

3.1 تشخيص بكتيريا *P. aeruginosa*

Identification of *P. aeruginosa*

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

غالباً 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 بدأ يواجه صعوبات في التشخيص الدقيق للعزلات البكتيرية لاسيما مع التغيرات في النمط المظهري Phenotype في الاجناس البكتيرية المعزولة التي تحتوي على العديد من الأنواع المتقاربة جداً 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 حضانة طويلة لكي تنمو في الوسط الزراعي (Yamamoto,2002) وهناك العديد من الجينات التي يمكن ان تستعمل لتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* بواسطة 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 يهيبى 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 تشخيصاً على مستوى النوع و له تسلسل ثابت لكل نوع من الأنواع البكتيرية لذلك له دور مهم جداً في التشخيص الجزيئي Molecular Identification (Hussien *et al.*,2012) وعلية فإن الفائدة المهمة عند استعمال هذه الطريقة هي التشخيص السريع عند الإصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* ويؤدي الى الاستعمال المبكر للمضادات الحيوية المناسبة للقضاء على الإصابة 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 وايضاً 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 الكربوهيدرات والمركبات النتروجينية وفضلا عن ذلك انها لاتحتاج الى عوامل نمو معقدة (Blanc,2007).

ان بكتيريا *P.aeruginosa* لاتزال في تطور مستمر في احداث الالصابات لاسيما في المرضى الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي لديهم اذ يكونون اكثر الاشخاص عرضة للإصابة (Hassan *et al.*,2009) وكذلك فإن العدوى عن طريق الالصابات 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 باللامسة 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 الإصابة 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 الرئيسية لتجرثم الدم Bacteremia ، ذات الرئة Pneumonia و السحايا Meningitis في وحدات العناية المركزة للاطفال حديثي الولادة (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 البولية Urinary tract infections واصابات المعدة والامعاء 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 نادراً 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 تبدأ مرحلة الالتصاق Attachment في الخلايا بواسطة 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* هي تجرثم الدم Bacteremia وفي اغلب الاحيان يحدث هذا المرض في مرضى العوز المناعي لاسيما عند المصابين بالايديز AIDS وعند حدوث نقص في خلايا العدلة Neutrophil و حالات الجروح والحروق الشديدة Wound and Burn Infection إذ تعد 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 بالمرضات 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

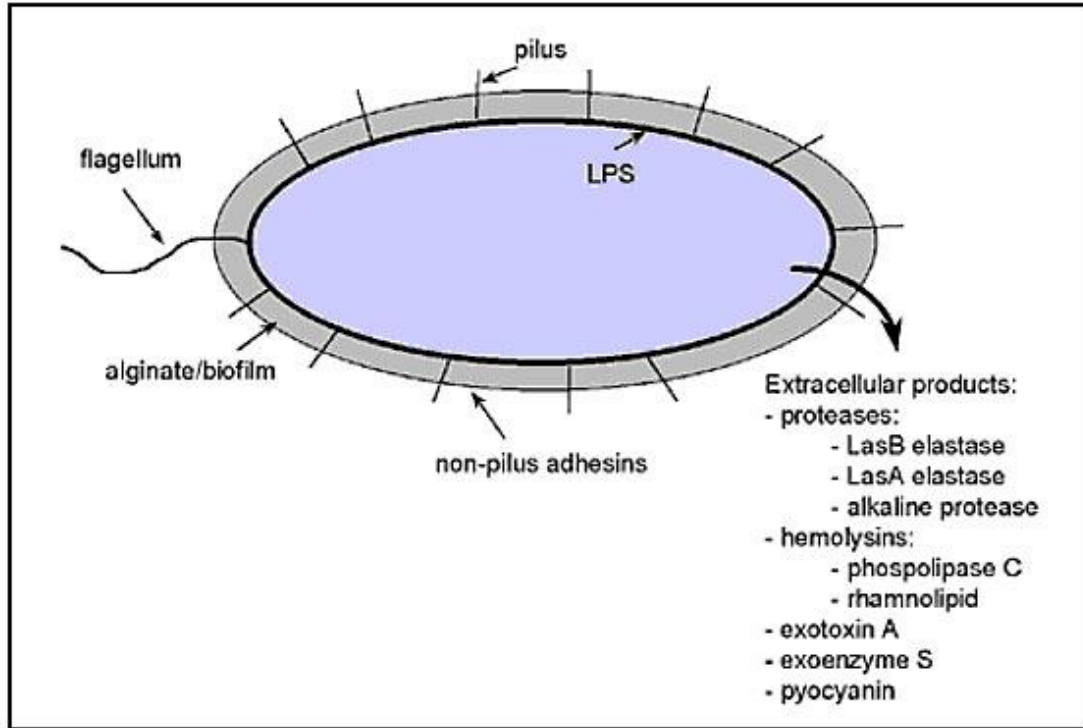
والجروح (Alwan *et al.*,2011) ، كما يمكن ان تحدث الاصابة في القناة البولية Urinary Tract Infection وهناك الملايين من المرضى مصابين بالتهاب المجاري البولية في كل سنة وغالباً ما تحدث هذه الاصابات في المستشفيات لاسيما في الدول النامية (Mittal *et al.*,2009) وتعد عمليات القثطرة Catheterization احدى العوامل 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 لتتحقق ذلك (Nikbin *et al.*,2012) ، وان القابلية الكبيرة لبكتيريا *P.aeruginosa* على غزو النسيج Invasive و انتاج السموم Toxinogenic يعود لكونها متعددة عوامل الضراوة Virulence Multifactorial (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 ايضا الذيفان الداخلي Endotoxin والألجنيت Alginate ، وهناك عوامل تفرز خارج الخلية Secreted Extracellular Factor ومنها الانزيم الحال للدم Hemolysin ، البروتينز القاعدي 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 و Elastin (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 هو احد 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 الرئيسية للرئة والمسؤول عن عملية تمدد وتقلص الرئة 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 المفترزة خارج الخلية (Parson et al.,2007) التي تكون ذات تأثير مثبط لنمو مجموعة البكتيريا الموجبة لصبغة كرام Gram-Positive عند نموها في الوسط الزراعي 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 متألفة 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 (Creanga et al.,2011 ; Voulhoux et al.,2006) وتمتلك بكتيريا *P. aeruginosa* 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 التخر 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 الألجنيث Alginate

ان طبقة الألجنيث Alginate عبارة عن متعدد السكريات الخارجي Exopolysaccharide 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 الألجنيث 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 الألجنيث (Jain and Ohman,2005) .

تعد طبقة الألجنيث المخاطية عنصرا اساسيا لتكوين الغشاء الحيوي Biofilm وهناك العديد من العوامل التي تحفز لانتاج الألجنيث 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 والحمض النووي DNA وتتميز بوجود قنوات ينقل من خلالها الافرارات 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 الإصابة (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 الإصابة (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 ونتاج الـ Toxin (Lanter *et al.*,2014) وان عملية تكوينه تتم من خلال حدوث انجذاب للخلايا وبناء المستعمرات ونتاج عديد السكريد الخارجي (Wei and (Alginate) Exopolysaccharide (Ma,2013) ويتم تنظيم عملية تكوين الغشاء الحيوي من خلال جينات Qorum-Sensing الذي يتيح من خلاله للخلايا البكتيرية التواصل مع بعضها البعض في داخل الغشاء الحيوي وبذلك تتفاعل فيما بينها وكأنها كائن متعدد الخلايا (Li and) Multi-Cellular Organism (Tian,2012) .

7.1 مقاومة بكتيريا *P.aeruginosa* للمضادات الحيوية

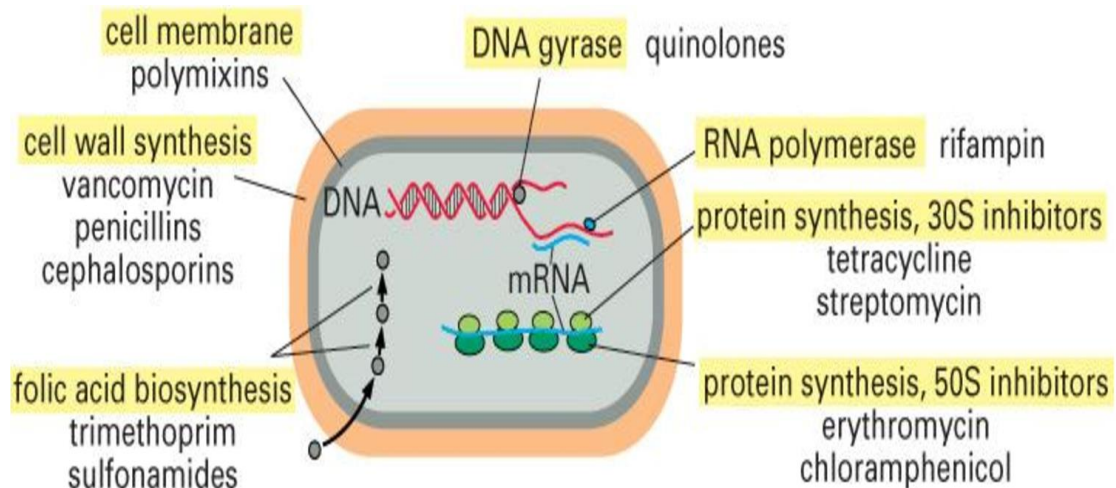
P.aeruginosa resistance to antibiotics

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 البيبتالاكتام β -Lactam مثل البنسيلينات (Ampicillin) Penicillinis ، السيفالوسبورينات

Monobactam ، السمونوبكتام (Cefotaxime و Ceftazidime) Cephalosporins ، الكاربينيم (Aztreonam) ، (Imipenem) Carbapenems ومجموعة مضادات الامينوكلايكوسايد (Amikacin ،Gentamicin ، Tobramycin) Aminoglycoside ومضادات الكينولونات (Ciprofloxacin ، Norfloxacin ، Ofloxacin) Quinolones (Black,2012) .

تعمل مجموعة مضادات البيتا لاكتام 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 الأهمية 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 تأثير قاتل للخلية البكتيرية التي لها طيف واسع ضد مجموعة البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (Hermann,2007) اما مجموعة مضادات الكينولونات فإن عملها يتمثل في تثبيط تصنيع الحامض النووي DNA من خلال إيقاف 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 الإصابة ببكتيريا *P.aeruginosa* صعبة العلاج نظرا لقدرتها على المقاومة الذاتية Intrinsic Resistance لمجاميع كثيرة من المضادات الحيوية من خلال الخصائص الوراثية المسؤولة عن منع تأثير الكثير من المضادات الحيوية والمقاومة الذاتية مرتبطة بالكرموسوم (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 قافز Transposone 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 الاليات هو انتاجها انزيمات البيتاكتاميز - β lactamase وبمستوى عال وان افرازها يكون في المنطقة Periplasmic في البكتيريا السالبة لصبغة كرام وتعمل على تحطيم حلقة البيتاكتام وبمجرد توقف فعالية المضاد فإنه يتوقف انتاجها وان الجينات المشفرة لانتاج انزيمات البيتاكتاميز تكون محمولة اما كروموسومياً او بلازميدياً او على الجينات القافزة (Boussoualim et al.,2014).

تنتج انزيمات البيتاكتاميز 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 البيتاكتام وتقسم انزيمات البيتاكتاميز الكروموسومية على نوعين انزيمات منتظمة التكوين Constitutive enzyme التي تنتج بشكل طبيعي من دون الحاجة لوجود عامل محفز لانتاجها التي تكون بمستويات واطنة والنوع الاخر هو الأنزيمات المحفزة Inducible enzyme التي تحتاج الى وجود محفز Inducer و تنتج بمستويات عالية (Cavaliere et al.,2005) اما انزيمات البيتاكتاميز التي تكون محمولة على البلازميد الاكثر شيوعاً 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 Impermeability 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 الدفع Efflux Systems ايضاً احدى آليات المقاومة في بكتيريا *P.aeruginosa* التي تعمل على ضخ المضاد الحيوي خارج الخلية البكتيرية مما يزيد من مقاومتها عند التعرض للمضادات الحيوية وان لمضخات الدفع وظائف أخرى ومنها ازالة النواتج الأيضية والسامة الموجودة في داخل الخلية البكتيرية (Jacoby,2009) .

اللية 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 البيتا لكتام 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 Modifying 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 Modifying enzyme لمجموعة مضادات الأمينوكلايكوسايد التي تعمل على التحوير الكيميائي لمجموعة الأمين والهيدروكسيل لهذه المجموعة من المضادات لتصبح ضعيفة قدره على الارتباط بالهدف وهو الرايبوسوم (Cox et al.,2015) .

هناك العديد من الأنواع البكتيرية المسببة للأمراض لها مرونة عالية في حدوث التغييرات 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 المتاحة (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 الكاربانيم (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 البييتالاكتاميز 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 التتميط الجيني لبكتيريا *P. aeruginosa*

Genotyping of *P. aeruginosa*

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

هناك نوعان من انظمة التتميط وهما التتميط المظهري Phenotyping والتتميط الجيني Genotyping (Jamasi and Proudfoot,2008) ، ان التتميط المظهري Phenotyping هو انعكاس لنتائج 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 للتمييز بين العزلات البكتيرية لاسيما القريبة من بعضها البعض وكذلك فإنها تحتاج الى جهد ووقت لانجازها (Sabat *et al.*,2013) و عليه فإن التطورات في التقنيات الجزيئية لها تأثيرات هامة في دراسة الاحياء المجهرية (Wolk and Dunne,2011) .

اما التتميط الجيني Genotyping يعمل على التمييز بين العزلات البكتيرية على اساس محتواها الجيني (Yildirim *et al.*,2011) وان طرائق التتميط 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 لسلسلة DNA Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) التي تعد من الطرائق السريعة والبسيطة ولا تحتاج 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

من الطرائق التي تتطلب جهداً كبيراً لانجازها مقارنة بطرائق التنميط الجيني الأخرى (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 اكبر من 50 كيلو زوج قاعدة لا يتم ترحيلها بكفاءة خلال جهاز الترحيل الكهربائي التقليدي وايضاً 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 PCR - Sequence 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: (REP) Repetitive Extragenic Palindromic

2: (ERIC) Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

3: (BOX) BOX elements

تعد هذه الطريقة من الطرائق السهلة والسريعة التي لا تحتاج الى وقت طويل لانجازها مقارنة بالطرائق الأخرى (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 بواسطة 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 الآن 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 (REP) Repetitive Extragenic Palindromic توجد بوفرة عالية في جينوم الاحياء المجهرية إذ تكون باكثر من 100 نسخة في الجينوم الواحد (Nunvar et al.,2010) وطول هذه التسلسلات هو 35 زوج قاعدة ويمكن ان تتواجد بشكل نسخ مفردة او بهيأة ازواج ويمكن ان تتواجد بشكل نسخ متعددة متجاورة في الجينوم (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*.

طريقة التعداد التكراري للجراثيم المعوية Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) التي وجدت تسلسلاتها بالاصل في بكتيريا *E. Coli* و *K. pneumonia* والانواع الاخرى من البكتيريا المعوية 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 و PFGE 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 تعقيداً 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 وايضاً دراسة اخرى قام بها Mansour et al. (2013) باستعمال طريقة ERIC لتحديد مدى وبائية بكتيريا *P.aeruginosa* المعزولة من عينات سريرية واطهرت 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 واطهرت 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 واطهرت 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 عملية السيطرة على التعبير الجيني Gene Expression ولكن هذا بقي مجرد اقتراح لدور هذه التسلسلات (Belkum and Hermans,2001) وهناك العديد من الدراسات السابقة التي وجدت ان تسلسلات BOX

تعد طريقة مفيدة لدراسة 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 واطهرت النتائج التي حصلت عليها وجود تباين وراثي بين كل من العزلات المرضية والبيئية عند استعمال طريقة BOX ولهذه التسلسلات قوة تمييزية 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 Apparatus

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

2.1.2 المواد الكيميائية Chemicals

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

4.1.2 الاوساط الزرعية Culture media

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

5.1.2 العدة المختبرية Kits

الشركة المصنعة (المنشأ)	العدة	ت
BioMerieux (France)	API20E System الذي يضم أشرطة الفحص فضلا عن : API Suspension Medium, Mineral Oil, Incubation Boxes وكذلك يضم الكواشف الأتية : James, VP1, VP2, TDA	1
Geneaid (Thailand)	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	2
Bioneer(Korea)	Go Taq Green Master Mix PCR	3

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 الأيوني 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 عقت جميع الادوات الزجاجية التي تحتاج الى التعقيم الجاف بالفرن الكهربائي Electrical oven في درجة حرارة 180 م° ولمدة ساعتين وعقت 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

حضر كاشف الأوكسيديز بتركيز 1% بإذابة 0.1 غم من NNNN-tetramethyl para phenylene diamine dihydrochloride في 10 مللتر من الماء المقطر وتمت عملية التعقيم بواسطة وحدات الترشيح Millipore filters وحفظ في قنينة معتمة لحين الاستعمال ويستعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتيريا لانتاج أنزيم الأوكسيديز . (Tadesse and Alem,2006)

2.1.2.2.2 كاشف الكاتليز Catalase reagent

حضر محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3% من المحلول الاصيلي 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 بواسطة 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 ES372 ESBL supplement

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

3.2.2.2.2 Supplement CN محلول

لقد حضر محلول Supplement CN من خلال مزج 0.2 غم من مادة الستريمايد Cetrimide و 0.15 غم من مادة Sodium nalidixate و تذويبهما في 5 مللتر من الماء المقطر وتمت عملية التعقيم بوساطة وحدات الترشيح Millipore filters وحفظ المحلول بدرجة الحرارة 4 م° لحين الاستعمال (Ramalho,2002).

4.2.2.2.2 Crystal violet صبغة محلول

حضر هذا المحلول باذابة 0.1 غم من Crystal violet في 10 مل من الماء المقطر وتمت عملية 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 البييتالاكتاميز B-lactamase

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

1. محلول دارى 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 مل 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 بنسلين ج Penicillin G solution

اذيب 0.569 غم من Penicillin G في محلول دارى الفوسفات Phosphate Buffer المحضر في الفقرة السابقة وعقم بوساطة وحدات الترشيح Millipore filters ذات القطر 0.22 مايكروميتر وحفظ بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال .

3. محلول النشا Starch solution

حضر هذا المحلول من اذابة 1 غم من النشا 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 المقطر المعقم وأكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر المعقم وحفظ بدرجة الحرارة 4 م° لحين الاستعمال .

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

خفف دارى TBE من 10X الى 1X وذلك من خلال أخذ 100 مل من دارى TBE (10X) Tris Borate EDTA Buffer 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 و Safranin المجهزة من قبل شركة Institute of Sera and Vaccines(Iraq) .

8.2.2.2.2 محاليل البودى Primers Solutions

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

جدول (2 - 1) : البودائ المستعملة في هذه الدراسة

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

ولقد حضر محلول كل بادئ بشكل منفصل بتركيز 10 بيكومول / مايكروليتر وذلك بأخذ 10 مايكروليتر من محلول كل بادئ خزين Stock واطافة له 90 مايكروليتر من الماء المقطر الأيوني ومزج بوساطة المازج Vortex جيداً وحفظ مع المحاليل الخزينة Stock للبودائ 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) المجهد 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 وفقاً 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 والدماع السائل Brain-Heart infusion broth ، نقيع القلب والدماع الصلب Brain-Heart infusion agar ، الاكار المغذي Nutrient agar ، المرق المغذي Nutrient broth ووسط تربتون الصويا السائل Tryptone soy broth، إذ عقت جميع هذه الأوساط الزرعية بالمؤسدة Autoclave بدرجة الحرارة 121 م° وضغط 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 بالمؤسدة 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 باذابة 48.4 غم من وسط اكار السيدوموناس Pseudomonas agar في 1000 مللتر من الماء المقطر ثم عقم بالمؤسدة 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 Cetrimide agar وسط اكار الستر امايد

حضر هذا الوسط باذابة 45.3 غم من وسط اكار الستر امايد Cetrimide agar في 1000 ملتر من الماء المقطر واضيف اليه 10 ملتر من الكلبيسيروول 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 CHROM agar Orientation وسط اكار الكرومايجين اورنتشن

حضر هذا الوسط باذابة 33 غم من وسط اكار الكرومايجين اورنتشن Orientation CHROM agar في 1000 ملتر 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 وسط CHROMagar ESBL حسب تعليمات شركة Pioneer (France) إذ تم مزج 1000 ملتر من وسط اكار الكرومايجين CHROM agar Orientation المحضر وفق الفقرة (1.3.2.2) مع 10 ملتر من محلول ES372 Supplement ESBL المحضر وفق الفقرة (2.2.2.2) وبعد ان برد الوسط الى درجة 45 م° بعدها صب في أطباق معقمة وحفظ في ظروف معقمة في الثلاجة واستعمل للكشف عن قابلية العزلات البكتيريا عن انتاج انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs.

6.2.3.2.2 Skimmed Milk agar وسط اكار الحليب الفرز

حضر هذا الوسط وذلك باذابة 10 غم من الحليب الفرز Skimmed Milk في 100 ملتر من الماء المقطر وعقم في المؤصدة Autoclave لمدة 5 دقائق بعد ذلك حضر وسط Nutrient agar إذ تم وزن 25.2 غم واذابته في 900 ملتر من ماء المقطر وعقم 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 جيداً وصب في أطباق معقمة وترك

ليتصلب واستعمل للتحري عن قابلية العزلات البكتيرية 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 المقطر وعقم بالمؤسدة Autoclave بدرجة الحرارة 121 م° وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة بعدها حفظ في الثلجة 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 الكروماجين 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 Microscopic examination الفحص المجهرى

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

3.2.5.2.2 Biochemical tests الاختبارات الكيموحيوية

1.3.2.5.2.2 Oxidase test فحص الأوكسيداز

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

2.3.2.5.2.2 Catalase test فحص الكاتليز

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

4.5.2.2 API20E identification system API20E التشخيص بنظام

بعد الحصول على نتائج الفحوصات التشخيصية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة ، اعتمدت عدة التشخيص API20E المجهزة من قبل شركة BioMerieux (France) لغرض اجراء التشخيص التأكدي 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 تقريبا للخلايا البكتيرية وهو ($10^8 \times 1.5$ خلية / مل) ، بعد ذلك اضيف جزء من العالق البكتيري بواسطة ماصة دقيقة Micropipette لكل حفرة من الحفر الأتية ONPG،ADG،LDC،ODC،HS،URE، اما الحفر ARA،AMY،MEI،SAC،RHA،SOR،INO،MAN،GIU،IND،TDA

GEL،VP،CIT فقد ملئت تماماً بالعالق البكتيري وكذلك أضيف الزيت الى الحفر ADG ، URE،ODC،LDC لغرض توفير الظروف اللاهوائية و تم حضنت الأشرطة في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة ، بعد الحضان اضيفت قطرة من كاشف VP1،VP2 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 بواسطة 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 الآتي :-

1. لقع 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 تقريبا للخلايا البكتيرية وهو $10^8 \times 1.5$ خلية / مل) وتم الحضان بدرجة الحرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة .

2. نقل 1.5 مل من المزروع البكتيري بواسطة ماصة دقيقة Micropipette الى انبوبة الابدروف جافة ومعقمة .

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

4. اضيف 180 مايكروليتر من دارى GT buffer وتم المزج بواسطة 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 الحضان تم رج الانابيب كل خمس دقائق وارجاعها الى الحمام المائي .

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

6. اضيف 200 مايكروليتر من الكحول المطلق (99% Absolute ethanol) 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 دارى 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 دارى 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) .

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 مايكروليتر من F-Primer ، 1.5 مايكروليتر من 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 الآتي :

الخطوة	البرنامج
1	دورة واحدة فقط لمدة دقيقتين عند درجة حرارة 95 م° للمسخ الأولي DNA القالب .
2	25 دورة تضمنت :
	A 20 ثانية عند درجة حرارة 94 م° لمسح DNA القالب template DNA .
	B 20 ثانية عند درجة حرارة 58 م° لكي يتم ارتباط البوادي مع DNA القالب .
C 40 ثانية عند درجة حرارة 72 م° ليتم استطالة البوادي المرتبطة .	
3	دورة واحدة فقط ولمدة 1 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% .

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 م° لمدة 24 ساعة وبعد الحضانة حفظت بدرجة 4 م° 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 و اضيف إليه الكليسيروول Glycerol بنسبة 15% وعقم بالمؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 م° وضغط 1.5 جو لمدة 15 دقيقة ثم لقت الانابيب الحاوية على 5 مل من الوسط بالمزروع البكتيري وحضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة وبعد الحضانة 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 ظهر 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 ولقت 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 بواسطة الثاقب الفليني بقطر 5 ملليمتر وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة وتم ملاحظة العزلات المنتجة لأنزيم 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 الاختبار الحاوية 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 (Collee,1996) Idometric method 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 الآتي :

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 تقريبا للخلايا ($10^8 \times 1.5$ 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 الطبقة ليتوزع العالق بشكل متساو في جميع اتجاهات الطبقة .

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 مايكروليتر من R-Primer المحضرين وفق الفقرة (8.2.2.2.2) و 12 مايكروليتر من الماء المقطر الأيوني 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 تحويل 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° لمسح DNA القالب template DNA .
	B 1 دقيقة عند درجة حرارة 55 م° لكي يتم ارتباط البودئ مع DNA القالب .
C 1 دقيقة عند درجة حرارة 72 م° ليتم استطالة البودئ 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 ما ذكر 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° لمسح DNA القالب template DNA .
	B 1 دقيقة عند درجة حرارة 55 م° لكي يتم ارتباط البودئ مع DNA القالب .
C 1 دقيقة عند درجة حرارة 72 م° ليتم استطالة البودئ 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° لمسح DNA القالب template DNA .
	B 45 ثانية عند درجة حرارة 60 م° لكي يتم ارتباط البودئ مع DNA القالب .
C 45 ثانية عند درجة حرارة 72 م° ليتم استطالة البودئ 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° لمسح DNA القالب template DNA .
	B 30 ثانية عند درجة حرارة 59 م° لكي يتم ارتباط البودئ مع DNA القالب .
C 30 ثانية عند درجة حرارة 72 م° ليتم استطالة البودئ 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 والمجهاز من قبل شركة Bioneer (Korea) ، 5 مايكروليتر من template DNA المستخلص وفق الفقرة (5.5.2.2) و 2 مايكروليتر من F-Primer ، 2 مايكروليتر من R-Primer المحضرين وفق الفقرة (8.2.2.2.2) و 11 مايكروليتر من الماء المقطر اللأيوني المعقم والمجهاز من قبل شركة Bioneer (Korea) ، بعد ذلك مزجت محتويات أنابيب PCR جيداً باستعمال المازج Vortex ثم وضعت في جهاز PCR وبرمج الجهاز حسب ما ذكر في (Mansour,2013) وتم تحويل البرنامج على النحو الآتي :

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° لمسح DNA القالب template DNA .
	B 45 ثانية عند درجة حرارة 48 م° لكي يتم ارتباط البودئ مع DNA القالب .
C دقيقتين عند درجة حرارة 72 م° ليتم استطالة البودئ 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 دارى (1X)TBE المحضر وفق الفقرة (6.2.2.2) وبعد ذلك سخن الاكاروز لدرجة الغليان بعدها ترك ليبرد لدرجة الحرارة 45 م° ثم اضيف له 5 مايكروليتر من صبغة الأثيديوم بروميد 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 المكوني 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 الستراميد Cetrimide agar ، وذلك لمقاومتها لمادة الستراميد إذ ظهرت المستعمرات البكتيرية باللون الاصفر المخضر واطهرت 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 باللون 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 عزلات *P. aeruginosa* لها القابلية على انتاج صبغة Pyocyanin وكذلك بينت 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 المفروزة خارج الخلية ولها تأثير مثبت للعديد من الأنواع البكتيرية إذ انها من مشتقات Phenozinium-5-methyl-

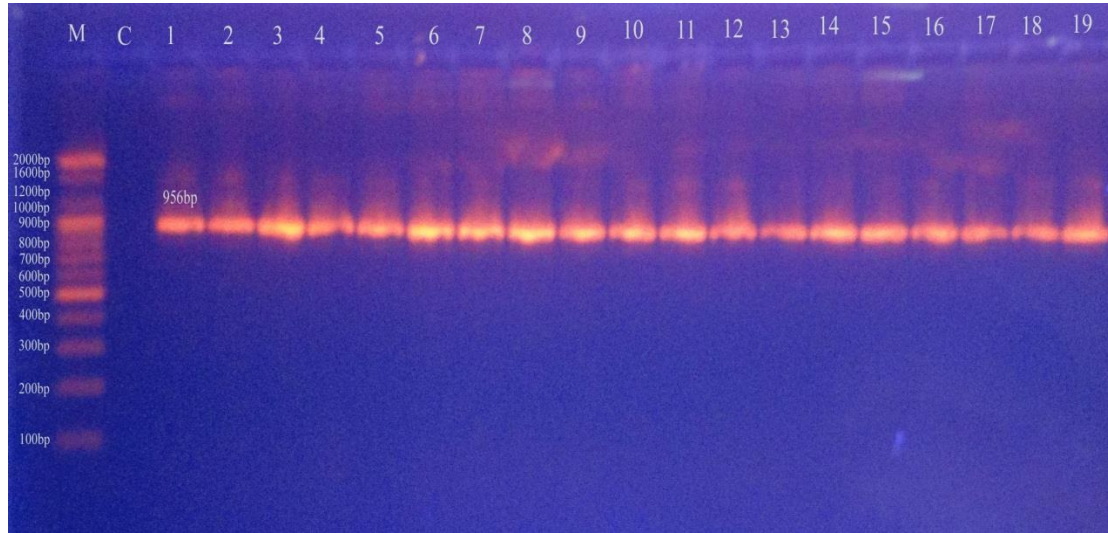
hydroxy ولهذه المركبات فعالية جيدة في عملية تثبيت الأنواع البكتيرية عند تواجدها في الموطن نفسه (Pierson and Pierson,2010).

عند التشخيص المجهرى Microscopical identification تم تصبغ الخلايا البكتيرية بصبغة كرام وقد اظهر الفحص المجهرى وجود عصيات Rods سالبة لصبغة كرام (Betsy and Keogh,2005) ، اما الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests المعتمدة لتمييز بكتيريا *P. aeruginosa* عن الأنواع البكتيرية الأخرى 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 بواسطة 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

ثابتاً 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 بواسطة الجين 16S rDNA إذ وجد ان هذه التقنية مناسبة لعملية تشخيص الأنواع البكتيرية وغالبا ما يستعمل تسلسلات منطقة الجين 16S rDNA في مجال دراسة العلاقات التطورية للسلاسل 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 التباين بين الانواع البكتيرية وبذلك يوفر تسلسلاً خاصاً بكل نوع من الانواع التي يستفاد منها في تشخيص الانواع البكتيرية (Brooks et al,2010).



الشكل (1-3) الترحيل الكهربائي لنتائج 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 (1-3).

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

ت	مصدر عزلات بكتيريا <i>P. aeruginosa</i>	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 Cefepime بنسبة 81.33 % ، Cefpime 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 (2-3) والملحق (3) .

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

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

(Sensitive:S , Intermediate:I , Resistant:R)

* بالاعتماد على CLSI (2012) .

بينت العديد من الدراسات أن بكتيريا *P. aeruginosa* لها القابلية على مقاومة العديد من المضادات الحيوية المختلفة لاسيما مضادات البيبتالاكتام (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) إلى أن مجموعة مضادات البيبتالاكتام β -lactam لاسيما المضاد Ampicillin كان قليل الفعالية في علاج التهاب المجاري البولية المتسبب بوساطة بكتيريا *P. aeruginosa* في دراسة أجريت في الكويت ، كما أظهرت العزلات البكتيرية قيد الدراسة مقاومة لمضاد Carbencillin وبنسبة 100 % وهذا يتفق مع النتيجة التي توصل إليها Mahmoud *et al.* (2013) و AL-Khazali (2009) الذين وجدوا أن نسبة المقاومة للمضاد Carbencillin من قبل البكتيريا *P. aeruginosa* كانت 100 % ، أما نسبة المقاومة لمضاد Piperacillin فكانت 37.33 % وهذه النتيجة تتفق مع النتيجة التي حصل عليها Bhat and Tenguria (2015) إذ وجد أن المقاومة لمضاد Piperacillin كانت 40 % ويعد مضاد Piperacillin من البنسلينات الواسعة الطيف Extended-Spectrum penicillin .

أبدت 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 الأول 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 أن نسبة المقاومة لكل من المضادين Ceftriaxone و Cefotaxime كانت 100 % لكل منهما وكذلك فإن هذه النتيجة تتفق مع النتيجة التي توصل إليها EL-Bialy *et al.* (2008) الذي وجد أن المقاومة من قبل عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* لكل من المضادين Ceftriaxone و Cefotaxime 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 جيدة 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 وجدوا أن نسبة مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للمضاد Aztreoname كانت 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 البيبتالاكتاميز . (Riera *et al.*,2011)

تعمل مجموعة مضادات البيبتالاكتام 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 البيبتيدوكلايكان 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 البييتالاكتام 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 أدى 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 البييتالاكتاميز β -lactamase وانزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs وكذلك انخفاض نفاذية الغشاء الخارجي Outer membrane و امتلاك الأنواع البكتيرية لمضخات الدفع Efflux pumps كل هذا أدى 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 Tobramycin و Gentamicin 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 ، وبالرغم 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

Aminoglycosides ويعود سبب المقاومة لهذه المجموعة من المضادات في الأغلب الى افراز هذه البكتيريا للأنزيمات المحورة (AMEs) Aminoglycoside modifying enzymes 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 الكينولونات 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 للمضادات Ofloxacin ، Norfloxacin 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 وكانت 37.5% و 31.2% على التوالي وهذه النتيجة تتفق مع نتائج الدراسة الحالية ، تعمل مجموعة مضادات الكينولونات 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 الكينولونات 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 والادراج 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 الادراج 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 الادراج 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*

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

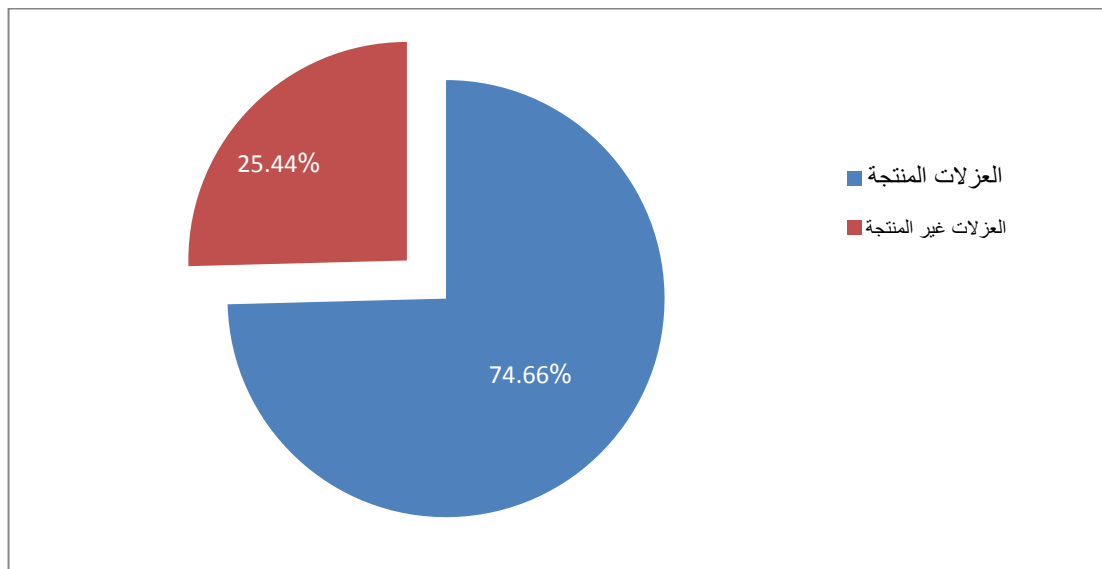
Amoxicillin\Clavulanic acid (AMC) , Ampicillin (AM) , Aztreonam (ATM) , Carbencillin (PY) , Cefepime (FEP) , Cefotaxime (CTX) , Ceftazidime (CAZ) , Ceftriaxone (CRO) , Cephalexin (CL) , Ciprofloxacin (CIP) , Gentamicin (CN) , Imipenem (IPE) , Kanamycin (K) , Meropenem (MEM) , Norfloxacin (NOR) , Ofloxacin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

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

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

تم التحري عن قابلية بكتيريا *P. aeruginosa* لانتاجها انزيمات البييتالاكتاميز 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 والمتكونين من كسر أصرة الأميد Amide bond في حلقة مضادات البييتالاكتام 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 البييتالاكتاميز وبنسبة 74.66 % وكانت 19 عزلة وبنسبة 25.44 % غير منتجة لهذه الأنزيمات كما في الشكل (2-3) .



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

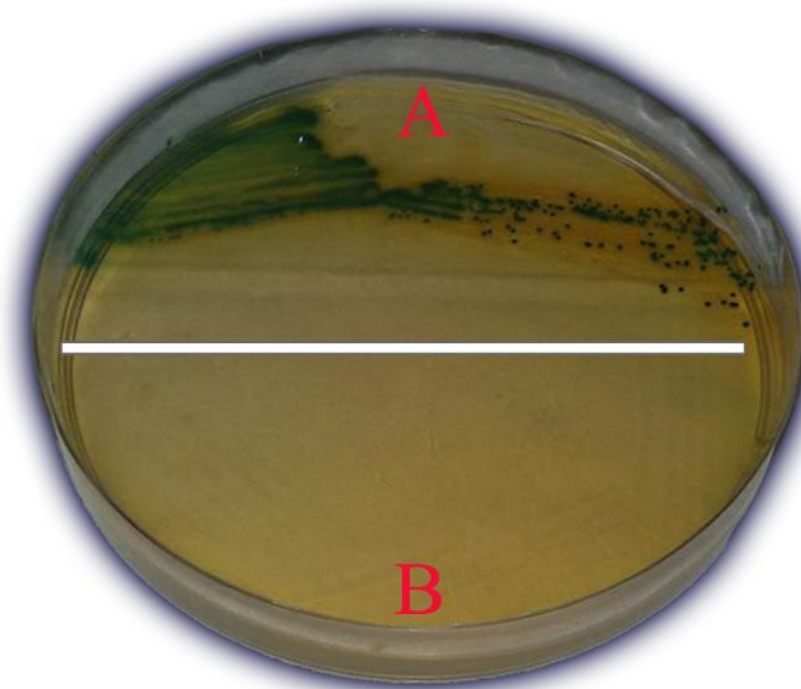
أنتفتت هذه النتيجة مع ما توصل اليه El-Baky *et al.* (2013) عندما وجدوا أن 72.4 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كانت منتجة لأنزيمات البييتالاكتاميز بينما وجد Ali *et al.* (2009) أن 79.16 % من عزلات هذه البكتيريا والمعزولة من مسحات الحروق كانت قادرة على انتاج أنزيمات البييتالاكتاميز من خلال دراستهم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

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

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

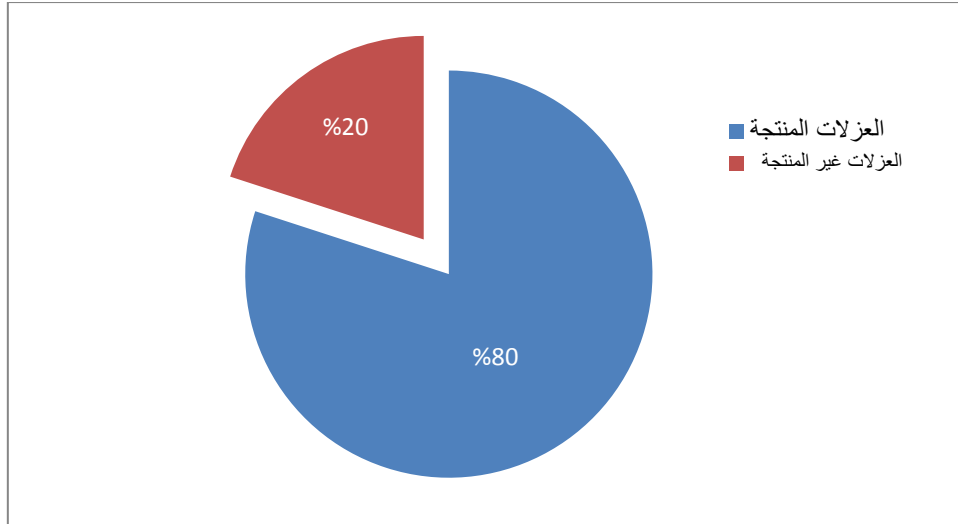
احدى اليات المقاومة المهمة للخلية البكتيرية هو انتاجها لأنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs إذ انها تكون معقدة ، متنوعة وسريعة التطور (Shaikh *et al.*,2015) ، تم التحري عن قابلية بكتيريا *P. aeruginosa* عن انتاج أنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs وذلك باستعمال وسط CHROMagar ESBL الخاص للكشف عن انتاج أنزيمات البييتالاكتاميز 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 لإنتاج أنزيمات البيبتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs في الشكل (3-4) واتفقت نتيجة الدراسة الحالية مع النتائج التي حصل عليها Woodford و Glupczynski *et al.* (2010) و *et al.* (2008) والذان وجدا أن 80% من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كانت منتجة لأنزيمات البيبتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs .



الشكل (3-3) إنتاج بكتيريا *P. aeruginosa* لأنزيمات البيبتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs باستعمال وسط الكروماجين CHROMagar ESBLs حيث ان :

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



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

بينت العديد من الدراسات الحديثة أن استعمال وسط الكروماجين 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 البييتالاكتاميز β -lactamase وأنزيمات البييتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs التي عملت على تطوير مقاومة البكتيريا لمجموعة مضادات البييتالاكتام 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 البييتالاكتام وهي ، Cefepime ، Ceftazidime ، Aztreonam ، Piperacillin ، Ampicillin ، Cephalexin ، Cefotaxime ، Ceftriaxone ، Amoxicillin/clavulanic ، Meropnem ، Imipenem ، Carbencillin 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 البييتالاكتاميز واسعة الطيف ESBLs وهذا يؤكد بأن لهذه الأنزيمات دورا في مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية التابعة

لمجموعة مضادات البيتا لاكتام (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 البيتا لاكتاميز ESBLs (Samra *et al.*,2008) و وجد ان هناك عزلات بكتيرية منتجة لهذه الانزيمات وعدم انتاجها لانزيمات البيتا لاكتاميز 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 الآخر 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) واطهرت 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 الضراوة التي تمتلكها بكتيريا *P. aeruginosa*

ت	المصدر Sources	عوامل الضراوة Virulence factor		
		البروتيز Protease (%)	الغشاء الحيوي Biofilm (%)	الهيموليسين 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 الهيمولاييسين Hemolysin production

أخضعت جميع العزلات البكتيرية لاختبار التحري عن انتاج أنزيم الهيمولاييسين 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 (3-4) 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 Raof (2011) وجد أيضا بان نسبة انتاج هذه البكتيريا لأنزيم الهيمولاييسين كانت 100 % ومن النوع β-hemolysis ، وأن أنزيم الهيمولاييسين 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 (3-4) 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 و اقل 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) .

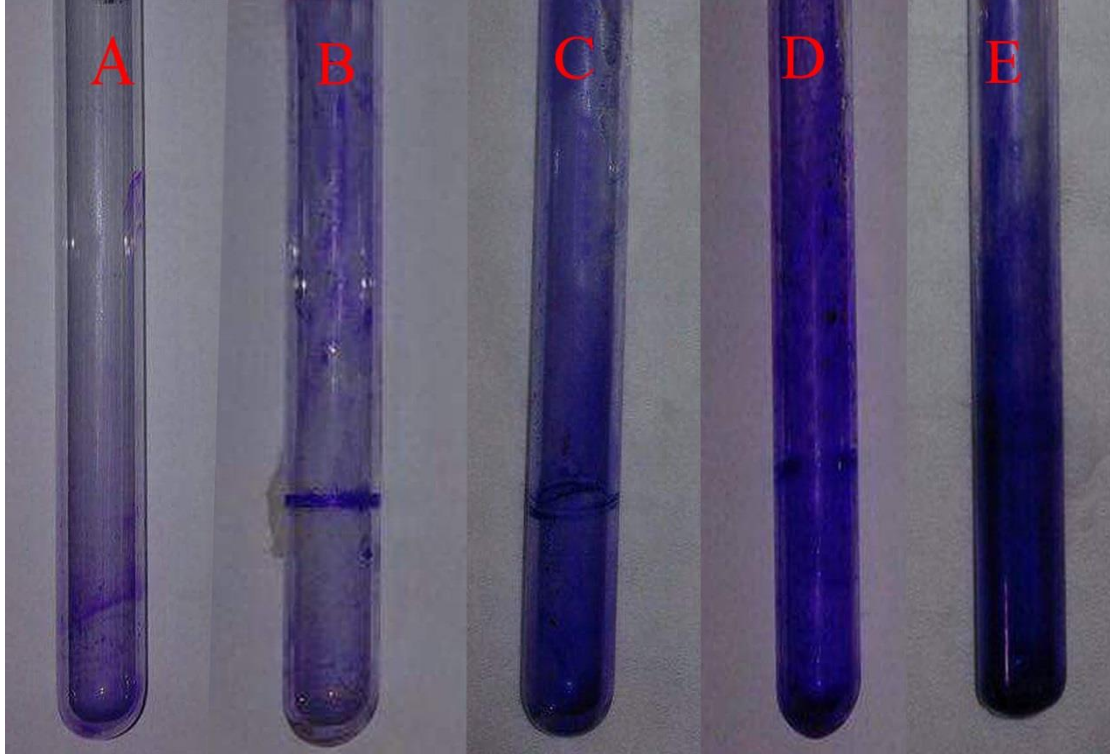
اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي حصلت عليها AL-Nisani (2011) التي وجدت أن 84 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كانت لها القابلية على إنتاج أنزيم Protease في حين وجدت Ali et al. (2009) أن 89.58 % من عزلات هذه البكتيريا أظهرت قابليتها على إنتاج أنزيم Protease وهذه النسبة العالية التي حصلوا 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 ملتصقة على جدران انابيب الاختبار أما عدم ظهور خلايا ملتصقة 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 16 عزلة 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 عليه Senturk et al. (2012) إذ وجد أن 78 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* أظهرت قابليتها 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 وجدوا الى أن 65 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* تمكنت من تكوين الغشاء الحيوي وكذلك وجدوا 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 الى حدوث الاصابات المكتسبة 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* باستخدام جهاز PCR

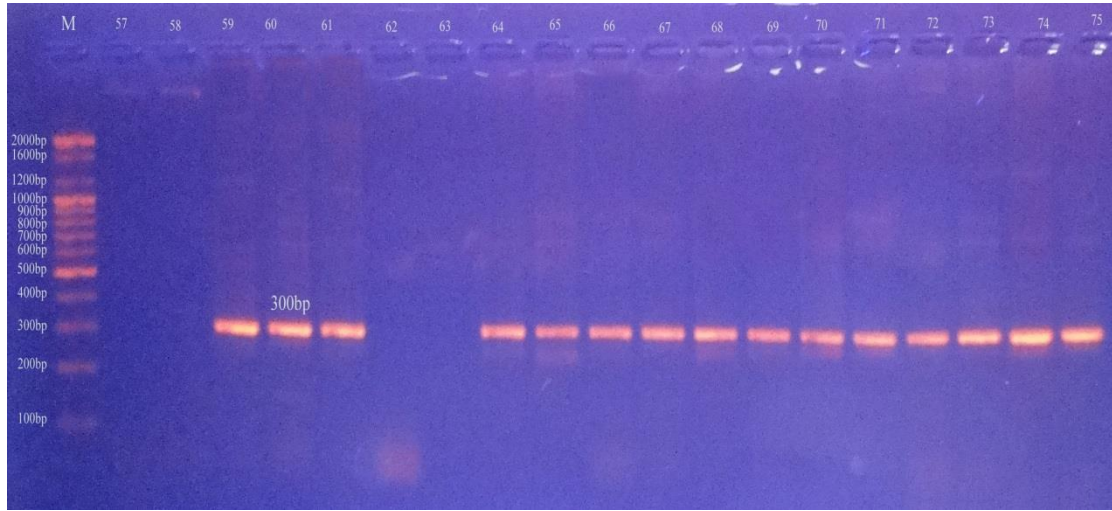
Genotype detection of virulence factor gene of *P. aeruginosa* using PCR

في الدراسة الحالية ، تم التحري عن جينات الضراوة وهي *alg D* ، *tox A* ، *las B* و *pvd A* وباستعمال جهاز PCR واطهرت 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 بوائى Primers متخصصة إذ تستهدف التسلسل النوعي للجينات اعلاه لغرض الكشف عن العزلات التي تملك هذه الجينات (*pvd A* ، *alg D* ، *tox A* ، *las B*) ، 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 البائى 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 ، اظهرت 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 الإصابة بها (Bai *et al.*,2011).



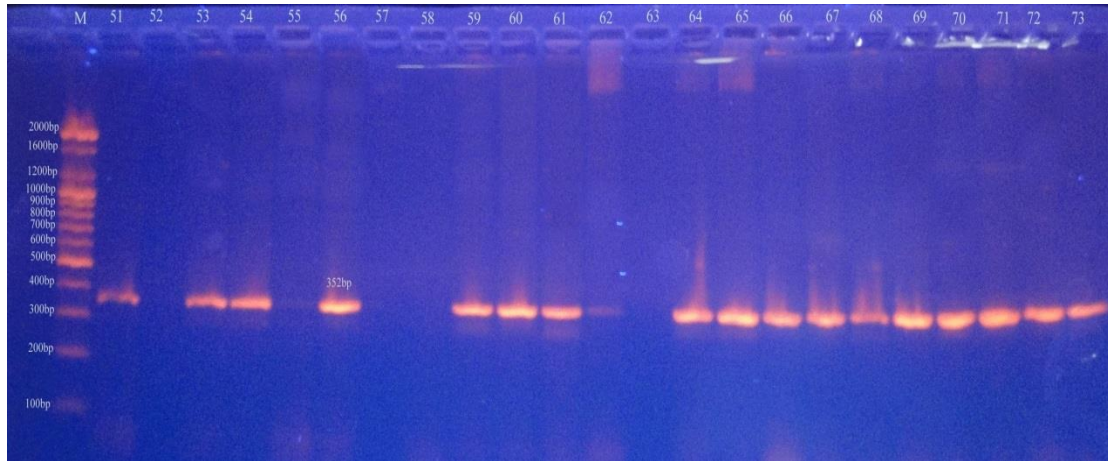
الشكل (6-3) الترحيل الكهربائي لنتائج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين *las B* (300 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت / لمدة ساعتين

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 (5-3) ادناه وجود 54 عزلة التي تعود لبكتيريا *P. aeruginosa* تمتلك الجين *tox A* بنسبة 72 % ، عند مقارنة الحزم المتضاعفة مع الدليل الحجمي وجد أن الحزم الناتجة ذات وزن جزيئي 352 زوج قاعدة كما في الشكل (7-3) ، 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 Tae et al. (2014) إذ وجدوا أن 81.5 % من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* كانت 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 الإصابة 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) .

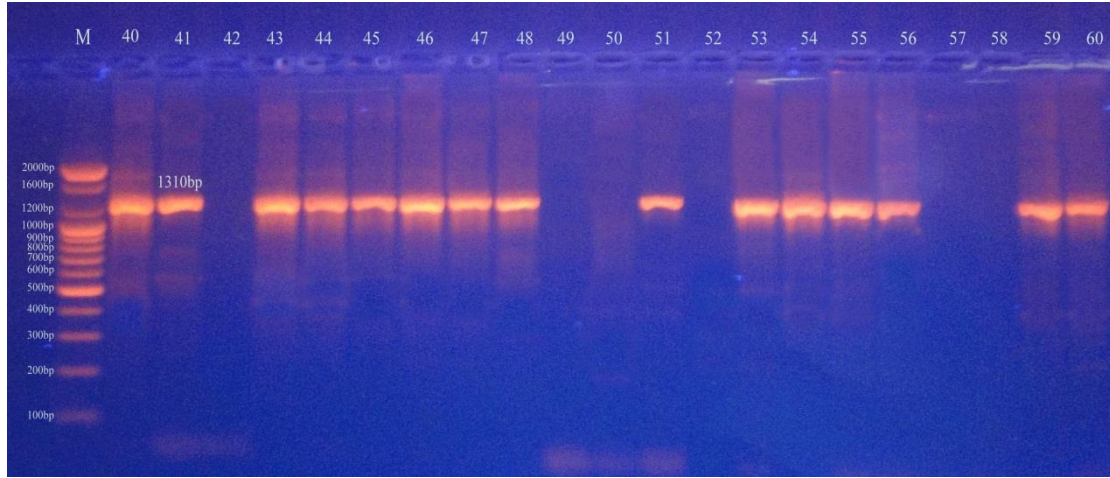


الشكل (7-3) الترحيل الكهربائي لنتائج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين *tox A* (352 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت / لمدة ساعتين .

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* لإنتاج 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 أساسيا لتكوين الغشاء الحيوي Biofilm وبذلك توفر حماية عند التعرض للمضادات الحيوية (Lamppa and Griswold,2013).

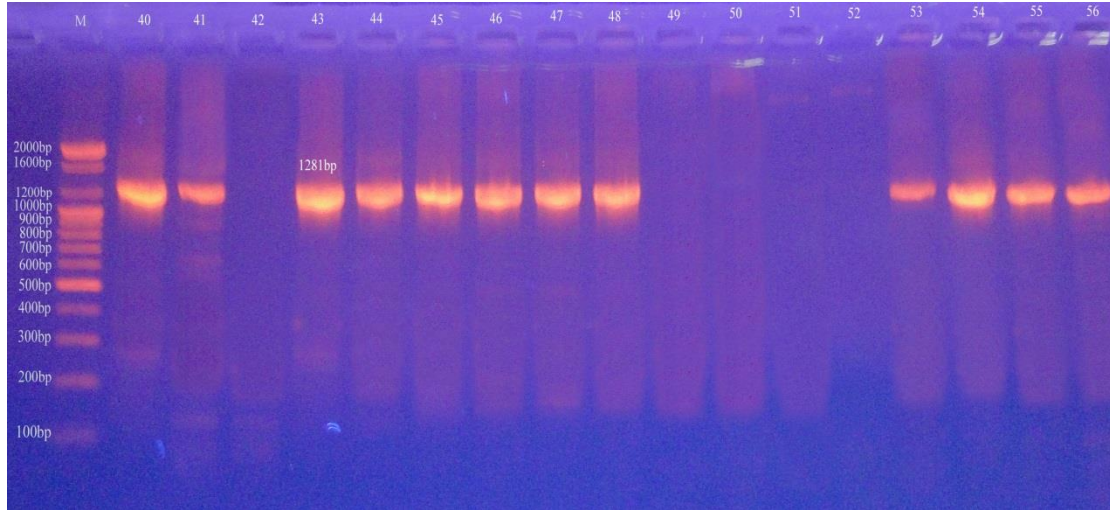


الشكل (3-8) الترحيل الكهربائي لنتائج التفاعل PCR لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال البادئ النوعي للجين *alg D* (1310 زوج قاعدة) على هلام الاكاروز بتركيز 2% وفرق جهد 50 فولت / لمدة ساعتين .

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 صبغة البايوفردين 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% و فرق 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*

جينات الضراوة Virulence genes				المصدر Sources	ت
(%) <i>pvd A</i>	(%) <i>alg D</i>	(%) <i>tox A</i>	(%) <i>las B</i>		
(64.28)18	(75)21	(60.71)17	(82.14)23	Otitis media التهاب الأذن 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 التمييز الجيني لبكتيريا *P. aeruginosa* باستخدام طريقة ERIC

Genotyping of *P. aeruginosa* using ERIC method

عملية التمييز الجيني Genotyping تعمل على التمييز بين السلالات البكتيرية على أساس محتواها الجيني وهناك العديد من طرائق التمييز الجيني التي أصبحت مهمة في مجال إيجاد 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 إيجاد وتحديد القرابة الوراثية تم تمييز جميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* قيد الدراسة بواسطة استعمال طريقة التعداد 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 وظهرت

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

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

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

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 و 63 كانت غير قابلة للتنميط Untypeable وذلك بسبب حصول طفرات في موقع التسلسلات المتكررة وهذه الطفرات تمنع ارتباط البادئ Primer مع التسلسل المكمل له

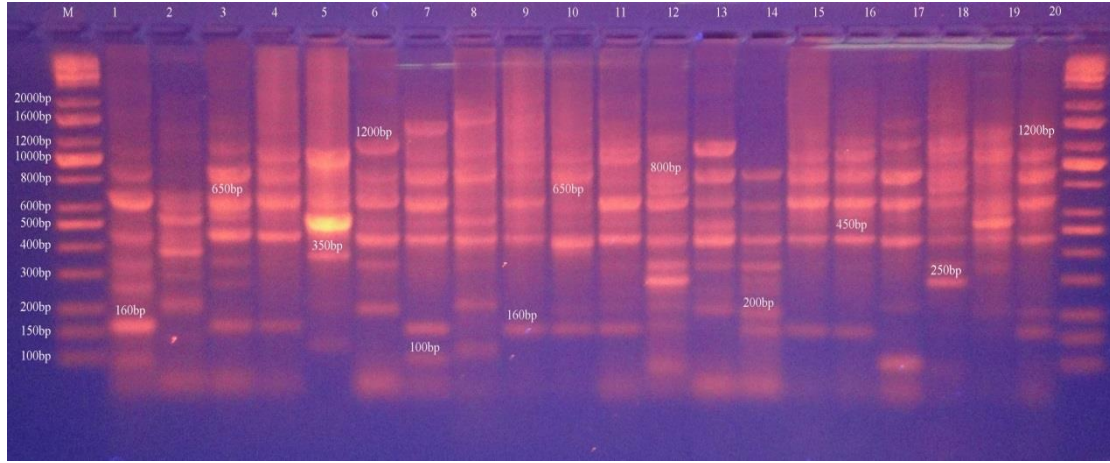
وبذلك لاتظهر الحزم على هلام الاكاروز (Wilson and Sharp,2006) وكذلك أظهر مخطط التحليل التجميعي وجود مجموعتين رئيسيتين هما (A و B) إذ ان المجموعة A تحتوي على 16 عزلة (21.9%) وتكونت من 5 نسيلة Clone في حين المجموعة B تحتوي على 57 عزلة (78.1%) وتكونت من 14 نسيلة Clone ولوحظ أن العزلات البكتيرية التي تم الحصول 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 فاطهرت 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 فاطهرت 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 فاطهرت 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 فاطهرت هذه العزلات امتلاكها للجينات *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 فاطهرت 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 *alg D* و *tox A* ، *las B* ، 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 *alg D* و *tox A* ، *las B* ، كذلك فإن العزلات 5 ، 24 ، 26 ، 28 ، 29 ، 33 ، 56 ، 57 ظهرت 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* ، أظهرت العزلتان 21 و 54 وجود علاقة وراثية فيما بينهما إذ أن هاتين العزلتين عزلت من مريضين في مستشفى الصدر العام و مصدر عزلتهما فكان من التهاب الأذن الوسطى ومن ناحية امتلاكها للجينات فإن هاتين العزلتين أظهرت امتلاكها للجينات *las B* ، *tox A* و *alg D* ، كذلك أظهرت 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 ، أيضا 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 أظهرت 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 .

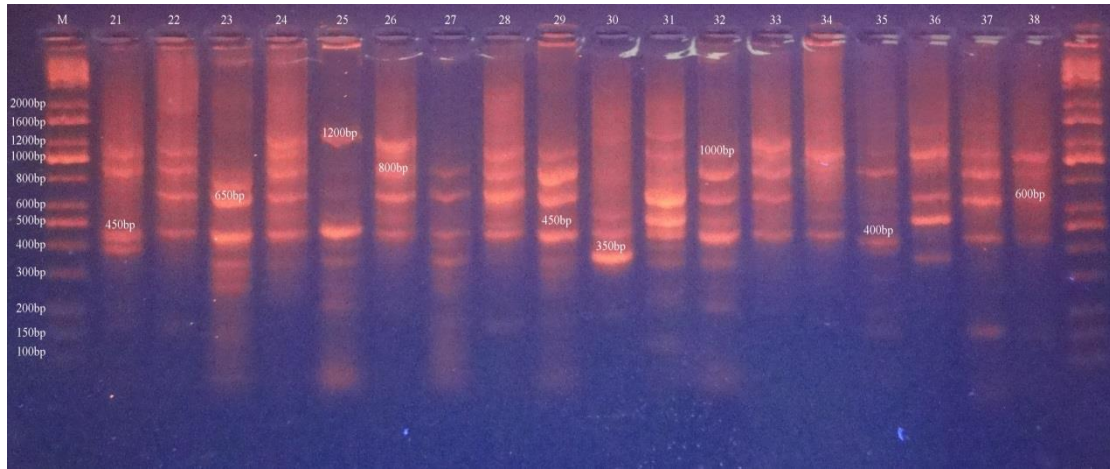
هناك العديد من الدراسات استعملت طريقة ERIC للتمييز بين السلالات البكتيرية وفي مجال الدراسات الوبائية وكذلك لتصنيف العديد من الانواع البكتيرية وتميزت هذه الطريقة بأنها أقل تعقيدا في تحليل النتائج وكذلك اسرع واقل كلفة عند مقارنتها بالعديد من طرائق التنميط الجيني الاخرى (Lim et al.,2009) .



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

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة .

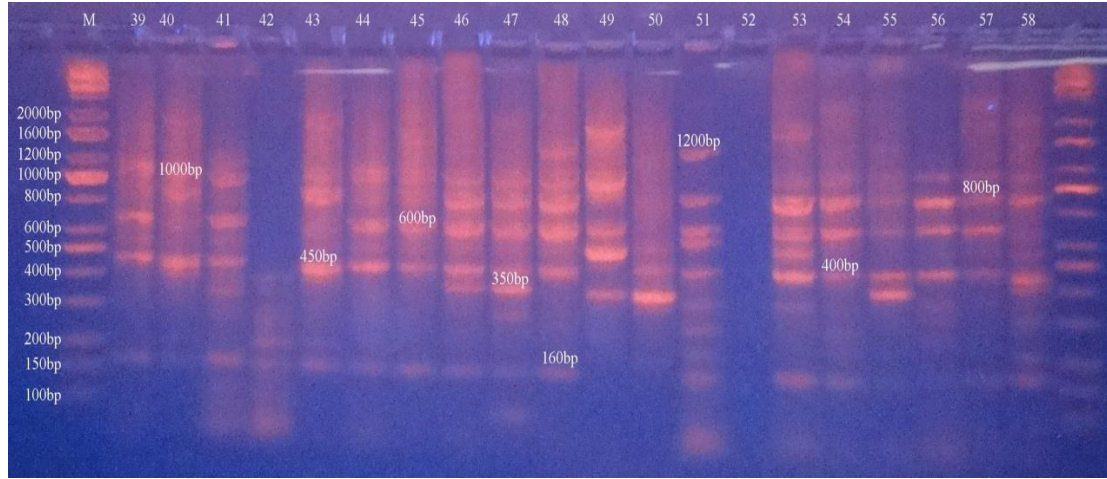
المسارات (1 – 20) ناتج تضخيم تسلسلات ERIC لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* .



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

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة .

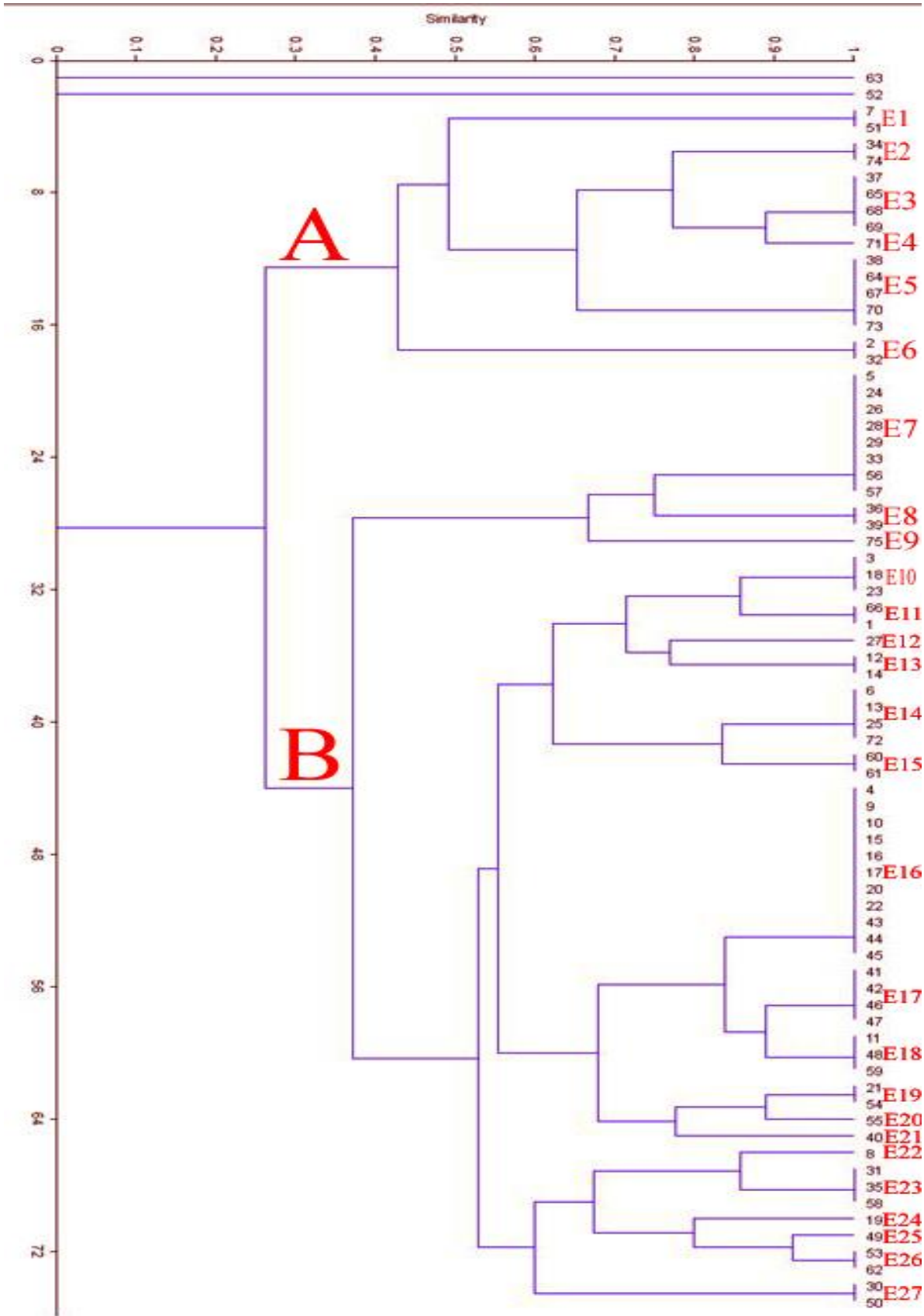
المسارات (39-58) نتائج تضخيم تسلسلات ERIC لعزلات بكتيريا *P. aeruginosa* .



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

المسار M يمثل الدليل الحجمي 100 زوج قاعدة .

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



الشكل (3-11) مخطط التحليل التجميحي Dendrogram 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 ، Cefotaxime ، Carbencillin ، Ampicillin ، Amoxicillin\Clavulanic acid ، Kanamycin و Cephalexin ، Ceftriaxone .
3. اظهرت 80% من عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* قابليتها على انتاج أنزيمات البيبتالاكتاميز 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 *tox A* و *pvd A* ، *alg D* ، *las B* 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 Genotyping لعزلات بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* .

التوصيات Recommendations

1. اجراء العديد من الدراسات الوراثية الخاصة للتميط الجيني Genotyping لبكتيريا *P. aeruginosa* وباستعمال طرائق التتميط 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. ; Omid, Y. and Saedi, 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 Microbiology* . 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 . 8th 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. ; Khenouf, 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 Pseudomonas . *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 *Staphylococcus 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) . Strutral 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 zanzan 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

bioprosthetic 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-Mustansiriyia 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. Elsevier 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) . Antibioqram 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 signaling 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 metallo 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. Toxicol.* 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 Sanchagrín, E. (2008). In vivo 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 Rooijackers, 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. ; Puthuchear, 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. Public 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 Agents 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 pulmonary 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 environmental 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) . Cpxp proteases positively regulate alginate overexpression 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 urinary 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* by enterobacterial 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 .

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

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. ; Diji, 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 . Loughheed 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 evolving 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 .

Tae, 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 , purification 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 characterisation 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	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.aeruginosa</i>
ONPG	Beta-galactosidase	-	-
ADG	Arginine dihydrolase	+	-
<u>LDC</u>	Lysine decarboxylase	-	-
<u>ODC</u>	Ornithine decarboxylase	+	-
<u>CIT</u>	Citrate utilisation	+	+
H ₂ S	H ₂ S 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*

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

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) , Cephalixin (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*

الاوران الجزيئية لحزم ERIC	عدد حزم ERIC	<i>pvd A</i>	<i>alg D</i>	<i>las B</i>	<i>tox A</i>	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*

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

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 Alornaouti

B.Sc. Biology / Baghdad University – 2013

Supervised By

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

2015 A.D

1436 H.J