



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

**التحري عن بعض الجينات المقاومة للامينوكلايوسيدات
والكينولينات في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*
المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في مدينة الديوانية .**

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم - جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في

علوم الحياة / أحياء مجهرية .

من قبل

زينب فالح داخل العادي

(بكالوريوس علوم حياة/كلية العلوم/جامعة القادسية/2012)

بإشراف

ا.م. د. سيوف خومان الرماحي

Introduction

تعد بكتيريا *Pseudomonas. aeruginosa* واحدة من اهم الانواع البكتيرية السالبة لصبغة جرام المسببة لتفشي العدوى المكتسبة من المستشفيات (Gawish *et al.*, 2013) , اذ لوحظ في كثير من الاحيان صعوبة علاج الاصابات الناتجة عن هذه البكتيريا لكونها تمتلك صفة المقاومة الطبيعية بالإضافة إلى قدرتها على اكتساب المقاومة تجاه العديد من المضادات الحيوية مثل الامينوكلايكوسيدات و الفلوروكينولونات ومضادات البيبتالاكتام (Cicek *et al.*, 2013).

استخدمت مضادات الأمينوكلايكوسيدات بشكل واسع في علاج الاصابات الناتجة عن البكتيريا السالبة لصبغة جرام , اذ تعطي فعلاً تازرياً مع مضادات البيبتالاكتام . ترتبط مضادات الأمينوكلايكوسيدات بالموقع A على الوحدة الرايبوسومية الصغيرة للوحدة الثانوية 30S في البكتيريا معرقة بذلك تصنيع البروتين ومؤدية إلى موت الخلية البكتيرية (Hamed *et al.*, 2013 ; Laureti *et al.*, 2013).

تحدث المقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات من خلال عدة آليات منها الإنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات (Aminoglycoside Modifying Enzymes) وأنظمة الدفق الفعالة بالإضافة الى فعالية انزيم المثيليز 16S rRNA methylase (Vaziri *et al.*, 2011), ومن بين هذه الآليات فان الإنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات والمعبر عنها بلازميدياً تعد الآلية الاكثر شيوعاً . تتضمن الإنزيمات المحورة ثلاثة مجاميع الإنزيمات الناقلة لمجموعة الأستيل (N-acetyl transferases) , الإنزيمات الناقلة للنيوكليوتيدات (O-nucleotid transferases) , والإنزيمات الناقلة لمجموعة الفوسفات (O-phospho transferases), والتي يعبر عنها من خلال الجينات *aac(6')-Ib* , *aac(6')-IIb* , و *aph(3')-VI* , ولهذه الجينات اهمية كبيرة لشيوخ تواجدها في بكتيريا *P. aeruginosa* (Woegerbauer *et al.*, 2014).

وفي الاونة الاخيرة سُخصت الجينات المعبرة عن انزيم المثيليز 16S rRNA methylase في العديد من المُسببات المرضية ومنها بكتيريا *P. aeruginosa* , اذ منحت مستويات عالية من المقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات ذات الاهمية السريرية مثل مضاد الاميكاسين (Tada *et al.*, 2013).

تمتلك مضادات الكينولينات طيفاً واسعاً من الفعالية تجاه البكتيريا السالبة لصبغة جرام , فضلاً عن قابلية الاختراق الجيدة وتأثيراتها الجانبية القليلة (Anvarinejad *et al.* , 2011) , اذ تحدث اهم آليات المقاومة لمضادات الكينولينات بواسطة الكروموسومات من خلال حدوث الطفرات في الجين *gyrA* والجين *gyrB* واللذين يعبران عن الإنزيم DNA gyrase (Cho *et al.* , 2014) , وكذلك حدوث الطفرات في الجين *parC* والجين *parE* واللذين يعبران عن الإنزيم Topoisomerase-IV (Ghosh and Hore , 2011) , كما ان حدوث الطفرات في الجين *gyrA* تعد الأكثر شيوعاً في العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* (Salma *et al.* , 2012) .

وبسبب ارتفاع نسبة مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* لمعظم المضادات الحيوية المستخدمة في الوقت الحاضر، ونظراً لعدم توفر دراسة سابقة عن إنتشار مقاومة مضادات (الأمينوكلايكوسيدات والكينولينات) في محافظة الديوانية , هدفت الدراسة الى :

معرفة إنتشار مقاومة مضادات (الأمينوكلايكوسيدات والكينولينات) لعزلات الـ *P. aeruginosa* المعزولة من حالات سريرية مختلفة في مستشفى الديوانية التعليمي في محافظة الديوانية .

خطوات الدراسة :

- 1- عزل وتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* من حالات سريرية مختلفة في مستشفى الديوانية التعليمي .
- 2- تشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل PCR .
- 3- دراسة نمط المقاومة البكتيرية لعزلات الـ *P. aeruginosa* تجاه عدد من المضادات الحيوية بطريقة انتشار القرص لـ كيربي- باور .
- 4- التحري عن انتشار بعض جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات والكينولينات لعزلات الـ *P. aeruginosa* المقاومة لها باستخدام تقنية الـ PCR .

المحتويات

| الصفحة | الموضوع |
|--------|--------------------------|
| 2-1 | Introduction |
| | 1- الفصل الاول : المقدمة |

| | | |
|-------|---|---|
| 22-3 | Literatures review | 2- الفصل الثاني : استعراض المراجع |
| 3 | History | 1-2: نبذة تاريخية |
| 3 | General characteristics | 2-2: الصفات العامة |
| 3 | Microscopic characteristics | 1-2-2: الصفات المجهرية |
| 4 | Cultural characteristics | 2-2-2: الصفات الزراعية |
| 4 | Biochemical tests | 3-2-2: الاختبارات الكيموحيوية |
| 4 | Pathogenicity of <i>P. aeruginosa</i> | 3-2: أمراضية بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 5-4 | Virulence factors | 1-3-2: عوامل الضراوة |
| 6 | Diseases caused by <i>P. aeruginosa</i> | 2-3-2: الأمراض المتسببة عن بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 7 | Resistance of <i>P. aeruginosa</i> to Antibiotics | 4-2: مقاومة بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> للمضادات الحيوية |
| 8-7 | Intrinsic resistance | 1-4-2: المقاومة الذاتية |
| 9 | Acquired resistance | 2-4-2: المقاومة المكتسبة |
| 9 | Antibiotics | 5-2: المضادات الحيوية |
| 9 | Aminoglycoside Antibiotics | 1-5-2: مضادات الأمينو كليكوسيدات |
| 11-10 | Classification of Aminoglycoside Antibiotics | 1-1-5-2: تصنيف مضادات الأمينو كليكوسيدات |
| 11 | Features of Aminoglycoside Antibiotics | 2-1-5-2: خصائص مضادات الأمينو كليكوسيدات |
| 12 | Molecular Mechanisms Action of Aminoglycoside Antibiotics | 3-1-5-2: آلية العمل الجزيئي لمضادات الأمينو كليكوسيدات |
| 13 | Aminoglycoside Antibiotics resistance | 4-1-5-2: مقاومة مضادات الأمينو كليكوسيدات |
| 14 | Aminoglycoside-Modifying Enzymes (AMEs) | 5-1-5-2: الإنزيمات المحورة للأمينو كليكوسيدات |
| 15-14 | N-acetyl transferases (AACs) | 1-5-1-5-2: الإنزيمات الناقلة لمجموعة الأستيل |
| 17-16 | O-nucleotid transferases (ANTs) | 2-5-1-5-2: الإنزيمات الناقلة للنوكليوتيدات |
| 18 | O-phospho transferases (APHs) | 3-5-1-5-2: الإنزيمات الناقلة لمجموعة الفوسفات |
| 19 | Quinolone Antibiotics | 2-5-2: مضادات الكينولونات |
| 19 | Classification of Quinolone Antibiotics | 1-2-5-2: تصنيف مضادات الكينولونات |
| 20 | Molecular Mechanisms Action of Quinolone Antibiotics | 2-2-5-2: آلية العمل الجزيئي لمضادات الكينولونات |
| 21 | Quinolone Antibiotics Resistance | 3-2-5-2: مقاومة مضادات الكينولونات |

| | |
|--------------|--|
| 21 | 1-3-2-5-2: مقاومة مضادات الكينولونات بواسطة الكروموسومات Chromosome-Mediated Quinolone Antibiotics Resistance |
| 22 | 2-3-2-5-2: مقاومة مضادات الكينولونات بواسطة البلازميدات Plasmid-Mediated Quinolone Antibiotics Resistance |
| 44-23 | 3- الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل Materials and methods |
| 23 | 1-3: المواد Materials |
| 24-23 | 1-1-3: : الأجهزة والأدوات المخبرية Equipment and apparatus |
| 25-24 | 2-1-3: المواد البايولوجية و الكيمياوية Biological and Chemical Material |
| 26 | 3-1-3: الأوساط الزرعية الجاهزة Ready prepare media |
| 27 | 4-1-3: المضادات الحيوية المجهزة من قبل شركة (Turkey) Bioanalyse (Turkey) Bioanalyse |
| 28 | 5-1-3: العدد الجاهزة العُدَد الجاهزة |
| 28 | 6-1-3: بادئات الـ DNA DNA Primers |
| 30 | 2-3: طرائق العمل Methods |
| 30 | 1-2-3: تحضير الأوساط الزرعية Culture media preparation |
| 30 | 2-2-3: تحضير الكواشف والمحاليل Reagents and Solutions |
| 30 | 1-2-2-3: الكواشف Reagents |
| 31 | 2-2-2-3: المحاليل Solutions |
| 32 | 3-2-3: جمع العينات Collection of samples |
| 32 | 4-2-3: عزل البكتيريا Isolation of bacteria |
| 33 | 5-2-3: تشخيص البكتيريا Identification of Bacteria |
| 33 | 1-5-2-3: الخصائص المظهرية Phenotypic characteristics |
| 33 | 2-5-2-3: التشخيص المجهرى Microscopic diagnosis |
| 35-33 | 3-5-2-3: الأختبارات الكيموحيوية Biochemical tests |
| 36-35 | 4-5-2-3: التشخيص بنظام api 20E api 20 E diagnosis system |
| 37 | 6-2-3: حفظ وإدامة العزلات البكتيرية Preservation and Maintenance of Bacterial Isolates |
| 37 | 7-2-3: إختبار فحص الحساسية Antibiotic Susceptibility Testing |
| 38 | 8-2-3: تفاعل السلسلة المتبلمرة Polymerase Chain Reaction (PCR) |
| 39-38 | 1-8-2-3: إستخلاص الحامض النووي البكتيري (Genomic DNA extraction) (Genomic DNA extraction) |
| 39 | 2-8-2-3: فحص الحامض النووي المستخلص DNA examination |
| 40 | 3-8-2-3: فحص تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase chain reaction Test |
| 40 | 1-3-8-2-3: تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة Monoplex PCR master mix |
| 41 | 2-3-8-2-3: برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـ DNA DNA |
| 42 | 3-3-8-2-3: تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة Multiplex PCR master mix |
| 43 | 4-3-8-2-3: برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـ DNA DNA |
| 44-43 | 4-8-2-3: الترحيل الكهربائي بالهلام Agarose Gel electrophoresis |
| 44 | 3-3: التحليل الاحصائي Statistical Analysis |
| 84-45 | 4- الفصل الرابع: النتائج والمناقشة Results and discussion |

| | | |
|-------|--|--|
| 46-45 | Statistical study | 1-4: الدراسة الإحصائية |
| 48-46 | Isolation and Identification | 2-4: العزل والتشخيص |
| 50-49 | Incident and distribution of <i>P. aeruginosa</i> in clinical samples | 3-4: انتشار وتوزيع بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> في العينات السريرية |
| 53-51 | Incident and distribution of <i>P. aeruginosa</i> isolates based on age, gender, and hospitalization . | 4-4: انتشار وتوزيع عزلات <i>P. aeruginosa</i> حسب العمر, الجنس, وحالة المرضى |
| 59-53 | Antibiotic Susceptibility Test | 5-4: اختبار الحساسية للمضادات الحيوية |
| 60 | Antibiotics- Resistant <i>P. aeruginosa</i> Isolates | 6-4: مقاومة عزلات <i>P. aeruginosa</i> للمضادات الحيوية |
| 62-60 | Aminoglycoside Antibiotics Resistance | 1-6-4: المقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات |
| 64-62 | Quinolone Antibiotics Resistance | 2-6-4: المقاومة لمضادات الكينولونات |
| 66-64 | Multidrug resistance | 3-6-4: المقاومة المشتركة لأصناف المضادات الحيوية الأخرى |
| 74-67 | Dissemination of Aminoglycoside Antibiotics-Resistance Genes | 7-4: انتشار جينات المقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات |
| 77-75 | Distribution of Aminoglycoside Antibiotics-resistance genes and their combinations isolates of <i>P. aeruginosa</i> | 8-4: توزيع جينات المقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات ومجاميعها في عزلات <i>P. aeruginosa</i> |
| 78-77 | Incident and distribution of Aminoglycoside Antibiotics-resistance genes in clinical samples of <i>P. aeruginosa</i> | 9-4: انتشار وتوزيع جينات المقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات في العينات السريرية لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 81-79 | Dissemination of Quinolone Antibiotics- Resistance Genes | 10-4: انتشار جينات المقاومة لمضادات الكينولونات |
| 82 | Distribution of Quinolone Antibiotics-resistance genes and their combinations isolates of <i>P. aeruginosa</i> | 11-4: توزيع جينات المقاومة لمضادات الكينولونات ومجاميعها في عزلات <i>P. aeruginosa</i> |
| 83 | Incident and distribution of Quinolone Antibiotics-resistance genes in clinical samples of <i>P. aeruginosa</i> | 12-4: انتشار وتوزيع جينات المقاومة لمضادات الكينولونات في العينات السريرية لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 84 | Dissemination of Aminoglycoside and Quinolone Antibiotics-Resistance Genes | 13-4: انتشار جينات المقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات والكينولونات |
| 85 | Conclusions and Recommendations | الاستنتاجات والتوصيات |
| 85 | Conclusions | الاستنتاجات |

| | | |
|---------|-----------------|---------------------------|
| 86 | Recommendations | التوصيات |
| 125-87 | References | المصادر |
| 127-126 | Appendices | الملاحق |
| A-B | Summary | الخلاصة باللغة الانكليزية |

قائمة بعناوين الجداول

| الصفحة | الجدول |
|--------|---|
| 29 | 1-3: بادئات الـ DNA التي استعملت في هذه الدراسة. |
| 40 | 2-3: مكونات مزيج تفاعل انزيم البلمرة Monoplex PCR master mix وحجومها . |
| 41 | 3-3: الظروف المستعملة في جهاز الدورات الحرارية PCR . |
| 42 | 4-3: مكونات مزيج تفاعل انزيم البلمرة Multiplex PCR master mix وحجومها . |
| 43 | 5-3: الظروف المستعملة في جهاز الدورات الحرارية PCR . |
| 45 | 1-4: توزيع العينات السريرية حسب المصدر والجنس وحالة المرضى . |
| 47 | 2-4: توزيع عزلات <i>P. aeruginosa</i> والعزلات السالبة والموجبة لصبغة غرام حسب مصدر جمع العينات . |
| 51 | 3-4: توزيع عزلات <i>P. aeruginosa</i> حسب العمر , الجنس , وحالة المرضى . |
| 54 | 4-4: النسب المئوية لعزلات <i>P. aeruginosa</i> الحساسة و المتوسطة الحساسية والمقاومة للمضادات الحيوية قيد الدراسة . |
| 65 | 5-4: توزيع عزلات <i>P. aeruginosa</i> على أنواع المقاومة والنسب المئوية لها . |
| 68 | 6-4: انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في عزلات <i>P. aeruginosa</i> |
| 75 | 7-4: توزيع جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات ومجاميعها في عزلات <i>P. aeruginosa</i> |
| 78 | 8-4: انتشار وتوزيع جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في العينات السريرية لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 80 | 9-4: انتشار جينات المقاومة لمضادات الكينولينات في عزلات <i>P. aeruginosa</i> |
| 82 | 10-4: توزيع جينات المقاومة لمضادات الكينولينات ومجاميعها في عزلات <i>P. aeruginosa</i> |
| 83 | 11-4: انتشار وتوزيع جينات المقاومة لمضادات الكينولينات في العينات السريرية لبكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 84 | 12-4: انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات والكينولينات |

قائمة بعناوين الاشكال

| الصفحة | الشكل |
|--------|-------|
|--------|-------|

| | |
|----|--|
| 10 | 2-1: التركيب الكيميائي لمضاد الستربتومايسين والذي يتضمن (من اليسار الى اليمين) سكر الستربتدين و سكر البنروز و سكر الكلوسامين . |
| 11 | 2-2: التركيب الكيميائي لمضاد الجنتاميسين . |
| 19 | 2-3: التركيب الكيميائي للمضادين الحيويين السبروفلوكساسين و النورفلوكساسين . |
| 48 | 4-1: الترجيل الكهربائي لهلام الاكاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص PCR لجين 16SrRNA الخاص بتشخيص بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 61 | 4-2: نسب المقاومة لعزلات <i>P. aeruginosa</i> تجاه مضادات الأمينوكلايوسيدات . |
| 63 | 4-3: نسب المقاومة لعزلات <i>P. aeruginosa</i> تجاه مضادات الفلوروكينولونات . |
| 67 | 4-4: انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايوسيدات في عزلات <i>P. aeruginosa</i> |
| 71 | 4-5: الترجيل الكهربائي لهلام الاكاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص mPCR لجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايوسيدات (<i>aac(3)-II</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>Aph(3')-VI</i>) في عزلات بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 72 | 4-6: الترجيل الكهربائي لهلام الاكاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص mPCR لجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايوسيدات: (<i>aac(3)-I</i> , <i>aac(6')-I</i> , <i>aac(6')-IIb</i>) في عزلات بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 73 | 4-7: الترجيل الكهربائي لهلام الاكاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص mPCR لجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايوسيدات: (<i>Ant(4')-IIb</i> , <i>armA</i> , <i>rmtA</i>) في عزلات بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 74 | 4-8: الترجيل الكهربائي لهلام الاكاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص mPCR لجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايوسيدات: (<i>rmtD</i> , <i>npmA</i>) في عزلات بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 79 | 4-9: الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص mPCR لجينات المقاومة لمضادات الكينولونات (<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>) في عزلات بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 80 | 4-10: الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص mPCR لجينات المقاومة لمضادات الكينولونات (<i>ParC</i> , <i>ParE</i>) في عزلات بكتيريا <i>P. aeruginosa</i> |
| 81 | 4-11: انتشار جينات المقاومة لمضادات الكينولونات في عزلات <i>P. aeruginosa</i> |

قائمة بعناوين الملاحق

| الصفحة | الملحق |
|--------|--|
| 126 | ملحق (1) : الصفات المجهرية والكيموحيوية لعزلات <i>P. aeruginosa</i> المعزولة من حالات سريرية مختلفة من مستشفى الديوانية التعليمي . |
| 127 | ملحق (2) : القائمة التوضيحية للفحوصات التي شملتها عدة 20E api التشخيصية المجهزة من قبل شركة Bio Merieux (France). |

قائمة المختصرات

| المختصر | المصطلح |
|------------|---|
| 16SrRNA | 16 Svedberg units ribonucleic acid . |
| A site | Aminoacyl site. |
| <i>aac</i> | Aminoglycoside Acetyltransferase. |
| AACs | Aminoglycosides N-Acetyltransferases. |
| AMEs | Aminoglycosides Modifying Enzymes. |
| ANTs | Aminoglycosides O-Nucleotidyltransferases. |
| APHs | Aminoglycoside O-Phosphotransferases. |
| api | Analytical Profile Index. |
| armA | Aminoglycoside Resistance Methyltransferase Type A. |
| bp | Base Pair. |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standard Institute. |
| dATP | Deoxy adenosine triphosphate . |
| dCTP | Deoxy cytidine triphosphate . |
| dGTP | Deoxy guanosine triphosphate . |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid. |
| dTTP | Deoxy thymiidine triphosphate . |
| F | Forword Primer. |
| GD | Genomic DNA . |
| GyrA | Gyrase Protein A. |
| GyrB | Gyrase Protein B. |
| HCl | Hydrochloric acid. |
| μl | Micro liter . |
| μm | Micro mole. |
| MBL | Metallo Beta-lactamase. |
| MDR | Multi Drug Resistance. |
| Mex | Multidrug Efflux. |
| Min | Minute. |
| ml | Millie liter. |
| mM | Millie molar. |
| MR | Methyl Red. |
| mRNA | Massinger Ribonucleic acid. |
| MRSA | Methicillin Resistance <i>Staphylococcus aureus</i> . |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information. |
| NCCLS | National Committee for Clinical Laboratory Standards. |

| | |
|----------|---|
| ng | Nano gram . |
| NIT | Nitrate . |
| nm | Nanometer. |
| npmA | Novel Plasmid-Mediated Methyltransferase A. |
| Opr | Outer Membrane Porin. |
| P site | Peptidyl site. |
| ParC | Topoisomerase protein C. |
| ParE | Topoisomerase protein E. |
| PCR | Polymerase Chain Reaction. |
| PDR | Pan-Drug Resistance. |
| PMQR | Plasmid – Mediated Quinolone Resisance . |
| Qnr | Quinolone Resistance Protien. |
| QRDR | Quinolone Resistance Determining Region. |
| R | Reverse Primer. |
| R-factor | Resistance factor. |
| rmtA | rRNA Methyltransferase type A. |
| rmtB | rRNA Methyltransferase type B. |
| rmtC | rRNA Methyltransferase type C. |
| rmtD | rRNA Methyltransferase type D. |
| rRNA | Ribosomal Ribonucleic Acid. |
| sec | Second. |
| spp | Species . |
| TDA | Tryptophan Deaminase. |
| tRNA | Transfer Ribonucleic Acid. |
| UTI | Urinary tract infection . |
| UV | Ultra-Violet. |
| VP | Voges-Proskauer. |
| WHO | World health organization . |
| XDR | Extensive-Drug Resistance . |

Literatures review

2 : استعراض المراجع

History

1-2 : نبذة تاريخية

عُزلت بكتيريا *P. aeruginosa* لأول مرة من مزرعة نقية عام 1872 من قبل العالم Schoroeter من مصادر بيئية مختلفة (Dworkin *et al.* , 2006) , وهي من العصيات الهوائية الإجبارية السالبة لصبغة جرام تظهر بشكل مفرد أو مزدوج أو بشكل سلاسل قصيرة متحركة بوساطة سوط قطبي (Brooks *et al.* , 2007) , لها القابلية على إنتاج صبغات متعددة تظهر في الوسط الزراعي منها صبغة البايوسيانين (Pyocyanin) الزرقاء المخضرة (القيح الأزرق) وصبغة البايوفردين (Pyoverdin) أو الفلورسين (Fluorescein) الخضراء المصفرة وصبغة البايوروبين (Poyrubin) الحمراء وصبغة البايو ميلانين (Pyomelanin) السوداء (Jawetz *et al.* , 2010) .

تمتلك بكتيريا *P. aeruginosa* جينوم كبير يتكون من 6.26 ميغا زوج قاعدي يشفر لحوالي 5567 جين بالمقارنة مع جينوم بكتيريا *Escherichia coli* الذي يتكون من 4.46 ميغا زوج قاعدي ويشفر لحوالي 4279 جين (Ratakia , 2011) .

تتواجد بكتيريا *P. aeruginosa* بشكل واسع في التربة والماء وعلى السطوح الخارجية للنباتات والحيوانات والبيئة الرطبة للمستشفيات كأرضية الردهات والحمامات وأدوات التنظيف (Fonseca *et al.* , 2007) , وتوجد بأعداد قليلة جداً ضمن النبيت الطبيعي (Normal flora) في القناة الهضمية للأشخاص الأصحاء (Islam , 2008) , كما يمكنها التواجد في بعض المحاليل المعقمة والمطهرات والصابون وبذلك تؤدي دوراً مهماً في العدوى المكتسبة من المستشفيات (Levinson , 2004).

General characterstics

2-2 : الصفات العامة

Microscopic characterstics

1-2-2: الصفات المجهرية

تضم مجموعة من البكتيريا الهوائية الاجبارية وعصوية الشكل وسالبة لصبغة جرام ومستقيمة او منحنية . تظهر بشكل مفردة او ثنائية او على شكل سلاسل قصيرة و تتحرك بواسطة سوط قطبي (Ryan and Ray, 2004) .

Cultural characterstics

2-2-2 : الصفات الزرعية

تظهر مستعمرات بكتيريا *P. aeruginosa* شاحبة اللون على وسط أگار الماكونكي لعدم قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز (Baron and Finegold , 1990) ، كما تمتاز معظم انواع جنس الزوائف الزنجارية بأفرازها صبغة البايوفردين الخضراء المصفرة والتي تذوب بالماء والكلورفورم (Lau et al ., 2004) ، والقليل من السلالات المحددة والعائدة لهذه البكتيريا لها القابلية على افراز بعض الصبغات مثل صبغة البايوروبين الحمراء ، وصبغة البايوميلائين السوداء او البنية (Jawetz et al ., 2008) .

Biochemical tests

3-2-2 : الاختبارات الكيموحيوية

تتصف بكتيريا *P.aeruginosa* بايجابيتها لأختبار الأوكسيديز والكتاليز، وتميع الجيلاتين، اما بالنسبة لمجموعة إختبارات IMViC والتي شملت اختبارات : (الأندول ، احمر المثيل ، فوكس بروسكاور، واستهلاك السترات) ، فكانت موجبة في اختبار استهلاك السترات فقط ، وسالبة لأختبارات الأندول ، والمثيل الأحمر ، و فوكس بروسكاور، اذ تستطيع هذه البكتيريا أستغلال مركبات متنوعة كمصدر للطاقة كالمصادر النايتروجينية والكاربونية (Itah and Essien , 2005) .

3-2: أمراضية بكتيريا *P. aeruginosa*

Pathogenicity of *P. aeruginosa*

Virulence factors

3-2-1: عوامل الضراوة

تعدّ بكتيريا *P. aeruginosa* من المسببات المرضية الانتهازية (Opportunistic pathogens) وخاصة في المناطق التي تخلو من الدفاعات الطبيعية (Jawetz et al ., 2008) لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة منها عوامل خلوية كالاسواط (flagella) والأهلاب (pili) والشعيرات (fimbria) التي تساعد على الحركة والالتصاق بخلايا المضيف وعوامل افرازية كصبغة البايوسيانين و صبغة البايوفردين وذيوانات Exotoxine A التي تكون قاتلة عند حقنها بشكل نقي في الحيوانات المختبرية وذيوانات Exotoxine S التي وظيفتها الالتصاق ومنع عملية البلعمة في الانسجة المصابة (Jawetz et al ., 2010) .

ومن عوامل الضراوة الاخرى في بكتيريا *P. aeruginosa* الغشاء الحيوي (Biofilm) والمادة اللزجة المخاطية (Todar , 2008) , التي تفرز من قبل بعض سلالات بكتيريا *P. aeruginosa* وتظهر مستعمراتها بمظهر مخاطي (Salyres and Whitt , 2002) , اذ يكثر انتاجها في حالات الخمج المزمن للرئة وخاصة في حالة التليف الكيسي ولها دور في تقليل نفاذية التراكيذ القاتلة لعدد من المضادات الحيوية والمعقمات ومنعها من الوصول الى الموقع الهدف في الخلية البكتيرية فضلاً عن دورها في زيادة مقاومة البكتيريا لعملية البلعمة (Jawetz et al ., 2010) .

ان غزو البكتيريا لخلايا المضيف يتطلب اختراقاً او تحطيماً للغلاف الخلوي الخارجي ويحدث ذلك عن طريق اساليب فيزيائية او وسائل انزيمية او الاثنين معاً (Musk and Hergenrothe , 2008) , وتؤدي العوامل الانزيمية دوراً اساسياً في تحطيم او تحليل الوحدات التركيبية في الغشاء الخلوي للمضيف والمتمثلة بالدهون المفسفرة و البروتينات اثناء غزو خلايا المضيف ومن هذه الانزيمات :

Protease enzymes

أ- انزيمات البروتيز

تلعب هذه الانزيمات دوراً مهماً في اختراق الانسجة وامراضية البكتيريا (Clark , 2006) , اذ توجد عدة انواع من انزيمات البروتيز ومنها انزيم الايلاستيز (Elastase) و انزيم البروتيز (Protease) اللذان يعملان على تحليل الايلاستين (Elastin) الموجود في جدران الاوعية الدموية مما يؤدي الى نضوح مكونات الدم السائلة كالمصل والبلازما والتي تستغلها البكتيريا في النمو والتكاثر مما يساعد على انتشارها داخل الجسم (Pichova et al ., 2001) , كذلك تعمل هذه الانزيمات على تلف انسجة الرئة من خلال تحطيم مادتي الايلاستين والكولاجين بمساعدة ذيفانات Exotoxine A المنتجة من قبل بكتيريا *P. aeruginosa* (Jawetz et al ., 2008) .

Lipase enzyme

ب- الانزيم الحال للشحوم

يستهدف هذا الانزيم الطبقة الشحمية الموجودة بين الادمة وتحت الادمة وبذلك يسمح للبكتيريا باختراق انسجة الجسم ويصاحب هذه الاصابة تكوين الخراجات (Todar , 2008) , كما يعمل هذا الانزيم على تحطيم طبقة الدهون الموجودة في الجدار الخلوي للمضيف مما يساعد البكتيريا على الانتشار داخل جسم الكائن الحي (George et al ., 2005) .

ج- انزيم الليستينيز

Lecithinase enzyme

يشير مصطلح الليستينيز الى مجموعة غير متجانسة من الانزيمات التي تشترك في تحطيم واحد او اكثر من الروابط الاسترية (Aster linkage) في الدهون المفسفرة الكليسيريدية في الغشاء الخلوي (Ansell and Hawthorne , 2008) , اذ تنتج بكتيريا *P. aeruginosa* انزيم الليستينيز اثناء عملية الاصابة وبذلك تعطي مؤشراً بان هذا الانزيم من عوامل الامراضية المهمة لدى هذه البكتيريا (Pier et al ., 1992) .

د- انزيم الكتاليز

Catalase enzyme

لهذا الانزيم دورٌ مهمٌ في حماية الخلية البكتيرية من التأثير السمي لبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الناتج من الفعاليات الايضية للبكتيريا , اذ يقوم هذا الانزيم بتكسير بيروكسيد الهيدروجين الى ماء واوكسجين (Suh et al ., 1999) .

2-3-2 : الأمراض المتسببة عن بكتيريا *P. aeruginosa*

Diseases caused by *P. aeruginosa*

تتميز بكتيريا *P. aeruginosa* بقدرتها على إحداث أنواع مختلفة من الاصابات في مواقع متعددة من الجسم ولا سيما بعد العمليات الجراحية وإصابات الحروق ثم تنتشر الإصابة وتسبب حالات تجرثم الدم (DeMiguel Martinez et al ., 2005) , اذ تخترق بكتيريا *P. aeruginosa* الحروق الشديدة بسبب ضعف مقاومة الانسجة الجلدية المعرضة للحرق وتلفها بالإضافة الى تواجد هذه البكتيريا بكثرة في البيئة المحيطة بالمريض في وحدة الحروق أو كادر التمريض في المستشفيات (Sheridan, 2005) .

إنّ الإصابات الشديدة ببكتيريا *P. aeruginosa* تكون بسبب قدرتها على استعمار مواقع تشريحية مختلفة بسبب إمتلاكها (آليات التصاق فعالة ومتطلبات تغذية قليلة ومقاومة للمضادات الحيوية) ولها قدرة على غزو أنسجة المضيف وتحطيمها وإحداث الأمراض الجهازية (, Zeng , 2004).

تعد بكتيريا *P. aeruginosa* سبباً مهماً في أخماج الجهاز التنفسي المزمن المرتبطة بالتليف الكيسي (Cystic fibrosis) والذي يسبب أخماج الصدر في البالغين والأطفال ، ويصاحب المرض إفراز مخاط لزج لا يمكن ازالته من الرئة مما يؤدي الى عسر في وظيفة الجهاز التنفسي

(Hoiby et al ., 2001) ، كما تسبب بكتيريا *P. aeruginosa* العديد من الأخماج الاخرى منها أخماج الاذن وأخماج العين وأخماج القناة البولية واخماج الجلد (Willenbrock et al ., 2006) ، وتزداد نسبة الاصابة بهذه البكتيريا في حالات الأورام السرطانية و نقص المناعة وبعده عمليات نقل الاعضاء (Willenbrock and Ussery , 2007) .

4-2 : مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية

Rsestance of *P. aeruginosa* to Antibiotics

نتيجة للإستخدام العشوائي المضطرب والمتكرر للمضادات الحيوية بشكل واسع أخذت تظهر للعيان مشكلة كبيرة ألا وهي المقاومة للمضادات الحيوية (Mims et al ., 2004) ، اذ تمتلك بكتيريا *P. aeruginosa* صفة المقاومة الذاتية (Intrinsic resistance) تجاه العديد من المضادات الحيوية بالإضافة إلى قدرتها على اكتساب المقاومة (Acquired resistance) التكيفية خلال فترة العلاج الطبي (Bukharia and Mowafi , 2010) ، لذلك فهي تمتلك حساسية قليلة ومقاومة عالية تجاه معظم المضادات الحيوية وان هذه الخاصية المثيرة للقلق جعلتها تشكل خطراً شديداً على صحة الإنسان. (Livermore, 2002) ، مما أدى إلى شيوع انتشارها في بيئة المستشفيات وصعوبة معالجة الإصابات الناتجة عنها من قبل الكوادر الطبية بسبب امتلاكها الكثير من آليات المقاومة هذه (Thomas, 2007) .

Intrinsic resistance

1-4-2: المقاومة الذاتية

تمتلك بكتيريا *P. aeruginosa* مقاومة وراثية تجاه العديد من المضادات الحيوية من خلال عدة آليات كانخفاض نفاذية الغشاء الخارجي و أنظمة الدفع و انتاج الإنزيمات المثبطة للمضاد الحيوي (Moore and Flaws , 2011) ، إذ يُعد الإنخفاض في نفاذية الغشاء الخارجي لبكتيريا *P. aeruginosa* صفة وراثية تُحمل جيناتها على الكروموسوم البكتيري (Lambert , 2002) .

تنتشر أغلب المضادات الحيوية خلال الغشاء الخلوي عبر ثقب مُتخصصة تدعى (Porins) والتي تؤدي دوراً مهماً في دخول هذه المضادات إلى داخل الخلية البكتيرية وتتنظم بشكل قنوات

بروتينية مملوءة بالماء (Honcock and Brinkman , 2002), تنقسم هذه الثقوب إلى صنفين هما :

الصنف الأول: ثقوب عامة (general porins) والتي تمتلك خاصية نفاذية عالية جداً تسمح بمرور جميع الجزيئات المحبة للماء (Hydrophilic molecules) من خلالها ومن أمثلتها OprD (Yildirim et al ., 2005).

الصنف الثاني: ثقوب مُتخصصة (Specific Porins) والتي تمتلك نفاذية قليلة مثل OprF في بكتيريا *P. aeruginosa* (Zhang et al ., 2005), حيث تسمح بمرور جزيئات محددة فقط من خلالها لإمتلاكها مواقع ارتباط خاصة (Tomber et al ., 2006).

يوجد في بكتيريا *P. aeruginosa* العديد من أنظمة الدفع (Efflux-pumps) اذ يستهدف هذا النوع من المقاومة طريق الوصول إلى الموقع الهدف (Target site) للمضاد الحيوي من خلال طرحه خارج الخلية (Lister et al ., 2009 ; Mims et al ., 2004), حيث تعمل هذه الأنظمة على احتجاز المضاد الحيوي من قبل أغشية بروتينية خاصة يُساعد لها في ذلك الغشاء الداخلي وفسحة البلازم المحيطي (Solink , 2003), كما ان وجود مضخات الدفع قد يكون جوهرياً أصيلاً او بسبب الطفرات الوراثية (Wang et al ., 2007), ويعد نظام الدفع "MexA- MexB- OprM" من أكفأ الأنظمة في بكتيريا *P. aeruginosa* والذي يؤدي دوراً مهماً في زيادة المقاومة الذاتية تجاه العديد من المضادات الحيوية (Prinsloo , 2003).

تنتج بكتيريا *P. aeruginosa* العديد من الإنزيمات المثبطة للمضادات الحيوية منها أنزيمات البيتا لاكتمايز (β - Lactamase) التي تعمل على تثبيط فعالية مضادات البيتا لاكتام (Sacha et al ., 2008), من خلال تحليل الأصرة بين الكربون والنيتروجين لحلقة البيتا لاكتام محولة إياها إلى مركبات كيميائية فاقدة للوظيفة (Mims et al ., 2004). تفرز هذه الإنزيمات من فسحة البلازم المحيطي في البكتيريا السالبة لصبغة غرام (Livermor and Woodford , 2006), كما تنتج هذه البكتيريا الإنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات (Aminoglycoside Modifying Enzymes) اذ تعمل هذه الإنزيمات على تثبيط فعالية مضادات الأمينوكلايكوسيدات (Pool , 2011).

2-4-2 : المقاومة المكتسبة

Acquired resistance

ازداد هذا النوع من المقاومة في الاونة الاخيرة بشكل سريع وملحوظ , و يعزى سبب ذلك الى مستوى التعرض للمضادات الحيوية لاسيما اثناء مدة العلاج مما يسبب فشل المعالجة , اذ تمتاز بكتيريا *P. aeruginosa* بسهولة اكتسابها لمقاومة العديد من المضادات الحيوية (Bukharia and Mowafi , 2010).

ومن العوامل التي تؤدي الى اكتساب البكتيريا للمقاومة هي البلازميدات (Plasmids) وهي عبارة عن جزيئات DNA حلقيه غير كروموسومية إضافية تتواجد بشكل طبيعي في البكتيريا، ولها القدرة على التضاعف الذاتي وبشكل متزامن مع DNA الكروموسومي (Madigan and Martinko , 2006) ، ومن أهم الصفات المحمولة على البلازميدات هي المقاومة للمضادات الحيوية (Warsha , 2007) ، والجينات القافزة (Transposons) وهي جينات لها القابلية على الانتقال من مكان لآخر ضمن الكروموسوم الواحد او من البلازميد الى الكروموسوم او بالعكس (Giedraitiene et al ., 2011) ، والانتغرونات (Intigrons) فهي عناصر وراثية تحتوي على كاسيتات الجين (Gene casset) التي تستطيع الانتقال من (Intigron) إلى آخر، أو إلى مواقع ثانوية في المورث البكتيري ، كما إنّ أكبر كاسيتات الجين المعروفة تشفر إلى مقاومة المضادات الحيوية (Kotsakis et al ., 2010).

5-2 : المضادات الحيوية

Antibiotics

1-5-2 : مضادات الأمينو كليكوسيدات

Aminoglycoside Antibiotics

تنتج مضادات الأمينوكليكوسيدات بصورة طبيعية من البكتيريا (Wax et al ., 2008) ، مثل جنس *Streptomyces* وتمتلك فعالية مهمة تجاه البكتيريا السالبة لصبغة جرام (Vakulenko and Mobashery , 2003) . يعتبر مضاد الستربتومايسين (Streptomycin) أول مضاد أكتشف في هذه المجموعة واستخدم في علاج مرض السل (Hermann , 2005) ، كما تضم هذه المجموعة عدد كبير من المضادات الحيوية منها الجنتاميسين (gentamicin) والتوبراميسين (tobramycin) والأميكاسين (amikacin) والنتليميايسين (netilmicin) ، اذ تتشابه هذه المضادات فيما بينها من حيث آلية عملها

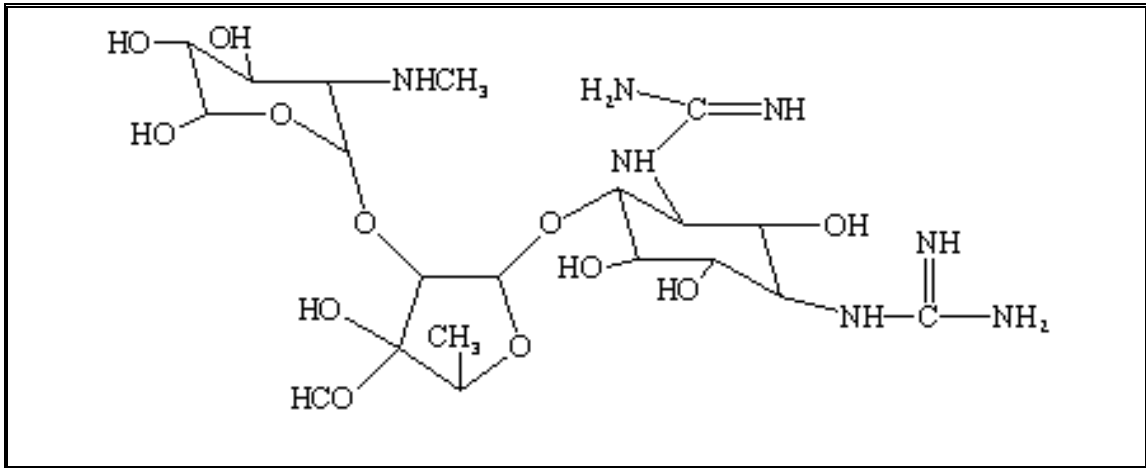
وخصائصها السمية والعلاجية ولكنها تختلف عن بعضها في الفعالية ضد المايكروبات
(Bennett and Brown , 2008) .

1-1-5-2: تصنيف مضادات الأمينوكلايكوسيدات

Classification of Aminoglycoside Antibiotics

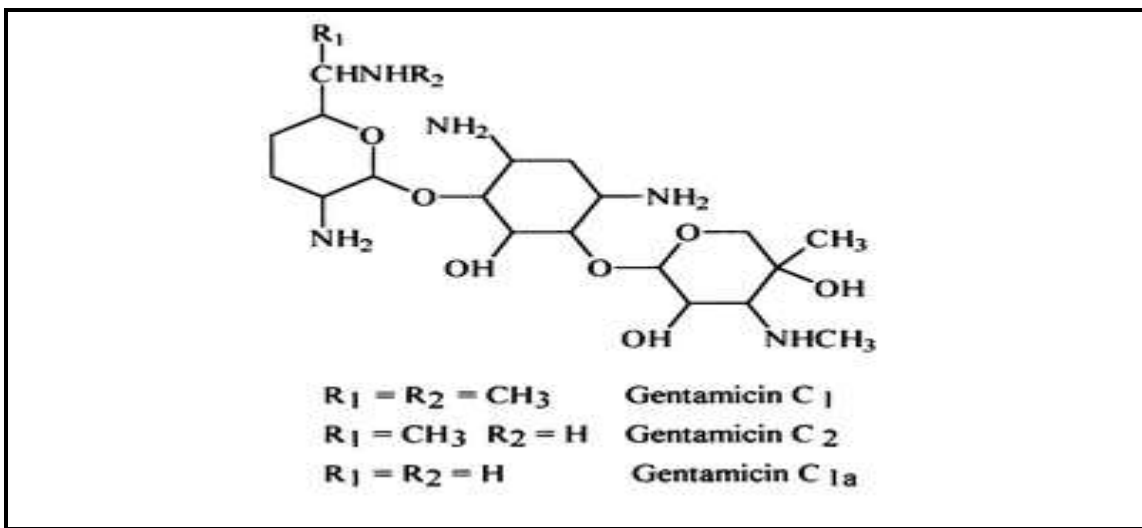
تعتبر مضادات الأمينوكلايكوسيدات عائلة معقدة يمكن تصنيفها بالإعتماد على التركيب
الكيميائي اذ تمتلك نواة Aminocyclitol nucleus ترتبط معها مجموعة من السكريات
الأمينية بوساطة أو اصرر كلايكوسيدية (Ramirez and Tolmasky , 2010) .

تصنف الأمينوكلايكوسيدات إلى صنفين صنف الستربتومايسين (Streptomycin) , الذي
يتألف من ثلاثة سكريات هي سكر الستربتدين (striptidine) المرتبط بسكر البننوز
(pentose) والذي بدوره يرتبط مع سكر الكلوسامين (glusamine) شكل (1-2) .



شكل (1-2) : التركيب الكيميائي لمضاد الستربتومايسين والذي يتضمن (من اليسار الى
اليمن) سكر الستربتدين و سكر البننوز و سكر الكلوسامين (Walsh , 2003) .

وصنف 2-deoxy Streptomine والذي تقع فيه النواة في الوسط ويكون فاقد للسكر بالموقع "2" (Hermann , 2005) , ويشمل هذا الصنف عدة مضادات تنتج من اجناس بكتيرية مختلفة (Arya , 2007) , بعضها ينتج من جنس *Streptomyces* وينتهي بالمقطع "mycin" مثل مضاد التوبراميسين (tobramycin) , والبعض الاخر ينتج من جنس *Micromonospora* وينتهي بالمقطع "micin" مثل مضاد الجنتاميسين (gentamicin) الذي يتألف من ثلاثة مكونات رئيسية (C2 , C1a , C1) شكل (2-2) .



شكل (2-2) : التركيب الكيميائي لمضاد الجنتاميسين (Isoherranen and Soback , 2000) .

2-1-5-2 : خصائص مضادات الأمينوكلايكوسيدات

Features of Aminoglycoside Antibiotics

تمتلك مضادات الأمينوكلايكوسيدات فعالية واسعة الطيف تجاه البكتيريا السالبة لصبغة جرام إضافة إلى الموجبة لصبغة جرام (Vokulenko and Mobashery , 2003) , اذ تعطي فعلاً تآزرياً مع المضادات المثبطة للجدار الخلوي مثل مضادات البيتا لاكتام (β - Lactams) أو مضادات الفانكوميسين (Vancomycin) (Gilbert , 2000) , استخدمت هذه المضادات بشكل أولي في معالجة الاصابات المتسببة عن البكتيريا السالبة لصبغة جرام وخاصة بكتيريا

P. aeruginosa , اذ استخدمت مضادات الجنتاميسين و التوبراماميسين لعلاج إصابات القناة التنفسية المرتبطة بالتليف الكيسي (Cheer , 2003) .

3-1-5-2 : آلية العمل الجزيئي لمضادات الأمينوكلايكوسيدات

Molecular Mechanisms Action of Aminoglycoside Antibiotics

يعتبر الرايبوسوم البكتيري الهدف الرئيس لمضادات الأمينوكلايكوسيدات ويتألف من وحدتين ثانويتين (30S ; 50S) مرتبطين مع معامل الترسيب (Wilson *et al.* , 2002) , تتألف الوحدة الثانوية الكبيرة (50S) من جزئيتين (5S ; 23S) من الحامض النووي الرايبوزي و (33) بروتين بينما تتألف الوحدة الثانوية الصغيرة (30S) من جزيئة واحدة من الحامض النووي الرايبوزي 16SRNA و(20-21) بروتين (, Poehlsaard and Douthwaite , 2005) .

تثبط مضادات الأمينوكلايكوسيدات عملية تصنيع البروتين بواسطة الارتباط مع الوحدة الثانوية (30S) المثبطة عملية انتقال (Translocation) الناقل الحامل للسلسلة الببتيدية (Peptidyl tRNA) من الموقع A (A-site) إلى الموقع P (P-site) مسببة قراءة خاطئة للحامض النووي الرايبوزي المراسل أي أنها تمنع تكوين معقد الإبتداء (Intiation complex) وتمنع تكوين الأصرة الببتيدية (Peptide bond) , مما يجعل البكتيريا غير قادرة على بناء البروتين الحيوي لغرض النمو (Sturenburg and Mark , 2003) .

ترتبط معظم الأمينوكلايكوسيدات مثل الجنتاميسين بالموقع A (A-site) وهو موقع الارتباط بالحامض النووي الرايبوزي الناقل (tRNA-binding site) على الوحدة الرايبوسومية 16S rRNA (Arya , 2007) , يشير تركيب الوحدة الثانوية الصغيرة 30S عالمياً إلى حفظ بقايا الأدينين (A1492 ; A1493) والتي تؤدي دوراً مهماً في عملية الترجمة (Ogle and Ramakrishnan , 2005) .

4-1-5-2 : مقاومة مضادات الأمينوكلايكوسيدات

Aminoglycosides Antibiotics resistance

تُستخدم مضادات الأمينوكلايكوسيدات لعلاج مختلف أنواع الإصابات التي تسببها بكتيريا *P. aeruginosa* (Giamarelloa , 2000) , وغالباً ما تتطلب إضافة مضادات أخرى معها وخاصة مضادات البييتالاكتام التي تعطي فعلاً تآزرياً مع هذه المضادات (Cheer , 2003) .

تختلف مقاومة العزلات السريرية لمضادات الأمينوكلايكوسيدات باختلاف عدة عوامل منها المضاد المستخدم و نوع الميكروب و الموقع الجغرافي وميكانيكية المقاومة وغيرها من العوامل (Vokulenko and Mobashery , 2003) , وتشيع مقاومة مضادات الأمينوكلايكوسيدات في مناطق العالم المختلفة ومنها العراق (Morita et al ., 2012 ; Wolska et al ., 2012) . (; AlShara , 2013) .

وان آليات مقاومة مضادات الأمينوكلايكوسيدات في البكتيريا المُمرضة للإنسان عديدة كتثبيط مضادات الأمينوكلايكوسيدات بواسطة الإنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات (AMES) أو عن طريق تقليل تركيز الأمينوكلايكوسيدات داخل الخلية البكتيرية بسبب التغير الحاصل في الغشاء الخارجي (Nikaido , 2003) , وكذلك أنظمة الدفع المتعددة (Magnet and Blanchard , 2005) , تتضمن الألية الرابعة حدوث عملية إضافة المثليل (Methylation) في الموقع A للوحدة الرايبوسومية الثانوية 16S rRNA (Yamane et al ., 2007) , بوجود انزيم المثليليز (Methylase) (Kang et al ., 2008) .

وتنتج البكتيريا المُمرضة سبعة أنواع من أنزيم المثليليز ويعبر عنها بواسطة سبعة جينات محمولة على البلازميد لها القابلية على مقاومة مضادات الأمينوكلايكوسيدات (Bogaerts et al ., 2007) , وهذه الجينات هي : (armA و rmtA و rmtB و rmtC و rmtD و rmtE و npmA) التي توجد في العائلة المعوية Enterobacteriaceae وبكتيريا *P. aeruginosa* و جنس *Acintobacter* spp. (Doie et al ., 2007 ; Wachino et al ., 2006) .

5-1-5-2: الإنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات

Aminoglycoside-Modifying Enzymes (AMEs)

تعتبر الإنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات من أهم آليات مقاومة مضادات الأمينوكلايكوسيدات في بكتيريا *P. aeruginosa* (Yamane *et al.*, 2007), وتُحمل هذه الإنزيمات عادة على العناصر الوراثية المتنقلة مثل البلازميدات الإقترانية (R-factor) والجينات القافزة الإقترانية (Transposons) والأنتغرونات (Integrans) كما يمكن أن يُشفّر لها عبر الكروموسوم (Sabtcheva *et al.*, 2003), وتتواجد جينات المقاومة للأمينوكلايكوسيدات في البكتيريا خلال الأيض الخلوي الطبيعي لها حيث يتواجد حوالي أكثر من 50 نوع من الإنزيمات المحورة مما يؤدي إلى زيادة مستويات المقاومة (Miro *et al.*, 2013).

وترتبط هذه الإنزيمات تساهمياً مع مجموعة الهيدروكسيل (OH group) أو مجموعة الأمين (NH₂ group) في أحد صنفَي الأمينوكلايكوسيدات (Tolmasky, 2007b), وتنقل هذه الإنزيمات مجموعة الأستيل (Acetyl group) المشتقة من المركب (Acetyl - CoA) ومجموعة الأدينيل (Adenyl group) ومجموعة الفوسفات (Phosphate group) المشتقة من مركب الطاقة (ATP) والتي تحفز تثبيط مضادات الأمينو كلايكوسيدات (Walsh, 2003), ترتبط الإنزيمات المحورة ارتباطاً ضعيفاً بالموقع A للرايبوسوم (Liano-Sotelo *et al.*, 2002), وتصنف هذه الإنزيمات بشكل واسع إلى ثلاث مجاميع هي:-

- 1- الإنزيمات الناقلة لمجموعة الأستيل N-acetyl transferases (AACs)
- 2- الإنزيمات الناقلة للنيوكليوتيدات O-nucleotid transferases (ANTs)
- 3- الإنزيمات الناقلة لمجموعة الفوسفات O-phospho transferases (APHs)

1-5-1-5-2: الإنزيمات الناقلة لمجموعة الأستيل N-acetyl transferases (AACs)

تعتبر هذه المجموعة من أكبر مجاميع الإنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات إذ تعود إلى عائلة كبيرة من البروتينات تتضمن حوالي 10 000 بروتين (Vetting *et al.*, 2005), تحفز هذه الإنزيمات حدوث عملية الأستلة (Acetylation) التي تتضمن إضافة مجاميع الأستيل إلى مجاميع الأمين باستخدام العامل المساعد (Acetyl CoA) كمادة واهبة وتحديث عملية

الأستلة في المواقع (1 , 2' , 3 , 6') للأمينوكلايكوسيدات (Ramirez and Tolmasky , 2010) .

تعمل إنزيمات الموقع الأول (1) AAC على عدة مضادات (Aparamycin , Ribostamycin , Lividomycin) , ولا توجد هذه الإنزيمات في السلالات المهمة سريرياً (Vokulenko and Mobashery , 2003) .

وتوجد إنزيمات الموقع الثاني (2') AAC في البكتيريا السالبة لصبغة جرام وجنس *Mycobacterium* وتعمل على تحويل العديد من مضادات الأمينوكلايكوسيدات منها الجنتاميسين و التوبراميسين و النتلياميسين (Adams , et al ; 2008) .

وتتضمن إنزيمات الموقع الثالث (3) AAC عشرة أصناف ثانوية جميعها تتواجد في البكتيريا السالبة لصبغة جرام إذ يتضمن الإنزيم AAC(3)-I خمسة إنزيمات (AAC(3)-Ia , AAC(3)-Ib , AAC(3)-Ic , AAC(3)-Id , AAC(3)-Ie) التي تمنح المقاومة لمضاد الجنتاميسين ومضادات الأمينوكلايكوسيدات الأخرى مثل مضاد Sisomicin ومضاد Fortimicin , إذ تتواجد هذه الإنزيمات بأعداد كبيرة في العائلة المعوية Enterobacteriaceae والعزلات السريرية للبكتيريا السالبة لصبغة جرام وجميعها يشفر لها من قبل حواظ جينية (Gene cassette) في الأنتغرونات (Integrans) فالجين *aac(3)-Ie* يتواجد في بكتيريا *P. aeruginosa* , *Salmonella spp.* , *Proteus vulgaris* (Gionchetti et al ., 2008 ; Wilson and Hall , 2010) .

ويتألف إنزيم AAC (3) -II من ثلاثة أنواع هي : AAC (3) -IIa ؛ AAC (3) -IIb ؛ AAC (3) -IIc , إذ تتواجد جميعها في بكتيريا *E.coli* , *P. aeruginosa* , *Alcaligenes. faecalis* (Oteo et al ., 2006 ; Dubois et al ., 2008) .

وتعد إنزيمات الموقع السادس (6') AAC من أكبر وأشهر مجاميع الإنزيمات المحورة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات , إذ لها القابلية على تحويل كل مضادات الأمينوكلايكوسيدات المهمة سريرياً (Vokulenko and Mobashery ,2003) . تتواجد في البكتيريا السالبة لصبغة جرام بالإضافة إلى تواجدها في البكتيريا الموجبة للصبغة وتُحمل جيناتها على

البلازميدات والكروموسومات وكذلك العناصر الوراثية المتنقلة (Centron and Roy , 2002) .

ويظهر إنزيم I- (6') AAC فعالية عالية ضد مضاد الاميكاسين ومضاد الجنتاميسين , اذ يعتبر إنزيم Ib-cr (6') AAC الصنف الثانوي للإنزيم I- (6') AAC والذي يظهر فعالية تجاه مضادات الفلوروكوينولونات (Ramirez and Tolmasky , 2010) , وهو أول إنزيم مكتشف له القابلية على مقاومة نوعين مختلفين من المضادات الحيوية (الأمينوكلايكوسيدات والكوينولونات) (Robicsek et al ., 2006) , ويرجع السبب في الإنتشار الواسع للإنزيم Ib- (6') AAC بين البكتيريا كون الجين المسؤول عن هذا الإنزيم يوجد على العناصر الوراثية المتنقلة مما يزيد من سرعة الإنتقال (Vokulenko and Mobashery, 2003) .

يتضمن إنزيم II- (6') AAC صنفين ثانويين من الإنزيمات هما إنزيم IIa- (6') AAC وإنزيم IIb- (6') AAC (Tolmasky , 2007b) , اللذين يعتبر وجودهما صفة تشخيصية لمقاومة مضادات الأمينوكلايكوسيدات في بكتيريا *P. aeruginosa* فقط من خلال الميكانيكية الرئيسية للمقاومة التي تتضمن الإنخفاض في النفاذية وأنظمة الدفع (Poonsuk et al ., 2013) .

2-5-1-5-2 : الإنزيمات الناقلة للنيوكليوتيدات O-nucleotid transferases (ANTs)

تتألف هذه المجموعة من خمسة أصناف من الإنزيمات طبقاً لموقع التحوير [; ANT(6) (Coyne et al ., 2010) [ANT (9) ; ANT (4') ; ANT (2") ; ANT (3") والجينات التي تشفر لإنزيمات الموقع السادس (6) ANT المرتبطة بتسلسل الحامض الأميني تتضمن (6) ant , ant (6)-Ia , aadE , وتتنصف هذه الإنزيمات بأنها غير متطابقة بالرغم من إن جميعها تعمل على مقاومة مضاد الستربتومايسين وتكون واسعة الإنتشار في البكتيريا الموجبة لصبغة جرام (, Tolmasky , 2003 ; Vokulenko and Mobashery , 2007a) , شُخص الجين ant (6)-Ib مؤخراً في العزلات المرضية لبكتيريا *Compylobacter.fetus* (Abril et al ., 2010) .

شُخص إنزيم الموقع التاسع (9) ANT لأول مرة في بكتيريا *Staphylococcus aureus* والذي يتضمن نوعين ANT (9)-Ia و ANT (9)-Ib اللذين يعبر عنهما من خلال الجينات

بكتيريا *Enterococcus faecalis* (Lebalance , 1991) .
ويعتبر الإنزيم الأول للموقع الرابع ANT (4)-I بمقاومة مضادات الاميكاسين والتوبراميسين وتعتبر الآلية الرئيسية لمقاومة مضادات الأمينو كلايكوسيدات في سلالات بكتيريا *S. aureus* في اليابان التي تكون 50% منها سلالات (MRSA) في أوربا (Schmitz et al ., 1991) بينما يوجد الإنزيم الثاني للموقع الرابع ANT (4')-II في بلازميد بكتيريا *P. aeruginosa* والعائلة المعوية Enterobacteriaceae (Jocoby et al ., 1990) وشخص الإنزيم ANT (4')-IIb مؤخراً في الجينات القافزة لبكتيريا *P. aeruginosa* (Coyne et al ., 2010) .

ويعتبر إنزيم الموقع الثاني ANT (2")-I من أكثر إنزيمات الأمينوكلايكوسيدات الناقلة للنيوكليوتيدات انتشاراً بالإضافة إلى إنزيمات الموقع السادس AAC(6) ومدى قليل من إنزيمات الموقع الثالث AAC(3) العائدة لمجموعة إنزيمات الأمينوكلايكوسيدات الناقلة لمجموعة الأستيل (AACs) التي تتواجد بشكل واسع في محددات مقاومة مضادات الأمينوكلايكوسيدات في بكتيريا *P. aeruginosa* (Miller et al ., 1995) , يُحمل الجين الذي يعبر عن الإنزيم ANT(2")-I على البلازميدات والجينات القافزة و الأنتيغرونات إذ يعمل هذا الإنزيم على تنشيط مضاد الجنتاميسين و مضاد التوبراميسين في العزلات السريرية المقاومة لمضاد الجنتاميسين (Busch - Sorensen et al ., 1996) والمقاومة لمضاد التوبراميسين (Macleod et al ., 2000) .

يُعتبر إنزيم الموقع الثالث ANT(3) من أكثر إنزيمات هذه المجموعة انتشاراً ويُعبر عنه من خلال (22) جيناً شُخصت في البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام تُحمل هذه الجينات على الحواظ الجينية والبلازميدات والأنتيغرونات والجينات القافزة (Ramirez and Tolmasky , 2010) .

3- 5-1-5-2 : الإنزيمات الناقلة لمجموعة الفوسفات

O-phospho transferases (APHs)

تعتبر هذه المجموعة ثاني أكبر مجموعة من الإنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات (AMEs) والتي تستخدم مركب الطاقة (ATP) ولها القابلية على فسفرة مجاميع الهيدروكسيل الخاصة في كل أصناف المضادات الحيوية , وتتضمن هذه المجموعة سبعة أصناف من الإنزيمات هي (APH(3') ; APH(2'') ; APH(3'') ; APH(4) ; APH(6) ; APH(7')) (Vokulenko and Mobashery , 2003) ; APH(9) .

ويعمل الإنزيم APH(6) على تحويل مجموعة الهيدروكسيل في الموقع السادس لمضاد الستربتومايسين ويتبع لهذا الإنزيم أربعة أنواع (APH(6) Ia و Ib و Ic و Id (Distler *et al.* , 1987) , بينما يُعبر عن إنزيم APH(9) من قبل جينات تُحمل على الكروموسوم وتسمح بمقاومة مضاد الستربتومايسين (Suter *et al.* , 1987) . يشكل إنزيم APH(3) أكبر مجموعة من الإنزيمات الناقلة لمجموعة الفوسفات ويتضمن سبعة أنواع تعمل على تحويل مجموعة الهيدروكسيل في الموقع (3) لمضادات الأمينوكلايكوسيدات والتي شُخصت في أنواع مختلفة من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام وتحمل الجينات المُعبّرة عنها على البلازميد والكروموسومات (Ramirez and Tolmasky , 2010) . شُخص الجين *aph(3')-Iib* في كروموسوم بكتيريا *P. aeruginosa* (Winsor *et al.* , 2005) , وشُخص الجين *aph(3')* في *Iic* بكتيريا *S.maltophilia* (Okazaki and Avison , 2007) .

ويتضمن الإنزيم APH(2'') أربعة أنواع (Smith and Baker , 2002) تعمل على تحويل مجموعة الهيدروكسيل في الموقع (2) لمضادات الاميكاسين والتوبراميسين . ينتج الإنزيم APH(2'')-Ib مستويات متوسطة من المقاومة بينما ينتج الإنزيم APH(2'')-Id مستويات عالية من المقاومة للمضادات الحيوية والجينات التي تعبر عن هذه الإنزيمات تقع على البلازميدات والكروموسومات (Ramirez and Tolmasky , 2010) . يظهر إنزيم APH(3'') مقاومة لمضاد الستربتومايسين ويتضمن نوعين APH(3'')-Ia و APH(3'')-Ib , اذ يعبر عنهما من خلال الجينات المحمولة على الكروموسومات و الجينات القافزة والبلازميدات (Ramirez and Tolmasky , 2010) .

Quinolone Antibiotics

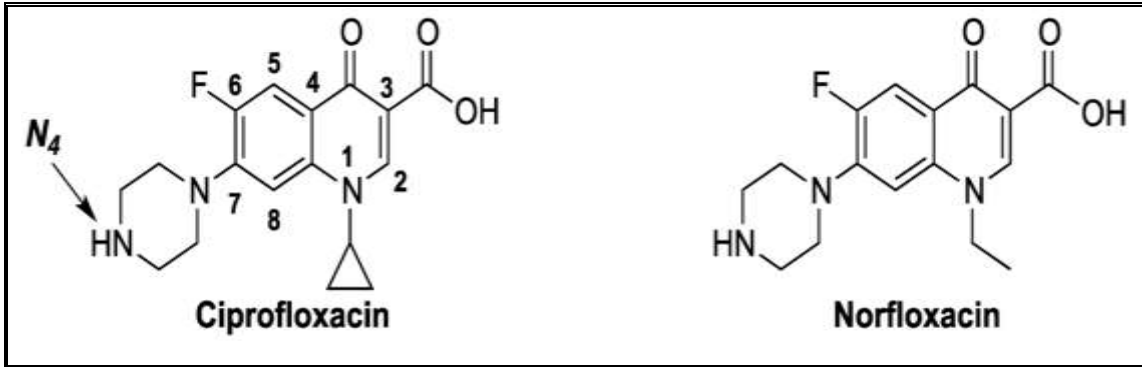
2-5-2 : مضادات الكينولونات

أُكتشفت مضادات الكينولونات في القرن الماضي وعُزلت من الكائنات الحية وبعد ذلك صُنعت من قبل الكيميائيين كعوامل مضادة للميكروبات (Andriol , 2005) , يعد مضاد Nalidixic acid أحد أفراد هذه المجموعة وقد صُنِع في عام 1962 ليدخل المجال السريري (Champney , 2008) , إذ إن محدودية استعمال هذا المضاد قاد إلى تطور أجيال من الكينولونات حيث تم اكتشاف الفلوروكينولونات (Greenwood *et al.* , 2007) .

1-2-5-2 : تصنيف مضادات الكينولونات

Classification of Quinolone Antibiotics

تقسم مضادات الكينولونات حسب فعاليتها إلى أربعة أجيال إذ تقع الكينولونات الحامضية ضمن الجيل الأول الذي يضم مضاد Nalidixic acid ومضاد Oxolinic acid (Ruiz , 2003) , بينما يضم الجيل الثاني الفلوروكينولونات التي تشمل عدة مضادات منها مضاد السبروفلوكساسين (Ciprofloxacin) ومضاد النورفلوكساسين (Norfloxacin) شكل (4-2).



شكل (3-2) : التركيب الكيميائي للمضادين الحيويين السبروفلوكساسين و النورفلوكساسين (Monique *et al.* , 2003) .

كما تضم هذه المجموعة المضادين الحيويين اوفلوكساسين (Ofloxacin) وليفوفلوكساسين (Levofloxacin) بالإعتماد على ذرات الكربون ضمن التركيب الحلقي المتغاير (Greenwood *et al.* , 2007) , يعد مضاد السبروفلوكساسين الذي استخدم لأول مرة في

المجال السريري عام 1980 أكثر فعالية من مضاد Nalidixic acid تجاه العائلة المعوية (Robissek et al., 2006).

يضم الجيل الثالث مضادات Gatifloxacin و Sparfloxacin و Grepafloxacin بينما يضم الجيل الرابع مضادات Moxifloxacin و Gemifloxacin و Trovafloxacin تمتاز مضادات الجيلين الثالث والرابع بفعاليتها تجاه بكتيريا *Streptococcus pneumonia* والبكتيريا اللاهوائية (Andriol, 2005).

2-2-5-2 : آلية العمل الجزيئي لمضادات الكينولونات

Molecular Mechanisms Action of Quinolone Antibiotics

تعمل مضادات الكينولونات على تثبيط بناء DNA البكتيري عن طريق إعاقة إنزيم DNAgyrase وإنزيم Topoisomerase-IV المثبطة تضاعف واستنساخ DNA (Harvey et al., 2006).

يُعتبر إنزيم DNAgyrase الهدف في البكتيريا السالبة لصبغة جرام بينما يُعتبر Topoisomerase-IV الهدف في البكتيريا الموجبة لصبغة جرام (Andriol, 2005), إذ تعمل الكينولونات بصورة أساسية على تثبيط إنزيم DNAgyrase البكتيري وهذا يمنع الالتفاف الفائق للـ DNA (Supercoiling of DNA) وهي العملية الضرورية لتثبيت الكروموسومات في الخلية البكتيرية (Bennett and Brown, 2008), بينما يعمل إنزيم Topoisomerase-IV بشكل أولي على فك ارتباط الكروموسومات البنوية المتضاعفة, إذ ترتبط الكينولونات بمعد DNA لإنزيمات DNAgyrase و Topoisomerase-IV وهذا المعدد يكون مسؤول عن تثبيط تضاعف DNA (Nordmann and Poirel, 2005).

3-2-5-2 : مقاومة مضادات الكينولونات Quinolone Antibiotics Resistance

تؤثر مضادات الفلوروكينولونات بشكل كبير على العصيات السالبة لصبغة جرام ومنها بكتيريا *P. aeruginosa* , إذ ازدادت معدلات مقاومة الفلوروكينولونات في عزلات هذه البكتيريا بسبب الاستخدام الواسع لهذه المضادات مما أدى إلى تحديد فائدتها وبشدة (Gasink , 2006) , إذ ينتج عن مقاومة الفلوروكينولونات فشل معالجة الأخماج المتسببة عن بكتيريا *P. aeruginosa* (Jalal ,2000) .

أشارت دراسة Van Eldere (2003) في بلجيكا الى أن معدلات مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* لمضاد السبروفلوكساسين ازدادت تدريجياً على مدى السنوات , إذ بلغ معدل المقاومة 13% عام 1991 و 16-18% في عام 1995 و 30% عام 1998 بينما بلغ معدل المقاومة في وحدات العناية المركزية في الولايات المتحدة الأمريكية 11% عام 1993 و 32% عام 2000 (Neuhauser , 2003) . أشار Algun (2004) بأن معدل المقاومة لمضاد السبروفلوكساسين تتراوح بين 12.5% - 30.7% في الهند .

وتحدث اهم آليات المقاومة لمضادات الكينولونات بوساطة الكروموسومات من خلال حدوث الطفرات في الجين *gyrA* والذي يعبر عن الإنزيم DNA gyrase وفي الجين *parC* الذي يعبر عن الإنزيم Topoisomerase-IV (Ghosh and Hore , 2011) او من خلال الإنزيم ACC(6)- Ib وهو احد إنزيمات الأمينوكلايكوسيدات الناقلة لمجموعة الأستيل , إذ يعمل هذا الإنزيم على تثبيط الكينولونات (Robicsek et al ., 2006) .

1-3-2-5-2 : مقاومة مضادات الكينولونات بوساطة الكروموسومات

Chromosome-Mediated Quinolone Antibiotics Resistance

تسبب المقاومة الكروموسومية للفلوروكينولونات استبدال الحامض الأميني في المناطق المحددة لمقاومة الكينولونات (QRDRs) لإنزيم DNA gyrase , والذي يعبر عنه من خلال الجينات *gyrA* و *gyrB* , او إنزيم Topoisomerase-IV والذي يعبر عنه من خلال الجينات *parC* و *parE* (Jacoby , 2005) .

إن الدور الذي تؤديه QRDRs في مقاومة العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* تجاه مضادات الفلوروكينولونات مهم (Mesaros , 2007) , إذ يعود الأنزيم DNA gyrase و الإنزيم Topoisomerase-IV إلى عائلة الإنزيم Topoisomerase-II (Ruiz , 2003) .

تحدث الطفرات الأشهر في السلالات المقاومة للفلوروكينولونات العائدة لبكتيريا *P. aeruginosa* في الموقع (83) للجين *gyrA* , حيث تحدث تغيرات بالأحماض الأمينية فيستبدل الحامض الأميني الثيريونين (Therionine) بالحامض الاميني آيزوليوسين (Isolusine) (Wydmuch *et al.* , 2005) هذا وقد حددت طفرات جديدة في الموقع (80) لنفس الجين وذلك باستبدال الحامض الأميني الهستيدين (Histidine) بالحامض الأميني الأرجنين (Arginine) (Salma *et al.* , 2012).

2-5-2 -2-3 : مقاومة مضادات الكينولونات بوساطة البلازميدات

Plasmid-Mediated Quinolone Antibiotics Resistance

أُكتشفت مقاومة مضادات الكينولونات بوساطة البلازميدات (PMQR) في أواخر عام 1998 من قبل Martinez – Martinez وجماعته ودرست هذه المجموعة البلازميد PMG252 في سلالات متعددة المقاومة لبكتيريا *K. pneumonia* المعزولة من عينات الإدرار عام 1994 في جامعة برمنغهام (Jacoby *et al.* , 2009). ويمكن تحديد فعالية المقاومة للكينولونات من خلال دراسة البروتين QnrA فقط حيث يرتبط هذا البروتين بكلا الوحدتين GyrA و GyrB لإنزيم gyrase في المراحل المبكرة للتفاعل بين إنزيم gyrase و DNA وتقليل الارتباط بينهما وبالتالي تثبيط الكينولونات (Tran and Hooper , 2002).

أُكتشفت الجينات *qnrB* و *qnrS* لأول مرة في العزلات السريرية لبكتيريا *Shigella flexeneri* في اليابان وكذلك في بكتيريا *K. pneumonia* المعزولة من جنوب الهند على التوالي , اذ ينتمي هذان الجينان إلى عائلة البروتينات خماسية البيبتيد وتتشارك بنسبة 40 % - 60% من الأحماض الأمينية مع البروتين QnrA (Hata *et al.* , 2005) , وأُكتشف الجين *qnrC* والجين *qnrD* لأول مرة في العزلات السريرية لبكتيريا *P. mirabilis* في الصين وكذلك في عزلات *Salmonella enterica* (Wang *et al.* , 2009).

ان الآلية الجديدة لمقاومة الكينولونات تحدث بوساطة الإنزيم AAC(6')-Ib-cr وهو أشهر انزيمات الأمينوكلايكوسيدات الناقلة لمجموعة الاستيل ولهذا الإنزيم القابلية على تثبيط مجموعة الامينوكلايكوسيدات ومجموعة الفلوروكينولونات (Park *et al.* , 2009 ; Jacoby *et al.* , 2006).

Materials and methods
Materials

3- المواد وطرائق العمل
1-3: المواد

Equipment and apparatus

3-1-1- الأجهزة والأدوات المختبرية

| الشركة المصنعة (المنشأ) | إسم الجهاز | ت |
|-------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| Olympus (Japan) | Compound light microscop | 1 مجهر ضوئي مركب |
| A& D Co. (Japan) | Sensitive electronic balance | 2 ميزان الكتروني حساس |
| Kotterman (Germany) | Water bath | 3 حمام مائي |
| Concord (Lebanon) | Refrigerator | 4 ثلاجة |
| GFL (Germany) | Distiller | 5 جهاز تقطير |
| | Deep freezer | 6 جهاز التجميد العميق |
| Hiclave (Japan) | Autoclave | 7 موصدة |
| Hettich (Germany) | Cooling centrifuge | 8 منبذة (مبردة) |
| Sony (Japan) | Nano Drop | 9 جهاز قياس كثافة DNA |
| | Digital camera | 10 كاميرا رقمية |
| Apel (Japan) | Spectrophotometer | 11 جهاز المطياف الضوئي |
| Memmert (Germany) | Incubator | 12 حاضنة |
| Himedia (India) | Standard wire loop (1μL) | 13 الناقل الزرعي القياسي |
| Eriotti (Italy) | Electric oven | 14 فرن كهربائي |
| Lab-Net (Tiwan) | Electrophoresis unit | 15 وحدة ترحيل كهربائي |
| GallenKaamp (England) | Hot plate | 16 مسخن حراري |
| Hettich (Germany) | High speed centrifuge | 17 منبذة عالية السرعة |
| GallenKaamp (England) | Magnetic stirrer | 18 محرك مغناطيسي |
| China | Calipres | 19 فيرنيا |
| Difco (USA) | Milliporefilter paper(0.22 μm) | 20 مرشحات غشائية دقيقة |

| | | | |
|------------------------|-------------------------|----------------------------|----|
| Ino-lab. (Germany) | pH-meter | جهاز قياس الحموضة | 21 |
| Lab-Line (USA) | Shaker incubator | حاضنة هزازة | 22 |
| Cruma (Spain) | Laminar flow cabinet | كابينة الزرع المجهرية | 23 |
| A & B Co. (Singapore) | Thermocycler (PCR) | جهاز الدورات الحرارية | 24 |
| MUV (Taiwan) | UV-transilluminater | مصدر الأشعة فوق البنفسجية | 25 |
| MelrosePark (USA) | Vortex mixer | مازج دوار | 26 |
| Sigma (England) | Ependroff tubes | أنابيب إندروف | 27 |
| Certyfied (Germany) | Automatic micropipette | ماصات دقيقة | 28 |
| Superstar (India) | Test tubes | أنابيب اختبار | 29 |
| SterellinLtd (England) | Sterilized cotton Swabs | مسحات قطنية معقمة | 30 |
| Al-Hani (USA) | Disposable Petri dishes | أطباق بلاستيكية | 31 |
| BBL (USA) | Conical flasks | دورق مخروطي | 32 |
| Superstar (India) | Slides and cover slides | شرائح زجاجية وغطاء الشريحة | 33 |

2-1-3: المواد البايولوجية و الكيمياوية

Biological and Chemical Material

| الشركة المصنعة (المنشأ) | اسم المادة | ت |
|---------------------------|---|-----------------------------|
| Biolife (Italy) | Agar | أغار 1 |
| Promega (USA) | Agarose gel | هلام الأكاروز 2 |
| BB (USA) | Gelatin | جيلاتين 3 |
| BIOBASICINC (USA) | TBE buffer | محلول الترحيل الدائري 4 |
| SDI (Iraq) | Hydrogenperoxide H ₂ O ₂ | بيروكسيد الهيدروجين (70%) 5 |
| Difco (USA) | Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆) | كلوكوز 6 |
| | Trypton | تريبتون 7 |
| | Peptone | ببتون 8 |
| Sigma (England) | Ethidium bromide | بروميد الاثيديوم 9 |
| | Safranin | سفرانين 10 |

| | | | |
|----------------------|--|--|----|
| Fluka (Switzerland) | Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃) | كليسيرول | 11 |
| | Barium chloride | كلوريد الباريوم | 12 |
| | Sodium hydroxide NaOH | هيدروكسيد الصوديوم | 13 |
| | Formaldehyde | فورمالديهايد | 14 |
| Mastdiagnostic (USA) | Iodine | اليود | 15 |
| | Urea solution | محلول اليوريا | 16 |
| Bioneer (Korea) | PCR water | ماء سلسلة البلمرة | 17 |
| | DNA ladder (100bp) | سلم الحامض النووي القياسي | 18 |
| | Loading dye | صبغة التحميل | 19 |
| BDH (UK) | α -naphthol (C ₁₀ H ₈ O) | الفانفتول | 20 |
| | Chloroform | كلوروفورم | 21 |
| | Crystal violet | البلور البنفسجي | 22 |
| | Ethanol (96 %) | كحول الايثانول | 23 |
| | Hydrochloric acid (HCl) | حامض الهيدروكلوريك | 24 |
| | Maltose | مالتوز | 25 |
| | Mannitol | مانيتول | 26 |
| | Methyl red (C ₁₅ H ₁₅ N ₃ O ₂) | المثيل الأحمر | 27 |
| | Isopropanol | أيزوبروبانول | 28 |
| | Isoamyl alcohol | أيزواميل الكحول | 29 |
| | Phenol | الفينول | 30 |
| | Sodium chloride NaCl | كلوريد الصوديوم | 31 |
| | Potassium iodide KI | يوديد البوتاسيوم | 32 |
| | Potassium hydroxide KOH | هيدروكسيد البوتاسيوم | 33 |
| | Monopotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄) | فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين | 34 |
| | Tetramethyl-P-phenylene-diamine-dihydrochloride | رباعي المثيل- بارافينيل- ثنائي امين- ثنائي كلوريد الهيدروجين | 35 |

Ready prepare media

3-1-3: الأوساط الزرعية الجاهزة

| الشركة المصنعة (المنشأ) | اسم الوسط الزراعي | ت |
|-------------------------|---|----|
| Himedia (India) | وسط آغار الماكونكي MacConkey agar | 1 |
| | وسط آغار الدم Blood agar | 2 |
| | الوسط المغذي الصلب Nutrient agar | 3 |
| | الوسط المغذي السائل Nutrient broth | 4 |
| | وسط ماء الببتون Peptone water | 5 |
| | وسط استهلاك السترات Simons citrate agar | 6 |
| | وسط كلكر Kliger's Iron Agar (KIA) | 7 |
| | وسط أساس اليوريا الصلب Urea agar base | 8 |
| Oxoid (UK) | وسط مولر- هنتون Muller-Hinton agar | 9 |
| | وسط المثيل الأحمر/ فوكس- بروسكاور السائل MR/VP broth | 10 |
| Mastdiagnostic (USA) | وسط نقيع القلب - الدماغ السائل Brain -heart infusion broth | 11 |
| | وسط نقيع القلب - الدماغ الصلب Brain- heart infusion agar | 12 |

4-1-3 : المضادات الحيوية المجهزة من قبل شركة Bioanalyse (Turkey)

| التركيز / مايكرو غرام | الرمز | اسم المضاد الحيوي | تحت الصنف للمضاد الحيوي | صنف المضاد الحيوي |
|-----------------------------|-------|--|-------------------------------|--|
| 100 | PY | كاربنسلين Carbencillin | Carboxypencillin | Penicillin |
| 100 | TPZ | بيراسلين- Piperracilin- tazobactam | | β -lactams/ β lactamase inhibitor combination |
| 30 | CAZ | سيفتازيديم Ceftazidime | الجيل الثالث Cephalosporin | Cephems |
| 30 | CTX | سيفوتاكسيم Cefotaxime | | |
| 30 | CRO | سفترياكسون Ceftriaxone | | |
| 10 | IMP | اميبينيم Imipenem | Carbapenem | Penems |
| 10 | MEM | ميروبنيم Meropenem | | |
| 30 | ATM | ازترونام Aztreonam | | Monobactams |
| 30 | AK | اميكاسين Amikacin | | Aminoglycosides |
| 10 | CN | جنتاميسين Gentamicin | | |
| 10 | TOB | توبراميسين Tobramycin | | |
| 30 | NET | نتليميسين Netlimicin | | |
| 5 | CIP | سبروفلوكساسين Ciprofloxacin | | |
| 10 | NOR | نورفلوكساسين Norfloxacin | | |

3-1-5: العدد الجاهزة

| ت | اسم العدة | الشركة المُصنعة (المنشأ) |
|---|--|--------------------------|
| 1 | عُدّة استخلاص الحامض النووي البكتيري Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit | Geneaid (USA) |
| 2 | عُدّة مزيج تفاعل سلسلة البلمرة AccuPower® PCR PreMix Kit | Bioneer (Korea) |
| 3 | عُدّة مزيج تفاعل سلسلة البلمرة AccuPower® Gold Multiplex PCR PreMix Kit | Bioneer (Korea) |
| 4 | عُدّة api 20 E | BioMerieux (France) |

DNA Primers

3-1-6 : بادئات الـ DNA

تم استخدام البادئات الخاصة بجين *16SrRNA* gene والمسؤول عن تشخيص بكتيريا *P.aeruginosa* , وكذلك استخدمت البادئات المسؤولة عن تحديد بعض جينات المقاومة لمضادات (الامينوكلايكوسيدات , الكينولينات) في هذه البكتيريا. ولقد صُممت جميع البادئات من خلال استخدام موقع NCBI-Genbank وبرنامج Primer3 plus design وتم تجهيز تلك البادئات عن طريق شركة Bioneer في كوريا.

جدول (1-3) : بادئات الـ DNA التي استعملت في هذه الدراسة .

| Genbank code | Sequence | | Amplicon | Primer |
|--------------|----------|------------------------|----------|---------------------|
| FM881781.1 | F | TCAACCTGGGAACTGCATCC | 468bp | <i>16S rRNA</i> |
| | R | ACATCTCACGACACGAGCTG | | |
| AF263520.1 | F | AGTTTGAGCAAGCGCGTAGT | 164bp | <i>aac (3')-I</i> |
| | R | GGGATCGTCACCGTAATCTG | | |
| AF466526.1 | F | CAAACGATGGGTGACGTATG | 212bp | <i>aac (3')-II</i> |
| | R | CGTCGAACAGGTAGCACTGA | | |
| AF263520.1 | F | ACTAGGGTTTGCCGAGCTTT | 257bp | <i>aac (6')-I</i> |
| | R | AGCAGCGTACTTGAGCAACC | | |
| DQ174113.1 | F | GCCATGGAACGGAGAGTTTG | 304bp | <i>aac (6')-Ib</i> |
| | R | CGGTACCTTGCTCTCAAAC | | |
| L06163.1 | F | CGCTCGAAGAGGTGAAAGAG | 359bp | <i>aac (6')-Iib</i> |
| | R | TGAAACGACCTTGACCTTCC | | |
| DQ315788.1 | F | CCGAAGACGACATCGGTATG | 410bp | <i>Aph3VI</i> |
| | R | TGCCTTCTCATAGCAGCGTA | | |
| AY114142.1 | F | TCCTGTACCTGCGAATTGTG | 462bp | <i>Ant(4')-Iib</i> |
| | R | CTAGCGCCTCAACGGTATTC | | |
| GQ227508.1 | F | GGTTGTGGCTTCAATCCATTAG | 130bp | <i>armA</i> |
| | R | TCGTCGTCTTAACTTCCCAAT | | |
| AB083212.2 | F | GATTTGCGGGGCCTATGTCA | 502bp | <i>rmtA</i> |
| | R | GTTTGCTTCCATGCCCTTGC | | |
| DQ914960.2 | F | GATCCATTCCGCATTCACGC | 552bp | <i>rmtD</i> |
| | R | AAATATCGCGACGTTTGCCC | | |
| NG_036511.1 | F | TTGAGGCGTTCTGTGCTGAT | 609bp | <i>npmA</i> |
| | R | TATGCCGTACCCTTCCAGGA | | |
| NC002516.2 | F | GAGGAACTGGAAGCGGTCAA | 315bp | <i>gyrA</i> |
| | R | CGGAATCTCGAAGGTACGCA | | |
| FJ652724.1 | F | CCGGAGACCTTCAGCAACAT | 403bp | <i>gyrB</i> |
| | R | TGAATTTCTTCGCCAGGCCT | | |
| AB003428.1 | F | CTCTCGGAAAAAGGCTGGGT | 458bp | <i>ParC</i> |
| | R | AACAATAGCAGACGGCCCTC | | |
| AY164481.1 | F | GAAATGGCGGACGAACAGC | 244bp | <i>ParE</i> |
| | R | GGACAAGGAATTCAGGCGA | | |

*F= Forward Primer.

*R = Reverse Primer.

Methods

2-3: طرائق العمل

Culture media preparation

1-2-3: تحضير الأوساط الزرعية

أ- تحضير الأوساط

حُضِرَت الأوساط الزرعية المذكورة في الفقرة (3-1-3) بحسب تعليمات الشركة المُصنَّعة لها وضُبطَ الأس الهيدروجيني لها بحسب الحاجة له ما عدا الأوساط التركيبية التي شملت وسطي أگار الدم واليوريا .

Media sterilization

ب- تعقيم الأوساط

عُقِمَت جميع الأوساط الزرعية المستعملة بجهاز الموصدة عند درجة حرارة 121°م وضغط 1 جو لمدة 15 دقيقة عدا السكريات واليوريا التي عُقِمَت بالترشيح .

Reagents and Solutions

2-2-3 : تحضير الكواشف والمحاليل

Reagents

1-2-2-3: الكواشف

أ- كاشف إختبار الأوكسيداز **Oxidase test reagent**:

حُضِرَ أنياً بإذابة 1غم من مادة Tetra methyl-P-phenylene diamine dihydro chloride في 90 مليلتر من الماء المقطر المعقم ثم أُكْمِلَ الحجم إلى 100 مليلتر. يُسْتخدَم للكشف عن قابلية البكتيريا على إنتاج إنزيم الأوكسيداز (Harley & Prescott, 1996).

ب - كاشف إختبار الكتاليز **Catalase test reagent**:

حُضِرَ بتركيز 3% من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وأُسْتعمل في الكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم الكتاليز (MacFaddin ,2000).

ج - كاشف كوفاكس **Kovac's reagent**:

حُضِرَ بإذابة 5غم من مادة Para-dimethyl aminobenzaldehyde في 75مليلتر كحول أيزوبروبيلي باستخدام حمام مائي ثم أُكْمِلَ الحجم إلى 100مليلتر بحامض HCl المركز ليصبح

لون الكاشف أصفر شاحب، بعدها حُفظ في قنينة معتمة في الثلاجة ، وإستُخدم في إختبار الأندول (Harley & Prescott, 1996).

د - كاشف المثيل الأحمر **Methyl red reagent**:

حُضِر بإذابة 0.1 غم من المثيل الأحمر في 300 مليلتر من الكحول الميثيلي بتركيز 95 % ثم أكمل الحجم إلى 500 مليلتر بإضافة 200 مليلتر من الماء المقطر (MacFaddin , 2000) . استعمل للتحري عن قابلية البكتيريا على تخمر سكر الكلوكوز.

هـ - كاشف فوكس- بروسكاور **Vogas- Proskaur reagent**:

يتكون هذا الكاشف من :

1- الفانفتول 5%

حُضِر بإذابة 5 غم من الفانفتول في 100 مليلتر من الكحول الايثيلي بتركيز 95 % .

2- هيدروكسيد البوتاسيوم 40 % KOH

حُضِر بإذابة 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100 مليلتر من الماء المقطر (MacFaddin , 2000) . استعمل للتحري عن قابلية البكتيريا على تحليل سكر الكلوكوز جزئياً .

Solutions

3-2-2: المحاليل

أ - المحلول الملحي الفسيولوجي **Normal Saline Solution**

حضر المحلول بإذابة 0.85 غرام من كلوريد الصوديوم في 90 مليلتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 مليلتر، وعقم بالموصدة. واستعمل هذا المحلول في إعداد اللقاح البكتيري المباشر (MacFaddin, 2000).

ب - أنبوبة ماكفرلاند القياسية **No.(0.5) McFarland Tube Standard**

حُضِرَت من المحاليل الآتية وحسب ما جاء في NCCLS (2003) :

أ- محلول كلوريد الباريوم المائي **BaCl₂. 2H₂O**

حُضِرَ المحلول بإذابة 1.175 غرام في 50 مليلتر من الماء المقطر المعقم وأكمل الحجم إلى 100 مليلتر للحصول على تركيز 0.048 مول/لتر من كلوريد الباريوم.

ب- محلول حامض الكبريتيك H_2SO_4

حُضِرَ المحلول بإضافة 18 مليلتر من حامض الكبريتيك المركز ببطء إلى 50 مليلتر من الماء المقطر المعقم، وأكمل الحجم إلى 100 مليلتر للحصول على تركيز 0.18 مول/لتر من H_2SO_4 .

أضيف 0.5 مليلتر من محلول (أ) إلى 99.5 مليلتر من محلول (ب) وعُدلت قراءة العكورة القياسية ما بين (0.08-0.10) وحدة تكوين المستعمرة عند طول موجي 625 نانومتر وهذه القراءة تمثل ما يقارب عكورة (1.5×10^8) [Colony forming unit (CFU)]. في مليلتر واحد من البكتريا النامية، ووزع المحلول في أنابيب إختبار معقمة ذات سدادات محكمة بحجم 4 مليلتر لكل أنبوبة وحفظ في أماكن معتمة بدرجة حرارة الغرفة واستعملت لغرض مقارنة كثافة النمو البكتيري في اللقاح المستعمل مع كثافة المحلول في الأنبوبة.

Collection of samples

3-2-3: جمع العينات

جُمعت 350 عينة من الحالات السريرية في مستشفى الديوانية التعليمي العام للمدة من تشرين الثاني 2014 الى اذار 2015 من المرضى المراجعين والراقدين في المستشفى المذكورة وبأعمار مختلفة لإكلا الجنسين. إستُخدمت المسحات القطنية الحاوية على وسط ناقل Transport media swabs في عملية جمع العينات لضمان حيوية العزلة.

Isolation of bacteria

3-2-4: عزل البكتيريا

لغرض عزل بكتيريا *P.aeruginosa* ، لُقحت الأوساط الزرعية أگار الدم Blood agar وأگار الماكونكي MacConkey agar بمسحات العينات بطريقة التخطيط ثم حُصّنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 18-24 ساعة , و حُصّنت الأطباق التي لم يظهر فيها نمو خلال 24 ساعة لمدة 24 ساعة اخرى قبل عدّها نتيجة سالبة .

Identification of Bacteria

3-2-5: تشخيص البكتيريا

شُخصت المستعمرات البكتيرية النامية اعتماداً على :

Phenotypic characteristics

3-2-5-1 : الخصائص المظهرية

لوحظت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية أشكالها و لونها و سطح المستعمرات ووجود روائح مميزة لها و قوامها و شفافيتها و نمط التحلل الدموي على وسط أگار الدم وتخمير اللاكتوز على وسط أگار الماكونكي (Winn *et al* ., 2006) .

Microscopic diagnosis

3-2-5-2 : التشخيص المجهرى

فُحصت العينات مجهرياً وذلك بأخذ مسحة من المستعمرات البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية وتثبيتها وتصبيغها بصبغة جرام لملاحظة اشكال وترتيب الخلايا البكتيرية وتفاعلها مع الصبغة (موجبة أو سالبة) .

Biochemical tests

3-2-5-3 : الأختبارات الكيموحيوية

أُجريت مجموعة من الإختبارات الكيموحيوية اللازمة لتشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة , وكالاتي:

1-إختبار الكتاليز Catalase test:

نُقِلَ جزء من مستعمرة فتية بعمر 24 ساعة بواسطة العيدان الخشبية المعقمة إلى شريحة زجاجية نظيفة ومن ثم أُضيفت قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3%. وتكون النتيجة موجبة بظهور فقاعات من غاز الأوكسجين (Brown, 2007).

2-إختبار الأوكسيديز Oxidase test:

نُقِلَ جزء من مستعمرة فتية بعمر 24 ساعة بواسطة عود خشبي مُعقم إلى ورقة ترشيح مشبعة بكاشف الأوكسيديز, وأنَّ تكوّن اللون البنفسجي خلال 10 ثوانٍ دليل على إيجابية الإختبار. (Brown, 2007).

3-إختبار انتاج الهيموليسين Hemolysin production test:

استُخدم في هذا الإختبار وسط أگار الدم؛ إذ تم تلقيح الوسط بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها , وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة 37°م لمدة 18-24 ساعة. لوحظت النتيجة

الموجبة عند حدوث تحلل دموي حول المستعمرة , اذ كان التحلل من نوع التحلل الكامل
β- hemolysis ، (Levinson and Jawetz, 2000).

4- إختبار فعالية إنزيم اليوريز Urease test:

استُخدم في هذا الإختبار وسط أگار اليوريا (Urea agar) المعقم الذي نُقِحَ بجزء من المستعمرة
البكتيرية النقية المراد إختبارها ثم حُضِنَ بدرجة حرارة 37°م لمدة 24-48 ساعة. ويستدل على
النتيجة الموجبة بتغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي (MacFaddin ,2000).

5- إختبار قابلية الحركة Motility test :

أجري هذا الإختبار بتلقيح الأنابيب الحاوية على وسط الحركة بطريقة الطعن المحضر بإذابة
0.5غم من أگار- أگار في 100 مل من وسط نقيع القلب - الدماغ السائل بالمزروع البكتيري ,
وحُضِنَ بدرجة حرارة 37°م لمدة 24-48 ساعة ، انتشار النمو خارج حدود الطعنة يدل على
النتيجة الموجبة (MacFaddin , 2000).

6- إختبار تخمر السكريات وإنتاج الغاز Sugar fermentation&gas production test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط (KIA) Kligler's Iron Agar بطريقة الطعن والتخطيط
على السطح المائل بالمزروع البكتيري . وحُضِنَت الأنابيب بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة
ان تغير لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر دليل على قدرة البكتيريا على تخمر سكري
الكلوكوز و اللاكتوز, بينما يكون إنتاج غازكبريتيد الهيدروجين على شكل راسب اسود اسفل
الوسط الصلب . (MacFaddin , 2000).

7- مجموعة إختبارات IMViC المكونة من:

• إختبار إنتاج الأندول Indol production test:

استُخدم في هذا الإختبار وسط ماء البيبتون (Peptone water) الذي نُقِحَ بجزء من المستعمرة
البكتيرية النقية المراد إختبارها، ثم حُضِنَت الأنابيب بدرجة حرارة 37°م لمدة 18- 24 ساعة
بعد ذلك أُضيفت عدة قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's reagent إلى كل انبوبة مع الرج
الجيد وأنَّ ظهور حلقة حمراء اللون دليل على إيجابية الفحص وقدرة البكتيريا على تحليل
الحامض الأميني التربتوفان Tryptophan وإنتاج الأندول (MacFaddin ,2000).

•إختبار المثيل الأحمر Methyl red test:

اجري هذا الإختبار بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي MR.VP. medium بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها وحُضِنَت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24-48 ساعة. بعد إنتهاء فترة الحضان أُضيفت 5 قطرات من كاشف المثيل الأحمر وسُجِلَت النتيجة الموجبة بظهور اللون الأحمر دلالةً على إنتاج الحامض، في حين أنَّ بقاء اللون الأصفر يمثل النتيجة السالبة (Collee et al ., 1996).

•إختبار فوكس – بروسكاور Voges – Proskauer test:

لُقِحت الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي MR.VP. medium بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها ثم حُضِنَت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24–48 ساعة, بعد ذلك أُضيف 1مليتر من الكاشف إلى كل انبوبة مع التحريك الهادئ ثم تُرك ساكناً لمدة 10-15 دقيقة، وإستدلَّ على النتيجة الموجبة بظهور اللون الأحمر (Collee et al ., 1996) .

•إختبار إستهلاك السترات Citrate utilization test:

لُقِحَ في هذا الإختبار وسط سيمون ستريت المائل بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها وحُضِنَ بدرجة حرارة 37°م لمدة 24–48 ساعة, واستدلَّ على إيجابية الفحص بتغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق دلالةً على إستهلاك البكتيريا للسترات على أنه مصدرٌ وحيثُ للكاربون (Winn et al ., 2006).

api 20 E diagnosis system

4-5-2-3 : التشخيص بنظام api 20 E

بعد الحصول على نتائج الفحوصات الكيموحيوية التي تنطبق على بكتيريا *P.aeruginosa* أستخدمت شرائط الـ api 20 E , لتشخيص هذا النوع بالشكل النهائي اذ يحوي هذا الشريط على 20 انبوبة خاصة بالفحوصات الكيموحيوية التأكيدية. تتضمن طريقة العمل الخطوات التالية :

Preparation of bacterial suspension

أ – تحضير العالق البكتيري

لُقِحَ 5 مليتر من محلول الملح الفسلجي ب 1-4 مستعمرة من بكتيريا *P.aeruginosa* بواسطة المسحة القطنية (swap) مع المزج المستمر للحصول على عالق تركيزه (1.5×10^8) خلية / مليتر وذلك بالمقارنة مع المحلول ثابت العكورة القياسي ذو الرقم (0.5) .

Inoculation of the api strip

ب - تلقيح شريط api

بعد تحضير العالق البكتيري وباستخدام ماصة (Pipette) نظيفة وجافة لقيح مقدار 0.12 مليلتر من عالق البكتيريا لكل انابيب الأختبار فيما بلغت كمية اللقاح البكتيري 0.28 مليلتر لانابيب الأختبارات CIT, VP, GEL , واضيف الزيت المعدني المعقم (Sterile mineral oil) الى الاختبارات التي تحتها خط والتي شملت URE, ADH, LDC, ODC, H₂S.

Incubating the strip in its chamber

ج- حضن شريط api

وضع شريط الـ api داخل غطاء او حاوية خاصة ضمن العدة بعد وضع القليل من قطرات الماء بالحفر الموجودة في هذا الغطاء , ثم حضن شريط الـ api بدرجة حرارة 37°م لمدة 24-48 ساعة .

Addition of reagents

د- اضافة الكواشف

- اضيفت قطرة من كاشف TDA الى اختبار ازالة مجموعة الامين من الحامض تربتوفان (Tryptophan deaminase) , تحول اللون الى البني يدل على النتيجة الموجبة .
- اضيفت قطرة من كاشف JAMES الى اختبار إنتاج الأندول (Indol production test) , ظهور حلقة حمراء اللون دليل على النتيجة الموجبة .
- اضيفت قطرة من كل كاشف VP1 + VP2 على التوالي الى اختبار فوكس - بروسكاور (Voges - Proskauer test) , تحول اللون الى الوردى يدل على النتيجة الموجبة .
- اضيفت قطرة من كاشف NIT1 و قطرة من كاشف NIT2 الى اختبار GLU , تحول اللون الى الازرق يدل على النتيجة الموجبة .

Reading of Result

ز- قراءة النتيجة

شُخصت البكتيريا من خلال الشفرة الرقمية (Code number) التي تتكون بعد وضع علامة (+) او علامة (-) لكل من الأختبارات الكيموحيوية الموجودة ضمن شريط الـ api حيث ان لكل بكتيريا شفرة رقمية خاصة بها , ثم قورنت الارقام في اوراق خاصة بالشريط وشُخصت باستخدام الدليل الملحق .

6-2-3 : حفظ وإدامة العزلات البكتيرية

Preservation and Maintenance of Bacterial Isolates

أ- الحفظ قصير الأمد

تم تلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتيريا المراد حفظها وحُضنت في درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، ثم حفظت بدرجة 4 م°، وكررت عملية الحفظ لتجديد حيوية العزلات، وتجنب حدوث التلوث (Collee et al ., 1996).

ب- الحفظ طويل الأمد

لُحقت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي السائل المدعم بالكليسيروول بتركيز (15%) بالبكتيريا قيد الدراسة، وحُفظت بدرجة - 20 م° (NCCLS , 2003) .

7-2-3 : إختبار فحص الحساسية Antibiotic Susceptibility Testing

اختبرت الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بطريقة الأقراص اعتماداً على طريقة Bauer وجماعته (1966) و (2012) CLSI , وتضمنت :

نقل 2-4 مستعمرات من بكتيريا *P. aeruginosa* إلى أنبوب إختبار يحوي 5مل من مرق تربتون الصويا المغذي وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 8 ساعات. خفف النمو الحاصل باستعمال محلول الملح الفسليجي ، تمت مقارنة النمو في الأنبوب مع أنبوبة ماكفرلاند (0.5) القياسية ، وغمست المسحة القطنية في مرق تربتون الصويا المزروع، وأزيل الفائض بالضغط على الجوانب الداخلية للأنبوبة ، نشرت البكتيريا على وسط مولر- هنتون الصلب بطريقة التخطيط لأكثر من مرة ، وباتجاهات مختلفة لغرض التأكد من نشر البكتيريا المراد إختبار حساسيتها بالتساوي ، وثُركت الأطباق 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة لضمان إمتصاص الرطوبة، وُضعت أقراص المضادات الحيوية المذكورة في الفقرة (3-1-4) بواقع خمسة أقراص في طبق قياس 100 ملي متر، و 12 قرص في طبق قياس 150 ملي متر، والمسافة بين كل قرص وآخر 20 ملي متر من مركز القرص الأول إلى مركز القرص الآخر، حُضنت الأطباق في 37 م° لمدة 18 ساعة لجميع أنواع المضادات الحيوية، ثم قيست أقطار التثبيط باستعمال الفيرنيا وقورنت مع القيم القياسية المذكورة في (2012) CLSI .

3-2-8: تفاعل السلسلة المتبلمرة (PCR) Polymerase Chain Reaction

3-2-8-1: إستخلاص الحامض النووي البكتيري (Genomic DNA extraction)

إستخلص الحامض النووي DNA من بكتيريا *P. aeruginosa* وذلك باستخدام عُدّة الاستخلاص (Genomic DNA extraction kit) , المجهزة من شركة Geneaid الأمريكية , وتم إجراء الاستخلاص حسب تعليمات الشركة وكآلاتي:

1- نُقل 1 مليلتر من العالق البكتيري لكل عزلة من بكتيريا *P. aeruginosa* النامية على وسط مرق نقيع الدماغ – القلب ووضعت في أنابيب إندروف مُعقمة حجم 1.5 مليلتر وبعدها نُقلت إلى جهاز الطرد المركزي المُبرّد بسرعة 15000 دورة / دقيقة وذلك لجمع الخلايا البكتيرية ثم التخلص من السائل الطافي.

2- أُضيف 20 مايكروتر من محلول انزيم 25mg/ml ProteinaseK وبعدها مزج الخليط بواسطة المازج vortex لمدة 5 ثوانٍ.

3- حُضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق وخلال فترة الحُضن تم تقليب الانابيب لضمان تحليل كامل للخلايا في المزيج.

4- أُضيف 200 مايكروتر من محلول GB buffer المُجهّز مع العدة إلى مزيج الخلايا المتحللة ومُزج جيداً بواسطة جهاز المازج (vortex) لمدة 5 ثوانٍ.

5- حُضن المزيج بدرجة حرارة 60°م لمدة 10 دقائق بإستخدام الحمام المائي.

6- أُضيف 200 مايكروتر من الكحول الأثيلي المطلق إلى المزيج المُتحلّل ومُزج جيداً بجهاز المازج لمدة 10 ثوانٍ.

7- نُقل الخليط من إنبوبة الإندروف إلى أنابيب الجمع (Collection tubes) حجم 2 مليلتر الحاوية على أعمدة تحوي مرشحات لتنقية الحامض النووي (GD filter column) والمجهزة مع العدة.

8- وُضعت أنابيب الجمع مع الأعمدة الحاوية على الخليط في جهاز الطرد المركزي المُبرّد ودوّرت بسرعة 15000 دورة / دقيقة للتخلص من نواتج الخلايا المتحللة.

9- تم التخلّص من المحلول الراسب للخلايا المتحللة ونُقِل (GD column) الحاوي على الحامض النووي إلى أنبوبة جمع جديدة.

10- أُضيف 400 مايكروتر من محلول (BufferW1) , المُجهّز مع العدة إلى العمود الحاوي على الحامض النووي لغسل الحامض النووي, بعدها وُضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 دورة / دقيقة لمدة 30 ثانية.

11- تمَّ التخلص من الراسب ومن ثم أُضيف 600 مايكرو لتر من محلول الغسل الحاوي على الكحول الأيثيلي المطلق (Wash buffer) , المُجهز مع العدة إلى العمود الحاوي على الحامض النووي للتخلص من الدهون ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 15000 دورة/ دقيقة لمدة 30 ثانية.

12- تمَّ التخلص من الراسب وإعادة الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي المُبرّد مرة ثانية لتجفيف الأعمدة بسرعة 15000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق.

13- نُقلت الأعمدة الحاوية على الحامض النووي إلى إنابيب إيندروف مُعقمة مع إضافة 50 مايكرو لتر من محلول الإذابة (Elution Buffer) المُجهز مع العدة إلى وسط العمود وثرُكَّ لمدة 5 دقائق بعدها وُضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي المُبرّد بسرعة 15000 دورة / دقيقة لمدة 30 ثانية لإذابة الحامض النووي وحُفظَ في درجة حرارة -20°م لحين إجراء تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة المتعدد.

2-8-2-3: فحص الحامض النووي المستخلص DNA examination

تم الكشف عن الحامض النووي DNA المستخلص وذلك من باستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer الخاص بالكشف وقياس تركيز الحامض النووي , اذ يتم الكشف عن الحامض النووي من خلال تحديد تركيز الحامض النووي DNA (ng/μl) وقياس نقاوة الحامض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين 260/280nm.

وتم استخدام الجهاز على النحو التالي :

- 1- اختيار برنامج قياس الحامض النووي نوع DNA .
- 2- صُفرت ركيزة المقياس مرتين وذلك بوضع 2 مايكرو ليتر من (ddH₂O) باستخدام ماصة معقمة على سطح ركيزة المقياس و اجراء التصفير, وبعدها نُظفت الركيزة باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز .
- 3- وضع 1 مايكرو ليتر من كل عينة من الـ DNA المستخلص على ركيزة مقياس الجهاز ومن ثم ضغط زر OK لبدء عملية قياس تركيز الـ DNA , ومن ثم نظفت مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.

4- حُدّدت نقاوة عينات الـ DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية بجهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين 260/280 nm , اذ ان الحامض النووي DNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي 1.8

3-8-2-3 : فحص تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase chain reaction test

أجري نوعان من فحص تفاعل سلسلة البلمرة, الأول Monoplex PCR لتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* باستخدام الجين *16SrRNA* gene والثاني Multiplex PCR للتحري عن بعض جينات المقاومة لمضادات (الامينوكلايكوسيدات , الكينولينات) في هذه البكتيريا , وحسب طريقة (Vaziri et al ., 2011) .

1-3-8-2-3 : تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة Monoplex PCR master mix

حُضر مزيج تفاعل سلسلة البلمره باستخدام عدة الـ AccuPower® PCR PreMix المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة كآلاتي :
1- حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة في انابيب PCR المجهزة مع العُدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة واضيفت المكونات الاخرى لمزيج التفاعل وحسب تعليمات الشركة كما في الجدول التالي :

جدول (2-3) : مكونات مزيج تفاعل انزيم البلمرة Monoplex PCR master mix وحجومها

| PCR master mix | Volume |
|-------------------------------|----------------------------|
| DNA template | 5 μ L |
| 16S rRNA forward Primer10pmol | 1.5 μ L |
| 16S rRNA reverse Primer10pmol | 1.5 μ L |
| PCR water | 12 μ L |
| Total | 20μL |

2- بعد اكمال تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمره غُلقت الانابيب ومُزجت بعناية بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثواني.

3- نُقلت الانابيب لجهاز PCR Thermocycler لاجراء حالات الدورات الحراريه PCR thermocycler conditions .

2-3-8-2-3: برنامج الدورات الحرارية لتضخيم الـ DNA

أجري تفاعل إنزيم البلمرة باستخدام المضخم الحراري Thermocycler لجهاز الـ PCR . باستخدام الجين *16SrRNA* gene كما في الجدول التالي :

جدول (3-3) : الظروف المستعملة في جهاز المضخم الحراري PCR

| PCR Step | Repeat cycle | Temperature | Time |
|----------------------|--------------|-------------|----------------|
| Initial denaturation | 1 | 95C | 5min |
| Denaturation | 30 | 95C | 30sec. |
| Annealing | | 58C | 30sec |
| Extension | | 72C | 1min |
| Final extension | 1 | 72C | 5min |
| Hold | - | 4C | Forever |

3-3-8-2-3 : تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة Multiplex PCR master mix

حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة باستخدام عدة الـ AccuPower® Gold Multiplex PCR PreMix Kit المجهزة من قبل شركة Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة كآلاتي :

1- حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة في انابيب PCR المجهزة مع العدة والحاوية على مكونات تفاعل سلسلة البلمرة واضيفت المكونات الاخرى لمزيج التفاعل وحسب تعليمات الشركة كما في الجدول التالي:

جدول (3-4) : مكونات مزيج تفاعل انزيم البلمرة Multiplex PCR master mix وحجمها .

| PCR master mix | Volume |
|----------------------|-------------|
| DNA template | 5µL |
| Forward Primer10pmol | 1µL |
| Forward Primer10pmol | 1µL |
| Forward Primer10pmol | 1µL |
| Reverse Primer10pmol | 1µL |
| Reverse Primer10pmol | 1µL |
| Reverse Primer10pmol | 1µL |
| PCR water | 9µL |
| Total | 20µL |

2- بعد اكمال تحضير مزيج تفاعل سلسلة البلمرة غُلفت الانابيب ومُزجت بعناية بجهاز المازج vortex لمدة 10 ثواني.

3- نُقلت الانابيب لجهاز PCR Thermocycler لاجراء حالات الدورات الحرارية PCR thermocycler conditions .

3-8-2-3: برنامج الدورات الحرارية لتضخيم ألد DNA

أجري تفاعل إنزيم البلمرة بإستخدام المضخم الحراري Thermocycler لجهاز الـ PCR . كما في الجدول التالي :

جدول (3-5) : الظروف المستعملة في جهاز المضخم الحراري PCR .

| PCR Step | Repeat cycle | Temperature | Time |
|----------------------|--------------|-------------|---------|
| Initial denaturation | 1 | 95C | 5min |
| Denaturation | 30 | 95C | 30sec. |
| Annealing | | 60C | 30sec |
| Extension | | 72C | 1min |
| Final extension | 1 | 72C | 5min |
| Hold | - | 4C | Forever |

Agarose Gel electrophoresis

3-8-2-4 : الترحيل الكهربائي بالهلام

اجري الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاغاروز بنسبة 1% وذلك لقراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمرة PCR product كما يأتي:

1- اذيب 1 غم من الاغاروز Agarose في 100 مليلتر من محلول الـ TBE buffer الدارئ بتركيز 1X وباستخدام الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة (Magnetic hot plate stirrer) لمدة 15 دقيقة.

2- تُرك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50م° وبعدها اضيفت صبغة الحامض النووي المشعة Ethidium bromide ومزجت جيدا مع الهلام.

3- تم صب هلام الاكاروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط Comb لتحديد اماكن عينات PCR , وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ومن ثم ازيل المشط من الهلام بعناية.

4- حُملت العينات باستخدام دارئ التحميل Loading dye على ورق البارافلم Parafilm paper وذلك باضافة 1حجم من صبغة التحميل لكل اربعة حجوم من الناتج PCR product ووضعت في حفر الهلام.

5- استخدم سلم القياس 100 DNA ladder لقياس ناتج PCR ووضع في الحفرة الاولى.

6- بعد اكتمال عملية التحميل , غُمر هلام الاكاروز باستخدام محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وغلُق غطاء الترحيل وبعدها شغل جهاز الترحيل باستخدام تيار 80 امبير و100فولت لمدة ساعة واحدة.

7- بعد انتهاء عملية الترحيل , فحص الهلام الحاوي على ناتج الـ PCR باستخدام مصدر الاشعة فوق البنفسجية U.V light source لتحديد الناتج مع وحدة القياس.

Statistical Analysis

3-3: التحليل الاحصائي

تم تطبيق التحليل الاحصائي باستخدام اختبار مربع كاي (Chi-square) لتحديد الدلالة الاحصائية للبيانات عند مستوى معنوية معنوية $P > 0.05$ (Niazi , 2000).

4 : النتائج والمناقشة

Results and discussion

1-4 : الدراسة الإحصائية

Statistical study

شملت الدراسة الحالية جمع 350 عينة من حالات سريرية مختلفة في مستشفى الديوانية التعليمي خلال المدة من شهر تشرين الثاني 2014 ولغاية شهر آذار 2015 وكانت عملية جمع العينات بشكل عشوائي للتحري عن بؤر التلوث ببكتيريا *P. aeruginosa* وما يترتب على ذلك من إجراءات تشخيصية ووقائية وعلاجية , شملت العينات السريرية حسب مصادر جمعها اخماج مختلفة منها اخماج الأذن الوسطى 162 مسحة وبنسبة (46.3%) والحروق 98 مسحة وبنسبة (28%) أما العينات المأخوذة من اخماج الجهاز التنفسي أو القشع فكان عددها 50 عينة وبنسبة (14.3%) و اخماج المسالك البولية 40 عينة مثلت نسبة (11.4%).

توزعت العينات حسب جنس المريض إلى 187 عينة من الذكور مثلت نسبة (53.4%) من العينات و 163 عينة من الإناث بنسبة (46.6%) , من مجموع العينات مثلت عينات المرضى الوافدين نسبة (59.4%) إذ جمعت 208 عينة في حين جمعت 142 عينة من المرضى الراقدين في المستشفى وبنسبة (40.6%) , توزعت عينات المرضى الوافدين ما بين (118) (56.7%) , 20 (9.6%) , 38 (18.2%) , 32 (15.3%) من مسحات الأذن الوسطى والحروق و عينات القشع و الإدراج على التوالي بينما كانت نسب نفس المسحات والعينات عند المرضى الراقدين كالتالي (44) (30.9%) , 78 (54.9%) , 12 (8.4%) , 8 (5.6%) , على التوالي جدول (1-4).

جدول (1-4) توزيع العينات السريرية حسب المصدر والجنس وحالة المرضى .

| العينات | النوع | العدد | النسبة المئوية |
|-------------|----------|-------|----------------|
| المصدر | الأذن | 162 | 46.3 |
| | الحروق | 98 | 28 |
| | القشع | 50 | 14.3 |
| | الإدراج | 40 | 11.4 |
| الجنس | ذكور | 187 | 53.4 |
| | إناث | 163 | 46.6 |
| حالة المرضى | الوافدين | 208 | 59.4 |
| | الراقدين | 142 | 40.6 |

من الظواهر الشائعة في معظم المستشفيات العامة ازدياد نسبة حدوث الإصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* , فقد عد (Lucky et al (2012) بكتيريا *P. aeruginosa* الممرض الخامس والاكثر تردداً بين البكتيريا السالبة لصبغة جرام بينما كانت الممرض الثاني والاكثر تردداً في عام 2004 والممرض الثالث في الأعوام 2005 , 2007 و 2009 على التوالي , والممرض الرابع في عام 2006 و عام 2010 , ولهذه البكتيريا القابلية على استعمار مواقع مختلفة من الجسم , اذ تفضل المناطق الرطبة مثل : الاغشية المخاطية للأنف , الاذن , الحلق , الادرار , بالاضافة الى البراز (Rossolin and Mantengoli , 2005) .

وعُزِرت نتائج الدراسة الحالية بنتائج الدراسات السابقة التي أجراها Abdul-Wahid (2014) و منحر (2011) و سالم (2014) , والتي اكدت بان اسباب انتقال التلوث البكتيري في المستشفيات إما أن يكون ذاتياً بكونها تمثل جزءاً صغيراً من الفلورا الطبيعية أو مكتسباً من طرف خارجي كاستعمال المرضى للصحيات أو عن طريق الأشخاص المشرفين على رعاية المريض وبصورة عامة فإن الهواء والمياه والأيدي والأطعمة جميعها تساعد على انتقال البكتيريا من شخص لآخر وبالتالي اتساع دائرة العدوى البكتيرية (Thomas , 2007).

لم تسجل الدراسة الحالية أي نسبة عزل للعينات البيئية والسبب في ذلك يرجع إلى الرقابة الصحية المشددة في مستشفى الديوانية التعليمي وارتفاع مستوى العناية والنظافة , بالاضافة الى استخدام المعقمات والمطهرات بشكل مستمر لمنع انتشار البكتيريا في المستشفى المذكورة .

Isolation and Identification

2-4 : العزل والتشخيص

كان الهدف الاساس من جمع العينات هو عزل بكتيريا *P. aeruginosa* وشُخصت العزلات اعتماداً على الصفات المظهرية للمستعمرات النامية إذ ظهرت على وسط أگار الماكونكي شاحبة عديمة اللون لعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز الموجود في الوسط الزرعي ولها رائحة شبيهة برائحة العنب المتخمّر بينما ظهرت مستعمراتها بلون غامق وأغلبها محاطة بهالة شفافة على وسط أگار الدم مما يدل على قدرتها على تحلل الدم .

أظهرت نتائج الفحص المجهرى الخلايا البكتيرية المعزولة عصوية الشكل متحركة مفردة أو ثنائية الترتيب سالبة لصبغة جرام .

بينت نتائج الفحوصات الكيموحيوية نتائج موجبة لإختبار الأوكسيديز واختبار الكتاليز في جميع العزلات وذلك لقدرة البكتيريا على إنتاج انزيمي الأوكسيديز والكتاليز . اما بالنسبة لمجموعة إختبارات IMViC والتي شملت اختبارات : (الأندول , احمر المثل , فوكس بروسكاور , واستهلاك السترات) , كانت النتيجة موجبة في اختبار استهلاك السترات فقط , اتصفت جميع العزلات بعدم قدرتها على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H₂S وانزيم اليوريز و أنها غير مخمرة للسكروز واللاكتوز , استخدمت شرائط api 20E في تأكيد تشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* (ملحق 1 و 2).

يبين جدول (2-4) التشخيص المظهري والكيموحيوي للعزلات البكتيرية , اذ كان عدد العزلات السالبة والموجبة لصبغة جرام 114 عزلة وبنسبة تواجد (32.6%) , بينما كان عدد العزلات الخالية من النمو البكتيري او الملوثة اثناء الزرع 186 عزلة وبنسبة (53.1%) .

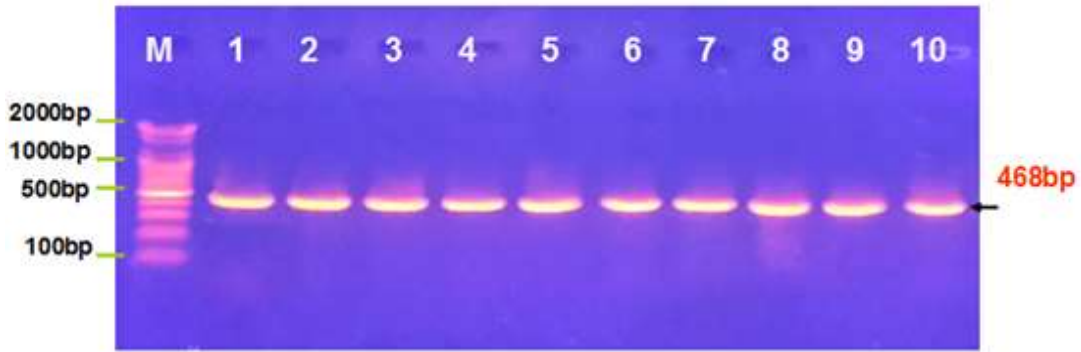
جدول (2-4) توزيع عزلات *P. aeruginosa* والعزلات السالبة والموجبة لصبغة جرام حسب مصدر جمع العينات .

| عدد العينات الخالية من النمو البكتيري | عدد العزلات السالبة والموجبة لصبغة جرام | عدد عزلات <i>P. aeruginosa</i> | العدد الكلي للعينات | المصدر |
|---|---|-----------------------------------|------------------------|---------|
| 80 (49.4%) | 55 (33.9%) | 27 (16.7%) | 162 | الأذن |
| 51 (52%) | 34 (34.7%) | 13 (13.3%) | 98 | الحروق |
| 29 (58%) | 15 (30%) | 6 (12%) | 50 | القشع |
| 26 (65%) | 10 (25%) | 4 (10%) | 40 | الإدرار |
| 186 (53.1%) | 114 (32.6%) | 50 (14.3%) | 350 | المجموع |

وجاءت نتائجنا مقارنة لما توصل إليه (Abdul-Wahid 2014) , فقد سجل عدد العزلات السالبة والموجبة لصبغة جرام 112 عزلة بنسبة (31.6%) , 178 عزلة بنسبة (50.1%) للعزلات الخالية من النمو البكتيري او الملوثة اثناء الزرع , كذلك مقارنة لما اشار اليه سالم

(2014) في دراسته بان عدد العزلات السالبة والموجبة لصبغة جرام وعدد العزلات الخالية من النمو البكتيري او الملوثة اثناء الزرع كان [120(41%) , 133(45.5%)] على التوالي .

اما من الناحية الجينية وباستعمال تقنية تفاعل سلسلة البلمرة Monoplex PCR , لتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* باستخدام الجين *16S rRNA gene* , اظهرت نتائج الدراسة الحالية إحتواء جميع عُزلات بكتيريا *P. aeruginosa* 50 عزلة على الجين *16S rRNA gene* الذي يُمثّل المورثة التشخيصيّة لهذه البكتيريا شكل (1-4) , مما يُثبت عائدية جميع العزلات 50 عزلة لبكتيريا *P. aeruginosa*



شكل (1-4) : الترحيل الكهربائي لهلام الاغاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص PCR لجين *16SrRNA gene* الخاص بتشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* , اذ يمثل 2000-100bp Marker ladder M: والعزلات من رقم (1-10) بكتيريا *P. aeruginosa* الموجبة للفحص بنتاج طوله 468 bp . باستخدام تيار 80 امبير و100 فولت لمدة ساعة واحدة.

3-4 : انتشار وتوزيع بكتيريا *P. aeruginosa* في العينات السريرية

Incident and distribution of *P. aeruginosa* in clinical samples

بلغ عدد عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* 50 عزلة من مجموع 350 عينة وبنسبة تواجد بلغت 14.3 % جدول (2-4) , تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ماتوصل اليه (Aziz 2015) في مدينة ميسان , اذ حصل على نسبة عزل 14.8% من العينات السريرية لبكتيريا *P.aeruginosa* , وجاءت النتائج مقارنة الى ما سجله سالم (2014) في مدينة الديوانية , اذ سجل نسبة عزل 12.8 % , وكذلك مقارنة الى نتائج (Upadhaya et al 2014) في الهند , اذ بلغت نسبة العزل 17% من العينات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* . بينما لا تتفق نتائجنا مع ما توصل اليه (Avains 2009) , Jane (2007) اللذان أشارا الى ان نسبة العزل لبكتيريا *P. aeruginosa* من حالات سريرية مختلفة كانت 76.2% و 51% على التوالي.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن أعلى نسبة عزل لبكتيريا *P. aeruginosa* كانت من اخماج الأذن الوسطى بنسبة 16.6 % جدول (2-4) , تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ماتوصل اليه (Al-jubori et al 2015) , الذين أشاروا الى ان نسبة عزل هذه البكتيريا كانت 16% من اخماج الأذن الوسطى في مستشفيات بغداد , و كانت النتائج مقارنة الى ما حصل عليه (2013) Al-Shara , اذ سجل نسبة عزل 13.9 % في مستشفيات النجف , لا تتفق نتائجنا مع ما حصل عليه (2014) Abdul-Wahid , اذ عزل بكتيريا *P. aeruginosa* من اخماج الأذن الوسطى بنسبة 25% في مستشفيات الناصرية . ويمكن إن يعزى هذا الاختلاف في نسب العزل الى الاختلاف في المستوى الاجتماعي والاقتصادي للمرضى و المنطقة الجغرافية والثقافة الصحية لدى المصابين.

اوضحت نتائج الدراسة الحالية أن نسبة عزل بكتيريا *P. aeruginosa* من اخماج الحروق بلغت 13.2 % جدول (2-4) , كانت النتائج مقارنة الى ما توصل اليه Al-muhannak (2010) , اذ سجل نسبة عزل 15% من اخماج الحروق , وهذه النتيجة أقل مما سجله سالم (2014) , اذ أشار إلى إن أعلى نسبة عزل كانت 23.6 % من اخماج الحروق , اما (2006) IwaIokun et al , فقد سجلوا أعلى نسبة عزل 29% من اخماج الحروق . وتكمن خطورة نسبة العزل بدرجة الاصابة وغالباً ما تؤلف بكتيريا *P. aeruginosa* نسبة عالية من حالات الحروق على مستوى دول العالم , ويرجع السبب في ذلك الى مقاومة هذه البكتيريا للمضادات الحيوية والمطهرات (Al-Shalchi et al ., 2001) , فقد أشارت إحصائية منظمة

الصحة العالمية (WHO) (2001) إلى إدراج 80% من حالات حروق الدرجة الثانية سبباً في حدوث الوفيات وبنسب عالية جداً لكون الوسائل الدفاعية للمصابين مخترقة وأقل قدرة على المقاومة . لذلك يمكن الاستنتاج بان نسبة عزل بكتيريا *P. aeruginosa* من اخماج الحروق في الدراسة الحالية لا تخلو من الخطورة على الرغم من ان شعبة الحروق في مستشفى الديوانية التعليمي خاضعة لرقابة مشددة , إذ إنخفض معدل التهابات الحروق للمصابين الراقدين بشكل ملحوظ لكن ما تزال العدوى البكتيرية تهدد المصابين بالحروق الشديدة .

إن نسبة عزل بكتيريا *P. aeruginosa* من اخماج الجهاز التنفسي (القشع) كانت 12% جدول (2-4) , ويمكن عدها ضمن نطاق النسب المتعارف عليها في الدراسات الاخرى التي اجراها كل من (Al-Shara 2013) , اذ سجل نسبة عزل 14.2% من القشع , اما سالم (2014) , فقد سجل نسبة عزل 15.3% من القشع , وهذه النتيجة اعلى مما سجله منحر (2011) , اذ بلغت نسبة العزل من القشع 4.4% , وفي دراسة اجريت في ايران من قبل (Vaziri et al 2011) , الذين أشاروا الى ان نسبة عزل بكتيريا *P. aeruginosa* من القشع كانت 9% , يُعزى الإختلاف في نتائج الدراسة الحالية مع الدراسات الاخرى إلى اختلاف الموسم الذي جُمعت فيه العينات , التدابير الصحية , واختلاف المرضى , إذ تزداد النسبة في المرضى الراقدين والذين يعانون أصلاً من ضعف في أنظمة الجسم المناعية (CDC , 2001) .

اوضحت نتائج الدراسة الحالية أن بكتيريا *P. aeruginosa* هي احد المُسببات الرئيسية في تكوين اخماج المسالك البولية , اذ كانت نسبة عزلها من الادرار 10% جدول (2-4) , وقد اشارت الى هذه الحقيقة انفا (Fayroz-Ali 2012) , بان بكتيريا *P. aeruginosa* الممرض الانتهازي الرابع المسبب ل اخماج المسالك البولية . تتفق نتائج هذه الدراسة مع الدراسات المحلية الاخرى التي اجراها كل من (Al-kabie 2009) , اذ سجل نسبة عزل 10% من الادرار , في حين سجل سالم (2014) نسبة عزل 10.4% من الادرار , كما تتفق نتائج هذه الدراسة مع ماتوصل اليه (Raja et al 2007) , الذين أشاروا الى ان نسبة عزل البكتيريا كانت 10.5% من الادرار في الولايات المتحدة , لكنها لا تتفق مع ما توصل اليه (Al-Fatlawi 2012) , إذ بلغت نسبة العزل من الادرار 6% , كما تعد بكتيريا *P. aeruginosa* الممرض الثاني والاكثر تردداً بين البكتيريا السالبة لصبغة جرام بنسبة 16.3% للمرضى الذين يعانون من اخماج المسالك البولية في الولايات المتحدة (Gaynes and Edwards , 2005) .

4-4 : انتشار وتوزيع عزلات *P. aeruginosa* حسب العمر, الجنس, وحالة المرضى
Incident and distribution of *P. aeruginosa* isolates based on age, gender, and hospitalization .

قسمت الدراسة الحالية المصابين إلى ست فئات عمرية ابتداء بالسنة الواحدة وانتهاء عند السنة الستين فاكتر جدول (3-4) .

جدول (3-4) توزيع عزلات *P. aeruginosa* حسب العمر, الجنس, وحالة المرضى .

| المرضى | الحالة | عدد عزلات <i>P. aeruginosa</i> |
|---------------------------|------------|--------------------------------|
| الفئات العمرية (سنة) | (10-1) | 2 (4%) |
| | (20-11) | 4 (8%) |
| | (30-21) | 11 (22%) |
| | (40-31) | 18 (36%) |
| | (50-41) | 7 (14%) |
| | اكبر من 60 | 8 (16%) |
| المجموع | | 50 (100%) |
| χ^2 الجدولية = 11.07 | | χ^2 المحسوبة = 3.69 |
| الجنس | ذكر | 18 (36%) |
| | انثى | 32 (64%) |
| | المجموع | 50 (100%) |
| χ^2 الجدولية = 3.841 | | χ^2 المحسوبة = 0.001 |
| حالة المرضى | الوافدين | 33 (66%) |
| | الراقدين | 17 (34%) |
| | المجموع | 50 (100%) |
| χ^2 الجدولية = 3.841 | | χ^2 المحسوبة = 0.0006 |

*P > 0.05

سجلت الدراسة الحالية أعلى نسبة إصابة في الفئة العمرية 31-40 سنة بنسبة 36% , تلتها الفئة العمرية 21-30 سنة والتي سجلت نسبة 22% جدول (4-3) , والسبب يرجع إلى إن هذه الفئات تمثل الفئات العمرية العاملة والتي قد تتعرض إلى الكثير من الملوثات أثناء العمل مما يشجع نمو وتطور العوامل المُمرضة , جاءت نتائج الدراسة الحالية مقارنة لما حصل عليه Prakash *et al* (2012) , إذ سجل أعلى نسبة إصابة في الفئة العمرية 21-40 سنة بنسبة 43.42% , وكذلك مقارنة لما سجله Abdul-Wahid (2014) , إذ وجد أعلى نسبة إصابة في الفئة العمرية 21-40 سنة , بلغت 47.7% .

سجلت الدراسة الحالية أقل نسبة إصابة في الفئة العمرية 1-10 سنة بنسبة 4% والسبب يعود كون المستشفى لا يستقبل الكثير من حالات الإصابة للأطفال لوجود مستشفيات خاصة بالأطفال في المدينة . في حين سجل Al-Shara (2013) نسبة إصابة 62.8% في الفئة العمرية 1-10 سنة .

سجلت الدراسة الحالية نسبة إصابة عالية في الفئات العمرية 41-50 سنة و أكبر من 60 سنة , إذ كانت نسبة الإصابة 14% و 16% على التوالي , وقد يعود السبب إلى ضعف جهاز المناعة لهذه الفئات العمرية مما يشجع العوامل المُمرضة على مهاجمة الجسم (CDC , 2001) . كانت نتائج الدراسة الحالية مقارنة لما سجله Abdul-Wahid (2014) , إذ وجد نسبة إصابة عالية في الفئة العمرية 41-60 سنة , بلغت 20% , وكذلك نسبة إصابة عالية بلغت 15.3% في الفئة العمرية أكبر من 60 سنة . كما لم تسجل الدراسة فرقاً معنوياً في نسب الإصابة بين الفئات العمرية عند مستوى معنوية $P > 0.05$.

سجلت الدراسة الحالية نسبة إصابة أعلى في الإناث 64% مقارنة بالذكور 36% الموضحة في جدول (4-3) , جاءت نتائج الدراسة الحالية مقارنة لما توصل اليه Abdul-Wahid (2014) في مدينة الناصرية , إذ كانت نسبة الإصابة في الإناث 60% فيما كانت بالذكور 40% , وكذلك لما سجله Al-Salihi and Hameed (2014) في مدينة كركوك , إذ وجد ان نسبة الإصابة في الإناث 52.98% في حين كانت بالذكور 47.02% , ومقارنة لنتيجة Bibi *et al* (2015) في باكستان , إذ كانت نسبة الإصابة في الإناث 75% بينما كانت بالذكور 25% , وكذلك لنتيجة Chander and Raza (2013) في النبال , إذ كانت نسبة الإصابة في الإناث 55.17% في حين كانت بالذكور 44.83% , لكنها لاتتفق مع ما سجله Ali khan *et al* (2008) في مدينة

اربييل , اذ كانت نسبة الإصابة في الإناث 38.2% في حين كانت بالذكور 61.8 % , لم تسجل الدراسة فرقاً معنوياً في نسب الإصابة بين الذكور والإناث عند مستوى معنوية $P > 0.05$.

تبين من الدراسة الحالية تسجيل العزلات نسبة 66% من المرضى الوافدين بينما سجلت نسبة 34% من المرضى الراقدين جدول (3-4) , واشتملت عُزلات الوافدين على نسب (65% , 11% , 15% , 9%) من مسحات اخماج الأذن والحروق وعينات القشع والإدرار على التوالي , بينما سجلت هذه المسحات و العينات النسب (18% , 62% ؛ 7% , 13%) على التوالي عند المرضى الراقدين , ويرجع السبب إلى الرقابة الصحية المشددة التي يتخذها المستشفى والرعاية الصحية العالية التي يقدمها . تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه Abdul-Wahid (2014) , اذ سجل نسبة 61.5% من المرضى الوافدين بينما سجل نسبة 38.5% من المرضى الراقدين , ولم تسجل الدراسة فرقاً معنوياً في نسب الإصابة بين المرضى الوافدين والراقدين عند مستوى معنوية $P > 0.05$.

5-4 : اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic Susceptibility Test

أجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية المذكورة في الجدول (3-1-4) والبالغة 14 مضاداً حيويًا , اذ اختيرت هذه المضادات لشيوع استعمالها في معالجة بعض الأخماج الناتجة عن الإصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* والجدول (4-4) يوضح نسب المقاومة والحساسية وما بينهما لهذه البكتيريا تجاه المضادات المستعملة وبالاعتماد على نتائج الفحص (قياس قطر منطقة التثبيط حول قرص المضاد الحيوي) ومقارنتها مع الجداول القياسية وبحسب ما جاء في CLSI (2012) , وذلك لمعرفة مدى مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية المستعملة في مستشفيات مدينة الديوانية وخطورة تلك المقاومة التي تمتد لتشمل طيفاً واسعاً من المضادات المختلفة .

جدول (4-4) النسب المئوية لعزلات *P. aeruginosa* الحساسة و المتوسطة الحساسية والمقاومة للمضادات الحيوية قيد الدراسة .

| ت | المضادات المستخدمة | العزلات الحساسة | | العزلات متوسطة الحساسية | | العزلات المقاومة | |
|----|------------------------|-----------------|----------|-------------------------|----------|------------------|----------|
| | | العدد | النسبة % | العدد | النسبة % | العدد | النسبة % |
| 1 | Amikacin | 30 | 60 | 7 | 14 | 13 | 26 |
| 2 | Gentamicin | 12 | 24 | 6 | 12 | 32 | 64 |
| 3 | Tobramycin | 17 | 34 | 9 | 18 | 24 | 48 |
| 4 | Netlimicin | 25 | 50 | 10 | 20 | 15 | 30 |
| 5 | Ciprofloxacin | 31 | 62 | 9 | 18 | 10 | 20 |
| 6 | Norfloxacin | 32 | 64 | 11 | 22 | 7 | 14 |
| 7 | Carbencilin | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 | 100 |
| 8 | Piperacilin-tazobactam | 20 | 40 | 3 | 6 | 27 | 54 |
| 9 | Cefotaxime | 3 | 6 | 11 | 22 | 36 | 72 |
| 10 | Ceftriaxone | 7 | 14 | 5 | 10 | 38 | 76 |
| 11 | Ceftazidime | 23 | 46 | 7 | 14 | 20 | 40 |
| 12 | Imipenem | 24 | 48 | 9 | 18 | 17 | 34 |
| 13 | Meropenem | 13 | 26 | 7 | 14 | 30 | 60 |
| 14 | Azteronam | 21 | 42 | 13 | 26 | 16 | 32 |

سجلت الدراسة الحالية ارتفاعاً ملحوظاً في نسب مقاومة عزلات *P. aeruginosa* لمضادات الأمينوكلايكوسيدات التي كانت وإلى وقت قريب العلاج الأمثل للإصابات ببكتيريا *P. aeruginosa* , إذ تبين إن نسبة المقاومة في العزلات قيد الدراسة مرتفعة نسبياً للمضاد الحيوي جنتاميسين حيث بلغت 64% , تلتها نسبة مقاومة 48% لمضاد توبراماميسين . تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه سالم (2014) , إذ سجل نسبة مقاومة لمضادي

جنتاميسين و توبراميسين بلغت 62% و 48% على التوالي , وجاءت النتائج مقارنة الى ما سجله (Al-kabie 2009) , اذ كانت نسبة المقاومة لمضاد جنتاميسين 60% , ومقارنة الى ما حصل عليه (Hamed *et al* 2013) , اذ كانت نسبة المقاومة 66.6% لمضاد جنتاميسين , وكذلك مقارنة الى ما توصل اليه (Mahmoud *et al* 2013) , اذ سجل نسبة مقاومة 50.9% لمضاد توبراميسين , لكنها لا تتفق مع ما توصل اليه (Naqvi *et al* 2013) , اذ سجل نسبة مقاومة عالية لمضاد جنتاميسين بلغت 95% , كما لا تتفق مع ما سجلته دراسة (Varaiya *et al* 2007) للمضادين جنتاميسين وتوبراميسين , اذ سجلت الدراسة نسبة مقاومة 10% لكل منهما .

بينما اظهرت الدراسة الحالية نسبة مقاومة لمضادى الاميكاسين والنتليميسين بلغت 26% و 30% على التوالي . تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه بلال (2010) , اذ سجل نسبة مقاومة 27% لمضاد الاميكاسين , وكما تتفق مع ما سجله (Sivaraj *et al* 2012) , اذ كانت نسبة المقاومة لمضاد الاميكاسين 28% , وكانت النتائج مقارنة الى ما حصل عليه (Haldorsen *et al* 2011) , Kim *et al* (2008) الذين أشارو إلى أنّ نسب المقاومة لمضاد الاميكاسين كانت 22% و 30% على التوالي . كما كانت مقارنة الى ما توصل اليه (Abdul-Wahid 2014) , اذ وجد إن نسبة المقاومة التي أبدتها عزلات *P. aeruginosa* تجاه مضاد النتليميسين كانت 20% , في حين اشار Raja *et al* 2007 في دراسته إن نسبة المقاومة لمضاد النتليميسين بلغت 10.1% .

إن الآلية الرئيسية في مقاومة مضادات الأمينوكلايكوسيدات تعود إلى وجود الإنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات (AMEs) , وغالبا ما تكون مستويات المقاومة العالية ضد هذه المضادات مرتبطة بانزيم المثليز 16S rRNA methylase فضلاً عن آلية الدفع وتقليل نفاذية الجدار الخارجي (Aghazadeh *et al* ., 2014) , إذ وجد (Abida-malic and Shahid 2005) إن جميع العزلات منتجة للإنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات والجينات المُشفرة لهذه الإنزيمات محمولة على البلازميد أو على الكروموسوم (Lopez-Yeste *et al* ., 2005) .

كما يمكن تفسير نسبة المقاومة العالية التي أبدتها عزلات *P. aeruginosa* لمضادات الأمينوكلايكوسيدات في الدراسة الحالية الى الإستخدام العشوائي لهذه المضادات الحيوية إلى جانب ذلك التطور في المقاومة الذي أحدثته هذه البكتيريا بسبب استخدام جرعات تحت علاجية ساهمت في ظهور عزلات طافرة (Magent and Balanchard , 2005) , وعلى الرغم من

شيوخ المقاومة العالية لمضادات الأمينوكلايكوسيدات فإن هذه المضادات لا زالت تُستعمل في علاج الأخمج البكتيرية وخاصة الأخمج الناتجة عن بكتيريا *P. aeruginosa* (Poulikako and Falagas , 2013).

سجلت الدراسة الحالية نسب المقاومة التي ابدتها بكتيريا *P. aeruginosa* لمضادات الفلوروكينولونات والتي عرفت بفعاليتها العالية في مقاومة نمو هذه البكتيريا , إذ كانت نسبة المقاومة تجاه المضاد الحيوي سبروفلوكساسين 20% بينما كانت نسبة المقاومة لمضاد نوروفلوكساسين 14% . تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما سجله الجراح (2007) , إذ كانت نسبة المقاومة لمضاد سبروفلوكساسين 22.4% , كما تتفق مع ما توصل إليه DeMiguel (2005) , إذ وجد إن نسبة المقاومة لمضاد سبروفلوكساسين 18% , تقترب نتائج الدراسة الحالية مع ما حصل عليه بلال (2010) و العزاوي (2006) , إذ كانت نسبة المقاومة لمضاد نوروفلوكساسين 21.6% و 22% على التوالي , في حين ذكر Abdul-Wahid (2014) , ان نسبة المقاومة لمضاد سبروفلوكساسين 29.2% ونسبة المقاومة لمضاد نوروفلوكساسين 30.8% . لا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما اشار إليه (2013) Al-Shara إذ كانت نسبة المقاومة لمضاد سبروفلوكساسين 73.4% ونسبة المقاومة لمضاد نوروفلوكساسين 55.5% .

تعمل مضادات الفلوروكينولونات على تثبيط بناء DNA البكتيري عن طريق إعاقة إنزيم DNA gyrase مثبتة بذلك تضاعف واستنساخ DNA , أما مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* لهذه المجموعة من المضادات فتعود إلى حدوث طفرة في الإنزيم الهدف DNA gyrase (Martines and Baquero , 2002) أو بفعل نظام الدفع الخارجي (Sheng et al ., 2002) , وقد تحمل جينات هذه المضادات على البلازميد أو الكروموسوم (Poole , 2000) .

يمتلك مضاد الكاربينسولين طيفاً واسعاً من الفعالية تجاه بكتيريا *P. aeruginosa* , إذ يختلف عن البنسيلين في كونه يحتوي على أيون الكاربوكسيل في السلسلة الجانبية مما جعله أكثر فعالية في مكافحة البكتيريا السالبة لصبغة جرام حيث يخترق جدار الخلية الخارجي على نطاق واسع أكثر من البنسيلين (wiliams et al ., 1984) , و تبين من الجدول (4-6) , إن أعلى نسبة مقاومة لبكتيريا *P. aeruginosa* سجلتها الدراسة الحالية كانت لمضاد الكاربينسولين إذ بلغت 100% , وهو من مضادات البنسيلينات , إذ تتطابق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصلت إليه الرماحي (2006) , إذ سجلت نسبة مقاومة 100% لمضاد الكاربينسولين , كما تتطابق مع ما

توصل اليه (2013) Mahmoud *et al* , إذ بلغت نسبة المقاومة لمضاد الكاربينسيلين 100% وكانت النتائج قريبة مما سجله سالم (2014) , إذ سجل نسبة مقاومة 92% لمضاد الكاربينسيلين, في حين كانت نتائج الدراسة الحالية أعلى مما سجل الحسو (2006) , إذ كانت نسبة المقاومة 26% لنفس المضاد .

ويمكن تفسير مقاومة عزلات *P. aeruginosa* لمضادات البنسيلينات بالمقاومة الطبيعية (Natural resistance) المعروفة لهذه البكتيريا تجاه البنسيلينات (Ibezim , 2005) , وقد تعود المقاومة العالية لهذه المضادات إلى إنتاج انزيمات البيتالاكتمايز او الى احد ميكانيكيات المقاومة ومنها تقليل نفاذية الجدار الخارجي و تحويل موقع الهدف للمضاد (Guilfoile , 2007) , كما تعزى المقاومة البكتيرية لهذه المجموعة من المضادات الى كثرة استخدامها سهولة وصولها إلى منطقة الهدف في الغشاء الخارجي للبكتيريا وقلّة أضرارها الجانبية والذي ساعد هذه البكتيريا على تطوير آليات مقاومة مختلفة تجاه هذه المضادات (Vandelden and Igievski , 1998) .

سجلت الدراسة الحالية نسبة مقاومة عالية ابدتها عزلات *P. aeruginosa* لمضاد البراسيلين – تازوباكتام , إذ بلغت (54%) , وكانت النتائج مقارنة مع ما توصل اليه Arora *et al* (2011) , إذ كانت نسبة المقاومة لمضاد البراسيلين- تازوباكتام 44% , أما Abdul-Wahid (2014) , فقد ذكر إن نسبة المقاومة التي ابدتها عزلات *P. aeruginosa* تجاه مضاد البراسيلين – تازوباكتام كانت 84.6% .

تعود مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للمجموعة المثبطة لمضادات البيتالاكتام ومنها مضاد البراسيلين – تازوباكتام الى زيادة إنتاج انزيمات البيتالاكتمايز او بسبب الية الدفع الفعال , إذ تساهم هذه الالية بشكل كبير في التعبير عن المقاومة لمضادات البيتالاكتام (Aghazadeh *et al* , 2014) .

أظهرت الدراسة الحالية إن نسب المقاومة التي ابدتها عزلات *P. aeruginosa* تجاه الجيل الثالث من السيفالوسبورينات المتمثلة بالسيفوتاكسيم والسيفترياكسون بلغت 72% و 76% لكل منهما و40% لمضاد السيفتازيديم . تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه Abdul-Wahid (2014) , إذ سجل نسبة مقاومة 76.9% لمضاد السيفترياكسون , في حين لا تتفق النتائج مع الباحث نفسه بالنسبة لمضاد السيفوتاكسيم , إذ كانت نسبة المقاومة 87.7% كما تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما سجله Arora *et al* (2011) , إذ بلغت نسبة المقاومة لمضاد

السيفترياكسون 75% , بينما جاءت النتائج مقارنة الى ما سجله الباحث نفسه بالنسبة لمضاد السيفتوتاكسيم , اذ سجل نسبة مقاومة بلغت 60% , ومن الجدير بالذكر ان الدراسة الحالية كشفت عن انخفاض المقاومة للجيل الثالث من السيفالوسبورينات عن ما اشار اليه حران (2012) , اذ ذكر ان نسبة المقاومة 100% لمضادي السيفتوتاكسيم والسيفترياكسون و96% لمضاد السيفتازيديم . بينت نتائج الدراسة الحالية ان مضاد السيفتازيديم اكثر فعالية من المضادين الاخرين تجاه بكتيريا *P. aeruginosa* , اذ تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما سجله Ikpeme (2013) *et al* , اذ وجد ان نسبة المقاومة 40.7% لمضاد السيفتازيديم , وكانت النتائج مقارنة الى ما توصلت اليه باصات (2006) , اذ سجل نسبة مقاومة 38% لمضاد السيفتازيديم , وكذلك مقارنة الى ما حصل عليه Kalai *et al* (2005) في دراسة لمرضى العوز المناعي في تونس اذ كانت نسبة المقاومة 36% لنفس المضاد .

تحتوي مضادات السيفالوسبورينات على حلقة البيتاالاكتام , اذ تعمل هذه المضادات على تثبيط عملية تصنيع الجدار الخلوي البكتيري , فقد قاومت بكتيريا *P. aeruginosa* مضادات السيفتوتاكسيم والسيفترياكسون والسيفتازيديم في الدراسة الحالية بنسب عالية , وقد يعود السبب في ذلك اما الى عدم نفاذية هذه المضادات خلال الغشاء البلازمي للخلية البكتيرية (Brooks *et al* , 2007) او بسبب وجود إنزيمات البيتاالاكتمايز ذات الطيف الواسع , والتي غالباً ما يعبر عنها من خلال البلازميد , اذ تعمل هذه الانزيمات على كسر حلقة البيتاالاكتام وبالتالي يفقدها القدرة على الارتباط ببروتينات الجدار (Bush and Jacoby , 2010) , وقد تعود مقاومة عزلات *P. aeruginosa* لمضادات الجيل الثالث من السيفالوسبورينات إلى إفراز إنزيمات السيفالوسبورينيز المُشفر لها كروموسومياً (Lopez-Yeste *et al* , 1996) .

سجلت عزلات *P. aeruginosa* في الدراسة الحالية نسبة مقاومة 34% للمضاد الحيوي الأميبينيم . تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما سجله Ansari *et al* (2015) , اذ وجد ان نسبة المقاومة 35.06% لمضاد الأميبينيم , وكانت النتائج مقارنة الى ما حصل عليه Mahmoud *et al* (2013) , الذي اشار الى ان نسبة المقاومة لمضاد الأميبينيم 31.6% , ومقارنة الى ما توصل اليه (2009) Salimi , اذ سجل نسبة مقاومة 30.2% لمضاد الأميبينيم . بينما سجلت النتائج ارتفاع ملحوظ في مقاومة عزلات *P. aeruginosa* لمضاد الميروبيينيم بنسبة 60% , وجاءت النتائج مقارنة الى ما اشار اليه سالم (2014) و بلال (2010) , اذ كانت نسبة المقاومة لمضاد الميروبيينيم 64% و 70% على التوالي . في حين ذكر Javiya *et al* (2008) ان نسبة المقاومة كانت 78% لمضاد الأميبينيم و 69% لمضاد الميروبيينيم .

تمتاز مضادات الكاربابنيم بكونها من المضادات الحيوية الأكثر فاعلية لعلاج الأخماج الناتجة عن بكتيريا *P. aeruginosa* بسبب ثبوتها ضد التحلل المائي بواسطة أنزيمات البيبتالاكتمايز فضلاً عن نفاذيتها خلال الغشاء الخارجي للبكتيريا (Hawkey and Manday , 2004) , اذ ان زيادة المقاومة لمضادات الكاربابنيم من قبل البكتيريا السالبة لصبغة جرام اصبحت من المشاكل الخطيرة بالعراق , اذ ترتبط هذه المقاومة بوجود عدة عوامل منها : انزيمات البيبتالاكتام المعدنية (MBL) , انزيمات الاوكزاسلينيز (Oxacilinase) , والعناصر الوراثية المتنقلة , وقد اشارت الى ذلك العديد من الدراسات السابقة في العراق (Fayroz-Ali (2012) و (Al-Mayahi (2013) و (Al-Shara (2013) .

سجلت الدراسة الحالية مقاومة مرتفعة لمضاد الازتيرونام بلغت 32% , وهو من مضادات المونوباكتام , تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما سجله (Shabaa (2015) , اذ كانت نسبة المقاومة لمضاد الازتيرونام 31.82% , كما اظهرت الدراسة الحالية نتيجة أعلى مما سجله (Abdul-Wahid (2014) , اذ كانت نسبة المقاومة لمضاد الازتيرونام 23% , وأقل مما سجله سالم (2014) , اذ كانت نسبة المقاومة 70% لنفس المضاد .

تمتلك مضادات المونوباكتام نشاط واسع ضد البكتيريا السالبة لصبغة جرام وخاصة بكتيريا *P. aeruginosa* (Bush et al ., 1995) , كما تمتلك فعالية تجاه الكائنات المنتجة لمضادات البيبتالاكتام , اذ تشكل المقاومة لمضادات المونوباكتام ضغطاً دوائياً حيث تعمل على تقليص جدول المضادات الحيوية المقدم للمريض .

6-4: مقاومة عزلات *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية

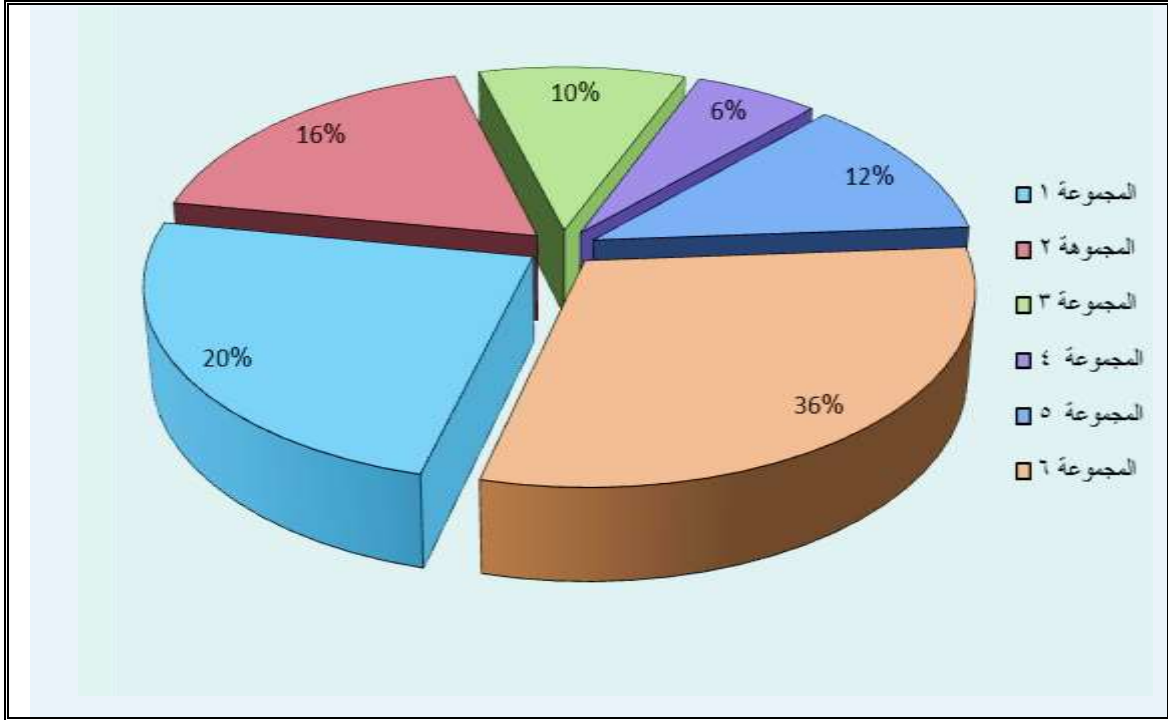
Antibiotics- Resistant *P. aeruginosa* Isolates

1-6-4: المقاومة لمضادات الأمينوكلايكوسيدات

Aminoglycoside Antibiotics Resistance

تمتلك مضادات الأمينوكلايكوسيدات فعالية واسعة الطيف لعلاج الاصابات الناتجة عن البكتيريا السالبة لصبغة جرام , اذ تمثل مضادات الأمينوكلايكوسيدات جزءاً صغيراً من المضادات المستعملة بالعراق بالمقارنة مع مضادات البيتاالاكتام لكنها لازالت المجموعة الأكثر اهمية في علاج الاصابات البكتيرية , كما ان مراقبة مستوى المقاومة لهذه المضادات يعد من الامور المهمة , لذا ركزت الدراسة الحالية على نسب المقاومة لمختلف مضادات الأمينوكلايكوسيدات في العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* , وتضم هذه المجموعة من المضادات اعداداً كبيرة من الادوية المهمة سريرياً ومنها الجنتاميسين و التوبراميسين و الاميكاسين و النتلياميسين وبالإعتماد على نتائج فحص الحساسية فإن 32 عزلة (64%) من عزلات *P. aeruginosa* قيد الدراسة مقاومة لمضاد واحد على الأقل من مضادات الأمينوكلايكوسيدات بالمقارنة مع القيم القياسية المذكورة في (2012) CLSI .

توزعت نسب المقاومة لهذه المضادات في الشكل (4-2) بنسبة 20% المجموعة المقاومة لكل الأمينوكلايكوسيدات وهي المجموعة الأولى و16% في المجموعة الثانية والتي تمثل المقاومة للجنتاميسين والحساسة لباقي المضادات و المجموعة الثالثة بنسبة 10% ومثلت المقاومة للمضادات الحيوية الجنتاميسين والتوبراميسين والنتلياميسين والحساسة لمضاد الأميكاسين , أما المجموعة الرابعة فمثلت العزلات المقاومة للمضادات الأميكاسين والجنتاميسين والتوبراميسين والحساسة لمضاد النتلياميسين وبنسبة 6% ومثلت المجموعة الخامسة المقاومة للمضادين الجنتاميسين والتوبراميسين والحساسة للمضادات الأخرى وبنسبة 12% والمجموعة السادسة تضمنت العزلات الحساسة لكل اللأمينوكلايكوسيدات وبنسبة 36% .



شكل (2-4) نسب المقاومة لعزلات *P. aeruginosa* تجاه مضادات الأمينوكلايكوسيدات .

*المجموعة الأولى = المجموعة المقاومة لكل الأمينوكلايكوسيدات .

*المجموعة الثانية = المجموعة المقاومة للجنتاميسين والحساسة لباقي المضادات .

*المجموعة الثالثة = المجموعة المقاومة للمضادات الحيوية الجنتاميسين والتوبراميسين والنتليميسين والحساسة لمضاد الأميكاسين .

*المجموعة الرابعة = المجموعة المقاومة للمضادات الأميكاسين والجنتاميسين والتوبراميسين والحساسة لمضاد النتليميسين .

*المجموعة الخامسة = المجموعة المقاومة للمضادين الجنتاميسين والتوبراميسين والحساسة للمضادات الأخرى .

*المجموعة السادسة = المجموعة الحساسة لكل الأمينوكلايكوسيدات .

ان سبب مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* لمضادات الامينوكلايكوسيدات يعود إلى عمل هذه المضادات داخل الخلية البكتيرية , اذ تهاجم مضادات الامينوكلايكوسيدات البكتيريا بخطوتين تتضمن الخطوة الاولى امتصاص الامينوكلايكوسيدات من قبل البكتيريا , اذ تؤثر عملية الامتصاص على الفعالية البايولوجية للبكتيريا , وتتضمن الخطوة الثانية إرتباط مضادات

الامينوكلايكوسيدات بالرايبوسومات داخل الخلية البكتيرية وبالتالي تثبط تصنيع البروتين (Vakulenko and Mobashery , 2003) .

تخترق مضادات الامينوكلايكوسيدات الجدار الخلوي للبكتيريا بثلاث مراحل المرحلة الاولى غير معتمدة على الطاقة متبوعة بمرحلتين معتمدتين على الطاقة , اذ ترتبط مضادات الامينوكلايكوسيدات في المرحلة الاولى بالمركبات الايونية الموجودة على سطح الجدار الخلوي البكتيري , والتي تتضمن متعدد السكريد الدهني و الفوسفات الدهنية و بروتينات الغشاء الخارجي في البكتيريا السالبة لصبغة جرام (Ramirez and Tolmasky , 2010) .

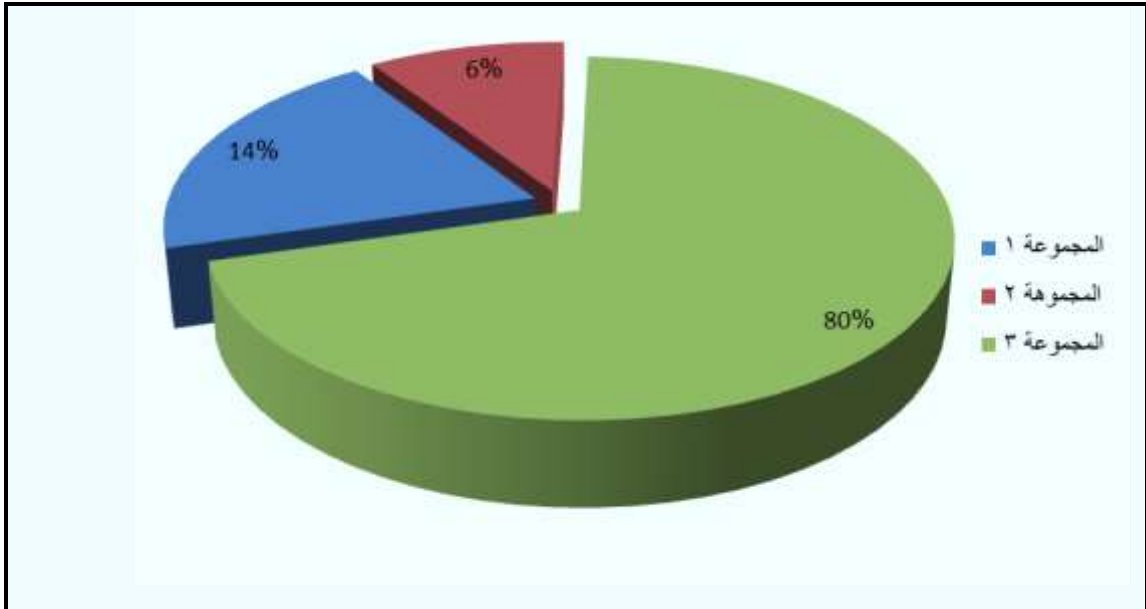
يحدث الارتباط بالمواقع الايونية للجدار الخلوي بوصفه نتيجة لاستبدال ايونات المغنيسيوم Mg^{+2} وايونات الكالسيوم Ca^{+2} التي ترتبط بجزيئات متعدد السكريد الدهني المجاورة . ان التأثير على جدار البكتيريا يزيد من النفاذية وبالتالي تتمكن مضادات الامينوكلايكوسيدات من اختراق فسحة البلازم المحيطي , بعد ذلك تبء المرحلة المعتمدة على الطاقة , اذ يعبر كمية قليلة من مضادات الامينوكلايكوسيدات خلال الغشاء الساييتوبلازمي لتصل الى الساييتوبلازم وترتبط مع الرايبوسومات بطريقة تسبب دخول تسلسلات خاطئة من الأحماض الأمينية في السلاسل الببتيدية وبالتالي تتكون البروتينات غير الطبيعية القاتلة للبكتيريا وتحطيم الغشاء الساييتوبلازمي , واخيراً فقدان الغشاء يحفز حدوث المرحلة الاخيرة وهي معتمدة على الطاقة ايضاً , اذ يتحطم الغشاء الساييتوبلازمي كنتيجة لتجمع الامينوكلايكوسيدات بالساييتوبلازم وإرتباطها بكل الرايبوسومات وبالتالي موت الخلية البكتيرية (Vakulenko and Mobashery , 2003) .

2-6-4: المقاومة لمضادات الكينولينات Quinolone Antibiotics Resistance

ونحن بصدد مقاومة العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية ارتأينا ان نسلط الضوء على مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* لمضادات الكينولينات كونها من الخيارات العلاجية المهمة لعلاج الأخماج التي تسببها هذه البكتيريا , اذ تمتلك مضادات الكينولينات طيفاً واسعاً من الفعالية تجاه البكتيريا السالبة لصبغة جرام , فضلا عن قابلية الاختراق الجيدة وتأثيراتها الجانبية القليلة (Anvarinejad et al ., 2011) , ولقلة الدراسات المتوفرة حول مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* لمضادات الكينولينات , انصب اهتمامنا على مقاومة البكتيريا لهذه المضادات.

وقد أشتملت الدراسة الحالية على دراسة مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* لنوعين من مضادات الفلوروكينولونات (سبرو فلوكساسين و نورفلوكساسين) , إذ أظهرت نتائج فحص الحساسية إن 10 عزلات (20%) من عزلات *P. aeruginosa* قيد الدراسة مقاومة لمضاد واحد على الأقل من مضادات الفلوروكينولونات بالمقارنة مع القيم القياسية المذكورة في (CLSI (2012) .

سجلت الدراسة الحالية نسبة مقاومة لكل مضادات الفلوروكينولونات بلغت 14% ومثلت المجموعة الأولى أما المجموعة الثانية فمثلت العزلات المقاومة لمضاد سبروفلوكساسين والحساسية لمضاد نوروفلوكساسين وكانت نسبتها 6% أما المجموعة الثالثة فكانت نسبتها 80% ومثلت العزلات الحساسة لكل الفلوروكينولونات شكل (3-4) .



شكل (3-4) نسب المقاومة لعزلات *P. aeruginosa* تجاه مضادات الفلوروكينولونات .

*المجموعة الأولى = المجموعة المقاومة لكل مضادات الفلوروكينولونات.

*المجموعة الثانية = المجموعة المقاومة لمضاد سبروفلوكساسين والحساسية لمضاد نوروفلوكساسين .

*المجموعة الثالثة = المجموعة الحساسة لكل الفلوروكينولونات .

تؤثر مضادات الكينولينات على البكتيريا السالبة لصبغة جرام وخصوصاً بكتيريا *P. aeruginosa* , إذ تمنع تكوين الحامض النووي الـ DNA , وقد تكون المقاومة لهذه المجموعة من المضادات الحيوية بعدة اليات منها تثبيط عملية دخول المضاد الحيوي الى داخل الخلية البكتيرية , او عن طريق حدوث طفرة في الجينات المشفرة لانتاج انزيمات DNA Topoisomerase-IV ,gyrase (Harvey et al ., 2006) , او عن طريق المقاومة التي تتوسطها البلازميدات , إذ وجد ان هذه البلازميدات تحمل جينات تشفر الى انتاج بروتينات حماية لانزيم Gyrase (Mitscher , 2005) .

3-6-4 : المقاومة المشتركة لاصناف المضادات الحيوية الأخرى

Multidrug resistance

اظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود مقاومة مشتركة بين اصناف المضادات الحيوية الاخرى مثل السيفالوسبورينات و الكاربابنيم والفلوروكينولينات , والتي لوحظت في كثير من الاحيان في عزلات *P. aeruginosa* المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات , مما يجعلها تمتلك مقاومة متعددة للمضادات الحيوية المدروسة (Multidrug resistance) , إذ يطلق مصطلح المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (Multidrug resistance) على قدرة البكتيريا على مقاومة ثلاثة أو أكثر من المضادات الحيوية المستعملة على أن يكون للبكتيريا القدرة على مقاومة مضاد واحد على الأقل ضمن الصنف (Magiorakos et al ., 2012) .

سجلت عزلات *P. aeruginosa* في الدراسة الحالية مستويات عالية من المقاومة لمضادات السيفالوسبورينات متنوعة بمضادات الكاربابنيم و مضادات الفلوروكينولينات , إذ لوحظ ان جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات والمحمولة بشكل واسع على العناصر الوراثية المتنقلة ترتبط بالمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وبانزيمات البييتالاكتمايز واسعة الطيف بالاضافة الى بلازميدات المقاومة لمضادات الكاربابنيم (Walsh , 2005) , كما ترتبط انزيمات البييتالاكتمايز بالتعبير العالي لانظمة الدفع مما يؤدي الى مستويات المقاومة العالية (Thomas et al ., 2010) .

شكلت عزلات *P. aeruginosa* ذات المقاومة المتعددة (MDR) في الدراسة الحالية نسبة 32% , إذ كانت 9 (56.3%) من العزلات مقاومة لثلاثة أصناف من المضادات الحيوية و 7 (43.7%) من العزلات مقاومة لأربعة أصناف من المضادات الحيوية جدول (4-5) .

جدول (4-5) توزيع عزلات *P. aeruginosa* على أنواع المقاومة والنسب المئوية لها .

| أنصاف المضادات الحيوية | عدد العزلات المقاومة | نوع المقاومة |
|------------------------|----------------------|--------------|
| 3 | 9 (56.3%) | MDR (32%) |
| 4 | 7 (43.7%) | |
| 5 | 11 (35.5%) | XDR (62%) |
| 6 | 20 (64.5%) | |
| 7 | 3 (6%) | PDR (6%) |
| | 50 (100%) | المجموع |

* MDR = Multidrug resistance . *XDR = Extensive drug resistance.

* PDR = Pandrug resistance.

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (2015) Ansari *et al* في السعودية , اذ سجل مقاومة متعددة لعزلات *P. aeruginosa* بنسبة 32.6% , كما تتفق مع ما سجله Zahra and (2011) Moniri في ايران , اللذان اشارا ان نسبة عزلات *P. aeruginosa* ذات المقاومة المتعددة كانت 30% , وجاءت النتائج مقارنة لما حصل عليه (2007) Gad *et al* في مصر, و (2005) Pandey *et al* في الهند , الذين سجلو مقاومة متعددة لعزلات *P. aeruginosa* بنسبة 36% .

كانت كل عزلات *P. aeruginosa* قيد الدراسة ذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية ويعود السبب إلى امتلاك هذه البكتيريا لكثير من آليات المقاومة مثل انتاج الإنزيمات المحورة للأمينوكلايكوسيدات وانزيمات البيبتالاكتمايز وامتلاكها آلية الضخ الخارجي وغيرها من الآليات التي تعمل معاً مسببة ظاهرة المقاومة المتعددة (Martinez ; 2005 ; Pournaras *et al* , 2002 and Baquero) . إنَّ الإرتفاع الملحوظ في نسبة عزلات *P. aeruginosa* ذات المقاومة المتعددة في مستشفى الديوانية التعليمي يُعد مؤشراً على تفشي السلالات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية ، مما يؤدي بالنتيجة إلى إحتمالية فشل العلاجات المستخدمة حالياً لعلاج الإصابات التي تسببها هذه البكتيريا.

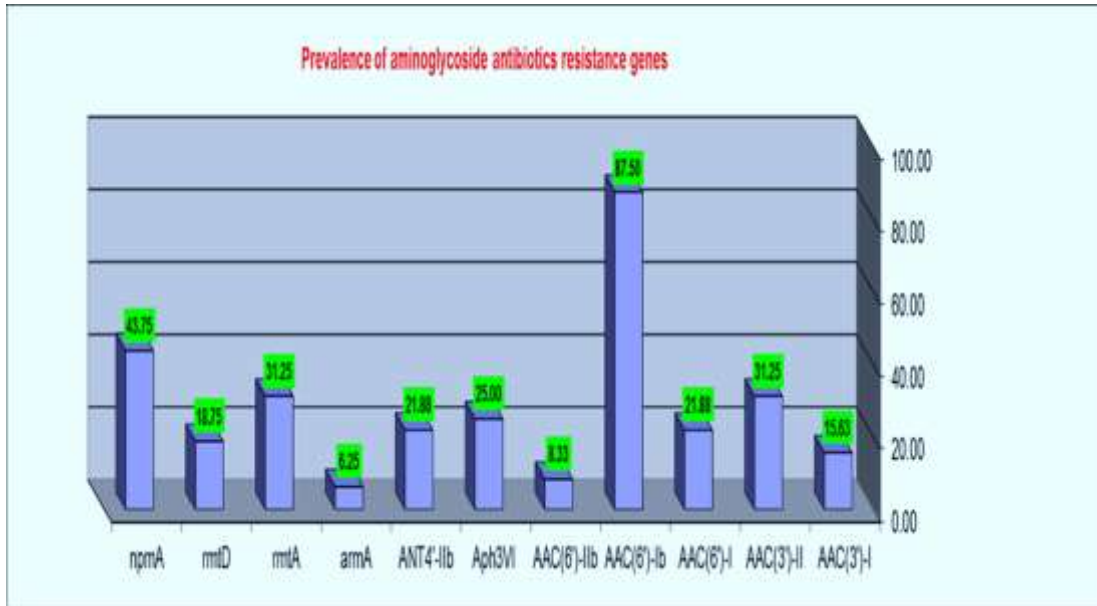
أما المقاومة الشاملة (Extensive drug resistance) فتطلق على مقاومة البكتيريا لكل أصناف المضادات الحيوية عدا صنف واحد أو اثنين من هذه الأصناف على ان تكون مقاومة لمضاد واحد على الأقل ضمن الصنف (Magiorakos *et al.*, 2012), إذ شكلت عزلات *P. aeruginosa* ذات المقاومة الشاملة (XDR) في الدراسة الحالية نسبة 62%, إذ كانت 11(35.5%) من العزلات مقاومة لخمسة أصناف من المضادات الحيوية و 20 (64.5%) من العزلات مقاومة لستة أصناف من المضادات الحيوية جدول (4-5), وجاءت النتائج اعلى مما توصلت اليه الدراسات المحلية, إذ وجد سالم (2014) في مدينة الديوانية, ان نسبة المقاومة الشاملة لعزلات *P. aeruginosa* بلغت 52%, في حين ذكر (2014) Abdul-Wahid في مدينة الناصرية, ان نسبة المقاومة الشاملة لعزلات *P. aeruginosa* كانت 48.3%, بينما سجل (2013) Al-Shara في مدينة النجف, نسبة 34% لعزلات *P. aeruginosa* ذات المقاومة الشاملة, إذ تكمن خطورة سلالات المقاومة الشاملة في توطنها داخل المستشفيات وسرعة انتشارها وارتفاع نسبة مقاومتها وتحولها إلى سلالات مقاومة لكل الادوية.

في حين يطلق مصطلح (Pandrug resistance) على المقاومة المسجلة لكل أصناف المضادات الحيوية المدروسة (Magiorakos *et al.*, 2012), إذ سجلت عزلات *P. aeruginosa* ذات المقاومة لكل أصناف المضادات الحيوية (PDR) في الدراسة الحالية نسبة 6% جدول (4-5). تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما حصل عليه (2013) Al-Shara في مدينة النجف, إذ سجل مقاومة لكل أصناف المضادات الحيوية لعزلات *P. aeruginosa* بنسبة 7.4%, وكانت النتائج مقارنة لما حصل عليه سالم (2014) في مدينة الديوانية, إذ وجد بنسبة 4% لعزلات *P. aeruginosa* ذات المقاومة لكل أصناف المضادات الحيوية المدروسة, بينما لم يسجل (2014) Abdul-Wahid في دراسته اي نسبة للمقاومة لكل أصناف المضادات الحيوية المدروسة.

7-4 : انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات

Dissemination of Aminoglycoside Antibiotics-Resistance Genes

تعتبر الية انتاج الانزيمات المحورة لمضادات الامينوكلايكوسيدات (AMEs) من اهم اليات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات واكثرها شيوعاً (Zhou *et al.* , 2010) , اذ يبين شكل (4-4) وجدول (6-4) انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* , اذ درست خمس جينات لانزيمات الامينوكلايكوسيدات الناقلة لمجموعة الاستيل (*aac(6')-Ib* , *aac(6')-I* , *aac(3)-I* , *aac(3)-II* , *aac(6')-Ib*) . (*Iib*) .



شكل (4-4) انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في عزلات *P. aeruginosa*

جدول (4-6) انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايوسيدات في عزلات

P. aeruginosa

| عدد عزلات <i>P. aeruginosa</i> | الجينات |
|--------------------------------|--------------------|
| 28 (87.50%) | <i>aac(6')-Ib</i> |
| 10 (31.25%) | <i>aac(3)-II</i> |
| 5 (15.63%) | <i>aac(3)-I</i> |
| 7 (21.88%) | <i>aac(6')-I</i> |
| 3 (8.33%) | <i>aac(6')-IIb</i> |
| 8 (25%) | <i>Aph(3')-VI</i> |
| 7 (21.88%) | <i>Ant(4')-IIb</i> |
| 2 (6.25%) | <i>armA</i> |
| 10 (31.25%) | <i>rmtA</i> |
| 6 (18.75%) | <i>rmtD</i> |
| 14 (43.75%) | <i>npmA</i> |

اظهرت نتائج الدراسة الحالية اعلى نسبة تواجد للجين *aac(6')-Ib* , كانت في 28 عزلة لبكتيريا *P. aeruginosa* بنسبة 87.50% , يتبعه الجين *aac(3)-II* , اذ تواجد في 10 عزلات لبكتيريا *P. aeruginosa* بنسبة 31.25% جدول (4-6) و شكل (4-5 أ و ب) , تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (Jafari et al (2013) في ايران , اذ سجل نسبة تواجد 74% للجين *aac(6')-Ib* , كما تتفق مع ما سجله (Abdul-Wahid (2014) في مدينة الناصرية , اذ سجل اعلى نسبة تواجد للجين *aac(6')-Ib* بنسبة 69% , في حين اشارت دراسة في بولندا من قبل (Sacha et al (2012) , الذي ذكر نسبة تواجد 58.3% للجين *aac(6')-Ib* , كذلك تتفق النتائج مع ما حصل عليه (Hamed et al (2013) في مصر , اذ اشار الى نسبة تواجد

33.3% للجين *aac(3)-II* , لكنها لا تتفق مع توصل اليه (Dubois et al 2008) في فرنسا ,
اذ سجل نسبة تواجد 36.5% و 5.8% للجينات *aac(6')-Ib* و *aac(3)-II* على التوالي .

يعتبر الانزيم *AAC (6') -Ib* من اكثر الانزيمات المحورة لمضادات الامينوكلايكوسيدات
الناقلة لمجموعة الاستيل اهمية , اذ يلعب هذا الانزيم دوراً اساسياً في مقاومة مضادات
الامينوكلايكوسيدات في الاصابات الناتجة عن البكتيريا السالبة لصبغة جرام (Ramirez and
Tolmasky , 2010) , ويشكل حوالي اكثر من 70% في العزلات البكتيرية السالبة لصبغة
غرام (Vokulenko and Mobashery , 2003) , اذ يقع الجين *aac(6')-Ib* الذي يعبر
عن الانزيم *AAC (6') -Ib* على الانتغرون مع الجينات الاخرى المسؤلة عن المقاومة
البلازمية لاصناف المضادات الحيوية الاخرى , وبذلك اصبحت الانزيمات المحورة لمضادات
الامينوكلايكوسيدات ذات اهمية كبيرة في تطور المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية في بكتيريا
P. aeruginosa (poole , 2011) , ومن خلال نتائج الدراسة الحالية يمكن الاستنتاج بان
موقع الجين *aac(6')-Ib* على العناصر الوراثية المتنقلة ساعد في سرعة انتشار المقاومة
لمضادات الامينوكلايكوسيدات في بكتيريا *P. aeruginosa* في مدينة الديوانية .

سجلت نتائج الدراسة الحالية نسبة تواجد للجينات *aac(3)-I* , *aac(6')-I* , *aac(6')-Iib*
بلغت 5 (15.63%) , 7 (21.88%) , 3 (8.33%) على التوالي في عزلات بكتيريا
P. aeruginosa جدول (6-4) وشكل (6-4 أ و ب) , تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما
حصل عليه (Ndegwa et al 2008) في كينيا , اذ سجل نسبة تواجد 16.3% للجين *aac(3)-I*
I و 22.2% للجين *aac(6')-I* , كما تتفق مع ما توصل اليه (Over et al 2001) في تركيا ,
اذ بلغت نسبة التواجد 16.6% للجين *aac(3)-I* , وكذلك تتفق مع ما اشار اليه (Abdul-
Wahid 2014) في مدينة الناصرية , اذ كانت نسبة التواجد 24.1% للجين *aac(6')-I* ,
وكانت النتائج مقارنة لما سجله الباحث نفسه بالنسبة للجين *aac(3)-I* , اذ بلغت نسبة التواجد
10.3% , في حين لم يسجل هذا الباحث أي نسبة تواجد للجين *aac(6')-Iib* , لا تتفق نتائج
الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (Gad et al 2011) في مصر , اذ سجل نسبة تواجد
48.9% للجين *aac(3)-I* كما لا تتفق مع ما حصل عليه (Vaziri et al 2011) في ايران ,
اذ سجل نسبة تواجد 7% للجين *aac(6')-I* و 36% للجين *aac(6')-Iib* .

اظهرت نتائج الدراسة الحالية نسبة تواجد للجين *Aph(3')-VI* , اذ تواجد في 8 عزلات
لبكتيريا *P. aeruginosa* بنسبة 25% جدول (6-4) و شكل (6-4 أ و ب) , وهذه النتيجة اعلى
مما اشارت اليه الدراسات الاخرى , اذ حصل (Al- jubori et al 2015) في مدينة بغداد على

نسبة تواجد بلغت 7.1% للجين *Aph(3')-VI* , في حين سجل (Park *et al* (2009) في كوريا نسبة تواجد 14.8% للجين *Aph(3')-VI* , بينما ذكر (Vaziri *et al* (2011) في ايران نسبة تواجد الجين *Aph(3')-VI* كانت 11% .

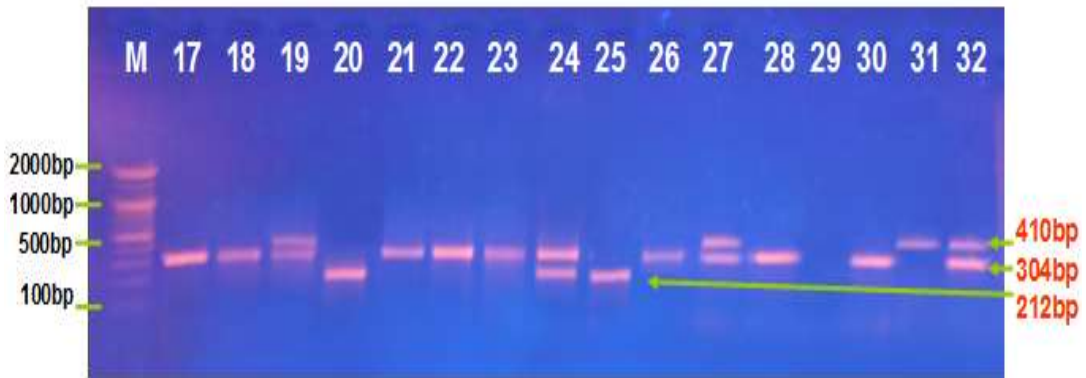
سجلت نتائج الدراسة الحالية نسبة تواجد للجين *Ant(4')-Iib* , اذ تواجد في 7 عزلات لبكتيريا *P. aeruginosa* بنسبة 21.88% جدول (4-6) وشكل (4-7 أ و ب) , تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (Al- jubori *et al* (2015) في مدينة بغداد , اذ سجل نسبة تواجد للجين *Ant(4')-Iib* بلغت 28.5% , في حين لم يسجل (Abdul-Wahid (2014) في مدينة الناصرية اي نسبة تواجد للجين *Ant(4')-Iib* .

تعتبر الية انتاج انزيم المثليز 16SrRNA methylase من اكثر الاليات شيوعاً لمقاومة مضادات الامينوكلايكوسيدات (Zhou *et al* ., 2010) , اذ يعمل هذا الانزيم على اضافة مجموعة المثيل الى موقع الارتباط بمضادات الامينوكلايكوسيدات (Valverde *et al* ., 2013) , اذ ذكر (Wu *et al* (2009) عدة انواع لجينات انزيم المثليز (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, and *npmA*).

اظهرت نتائج الدراسة الحالية نسبة تواجد للجين *armA* , كانت في 2 عزلة بنسبة 6.25% , وتواجد الجين *rmtA* في 10 عزلات بنسبة 31.25% , في حين تواجد الجين *rmtD* في 6 عزلات بنسبة 18.75% , وتواجد الجين *npmA* في 14 عزلة بنسبة 43.75% جدول (4-6) وشكل (4-8 أ و ب) , اذ سجل الجين *npmA* اعلى نسبة تواجد بين جينات انزيم المثليز 16SrRNA methylase في الدراسة الحالية , في حين سجل الجين *armA* اقل نسبة تواجد بين جينات انزيم المثليز , لاتتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما اشار اليه Abdul-Wahid (2014) , اذ لم يسجل اي نسبة تواجد للجينات (*npmA*, *rmtD*, *rmtA*, *armA*) في دراسته في مدينة الناصرية .

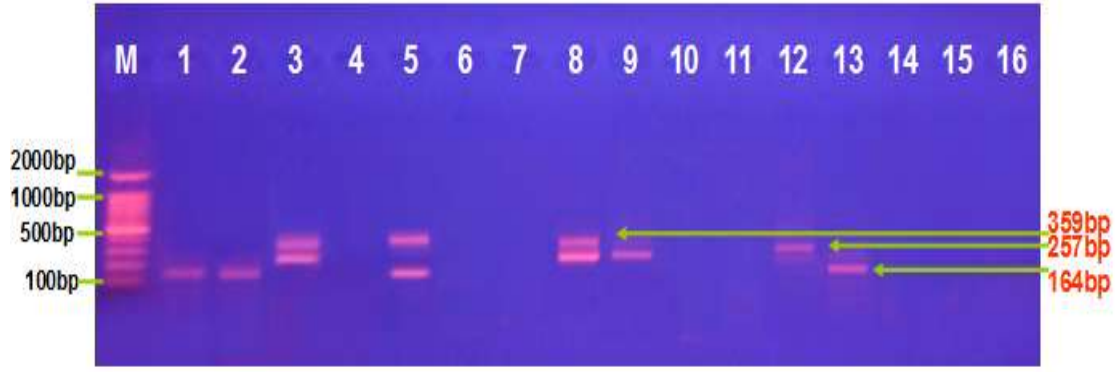


(أ)



(ب)

شكل (4-5 أ و ب): الترحيل الكهربائي لهلام الاغاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص mPCR لجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* , اذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp , 10 عزلات موجبة لجين *aac(3)-II* بناتج طوله 212bp و 28 عزلة موجبة لجين *aac(6')-Ib* بناتج طوله 304bp و 8 عزلات موجبة لجين *Aph(3')-VI* بناتج طوله 410bp. باستخدام تيار 80 امبير و100 فولت لمدة ساعة واحدة.

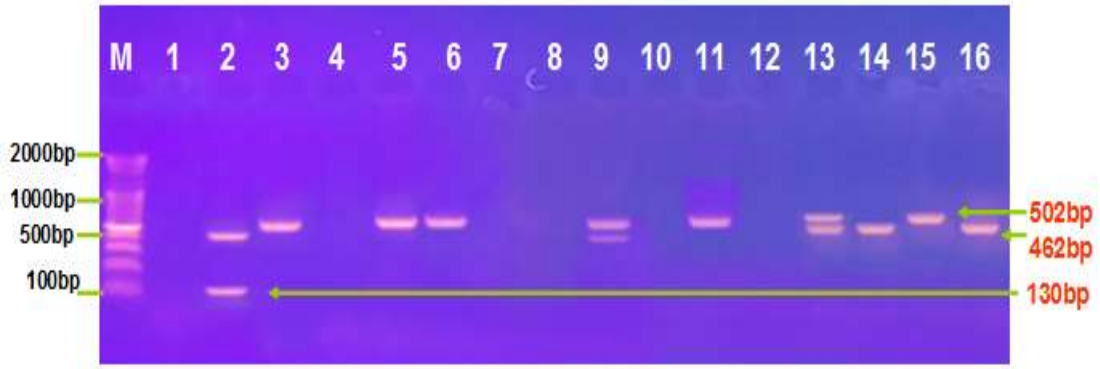


(أ)

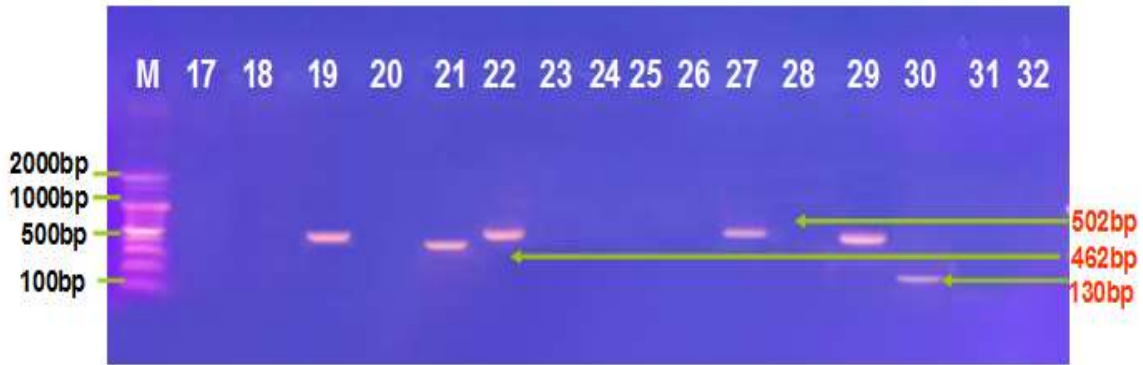


(ب)

شكل (4-6 أ و ب) : الترحيل الكهربائي لهلام الاغاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحلوي على نتائج فحص mPCR لجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايوسيدات في عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* , اذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp , 5 عزلات موجبة لجين *aac(3)-I* بناتج طوله 164bp و 7 عزلات موجبة لجين *aac(6')-I* بناتج طوله 257bp و 3 عزلات موجبة لجين *aac(6')-IIb* بناتج طوله 359bp. باستخدام تيار 80 امبير و100 فولت لمدة ساعة واحدة.

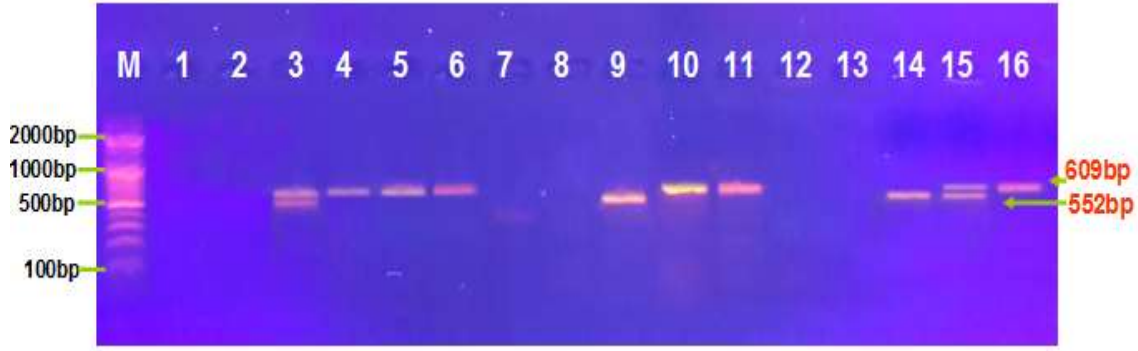


(أ)

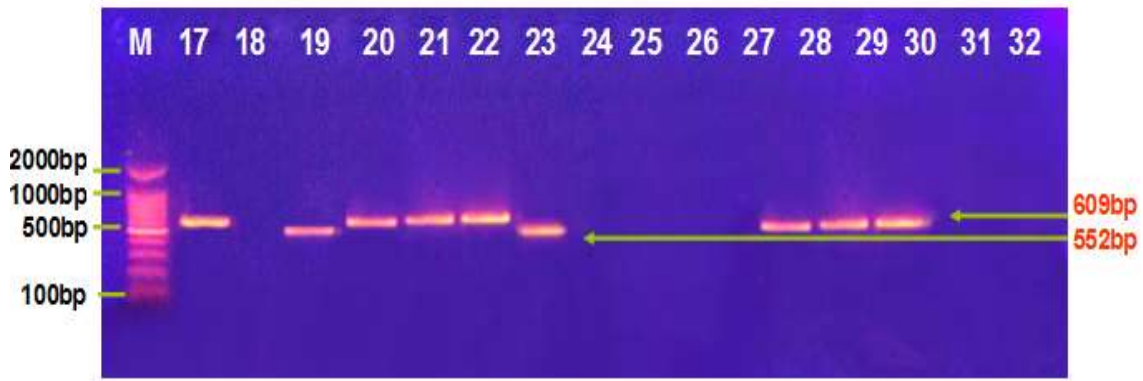


(ب)

شكل (4 - 7 أ و ب) : الترحيل الكهربائي لهلام الاغاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحوي على نتائج فحص mPCR لجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* , اذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp , 7 عزلات موجبة لجين *Ant(4')-IIb* بناتج طوله 462bp و 2 عزلة موجبة لجين *armA* بناتج طوله 130bp و 10 عزلات موجبة لجين *rmtA* بناتج طوله 502bp. باستخدام تيار 80 امبير و100 فولت لمدة ساعة واحدة.



(أ)



(ب)

شكل (4-8 أ و ب): الترحيل الكهربائي لهلام الاغاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص mPCR لجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* , اذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp , 6 عزلات موجبة لجين *rmtD* بناتج طوله 552bp و 14 عزلات موجبة لجين *npmA* بناتج طوله 609bp. باستخدام تيار 80 امبير و100 فولت لمدة ساعة واحدة.

8-4: توزيع جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات ومجاميعها في عزلات

P. aeruginosa

Distribution of Aminoglycoside Antibiotics-resistance genes and their combinations isolates of *P. aeruginosa*

اوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود الجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في مجاميع في العزلة الواحدة جدول (7-4) .

جدول (7-4) توزيع جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات ومجاميعها في عزلات

P. aeruginosa

| عدد عزلات <i>P. aeruginosa</i> (%) | الجينات المشتركة |
|------------------------------------|---|
| 1 (3.12%) | <i>Aph(3')-VI</i> |
| 2 (6.25%) | <i>aac(6')-Ib</i> |
| 2 (6.25%) | <i>aac(3)-I + aac(6')-Ib</i> |
| 2 (6.25%) | <i>aac(6')-Ib + npmA</i> |
| 2 (6.25%) | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(6')-Ib + Aph(3')-VI</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(6')-Ib + rmtA + npmA</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(3)-II + rmtA + npmA</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I</i> |
| 2 (6.25%) | <i>aac(6')-Ib + npmA + Aph(3')-VI</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(6')-Ib + npmA + Ant(4')-IIb</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(6')-Ib + rmtA + rmtD</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(6')-Ib + npmA + aac(6')-IIb</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(3)-I + npmA + Ant(4')-IIb</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(6')-I + aac(6')-Ib + armA</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(6')-Ib + npmA + rmtA + rmtD</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(3)-I + aac(6')-Ib + Ant(4')-IIb + armA</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I + aac(6')-IIb</i> |
| 2 (6.25%) | <i>aac(6')-Ib + Aph(3')-VI + rmtA + npmA</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(3)-I + aac(6')-Ib + Ant(4')-IIb + rmtA</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + Ant(4')-IIb + rmtD</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(6')-Ib + aac(6')-I + Aph(3')-VI + rmtD</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I + aac(6')-IIb + rmtA</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(3)-I + aac(6')-Ib + aac(6')-I + rmtA + npmA</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + Aph(3')-VI + rmtD + npmA</i> |
| 1 (3.12%) | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I + Ant(4')-IIb + rmtA + rmtD</i> |
| 32 (100%) | المجموع |

اظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود تكرار مميز لجينين كانا قد ظهرا في العزلة الواحدة في اربعة مجاميع , اذ سجلت ثلاثة منها $aac(3)-I + aac(6')-Ib$, $aac(6')-Ib + npmA$, $aac(3)-II + aac(6')-Ib$ نسبة (6.25 %) , في حين سجلت المجموعة الرابعة $aac(6')-Ib + Aph(3')-VI$ نسبة (3.12%) جدول (7-4) .

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (2014) Abdul-Wahid في مدينة الناصرية , بالنسبة للمجموعة $aac(3)-II + aac(6')-Ib$, اذ كانت بنسبة 6.8% , وجاءت النتائج مقارنة لما حصل عليه الباحث نفسه بالنسبة للمجموعة $aac(3)-I + aac(6')-Ib$, اذ كانت بنسبة 3.5% , لا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما اشار اليه (2015) Al- jubori et al في مدينة بغداد , اذ سجل نسبة 21.4% للمجموعة $aac(3)-I + aac(6')-Ib$.

سجلت نتائج الدراسة الحالية وجود تكرار لثلاث جينات ظهرت في العزلة الواحدة في تسعة مجاميع , شكلت ثمانية منها $aac(6')-Ib + rmtA + npmA$, $aac(3)-II + rmtA +$, $aac(6')-Ib + npmA + Ant(4')-$, $aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I$, $npmA$, $aac(6')-Ib + npmA + aac(6')-Iib$, $aac(6')-Ib + rmtA + rmtD$, Iib , $aac(6')-I + aac(6')-Ib + armA$, $aac(3)-I + npmA + Ant(4')-Iib$ نسبة (3.12%) , في حين شكلت مجموعة واحدة منها $aac(6')-Ib + npmA + Aph(3')-VI$ نسبة (6.25%) جدول (7-4) .

اوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود تكرار مميز لاربعة جينات ظهرت في العزلة الواحدة في سبعة مجاميع , اذ سجلت ستة منها $aac(3)-I$, $aac(6')-Ib + npmA + rmtA + rmtD$, $aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I +$, $aac(6')-Ib + Ant(4')-Iib + armA$, $aac(3)-I +$, $aac(3)-I + aac(6')-Ib + Ant(4')-Iib + rmtA$, $aac(6')-Iib$, $aac(6')-Ib + aac(6')-I + Aph(3')-VI +$, $aac(6')-Ib + Ant(4')-Iib + rmtA$, $rmtD$ نسبة (3.12%) , في حين سجلت مجموعة واحدة منها $aac(6')-Ib + Aph(3')-VI$ + $rmtA + npmA$ نسبة (6.25%) جدول (7-4) .

اظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود تكرار لخمس جينات قد ظهرت في العزلة الواحدة في ثلاثة مجاميع $aac(3)-I +$, $aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I + aac(6')-Iib + rmtA$, $aac(3)-II + aac(6')-Ib +$, $aac(6')-Ib + aac(6')-I + rmtA + npmA$, $Aph(3')-VI + rmtD + npmA$ جميعها شكلت نسبة (3.12%) .

بينت نتائج الدراسة الحالية وجود ستة جينات في عزلة واحدة + *aac(3)-II* + *aac(6')-Ib* + *aac(6')-I* + *Ant(4')-IIb* + *rmtA* + *rmtD* بنسبة (3.12%) جدول (4-7) .

9-4: انتشار وتوزيع جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في العينات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa*

Incident and distribution of Aminoglycoside Antibiotics-resistance genes in clinical samples of *P. aeruginosa*

كانت نتائج الدراسة الحالية التي كشفت عن تواجد مجاميع الجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* والتي حصلنا عليها من مستشفى الديوانية التعليمي هي الاولى من نوعها , اذ تواجدت جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات بنسبة (53.1%) في مسحات الاذن , وبنسبة (25%) في مسحات الحروق , وشكلت نسبة (12.5%) و (9.3%) في عينات القشع والادرار علي التوالي جدول (4-8) .

ان انتشار وتوزيع جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في عزلات *P. aeruginosa* له اهمية كبيرة في المختبرات السريرية التي ربما تفتقر الى هذه المعلومات مما يعرض العلاج الكيموحيوي بمضادات الامينوكلايكوسيدات للفشل , وان هذا الاكتشاف يؤكد ان بكتيريا *P. aeruginosa* ربما تصبح مصدراً كامناً لجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات .

جدول (8-4) انتشار وتوزيع جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في العينات

السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa*

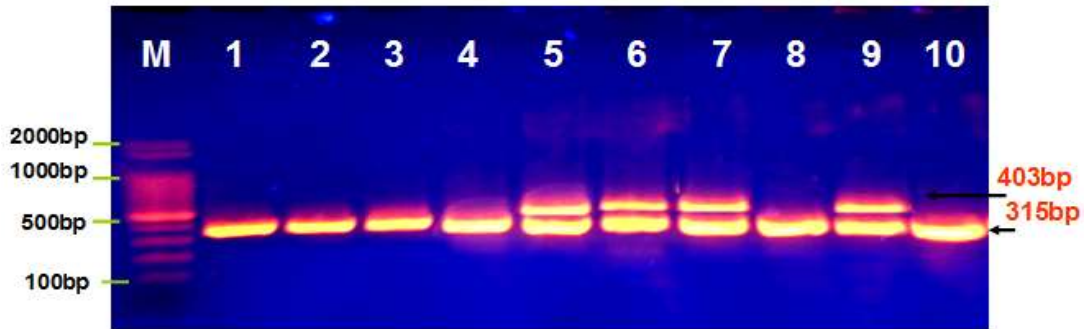
| رقم العزلة حسب مصدر جمعها | | | | عدد العزلات | الجينات المشتركة |
|---------------------------|-------|--------|-------|-------------|---|
| الادرار | القشع | الحروق | الاذن | | |
| ----- | ----- | ----- | 31 | 1 | <i>Aph(3')-VI</i> |
| ----- | ----- | 26 | 47 | 2 | <i>aac(6')-Ib</i> |
| ----- | 5 | 1 | ----- | 2 | <i>aac(3)-I + aac(6')-Ib</i> |
| ----- | ----- | 49 | 17 | 2 | <i>aac(6')-Ib + npmA</i> |
| 24 | ----- | ----- | 42 | 2 | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib</i> |
| ----- | ----- | ----- | 32 | 1 | <i>aac(6')-Ib + Aph(3')-VI</i> |
| ----- | ----- | ----- | 6 | 1 | <i>aac(6')-Ib + rmtA + npmA</i> |
| ----- | 20 | ----- | ----- | 1 | <i>aac(3)-II + rmtA + npmA</i> |
| ----- | ----- | 12 | ----- | 1 | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I</i> |
| 10 | ----- | ----- | 16 | 2 | <i>aac(6')-Ib + npmA + Aph(3')-VI</i> |
| ----- | ----- | ----- | 22 | 1 | <i>aac(6')-Ib + npmA + Ant(4')-IIb</i> |
| ----- | ----- | ----- | 33 | 1 | <i>aac(6')-Ib + rmtA + rmtD</i> |
| ----- | ----- | 28 | ----- | 1 | <i>aac(6')-Ib + npmA + aac(6')-IIb</i> |
| ----- | 29 | ----- | ----- | 1 | <i>aac(3)-I + npmA + Ant(4')-IIb</i> |
| ----- | ----- | ----- | 30 | 1 | <i>aac(6')-I + aac(6')-Ib + armA</i> |
| 15 | ----- | ----- | ----- | 1 | <i>aac(6')-Ib + npmA + rmtA + rmtD</i> |
| ----- | ----- | ----- | 2 | 1 | <i>aac(3)-I + aac(6')-Ib + Ant(4')-IIb + armA</i> |
| ----- | ----- | ----- | 8 | 1 | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I + aac(6')-IIb</i> |
| ----- | ----- | 27 | 50 | 2 | <i>aac(6')-Ib + Aph(3')-VI + rmtA + npmA</i> |
| ----- | ----- | 43 | ----- | 1 | <i>aac(3)-I + aac(6')-Ib + Ant(4')-IIb + rmtA</i> |
| ----- | ----- | ----- | 14 | 1 | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + Ant(4')-IIb + rmtD</i> |
| ----- | 19 | ----- | ----- | 1 | <i>aac(6')-Ib + aac(6')-I + Aph(3')-VI + rmtD</i> |
| ----- | ----- | ----- | 3 | 1 | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I + aac(6')-IIb + rmtA</i> |
| ----- | ----- | 5 | ----- | 1 | <i>aac(3)-I + aac(6')-Ib + aac(6')-I + rmtA + npmA</i> |
| ----- | ----- | ----- | 39 | 1 | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + Aph(3')-VI + rmtD + npmA</i> |
| ----- | ----- | ----- | 9 | 1 | <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I + Ant(4')-IIb + rmtA + rmtD</i> |

10-4 : انتشار جينات المقاومة لمضادات الكينولينات

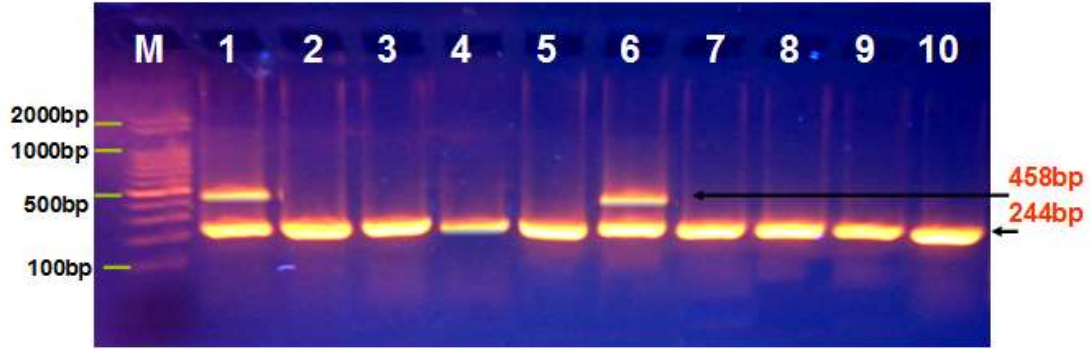
Dissemination of Quinolone Antibiotics- Resistance Genes

ان الكشف عن تواجد جينات المقاومة لمضادات الكينولينات ذات اهمية كبيرة من الناحية الوبائية, كما إنَّ المعلومات حول تواجد وانتشار جينات المقاومة لمضادات الكينولينات في العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* غير متوفرة في العراق عموماً ومدينة الديوانية خاصة, لذلك ارتأت الدراسة الحالية التحري عن مدى تواجد وانتشار جينات المقاومة لمضادات الكينولينات في 10 عزلات لبكتيريا *P. aeruginosa* باستعمال تقنية سلسلة تفاعل انزيم البلمرة Multiplex PCR .

تحدث اهم آليات المقاومة لمضادات الكوينولينات بواسطة الكروموسومات من خلال حدوث الطفرات في الجين *gyrA* والجين *gyrB*, اللذين يعبران عن الإنزيم DNA gyrase (Ruiz, 2003), وكذلك حدوث الطفرات في الجين *parC* والجين *parE*, اللذين يعبران عن الإنزيم Topoisomerase-IV (Ghosh and here, 2011) شكل (9-4) وشكل (10-4) .



شكل (9-4): الترحيل الكهربائي لهلام الاغاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص mPCR لجينات المقاومة لمضادات الكينولينات في عزلات بكتيريا *P. aeruginosa*, اذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp , 10 عزلات موجبة لجين *gyrA* بناتج طوله 403bp , و 4 عزلات موجبة لجين *gyrB* بناتج طوله 315bp. باستخدام تيار 80 امبير و100 فولت لمدة ساعة واحدة.

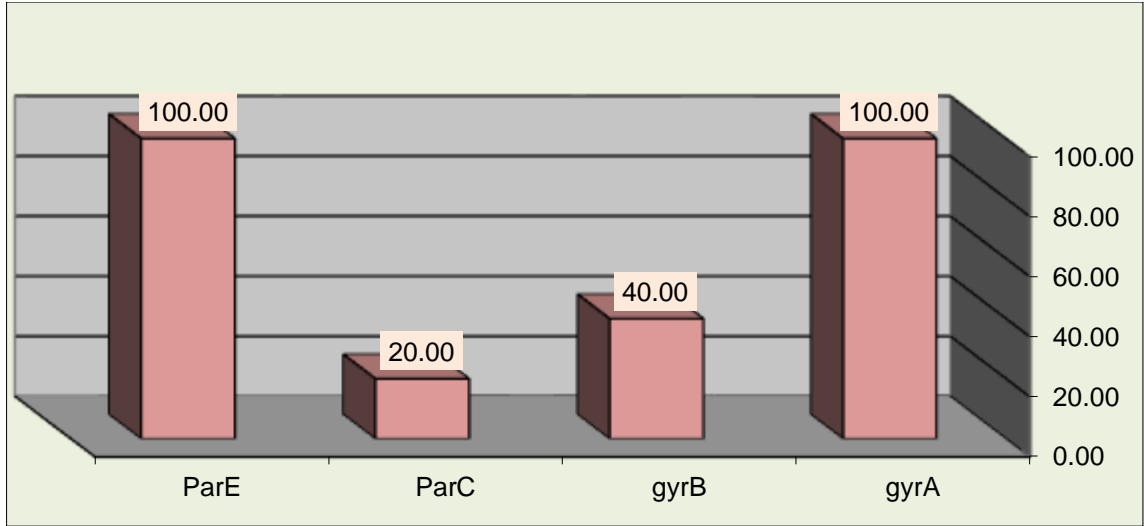


شكل (4-10): الترحيل الكهربائي لهلام الاغاروز المستخدم بتركيز 1 غم والحاوي على نتائج فحص mPCR لجينات المقاومة لمضادات الكينولينات في عزلات بكتيريا *P. aeruginosa*, اذ يمثل M: Marker ladder 2000-100bp , 10 عزلات موجبة لجين *ParE* بناتج طوله 244bp , و 2 عزلة موجبة لجين *ParC* بناتج طوله 458bp. باستخدام تيار 80 امبير و100 فولت لمدة ساعة واحدة.

سجلت نتائج الدراسة الحالية نسبة تواجد عالية للجين *gyrA* , اذ تواجد في 10 عزلات لبكتيريا *P. aeruginosa* بنسبة 100% , في حين تواجد الجين *gyrB* في 4 عزلات بنسبة 40% , اذ يبين جدول (4-9) وشكل (4-11) انتشار جينات المقاومة لمضادات الكينولينات في العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa*

جدول (4-9) انتشار جينات المقاومة لمضادات الكينولينات في عزلات *P. aeruginosa*

| عدد عزلات <i>P. aeruginosa</i> | الجينات |
|--------------------------------|-------------|
| 10 (100%) | <i>gyrA</i> |
| 4 (40%) | <i>gyrB</i> |
| 2 (20%) | <i>parC</i> |
| 10 (100%) | <i>pare</i> |



شكل (4-11) انتشار جينات المقاومة لمضادات الكينولينات في عزلات *P. aeruginosa*

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (Cho *et al* (2014) في كوريا , اذ سجل نسبة تواجد 98.1% للجين *gyrA* , وجاءت النتائج مقارنة لما حصل عليه Agnello and Wong-Beringer (2012) في فرنسا , اذ سجل نسبة تواجد 88% للجين *gyrA* , في حين لا تتفق النتائج مع ما اشار اليه الباحث نفسه بالنسبة للجين *gyrB* , اذ سجل نسبة تواجد 84% , كما لا تتفق النتائج مع ما سجله Rieuwpassa *et al* (2015) في اندونيسيا , اذ سجل نسبة تواجد 54.5% للجين *gyrA* , وقد ذكر (Salma *et al* (2012) ان حدوث الطفرات في الجين *gyrA* , تعد الأكثر شيوعاً في العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa*

كما اظهرت نتائج الدراسة الحالية نسبة تواجد عالية للجين *parE* , اذ تواجد في 10 عزلات لبكتيريا *P. aeruginosa* بنسبة 100% , بينما تواجد الجين *parC* في عزلتين بنسبة 20% جدول (4-9) . تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (Salma *et al* (2012) في لبنان , اذ سجل نسبة تواجد 21.05% للجين *parC* , كما تتفق مع ما اشار اليه Yang *et al* (2015) في الصين , اذ سجل نسبة تواجد 23.1% للجين *parC* , وكانت النتائج مقارنة لما حصل عليه (Agnello and Wong-Beringer (2012) في فرنسا , اذ سجل نسبة تواجد 86% للجين *parE* , لا تتفق النتائج مع ما سجله (Mastumoto *et al* (2012) في اليابان , اذ سجل نسبة تواجد 9.1% للجين *parC* .

11-4: توزيع جينات المقاومة لمضادات الكينولينات ومجاميعها في عزلات

P. aeruginosa

Distribution of Quinolone Antibiotics-resistance genes and their combinations isolates of *P. aeruginosa*

اظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود الجينات المقاومة لمضادات الكينولينات في مجاميع في العزلة الواحدة جدول (10-4) . اذ تبين من نتائج الدراسة الحالية وجود الجينين *gyrA + parE* بنسبة 50% .

سجلت نتائج الدراسة الحالية وجود تكرار لثلاث جينات ظهرت في العزلة الواحدة في مجموعتين, شكلت المجموعة *gyrA + parC+ parE* نسبة 10% , في حين شكلت المجموعة الاخرى *gyrA + gyrB + parE* نسبة 30% , كما اوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود تكرار لاربعة جينات ظهرت في العزلة الواحدة *gyrA + gyrB+ parC+ parE* بنسبة 10% .

جدول (10-4) توزيع جينات المقاومة لمضادات الكينولينات ومجاميعها في عزلات

P. aeruginosa

| عدد عزلات <i>P. aeruginosa</i> | الجينات المشتركة |
|--------------------------------|--------------------------------|
| 5 (50%) | <i>gyrA + parE</i> |
| 1 (10%) | <i>gyrA + parC+ parE</i> |
| 3 (30%) | <i>gyrA + gyrB + parE</i> |
| 1 (10%) | <i>gyrA + gyrB+ parC+ parE</i> |
| 10 (100%) | المجموع |

12-4 : انتشار وتوزيع جينات المقاومة لمضادات الكينولونات في العينات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa*

Incident and distribution of Quinolone Antibiotics-resistance genes in clinical samples of *P. aeruginosa*

كانت نتائج الدراسة الحالية التي كشفت عن تواجد مجاميع الجينات المقاومة لمضادات الكينولونات في العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa* والتي حصلنا عليها من مستشفى الديوانية التعليمي هي الاولى من نوعها , اذ تواجدت جينات المقاومة لمضادات الكينولونات بنسبة 50% في مسحات الاذن , وبنسبة 30% في مسحات الحروق, وشكلت نسبة 10% في كل من عينات القشع وعينات الادرار جدول (11-4) .

جدول (11-4) انتشار وتوزيع جينات المقاومة لمضادات الكينولونات في العينات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa*

| رقم العزلة حسب مصدر جمعها | | | | عدد العزلات | الجينات المشتركة |
|---------------------------|-------|---------|----------------|-------------|--------------------------------|
| الادرار | القشع | الحروق | الاذن | | |
| ---- | 5 | 27 | , 32 ,17 47 | 5 | <i>gyrA + parE</i> |
| ---- | ---- | ---- | 3 | 1 | <i>gyrA + parC+ parE</i> |
| 10 | ---- | 49 , 12 | ---- | 3 | <i>gyrA + gyrB + parE</i> |
| ---- | ---- | ---- | 33 | 1 | <i>gyrA + gyrB+ parC+ parE</i> |

ان انتشار وتوزيع جينات المقاومة لمضادات الكينولونات في عزلات *P. aeruginosa* له اهمية كبيرة من الناحية العلاجية , وهذا الأمر يدعو إلى القلق لكونه يقلل فرص نجاح الخيارات العلاجية الفعالة , وان هذا الاكتشاف يؤكد ان بكتيريا *P. aeruginosa* ربما تصبح مصدراً كامناً لجينات المقاومة لمضادات الكينولونات.

13-4: انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات والكينولينات

Dissemination of Aminoglycoside and Quinolone Antibiotics-Resistance Genes

تعد بكتيريا *P. aeruginosa* من ملوثات المستشفيات المعروفة التي أصبح وجودها من المشكلات الرئيسية التي يعاني منها الكادر الطبي وذلك لمقاومتها العالية والمتعددة للمضادات الحيوية لاسيما التي تعود لمجموعة الامينوكلايكوسيدات ومجموعة الكينولينات , لذلك فإن وجود أصناف مختلفة من الجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات والكينولينات في عزلة بكتيرية مفردة ربما يسبب تحديات تشخيصية وعلاجية كثيرة .

اوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود الجينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات في 32 عزلة لبكتيريا *P. aeruginosa* بنسبة 64% , اذ كانت 10 عزلات منها بنسبة 31.2% تمتاز بوجود الجينات المقاومة لمضادات الكينولينات ايضاً جدول (4-12) .

جدول (4-12) : انتشار جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات والكينولينات .

| جينات المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات | عدد عزلات <i>P.aeruginosa</i> | جينات المقاومة لمضادات الكينولينات |
|--|----------------------------------|---------------------------------------|
| <i>aac(3)-I + aac(6')-Ib + aac(6')-I + rmtA + npmA</i> | 5 (50%) | <i>gyrA + parE</i> |
| <i>aac(6')-Ib + npmA</i> | | |
| <i>aac(6')-Ib + Aph(3')-VI + rmtA + npmA</i> | | |
| <i>aac(6')-Ib + Aph(3')-VI</i> | | |
| <i>aac(6')-Ib</i> | | |
| <i>aac(6')-Ib + npmA + Aph(3')-VI</i> | 3 (30%) | <i>gyrA + gyrB + parE</i> |
| <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I</i> | | |
| <i>aac(6')-Ib + npmA</i> | | |
| <i>aac(3)-II + aac(6')-Ib + aac(6')-I + aac(6')-Iib + rmtA</i> | 1 (10%) | <i>gyrA + parC + parE</i> |
| <i>aac(6')-Ib + rmtA + rmtD</i> | 1 (10%) | <i>gyrA + gyrB + parC + parE</i> |
| | 10 (100%) | المجموع |

Conclusions

الاستنتاجات

- 1- اظهرت الدراسة ان بكتيريا *P. aeruginosa* مسؤولة عن اخماج مرضية مختلفة وبنسب عالية في مستشفى الديوانية التعليمي .
- 2- أبدت جميع عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* قيد الدراسة صفة تعدد المقاومة MDR , XDR , PDR , مما يشكل تحدياً علاجياً كبيراً .
- 3- أظهرت تقنية تفاعل إنزيم البلمرة PCR قابلية عالية لمعظم عزلات *P. aeruginosa* المقاومة لمضادات الامينوكلايكوسيدات على إنتاج إنزيمات الامينوكلايكوسيدات .
- 4- بينت الدراسة ارتفاع مستويات المقاومة لمضادات لامينوكلايكوسيدات , اذ كان الجين *aac(6')-Ib* هو الجين الاكثر تواجداً بين جينات المقاومة للأمينوكلايكوسيدات (*aac(3)-II* و *aac(6')-I* و *aac(3)-I* و *aac(6')-Iib* و *aph (3')-VI* و *ant* و *(4')-Iib*) .
- 5- أبدت عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* قابلية عالية على إنتاج انزيم المثليز 16SrRNA methylase , اذ سجل الجين *npmA* اعلى نسبة تواجد بين جينات انزيم المثليز, في حين سجل الجين *arma* اقل نسبة تواجد بين جينات انزيم المثليز .
- 6- أظهرت تقنية تفاعل إنزيم البلمرة PCR قابلية عزلات *P. aeruginosa* المقاومة لمضادات الكينولينات على إنتاج الجينات المقاومة للكينولينات.
- 7- سجلت الدراسة نسبة تواجد عالية للجينين *gyrA* و *parE* , في حين سجلت اقل نسبة تواجد للجين *parC* .
- 8- اظهرت الدراسة وجود الجينات المقاومة للأمينوكلايكوسيدات و الكينولينات مجتمعة في بعض عزلات *P. aeruginosa*

- 1- ضرورة اجراء المسح الدوري للمستشفيات لتحديد مصدر التلوث البكتيري ومعرفة مستويات المقاومة للمضادات الحيوية .
- 2- اعتماد فحص الحساسية الدوائية في مختبرات مستشفى الديوانية التعليمي , والتأكيد على استعمال المضادات الحيوية عند الحاجة القصوى لتلافي ظهور السلالات المقاومة لتلك المضادات .
- 3- الكشف عن الجينات المقاومة للأمينوكلايكوسيدات في البكتيريا الموجبة لصبغة جرام .
- 4- اجراء المزيد من الدراسات على بكتيريا *P. aeruginosa* لتحديد التعبير الجيني لانزيمات الأمينوكلايكوسيدات باستعمال التقنيات الحديثة الاكثر تطوراً مثل تقنية Real time PCR .
- 5- التوسع في الدراسات الخاصة بمعرفة مدى أنتشار الجينات المقاومة للكينولينات في عزلات *P. aeruginosa* لما لها من دور في رصد المقاومة لهذه المضادات وللحد من انتشارها باستعمال تقنية تفاعل إنزيم البلمرة PCR .

المصادر العربية :

- باصات ، ديمة نزار فرج. (2006). تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنباتي سم الفراخ والقريص على بعض عوامل الضراوة والدنا البلازميدي لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة محلياً. رسالة ماجستير. كلية العلوم- جامعة بغداد.
- بلال , الهام جواد كاظم. (2010). التحري عن بعض إنزيمات البييتالاكتاميز في العزلات السريرية لبكتيريا الزوائف الزنجارية في مدينة النجف . رسالة ماجستير , كلية التربية للبنات - جامعة الكوفة.
- الجراح , صلاح سلمان زين العابدين . (2007) . المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة في مدينة الرمادي . مجلة الانبار للعلوم الصرفة العدد الأول , المجلد الأول : 1991-8941.

حران , عمر حسين. (2012). التحري عن جينات المقاومة لمضادات البيتاالكتام من البكتيريا المعزولة من بعض الإصابات السريرية في محافظة الديوانية . رسالة ماجستير , كلية العلوم - جامعة القادسية .

الحسو , محمود زكي سليمان سلطان. (2006). استخلاص وتنقية انزيمات البيتاالكتاميز من بعض العصيات السالبة لصبغة غرام المعزولة من إصابات الجهاز التنفسي السفلي ودراسة بعض خصائصها . أطروحة دكتوراه , كلية العلوم - جامعة الموصل .

الرماحي , سيوف خومان علوان. (2006). دراسة مايكروبية ومناعية على بعض المسببات المرافقة لخمج الأذن الوسطى في محافظة القادسية . أطروحة دكتوراه , كلية التربية - جامعة القادسية .

سالم , رنا مشعل. (2014). انتشار انزيمات البيتاالكتاميز نوع OXA بين بكتيريا الزوائف الزنجارية والمعزولة من مشششفيات محافظة الديوانية . رسالة ماجستير , كلية العلوم - جامعة القادسية .

العزاوي ، أحمد نوري فيصل. (2006) دراسة مقارنة بين تأثير بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* و EDTA مع المضادات الحيوية على بكتيريا الـ *Pseudomonas aeruginosa*. رسالة ماجستير , مقدمة إلى كلية العلوم - جامعة النهرين.

منحر , لمى فؤاد. (2011). دراسة بعض الجوانب الفسلجية والوراثية لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من حالات سريرية في مدينة الديوانية . رسالة ماجستير , كلية التربية - جامعة القادسية .

References:

Abdul-Wahid, A.A.(2014). Dissemination of Aminoglycosides Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Al-Nasseryia Hospitals. M.Sc. Thesis. College of Medicine. University of Kufa.

Abril, C.; Brodard, I. and Perreten, V. (2010). Two novel antibiotic resistance genes, *tet (44)* and *ant(6)-Ib*, are located within a transferable pathogenicity island in *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Antimicrob. Agents Chemother., 54:3052–3055.

Adams, M.D.; Goglin, K.; Molyneaux, N.; Hujer, K.M.; Lavender, H.; Jamison, J.J.; MacDonald, I.J.; Martin, K.M.; Russo, T.; Campagnari, A.A.; Hujer, A.M.; Bonomo, R.A. and Gill, S.R. (2008). Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.*, 190:8053–8064.

Adams-Haduch, J.M.; Paterson, D.L.; Sidjabat, H.E.; Pasculle, A.W.; Potoski, B.A.; Muto, C.A.; Harrison, L.H. and Doi, Y. (2008). Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52(11):3837–3843.

Aghazadeh, M.; Hojabri, Z.; Mahdian, R.; Nahaei, M.R.; Rahmati, M.; Hojabri, T.; Pirzadeh, T. and Pajand, O. (2014). Role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY (-OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in non-metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and burn patients. *Infection, Genetics and Evolution.* 24:187-192.

Agnello, M. and Wong-Beringer A. (2012). Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoSOne*;7(8):e42973.

Al-Fatlawi, A.F.(2012). Detection of some Extended Spectrum Beta Lactamases Genes in *Escherchia coli* and *Klebsiella spp.* Isolated from Colon and Bladder Cancer

Patients in Al-Diwania City . M.Sc. Thesis. College of Medicine, Al-Qadisiya University.

Algun, U.; Arisoy, A.; Gunduz, T. and Ozbakkaloglu, B.(2004). The resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains to fluoroquinolone group of antibiotics . Indian J Med Microbiol ,22(2):112-114.

Ali Khan, J.; Zafari, I.; Saeed, U. and Kalsoom, F. (2008). Prevalence and pattern of *Pseudomonas aeruginosa* against various antibiotics. Pak. J. Pharm. Sci., 21(3):311-315.

Al-Jubori,S.S.; Al-Jabiri, H.A.; and Al-Kadmy, I. M.S. (2015). Molecular Detection of Aminoglycoside Resistance Mediated by Efflux Pump and Modifying Enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Iraqi Hospitals.. Int'l Conf. on Medical Genetics, Cellular & Molecular Biology, Pharmaceutical & Food Sciences.

Al-kabei, M.N.H.(2009). Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages Infecting *Pseudomonas aeruginosa* . M.Sc. Thesis. College of Sciences, Al-Qadisiya University.

Al-Mayahi, F.S. (2013). Distribution of CTXM beta-lactamases (ESBL) of uropathogenic isolates of *Escherichia coli* in Al-Diwaniya city. Ph.D. Thesis. University of Al-Kadeseiya .

Al-Muhannak, F.H. (2010). Spread of some extended-spectrum beta-Lactamases in clinical isolates of Gram-negative

bacilli in Najaf. M.Sc.Thesis. College of Medicine.University of Kufa.

Al-Salihi , S.S. and Hameed , B.H. (2014). Antibiosis resistant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical specimens. Kirkuk University Journal /Scientific Studies,9 (2): 15-28.

Al-Shalchi, S.A. ; Jubrael, J.M. and Krekor, A. (2001) . The use of RAPD-PCR atyping method for epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* . The second conference in Medical and Biological Sciences , 157-158.

Al-Shara, J.M.R. (2013). Phenotypic and molecular detecting of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Najaf Hospitals. Ph.D. Thesis. Faculty of Science. University of Kufa. Iraq .

Andriole, V.T. (2005). The quinolones: past, present, and future. Clin. Infect. Dis., 41: 113-119.

Ansari, A.; Salman, S. M. and Yaqoob, S. (2015). Antibiotic Resistance Pattern in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated at Era s Lucknow Medical College and Hospital,Lucknow, India.Int.J.Curr.Microbial.App.

Ansell, A. and Hawthorne, D. (2008). Separation and characterization of lecithinase in *Pseudomonas aeruginosa* . J. Biochem ., 84:179-191.

Anvarinejad, M. ; Farshad, S. ; Alborzi, A. ; Ranjbar, R. ;Giammanco, G. ; and Japoni, A.(2011).Integron and genotype patterns of Quinolones- resistant uropathogenic

Escherichia coli ., Afr. J. Microbial. Res Italy. 5 (22) : 3765-3770.

Arora, D., Jindal, N., Kumar, R. & Romit, M. (2011) Emerging Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Challenge. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 3(2): 1488-1491.

Arsaln, H.; Azap, O.K.; Ergonul, O. and Timurkaynak, F. (2005). Urinary tract infection study group, risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. J. Antimicrob. Chemother.,56: 914-918.

Arya, D.P. (2007). Aminoglycoside antibiotics, chemical biology to drug discovery. Hoboken, N.J., Wiley-Interscience.

Avains , A.B. (2009). Identification of unusual pathogenic gram-negative aerobic and an aerobic . Afr. J. Med . Sci,24:135-139.

Aziz, Z. S. (2015). Study of carbapenems phenotypic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burns in Misan province. Journal of International Academic Research for Multidisciplinary.3(3): 2320-5083.

Baron, E.J. and Finegold, S.M. (1990).Bailey and Scott's. Diagnostic Microbiology .(8thed) Mosby . USA.

Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; and Truck, M.(1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 45: 493 – 496.

- Bennet** , P. and **Brown** , M. (2008). Clinical pharmacology , 10th ed . Churchill livingstone , Elsevier .Spain .
- Bibi**, K. ; **Khattak**, M. ; **Ahmad**, N.; **Ishaq**, M.S. and **Muhammad**, A. (2015). Isolation, Identification and antimicrobial analysis of *Pseudomonas aeruginosa* from different clinical samples and to study the interactions of target and resistant proteins with cefepime and imipenem through docking. Kaohsiung Journal of Medical Sciences.8(1).
- Blandino**, G.; **Marchese**, A.; **Ardito**, F.; **Fadda**, G. and **Fontana**, R. (2004). Antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated in Italy from patients with hospital acquired infections. Int. J. Antimicrob. Agents., 24:515-518.
- Bogaerts**, P.; **Galimand**, M.; **Bauraing**, C.; **Deplano**, A.; **Vanhoof**, R.; **Mendonca**, R.D.; **Villalobos**, H.R.; **Struelens**, M. and **Glupczynski**, Y. (2007). Emergence of *ArmA* and *RmtB* aminoglycoside resistance *16S rRNA* methylases in Belgium. J. Antimicrob. Chemother., 59(3):459-464.
- Brooks**, G. I.; **Butel**, J. S. and **Morse**, S. A. (2007). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 2nd ed., Lange Medical Books, McGraw-Hill, USA. P.818 .
- Brown**, A . (2007). Bensons Microbiological application laboratory manual in general microbiology . McGraw – Hill Co.INC. USA . P:102 -263.
- Bukharie**, H. A. and **Mowafi**, H. A.(2010). Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* and

Antibiotic Use in King Fahd Hospital of the University in Khobar, Saudi Arabia. Scientific Journal of King Faisal University. Basic and Applied Sc.,11(1):1431.

Busch-Sorensen, C.; Sonmezoglu, M.; Frimodt-Moller, N.; Hojbjerg, T.; Miller, G.H. and Espersen, F. (1996). Aminoglycoside resistance mechanisms in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. from two Danish hospitals: correlation with type of aminoglycoside used. APMIS., 104:763–768.

Bush, K. and Jacoby, G.A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother., 54:969–976.

Bush, K., Jacoby, G. and Medeiros, A. (1995). A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother., 39:1211-1233.

Centron, D. and Roy, P.H. (2002). Presence of a group II intron in a multiresistant *Serratia marcescens* strain that harbors three integrons and a novel gene fusion. Antimicrob. Agents Chemother. , 46:1402– 1409.

Champney , W. (2008). Methods in Molecular Medicine new Antibiotic targets . Totowa , Newjersey . P: 1-63.

Chander, A. and Raza, M.S. (2013) Antimicrobial susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates at a tertiary care hospital in Kathmandu, Nepal. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research; 6(3).

- Cheer, S.M.;** Waugh, J. and Noble, S. (2003). Inhaled tobramycin (TOBI): a review of its use in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis. *Drugs.*, 63(22):2501-2520.
- Cho, H.H. ;** Kwon, K.C. ; Kim, S. ; and Koo, S.H.(2014). Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* . Original Article *Clinical Microbiology* , 34:286-292.
- Cicek, A.C.;** Saral, A.; Duzgun, A.O.; Cizmeci, Z.; Kayman, T.; Balci, P.O.; Dal, T.; Firat, M.; Yazici, Y.; Sancaktar, M.; , Osman Birol Ozgumus, O.B. and Sandalli, C. (2013). Screening of class 1 and class 2 integrons in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* collected from seven Hospitals in Turkey: A Multicenter Study. *J. Med. Microb.*, 3:227-233.
- Clark, M.** (2006) . Role of cell wall degrading enzymes in Pathogenicity of bacteria . *Rev. Iberoam. Microbiology.* 17:547-553.
- Clinical** and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22ed. Informational Supplement. 32(3).
- Collee, J. G.;** Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmon, A. (1996). Mackie and McCartney, *Practical Medical Microbiology*. 4th ed. Churchill Livingstone inc.; USA.
- Coyne, S.;** Courvalin, P. and Galimand, M. (2010). Acquisition of multidrug resistance transposon Tn6061 and IS6100-

mediated large chromosomal inversions in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbiology.*, 156:1448–1458 .

DeMiguel Martinez, I.;Del Rosario Quintana, C.; Bolanos, Rivero, M. and Ramos Macias, A. (2005). Aetiology and therapeutic considerations in chronic otitis media. Analysis of a 5 years period. *Acta. Otorrinolaringol. Esp.* 56 (10): 459 – 462.

Distler, J.; Ebert, A.; Mansouri, K.; Pissowotzki, K.; Stockmann, M. and Piepersberg, W. (1987). Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.*, 15(19):8041–8056.

Doi, Y. and Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.*, 45(1):88–94.

Doi, Y.; Garcia, D.; Adams, J. and Paterson, D.L. (2007). Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51(3):852–856.

Drlica, K.; Hiasa, H.; Kerns, R.; Malik, M.; Mustaev, A. and Zhao, X. (2009). Quinolones: action and resistance updated. *Curr. Top Med. Chem.*, 9(11):981–998.

Dubois , V.; Arpin, C.; Dupart, V.; Scavelli, A.; Coulange, L.; Andre, C.; Fischer, I.; Grobost, F.; Brochet, J.P.;

Lagrange, I.; Dutilh, B.; Jullin, J.; Noury, P.; Larribet, G. and Quentin, C. (2008). B-lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *J. Antimicrob. Chemother.*, 62:316–323.

Dunne, W.M. and Hardin, D.J. (2005). Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter. spp.*, *Citrobacter. spp.* and *Serratia. spp.* *Clin. Microbiol.*, 43(12):5945-5949.

Dworkin, M.; Falkow, S.; Schleifer K-H. ; *et al.*(2006). The prokaryotes a handbook on the biology of bacteria. Springer Science Business Media, USA. P. 704-713.

Fang, D. ; Xi-wei, X. ;Wen-qi, S.; Ping, L.; Sang-jie, Y.; Yong-hong, Y.; Xu-zhuang, S. (2008). Characterization of multi drug resistant and metallo beta lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from paediatric clinic in china. *Chinese Medical Journal.* 121(17): 1611-1616.

Fayroz-Ali, J.M.H. (2012). Detection of quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from patients with significant bacteriuria in Najaf Province. Ph.D. Thesis. Sc.University of Babylon. Iraq.

Fonseca, A.P.; Correia, P.; Sousa, J.C. and Tenreiro, R. (2007). Association patterns of *Pseudomonas aeruginosa* clinical

isolates as revealed by virulence traits, antibiotic resistance, serotype and genotype. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 51(3):505-516.

- Gad**, G.F.; Mohamed, H.A. and Ashour, H.M. (2011). Aminoglycoside Resistance Rates, Phenotypes, and Mechanisms of Gram-Negative Bacteria from Infected Patients in Upper Egypt. PLoS ONE. 6(2):1-7.
- Galimand**, M.; Courvalin, P. and Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. Antimicrob. Agents Chemother., 47(8):2565–2571.
- Gasink**, L.B.; Fishman, N.O.; Weiner, M.G.; Nachamkin, I.; Bilker, W.B. and Lautenbach, E. (2006). Fluoroquinolone resistant *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk factors and clinical impact. Am. J. Med., 119(6):19-25.
- Gawish**, A.; Mohammed, N.; El-Shennawy, G. and Mohammed, H. (2013). An investigation of type 3 secretion toxins encoding-genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a university hospital in Egypt. J. of Microbio. and Infec. Dis., 3 (3): 116-122.
- Gaynes**, R. and Edwards, J. R. (2005). Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. Clin. Infect. Dis., 41:848-854.
- George**, A.; Krivoshein, Y.D.; and Pichon, N. (2005). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in the clinical Laboratory. J. of medical Microbiol., 2:9-16.

- Ghosh, U.K. and Hore, A. (2011).** Isolation and Characterization of Nalidixic Acid Resistant Mutant of a Thermophilic Actinomycete. *Int. J. Microbiol. Res.*, 2: 120-123.
- Giamarellou, H. (2000).** Therapeutic guidelines for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Int. J. Antimicrob. Agen.*, 16(2):103-106.
- Giedraitienė, A.; Vitkauskienė, A.; Naginienė, R. and Pavilion, A. (2011).** Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*., 47(3):137-146.
- Gilbert, D.N. (2000).** Principles and practice of infectious diseases, aminoglycosides. Churchill Livingstone. New York., 307–336.
- Gionechetti, F.; Zucca, P.; Gombac, F.; Monti Bragadin, C.; Lagatolla, C.; Tonin, E.; Edalucci, E.; Vitali, L.A. and Dolzani, L. (2008).** Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from mediterranean herring gulls (*Larus cachinnans*). *Microb. Drug Resist.*, 14:93–99.
- Greenwood, D.; Finch, R.; Davey, P. and Wilcox, M. (2007).** Antimicrobial chemotherapy. Oxford University Press, New York.
- Guilfoile, G.(2007).** Deadly disease and epidemics Antibiotic-Resistant Bacteria. Chelser House publisher , World Health organization. P:10-119.
- Haldorsen, B.C. (2011).**Aminoglycoside resistance in clinical Gram-negative isolates from Norway.M.Sc. thesis in medical biology. Norway. University of Tromso.

- Hamed**, S.M.; Aboshanab, K.M.A.; Walid F. Elkhatib, W.F. and Ashour, M.S. (2013). Aminoglycoside resistance patterns of certain Gram negative uropathogens recovered from hospitalized Egyptian patients. *British Microbiol. Rese. J.*, 3(4): 678-691.
- Hancock**, R.E.W. and Brinkman, F. (2002). Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56:17-38.
- Harley**, J. P. and Prescott, L. M. (1996). *Laboratory Exercises in Microbiology*. 3rd ed. McGraw-Hill Comp., USA.
- Harvey** , R . ; Champe ,P. ; Fisher , B .(2007). *Lippincotts illustrated review Microbiology* . 2nd ed . Lippincott Williama and Wilkins , USA. 112.
- Harvey** , R . ; Champe ,P. ; Howland , R. ; Mycek , M.(2006). *Lippincotts illustrated review Pharmacology* . 3rd ed . Lippincott Williama and Wilkins , USA .552.
- Hata**, M.; Suzuki, M.; Matsumoto, M.; Takahashi, M.; Sato. K.; Ibe, S. and Sakae, S. (2005). Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49 : 801-803.
- Hawkey** , P. and Munday , C. (2004). Chemical resistance in Gram negative Bacteria . *Lippincott Williama and Wilkins ,Rev. Med . Microbiol.*,15(2).
- Hermann**, T. (2005). Drugs targeting the ribosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15:355 – 366 .

- Heuer, H.;** Krogerrecklenfort, E.; Wellington, E.M.; Egan, S.; Elsas, J.D.; Overbeek, L.; Collard, J.M.; Guillaume, G.; Karagouni, A.D.; Nikolakopoulou, T.L. and Smalla, K. (2002). Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 42:289–302.
- Hoiby, N.;** Johansen, H.K.; Moser, C.; Song, Z.; Ciofu, O. and Kharazmi, A. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microb. Infection.*, 3: 23-35.
- Ibezim, E. C.** (2005). Microbial resistance to antibiotics. *African Journal of Biotechnology.* 4 (13): 1606-1611.
- Ikpeme, E.M. ;** Enyi-Idoh, K.H. ; Nfongeh, J.F. ; Etim, L.B. and Akubuenyi, F.C. (2013). Prevalence antibiogram profile and cross transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary burn unit. *Malaysian Journal of Microbiology,* 9(1):116-119.
- Islam, S.** (2008). Chromosomal antibiotic resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria gonorrhoeae*. Karoliska Institute. Stockholm, Sweden.
- Isoherranen, N. and** Soback, S. (2000). Determination of gentamicin after trimethylsilylimidazole and trifluoroacetic anhydride derivatisation using gas chromatography and negative ion chemical ionization ion trap mass spectrometry. *Analyst* 125: 1573-1576.
- Itah, A.Y. and** Essien , J.P. (2005). Growth profile and Hydrocarbono clastic potential of Microorganisms

Isolated from Tarballs in the Bight of Bonny , Nigeria ,
World J. of Microbiol Biotechnol., V. 21: 6-7.

Iwalokun, B.A.; Akinsinde , K.A.; Lanlenhin, O. and Onubogu, C. (2006). Bacterio cinogenicity and production of pyocins from *Pseudomonas aeruginosa* species isolated in Lagos, Nigeria. Afr. J. Biotechnology. 5(11) : 1072-1077.

Jacoby, G. A. (1994). genetics of extended – spectrum β - lactamas
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Supplement 1: 2-11.

Jacoby, G.A. (2005) Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis 41: 120–126.

Jacoby, G.A.; Blaser, M.J.; Santanam, P.; Hachler, H.; Kayser, F.H.; Hare, R.S. and Miller, G.H. (1990). Appearance of amikacin and tobramycin resistance due to 4'-aminoglycoside nucleotidyltransferase [ANT(4')- II] in gram-negative pathogens. Antimicrob. Agents Chemother., 34:2381–2386.

Jacoby, G.A.; Gacharna, N.; Black, T.A.; Miller, G.H. and Hooper, D.C. (2009). Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. Antimicrob. Agents Chemother.,53:1665-1666.

Jafari, M.; Fallah, F.; Borhan, R.S.; Navidinia, M.; Karimi, A.I.; Tabatabaei, S.R. and Hashemi, A. (2013). The first report of CMY, *aac (6')-Ib* and *16S rRNA* methylase genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran. Arch Pediatr Infect dis;1(3): 109-112.

- Jalal, S.;** Ciofu, O.; Hoiby, N.; Gotoh, N. and Wretlind, B. (2000). Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosos. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44 (3): 710–712.
- Jane , M.** (2007) . Clinical investigation the prevalence and resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units in au niversity hospital . *Turk . J . Med . Sci .* 35 : 317-322.
- Japoni, A.;** Farshad, S.; Alborzi, A. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: burn infection, treatment and antibacterial resistance. *Iranian Red Crescent. Medical Journal IRCMJ*, 11 (3): 244-253.
- Javiya, V.A.;** Ghatak, S.B.; Patel, K.R. and Patel, J.A. (2008). Antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* at a tertiary care hospital in Gujarat, India. *Indian J. Pharmacol.*, 40: 230-234.
- Jawetz, E. J.;** Melnick, J. L.; Adelberg, E. A.; Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. (2010). *Medical Microbiology*. 23rd ed. Appelton and Longe New York Connctical.PP. 45-60 .
- Jawetz, E.,** Melnik, J.L. ; Adelberg , E.A.; Brook, G.F.; Butel, J.S. and Morse , S.A. (2008). *Medical Microbiology* 26th. ed. Appleten and Lang New York. Connctical. PP.45-60.
- Jin, J.S.;** Kwon, K.T.; Moon, D.C. and Lee, J.C. (2009). Emergence of *16S rRNA* methylase *rmtA* in colistin-

only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. Int. J. Antimicrob. Agents., 33(5):490–491.

Kalai, S.; Achour, W.;Abdeladhim, A.; Bejaoui, M. and Benttassen, A. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* isolated in immunocompromised patients: antimicrobial resistance, serotyping and molecular typing. Med. Mal. Infect. 35 (11): 530 – 535.

Kang, H.Y.; Kim, K.Y.; Kim, J.; Lee, J.C.; Lee, Y.C.; Cho, D.T. and Seol, S.Y. (2008). Distribution of conjugative-plasmid-mediated *16S rRNA* methylase genes among amikacin-resistant Enterobacteriaceae isolates collected in 1995 to 1998 and 2001 to 2006 at a university hospital in South Korea and identification of conjugative plasmids mediating dissemination of 16S rRNA methylase. J. Clin. Microbiol., 46(2):700-706.

Kim, J.Y.; Park, Y.J.; Kwon, H.J.; Han, K.; Kang, M.W. and Woo, G.J. (2008). Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with b-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. J Antimicrob Chemother. 62:47983,doi:10.1093.

Kotsakis, S.D.; Papagiannitsis, C.C.; Tzelepi, E.; Legakis, N.J.; Miriagou, V. and Tzouvelekis, L.S. (2010). GES-13, a β -lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother., 54(3):1331–1333.

- Lambert, P.A.** (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Theroyal Soc. Med.*, 95(41).
- Lau, G.W.;** Hassett, D.J.; Ran, H. and Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10(12):599-606.
- Laureti, L.;** Matic, I. and Gutierrez, A. (2013). Bacterial responses and genome instability induced by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Antibiotics.*, 2:100-114.
- LeBlanc, D.J.;** Lee, L.N. and Inamine, J.M. (1991). Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenylyltransferases AAD (9) determinant from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35:1804–1810.
- Levinson, W.** (2004). A lange medical review of medical microbiology and immunology. 9th ed., McGraw-Hill Companies, USA.
- Levinson, W.** and Jawetz, E. (2000). *Medical Microbiology and Immunology*. 6th ed. McGraw-Hill. New York, USA.
- Liano-Sotelo, B.;** Azucena, E.F.; Kotra, L.P.; Mobashery, S. and Chow, C.S. (2002). Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem. Biol.*, 9(4):455-63.

- Lister, P.D.; Wolter, D.J. and Hanson, N.D. (2009).** Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 22:582-610.
- Livermore, D. M. (2002).** Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* 34 (5): 634-640.
- Livermore, D. M. and Woodford, N. (2006).** "The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*." *Trends Microbiol* 14: 413-420.
- Lopez-Yeste, M.; Xercavins, M.; Lite, J.; Cuchi, E. and Garan, J. (1996).** Fluoroquinolone and aminoglycosides resistance in chromosomal cephalosporinase – over producing in gram negative bacilli strains with inducible β – Lactamase. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 14 (4): 211 – 214.
- Lucky, H. M.; Teguh, S.; Hartono, E.; Hagni, W. and Enty, T. (2012).** Trend of antibiotics susceptibility of multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* in Jakarta and surrounding areas from 2004 to 2010. *African J. Microbiol. Res.*, 6(9):2222-2229.
- Ma, L.; Alba, I.; Chang, F.; Ishiguro, M.; Yamaguchi, K. Siu, L. and Ishii, Y. (2005).** Novel SHV driven extended spectrum β - Lactamase, SHV-57 that confers resistance to Ceftazidime but not Cefazolin. *Antimicrob agent Chemother.* 49 (2) :600 -605.

- MacFaddin, J. F.** (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
- MacLeod, D.L.; Nelson, L.E.; Shawar, R.M.; Lin, B.B.; Lockwood, L.G.; Dirk, J.E.; Miller, G.H.; Burns, J.L. and Garber, R.L.** (2000). Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *J. Infect. Dis.*, 181:1180–1184.
- Madigan, M. T. and Martinko, J. M.** (2006). Biology of the Microorganisms. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, JF.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; Paterson, D.L.; Rice, L.B.; Stelling, J.; Struelens, M.J.; Vatopoulos, A.; Weber, J.T. and Monnet, D.L.** (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18(3):268-281.
- Magnet, S. and Blanchard, J.S.** (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem. Rev.*, 105(2):477–498.
- Mahmoud, A. B.; Zahran, W. A.; Hindawi, G. R.; Labib, A. Z.; and Galal, R.** (2013). Prevalence of multidrug-resistant

Pseudomonas aeruginosa in patients with nosocomial infections at a University Hospital in Egypt, with special reference to typing methods. Journal of Virology & Microbiology : 13.

Martinez, J. L. and Baquero, F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infections: Pathogenicity, epidemicity and antibiotic resistance. C. M. R. 15 (4): 647 – 679.

Martínez-Martínez, L.A., Pascual, A., and Jacoby, G.A. (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet 351: 797–799.

Matsumoto, M. ; Shigemura, K. ; Shirakawa, T. ; Nakano, Y. ; Miyake, H. ; and Tanaka, K.(2012). Mutations in the *gyrA* and *parC* genes and in vitro activities of fluoroquinolones in 114 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* derived from urinary tract infections and their rapid detection by denaturing high-performance liquid chromatography. Int J Antimicrob Agents;40:440-4.

Meletis, G. and Bagkeri, M. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: multi-drug-resistance development and treatment options. Section 2 of the Textbook: Infection Control, Infectious Diseases.

Mesaros, N.; Nordmann, P.; Plesiat, P.; Roussel- Delvallez, M.; Van Eldere, J.; Glupczynski, Y.; Van Laethem, Y.; Jacobs, F.; Lebecque, P.; Malfroot, A.; Tulkens, P.M.; and Van Bambeke, F.(2007) *Pseudomonas aeruginosa*

resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect.* ,13(6): 560-578.

Miller, G.H.; Sabatelli, F.J.; Naples, L.; Hare, R.S. and Shaw, K.J. (1995). The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and the role of isepamicin—a new broad-spectrum aminoglycoside. *J. Chemother.*, 7(2):31-44.

Mims, C. A.; Dockrell, H. M.; Goering, R. V.; Roitt, I.; Wakelin, D. and Zuckerman, M. (2004). *Medical Microbiology*. 3rd ed. Mosby Comp. USA.

Miró, E.; Grünbaum, F.; Gómez, L.; Rivera, A.; Mirelis, B.; Coll, P.; and Navarro, F. (2013). Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in Enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb. Drug Resist.*, 19(2):94-99.

Mitscher, L.(2005).*Chemical Reveiws : Bacterial Topoisomerase Inhibitors : Quinolone and Pyridine Antibacterial Agents*. Uni. Kansas. 105 (2) :559-592.

Monique, I. ; Andersson and Alasdair, P. ; MacGowan. (2003). Development of the quinolones .*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1): 1–11.

Moore, N.M. and Flaws, M.L. (2011). Antimicrobial resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Lab. Sci.*, 24:47-51.

- Morita**, Y.; Tomida, J. and Kawamura, Y. (2012). MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.*, 3:1-13.
- Muramatsu**, H.; Horii, T.; Takeshita, A.; Hashimoto, H. and Maekawa, M. (2005). Characterization of fluoroquinolone and carbapenem susceptibilities in clinical isolates of levofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemother.*, 51(2-3):70–75.
- Murphy**, E. (1985). Nucleotide sequence of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Staphylococcus aureus* and its relationship to AAD(3") (9). *Mol. Gen Genet.*, 200:33–39.
- Musk**, A. and Hergenrothe, M. (2008). Microbiological study on the importance of *Pseudomonas* in nosocomially infected ICU patients, with special reference to metallo-beta lactamase production. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 49:44-48.
- Naqvi**, Z.A.; Hashmi, K.; Rizwan, Q. and Kharal, S.A. (2005). Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A nosocomial infection treat in burn patients. *Pakistan Journal of Pharmacology.*, 22(2):9-15 .
- NCCLS** (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2003). Performance standards for disks susceptibility testing; approved standard, 6th ed. PP: 100-113, Wayne, Pannsylvania, USA.
- Ndegwa**, D. W. ; Budambula, N. L. M. ; Kariuki, S. ; Revathi, G. ; and Kiiru, J. N.(2008) .Aminoglycoside modifyhng

enzymes detected in strains of *Escherichia* , *Klebsiella* , *Pseudomonas* , and *Acintobacter* implicated in invasive infections in Nairobi, Kenya. Centre for Microbiology Research, Kenya Medical Research Institute, Nairobi, Kenya.

Neuhauser, M.M.; Weinstein, R.A.; Rydman, R.; Danziger, L.H.; Karam, G.; Quinn, J.P.(2003) Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. *JAMA.*, 289(7):885-888.

Niazi, A. D. (2000). Statistical Analysis in Medical Research. Republic of Iraq. Al-Nehrein university. P.148 .

Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(4):593–656.

Nordmann, P., and Poirel, L. (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J. of Antimicrob. Chemo.*56: 436-469.

Ogle, J.M. and Ramakrishnan, V. (2005). Structural insights into translational fidelity. *Annu. Rev. Biochem.*, 74:129 – 177 .

Okazaki, A. and Avison, M.B. (2007). Aph(3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51(1):359–360.

Oteo, J.; Navarro, C.; Cercenado, E.; Delgado-Iribarren, A.; Wilhelmi, I.; Orden, B.; Garcia, C.; Miguelanez, S.;

Perez-Vazquez, M.; Garcia-Cobos, S.; Aracil, B.; Bautista, V. and Campos, J. (2006). Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J. Clin. Microbiol.*, 44:2359–2366.

Over, U.; Unal, S.; Miller, G.H. and Aminoglycoside resistance Study group. (2001). The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *Clinical Microbiology and Infection*. 7:470-478.

Palamthodi, S.M.; gaikwad, V.J.; ghasghase, N.V. and Patil, S.S. (2011). Antibacterial targets in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. of Pharmaceutical Applications.*, 2:159-164.

Pandey, A.; Maleni, R. and Asthana, A. K. (2005). Beta – lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients. *Indi. J. Pathol. Microbiol.* 48 (4): 530 – 533.

Park, C. H.; Robicsek, A.; Jacoby, G. A.; Sahm, D., and Hooper, D. C. (2006). Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 3953-3955.

Park, Y.J. (2009). Aminoglycoside resistance in Gram-negative bacilli. *Korean. J. Clin. Microbiol.*

Pichova, D.; Morihara, M.; and Lamann, M. (2001) . *Pseudomonas aeruginosa* . Protease: Isolation,

crystallization and preliminary characterization, *J. Biol. Chem.*, 240:23-26.

Pier, G.B.; Meluleni, G.; and Neuger, E. (1992). A murine model of chronic mucosal colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 60:4768-4776.

Poehlsgaard, J. and Douthwaite, S. (2005). The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(11):870-881.

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

Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front. Microbiol. Cellular infec. Microbiol.*, 2. (65).

Poonsuk, K.; Tribuddharat, C. and Chuanchuen, R. (2013). Aminoglycoside resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolate from non-cystic fibrosis patients in Thailand. *Canadian J. of Microb.*, 59(1): 51-56.

Poulikakos, P. and Falagas, M.E. (2013). Aminoglycoside therapy in infectious diseases. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.*, 14(12):1585-1597 .

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

- Prakash**, H.R. ; Belodu, R. ; Karangate, N. ; Sonth, S. ; Anitha, M.R ; Vijayanath,V.(2012). Antimicrobial susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical sources. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences ., 14: 2230 – 7885.
- Prinsloo**,A.(2003). Susceptibility and synergism profile of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an ICU environment.M.Sc. Thesis. Faculty of Health Sciences. University of Pretoria.
- Pukatzki** , S. ; Kessin , R. ; Mekalanos , I. (2002) . The Human Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence Pathway to infect the social Amoeba Dictyostlium discoideum . Johan .I. Mekalanos , 29 (5). :3159 -3164 .
- Raja**, N.S.and Singh, N.N. (2007). Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. J. Microbiol.Immunol. Infect.,40:45-49.
- Ramirez**, M. S. and Tolmasky, M.E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist. Updat., 13(6):151-171.
- Ramon-Garcia**, S.; OtaI, I.; Martin, C.; Gomez-Lus, R. and Ainsa, J.A. (2006). Novel streptomycin resistance gene from Mycobacterium fortuitum. Antimicrob. Agents Chemother., 50(11):3920–3922.
- Ratkai**, C. (2011). Characterization of medically important *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Institute of Clin. Microbiol. Faculty of Medicine. University of Szeged.

- Razieh, P.J., and Ehsan, M.**(2010). Study of Mutations in the DNA gyrase *gyrA* Gene of *Escherichia coli*. Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services Iranian J. of Pharma. Res., 9 (1) :43-48.
- Rieuwpassa, I.E. ; Dwiyanti, R. ; Yasir,Y. ; Sabir,M. and Hatt,M.**(2015). Topoisomerases II mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Makassar, Indonesia.American Journal of Infectious Diseases and Microbiology, 3 (3): 91-94.
- Robicsek, A.; Strahilevitz, J.; Jacoby, G.A.; Macielag, M.; Abbanat, D.; Park, C.H.; Bush, K. and Hooper, D.C.** (2006). Fluoroquinolone- modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat. Med., 12:83-88.
- Rossolin, G.M. and Mantengoli, E.** (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Microbiol Infect., 11:17-32.
- Ruiz, J.** (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob. Chemother.; 51:119-17.
- Ryan, K. J. and Ray, C.G.**(2004). Introduction to Infectious Diseases : Sherris Medical Microbiology.(4th ed.) Mc Graw- Hill , New York .
- Sabtcheva, S.; Galimand, M.; Gerbaud, G.; Courvalin, P. and Lambert, T.** (2003). Aminoglycoside resistance gene *ant(4')-IIb* of *Pseudomonas aeruginosa* BM4492, a

clinical isolate from Bulgaria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 4:1584-1588.

Sacha, P.; Jaworowska, J.; Ojdana, D.; Wieczorek, P.; Czaban, S.; and Trynieszewska, E. (2012) Occurrence of the *aacA4* gene among multidrug resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bronchial secretions obtained from the Intensive Therapy Unit at University Hospital in Bialystok, Poland. *Folia Histochem Cytobiol.* 50:322–324.

Sacha, P.; Wieczorek, P.; Hauschild, T.; Zórawski, M.; Olszańska, D. and Trynieszewska, E. (2008). Metallo-beta-lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* a novel mechanism of resistance to beta-lactam antibiotics. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 46(2):137-142.

Salimi, S.; Owlia, P.; Yakhchali, B.; and Rastegar Lari, A. (2009). Drug Susceptibility and Molecular Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in a Burn Unit *American Journal of Infectious Diseases* 5 (4): 308-313.

Salma, R.M. ; Dabboussi, F.A. ; Kassaa, I.O. ; Khudary, R.H. and Hamze, M.M. (2012). *gyrA* and *parC* Mutations in Quinolone-Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Nini Hospital in North Lebanon . *International Journal of Microbiological Research* 3 (2): 82-86.

Salyers, A.A., and Whitt, D.D. (2002). *Bacterial Pathogenesis amolecular approach*, P. 251- 259 . American Society for Microbiolog Press, Washington, D.C.

- Schmitz**, F.R.; Fluit, A.C.; Gondolf, M.; Beyrau, R.; Lindenlauf, E.; Verhoef, J.; Heinz, H.P. and Jones, M.E. (1999). The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.*, 43:253-259.
- Shabaa**, R. A. H. (2015). Molecular Detection of *PstS* Gene Responsible for Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Magazin of Al-Kufa University for Biology*.7(1) : 2311-6544.
- Shahid**, M. and Malik, A. (2005). Resistance due to aminoglycoside modifying enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burns patients. *Indian J. Med. Res.*, 122:324–329.
- Sheng**, W.H.; Chen, Y.C.; Wang, J.T.; Chang, S.C.; Luh, K.T. and Hsieh, W.C. (2002). Emerging fluoroquinolone-resistance for common clinically important gram negative bacteria in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 43:141–147.
- Sheridan** , R.L. (2005) . Sepsis in pediatric burn patients predisposition to sepsis . *Pediatr. Critical Care Med.*, 6(3):5112-5119.
- Sivaraj**, S. ; Murugesan, P. ; Muthuvelu, S. ; Purusothaman, S. and Silambarasan, A.(2012). Comparative study of *Pseudomonas aeruginosa* isolate recovered from clinical and environmental samples against, 4 (3): 975-1491 .

- Smith, C.A.** and Baker, E.N. (2002). Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.*, 2(2):143-160.
- Solink , I.** (2003). Antibiotic mechanisms of resistance . *Div. Inf. Dis.* 350: 752 -1333.
- Sturenburg , E. ;** and Mark , D.(2003). Extended spectrum β -Lactamase implication for the clinical Microbiolpgy laboratory ; therapy and infection control . *I . Inf.*, 47 :273- 295 .
- Suh, J.;** Liegmann, K. and Peter, J.B. (1999). Rpid detection of gram negative bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 39:51-52.
- Suter, T.M.;** Viswanathan, V.K. and Cianciotto, N.P. (1997). Isolation of a gene encoding a novel spectinomycin phosphotransferase from *Legionella pneumophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41(6):1385– 1388.
- Tada, T.;** Akiyama, T.M.; Kato, Y.; Ohmagari, N.; Takeshita, N.; Hung, N.V.; Phuong, D.M.; Thu, T.A.; Binh, N.G.; Anh, N.Q.; Nga, T.T.; Truong, P.H.; Xuan, P.T.; Thu, L.T.; Son, N.T and Kirikae, T. (2013). Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. *Infec. Dis.*, 13:251.
- Tamber, S.;** Ochs, M.M. and Hancock, R.E.W. (2006). Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 188:45-54.

- Tatterson, L.E.;** Poschet, J.F.; Firoved, A.; Skidmore, J. and Deretic, V. (2001). CFTR and *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. *Front. Biosci.*, 6:890-897.
- Thomas, L.,** S.T. Buckland, E.A. Rexstad, J.L. Laake, S. Strindberg, S.L. Hedley, J.R.B. Bishop & T.A. Marques.(2010). Distance software: design and analysis of distance sampling surveys for estimating population size. *Journal of Applied Ecology* 47:5-14.
- Thomas, L.C.** (2007). Genetic methods for rapid detection of medically important nosocomial bacteria. Faculty of Medicine, Department of Medicine, The University of Sydney, Australia.
- Todar, K.** (2008) .Text Book of Bacteriology Written and Edited by Kneth Todar university Todar online text book of Bacteriology.
- Tolmasky, M.E.** (2007a). Aminoglycoside-modifying enzymes: characteristics, localization, and dissemination, enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition. ASM Press, Washington: 35-52.
- Tolmasky, M.E.** (2007b). Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition, overview of dissemination mechanisms of genes coding for resistance to antibiotics. ASM Press, Washington: 267-270.

- Tran, J. H., Hooper, G. A., (2002).** Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*,99: 5638-5642.
- Upadhaya, S. ; Shenoy, R. ; Shetty, V. ; Lamsal, A. ; Lamichhane, P. ; and Pokhrel, S. (2014).** Multi-drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Intensive Care Burn Unit. *International Journal of Biomedical Research* , 5 (4) : 0976-9633.
- Vakulenko, S.B. and Mobashery, S. (2003).** Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.*, 16(3):430-450.
- Valverde, D.M.; Sojo-Dorado, J.; Pascual, A. and Baño, J.R. (2013).** Clinical management of infections caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Therap. Adv. Infect. Dis.*, 1(2):49-69 .
- Van Eldere, J.(2003).** Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections . *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* , 51: 347–352.
- Vandelden, C. and Iglewski, B.H. (1998).** Cell to cell signalling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Disease*, 4(4): 1-14.
- Varaiya, A.; Kulkarni, K.; Kulkarni, M.; Bhalekar, P. and Dogra, J. (2007)** Incidence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in ICU patients. Department of Microbiology, S.L.Raheja Hospital, Mumbai, India.

- Vaziri, F.;** Peerayeh, S.N.; Nejad, Q.B. and Farhadian, A. (2011). The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (*aac (6')-I*, *aac (6')-II*, *ant(2')-I*, *aph(3')-VI*) in *Pseudomonas aeruginosa*. Clinics., 66(9):1519-1522. 114.
- Vetting, M.W.;** LP, S.d.C.; Yu, M.; Hegde, S.S.; Magnet, S.; Roderick, S.L. and Blanchard, J.S. (2005). Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. Arch. Biochem. Biophys., 433:212–226.
- Wachino, J.I.;** Shibayama, K.; Kurokawa, H.; Kimura, K.; Yamane, K.; Suzuki, S.; Shibata, N.; Ike, Y. and Arakawa, Y. (2007). Plasmid-mediated novel m1A1408 methyltransferase, *NpmA*, for *16S rRNA* found in clinically isolated *Escherichia coli* resistant to structurally diverse aminoglycosides. Antimicrob. Agents Chemother., 51(12):4401–4409.
- Walsh, C.** (2003). Antibiotics: actions, origins, resistance. ASM Press., 13:3059-3060.
- Walsh, T.R.;** Toleman, M.A.; Poirel, L. and Nordman, P. (2005). Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm. Clin. Microbiol. Rev., 18(2):306–325.
- Wang, D.D.;** Sun, T.Y.; Hu, Y.J. (2007). Contributions of efflux pumps to high level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. Chin Med J, 120: 68-70.
- Wang, M.;** Guo, Q. X.; Xu, X.; Wang, X.; Ye, S.; Wu, D. C.; Hooper, and Wang, M. (2009). New plasmid-mediated

quinolone resistance gene *qnrC1*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:1892-1897.

Warsha, A.M. (2007). Prevalence and genetic location of some resistant dihydrofolate reductase genes in South African Commensal, faecal isolates . *Epidemiol. Infect.*, 115, 255- 267.

Wax, R.G.; Lewis, K.; Salyers, A.A. and Taber, H. (2008). *Bacterial resistance to antimicrobials*. 2nd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group.

Willaims, R.J. ; Livemore, D.M. ; Lindridge, M.A. ; Said, A.A. ; and Williams, J.D.(1984). Mechanisms of β – lactam resistance in British isolates of *Pseudomonas aeruginosa* , *journal of medical microbial* ., 17 : 283-293.

Willenbrock, H. and Ussery, D.W. (2007). Prediction of highly expressed genes in microbes based on chromatin accessibility . *BMC, Mol., Biol.*, 8: 11.

Willenbrock, H.; Friis, C.; Friis, A.S. and Ussery, D.W. (2006). An environmental Signature for 323 microbial genomes based on codon adaption indices genome. *Biol.*, 7 : R114.

Wilson, D.N.; Blaha, G.; Connell, S.R.; Ivanov, P.V.; Jenke, H.; Stelzl, U.; Teraoka, Y. and Nierhaus, K.H. (2002). Protein synthesis at atomic resolution: mechanistics of translation in the light of highly resolved structures for the ribosome. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 3(1):1–53.

- Wilson**, N.L. and Hall, R.M. (2010). Unusual class 1 integron configuration found in *Salmonella* genomic island 2 from *Salmonella enterica* serovar Emek. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54:513–516.
- Winn**, J. W.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P. and Woods, G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed., Lippincott–raven Publishers. Philadelphia, PP: 239–270. USA.
- Winsor**, G.L.; Lo, R.; Sui, S.J.; Ung, K.S.; Huang, S.; Cheng, D.; Ching, W.K.; Hancock, R.E. and Brinkman, F.S. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* genome database and pseudo CAP: facilitating community-based, continually updated, genome annotation. *Nucleic Acids Res.*, 33:338–343.
- Wirth**, F.W. ; Picoli S.V. ; Cantarelli VV. ; Goncalves , FR.; Santos , LM. ; Barreot , MF. (2009). Metallo β -Lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospital from Southern Brazil. *Bra. J. In. Dis .*, 13 : 170-172 .
- Woegerbauer**, M.; Zeinzinger, J.; Springer, B.; Hufnagl, P.; Indra, A.; Korschineck, I.; Hofrichter, J.; Kopacka, I.; Fuchs, R.; Steinwider, J.; Fuchs, K.; Nielsen, K.M. and Allerberger, F. (2014). Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes *aph(3')-IIIa* and *aph(3')-IIa* in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Staphylococcus aureus* isolates in Austria. *J. Med. Microbiol.*, 63(2):210-217.

- Wolska, K.;** Kot, B. and Jakubczak, A. (2012). Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitals in Siedlce (Poland). *Brazilian J. of Microbiol.*, 274-282.
- World Health Organization,WHO.** (2002) .Prevention of hospital-acquired infections. Geneva, Switzerland. P.72.
- Wright, G.D.** and Thompson, P.R. (1999). Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure and mechanism. *Fron. in Biosc.*, 4:9-21.
- Wu, Q.;** Zhang, Y.; Han, L.; Sun, J. and Ni, Y. (2009). Plasmid-mediated 16S rRNA methylases in aminoglycoside-resistant Enterobacteriaceae isolates in Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53: 271-272.
- Wydmuch, Z.;** Skowronek-Ciolek, O.; Cholewa, K.; Mazurek, U.; Pacha, J.; Kepa, M.; Idzik, D.; and Wojtyczka, R.D. (2005). *gyrA* mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a Silesian Hospital in Poland. *Pol. J. Microbiol.*, 54: 201-206.
- Xavier, D. E.;** Pico, R. C.; Girardello, R.; Fehlberg, L. C.C. and Gales, A.C. (2010). Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol.*, 10:217.
- Yamane, K.;** Wachino, J.; Doi, Y.; Kurokawa, H. and Arakawa, Y. (2005). Global spread of multiple aminoglycoside resistance genes. *Emerg. Infect. Dis.*, 11: 951- 3.

- Yamane, K.;** Wachino, J.; Suzuki, S.; Shibata, N.; Kato, H.; Shibayama, K.; Kimura, K.; Kai, K.; Ishikawa, S.; Ozawa, Y.; Konda, T. and Arakawa, Y. (2007). 16S rRNA methylase– producing, Gram-negative Pathogens, Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, 13(4):642–646.
- Yang, X. ;** Xing, B. ; Liang, C. ; Ye, Z. ; and Zhang, Y.(2015). Prevalence and fluoroquinolone resistance of *pseudomonas aeruginosa* in a hospital of South China. *Int J Clin Exp Med* ; 8(1):1386-1390.
- Yao, J. and** Moellering, R. (2007). Manual of clinical microbiology, antibacterial agents. American Society for Microbiology Press, Washington: 1077-1113.
- Yildirim, S.;** Narsal, T. Z.; Tarim, A.; Torer, N.; Noyan, T.; Demiroglu, Y. Z.; Moray, G. and Heberal, M. (2005). Bacteriological profile and antibiotic resistance: comparison of findings in a burn intensive care unit, other intensive care unit, and the hospital services unit of a single center, *J. Burn. Car. Rehabil.* 26 (6): 488 – 492.
- Yokoyama, K.;** Doi, Y.; Yamane, K.; Kurokawa, H.; Shibata, N.; Shibayama, K.; Yagi, T.; Kato, H. and Arakawa. Y. (2003). Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.*, 362(9399):1888-1893.
- Zahra, T. and** Moniri, R. (2011). Detection of ESBLs and MDR in *Pseudomonas aeruginosa* in a Tertiary-Care Teaching Hospital, *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases*, 6(1) 18 -23.

- Zeng, L.** (2004). *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity And Antibiotic Resistance. Doctor Of Philosophy University Of Florida.
- Zhang, Y. H.; Deng, S. L. and Liu, J. W.** (2005). Analysis of susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burns toward antibiotics in vitro Zhonghua. Shao. Shang. Za. Zhi. 21 (2): 104 – 106.
- Zhou, Y.; Yu, H.; Guo, Q.; Xu, X.; Ye, X.; Wu, S.; Guo, Y. and Wang, M.** (2010). Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 29(11):1349–1353.