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

عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من التهابات الحروق والجروح

بحث تقدَّمت بها الطالبة

زينة جواد كاظم

الى

كلية العلوم ـ جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات بحث تخرج في

كلية العلوم / قسم علوم حياة.

بإشراف

أ.م.د. ميثم غالي يوسف

١٤٣٨هـ 2017م

ويسئلونك عن الروح قل الروح من أمر ربي وما أوتيتم من العلم إلا قليلاً ﴿٨٥﴾. سورة الاسراء الاية (٨٥)

** الإهداء **

الى . . . من تشرفت السماء بوجودهم وتطهرت الارض برقدتهم فيها . . . الى من الذين اذهب عنهم الرجس وطهرهم تطهيرا . . . محمد وال بيته الطيبين الاطهار

الى . . . مصابيح الهدى وسفن النجاة . . . الى من انارو بدمهم دجى الحياة . . . الامام الحسين واخية ابى الفضل العباس عليهما السلام

إلى . . . الغائبَين الحاضرين في قلبي رحمهما الله أقدم هديتي لكما إنها بعضٌ من أفضالكما . . براً وحباً وشوقاً وافتقاداً . . . . والدي ووالدتي الغاليين

إلى . . . . نبراس حياتي ومن بهم اشد ازري . . . . إلى سندي وعزوتي و ينبوع المحبة والحنان . . أخوتي وأخواتي

احدى ثمرة جهدي المتواضع

زينة

شـــــــكر وتقـــــــدير

بسم الله الرحمن الرحيم والحمد لله الذي قصرت عن رؤيته أبصار الناظرين وعجزت عن نعته أوهام الواصفين، والصلاة والسلام على أشرف الخلق أجمعين محمد سيد المرسلين وعلى أهل بيته الطيبين الطاهرين..

بعد ان منَ الله علي ووفقني لإكمال بحثي يطيب لي أن اقدم أسمى معاني الشكر والعرفان لأستاذي الفاضل **الدكتورميثم غالي يوسف** لاقتراحه خطة البحث وارشاداته العلمية القيمة التي لها الأثر الكبير في اعداد هذه الرساله سائلة الله العلي القدير أن يمده بدوام الصحة والرقي العلمي.

كما يدعوني الواجب أن اقّدم الشكر والامتنان إلى عمادة كلية العلوم/جامعة القادسية وإلى رئاسة قسم علوم الحياة. كما أود أن أقدم شكري الجزيل إلى أساتذتي الفضلاء في قسم علوم الحياة ممن كانوا لي مثلاً في عطائهم العلمي .

وفي الختام لا يسعني الا أن أحمد لله الذي أغناني بفضله وسخرّ لي جمعاً من النفوس الطيبة لإتمام هذا العمل وفي نهايته لا يسعني إلا أن أقدم خالص شكري وعرفاني لهم أجمعين وأسأل من الله أن يوفقهم.

زينة

الخلاصة

تعد بكتيريا الزوائف الزنجارية من الاجناس واسعة الانتشار في البيئة وخاصة العدوى داخل المستشفيات وتعد ايضاً من المسببات المرضية الانتهازية التي تتميز بقدرتها على احداث انواع مختلفة من الاصابات في مواقع متعددة من الجسم.

جُمعت عينات الدراسة من مرضى المصابين بالالتهابات الحروق في مركز الحروق التخصصي في مدينة الديوانية ولكلا الجنسين بواقع 30 عينة لمدة من شهرشباط 2017 لغاية شهر اذار 2017 اذ اظهرت نتائج الفحوصات الزرعية والكيموحيوية عائدية 10 عزلات لبكتيريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* .

المقدمة

تعد بكتريا *P. aeruginosa* واحدة من الممرضات الانتهازية opportunistic pathogens التي تمتلك العديد من عوامل الضراوة و هي سبب مهم في العدوى المكتسبة من المستشفيات (infections nosocomial) (Gawish et al., 2013). كما تعد بكتيريا P. aeruginosa واحدة من أكثر الانواع البكتيرية شيوعا وانتشارا في الطبيعة المسببة لامراض كثيرة (Bojary et al ., 2012). ويمكن لهذه البكتريا العيش في بيئات خاملة مع متطلبات غذائية قليلة (Farinas et al ., 2013). ان الاصابة بهذه البكتيريا ترتبط بصورة كبيرة مع معدلات الهلاك والوفيات إذا ما قورنت مع غيرها من مسببات الأمراض البكتيرية الاخرى (Brusselaers et al., 2011).

2: استعراض المراجع Literatures review

1-2 : التسمية والاكتشاف Nomenclature and Discovery

عرفت بكتريا الزائفة الزنجارية مثل باقي الاجناس البكتيرية التي عاشت مئات السنين الماضية , حيث صنفت في نهاية القرن التاسع عشر و حددت من قبل العالم والتر ميغولا Walter Migula و كلمة Pseudo باليونانية تعني" كاذبة" وmonad تعني الكائن الدقيق الاحادي الخلية وقد استخدمت هذه المصطلحات في وقت مبكر من تاريخ علم الاحياء المجهرية وذلك للاشارة الى الكائنات احادية الخلية single cell وهو مايعني وحدة كاذبة **(Palleroni, 2010).** واكتشفت البكتريا بعد ان عزلت أول مرة من مزرعة نقية عام 1872 من قبل العالم Schoroeter من مصادر بيئية مختلفة **(Dworkin *et al* ., 2006).**

كما اطلقت العديد من التسميات على هذه البكتريا في بداية اكتشافها , منها عصيات بايوسيانيس***Bacterium pyocyaneus*** او زوائف بايوسيانيا ***P. pyocyaneus*** **(Holt et al., 1994)**.سميت بعد ذلك بالزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* ثم صارت هذه التسمية الاسم العلمي للبكتريا **(Tzouchas , 2014).**

2-2: الصفات العامة General characteristics

1-2-2: الصفات المجهرية Microscopic characterstics

الزائفة الزنجارية هي عصيات سالبة لصبغة غرام هوائية اجبارية ,تنتمي للعائلة البكتيرية *pseudomonadaceae* وتظهر بشكل منفرد او ثنائي او بشكل سلاسل قصيرة قد تكون مستقيمة او منحنية , تبلغ ١,٥- ٣,٠ مايكروميتر طولا و قطرها حوالي ٠,٥- ٠,٧ مايكروميتر و تتحرك البكتريا بواسطة اسواط قطبية **(Stover *et al*.,2000; Lewenza *et al*., 2005 ;Filiatrault *et al*., 2006).**

2-2-2: الصفات الزرعية Cultural characteristics

تمتاز بكتريا *P.aeruginosa* بعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز,ونتيجة لذلك تظهر مستعمراتها شاحبة اللون على وسط اگار الماكونكي **(Baron and Finegold , 1990).** ويمكن ان تنمو البكتريا في ظروف لاهوائية اذا اضيفت النترات للوسط الزرعي النامية عليه ,بسبب قدرتها على استخدام الاوكسجين الموجود في النترات (**Jones *et al* ., 2000; Worlitzsch *et al* ., 2002).**كما تتميز البكتريا بافرازها العديد من الصبغات منها صبغة البايوسيانين pyocyanin الزرقاء, و صبغة البايوفيريدين pyoverdin الصفراء, وصبغة البايوروبين pyorubin الحمراء ,وصبغة البايوميلانين pyomelaninالسوداء **Baron *et al* .,1994; Koneman *et al*.,1997)).**

2-2-3: الصفات الكيموحيوية Biochemical characteristics

اتصفت البكتريا *P.aeruginosa* بايجابيتها تجاه كلً من اختبار الاوكسديز و الكتاليز وكذلك اختبار الستريت وتميع الجيلاتين , وتكون سالبة لاختبارات : الاندول ,المثيل الاحمر, فوكس بروسكاور,وتخمر السكريات **(Greenwood *et al* ., 1998),** حيث تستطيع هذه البكتريا استغلال مركبات عديدة بوصفها مصدرا مهما للطاقة مثل المصادر النايتروجينية و الكاربونية **(Itah and Essien , 2005).**

2-3:امراضية بكتريا *P.aeruginosa*

pathogenicity of *P. aeruginosa*

2-3-1 :عوامل الضراوة Virulence factors

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* كائنا شائعاً في البيئة ويمكن العثور عليها في البراز والتربة و مياه الصرف الصحي ويمكنها ان تنمو في البيئات المائية ,وهي مصدر لعدوى المستشفيات **Nosocomial infection** ويمكن ان تسبب مضاعفات خطيرة **(Moreau-Marquis *et al*., (2008;Noura *et al* .,2009).** بعد الدراسات الكثيرة على هذه البكتريا وجد انها تمتلك العديد من عوامل الضراوة منها عوامل خلوية الاهلاب pili و الاسواط Flagella التي تساعدها على الحركة والالتصاق بخلايا المضيف,وعوامل افرازية

مثل المواد البروتينية كصبغتي ال pyocyanin و pyoverdin,وذيفانات Exotoxin A التي تعد قاتلة عند حقنها بشكل نقي بالحيوانات المختبرية كما تنتج ذيفانات Exotoxin S التي تقوم بوظيفة الالتصاق ومنع عملية البلعمة في الانسجة المصابة,كما تعتبر السكريات المتعددة المخاطية mucoid exopolysaccharides من احد عوامل الضراوة لبكتيريا *P. aeruginosa*, عند مهاجمة البكتريا لجسم الانسان فان مراحل الاصابة تبدا من خلال وجود مستقبلات تدعى Toll-like receptors**(TLRs)** موجودة على الخلايا الطلائية وخلايا المناعة الطبيعية وهذه المستقبلات وظيفتها استلام اشارات من خارج الخلية وعند ارتباط الخلية بالمستقبل تحدث استجابة خلوية بعد ذلك يحدث استعمار للبكتريا colonization و بالتالي حدوث الاصابة **infection (Kobayashi *et al*., 2009)**.

بكتريا *P.aeruginosa* لديها ايضا خاصية البقاء على قيد الحياة على السطوح الخاملة وانتاج الاغشية الحيوية البيوفيلم Biofilm التي تعد احد عوامل الضراوة للبكتريا **(Vila *et al*.,2010;Sigurdsson (*et al*.,2012**. اذ تعد بكتريا *P.aeruginosa* احد الانواع البكتيرية التي لها القدرة على انتاج انزيمات محللة تمكنها من غزو خلايا المضيف و تحطيمها للغلاف الخلوي الخارجي من خلال تحطيم او تحليل الوحدات التركيبية في الغشاء الخلوي للمضيف والمتمثلة بالدهون المفسفرة والبروتينات**(Teanpaisan *et al* ., 2009)**.ومن هذه الانزيمات:الانزيم الحال للشحوم Lipase الذي يعمل على تحطيم طبقة الدهون الموجودة في الجدار الخلوي للمضيف مما يساعد البكتريا على الانتشار داخل جسم الكائن الحي**(George *et al* ., 2005)**.وانزيم الليسيثينيز Lecithinase الذي يكمن دوره في تحطيم طبقة Lecithin في الغشاء الخلوي للمضيف**(Ansell and Hawthrone, 2008)**.اما انزيم البروتيزProtease فأنه يلعب دورا مؤثر فاعل في اختراق الانسجة وامراضية البكتريا **(Clark , 2006)**.واخيرا انزيم الكتاليز Catalase و دوره في حماية الخلية البكتيرية من التاثير السمي لبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2الناتج من الفعاليات الايضية للبكتريا**(Suh *et al* ., 1999).**

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

Diseases caused by bacteria *P.aeruginosa*

تعد بكتريا *P.aeruginosa* الممرض الانتهازي السائد للانسان وعلى نحو متزايد ,حيث وجد انها مسؤولة عن حوالي 16% من حالات الالتهاب الرئوي في المستشفيات **(Wiblin RT , 1997).**و12% من التهابات المسالك البولية UTI المكتسبة من المستشفيات **(Pollack M ,**

1995).و 10% من التهابات مجرى الدم و 8% من اصابات الجروح(**Kluytmans J** **1998 ,1997;Gordon SM ., *et al*)**. ان الاصابة ببكتريا *P.aeruginosa* تكون موضعية و شديدة وذلك بسبب قدرتها على استعمار مواقع تشريحية مختلفة(بسبب امتلاكها آليات التصاق فعالة , و متطلبات تغذية قليلة , ومقاومة للمضادات الحيوية)كما لها القدرة على غزو انسجة المضيف وتحطيمها واحداث الامراض الجهازية **(Zeng , 2004).**

كما تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* احد اهم المشاكل التي تواجه المرضى الذين يعانون من نقص المناعة immunocompromised ومستخدمي العدسات اللاصقة **(Patel P *et al* .,2002)**.حيث اجريت دراسة لحوالي ٣٠،٠٠٠،٠٠٠ شخص من الذين يستخدمون العدسات اللاصقة ووجد بان ٥٤،٠٠٠ منهم معرض للاصابة ببكتريا الزائفة الزنجارية كل عام , ان الاصابة بهذه البكتريا مرتبطة باصابات العين ,والاذن, والمسالك البولية (UTIs),والجهاز الهضمي ,والجهاز العصبي المركزي ,واصابات الحروق والجروح **(Smulders C *et al* ., 1999 ; Cheng BC, *et al* .,2004)**.ففي عام 2003 سجلت البكتريا في الولايات المتحدة بانها من الممرضات الاكثر انتشارا وبنسبة (18.1%)من عزلات بكترية للمرضى المصابين بذات الرئة pneumonia,والمسبب المرضي الاكثر انتشارا الثاني وبنسبة(16.3%)من عزلات بكتيرية لمرضى المجاري البوليةUTI(**Tam *et al* 2007.,)**.وتزداد نسبة الاصابة بالبكتريا في حالات اصابة الاشخاص بالاورام السرطانية وكذلك بعد عمليات نقل الاعضاء**(Willenbrock and Ussery , 2007)**.كما ان اصابات الحروق كان لها دور في الامراضية بهذه البكتريا حيث اشارت الدراسات الى ان الاحياء المجهرية تنتهز الفرصة للتضاعف والاستعمار في منطقة الحرق المفتوحة نتيجة لتحطيم حاجز الجلد وتحول منطقة الحرق الى وسط غني وملائم لنمو الجراثيم(**Fournior and Pilpott, 2005)**.

4-2: الوبائية Epidemiology of *P. aeruginosa*

ليس غريبا على الاصابات الناتجة من بكتريا الزائفة الزنجارية ان تكون مرتبطة بشكل كبير مع معدلات الهلاك والوفيات نظرا لقدرة البكتريا على التكيف بسهولة للتغيرات التي تحدث في البيئة ,لتتطور بسرعة المقاومة للمضادات الحياتية ,وانتاج مجموعة متنوعة من عوامل الضراوة **(Van Delden *et al* .,1998)**. وتعد بكتريا *Ps. aeruginosa* واحدة من الممرضات

الانتهازية opportunistic pathogens التي تمتلك العديد من عوامل الضراوة والمرتبطة مع اصابات المستشفيات nosocomial infections **(Gawish *et al*., 2013).**

كما عرفت هذه البكتريا بانها تستطيع النمو والبقاء على قيد الحياة في اي بيئة تقريبا ,على الرغم من انها تفضل البيئات الرطبة حيث يحدث الاستعمار لهذه البكتريا في الانسان في منطقة الابطين والاذن ,اذ ان الرطوبة تمثل عاملا مهما في حدوث الاصابة ,كما بينت الدراسات ان نسبة انتقال البكتريا بين الاشخاص الاصحاء قليلة نسبيا **(Pollack *et al* .,2000).**ان اغلب اصابات بكتريا الزائفة الزنجارية هي منتشرة عالميا وتتميز بانها ذات سمية toxinogenic ,كما ان الاصابة النهائية بالبكتريا يمكن تمييزها بثلاث مراحل وهي تبدا بالارتباط البكتيري bacterial attachment,ثم الاستعمار colonization,واخيرا الغزو الموضعي للانسجة local invasion,وحدوث الاصابة infection**(Palamthodi *et al* ., 2011).** تستطيع البكتريا النمو بدرجة حرارة 42م°كما انها قادرة على النمو في الديزل ووقود الطائرات, وكما هو معروف عن الكائنات الدقيقة التي تستخدم الهيدروكاربونات فانها سوف تسبب التاكل الميكروبي microbial corrosion **(Striebich *et al*., 2014).**تميزت البكتريا بقدرتها على استخدام مجموعة واسعة من المركبات العضوية مصادرا للغذاء ,مما يعطيها قدرة استثنائية على استعمار بيئات عديدة عند قلة المواد الغذائية وذلك يعد احد مظاهر الوبائية للبكتريا (**Qarah *et al* ., 2008).**

٣-المواد وطرائق العمل Materials and methods

٣-١ المواد materials

٣-١-١ :الأجهزة و الأدوات المختبرية Equipment and apparatus

اسم الجهاز		الشركة المصنعة(المنشأ)
موصدة	Autoclave	Hiclave (Japan)
ثلاجة	Refrigerator	Concord (Lebanon)
ميزان الكتروني حساس	Sensitive electronic balance	A&D Co. (Japan)
مجهر ضوئي مركب	Compound light microscope	Olympus (Japan)
حاضنة	Incubator	Memmert (German)
حمام مائي	Water bath	Kottermann (German)
مسخن حراري	Hot plate	Gallankamp (England)
كاميرا رقمية	Digital camera	Canon (china)
مازج	Vortex mixer	Melrosee park (USA)
جهاز تقطير	Distillator	GFL (German)
مسحات قطنية معقمة	Sterilized cotton swabs	SterellinLtd (England)
اطباق بلاستيكية	Disposable petri dishes	Al-Hani (USA)
دورق مخروطي	Conical flasks	BBL (USA)
شرائح زجاجية وغطاء الشريحة	Slides and cover slides	Superestar (India)
انابيب اختبار	Test tubes	Superestar (India)

٣-١-٢ :المواد الكيمياوية Chemical materials

اسم المادة		الشركة المصنعة(المنشأ)
كحول الايثانول	Ethanol(96%)	BDH (USA)
اكار	Agar	Biolife (Italy)
كلوريد الباريوم	Barium chloride	Fluka (Switzerland)
حامض الهيدروكلوريك(HCL)	Hydrochloric acid	BDH (USA)
بيروكسيد الهيدروجين (H2O2)	Hydrogen peroxid (70%)	SDI (Iraq)

جيلاتين	Gelatin	BB (USA)
كليسيرول	Glycerol ($C_3H_8O_3$)	Fluka (Switzerland)
ببتون	Pepton	Difco (USA)

٣-١-٣: الأوساط الزرعية الجاهزة Ready media

اسم الوسط الزرعي		الشركة المصنعة(المنشأ)
وسط اكار ماكونكي	MacConkey agar	Himedia (India)
وسط الاكار المغذي	Nutrient agar	Himedia (India)
وسط اكار نقيع القلب-الدماغ	Brain-heart infusion agar	Mastdiagnostic(USA)
وسط اكار الدم الاساسي	Blood agar base	Accumix (India)
وسط احمر المثيل – فوكس بروسكاور	MR/VP broth	Oxoid (UK)
وسط اكار مولر- هنتون	Muller-Hinton agar	Oxoid (India)
وسط ماء الببتون	Peptone water	Himedia (India)
وسط اغار ثلاثي السكريات و الحديد	Trible sugar iron agar	Himedia (India)

٣-٢طرائق العمل

1-2-3: تحضير الأوساط الزرعية Culture media preparation

أ-تحضير الأوساط

حُضِّرت الأوساط الزرعية المذكورة في الفقرة (3-1-3) حسب تعليمات الشركة المُصنِّعة لها وضُبِطَ الأس الهيدروجيني لها بحسب الحاجة لهُ ما عدا الأوساط التركيبية التي شمِلت وسطي أگار الدم واليوريا .

ب- تعقيم الأوساط Media sterilization

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

٣-2-2 : تحضير الكواشف والمحاليل Reagents and Solutions

1-2-2-3 :الكواشف Reagents

أ- كاشف إختبار الأوكسديز Oxidase test reagent:

حُضر آنياً بإذابة 1غم من مادة Tetra methyl-P-phenylene diamine dihydro chloride في 90 مليلتر من الماء المقطر المعقم ثم أُكمل الحجم إلى 100 مليلتر. إستُخدم للكشف عن قابلية البكتيريا على إنتاج إنزيم الأوكسديز (MacFaddin, 2000).

ب - كاشف إختبار الكتاليز Catalase test reagent:

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

ج - كاشف كوفاكس Kovac's reagent:

حُضر بإذابة 5غم من مادة Para–dimethyl aminobenzaldehyde في 75مليلتر كحول آيزوبروبيلي بإستخدام حمام مائي ثم أُكمل 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 فوكس- بروسكاور Vogas- Proskaur reagent:

يتكون هذا الكاشف من :

١- الفانفثول ٥%

حُضر بإذابة ٥ غم من الفانفثول في 100 مليلتر من الكحول الاثيلي بتركيز 95 % .

٢- هيدروكسيد البوتاسيوم KOH ٤٠ %

حُضر بإذابة ٤٠ غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100 مليلتر من الماء المقطر (MacFaddin , 2000) . استعمل للتحري عن قابلية البكتيريا على تحليل سكر الكلوكوز جزئياً .

2-2-2-3: المحاليل Solutions

المحلول الملحي الفسيولوجي Normal Saline Solution

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

3-2-3: جمع العينات Collection of samples

جُمعت 30 عينة من الحالات السريرية في مركز الحروق التخصصي في مدينة الديوانية لمدة من شهر شباط٢٠١٧ الى شهر أذار ٢٠١٧ من المرضى المراجعين والراقدين في المركز وبأعمار مختلفة لِكِلا الجنسين. إستُخدمت المسحات القطنية العادية و الحاوية على وسط ناقل Transport media swabs في عملية جمع العينات وذلك لضمان حيوية العزلة.

4-2-3: عزل البكتيريا Isolation of bacteria

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

5-2-3: تشخيص البكتيريا Identification of Bacteria

شُخصت المستعمرات البكتيرية النامية اعتماداً على :

1-5-2-3 : الخصائص المظهرية Phenotypic characteristics

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 وتخمر اللاكتوز على وسط أگار الماكونكي (Winn *et al* ., 2006) .

2-5-2-3 : التشخيص المجهري Microscopic diagnosis

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

3-5-2-3 : الأختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

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

1-إختبار الكتاليز Catalase test:

نُقلَ جزء من مستعمرة فتيَّه بعمر 24 ساعة بوساطة 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:

نُقلَ جزء من مستعمرة فتيَّه بعمر 24 ساعة بوساطة عود خشبي مُعقم إلى ورقة ترشيح مشبَّعة بكاشف الأوكسيديز, وأنَّ تكوّن اللون البنفسجي خلال 10 ثوانٍ دليل على إيجابية الإختبار (Brown, 2007).

3-إختبار انتاج الهيمولايسين Hemolysin production test:

استُخدم في هذا الإختبار وسط أگار الدم؛ إذ تم تلقيح الوسط بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها , وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة37°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).

6- إختبار تخمرالسكريات وانتاج الغاز Sugar fermentation&gas production test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط (Kliger's Iron Agar (KIA بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل بالمزروع البكتيري . وحُضنت 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 المُكوّنة من:

•إختبار إنتاج الأندول Indol production test:

استُخدم في هذا الإختبار وسط ماء الببتون (Peptone water) الذي لُقِحَ بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها، ثم حُضنَت 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 Tryptophanوإنتاج 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 وحُضِنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24- 48 ساعة. بعد إنتهاء فترة الحضن أُضيفت 5 قطرات من كاشف المثيل الأحمر وسُجِلت 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:

لُقحت الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي MR.VP. medium بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها ثم حُضِنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 –48 ساعة, بعد ذلك أُضيف 1مليلترمن الكاشف إلى كل انبوبة مع التحريك الهادئ ثم تُرك ساكناً لمدة ١٠-١٥ دقيقة، وإستدلَ على النتيجة الموجبة بظهور اللون الأحمر (Collee *et al* ., 1996) .

٨-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, واستدلَ على إيجابية الفحص بتغير

لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق دلالةً على إستهلاك البكتيريا للسترات على أنهُ مصدرٌ وحيدٌ للكاربون (Winn *et al* ., 2006).

٣-2-6 : حفظ وإدامة العزلات البكتيرية

Preservation and Maintenance of Bacterial Isolates

الحفظ قصير الأمد

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

٤ : النتائج والمناقشة Results and discussion

٤-١ : مجتمع الدراسة

تضمنت الدراسة الحالية جُمع 30 عينة من مرضى المصابين بالالتهابات الحروق في مركز الحروق التخصصي في مدينة الديوانية ولكلا الجنسين لمدة من شهرشباط 2017 لغاية شهر اذار 2017 , بلغت نسبة عزلات بكتريا *P. aeruginosa* (10 33.3%) التي تم الحصول عليها من مجموع 30 من العينات السريرية وكانت عملية جمع العينات بشكل عشوائي للتحري عن بؤرالتلوث ببكتيريا *P. aeruginosa* وما يترتب على ذلك من إجراءات تشخيصية ووقائية وعلاجية .

توزعت العينات حسب جنس المريض إلى ٤ عينة من الذكور مثلت نسبة ٤٠% من العينات و ٦ عينة من الاناث بنسبة ٦٠ % , من مجموع العينات مثلت عينات المرضى الوافدين نسبة ٢٠ % إذ جُمعت ٢ عينة في حين جُمعت ٨ عينة من المرضى الراقدين في المستشفى وبنسبة ٨٠% ,كما هو موضح في **الجدول (٤-١)**.

جدول (٤-١) توزيع العينات السريرية حسب المصدر والجنس وحالة المرضى .

العينات	النوع	العدد	النسبة المئوية
المصدر	الحروق	١٠	%٣٣,٣
الجنس	ذكور	٤	%٤٠
	اناث	٦	%٦٠
حالة المرضى	الوافدين	٢	%٢٠
	الراقدين	٨	%٨٠

من خلال نتائج العزل نلاحظ ان بكتيريا *P. aeruginosa* قادرة على أن تسبب مجموعة كبيرة من الأمراض المختلفة، سواء كانت الاصابة حادة ام مزمنة ويمكنها أن تغزو أي جزء من اجزاء الجسم (**Selezska and Ukraine , 2010**). وبالتالي فإن البكتيريا *P. aeruginosa* تعد واحدة من اهم الممرضات المسببة لعدوى المستشفيات Nosocomial

infection التي تؤدي إلى ارتفاع نسب وفيات المرضى ونسب الهلاك اي نسبة انتشار المرض**(Altoparlaket *et al*., 2005)** .

وقد بينت الدراسات ان معدل حدوث الاصابة في مرضى الحروق هو متزايد نتيجة لعوامل مختلفة مثل طبيعة الحروق نفسها، والحالة المناعية للمريض **(Pruitt *et al* ., 1998)**، وعمر المريض ومدى الإصابة، وعمق الحرق بالاضافة الى العوامل الميكروبية مثل نوع وعدد الكائنات الحية، إنتاج الانزيم و السموم، و موقع استعمار الجروح و الحروق ,ومن ثم الغزو النسيجي من قبل الكائنات المستعمرة **(Magnet *et al* ., 2013) .**

ففي احصائية لمنظمة **WHO (٢٠٠١)** بينت خلالها ان حوالي ٨٠% من حالات حروق الدرجة الثانية كانت سببا في احداث الوفيات وبنسب عالية جدا ,والسبب يعود الى كون الوسائل الدفاعية للمصابين مخترقة واقل قدرة على المقاومة, نستنتج من ذلك ازدياد مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية وذلك يشكل خطرا على الوقاية و العلاج الفعالين,كما نستنتج ان نسبة عزل البكتيريا في هذه الدراسة من حالات الحروق لا تخلو من الخطورة على الرغم من ان شعبة الحروق خاضعة للرقابة المشددة اذ خفض هذا معدل التهابات الحروق للمصابين الراقدين وبشكل ملحوظ و لكن ما تزال العدوى البكتيرية تهدد حياة الاشخاص المصابين بحروق شديدة.

و تعد الحروق سبباً من بين الأسباب الرئيسية لزيادة نسب الوفاة في العالم. اشارت تقارير منظمة WHO ان أكثر من ٩٠% من الحروق تحدث في البلدان النامية أوالدول المتخلفة، حيث ان معدل الوفيات من حروق الدرجة الثانية (٤٠% من مساحة السطح الكلي للجسم) بلغ ١٠٠%**(Potokar *et al* ., 2008).**

٢-٤ : عزل و تشخيص البكتيريا **Isolation and Identification**

كان الهدف الاساسي من جمع العينات هو عزل بكتيريا *P. aeruginosa* وتشخيص 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 المتخمر بينما ظهرت مستعمراتها بلون غامق وأغلبها محاطة بهالة شفافة على وسط أگار الدم مما يدل على قدرتها على تحلل الدم .

أظهرت نتائج الفحص المجهري الخلايا البكتيرية المعزولة عصوية الشكل متحركة مفردة أو ثنائية الترتيب سالبة لصبغة گرام ومكونة للمحفظة.

بينت نتائج الفحوصات الكيموحيوية نتائج موجبة لإختبار الأوكسيديز واختبار الكتاليز في جميع العزلات وذلك لقدرة البكتيريا على انتاج انزيمي الأوكسيديز والكتاليز . اما بالنسبة لمجموعة إختبارات IMViC والتي شملت اختبارات : (الأندول , احمر المثيل , فوكس بروسكاور, واستهلاك السترات) , كانت النتيجة موجبة في اختبار استهلاك السترات فقط , اتصفت جميع العزلات بعدم قدرتها على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S وانزيم اليوريز و أنها غير مخمرة للسكروز واللاكتوز كما موضح في **الجدول (٤-٢)** .

خلال اجراء الاختبارات اعلاه لاحظنا وجود و افراز صبغات وبالوان مختلفة منها الزرقاء البايوسيانين Pyocyanin ومنها الاخضر المزرق والصفراءPyoverdin وغيرها ,ان العديد من سلالات البكتيريا *P. aeruginosa* هي قادرة على انتاج هذه الصبغات حيث تقوم الخلايا بانتاجها بعد مرحلة النمو الأسي اللوغارتيمي Exponential phase,ان هذه الصبغات مهمة بالنسبة للبكتريا *P. aeruginosa* حيث تزيد من فعالية المضاد الحيوي ضد مدى واسع من البكتيريا,بالاضافة إلى القدرة على قتل خلايا اللبائن ورفع الموت المبرمج apoptosis لمستوى خلايا العدلة في الإنسان Neutrophils **(Hassett *et al.*, 1992) .**

أظهر مولر وآخرون (٢٠٠٢) في دراستهم على صبغة البايوسيانين بانها ستعمل على تثبيط تكوين الخلايا الليفية fibroblasts المسؤولة عن توليد الجلد البشري ،وبالتالي يؤدي ذلك الى تحفيز الشيخوخة المبكرة حتى لو كانت الصبغة بتركيزات منخفضة. وتكهن الباحثون أن هذا هو ما يفسر جزئيا كون بكتيريا *P. aeruginosa* تعوق التئام الجروح (**Muller *et al.*, ٢٠٠٩).**

الجدول (٤-٢) الاختبارات الكيموحيوية لبكتيريا *P.aeruginosa* المعزولة من العينات السريرية.

الاختبار	النتيجة
اختبار الاوكسديز	+
اختبار الكتاليز	+
اختبار الاندول	-
اختبار النمو في درجة ٤٢ م°	+
اختبار احمر المثيل	-
اختبار فوكس بروسكاور	-
اختبار استهلاك السترات	+
اختبار استهلاك السكريات الثلاثة وانتاج H2S	K/K--
اختبار اليوريز	-

٤-٣: انتشار وتوزيع عزلات *P. aeruginosa* حسب العمر ,الجنس ,وحالة المرضى

Incident and distribution of *P. aeruginosa* isolates based on age, gender, and hospitalization

لاحظنا في هذه الدراسة ان للعمر و الجنس تاثيرا على الاصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* و**الجدول (٤-٣)** يبين توزيع الحالات المرضية على الفئات العمرية المدونة ضمن بيانات المرضى اذ سجلت اعلى نسبة اصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* عند الفئات العمرية (٢١-٤٠) سنة ,والسبب يعود الى كون هذه الفئات تمثل الفئات العاملة من بين بقية الفئات العمرية تلتها الفئات العمرية (١-٢٠) و (٤١-٥٠) اذ كانت نسبة الاصابة في هذه الاعمار عالية.

جدول (٤-٣) مصادر الاصابة ببكتيريا *P. aeruinosa* حسب الفئات العمرية والجنس .

الجنس / الفئات العمرية	الذكور	الاناث	النسبة المئوية
١-٢٠	١	٢	٣ (٣٠%)
٢١-٤٠	٢	٢	٤ (٤٠%)
٤١-٥٠	١	١	٢ (٢٠%)
>٥١	ــــ	١	١ (١٠%)

٥- الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

- اظهرت الدراسة ان بكتيريا *P. aeruginosa* مسؤولة عن اخماج مرضية مختلفة وبنسب عالية في مستشفيات مدينة الديوانية أظهرت الدراسة الحالية الدور الاساسي في عدوى.

التوصيات Recommendation

- يجب اجراء فحص دوري للمستشفيات في مدينة الديوانية لتحديد مصدر التلوث البكتيري وتحديد مستوى المقاومة للمضادات الحياتية وكذلك أستعمال تقنية الـPCR للتحري عن كافة انواع البكتيرية المسببة لعدوى داخل المستشفيات مدينة الديوانية .

المصادر

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

Baron, **E.J. and Finegold, S.M.(1990).** Diagnostic microbiology. (8th ed) Mosby . The C.V. Mosby Company , USA.Toronto.pp:171-185.

Bojary, **N.M.R. and M. Hajia,(2012).**Multidrug- resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in Tehran Reference Burn Hospital,Tehran,Iran. African Journal of Microbiology Research,6: 1393-1396.

Brown, **RW. (2016).** Composition of Scientific Words. Smithsonian Institutional Press. ISBN 0-87474-286-2.Wekipdia

Brusselaers, **N.; Vogelaers,D. and Blot,S.(2011).** The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. Annals Inten. C., 1:47.

Cheng ,BC. **(2004)** Bacterial meningitis in hemodialyzed patients. Journal of nephrology 17(2):236-241.

Clark, M**. (2006)** . Role of cell wall degrading enzymes in Pathogenicity of bacteria . Rev. Iberoam. Microbiology. 17:547-553.

Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmiom, B. P.;and Simmon, A. (1996). Mackie and McCarteny Practical Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone Inc; USA.

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

Fariñas, MC. Martínez-Martínez, L.(2013). Infecciones causadas por bacteria gram negativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, Acinetobacter baumannii y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 2013;

Filiatrault, M.J., Picardo, K.F., Ngai, H., Passador, L., and Iglewski, B.H. (2006) Identification of Pseudomonas aeruginosa genes involved in virulence and anaerobic growth. Infect Immun 74: 4237-4245.

Fournior, B. and Philpott, D. (2005). Recognition of Staphylococcus aureus by the innate immune system. Clinical Microbial., Reviews. 18(3):521-540.

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. Dise, 3 (3): 116-122.

George, A.; Krivoshein, Y.D.; and Pichon, N. (2005). Identification of Pseudomonas aeruginosa in the clinical Libratory. J. of medical Microbiol., 2:9-16.

Gordon, SM. Serkey, JM. Keys, TF. Ryan, T. Fatica, CA. Schmitt, SK.(1998). Secular trends in nosocomial bloodstream infections in a 55-bed cardiothoracic intensive care unit. Ann Thorac Surg ;65:95-100.

Greenwood, D.; Slack, R. and Peutherer, J. (1998). Medical Microbiology. 15th Ed. Churchill Livingstone. Inc.

Hassett, D.J., Charniga, L., Bean, K., Ohman, D.E., and Cohen, M.S., 1992. Response of Pseudomonas aeruginosa to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-co-factored superoxide dismutase. 60, 328-36.

Jones, R.D.; Jampani, H.B.; Newman,J.L. and Lee, A.S. (2000). Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings. American Journal of Infection Control 28: 184-196.

Kobayashi, H. Kobayashi, O. and Kawai, S. (**2009**). "Pathogenesis and Clinical Manifestations of Chronic Colonization by Pseudomonas aeruginosa and Its Biofilms in the Airway Tract," Journal of Infection and Chemotherapy, Vol. 15, No. 3, , pp. 125-142.

Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C. and Winn, W . C. (1997). "Color Atlas and Textbook of Diagnostic Micro-biology" . 5th ed., Lippincott-Raven publisher, Philadelphia, U.S.A.

Lewenza, S., Falsafi, R.K., Winsor, G., Gooderham, W.J., McPhee, J.B., Brinkman, F.S., and Hancock, R.E.W. (2005) Construction of a mini-Tn5-luxCDABE mutant library in Pseudomonas aeruginosa PAO1: a tool for identifying differentially regulated genes. Genome Res 15: 583-589.

Macfaddin, J.F. (2000). Biochemical test for bacteria, 3nded.the Williams andWilkins. London. identification of medical Microbiology .8thed .The McGraw-Hill Companies.USA.

Magnet, **MD. M. H.; Arongozeb, MD.; Khan,G. M.; and Ahmed, Z. (2013).** Isolation and identification of different bacteria from different types of burn wound infection and study their antimicrobial sensitivity pattern. International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences., 1(3) :125-132.

Moreau-Marquis, **S., Bomberger, J.M., Anderson, G.G., Swiatecka-Urban, A., Ye, S., O'Toole, G.A., and Stanton, B.A. (2008)** The {Delta}F508-CFTR mutation results in increased biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa by increasing iron availability. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295: L25-L37.

Muller, M. Li. Z.and Maitz P.KM. (2009). Pseudomonas pyocyanin inhibits wound repair by inducing premature cellular senescence: Role for p38 mitogen-activated protein kinase. Burns. 35: 500-508.

Noura, **Salih KM, Jusuf NH, Hamid AA, & Yusoff WM (2009)** High prevalence of Pseudomonas species in soil samples from Ternate Island-Indonesia. Pakistan journal of biological sciences: PJBS 12(14):1036-1040.

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.

Palleroni, N.J., (2010). The Pseudomonas story Environ.Microbiol.12(6), 1377-1383.

Patel, **P. Whittier, S. & Frank, E. (2002)** Person-to-person transmission of Pseudomonas pneumonia in the community: documentation by pulsed-field electrophoresis. Southern medical journal 95(6):653-656.

Pollack, M.(1995). *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. New York: Churchill Livingstone; p. 1980-2003.

Pollack, M., Mandell, G.L., Bennett, J.E., and Dolin, R. (2000) Pseudomonas aeruginosa In Principles and practice of infectious diseases: Churchill Livingstone Press, pp. 2310-2335.

Potokar, **T.S.; Ali, S.; Chamania, S.; Prowse, S. and Whitaker, I.S. (2008**). A global overview of burns research highlights the need for forming networks with the developing world. Burns, 34: 3–5.

Pruitt, **B.A.; McManus, A.T.; Kim, S.H.; and Goodwin, C.W. (1998).**Burn wound infections: current status. World J Surg., 22: 135-145.

Qarah, S.; Cunha, B.; Dua, P.; Lessnau, K.; and Madappa, T. (2008). Pseudomonas aeruginosa Infections. www.emedicine.medscape.com.

Selezska, **K. and Ukraine, K. (2010).** *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus. der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina., 1-106.

Sigurdsson G, Fleming RMT, Heinken A, Thiele I(2012). A Systems Biology Approach to Drug Targets in Pseudomonas aeruginosa Biofilm. Plos One. Apr 16; 7(4):e34337.

Smulders C, Brink H, Wanten G, Weers-Pothoff G, & Vandenbroucke-Grauls C (1999) Conjunctival and corneal colonization by Pseudomonas aeruginosa in mechanically ventilated patients. A prospective study. The Netherlands journal of medicine 55(3):106-109.

Stover, C.K., and Pham, X.Q., and Erwin, A.L., and Mizoguchi, S.D., and Warrener, P., and Hickey, M.J., and Brinkman, F.S., and Hufnagle, W.O., and Kowalik, D.J., and Lagrou, M . (2000) Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PA01, an opportunistic pathogen. Nature 406: 959-964.

Striebich, **Richard C.; Smart, Caitlin E.; Gunasekera, Thusitha S.; Mueller, Susan S.; Strobel, Ellen M.; Mc- Nichols, Brett W.; Ruiz, Oscar N. (2014).** "Characterization of the F-76 diesel and Jet-A aviation fuel hydrocarbon degradation profiles of Pseudomonas aeruginosa and Marinobacter hydrocarbonoclasticus". International Biodeterioration & Biodegradation 93: 33–43.

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

Tam, V.H.; Kai-Tai, C.; Mark, T. L.; Amy, N. S.; Shana, K. M.; Keith, P. and Kevin, W.G.(2007). Prevalence, mechanisms, and risk factors of carbapenem resistance in bloodstream isolates of Pseudomonas aeruginosa Diag.Microbio. Infec. Dis., 58:309 314.

TeanPaisan, A. Pollack, M. and Bennrtt, F. (2009). Pseudomonas aeruginosa Principle and Practic of infectious Diseases . Sth ed. New York .

Tzouchas, **A. T. (2014).** West Bow Press. Greek Words. p. 550. ISBN 978-1490726106.

Van Delden, **C., and Iglewski, B.H.(1998).** Cell to cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections .Emerg . Infect.Dis.,4:(4)551-560.

Vila J, Marco F. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. **2010** Dec; 28(10):726–36.

Wiblin, **RT.(1997).** Nosocomial pneumonia. In: Wenzel RP, editor. Prevention and control of nosocomial infections. 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins; p. 807-19.

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

Winn, W.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P. and G. Woods. (2006). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M., Schwab U., Cekici A., Meyer K.C., Birrer P., Bellon G., Berger J., Weiss T. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. J. Clin. Investig.;109:317–325.

Zeng, L. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity And Antibiotic Resistance. Doctor Of Philosophy University Of Florida.