جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية – كلية العلوم

قسم علوم الحياة

عزل وتشخيص بكتريا *pseudomonas.aeruginosa* من الحروق ودراسة مقاومتها لبعض المضادات الحيوية

بحث مقدم إلى

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة القادسية كجزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس علوم في علوم الحياة

من قبل الطالبة

سارة نايف طعمة

بإشراف

أ. م. د. فراس سرحان عبد المياحي

1440هـ

2019م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

﴿قُل لَّوْ كَانَ الْبَحْرُ مِدَادًا لِّكَلِمَاتِ رَبِّي

لَنَفِدَ الْبَحْرُ قَبْلَ أَن تَنفَدَ كَلِمَاتُ رَبِّي وَلَوْ

جِئْنَا بِمِثْلِهِ مَدَدًا﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة الكهف الآية (109)

الإهداء
إلى الشمعة التي تنير طريقي
والدي العزيز
إلى من وضعت الجنة تحت اقدامها
والدتي العزيزة
إلى من اشد ازري وسندي بهم
اخوتي واخواتي
إلى كل من يفرحه نجاحي وتقدمي
اهدي ثمرة جهدي المتواضع هذا
سارة

شكر وتقدير

الشكر لله سبحانه وتعالى الذي وفقنا لاكتمال هذا البحث والصلاة والسلام على المبعوث رحمة للعالمين وعلى اله وصحبه اجمعين

اتقدم بجزيل الشكر وعظيم التقدير لإدارة جامعة القادسية للعلوم التي منحتني هذه الفرصة واخص بالشكر استاذي الفاضل الدكتور فراس سرحان المياحي الذي تفضل مشكورا لقبول الاشراف على هذا البحث وحرصه على اكتماله وفي سبيل ذلك زودني بنصائحه ومنحني وقته الثمين وعمله العزيز.

كما اتقدم بالشكر والتقدير والاحترام للسادة الأفاضل في لجنة المناقشة على ما بذلوه في جهد لقراءة البحث .

كما اتقدم بالشكر لإدارة المكتبات في الجامعة على تعاونهم الصادق من اجل البحث العلمي .

كما اتقدم بالشكر والتقدير لكل من ساهم ومد يد العون بشكل مباشر او غير مباشر .

قائمة المحتويات

العنوان	الصفحة
الخلاصة	I
المقدمة	3 - 1
المواد وطرق العمل	12 - 4
النتائج والمناقشة	16 - 13
الاستنتاجات والتوصيات	17
المصادر	21 - 18

قائمة الجداول

الجداول	الصفحة
جدول (1) يوضح نتائج الاختبارات الكيموحيوية التي أجريت على عزلات بكتيريا *Ps. aeruginosa*	11
جدول (2) يوضح النسبة المئوية للإصابة ببكتيريا *Ps. aeruginosa* حسب الجنس	12
جدول (3) يوضح النسبة المئوية للفئات العمرية وعدد الاصابات للمصابين بالحروق	13
جدول (4) النسبة المئوية الكلية لعزلات *Ps. aeruginosa* المقاومة والمتوسطة المقاومة والحساسة	14

الخـلاصـة

ان الهدف من البحث هو عزل وتشخيص بكتيريا ***pseudomonas aeruginosa*** من الحروق ومعرفة مقاومتها للمضادات الحيوية فقد تم جمع (60) عينة من المرضى الراقدين والوافدين إلى مستشفى الديوانية التعليمي وحده الحروق وأيضا من مستشفى الحمزة العام لفترة امتدت من كانون الأول 2018 إلى آذار 2019 فتم الحصول على (9) عزلات اثبتت انها تابعة لـــ ***pseudomonas aeruginosa*** من مستشفى الديوانية وأيضا (4) عزلات من مستشفى الحمزة العام حيث تم تشخيصها بأجراء الفحص المجهري باستخدام صبغة گرام حيث ظهرت انها سالبة وأيضاً اختبارات **Bio-chemical test** الذي أجريت على العينات.

بعد ذلك قمنا بأجراء اختبار الحساسية للعزلات لمعرفة مدى مقاومتها للمضادات الحيوية حيث استخدمنا طريقة الانتشار بالأقراص **Diffusion Disk** لـــ (20) مضاد حيوي خاص بالبكتيريا فتبين ان هناك بعض العزلات كانت مقاومة وبعضها كانت حساسة حيث اعطت المضادات (**Cefepim** و**Cefotoxine** و**Ceftriaxone** و**Amoxicilin**) أقل نسبة تثبيط لنمو البكتريا اذ كانت مقاومة البكتريا تجاهها عالية جداً بلغت (100%).

في حين اعطت مضادات ال(**Impipen** و**Ciprofloxacin** و**Colistin**) أعلى نسبة تثبيط لنمول البكتريا (35-30-30)% اي كانت نسبة المقاومة قليلة.

المقدمة

INTRODUCTION

المقدمة

تعد بكتيريا الزوائف الزنجارية (*pseudomonas aeruginosa*) واحدة من الأنواع البكتيريا الممرضة الانتهازية السائدة في الإنسان والتي تشكل اعلى نسبة إصابة عند مرضى الحروق (Baron and peterson; 2007) والأشخاص ضعيفي المناعة ففي إحصائية لمنظمة WHO(2001) بينت خلالها ان حوالي 80% من حلات الحروق الدرجة الثانية كانت سببا في احداث الوفيات وبنسبة عالية جدا تعود هذه البكتيريا الى عائلة pseudomondaceae ضمن جنس *pseudomonas*.

Schroeder لأول مرة من قبل العالم *p.aeruginosa* وسميت ب (koneman et al;1997) عام 1872 إذا تم عزلها من الجروح الجلدية لأول مرة التي لها لون ازرق مخضر من قبل Gassard عام 1882 ومن الخصائص المجهرية التي يتميز بها هذا الجنس انها سالبة لصبغة گرام ، تتحرك بواسطة أصوات قطبية Lewrnza *et al;*2005;filiante et al; 2006 كما تعد هذا البكتيريا هوائية اجبارية (collee *et al:*1996) لكن لوحظ ان بعضها اختياريه لاهوائية .(Anon;2008) تظهر بشكل منفرد أو بشكل ثنائي وبسلاسل قصيرة لهذه البكتيريا القابلية على النمو في مختلف الأوساط الزرعية فعند نموها على وسط nutrient agar فأن مستعمرتها تكون واسعة ، قليلة التحدب ، وملساء ، وذات حواف غير منتضمة ، وملونة للوسط الزرعي اخضر متفلور (Laa et al;2004) وهذا المظهر ناتج من صبغة pyocyanin التي تفرزها البكتيريا كما تتميز بأن لها القدرة على إفراز صبغات أخرى ومنها صبغة البيروبين (الأحمر - البني) وصبغة البايروميلانين (Jawetz *et al;* 2010) ' (kayseretal;2005) كما يكون لونها شاحب على وسط الماكونگي وذلك لانها غير مخمرة لسكر اللاكتوز لذلك يكون لونها شاحب (Baron and finegold;1990) ومن الخصائص الكيمو حيوية التي تتميز بها بكتيريا ال p.aeruginosa والتي ذكرها العالم (Mis,2008) انها موجبة لاختبار الاوكسديز والكاتليز (greenwood *et al;*2007) وموجبة أيضا للسترات وسالبة لاختبارات Mivc (الاندول واختبار المثيل الأحمر واختبار فوكس -بروسكاور) (collee *et al;*1996) وبينت الدراسات ان بكتيريا ال p.aeruginosa تستعمر أماكن الحروق مباشرة بعد دخول المريض إلى المستشفى بالتالي تحصل الاصابة وذلك بسبب ضعف مقاومة الأنسجة التالفة حيث ان هذه البكتيريا سبب مهم في العدوى المكتسبة من المستشفيات (Gawish *et al;* 2013) وهي النوع الأكثر شيوعا بين الأنواع الشائعة لجنس الزوائف وتشكل النسبة الأعلى كمسبب للإصابات بين المرضى الراقدين في المستشفيات وخصوصا المرضى المصابين بمتلازمة المناعة المكتسبة ومرضى السرطان

وأيضا المرضى الذي يعانون من اخماج الجروح والحروق كما تبين هذا البكتيريا تعمل على غزو واستيطان انسجة الجسم ودخولها جهاز الدوران مسببة تجرثم الدم (Davy and oTool;2000).

لقد استخدمت المواد المشتقة من الاحياء المجهرية والتي تدعى بالمضادات الحيوية في علاج الكثير من الإصابات المرضية وكان اول رواد هذا المجال (Louis pasteur;1877) إذا اكتشف ان نمو البكتيريا المسببة للمرض يمكن ان تثبط بواسطة البكتيريا الأخرى وبذلك عرفت المضادات الحيوية على انها المادة التي تنتج من قبل الكائن المجهري وثبط نمو كائنات مجهرية أخرى وقد أدى ابتكار طرائق التحضير التركيبي إلى تحوير هذا التعريف وقد عرف بانها المادة المنتجة من قبل الكائن المجهري التي تثبط بتراكيز قليلة نمو كائنات مجهرية أخرى (Hugo and Russell;1983) حيث بدء استخدام المضادات الحيوية بعد تبين ان لها سمية انتقائية أي انها تقتل الكائن الممرض ولكن لا تؤذي خلايا الجسم وتكون مؤثرة في علاج الامراض (prescot *et* al;1993) هذه المضادات عبارة عن نتائج العمليات الايضية الطبيعية للأحياء المجهرية لها القدرة أما تعمل على تثبط أو قتل الأحياء الأخرى

وجد ان الزوائف الزنجارية قادرة على تكوين الاغشية الخلوية (Bio film). التي تتسم بإفراز نسيج خارج الخلية حاضن ولاصق يمنع المضاد الحيوي من الدخول إلى الهدف وبذلك تحمي نفسها وتزيد من قدرتها الامراضية وتسبب مضاعفات خطيرة (vilaet *et al;* 2012). إذ تم ملاحظة ان الاصابة بهذه البكتيريا يصعب علاجها بسبب امتلاكها صفة المقاومة الطبيعية للعديد من المضادات الحيوية (Live more;2012) وكان السبب في ذلك هو الاستخدام المتكرر للمضادات الحيوية واسعة الطيف ومن الدراسات العالمية والعراقية التي أكدت على وجود صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية MDR (Bonnet *et al*;2002) و(cherian *et al*; 2003) (Raka *et al;*2004) (واسماعيل وحامد ،2004) (المؤيد ،2003) (عاكف ،2003) وتتميز الزوائف الزنجارية أيضا بأمتلاكها آليات أخرى مثل تحوير موقع الهدف للمضاد وإنتاج إنزيمات البيتالاكتيم وتحوير الاغشية الخارجية وهذه الآليات وسوء استخدام المضادات تجعل البكتيريا مقاومة اتجاه العديد من المضادات الحيوية (Tavajjohi *et al;* 2011)ولتحقيق هذه الأهداف تناولت الدراسة تحقيق الجوانب الاتية :-

1. عزل بكتيريا ال pseudomous aeruginosa المأخوذة من الحروق.
2. تشخيص بكتيريا pseudomous aeruginosa باستخدام وسط المكونكي والفحص المجهري والاختبارات البايوكيميائية.
3. معرفة مقاومة عزلات بكتيريا pseudomous aeruginosa تجاه المضادات الحيوية المستخدمة.
4. التعرف على العزلات التي اظهرت مقاومة متعددة MDR.

المواد وطرق العمل

MATERIALS AND METHODS

المواد وطرائق العمل

أولاً :- المواد

1. محلول الكاتليزcatalase solution
2. مادة الاوكسديز oxidase sub stain
3. ماء مقطر distilled water
4. محلول ملحي normal saline
5. مادة الـــ safranin
6. Iodine
7. كحول اثلين
8. crystal violet
9. اگار Agar
10. ببتونpeptone
11. المثل الأحمر methyl red
12. الفانفثول naphthol

ثانياً: - الأدوات

1. أطباق بتري pater Dish
2. حوض للتصبيغ
3. الناقل الزرعي loop
4. مصباح بنزن
5. انابيب اختبار
6. مسحات قطنية معقمة swap
7. عيدان خشبية
8. أوراق ترشيح
9. شرائح زجاجية مع اغطيتها slide and cover
10. ماصات pipetes

ثالثاً:- الأجهزة:

1. ميزان حساسsensitive balance
2. جهاز الموصدة Autoclave
3. الحاضنة Incubator
4. جهاز التقطير Distillator
5. كابينة الزرع المجهري Laminar flow cabinet
6. مجهر ضوئي مركب compound light microscope

رابعاً:- الأوساط الزرعية

1. وسط اگار ال macConkey
2. وسط ال blood agar
3. وسط ال Muller-Hinton agar
4. وسط ال Milk agar
5. وسط ال kligler's agar
6. وسط ال urease broth
7. وسط ال samion. citrat agar
8. وسط ال peptone water
9. وسط ال PV/MR broth
10. وسط النutrient agar
11. وسط ال Brain-heart infusion agar

طرائق العمل

تحضير الأوساط الزرعية

حضرت جميع الأوساط الزرعية المذكورة بالاعتماد على التعليمات الموجودة على العبوة من الشركة المصنعة لها نضبط الاس الهيدروجيني حسب الحاجة.

تعقيم الأوساط الزرعية

عقمت الأوساط الزرعية وذلك نوع الوسط أما باستخدام جهاز المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 مئوية تحت ضغط 1 جو لمدة 15 دقيقة أو باستخدام مرشحات دقيقة.

تحضير المحاليل والكواشف المستخدمة

1.محاليل صبغة گرام

تستخدم هذه الصبغة لمعرفة استجابت البكتيريا لعملية التصبيغ حيث حضرت المحاليل وفق ما ذكره (Benson,1998)

2. كاشف الكاتليز catalase reagent

يستخدم هذه الكاشف للاستدلال على البكتيريا المنتجة لإنزيم كاتليز (macfadddin;2000). يحضر بإضافة 21 ملي لتر من H_2O_2 بتركيز 50 ملي لتر من الماء المعقم ونكمل الحجم إلى 100 ملي لتر للحصول على تركيز نهائي 30% ويحفظ في قنينة معتمة

3.كاشف الاوكسديز oxidase reagent

يستخدم هذه الكاشف للتحري عن قدرة البكتيريا على انتاج أنزيم الاوكسديز (macfadddin;2000) يحضر بإذابة 0.1 من رباعي المثل -بارا مثلين آمين مع كلوريد الهيدروجين في 10 ملي لتر من الماء المعقم ويحفظ في قنينة معتمة.

4.كاشف فوكس بروسكاور voges- proskour reagent

يحضر حسب ما جاء في (macfadddin;2000) بإذابة 5 غرام من الفانفثول في 100ملي لتر من كحول الاثيلي بتكريز 96%

5.المحلول الملحي الفسيولجي normal saline

يحضر المحلول بإذابة 0.85 من كلوريد الصوديوم في 90 ملي لتر من الماء المقطر ونكمل الحجم الى 100 ملي لتر ويعقم بالمؤصدة.

جمع العينات collection of samples

لقد قمنا بجمع عينات سريرية من المرضى الراقدين والوافدين الى المستشفى والمصابين بالحروق وبأعمار مختلفة ولكلا الجنسين من مستشفى الديوانية التعليمي ومستشفى الحمزة العام خلال فترة امتدت من كانون الأول 2018 الى آذار 2019 حيث اخذت العينات بواسطة مسحات معقمة من الجروح .wound حيث تضمنت 5عزلات إناث و8 ذكور ثم بعد ذلك قمنا بأخذ العينات مع توفير الظروف الملائمة الى مختبرات الكلية وقمنا أولا بتنشيط العينات بزراعتها بطريقة التخطيط ع وسط الماكونكي ووسط نقيع المخ والقلب ثم حضنت بدرجة حرارة 37% لمدة 24 ساعة.

عزل البكتيريا isolation of bacteria

يتم عزل البكتيريا عن طريق زرع العينات المنشطة على الأوساط الزرعية وهي وسط اگار الدم ووسط الماكونكي بطريقة التخطيط باستخدام الناقل المعقم ثم تحضن الأوساط بدرجة حرارة 37% لمدة 24 ساعة لكي نحصل على مستعمرات بعد ذلك نقوم بأخذ جزء من المستعمرة وزرعها على أوساط اختيارية وانتقائية لكي نحصل على بكتيريا نقية.

تشخيص البكتيريا Identification of bacteria

1.الفحص المظهري morphology examination

يتم الفحص المظهري عن طريق دراسة الصفات المظهرية للمستعمرات النامية من خلال ملاحظة لون المستعمرات وحجمها وأشكالها وقوامها وارتفاعها والروائح المميزة لها وأيضا قابليتها على تكوين الصبغات وتخمر اللاكتوز على وسط اگار المكونكي (winn *et. al*.; 2006)

2.الفحص المجهري microscopic examination

يجري الفحص وذلك عن طريق اخذ مسحة من المستعمرة البكتيريا ووضعها على شريحة زجاجية slide وتصبيغها بصبغة گرام وفحصها باستخدام المجهر لكي يتم ملاحظة شكل الخلايا وحجمها ووجود الاسواط والاهداب ومعرفة تفاعل البكتيريا مع الصبغة (موجبة أو سالبة) وكالآتي: -

اختبار صبغة كرام

1. بواسطة loop بعد تعقيمه بمصباح بنزن نأخذ جزء من المستعمرة النامية وفرشها على شريحة زجاجية.
2. نغمر الشريحة بصبغة crystal violate بالون البنفسجي لمدة دقيقة بعد ذلك نغسل الشريحة بالماء المقطر لغرض التخلص من الصبغة الزائدة
3. نغمر الشريحة بصبغة iodine لمدة دقيقة بعد ذلك نغسل الشريحة بالماء المقطر
4. نغمر الشريحة بـ alcohol acetone solution ذو الون الشفاف المستخدم لاستخلاص الصبغة ويترك لمدة 30 دقيقة بعد ذلك يغسل بالماء المقطر
5. نغمر الشريحة بصبغة ال .safranin ذو الون الأحمر الغامق بعد ذلك تغسل الشريحة بالماء المقطر
6. بعد ذلك يتم تنشيف الشريحة بورق الترشيح وتفحص الشريحة تحت المجهر على قوة x100 نلاحظ ان العينة تصبغ بالون الأحمر وهذه يدل على سالبية البكتيريا لصبغة گرام.

3.الاختبارات الكيمو حيوية Biochemical test

تم اجراء مجموعة من الاختبارات الكيموحيوية الازمة لتشخيص العزلات البكتيريا وكالاتي:

1.اختبار الـ Oxidase

نقوم بأخذ ورقة ترشيح مبللة بمادة الاوكسديز Oxidase بعد ذلك بواسطة loop المعقم نقوم بنقل جزء من المستعمرة البكتيريا النامية التابعة لـ .p.aeruginosa ونضعها على ورقة الترشيح التي تحتوي على مادة الاوكسديز ونلاحظ إذا تحول لون المستعمرة الى البنفسجي الغامق فهذا يدل على النتيجة الموجبة للاختبار

2.اختبار الـ catalase

نقوم بأخذ شريحة زجاجية ونضع عليها قطرة صغيرة من محلول الكاتليز بعد ذلك ننقل جزء من المستعمرة البكتيريا النامية بواسطة عيدان خشبية ونضعها على الشريحة الزجاجية التي تحتوي على مادة الاوكسديز فإذا لاحظنا ضهور فقاعات من غاز الاوكسجين فان هذا يدل على النتيجة الموجبة للاختبار.

3.اختبار الاندول Indol test

نقوم بتلقيح وسط ماء الببتون بجزء من المستعمرة البكتيريا النامية المراد اختبارها بطريقة الطعن ثم نحضن الاطباق بدرجة حرارة 37% لمدة 24 ساعة بعد انتهاء مدة الحضن نقوم بإضافة كاشف kovac's regent. فإذا ظهرت حلقة حمراء الون يدل على النتيجة الموجبة للاختبار.

4.اختبار الحركة motility test

يتم اختبار الحركة عن طريق تلقيح الأنابيب التي تحتوي على وسط المانتول بجزء من المستعمرة البكتيريا المراد اختبارها بطريقة الطعن باستخدام إبرة ناقلة معقمة في المركز ونقوم بالحضن بدرجة حرارة 37% لمدة 24 ساعة فإذا لاحظنا ان انتشار النمو خارج حدود الطعنة فهذا يدل على النتيجة الموجبة أما بقاء النمو فقط في الطعن يدل على ان البكتيريا غير هوائية

5.اختبار تخمر السكريات وإنتاج غاز H2c

نلقح وسط الاگاركليكر klA بالمزرعة البكتيريا المراد اختبارها بطريقة الطعن بالاستعمال إبرة التلقيح والتخطيط على السطح المائل للوسط ثم تحضن بدرجة 37% لمدة 24 ساعة بعد انتهاء مدة الحضن إذا لاحظ تغير لون الوسط من الأحمر الى الأصفر بفعل الكاشف دليل على قدرة البكتيريا على تخمر سكر اللاكتوز والكلوكوز وان كانت البكتيريا منتجة للغاز سوف نلاحظ فقاعات في أسفل الوسط والبكتيريا المنتجة للغاز H2c سوف تكون راسب اسود التي تحتوي على الوسط.

6.اختبار ال Urease test

في هذا الاختبار يتم استخدام وسط Urease broth المعقم اذ نقوم بتلقيح الأنابيب التي تحتوي على الوسط بجزء من المستعمرة البكتيريا المراد اختبارها ثم نحضن الاطباق بدرجة 37% لمدة 24 ساعة حيث نلاحظ تغير لون الوسط الى الوردي وهذا يدل على النتيجة الموجبة والبكتيريا المنتجة لإنزيم اليوريز.

7.اختبار المثيل الأحمر Methyl red test

يتم هذا الأخبار عن طريق تلقيح وسط MR-VP medium جزء من المستعمرة البكتيريا المراد تشخيصها ثم تحضن بدرجة حرارة 37% لمدة 24-48 ساعة بعد انتهاء مدة الحضن نقوم بإضافة كاشف المثيل الأحمر فإذا لاحظ تغير لون الوسط الى الأحمر فهذا يدل على النتيجة الموجبة للاختبار.

8.اختبار فوكس بروسكاور Voges-proskaure

يتم هذا الاختبار بتلقيح وسط MR-VP medium بالمستعمرة البكتيريا المراد تشخيصها بعد ذلك نحضن الأطباق بدرجة حرارة 37% لمدة 24-48 ساعة بعد انتهاء مدة نضع قطرات من كاشف ألفا نفثول 5% وهيدروكسيد البوتاسيوم 10% مع التحريك ثم يترك لمدة 15 دقيقة فإذا تغير لون الوسط الى الون الأحمر يدل على النتيجة الموجبة للاختبار.

9.اختبار استهلاك السترات

نقوم بزرع جزء من المستعمرة البكتيريا على وسط siamon citrat بطريقة التخطيط ثم تحضن الأطباق بدرجة حرارة 37% لمدة 24 ساعة فإذا لاحظ تحول لون الوسط من الأخضر الى الأزرق فهذا يدل على النتيجة الموجبة للاختبار وقدرة البكتيريا على استهلاك السترات كمصدر الكاربون.

اختبار فحص الحساسية Antibiotic susceptibility test

طريقة الانتشار بالأقراص

تم اجراء اختبار فحص الحساسية للعزلات البكتيريا اعتمادا على طريقة (Bauer,1966): -

نقوم بتحضير وسط ال .molar Hinton الخاص باختبار الحساسية ونقوم بأخذ جزء من المستعمرة البكتيرية النامية بواسطة swab وعمل عالق بكتيري عن طريق التخفيف بواسطة المحلول الملحي الفسلجي مقارنة مع انبوبة السيطرة القياسية ماكفرلاند ثم نقوم بنقل 0.1 مول من العالق البكتيري بواسطة swab معقم وزراعته على وسط مولر هنتون بطريقة التخطيط ثم نترك الأطباق لمدة نصف ساعة بدرجة الغرفة بعد ذلك نقوم بوضع أقراص المضادات الحيوية على سطح الوسط بواسطة ملقط معقم مع الضغط على الأقراص بعناية لتثبيتها حيث استخدم 20 مضاد حيوي ثم وضع المضادات في طبق بعد ذلك تحضن الأطباق بدرجة حرارة 37% لمدة 24 ساعة بعد انتهاء مدة الحضن نقوم بقياس التثبيط بواسطة مسطرة وقورنت مع القيم المحددة في CLSI وتحديد البكتيريا الحساسة والمقاومة لهذه المضادات.

النتائج والمناقشة

RESULTS AND DISCUSSION

النتائج والمناقشة:

بينت نتائج العينات التي تم جمعها والتي عددها 60عينة ان هناك 13 عزلة تابعة لبكتريا الـ *Pseudomonas aeruginosa.* وبنسبة 21.6%حيث كانت هذه النتائج متشابهة الى ما توصل اليها (Hassan;2012) و(Napid; 2005) الى ان نسبة عزل البكتريا 21%و 25.5%وتتعارض نسبة العزلات التي تم الحصول عليها مع نتائج (Gadوجماعته 2007)حيث سجلوا اعلى نسبة عزل بلغت 72%من اخماج الحروق من خلال الفحص المجهري والفحص المظهري واختبارات الكيموحيوية Bio-chemical testالتي تم اجرائها على العينات تم تشخيص البكتريا وكالاتي: _

جدول (1) يوضح نتائج الاختبارات الكيمو حيوية التي اجريت على عزلات بكتريا الـ *Pseudomonas aerugoinosa*

الاختبارات الكيمو حيوية	النتائج
اختبار الاوكسديز	+
اختبار الكاتليز	+
اختبار الاندول	_
اختبار الحركة	+
اختبار تخمر السكريات وانتاجH2s	K/k_
اختبار الurease	_
اختبار المثيل الأحمر	_
اختبار فوكس_بروسكاور	_

- بينت نتائج الفحص المجهري باستخدام اختبار صبغة كرام ان بكتريا *pseudomonas aerugoinosa* سالبة لصبغة كرام، عصوية الشكل، مفردة او ثنائية الترتيب.
- بينت نتائج الفحص المظهري ان بكتريا ال pseudomonas aeruginosa قادرة على افراز صبغات متميزة لها ومتعددة يمكن من خلال هذه الصبغات تشخيصها حيث لاحظ وجود صبغات وبالألوان مختلفة منها صبغة الpyocynin وصبغة pyoverdin وغيرها من الصبغات الاخرى.

- بينت نتائج الفحوصات الكيمو حيوية ان بكتريا p.areuginosa موجبة لاختبار الاوكسديز من خلال تكونها اللون البنفسجي الغامق على ورقة الترشيح وايضا موجبة لاختبار الكاتليز من خلال تكونها فقاعات هوائية عند إضافة الكاشف وموجبة لاختبار الحركة واختبار استهلاك السترات.
- اما بالنسبة لاختبارات Mivic (الاندول_فوكس بروسكاور _احمر المثيل _استهلاك السكريات وانتاج H2s. فكانت النتيجة سالبة.

جدول (2) يوضح النسب المئوية للإصابة ببكتريا ال*pseudomonas aeruginosa* حسب الجنس.

الجنس	عدد الاصابة	النسبة المئوية
الذكور	9	%69
الاناث	4	%31
المجموع	13	%100

من خلال الجدول قد تبين ان للجنس تأثير على الاصابة ببكتريا p.areuginosa فأعطت النتائج بان عد الاصابة في الذكور بلغ 9حيث بلغت النسبة المئوية 69%في حين كانت عدد الاصابة في الاناث 4حيث بلغت النسبة المئوية 31% وهذا يبين ان عدد الاصابة في الذكور اعلى منها في الاناث وهذا يتفق مع ما سجله (Ali Khan et al,2008) وهذا ايضا يختلف باختلاف موسم جمع العينات واختلاف المرضى.

جدول (3)يوضح النسبة المئوية للفئات العمرية وعد الاصابات للمصابين بالحروق

الفئه العمرية	عدد الإصابة	النسبة المئوية
10-1	4	%30.7
19-11	4	%30.7
30-20	5	%38.4
المجموع	13	99.8

تبين من خلال الجدول ان للعمر تأثير على الاصابة ببكتريا p. areuginosa اذ سجلت اعلى عدد اصابة ببكتريا p. areuginosa عند الفئة العمرية (20-30) حيث بلغ عدد الاصابة 5وكانت النسبة المئوية لها 38.4% وبين ان السبب في ذلك هو ضعف الجهاز المناعي. والتقدم بالعمر باعتبار هذه الفئة هي الفئة العاملة والاكثر عمرا مما يسبب في مهاجمة الجسم بواسطة البكتريا وتحصل الاصابة.

اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية.

اختبرت حساسية 13عزلة من بكتريا *p. areuginosa* المعزولة من الحروق تجاه 20 مضاد حيوي تم استخدامه.

جدول (4)النسبة المئوية الكلية لعزلات بكتريا *p.areuginosa* المقاومة والمتوسطة المقاومة والحساسة للمضادات الحيوية

ت	المضادات الحيوية	العزلات المقاومة		العزلات المتوسطة		العزلات الحساسة	
		العدد	النسبة	العدد	النسبة	العدد	النسبة
1	Piperacillin	9	%69.2	2	%15.3	2	%15.3
2	Piperacillin/Tazobactam	6	%46	4	%30	3	%23
3	Ticarcilin/clavlanat acid	10	%76.9	3	%23	-	-
4	Amoxcillin clavulanic acid	13	%100	-	-	-	-
5	Ceftzidime	13	%100	-	-	-	-
6	Cefotaxime	13	%100	-	-	-	-
7	Ceftriaxone	13	%100	-	-	-	-
8	Cefoxitin	12	%92.3	-	-	1	%7.6
9	Cefepime	13	%100	-	-	-	-
10	Imipene	5	%38.4	2	%15	6	%46
11	Meropenem	9	%69.2	-	-	4	%30
12	Azteronam	9	%69.2	-	-	4	%30
13	Amoxicillin	13	%100	-	-	-	-
14	Gentamicin	8	%61.5	2	%15	3	%23
15	Tobramycin	9	%69.2	-	-	4	%30
16	Ciprofloxacin	6	%46.1	-	-	7	%35
17	Levofloxacin	6	%46.1	5	%38.4	2	%15.3
18	Norfloxacin	6	%46.1	1	%7.6	6	%46.1
19	Ofloxacin	6	%46.1	1	%7.6	6	%46.1
20	Colistin	6	%46.1	1	%7.6	6	%46.1

اظهرت العزلات العائدة لبكتريا *p.areuginosa* اعلى نسبة مقاومة بلغت 100%لمضادات cefotaxime ,ceftriaxone,cefepime ,cefoxitin,Amoxcilin/clavulanic acid ,ceftzidime,

في حين كانت اقل نسبة مقاومة 38% لمضاد Imipene وفيما يخص مضادات البيتالاكتام فقد اظهرت بكتريا ال *p.aeruginosa* مقاومة عالية تجاه هذه المجموعة *(sligh et al* 2006 ,*Hsuch,2005)*حيث كان السبب في ذلك كثرة سوء استخدام هذه المضادات ادت الى ظهور المقاومة.

بالنسبة لمضاد piperacillinفقد كانت المقاومة التي اظهرتها البكتريا تجاهه عالية بلغت نسبتها 69%وقد تعود المقاومة للبنسلينات الى انتاجها لأنزيمات البيتالاكتميز وهذا يتطابق مع ما جاء به (مفتن، 2000)

اما مضاد الAmoxicillin فأظهرت العزلات البكتيرية مقاومة عالية بلغت 100%وهذه النتيجة تتقارب مع نتيجة الشويخ 02000الذي وجد ان نسبة المقاومة لهذا المضاد 90%

اما فيما يخص ال cefotaximeهو من مجموعة السيفالوسبورينات العائدة لمضادات البيتالاكتام فقد كانت المقاومة لهذا المضاد% 100وهذه النتائج تتفق مع ما اشارت اليه (الفتلاوي، 2001) التي وجدت نسبة مقاومة عزلاتهم لهذا المضاد %100لكنها لا تتفق مع نتائج (الجوراني،2001 :الشويخ،2002:والرماحي 2006) كانت نسبة المقاومة قدرها (47.1,10.2,34.6%).

اما فيما يخص مجموعة Aminoglycosidالمتمثلة بمضاد الGentamycinو Torbymycinفقد اظهرت نسبه مقاومه 69.2,61.2ولم تتفق هذه النتائج مع كل من نتائج (حنا،1999) (الصكر،2000) (الجوراني،2002)كانت نسبة مقاومة عزلات لهذه المضاد%(38.7,40,42) على التوالي

ويعود سبب مقاومة البكتريا لمضادات الامينوكلايكوسيدات الى عمل هذه المضادات داخل الخلية البكتيرية اذ تهاجم هذه المضادات البكتريا بخطوتين تتضمن الخطوة الاولى امتصاص الامينوكلايكوسيدات من قبل البكتريا اذ تؤثر عملية الامتصاص على الفعالية البايلوجية والخطوة الثانية ارتباط مضادات الامينوكلايكوسيدات بالرايبوسومات داخل الخلية وبالتالي تثبيط البروتين.

في حين كانت نسبة المقاومة لمضاد الLevofloxacinهي 46.1%وهو مضاد يعود الى الفلوروكويتولون وهذه النتيجة لا تتفق مع النتائج التي توصل اليها (بلال،2010) اذ وجد ان نسبة المقاومة كانت 21.6%

اما مضاد ال Imipenen فقد اظهر نسبة مقاومة قليلة بلغت 38.4% وهذه النتائج مقاربة الى النتائج التي اجرائها (داخل،2015) حيث بين ان نسبة المقاومة لهذا المضاد كانت (34%) في حين لم تتفق هذه النتائج مع الدراسة التي اجريت في الهند من قبل (paranjothin,2010) حيث سجل نسبة مقاومة لهذا المضاد 12.5% وهناك دراسات سجلت نسبة مقاومة (0%) حيث اعتبر هذا المضاد و العلاج الامثل

اما مضاد الAzeteronam فقد اظهر نسبة مقاومة بلغت (69.2%)وهو مضاد يعود الى صنف monobactumوالتي تمتاز بكونها فعالة تجاه البكتريا السالبة حيث كانت هذه النتائج متقاربة الى ما توصل اليه (سالم،2014) اذ وحد نسبة مقاومة البكتريا لهذا المضاد 70% في حين توصل كل من (Du واخرون،2010) و (Tirodimonsواخرون، 2010) بان نسبة المقاومة لمضاد ال Azetronam (22,42.9) على التوالي

اما مضاد ال cefotrixoneفقد اظهر نسبة مقاومة بلغت (100%)حيث كانت هذه النتيجة متقاربة مع نتائج ما توصل اليها (El mosallamyوجماعته، 2015) في مصر حيث كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد 99%

اما مضاد Ciprofloxacin فقد اظهر نسبة مقاومة بلغت 46.1% وتعود المقاومة الضعيفة لهذا المضاد الى تغير في منطقة الهدف او الى زيادة في انظمة الدفق(Jounson *et al*,2005)

في حين كانت نسبة مقاومة عزلات البكتريا لمضاد Amoxcilin_clavicunic acid100% التي مثلت نسبة مقاومة عالية جدا يعتبرهذا المضاد من مضادات البيتالاكتم التعاضدية (اموكسلين_حامض الكلافيولانك) الذي يمتاز بتأثيره الفعال على البكتريا المنتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز وهذه النتيجة تتقارب مع نتائج حران (2012)

اظهرت الدراسة الحالية ان معظم عزلات *ال p.aeruginosa* قيد الدراسة كانت ذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية MDRاذ تعتبر الانواع البكتيرية التي تمتلك هذه الصفة من اكثر الانواع تهديدا للصحة العامة اذ بلغت عدد العزلات المقاومة 7 وكانت النسبة المئوية لها 53.8% ويعود سبب المقاومة المتعددة لبكتريا *ال P.aeruginosa*الى امتلاكها اكثر من اليات مقاومة والتي تشمل الانزيمات المحورة للبيتالاكتميز وانزيمات الامينوكلايكوسيدات وامتلاكها آلية الضخ الخارجي وغيرها من الاليات التي تعمل معا مسببة المقاومة المتعددة للمضادات (shahid and Abid Malik,2005).

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

1. اظهرت الدراسة ان بكتيريا *p.aeruginosa* *مسؤولة عن* حدوث التهابات مرضية مختلفة وبنسب عالية في المستشفيات.

2. اثبت ان هناك عزلات بكتيرية تابعة لل*p.aeruginosa* لها صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية MDRمما يشكل تحديا علاجيا كبيرا.

3. اثبتت العزلات البكتيرية مقاومة عالية للمضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة باستثناء بعض المضادات مثل ciprofloxacin-colistin الذي استجابت لها البكتريا.

التوصيات

1. يجب التشخيص الدقيق لنوع المسبب المرضي الذي ادى الى حدوث المرض واعطائه المضاد المناسب اذ ان عدم التشخيص الدقيق يعد أحد اسباب المقاومة.

2. عدم استخدام المضادات الحيوية بطريقة عفوية وذاتية ودون استشارة الطبيب للحد من مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية.

3. يجب عدم اعطاء المصاب أكثر من مضادين حيويين ذي تأثيرين مختلفين أحدهما يعمل عكس الاخر اي ان أحدهما قاتل للبكتريا والاخر مثبط لان ذلك سوف يؤثر سلبيا على المريض وايجابيا على البكتريا باتجاه المقاومة.

4. يجب القيام بالعديد من الابحاث لتقيم الخصائص الوراثية للبكتريا لمعرفة علاقتها بتكوين الاغشية الخلوية ولتحديد الجينات الرئيسية المسؤولة عن تشكيل الاغشية الخلوية ودارسة مدى تأثير تكوين الاغشية الخلوية واحداث الامراض والبقاء حية في البيئة.

5. استخدام تقنية الشجرة الوراثية للعزلات التي تمتلك مقاومة متعددة للمضادات الحيوية وذلك للكشف عن العزلات التي تحمل جينات مقاومة جديدة على المستوى المحلي والعالمي.

المصادر

REFERENCES

References المصادر

المصادر العربية:

1. اسماعيل، سعيد محمد عوض. 2004 استخلاص وتوصيف انزيم اليوريز من بكتريا المثقبات المعزولة من مرض الخمج المجاري البولية في اليمن اطروحة دكتوراه- كلية العلوم - جامعة المستنصرية.
2. الشافعي، عبير حمودي صبار 2016 انتشار انزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف CTX-MCي بين عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية رسالة ماجستير- كلية علوم -جامعة القادسية.
3. المياحي، فراس سرحان عبد 2002 تقييم كفاءة المضادات الحيوية من مناشئ مختلفة تجاه بعض العزلات البكتيرية المأخوذة من حالات التهابية مختلفة ماجستير علوم حياة /احياء مجهرية- جامعة القادسية.
4. الفحام، سجاد كاظم حسين 2017 دراسة جزيئية مقارنة لحساسية جرثومي p.aerugoinsa and p.mirabilisلعدد من المضادات الحيوية و المستخلصات النباتية ماجستير علوم حياة /احياء مجهرية- جامعة القادسية.
5. المؤيد ،احمد قاسم حسين 2003 دراسة انتشار المقاومة لبعض المضادات B-lactamالحديثة من قبل بعض انواع البكتيريا السالبة لصبغة كرام لدى المرضى سرطان المسالك البولية ماجستير -كلية العلوم – جامعة المستنصرية .
6. حامد، سعد لعيبي 2004 دور بعض انواع البكتيريا في السائل المنوي للمصابين بالعقم ودراسة تاثيرها على معايير النطف واستجابتها لعدد من المواد المضادة للجراثيم اطروحة دكتوراه -كلية العلوم -جامعة المستنصرية.
7. حنا، صفاء تومان. (1999) دراسة عن الجراثيم الهوائية الملوثة لردهات احدى المستشفيات ومقاومتها لمضادات الحياة والمطهرات. رسالة ماجستير. كلية العلوم-جامعة بغداد.

المصادر الاجنبية

- Abdul_wahid,A.A.(2014) Dissemination of Aminoglycoside Resistance in pseudomonas aeruginosa Isolates in Al Nasseriyia Hospital M.SC. Thesis collage of Medicine university of kufa.
- Ali khan J.zafari,Ij saeed v.and kalsoom F.(2008)prevalence and pattem of p.aerugionsa against various antibiotic pak;j pharm-sci;21(3):311-315.
- Anon et---al;2008
- Baron,E.J.and Finegold, S.M(1990).Bailey and scott‘pDiagnostic Microbiology (8th ed) mosby. USA.
- Brown,A.(2007),Benson microbilogyical application laboratory munal in general microbiology. McGraw -Hill co. INC.USA.P:102-263.
- Bauer,A.W;kirby,W.M.M;sherid,J.c;and Truck,M(1966) Antibiotic susceptibility testing by astandardized single disk method AM. J. clin. Pathol,45:493-496.
- Bensor,1998
- Bonnet,Recule,C :Barduc,R:chanal,c,sirot, D;Dechemps,Cand sirot, j(2003) effect of D240Gsustition in anovel ESBL CTX-M-27J,Antimicrob chemo ther52:29-35.
- Cherian,G.p.;mnanjunath,M;pintofereia,L.Mand . (2003).Extended spectrum beta_lactamase production.Entrobacteriacea intertiary care hospital in trinidad and tobago. West india med. J.,52(1):31-33.
- Collee,J.G;fraser ,A.G;marmiom,B.p.and simon, A(1996) mackie and mcCarteny practical medical microbilogy. 4th ed churchill livingstone inc';USA.
- Davey ,M.E.and G.o.o'toole(2000).microbial biofilms:from ecology to molecular genetics. Microbiol ,moll.Biil.Revs.64(4):847-67.
- Hugo .W.B and Russel ,A.D(1983).pharmaceutical microbiology. 3rd ed .Black well scientific publication ox ford, london.

- Jawetz,E,,melnik,;Adelbrg,E.;zBrookG.f;Butel,J.s.
- andMorse, S.A.(2010).medical microbilogy 26th.ed Applenten and lang New york.connctical pp.45-60.

- Gawish,A;mohammed,N;El-shennawy,G.and mohammed ,H(2013) Aninvestigatiin of 3type secretion toxins encoding -gens of psedomonas aerugionsa isolate in auniversity hosptal in Egypt. J.ofmicrob and infec. Dise,3(3):116-122.
- Green wood ,D;slack, R.and peutherer,J.(1998)Medical microbilogy. 15thEd. Churchill Livingston. Inc.
- Kayser,et---al; (2005).
- Koneman,E.W.;Allen,S.D;Janda,W.M.;schreckenberger,P.C.and winn,w.c.(1997).color Atlase and textbook of Diagnostic micro-bilogy ".5th ed,lippincott-Raven publisher,philadelphia.
- Lau,G.W,;Hassett,D.J.;Ran,H.and kong ,.f.(2004)the role of pyocyanin in pseudomonas aeruginosa infaection. Trends in molecular. Medicine,10(12):599-606.
- Lewenza,S.,falsafi,R.k.winsor,G.,Gooderham,W.J.,Mcphee,J.B., Brinkman,F.s.,andHancock, R.E.W.(2005)construction of mini-Tn5-luxCDABEmutant library in pseudomonas aeruginosa PAO1:atool for identifying differentially regulated gene.Genome Res 15 :583-589.
- Live more,D.M.(2012).current Epidemiology and Growing Resistance of gram-negitive pathogens.Korean J.lntern med.27(2);128 142.
- Macfaddin,J.F.(2000).Biochemical test for identification of medical bacteria. 3rd ed. Lippincott williams and wilkins, USA
- Miss,(2008)
- Prescott.l.M;Harley, j.p.and klein,D.A.(1993)microbilogy,.3rd ed W.M.C.Brown communication Inc.Lowa.U.S.A.
- Raka,l.,mulliai-osmani,.;Berisha,l.;Begolli, L.;omeragia,S.;parsons,L.salfinger,M.;Jaka,A;kurti,A.and Jakupi.x.(2004).Etiology m.;Jaka.A.;kurti,A and Jakupi.x(2004).Etiology and susceptibility of urinary tract isolates in kosova.int. J.Antimicrobial agents-(suppll):2-5.
- Tavajjohi,z.,moniri,R and khorshidi,A.(2011)."Detection and characterization of resistaince and extended spectrum B-lactamase producing (ESBL)Pseudonmonas aeruginosa isolatase in ateaching hospital"African J.microbiol Res. 5(20):3223-28.
- Vilate,et---al,(2012)

- WHO,(2000).prevention of hospital -acquired infection. Geneva, switzerland. P.72.
- Winn,W.,Allen,S,;Janda,W,;konem,E.;procop,G;screckenberger,P. and woods, G.(2006).koneman's color Atlas and Textbook of Diaganostic mucrobiology, 6th ed, Lippincott-raven publishers. ,philadelphia, pp:239-270.USA.

Abstract

The aim of the study was to isolate and diagnose the pseudomonas aeruginosa bacteria from burns and to know their resistance to antibiotics. Sixty of the patients who were present and arriving at the Diwaniyah Teaching Hospital, alone, were also collected from Al Hamzah General Hospital for the period from December 2018 to March 2019. (9) Isolates proved to be followed by pseudomonas aeruginosa from Diwaniyah hospital and isolates from Al-Hamzah General Hospital where they were diagnosed with a micrograph, where they were negative, as well as bio-chemical tests.

We then tested the sensitivity of the isolates to know how antibiotic resistance was. We used Diffusion Disk for 20 bacteria antibodies. Some isolates were resistant and some were sensitive. Cefepim, Cefotoxine, Ceftriaxone and Amoxicilin gave the least inhibitory growth. The bacteria were very resistant to bacteria (100%).

While the antiperspirants (Impipen, Ciprofloxacin and Colistin) gave the highest percentage of inhibiting the growth of bacteria (30-30-35)%, which was a low resistance rate.

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education
& Scientific Research

University of Al-Qadissiya
College of Sciences
Department of life Sciences

Isolation and diagnosis of *pseudomonas aeruginosa* bacteria from burns and study of their resistance to certain antibiotics

Search submitted to
Department of Life Sciences / Faculty of Science /
University of Qadisiyah is part of the Requirements for
a Bachelor's Degree in Science in Life Sciences

By

Sarah Naif Tohma

Supervised By

Dr. Firas Sarhan Abd Al- Mayahi

2019 A. D. **1440 A.H.**