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

عزل وتشخيص بكتريا pseudomonas aeruginosa الموجودة في مستشفيات مدينة الحلة

بحث تخرج الى مجلس كلية العلوم ــجامعة القادسية
كجزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس
في علوم الحياة

اعدادالطالبة
رؤى رضا فرحان الرماحي

أشراف الدكتور
فراس سرحان المياحي

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ قَالُواْ سُبحانَكَ لا عِلمَ لَنَا إِلاَّ ما عَلمتَنَا إِنَكَ أَنتَ العَلِيمُ الحَكِيمُ ﴾ .

صدق الله العلي العظيم

سورة البقرة (٣٢)

الاهداء

إلى سَيدي وحَبيبي رسُول الله مُحَمد صلى الله عَليهِ وعَلى آلهِ وصَحبهِ وسَلم .....

إلى أبي الغالي وقُـــــــــــرة عيني .....

إلى أمي الحَبيبة منبع الحنان والمحبة والطيبة .....

إلى النفحات العطرة أخوتي و أخواتي .....

الى رفيق دربي وأملي في الحياة زوجي .....

الى الذين بذلوا كل جهد وعطاء لكي اصل الى هذي اللحظة -----اساتذتي الكرام

إلى من احب العلم وعَلمهُ .... اهدي ثَمرة جُهدي المتواضع .....

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين ، والصلاة والسلام على أشرف الخلق أجمعين أبي القاسم محمد خاتم الأنبياء والمرسلين وآله الطيبين الطاهرين وأصحابه الغر الميامين ...

اتقدم بأسمى ايات الشكر والتقدير والاحترام .....الى مشرفي الفاضل الدكتور فراس سرحان المياحي للمتابعة المستمرة والتوجيهات الدائمة والقيمة طلية فترة اعداد البحث و اتمنى ان يمن الله علية بمزيد من نجاحوالتقدم العلمي وكما تقدم بالشكر والتقدير وامنياتي الطيبة الى منتسبي كلية العلوم وقسم علوم الحياة واخص استاذتي ورئيس قسم علوم الحياة دكتور حبيب وسيل شبر الموسوي لما قدموه لي طلية السنوات السابقة.

عرفان مني ان اتقدم لكل من ساعدني في جمع العينات واجراء الاعمال المختبرية

الخلاصة **Abstract**

استهدفت الدراسة تقيم كفاءة مضادات الحيوية مختبرياً اتجاه بكتريا *P. aeruginosa* الماخوذة من حالات التهاب المسالك البولية في المستشفيات مدينة الحلة للمدة من كانون الاول ٢٠١٨ الى مارس ٢٠١٩ من المرضى المراجعين والوافدين في المستشفى المذكور بأعمار مختلفة لكلا الجنسين وعزلت ٢٠ عزلة من المرضى الراقدين .

استخدمت طريقة انتشار بالاقراص (Disesdiffusion method) لـ ١٥ من مضادات حيوية والمعتمدة على قياس قطر منطقة تثبيط النمو المستعمرات.

اظهرت نتائج الفحص بطريقة الانتشار بالاقراص ان العزلات البكتيرية ابدت مقاومة عالية للمضادات الحياتية المستخدمة في الدراسة باستثناء مضادات Nalidixicacid و Gentamycin و Norfloxacin استجابت له اغلب لعزلات حيث عملت على تثبيط نمو اغلب العزلات في هذة الدراسة.

المقدمة: Introduction

بكتيريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* هي بكتريا سالبة لصبغة كرام اكتشفت عام ١٨٨٢ من قبل الصيدلاني الفرنسي Carle Gressare ، وتعد واحدة من الممرضات الانتهازية opportunistic pathogens والتي تمتلك العديد من عوامل الضراوة و هي سبب مهم في العدوى المكتسبة من المستشفيات كما تعد بكتيريا *P. aeruginosa* عصيات هوائية متحركة تمتلك هدب قطبي وحيد وتعد هذا البكتيرية أكثر الأنواع شيوعا وانتشارا في الطبيعة والمسببة لأمراض كثيره . ويمكن لهذه البكتريا العيش في بيئات خاملة مع متطلبات غذائية قليلة (Farinas and Martinez، ٢٠١٣). اذ لوحظ أن الإصابة ببكتيريا *P aeruginosa*. يصعب علاجها بسبب امتلاكها صفة المقاومة الطبيعية للعديد من المضادات الحيوية (Livermore,2012) (MDR). في العقود الأخيرة كان هناك انتشار عالمي لمقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية ، التي أعلنت حالة الطوارئ و اعتبرتها منظمة الصحة العالمية مشكلة صحية عامة في عام ١٩٩٨. وبالتالي فان الاستخدام المكثف للمضادات الحياتية واسعة الطيف زاد من مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* للعقاقير المستخدمة في العلاج (Peng *et al.*،٢٠١٤)

و تحدث مقاومة بكتيريا *P .aeruginosa* تجاه المضادات الحيوية من خلال اكتسابها عدة آليات متميزة منها تحوير الموقع الهدف للمضاد أو تحرير الأغشية الخارجية، وإنتاج انزيمات البيتالاكتاميز ، وانظمة الدفق الفعالة . وقد تزداد مقاومة البكتيريا للمضادات والسبب يعود الى سوء الاستخدام المضادات الحيوية مثل السيبروفلوكساسين، والبيتالاكتام وامينوكلايكوسيدات وكذلك عدم توافر و ارتفاع تكاليف الأدوية الفعالة الأخرى (Tavajjohi *et al.*، ٢٠١١) و عوامل اخرى ادي أن بكتيريا *P . aeruginosa* ظهور سلالات تمتاز بصفة تعدد المقاومة للعقاقير MDR (Livermore, 2012) في البلدان النامية هنالك عدد كبير من الناس يموتون يوميا بسبب العدوى بهذه البكتيريا او غيرها من الأنواع البكتيرية الأخرى ، وهي واحدة من المشاكل الصحية التي تنتج عن غزو الكائنات المسببة للأمراض في أجزاء مختلفة من الجسم، ، بعضها أمراض يمكن الوقاية منها والتي يمكن علاجها مثل التهابات مسالك البولية (Akingbade ٢٠١٢ *et al*)

الهدف من الدراسة :

١- عزل بكتيريا *P . aeruginosa* من مستشفيات مدينة الحلة

٢- تشخيص بكتيريا *P .aeruginosa* باستخدام وسط المكونكى والاختبارات البايو كيميائية .

٣- التعرف على العزلات المقاومة البكتريا ال *P.aeruginosa* تجاه عدد من المضادات الحيوية

٢-المواد وطرق العمل materials and methods

٢-١ المواد Materials

٢-١-١: الأوساط الزراعية الجاهزة Ready media

جدول (١) الأوساط الزراعية

ت	اسم الوسط الزرعي	
١	وسط اكار ماكونكي	MacConkey ager
٢	وسط المرق المغذي	Nutrient both
٣	وسط اكار نقيع القلب-الدماغ	Brain-heart infusion agar
٤	وسط أحمر المثيل- فوكس بروسكاور	MR/VP broth
٥	وسط اكار مولر . هنتون	Muller- Hinton agar
٦	و سط ماء الببتون	Peptone water
٧	وسط استهلاك السترات	Simons citrate agar
٨	وسط اغار ثلاثي السكريات و الحديد	Trible sugar iron agar

٢-٢-١ : تحضير الاوساط الزرعية culture media

حضرت وعقمت الاوساط الزرعية الجاهزة المذكورة بحسب تعليمات الشركة منتجة المثبتة على العبوات وضبط الاس الهيدروجيني عند ٧ بأذابة ٣٨ غرام /لتر

٢-٢-٢: تعقيم المواد والادوات sterilization of materials and instruments

- عقمت المواد وللاوساط الزرعية المستعملة بأستخدام جهاز الموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة ١٢١م وتحت ضغط ١٥ باوند/انج^{٢} لمدة ٢٠ دقيقة.
- عقمت الادوات الزجاجية والادوات الاخرى التي تحتاج الى تعقيم الجاف بالفرن الكهربائي (Electric Oven) بدرجة ٢٠٠م.

٢-٢-٣: تحضير محلول مكفر لاند القياسي(Mcfarland tube standared)

حضرت من المحاليل الاتية وحسب ما جاء في (٢٠٠٣) NCCLS

أ- محلول كلوريد الباريوم المائي $Bacl_2\ 2H_2O$

حضر المحلول بأذابة ١.١٧٥ غرام في ٥٠ غرام مليلتر من الماء المقطر المعقم وأكمل الحجم الى ١٠٠ مليلتر على تركيز ٠.٠٤٨ مول /لترمن كلوريد الباريوم.

ب- محلول حامض الكبريتك H_2SO4

حضر المحلول بأضافة ١٨ مليلتر من حامض الكبريتك المركز ببطء الى ٥٠ مليلتر من الماء المقطر المعقم ، واكمل الحجم الى ١٠٠ مليلتر للحصول على تركيز ٠.١٨ مول /لتر من H_2SO4 . اضيف ٠.٥ مليلتر من محلول (أ) الى ٩٩.٥ مليلتر من محلول (ب) وعدلت القراءة العكورة القياسية مابين (٠.٠٨-٠.١٠) وحدة تكوين المستعمرات عند طول موجي ٦٢٥ نانوميتر وهذة القراءة تمثل ما يقارب عكورة (١.٥×١٠^{٨}). (Colony forming unit) (CFU) في مليلتر واحدة من البكتريا النامية ، ووزع المحلول في الانابيب اختبار معقمة ذات سدادات محكمة بحجم ٤ مليلتر لكل انبوبة وحفظ في اماكن معقمة بدرجة حرارة الغرفة واستعملت لغرض مقارنة كثافة النمو البكتري في اللقاح المستعمل مع كثافة المحلول في الانبوبة.

٢-٢-٤: جمع العينات **Collection of samples**

جمعت ٣٠ عينة الادرار من الحالات السريرية من المستشفيات مدينة الحلة للمدة من كانون الاول ٢٠١٨ الى مارس ٢٠١٩ من المرضى المراجعين والوافدين في المستشفى المذكور بأعمار مختلفة لكلا الجنسين

٢-٢-٥: عزل البكتريا **Isolation of bacteria**

لغرض عزل البكتريا *P. aeruginosa* لقحت الوسط الزرعي اكار الماكونكي MacConkey ager بمسحات العينات بطريقة التخطيط ثم الحضنت بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ١٨-٢٤ ساعة وحضنت الاطباق التي لم يظهر فيها نمو خلال ٢٤ ساعة لمدة ٢٤ ساعة اخرى قبل عدها نتيجة سالبة.

٢-٢-٦: تشخيص البكتريا **Identification of bacteria**

شخصت المستعمرات البكتيرية النامية اعتماداً على

٢-٢-٦-١الخصائص المظهرية **Phenotypic characteristics**

لوحظت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية اشكالها و لونها و سطح المستعمرات ووجود روائح مميزة لها و قوامها و شفافيتها وتخمر اللاكتوز على وسط اگار الماكونكي. (Winn *et al* ., 2006)

٢-٢-٦-٢ التشخيص المجهري **Microscopic diagnosis**

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

٢-٢-٦-٣ الأختبارات الكيموحيوية **Biochemical tests**

أجريت مجموعة من الإختبارات الكيموحيوية اللازمة لتشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة، وكالأتي:

أ- إختبار الكتاليز :Catalase test

نقل جزء من مستعمرة فتيه بعمر ٢٤ ساعة بوساطة العيدان الخشبية المعقمة إلى شريحة زجاجية نظيفة ومن ثم أضيفت قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين H2O, بتركيز ٣%. وتكون النتيجة موجبة بظهور فقاعات من غاز الأوكسجين (Brown,٢٠٠٧)

ب- إختبار الأوكسيديز Oxidase test

نقل جزء من مستعمرة فتيه بعمر ٢٤ ساعة بوساطة عود خشبي معقم إلى ورقة ترشيح مشبعة بكاشف الأوكسيديز، وأن تكون اللون البنفسجي خلال ١٠ ثوان دليل على إيجابية الإختبار(Brown, 2007)

ج- إختبار قابلية الحركة : Motility test

اجري هذا الإختبار بتلقيح الأنابيب الحاوية على وسط الحركة بطريقة الطعن المحضر باذابة- ٠ . ٥غم من أگار- أگارفي ١٠٠ مل من وسط نقيع القلب - الدماغ السائل بالمزروع البكتيري - وخضن بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة -٢٤ ٤٨، ساعة ، انتشار النمو خارج حدود الطعنة يدل على النتيجة الموجبة (Macfaddin، ٢٠٠٠).

د -تخمر السكريات وانتاج H_2S

لقح السطح المائل لوسط اكار كليكلر بالمزروع البكتيري المراد اختياره بطريقة التخطيط او باستعمال ابرة ناقلة معقمة بطريقة الطعن بقعر الانبوبة ،وبعدها ذات حضنت الانابيب بدرجه حرارة ٣٧ م" لمدة ٢٤ ساعة ، ثم قرأت التغيرات في الدالة الحامضية pH7 في القعر و السطح المائل ولو حظ التخمر بتغير لون كاشف احمر الفينول (Phenol red) إلى الاصفر، و ان تكون الغاز غالبا ما لوحظ على شكل فقاعات أسفل الوسط الصلب والبكتريا المنتجة لـــ H_2S كونت راسب اسودا في قعر الأنبوبة نتيجة تفاعل غاز H_2S مع كبر يتات الحديد الموجودة في الوسط ليكون كبريتيد الحديدوز الأسود اللون إذ كانت النتائج كما يلي : .

* AIk / Alk تعلي عدم تخمر السكريات . .

* Acid / Acid (++) تعنى تخمر السكريات و إنتاج غاز H_2S

* Acid / Acid(- +) تعني تخمر السكريات و إنتاج غاز عدم إنتاج غاز H_2S

*Acid / Acid (- -) تعني تخمر السكريات و عدم إنتاج غاز H_2S

*Acil / Alk (- -) تعني تخمر الكلوكوز فقط و عدم إنتاج غاز H_2S

.(Macfaddin,2000)

و- مجموعة إختبارات LMViC المكونة من

* إختبار إنتاج الأندولIndol production test

استخدم في هذا الإختبار وسط ماء البيتون (Peptone water) الذي أقح بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها، ثم خضنت الأنابيب بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة ١٨- ٢٤ ساعة بعد ذلك أضيفت عدة قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's reagent إلى كل انبوبة مع الرج الجيد وان 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 . mediumبجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها وخضنت بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤- ٤٨ ساعة بعد انتهاء فترة الحضن أضيفت ٥ قطرات من كاشف المثيل الأحمر وسجلت النتيجة الموجبة بظهور اللون الأحمر دلالة على إنتاج الحامض، في حين أن بقاء اللون الأصفر يمثل النتيجة السالبة (Collce *et al*. ,1996).

*إختبار فوكس – بروسكاور Voges - Proskauer test

القحت الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي MR . VP , mediumبجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختيارها ثم خضينت بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ -٤٨ ساعة، بعد ذلك اضيف ١ مليلتر من الكاشف الى كل انبوبة مع التحريك الهادئ ثم ترك ساكناً لمدة ١٠-١٥ دقيقة واستدل على النتيجة بظهور لون الاحمر(Collee *et al*,1996) أضيف ١مليلتر من الكاشف إلى كل انبوية مع التحريك الهادي ثم ترك ساكنة لمدة ١٠-١٥ دقيقة، واستدل على النتيجة الموجية بظهور اللون الأحمر (Collee *et a*l, 1996)

|*اختبار إستهلاك السترات:Citrate utilization test

لقح في هذا الإختبار وسط سيمون ستريت المائل بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها وخضن بدرجة حرارة ٣٧°م لمدة ٢٤ ٤٨ ساعة، واستدل على إيجابية الفحص بتغير وحيد للكاربون (Winn et al.، ٢٠٠٦) لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق دلالة على إستهلاك البكتيريا للسترات على أنه مصدر وحيد للكاربون (Winn *et al*,2006).

٢-٣ تحضير العالق البكتيري Preparation of bacterial suspension

لقح ٥ مليلتر من محلول الملح الفسلجي ب ١-٤ مستعمرة من بكتيريا . *P. aeruginosa* بواسطة المسحة القطنية (swap) مع المزج المستمر للحصول على عالق تركيزه (١.٥*١٠^٨) خلية/ مليلتر وذلك بالمقارنة مع المحلول ثابت العكورة القياسي ذو الرقم(٠.٥).

٢-٤-:حفظ وإدامة العزلات البكتيرية Preservation and Maintenance of Bacterial

أ- الحفظ قصير الأمد

تم تلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتيريا المراد حفظها وحضنت في درجة حرارة ٣٧ مه لمدة ٢٤ ساعة، ثم حفظت بدرجة ٤ م، وكررت عملية الحفظ التجديد حيوية العزلات، وتجنب حدوث التلوث
(Collee *et al*,1996).

ب- الحفظ طويل الأمد

القحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي السائل المدعم بالكليسيرول بتركيز (١٥%) بالبكتيريا قيد الدراسة، وحفظت بدرجة - ٢٠ م (NCCLS,2003)

٢-٢-٥ : إختبار فحص الحساسية **Antibiotic Susceptibility Testing**

اختبرت الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بطريقة الأقراص إعتمادا على طريقة Bauer *et al,* (١٩٦٦) و CLSI (٢٠١٢) ، وتضمنت :
نقل ٢-٤ مستعمرات من بكتيريا *P . aeruginosa* الى انبوب إختبار يحوي ٥مل من مرق تربتون الصويا المغذي وحضنت بدرجة ٣٧ م لمدة ٨ ساعات. خفف النمو الحاصل باستعمال محلول الملح الفسلجي ، تمت مقارنة النمو في الأنبوب مع انبوبة ماكفرلاند (٠.٥) القياسية ، و غمست المسحة القطنية في مرق تربتون الصويا المزروع، وازيل الفائض بالضغط على الجوانب الداخلية للأنبوبة ، نشرت البكتيريا على وسط مولر- هنتون الصلب بطريقة التخطيط الأكثر من مرة ، وباتجاهات مختلفة لغرض التأكد من نشر البكتيريا المراد إختبار حساسيتها بالتساوي ، وتركت الأطباق ١٥ دقيقة في درجة حرارة الغرفة لضمان إمتصاص الرطوبة وضعت أقراص المضادات الحيوية بواقع ١٠ أقراص في طبق قياس ١٥٠ ملي متر، ، والمسافة بين كل قرص وآخر ٢٠ ملي متر من مركز القرص الأول إلى مركز القرص الآخر، خضنت الأطباق في ٣٧ م لمدة ١٨ ساعة لجميع أنواع المضادات الحيوية، ثم قيست أقطار التثبيط باستعمال الفيرنيا وقورنت مع القيم القياسية المذكورة في (٢٠١٦) CLSI .

جدول (٢) اقطار مناطق التثبيط لنمو البكتريا القياسية اتجاه المضادات الحيوية

ت	اسم المضاد	محتوى القرص (مايكروغرام/مل)	البكتريا المستخدمة في الاختبار	Susceptible ≤	Resistance ≥
١	Ampicillin	١٠	Gran-negative entric -Staphlococci - Staphlococci	١٧ ٢٩ ٢٦	١٣ ٢٨ ١٨
٢	Nalidixic acid	٣٠	-Allorganisms	١٩	١٣
٣	Gentamycin	١٠	-Allorganisms	١٥	١٢
٤	Cefotaxime	٣٠	-Staphlococci -Other organisms	٢٨ ٣٢	٢٥ ١٤
٥	Chloramphenicol	٣٠	-Staphlococci -Other organism	٢١ ١٨	٢٠ ١٢
٦	Ceflazidim	٥	-Allorganisms	١٧	١٤
٧	Cefepime	٣٠	Gran-negative entric -Staphlococci	١٧ ٢٨	١٤ ٢٩
٨	Azteroman	٣٠	-Allorganisms	٢٠	١٥
٩	Gentamycin	١٠	Gran-negative entric -Staphlococci	١٤ ٣٠	١٢ ٢٤
١٠	Tobramycin	١٠	-Allorganisms	١٤	١٢
١١	Amikacin	٣٠	-Staphlococci -Other organism	١٦	١٤
١٢	Ciprofloxacin	٥	Gran-negative entric -Staphlococci	٢٠ ٢٢	١٥ ٢١
١٣	Norfloxacin	١٠	-Allorganisms	١٦	١٢
١٤	Ofloxacin	٥	-Allorganisms	١٧	١٤
١٥	Imipenem	١٠	-Staphlococci -Other organism	١٨	١٥

٣: النتائج والمناقشة Results and discussion

P. aeruginosa تعد واحدة من أهم الممرضات المسببة لعدوى المستشفيات Nosocomial infection التي تؤدي إلى ارتفاع نسب وفيات المرضى ونسب الهلاك (Altoparlak *et al.* ،٢٠٠٥) ، و سجلت الدراسة فرقة معنوية في نسب لإصابة بين المرضى المراجعين والوافدين و حسب مصدر العينة في حين لم تسجل فروقاً معنوية بين الذكور والاناث عند مستوى معنوية.

٣-١عزل وتشخيص البكتريا Isolation and Identification

خلال اجراء الاختبارات اعلاه لاحضنا وجود وافراز صبغات بالوان مختلفة، وان العديد من سلالات البكتريا *p.aeruginosa* هي قادرة على انتاج الصبغات . ظهرت أنواع بكتيرية أخرى مختلفة عند عزل بكتيريا *P. aeruginosa* منها بكتيريا سالبة لصبغة كرام ومنها الموجبة للصبغة باضافة الى انه هناك عزلات لم تعطي نمو والتي ظهرت نتائجها السلبية بعدم وجود المستعمرات بعد زراعتها على الأوساط الزرعية وحضنها لمدة ٢٤ ساعة وبدرجة حرارة ٣٧م في الحاضنة ، وقد يعود سبب ذلك إلى كون المريض قد تناول علاجا مسبقا أو أن المسبب المرضي هو فاير وسي أو فطري ولم تتوافر له الظروف المختبرية المناسبة للنمو و سجلت الدراسة فرقاً معنوية في عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* والعزلات السالبة والموجبة لصبغة غرام حسب مصدر جمع العينات.

جدول (٣) الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *p.aeruginosa* المعزولة من العينات السريرية

الاختبار	النتيجة
اختبار الأوكسديز	+
اختبار الكتاليز	+
ختبار الاندول	-
اختبار احمر المثيل	-
اختبار فوكس بروسكاور	-
اختبار استهلاك السترات	+
اختبار استهلاك السكريات الثلاثة وانتاج H2S	k/k-

٣-٢ : 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 أن للعمر و الجنس تاثيرا على الاصابة ببكتيريا *P . aeruginosa* يبين توزيع الحالات المرضية على الفئات العمرية المدونة ضمن بيانات المرضى اذ سجلت أعلى نسبة اصابة ببكتيريا *P. aeruginosa* عند الفئات العمرية (٤٠-٣١) سنة ، والسبب يعود إلى كون هذه الفئات تمثل الفئات العاملة من بين بقية الفئات العمرية. جاءت النتائج مقاربة لما توصل اليه داخل (٢٠١٥) اذا سجل

اعلى نسبة اصابة في الفئات العمرية (٤٠-٣١) ، تليها الفئات العمرية (١٠-١) (١١ - ٢٠) اذ كانت نسبة الإصابة في هذه الاعمار عالية، حيث أن الفئة العمرية (١٠-١) تمثل الفئات العمرية الصغيرة اذ ان الاطفال يتعرضون للاصابة بالجراثيم عند التماس مع بعضهم البعض يعزي الإختلاف في نتائج الدراسة الحالية مع الدراسات الأخرى إلى اختلاف الموسم الذي جمعت فيه العينات ، التدابير الصحية ، واختلاف المرضى ، حيث تزداد النسبة في المرضى الراقدين والذين يعانون أصلا من ضعف في أنظمة الجسم المناعية (DC ٢٠٠١), و سجلت الدراسة فرقة معنوية في الفئات العمرية المذكورة.

٣-٣: حساسية البكتريا للمضادات الحيوية

اختبرت حساسية ٢٠ عزلة من البكتريا *P . aeruginosa* المعزولة من حالات التهاب المسالك البولية ويبن الجدول(٤) المقاومة الكلية للبكتريا.

ت	اسم المضاد	رمز المضاد	عدد العزلات البكتريا المقاومة والنسب
١	Ampicillin	AM	٢٠ (١٠٠)
٢	Nalidixicacid	NA	٤ (٢٠)
٣	Gentamycin	GM	١١ (٥٥)
٤	Cefotaxime	CE	١٨ (٩٠)
٥	Chloramphenicol	C	١٣ (٦٥)
٦	Ceflazidim	CEF	١٠ (٥٠)
٧	Cefepime	CAZ	٨ (٤٠)
٨	Azteroman	AT-ATM	١٦ (٨٠)
٩	Gentamycin	CM-CN	٧ (٣٥)
١٠	Tobramycin	TOB	١٠ (٥٠)
١١	Amikacin	AK	٦ (٣٠)
١٢	Ciprofloxacin	CIP	٨ (٤٠)
١٣	Norfloxacin	NOR	٥ (٢٥)
١٤	Ofloxacin	OFX	١٢(٦٠)
١٥	Imipenem	IMP	٨ (٤٠)

اظهرت العزلات العائدة لبكتريا *P . aeruginosa* أعلى نسب مقاومة (٦٥، ٩٠، ١٠٠) لمضادات ال Chloramphenicol، Ampicillin Cefotaxime على التوالي ، في حين كانت اقل نسب مقاومة (٢٠ ، ٥٥) لمضادي Nalidixic acid و Gentamycin على التوالي .

وفيما يخص مضادات البتالاكتام ، فقد اظهرت بكتريا *P . aeruginosa* مقاومة تامة اتجاة مضاد الـــــAmpicillin واتفقت هذه النتيجة مع نتائج كل من Fekete *et al*(1996)

الذين وجدوا ان نسبة مقاومة عزلاتهم لهذا المضاد ١٠٠% و الدباغ (١٩٩٨) ، العباسي (٢٠٠٠) و الفتلاوي (٢٠٠١) والعابدي (٢٠٠٢) و الشيباني (٢٠٠٤) كانت نسبة لمقاومة لهذا المضاد قدرها (١٠٠ %) ، وكذلك اتفقت هذه نتائج مع نتائج الرماحي (٢٠٠٦) والتي كانت نسبة مقاومة قدرها (١٠٠%) .تعد المقاومة المتعددة لمضادات البتالاكتام من المشاكل الطبية المهمة في العديد من بلدان العالم(Neu,1985) وقد تنتج المقاومة من تناول لهذة المركبات بجرعات غيرصحيحة استخدامها بدون استشارة الطبيب، فضلاً عن عدم الاعتماد على نتائج فحص الحساسية لتحديد المضادات الاكفأ في علاج الحالات السريرية المختلفة كما ان تكرار الاصابة بنفس المسبب المرضي وطول مدة الاقامة في المستشفيات هي احد الاسباب المهمة لظهور المقاومة وجد في دراسة(Talarmin *et al*,1996) التي اجريت على عزلات النمط المصلي(٠١٢) للنوع *P . aeruginosa* ان نسبة المقاومة لمضادات B.lactan,Aminoglycosides كانت عالية حداً بحيث شملت (٢٤) عزلة من من مجموع ٢٥ عزلة.

اما مضاد Chloramphenicol فكانت نسبة مقاومة التي ابدتها البكتريا لهذا المضاد (٦٦%) وجاءت هذة النتيجة اقل من نتائج التي توصل اليها الرماحي (٢٠٠٦) اذ كانت نسبة هي (٨٩.١%) ولم تتفق هذه النتيجة مع ما توصل الية ، الجوراني (٢٠٠١) اذ كانت نسبة مقاومة العزلات(٩٠.٥%) وذكر كل من ياسين (١٩٩٠) الخفاجي (١٩٩٣) و Indubharan و Hag (١٩٩٩) بان بكتريا P . aeruginosa اظهرت مقاومة عالية ضد المضاد Chloramphenicol بنسبة (٩١.٦ و ٨٥.٥ و ٩٦.٦%) وعلى التوالي. كذلك لم تفق مع نتائج كل من العابدي(٢٠٠٠) والعباسي (٢٠٠٠) حيث كانت نسبة مقاومة عزلاتها لهذا المضاد (٣٣ ،٣٣، ٢٨.٥٧%).

اظهرت نتائج ان مقاومة Ceflazidim قد بلغت (٥٠%) بينما Cefepime و Azteroman و Gentamycinو Tobramycin فقد بلغت ٤٠ و٨٠ و٣٥ و٥٠ % وعلى التوالي .

اوضحت الدراسة الحالية ان عزلات بكتريا*PS . aeruginosa* كانت مقاومة للمضادات الحيوية مثل Amikacin وCiprofloxacin و Norfloxacin وOfloxacin وImipenem بلغت ٣٠ و٤٠ و٢٥ و٦٠ و٤٠ % وعلى التوالي.

وفيما يخص الـ Cefotaxime وهو من مجموعة السيفالوسبورينات العائدة لمضادات البيتا لاكتام ، فقد كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد (٩٠ %) وهذه النتائج جاءت مقاربة لما توصل إليه الفتلاوي (٢٠٠١) التي وجدت نسبة مقاومة عزلاتهم لهذا المضاد (١٠٠ %) ، فيما لم تتفق هذه النتائج مع نتائج كل من الدباغ (١٩٩٨) ، العباسي (٢٠٠٠) و العابدي (٢٠٠٢) كانت نسبة مقاومة عزلاتهم لهذا المضاد (٤٠ ، ٥٧، ٥٠ %) على التوالي ، فيما أشارت وكذلك لم تتفق هذه النتائج مع نتائج كل من الجوراني (٢٠٠١) ، الشويخ (٢٠٠٢) والرماحي (٢٠٠٦) كانت نسبة المقاومة قدرها (٣٤.٦ ، ١٠.٢ ، ٤٧.١) و أشارت (Shawar eta ., ١٩٩٩) و (Osoba ١٩٩٧) في دراسة اللهم بان بكتريا *PS . aeruginosa* كانت ذات مقاومة عالية لمضادات البيتا لاكتام . واشارت الأمير (١٩٩٨) أن العقاقير المفضلة للقضاء على بكتريا.aeruginosa. PS هي الــ Cefotaxime و الـ Gentamycin

فيما اوضح حنا (١٩٩٧) آن مضاد السيفوتاكسيم في القضاء على هذه البكتريا بنسبة ١٠٠.%

فيما يخص مجموعة Aminoglycosides المتمثلة بمضاد ال Gentamycin فقد أظهرت نسبة مقاومة قدرها (٥٥ %) وجاءت نتائجنا مقاربة مع نتائج حنا (١٩٩٩) والصكر (٢٠٠٠) و الجوراني (٢٠٠٢) كانت نسبة مقاومة عزلاتهن لهذا المضاد (٤٢.٨ ،٤٠ ،٣٨%) وعلى التوالي.

. فيما لم تتفق هذه النتائج مع نتائج كل من خليل (١٩٨٠) الذي أشار آن مضاد ال Gentamycin هو الأكثر كفاءة في علاج التهابات إذ أظهرت البكتريا نسبة مقاومة لهذا المضاد (2.6%) والرماحي

(٢٠٠٦) التي كانت نسبة مقاومة عزلاتها لهذا المضاد (٩.٤ %) وتوصل (١٩٨٨)Talib & Habib AL- بان نسبة مقاومة (١٥٩) عزلة الـ *PS . aeruginosa* للمضاد نفسه (26.7%) واثبت ياسين (١٩٩٠) مقاومة *PS . aeruginosa* الواطئة لل Gentamycinوبين (١٩٩٥), Oyeka *et al* المقاومة الواطئة التي أبدتها العزلات البكتيرية المعزولة التي تعود الل . *P . aeruginosa* واثبت الأمير (١٩٩٨) مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* الواطئة اللـ Gentamycin- ووصفه عقارا مفضلا في القضاء على هذه البكتريا وفي دراسات أخرى وجد كل من (١٩٩٤) ؛ Lorente et al و (١٩٩٨) AL- Faris *et al,*والشويخ (٢٠٠٢) .

وفيما يخص مجموعة Quinolones فقد ابدت البكتريا مقاومة قدرها (٢٠%) اتجاه مضاد Nalidixic acid . وجاءت هذه النتائج اعلى من نتائج كل من العباسي(٢٠٠٠) والعابدي (٢٠٠٢) وكانت نسبة المقاومة (١٤.٢٨ و١٦.٦٦%) . ولم تتفق هذه نتائج مع نتائج كل من (1992),preston *et al* الذين اثبتو مقاومة لهذا المضاد قدرها (٩٢.٧%).لعل من اسباب المقامة العالية لبكتريا*PS . aeruginosa* لمعظم مضادات الحيوية لامتلاكها العديد من اليات المقاومة اهما:

١- احتواء جدارها الخلوي على بروتين خاص يتميز بقدرة على تحرير مختلف مضادات الحياة الى خارج الخلية البكترية بسرعة مساوية لسرعة دخولها. مما يؤدي الى بقاء تركيز المضاد داخل الخلية غير كاف للقضاء عليها (James,1999).
٢- امتلاكها لبلازميدات المقاومة R-Plasmid التي تكسبها صفة المقاومة للعديد من مضادات الحياة (James,1999).
٣- تنتج بعض السلالات منها انزيمات معينة وظيفتها الرئيسية تحطيم مضادات الحياة.
٤- امتلاك بعض سلالاتها اليات اخرى تمنع نفاذ المضادات الى داخل الخلية (Brokopp & Fanner, 1979)

الاستنتاجات:

١. اظهرا الدراسة انه بكتريا *P . aeruginosa* مسؤاله عن اخماج التهابية مختلفة في مستشفيات مدينة الحلة.

٢- أبدت العزلات البكتيرية مقاومة عالية للمضادات الحياتية المستخدمة في الدراسة باستثناء مضادات Nalidixicacid وGentamycin و Norfloxacin استجابت له اغلب لعزلات.

التوصيات **Recommendations**

١- عدم الاستخدام العشوائي لمضادات دون استشارة الطبيب المختص وعدم استخدام مضادين مختلفين في مقاومتهم لبكتريا احدهم قاتل والاخر مثبط
٢- اجراء المزيد من الدراسات لهذا البكتريا المتطبعة والمقاومة الكثير من المضادات وخصوصا أن هذا البكتريا مسببه التهابات مختلفة
٣- ضرورة اجراء المسح الدوري للمستشفيات المعرفة و تحديد مصادر التلوث البكتيري ومعرفة مستويات المقاومة للمضادات الحيوية

المصادر العربية :

•الامير ، لينا عبد الكريم عبد الرزاق.(١٩٩٨). دراسة جزئية لعوامل الضراوة في بكتريا (Pseudomonas aeruginosa) .اطروحة دكتوراه كلية العلوم –جامعة بغداد.

الجوراني ، ماجد غازي مكطوف .(٢٠٠١). دراسة بعض الجوانب المناعية والبكترولوجية للمصابين بالتهاب الاذن الوسطى في مدينة التاصرية.رسالة ماجستير.كلية العلوم –جامعة المستنصرية.

حنا ، صفاء توما (١٩٩٩) ، دراسة عن الجرائم الهوائية الملوثة لردهات إحدى المستشفيات و مقاومتها لمضادات الحياة والمطهرات ، رسالة ماجسار . كلية العلوم – جامعة بغداد

الخفاجي ، فراس حمود ، (١٩٩٣) ، دراسة سريرية وحياتية لالتهاب الأذن الوسطى القيحي المزمل ، رسالة ماجستير رسالة مقدمة الى كلية الطب وهيئة الدراسات العليا في جامعة بغداد

خليل، هيثم محمد . (١٩٨٠) ، انواع الجراثيم المسببة لالتهاب الأذن الوسطى في الأعمار المختلفة في الموصل، وحواليها . رسالة ماجستير ، كلية الطب - جامعة الموصل

الدباغ ، نبراس نصر الله ، (١٩٩٨) عزل وتلخيص العزلات البرية المسببة لالتهابات المجاري البولية لدى اطفال محافظة بابل ، أطروحة ماجستير ، كلية العلوم - جامعة بابل .

الرماحي، سيوف خومان علوان . (٢٠٠٦) ، دراسة بكتيرية و مناعية على مرضى خمج | الاذن في محافظة القادسية ، اطروحة دكتوراه كلية التربية - جامعة القادسية .

الشيباني ، انتصار ناظم خلخال . (٢٠٠٤) . دراسة بكتريولوجية للأنواع التابعة لمجموعة | Pseudomonas المعزولة من المستشفيات في بغداد و تاثير بعض العوامل عليها و رسالة دكتوراه ، كلية العلوم - الجامعة المستنصرية .

الشويخ، رنا مجاهد عبد الله . (٢٠٠٢) ، عزل وشخوص بعض أنواع البكتريا المسببة التهاب الأذن الوسطى المزامن مع دراسة جزئية لبعض أنواعها . رسالة ماجستير . كلية العلوم - جامعة المستنصرية .

الصكر ، زرياب قاسم ، (٢٠٠٠). دراسة عن بعض البكتريا الهوائية المقاومه المصادر للمضادات الحيوية المعزولة من المرضى المصابين بالتهاب الأذن الوسطى ، رسالة ماجستر ، كلية العلوم - جامعة بغداد .

| العباسي ، انعام جواد مطرود. (٢٠٠٠) . دراسة لخمج المسالك البولية البكتيري لدى أطفال محافظة النجف ، أطروحة ماجستير ، كلية القات التربية للبنات - جامعة الكوفة .

العابدي ، هتف مهدي كاظم . (٢٠٠٢) . عزل وتشخيص البكتريا الهوائية المشاركة في خمج السبيل البولي لأطفال مدينة الديوانية وحساسيتها لبعض مضادات الحية . رسالة ماجستير . كلية التربية - جامعة القادسية.

المصادر الاجنبية:

• Akingbade, O. A.; Balogun, S. A.; Ojo, D. A.; Afolabi, R. O.; Motayo, B. O.; Okerentugba, P. O. and Okonko, L.O.(2012). Plasmia profile analysis of multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from wound infections in South West, Nigeria. World Appli Sci J, 20(6):766 775.

• AL - Faris, E. A: Abdulghani. H.: Mukdomi .G.J.; Kambal . A. and AL-Muhaimeed. H.S. (1998) : Microbiology and antimicrobial sensitivity of supprative otitis media Saudi Medical Journal – 19(4):417-422

• AL.Talib & Habib. H.M. (1988). Pseudomonas aeruginosa Isolated from types of infectionsits sensitivity to antibiotic - Journal of faculty of medicin mouse . 14(2) December 31

• Altoparlak, U., Aktas, F., Celebi, D., Ozkurt, Z. & Akcay, M. N. (2005). Prevalence of metallo-beta-lactamase among Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. Burns 31, 707-710.

• Brokopp. C.D. and Farmer, J.J. III. (1979). Typing methods for Pseudomonas aeruginosa in " Clinical manifestation of infection and current therapy" (ed) R. G.Doggett Academic press . New York. San Fransisco, London.

• Brown, A. (2007). Bensons Microbiological application laboratory manual in general microbiology. McGraw-Hill Co.INC. USA P:102 -263.

• Brown, 2005(Application microbiology)

• Collee,J .G Fraser, A.G ; Marmion. B.P & simmon. A.S. .(١٩٩٦) .Practical medical microbiology -- churchill living stone

• Fekete.J. Tumah, W .J ;Satish ,C.V; Truant A & Axelrod. (1996). Comparative susceptibility of Klebsiella sp, Enterobacter sp. and Pseudomonas aeruginosa to antimicrobial agent sin antertiary – care university hospital. Am J Med., 100(6A): 205 - 255. •

• Indudharan, R. and Hag , L.A. (1999) use of Preduced swabs in bacteriology of CSOM The - J -of Lary and and 0 to 1.110: 950 - 951.

•James, J. (1999). The mechanisms and the spread of antibiotic resistance Pediater. Annl.28(7): 446 - 452.

• Livermore, D.M.(2012). Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. Korean J.Intern Med.27(2): 128 142.

• Lorente, J.Sabater, F.Maristany, M.; Jimenez, R.; Menem, J.; Vinas, J.: Quesada, P. Traserra, J.: Dicenta, M.; Abello, P. and Villar, E. (1994). Multicentre study comparing the efficacy and tolerance of topical ciprofloxacin (0.3 %) verustopical gentamicin (0.3 %) in the treatment of simple non - choleste atomatous Chronicotitis media in the suppurative phase - An. Otorinolaringol Lbero. Am. 2275): 521 – 533.

• MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA

• **NCCLS** (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2003). Performance standards for disks susceptibility testing; approved standard, 6th ed. PP: 100-113, Wayne, Pannsylvannia, USA.

• Osoba, A.O. (1997). Antimicrobialsusceptibility pattern of gram negative acrobic isolates from intensivecare units in Sounds Arabia Amuticenter study. Saudi Medical Journal. 18 (5) - 471 - 475.

• Oyaka , CA- : Okeke, G.N. (1995) Prevalence of bacterial Otitis media in primary school children in Enugu Surburb, Enugu state, Nigeria. West. Afr.J. Med. 14(2): 78-81.

• **Peng**, Y.;Bi, J.;Shi, J.;Li, Y.; Ye, X.; and Chen, X.(2014). Multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa infections pose growing threat to health care-associated infection control in the hospitals of Southern China:a casecontrolsurveillancestudy. Am. J.Infect.Control 42, 1308-1311.

• Preston, C.A.K : Bruce , A.W. and Reid G. (1992): Antibiotic resistance of urinary pathogens isolated from patientsattending the Toronto hospital between 1986 and 1990. J. Hosp. Infect. 22: 129 - 135.

• Shawer . R - M - ; Macleod, D.L. : Garber, R. L.; Burns, J.L:. Stapp.J.R.; Clausen, C. R. and Tanaka, S.K. (1999). Activities of Tobramycin and six other antibiotics against Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cysticfibrosis

• Talarmin, A ; Dubrous , P : Gerome, P and Buisson, Y. (1996): study of Pseudomonas aeruginosa serotype 012 isolates with acommonantibioticsus ceptibility pattern, Eur. J. Clin - Microbial - infect - Dis - 15(6):459 - 64.

• Tavajjohi, Z., Moniri, R. and Khorshidi, A. (2011). "Detection and characterization of resistance and extended spectrum ß-lactamase producing (ESBL) Pseudomonas aeruginosa isolates in a teaching hospital". African J. Microbiol Res. 5(20): 3223-28.

• **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.